

# 酶法提取苦荞 D-手性肌醇及体外降糖活性

田晓艳<sup>1</sup>, 白晓琳<sup>1</sup>, 王振宇<sup>2</sup>, 张大千<sup>1</sup>, 樊梓鸾<sup>1,3\*</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 哈尔滨工业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

(3. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 该实验以苦荞籽粒为研究对象, 使用酶辅助超声法提取 D-手性肌醇 (D-Chiro Inositol, DCI)。考察了 pH 值、酶解温度、酶解时间、加酶量、料液比、乙醇体积分数对 DCI 浓度的影响, 并在此基础上, 采用响应面设计优化了 DCI 最佳提取工艺。结果显示: 酶解最佳 pH 值为 6, 酶解温度为 36.4 °C, 酶解时间为 0.5 h, 加酶量为 2.1%, 料液比为 1:10, 乙醇体积分数为 48% 时, DCI 浓度为 5.87 mmol/L。进一步利用  $\alpha$ -淀粉酶及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶两项指标评价提取物纯化前后的体外降糖能力。采用活性炭、固相萃取离子小柱纯化 DCI, 结果显示阴离子 (SAX) 固相萃取小柱纯化效果最好, 能够将纯度提高 80%。苦荞中 DCI 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的半抑制质量浓度 (50% Inhibitory Concentration, IC<sub>50</sub>) 降低, IC<sub>50</sub> 值由 0.68 mg/mL 降到 0.47 mg/mL, 表明纯化效果显著。采用  $\alpha$ -半乳糖苷酶辅助超声法可以有效的获得高浓度 DCI, 并证实纯化后的 DCI 具有较好的体外降糖活性。通过该项目的研究为苦荞的综合开发利用提供理论参考。

**关键词:** D-手性肌醇 (DCI);  $\alpha$ -半乳糖苷酶; 降糖活性; 苦荞

文章编号: 1673-9078(2023)05-32-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0663

## Enzymatic Extraction of D-chiro-inositol in Tartary Buckwheat and Its *in Vitro* Hypoglycemic Activity

TIAN Xiaoyan<sup>1</sup>, BAI Xiaolin<sup>1</sup>, WANG Zhenyu<sup>2</sup>, ZHANG Daqian<sup>1</sup>, FAN Ziluan<sup>1,3\*</sup>

(1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2.College of Food Science, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

(3.Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Using Tartary buckwheat grains as the research object, D-chiro-inositol (DCI) was extracted via an enzyme-assisted ultrasonic method. The effects of pH, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, enzyme concentration, solid-liquid ratio, and ethanol concentration on DCI concentration were investigated, and the extraction process of DCI was optimized using response surface methodology. The optimal enzymatic hydrolysis pH was 6, enzymatic hydrolysis temperature was 36.4 °C, enzymatic hydrolysis time was 0.5 h, enzyme concentration was 2.1%, solid-liquid ratio was 1:10, and ethanol concentration was 48%; as such, DCI concentration measured under these conditions was 5.87 mmol/L. Further, the *in vitro* hypoglycemic activity of the extract before and after purification was evaluated using  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. DCI was purified with activate carbon and a solid-phase extraction cartridge. Anion (SAX) solid-phase extraction cartridge produced the best purification effect, increasing the purity by 80%. The 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of DCI on  $\alpha$ -glucosidase in Tartary buckwheat decreased from 0.675 to 0.472 mg/mL, indicating a significant purification effect. The proposed  $\alpha$ -galactosidase-assisted ultrasound method effectively produced a high concentration of DCI, and the purified DCI showed excellent *in vitro* hypoglycemic activity. These findings provide a theoretical reference for the comprehensive development and utilization of Tartary buckwheat.

引文格式:

田晓艳,白晓琳,樊梓鸾,等.酶法提取苦荞 D-手性肌醇及体外降糖活性[J].现代食品科技,2023,39(5):32-40.

TIAN Xiaoyan, BAI Xiaolin, FAN Ziluan, et al. Enzymatic extraction of D-chiro-inositol in tartary buckwheat and its *in vitro* hypoglycemic activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 32-40.

收稿日期: 2022-05-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31170510); 黑龙江省大学生创新训练项目 (202110225278); 黑龙江省科学自然基金项目 (JJ2020LH1480); 中央高校科学前沿与交叉学科创新基金项目 (2572019BA09); 黑龙江省高等教育教学改革项目 (SJGY20200018); 中国博士后科学基金 (2016M600239)

作者简介: 田晓艳 (1998-), 学士, 研究方向: 植物活性成分功能, E-mail: 2642883465@qq.com

通讯作者: 樊梓鸾 (1981-), 博士后, 副教授, 研究方向: 天然产物分离纯化及功能活性评价, E-mail: fzl\_1122@163.com

**Key words:** D-chiro inositol;  $\alpha$ -galactosidase; hypoglycemic activity; Tartary buckwheat

D-手性肌醇 (D-Chiro Inositol, DCI), 白色粉末, 易溶于水, 微溶于乙醇、甲醇等有机溶剂, 是肌醇 9 种异构体<sup>[1]</sup>中具有旋光性的一种, 也是维生素 B8 的生物活性异构体<sup>[2]</sup>, 以相对高的水平存在于荞麦种子、大豆等植物以及部分昆虫中<sup>[3]</sup>, 多以甲基化或糖基化衍生物的形式存在, 是荞麦糖醇的生物降解产物<sup>[4]</sup>; 具有胰岛素增敏作用和促进肝脏脂肪代谢功能, 能明显降低血糖含量, 对糖尿病有显著治疗效果<sup>[5]</sup>。此外, DCI 还具有改善多囊卵巢综合征 (Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS)<sup>[6]</sup>、抗氧化、抗衰老、清除自由基等作用, 具有良好的利用价值<sup>[7]</sup>。然而, 目前 DCI 以化学合成为主, 转化步骤单一化, 转化工艺复杂、成本高、副产物多。因此, 如何能经济简便地从天然产物中高效分离提取和制备 DCI 成为该领域的一个主攻方向。

苦荞麦, 俗称苦荞<sup>[8]</sup> (*Fagopyrum esculentum* Moench), 属于蓼科 (Polygonaceae) 荞麦属 (*Fagopyrum*) 的双子叶作物<sup>[9]</sup>, 也是一种高产<sup>[10]</sup>的粮药兼用珍贵作物资源<sup>[11]</sup>; 富含多种营养成分, 如生物类黄酮、优质蛋白质、不饱和脂肪酸、膳食纤维等<sup>[12]</sup>。同时, 还含有肌醇类活性物质, 特别是在植物资源中很难发现的 DCI。研究表明, 萌发处理能够降低荞麦植酸含量, 提高磷、钙、铁、锌等矿质元素的吸收利用率; 提升荞麦脂肪酸的营养价值, 提高荞麦中  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -Aminobutyric Acid, GABA) 和 DCI 含量<sup>[9]</sup>。荞麦籽粒经萌芽处理后, DCI 单体含量提高 8 倍左右<sup>[13]</sup>, 原因在于, 苦荞麦种子萌芽以后, 能够释放  $\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -Galactosidase,  $\alpha$ -Gal, EC 3.2.1.22), 该酶可切断 DCI 糖醇类衍生物中的糖苷键, 释放单体物质, 从而增加 DCI 的含量<sup>[14]</sup>。然而, 萌发过程中, 光照、温度、湿度、pH 值等诸多因素对于 DCI 含量有不同程度的影响, 存在着巨大的不确定性, 且周期较长。因此, 本实验采用  $\alpha$ -半乳糖苷酶<sup>[15]</sup>辅助超声法提取 DCI 提高其产率, 降低提取成本, 缩短周期, 提高降糖<sup>[16]</sup>活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苦荞 (*Fagopyrum esculentum* Moench) 来源于四川凉山。

D-手性肌醇标准品 (纯度  $\geq 98\%$ )、 $\alpha$ -淀粉酶 (来源于米曲霉)、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (来源于黑曲霉), 上海源叶生物科技有限公司;  $\alpha$ -半乳糖苷酶 (来源于黑曲霉), 北京博奥拓达科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

982S 紫外分光光度计、PHS-26 数显 pH 计, 上海精密仪器有限公司; KQ-300DE 数控超声波清洗器, 昆明市超声仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发器、SHB-3 真空泵循环水系统, 上海亚荣生化仪器厂; FW100 高速万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; TDL-5 离心机, 上海科兴仪器有限公司; DK-512 电热恒温水浴锅, 上海森信试验仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DCI 标准曲线的绘制

参考胡园园等<sup>[11]</sup>的标准曲线制作方法, 采用高碘酸钠氧化法测定 DCI 含量, 并对其稍做修改: 称取适量的标准品 DCI, 配得终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mmol/L 的 DCI 水溶液, 各取标样 2 mL 分别加入 4 mL, pH 值 4.5 的醋酸钠缓冲液和 1.2 mL, 0.1 mmol/L 的高碘酸钠溶液; 以 2 mL 蒸馏水, 4 mL pH 值 4.5 的醋酸钠缓冲液和 1.2 mL 0.1 mmol/L 的高碘酸钠溶液作为参比; 于 260 nm 测定吸光值。以吸光值为纵坐标, 以 DCI 的浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

#### 1.3.2 半乳糖苷酶辅助超声波提取的工艺优化

表 1 单因素与水平设计

Table 1 Single factors and horizontal design

因素	pH 值	酶解温度/°C	酶解时间/h	加酶量/%	乙醇体积分数/%	料液比 (m/V)
1	3	20	0.5	1	30	1:10
2	4	30	1.0	2	40	1:15
3	5	40	1.5	3	50	1:20
4	6	50	2.0	4	60	1:25
5	7	60	2.5	5	70	1:30

苦荞中 DCI 的提取: 将一定量的苦荞籽粒原料置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重, 以间歇式高速粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 样品袋封存于干燥器中放置备用。

准确称取粉末 5.0 g 于烧杯中, 按一定料液比加入蒸馏水, 调节 pH 值, 加入半乳糖苷酶, 常温下酶解, 酶解后加入等体积的无水乙醇, 然后置于 50 °C 恒温水浴超声 (功率为 150 W) 振荡提取 0.5 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测定其含量。单因素各水平请详见表 1。

### 1.3.3 响应面优化设计

根据 1.3.2 单因素的结果, 以 DCI 浓度为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合设计加酶量 (A)、乙醇体积分数 (B)、酶解温度 (C) 三因素三水平响应面分析试验。实验设计如表 1。使用模型的 ANOVA 和 3D 表面图来分析实验和预测数据以确定模型的准确性, 以获得最佳提取过程和预测值的响应变量。水平设计如表 2。

表 2 响应面分析法因素与水平设计

Table 2 Response surface analysis factor and horizontal design

因素	A 加酶量/%	B 乙醇体积分数/%	C 酶解温度/°C
-1	1	40	20
0	2	50	30
1	3	60	40

### 1.3.4 固相萃取小柱纯化 (SPE)

(1) 活化/调节/老化: 用 5 mL 去离子水/低离子强度缓冲溶液 (0.001~0.01 mol/L) 冲洗填料。

(2) 上样: 将样品加入到填充床上, 以 1~2 mL/min 的速度推过填料。

(3) 冲洗: 所需样品被保留, 则使用去离子水/低离子强度缓冲溶液将弱保留的干扰物冲洗下来。

(4) 洗脱: 使用 5 mL 的高浓度盐溶液 (0.1~0.5 mol/L) 洗脱所需化合物或改变洗脱缓冲液的酸碱度, 使得样品化合物不再离子化, 收集样品用于分析。

本实验选用 100 mg/mL 的 SPE 阴阳离子小柱进行纯化, 缓冲溶液分别为 0.01 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L NaCl。

$$P = \frac{N \times c \times v / 1000 \times 180.16}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$P$ —纯度, %;

$N$ —稀释倍数;

$c$ —DCI 浓度, mmol/L;

$v$ —溶液体积, L;

$m$ —干物质质量, g。

样品中 DCI 含量计算公式:

$$X = \frac{C \times V \times n}{M \times 1000} \times 100 \quad (2)$$

式中:

$X$ —样品中 DCI 含量, g/100 g;

$V$ —样品定容体积,  $V=2.00$  mL;

$C$ —从曲线上查出的样品溶液中待测物质浓度, mg/mL;

$M$ —称取样品质量, g;

$n$ —稀释倍数,  $n=1$ 。

### 1.3.5 高效液相色谱法分析

将 DCI 标品和纯化前后样品溶于  $\varphi=70\%$  的乙腈水溶液中, 使其浓度分别为 0.18 mg/mL 和 1.8 mg/mL, 然后用水系 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 取滤液备用。使用岛津公司 HPLC 仪, 过酰胺柱 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m), 示差折光检测器测定, 样品用  $\varphi=81\%$  的乙腈溶液洗脱, 进样量为 20  $\mu$ L, 体积流量设置为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 在波长为 512 nm 下检测。

### 1.3.6 对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制率

参考文献<sup>[18]</sup>稍作修改, 在试管中依次加入 200  $\mu$ L 不同浓度纯化前后样品溶液和 20  $\mu$ L 20 U/mg  $\alpha$ -淀粉酶溶液, 于 37 °C 恒温 20 min, 然后加入 200  $\mu$ L 0.5% 淀粉溶液, 37 °C 反应 15 min, 加入 300  $\mu$ L 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS) 溶液终止反应, 沸水浴放置 10 min, 冷却, 稀释后各取 200  $\mu$ L 于 96 孔板中, 用酶标仪在 540 nm 波长下测定吸光值。实验以 DCI 标品为阳性对照, 计算抑制率。

$$R_1 = \left( 1 - \frac{A_3 - A_2}{A_1} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

$R_1$ —对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制率, %;

$A_3$ —加样品及酶的样液在 540 nm 波长下的吸光值;

$A_2$ —不加酶的样品空白对照在 540 nm 波长下的吸光值;

$A_1$ —不加样品的空白对照在 540 nm 波长下的吸光值。

### 1.3.7 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率

参考文献<sup>[19]</sup>适当调整, 在 96 孔板中依次加入 100  $\mu$ L 不同浓度纯化前后样品溶液和 20  $\mu$ L 0.125 U/mL  $\alpha$ -葡萄糖苷酶溶液, 于 37 °C 恒温箱中放置 20 min, 然后加入 20  $\mu$ L 2.5 mmol/L 对硝基苯- $\alpha$ -D-葡萄糖吡喃苷溶液 (4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Glucopyranoside, PNPG) 底物溶液, 37 °C 温度下反应 20 min 后, 加入 100  $\mu$ L 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液终止反应, 用酶标仪在 405 nm 波长下测定吸光值。实验以 DCI 标品为阳性对照, 步骤同上, 计算抑制率。

$$R_2 = \left( 1 - \frac{A_6 - A_5}{A_4} \right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$R_2$ ——对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率, %;

$A_6$ ——加样品及酶的样液在405 nm波长下的吸光值;

$A_5$ ——不加酶的样品空白对照在405 nm波长下的吸光值;

$A_4$ ——不加样品的空白对照在405 nm波长下的吸光值。

## 1.4 数据分析

所有实验数据均为3次重复, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 Microsoft Office Excel 2007、Origin 11.0、Design-Expert 8.0.6.1、SPSS 21.0、Calculus Demo 软件进行数据处理工作。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果分析

#### 2.1.1 pH对DCI浓度的影响

根据标准曲线回归方程:  $y=0.9378x-0.056$ ,  $R^2=0.9991$ , 计算不同pH值对DCI浓度的影响, 如图1。

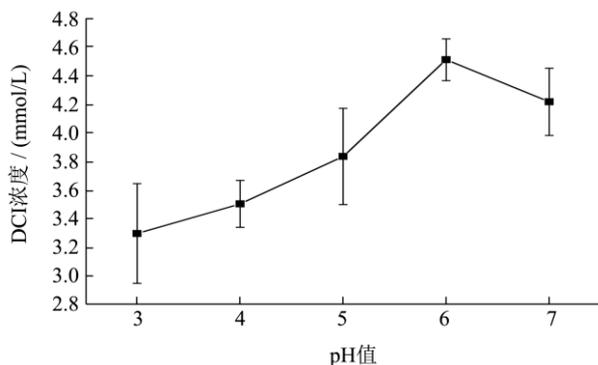


图1 pH值对DCI浓度的影响

Fig.1 Effect of pH value on DCI concentration

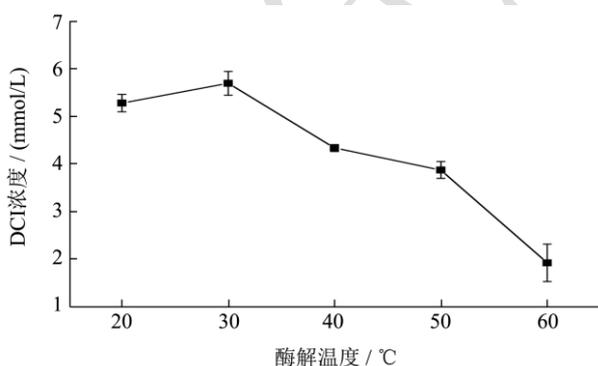


图2 酶解温度对DCI浓度的影响

Fig.2 Effect of enzymatic temperatures on DCI concentration

$\alpha$ -半乳糖苷酶广泛存在于植物种子、果实、叶子和块茎中, 在动物和微生物中也有分布, 来源不同的酶具有不同的特性, 如酶的最适pH值、最适温度、动力学常数  $K_m$  等。从图1可知, pH值在3~6时随着pH值的增加, DCI浓度呈上升趋势, 在6~7时呈

下降趋势。pH值6, DCI浓度最大, 为4.51 mmol/L。因此, 选择pH值为6最佳。

#### 2.1.2 酶解温度对DCI浓度的影响

从图2看出, 酶解温度在20~30°C时, DCI浓度随温度的升高而上升; 而在30~60°C时, DCI浓度随温度的升高而下降。本实验采用的 $\alpha$ -半乳糖苷酶来自黑曲霉, 属于糖苷水解酶, 是催化 $\alpha$ -半乳糖苷键水的一种外切糖苷酶, 对温度和pH值比较敏感, 说明温度过高时可能破坏了 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性, 致使其无法发挥作用导致DCI含量的降低。酶解温度在30°C时, DCI浓度最大, 为5.71 mmol/L。即在酶解温度为30°C时, 提取效果最好。不同种类的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的最适温度也不同, 细菌 $\alpha$ -半乳糖苷酶嗜热性更好, 如 *T. thermophilus* HB27  $\alpha$ -半乳糖苷酶最适温度可达90°C; 而真菌 $\alpha$ -半乳糖苷酶最适温度一般不超过50°C<sup>[15]</sup>。本试验证实 $\alpha$ -半乳糖苷酶提取DCI的最适温度为30°C, 此结果与“荞麦中D-手性肌醇分离提取与纯化研究”<sup>[19]</sup>一文中所确定的提取温度一致。

#### 2.1.3 酶解时间对DCI浓度的影响

图3表明, 0.25~0.5 h内随着酶解时间的延长, DCI浓度升高, 说明随着时间的延长, 酶缓慢与底物接触, 不断释放DCI单体溶出; 0.5 h, DCI浓度达到最高值, 证实酶充分与底物接触, 酶解完全, DCI单体完全溶出; 时间再增加, DCI浓度趋于平缓, 可能是由于苦荞籽粒中的其他成分在水中溶出, 改变了酶的最适条件(如pH值等); 有研究表明,  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性在25~55°C的温度下能保持至少30 min<sup>[20]</sup>, 时间过长酶可能失活。酶解0.5 h可使DCI浓度最大, 时间较短效率较高。因此, 选择0.5 h作为最终确定的酶解时间。

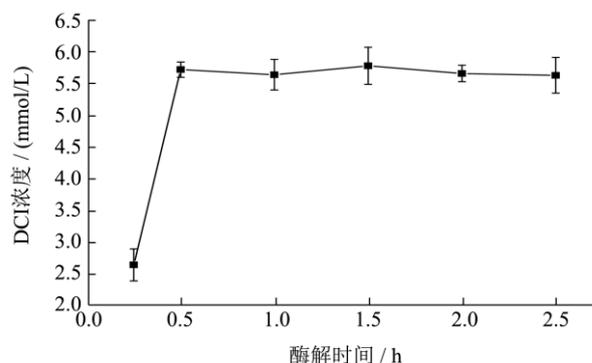


图3 酶解时间对DCI浓度的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis times on DCI concentration

#### 2.1.4 加酶量对DCI浓度的影响

酶浓度和底物浓度对酶促反应影响较大, 图4表示了1%~5%不同加酶量的DCI浓度, 随着加酶量的

增加, DCI 浓度逐渐增加, 加酶量在 2% 时 DCI 浓度最大, 为 5.80 mmol/L, 此时提取率最高; 加酶量再升高, DCI 浓度无显著增加, 表明 2% 的加酶量已经达到与底物的充分结合, 酶过多达到 3%~5%, DCI 的溶出并没有明显的增加。有研究显示<sup>[22]</sup>, 用半乳糖苷酶解豆浆中的大豆寡糖, 用量为 1.23%, 与此结果较为接近。故选择 2% 的加酶量最为合适。

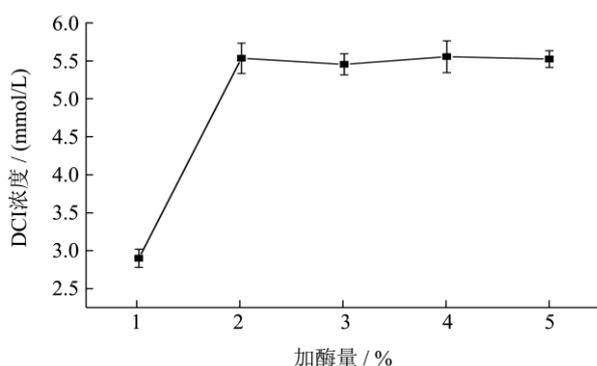


图 4 加酶量对 DCI 浓度的影响

Fig.4 Effect of enzyme dosages on DCI concentration

### 2.1.5 料液比对 DCI 浓度的影响

如图 5 所示, 在固体物料一定的情况下, 随着提取溶剂的增多, 提取率呈上升趋势, 但上升趋势较为平缓; 其中在 1:30 的料液比条件下, DCI 的溶出基本已达极限, DCI 浓度基本稳定在 5.75 mmol/L。与料液比为 1:10 时的 5.45 mmol/L 相比, 差别不明显。结合图像、经济因素与实际应用考虑, 选择 1:10 的料液比提取 DCI, 与王立军等<sup>[22]</sup>选取的 1:15 料液比提取条件相近。

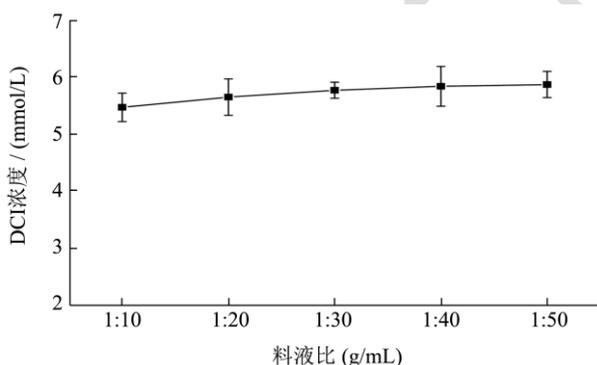


图 5 料液比对 DCI 浓度的影响

Fig.5 Effect of solid-liquid ratio on DCI concentration

### 2.1.6 乙醇体积分数对 DCI 浓度的影响

由图 6 可知, 在乙醇体积分数为 30%~50% 时, DCI 浓度随乙醇体积分数的升高而增大, 在 50% 时达到最大值, 为 5.89 mmol/L, 说明 DCI 虽然易溶于水, 但一定的乙醇体积分数会促进 DCI 的提取; 而在乙醇体积分数为 50%~70% 时, DCI 浓度有些许下降, 说明

过高的乙醇体积分数会阻碍了 DCI 在水中的溶出。在卢丞文<sup>[19]</sup>的研究中也指出最佳乙醇体积分数为 50%, 因此, 选用乙醇体积分数为 50% 的条件来提取 DCI 更为合理。

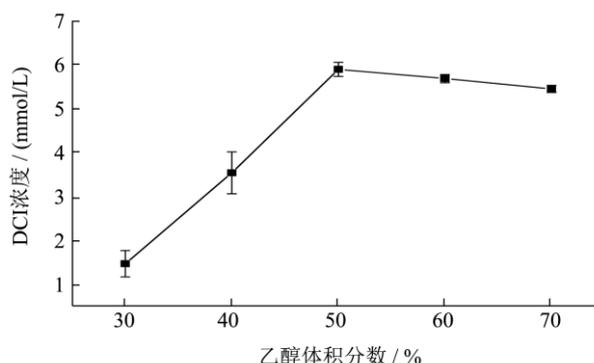


图 6 乙醇体积分数对 DCI 浓度的影响

Fig.6 Effect of ethanol concentration on DCI concentration

## 2.2 响应面结果分析

使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面回归分析, 拟合所得方程:

DCI 浓度 =  $6.14 - 0.017A + 0.14B - 0.018C - 0.007034AB - 0.058AC + 0.097BC - 0.39A^2 - 0.21B^2 - 0.30C^2$ , 决定系数  $R^2 = 0.8255$ , 模型拟合较好, 实验值与预测值比较接近。响应面实验设计及结果如表 1。

表 1 响应面试验设计及结果

Table 1 Response surface test design and results

序号	A/%	B/%	C/°C	DCI 浓度/(mmol/L)
1	2	40	20	5.79
2	2	40	40	5.41
3	2	50	30	6.28
4	3	50	20	5.41
5	2	50	30	6.39
6	1	40	30	5.28
7	1	50	40	5.62
8	2	60	20	5.67
9	2	50	30	5.96
10	1	50	20	5.38
11	2	50	30	5.88
12	2	60	40	5.67
13	2	50	30	6.18
14	3	60	30	5.78
15	3	50	40	5.40
16	3	40	30	5.32
17	1	60	30	5.77

表 2 响应面试验方差分析

Table 2 Response surface test analysis of variance

Source	Sum of Squares	Degree of Freedom	Mean Squares	F-value	P-value Prob>F
Model	1.53	9	0.17	3.68	0.049 significant
A	0.02	1	0.02	0.05	0.83
B	0.15	1	0.15	3.25	0.11
C	0.02	1	0.02	0.06	0.82
AB	0.00	1	0.00	0.04	0.95
AC	0.01	1	0.01	0.29	0.60
BC	0.04	1	0.04	0.81	0.39
A <sup>2</sup>	0.64	1	0.64	13.86	0.01**
B <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	3.97	0.09
C <sup>2</sup>	0.37	1	0.37	8.04	0.03*
Residual	0.32	7	0.05		
Lack of Fit	0.14	3	0.05	0.99	0.48 Not significant
Pure Error	0.19	4	0.05		
Cor Total	1.85	16			

注:  $P < 0.05$  为显著, 用“\*”表示;  $P < 0.01$  为极显著, 用“\*\*”表示。

从方差分析结果可以看出,  $F$  值为 3.68 即表明模型显著; 当  $P < 0.01$  时, 效果非常显著; 当  $P < 0.05$  时, 效果显著。从表可以看出,  $A^2$ 、 $C^2$  是重要的影响因素; 信噪比为 4.73 > 4, 说明此模型有足够强的响应信号; 校正决定系数  $R^2_{adj} = 0.6012$ , 表明该模型能够解释 60.12% 响应值的变化。失拟项用来表示所用模型与实验拟合的程度, 即二者差异的程度。失拟项  $P = 0.4833 > 0.05$ , 对模型是有利的, 无失拟因素存在, 因此可用该回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析。该模型拟合较好, 可用于预测苦荞籽粒 DCI 的提取工艺结果。通过检验  $Y$  的回归系数, 由显著性及  $F$  值可知, 各因素对 DCI 浓度的影响顺序为: B (乙醇体积分数) > C (酶解温度) > A (加酶量)。

交互效应的强弱可以通过等高线的形状判断, 椭圆表示两因素交互作用显著。图中响应面上标记的最高点即为最大值, 说明在所选分析的因素水平范围内存在极值<sup>[22]</sup>。由图可知, 加酶量、乙醇体积分数和酶解温度对 DCI 浓度均有显著的影响。

图 7a 中加酶量和乙醇体积分数对 DCI 浓度的结果表明, 随着加酶量的增加, DCI 浓度增大, 这些酶能够充分将苦荞籽粒中 DCI 糖醇类衍生物中的糖苷键切断, 释放单体物质, 使 DCI 的含量增加。当加酶量为 2% 时, DCI 浓度最高, 此时酶的作用已达到饱和; 随着加酶量提高到大于 2% 时, DCI 浓度降低, 即提取率下降, 表明 2% 的酶已经在 DCI 糖醇类衍生物中

充分发挥了作用, 再增加酶的量反而会使其附着在苦荞籽粒粉末的表面, 阻碍了 DCI 的溶出。同时, 乙醇体积分数也显示出同样的变化趋势。随着乙醇体积分数的增加, DCI 浓度先增加然后减小。

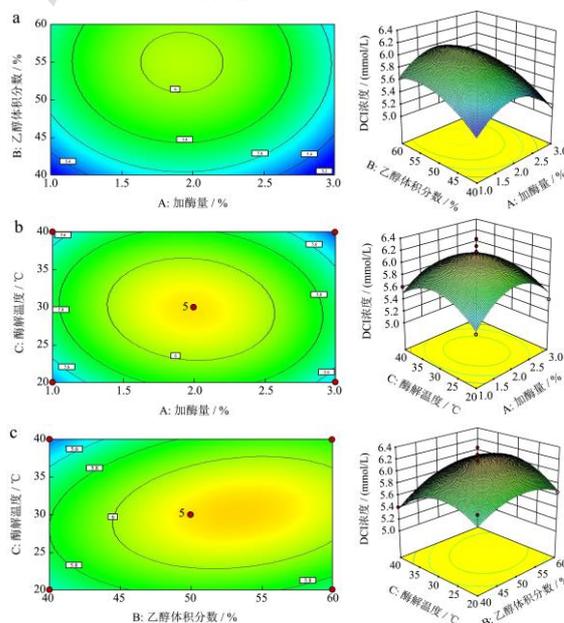


图 7 因素交互作用对 DCI 浓度的影响

Fig.7 Effect of factor interaction on DCI concentration

注: a 加酶量与乙醇体积分数等高线与交互作用; b 加酶量与酶解温度等高线与交互作用; c 乙醇体积分数与酶解温度等高线与交互作用。

图 7b 表示了加酶量和酶解温度对 DCI 浓度的影

响, 当加酶量恒定时, DCI 浓度随酶解温度的增加呈现出抛物线趋势。这是因为酶具有其最适温度, 在过高或过低时都无法发挥酶的最大活力, 使 DCI 溶出减小, 测得的浓度较低。而在酶解温度一定时, 加酶量也显示出类似的抛物线趋势, 加酶量在 2% 左右时的 DCI 浓度最大。可以看出, 此曲面图比较均衡, 弧度较好, 表明两者对于 DCI 浓度的影响较为相近, 且两者交互作用显著。

乙醇体积分数和酶解温度对 DCI 浓度的影响 (图 7c) 表明, 酶解温度一定时, 随着乙醇体积分数的增加, DCI 浓度先增加后减小, 这是因为 DCI 易溶于水, 一定的乙醇体积分数有利于 DCI 的溶出; 但乙醇体积分数过高时, 因为 DCI 微溶于乙醇, 反而会对 DCI 溶解造成影响, 导致测得的 DCI 浓度降低。酶解温度对 DCI 浓度的影响相同, 其他参数保持在零水平。

从回归模型中, 响应面实验的最佳提取条件为: 加酶量为 2.12%, 乙醇体积分数为 47.80%, 酶解温度

为 36.39 °C。在此条件下计算的 DCI 浓度为 5.94 mmol/L。为了验证提取条件的可靠性, 考虑实际操作, 校正最佳工艺参数如下: 加酶量为 2.1%, 乙醇体积分数为 48%, 酶解温度为 36.4 °C。在此条件下, 保证料液比为 1:10, 酶解时提取溶剂为蒸馏水, 酶解时间为 0.5 h, 3 次平行实验后, DCI 浓度分别为 5.86、5.76、5.99 mmol/L。三次平行实验的平均值为 5.87 mmol/L。实际含量与模型预测值的误差为 1.01%。

### 2.3 固相萃取小柱纯化 (SPE)

使用阴离子 SPE 小柱对苦荞中的 DCI 提取物进行纯化, 将纯化液进行干燥, 得到浅黄色固体。SAX 小柱纯化回收率为 95%。运用高碘酸钠法测定其纯度, 发现阴离子纯化样品纯度是粗提物样品的 7.37 倍。

根据 HPLC 标准系列数据 (表 3), 得到相关性方程:  $S=222\ 062C-1\ 137$  ( $S$  为峰面积), 相关系数为 0.999 9, 由此相关性方程可得表 4 的结果。

表 3 HPLC 标准系列数据

**Table 3 HPLC standard series data**

序号	1	2	3	4	5	6	7
C/(mg/mL)	0	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	10.00
S	0	123 177	223 961	436 589	868 426	1 774 544	2 227 913

表 4 各样品含量

**Table 4 Content of each sample**

样品	m/g	S	C/(mg/mL)	X/(g/100 g)
纯化前提取物	0.05	181 541	0.82	3.15
活性炭纯化物	0.05	-	-	ND
SAX 纯化物	0.05	334 003	1.51	5.67
SCX 纯化物	0.05	-	-	ND

注: ND, 即 not detected, 表示含量极低, 超出仪器检测范围, 可近似于未检出。

通过表 4 结果显示, 活性炭与 SCX 小柱纯化后, DCI 几乎为零, 即可说明这两种纯化方法不仅没有起到纯化作用, 还使 DCI 造成了损失, 这两种方法运用于 DCI 的纯化还有待考究。但是有其他文献显示活性炭柱纯化效果较好, 方法类似然而结果不同的原因与活性炭状态、提取物纯化物的保存、还有溶解程度等等都有许多关系。另外, 根据 8a 图得知, DCI 的出峰时间为 10 min。由此与图 8b 对比并根据计算可以得出结论: 通过 SAX 小柱的纯化, 纯度提升了 80%, 但总的来看, 不论是粗提物还是纯化物, DCI 的含量都比较少, 除苦荞中 DCI 含量少的原因外, 与提取方法和纯化方法都有影响, 因此, 从苦荞中提取 DCI 的提取与纯化技术仍然有待研究。

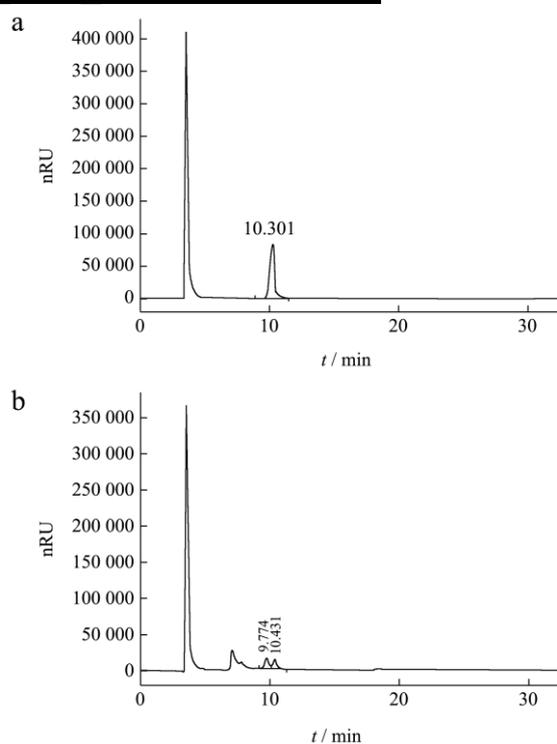


图 8 高效液相色谱图

Fig.8 High performance liquid chromatogram

注: a: DCI 质量浓度为 8 mg/mL 的 HPLC 图; b: SAX 纯化物 HPLC 图。

## 2.4 体外抗糖尿病活性测定结果分析

### 2.4.1 对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制率

通过检测样品对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制率来判断其抗糖尿病活性，其原理是：在  $\alpha$ -淀粉酶存在下水解淀粉，体外测量  $\alpha$ -淀粉酶活性，降低的蓝色强度表明酶诱导的淀粉水解成单糖<sup>[23]</sup>；若能抑制酶活性，则控制了体液内糖的含量。图 9 表明，DCI 标品与纯化前后提取液均具有相同的趋势，随着溶液质量浓度的增大， $\alpha$ -淀粉酶的抑制率也逐渐增大，表明了  $\alpha$ -淀粉酶的抑制率与质量浓度成正相关。同一溶液质量浓度下，DCI 标品抑制活性最高，纯化后溶液次之，纯化前溶液最低，说明纯化效果较好。由表 5  $IC_{50}$  值可以看出，样品纯化前后对  $\alpha$ -淀粉酶活性没有显著性差异，但略低于 DCI 标品。

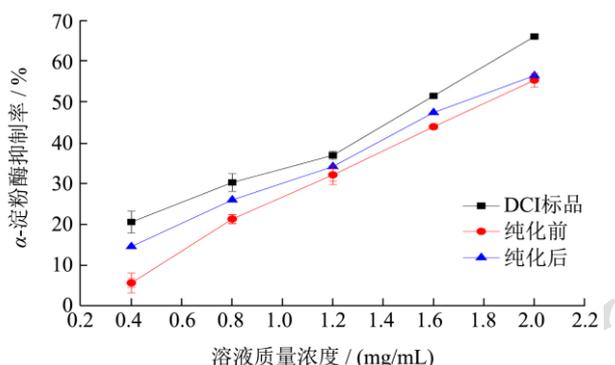


图 9 不同浓度 DCI 标品及纯化前后溶液对  $\alpha$ -淀粉酶抑制率的影响

Fig.9 Effects of different concentration DCI standards and solutions before and after purification on the inhibition rate of  $\alpha$ -amylase

### 2.4.2 对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率

$\alpha$ -葡萄糖苷酶 (EC 3. 2. 1. 20) 是水解淀粉和二糖以产生葡萄糖的关键酶。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂已成为治疗多种疾病的目标，包括 II 型糖尿病和肥胖症等。这种酶抑制剂有助于延缓糖的裂解，从而控制糖尿病患者和肥胖症患者的餐后血糖水平<sup>[24]</sup>。实验中， $\alpha$ -葡萄糖苷酶催化对硝基苯- $\alpha$ -D 吡喃半乳糖苷 (PNPG) 反应生成黄色对硝基苯酚 (PNP)，在 405 nm 处有最大吸收光，溶液颜色随 PNP 的含量增多逐渐颜色加深<sup>[25]</sup>。

图 10 表明， $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率与质量浓度成正相关，即  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率随溶液质量浓度增大而增大。但与  $\alpha$ -淀粉酶结果不同的是，此图中在同一溶液质量浓度下，DCI 标品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率最低，说明苦荞籽粒的提取液中除了 DCI 外，还有其他活性成分可能通过抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的方式达到降血糖的功能，例如黄酮等<sup>[26]</sup>。溶液质量浓度小于

1.2 mg/mL 时，相同浓度下纯化后的抑制率比纯化前的高；质量浓度在 1.2~1.6 mg/mL 时，对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性相当；而质量浓度大于 1.6 mg/mL 时，纯化前溶液比纯化后溶液抑制率大，质量浓度为 2 mg/mL 时，纯化前溶液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活性高达 95%，由表 5 抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的  $IC_{50}$  值结果显示，纯化后抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的质量浓度为 0.47 mg/mL 高于纯化前的 0.68 mg/mL，纯化前后都优于 DCI 标品。

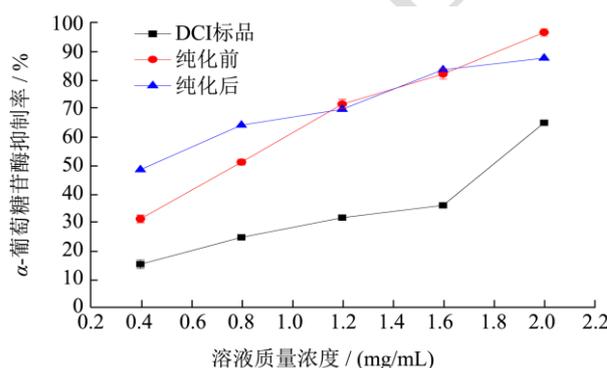


图 10 不同浓度 DCI 标品及纯化前后溶液对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.10 Effects of different concentration DCI standards and solutions before and after purification on the inhibition rate of  $\alpha$ -glucosidase

表 5 抑制  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的  $IC_{50}$  值

Table 5 Inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase  $IC_{50}$  values (mg/mL)

样品	抑制 $\alpha$ -淀粉酶	抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶
DCI 标品	1.47 $\pm$ 0.05	1.88 $\pm$ 0.07
纯化前溶液	1.78 $\pm$ 0.08	0.68 $\pm$ 0.02
纯化后溶液	1.79 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.02

## 3 结论

以苦荞籽粒为原料，采用  $\alpha$ -半乳糖苷酶结合超声波方法可以有效的获得高浓度 DCI，体外抗糖尿病实验表明，苦荞籽粒中的 DCI 提取物对  $\alpha$ -淀粉酶及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性均有一定的抑制作用，为 DCI 的提取以及降血糖的相关研究提供了一定的参考。主要结论总结如下：

(1)  $\alpha$ -半乳糖苷酶辅助超声波法对于 DCI 含量影响较大的三个因素为加酶量、乙醇体积分数以及酶解温度，且影响顺序为：乙醇体积分数>酶解温度>加酶量。最佳工艺条件为：加酶量为 2.1%，乙醇体积分数为 48%，酶解温度为 36.4  $^{\circ}C$ ，料液比为 1:10，酶解时提取溶剂为蒸馏水，酶解时间为 0.5 h；在此条件下测得的 DCI 浓度为 5.87 mmol/L。证实酶法辅助超声提取活性成分可以有效切断 DCI 糖醇类衍生物中的糖

苷键, 释放单体物质, 从而增加 DCI 的含量。

(2) 对于 DCI 的纯化, 活性炭、固相萃取离子小柱效果都不是特别好, 但相比较而言, 阴离子(SAX)固相萃取小柱纯化效果最好, 能够将纯度提高 80%。

(3) 通过  $\alpha$ -淀粉酶及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外降糖的实验, 说明对酶的抑制率与 DCI 浓度成正相关, 并且从侧面表明了纯化效果显著; 同时能够得出, 苦荞籽粒的提取液中除了 DCI 外, 还有其他活性成分可能也具有降血糖的功能。

### 参考文献

- [1] 王慧,赵江,杨胜楠,等.D-手性肌醇对高糖导致氧化损伤线虫延缓衰老的作用及机制[J].食品工业科技,2019,40(2):282-286.
- [2] Zielinski H, Honke J, Baczek N, et al. Bioaccessibility of D-chiro-inositol from water biscuits formulated from buckwheat flours fermented by lactic acid bacteria and fungi [J]. Food Science and Technology, 2019, 106: 37-43.
- [3] 张泽生,张梦娜,高云峰,等.D-手性肌醇及 D-松醇对缓解 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用[J].中国食品添加剂,2016,9:58-63.
- [4] 胡俊君,蒋梅峰,林勤保,等.苦荞麸皮中 D-手性肌醇的分离纯化[J].食品工业科技,2009,30(4):197-199.
- [5] 宋雨,邹亮,赵江林,等.苦荞萌发过程中 D-手性肌醇含量变化的探究[J].食品科技,2016,41(2):80-83.
- [6] Antonio Simone Lagan. Evaluation of ovarian function and metabolic factors in women affected by polycystic ovary syndrome after treatment with D-chiro-inositol [J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2015, 291(5).
- [7] 张泽生,裴雅,高云峰,等.D-手性肌醇的研究与开发[J].中国食品添加剂,2013,3:77-83.
- [8] 杨延利.萌发对苦荞黄酮合成的影响及萌发物抑菌、抗肿瘤活性的研究[D].上海:上海师范大学,2011.
- [9] 胡俊君,李云龙,李红梅,等.高含量  $\gamma$  含氨基丁酸和 D-手性肌醇苦荞醋的研制[J].粮油食品科技,2017,25(6):10-12.
- [10] 谭玉荣,陶兵兵,关郁芳,等.苦荞类黄酮的研究现状及展望[J].食品工业科技,2012,33(18):377-381.
- [11] 胡园园,易若琨,王仲明,等.苦荞中 D-手性肌醇的纯化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2017,38(14):82-86.
- [12] 胡俊君,仪鑫,胡红娟,等.柱前衍生化高效液相色谱测定荞麦中 D-手性肌醇含量的方法[J].食品工业科技,2018,39(13):248-252.
- [13] WANG Li, LI Xiaodan, NIU Meng, et al. Effect of additives on flavonoids, D-chiro-inositol and trypsin inhibitor during the germination of Tartary buckwheat seeds [J]. Journal of Cereal Science, 2013, 58(2): 124-129.
- [14] 勾秋芬.不同发酵条件对酿酒酵母产 D-手性肌醇含量的影响[J].产业与科技论坛,2016,15(17):51-54.
- [15] 闫巧娟,刘瑜,江正强.微生物  $\alpha$  半乳糖苷酶的研究进展[J].微生物学杂志,2017,37(3):1-9.
- [16] GAO Yunfeng, ZHANG Mengna, WANG Tianxin, et al. Hypoglycemic effect of D-chiro-inositol in type 2 diabetes mellitus rats through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2016, 433: 26-34.
- [17] 杨希,叶明.高钙菊花枸杞酸奶的研制及其体外抗氧化降血糖功能[J].广西科技大学学报,2018,29(3):108-114,128.
- [18] 徐悦,张卫明,马世宏,等.芫荽水提物的体外抗氧化活性和抑制  $\alpha$  葡萄糖苷酶作用的研究[J].中国调味品,2018,43(3):46-50.
- [19] 卢丞文.荞麦中 D-手性肌醇分离提取与纯化研究[D].长春:吉林农业大学,2007.
- [20] 罗媛,李孟伟,陈清华.半乳糖苷酶在禽料生产中的应用进展[J].湖南饲料,2015,4:15-16.
- [21] 王利军,白雪.荞麦 D-手性肌醇提取工艺的研究[J].食品科技,2014,39(8):208-210.
- [22] 咎立峰,杨香瑜,张策,等.响应面优化涉县无核黑枣果酒发酵工艺[J].食品研究与开发,2019,40(8):139-144.
- [23] Lakshmanan V K, Robinson J S, Geevaretnam J. *In vitro* anti-cancer, anti-diabetic, anti-inflammation and wound healing properties of collagen peptides derived from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) at different hydrolysis [J]. Turk J Fish & Aquat Sci, 2019, 19(7): 551-560.
- [24] Young M J, Jeong Y K, Soo M L, et al. Anti-cancer, anti-diabetic, anti-inflammation *Garcinia hanburyi* [J]. Journal of Applied Biological Chemistry, 2019, 62: 81-86.
- [25] 王锐.余甘子多糖体外降血糖及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2018,39(17):189-192,224.
- [26] Lei F, Xie Y F, Chenmiao P, et al. A novel antidiabetic food produced via solid-state fermentation of Tartary buckwheat by *L. plantarum* TK9 and *L. paracasei* TK1501 [J]. Food Technology & Biotechnology, 2018, 56(3): 373-380.