

杨桃根多糖提取工艺优化及其体外活性

廖彭莹¹, 李典鹏², 扈芷怡¹, 陈慧萍¹, 杨小妹¹, 吴勇燕¹

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006)

摘要: 目的 优化杨桃 *Averrhoa carambola* L. 根多糖提取工艺, 并评价其体外活性。方法 在单因素试验基础上, 以提取温度、提取时间、料液比为影响因素, 多糖提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。然后, 酶标板法考察多糖抗氧化活性及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。**结果** 最佳条件为提取温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间 30 min, 料液比 1 : 30, 多糖提取率 1.93%。多糖对 ABTS^{·+}、DPPH \cdot 的 EC₅₀ 值分别为 0.10、0.33 mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率高于阿卡波糖。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取具有较强抗氧化活性、抑制 α -葡萄糖苷酶作用的杨桃根多糖。

关键词: 杨桃; 根; 多糖; 提取; 抗氧化活性; α -葡萄糖苷酶; 正交试验; 酶标板法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2030-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.002

Extraction process optimization and *in vitro* activity evaluation for polysaccharides from *Averrhoa carambola* roots

LIAO Peng-ying¹, LI Dian-peng², HU Zhi-yi¹, CHEN Hui-ping¹, YANG Xiao-mei¹, WU Yong-yan¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Key Laboratory for Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction process for polysaccharides from *Averrhoa carambola* L. roots and to evaluate their *in vitro* activities. **METHODS** With extraction temperature, extraction time and solid-liquid ratio as influencing factors, the extraction rate of polysaccharides as an evaluation index, the extraction process was optimized by orthogonal test on the basis of single factor test. Subsequently, enzyme label plate assay was applied to investigating polysaccharides' antioxidant activity and inhibitory effect on α -glucosidase. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 70 $^{\circ}\text{C}$ for extraction temperature, 30 min for extraction time, and 1 : 30 for solid-liquid ratio, the extraction rate of polysaccharides was 1.93%. The EC₅₀ values of polysaccharides on ABTS^{·+}, DPPH \cdot were 0.10, 0.33 mg/mL, respectively, whose inhibitory rate on α -glucosidase was higher than that of acarbose. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for extracting polysaccharides, with strong antioxidant activity and inhibitory effect on α -glucosidase from *A. carambola* roots.

KEY WORDS: *Averrhoa carambola* L.; roots; polysaccharides; extraction; antioxidant activity; α -glucosidase; orthogonal test; enzyme label plate assay

收稿日期: 2018-09-16

基金项目: 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139116); 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室开放课题(PCU201503); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室2016年开放基金(FPRU2016-13); 广西中医药大学药学院中药学学科青年教师提升计划(2017); 广西中医药大学2017年自治区级大学生创新创业训练计划(201710600070); 广西中医药大学2018年广西一流学科建设项目重点课题(2018XK045)

作者简介: 廖彭莹(1984—), 女, 硕士, 副教授, 从事中药化学、天然药物化学研究工作。E-mail: gxlpy@163.com

杨桃根为酢浆草科五敛子属植物杨桃 *Averrhoa carambola* L. 的根或根皮, 其味酸、涩, 性平, 具有祛风除湿、行气止痛、涩精止带的功效^[1], 含有类型丰富的活性成分^[2-6], 其中多糖具有降血糖、抗氧化作用^[5-7]。

糖尿病是以持续高血糖为主要生化特征的综合代谢性疾病, 发病率持续增加, 目前我国患病人数已居世界第一^[8]。 α -葡萄糖苷酶是食物中碳水化合物水解的关键酶, 相关抑制剂通过抑制其活性来阻滞多糖、双糖水解, 延缓葡萄糖吸收, 从而使血糖平稳缓慢地维持在一定水平^[9], 部分植物多糖已证实具有较强抑制活性^[10-12], 但杨桃根多糖相关研究尚无报道。因此, 本实验将优化杨根多糖提取工艺, 并评价其体外活性, 以期为该成分开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); BSA224S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); 恒温水浴器 (金坛市医疗仪器厂); PH 计 (德国赛多利斯公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 药材 杨桃根于 2015 年 6 月采于广西南宁, 经广西中医药大学朱意麟实验师鉴定为酢浆草科五敛子属植物杨桃 *Averrhoa carambola* L. 的根, 粉碎过 40 目筛后备用。

1.3 试剂 维生素 C 购自天津博迪化工股份有限公司; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2, 2-联氮-二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS) 购自上海伊卡生物技术有限公司; 过硫酸钾购自中国医药集团上海化学试剂公司; α -葡萄糖苷酶、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷、阿卡波糖购自美国 Sigma 公司; D- (+) -葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司。所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材预处理 称取药材粉末 600 g, 加入 3 000 mL 石油醚回流提取 3 次, 每次 1 h, 药渣挥干, 加入 95% 乙醇 3 000 mL 回流提取 3 次, 每次 1 h, 药渣挥干, 得到药渣 555 g。

2.2 多糖含有量测定

2.2.1 线性关系考察 精密吸取不同体积葡萄糖对照品溶液 (0.10 mg/mL) 于 50 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 摇匀, 精密吸取 2 mL 于 10 mL 具塞试管中, 加入苯酚 1 mL、浓硫酸 8 mL, 摇匀, 冷却,

静置 30 min; 另取 2 mL 蒸馏水同法操作, 作为空白参比, 在 485 nm 波长下测定吸光度。以吸光度为纵坐标 (A), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $A = 10.045X + 0.05406$ ($r = 0.9991$), 在 0.010~0.060 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.2.2 方法学考察

2.2.2.1 精密度试验 精密吸取 0.05 mg/mL 多糖溶液 6 份, 每份 1.5 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 按“2.2.1”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 0.40%, 表明仪器精密度良好。

2.2.2.2 稳定性试验 精密吸取 0.05 mg/mL 多糖溶液 1.5 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 按“2.2.1”项下方法测定吸光度, 每隔 30 min 1 次, 测得其 RSD 为 0.64%, 表明溶液在 3 h 内稳定性良好。

2.2.2.3 重复性试验 精密称取药材 5 份, 每份 1 g, 按“2.1”项下方法预处理后将药渣挥干, 加入 50 mL 蒸馏水煎煮 2 次, 每次 1 h, 过滤得到水提液, 定容至 100 mL 量瓶中, 精密量取 1.5 mL 于 10 mL 具塞试管中, 按“2.2.1”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.57%, 表明该方法重复性良好。

2.2.2.4 加样回收率试验 精密吸取 5 份 0.05 mg/mL 多糖溶液, 每份 5 mL, 加入 0.1 mg/mL 对照品溶液 1.5 mL, 定容至 10 mL, 按“2.2.1”项下方法测定吸光度, 测得其平均加样回收率为 98.10%, RSD 为 5.51%。

2.3 单因素试验

2.3.1 提取时间 精密称取适量药渣 (M_1), 置于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入料液比 1:30 的蒸馏水, 超声 (40 kHz、200 W) 处理 20、30、40、50、60 min, 每组平行 3 次。所得提取液过滤, 滤液减压浓缩至约 10~15 mL, 加入 4 倍量无水乙醇至含醇量为 80%, 静置过夜, 抽滤, 沉淀用无水乙醇、乙醚、丙酮各 5~10 mL 洗涤, 减压干燥, 得到多糖, 精密称定质量 (M_2), 计算提取率, 公式为提取率 = $M_2/M_1 \times 100\%$, 结果见图 1。由图可知, 随着提取时间延长, 多糖提取率逐渐上升, 在 50 min 时最高, 为 1.85%, 但继续延长时反而明显下降, 故选择 30~50 min 作进一步优化。

2.3.2 提取温度 精密称取适量药渣于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入料液比 1:30 的蒸馏水, 提取温度 50、60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$, 超声处理 30 min, 每

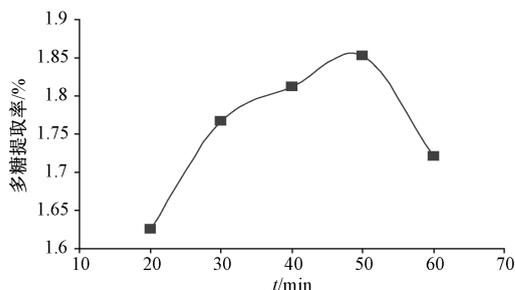


图1 提取时间对多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on the extraction rate of polysaccharides

组平行3次,提取液过滤,按“2.4.1”项下方法计算多糖提取率,结果见图2。由图可知,随着提取温度升高,多糖提取率缓慢增加,在60~70℃之间最高,但继续升高时反而明显下降,故选择50~70℃作进一步优化。

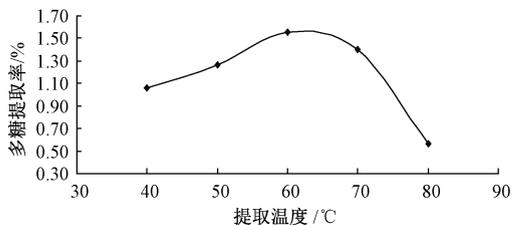


图2 提取温度对多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the extraction rate of polysaccharides

2.3.3 料液比 精密称取适量药渣于250 mL具塞锥形瓶中,加入料液比1:10、1:20、1:30、1:40、1:50的蒸馏水,提取温度70℃,超声处理30 min,每组平行3次,提取液过滤,按“2.3.1”项下方法计算多糖提取率,结果见图3。由图可知,料液比1:20、1:40时多糖提取率最高,但1:50时明显下降,可能是后期处理过程中提取液过多而造成多糖损失,故选择料液比1:20~1:40作进一步优化。

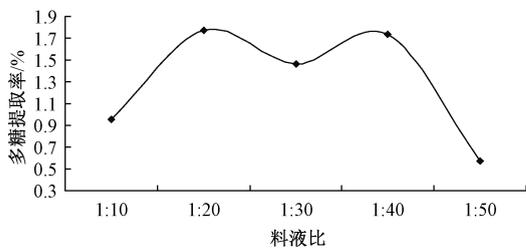


图3 料液比对多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate of polysaccharides

2.4 正交试验 在单因素试验基础上,选择提取时间(30、40、50 min)、提取温度(50、60、70℃)、料液比(1:20、1:30、1:40)作为影响因素,多糖提取率作为评价指标,设计 $L^9(3^4)$ 正交试验,每组3个平行。结果见表1,方差分析见表2。

表1 试验设计及结果

Tab.1 Design and results of tests

试验号	因素				多糖提取率/%
	A(温度/°C)	B(提取时间/min)	C(料液比)	D(空白)	
1	1(50)	1(30)	1(1:20)	1	1.35
2	1(50)	2(40)	2(1:30)	2	1.58
3	1(50)	3(50)	3(1:40)	3	1.27
4	2(60)	1(30)	2(1:30)	3	1.82
5	2(60)	2(40)	3(1:40)	1	1.63
6	2(60)	3(50)	1(1:20)	2	1.55
7	3(70)	1(30)	3(1:40)	2	1.74
8	3(70)	2(40)	1(1:20)	3	1.66
9	3(70)	3(50)	2(1:30)	1	1.88
T_1	4.20	4.91	4.56	4.86	—
T_2	5.00	4.87	5.28	4.87	—
T_3	5.28	4.70	4.64	4.75	—
K_1	1.40	1.64	1.52	1.62	—
K_2	1.67	1.62	1.76	1.62	—
K_3	1.76	1.57	1.55	1.58	—
R	0.36	0.07	0.24	0.04	—

表2 方差分析

Tab.2 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	0.209	2	0.105	70.86	<0.05
B	0.008	2	0.004	2.80	>0.05
C	0.104	2	0.052	35.13	<0.05
D(空白)	0.003	2	0.001	—	—

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

由表1可知,各因素影响程度依次为提取温度>料液比>提取时间,最优工艺为 $A_3B_1C_2$,即提取温度70℃,提取时间30 min,料液比1:30。由表2可知,提取温度、料液比具有显著影响($P<0.05$),而提取时间无显著影响($P>0.05$)。

2.5 验证试验 按照优化工艺进行提取,平行3次,测得多糖提取率分别为1.92%、1.87%、1.99%,平均1.93%,表明工艺稳定性良好。

2.6 多糖精制及光谱分析 采用Sevag法对多糖溶液进行除蛋白^[13],向脱蛋白多糖溶液中加入1%双氧水进行脱色,再向溶液中加入乙醇至含醇量为80%,4℃下静置过夜,离心,沉淀用丙酮、乙醇分别洗涤,50℃下烘干,即得精制多糖。然后,将其配成0.1 mg/mL,紫外分光光度法在200~

400 nm波长范围内扫描,发现在260、280 nm处均无明显吸收峰,表明不含核酸和蛋白质^[14]。

2.7 多糖体外活性研究

2.7.1 清除 ABTS^{·+}

将7 mmol/L ABTS水溶液和2.45 mmol/L 过硫酸钾水溶液等体积混合,在室温下避光反应,静置过夜,形成自由基贮备液,超纯水将其稀释成工作液,在30℃、734 nm波长下的吸光度为0.70±0.02。加入200 μL ABTS自由基工作液和50 μL多糖溶液,作为样品组;以等体积超纯水代替多糖溶液,作为对照组;以等体积超纯水代替ABTS自由基工作液,作为空白组,混合10 s,15 min后读取734 nm下吸光度,每组平行3次,计算清除率,公式为清除率 = $[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}] \times 100\%$,其中A₁为样品组吸光度,A₂为空白组吸光度,A₀为对照组吸光度,结果见图4。由图可知,多糖清除能力随着其质量浓度升高而逐渐增加,在0.5 mg/mL时清除率达到100%,EC₅₀为0.10 mg/mL。

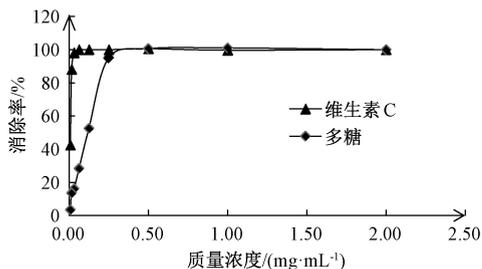


图4 多糖对 ABTS^{·+}清除率的影响

Fig. 4 Effect of polysaccharides on the scavenging rate of ABTS^{·+}

2.7.2 清除 DPPH·

取多糖溶液、0.2 mmol/L DPPH自由基溶液各100 μL,作为样品组;以等体积无水乙醇代替DPPH自由基溶液,作为空白组;以等体积蒸馏水代替多糖溶液,作为对照组,每组平行3次,混合均匀后常温下避光反应30 min,于517 nm波长处测定吸光度,按“2.7.1”项下方法计算清除率,结果见图5。由图可知,在0.2~2.0 mg/mL范围内多糖对DPPH·的清除率随着其质量浓度增加而不断升高,EC₅₀为0.33 mg/mL。

2.7.3 抑制 α-葡萄糖苷酶

以pH 6.8磷酸缓冲液配制不同质量浓度的多糖溶液和阿卡波糖溶液,设置样品反应孔、样品对照孔、空白反应孔、空白对照孔,每个质量浓度平行3次,反应孔中依次加入样品溶液和α-葡萄糖苷酶,对照孔中依次加入空白缓冲液(pH 6.8磷酸缓冲液)和α-葡萄糖苷酶,振荡30 s,恒温(37℃)孵育10 min,各孔

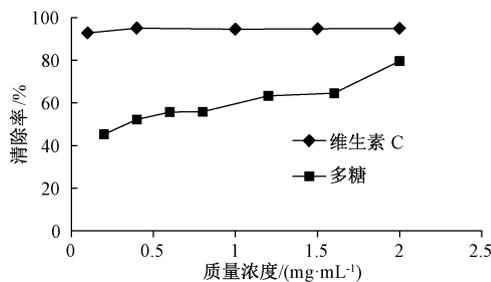


图5 多糖对 DPPH·清除率的影响

Fig. 5 Effect of polysaccharides on the scavenging rate of DPPH·

加入底物(对硝基苯酚葡萄糖苷),振荡30 s,恒温(37℃)孵育20 min,再加入Na₂CO₃溶液终止反应,在405 nm波长处测定吸光度(A)值,计算抑制率,公式为抑制率 = $[1 - \frac{\text{样品反应孔 OD 值} - \text{样品对照孔 OD 值}}{\text{空白反应孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值}}] \times 100\%$,结果见表3。由表可知,多糖对α-葡萄糖苷酶有较强的体外抑制活性,强于同等质量浓度下的阳性药阿卡波糖。

表3 多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Tab. 3 Effect of polysaccharides on inhibiting α-glucosidase

质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	多糖抑制率/%	阿卡波糖抑制率/%
0.125	94.7	12.3
0.063	79.7	10.2
0.031	58.0	5.8

3 讨论与结论

本实验通过正交试验优化杨桃根多糖提取工艺,发现该方法操作简便,易于推广应用。再对多糖进行精制处理和体外活性研究,发现该成分有较强的体外抗氧化活性,对ABTS^{·+}的清除能力接近维生素C,而且同等质量浓度下对α-葡萄糖苷酶的体外抑制作用强于阳性对照药阿卡波糖。

α-葡萄糖苷酶抑制剂类药物已被推荐为治疗II型糖尿病的一线用药,目前仅有阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇3个药物成功上市,并应用于临床。本实验对杨桃根多糖抑制α-葡萄糖苷酶活性进行评价,从新角度发现了其医药价值。

致谢:感谢国家中医药管理局科研三级实验室中(壮)药化学与质量分析实验室、广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室提供实验仪器及场所。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第12

- 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 715.
- [2] Zheng N, Lin X, Wen Q, *et al.* Effect of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione, isolated from *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) roots, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in type 2 diabetic KKAY mice[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 219(1): 77-84.
- [3] Wen Q W, Liang T, Qin F Z, *et al.* Lyoniresinol 3 α -O- β -D-glucopyranoside-mediated hypoglycaemia and its influence on apoptosis-regulatory protein expression in the injured kidneys of streptozotocin-induced mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e81772.
- [4] Wen Q W, Lin X, Liu Y Q, *et al.* Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. root[J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 12330-12340.
- [5] 黄桂红, 邓 航, 黄纯真, 等. 杨桃根多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2009, 31 (9): 1438-1440.
- [6] 罗旭艳, 黄建春, 杨 欣, 等. 杨桃根多糖体外抗氧化作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4): 111-114.
- [7] 罗旭艳, 杨 欣, 王丽惠, 等. 杨桃根多糖片对糖尿病模型小鼠的降糖降脂作用 [J]. *医药导报*, 2016, 35 (S1): 1-3.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 年版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1): 81-117.
- [9] Kita A, Matsui H, Somoto A, *et al.* Substrate specificity and subsite affinities of crystalline α -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2327-2335.
- [10] 王小江, 单鑫迪, 胡明华, 等. 青钱柳叶多糖的结构表征及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48 (8): 1524-1528.
- [11] 郭凤霞, 曾 阳, 李锦萍, 等. 沙棘多糖对 α -葡萄糖苷酶活性及正常小鼠血糖的影响 [J]. *药学报*, 2013, 48 (4): 604-608.
- [12] 李玉萍, 皮小芳, 刘成梅, 等. 百合多糖降糖作用机理的体外研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 1964-1966.
- [13] 廖彭莹, 邱志彬, 卓生华. 柚寄生多糖的提取与含量的测定 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(22): 74-77.
- [14] 李石军, 王凯平, 汪 柳, 等. 香菇多糖 LNT2 的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2014, 45 (9): 1232-1237.

柚皮素纳米混悬剂的制备及其体内药动学行为

裴岩岩, 闫春生, 牛美兰, 郭志刚
(黄河科技学院, 河南 郑州 450005)

摘要: 目的 制备柚皮素纳米混悬剂, 并考察其体内药动学行为。方法 高压均质法制备纳米混悬剂后, 测定其粒径、PDI、Zeta 电位、累积释放度。然后, 研究纳米混悬剂体内药动学行为, 计算主要药动学参数。结果 纳米混悬剂平均粒径为 (161.67 \pm 4.23) nm, PDI 为 0.105 \pm 0.011, Zeta 电位为 (-30.47 \pm 1.15) mV, 40 min 内累积释放度大于 90%。与原料药比较, 纳米混悬剂 t_{max} 显著缩短 ($P < 0.05$), C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著升高 ($P < 0.01$), 相对生物利用度增加了 1.86 倍。结论 纳米混悬剂可有效改善柚皮素体内吸收, 明显提高其生物利用度。

关键词: 柚皮素; 纳米混悬剂; 制备; 体内药动学行为; 高压均质法

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2034-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.003

Preparation and *in vivo* pharmacokinetic behaviors of naringenin nanosuspensions

PEI Yan-yan, YAN Chun-sheng, NIU Mei-lan, GUO Zhi-gang
(Huanghe Science & Technology College, Zhengzhou 450005, China)

ABSTRACT: AIM To prepare naringenin nanosuspensions and to investigate the *in vivo* pharmacokinetic behav-

收稿日期: 2019-04-30

基金项目: 河南省重大科技专项 (162102310003)

作者简介: 裴岩岩 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为药理学。Tel: (0371) 68782349, E-mail: pyhkdyxy@126.com