

黄秋葵多糖缓冻协同微波提取工艺优化及其降血糖作用

张艳军*, 李靖, 张玉领, 韩永红

(江苏护理职业学院药学与中药学院, 江苏淮安 223005)

摘要: 本文采用缓冻协同微波辅助提取手段, 通过单因素实验, 确定合适的因素, 采用响应面优化方法对黄秋葵多糖提取工艺条件进行优化; 采用对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)法测定黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的影响, 通过小鼠实验, 测定黄秋葵多糖对肾上腺素引起高血糖小鼠血糖水平的影响, 从而探索黄秋葵多糖的降血糖作用。结果表明: 通过响应面优化提取条件, 确定黄秋葵多糖的最佳提取工艺条件是缓冻时间 16 h, 液料比 40:1 (mL/g), 浸提时间 2.2 h; 浸提温度 65 $^{\circ}$ C, 微波功率 310 W, 在此条件下, 黄秋葵多糖的得率可达到 17.17%, 明显高于相对单一的提取工艺。黄秋葵多糖能够明显抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 在 10 mg \cdot mL $^{-1}$ 剂量下抑制率达 68.26%; 且极显著降低肾上腺素引起高血糖小鼠的血糖水平 ($P < 0.01$)。缓冻协同微波处理能够显著提高黄秋葵多糖的得率, 黄秋葵多糖具有良好的降血糖作用, 具备开发成为预防和治疗糖尿病的市场应用与开发前景。

关键词: 黄秋葵多糖, 响应面分析, α -葡萄糖苷酶, 肾上腺素, 降血糖

Optimization of Polysaccharide from Okra by Slowfreezing-Microwave Assisted Extraction Method and Its Hypoglycemic Activity

ZHANG Yanjun*, LI Jing, ZHANG Yuling, HAN Yonghong

(School of Pharmaceutical Science and Chinese Materia Medical, Jiangsu College of Nursing, Huai'an 223005, China)

Abstract: Slow freezing-microwave assisted extraction optimized by single factor experiment and response surface methodology was implemented to extract polysaccharides from Okra. To explore the hypoglycemic effect of okra polysaccharides, the inhibitory effects on the activities of α -glycosidase were studied by the colorimetry of pNPG, the effects on blood glucose were studied in adrenaline-induced hyperglycemia model mice. Results showed that the optimal conditions were slow freezing time 16 h, liquid-solid ratio 40:1 (mL/g), extracting time 2.2 h, extracting temperature 65 $^{\circ}$ C, microwave power 310 W. Under these conditions, the extraction rate of polysaccharide was 17.17%, which was significantly higher than a single extraction process. The polysaccharides from Okra could significantly inhibited the activity of α -glucosidase, the inhibition rate was 68.26% at 10 mg \cdot mL $^{-1}$; and significantly reduced the blood glucose level of adrenaline-induced hyperglycemia mice ($P < 0.01$). The extraction rate of okra polysaccharides was improved by slowfreezing-microwave assisted extraction method. Okra polysaccharides had better potential for the hypoglycemic effect, and might be developed to prevent and treat diabetes.

Key words: Okra polysaccharide; response surface methodology; α -glucosidase; adrenaline; hypoglycemic

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)04-0161-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020050257

引文格式: 张艳军, 李靖, 张玉领, 等. 黄秋葵多糖缓冻协同微波提取工艺优化及其降血糖作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 161-167.

ZHANG Yanjun, LI Jing, ZHANG Yuling, et al. Optimization of Polysaccharide from Okra by Slowfreezing-Microwave Assisted Extraction Method and Its Hypoglycemic Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 161-167. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

黄秋葵 [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] 又名 Okra、秋葵、补肾草等, 是原产于非洲热带地区的锦葵科秋葵属草本植物, 现在我国南北方各地均有

栽培。黄秋葵的幼嫩荚果是百姓餐桌上常见的保健蔬菜, 《本草纲目》记载, 黄秋葵的根、茎、花、果实、种子等均可入药, 其根利水消肿, 治肺热咳嗽; 种子补

收稿日期: 2020-05-25

作者简介: 张艳军 (1982-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然药物活性研究, E-mail: yanjunzhang1982@163.com。

基金项目: 江苏省淮安市自然科学研究计划项目 (HAB201716)。

脾健胃,治消化不良;全株清热解毒,润燥滑肠等^[1]。黄秋葵果实含有丰富的蛋白质、游离氨基酸、矿物质及由果胶和多糖等组成的黏性物质,具有降血糖^[2]、降血脂^[3]、抗疲劳^[4]、抗氧化等保健作用。黄秋葵中多糖成分含量约占2%^[5]。

植物多糖是普遍存在于天然植物中的聚糖,具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、降血脂、抗辐射、抗菌抗病毒、保护肝脏等保健作用^[6]。植物多糖的提取方法主要有热水浸提法、酸碱浸提法、酶解提取法、微波辅助提取法、超声辅助提取法等^[7]。热水浸提法耗时长,得率低;酸碱浸提法对酸碱的要求较高;酶解提取法存在酶残留及降解产物;超声提取法长时间超声破坏多糖结构;微波提取法不适用于热不稳定化合物。缓冻技术是在低温环境下,细胞中的水分经过长时间冷冻之后凝结成冰晶,刺破细胞壁,有利于多糖的溶出。在解冻过程中,采用微波迅速升温,微波穿透力强,透过细胞壁使细胞内部产生高温高压,冲破细胞膜和细胞壁,细胞内容物质更快更彻底地流出^[8]。因此缓冻协同微波方法能够克服微波不适用对热不稳定化合物的缺点,同时提高得率。向东等比较了缓冻和超声波两种方法强化南瓜多糖的提取,结果表明缓冻方法提取效果明显优于超声波方法^[9]。李超柱等采用了缓冻协同微波的方法对甘薯多糖进行提取,显著提高了多糖的得率^[10]。

2型糖尿病是由胰岛素调控葡萄糖代谢能力下降(胰岛素抵抗)伴随胰岛 β 细胞功能缺陷所导致的胰岛素分泌减少(或相对减少)为病理生理学特征的代谢性疾病^[11]。2型糖尿病患者餐后高血糖(PPHG)比空腹高血糖更易导致微血管和大血管并发症^[12],有效的降低餐后血糖,对PPHG进行有效的管理被科学界认为是2型糖尿病治疗的主要策略之一^[13]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过抑制小肠内低聚糖分解成葡萄糖,减少葡萄糖吸收进入血液循环而降低PPHG,是临床常用的一类口服降糖药物^[14-15]。目前已从多种常见植物中分离制备出多糖用于抑制 α -葡萄糖苷酶的研究^[16]。

本文采取缓冻协同微波辅助提取方法提取黄秋葵多糖,采用响应面优化设计,探索黄秋葵多糖的最优提取工艺。同时通过黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶的活性和对肾上腺素所致高血糖小鼠血糖的影响,探索黄秋葵多糖的降血糖作用,为黄秋葵多糖的生理活性的研究提供补充,促进黄秋葵的市场应用与开发。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

昆明(KM)小鼠 雄性,SPF级,体重19~22 g,许可证号:SCXK(苏)2016-0002,由南京君科生物科技有限公司提供;黄秋葵果实 江苏省淮安市景台农业生态园;对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、 α -葡萄糖苷酶 美国Sigma公司;谷胱甘肽 上海蓝季科技发展有限公司;阿卡波糖 德国拜耳医药保健有限公司;盐酸肾上腺素注射液 上海禾丰制药有限公司;盐酸二甲双胍片 上海施贵

宝制药有限公司;葡萄糖、苯酚、浓硫酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、碳酸钠、乙醇、三氯甲烷、正丁醇、石油醚 国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。

T6新世纪紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;LGJ-18冷冻干燥机 北京松源华兴生物技术有限公司;NJL07-3实验用微波炉 南京杰全微波设备有限公司;DZKW-S-8恒温水浴箱 苏州江东精密仪器有限公司;DX-30B小型实验用粉碎机 广州市大祥电子机械设备有限公司;TGL-10C离心机 上海精密仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄秋葵多糖的提取 取黄秋葵果实,纯化水清洗干净,冷冻干燥,粉碎过筛(60目),3倍体积石油醚脱脂,挥干溶剂,黄秋葵粉与去离子水按照一定液料比混合,在一定温度下水浴浸提一定的时间,然后在-20℃环境下冷冻一定时间,在一定功率下微波处理,提取液加入等体积Sevage试剂(三氯甲烷/正丁醇4:1),充分振摇后静置,4000 r/min离心10 min,取上清液,加入3倍体积95%乙醇溶液,4℃沉淀过夜,4000 r/min离心10 min,沉淀物依次用70%乙醇溶液、95%乙醇溶液、无水乙醇洗涤,然后用去离子水溶解,测定吸光度。

1.2.2 单因素实验 以黄秋葵多糖得率为评价指标,选取缓冻时间、液料比、浸提时间、浸提温度、微波功率5个因素做单因素试验,考察各因素对黄秋葵多糖得率的影响。固定液料比40:1(mL/g),浸提温度60℃,浸提时间2 h,微波功率300 W,探究不同缓冻时间(8、12、16、20、24 h)对黄秋葵多糖得率的影响;固定缓冻时间16 h,浸提温度60℃,浸提时间2 h,微波功率300 W,探究不同液料比(20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL/g)对黄秋葵多糖得率的影响;固定缓冻时间16 h,液料比40:1(mL/g),浸提温度60℃,微波功率300 W,探究不同浸提时间(1、1.5、2、2.5、3 h)对黄秋葵多糖得率的影响;固定缓冻时间16 h,液料比40:1(mL/g),浸提时间2 h,微波功率300 W,探究不同浸提温度(40、50、60、70、80℃)对黄秋葵多糖得率的影响;固定缓冻时间16 h,液料比40:1(mL/g),浸提温度60℃,浸提时间2 h,探究不同微波功率(100、200、300、400、500 W)对黄秋葵多糖得率的影响。

1.2.3 响应面试验优化提取工艺 在单因素实验的基础上,按照Box-behnken Design试验设计原理,选择液料比A、浸提时间B、浸提温度C、微波功率D等4个因素作为考察因素,以黄秋葵多糖得率为响应值,采用四因素三水平响应面分析法进行试验设计。试验设计因素与水平编码表见表1。

1.2.4 黄秋葵多糖含量的测定

1.2.4.1 葡萄糖溶液标准曲线的绘制 准确称取105℃干燥至恒重的葡萄糖0.0250 g置于250 mL容量瓶,加纯化水定容至刻度,摇匀,即得浓度为100.00 μ g/mL的标准葡萄糖溶液。移取上述标准溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL于10 mL容量瓶中,分别依次加入6%苯酚溶液1.0 mL,浓硫酸

表1 Box-behnken Design 试验设计因素水平编码表

Table 1 Code table of factors and levels of Box-Behnken design

水平	因素			
	A 液料比 (mL/g)	B 浸提时间 (h)	C 浸提温度 (°C)	D 微波功率 (W)
-1	30:1	1.5	50	200
0	40:1	2.0	60	300
1	50:1	2.5	70	400

5.0 mL, 摇匀, 静置 5 min, 用纯化水定容至刻度, 充分摇匀, 沸水浴放置 30 min, 冷却, 于 490 nm 波长处测定吸光度值, 以葡萄糖质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程: $y = 0.0681x + 0.0095$, $R^2 = 0.9994$ 。

1.2.4.2 黄秋葵多糖的得率测定 取 1 mL 黄秋葵多糖提取液于 100 mL 容量瓶中, 用纯化水定容至刻度, 准确量取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 分别依次加入 6% 苯酚溶液 1.0 mL, 浓硫酸 5.0 mL, 静置 5 min, 用纯化水定容至刻度, 摇匀后沸水浴放置 30 min, 冷却, 于 490 nm 波长处测定吸光度。根据回归方程测定多糖的含量。然后根据以下公式计算多糖的得率。

$$\text{黄秋葵多糖得率}(\%) = \frac{m_1 \times V \times n}{m} \times 100$$

式中: m_1 : 测定的多糖的质量 (g), V : 多糖提取液的体积 (mL), n : 多糖提取液的稀释倍数, m : 黄秋葵果实粉末质量 (g)

1.2.5 黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的影响 反应体系为 $67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钾缓冲液 (37°C , pH6.8) $860 \mu\text{L}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 谷胱甘肽溶液 $25 \mu\text{L}$, $2.74 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶溶液 $35 \mu\text{L}$, 与黄秋葵多糖 ($2, 6, 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$, 阿卡波糖 ($2, 6, 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$; 混匀, 37°C 恒温 10 min, 加入 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pNPG 溶液 $60 \mu\text{L}$, 继续恒温 10 min, 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液 4 mL, 于波长 400 nm 处测定吸光度 (A)。 α -葡萄糖苷酶管不加多糖, 样品空白管除不加 pNPG 外其余同样品管, 空白管不加 pNPG, 其余用等体积的纯化水补充^[17]。

$$\text{酶抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{酶}} - (A_{\text{样}} - A_{\text{样空}})}{A_{\text{酶}} - A_{\text{空}}} \times 100$$

式中: $A_{\text{酶}}$: α -葡萄糖苷酶管的吸光度; $A_{\text{样}}$: 多糖样品管的吸光度; $A_{\text{样空}}$: 样品空白管的吸光度; $A_{\text{空}}$: 空白管的吸光度

1.2.6 黄秋葵多糖对肾上腺素所致高血糖小鼠血糖水平的影响 取昆明小鼠 60 只, 随机分成 6 组, 对照组按 250 mg/kg bw 每日一次灌胃二甲双胍; 实验组按照低剂量组 100 mg/kg bw 、中剂量组 200 mg/kg bw 、高剂量组 400 mg/kg bw 每日一次灌胃黄秋葵多糖。同时设空白对照组和肾上腺素处理组, 每日一次灌胃等体积生理盐水。此外除空白对照组外, 其余各组按 0.2 mg/kg bw 每日一次腹腔注射肾上腺素, 空白对照组注射生理盐水, 连续注射 7 d。最后一次给药前禁食 12 h, 给药后 30 min 眼眶采血, 血糖仪测定空腹血糖 (FBG)^[18]。

1.3 数据分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵多糖提取工艺单因素实验结果

2.1.1 缓冻时间对黄秋葵多糖得率的影响 不同缓冻时间对黄秋葵多糖得率的影响结果如图 1 所示。在缓冻 8~16 h 范围内, 随着缓冻时间的延长, 黄秋葵多糖的得率不断增加, 缓冻 16 h 后得率增加不显著 ($P > 0.05$)。黄秋葵在冷冻状态下细胞内产生冰晶破坏细胞壁, 多糖释放细胞壁的阻碍相应减少, 有利于细胞内多糖的溶出。但冻结时间过长, 分子的热运动长时间处于抑制状态又不利于细胞内多糖的溶出^[19], 因此选择 16 h 作为最佳缓冻时间。

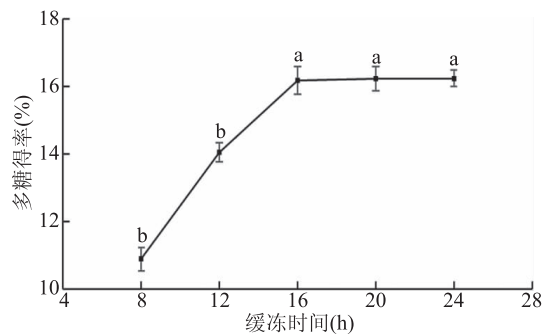


图1 缓冻时间对黄秋葵多糖得率的影响

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

2.1.2 液料比对黄秋葵多糖得率的影响 不同液料比对黄秋葵多糖得率的影响结果如图 2 所示。随着液料比的增加, 多糖得率出现先升高后降低的趋势, 在液料比为 40:1 (mL/g) 时, 黄秋葵多糖得率出现最大值, 且与其它比例存在显著性差异 ($P < 0.05$)。随着溶剂的增多, 黄秋葵细胞内与溶剂间的多糖浓度梯度也相应增加, 使得多糖的溶出更加容易, 但当液料比超过 40:1 (mL/g) 时, 再继续增大容积的量, 同样促进细胞内其他物质溶出^[20], 与多糖溶出相竞争, 抑制多糖的溶出。因此确定最佳液料比为 40:1 (mL/g), 选择液料比 30:1、40:1、50:1 (mL/g) 进行响应面优化试验。

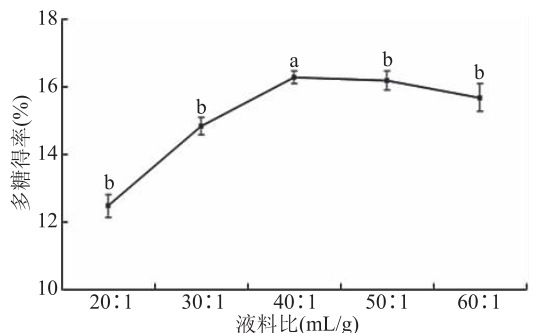


图2 液料比对黄秋葵多糖得率的影响

Fig.2 Effect of liquid-solid ratio on the extraction rate of okra polysaccharides

2.1.3 浸提时间对黄秋葵多糖得率的影响 不同浸提时间对黄秋葵多糖得率的影响结果如图3所示。在浸提时间1.0~2.0 h范围内,黄秋葵多糖的得率增加显著,2.0 h时出现最大值,继续延长浸提时间,多糖得率无显著变化。在提取初期,由于溶剂内多糖的浓度较小,黄秋葵细胞内外多糖的浓度梯度较大,因此多糖渗透、溶解、扩散的速度显著增加,多糖的得率增加趋势显著。但浸提是在一定温度的水浴中进行,随着浸提时间增加,多糖容易发生降解,进而影响了多糖得率^[21]。因此确定最佳浸提时间为2.0 h,选择浸提时间1.5、2.0、2.5 h进行响应面优化试验。

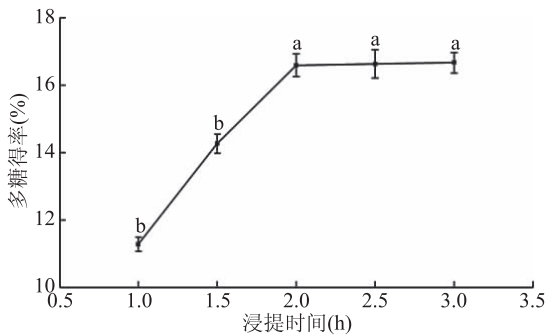


图3 浸提时间对黄秋葵多糖得率的影响

Fig.3 Effect of extracting time on the extraction rate of okra polysaccharides

2.1.4 浸提温度对黄秋葵多糖得率的影响 不同浸提温度对黄秋葵多糖得率的影响结果如图4所示。在40~80℃温度范围内,随着温度的增加,多糖得率呈现先增加后减少的趋势,在60℃多糖得率最高,且差异显著($P < 0.05$)。浸提温度的升高,加快多糖分子热运动,同时降低浸提液粘度,从而增加多糖扩散系数,有利于多糖的溶出,但浸提温度超过60℃后,继续增加温度,多糖的结构被破坏,导致多糖得率降低^[22]。因此确定最佳浸提温度为60℃,选择液料比50、60、70℃进行响应面优化试验。

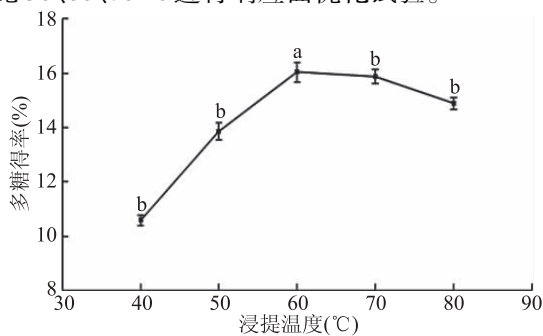


图4 浸提温度对黄秋葵多糖得率的影响

Fig.4 Effect of extracting temperature on the extraction rate of okra polysaccharides

2.1.5 微波功率对黄秋葵多糖得率的影响 微波功率对黄秋葵多糖得率的影响结果如图5所示。多糖的得率随着微波功率的增加而不断增加,在300 W时出现最大值。由于微波强的穿透能力,使细胞内温度迅速升高,致使液态水快速汽化,从而产生强大的压力,冲破细胞膜和细胞壁,促进多糖溶出^[23]。但功率超过300 W后,多糖的结构遭到破坏,导致多糖

得率略有下降。因此确定最佳微波功率300 W,选择微波功率200、300、400 W进行响应面优化试验。

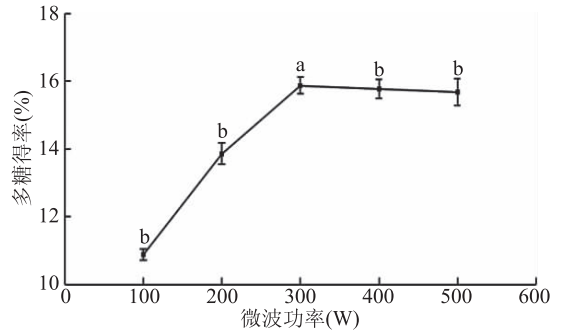


图5 微波功率对黄秋葵多糖得率的影响

Fig.5 Effect of microwave power on the extraction rate of okra polysaccharides

2.2 响应面优化设计和分析结果

2.2.1 响应面优化试验设计及结果 根据单因素实验结果,应用 Design-Expert.V8.0.6 软件,以液料比 A、浸提时间 B、浸提温度 C、微波功率 D 为试验因素,进行了四因素三水平共 29 个响应面分析试验,试验设计方案与结果见表 2。

表2 Box-Behnken 设计方案与结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号	A	B	C	D	多糖得率(%)
1	0	-1	0	-1	11.07
2	0	0	-1	1	12.46
3	1	0	-1	0	12.08
4	-1	0	0	-1	12.96
5	0	-1	1	0	13.25
6	0	1	0	-1	13.95
7	-1	0	0	1	14.22
8	1	0	0	1	14.49
9	0	0	0	0	16.26
10	0	0	1	-1	13.47
11	0	-1	0	1	12.15
12	1	-1	0	0	12.95
13	0	1	0	1	14.01
14	0	0	0	0	16.98
15	-1	0	-1	0	11.98
16	-1	0	1	0	14.87
17	0	0	0	0	16.52
18	1	1	0	0	15.28
19	1	0	0	-1	13.47
20	0	-1	-1	0	11.48
21	0	1	-1	0	12.46
22	-1	-1	0	0	12.45
23	1	0	1	0	15.06
24	0	0	1	1	14.8
25	0	0	-1	-1	10.68
26	-1	1	0	0	14.98
27	0	0	0	0	17.22
28	0	1	1	0	15.93
29	0	0	0	0	16.34

表3 回归模型方差分析结果
Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	90.62	14	6.47	42.46	<0.0001	**
A	0.29	1	0.29	1.91	0.1884	
B	14.65	1	14.65	96.12	<0.0001	**
C	21.98	1	21.98	144.18	<0.0001	**
D	3.55	1	3.55	23.31	0.0003	**
AB	0.01	1	0.01	0.066	0.8016	
AC	0.002	1	0.002	0.013	0.9099	
AD	0.014	1	0.014	0.094	0.7631	
BC	0.72	1	0.72	4.74	0.0471	*
BD	0.26	1	0.26	1.71	0.2125	
CD	0.051	1	0.051	0.33	0.5736	
A ²	7.67	1	7.67	50.32	<0.0001	**
B ²	18.55	1	18.55	121.7	<0.0001	**
C ²	22.71	1	22.71	148.98	<0.0001	**
D ²	25.17	1	25.17	165.12	<0.0001	**
残差	2.13	14	0.15			
失拟项	1.44	10	0.14	0.82	0.6363	
纯误项	0.7	4	0.17			
总离和	92.75	28				

$R^2 = 0.9770$ $R^2_{Adj} = 0.9540$

注: $P < 0.01$ 为极显著“**”; $P < 0.05$ 为显著“*”; $P > 0.05$ 为不显著。

2.2.2 回归模型有效性和显著性分析 采用 Design-Expert.V8.0.6 程序软件对表 2 试验结果进行响应面分析,得到黄秋葵多糖得率 Y 与液料比(A)、浸提时间(B)、浸提温度(C)、微波功率(D)四因素回归拟合方程 $Y = 16.66 + 0.16A + 1.11B + 1.35C + 0.54D - 0.05AB + 0.023AC - 0.06AD + 0.42BC - 0.25BD - 0.11CD - 1.09A^2 - 1.69B^2 - 1.87C^2 - 1.97D^2$ 对回归方程进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知,回归模型的 P 值 < 0.0001 ,说明回归模型极其显著,失拟项用来表示所用模型与试验拟合的程度,失拟项 $P = 0.6363 > 0.05$,说明失拟项不显著,回归方程的决定系数 $R^2 = 0.9770$, $R^2_{Adj} = 0.9540$,说明该回归方程拟合度较好,未知试验因素对试验结果的干扰较小,可用来对缓冻协同微波辅助提取黄秋葵多糖的工艺进行分析和预测。方程中一次项 B、C、D 及二次项 A²、B²、C²、D² 对黄秋葵多糖得率的影响极显著 $P < 0.01$,交互项 BC 对多糖得率的影响显著 ($P < 0.05$),一次项 A,交互项 AB、AC、BD、CD 对多糖得率的影响不显著。依据各因素的 F 值判断,各因素对黄秋葵多糖得率的影响依次是浸提温度 > 浸提时间 > 微波功率 > 液料比。

2.2.3 响应曲面结果分析 以任意两个因素为考察对象,其他因素选取响应面设计中 0 水平对应的值,利用 Design-Expert.V 8.0.6 绘制两因素之间交互作用的等高线图和 3D 响应曲面图,见图 6。响应面坡度的陡峭程度直观地反映了各因素对响应值的影响,响应面坡度陡峭,说明因素对响应值的影响较大,反之,响应面坡度平缓,说明因素对响应值的影响教小^[24]。在响应面等高线图中,曲线离中心越近,

对应的响应值也越大。此外,等高线的形状可直观反映出自变量之间交互效应的显著性,等高线形状若呈圆形,表明两个自变量间的交互效应不显著,若等高线的形状呈椭圆形,则表明两个自变量间有显著的交互作用^[25]。BC 等高线为椭圆形,说明浸提温度和浸提时间两因素的交互作用显著,对响应值的影响较大,浸提时间与液料比、浸提温度与液料比、微波功率与液料比、微波功率与浸提时间、微波功率与浸提温度等高线图接近圆形,交互作用不显著,对响应值的影响较小。此外从响应曲面可以看出,浸提时间、浸提温度、微波功率对黄秋葵多糖得率的影响大于液料比,浸提温度对大于浸提时间,浸提时间大于微波功率,这与回归模型的显著性分析一致。

2.2.4 响应优化提取条件及验证试验 利用 Design-Expert.V 8.0.6 软件对各因素进行优化,对回归方程进行求解,获得预测的黄秋葵多糖得率最优的工艺条件是液料比:40.7:1 (mL/g),浸提时间 2.19 h,浸提温度 64 °C,微波功率 310 W。在此条件下,黄秋葵多糖的得率最优值是 17.17%。结合实际情况,将优化工艺条件修正为液料比 40:1 (mL/g),浸提时间 2.2 h,浸提温度 65 °C,微波功率 310 W。并以此为条件对实验模型进行试验验证,得到黄秋葵多糖得率为 17.10%±0.13%,与拟合预测值相差 0.07%,说明该优化响应面模型有效,可靠性好。

2.3 黄秋葵多糖对 α-葡萄糖苷酶活性的影响

α-葡萄糖苷酶抑制剂的降糖机制是通过抑制小肠黏膜上的 α-葡萄糖苷酶的活性,降低寡糖的分解速率,使碳水化合物的消化过程向小肠底部延伸,从而延迟葡萄糖进入血液,降低葡萄糖的总吸收率而

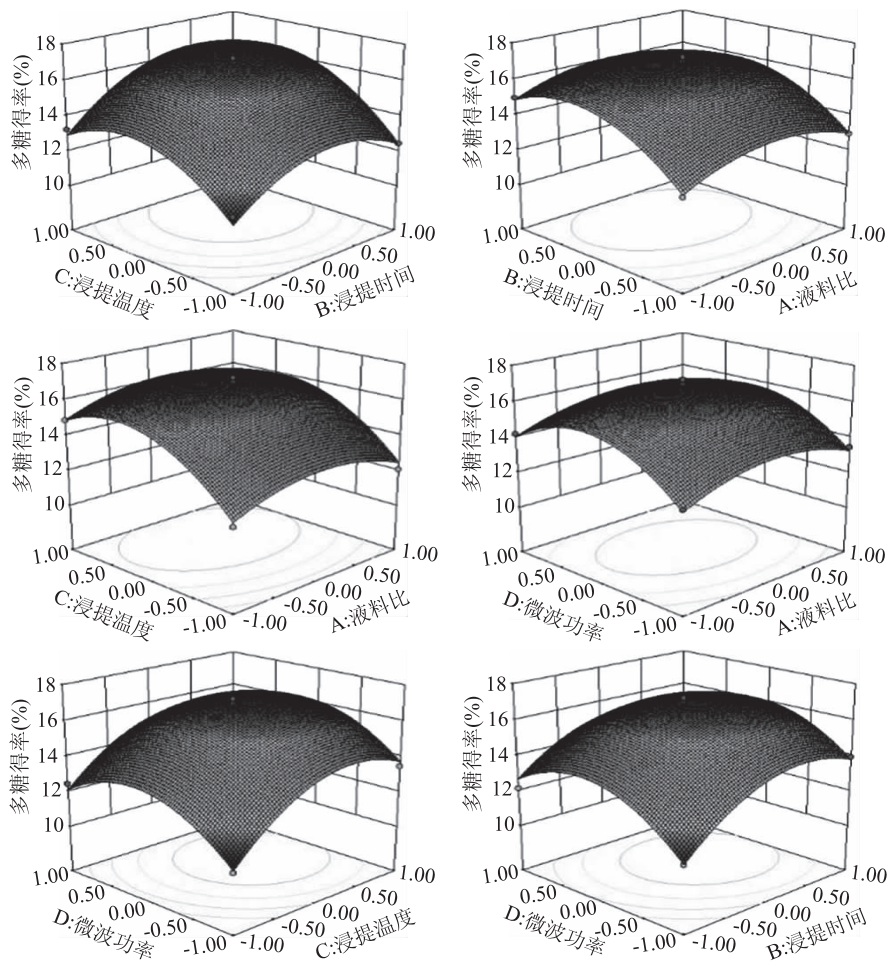


图6 两因素交互作用的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of the interaction of two factors

降低血糖,对餐后高血糖的作用比较明显,是降低餐后血糖升高的最佳策略之一,并且有助于避免晚期糖尿病并发症的发生^[26]。葡萄糖苷酶抑制剂不刺激胰岛素的分泌,单独使用本类药物通常不会引发低血糖,因此有助于减少血糖的波动。目前临床常用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂有阿卡波糖、伏格列多糖等,阿卡波糖是从放线菌的次生代谢产物分离出来的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,对控制餐后血糖的升高有显著疗效,是临床餐后高血糖患者的首选药物^[27]。由表4可以看出黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶有明显的抑制作用,且具有剂量依赖性,随着浓度的增加抑制率明显增强。但同等质量浓度下,黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制率要低于阿卡波糖,且差异显著($P < 0.01$),可能是由于黄秋葵多糖成分复杂,从而在同等质量浓度下影响了抑制率。试验结果表明,黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制活性,可开发为具有降糖功效的膳食补充剂或保健食品,也可通过进一步研究开发成为新的降糖药物。

2.4 黄秋葵多糖对肾上腺素引起高血糖小鼠血糖水平的影响

肾上腺素是肾上腺髓质分泌的一种递质,通过与肝和肌肉细胞膜受体结合,促使肝糖元分解,同时能够抑制胰岛素的释放,减少外周组织对葡萄糖的

表4 黄秋葵多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用Table 4 Inhibitory effect of okra polysaccharide on α -glucosidase

药物	抑制率(%)		
	2 mg·mL ⁻¹	6 mg·mL ⁻¹	10 mg·mL ⁻¹
阿卡波糖	56.22 ± 0.36	72.55 ± 0.34	86.18 ± 0.56
黄秋葵多糖	38.02 ± 0.30 **	45.46 ± 0.42 **	68.26 ± 0.65 **

注:与阿卡波糖比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

摄取,从而升高血糖^[28]。由表5可以看出,连续灌胃7 d后,肾上腺素组小鼠的血糖值为12.67 mmol/L,二甲双胍对照组和黄秋葵多糖各组小鼠血糖值均明显低于肾上腺素组($P < 0.01$),说明黄秋葵多糖对肾上腺素引起的高血糖小鼠的血糖水平有明显的抑制作用。二甲双胍灌胃7 d后血糖值为7.69 mmol/L,黄秋葵多糖低、中剂量组小鼠血糖值分别为9.75和8.78 mmol/L,高于二甲双胍组,且存在极显著差异($P < 0.01$),多糖高剂量组血糖值为8.41 mmol/L,与二甲双胍组比较差异显著($P < 0.05$),说明黄秋葵多糖对肾上腺素引起的高血糖小鼠血糖水平的抑制作用要弱于二甲双胍。以上结果表明黄秋葵多糖对肾上腺素引起的高血糖小鼠的血糖水平有明显的抑制作用,且高剂量组抑制作用比较明显,说明黄秋葵多糖具有明显的降低血糖的作用。

表5 黄秋葵多糖对肾上腺素引起高血糖小鼠血糖水平的影响

Table 5 Effects of okra polysaccharide on blood glucose in adrenaline-induced hyperglycemic mice

组别	血糖值 (mmol/L)
空白组	5.41 ± 0.59
肾上腺素组	12.67 ± 0.62
肾上腺素 + 二甲双胍组	7.69 ± 0.87 **
肾上腺素 + 多糖低剂量组	9.75 ± 0.93 **##
肾上腺素 + 多糖中剂量组	8.78 ± 0.64 **##
肾上腺素 + 多糖高剂量组	8.41 ± 0.78 **#

注:与肾上腺素组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;与二甲双胍组比较,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$ 。

3 结论

本实验采取缓冻协同微波提取的方法,通过单因素试验考查不同因素对黄秋葵多糖得率的影响,确定合适的提取条件,通过响应面实验设计优化黄秋葵多糖的提取工艺,得出黄秋葵多糖的最佳提取工艺条件是缓冻时间 16 h,液料比 40:1 (mL/g),浸提时间 2.2 h;浸提温度 65 °C,微波功率 310 W,在此条件下,黄秋葵多糖的得率可达到 17.17%,且黄秋葵多糖得率的影响因素依次是浸提温度 > 浸提时间 > 微波功率 > 液料比。黄秋葵多糖能明显降低肾上腺素引起高血糖小鼠血糖水平,通过抑制 α -葡萄糖苷酶,延缓碳水化合物的吸收,使血糖不会集中在小肠的上端吸收而使血糖急剧增加,改善餐后血糖的高峰,降低糖尿病患者餐后血糖,同时有助于降低晚期糖尿病患者的并发症。黄秋葵多糖其它方面的降血糖机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 钱文文,辛宝,杨燕.黄秋葵的营养保健功能及开发应用前景[J].现代中医药,2016,36(5):112-115.

[2] Panneerselvam K, Ramachandran S, Sabitha V, et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2011, 3(3):397.

[3] Wang H, Chen G, Ren D D, et al. Hypolipidemic activity of okra is mediated through inhibition of lipogenesis and upregulation of cholesterol degradation [J]. Phytotherapy Research, 2014, 28(2):268-273.

[4] 钟雨,闫明珠,张泽生,等.黄秋葵水提物抗运动疲劳作用研究[J].食品科技,2015,40(7):221-225.

[5] 黄阿根,陈学好,高云中,等.黄秋葵的成分测定与分析[J].食品科学,2007,28(10):451-455.

[6] Xie J H, Jin M L, Morris G A, et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(Suppl 1):S60-S84.

[7] 李翠丽,王炜,张英,等.中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J].中国药房,2016,27(19):2700-2703.

[8] 施伟梅,张颖豪,邓龙华,等.超声波-超低温冻融法提取紫花苜蓿多糖的工艺优化[J].粮食与油脂,2019,32(4):

85-89.

[9] 向东,赖凤英,梁平.植物性多糖的强化提取[J].食品与发酵工业,2004,30(5):81-84.

[10] 李超柱,李慧,陈艳辉,等.缓冻协同微波提取甘薯多糖的工艺研究[J].食品科技,2013,38(2):187-191.

[11] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J].中华糖尿病杂志,2014,6(7):447-498.

[12] Joshi S R, Standl E, Tong N W, et al. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: An evidence-based review [J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2015, 16(13):1959-1981.

[13] Ceriello A, Genovese S. Atherogenicity of postprandial hyperglycemia and lipotoxicity [J]. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, 2016, 17(1):111-116.

[14] Priscilla D H, Roy D, Suresh A, et al. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats [J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 210:77-85.

[15] Proença C, Freitas M, Ribeiro D, et al. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: An *in vitro* and *in silico* structure-activity relationship study [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2017, 32(1):1216-1228.

[16] Wang Y F, Wang J, Wu J, et al. *In vitro* antioxidant activity and potential inhibitory action against α -glucosidase of polysaccharides from fruit peel of tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2014, 15(2):173-180.

[17] 张义晖,田丽萍,薛琳,等.打瓜干皮中多糖的含量测定及降血糖作用机制[J].医药导报,2017,36(5):477-480.

[18] 叶文斌,樊亮.纹党多糖对四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠血糖血脂的影响[J].食品工业科技,2015,36(20):359-363.

[19] 施伟梅,张颖豪,邓龙华,等.超声波-超低温冻融法提取紫花苜蓿多糖的工艺优化[J].粮食与油脂,2019,32(4):85-89.

[20] 于睿,李层层,鲁慧,等.响应面优化酶法提取鹰嘴豆多糖及其红外光谱分析[J].食品科技,2016,41(9):204-208,215.

[21] 曾碧玉,苏明华,陈清西,等.响应面法优化葫芦多糖提取条件[J].热带作物学报,2016,37(3):615-621.

[22] 陈亮,张炜,陈元涛,等.响应曲面法优化黑果枸杞多糖的超声提取工艺[J].食品科技,2015,40(1):220-227.

[23] 李翠丽,王炜,张英,等.中药多糖提取、分离纯化方法的研究进展[J].中国药房,2016,27(19):2700-2703.

[24] 张丙云,孙莉,黄艳,等.响应面法优化竹叶椒总木脂素的超声提取工艺[J].食品工业科技,2014,35(7):198-201,206.

[25] 刘剑,罗仓学,伍贤密魏丽娜.响应面法优化金花葵籽多糖提取工艺研究[J].食品研究与开发,2018,39(1):25-29.

[26] Kumar V, Prakash O, Kumar S, et al. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes [J]. Pharmacognosy Reviews, 2011, 5(9):19.

[27] 杨文英.葡萄糖苷酶抑制剂类药物治疗临床研究和应用[J].中国实用内科杂志,2014,34(10):939-941.

[28] 于淑池,陈文,杭瑜瑜,等.海南苦丁茶多糖的降血糖功效评价[J].食品研究与开发,2017,38(4):161-164.