

文章编号:1673-1689(2009)03-0342-05

超滤分离癞葡萄水溶性降糖活性物质

袁晓晴¹, 顾小红², 汤坚², 叶婧¹

(1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 采用超滤法从癞葡萄水提取物中初步分离降血糖活性物质。考察了进料流量、操作压力、操作温度及料液质量浓度等工艺参数对超滤过程中膜通量的影响, 并对超滤后两组分的相对分子质量分布及降血糖活性进行了测定。结果表明: 用截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维膜对癞葡萄水提取物进行超滤分离的最适工艺条件为: 进料流量 200 L/h、温度 25 ℃、压力 0.10 MPa、料液质量浓度 20 g/L。超滤有效地将癞葡萄水提取物分成两个组分, 其中相对质量较小的组分具有显著的降血糖活性, 而相对质量较大的组分不具有降血糖活性。

关键词: 癞葡萄; 水提物; 超滤; 分离; 降血糖

中图分类号: TS 201

文献标识码: A

Separation of Aqueous Extract of *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser. with Hypoglycemic Effect by Ultrafiltration

YUAN Xiao-qing¹, GU Xiao-hong², TANG Jian², YE Jing¹

(1. College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China)

Abstract: The preliminary separation of aqueous extract of *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser. with hypoglycemic effect was performed by ultrafiltration. The effect of input flow, operation pressure, operation temperature, concentration of the aqueous extract on flux was investigated. The molecular weight distribution and hypoglycemic effect of fractions obtained by ultrafiltration were compared. The results showed that the optimum conditions of ultrafiltration were concentrations of input flow rate of 200 L/h, temperature of 25 ℃, pressure of 0.10 MPa, concentration of aqueous extract of 20 g/L. The results showed that the fraction with low molecular weight had significant hypoglycemic activity, while the fraction with high molecular weight had no hypoglycemic effect.

Key words: *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser.; aqueous extract; ultrafiltration; separation; hypoglycemic effect

癞葡萄是葫芦科苦瓜属的一个栽培种, 其果实 成纺锤状, 果面呈不规则尖刺状, 长约 4 cm, 宽约 3

收稿日期: 2008-05-18

基金项目: 无锡市产学研合作项目(DY050012)。

作者简介: 袁晓晴(1977-), 女, 江苏泰州人, 工学博士, 讲师, 主要从事功能性食品研究。Email: yxq1977@mail.

zjgsu.edu.cn

cm,果重 25~30 g,未成熟果实呈浅绿色,成熟后为金黄色。癩葡萄水提物具有降血糖作用^[1],考虑到降血糖活性物质可能是热敏性物质,超滤分离技术可以最大限度地保留组分的生物活性并且有利于实现工业化生产,因此作者选择通过超滤对癩葡萄水提物进行初步分离。

超滤的基本原理是在外力的推动下,利用分离膜具有选择性透过的特点,根据被分离物质中各组分的相对分子质量大小的差异,选择相对应的分离膜,实现各组分分离、富集的目的^[2-3]。应用超滤技术分离溶液的过程中,一个关键的问题是膜污染和浓差极化引起的膜通量下降。因此作者研究考察了操作压力、操作温度及料液浓度等工艺参数对超滤过程中膜通量的影响,以确定最适的超滤工艺参数;并对超滤后两组分的相对分子质量分布及降血糖活性进行了测定。

1 材料与方法

1.1 材料

癩葡萄鲜果:无锡市富仁生物科技有限公司提供;四氧嘧啶(Alloxan);Sigma 公司产品;格列本脲片:天津太平洋制药有限公司产品;昆明种小鼠:雄性,体重 18~22 g,上海斯莱克实验动物有限公司产品;10 000 的中空纤维聚砜超滤膜(内压式):天津膜天膜工程有限公司产品;所用试剂均为分析纯级。

1.2 主要仪器

超滤装置:天津膜天膜工程有限公司产品;LG-3 型多用冷冻干燥机:宁波市生化仪器厂产品;罗氏血糖监测仪:Roche Diagnostics GmbH 公司产品;Waters 600 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 膜通量的测定 膜通量通常用单位时间内通过单位膜面积的透过液的量来表示。

超滤系统运行稳定后,控制操作参数,如超滤压力、进料流量、操作温度、料液浓度等,取样,记录一定时间的透过液体积,由下式计算膜通量 J ^[4-5]:

$$J = \frac{V}{T \times A}$$

式中, J 为膜通量, $L/(m^2 \cdot h)$; V 为透过液体积, L ; T 为取样时间, h ; A 为膜面积, m^2 。

1.3.2 超滤工艺参数对膜通量的影响 改变进料流量、操作压力、温度、料液质量浓度等工艺参数,考察上述工艺参数对膜通量的影响。

万方数据

1.3.3 超滤分离癩葡萄水提物 在一定的进料流量、操作压力、操作温度和料液质量浓度下,选用截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维膜进行超滤,分别收集浓缩液和透过液,经旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,保存备用。

1.3.4 超滤后两组分相对分子质量分布测定 高效液相色谱:Waters 600 高效液相色谱仪;色谱柱:TSKgel 2000 SWXL 300 mm×7.8 mm;检测波长:UV220 nm;流动相: $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{三氟乙酸})=45:55:0.1$;流量:0.5 mL/min;柱温:30℃;相对分子质量校正曲线所用标准品:细胞色素 C(12 500);抑肽酶(6 500);杆菌酶(1 450);乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(451);乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(189)。

1.3.5 四氧嘧啶糖尿病小鼠模型的建立 小鼠适应性喂养 4 d 后禁食(不禁水)18 h,然后腹腔注射四氧嘧啶 200 mg/kg(临用前配成质量分数 1% 四氧嘧啶溶液)^[6],一周后通过尾静脉取血测量血糖值,选血糖值在 12~25 mmol/L 的糖尿病小鼠,作为四氧嘧啶型糖尿病小鼠模型。

1.3.6 超滤后两组分对四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖的影响 小鼠禁食 12 h 后,随机分成 5 组,每组 12 只。空白对照组和模型对照组灌胃给予生理盐水。给药组分别灌胃给予待测组分和阳性对照药格列本脲片。用血糖监测仪分别测量给药前、给药后 2 h 和 4 h 后的血糖值。

1.3.7 统计方法 数据用 $\bar{x} \pm S. D.$ 表示,使用学生氏 t 检验(两尾)计算显著性。 P 值小于 0.05 认为是统计学显著。

2 结果与讨论

根据 Darcy 定律过滤模型,膜通量可表示为^[7]:

$$Jv = A\Delta p \quad (1)$$

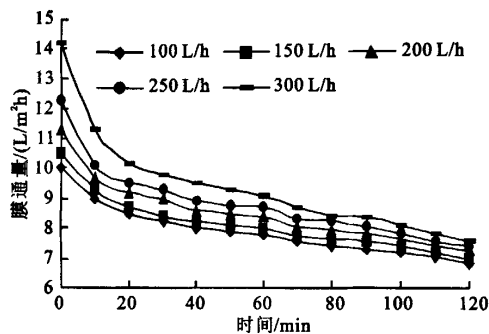
式中, Δp 为膜两侧的压差; A 为渗通常数,与膜的孔隙率、孔径和孔径分布等膜结构特征以及料液粘度等因素有关。因此,在超滤过程中,影响膜通量的因素主要有操作压差、操作温度、进料流量、料液浓度等。

2.1 进料流量对膜通量的影响

增大进料流量,有利于提高膜通量,因为料液流量的增加,增大了膜面的剪切力,加快了大分子物质离开膜面的速度,从而减轻了浓差极化和凝胶层的形成带来的不利影响。

在改变进料流量而保持其他条件相同的情况下,对癩葡萄水提物进行超滤处理。对比不同进料

流量时膜通量随时间的变化,结果如图1所示。由图可知,在超滤刚开始时,进料流量大小对膜通量的影响较为显著,但到超滤后期,进料流量大小对膜通量的影响较小。这可能是因为流量较大时,溶质和溶剂的扩散速度较快,被截留的大分子溶质在一定的驱动力下将随溶液流动形成回流,而不易于在膜表面形成堆积使得膜孔阻塞,而且浓差极化层的厚度减小,从而减轻了浓差极化现象带来的不利影响。然而,随着超滤的不断进行,被截留的大分子溶质将不断增多,部分膜孔完全或部分被大分子溶质阻塞,而使得膜有效面积逐渐减小,当膜有效面积减小到一定值时,即使进一步增大流量也不能达到提高膜通量的目的。由图1可知,在同一时间点,膜通量随进料流量的增加而上升。因此,在实际生产中,采用较高的进料流速有助于提高效率。作者选用200 L/h进料流速对癯葡萄水提物进行超滤。



$\Delta P = 0.08 \text{ MPa}$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 料液初始质量浓度 = 20 g/L

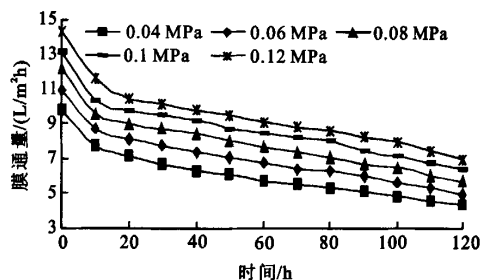
图1 进料流量与膜通量的关系

Fig. 1 Relationship between input flow rate and the flux

2.2 超滤压力对膜通量的影响

在改变操作压力而保持其他条件相同的情况下,对癯葡萄水提物进行超滤处理。对比不同操作压力下膜通量随时间的变化,结果如图2所示。从图中可以看出,随着操作压力的增加,膜通量逐渐上升。同一操作压力下,膜通量随着超滤时间的延长而逐渐下降。从式1可知,如果渗透常数 A 恒定,那么膜通量与膜两侧的压差成正比,而事实上, A 与超滤过程的多种因素有关,不仅不同操作条件下相应的 A 值不同,即使操作条件相同,不同超滤阶段内的 A 值也必定不同。然而,式1仍然可以说明膜通量与膜两侧的压差成正相关关系,图2的实验结果与该式相符,在其他条件相同的情况下,操作压力越大,膜通量也越大。但操作压力越大,导致超滤膜产生形变、膜孔堵塞等损伤的可能性越大,对膜的使用寿命的影响越大,不利于膜长期反复使用,而且考虑到膜组件所能承受最高使用压力

为0.15 MPa。因此在实际操作时,选用0.08 MPa的操作压力。



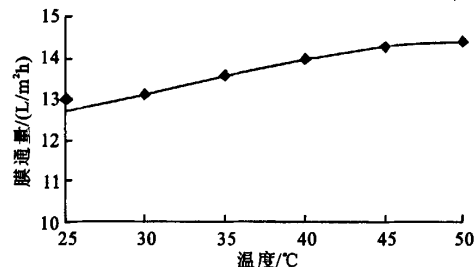
进料流量 = 200 L/h, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 料液初始质量浓度 = 20 g/L

图2 超滤压力与膜通量的关系

Fig. 2 Relationship between pressure and flux

2.3 操作温度对膜通量的影响

在改变操作温度而保持其他条件相同的情况下,对癯葡萄水提物进行超滤处理,结果如图3所示。从图中可以看出,膜通量随着温度的升高而升高,其原因之一在于升高温度使得料液粘度降低。另一原因在于温度升高使得溶质和溶剂的扩散系数增大。溶质的扩散系数增大,尤其是大分子溶质,不仅表现在其透过膜的速率增大,而且返回主体溶液的速率也会增大,从而减少了大分子溶质在膜面的积累,从而大大减弱了浓差极化现象^[8],有利于提高或维持较高的膜通量。在超滤后期,当膜面产生浓差极化现象,此时小分子溶质的透过主要靠扩散作用,扩散系数的增大有助于溶质透过超滤膜。但在实际操作中,考虑到保持提取物的生物活性、防止微生物生长所致的膜污染及节省能源等因素,选择操作温度25 $^{\circ}\text{C}$ 进行超滤。



$\Delta P = 0.08 \text{ MPa}$, 进料流量 = 200 L/h, 料液初始质量浓度 = 20 g/L

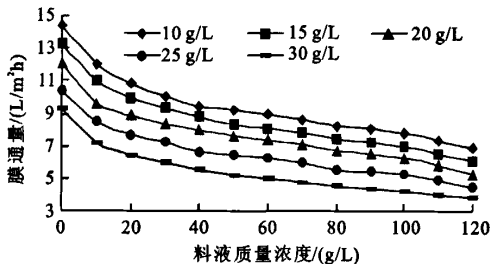
图3 温度与膜通量的关系

Fig. 3 Relationship between temperature and flux

2.4 料液质量浓度对膜通量的影响

在改变料液质量浓度而保持其他条件相同的情况下,对癯葡萄水提物进行超滤处理,结果如图4所示。从图中可知,在其他条件相同的情况下,料液质量浓度越低,膜通量越大,料液质量浓度为10 g/L时的膜通量明显比其他较高料液浓度所对应的

膜通量大,这是因为料液质量浓度很低时,料液的粘度低而在膜管内的流动容易接近于湍流状态,使得大分子溶质不易在膜面形成堆积,即使有部分溶质滞留在膜面,滞留量也是小的,相对于料液质量浓度较高的体系来说,膜厚度的增加不明显,形成浓差极化的程度也较小,从而膜能保持较高的通量^[9]。同时,料液质量浓度升高加强了溶质分子间的相互作用,削弱了溶质分子与膜之间的相互作用力,因而透过阻力增加,膜通量下降^[10]。但是料液质量浓度过低时,仅仅是溶剂(水)通量的提高,溶质(小分子物质)通量反而呈下降趋势,使得膜效能下降^[11]。为提高产量,充分发挥超滤膜的作用,应当适当提高料液质量浓度,对于葡萄水提取物,适合采用 20~25 g/L 的料液浓度。



$\Delta P=0.08\text{ MPa}$, 进料流量=200 L/h, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$

图 4 料液质量浓度与膜通量的关系

Fig. 4 Relationship between sample concentration and flux

2.5 超滤后两组分中多肽的相对分子质量分布

在进料流量 200 L/h、温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、压力 0.08 MPa、料液质量浓度 20 g/L 条件下,对葡萄水提取物进行超滤。考虑到本研究目的产物为具有降血糖活性的肽,因此对超滤后浓缩液(MC1)及透过液(MC2)中多肽的相对分子质量分布进行了测定,结果见图 5 和 6 和表 1。

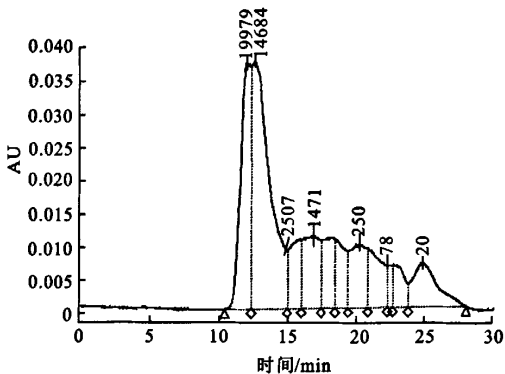


图 5 MC1 中多肽相对分子质量分布图

Fig. 5 Molecular weight distribution of peptides in MC1

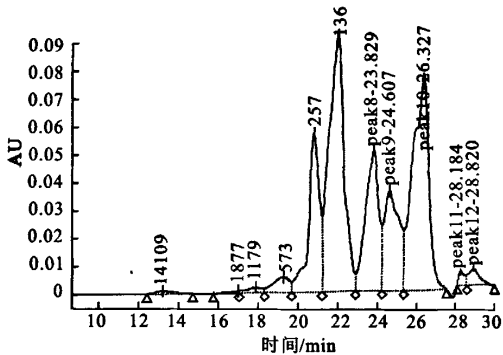


图 6 MC2 中多肽相对分子质量分布图

Fig. 6 Molecular weight distribution of peptides in MC2

表 1 超滤后组分 MC1 和 MC2 中多肽相对分子质量分布的比较

Tab. 1 Comparison of molecular weight distribution of peptides in MC1 and MC2

相对分子质量	MC1 中比例/%	MC2 中比例/%
>10 000	35.41	0.31
10 000~1 000	14.75	1.24
<1 000	49.84	98.25

由表可知,相对分子质量高于10 000的多肽在MC1中的含量远远高于MC2中含量,说明超滤能有效地实现MC1和MC2中肽类物质的分离。

2.6 超滤两组分占原料液的质量分数

按文献[1]提取工艺处理 2 400 g 葡萄鲜果,所得水提取物经超滤处理后,测量超滤后 MC1 和 MC2 占水提取物的质量分数,结果见表 2。由表可知,MC1 和 MC2 相对水提取物质量分数之和为 91.99%,这是由于超滤过程中膜的吸附以及在膜管路中残留等因素造成样品的损失。

表 2 MC1 和 MC2 占水提取物的质量分数

Tab. 2 Weight ratio of MC1 and MC2 to MCV aqueous extract

水提取物 质量/g	MC1		MC2		回收率/%
	质量/ g	质量 分数/%	质量/ g	质量 分数/%	
60.23	4.51	7.49	50.90	84.51	91.99

2.7 超滤两组分对小鼠血糖浓度的影响

由文献[12]可知,葡萄水提取物经截留相对分子质量为10 000 的超滤膜分离后的大分子物质不具有降血糖作用,而小分子物质具有降血糖作用。由于作者采用的超滤工艺参数与文献[12]有所不同,因此对超滤膜分离所得 MC1 和 MC2 的降血糖

作用进行了进一步的验证。由文献[1]可知,癸葡萄糖水提取物对四氧嘧啶型糖尿病小鼠有降血糖作用,且最佳剂量为 500 mg/kg。由表 2 可知,MC1 和 MC2 占水提物的质量分数分别为 7.5% 和 84.5%。综合考虑这两个因素,在研究 MC1 和 MC2 降血糖功效时,分别选择 100 mg/kg 和 400 mg/kg 剂量。MC1 和 MC2 对四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖浓度的影响见表 3。由表可知,MC1 对糖尿病小鼠血糖浓度没有显著影响;MC2 可显著降低糖尿病小鼠血糖浓度,在给药 2 h 和 4 h 后小鼠血糖值较初始值分别下降了 46.15% 和 52.59%。

3 结 语

1) 研究了进料流量、操作压力、操作温度和料液质量浓度对膜通量的影响。根据结果选择超滤条件为:进料流量 200 L/h、温度 25 ℃、压力 0.10 MPa、料液质量浓度 20 g/L。

2) 超滤有效地将癸葡萄糖水提取物分成浓缩液(MC1)和透过液(MC2)两个组分。动物实验结果表明,MC2 可显著降低四氧嘧啶型糖尿病小鼠的血糖浓度,而 MC1 对血糖浓度影响不显著。

表 3 MC1 和 MC2 对四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖浓度的影响

Tab. 3 Effect of MC1 and MC2 on the blood glucose level in diabetic mice

组别	剂量/ (mg/kg)	血糖值/(mmol/L)		
		0 h	2 h	4 h
空白	—	4.36±	4.23±	4.19±
对照组		0.44	0.58	0.63
模型	—	16.09±	15.33±	14.29±
对照组		3.09	2.29	2.68
MC1	100	15.89±	13.29±	12.63±
		3.21	2.76	2.17
MC2	400	16.01±	8.62±	7.59±
		3.17	1.05 ^b	0.82 ^b
阳性	20	15.95±	8.38±	7.14±
		3.25	0.93 ^a	0.68 ^b

^a $P < 0.05$, 与初始值比较差异显著; ^b $P < 0.01$, 与初始值比较差异极其显著。

参考文献(References):

- [1] 袁晓晴,顾小红,汤坚. 癸葡萄糖水提取物的降糖效果研究[J]. 食品科技, 2007, 32(1): 215—218.
YUAN Xiao-qing, GU Xiao-hong, TANG Jian. Antihyperglycemic effect of aqueous extract from *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. on alloxan-induced rat[J]. **Food Science and Technology**, 2007, 32(1): 215—218(in Chinese)
- [2] 张晓楠,郭立安. 超滤在蛋白质纯化中的应用[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(2): 97—98.
ZHANG Xiao-nan, GUO Li-an. Application of ultrafiltration to the purification of proteins[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 1999, 20(2): 97—98(in Chinese)
- [3] Alvisé ND, Lesueur-Lambert C, Fertin B. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 27: 286—294.
- [4] 时钧,袁权. 膜技术分离手册[M]. 北京:化学工业出版社,2001.
- [5] 刘荣娥. 膜分离技术[M]. 北京:化学工业出版社,1998.
- [6] 郑建仙. 功能性食品[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [7] 任建新. 膜分离技术及其应用[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [8] 华耀祖. 超滤技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [9] Rao A, Shallo HE, Ericson HE, et al. Characterization of soy protein concentrate produced by membrane ultrafiltration [J]. **Journal of Food Science**, 2002, 67(4): 1412—1418.
- [10] Shallo HE, Rao A, Ericson AP, et al. Preparation of soy protein concentrate by ultrafiltration [J]. **Journal of Food Science**, 2001, 66(2): 242—246.
- [11] 龙晓丽. 红三鱼蛋白水解物的制备及分离技术的研究[D]. 广州:华南理工大学,2004.
- [12] 袁晓晴,顾小红,蒋再良,等. 癸葡萄糖降糖活性成分的提取及其降糖活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 30—31.
YUAN Xiao-qing, GU Xiao-hong, JIANG Zai-liang, et al. Study on extraction of active extract and its hypoglycemic activity of *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser[J]. **Food Research and Development**, 2006, 27(3): 30—31(in Chinese)

(责任编辑:朱明)