

铁钉菜水提醇沉上清液部分的抗氧化、抗酪氨酸酶活性及其冲剂的降糖作用

黄晓冬^{1,2}, 黄世英^{1,3}, 蔡建秀¹, 王玲平¹, 孙波¹, 谢秋燕¹

(1. 泉州师范学院 海洋与食品学院, 福建 泉州 362000; 2. 华侨大学 福建省分子医学重点实验室, 福建 厦门 361021; 3. 福建省海洋藻类活性物质制备与功能开发重点实验室, 福建 泉州 362000)

摘要: 为探讨海藻铁钉菜提取物的抗氧化、抗酪氨酸酶活性与降糖作用, 作者采用 DPPH、羟基自由基清除体系测定铁钉菜水提醇沉上清液部分(SWEAPI)的抗氧化活性, 采用多巴色素法测定其抗酪氨酸酶活性, 并以可溶性淀粉、甜蜜素、 β -环状糊精为辅料, 采用正交实验设计的优化条件制备铁钉菜固体冲剂; 通过体外 α -葡萄糖苷酶活性抑制实验与体内四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型, 研究该冲剂的降血糖作用。结果表明: SWEAPI 具有较强的自由基清除能力与抗酪氨酸酶活性, 其 DPPH 自由基清除的半效应质量浓度 EC_{50} 为 1.19 mg/mL, 羟基自由基清除的 EC_{50} 为 5.08 mg/mL, 酪氨酸酶活性抑制的半效应质量浓度 IC_{50} 为 1.27 mg/mL; 这可能与较高的多酚含量(8.30%)有关。采用 SWEAPI: 可溶性淀粉: 甜蜜素: β -环状糊精为 30:60:1:7.5 的配比进行铁钉菜冲剂制备可获得较好的产品质量, 冲剂的水分质量分数 $\leq 10\%$ 、总糖质量分数约为 18.74%、蛋白质质量分数 16.60%、多酚质量分数 2.53%。该冲剂具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 半效应质量浓度 IC_{50} 为 0.37 mg/mL。口服冲剂 14 d 后, 与模型组比较, 350 mg/kg 的使用剂量时可极显著降低糖尿病小鼠血糖, 糖耐量实验进一步证实其可以在短时间内降低餐后血糖, 总体上, 其降糖效果与阳性药物二甲双胍处理组(500 mg/kg)相近。可见, SWEAPI 具有较强的抗氧化活性、抗酪氨酸酶活性与降糖作用, 具有开发成海藻源护肤品、降糖功能产品的潜在应用价值。

关键词: 铁钉菜; 水提醇沉上清液部分; 抗氧化; 抗酪氨酸酶; 冲剂; 降血糖

中图分类号: TS218; R931.7; Q914.82 文章编号: 1673-1689(2019)11-0144-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.020

Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities of Supernatants from Water Extracting-Alcohol Precipitation of *Ishige okamurai* and Hypoglycemic Effect of Its Granules

HUANG Xiaodong^{1,2}, HUANG Shiyong^{1,3}, CAI Jianxiu¹, WANG Lingping¹, SUN Bo¹, XIE Qiuyan¹

(1. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China; 2. Fujian Key Laboratory of Molecular Medicine (Huaqiao University), Xiamen 361021, China; 3. Province Key Laboratory for the Development of Bioactive Material From Marine Algae, Quanzhou 362000, China)

收稿日期: 2017-01-13

基金项目: 福建省自然科学基金海洋经济发展专项重点项目(2014N0017); 泉州市科技计划项目(2014Z129); 福建省分子医学重点实验室开放研究课题项目(600005-Z17X0043)。

作者简介: 黄晓冬(1973—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事生物活性物质与资源植物学方面的研究。E-mail: hxd602@163.com

引用本文: 黄晓冬, 黄世英, 蔡建秀, 等. 铁钉菜水提醇沉上清液部分的抗氧化、抗酪氨酸酶活性及其冲剂的降糖作用[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 144-150.

Abstract: The study aimed to investigate the antioxidant, anti-tyrosinase, and hypoglycemic activities of the extracts from *Ishige okamurai*. The antioxidant activities of the supernatants from water extracting-alcohol precipitation of *Ishige okamurai* (hereafter, referred to as simply SWEAPI) were determined by the DPPH and hydroxyl radical scavenging system, its anti-tyrosinase activity was determined by the dopachrome method. Using SWEAPI as basic material and soluble starch, sodium cyclamate, and β -cyclodextrine as auxiliary materials, the granules were prepared by the optimization conditions from orthogonal experiment. The hypoglycemic effects of granules were studied by *in vitro* α -glycosidase enzyme activity inhibition experiment and *in vivo* alloxan-induced diabetic mice. The results show that EC_{50} of DPPH scavenging is 1.19 mg/mL, EC_{50} of hydroxyl radical scavenging is 5.08 mg/mL, and IC_{50} of tyrosinase inhibition is 1.27 mg/mL. These phenomena are related to its higher polyphenol content (8.30%). When the granules are made by the optimization conditions with the 30:60:1:7.5 ratio of SWEAPI:soluble starch:sodium cyclamate: β -cyclodextrine, it has the best product quality with content of water ($\leq 10\%$), total sugar (18.74%), protein (16.60%), and polyphenol (2.53%). The granules have strong inhibitory activity against α -glycosidase enzyme with IC_{50} of 0.37 mg/mL. Compared with the model control group, the granules could significantly reduce the blood glucose level of diabetes mice after 14 days of treatment with oral dose of 350 mg/kg. The granules also could reduce postprandial blood glucose level in a short time by the results of glucose tolerance experiment, which are similar to positive drug metformin at dose of 500 mg/kg. In conclusion, SWEAPI has strong antioxidant, anti-tyrosinase, and hypoglycemic activities with potential applications in skin care products and hypoglycemic functional products.

Keywords: *Ishige okamurai* Yendo, supernatants from water extracting-alcohol precipitation, antioxidant activity, anti-tyrosinase, granules, hypoglycemic

大型海藻资源丰富,自古以来是沿海居民药食两用的食材。分布在我国东南沿海中、高潮带岩礁的褐藻铁钉菜(*Ishige okamurai* Yendo)系北太平洋西部特有的可食海藻,其甲醇提取物具有较高的多酚含量,甲醇提取物的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水等5个萃取部分均具有一定的抗氧化活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[1-2],80%甲醇提取物可通过改变肝葡萄糖代谢酶活性、改善胰岛素抵抗起到降血糖的作用^[3]。考虑提取成本与应用安全性的因素,结合前期铁钉菜甲醇提取物水部位有抗氧化与 α -葡萄糖苷酶抑制活性的基础上,作者设计以水提醇沉法提取获得铁钉菜水提醇沉物与水提醇沉上清液部分,在初步比较两者相关活性的前提下,选取水提醇沉上清液部分进行抗氧化、抗酪氨酸酶活性研究,并进行冲剂制备与体内外降糖活性检测,旨在为铁钉菜水提醇沉上清液部分的开发应用提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 铁钉菜水提醇沉上清液部分的制备

新鲜铁钉菜藻体采自福建泉州围头半岛海域中、高潮带岩礁,藻体剔除异物,清洁海水洗除杂质,组织粉碎机粉碎后,按料液比(1 g:30 mL)加蒸馏水,90~100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴提取两次,每次2 h,抽滤后取滤液减压浓缩(-0.09 MPa,65 $^{\circ}\text{C}$)至一定体积,加入无水乙醇使体系中乙醇体积分数为75%,4 $^{\circ}\text{C}$ 醇沉24 h后,4 000 r/min离心5 min得上清液与醇沉物。上清液减压浓缩(-0.09 MPa,65 $^{\circ}\text{C}$),冻干后制得铁钉菜水提醇沉上清液部分(supernatants from water extracting-alcohol precipitation of *Ishige okamurai*,以下简称SWEAPI)。

1.2 SWEAPI的抗氧化活性测定

参照刘冬冬等^[4]的方法测定DPPH自由基清除活性,以维生素C作为阳性对照;参照黄晓冬等^[5]的

方法测定羟基自由基清除活性,以2,6-二叔丁基对甲酚BHT为阳性对照。以样液浓度对清除率拟合回归方程,求得半数效应质量浓度 EC_{50} 。

1.3 SWEAPI的抗酪氨酸酶活性测定

参照石嘉悻^[9]的方法略加修改。具体步骤为:取1.0 mL样液,0.4 mL 100 U/mL酪氨酸酶溶液(50 mmol/L pH 6.8磷酸盐缓冲液PBS配制),2.8 mL 0.5 mmol/L多巴(L-DOPA)底物溶液,充分混匀后37℃水浴保温10 min,测波长475 nm处的吸光度值,实验重复3次,取平均值。

酶活性抑制率的公式:

$$I\%=[1-(A_s-A_b)/(A_0-A_1)] \times 100\%$$

式中: A_s 为样液组的吸光度值; A_0 为空白对照组(以PBS代替样液)的吸光度值; A_1 为空白对照组背景吸光度值(以PBS代替样液与酪氨酸酶溶液); A_b 为样液背景吸光度值(以PBS代替酪氨酸酶溶液)。

以样液质量浓度对抑制率拟合回归方程,求得半数抑制质量浓度 IC_{50} 。

1.4 铁钉菜冲剂的制备工艺条件优选与质量评价

1.4.1 制备工艺 SWEAPI与一定比例的可溶性淀粉、甜蜜素、 β -环状糊精混合后,稍加适量95%乙醇,制成捏可成团、压可散开的软材,过40目药筛制粒,制粒后80℃干燥、整粒、紫外灭菌、密封包装。

1.4.2 正交试验设计 以SWEAPI与可溶性淀粉、甜蜜素、 β -环状糊精的比例用量为因子,设置三个水平进行按 $L_9(3^4)$ 正交设计与实验,因子水平见表1。实验结果参考全山丛等^[7]的评分方法进行综合评价,根据制粒难易程度、溶化性、溶化后固形物残留量、味觉、感官性状等分别等级评分,各项评分按权重折算求总分,以此作为正交优选的考察指标,各项评分指标与等级标准见表2。

表1 制粒工艺试验因子水平表

Table 1 Granulating process test factors and levels of orthogonal experiment

水平	因子		
	A SWEAPI:可溶性淀粉/g:g	B SWEAPI:甜蜜素/g:g	C β -环状糊精:SWEAPI/g:g
1	1:2	30:1	15:100
2	1:2.5	40:1	25:100
3	1:3	50:1	35:100

表2 评分标准与权重

Table 2 Grading standard and proportion

评价指标	等级标准	权重/%
制粒难易程度	根据制粒时材料的混合粘度,过筛难易分为四档:容易制粒记为100分,一般记为90分,难制粒记为80分,很难记为70分。	20
溶化性	将等量固体颗粒加入一定体积的开水中(稍微搅拌),观察其溶化所用时间,按溶化时间长短分级:第I级100分,第II级95分,第III级90,第IV级85分,第V级80份,第VI级75分。	30
固形物残余量	冲溶静置后按杯底固形物残余量的多少分为四档:无或很少记为100分,少记为90分,较多记为80分,很多记为70分。	30
味觉	根据成品味觉即腥味有无和甜度是否适宜分为四个等级:无腥味、甜味适中100分,少量腥味、甜味适中90分,甜味过淡80分,腥味过大或甜味过甜70分。	10
感官	根据冲剂溶液的颜色、浑浊度等分为四档:颜色亮丽、清澈透光为100分,颜色较清澈90分,较浑浊记为80分,浑浊70分。	10

1.4.3 铁钉菜冲剂产品质量的评价 称取0.25 g样品置于盛有250 mL生理盐水的无菌均质杯中,8 000~10 000 r/min均质2 min,制成1:1 000的样品匀液,按GB 4789.2-2010的方法^[8]进行卫生学检查,微生物限量按保健(功能)食品通用标准GB 16740-1997^[9]进行描述;直接干燥法测定水分质量分数^[10];苯酚-硫酸法测定总糖质量分数^[11],结果以葡萄糖计;凯式定氮法^[12]测定冲剂蛋白质质量分数(考马斯亮蓝法^[13]测上清液部分蛋白质质量分数);福林酚法测定多酚质量分数,结果以没食子酸计^[14]。

1.5 铁钉菜冲剂对 α -葡萄糖苷酶活性抑制的测定

α -葡萄糖苷酶抑制活性测定参照Li T等^[15]的方法。在96孔酶标板上依次加入112 μ L 0.1 mol/L PBS (pH 6.8),20 μ L 0.2 U/mL α -glucosidase,8 μ L样液(以二甲亚砜DMSO配制),37℃恒温15 min后加入2.5 mmol/L 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷PNPG 20 μ L,经反应15 min后加入80 μ L 0.2 mol/L的 Na_2CO_3 溶液终止反应,酶标仪405 nm波长下测吸光度值,重复实验3次,取平均值。

酶活性抑制率的公式:

$$I\%=[1-(A_1-A_2)/(A_3-A_4)] \times 100\%$$

式中: A_1 为样液组的吸光度值; A_2 为以PBS代替酶溶液测得的样液组背景吸光度值; A_3 为以DMSO代替样液测得的空白对照组吸光度值; A_4 为以DMSO

代替样液与 PBS 代替酶溶液测得的空白对照组背景吸光度值。

1.6 铁钉菜冲剂对四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型的降糖作用

雄性、体质量(22±1) g 的 SPF 级健康 KM 小鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号为 SCXK(沪)2012-0002)于鼠房适应性喂养 3 d,食量适当,饮水充足,保持鼠房温度 18~20 ℃。3 d 后禁食不禁水 12 h,按 200 mg/kg 剂量腹腔注射 2% 四氧嘧啶溶液(无菌生理盐水配制),随机选取 10 只小鼠作为正常组(NC)腹腔注射等体积的生理盐水。1 h 后恢复正常饮食,3 d 后断尾取血(取血前小鼠禁食不禁水 12 h),血糖仪(三诺安稳 YZBI 湘 004-2012,长沙三诺生物传感技术股份有限公司)测血糖值,隔天再测一次血糖,以血糖值稳定并且大于 11.1 mmol/L 且出现多饮、多食、多尿现象的小鼠视为造模成功。

将建模成功的糖尿病小鼠按体质量、血糖值分为 5 组,各组动物血糖平均差值不大于 0.5 mmol/L,每组 10 只,分别记为糖尿病模型对照组(MC)、阳性对照盐酸二甲双胍组(MH,500 mg/kg)、铁钉菜冲剂低剂量组(LI,350 mg/kg)、铁钉菜冲剂中剂量组(MI,700 mg/kg)、铁钉菜冲剂高剂量组(HI,1400 mg/kg)。给药组每天下午 5 时按剂量灌胃给药一次,正常组和模型组每天给予等量的生理盐水,连续 14 d。每 7 天测一次空腹血糖(晚餐后禁食不禁水 12 h,次日早晨 7~8 时测定血糖值)。实验末,参考陈玲玲等^[16]的方法测定糖耐量,即测空腹血糖值后按剂量灌胃 1 次,20 min 后灌胃葡萄糖 2.0 g/kg,测定给葡萄糖后 0.5、1、2 h 的血糖值。

2 结果与分析

2.1 SWEAPI 的抗氧化活性

2.1.1 SWEAPI 对 DPPH 自由基的清除作用 不同质量浓度的 SWEAPI 样液对 DPPH 自由基的清除作用见图 1。在质量浓度 0~2.0 mg/mL 范围内,SWEAPI 对 DPPH 自由基清除的量效关系均随样液质量浓度的增大而增强,2.0 mg/mL 时 DPPH 自由基清除率可达(73.66±1.53)%,剂量-效应呈现极显著的正相关($P<0.01$),满足线性回归方程 $y=36.218x+7.230(R^2=0.9526, P<0.01)$ 。由此方程可计算出 SWEAPI 清除 DPPH 自由基的半效应质量浓度

为 EC_{50} 1.18 mg/mL,与本实验测得的 0.054 mg/mL VC 具有等效作用。

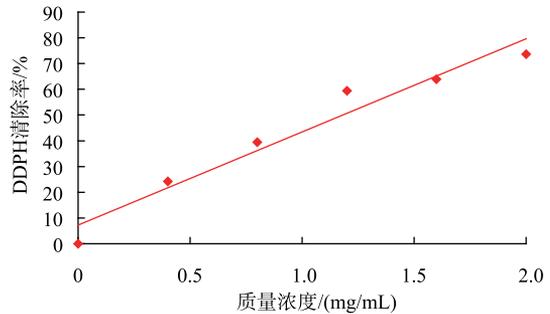


图 1 铁钉菜水提醇沉上清液部分对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 1 DPPH radical scavenging effect of SWEAPI

2.1.2 SWEAPI 对羟基自由基的清除作用 在质量浓度 0~8.0 mg/mL 范围内,SWEAPI 对羟基自由基的清除能力随样液质量浓度的增大而增强,见图 2。量效关系满足 logistic 方程,经拟合并计算出其 EC_{50} 为 5.08 mg/mL,与 3.04 mg/mL 的人工合成抗氧化剂 2,6-二叔丁基对甲酚 BHT 等效。

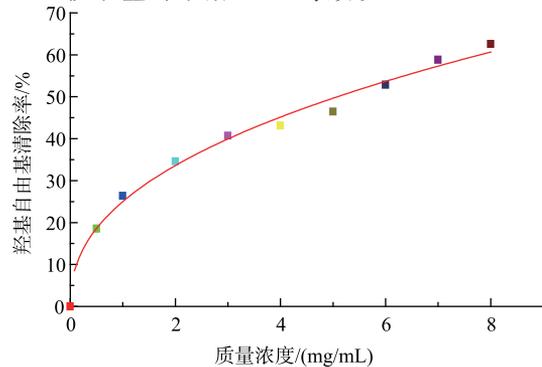


图 2 铁钉菜水提醇沉上清液部分对羟基自由基的清除作用

Fig. 2 Hydroxy radical scavenging effect of SWEAPI

2.2 SWEAPI 的抗酪氨酸酶活性

SWEAPI 对酪氨酸酶活性的影响见图 3。图 3 显示,SWEAPI 具有较强的酪氨酸酶活性抑制作用,在质量浓度为 0.25~6.0 mg/mL 范围内,酶活抑制率为(24.51±2.04)%~(88.37±5.43)%,酶活抑制率随样液质量浓度的增大而增强,呈现极显著正相关的量效关系($P<0.01$),经非线性方程拟合并计算出其对酪氨酸酶活性的半抑制质量浓度 IC_{50} 为 1.27 mg/mL。

2.3 铁钉菜冲剂的制备工艺与产品质量评价

2.3.1 铁钉菜冲剂的制备工艺优化 以 SWEAPI 与可溶性淀粉、甜蜜素、 β -环状糊精的比例用量为因子,设置三个水平进行按 $L_9(3^4)$ 正交设计与实验,实验结果与综合评分见表 3,方差分析见表 4。

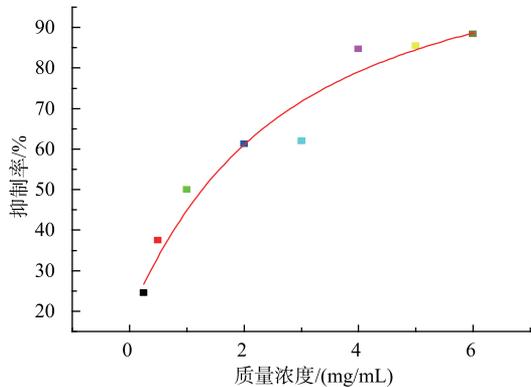


图3 铁钉菜水提醇沉上清液部分对酪氨酸酶活性的抑制作用
Fig. 3 Tyrosinase inhibiting effect of SWEAPI

表3 铁钉菜冲剂制粒工艺正交试验设计与结果
Table 3 Orthogonal experiment design and results of granulation process of *Ishige okamurai* granules

编号	A SWEAPI; 可溶性淀粉	B SWEAPI; 甜蜜素	C β-环状糊精; SWEAPI	综合 分值
1	1	1	1	91
2	1	2	2	92
3	1	3	3	86.5
4	2	1	2	86
5	2	2	3	81.5
6	2	3	1	79.5
7	3	1	3	75
8	3	2	1	74
9	3	3	2	74
\bar{K}_1	90.00	84.17	81.67	
\bar{K}_2	82.33	82.50	84.00	
\bar{K}_3	74.33	80.00	81.00	
R	15.67	4.17	3.00	

表4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	df	F比	F临界值	Sig.
SWEAPI:可溶性淀粉	368.222	2	6 575.393	19.000	*
SWEAPI:甜蜜素	24.389	2	471.232	19.000	*
β-环状糊精:SWEAPI	14.89	2	265.875	19.000	*
误差	0.06	2			

注：“*”示显著水平 $P < 0.05$ 。

由表3~4可以看出，可溶性淀粉，甜蜜素与SWEAPI比例以及β-环状糊精的使用量对冲剂制

备均有显著影响，影响大小依次为 $A > B > C$ ，优化的工艺条件为 $A_1B_1C_2$ ，即SWEAPI与可溶性淀粉比例为1:2，SWEAPI与甜蜜素比例为30:1，β-环状糊精:SWEAPI比例为25:100，也就是SWEAPI:可溶性淀粉:甜蜜素:β-环状糊精为30:60:1:7.5的质量配比。按此工艺条件铁钉菜冲剂制粒容易、溶化性较好、腥味少、甜味适中，具海藻类特有的气味。

2.3.2 铁钉菜冲剂的产品质量指标 实验测得铁钉菜冲剂的含水量约为6.3%，水分要求符合GB/T 29602-2013^[7]固体饮料不高于7%的规定；细菌总数 $\leq 1\ 000$ cfu/mL，符合保健(功能)食品通用标准GB 16740-1997规定的卫生要求；总糖质量分数约为18.74%；凯式定氮法测得蛋白质质量分数16.60% (考马斯亮蓝法测得SWEAPI蛋白质质量分数为21.68%)；多酚质量分数2.53% (SWEAPI多酚质量分数为8.30%)。

2.4 铁钉菜冲剂的α-葡萄糖苷酶抑制活性

铁钉菜冲剂对α-葡萄糖苷酶活性的影响结果见图4。由图4可知，铁钉菜冲剂对α-葡萄糖苷酶活性表现为较强的抑制作用，样液质量浓度0.50 mg/mL时，酶活抑制率可达87.95%，在0.17~0.50 mg/mL的测量质量浓度范围内，量效满足线性回归方程 $y = 269.04x - 50.185$ ($R_2 = 0.977$, $P < 0.01$)，呈现极显著的正相关 ($P < 0.01$)，半抑制质量浓度 IC_{50} 为0.37 mg/mL。

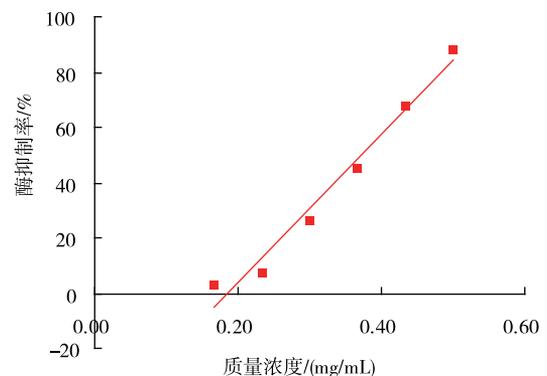


图4 铁钉菜冲剂对α-葡萄糖苷酶活性的抑制

Fig. 4 Inhibitory activity of *Ishige okamurai* granules against α-glucosidase

2.5 铁钉菜冲剂对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的的降糖作用

以四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型研究铁钉菜冲剂的降糖作用，实验结果见表5。由表5可知，与模型组比较，铁钉菜冲剂各剂量组在观测时程7 d与14 d内均有一定的降血糖作用，差异具有极显著的

统计学意义($P<0.01$),并且各剂量组降糖作用与盐酸二甲双胍组的降糖作用差异不具有统计学意义($P>0.05$),14 d时各剂量组间降糖作用差异也不具有统计学意义($P>0.05$),说明铁钉菜冲剂 350 mg/kg 的使用剂量已能有效发挥降血糖效果。

表 5 铁钉菜冲剂对四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型血糖值的影响($n=10$)

Table 5 Effect of Ishige okamurai granules on blood glucose value in alloxan-induced diabetic mice

组别	给药前血糖值/(mmol/L)	给药后血糖值/(mmol/L)	
		7 d	14 d
NC	5.8±1.0	6.0±0.8	5.7±0.7
MC	20.2±3.0	24.3±2.4	24.3±2.2
MH	20.2±3.1	18.7±2.3 ^{##}	16.1±3.8 ^{##}
LI	20.4±3.7	19.8±1.4 ^{##}	16.8±2.9 ^{##}
MI	20.2±3.7	18.5±1.9 ^{##}	15.5±3.8 ^{##}
HI	20.1±3.6	15.6±1.9 ^{##}	14.9±2.7 ^{##}

注:正常对照组(NC),模型组(MC),盐酸二甲双胍组(MH, 500 mg/kg),铁钉菜冲剂低剂量组(LI,350 mg/kg),铁钉菜冲剂中剂量组(MI,700 mg/kg),铁钉菜冲剂高剂量组(HI,1 400 mg/kg)。与MC组比较,## $P<0.01$ 。

一般来讲,在口服葡萄糖后,0.5~1 h时血清葡萄糖水平升高达峰值,2 h后恢复至空腹血糖值。由表 6 可看出,铁钉菜冲剂各剂量组小鼠在口服葡萄糖后的血糖值在每一个时间点均显著低于模型对照组(MC)血糖值($P<0.01$),说明铁钉菜冲剂可以在短时间内降低餐后血糖,并且其降糖效果与阳性药物二甲双胍相近($P>0.05$)。

表 6 铁钉菜冲剂对四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型糖耐量的影响($n=10$)

Table 6 Effect of Ishige okamurai granules on glucose tolerance in alloxan-induced diabetic mice

组别	血糖值/(mmol/L)			
	0 h	0.5 h	1 h	2 h
NC	5.7±0.7	8.7±0.3	7.4±0.4	5.9±0.7
MC	24.3±2.2	26.7±1.1	25.2±0.7	24.6±2.0
MH	16.1±3.8 ^{##}	22.3 ±1.2 ^{##}	19.4±1.4 ^{##}	16.6±2.9 ^{##}
LI	16.8±2.9 ^{##}	21.8 ±2.7 ^{##}	19.3 ±2.2 ^{##}	17.1±2.6 ^{##}
MI	15.5±3.8 ^{##}	21.8±2.2 ^{##}	18.8±2.7 ^{##}	16.0±3.2 ^{##}
HI	14.9±2.7 ^{##}	20.5±2.2 ^{##}	17.3 ±2.5 ^{##}	14.8±2.9 ^{##}

注:正常对照组(NC),模型组(MC),盐酸二甲双胍组(MH, 500 mg/kg),铁钉菜冲剂低剂量组(LI,350 mg/kg),铁钉菜冲剂中剂量组(MI,700 mg/kg),铁钉菜冲剂高剂量组(HI,1 400 mg/kg)。与MC组比较,## $P<0.01$ 。

3 结 语

水提醇沉法(水醇法)系指在样品的水提浓缩液中加入乙醇使达不同含醇量,使得某些化学成分在醇溶液中溶解度降低而析出沉淀,固液分离后分别获得水提醇沉物与水提醇沉上清液部分,该法可避免毒性较大有机溶剂的应用,降低后续处理的成本,是精制水提液的简单方法。作者采用水醇法制得铁钉菜水提醇沉物(EWEAPI)与水提醇沉上清液部分(SWEAPI),经 DPPH 自由基清除反应发现,SWEAPI 较之 EWEAPI 具有较强的 DPPH 自由基清除能力,半效应质量浓度 EC_{50} 为 1.19 mg/mL;清除羟基自由基的 EC_{50} 为 5.08 mg/mL,表现出较强的抗氧化活性。研究指出,海藻由于生境的特殊性使其具有与陆岸植物差异较大的化学组成,存在着多糖、多酚等各种抗氧化活性成分,是天然抗氧化剂开发的潜在资源^[8]。SWEAPI 的抗氧化活性可能与其较高的多酚含量(8.30%)有关。多酚的酚羟基结构往往使其具有较强的还原性和自由基捕捉活性,这种活性以及络合酪氨酸酶分子中 Cu^{2+} 的可能性还可使之具有抑制该酶活力的作用^[9]。我们的前期研究已经证实铁钉菜甲醇提取物具有较高的多酚含量与明显的酪氨酸酶抑制作用^[1],本实验中 SWEAPI 亦表现出较强的酪氨酸酶抑制活性,半抑制质量浓度 IC_{50} 为 1.27 mg/mL。酪氨酸酶过量表达与人体雀斑、黄褐斑与老年斑等色素沉着性疾病有关,SWEAPI 的抗氧化、抗酪氨酸酶活性有望使之成为开发海藻源抗氧化型、美白护肤品的良好基料。

海藻在降血糖方面亦有独特的功效,羊栖菜多糖^[20]、多管藻总酚^[21]、海带多糖^[22]、泡叶藻多糖与多酚组分^[23]等均表现出降血糖活性。本实验发现SWEAPI 具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,提示其作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂开发的可行性。研究指出 α -葡萄糖苷酶抑制剂可延缓或阻碍碳水化合物的消化,延迟葡萄糖的吸收,其作用过程温和持久、毒副作用小,为降餐后血糖的首选药物^[2]。因此,我们选择 SWEAPI 与可溶性淀粉、甜蜜素以及 β -环状糊精按比例进行冲剂制备,经正交设计与实验优化出 SWEAPI:可溶性淀粉:甜蜜素: β -环状糊精为质量比 30:60:1:7.5 的铁钉菜冲剂制备工艺,按此工艺条件制粒容易、溶化性较好、腥味降低、甜味适中。该冲剂的体外 α -葡萄糖苷酶半抑制质量浓度 IC_{50} 为 0.37 mg/mL,350 mg/kg 灌胃给药 14 d 对四氧嘧啶

致糖尿病小鼠模型的降糖作用与盐酸二甲双胍组(500 mg/kg)的降糖作用差异不具有统计学意义($P > 0.05$),并且能短时间内降低餐后血糖,这说明铁钉

菜冲剂在长时间和短时间内均能发挥一定的降血糖效果,其原因是否与 α -葡萄糖苷酶抑制、清除自由基、激活胰岛素分泌相关仍需深入的研究。

参考文献:

- [1] CHEN Jingming, HUANG Xiaodong, CAI Jianxiu, et al. Study on antioxidant active fraction from a seaweed, *Ishige okamurai*[J]. **Journal of Minnan Normal University: Natural Science Edition**, 2016, 29(2): 73-79. (in Chinese)
- [2] HUANG Xiaodong, CAI Qiongyao, WANG Yuanhua, et al. Screening of fraction with inhibiting activity against α -glucosidase from *Ishige okamurai* and its inhibition kinetics[J]. **Chinese Journal of Hospital Pharmacy**, 2016, 36(1): 16-20. (in Chinese)
- [3] MIN K H, KIM H J, JEON Y J, et al. *Ishige okamurai* ameliorates hyperglycemia and insulin resistance in C57BL/KsJ-db/db mice[J]. **Diabetes Res Clin Pract**, 2011, 93(1): 70-76.
- [4] LIU Dongdong, TIAN Yaping. Study on the preparation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysis of laver and their comprehensive utilization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(2): 166-172. (in Chinese)
- [5] HUANG Xiaodong, CAI Jingxiu, XU Lixuan, et al. Study on antioxidation effect in vitro and in vivo of total flavonoids from *Inonotus obliquus*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(10): 1062-1068. (in Chinese)
- [6] SHI Jiayi. Inhibitory effect and mechanism of *Prunus mume* flowers extracts on tyrosinase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011, 32(10): 205-208. (in Chinese)
- [7] QUAN Congshan, CHEN Xuejing, WANG Zhongwang. Study on preparation technology of hypoglycemic granule[J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 1999, 21(3): 110-112. (in Chinese)
- [8] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 GB 4789.2-2010. 食品安全标准. 食品微生物学检验. 菌落总数的测定[S]. 2010.
- [9] 中国食品工业标准化技术委员会. 中华人民共和国国家标准 GB 16740-1997 保健(功能)食品通用标准[S]. 1997.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 GB 5009.3-2010 食品安全标准. 食品水分的测定[S]. 2010.
- [11] DENG Weize, TANG Xianfu, GU Xia, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(10): 1101-1106. (in Chinese)
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准 GB 5009.5-2010. 食品安全标准. 食品中蛋白质的测定[S]. 2010.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第2版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [14] MATANJUN P, MOHANMED S, MUSTAPHA N M, et al. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo[J]. **J Appl Phycol**, 2008, 20(4): 367-373.
- [15] LI T, ZHANGXD, SONGY W, et al. A microplate-based screening method for alpha-glucosidase inhibitors[J]. **Chin J Clin Pharm Ther**, 2005, 10(10): 1129-1134.
- [16] CHEN Lingling, LIU Wei, CHEN Jianguo, et al. Studies on glycemia effects of flavonoids in mulberry leaves to diabetic mice[J]. **Strait Pharmaceutical Journal**, 2010, 22(9): 24-27. (in Chinese)
- [17] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准 GB/T 29602-2013. 固体饮料[S]. 2013.
- [18] CHANDINI S K, GANESAN P, BHASKAR N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India[J]. **Food Chemistry**, 2008, 107(2): 707-713.
- [19] LI Hang, ZHAO Guohua, KAN Jianquan, et al. Development about mechanism of natural material inhibiting the tyrosinase[J]. **China Surfactant Detergent & Cosmetics**, 2003, 33(6): 383-386. (in Chinese)
- [20] WANG Bing, LI Jing, MA Shubing, et al. The experimental study of SFP on hypoglycemic effect[J]. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 2000, 75(3): 33-35. (in Chinese)
- [21] LIU Quanwen, ZHANG Ting, LIU Ke, et al. Experimental study on antidiabetic effect of total phenols from *Polysiphonia urceolata* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2007, 38(3): 415-418. (in Chinese)
- [22] WANG Tingxin, WANG Tingxiang, PANG Jiahong. Study on the hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Laminaria japonica* polysaccharides[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**, 2007, 29(1): 99-100. (in Chinese)
- [23] ZHANG J Z, TILLER C, SHEN J K, et al. Antidiabetic properties of polysaccharide- and polyphenolic-enriched fractions from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*[J]. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 2007, 85(11): 1116-1123.