

怀山药硒多糖的制备及其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用

胡燕, 连伟帅, 许美娟, 袁晓晴

(河南牧业经济学院食品与生物工程学院, 郑州 450046)

摘要: 硒化修饰可以提高天然多糖的生物活性。以怀山药多糖 (CYP) 为原料, 采用 $\text{HNO}_3\text{-Na}_2\text{SeO}_3$ 法制备怀山药硒多糖 (Se-CYP), 对其制备工艺和 α -葡萄糖苷酶活性抑制作用进行了研究。单因素试验和正交试验结果表明, 以反应产物的 α -葡萄糖苷酶抑制率为指标时, 最佳工艺条件为: CYP 与 Na_2SeO_3 质量比为 6:4, 硝酸浓度为 1.4%, 反应时间为 10 h, 反应温度为 80 °C。相关性分析结果显示, Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率与其硒含量高度正相关。傅里叶红外光谱结果显示, 硒以硒酯的方式存在于 Se-CYP 中, 其存在形式主要为 $\text{R}_1\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{Se-O-R}_2$ 。不同浓度的 Se-CYP 均对 α -葡萄糖苷酶活性表现出较强的抑制作用, 且浓度越高, 抑制率越高。相同浓度的 Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率高于 CYP。研究结果可以为筛选和制备高活性且绿色安全的 α -葡萄糖苷酶抑制剂提供理论参考。

关键词: 怀山药; 硒多糖; 制备; α -葡萄糖苷酶抑制率

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2023)05-0911-06

Preparation of selenium-polysaccharide from Huaishan yam and its inhibitory effect on α -glucosidase activity

HU Yan, LIAN Weishuai, XU Meijuan, YUAN Xiaoqing

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Animal Husbandry and Economics, Zhengzhou 450046)

Abstract: Selenization modification can improve the biological activity of natural polysaccharides. With Huaishan yam polysaccharide (CYP) as the raw material, selenium-polysaccharide from Huaishan yam (Se-CYP) was prepared by $\text{HNO}_3\text{-Na}_2\text{SeO}_3$ method. The preparation technology and α -glucosidase activity inhibition of Se-CYP were studied. The results of single factor test and orthogonal test showed that, with the α -glucosidase inhibition rate as the index, the optimal conditions were as follows: mass ratio of CYP to Na_2SeO_3 was 6:4, concentration of nitric acid was 1.4%, reaction time was 10 h, and reaction temperature was 80 °C. Correlation analysis showed that the α -glucosidase inhibition rate of Se-CYP was highly positively correlated with the selenium content. FTIR results showed that selenium existed in Se-CYP in the form of selenium ester, and its existence form was mainly as $\text{R}_1\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{Se-O-R}_2$. Different concentrations of SE-CYP all showed strong inhibition on the α -glucosidase activity, and the higher the concentration, the higher the inhibition rate. The α -glucosidase inhibition rate of Se-CYP was higher than that of CYP at the same concentration. These results can provide a theoretical reference for screening and preparing of high activity and safe α -glucosidase inhibitors.

Key words: Huaishan yam; selenium-polysaccharide; preparation; α -glucosidase inhibition

糖尿病已经成为严重威胁人类健康的疾病之一。II型糖尿病的主要危害表现为餐后高血糖引起的并发症, 所以控制高血糖水平成为防治糖尿病的最首要目标。糖尿病人血糖的升高与糖尿病关键酶

α -葡萄糖苷酶的作用密切相关, 因而 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选已成为筛选治疗II型糖尿病药物的热点^[1]。现临床使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂 (阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇) 都存在不同程度的不

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 2021年度河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (212102110340, 212102110342) 和河南牧业经济学院博士科研启动基金 (2020HNUAHEDF003) 共同资助。

作者简介: 胡燕, 博士, 讲师。E-mail: 278266256@qq.com

良反应,容易引起腹胀、腹痛和腹泻等^[2],因此筛选安全有效的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂成为当下研究的热点方向。

现代药理学研究表明山药多糖(CYP)具有显著的降血糖、增强免疫、抗突变、抗肿瘤等作用^[3]。段伟萍等^[4]初步评价了不同产地山药多糖 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结果发现,不同产地山药多糖均对 α -葡萄糖苷酶活性具有抑制作用,并随着多糖浓度的提高,其抑制率随之提高。有研究显示,天然多糖的活性往往不够高,限制了它们的应用,而这种缺陷往往可以通过分子修饰的方法弥补^[5-6]。硒化改性是常见的分子修饰方法之一。多糖分子中含有醛基、羟基、酮基等多种功能性活性基团,可以与其他物质发生反应。硒可以通过化学反应被接枝到多糖分子上^[7]。硒多糖是一种重要的有机硒化合物,具有比单独的硒或多糖更高的生物活性,其生物活性涉及抗氧化、降血糖、增强免疫力、抗癌、抗金属中毒等多方面^[8-10]。有研究表明,山药硒多糖对超氧阴离子自由基清除能力、对羟基自由基的清除能力和对DPPH的清除能力都比山药多糖强^[11],但是有关山药硒多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究目前还鲜见报道。本文采用 HNO_3 - Na_2SeO_3 法对CYP进行硒化修饰,研究Se-CYP的制备及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性,为筛选和制备高活性且绿色安全的 α -葡萄糖苷酶抑制剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试材与试剂

新鲜怀山药,购买自河南省焦作市温县山药种植基地。纤维素酶($1\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、 α -淀粉酶($4\ 000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、 α -葡萄糖苷酶($50\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)、阿卡波糖、4-硝基苯- α -D吡喃葡萄糖苷均为BR,麦克林试剂。 NaOH 、 HCl 等其他化学试剂均为AR,国药化学试剂。

1.2 仪器

BlueStarB 紫外可见分光光度计,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;F98 荧光分光光度计,上海棱光仪器有限公司;WQF-530 红外光谱仪,北京北分瑞利分析仪器有限公司;DSX-9243B51 电热鼓风干燥箱,上海福玛实验设备有限公司;JW-2018H 高速离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 CYP的提取和纯化方法 参照周丽等^[12]的方法并稍加修改。新鲜山药去皮,洗净,切成均匀薄片,冷冻干燥,粉碎过筛备用。准确称取山药粉5 g,添加山药粉质量0.2%的纤维素酶和1%的 α -

淀粉酶,加入100 mL的蒸馏水并调节pH至4~5,在设定温度 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅中提取3 h时间后,上清液在 $4\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心20 min,去沉淀留上清液浓缩,加入4倍的95%乙醇于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中过夜后离心,沉淀即为CYP。称取5 g的CYP溶于纯水中,将氯仿和正丁醇按 $V_{(\text{氯仿})}:V_{(\text{正丁醇})}=5:1$ 混合,即Sevage试剂。加入1 mL Sevage试剂,混合物剧烈振荡均匀后离心,倾出上清液,重复操作到中间层无变性蛋白为止,上清液浓缩干燥得精制的CYP。

1.3.2 Se-CYP的制备方法 参照张春岭等^[13]的方法并稍加修改。将100 mg CYP与20 mL一定浓度的 HNO_3 混合,搅拌使其完全溶解,然后加入一定量的 Na_2SeO_3 ,在一定的温度和时间下进行反应。反应完成后,冷却至 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 左右,调整pH值至5~6,然后 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min。上清液用1 kDa超滤膜透析至检测不到游离 Na_2SeO_3 存在。游离 Na_2SeO_3 用抗坏血酸法进行检测^[14]。将多糖溶液浓缩,冷冻干燥即得到Se-CYP。

1.3.3 单因素试验设计 1) CYP与 Na_2SeO_3 质量比对Se-CYP硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。固定硝酸浓度、反应时间和反应温度不变,调整CYP与 Na_2SeO_3 的比例分别为2:8、4:6、5:5、6:4和8:2,按照1.3.2的方法制备Se-CYP,并对其硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行测定。

2) 硝酸浓度对Se-CYP硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。固定CYP与 Na_2SeO_3 质量比、反应时间和反应温度不变,调整硝酸浓度分别为0.6%、0.8%、1.0%、1.2%和1.4%,按照1.3.2的方法制备Se-CYP,并对其硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行测定。

3) 反应时间对Se-CYP硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。固定CYP与 Na_2SeO_3 质量比、硝酸浓度和反应温度不变,调整反应时间分别为2.0、4.0、6.0、8.0和10.0 h,按照1.3.2的方法制备Se-CYP,并对其硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行测定。

4) 反应温度对Se-CYP硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。固定CYP与 Na_2SeO_3 质量比、硝酸浓度和反应时间不变,调整反应温度分别为50、60、70、80和 $90\text{ }^\circ\text{C}$,按照1.3.2的方法制备Se-CYP,并对其硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行测定。

1.3.4 正交试验设计 以CYP与 Na_2SeO_3 质量比、硝酸浓度、反应时间和反应温度为自变量,反应产

物的硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率为指标, 设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A CYP:Na ₂ SeO ₃ (m/m)	B 硝酸 浓度/%	C 反应 时间/h	D 反应 温度/℃
1	5:5	1.0	6	70
2	6:4	1.2	8	80
3	8:2	1.4	10	90

1.3.5 硒含量的测定 参照王莲芳等^[15]的方法, 利用 3,3'-二氨基联苯胺比色法测定硒含量。

1) 硒标准溶液的配制。准确称取 Na₂SeO₃ 0.5475 g, 用蒸馏水溶解定容至 250 mL, 制备硒含量为 1 g·L⁻¹ 的储备液。临用时稀释为 1 mg·kg⁻¹。

2) 消化液的配制。称取 2.4 g 硫酸铜和 36 g 硫酸钾, 缓慢加入 120 mL 硫酸, 混匀备用。

3) 样品处理。取 1 g 样品至 15 mL 的离心管中, 加入 5 mL 的消化液, 低温消化至溶液绿色透明。冷却后, 将消化液转移至 50 mL 的烧杯中, 将离心管内剩余的样品溶液冲洗干净, 并一起倒入烧杯中, 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 调定 pH 值至 7 左右, 用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中检测。

4) 标准曲线的测定。用移液枪准确吸取 0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 mL 硒标准溶液至 125 mL 的分液漏斗中, 加入蒸馏水至 40 mL, 用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液调至 pH 为 2~3, 再加入 5% EDTA-2Na 溶液, 再加入 0.5% 的 3,3'-二氨基联苯胺溶液 2 mL, 摇匀备用。在黑暗中反应 40 min, 然后取出并用 1 mol·L⁻¹ NaOH 将 pH 调至 7 左右后, 加入 10 mL 甲苯, 用力摇晃 2 min 使分层, 最后取出甲苯层, 在分光光度计 420 nm 波长处测量吸光度值。以硒含量 (μg) 为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线。得到回归方程 $Y=0.011X+0.0002$, $R^2=0.9991$, 线性关系良好。

5) 样品中硒含量的测定。用移液器准确吸取 1 mL 消化后的样品于 125 mL 分液漏斗中, 按照上述标准曲线的测定步骤进行操作。硒含量 X ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 按照公式 (1) 进行计算。

$$X = \rho/W \times m \quad (1)$$

式 (1) 中: ρ 为从标准曲线中查得的硒含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); W 为测定时的样品体积占定容后总的样品体积分数 (%); m 为称取的样品质量 (g)。

1.3.6 α -葡萄糖苷酶抑制率的测定 根据庞小一等^[16]的方法, 在 10 mL 容量瓶中加入 6 units β -葡萄糖苷

酶 0.2 mL, 15 mg·mL⁻¹ 的山药多糖溶液 0.2 mL 摇匀, 置于 37 °C 水浴中保温 25 min。分别加入 2 mmol·L⁻¹ PNPG 溶液 0.1 mL 后, 摇匀, 置 37 °C 水浴中保温 15 min, 取出冷却后, 分别加入 0.5 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 溶液 1 mL, 用纯水定容。分别于 405 nm 波长下测定吸光度 A_1 。用等量的纯水替代山药多糖溶液作为空白组, 其吸光度为 A_0 。其中, α -葡萄糖苷酶抑制率记为 $W(\%)$, 按照式 (2) 进行计算:

$$W = \frac{1 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

1.3.7 傅里叶红外分析 采用邝小贤等^[17]的 KBr 压片法: 准确称取 2 mg 的怀山药硒多糖与 200 mg 干燥的 KBr 研磨使其混合均匀, 制成透明的薄片, 最后用傅里叶红外光谱仪进行扫描。

1.3.8 数据处理 试验结果以 3 次重复测定的平均值 \pm 标准偏差 (SD) 表示。利用 OMNIC 软件进行傅里叶变换红外光谱分析, 利用 Origin 8.5 软件作图和进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 制备条件对 Se-CYP 硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

多糖与亚硒酸钠比例、硝酸浓度、反应时间和反应温度等主要的制备条件对 Se-CYP 硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响见图 1。从图 1 (a) 中可以看出, Se-CYP 中硒含量开始随 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比的增加而增加, 在 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比为 6:4 时硒含量达最大值 (9.61 \pm 0.44) mg·g⁻¹, 随后当 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比继续增大时, 硒含量随之下降。Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率随着 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比增大也呈现先增大后减小的趋势, 在 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比为 6:4 时达最大值 (59.3 \pm 1.85) %。说明当 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比为 6:4 时, 二者反应较充分。

从图 1 (b) 中可以看出, 当 HNO₃ 浓度为 1.2% 时, Se-CYP 硒含量最高, 达 (9.11 \pm 0.43) mg·g⁻¹, α -葡萄糖苷酶抑制率也最高, 达 (56.5 \pm 1.24) %。而当 HNO₃ 浓度低于或高于 1.2% 时, 反应产物的硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率都相对较低。HNO₃ 是该接枝反应的反应助剂, 当 HNO₃ 浓度过低时, 反应不能很好的发生; 而当 HNO₃ 浓度过高时, 可能不利于反应产物的稳定性。

从图 1 (c) 中可以看出, Se-CYP 中硒含量随着反应时间的延长而不断增大, 但是当反应时间超过 6 h 后, 硒含量增大的趋势趋于平缓, 变化不大。在实

验考察范围内,当反应时间达 10 h 时,反应产物硒含量达最大值(9.32±0.55) mg·g⁻¹。而 α-葡萄糖苷酶抑制率随着反应时间的延长呈现先增大后减小的趋势,当反应时间为 8 h 时,其 α-葡萄糖苷酶抑制率达最大值(55.6±2.89)%。而当反应时间进一步延长时,其 α-葡萄糖苷酶抑制率表现为小幅度的下降。可能是因为当反应时间达到一定程度时,CYP 和硒的螯合已经达到饱和,继续高温则会导致 Se-CYP 的结构发生变化,致使活性遭受部分损失^[18]。

从图 1 (d) 中可以看出,Se-CYP 中硒含量随

着反应温度的升高而不断增大。在实验考察范围内,当反应温度为 90 °C 时,反应产物硒含量达最大值(9.25±0.34) mg·g⁻¹。而 α-葡萄糖苷酶抑制率随着反应温度的升高呈现先增大后减小的趋势,当反应温度为 80 °C 时,其 α-葡萄糖苷酶抑制率达最大值(55.8±2.06)%。当温度继续升高时,其 α-葡萄糖苷酶抑制率表现为小幅度下降。适当提高温度有利于硒化反应体系的动能增加,从而提高链反应速率,有利于硒化产物的形成^[19]。但是,过高的温度有可能不利于反应产物的生物活性。

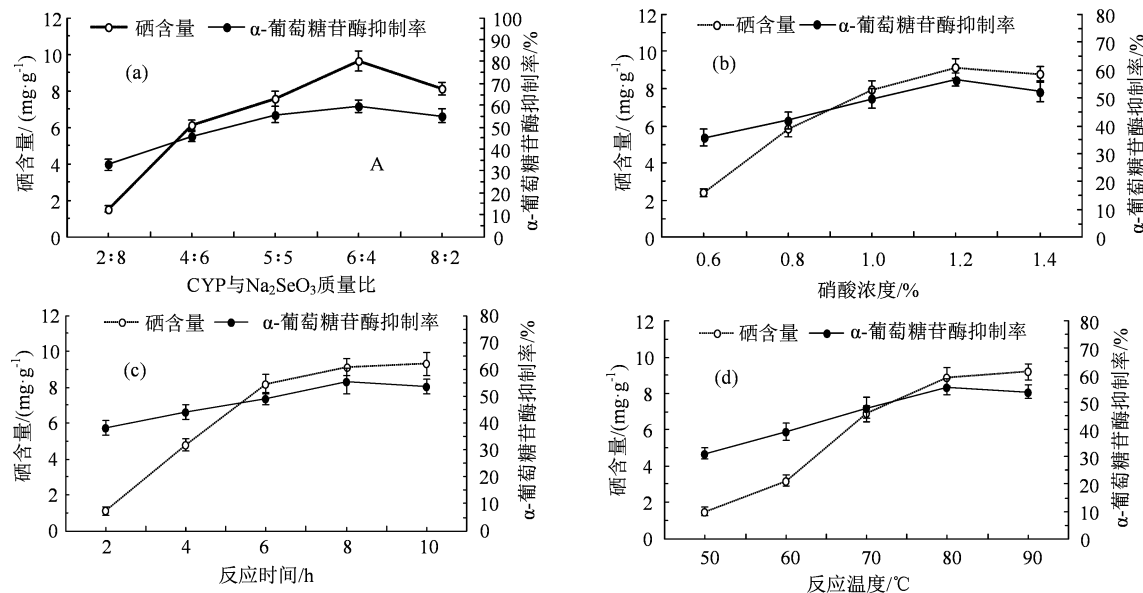


图 1 多糖与亚硒酸钠比例 (a)、硝酸浓度 (b)、反应时间 (c) 和反应温度 (d) 对 Se-CYP 硒含量和 α-葡萄糖苷酶抑制率的影响

Figure 1 Effects of ratio of CYP to Na₂SeO₃ (a), HNO₃ concentration (b), reaction time (c) and reaction temperature (d) on selenium content and α-glucosidase inhibition rate of Se-CYP

表 2 Se-CYP 制备的正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test of extraction of the preparation of Se-CYP

No.	A	B	C	D	硒含量/(mg·g ⁻¹)	α-葡萄糖苷酶抑制率/%
1	1	1	1	1	8.41	54.22
2	2	1	2	2	8.94	56.11
3	3	1	3	3	8.64	53.50
4	1	2	3	2	9.03	56.22
5	3	3	1	2	8.85	56.15
6	2	2	1	3	9.15	57.82
7	3	2	2	1	8.25	53.12
8	2	3	3	1	9.26	59.85
9	1	3	2	3	9.11	56.80
硒含量	K ₁	8.85	8.66	8.80	8.64	A ₂ B ₃ C ₃ D ₃
	K ₂	9.12	8.81	8.77	8.94	
	K ₃	8.58	9.07	8.91	8.97	
	R	0.54	0.41	0.14	0.33	
α-葡萄糖苷酶抑制率	K ₁	55.75	54.61	56.06	55.73	A ₂ B ₃ C ₃ D ₂
	K ₂	57.93	55.72	55.34	56.16	
	K ₃	54.26	57.60	56.52	56.04	
	R	3.67	2.99	1.18	0.43	

2.2 正交试验结果及其分析

Se-CYP 制备的正交试验结果 (表 2) 表明,从

反应产物的硒含量来看,制备工艺中各因素的重要性顺序为:A>B>D>C,即 CYP 与 Na₂SeO₃ 质量

比>硝酸浓度>反应温度>反应时间。最佳工艺为: $A_2B_3C_3D_3$, 即 CYP 与 Na_2SeO_3 质量比为 6:4, 硝酸浓度为 1.4%, 反应时间为 10 h, 反应温度为 90 °C。按此最佳工艺制备的 Se-CYP, 平行 3 次, Se-CYP 硒含量平均为 $(9.58 \pm 0.23) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 高于正交试验中的最大值。从反应产物的 α -葡萄糖苷酶抑制率来看, 制备工艺中各因素的重要性顺序为: $A > B > C > D$, 即 CYP 与 Na_2SeO_3 质量比>硝酸浓度>反应时间>反应温度。最佳工艺为: $A_2B_3C_3D_2$, 即 CYP 与 Na_2SeO_3 质量比为 6:4, 硝酸浓度为 1.4%, 反应时间为 10 h, 反应温度为 80 °C。按此最佳工艺制备的 Se-CYP, 平行 3 次, $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率平均为 $(61.15 \pm 1.15) \%$, 高于正交试验中的最大值。

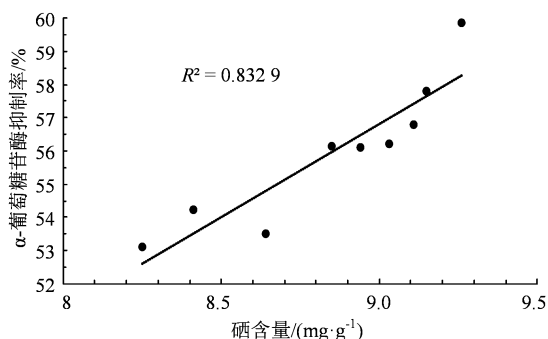


图 2 Se-CYP 硒含量与 α -葡萄糖苷酶抑制率拟合曲线
Figure 2 The fitting curve of the selenium content and α -glucosidase inhibition rate of Se-CYP

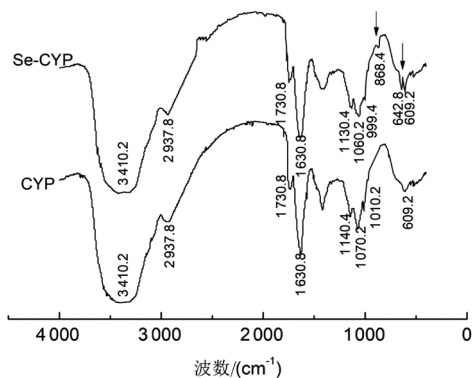


图 3 Se-CYP 与 CYP 的 FT-IR 图谱
Figure 3 FT-IR spectrum of Se-CYP and CYP

对正交试验结果中制备得到的 Se-CYP 的硒含量和 α -葡萄糖苷酶抑制率进行相关性分析, 并进行线性拟合, 结果见图 2。从图 2 中可以看出, 两个变量相关系数 R^2 为 0.8329, 说明 Se-CYP 的硒含量与 α -葡萄糖苷酶抑制率之间高度正相关。因为硒这种元素本身就与糖尿病的高血糖之间存在密切的关系, 有研究称, 补充足量的硒对糖尿病的防治具有重要的意义^[20]。因此, 硒含量越高的 Se-CYP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用表现更为突出。

2.3 Se-CYP 与 CYP 的红外图谱分析

FT-IR 光谱可以用来测定碳水化合物的结构特点^[21]。以硒含量为优化指标, 按照最佳工艺制备的 Se-CYP, Se-CYP 与 CYP 的 FT-IR 图谱见图 3。从图 3 中可以看出, 3200 cm^{-1} 到 3600 cm^{-1} 范围内宽且强的吸收峰可归因为 OH 氢键的伸缩振动, 2937 cm^{-1} 附近的弱吸收峰归因为 C-H 键的伸缩振动, 1730 cm^{-1} 附近的弱吸收峰可归因为糖醛酸羧基的伸缩振动, 说明 Se-CYP 与 CYP 分子结构中存在糖醛酸^[10]。 1630 cm^{-1} 附近的吸收峰可归因为 C=O 键的伸缩振动。与 CYP 的图谱相比较, Se-CYP 图谱中增加了 2 个弱吸收峰, 一个位于 868.4 cm^{-1} 处, 一个位于 642.8 cm^{-1} 处。 868.4 cm^{-1} 处的吸收峰可以归因于硒酯的 Se=O 键的非对称拉伸振动^[22], 而 642.8 cm^{-1} 处的吸收峰可归因于 Se-O-C 的非对称拉伸振动^[23], 说明 CYP 分子被成功的进行了硒修饰。此外, 1140.4 cm^{-1} 、 1070.2 cm^{-1} 和 1010.2 cm^{-1} 吸收峰是吡喃环的特征吸收峰, 与 CYP 相比, Se-CYP 图谱中这 3 个吸收峰都发生了一定程度的红移, 说明硒以硒酯的方式存在于 Se-CYP 中^[24]。综上所述, 推测 Se 在 Se-CYP 中的存在形式主要为 $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{Se}}-O-R_2$ 。Se-CYP 与 CYP 的光谱特性相似, 说明硒化修饰不影响 CYP 的主体结构。

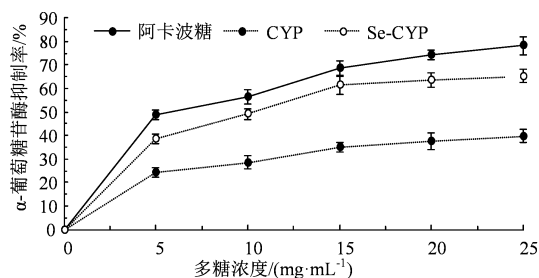


图 4 不同浓度的 Se-CYP 对 α -葡萄糖苷酶活性的影响
Figure 4 Effects of different concentrations of Se-CYP on α -glucosidase activity

2.4 不同浓度的 Se-CYP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

以 α -葡萄糖苷酶抑制率为指标, 按照最佳工艺制备 Se-CYP。分别以 CYP 和阿卡波糖为对照, 测定不同浓度的 Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率, 结果见图 4。从图 4 中可以看出, Se-CYP、CYP 和阿卡波糖都具有抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 且都表现为剂量依赖性, 浓度越高, α -葡萄糖苷酶抑制率越大。相同浓度的 Se-CYP 和 CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率都小于阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶抑制率。相同浓度的 Se-CYP 相比 CYP 表现出更高的 α -葡萄糖苷酶抑制率。当 Se-CYP 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率相比 CYP 高出约 58.7%; 当

浓度为 10、15、20 和 25 mg·mL⁻¹ 时, Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率相比 CYP 分别高出约 73.2%、76.7%、69.1%和 64.5%。这是因为偶联在 Se-CYP 中的 Se 对 CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性有促进作用。因此, Se-CYP 是一个比 CYP 更为优秀的 α -葡萄糖苷酶抑制因子候选物。

3 结论

采用 HNO₃-Na₂SeO₃ 法制备 Se-CYP, 采用单因素试验和正交试验对制备条件进行了优化。以反应产物硒含量为指标时, 最佳工艺条件为: CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比为 6:4, 硝酸浓度为 1.4%, 反应时间为 10 h, 反应温度为 90 °C。按照此最佳工艺制备得到的 Se-CYP 的硒含量可达到 (9.58 ± 0.23) mg·g⁻¹。以反应产物的 α -葡萄糖苷酶抑制率为指标时, 最佳工艺条件为: CYP 与 Na₂SeO₃ 质量比为 6:4, 硝酸浓度为 1.4%, 反应时间为 10 h, 反应温度为 80 °C。按照最佳工艺制备得到的 Se-CYP, 在 15 mg·mL⁻¹ 浓度时其 α -葡萄糖苷酶抑制率可达到 (61.15 ± 1.15) %。相关性分析结果显示, Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率与其硒含量高度正相关。傅里叶红外光谱结果显示, 硒以硒酯的方式存在于 Se-CYP 中, 其存在形式主要为 $R_1-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{Se}}-\text{O}-R_2$ 。不同浓度的 Se-CYP 均对 α -葡萄糖苷酶活性表现出较强的抑制作用, 且浓度越高, 抑制率越高。相同浓度的 Se-CYP 的 α -葡萄糖苷酶抑制率高于 CYP。综上所述, Se-CYP 可作为一种安全高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 用于防治糖尿病的保健食品或者药品的开发。

参考文献:

- [1] VALDES M, CALZADA F, MENDIETA-WEJEBE J. Structure-activity relationship study of acyclic terpenes in blood glucose levels: potential α -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors[J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4020.
- [2] JAKHER H, CHANG T I, TAN M, et al. Canagliflozin review-safety and efficacy profile in patients with T2DM[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*, 2019, 12: 209-215.
- [3] CHENG Z Y, HU M, TAO J, et al. The protective effects of Chinese yam polysaccharide against obesity-induced insulin resistance[J]. *J Funct Foods*, 2019, 55: 238-247.
- [4] 段伟萍, 李新蕊, 司明东, 等. 山药多糖提取工艺的响应面法优化及其功能活性分析[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(7): 118-123.
- [5] HUANG L X, HUANG M, SHEN M Y, et al. Sulfated modification enhanced the antioxidant activity of *Mesona chinensis* Benth polysaccharide and its protective effect on cellular oxidative stress[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 1000-1006.
- [6] WANG Z J, XIE J H, YANG Y J, et al. Sulfated *Cylocarya paliurus* polysaccharides markedly attenuates inflammation and oxidative damage in lipopolysaccharide-treated macrophage cells and mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40402-40413.
- [7] GAO Z Z, CHEN J, QIU S L, et al. Optimization of selenylation modification for garlic polysaccharide based on immune-enhancing activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 136: 560-569.
- [8] QIN T, CHEN J, WANG D Y, et al. Optimization of selenylation conditions for Chinese angelica polysaccharide based on immune-enhancing activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 645-650.
- [9] QIN T, CHEN J, WANG D Y, et al. Selenylation modification can enhance immune-enhancing activity of Chinese angelica polysaccharide[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 95(1): 183-187.
- [10] LIU Y T, SUN J, RAO S Q, et al. Antidiabetic activity of mycelia selenium-polysaccharide from *Catathelasma ventricosum* in STZ-induced diabetic mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62: 285-291.
- [11] 谷娜, 侯艳秋, 郑晓凤, 等. 山药多糖及其硒多糖抗氧化性的比较研究[J]. *微量元素与健康研究*, 2016, 33(5): 41-43.
- [12] 周丽, 邵继红, 任香梅, 等. 淮山药多糖及其衍生物体外抗氧化活性研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(2): 188-191.
- [13] 张春岭, 吴校卫, 陈大磊, 等. 硒化红枣多糖制备工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(22): 241-244.
- [14] YANG J, HUANG J, JIANG K, et al. The research of optimization of preparation process for selenizing *Rhodiola* polysaccharides according to orthogonal test and the character of selenizing *Rhodiola* polysaccharides[J]. *Chin Pat Med*, 2009, 32(6): 1065-1067.
- [15] 王莲芳, 窦春霞, 张连富, 等. 有机物中微量元素硒的测定[J]. *食品与机械*, 2007, 23(1): 115-117, 147.
- [16] 庞小一, 王静, 张慧娟, 等. 燕麦肽的制备、抗氧化性及其对 α -淀粉酶抑制作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(20): 163-168.
- [17] 邝小贤, 张敏婕, 何冠浩, 等. 乳源锌螯合肽酶解制备及其螯合特性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(10): 135-141.
- [18] 张春岭, 吴校卫, 陈大磊, 等. 硒化红枣多糖制备工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(22): 241-244.
- [19] 毛俊龙, 齐贺, 姚玉超, 等. 硒化卡拉胶寡糖的制备及抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2019, 30(11): 84-92.
- [20] HUANG S Y, YANG W J, HUANG G L. Preparation and activities of selenium polysaccharide from plant such as *Grifola frondosa*[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 242(1): 116409-116415.
- [21] SINGTHONG J, NINGSANOND S, CUI S W, et al. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves[J]. *Food Chem*, 2009, 114(4): 1301-1307.
- [22] ZHANG J, WANG F X, LIU Z W, et al. Synthesis and characterisation of seleno-*Cynomorium songaricum* rupr. polysaccharide[J]. *Nat Prod Res*, 2009, 23(17): 1641-1651.
- [23] ZHAO B T, ZHANG J, YAO J, et al. Selenylation modification can enhance antioxidant activity of *Potentilla anserina* L. polysaccharide[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 320-328.
- [24] CHEN W X, CHEN J Y, WU H M, et al. Optimization of selenylation conditions for a pectic polysaccharide and its structural characteristic[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 69: 244-251.