

灵菊七蛋白提取及其降糖活性研究

马科,程源航,苏泽宇

(郑州轻工业大学烟草科学与工程学院,河南郑州450008)

摘要:为了开发降糖药用植物灵菊七,从提取溶剂、加热方式、提取时间、提取温度、料液比5个方面对灵菊七活性蛋白提取工艺进行了研究,并检测了不同工艺获得的提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,通过响应面法优化了提取条件.结果表明,蛋白提取率最高的提取条件为:提取温度62 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间3 h、料液比1:30、提取溶剂PBS缓冲液,蛋白最大提取率可达10.8%;提取液对 α -淀粉酶具有最高抑制率的提取条件为:提取温度59 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间3 h、料液比1:30、提取溶剂PBS缓冲液,最大抑制率为34.49%;浸提液对 α -葡萄糖苷酶具有最高抑制率的提取条件为:提取温度52 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间5 h、料液比1:30、提取溶剂PBS缓冲液,灵菊七浸提液对 α -葡萄糖苷酶的最大抑制率达到16.04%.浸提液对 α -淀粉酶抑制率随着蛋白含量的增加而升高,结合提取液蛋白含量和纯度研究,可以推测灵菊七浸提液含有对 α -淀粉酶具有较好抑制作用的活性蛋白.

关键词:灵菊七;活性蛋白;提取工艺; α -淀粉酶抑制活性

中图分类号:R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-8513(2024)01-0023-08

随着人们回归自然和食疗观念的兴起,糖尿病专属特医食品、功能食品、药膳等的开发和利用得到了人们的认可和重视^[1-5].利用这些新型食品辅助药物治疗,改善糖尿病与并发症、减少病人对药物的依赖,被认为是一种更安全可靠的糖尿病治疗新方式.

灵菊七(*Gynura medica*. Y. K. Yang)是我国学者发现并鉴定的菊三七属新种^[6],民间取其茎叶食用,对糖尿病显示独特疗效.自被发现鉴定以来仅有我国学者对灵菊七降糖作用进行研究.刘莹等^[7-8]首次报道了灵菊七降糖和急性毒研究,证明其有较好降糖功效,且无毒性、安全性高.相关学者通过动物模型(包括链脲佐菌素诱导、高糖高脂饮食诱导、肾上腺素诱导、遗传性等糖尿病模型)、细胞模型(MIN6胰岛细胞)验证了灵菊七水提物具有确切的降糖作用.并且通过安全性研究证明,与同属其他植物相比,其无毒性,安全性高,具有巨大的抗糖尿病药食产品开发潜力^[9-13].

α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分是2种重要的降糖活性成分^[14-16],目前还没有该植物中关于这两类降糖活性成分的研究报道.为了阐明灵菊七降糖活性成分,本文从提取溶剂、加热方式、提取时间、提取温度、料液比5个方面对灵菊七活性蛋白提取工艺进行研究,并检测不同方法获得的提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用.通过以上研究,期望为灵菊七降糖药食产品的开发提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

灵菊七茎叶样品:郑州万田生物科技公司提供,经河南中医药大学药学院生药教研室鉴定为菊科植物灵菊七(*Gynura medica*. Y. K. Yang)的干燥茎叶;DNS试剂、蛋白检测试剂盒、 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶:生工生物工程(上海)有限公司;石油醚、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、吐温20、吐温80、十二烷基磺酸钠(SDS)、可溶性淀粉、阿卡波糖、芸豆蛋白提取物、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、二甲基亚砜:上海麦克林生化科技有限公司.

收稿日期:2022-09-27.

基金项目:国家自然科学基金(32000281).

作者简介:马科(1986-),男,博士,讲师.主要从事新型功能食品开发与研究.

1.2 仪器与设备

DF-101S 水浴锅:巩义于华仪器公司;红外辐射式烘箱:上海一恒科学仪器公司;超声波提取器 BCT-10L:上海利闻科学仪器有限公司;超声波恒温水浴提取器 SCQ-HD300A:上海声彦超声波仪器有限公司;家用型微波炉:中国美的科技有限公司;紫外分光光度计 UV-1800PC:梅特勒托利多科技(中国)有限公司;RE-100-S 旋转蒸发器:德拉布科技有限公司;冷冻干燥机 BILON-FD80AD:上海比朗仪器制造有限公司.

1.3 实验方法

1.3.1 灵菊七样品前处理

取 200 g 干燥的灵菊七根茎,粉碎过 0.077 mm 筛,加入 20 倍体积的 I 类石油醚,50 °C 下浸提 2 h,过滤后的到除去油脂的灵菊七残渣,将残渣在 40 °C 烘箱内干燥除去石油醚.得到干燥的灵菊七样品备用.

1.3.2 灵菊七蛋白提取工艺研究

1) 提取溶剂

选取磷酸缓冲盐溶液(PBS)、水、3%吐温 20、3%吐温 80、5% SDS 作为提取溶剂,提取条件为料液比 30:1、提取温度 60 °C、提取时间 3 h. 根据蛋白提取率来判断出最适的提取溶剂.

2) 提取方式

红外辐射加热法 将样品置于红外辐射式烘箱,在温度 50 °C 下提取 30 min.

微波加热法 将样品置于微波炉中,在设置为中温档下提取 5 min.

恒温水浴加热法 将样品置于水浴锅中,在 50 °C 条件下水浴提取 30 min.

超声提取法 将样品置于超声波恒温水浴,功率 100 W、室温条件下超声 30 min.

超声辅助水浴加热法 将样品置于超声波恒温水浴,在设置功率 100 W、50 °C 条件下超声水浴 30 min.

其它条件与 1) 一致.

1.3.3 灵菊七蛋白提取单因素

料液比 选取 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 5 种料液比. 其它条件与 1) 一致.

提取温度 选取 50、60、70、80 和 90 °C 5 个梯度. 其它条件与 1) 一致.

提取时间 选取 3、4、5、6 和 7 h 5 个梯度. 其它条件与 1) 一致.

1.3.4 响应面实验

本实验以提取时间、提取温度作为连续因子,提取方式作为类别因子,采用 3 因素 4 水平的 BoxBehnken 试验设计(BBD)(表 1),对提取温度(30、40、60、80 °C);提取时间(1、3、5 h)和加热方式(1 水浴、2 超声水浴)进行优化.

1.3.5 灵菊七蛋白质测定方法

1) 蛋白标准曲线的绘制 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白绘制标准曲线,准确称取 1 mg 牛血清蛋白溶于 50 mL 蒸馏水中,即 10 mg/mL 原液,将原液梯度稀释为 1、2、3、4、5 mg/mL. 测定方法参照 BCA 蛋白试剂盒检测,取适量的 A 液和 B 液按照 50:1 体积比充分混匀,配置适量 BCA 工作液,取 20 μ L 标准蛋白和 200 μ L BCA 工作液混匀后,在 37 °C 条件下温水浴 1 h 后于波长 595 nm 下检测吸光度. 通过 Origin 绘制蛋白含量标准曲线.

2) 样品测定 根据相关文献[19]报道,提取结束后,对提取液抽滤,取 20 μ L 上清液,加入 200 μ L BCA 工作液,在 37 °C 条件下温水浴 1 h 后于波长 595 nm 下检测吸光度,

表 1 3 因素 4 水平的 BoxBehnken 试验设计(BBD)

序列号	提取温度/°C	提取时间/h	提取方式
1	60	3	2
2	40	5	2
3	60	3	2
4	80	1	2
5	40	1	1
6	40	5	1
7	60	3	1
8	60	3	2
9	60	5	2
10	80	5	2
11	60	3	1
12	60	1	1
13	80	5	1
14	80	3	2
15	30	3	2
16	60	3	1
17	60	5	1
18	80	3	1
19	30	3	1
20	60	3	1
21	40	1	2
22	80	1	1
23	60	3	2
24	60	1	2
25	60	3	2
26	60	3	1

考虑到灵菊七浸提液颜色较重,以不加显色剂的浸提液为空白对照组排除干扰.将样品组吸光度减去空白对照组吸光度后,带入到上述蛋白含量标准曲线中计算出蛋白浓度.

1.3.6 灵菊七浸提液对 α -淀粉酶抑制率测定方法

将 0.5 g 可溶性淀粉溶解到 100 mL 去离子水中,配置成 0.5 g/mL 溶液,并在 100 °C 条件下让淀粉充分溶解,待到溶液澄清后,室温冷却降温待用;取 0.05 g α -淀粉酶加入到 50 mL 磷酸盐缓冲溶液中,充分溶解,配置成 0.05 g/50 mL 酶溶液,将 50 μ L 酶液与 50 μ L 分离组分在 40 °C 条件下相互作用 1 h,取 100 μ L 混合液加入到 1 mL 淀粉溶液中,混匀后于 40 °C 恒温反应 15 min,取 100 μ L 反应液加入 200 μ L 的 DNS 试剂,反应液于沸水浴中加热 5 min 后取出,并于冰水浴中迅速冷却,取出 100 μ L 加入 900 μ L 水稀释,于波长 540 nm 处测定吸光度.按下式计算:

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, $A_{\text{样品}}$ 为样品反应液吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为以磷酸盐缓冲液代替酶的吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为以磷酸盐缓冲液代替样品的吸光度.

1.3.7 灵菊七浸提液对 α -糖苷酶抑制率测定方法

将 10 mg 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷溶于 100 μ L 二甲基亚砜中,取 10 μ L 上述溶液溶解在 990 μ L 磷酸缓冲盐溶液(0.1 mol/L,pH 6.8)中.取 α -糖苷酶稀释为 0.4 单位/mL.取 80 μ L 酶液和灵菊七浸提液混合在 37 °C 条件下预培养 15 min,添加 40 μ L 底物开始酶促反应,进一步温育 30 min.通过加入 1 mL 0.1 mol/L 的碳酸钠中止酶活,在 405 nm 下测定吸光度.

1.4 浸提液的冻干、复溶与纯化

将 1 L 浸提液放 -20 °C 冷冻 10 h,然后将样品置冷冻干燥机中冷冻干燥,获得冻干物.

取冻干物加入到 10 mL 超纯水中溶解.依次加质量分数为 20%、40%、60% 的硫酸铵,使溶液产生沉淀,沉淀离心并冷冻干燥,获得冻干物.

1.5 数据处理与分析

本次试验中 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率数据均重复 6 次,结果表示均以实验数据的平均值 \pm 标准偏差的形式呈现.采用 Design-Expert 8.0.6、Minitab 进行数据处理;采用 Origin 2021 进行图表绘制.

2 结果与讨论

2.1 提取方法对灵菊七蛋白提取的影响

加热为活性蛋白从植物细胞内扩散到胞外提供能量,促进蛋白的浸出,增加溶出速率和浸出率,并且不同加热方式对提取的影响不同^[17].本文研究了烘箱、微波、水浴、超声、超声水浴 5 种加热方式对提取的影响,结果如图 1A 所示,超声辅助水浴和烘箱的蛋白提取率高于其它.因为在超声的过程中超声产生的空压可以破坏植物细胞膜,利于胞内溶质扩散,从而导致更多的活性蛋白从植物细胞中释放出来^[18];烘箱加热法通过红外线辐射加热使细胞内部的水分快速气化导致细胞破裂,从而促使蛋白从细胞内释放出来^[19],但是对温度需求较高,容易破坏蛋白的结果而导致其失去活性,因此超声辅助水浴是最适的加热方式.

提取溶剂作为蛋白的溶出的媒介对蛋白提取影响较大,不同溶剂对蛋白的溶解能力不同,提取效果差异较大^[20].本文研究了磷酸缓冲盐溶液(PBS)、水、3%吐温 20、3%吐温 80、5% SDS 5 种溶剂对灵菊七蛋白的提取率的影响.结果如图 1B 所示,吐温 80 提取灵菊七蛋白效率最高,其次为 PBS.这是由于吐温 80 作为表明活性剂,使细胞表面张力增大,蛋白更易从细胞中释放出来^[21],但是吐温 80 提取物颜色较深,表明含有较多杂质,且考虑到 PBS 对与活性蛋白有保护作用,因此选用 PBS 作为最适的提取溶剂.

2.2 灵菊七蛋白提取单因素研究

结果如图 2A 所示,随着料液比的增大蛋白提取率逐步增大,料液比达到 30:1、40:1、50:1 后,蛋白提取率缓慢增长,因此选择 30:1 的料液比对最为合适.

如图 2B 所示,40~60 °C 时候随着温度的增加,蛋白提取率增加,因为温度增加时,有利于蛋白质分子和水分子的运动,增加其溶解度,60 °C 以后随着温度的增加蛋白提取率在降低,高温导致蛋白质结构发生改变,蛋白内部

的非极性基团暴露到表面,减少了蛋白的溶解度,随着温度的升高,对于蛋白质活性的破坏程度也在不断提升,很可能影响灵菊七浸提液对与 α -淀粉酶与 α -葡萄糖苷酶活性的影响,因此 50~60 °C 为最适的提取温度.

结果如图 2C 所示,在 1~3 h 内灵菊七蛋白的提取率随着时间的增加明显升高,3 h 后蛋白提取率增加不明显,考虑到过长时间在高温水浴条件下对蛋白活性的影响,因此选择 3 h 作为最适的提取时间.

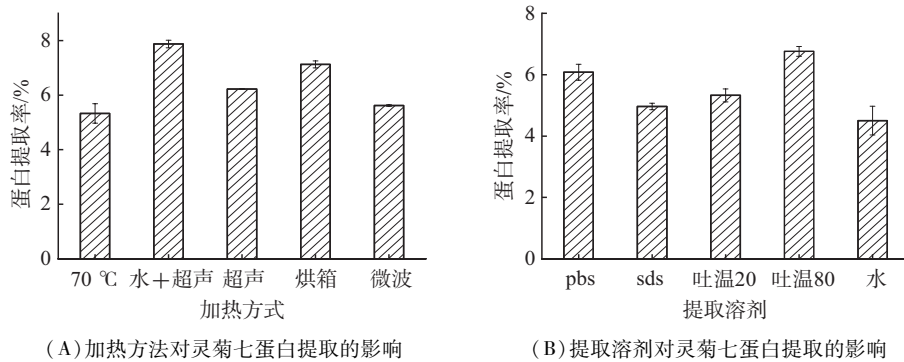


图 1 提取方法对灵菊七蛋白提取率的影响

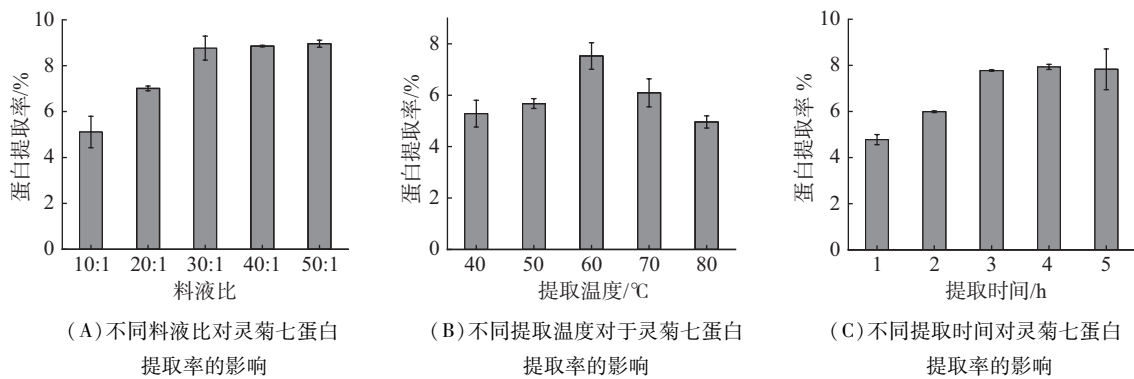


图 2 提取条件单因素研究

2.3 响应面实验

本文选取提取时间、提取温度作为连续因子,提取方式作为类别因子,以总蛋白提取率和浸提液分别对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率作为结果,做了 3 组响应面实验.

2.3.1 总蛋白提取率

由表 2 可知,通过 Minitab 软件对统计结果进行方差分析,模型 p 值 < 0.001 ,模型极显著,失拟项 p 值 $0.609 > 0.05$,模型的失拟项不显著,表明该模型具有统计学意义. 回归分析结果显示,在蛋白提取过程中的影响因素中, A^2 项极显著, A 、 C 项显著,说明提取温度、提取方式对灵菊七蛋白提取率有显著影响. 各因素对蛋白提取率的影响程度 $A > C > B$, 运用 Minitab 软件进行分析,得到二次多项式回归方程:

$$\text{蛋白提取率 } C_1 = -15.97 + 0.7739A + 1.800B - 0.005900A^2 - 0.1120B^2 - 0.01566AB$$

$$\text{蛋白提取率 } C_2 = -17.27 + 0.7961A + 1.469B - 0.005900A^2 - 0.1120B^2 - 0.01566AB$$

表 2 蛋白提取率回归分析

来源	自由度	AdjSS	AdjMS	F 值	P 值	显著性
模型	8	95.245	11.9057	11.21	0.000	***
A	1	5.835	5.8347	5.49	0.032	*
B	1	0.038	0.0379	0.04	0.852	
C	1	5.936	5.9358	5.59	0.030	*
A2	1	77.510	77.5101	72.97	0.000	***
B2	1	2.783	2.7833	2.62	0.124	
AB	1	3.138	3.1375	2.95	0.104	
AC	1	0.787	0.7871	0.74	0.401	

续表 2

来源	自由度	AdjSS	AdjMS	F 值	P 值	显著性
BC	1	1.746	1.746 2	1.64	0.217	
误差	17	18.059	1.062 3			
失拟	9	8.721	0.969 0	0.83	0.609	
纯误差	8	9.338	1.167 2			
合计	25	113.304				

由图 3 可以得出,提取时间和提取温度交互面的坡面较为陡峭,等高线呈现椭圆形,交互作用明显,与方差分析结果一致.图 3a 和图 3b 对比得出,相对与水浴提取法而言,超声辅助热提取法蛋白的最大提取率从 10.2% 提高到了 10.9%,有一定地提升效果.经 Minitab 软件进一步优化,最终得到灵菊七蛋白的最适提取条件为:超声辅助热提取法、提取温度 62 °C、提取时间 3 h、料液比 1:30、提取溶剂 PBS,灵菊七蛋白的最大提取率可达到 10.8%.

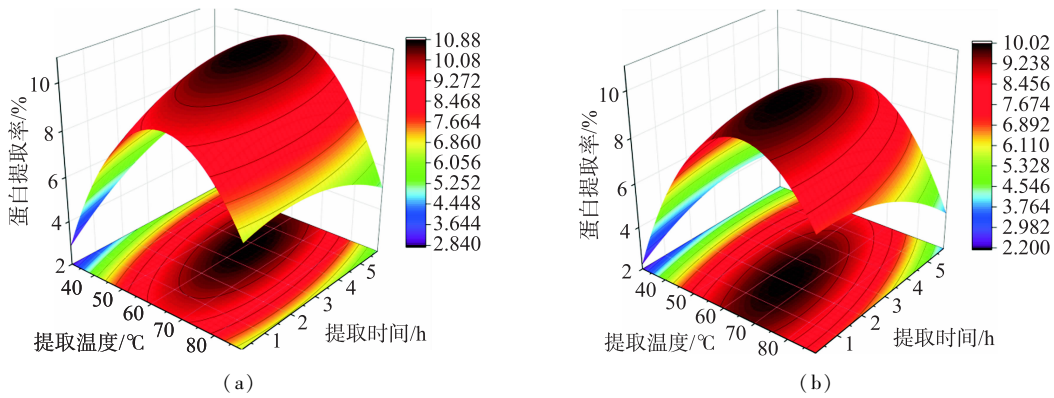


图 3 蛋白提取率响应面曲线

2.3.2 α-淀粉酶抑制率

由表 3 可知,通过 Minitab 软件对统计结果进行方差分析,模型 p 值 < 0.05,模型显著,失拟项 p 值 0.954 > 0.05,模型的失拟项不显著,表明该模型具有统计学意义.回归分析结果显示,在蛋白提取过程中的因素中,A²,A 项显著,说明提取温度对灵菊七浸提液对 α-淀粉酶抑制率有显著影响.各因素对蛋白提取率的影响程度 A > B > C,运用 Minitab 软件进行分析,得到二次多项式回归方程:

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率 } C_1 = -30.4 + 1.664A + 0.51B - 0.01597A^2 + 0.498B^2 - 0.0035AB$$

$$\alpha\text{-淀粉酶抑制率 } C_2 = -24.9 + 1.644A - 1.56B - 0.01597A^2 + 0.498B^2 - 0.0035AB$$

表 3 浸提液对 α-淀粉酶抑制率回归分析

来源	自由度	AdjSS	AdjMS	F 值	P 值	显著性
模型	8	1 572.62	196.577	2.43	0.039	*
A	1	476.07	476.075	5.90	0.027	*
B	1	323.08	323.083	4.00	0.062	
C	1	23.17	23.173	0.29	0.599	
A2	1	567.99	567.987	7.04	0.017	*
B2	1	55.01	55.009	0.68	0.421	
AB		74	0.154	0.00	0.996	
AC		0.65	0.649	0.01	0.930	
BC		68.55	68.548	0.85	0.370	
误差	19	1 451.52	80.730			
失拟	11	320.51	38.483	0.30	0.954	

由图 4 可以得出,提取时间和提取温度交互等高线不是椭圆形,两者交互作用不明显,提取时间等高线更为陡峭,该条件对灵菊七对 α-淀粉酶抑制率作用更大,与回归分析结果一致.由图 4a 和图 4b 对比得出,超声辅助热提取法相对于热提取法,抑制率从 24.20% 提升到了 31.80%,提升非常明显,经 Minitab 软件进

一步优化,得出灵菊七浸提液对 α -淀粉酶抑制最适提取条件:超声辅助热提取法、提取温度 59 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 3 h、料液比 1:30、提取溶剂 PBS,灵菊七浸提液对 α -淀粉酶的最大抑制率达到 31.8%.

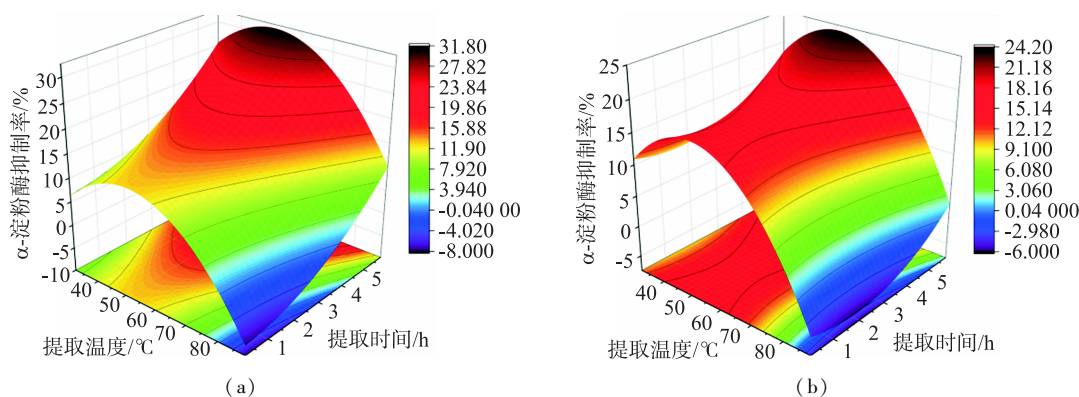


图 4 α -淀粉酶抑制率响应面

2.3.3 α -葡萄糖苷酶抑制率

由表 4 可知,通过 Minitab 软件对统计结果进行方差分析,模型 p 值 < 0.05 ,模型显著,失拟项 p 值 $0.853 > 0.05$,模型的失拟项不显著,表明该模型具有统计学意义.回归分析结果显示,在蛋白提取过程中的因素中,B 项显著,说明提取时间对灵菊七浸提液对 α -淀粉酶抑制率有显著影响.各因素对蛋白提取率的影响程度 $B > A > C$,运用 Minitab 软件进行分析,得到二次多项式回归方程:

$$\text{蛋白提取率 } C = -4.2 + 0.484A - 2.15B - 0.00469A^2 + 0.526B^2$$

表 4 浸提液对 α -糖苷酶抑制率回归分析

来源	自由度	AdjSS	AdjMS	F 值	P 值	显著性
模型	4	229.83	57.46	3.42	0.027	*
A	1	39.17	39.17	2.33	0.142	
B	1	63.73	63.73	3.79	0.045	*
A2	1	48.91	48.91	2.91	0.103	
B2	1	61.46	61.46	3.66	0.070	
误差	21	352.86	16.80			
失拟	13	163.01	12.54	0.53	0.853	
纯误差	8	189.85	23.73			
合计	25	582.69				

由图 5 可以得出,提取时间和提取温度交互等高线不是椭圆形,两者交互作用不明显,提取温度等高线更为陡峭,该条件对灵菊七浸提液对 α -糖苷酶抑制率作用更大,与回归分析结果一致.经 Minitab 软件进一步优化,得出灵菊七浸提液对 α -糖苷酶抑制最适提取条件:超声辅助热提取法、提取温度 52 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 5 h、料液比 1:30、提取溶剂 PBS,灵菊七浸提液对 α -淀粉酶的最大抑制率达到 13.60%.

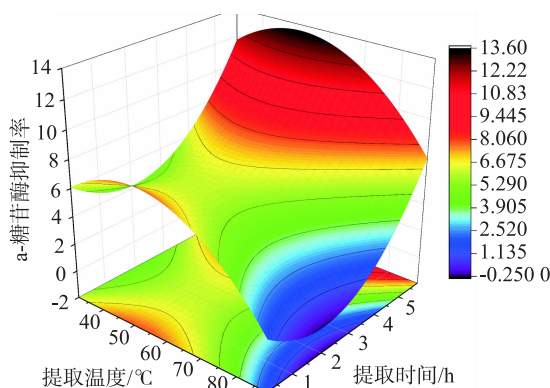


图 5 α -葡萄糖苷酶抑制率响应面

2.4 提取液蛋白含量、纯度检测及其 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析

上述研究通过以提取时间、提取温度作为连续因子,提取方式作为类别因子,采用 3 因素 4 水平的 Box-Behnken 试验设计(BBD),获得了 26 组不同提取工艺的灵菊七蛋白提取液蛋白含量,并检测了其 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性.通过蛋白含量与其对酶的抑制活性相关性分析研究(图 5),可以发现灵菊七蛋白浸提液对 α -淀粉酶抑制率随着蛋白含量的增加而升高,即提取液蛋白含量与 α -淀粉酶抑制率呈正相关,而与 α -葡萄糖苷酶抑制率关系不大.另外,进一步对蛋白含量最高、抑制率最大的提取液样品中蛋白含量和纯度进行了研究.结果表明,1 L 该提取液蛋白含量为 20.8 mg,提取液冻干物质量为 80.3 mg,蛋白纯度为 25.9%.为了进一步排除干扰,对浸提液冻干物进行复溶,然后依次加质量分数为 20%、40%、60% 的硫酸铵,其中加 40% 和 60% 硫酸铵获得沉淀,分别离心并冷冻干燥后分别获得 16.1 和 4.2 mg 冻干物.最后 2 种冻干物配置成 100 mg/L 的溶液并检测 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性,其中,40% 硫酸铵沉淀物的 α -淀粉酶抑制率最大,可达 90.2%,2 种冻干物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用很微弱,仅 1.8% 和 1.1%.综上所述,可以推断灵菊七 PBS 浸提液中含有对 α -淀粉酶具有较好抑制作用的活性蛋白.通过文献调研,可以发现已有关于灵菊七同属植物降糖活性成分的研究主要集中在小分子天然产物上,对于具有 α -淀粉酶抑制活性的蛋白和多肽还没有研究报道.

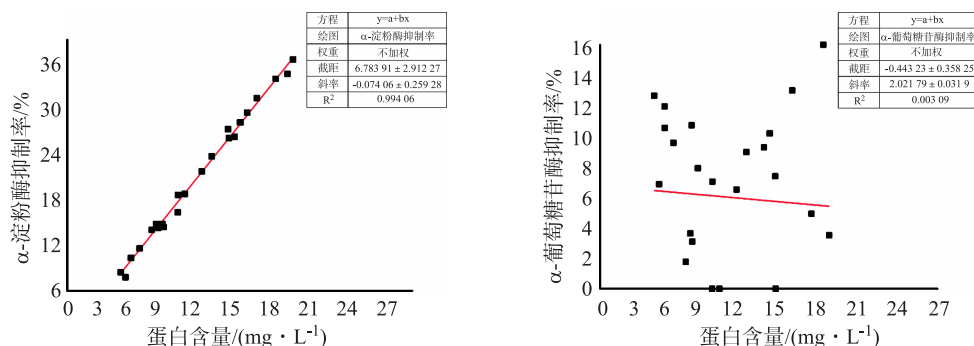


图 6 蛋白含量与抑制率相关性

3 结语

本文确定了灵菊七蛋白最佳提取方式为以 PBS 为溶剂,超声辅助水浴加热法提取.通过响应面法优化了提取工艺条件,最佳条件下总蛋白提取率最高可达 10.8%,提取物对 α -淀粉酶最大抑制率为 34.49%,提取物对 α -葡萄糖苷酶最大抑制率为 13.6%,并且浸提液对 α -淀粉酶抑制率随着蛋白含量的增加而升高,结合浸提液冻干物的 40% 硫酸铵沉淀物对 α -淀粉酶抑制率可达 90.2%,可以推测提取液含有对 α -淀粉酶具有较好抑制作用的活性蛋白.以上研究结果表明,灵菊七茎叶中可能含有新型 α -淀粉酶抑制活性蛋白,具有开发为 α -淀粉酶抑制活性药食产品的巨大潜力.但是,本文仅对灵菊七粗提物和硫酸铵沉淀物进行了研究,虽然蛋白纯度高,但并没有完全排除干扰.后续可以根据该提取条件,大批量提取灵菊七,以分离高纯度活性蛋白,完全排除小分子干扰,进一步明确灵菊七含有 α -淀粉酶抑制活性蛋白,并解析蛋白结构及构效关系.

参考文献:

- [1] LI N, YUE D Y, PENG J Y, et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms [J]. *Pharmacological Research*, 2018, 130(2): 451–465.
- [2] PANG G M, LI F X, YAN Y, et al. Herbal medicine in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Chinese Medical Journal*, 2019, 132(1): 78–85.
- [3] KUMAR A, ASWAL S, SEMWAL R B, et al. Role of plant-derived alkaloids against diabetes and diabetes-related complications: a mechanism-based approach [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2019, 18: 1277–1298.
- [4] 柯仲成, 侯雪峰, 贾晓斌. 基于活性成分的降血糖中药应用思路及方法探讨 [J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1797–1805.
- [5] 苟琳, 钟昱阳, 阳艺, 等. 老鹰茶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2016, 55(6): 842–846.

- [6] 杨永康,吴家坤. 菊三七属一新种(菊科)[J]. 中国医学生物技术应用,2004,3(2):55-58.
- [7] 刘莹,徐向进,陈明珠,等. 灵菊七的急性毒性与降糖作用研究[J]. 解放军药学学报,2005,12(5):340-342.
- [8] 刘莹,朱东屏,徐向进,等. 灵菊七提取物对糖尿病大鼠治疗作用的实验研究[J]. 解放军药学学报,2006,11(4):287-289.
- [9] 季顺进,方宪康,朱丹妮,等. 灵菊七水提物的降糖作用及促胰岛素分泌作用研究[J]. 安徽医药,2009,13(3):256-258.
- [10] 马正东,魏文树. 灵菊七提取物降血糖作用的实验研究[J]. 海峡药学,2008,10(2):25-27.
- [11] 徐智宇. LQJ 抗糖尿病活性部位的筛选和评价[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院,2011.
- [12] YOU J J. Simultaneous determination of nine components in *Gynura procumbens* aqueous extract by HPLC-MS/MS[J]. Chinese traditional and herbal drugs,2017:294-298.
- [13] LI L,ZHANG H,LÜ H, et al. Detection of pyrrolizidine alkaloids from leaf of *Gynura divaricata* by LC-MS[J]. J Plant Res Environ,2008,17:79-80.
- [14] JAGADEESAN G,MUNIYANDI K,MANOHARAN A L, et al. Understanding the bioaccessibility, α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition kinetics of *Allmania nodiflora* (L.) R. Br. ex Wight polyphenols during in vitro simulated digestion[J]. Food Chemistry,2022,372:131294.
- [15] ZHENG Y,TIAN J,YANG W, et al. Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase[J]. Food Chemistry,2020,317:126346.
- [16] RIYAPHAN J,PHAM D C,LEONG M K, et al. In silico approaches to identify polyphenol compounds as α -glucosidase and α -amylase inhibitors against type-II diabetes[J]. Biomolecules,2021,11(12):1877-1879.
- [17] 杨萍,申元福,鄢硕,等. 提取溶剂对石榴籽油生物活性及纳米乳形成的影响[J]. 食品工业科技,2020,41(17):62-67.
- [18] 漆书文,徐明,杨磊,等. 表面活性剂-超声协同提取刺五加苷的工艺优选[J]. 四川林业科技,2020,41(3):81-85.
- [19] 高泽汝,刘昆仑,陈复生. 碱法提取玉米胚芽蛋白的条件优化[J]. 食品工业,2020,41(10):5-8.
- [20] 谢丹,鲁延杰,李佳璇,等. 响应面法优化川芎蛋白提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2021,42(21):213-220.
- [21] 白雪,赵梦娜,岳小湘,等. 亚临界水提取植物源生物活性物质的研究进展[J]. 食品工业科技,2022,43(4):470-477.

Study on extraction and hypoglycemic activity of protein from *Gynura medica*

MA Ke, CHENG Yuan-hang, SU Ze-yu

(School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: In order to develop the hypoglycemic medicinal plant named *Gynura medica*, the extraction process of the active protein of *Gynura medica* was studied in terms of extraction solvent, heating method, extraction time, extraction temperature and material liquid ratio, and the effects of the extracts obtained by different processes on α -Amylase and α -glucosidase was detected. The extraction conditions were optimized by response surface methodology. The results showed that the maximum extraction rate of protein was 10.8% under the following conditions: extraction temperature 62 °C, extraction time 3 h, material liquid ratio 1:30, extraction solvent PBS. The extraction conditions of the extractor with the highest inhibition rate of α -amylase were as follows: extraction temperature 59 °C, extraction time 3h, material liquid ratio 1:30, extraction solvent PBS, the maximum inhibition rate was 31%; The extraction conditions of the extractor with the highest inhibition rate of α -glucosidase were as follows: extraction temperature 52 °C, extraction time 5 h, material liquid ratio 1:30, extraction solvent PBS. The maximum inhibition rate of α -glucosidase was 13.60%. The inhibition rate of α -amylase increased with the increase of protein content. Considering the protein content and purity of the extract, it can be inferred that the extractor of *Gynura medica* contained a high α -amylase inhibition activity protein.

Key words: *Gynura medica*; active protein; extraction process; α -amylase inhibitory activity

(责任编辑 王煜丹)