

碱提西番莲叶多糖的分离、鉴定及生物活性

Isolation, identification and its biological activity analysis of the polysaccharide in *Passiflora edulis* Sims leaves from alkali extracts

李霞 刘承鑫 黄艳 莫观兰 关媛

LI Xia LIU Cheng-xin HUANG Yan MO Guan-lan GUAN Yuan

(桂林理工大学化学与生物工程学院, 广西 桂林 541006)

(College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Science and Technology, Guilin, Guangxi 541006, China)

摘要:以热水提取后的西番莲叶残渣为原料,利用 NaOH 碱溶液提取多糖(APEL),通过离子交换层析进行分离,测定多糖的理化性质,同时采用红外光谱、高效液相色谱、凝胶渗透色谱法对多糖进行分析,并研究了西番莲叶中多糖组分的体外降血糖及抗凝血活性。结果表明:APEL 经 DEAE-52 纤维素离子交换层析法分离得到 3 种组分:APEL-1、APEL-2、APEL-3,APEL 及其分离组分均具有多糖的典型特征峰,主要由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸组成,APEL、APEL-1、APEL-2 和 APEL-3 的分子量分别为 4.277×10^6 , 4.276×10^6 , 4.203×10^6 , 4.111×10^6 Da。APEL 及其组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶均有显著抑制作用,并能显著延长活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间和凝血酶时间,具有明显的体外降血糖和抗凝血活性。

关键词:西番莲叶;多糖;碱提;分离;鉴定;降血糖;抗凝血

Abstract: The residue of *Passiflora edulis* Sims leaves after hot water extraction was used as material. Polysaccharide was extracted from the residue by using NaOH alkaline solution, followed by separation of ion-exchange chromatography. The physico-chemical properties of polysaccharide were determined and analyzed by IR, HPLC and gel permeation chromatography, and then its hypoglycemic and anticoagulant were studied. The results showed that APEL was separated by DEAE-52 cellulose ion-exchange chromatography to obtain the APEL-1, APEL-2,

APEL-3, the APEL and its separated components all have typical characteristic peaks of polysaccharides, mainly composed of arabinose, glucose, galactose, xylose, rhamnose, glucuronic acid. The molecular weights of APEL, APEL-1, APEL-2 and APEL-3 were 4.277×10^6 , 4.276×10^6 , 4.203×10^6 , 4.111×10^6 Da. The APEL and its components could significantly inhibit α -amylase and α -glucosidase, and prolong the activated partial thromboplastin time, prothrombin time and thrombin time, showing obvious hypoglycemic and anticoagulant activities *in vitro*.

Keywords: *Passiflora edulis* Sims leaf; polysaccharide; alkali extraction; isolation; identification; hypoglycemic effect; anticoagulant activity

西番莲(*Passiflora edulis* Sims)含有大量对人体有益的活性物质及矿物元素^[1],其叶被视为一种药材,用于医治失眠、情绪失常和癫痫,有缓解止痛的功效^[2]。现有研究表明植物多糖具有降血糖和抗凝活性,Colomeu 等^[3]研究表明西番莲叶水提物中酚类化合物具有一定糖尿病免疫作用;全娜^[4]研究发现枸杞叶多糖显著提高小鼠血清胰岛素的含量,降低血糖的同时也能保护糖尿病小鼠脏器及血清内酶活力;马琳^[5]研究得出碱提红枣多糖对 APTT 值的延长达到水提红枣多糖的 11.1 倍,说明碱提红枣多糖抗凝效果较好;Francisco 等^[6]研究表明红藻中的硫酸化多糖不仅具有良好的抗凝血作用,还具备有效的抗血栓形成作用以及抑制血小板聚集的作用。

目前,关于西番莲果皮抗氧化^[7-8]、降血压^[9]等方面的研究文献较多,但对西番莲叶中多糖组分的体外降血糖和抗凝血活性研究还没有详细的报道。植物多糖除水溶性多糖外,还有大量的胞内多糖或细胞壁结合多糖,热水提取法不能使之溶出,且水提后的残渣通常会被丢弃,而一定浓度碱溶液可以继续提出残渣中的细胞壁结合多

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:3186040051);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(编号:2020KY06018);科研启动基金(编号:GUTQDJJ2019017)

作者简介:李霞,女,桂林理工大学教授,博士。

通信作者:关媛(1989—),女,桂林理工大学讲师,博士。

E-mail:2019017@glut.edu.cn

收稿日期:2020-11-27

糖或胞内多糖^[10]。研究拟以热水提取后的西番莲叶残渣为原料,利用碱溶液从残渣中继续提取多糖,对多糖进行测定,并进行体外降血糖和抗凝血活性的研究,以期为西番莲叶中多糖相关药物的研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

西番莲叶:桂林万禾农产品有限公司;

NaOH、葡萄糖标准品、无水乙醇、3,5-二硝基水杨酸、无水碳酸钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

苯酚:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

考马斯亮蓝:分析纯,合肥博美生物科技有限责任公司;

α -淀粉酶:3.7 U/mg,北京索莱宝科技有限公司;

α -葡萄糖苷酶:酶活 25 U/mg,上海源叶生物科技有限公司;

阿卡波糖:杭州中美华东制药有限公司;

肝素钠:北京索莱宝科技有限公司;

活化部分凝血活酶时间测定试剂盒、凝血酶原时间测定试剂盒、凝血酶时间测定试剂盒:上海太阳生物技术有限公司。

1.2 主要仪器与设备

旋转蒸发仪:UV760CRT 型,上海贤德实验仪器有限公司;

紫外可见分光光度计:UV760CRT 型,上海傲谱分析仪器有限公司;

冷冻干燥仪:ALPHA1-2LD 型,德国 Martin Christ 公司;

离心机:DL-5-B 型,上海安亭科学仪器有限公司;

振荡培养箱:LRH-250-Z 型,韶关市泰宏医疗器械有限公司;

傅里叶红外光谱仪:IS10 型,美国 Thermo Fisher 公司;

液相色谱仪:LC1220 型,安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取与分离 西番莲叶烘干粉碎,用 75% 的乙醇在 85 °C 下冷凝回流提取 2 h,提取 3 次。将醇提后的西番莲叶烘干,按照料液比($m_{\text{西番莲叶}} : V_{\text{乙醇}}$)1 : 16 (g/mL)、100 °C 热水提取 6 h,将热水提取后的西番莲叶残渣烘干,以料液比($m_{\text{西番莲叶残渣}} : V_{\text{NaOH}}$)1 : 15.6 (g/mL)用 6% NaOH 浸泡 12 h 后,60 °C 水浴提取 1 h,提取 4 次,得到西番莲叶的碱提液,浓缩至其 1/6 体积,冷却,加入 3 倍体积无水乙醇,4 °C 醇沉 48 h,过滤,4 500 r/min 离心 15 min,蒸馏水复溶,35% 盐酸中和,流水透析 48 h,冷冻干燥^[11],得到碱提西番莲叶粗多糖(APEL)。将 APEL 用

DEAE-52 纤维素柱分离,分别用蒸馏水洗脱出 APEL-3、0.7 mol/L NaCl 洗脱出 APEL-2、0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱出 APEL-1,流速 15 mL/min。

1.3.2 多糖主要成分测定

(1) 总糖含量:采用苯酚—硫酸法^[12]。

(2) 糖醛酸含量:间羟基联苯法^[13]。

(3) 蛋白质含量:考马斯亮蓝法^[14]。

(4) 还原糖含量:3,5-二硝基水杨酸法^[15]。

1.3.3 红外光谱分析 取适量多糖样品,按照($m_{\text{多糖}} : m_{\text{溴化钾}}$)1 : 100 的比例加入干燥的溴化钾晶体,均匀研磨后压片,于 4 000~400 cm^{-1} 区间用傅里叶红外光谱进行扫描分析。

1.3.4 单糖组成分析 采用高效液相色谱法^[16]。将含 1 mol/L HCl 的无水甲醇(0.5 mL)和多糖样品(2 mg)混合并在 80 °C 下水解 16 h,然后在 120 °C 下用 2 mol/L 三氟乙酸(0.5 mL)水解 1 h。用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)处理所得的水解产物,并在连接 Shimadzu 的 DIKMA Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×150 mm)上进行分析。选用 SPD-10AVD UV-VIS 检测器。注入 PMP 衍生物(20 μL),用 82.0% 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)和 18.0% 乙腈($V_{\text{PBS}} : V_{\text{乙腈}}$)4.5 : 1.0 的比例以 1.0 mL/min 的流速洗脱,并通过 245 nm 下的紫外光谱(UV)进行监测。

1.3.5 相对分子质量测定 采用凝胶渗透色谱法^[17]。色谱条件:配备 RI 检测器的 Tosoh EcoSEC HLC-8320 凝胶色谱柱和 TSKgel guard PW×1 + 2×TSKgel MPW×1 + TSKgel G2500PW×1 (7.8 mm×300 mm)色谱柱,流动相为 0.1 mol/L NaNO_3 ,流速 1 mL/min,上样体积 100 μL ,柱温 40 °C。

1.3.6 体外降血糖活性测定

(1) 对 α -淀粉酶的抑制作用:根据文献^[18]修改如下,取 1 mL 不同浓度梯度的样品溶液,加入 0.3 mL 酶液,并在 37 °C 预热 20 min,加入 0.4 mL 淀粉溶液混匀反应 5 min,加入 1 mL 盐酸,0.2 mL 碘液摇匀,于 660 nm 处测量吸光度值 A_1 ,用蒸馏水代替酶液测量吸光度值 A_2 ,蒸馏水作为空白,吸光度值为 A_0 ,以阿卡波糖为阳性对照,按式(1)计算 α -淀粉酶清除率。

$$K = \frac{A_0 - (A_2 - A_1)}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

K —— α -淀粉酶清除率,%;

A_0 ——蒸馏水代替样品反应后的吸光值;

A_1 ——加入样品反应后的吸光度值;

A_2 ——蒸馏水代替酶液反应后的吸光度值。

(2) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用:取 112 μL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液与 0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶

液 20 μL 混合后加入二甲基亚砜 8 μL , 然后加入不同浓度梯度的样品溶液 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min 后加入 10 mmol/L 的 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 20 μL , 继续孵育 20 min, 加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 80 μL , 在 410 nm 下测定吸光度值 A , 并用不加样品 (不加样品的以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液代替) 测定酶的活力吸光度值 A_0 , 以阿卡波糖为阳性对照^[19]。按式 (2) 计算 α -葡萄糖苷酶清除率。

$$S = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S—— α -葡萄糖苷酶清除率,%;

A_0 ——不加样品测定酶的活力吸光度值；

A——加入样品反应后的吸光度值。

1.3.7 体外抗凝血活性测定 采集新鲜鸡血,将 0.109 mol/L 柠檬酸钠溶液与全血按 $V_{\text{柠檬酸钠}} : V_{\text{全血}} = 1 : 9$ 混合,3 600 r/min 离心 15 min,取上层血浆。以 9% 生理盐水为溶剂配制 0.10 g/L 多糖样品溶液,用 9% 生理盐水将样品溶液稀释成 5, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度梯度。阳性对照:用 9% 生理盐水配制质量浓度为 0.10 g/L 的肝素钠溶液^[20]。采用上海太阳生物技术有限公司的试剂盒分别检测活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 3 个抗凝血活性指标。

1.3.8 数据分析 采用 Origin 7.0 作图和 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,并采用单因素方差分析(ANOVA)进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 多糖成分

如表 1 所示, APEL、APEL-1、APEL-2 和 APEL-3 总糖质量分数分别为 73.80%, 81.42%, 83.34%, 62.93%, 糖醛酸质量分数分别为 9.38%, 4.04%, 9.15%, 5.59%。APEL 经过分离后, APEL-1、APEL-2 和 APEL-3 的蛋白质和还原糖质量分数降低, 说明使用 DEAE-52 纤维素柱分离 APEL 具有一定的纯化效果, 而其中蛋白质质量分数偏高, 推测是在碱性条件下蛋白质易溶于溶液中, 形成较难去除的高水平蛋白质^[21]。

2.2 红外光谱分析

如图 1 所示, APEL 及其各组分均在 $3\,417\text{ cm}^{-1}$ 左右有较强的吸收峰, 该峰是由多糖中的羟基 O—H 伸缩振动引起的^[22]; 在 $2\,927\sim 2\,937\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰是 C—H 的伸缩振动, 为糖类的特征峰; 在 $1\,635\sim 1\,639\text{ cm}^{-1}$ 附近处的吸收峰是由于 C=O 伸缩振动引起的^[23], 表明含有糖醛酸; 在 $1\,400\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是由于 C—H 的变角振动引起的; $1\,043\sim 1\,079\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰是由 C—O 的伸缩振动引起的^[24], 其中 APEL-3 的 C—O 伸缩振动为变角振动。

表 1 多糖样品中化学成分和功能性成分质量分数比较

Table 1 Comparison of chemical and functional components in polysaccharide samples %

样品	总糖	糖醛酸	蛋白质	还原糖
APEL	73.80	9.38	6.79	7.98
APEL-1	81.42	4.04	5.89	2.17
APEL-2	83.34	9.15	5.21	3.63
APEL-3	62.93	5.59	4.76	1.45

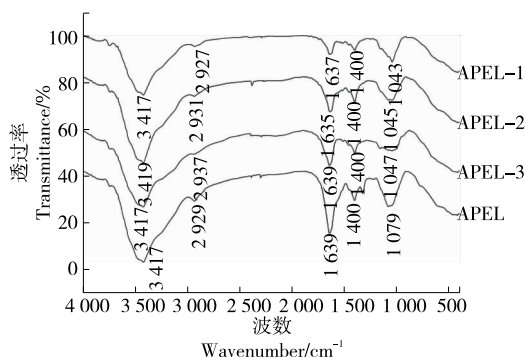


图 1 多糖样品的红外光谱图

Figure 1 Infrared spectra of polysaccharide samples

2.3 单糖组成成分

如表 2 所示, APEL 由阿拉伯糖、半乳糖醛酸和半乳糖 3 种单糖组成, 以阿拉伯糖为主, 其相对质量分数为 52.11%。与 APEL 相比, 分离后得到的 APEL-1、APEL-2 和 APEL-3 的单糖组成明显发生变化; APEL-1 主要由葡萄糖和木糖组成, 其中葡萄糖组分相对质量分数最大为 40.53%, 木糖相对质量分数达 32.36%; APEL-3 主要由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖组成, 同时含有少量的木糖、鼠李糖和葡萄糖醛酸; APEL-2 的单糖成分主要为半乳糖醛酸, 其相对质量分数为 58.63%, 其次是阿拉伯糖(18.89%)和半乳糖(12.36%)。在所有的多糖中都能够检测到阿拉伯糖和半乳糖的存在, 但其质量分数不同, 并且这两种单糖在所有的多糖中占比都比较大。中性多糖 APEL-3 中阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖质量分数相差不大, 在糖链中分布较均匀; 而酸性多糖 APEL-2 的糖链中半乳糖醛酸质量分数相对较高, 所以阿拉伯糖和半乳糖质量分数较低。碱提多糖 APEL-1 中阿拉伯糖和半乳糖含量较低, 葡萄糖和木糖质量分数较高, 可能是在碱溶液洗脱过程中, 各成分之间发生了相互转化或部分产生了降解。

2.4 多糖相对分子质量

碱提西番连叶多糖及其组分的相对分子质量分布图如图2所示, APEL、APEL-1 的相对分子质量分布图中都是单峰, 而 APEL-2、APEL-3 的有多个峰, 说明 APEL-2 和 APEL-3 中可能存在其他杂质, 纯度不高, 需要进一步

表 2 各样品单糖组分的相对质量分数

Table 2 Relative content of monosaccharide components of each sample								%
样品	半乳糖醛酸	阿拉伯糖	葡萄糖	半乳糖	木糖	鼠李糖	葡萄糖醛酸	甘露糖
APEL	16.53	52.11	—	31.36	—	—	—	—
APEL-1	—	12.58	40.53	14.53	32.36	—	—	—
APEL-2	58.63	18.89	—	12.36	4.88	—	5.23	3.93
APEL-3	—	26.89	31.14	26.56	9.35	3.51	2.54	—

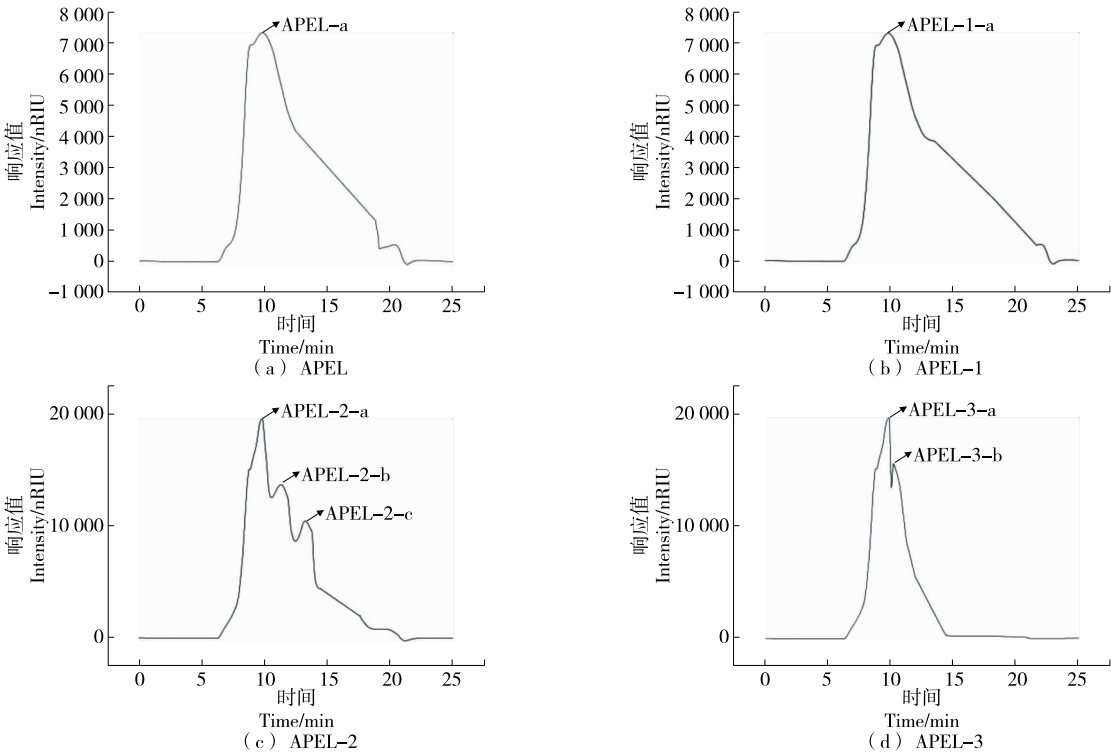


图 2 多糖样品的相对分子质量分布图

Figure 2 Relative molecular mass distribution of polysaccharide samples

分离纯化。从相对分子质量大小来看,碱提多糖 APEL 及其组分相对分子质量都比较大,且分布较集中。多糖样品中各峰对应的相对分子质量见表 3。

2.5 体外降血糖活性

2.5.1 对 α -淀粉酶的抑制作用 如图 3 所示,在试验范围内,所有样品对 α -淀粉酶抑制效果均随质量浓度的增大而增加,说明各样品对 α -淀粉酶的抑制率均存在一定的剂量依赖性。1.0 mg/mL 时,APEL-1 和 APEL-2 对 α -淀粉酶的抑制率接近阳性对照组(阿卡波糖)的,表明这 2 种多糖组分对 α -淀粉酶的抑制作用较好;碱提西番莲叶多糖及其组分对 α -淀粉酶抑制作用强弱顺序为 APEL-2>APEL-1>APEL>APEL-3,其中 APEL-2 对 α -淀粉酶的抑制作用最强,最高达到 39.21%。

2.5.2 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 如图 4 所示,随质量浓度的增大,各样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性逐渐升高。与阳性对照相比,碱提西番莲叶多糖及其组分对

α -葡萄糖苷酶的抑制活性均低于阿卡波糖,其中 APEL-1 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性最高,为 63.89%。APEL 经过分离后,APEL-1 和 APEL-3 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果均高于分离前多糖 APEL,而 APEL-2 对 α -葡萄糖苷酶

表 3 样品各峰对应的相对分子质量

Table 3 Relative molecular mass corresponding to each peak of the sample

样品	峰号	相对分子质量/Da
APEL	APEL-a	4.277×10^6
APEL-1	APEL-1-a	4.276×10^6
APEL-2	APEL-2-a	4.203×10^6
	APEL-2-b	8.500×10^5
	APEL-2-c	3.270×10^5
APEL-3	APEL-3-a	4.111×10^6
	APEL-3-b	2.905×10^5

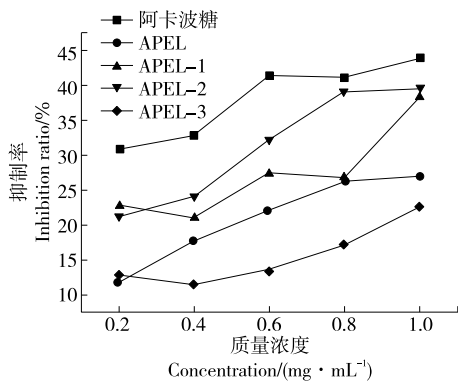


图3 多糖样品对 α -淀粉酶的抑制作用

Figure 3 Effects of polysaccharide on α -amylase

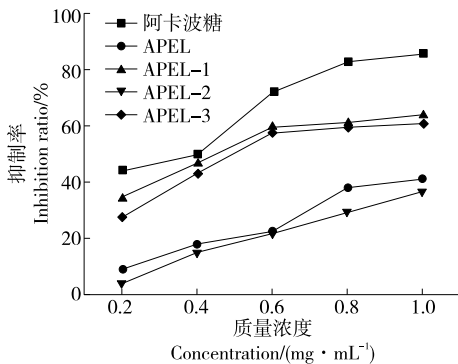


图4 多糖样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Figure 4 Inhibition of α -glucosidase by polysaccharide sample

的抑制能力最低;推测可能与其单糖组成及相对分子质量不同有密切关系^[25]。

2.6 体外抗凝血活性

如表4所示,与生理盐水相比,随着质量浓度的增加,碱提西番莲叶多糖及其组分均明显延长了APTT的时间($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈剂量依赖性,尤其是APEL,在质量浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,APEL的APTT凝血时间是生理盐水的4.82倍,说明碱提西番莲叶多糖组分是通过参与内源性凝血途径来发挥抗凝血作用。多糖中的糖醛酸含量会影响其抗凝血效果,糖醛酸含量高,抗

凝效果好^[26];在多糖理化性质中,APEL和APEL-2的糖醛酸含量高,而单糖组成分析中这两种多糖的半乳糖醛酸含量都较大,所以APEL和APEL-2相比于生理盐水具有较好的抗凝效果。

如表5所示,与生理盐水相比,质量浓度为 $5\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,所有多糖样品对PT的影响均达到显著性水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),各多糖样品组对PT时间均有明显延长作用,表明西番莲叶中多糖组分也通过外源性发挥抗凝血效果;其中,APEL-2在 $0\sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时对PT基本没有影响,而 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时可以显著延长PT,延长了30.53%。研究表明,当肝素钠分子量在 $1\text{ }000\sim 10\text{ }000\text{ Da}$ 时,肝素钠的抗凝血效果较弱^[27];而多糖的分子量也可能影响抗凝功能,分子量过小,无抗凝血能力^[28],APEL、APEL-1、APEL-2和APEL-3均为分子量很大的多糖,所以均具有较好的抗凝血活性。

如表6所示,碱提西番莲叶多糖及其组分对TT也有延长作用,但与肝素钠相比,其增长幅度极小,各多糖样品要达到相同的抗凝血作用则需要更高的浓度,因此推测其可能不是通过共同途径来影响凝血过程。而有研究^[29]发现,含有硫酸基的多糖均表现出较好的抗凝血活性;肝素钠本身是一种硫酸氨基葡萄糖钠盐,因此肝素钠会表现出比多糖较好的抗凝血效果。半乳糖是黏附分子凝集素家族识别的配体,与凝集素结合后,阻断了凝集素在血栓形成中的粘附作用,从而达到抗凝血的效果;崔莹莹等^[30]发现碱提大蒜多糖组分中的半乳糖构成比例较大,可能是其具有抗凝血活性的原因;单糖组成分析发现碱提西番莲叶多糖组分都存在半乳糖,推测其抗凝血活性可能与半乳糖含量有关。

3 结论

试验结果表明,碱提西番莲叶多糖及其组分具有典型的多糖特征吸收峰,均含有阿拉伯糖和半乳糖,且碱提西番莲叶多糖及其碱洗脱组分为单峰,多糖组分对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶具有抑制作用,主要是多糖链上含有羟基和羧基,可以与消化酶的氨基酸残基结合,从而抑制酶的活性,并且碱提西番莲叶多糖及其组分对 α -淀粉

表4 多糖样品对APTT的影响[†]

Table 4 Effects of polysaccharide samples on APTT

样品	多糖质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
	0(生理盐水)	5	20	50	100
APEL	24.13 ± 2.92	47.18 ± 9.42	58.67 ± 15.84^b	60.69 ± 7.96^b	116.49 ± 7.78^b
APEL-1	24.13 ± 2.92	38.65 ± 17.31	103.38 ± 17.00^b	104.81 ± 12.26^b	110.54 ± 22.44^b
APEL-2	24.13 ± 2.92	42.60 ± 10.08^b	86.00 ± 1.41^b	98.04 ± 2.18^b	112.61 ± 10.45^b
APEL-3	24.13 ± 2.92	29.12 ± 19.27	50.73 ± 5.03	58.54 ± 15.71	77.22 ± 13.27^b
肝素钠	24.13 ± 2.92	83.47 ± 64.57^b	166.60 ± 15.36^a	180.00 ± 13.75^a	209.80 ± 35.83^b

[†] 与生理盐水相比,a为 $P<0.05$;b为 $P<0.01$ 。

表 5 多糖样品对 PT 的影响[†]

Table 5 Effects of polysaccharide samples on PT s

样品	多糖质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	0(生理盐水)	5	20	50	100
APEL	67.40±9.39	86.70±5.54 ^a	90.38±8.85 ^a	109.35±20.20 ^b	110.93±6.25 ^b
APEL-1	67.40±9.39	75.25±5.95	76.59±12.43	85.68±19.00	113.64±27.32 ^a
APEL-2	67.40±9.39	57.23±9.01	62.50±2.12	62.50±7.23	87.98±8.02 ^b
APEL-3	67.40±9.39	74.54±15.71	74.98±0.57	76.05±3.69	111.86±5.94 ^b
肝素钠	67.40±9.39	94.47±32.88	112.44±9.87 ^a	144.19±14.89 ^b	176.55±29.47 ^b

[†] 与生理盐水相比,a 为 P<0.05;b 为 P<0.01。

表 6 多糖样品对 TT 的影响[†]

Table 6 Effects of polysaccharide samples on TT s

样品	多糖质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	0(生理盐水)	5	20	50	100
APEL	63.73±3.14	70.87±8.12	73.19±2.31	76.35±2.02	77.03±3.01 ^b
APEL-1	63.73±3.14	73.25±6.93 ^a	76.81±1.39 ^a	73.37±1.30 ^a	76.29±3.70 ^b
APEL-2	63.73±3.14	73.09±3.07 ^b	78.10±2.49 ^b	78.36±2.56 ^b	82.46±4.92 ^b
APEL-3	63.73±3.14	64.41±6.67	68.04±2.34	69.62±3.34	78.05±1.20 ^b
肝素钠	63.73±3.14	97.43±1.37 ^a	102.25±1.22 ^a	145.98±23.35 ^b	169.45±22.8 ^b

[†] 与生理盐水相比,a 为 P<0.05;b 为 P<0.01。

酶活性的抑制率大小顺序与糖含量的一致,说明其抑制作用与糖含量呈正相关。抗凝血试验显示,碱提西番莲叶多糖及其组分均显著延长活化部分凝血活酶时间和凝血酶原时间,呈现非常好的抗凝血作用;尤其在质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,碱提西番莲叶多糖及其碱洗脱组分分别显著延长活化部分凝血活酶时间和凝血酶原时间,凝血时间分别达到生理盐水的 4.82 倍和 1.68 倍,说明其通过内外源性凝血途径达到抗凝效果。综上所述,碱提西番莲叶多糖明显具有潜在的降血糖和抗凝血作用。后续将进一步探索碱提西番莲叶多糖的体内降血糖和抗凝血活性机制,对其他功能活性如抗血栓等方面进行研究。

参考文献

[1] 朱文娟,夏必帮,廖红梅. 西番莲的功能活性成分及加工与综合利用研究进展[J]. 食品与机械, 2018, 34(12): 181-184.

[2] 周正元,程昊,唐婷范,等. 百香果叶总黄酮提取工艺优化[J]. 广西科技大学学报, 2019, 30(3): 115-119.

[3] COLOMEU T C, FIGUEIREDO D, CAZARIN C B, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (nond-mice) [J]. International Immunopharmacology, 2014, 18(1): 106-115.

[4] 全娜. 枸杞叶多糖的分离纯化、结构表征及降血糖活性分析[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018: 73-74.

[5] 马琳. 碱提枣多糖抗凝血作用途径的初步探讨[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014: 41-42.

[6] FRANCISCO D S C, GLAUBER C L, VALESCA I N S, et al. Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 415-421.

[7] 李霞,熊峰,覃献杏,等. 西番莲果皮多糖微波辅助提取工艺优化及其体外抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 141-146.

[8] 李霞,胡楠,陈齐琳,等. 西番莲叶多糖提取工艺的优化及其体外抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2020, 45(10): 153-157, 162.

[9] LWEIS B J, HERRLINGER K A, CRAIG T A, et al. Anti-hypertensive effect of *passion fruit* peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously hypertensive rats [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(7): 1 359-1 366.

[10] 焦中高,张春岭,刘杰超,等. 碱提红枣多糖与水解红枣多糖生物活性的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 4 181-4 187.

[11] MA Jin-shuang, LIU Hong, HAN Chang-ri, et al. Characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115409.

[12] 白丽丹,段懿涵,谭超杰,等. 蛹、米虫草多糖含量及抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(20): 22-29.

- [13] NELLY B, GUSTAV A H. New method for quantitative determination of uronic acids[J]. Analytical Biochemistry, 1973, 54(2): 484-489.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [15] 谢静静, 付文鹏, 赵艳雯, 等. 美洲大蠊脱脂膏中总糖和还原糖含量的测定[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 199-206.
- [16] 黄小兰, 何旭峰, 杨勤, 等. PMP 柱前衍生化 HPLC 法测定地参多糖的单糖组成[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 250-256.
- [17] TRUC C H, ANLEY T K, SARAVANA P S, et al. Green extraction of polyphenolic-polysaccharide conjugates from *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk: Chemical profile and anticoagulant activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 157: 484-493.
- [18] CHEN Chun, ZHANG Bin, HUANG Qiang, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Moringa oleifera* Lam. leaves: Characterization and hypoglycemic activity[J]. Industrial Crops & Products, 2017, 100: 1-11.
- [19] XIAO Heng, FU Xiong, CAO Chang-liang, et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 121: 407-414.
- [20] 孔艳, 棚日翔, 戴梓茹, 等. 近江牡蛎糖胺聚糖降血糖及凝血活性研究[J]. 食品科技, 2019, 44(10): 289-293.
- [21] GAO Han, ZHANG Wen-cheng, WU Ze-yu, et al. Preparation, characterization and improvement in intestinal function of oligosaccharide fractions from okra[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 50: 147-157.
- [22] 郭金英, 朱蓓茹, 任国艳, 等. 发菜胞外多糖硫酸化条件的优化及红外光谱分析[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 61-67.
- [23] 王莹, 申秀娟, 张磊, 等. 火炬树芽多糖提取工艺的响应面优化及红外光谱分析[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(9): 96-100.
- [24] 刁毅, 刘涛, 韩洪波. 不同地区地木耳多糖红外光谱与抗氧化活性研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(4): 984-987, 996.
- [25] 马天晓, 尹震花, 张翠利, 等. 流苏子多糖的提取分离、理化性质及体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 64-68, 80.
- [26] IZABELA P, LESZEK C, WITOLD P, et al. Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of *Asteraceae* and *Rosaceae* families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(3): 568-575.
- [27] LI Shi-jie, XIONG Qing-ping, LAI Xiao-ping, et al. Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Science and Food Safety, 2016, 15(2): 237-250.
- [28] 卞春, 王振宇, JOHN S, 等. 非肝素类天然抗凝血多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 300-308.
- [29] LI Hong-yan, MAO Wen-juan, ZHANG Xiu-li, et al. Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(2): 394-400.
- [30] 崔莹莹, 张剑韵, 张容鹄, 等. 大蒜多糖的体外抗凝血作用及结构分析[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 24-27.
- (上接第 115 页)
- [3] 蒋峰, 罗黎明, 陈建军, 等. 基于改进的 Hough 算法的细胞破碎智能监测计数系统[J]. 计量学报, 2018, 39(6): 902-907.
- [4] 张汝祥, 陈德林, 季江伟, 等. 基于圆对称性和随机选点改进霍夫变换圆检测算法[J]. 科技创新与应用, 2019(14): 47-49.
- [5] 林金龙, 石青云. 用点 Hough 变换实现圆检测的方法[J]. 计算机工程, 2003, 29(11): 17-18.
- [6] 王红茹, 丁文. 一种改进的基于对称性的 Hough 变换圆检测算法[J]. 微电子学与计算机, 2014, 31(6): 121-124.
- [7] 武洪恩, 倪良月, 王凯, 等. 基于 Hu 矩和递进 Hough 变换的 SOT 元件识别定位算法[J]. 组合机床与自动化加工技术, 2019(8): 4-7.
- [8] 范松, 陈坤, 马文庆, 等. 基于多层图像分割 hough 变换的零件定位模型[J]. 中国设备工程, 2019(7): 126-128.
- [9] 安培源, 张华. 基于边缘检测和 Hough 变换的圆定位算法[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2018, 39(5): 76-81.
- [10] ADEM Kemal. Exudate detection for diabetic retinopathy with circular Hough transformation and convolutional neural networks[J]. Expert Systems with Applications, 2018, 114(30): 289-295.
- [11] 薛怡宁, 何明棚, 徐川晴, 等. 基于梯度 Hough 变换和 K-medoids 聚类的年轮髓心定位[J]. 电子技术与软件工程, 2019(8): 70-72.
- [12] 苗丹, 卢伟, 高娇娇, 等. 基于聚类与 Hough 变换的交通标志检测方法[J]. 计算机系统应用, 2019, 28(11): 213-217.
- [13] 龚昕, 张楠. 基于 Hough 变换的圆检测算法的改进[J]. 信息技术, 2020, 44(6): 89-93.
- [14] 申翠香, 张晓宇. 基于量子遗传算法的圆度误差测量研究[J]. 计量学报, 2018, 39(2): 242-245.
- [15] 李刚, 邓岩, 姚禹, 等. 基于改进果蝇优化的机械圆度误差评定研究[J]. 机电技术, 2020(1): 28-32.