

# 辣椒中降糖因子筛选的探究

王君怡

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华

收稿日期: 2024年3月5日; 录用日期: 2024年4月5日; 发布日期: 2024年4月16日

## 摘要

从辣椒中提取黄酮、多酚、多糖、蛋白质等功能因子, 以秀丽隐杆线虫为研究对象进行降糖功能评价, 明确其降糖量效关系, 探究其作用机理。实验证明辣椒多糖提取物有良好的降糖效果, 可以显著降低高糖线虫体内的葡萄糖含量, 延长其存活寿命。

## 关键词

辣椒, 秀丽线虫, 降糖

# Research on Screening Hypoglycemic Factors in Chili Peppers

Junyi Wang

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua Zhejiang

Received: Mar. 5<sup>th</sup>, 2024; accepted: Apr. 5<sup>th</sup>, 2024; published: Apr. 16<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

In this paper, the functional factors such as flavonoids, polyphenols, polysaccharides, and proteins were extracted from chili peppers to evaluate the hypoglycemic function in *Caenorhabditis elegans* and clarify its dose-response relationship, exploring its mechanism of action. Results have shown that chili polysaccharide extract has a good hypoglycemic effect, which can significantly reduce the glucose content in the body of high sugar nematodes and prolong their survival life.

## Keywords

Chili Peppers, *Caenorhabditis elegans*, Hypoglycemic

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

辣椒是中国重要的蔬菜之一,播种面积达到世界辣椒总播种面积的 35%,产量为世界辣椒产量的 46%,是我国重要的蔬菜之一[1]。辣椒是一种富含辣椒碱类、维生素类、多酚、黄酮等活性功能物质的一年生或多年生草本植物,近年来越来越多的研究发现其在糖脂代谢的调节方面具有一定疗效[2] [3] [4]。本实验以秀丽隐杆线虫为模型,探索辣椒提取物对秀丽隐杆线虫降糖降脂以及抗氧化的影响,旨在为挑选优良辣椒品种,研究辣椒潜在功能因子等提供理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料与设备

*E. coli* OP50, 购自 CGC (Caenorhabditis Genetics Center); 秀丽隐杆线虫, 购自 CGC (Caenorhabditis Genetics Center); 降糖辣椒由金华农科院提供; 氯化钠、多聚蛋白胨、琼脂粉、亚硝酸钠、氯化钙、硫酸镁、磷酸钾、胆固醇、对硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、碳酸钠、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、芦丁对照品、硝酸铝、福林酚试剂、没食子酸、苯酚、浓硫酸等; 立式压力蒸汽灭菌器, 隔水式恒温培养箱, ML31 生物显微镜, 电子天平, TGL-16 离心机, 紫外可见分光光度计, 旋转蒸发仪等。

### 2.2. 实验方法

#### 2.2.1. 降糖辣椒功能因子提取与鉴定

样品预处理方法: 将辣椒果实冻干, 称量, 粉碎, 辣椒粉过 80 目筛, 移入干燥器备用。

##### 1) 黄酮类化合物

天然黄酮类化合物以其在抗衰老、抗肿瘤、抗炎、肝脏保护和降血糖方面的高活性成为糖尿病防治研究热点[5] [6] [7]。在抗氧化模型方面, 关淑文等[8]表明苜蓿所富含的黄酮类营养活性物质具有抗氧化功能。植物黄酮类可以有效防止糖尿病及其并发症。曹稳根等[9]通过  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制实验及四氧嘧啶糖尿病小鼠模型, 证实了枣子叶总黄酮具有显著的降糖活性。

本实验以冷冻干燥后的降糖辣椒粉末为原料, 利用超声波提取法来提取降糖辣椒中的粗黄酮组分[10]。将辣椒果实冻干, 称量, 粉碎, 移入干燥器备用。准确称取 2 g 冻干粉末样品, 置于圆底烧瓶中, 加入 80% 的乙醇溶液, 超声辅助提取 50 min (130 W/65 $^{\circ}$ C)。提取液离心(转速 10,000 r/min, 4 $^{\circ}$ C)后去沉淀, 上清液于 50 $^{\circ}$ C 旋蒸除去乙醇, 冻干。分光光度法是通过测定显色反应达到平衡后溶液的吸光度来计算溶液的浓度。制作芦丁标准曲线, 用最小二乘法求出回归方程。用同样的方法测定降糖辣椒黄酮提取液的吸光值, 代入回归方程中, 即可求出样品的总黄酮含量[11]。

##### 2) 多酚类化合物

多酚广泛存在于天然植物的根、茎、叶、花、果实及果皮中, 具有药用保健功能。杨成峻等[12]表明花椒多酚类物质已经被证明具有抗氧化、抑菌、镇痛抗炎、降血脂和降血糖等活性。在抗氧化方面, 张正海等[13]表明多酚类化合物具有清除自由基的作用。陈旭等[14]的研究表明, 山楂叶多酚对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶有较好的抑制作用。

参考李勇等辣椒叶多酚提取工艺研究[15],取 2.000 g 辣椒冻干粉,以 60%乙醇作溶剂,在 45℃条件下,料液比 1:30 g/mL,提取 40 min, pH 为 1,超声功率 200 W。减压过滤浸提液,旋蒸浓缩至无酒精味。将产物冻干,得到辣椒多酚粗提物。制作标准曲线,用最小二乘法求出回归方程。同样的方法测定其降糖辣椒多酚粗提物的吸光值,代入上述没食子酸的回归方程中,计算提取率。

### 3) 多糖类化合物

多糖是一种高分子碳水化合物,它是一类具有复杂结构的糖类物质。国内外的专家学者发现天然植物多糖降血糖的机理主要有促进胰岛素的分泌、提高胰岛素的敏感性、改善糖代谢、抑制脂质氧化、抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶等生理活性[16][17][18]。李攀攀等[19]研究发现都匀毛尖茶多糖对四氧嘧啶模型小鼠具有明显的降糖作用,对糖尿病小鼠的糖耐量有明显的改善作用,并能改善糖代谢,增加胰岛素的分泌和肝糖原含量,同时可以降低模型小鼠血清中 MDA 含量,提高其 SOD 活力,能明显改善高血糖小鼠的脂质过氧化程度。

称量辣椒冻干粉 2.000 g,加入蒸馏水,在恒定温度下,多次提取,将复提后的滤液合并,用减压旋转蒸发器旋蒸浓缩体积,将不同条件下提取的溶液浓缩到相同的体积。加入四倍体积的无水乙醇进行醇沉多糖,密封放入 4℃冰箱内,静置 12 h 后,离心去上清液,将沉淀冷冻干燥后,进行称量,计算粗多糖的提取率。用苯酚-浓硫酸法对辣椒水提醇沉物中的多糖成分进行定量。

### 4) 辣椒渣蛋白

蛋白提取工艺采用碱提酸沉法[20],超声时间 102 min,超声温度 56℃,碱液浓度 0.4 mol/L,料液比 1:27 (m:V)的条件进行重复性试验,平行 5 次,得到平均提取率为 86.81%,最等电点为 3.6。

## 2.2.2. 测定降糖辣椒粗提物体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率

本课题用 PNPG 法研究了降糖辣椒粗提物功能因子对猪小肠来源的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率。取降糖辣椒活性功能因子粗提物,用 PBS 缓冲液(pH 7.0)稀释成 1 mg/mL,取 30  $\mu$ L 置于 96 孔板中,加入酶液 ( $1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 50  $\mu$ L,37℃培养 10 min,然后加入 3 mmol/L PNPG 底物 50  $\mu$ L,混合液在 37℃条件下反应 20 min 后,加入 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 100  $\mu$ L 终止反应,在 SUNRISE 酶标仪上设定波长为 405 nm,测定吸光值。实验组与空白组试剂添加量如表 1 所示。

**Table 1.** *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibition experiment

**表 1.** 体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制实验

	磷酸钾缓冲溶液( $\mu$ L)	降糖辣椒功能因子( $\mu$ L)	$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\mu$ L)	PNPG ( $\mu$ L)	碳酸钠溶液( $\mu$ L)
样品实验组		30	50	50	100
样品空白组	50	30		50	100
对照实验组	30		50	50	100
对照空白组	80			50	100

计算公式为:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{样品实验组} - \text{样品空白组}}{\text{对照实验组} - \text{对照空白组}}\right) \times 100\%$$

## 2.2.3. 不同浓度辣椒黄酮对秀丽隐杆线虫体内过氧化氢酶(CAT)影响的测定

根据 CAT 试剂盒说明书操作,按照 1:10 (m/v)加入提取液后使用组织研磨器冰浴研磨至匀浆,8000 g,4℃离心 10 min,取 25℃预热的的工作液 1 mL,加入上清液 35  $\mu$ L,混匀立马测其在波长 240 nm 处吸光值和 1 min 后吸光值,记为 A1 和 A2。以每克虫体在反应体系中每分钟催化 1 微摩尔过氧化氢降解为一个

酶活单位。

$$CAT(U/g) = 678 * \Delta A \div W(2-1)$$

$\Delta A$ :  $A_2 - A_{1W}$ : 样本质量

#### 2.2.4. 辣椒多糖对线虫寿命影响

分组给药: 将同步化得到的 L2 秀丽隐杆线虫随机分成 6 组, 分别为空白组(0  $\mu$ L)和辣椒多糖给药组(50、100、500、1000  $\mu$ L), 每组设有 1 板且每板各分配 30 条活跃状态相当的秀丽隐杆线虫, 并记为第一天, 后在酒精灯旁按每组的不同体积用移液枪进行给药。给药后, 置于 20 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。每天同一时间将存活的线虫转移至新平板中, 记录每天存活的线虫数, 直至全部死亡, 线虫死亡标准为铂金铲触硬线虫无任何反应, 丢失和爬到培养基壁上干死的线虫应从统计中剔除。

#### 2.2.5. 辣椒多糖添加量对秀丽隐杆线虫运动能力的影响

将不同浓度辣椒多糖暴露 5 天后的线虫转移至 NGM 培养基上, 恢复适当时间, 使用显微镜观察线虫头部在 1 分钟内摆动的次数。每个处理组统计 30 条线虫。线虫摄食能力的强弱可以通过咽部抽动速率来体现。将不同浓度辣椒多糖暴露 5 天后的线虫转移至铺有 OP50 的 NGM 上, 先让其爬行 30 min, 再直接在荧光显微镜底下计数线虫 60 s 内咽部抽动的次数, 每组测定 30 条线虫。数据统计分析与作图主要通过软件 spass26 完成, 所有实验结果均表示为平均值  $\pm$  标准误(Means  $\pm$  SEM)。

### 3. 结果与分析

#### 3.1 功能性因子的含量测定

$$\text{总黄酮含量如下计算 } M = \frac{C \times V \times n \times d}{m \times d}$$

根据实验方法所测得的降糖辣椒粗黄酮溶液吸光度带入线性方程  $y = 0.8689x + 0.0083$  ( $R^2 = 0.9981$ ), 计算出相对应浓度为 0.891 mg/mL。根据公式计算出所得样品中降糖辣椒粗黄酮含量为 27.365 mg/g。

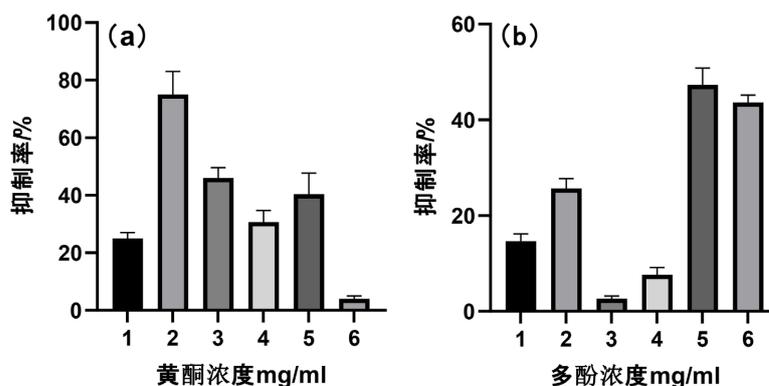
$$\text{多糖含量}(\%) = (A - B) \times V \times D / (C \times W)$$

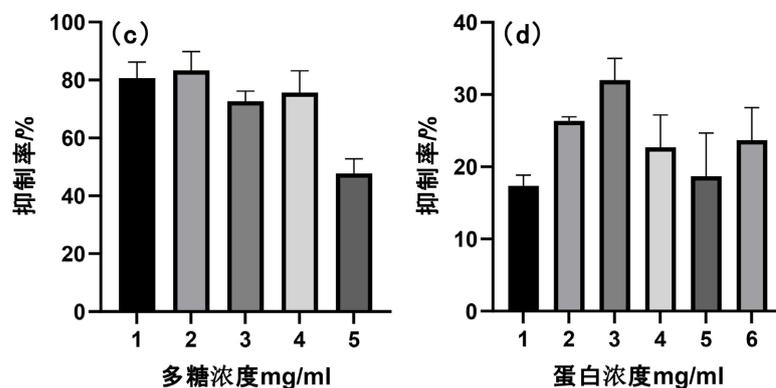
根据实验方法所测得的降糖辣椒粗多糖溶液吸光度带入线性方程  $y = 0.0567x + 0.0564$  ( $R^2 = 0.9905$ ), 计算出相对应浓度为 3.66  $\mu$ g/mL。根据公式计算出所得样品中降糖辣椒粗多糖提取率为 91.04%。

$$\text{多酚含量}(\%) = (A - B) \times V \times D / (C \times W)$$

根据实验方法所测得的降糖辣椒粗多酚溶液吸光度带入线性方程  $y = 81.695x + 0.0205$  ( $R^2 = 0.9913$ ), 计算出相对应浓度为 0.004584 mg/mL, 根据公式计算出所得样品中降糖辣椒粗多酚提取率为 11.46%。

#### 3.2. 降糖辣椒功能活性因子提物体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率



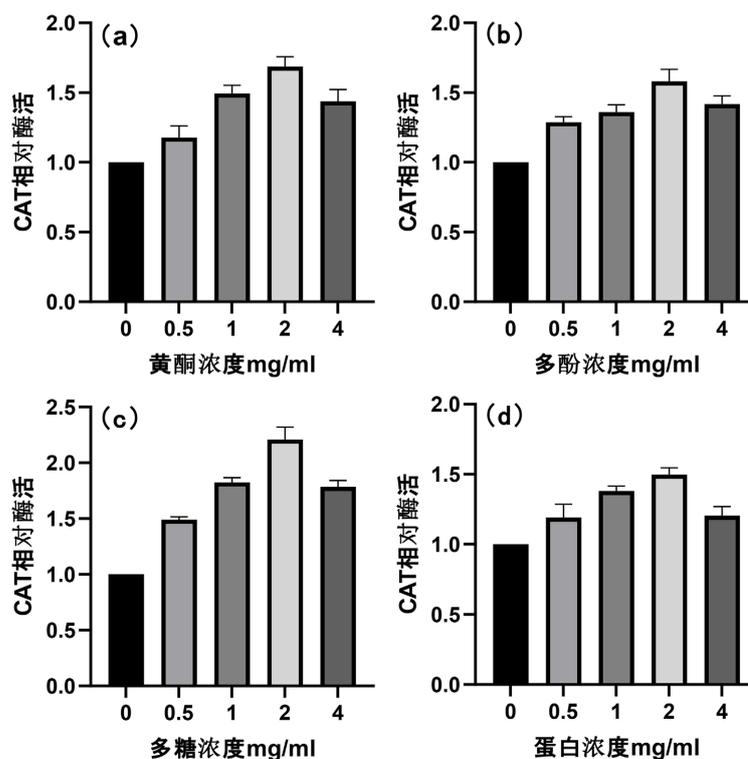


**Figure 1.** Functional activity factors affecting  $\alpha$ -glucosidase inhibition rate: (a) Flavonoids; (b) Polyphenols; (c) Polysaccharides; (d) Protein

**图 1.** 功能活性因子对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率: (a) 黄酮; (b) 多酚; (c) 多糖; (d) 蛋白质

降糖辣椒黄酮类化合物对于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶体外抑制的作用较为明显, 1.982 mg/mL 的抑制率达到了 70%, 辣椒多糖提取物 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL 的抑制率均在 80%以上, 辣椒多酚提取物 1.738 mg/mL、2.172 mg/mL 的抑制率均在 40%以上, 如图 1 所示。因此可以得出结论, 降糖辣椒中的多糖和黄酮是主要的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性因子。

### 3.3. 不同浓度辣椒提取物对秀丽隐杆线虫体内过氧化氢酶(CAT)活力影响的测定



**Figure 2.** Determination of the effect of chili flavonoids on the activity of catalase (CAT) in the body of *Caenorhabditis elegans*: (a) Flavonoids; (b) Polyphenols; (c) Polysaccharides; (d) Protein

**图 2.** 辣椒黄酮对秀丽隐杆线虫体内过氧化氢酶(CAT)活力影响的测定: (a) 黄酮; (b) 多酚; (c) 多糖; (d) 蛋白质

如图 2 经过高浓度辣椒处理后的线虫体内 CAT 酶活力显著升高,其中 2 mg/mL 辣椒多糖处理的线虫酶活提高明显,说明其体内羟基自由基清除能力显著提高,有良好的抗氧化效果。

### 3.4. 辣椒多糖对线虫寿命影响

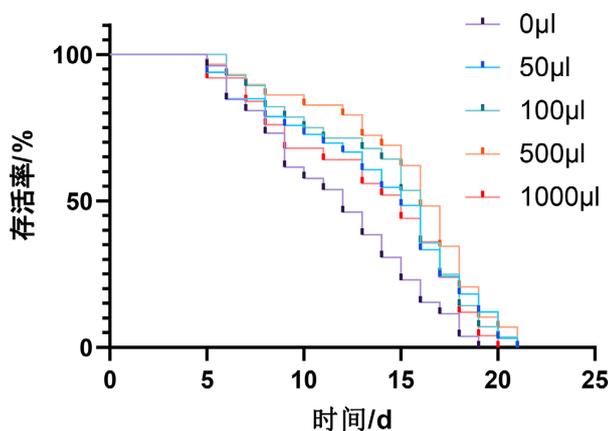


Figure 3. The effect of chili polysaccharides on the lifespan of nematodes  
图 3. 辣椒多糖对线虫寿命的影响

如图 3 将辣椒多糖以不同添加量对秀丽隐杆线虫进行饲喂,探究对线虫的延寿作用,确定其有效添加浓度。结果显示,当添加辣椒多糖能显著延长秀丽隐杆线虫的寿命,其中 500  $\mu$ L 组中位平均寿命增加 4 d,约延长了 21.05%,最大寿命增加 2 d。辣椒多糖具有显著延长秀丽隐杆线虫的寿命的能力,且呈现一定范围的浓度梯度依赖性。

### 3.5. 辣椒多糖添加量对秀丽隐杆线虫运动能力(头部摆动频率和线虫吞咽频率)的影响

Table 2. Effect of chili polysaccharide addition on the motility of *Caenorhabditis elegans*

表 2. 辣椒多糖添加量对秀丽隐杆线虫运动能力的影响

辣椒多糖添加量/(mg/mL)	线虫吞咽频率/(次/min)	线虫体长/(mm)
0	200.00 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	965.28 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>
0.05	226.00 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	986.22 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>
0.1	245.00 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	1005.00 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>
0.5	278.00 $\pm$ 1.54 <sup>bc</sup>	1078.00 $\pm$ 1.54 <sup>bc</sup>
1	300.00 $\pm$ 1.63 <sup>c</sup>	1073.00 $\pm$ 1.63 <sup>bc</sup>

注: 同列不同字母表示具有显著差异,  $P < 0.05$

由表 2 可知,当辣椒多糖含量较低时,线虫运动速率与对照组相比无显著差异( $P > 0.05$ ),表明低浓度辣椒多糖无法影响线虫的运动。当辣椒多糖含量为 0.5 mg/mL 时,线虫运动速率显著高于对照组( $P < 0.05$ )和 1 mg/mL 实验组( $P < 0.05$ );但是 0.1 mg/mL 实验组与 0.5 mg/mL 实验组无显著差异( $P > 0.05$ )。当辣椒多糖含量为 1 mg/mL 时,相比空白对照组的 101.00  $\pm$  5.78 次/min.增加了 47.52%;运动频率达到了 149.00  $\pm$  7.25 次/min。

当辣椒多糖含量为 1 mg/mL 时,相比空白对照组的 200.00  $\pm$  0.82 次/min,增加了 50.00%;运动频率达到了 300.00  $\pm$  1.63 次/min。说明辣椒多糖具有显著提高秀丽隐杆线虫的吞咽的能力。

## 4. 讨论

基于国内外同类工作研究现状和本课题组研究基础,本研究以现有的辣椒部分高代材料为初始研究对象,针对它们所含有主要功能因子:蛋白质、多酚、黄酮、多糖等,通过高效绿色的提取和纯化技术进行集成制备并对其有效成分进行分析检测,在获得相关成熟技术和工艺的基础上,通过构建秀丽隐杆线虫不同模型进行功效验证。植物中活性成分分布广泛,种类繁多,作用机制也各不相同,通过体外抗氧化测评,高浓度辣椒提取物可以很好清除体外游离总自由基和游离羟基自由基,有良好抗氧化作用。通过对秀丽隐杆线虫体内抗氧化酶活力的测定,证实辣椒提取物可以提高生物体内有清除自由基效果的酶活力,在高浓度给药的情况下,秀丽隐杆线虫体CAT酶活力显著提高,证明其在机体内有提高抗氧化酶活力的能力,可以进一步证明其的抗氧化能力。

## 参考文献

- [1] 张亚如,李映志. 辣椒高产栽培种植[J]. 耕作与栽培, 2019, 39(5): 54-55, 58.
- [2] 尹峥桢,侯北伟,卢蓓蓓,等. 辣椒降糖活性的研究进展及应用前景[J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(5): 89-92, 105.
- [3] 祝文轩,师全英,王向红,等. 辣椒素与槲皮苷通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路调节 HepG2 细胞脂质代谢作用机制[J/OL]. 食品科学, 1-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231225.1502.052.html>, 2024-03-11.
- [4] 龚婷. 辣椒素降低高脂膳食大鼠血脂的机制研究[D]: [博士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2022. <https://doi.org/10.27684/d.cnki.gxndx.2022.003830>
- [5] 王俊龙,蔺永刚,陈凤霞,等. 弯萼金丝桃总黄酮提取及抗氧化、降糖活性[J/OL]. 精细化工, 1-14. <https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20230469>, 2024-03-11.
- [6] 陈建中,葛水莲,杨明建,等. 太行菊黄酮对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(8): 95-102.
- [7] 钱志伟,李镁娟,马娇豪,等. 枳椇子总黄酮的抗氧化及降糖活性研究[J]. 河南农业, 2023(21): 59-61, 64. <https://doi.org/10.15904/j.cnki.hnny.2023.21.024>
- [8] 关淑文,潘子琮,寇伟,等. 基于高效液相色谱特征指纹图谱法探究不同品种苜蓿中黄酮抗氧化活性的谱-效关系[J]. 动物营养学报, 2022, 34(12): 8086-8096.
- [9] 曹稳根,史晔瑶,王晴,等. 王枣子叶总黄酮的降糖活性研究[J]. 中成药, 2022, 44(9): 3031-3034.
- [10] 杨喜花,陈敏,张华珺,李慧,殷丽君. 微波法提取沙棘叶总黄酮的工艺研究[J]. 中草药, 2006, 37(4): 535-537.
- [11] Dabhi, A.S., Bhatt, N.R. and Shah, M.J. (2013) Voglibose: An Alpha Glucosidase Inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7, 3023-3027.
- [12] 杨成峻,陈明舜,刘成梅,等. 花椒果皮多酚类成分鉴定及降血糖活性[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 271-278.
- [13] 张正海,董艳,姬妍茹. 黑蒜的抗氧化与免疫保护作用[J]. 中国调味品, 2022, 47(10): 210-214.
- [14] 陈旭,卢静静,王涵驰,李延华. 响应面法优化山楂叶多酚微波-超声辅助提取工艺及其降糖活性研究[J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(7): 67-77, 87. <https://doi.org/10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2022.07.008>
- [15] 李勇,黄昀,陈娜,等. 超声辅助提取辣椒叶中多酚的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(13): 216-219
- [16] 屈雅宁,李慧,向大松,等. 两种细菌发酵豆粉粗多糖体外降血糖、降血脂活性比较[J/OL]. 食品工业科技, 1-16. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080053>, 2024-03-11.
- [17] 魏菱鸽,李慧,米圣成,等. 白茅根多糖理化性质及对 HepG2 细胞的降糖作用研究[J/OL]. 食品与发酵工业, 1-16. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037115>, 2024-03-11.
- [18] 米圣成,徐晓杰,魏菱鸽,等. 元宝枫种仁多糖提取纯化、结构表征以及降糖活性研究[J/OL]. 食品工业科技, 1-16. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080038>, 2024-03-11.
- [19] 李攀攀,白锦龙,艾于杰. 都匀毛尖茶多糖对四氧嘧啶模型小鼠降血糖作用的研究[J]. 福建茶叶, 2024, 46(2): 28-30.
- [20] 魏佳,魏臻武,张有鑫,等. 植物叶蛋白提取工艺及蛋白肽制备技术研究进展[J/OL]. 草业科学, 1-22. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1069.S.20240122.1939.002.html>, 2024-04-11.