

大麦芽多糖的降血糖活性及结构解析

杨延超, 徐德平*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 用四氧嘧啶糖尿病小鼠模型, 考察大麦芽粗多糖的降糖作用, 并通过 DEAE-cellulose、HW-55F、Sephacryl S-400 柱对有降血糖活性的组分进行分离。采用苯酚-硫酸法、薄层色谱法检测多糖纯度, 通过单糖组成分析和 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、 $^{135}\text{DEPT}$ -NMR 检测对多糖初级结构进行表征。结果表明: 大麦芽粗多糖具有降低小鼠空腹血糖作用, 对其餐后血糖效果不显著; 粗多糖经 DEAE-cellulose 柱分离得到中性多糖和酸性多糖两个部分, 其中水洗中性多糖经过 HW-55F、Sephacryl S-400 柱层析得到大麦芽多糖 BP I 和 BP II。BP I 结构由呋喃葡萄糖组成, 以 1 $\rightarrow$ 3 键相连, α 和 β 构型交替出现; BP II 为半乳糖分子以 1 $\rightarrow$ 4 键相连形成主链, 另有一个半乳糖分子连在主链糖分子的 6-位上, 形成侧链。其中, BP II 在大麦芽中首次报道。

关键词: 大麦芽; 多糖; 降血糖作用; 结构

中图分类号: Q539

文献标志码: A

文章编号: 1673—1689(2012)10—1087—06

Hypoglycemic Effect and Structural Determination of Polysaccharides from Barley Malt

YANG Yan-chao, XU De-ping*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Purpose: To investigate the separation method and the structure of polysaccharides with hypoglycemic effect from barley malt (BP). Methods: Alloxan-induced diabetic mice model was built, in which the hypoglycemic effect of polysaccharides from barley malt were determined. The polysaccharides from barley malt was purified to homogeneity through DEAE-cellulose, HW-55F and Sephacryl S-400 column chromatography. Meanwhile, the purity identification was analyzed by phenol-sulfuric method and thin layer chromatography. The structure was investigated using sugar composition analysis and ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, $^{135}\text{DEPT}$ -NMR analysis. Results: The polysaccharides can decrease fasting plasma glucose of the diabetes mice efficiently, and showed no significant effect on postprandial plasma glucose. Neutral polysaccharides (NBP) and acidic polysaccharides was isolated by DEAE-cellulose. BP I and BP II were further isolated from NBP by HW-55F and Sephacryl S-400. BP I consists only of glucofuranose units joined by 1 $\rightarrow$ 3 bond,

收稿日期: 2011-11-02

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD83B02)。

* 通信作者: 徐德平(1965-), 男, 安徽宣城人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物化学方面的研究。

E-mail: xdp1219@sina.com

and both of α and β -configuration appear alternately. The main chain of BP II is galactoses linked by 1 $\rightarrow$ 4 bond, and the galactose, forming lateral chain, is linked to C-6 of galactose in the main chain. BP II is reported for the first time from barley malt.

Keywords: barley malt, polysaccharides, hypoglycemic effect, structure

大麦(*Hordeum vulgare* L.), 又名裸麦、饭麦、赤膊麦, 为禾本科一年生草本植物的果实, 将成熟果实发芽干燥而得的麦芽, 是药食同源性传统中草药^[1]。大麦芽中含有麦黄酮、 β -葡聚糖、大麦芽碱、尿囊素等多种活性成分, 具有清除自由基、改善记忆、降血糖、降血脂、抗癌等功能^[2-5], 有关大麦芽的降血糖作用在《名医别录》和《中药大辞典》等均有记载。

目前, 国内对大麦芽的研究主要集中在大麦芽活性成分的生理功能上, 而对大麦芽多糖的分离、结构解析的研究还未见报道。作者利用四氧嘧啶糖尿病小鼠模型发现大麦芽粗多糖具有降血糖活性, 并进一步对粗多糖进行分离与结构分析, 为研究大麦芽多糖构效关系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大麦芽: 江苏省农垦麦芽有限公司提供; 四氧嘧啶: FLUKA 公司; ICR 种小鼠: 雄性, 体重 28~32 g, 上海西普尔必凯实验动物有限公司; 血糖测定试剂盒: 上海科华东菱诊断用品有限公司; GF₂₅₄ 硅胶板: 山东烟台芝罘化工厂; DEAE-cellulose、HW-55F: TOSOH 公司; Sephacryl S-400 柱填料: Pharmacia 公司; 氯仿、氯化钠: 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

DFY-600 型摇摆式高速中药粉碎机: 温岭市林大机械有限公司; CQ-005 型萃取罐: 常州市特威电气自动化系统有限公司; R-1002 型旋转蒸发器: 上海申顺生物科技有限公司; MK3 酶标仪: 上海天呈科技有限公司; TU-1900 型双光束紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司; GC-17AATF 气相色谱仪: 日本岛津公司; Avance-500 型核磁共振仪: Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 大麦芽多糖的提取 将 5 kg 大麦芽粉碎过 60 目筛, 以质量体积比 1:5 的料液比采用去离子水

40 ℃提取 5 h, 离心去除滤饼, 滤渣依上述条件重复提取 2 次。将 3 次提取得到的滤液合并, 真空浓缩至一定体积。边搅拌边加入 3 倍体积的 95%乙醇, 于 3~4 ℃的冰箱内静置 24 h, 将沉淀物用 95%乙醇洗涤 3 次, 得到大麦芽粗多糖。

1.3.2 糖尿病小鼠模型的建立 取 ICR 种雄性小鼠, 分笼饲养于 (20 $\pm$ 2) ℃明暗各 12 h 的动物实验室内, 实验动物自由饮水和进食。正常喂养 2 d, 禁食 18 h 后, 按 60 mg/kg 的剂量 IV 注射四氧嘧啶溶液, 快速注射完毕, 注射完后 72 h 测定餐后血糖, 将血糖值 >20.0 mmol/L 的小鼠作为高血糖模型。

1.3.3 样品对糖尿病小鼠血糖水平的影响 动物按血糖值随机分成 3 组, 每组 9 只: 模型对照组、阳性对照组 (二甲双胍 240 mg/kg)、大麦芽粗多糖组 (500 mg/kg)。各给药组按 10 mg/kg 剂量灌喂给药, 模型对照组给予等量蒸馏水。连续给药 4 周后, 测定餐后血糖及给药后空腹血糖值^[6-8]。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间实验数据的比较采用两样本均数的 t 检验; 等级资料采用 Ridit 检验; $P < 0.05$ 时表明有显著差异^[9]。

1.3.4 大麦芽粗多糖离子交换柱分离 取大麦芽粗多糖加适量水溶解, 上 DEAE-cellulose (60 mm $\times$ 600 mm) 柱层析, 依次用去离子水、0.1、0.2、0.3 mol/L NaCl 溶液洗脱, 流速 5 mL/min, 分步收集, 试管接收, 每管 15 mL。用苯酚-硫酸法^[10]检测, 将含糖各主峰合并收集, 得到去离子水洗脱和 0.1 mol/L NaCl 洗脱两个组分。

1.3.5 大麦芽多糖水洗部分的分离 将水洗部分上 HW-55F (35 mm $\times$ 1500 mm) 柱层析, 用去离子水洗脱, 流速 5 mL/min, 经苯酚-硫酸法检测将含糖各主峰合并收集, 最后反复上 Sephacryl S-400 (35 mm $\times$ 1500 mm) 柱纯化, 用去离子水洗脱, 流速 5 mL/min, 收集含糖各主峰即得大麦芽多糖 BP I 和 BP II。

1.3.6 纯度鉴定 将色谱得到的纯的化合物 BP I 和 BP II, 再通过薄层层析法 (TLC) 进行纯度鉴定。展开剂为乙酸乙酯-正丁醇-氨水-水 (体积比 6:5:3:

2)溶液,显色剂为甲醇-冰醋酸-浓硫酸-茴香醛(体积比 170:20:10:1)溶液。

1.3.7 单糖组成分析 按文献[11]报道的方法对样品进行水解,水解后单糖按文献[12]的方法进行衍生化,用 GC 法检测单糖组成^[13-14]。

1.3.8 核磁共振分析 将纯化后得到化合物用重水(D₂O)溶解后在核磁共振仪上进行 ¹H-NMR、¹³C-NMR、¹³⁵DEPT-NMR 分析,以四甲基硅烷(TMS)为内标物^[15]。

2 结果与分析

2.1 大麦芽粗多糖降血糖活性的检测

粗多糖组分对四氧嘧啶糖尿病小鼠的作用结果见表 1。由表 1 可知:在给药 4 周后,二甲双胍组、

大麦芽粗多糖组中糖尿病小鼠的空腹血糖值明显低于模型对照组($p<0.05$),说明二甲双胍、大麦芽粗多糖具有降低糖尿病小鼠的空腹血糖作用;大麦芽粗多糖组中糖尿病小鼠的餐后血糖值下降较少,说明大麦芽粗多糖对糖尿病小鼠的餐后血糖也有一定的作用,但没有明显差异。

本实验中的糖尿病小鼠是由四氧嘧啶诱导所致。四氧嘧啶通过产生超氧自由基破坏胰岛 β 细胞,导致胰岛 β 细胞合成前胰岛素减少,造成胰岛素缺乏^[16]。大麦芽粗多糖能降低小鼠的空腹血糖,表明其主要作用是改变基础血糖,可能是通过减轻四氧嘧啶对胰岛 β 细胞的损伤,使胰岛 β 细胞功能得到修复,从而改善胰岛分泌胰岛素的水平,最终达到降血糖作用。

表 1 多糖组分对糖尿病小鼠血糖的影响

Tab.1 Effect of polysaccharides on plasma glucose in diabetic mice

组别	剂量/(mg/kg)	血糖浓度/(mmol/L)				
		基础血糖 餐后	给药 2 周 餐后	给药 2 周 空腹	给药 4 周 餐后	给药 4 周 空腹
模型组	—	42.5±6.6	39.3±5.8	24.4±7.1	45.0±4.3	33.9±5.7
阳性对照组	240	44.4±6.7	35.0±5.9	14.0±11.2*	42.4±8.1	18.2±12.2**
大麦芽粗多糖	500	42.7±8.5	31.9±9.5	20.3±10.6	41.8±7.0	27.4±6.1*

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.2 大麦芽粗多糖离子交换柱色谱的分离结果

大麦芽粗多糖上 DEAE-cellulose 柱分离,经苯酚-硫酸法检测得到洗脱曲线,见图 1。图 1 中共有 4 个洗脱峰,分别为去离子水、梯度 NaCl 溶液洗脱得到的中性多糖和酸性多糖^[17-18]。由于 0.2 mol/L 和 0.3 mol/L NaCl 溶液洗脱组分干物质含量较少,不作为进一步研究对象。

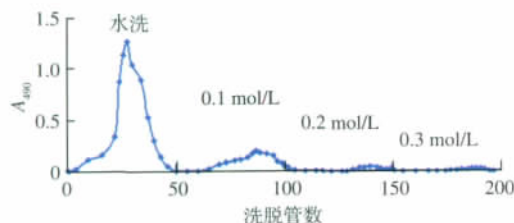


图 1 DEAE-cellulose 柱洗脱曲线

Fig.1 Elution curve on DEAE-cellulose column chromatography

2.3 大麦芽多糖水洗部分的分离结果

将水洗中性多糖上 HW-55F 柱分离,洗脱曲线见图 2。从图 2 可以看出:水洗中性多糖经 HW-55F 柱层析分离得到 I、II 两个峰,两峰之间有较好的分离度。

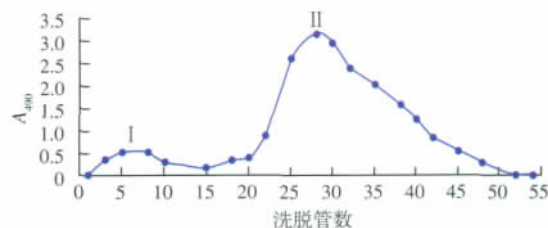


图 2 HW-55F 柱洗脱曲线

Fig.2 Elution curve on HW-55F column chromatography

将洗脱峰 I、II 部分再分别经 Sephacryl S-400 柱反复分离,最终得到大麦芽多糖 BP I 和 BP II,结果见图 3,由峰型可见单一且对称,表明组分 I 与 II 已经达到较好分离。

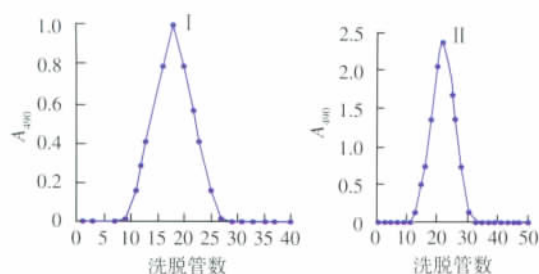


图3 多糖 I、II Sephacryl S-400 柱洗脱曲线

Fig.3 Elution curve of BP I and BP II on Sephacryl S-400 column chromatography

2.4 纯度鉴定

如图4显示,由TLC检测,BP I和BP II在薄层板上为单一斑点,表明分离后得到的BP I和BP II的纯度达到核磁分析的要求。

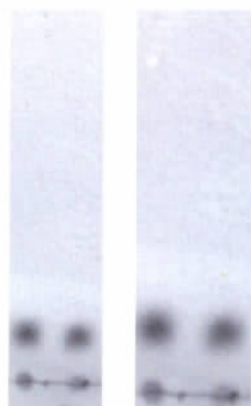


图4 多糖 I、II 的薄层色谱图

Fig.4 Thin layer chromatographic spectra of component I、II

2.5 单糖组成测定结果

在混合标准单糖同样反应和测定条件下,进行大麦芽多糖水解产物的糖腈乙酸酯气相色谱分析。由标准单糖衍生物的气相色谱图,对比可知:BP I、BP II均为均一性多糖,其中BP I单糖与标准单糖的保留时间皆不一致,BP II单糖与标准单糖半乳糖的保留时间一致。

2.6 核磁图谱分析

BP I 的 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, $^{135}\text{DEPT}$ 谱图见图5~图7。从 ^1H -NMR 可见, $\delta 5.32, 5.27$ 处有两个强的H信号,这两个H应为糖上端基H,说明该组分主要由两个糖残基构成;从 ^{13}C -NMR 可见 $\delta 111.4, 104.4$ 处有两个端基碳信号,表明有两个糖残基存在。两个组分糖的化学位移分别为 $111.4, 87.0, 83.8, 79.9, 76.3, 63.9$ 和 $104.4, 87.2, 83.7, 79.3,$

$75.3, 63.8$ 。从这些数据来看, $\delta 87.0, 87.2$ 应为 C-3 位成苷键造成的化学位移向低场移动,而其他碳信号与吡喃糖相应的碳信号不一致,化学位移明显高于吡喃糖,判断两个糖以呋喃环的形式存在,综合碳谱信号来看,两个糖为呋喃葡萄糖, $\delta 111.4$ 的端基碳为 β 构型, $\delta 104.4$ 的端基碳为 α 构型。从 $^{135}\text{DEPT}$ 谱来判断,糖的 6-位未参与成键。

综合分析推测,BP I 为由呋喃葡萄糖组成,呋喃葡萄糖分子以 $1 \rightarrow 3$ 键相连, α 和 β 构型交替出现。这一结构与相关的报道有较大的差别^[19-21]。

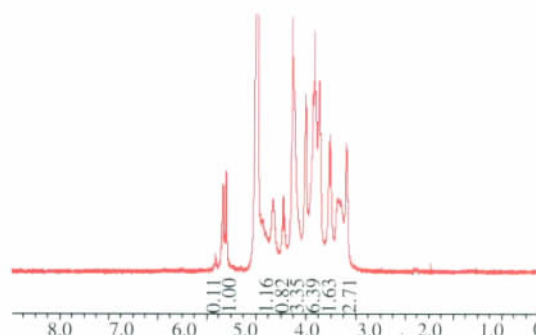


图5 BP I 的 ^1H -NMR 谱图

Fig.5 ^1H -NMR spectrum of BP I

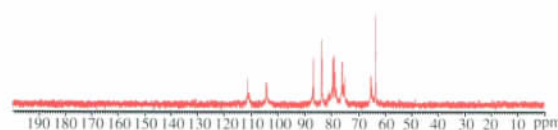


图6 BP I 的 ^{13}C -NMR 谱图

Fig.6 ^{13}C -NMR spectrum of BP I

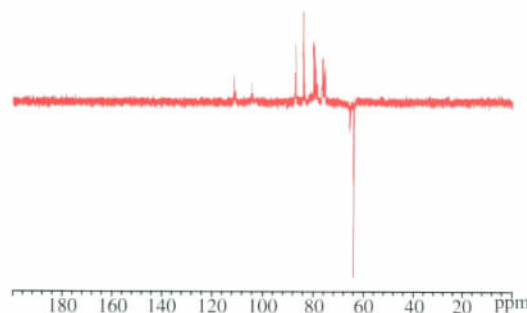


图7 BP I 的 $^{135}\text{DEPT}$ 谱图

Fig.7 $^{135}\text{DEPT}$ spectrum of BP I

BP II 的 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, $^{135}\text{DEPT}$ 谱图见图8~图10。从 ^1H -NMR 可见, $\delta 5.40, 5.01$ 处有两个H信号,说明该组分主要由两个糖残基构成, $\delta 5.40$ 的H信号较强, $\delta 5.01$ 处的H信号相对较弱,表明该多糖除了主链外还有侧链。从 ^{13}C -NMR 可见, $\delta 102.7, 100.4$ 两个端基碳信号,其中 $\delta 102.7$ 的碳信

号较强, $\delta 100.4$ 的碳信号较弱,表明 $\delta 102.7$ 端基碳的糖为主链, $\delta 100.4$ 端基碳的糖为侧链。 $\delta 60.1, 19.5$ 为乙醇残留的溶剂峰。从 ^{13}C DEPT谱来看,碳-6的化学位移明显向低场移动了5.5,说明糖的6-位参与成键。综合分析推测BP II为半乳糖分子以1 $\rightarrow$ 4键相连形成主链,另有一个半乳糖分子连在主链糖分子的6-位上,形成侧链。这一结构在大麦芽中首次报道。

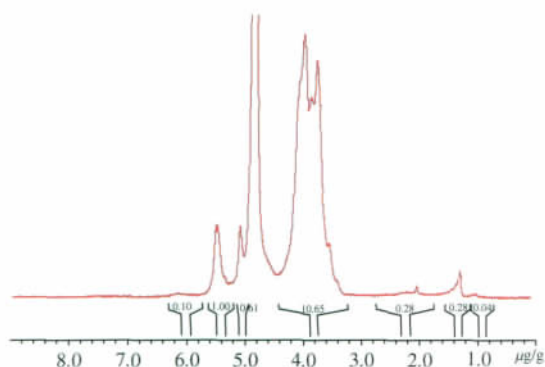


图8 BP II的 ^1H -NMR谱图
Fig.8 ^1H -NMR spectrum of BP II

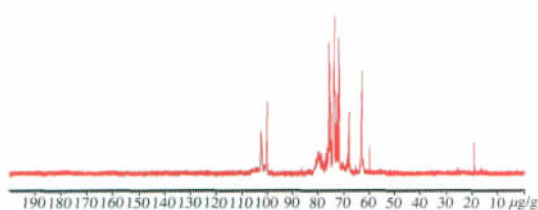


图9 BP II的 ^{13}C -NMR谱图
Fig.9 ^{13}C -NMR spectrum of BP II

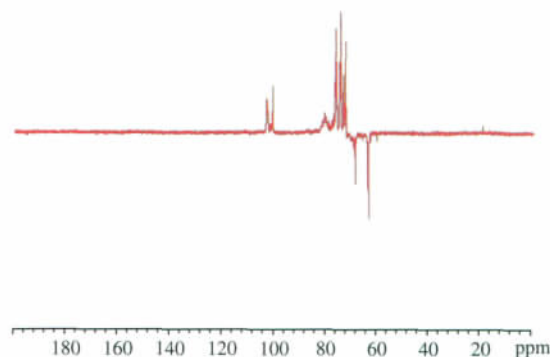


图10 BP II的 ^{13}C DEPT谱图
Fig.10 ^{13}C DEPT spectrum of BP II

3 结 语

大麦芽粗多糖具有降低糖尿病小鼠的空腹血糖作用,对餐后血糖也有一定的作用,但没有明显性差异。

大麦芽粗多糖经DEAE-cellulose柱分离得到中性多糖和酸性多糖两个部分,其中水洗中性多糖经过HW-55F、Sephacryl S-400柱层析最终纯化得到大麦芽多糖BP I和BP II。经过核磁共振分析得到,BP I的主链为由吡喃葡萄糖组成,以1 $\rightarrow$ 3糖苷键相连, α 和 β 构型交替出现,这一结构与Steve^[19]、Lazaridou^[21]等的研究结果有较大差别,与报道中的 β -葡聚糖分子结构相比,BP I的单糖组成中不含吡喃葡萄糖,且不存在1 $\rightarrow$ 4糖苷键。BP II的结构为半乳糖分子以1 $\rightarrow$ 4键相连形成主链,另有一个半乳糖分子连在主链糖分子的6-位上,形成侧链,这一结构在大麦芽中首次报道。

参考文献:

- [1] 陈海华,董海洲. 大麦的营养价值及其在食品工业中的开发利用[J]. 山东食品发酵,2002,(1):28-30.
CHEN Hai-hua,DONG Hai-zhou. The nutritional value of the Barley and its application in food industry[J]. *Shandong Food Ferment*,2002,(1):28-30.(in Chinese)
- [2] 凌俊红,王楠,任玉珍,等. HPLC法测定大麦芽中麦黄酮[J]. 中草药,2005,36(11):1632-1634.
LING Jun-hong,WANG Nan,REN Yu-zhen,et al. Determination of tricin in malt by HPLC[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*,2005,36(11):1632-1634.(in Chinese)
- [3] Maillard M N,Soum M H,Boivin P,et al. Antioxidant activity of barley and malt;relationship with phenolic content[J]. *Lebensm Wiss Technol*,1996,29(3):238-244.
- [4] Ajithkumar A,Andersson R,Christerson T,et al. Amylose and β -glucan content of new waxy barleys[J]. *Starch/Starke*,2005,(57):235-239.
- [5] Bourdon I,Yokoyama W,Davis P,et al. Postprandial lipid,glucose,insulin,and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan[J]. *Am J Clin Nutr*,1999,69(1):55-63.
- [6] 张雪萍,白学敏. 复方南瓜粉对糖尿病模型小鼠药理作用的研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2004,21(4):278-280.

- ZHANG Xue-ping, BAI Xue-min. Effect of compound pumpkin powder on diabetic mice[J]. **Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy**, 2004, 21 (4): 278-280. (in Chinese)
- [7] 陈福军, 卢军, 张永煜. 桑叶的药理研究(Ⅰ): 桑叶降血糖有效组分对糖尿病动物糖代谢的影响[J]. **沈阳药科大学学报**, 1996, 1(1): 24-26.
- CHEN Fu-jun, LU Jun, ZHANG Yong-yu. Pharmacological studies on morus (Ⅰ): Effect of total polysaccharide of morus (TPM) on carbohydrate metabolism in diabetic mice[J]. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, 1996, 1(1): 24-26. (in Chinese)
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版, 2002: 1066-1067.
- [9] 杨雨, 欧阳臻, 常钰. 桑叶不同组分降血糖作用研究[J]. **食品科学**, 2007, 28(8): 454-457.
- YANG Yu, OU Yang-zhen, CHANG Yu, et al. Study on hypoglycemic effects of components in mulberry leaves[J]. **Food Science**, 2007, 28(8): 454-457. (in Chinese)
- [10] 孙元琳, 顾小红, 汤坚, 等. 当归水溶性多糖的分离、纯化及结构初步分析[J]. **食品与生物技术学报**, 2006, 25 (1): 1-4.
- SUN Yuan -lin, GU Xiao -hong, TANG Jian, et al. The preparation, purification and structure analysis of water -soluble polysaccharides from angelica sinensis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(1): 1-4. (in Chinese)
- [11] 周鹏, 沈金灿, 谢明勇, 等. GC-MS 法分析茶叶中提取物 TGP 的单糖组成及机理探讨[J]. **厦门大学学报**, 2003, 42(2): 213-217.
- ZHOU Peng, SHEN Jin-can, XIE Ming-yong, et al. Studies on monosaccharide composition of TGP extracted from tea and its ionization mechanism by GC-MS[J]. **Journal of Xiamen University**, 2003, 42(2): 213-217. (in Chinese)
- [12] 殷军艺, 聂少平, 付志红, 等. 大粒车前子多糖分离、纯化及单糖组成分析[J]. **食品科学**, 2008, 29(9): 529-532.
- YIN Jtm-yi, NIE Shao-ping, FU Zhi-hong, et al. Isolation and purification of polysaccharide from seeds of *Plantago asiatica* L and analysis of its monosaccharide composition[J]. **Food Science**, 2008, 29(9): 529-532. (in Chinese)
- [13] ZHU K X, ZHOU H M. Purification and characterization of a novel glycoprotein from wheat germ water-soluble extracts[J]. **Process Biochemistry**, 2005, (40): 1469-1474.
- [14] Englyst H, Wiggins H S, Cummings J H. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates[J]. **Analyst**, 1982, (107): 307-318.
- [15] Kimiko O, Kyoko M. Structure of mannan fractionated from water-soluble mucilage of nagaimo (*Dioscorea batatas* Dence)[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1991, 55(9): 2413-2414.
- [16] 季峰, 魏贤勇, 刘广龙, 等. 玉竹多糖降血糖作用的实验研究[J]. **江苏中医药**, 2006, 27(9): 70-71.
- JI Feng, WEI Xian-yong, LIU Guang-long, et al. Experimental study of hypoglycemic effect of polygonatum polysaccharides[J]. **Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2006, 27(9): 70-71. (in Chinese)
- [17] 顾林, 姜军. 山药多糖的分离纯化及组成研究[J]. **食品科学**, 2007, 28(9): 158-161.
- GU Lin, JANG Jun. Study on constituents, separation and purification technology of Yam polysaccharides[J]. **Food Science**, 2007, 28(9): 158-161. (in Chinese)
- [18] 吴艳, 顾小红, Steve W C, 等. 胖大海酸性多糖的分离纯化及初步结构研究[J]. **食品研究与开发**, 2006, 27(7): 95-98.
- WU Yan, GU Xiao-hong, STEVE W, et al. Study of separation, purification and preliminary structure of acidic polysaccharides from boat-fruited sterculia seed[J]. **Food Research and Development**, 2005, 26(12): 90-93. (in Chinese)
- [19] Steve W C, Wang Qi. Cell wall polysaccharides in cereals: chemical structures and functional properties[J]. **Structural Chemistry**, 2009, (20): 291-297.
- [20] 汪海波, 谢笔钧, 刘大川, 等. 燕麦中 β -葡聚糖的分离纯化及结构表征[J]. **食品科学**, 2005, 26(12): 90-93.
- WANG Hai-bo, XIE Bi-un, LIU Da-chuan, et al. Separation, purification and structural analysis of β -glucan from oat[J]. **Food Science**, 2005, 26(12): 90-93. (in Chinese)
- [21] Lazaridou A, Biliaderis C G. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects[J]. **Journal of Cereal Science**, 2007, (46): 101-118.