

牛膝多糖降血糖活性成分的分离鉴定

刘铄菲, 唐年初, 徐德平*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究牛膝多糖与降血糖活性的关系。牛膝粉碎后先经乙醇提取,再用热水提取,水提液减压浓缩后经醇沉得到牛膝水提醇沉物。采用链脲佐菌素(streptozocin,STZ)诱导方法建立小鼠糖尿病模型,每日给药牛膝各分离组分,连续给药8周,通过测定小鼠血糖、糖化血红蛋白,检测牛膝中具有降血糖活性的组分。采用DEAE、HW-55F、Sephacryl S-400等凝胶色谱柱对具有降血糖活性的牛膝多糖组分进一步分离。运用Sephadex G-100凝胶色谱、飞行时间质谱(time of flight mass spectrometer,TOF-MS)、气相色谱(gas chromatography,GC)、核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)等手段鉴定多糖纯度、测定相对分子质量、分析结构。结果表明,牛膝的水提醇沉物能显著降低糖尿病小鼠的空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)和糖化血红蛋白(HbA1c)浓度($P<0.05$)。将水提醇沉部分进一步分离得到具有降血糖活性的牛膝多糖,并鉴定其纯度为均一多糖,相对分子质量为1801.5,该多糖由1分子葡萄糖和10分子果糖组成,以葡萄糖分子为起点,与果糖C₂相连,果糖之间以 β -1,2糖苷键连接形成主链,支链连接在果糖的C₆上,该研究明确了牛膝中具有降血糖活性的多糖分子结构。

关键词: 牛膝;多糖;降血糖;分离纯化;活性成分

中图分类号:R 284.2 文章编号:1673-1689(2023)07-0104-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.07.012

Isolation and Identification of Hypoglycemic Polysaccharide from *Achyranthes bidentata*

LIU Shuofei, TANG Nianchu, XU Deping*

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

Abstract: The study investigated the relationship between polysaccharides from *Achyranthes bidentata* and their hypoglycemic activity. The powder of *Achyranthes bidentata* was first extracted with ethanol, followed by hot water extraction. The resulting water extract was concentrated under reduced pressure, and the *Achyranthes bidentata* water extract precipitate was obtained by ethanol precipitation. Streptozocin (STZ) induction method was used to establish a diabetic mouse model, mice were given gastric medicine *Achyranthes bidentata* isolated components daily for eight weeks, and hypoglycemic components in *Achyranthes bidentata* were detected by measuring blood glucose levels and glycated hemoglobin values in mice. Hypoglycemic polysaccharide components from *Achyranthes bidentata* were further purified using DEAE, HW-55F and Sephacryl S-400 gel

收稿日期: 2021-12-02

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目(JUSRP21127)。

* 通信作者: 徐德平(1965—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事天然产物化学研究。E-mail: xdp1219@sina.com

columns. The purity, relative molecular weight, and structure of the polysaccharides were determined using Sephadex G-100 gel chromatography, time of flight mass spectrometer (TOF-MS), gas chromatography (GC), and nuclear magnetic resonance (NMR). Results showed that the *Achyranthes bidentata* water extract precipitate significantly reduced fasting plasma glucose (FPG) and glycated hemoglobin (HbA1c) levels in diabetic mice ($P < 0.05$). The hypoglycemic polysaccharides with a relative molecular weight of 1 801.5 from the water extract precipitate were identified as a homogeneous polysaccharide composed of one glucose molecule and ten fructose molecules, connected to the glucose molecule as the starting point and to C₂ of fructose. The main chain is formed by connecting the fructose molecules with β -1,2 glycosidic bonds linkage, and the branched chains are connected to C₆ of fructose. The molecular structure of the hypoglycemic polysaccharides in *Achyranthes bidentata* was identified.

Keywords: *Achyranthes bidentata*, polysaccharides, hypoglycemic, isolation and purification, activity component

牛膝(*Achyranthes bidentata*)为多年生草本植物,属苋科植物,广泛分布于河南、山东、四川等地^[1]。牛膝是保健食品生产原料,在河南焦作一带用作煲汤滋补佳品^[2],主要成分有多糖、皂苷、蜕皮甾酮、黄酮类和生物碱类等^[3-4],具有多种药理活性,如消炎镇痛、抗骨质疏松、免疫调节等。现代药理研究发现牛膝具有降血糖活性^[5],成为中药降血糖方剂的高频用药,牛膝中具有降血糖活性的成分多指向多糖类物质,如牛膝粗多糖对血脂代谢的改善作用^[6]、牛膝粗多糖对糖尿病模型小鼠和大鼠的降血糖作用^[7-8],以及在高脂饲料中,随着牛膝粗多糖添加量的增加,血鸚鵡的血糖含量显著降低,表现出降血糖作用等^[9],但有关牛膝多糖构成与降血糖活性的关系鲜有报道。

牛膝多糖的降血糖活性研究不应仅仅局限在粗提物的活性上,应深入研究牛膝多糖降血糖作用的构效关系,为揭示牛膝降血糖机制和开发利用提供理论依据。因此,作者以牛膝为原料,通过水提醇沉法以及多种柱层析手段对牛膝多糖进行提取与纯化^[10],结合动物实验检测降血糖活性,筛选出牛膝中具有降血糖活性的多糖,为明确其在糖尿病治疗方面的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛膝:购自亳州药材市场,经鉴定为怀牛膝(*Achyranthes bidentata*);硅胶板:山东烟台芝罘化工厂产品;DEAE-Cellulose 色谱柱、HW-55F 色

柱、G-5000 PWXL 凝胶柱、G-3000 PWXL 凝胶柱:日本 TOSOH 公司产品;Sephacry S-400 色谱柱:美国 GE Healthcare 公司产品;Sephadex G-100 色谱柱:瑞典 Pharmacia 公司产品;链脲佐菌素(streptozocin,STZ):美国 Sigma 公司产品(批号:SLCF1289);SPF 级雄性 ICR 小鼠:浙江维通利华实验动物技术有限公司提供(合格证号:20201204Abzz0619000862);实验用水为去离子水;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

RAT-100 型萃取罐:无锡申科仪器有限公司产品;R-1002 型旋转蒸发器:上海申顺生物科技有限公司产品;SYB206-100 型恒流泵:天津市科器高新技术公司产品;UV-2450 型紫外分光光度计:日本岛津公司产品;Avance 500 MHz 型核磁共振仪:美国 Bruker 公司产品;Voyager-DE PRO 型质谱仪:美国 ABI 公司产品;TRACE 1300 型气相色谱仪:赛默飞世尔科技公司产品;卓越金采型血糖测定仪及试纸:上海罗氏制药有限公司产品;AU5800 全自动生化分析仪:美国贝克曼库尔特有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 牛膝各组分的提取与粗分离 称取 10 kg 牛膝,粉碎后置于 100 L 萃取罐中,按照料液比 1 g:10 mL 加入体积分数为 75%的乙醇,60 ℃搅拌提取 3 h,过滤,取滤液,滤渣按照上述方法重复提取一次,合并两次滤液进行减压浓缩得到醇提物。滤渣继续按照料液比 1 g:10 mL 加入去离子水,相同条件下搅拌提取两次,合并滤液减压浓缩得到牛膝水提液,向

水提液中边搅拌边加入 3 倍体积的无水乙醇,静置 8 h 后过滤得到水提醇沉物和水提醇溶物。

另取 500 g 牛膝,粉碎后置于 10 L 萃取罐中,按照料液比 1 g:10 mL 加入体积分数为 75% 的乙醇,60 ℃ 旋转提取 3 h,过滤,取出醇提液后,滤渣按照料液比 1 g:10 mL 加入去离子水,相同条件下得到水提液,将水提液和醇提液合并浓缩至干,即得到牛膝原样。

1.3.2 牛膝提取物降血糖活性测定

1) STZ 溶液的配制 参照段晖等的方法^[11],准确称取 2.10 g 柠檬酸,加入 100 mL 双蒸水配成柠檬酸母液,称为 A 液;准确称取 2.94 g 柠檬酸三钠,加入 100 mL 双蒸水配成柠檬酸钠母液,称为 B 液。将 A、B 液按体积比 1.00:1.32 混合,用 pH 计测定 pH,调溶液 pH 为 4.0,得到 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液。准确称取 300 mg STZ 溶于 30 mL 柠檬酸钠缓冲液中,新鲜配制成 10 mg/mL 的 STZ 溶液,并用 0.22 μm 滤菌器过滤除菌,注意避光配制,现用现配。

2) 糖尿病模型的建立与分组 取 5 周龄 SPF 级 ICR 雄性健康小鼠 80 只,适应性喂养 7 d 后禁食 12 h,随机取 70 只小鼠按照 150 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ 溶液,余下 10 只小鼠注射相同剂量的柠檬酸钠缓冲液,记为空白组。3 d 后,用血糖仪检测各组小鼠空腹血糖,空腹血糖高于 11.2 mmol/L 即认为糖尿病模型建造成功^[12]。

选造模成功的小鼠 50 只,分为模型组、原样组(A)、水提醇沉组(B)、水提醇溶组(C)、醇提组(D),每组 10 只。分别取适量分离组分用去离子水配制成 0.1 g/mL 的样品溶液,各给药组按照 1.0 g/(kg·d) 剂量^[13-14]灌胃相应的组分,模型组与空白组则灌胃饮用水,连续灌胃 8 周。

每周记录一次各组小鼠进食量、饮水量及体质量,并对小鼠毛色、尿量、精神状态等一般情况进行观察。给药前、给药第 4 周和第 8 周测定小鼠空腹血糖。给药 8 周后,对小鼠摘眼球采血,室温静置 2 h 后于 4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 15 min 提取血清,用全自动生化分析仪测定 HbA1c,同时取小鼠肝、肾称质量,计算肝脏系数和肾脏系数。

1.3.3 水提醇沉组分的分离 取水提醇沉组分,加入适量的去离子水至适宜体积,上样至 DEAE 柱(5 cm×100 cm),流量恒定为 5 mL/min,分别用去离子水和 0.05、0.10 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱,自动收

集器收集洗脱液,每管 10 mL。采用苯酚硫酸法检测,根据洗脱峰分别收集水洗脱液(M)和盐洗脱液,由于盐洗脱部分中糖组分极少,不足以支撑后续的分选,无法进一步研究。

取适量水洗脱液,浓缩之后上样到 HW-55F(5 cm×150 cm)色谱柱上,用去离子水以 5 mL/min 的流量洗脱,每管 10 mL,收集洗脱液。采用苯酚硫酸法检测洗脱组分,得到洗脱组分 M1、M2、M3,经多次分离后得到用于动物实验的各组分的量。

1.3.4 HW-55F 柱水洗脱组分降血糖活性检测 按照 1.3.2 的方法建立小鼠糖尿病模型,测定 M1、M2、M3 组分的降血糖活性。

1.3.5 活性组分的纯化 将具有降血糖活性的 M2 组分上样至 Sephacryl S-400 凝胶色谱柱(3 cm×150 cm),继续用去离子水以 2 mL/min 的流量洗脱。采用苯酚硫酸法检测洗脱组分,收集主要组分并反复上此柱分离,直到洗脱峰为单一对称峰为止,最后得单一组分 N。

1.3.6 多糖 N 的纯度鉴定 将具有降血糖活性的多糖 N 用去离子水配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,使用紫外分光光度计在波长 200~400 nm 进行扫描,检测其是否含有蛋白质吸收峰。另取适量多糖 N 溶液上样至 Sephadex G-100 凝胶色谱柱(3 cm×150 cm),用去离子水以 2 mL/min 的流量洗脱。采用苯酚硫酸法测定洗脱液,以确定是否为单一峰。

1.3.7 多糖 N 的单糖组成分析 按刘冰等的方法^[15],称取 20 mg 多糖 N,加入 2 mL 1 mol/L 的硫酸,在安培管中用沸水浴水解 5 h,取出冷却后,水解液用 BaCO₃ 固体中和至 pH 为 7,离心取上清液备用。

将上述上清液移至具塞试管中,加入 10 mg 盐酸羟胺、适量肌醇和 0.5 mL 无水吡啶溶解,加塞,90 ℃ 恒温水浴振荡 30 min;冷却至室温后,加入 0.5 mL 乙酸酐,加塞,90 ℃ 恒温水浴振荡 30 min,冷却至室温,即得单糖乙酰化衍生物。取 6 种标准单糖:鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖各 10 mg,按上述方法制备乙酰化衍生物。

将 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)衍生化样品进行气相色谱分析,参数如下:DB-1701 石英毛细管色谱柱(0.53 mm×30 m×1.5 μm);检测器:FID(氢火焰离子化检测器);柱温采用程序升温,起始温度为 120 ℃,停留 2 min 后,以 10 ℃/min 升温

至 195 ℃,停留 1 min 后,以 3 ℃/min 升温至 240 ℃,停留 10 min。

1.3.8 多糖 N 的相对分子质量测定 从色谱洗脱曲线中可知多糖 N 的保留时间较长,说明多糖 N 的相对分子质量较小,取多糖 N 直接进行质谱分析^[16],测定相对分子质量。

1.3.9 多糖 N 的核磁共振测定 多糖 N 先进行重水(D₂O)交换二次,再以重水为溶剂,进行 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等分析。

1.3.10 数据处理 数据采用 SPSS 26.0 统计学软件分析,结果以平均值±标准差表示。组间比较采用方差齐性检验, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 牛膝提取物不同组分降血糖活性

与空白组相比,模型小鼠毛发干枯暗淡、精神不佳、垫料湿脏,出现明显的“三多一少”症状(即多饮、多食、多尿和体质量减轻),这是机体在长期高血糖状态下的典型表现^[17],主要是因为血糖过高造成渗透性利尿,导致“多尿”,进而引起口渴多饮,又因营养物质流失而出现多食却消瘦的现象。各组小鼠进食量、饮水量与体质量变化见图 1~图 3,前 28 d 各给药组小鼠“三多一少”症状与模型组类似,随着给药的进行,后 28 d 有不同程度的改善,其中 B 组小鼠“三多一少”症状改善最为明显。

糖尿病的“三多一少”症状,在中医理论中被称作“消渴症”,由瘀血阻络、热毒内盛、伤阴耗气等所致,因此选用的治疗药物多为活血化瘀、清热解毒及补益类中草药^[18],牛膝也正是因为具有以上功效而被用于治疗糖尿病。根据小鼠“三多一少”症状的定量分析,活性组分主要存在于牛膝水提醇沉物中。

各组小鼠肝脏系数、肾脏系数见表 1。模型组肝脏系数和肾脏系数明显高于空白组,异常肥大,A 组、B 组和 D 组的肝脏系数和肾脏系数相比于模型组显著降低($P<0.05$),与空白组接近,趋于正常,表明牛膝原样、水提醇沉物和醇提物可缓解糖尿病小鼠肝、肾病理性肥大。糖尿病小鼠在持续高血糖状态下会出现肝、肾病变,如异常的血脂代谢诱发肝硬化、脂肪肝等,肾小球基底膜增厚,系膜扩张,出现肾小球硬化和肾小管间质性纤维化等病理改变,导致肝脏、肾脏等脏器出现异常肥大^[7]。从各组小鼠肝脏系数、肾脏系数的比较结果上可以看出,牛膝

原样、牛膝水提醇沉物和醇提物均具有缓解脏器肥大的作用。

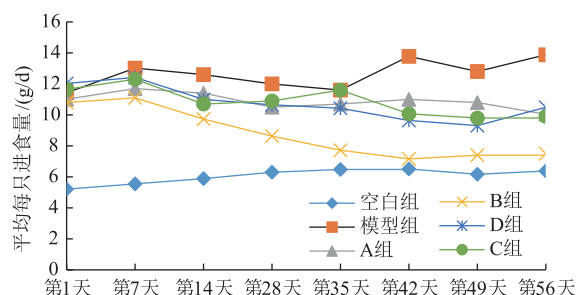


图 1 各组小鼠进食量变化

Fig. 1 Changes in food intake of mice in each group

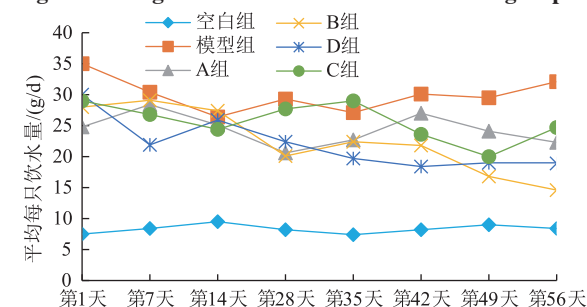


图 2 各组小鼠饮水量变化

Fig. 2 Changes in water consumption of mice in each group

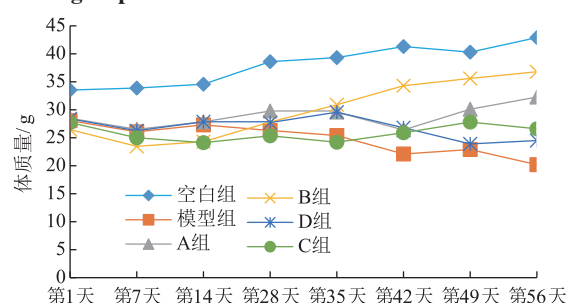


图 3 各组小鼠体质量变化

Fig. 3 Changes in body weight of mice in each group

表 1 肾脏系数和肝脏系数

Table 1 Kidney and liver weight indexes

组别	肝脏系数/%	肾脏系数/%
模型组	7.22±0.33	2.98±0.42
空白组	4.54±0.27*	1.83±0.26*
A 组	5.04±0.32*	2.00±0.52*
B 组	5.17±0.38*	2.05±0.42*
C 组	5.97±0.30#	2.20±0.71*
D 组	4.94±0.42*	1.98±0.33*

注:*表示与模型组比较, $P<0.05$;#表示与空白组比较, $P<0.05$ 。

各组分对小鼠空腹血糖和糖化血红蛋白的影响见表2。给药前,模型组小鼠和各给药组小鼠之间的空腹血糖无显著性差异,均高于空白组小鼠,说明糖尿病小鼠造模成功。在给药第4周,与模型组相比,B组小鼠血糖明显下降;在给药第8周,B组小鼠血糖比模型组显著降低($P<0.05$),具有降血糖作用。A组小鼠在第8周仍为高血糖状态,与模型组无差异,而牛膝经过水提醇沉得到的B组样品才表现出降血糖功效,出现这一结果的原因可能是经过提取分离,B组分富集了降血糖活性成分,故在相同给药剂量下,B组表现出优于A组的降血糖效果。

表2 牛膝各组分对小鼠FPG和HbA1c的影响($n=10$)

Table 2 Effects of various components of *Achyranthes bidentata* on FBG and HbA1c in mice($n=10$)

组别	FPG 浓度/(mmol/L)			HbA1c 浓度/(mmol/L)
	给药前	给药第4周	给药第8周	
空白组	5.82±1.51*	5.88±1.33**	5.94±1.43**	3.40±0.20**
模型组	28.18±4.93	28.00±4.24	25.30±6.22	6.83±0.98
A组	26.60±5.25	21.66±3.86	19.32±4.27	5.77±2.31
B组	24.04±6.09	17.82±6.23	10.44±3.89*	4.30±1.28*
C组	20.20±7.79	23.14±6.62	22.78±5.56	6.77±1.87
D组	25.11±5.30	22.95±4.76	19.75±6.12	5.63±1.31

注:与模型组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

2.2 牛膝水提醇沉组分的分离结果

牛膝水提醇沉物经DEAE柱分离,其洗脱曲线如图4所示。水洗脱有一个主峰,而NaCl溶液洗脱只有一个很小的洗脱峰,表明水提醇沉物中多糖主要在水洗脱部分,进一步得出牛膝多糖以中性多糖为主,收集水洗脱物浓缩到适当体积。

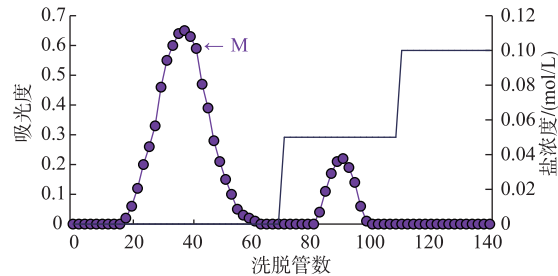


图4 DEAE纤维素柱洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of DEAE cellulose column

将水洗脱物用HW-55F凝胶色谱柱继续用水洗脱分离,其洗脱曲线见图5。有3个不同保留时间的洗脱峰,依照洗脱顺序分别记为M1、M2、M3。从保留时间判断,3个洗脱组分的相对分子质量以M1为最大,M2介于中间,M3最小。

HbA1c是由红细胞中的血红蛋白与血清中的糖类发生非酶反应所产生的产物,其测定结果与检测前是否空腹、是否注射胰岛素、是否服用降糖药物等因素无关^[19],故比空腹血糖更能准确反应机体血糖水平。在第8周时,B组小鼠的HbA1c显著低于模型组($P<0.05$),进一步证明牛膝水提醇沉物具有降血糖效果。

从以上结果可以看出,牛膝不同组分具有降血糖的作用,其中牛膝醇提物与水提醇沉物均具有缓解糖尿病小鼠脏器病变的效果,水提醇沉物同时具有降血糖活性。

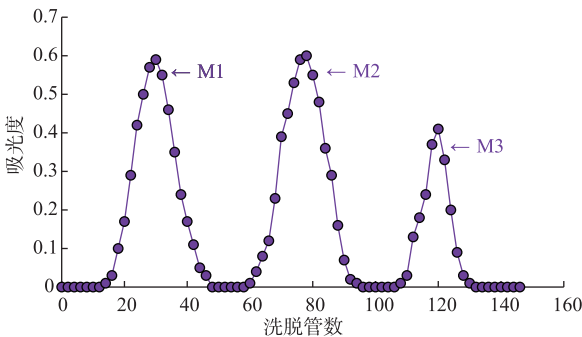


图5 HW-55F凝胶柱洗脱曲线

Fig. 5 Elution curve of HW-55F gel column

2.3 M1、M2、M3组分降血糖活性检测

将给药3个组分的小鼠分为M1组、M2组、M3组,3个组分对小鼠FPG和HbA1c的影响见表3。在给药第4周,M2组小鼠的FPG呈下降趋势,在给药第8周,M2组小鼠的FPG和HbA1c均显著低于模型组($P<0.05$),由此可得M2组分具有降血糖活性,而M1、M3组分没有该活性。牛膝多糖中具有降血糖活性的组分主要为中等相对分子质量的M2,而大相对分子质量和小相对分子质量的组分都没有该活性。

表 3 M1、M2、M3 组分对小鼠 FPG 和 HbA1c 的影响($n=10$)

Table 3 Effects of components M1, M2 and M3 on FPG and HbA1c in mice($n=10$)

组别	FPG 浓度/(mmol/L)			HbA1c 浓度/(mmol/L)
	给药前	给药第 4 周	给药第 8 周	
空白组	4.72±1.33**	4.92±1.20**	5.79±1.64**	3.48±0.22**
模型组	24.18±4.26	27.00±4.24	27.50±5.92	7.05±0.48
M1 组	25.66±3.67	22.70±7.23	18.41±5.90	6.48±0.70
M2 组	27.05±5.85	21.68±4.01	15.80±6.78*	5.18±0.47*
M3 组	28.11±2.82	25.08±5.27	20.82±8.15	6.95±0.62

注:与模型组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

2.4 活性组分的纯化

具有降血糖活性的 M2 组分反复经 Sephacryl S-400 凝胶色谱柱纯化,直到洗脱峰为单一对称峰,其洗脱曲线如图 6 所示,结果表明得到了一个单一多糖,记为 N。

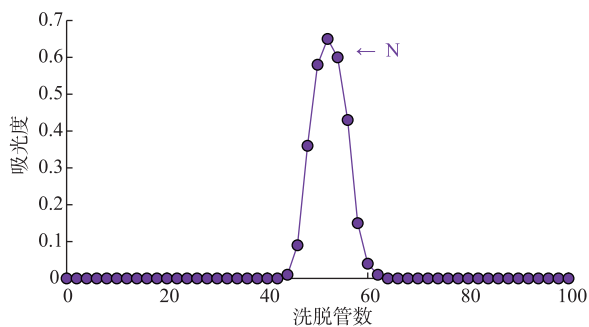
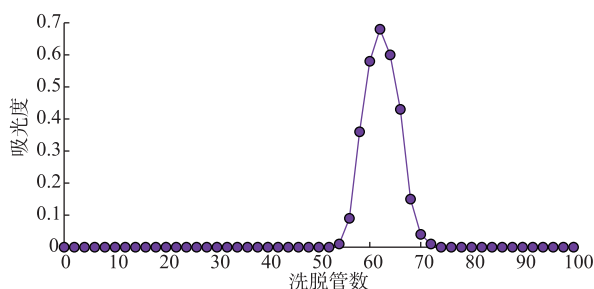


图 6 Sephacryl S-400 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of Sephacryl S-400 gel column

2.5 多糖 N 的结构分析

2.5.1 纯度鉴定 多糖 N 经过 Sephadex G-100 (3 cm×150 cm)凝胶色谱柱洗脱,其洗脱曲线如图 7 所示。从图中看到也为单一对称峰。另外,在 260~280 nm 下检测时无紫外吸收峰,表明 N 为纯多糖。



在 490 nm 下测定吸光度。

图 7 Sephadex G-100 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 7 Elution curve of Sephadex G-100 gel column

2.5.2 单糖组成分析 多糖 N 水解经乙酰化后气相色谱结果只看到一个峰,经与标准品对比,与葡萄糖峰一致,说明多糖 N 含有葡萄糖残基。结合核磁分析多糖 N 含有果糖,由于酮糖不易进行衍生化,实验中使用的 PMP 柱前衍生化法无法检测出果糖,而未呈现果糖的色谱峰。

2.5.3 相对分子质量测定结果 多糖 N 的质谱如图 8 所示,分子离子峰([M-H]⁻)质荷比为 1 800.5,确定该多糖 N 相对分子质量为 1 801.5,每组系列峰中相邻两峰之间的 m/z 均相差 162,表明多糖的

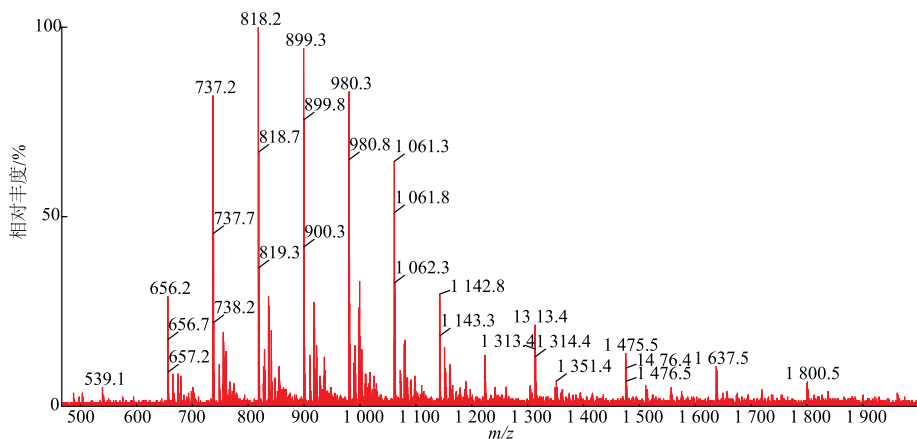


图 8 多糖 N 的 TOF-MS ES 图谱

Fig. 8 TOF-MS ES spectra of polysaccharide N

糖残基单元为己糖,即多糖 N 由 11 个糖残基组成,说明 N 的相对分子质量较小,这与前面的结果一致。

2.5.4 核磁共振分析 多糖 N 为白色无定形粉末,其 $^1\text{H-NMR}$ 谱、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱、 $^{135}\text{DEPT}$ 谱见图 9、图 10、图 11。 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中仅在 δ 为 5.290 处有一弱信号,为糖上的端基 H 信号, δ 为 4.780 处是重水残存的信号峰, δ 为 3.371~4.077 处的信号峰为糖上的端基 H 信号。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 图谱中, δ 为 103.037~104.067 处有 3 组糖端基的碳信号,而 $^1\text{H-NMR}$ 谱无相应的端基 H 信号,说明多糖中是以酮糖为主要组成单元,结合 $^{135}\text{DEPT}$ 谱可见 δ 为 63.210~59.854 处都是 CH_2 上的碳信号,从化学位移进一步分析得出这些酮糖为果糖,有 3 个果糖残基且都为 β 构型。碳谱中还存在一组弱的碳信号,分别在 δ 为 92.367、76.162、75.066、72.491、70.984、61.141 处,这是一组葡萄糖信号,从 δ 为 92.367 处的化学位移信号来看,葡萄糖为 α -构型。从丰度看

为 103.037 处的碳信号与 δ 为 92.367 处的碳信号接近,可以判断该果糖残基与葡萄糖相连,葡萄糖中其他碳并未成键,说明葡萄糖是该多糖的起点。 δ 为 81.007 和 80.147 处的碳信号应为果糖 C_3 、 C_5 的碳信号,果糖之间是以 β -1,2 糖苷键连接构成主链,并在 C_6 位上形成侧链。该结构(见图 12)与王昌盛报道的牛膝果聚糖完全一致^[20]。

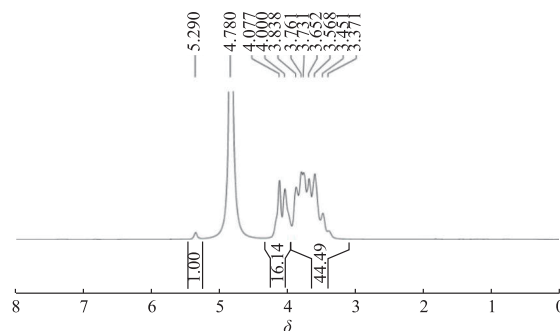


图 9 多糖 N 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 9 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of polysaccharide N

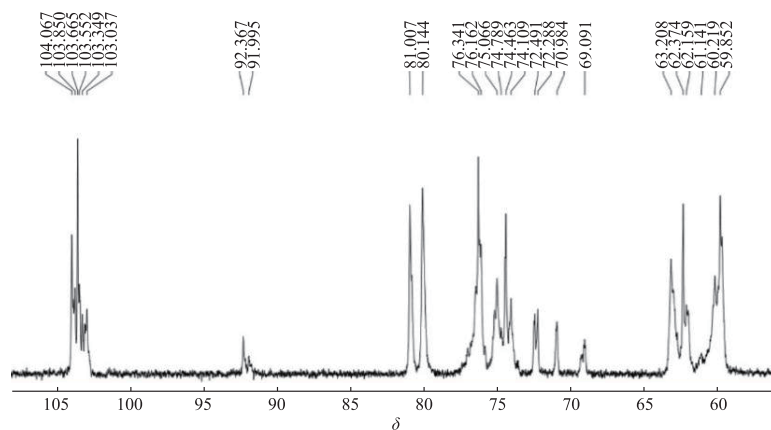


图 10 多糖 N 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 图谱

Fig. 10 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of polysaccharide N

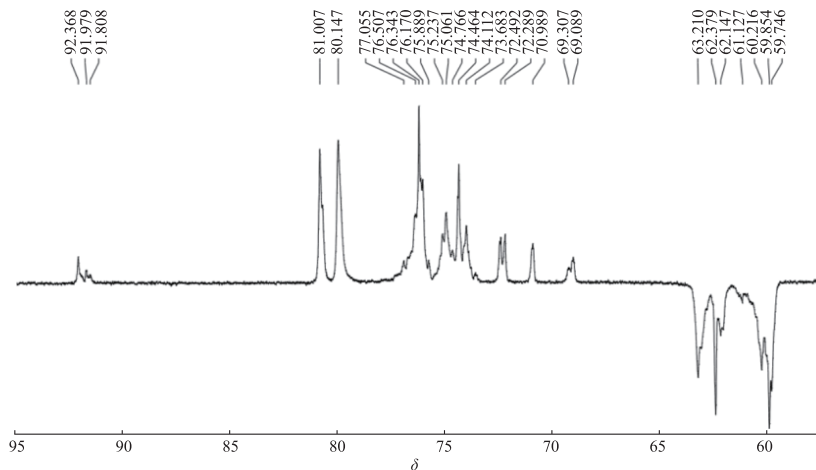


图 11 多糖 N 的 $^{135}\text{DEPT}$ 图谱

Fig. 11 $^{135}\text{DEPT}$ spectrum of polysaccharide N

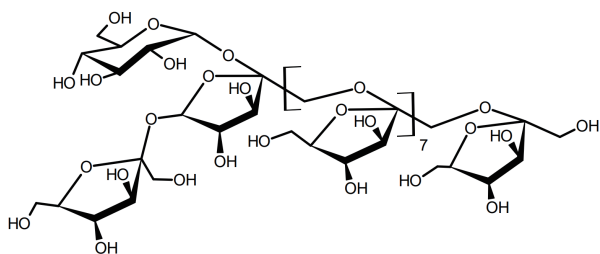


图 12 牛膝多糖 N 结构式

Fig. 12 Structural formula of polysaccharide N from *Achyranthes bidentata*

3 结 语

通过 STZ 诱导糖尿病小鼠实验,筛选出牛膝中具有降血糖活性的多糖,并经分离纯化,鉴定多糖构成。

参考文献:

- [1] 尚风琴. 怀牛膝与川牛膝功能活性成分的比较研究[D]. 武汉:中国科学院,2016.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [3] 张格艳. 牛膝化学成分及质量评价方法研究[D]. 郑州:河南省中医药大学附属第二医院,2013.
- [4] 胡慧玲,王彦志,张磊. 怀牛膝化学成分提取分离与鉴定[J]. 中药材,2019,42(1):96-99.
- [5] 董琴琴. 牛膝化学成分的研究[D]. 扬州:扬州大学,2010.
- [6] 郭晶,孙传鑫,王秋红,等. 川牛膝化学拆分组分性味药理学评价:川牛膝化学拆分组分降血脂作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(7):16-19.
- [7] 李金贵,袁楷,刘学忠,等. 牛膝多糖对链佐星诱导性糖尿病小鼠的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(1):1-7.
- [8] 杨旭东,张杰,申梅淑. 牛膝多糖对 2 型糖尿病大鼠脂肪分化相关蛋白表达的影响[J]. 药物生物技术,2010,17(4):334-336.
- [9] 崔培,范耘硕,白东清,等. 牛膝多糖对血鸚鵡部分非特异性免疫与脂类代谢指标的影响[J]. 大连海洋大学学报,2016,31(4):397-403.
- [10] 杨延超,徐德平. 大麦芽多糖的降血糖活性及结构解析[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(10):1087-1092.
- [11] 段晖,秦玉梅,熊艺姣,等. 链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠轮廓状乳头中味蕾特征变化[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(6):628-632.
- [12] 钱明辉,达热卓玛,徐德平. 荞麦花粉多糖 A 的分离及其降血糖活性[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(6):80-85.
- [13] 王仁忠,季旭明. 牛膝的毒性毒理研究[J]. 山西中医,2007,23(4):67-68.
- [14] 杨青雅,张伟. 牛膝多糖的急性毒性及其制剂的稳定性实验[J]. 医药导报,2005,24(10):883.
- [15] 刘冰,许程剑,卢士玲,等. 阿魏菇多糖的相对分子质量及单糖组成的测定[J]. 食品与生物技术学报,2014,33(10):1050-1055.
- [16] 廖俊昭. 基于液相色谱-飞行时间质谱对三种中草药多糖的糖谱研究[D]. 南昌:南昌大学,2015.
- [17] 熊韬,喻嵘,吴勇军. 全国名中医王行宽治疗消渴(糖尿病)的数据挖掘[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(5):720-724.
- [18] 丁英钧,王世东,王颖辉,等. 糖尿病“内热伤阴耗气”基本病机探讨[J]. 中医杂志,2008,49(5):389-391.
- [19] 刘丽,郑淑君,何英. 果糖胺和糖化血红蛋白测定对烧伤后高血糖鉴别的意义[J]. 中国药物与临床,2013,13(5):647-648.
- [20] 王昌盛. 怀牛膝糖聚物的分离纯化、结构鉴定及生物活性测试[D]. 广州:广东药科大学,2016.

经 STZ 诱导糖尿病小鼠实验证明水提醇沉物具有降血糖活性。水提醇沉物经 DEAE-Cellulose、HW-55F 分离,得到相对分子质量不同的 3 个组分,经动物实验得出中等相对分子质量的多糖具有降血糖活性。

作者将该活性组分经 Sephacryl S-400 凝胶柱进一步纯化,得到单一多糖 N。在紫外分光光度计下鉴定不含蛋白质。经 Sephadex G-100 凝胶柱鉴定为均一多糖,经质谱测定相对分子质量为 1801.5,该多糖由 1 分子葡萄糖和 10 分子果糖组成,以葡萄糖分子为起点,与果糖 C₂ 相连,果糖之间以 β -1,2 糖苷键连接形成主链,支链连接在果糖的 C₆ 上。经 STZ 诱导糖尿病小鼠实验证明其具有降血糖活性,是牛膝发挥降血糖作用的主要成分。