荞麦蜂花粉多糖 A 的分离及其降血糖活性

钱明辉， 达热卓玛， 徐德平 *
（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：对荞麦蜂花粉粗多糖进行分离鉴定并检测纯化多糖的降血糖活性。利用 DEAE-52 离子交换柱、HW-55F、Sephacryl S-400 凝胶柱对荞麦蜂花粉粗多糖进行分离，得到一个单一组分多糖 A。利用 STZ 糖尿病小鼠模型检测多糖 A 的降血糖活性并通过核磁方法对其进行 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR 和 ^{135}DEPT-NMR 分析。结果表明：与高血糖模型组相比，多糖 A 高、低剂量组的 STZ 糖尿病小鼠空腹血糖值都显著降低（$P<0.01$，$P<0.01$），降低率分别为 18.46 %、15.11 %，并提高糖尿病小鼠糖耐量。初步推测多糖 A 主链是（1→6）-β-葡萄糖组成的，在侧链上连有氨基酸。

关键词：荞麦蜂花粉；多糖；分离；降血糖；化学结构
中图分类号：O 629.12　**文章编号**：1673-1689(2019)06-0080-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.011

Separation of Polysaccharide A from Buckwheat Bee Pollen and Its Hypoglycemic Activity

QIAN Minghui， *DARE Zhuoma*， *XU Deping* *
（School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The polysaccharides from buckwheat bee pollen were isolated and identified，and the hypoglycemic activity of purified polysaccharides was determined. By using DEAE-52 ion-exchange column，HW-55F gel column and Sephacryl S-400 gel column，polysaccharide A was separated and purified from the crude polysaccharides. The hypoglycemic activity of polysaccharides A was evaluated through the mouse model of diabetes and polysaccharides A was identified by using nuclear magnetic resonance technique. Compared with control group （without treatment of polysaccharide A），the blood glucose in diabetic mice was notably decreased with treatment of polysaccharide A at both high and low doses，with decreased rates of 18.46% and15.11% ，respectively. Moreover，polysaccharide A improved glucose tolerance in diabetic mice and its main chain was deduced to be composed of （1 → 6） -β- glucose and the side chains are linked with amino acids.

Keywords：buckwheat bee pollen，polysaccharide，separation，hypoglycemia，chemical structure

收稿日期：2016-07-25
基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金项目(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
引用本文：钱明辉，达热卓玛，徐德平. 荞麦蜂花粉多糖 A 的分离及其降血糖活性[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：80-85.

蜂花粉作为一种高价值的天然食品,不仅营养丰富,还存在大量生物活性物质[1],被称为“微型营养库”。而蜂花粉多糖作为花粉中的一种活性物质,具有增强机体免疫力[2-4]、抗病毒[5-6]、调节血脂[7]及抗肿瘤[8]、抗氧化[9]等多种活性。目前有关荞麦蜂花粉多糖的研究集中在提取工艺[10-11]与生物活性[12]上,而对荞麦蜂花粉多糖结构方面的研究尚少见报道。本文利用多种色谱技术对荞麦蜂花粉多糖进行分离,并对其化学结构、降血糖活性进行了研究,以期为荞麦花粉资源的进一步开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦蜂花粉,购于内蒙库伦旗蜂场;昆明小鼠(60只,雄性,4周龄),购于上海斯莱克实验动物有限公司;链脲佐菌素(STZ),购于Sigma公司;盐酸二甲双胍,购于上海华氏制药有限公司;DEAE-52(40~50 μm)离子交换柱,购于上海生化试剂公司;HW-55F(30~60 μm)凝胶柱,购于日本TOSOH公司;Sephacryl S-400(25~75 μm)、Sephadex G-100(10~40 μm)凝胶柱,购于瑞典Pharmaeia公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器和设备

不锈钢五谷杂粮磨粉机:浙江省温岭市创力药材器械厂产品;RAT-100D双层玻璃反应釜:无锡申科仪器有限公司产品;RE-5220型旋转蒸发仪:上海一科仪器有限公司产品;高速冷冻离心机:美国Thermo公司产品;罗氏卓越血糖仪:德国Roche Diagnostics GmbH公司产品;核磁共振仪Avance 500 MHz:Bruker公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 荞麦蜂花粉粗多糖的制备 将10 kg荞麦蜂花粉粉碎后,过40目筛,投入100 L萃取罐,按料液质量体积比1 g:8 mL加入体积分数95%乙醇,并在60 ℃条件下提取3 h,过滤取滤渣,抽滤后的滤渣按1 g:6 mL的料液比加入去离子水,并在60 ℃下提取3 h,过滤得上清液,真空浓缩至1 L,按1:4的体积比加入体积分数95%乙醇并搅拌,静置一夜后,抽滤得沉淀物,沉淀物用无水乙醇洗涤3次,然后真空干燥、Sevag法脱蛋白、大孔树脂AB-8脱色,冷冻干燥得粗多糖。

1.3.2 DEAE-52离子交换柱分离 取粗多糖溶于蒸馏水,配成200 mg/mL的溶液,上样量为50 mL,进行DEAE-52离子交换柱(6 cm×60 cm)分离,分别用蒸馏水以及0.1、0.2、0.3 mol/L的NaCl溶液进行梯度洗脱,洗脱速度为6 mL/min,利用自动收集器收集洗脱液,10 mL/管,用苯酚-硫酸法检测,合并收集各含糖的峰。

1.3.3 凝胶柱分离 取离子柱下来的样品,依次上HW-55F(3 cm×100 cm)、Sephacryl S-400(3 cm×100 cm)凝胶色谱柱进行分离,上样量为20 mL,质量浓度为40 mg/mL,洗脱液为蒸馏水,洗脱速度为2 mL/min,用自动分部收集器10 mL/管收集,经苯酚-硫酸法检测,合并收集各含糖的峰。

1.3.4 纯度鉴定 蒸馏水配成样品质量浓度5 mg/mL的多糖A溶液,在200~400 nm下进行紫外全扫描。多糖A上Sephadex G-100色谱柱鉴定其纯度,流速为2 mL/min,蒸馏水洗脱,苯酚-硫酸法检测。

1.3.5 多糖A的降血糖活性测定 小鼠禁食不禁水16 h,腹腔注射柠檬酸缓冲液配置的STZ溶液,剂量为120 mg/kg,注射体积与小鼠体质量比为10 mL/kg。7 d后将小鼠禁食12 h,剪尾采血,用罗氏血糖仪测小鼠空腹血糖,血糖值在11.1~24.0 mmol/L范围内的小鼠为造模成功小鼠。将造模成功小鼠分为高血糖模型组、阳性对照组、多糖A低剂量组、多糖A高剂量组4个实验组,同时设置正常对照组,每组各10只。正常对照组与高血糖模型组灌胃等体积的生理盐水,而多糖A低、高剂量组分别按100、300 mg/(kg·d)的剂量灌胃多糖A,阳性对照组按300 mg/(kg·d)的剂量灌胃盐酸二甲双胍,每天给药1次连续给药30 d,末次给药后禁食12 h,剪尾采血测定血糖。然后各组小鼠用葡萄糖溶液经口灌胃,剂量为2.0 g/kg,分别于给糖后0、15、30、60、120 min测血糖值。

1.3.6 结构分析 多糖A以四甲基硅烷(TMS)为内标物,以氘代吡啶为溶剂,利用核磁共振仪Avance 500 MHz对其进行^{135}DEPT-NMR、^{13}C-NMR和^{1}H-NMR分析。

2 结果与讨论

2.1 离子柱分离结果

粗多糖用DEAE-52离子交换柱分离,经蒸馏

水和不同浓度梯度的 NaCl 溶液洗脱后，得到图 1 所示的荞麦蜂花粉粗多糖洗脱曲线。从图 1 可以看出主要有 4 个洗脱峰，分别为 QQC1、QQC2、QQC3、QQC4，由洗脱液的吸光值可知，多糖组分主要集中在蒸馏水洗脱的 QQC1 与 QQC2，而 NaCl 洗脱的 QQC3 与 QQC4 含量较少，因此将组分 QQC2 作为进一步研究对象。

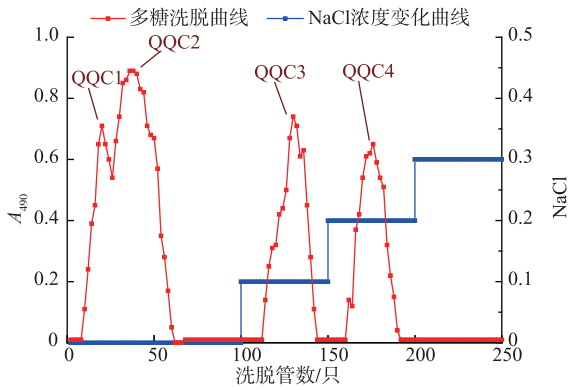


图 1　DEAE–52 离子交换柱洗脱曲线

Fig. 1　Elution curve of DEAE– 52 ion–exchange column

2.2　凝胶柱分离结果

多糖 QQC2 经 HW–55F 凝胶柱分离得到 QQC2a、QQC2b、QQC2c 等 3 个组分，所得洗脱曲线如图 2 所示，其中 QQC2a 组分占中性多糖的质量密度最大，因此选其作为进一步分离对象。QQC2a 经 Sephacryl S–400 凝胶柱反复分离，最终得到多糖 A，由图 3 洗脱曲线可以看出，多糖 A 洗脱峰呈单一对称峰。

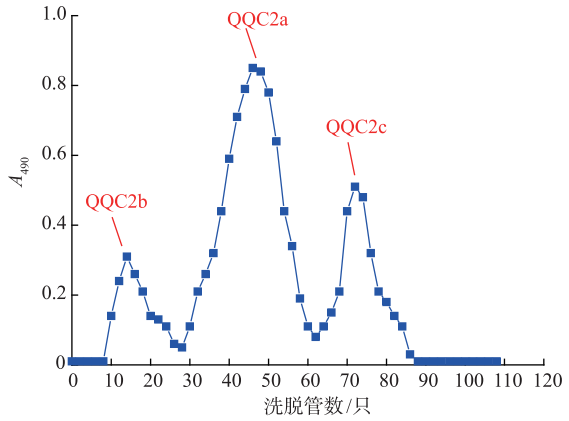


图 2　HW–55F 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 2　Elution curve of HW–55F gel column

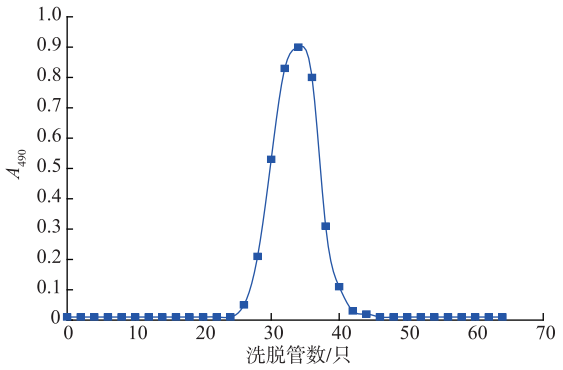


图 3　Sephacryl S–400 凝胶柱洗脱曲线

Fig. 3　Elution curve of Sephacryl S–400 gel column

2.3　纯度鉴定结果

从图 4 可知，多糖 A 溶液在 260 nm 与 280 nm 波长处不存在吸收峰，这说明多糖 A 不含核酸与蛋白质或者是含量极低。从图 5 可以看出，多糖 A 经 Sephadex G–100 色谱柱洗脱，洗脱峰呈单一对称峰，说明多糖 A 为均一多糖。

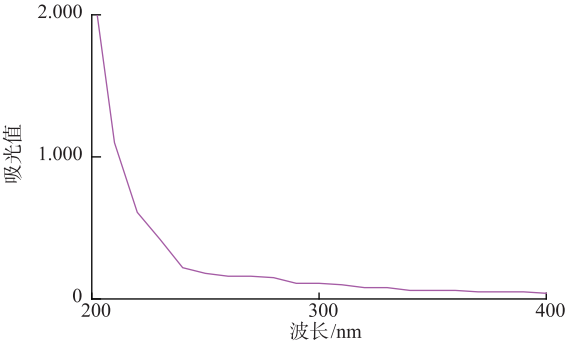


图 4　多糖 A 紫外扫描图

Fig. 4　UV scan of polysaccharide A

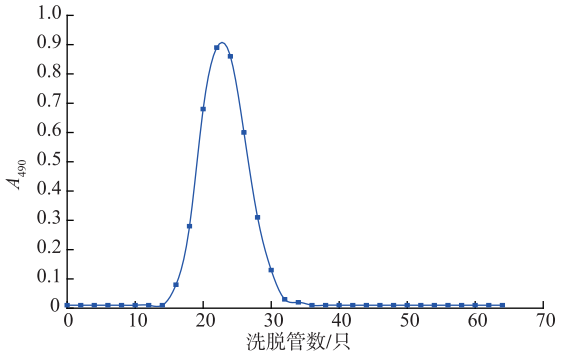


图 5　Sephadex G–100 色谱柱洗脱曲线

Fig. 5　Elution curve of Sephadex G–100 column

2.4　多糖 A 的降血糖活性测定结果

从表 1 可以看出，与正常对照组相比，给药前

的高血糖模型组、阳性对照组以及多糖A高、低剂量组的血糖值明显升高,差异显著($P<0.01$),说明造模成功。给药30 d后,高血糖模型组、阳性对照组以及多糖A高、低剂量组小鼠的血糖值分别是21.23、15.43、17.35、18.05,与高血糖模型组血糖值相比,阳性对照组以及多糖A高、低剂量组小鼠的血糖值都显著降低($P<0.01$),降低率分别为27.44%、18.46%、15.11%,说明多糖A具有降低糖尿病小鼠血糖值的作用,但是与盐酸二甲双胍的降糖作用相比要弱。与多糖A低剂量组相比,多糖A高剂量组血糖值有下降趋势,但是高、低剂量组的血糖值无显著性差异,并没有体现显著的量效关系。

表1 多糖A对糖尿病小鼠血糖的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of polysaccharide A on blood glucose in diabetic mice($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	给药前血糖浓度/(mol/L)	给药30 d后血糖浓度/(mol/L)	降低率/%
正常对照组	5.12±0.83	5.36±0.47	—
高血糖模型组	18.44±3.74[a]	21.23±3.48	—
阳性对照组	18.95±2.51[a]	15.43±2.15[b]	27.44
多糖A高剂量组	18.66±4.57[a]	17.35±4.31[b]	18.46
多糖A低剂量组	18.42±4.34[a]	18.05±4.46[b]	15.11

注:a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与高血糖模型组比较

从图6可知,正常对照组小鼠血糖在15 min达到最大值,随后逐渐下降,120 min时恢复到正常水平。模型组在30 min达到最大值,随后逐渐降低,120 min时还维持在较高水平。与正常组相比,模型组小鼠的血糖值下降缓慢,一直维持在高值,说明模型组小鼠对血糖敏感性弱,调节血糖能力差。多糖A低剂量组与高剂量组的血糖在15 min时达到最大值并且在30 min时有下降趋势,随后逐渐降低,120 min时恢复到了初始值附近,与模型组相比,多糖A低剂量组与高剂量组的血糖值下降得更快,同时能快速降低到初始值,表明多糖A低剂量组与高剂量组都有提高糖尿病小鼠糖耐量的能力。

多糖A低剂量组能显著降低糖尿病小鼠的血糖值同时提高其糖耐量,这表明了低剂量的多糖A就能起到很好的降血糖效果。多糖A低剂量组与多糖A高剂量组的血糖值相比,无显著性差异,说明多糖A的降糖效果与剂量没有显著量效关系,单一增加剂量不能显著提升多糖A对糖尿病小鼠的治疗效果。这可能与多糖A的降血糖机制有关,具体原因有待进一步研究。多糖A发挥降糖作用的原因可能是多糖A具有抗氧化作用,提高了还原型谷胱甘肽及超氧化物歧化酶的活性,从而修复受损伤的胰岛细胞或者使胰岛细胞再生,也可能是通过提高糖尿病小鼠胰岛的敏感性、促进葡萄糖转变为肝糖原或者是提高肝葡萄糖激酶活性的作用[13-15]来实现降血糖。荞麦蜂花粉多糖的降糖作用虽然比盐酸二甲双胍弱,但是毒性较小或无毒副作用,可以把荞麦多糖A开发成糖尿病患者的保健食品或者辅助治疗药品。

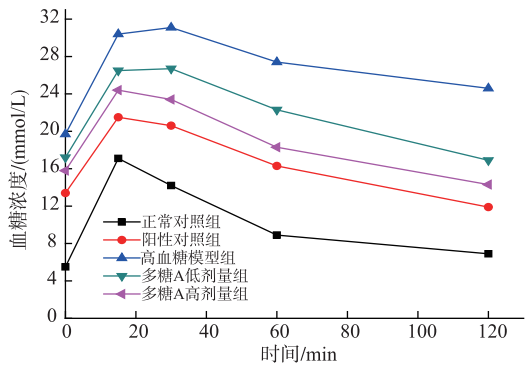


图6 多糖A高、低剂量组对糖尿病小鼠糖耐量的影响

Fig. 6 Effect of high and low dose group of polysaccharide A on glucose tolerance in diabetic mice

2.5 多糖A结构鉴定结果

多糖A的^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、^{135}DEPT-NMR谱见图7-8。从1H-NMR可见,在异头质子区(δ4.5~δ5.9)存在5个信号较强的H信号,分别是δ5.303、δ5.256、δ5.233、δ5.205、δ5.014,这5个H应为糖上端基H。从^{13}C-NMR可见,在δ90~δ115范围内存在5个C信号,分别是δ110.19、δ109.62、δ109.12、δ106.10、δ105.34,这5个C应为糖上端基C,可以推测多糖A含有5个化学环境不同的糖残基。根据丰度可以推测δ106.1、76.5、75.3、73.5、71.4、72.2应为主链,从化学位移值来看应为葡萄糖。从^{135}DEPT-NMR谱看出δ72.2为CH_2,应为C6的信号,正常情

况 C6 值为 60 左右,表明主链 C6 成苷键,因此推测主链为 1→6 连接。在碳谱中一般 α 构型异头碳化学位移值小于 103,β 构型的异头碳化学位移值大于 103, 多糖 A 主链 C1 的化学位移值为 106.1,因此推测主链是 β 构型。

在碳谱中有 δ176.36、173.36 二个羧基信号,多糖 A 是蒸馏水洗脱下来的中性糖,所以排除存在糖醛酸的可能,紫外光谱显示在 260 nm 与 280 nm 波长处不存在吸收峰, 这说明多糖 A 是不含蛋白质的, 因此推测 δ176.36、δ173.36 应为 2 个氨基酸信号,并形成酰基键,氨基酸种类及连接位置有待进一步确定。

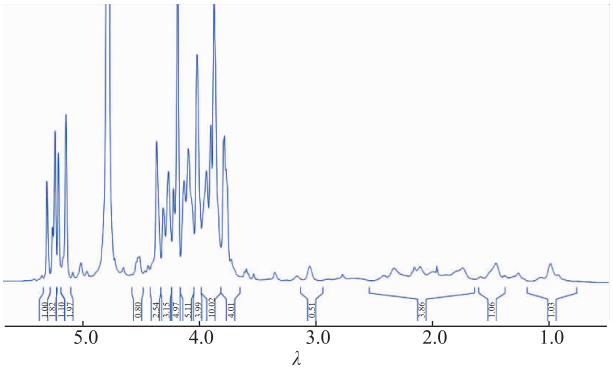


图 7 多糖 A ^{1}H–NMR 图谱

Fig. 7 ^{1}H–NMR spectrum of polysaccharide A

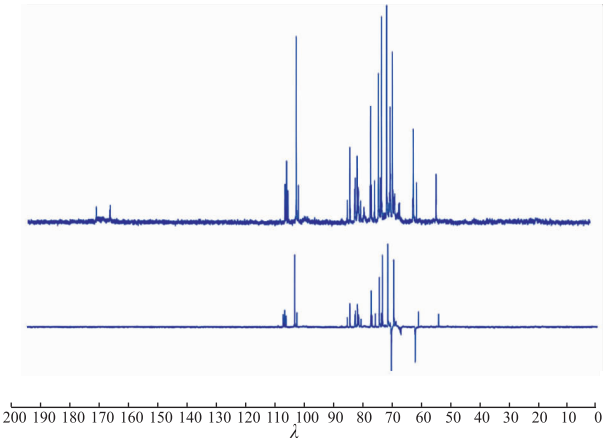


图 8 多糖 A ^{13}C–NMR 和 ^{135}DEPT–NMR 图谱

Fig. 8 ^{13}C –NMR and ^{135}DEPT –NMR spectrum of polysaccharide A

3 结 语

荞麦蜂花粉粗多糖经 DEAE–52 离子交换柱、HW–55F、Sephacryl S–400 凝胶柱依次分离,得到多糖 A。多糖 A 具有降低糖尿病小鼠血糖值、提高糖尿病小鼠糖耐量的作用。通过多糖 A 的 ^{13}C–NMR、^{135}DEPT–NMR 谱等分析可以推测多糖 A 大致的框架是主链由(1→6)–β–葡萄糖组成的,在侧链上连有氨基酸,荞麦蜂花粉粗多糖连有氨基酸在文献中属于首次报道,有关多糖 A 的精细结构还有待进一步研究。

参考文献:

[1] REN Naiyan,LU Rong,CHENG Ni,et al. A review on bioactive constituents of bee pollen[J]. **Apiculture of China**,2011,Z4:76-78.(in Chinese)

[2] WEI Kai,SUN Zhenhong,TAN Yanling,et al. Research on the effect of immune enhancement of Taishan pine pollen polysaccharide in murine[J]. **Scientia Agricultura Sinica**,2010,17:3645-3652.(in Chinese)

[3] 邢丽. 松花粉硫酸酯化多糖对小鼠巨噬细胞的免疫调节作用[D]. 山东:山东师范大学,2015.

[4] WU Panpan,DUAN Yuanfeng,XU Deping. Isolate,identify and the immune improving activity of polysaccharides from rape bee pollen[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,10:1040-1044.(in Chinese)

[5] 高秀妹. 四种植物多糖抑菌抗病毒作用及其对波氏杆菌免疫增强作用的比较研究[D]. 山东:山东农业大学,2012.

[6] KHAN M T H,ATHER A,THOMPSON K D,et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses [J]. **Antiviral Research**,2005,67(2):107-119.

[7] YANG X,GUO D,ZHANG J,et al. Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide[J]. **International Immunopharmacology**,2007,7(3):401-408.

[8] 王博. 八种蜂花粉多糖的分析及抗肿瘤活性研究[D]. 吉林:东北师范大学,2013.

[9] DONG Jie,ZHANG Hongcheng,LI Hui,et al. Study on the antioxidant activities of ethanolic extracts from eight kinds of bee pollen in vitro[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**,2010(3):309-312.(in Chinese)

[10] ZHANG Ping,CHEN Yan,ANG Xiaoling. The extracting technology and antioxidation of polysaccharides from buckwheak bee pollen[J]. **Food Science and Technology**,2011(7):169-173.(in Chinese)

[11] XU Wentao，ZHANG Fangfang，LUO Yunbo，et al. Isolation and purification of water-soluble polysaccharide from common buckwheat（fagopyum esculentum）and determination of its molecular weight[J]. **Food Science**，2009，13：22-24.（in Chinese）
[12] LIN Chunrong，ZHANG Cuixiang，ZUO Shaoyuan. Effect of polysaccharide from buckwheat bee pollen on blood glucose and lipids in experimental diabetic rats[J]. **Asia Pacific Traditional Medicine**，2013（3）：7-9.（in Chinese）
[13] TAKAHASHI M，MASUYAMA J I，et al. Effects of endogenous endothelial interleukin-8 on neutrophil migration across an endothelial monolayer[J]. **Cardiovascular Research**，1995，29（5）：670-675.
[14] ZHANG Xudong，ZHANG Lei，ZHAO Chunfang. The structure of pancreatic islet β cells in diabetic mice by LM and TEM[J]. **Progress of Anatomical Sciences**，2008，14（3）：256-259.（in Chinese）
[15] LIU Yanji，LIU Jinfeng，TIAN Xiaoyan，et al. Polysaccharide of actinidia ariguta and activity of blood glucose and lipid of decline [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2012，31（3）：86-89.（in Chinese）

科　技　信　息

欧盟评估来自一种转基因地衣芽孢杆菌的 1,4–α–麦芽四糖淀粉酶的安全性

2019 年 5 月 8 日，欧盟食品安全局发布关于来自基因地衣芽孢杆菌（菌株 DP - Dzr46）的 1,4–α–麦芽四糖淀粉酶（1,4 - α - maltotetraohydrolase）安全性的评估结果。

据了解，这种食品酶旨在用于烘焙过程。经过评估，专家小组得出结论，这种食品酶在预期使用条件下不会引起安全问题。

［信息来源］食品伙伴网. 欧盟评估来自一种转基因地衣芽孢杆菌的 1,4–α–麦芽四糖淀粉酶的安全性 [EB/OL]. (2019–5–10). http://news.foodmate.net/2019/05/517728.html