

# 南瓜中降血糖活性成分的提取及其功能性质的研究

张拥军<sup>1</sup> 王兰州<sup>1</sup> 姚惠源<sup>2</sup>

1(中国计量学院生命科学学院 杭州 310034) 2(江南大学食品学院 无锡 214036)

**摘 要** 为探寻南瓜中对正常及糖尿病模型小鼠血糖有影响的有效成分,本实验采用新的分离工艺从南瓜粉中提取得到南瓜粗多糖(PP),用DEAE分级获得3个组分,收集的主导组分经过Sephadex G-100柱分级,以小白鼠血糖值作为筛选活性成分的指标,收集有活性的组分(PP-CG)经Sephadex G-200证实为单一峰。气相色谱分析其单糖组成为葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖及鼠李糖。高效液相色谱证明其为杂多糖,分子质量为 $1.16 \times 10^5$  u。

**关键词** 南瓜多糖 降血糖 单糖组成

糖尿病是一种常见病和多发病,严重危害人类健康,在工业发达国家其发病率呈显著上升趋势。目前,全世界约有1.2亿糖尿病患者,90%为Ⅱ型糖尿病,其中我国有糖尿病患者3000万,美国有1300万,日本有500万<sup>[1]</sup>。由糖尿病导致的死亡率已是继心血管疾病和癌症之后列第3位,由于糖尿病是终身性、心身性和全身性疾病,故对药物治疗提出了更高要求。目前糖尿病的发病机理仍不十分清楚,临床治疗主要利用药物及胰岛素控制血糖升高及防治并发症。其中,药物治疗均有不同程度的副作用,且无法根本阻止胰岛细胞的进一步坏死,往往导致胰岛素依赖<sup>[2,3]</sup>。因此,如何进行糖尿病的防治和保健,寻找有效地治疗糖尿病的新物质,特别是从天然资源中去筛选和研究降糖成分,成为国内外医药工作者所关注和瞩目的重要课题和迫在眉睫的任务。在各种新型的农产品食品资源中,南瓜作为一种极具开发潜力和开发价值的农产品资源,引起了食品界和医学界专家们极大的兴趣。

南瓜是葫芦科植物南瓜的果实,它生长强健,对环境适应力极强,我国各地普遍栽培。南瓜的营养成分全面而独特<sup>[4,5]</sup>,我国古代就有对南瓜食疗保健作用的记载,在《本草纲目》中,李时珍将南瓜与灵芝放在一起,

说它有“补中,补肝气,益心气,益肺气,益精气”的作用。近年来的研究亦表明,南瓜具有多种食疗保健作用,尤其作为一种防治糖尿病的营养保健食品倍受人们的重视<sup>[6]</sup>。

目前,有关南瓜防治糖尿病的活性成分的报道很多,但大多是理论推测,尚缺乏有力的理论依据。本课题采用现代生化分离技术及活性检测手段,已成功找出南瓜中具有平衡血糖显著效果的活性组分——南瓜多糖,并对其进行有效地分离和纯化。本课题的主要特色之一在于追踪的活性成分为未知,因此可在确认南瓜的降血糖活性之后,选用简便、灵敏、可靠的活性测定方法,在分离的每一阶段对分离所得各个组分进行活性定量评估,并追踪活性最强的部分。其优点在于活性低或含量少的成分不易丢失;检出新化合物的机会增加;可能分离到具有不同作用的化合物。本课题的研究,一方面将会给医药界提供一种新颖、可靠、安全地防治疾病的方法和途径,肯定食疗的治疗学价值;另一方面将促进当前多糖类活性物质生产工业的产业结构升级,使该产业高新技术化,真正实现具有我国自主知识产权的多糖类活性物质在国际上的竞争力,从而产生极大的经济效益和社会效益。

第一作者:博士研究生。

收稿时间:2002-01-20, 改回时间:2002-04-26

## 1 试验材料及仪器

### 1.1 试验材料

南瓜粉:自制。

四氧嘧啶(Alloxan)、Sephadex G-100 及 Sephadex G-200:美国 Sigma Chemical Co. 产,购于上海试剂商店。

昆明小白鼠:雌雄兼用,雌者应无孕,体重 18~22g,无锡原子医学研究所提供。

试剂:本试验所用试剂均为分析纯级及色谱纯级。

### 1.2 试验仪器

美国强生 Touch II 血糖监测仪,755 型紫外分光光度计,电热恒温水浴箱,粉碎机,冷冻干燥机,气相色谱仪,高压液相色谱仪。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 南瓜有效成分的提取

选取成熟的、形状较平滑、肉质硬且厚、肉质呈桔红色的成熟期较长的南瓜作为加工南瓜粉的原料。用洁净清水冲去泥污,并用毛刷将缝隙刷洗干净,去掉南瓜外表皮及蒂部,去籽及瓣后切成薄片晾干,注意防尘、防蝇、防鼠、防霉。将南瓜片放入烤箱烘至干透为止,注意避免温度过高而焦糊。烘干后,置于干燥洁净的环境中冷却至室温,然后用粉碎机将干燥的南瓜片粉碎成 20 目左右的南瓜粉。经以上过程制作的南瓜粉呈桔红色或黄红色,细腻、无杂质、无结块、无霉斑、有明显的南瓜清香味。

南瓜粉用热水抽提后过滤,滤液回收,滤渣用体积分数为 95% 乙醇渗滤 48 h 后收集滤液,合并两滤液,得到南瓜初提物(组分 P),然后依次用有机溶剂分步萃取,将南瓜初提物分级得到 4 种组分,分别为组分 A、B、C 及 D,分别验证其降血糖活性,得到活性最高的组分 C 为淡黄色的南瓜粗多糖(PP),得率为 2.6%。

### 2.2 南瓜多糖的分离纯化

将活性最高的组分 C 经过离子交换纤

维素柱层析分级获得 3 个组分(PP-CI、PP-CJ、PP-CK),其中 PP-CI 为主导组分,经动物实验证明其为活性多糖,进一步使用分子筛柱层析对其纯化,苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>检测糖反应阳性的高峰部分并收集得到 2 个组分,冷冻干燥得到组分 PP-CG 和组分 PP-CR,经活性检测组分 PP-CG 的降血糖效果最好。

### 2.3 组分 PP-CG 的纯度鉴定及相对分子质量的测定

将活性最高的组分 PP-CG 溶于 NaCl 溶液中并用 NaCl 溶液平衡好 Sephadex G-200 层析柱后开始洗脱,每管收集洗脱液 2 mL,苯酚-硫酸法部分收集检测,结果呈单一对称峰。采用 HPLC 检测其峰形很宽,说明组分 PP-CG 为杂多糖;高效液相色谱仪为 Waters 510/2410, Ultrahydrogel™ Linear 色谱柱,流动相为 0.8 mol/L NaNO<sub>3</sub> 溶液,流速 0.8 mL/min。根据 HPLC 经验公式,测定其相对分子质量:

$$\lg M = -0.475 T_R + 13.3$$

其中,  $M$ ——被测样品的分子质量  $\mu$ ;

$T_R$ ——保留时间, min。

由保留时间算得组分 PP-CG 的分子质量为  $1.16 \times 10^5$  u。

组分 PP-CG 用苯酚-硫酸法测其糖含量为 82.63%,凯氏定氮法测其蛋白质含量为 3.4%。其紫外光谱在 280 nm 和 260 nm 处无蛋白质和核酸吸收峰。

### 2.4 组分 PP-CG 的单糖组成分析

称取组分 PP-CG 15.0 mg,以 1.0 mol/L 硫酸 2.0 mL 封管,于 100℃ 水解 6 h,饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 水溶液中和,过滤,滤液置 40℃ 下减压蒸干,然后加入吡啶和盐酸羟胺于水浴中保持数分钟,取出后加入乙酸酐再于水浴中保温数分钟,待样品冷却后,清液进行 GC 分析,用标准品对照,测得 PP-CG 中含有葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖。

### 2.5 南瓜初提物(组分 P)对正常小鼠及糖尿病小鼠血糖浓度的影响

正常组鼠不需禁食,随机分成 4 组,每组 10 只。第 1 组为空白组,腹腔注射生理盐水

0.5 mL ;第 2、3 组、4 组分别腹腔注射 P 组分 100、200、400 mg/kg。使用美国强生血糖监测仪分别测量给药前后 4、7 及 11 h 时的血糖值。糖尿病组小鼠禁食 12 h ,腹腔注射四氧嘧啶 200mg/kg ,72 h 后测量血糖值 ,每组选用

中等程度糖尿病小鼠 10 只 ,分别腹腔注射 P 组分 100、200、400 mg/kg ,测量给药后 4、7 及 11 h 时的血糖值。小鼠的血糖测定结果如表 1 所示。

表 1 组分 P 对正常小鼠及糖尿病小鼠的血糖测定结果

组 别	剂 量 /mg·kg <sup>-1</sup>	时 间/h			
		0	4	7	11
		血糖值( $\bar{x} \pm SD$ )/mmol·L <sup>-1</sup>			
空白对照组	0	5.07 ± 0.45	5.05 ± 0.32	5.05 ± 0.49	5.02 ± 0.35
正常组	100	4.70 ± 0.42	4.54 ± 0.78	4.12 ± 0.59	4.09 ± 0.46
	200	5.50 ± 0.85	4.94 ± 0.97	3.92 ± 0.88 *	3.96 ± 0.79 *
	400	4.82 ± 0.69	4.53 ± 0.87	4.08 ± 0.59 *	4.11 ± 0.54
糖尿病组	100	12.46 ± 2.86	12.02 ± 3.11	11.27 ± 2.77	11.32 ± 2.57
	200	15.01 ± 3.67	12.42 ± 3.15	9.77 ± 3.74 *	9.64 ± 3.52 *
	400	13.12 ± 3.45	11.24 ± 3.02	9.45 ± 2.73 *	9.97 ± 2.86

注 : \* 表示  $P < 0.05$  ,说明有差异 ; \* \* 表示  $P < 0.01$  ,说明差异显著。表中  $\bar{x}$  为均值 ,SD 为标准差。

由表 1 结果可知 ,小白鼠在给药剂量为 200 mg/kg、给药时间为 7 及 11 h 时 ,血糖的降低效果明显 ,因此选取剂量 200 mg/kg、时间 7 及 11 h 做以下实验。同时 ,南瓜初提物(组分 P)在给药时间为 7 及 11 h 时均对四氧嘧啶型糖尿病小鼠有治疗效果 ,因此组分 P 有进一步分离提取的价值。

2.6 组分 A、B、C 及 D 对正常小鼠及四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖浓度的影响

4 种组分血糖浓度的测定方法同 2.5 ,测定结果如表 2 所示。

表 2 四种组分对正常及糖尿病小鼠的血糖测定结果

组 别	时间/h		
	0	7	11
	血糖值( $\bar{x} \pm SD$ )/mmol/L		
正常组	A 5.77 ± 1.02	4.30 ± 0.77 *	3.88 ± 0.48 * *
	B 5.88 ± 0.72	3.98 ± 0.78 * *	4.29 ± 0.79 *
	C 5.39 ± 0.75	4.40 ± 0.84 *	4.61 ± 0.92
	D 5.76 ± 0.66	5.70 ± 0.72	5.24 ± 0.81
糖尿病组	A 15.40 ± 4.76	14.62 ± 3.04	15.63 ± 3.32
	B 16.03 ± 4.16	11.12 ± 2.87 *	12.33 ± 3.68
	C 15.32 ± 4.38	5.77 ± 1.46 * *	5.80 ± 0.94 * *
	D 13.50 ± 3.87	12.76 ± 2.81	13.04 ± 2.97

注 : \* 表示  $P < 0.05$  ,说明有差异 ; \* \* 表示  $P < 0.01$  ,说明差异显著 ; \* \* \* 表示  $P < 0.001$  ,说明差异极显著。

表 2 结果表明 ,组分 A 及 D 对正常小鼠

的血糖浓度降低效果显著 ,而对四氧嘧啶型糖尿病小鼠的血糖浓度影响很小。因此 ,组分 A 和 D 对糖尿病没有治疗效果。组分 B 对正常小鼠及四氧嘧啶型糖尿病小鼠的血糖浓度均无影响 ,说明组分 B 没有降血糖的功能。组分 C 对正常小鼠有轻度的降血糖效果 ,对四氧嘧啶型糖尿病小鼠的降血糖效果极其显著 ,说明组分 C 的药用价值很大 ,需进一步探讨其组成。

2.7 组分 PP-CI、PP-CG 及 PP-CR 对四氧嘧啶型糖尿病小鼠血糖浓度的影响

3 种组分对糖尿病小鼠血糖浓度的测定方法同 2.5。血糖测定结果如表 3 所示。

表 3 三种组分对四氧嘧啶型糖尿病小鼠的血糖测定结果

组 别	时间/h		
	0	7	11
	血糖值( $\bar{x} \pm SD$ )/mmol/L		
PP-CI	14.33 ± 3.68	7.78 ± 1.46 * *	7.96 ± 1.84 * *
PP-CG	12.70 ± 2.88	5.19 ± 0.94 * *	5.33 ± 0.86 * *
PP-CR	12.85 ± 3.22	12.28 ± 2.98	13.75 ± 2.45

注 : \* \* 表示  $P < 0.001$  ,说明差异极显著。

表 3 结果表明 ,南瓜粗多糖经离子交换柱层析得到的中性多糖的降血糖效果很显著 ,对其进行进一步分离 ,得到的组分 PP-CG

是柱层析后的大分子物质,它对四氧嘧啶型糖尿病小鼠的降血糖效果很好,说明南瓜中具有降血糖作用的活性组分是大分子的多糖类物质。

### 3 结 语

(1)本文所述提取南瓜多糖方法,收率高、纯度亦高,同时以有效成分作为待筛选的未知组分,以血糖值作为活性鉴定的指标,逐步分离纯化,避免了活性成分的中间丢失,方法准确可靠。

(2)南瓜多糖属多糖类,它在结构上不同寻常的复杂性及多样性使其成为研究的热点之一,近 10 a 涉及糖的生物学研究已使其重大前景初露端倪。多糖类活性物质目前主要用于抗肿瘤、降血糖、免疫增强等医学领域,其中,具有降血糖活性的植物多糖主要有人参多糖、黄芪多糖、银耳多糖及南瓜多糖等。由于多糖无毒副作用,将会作为一种高效低毒药物跨入口服降糖药的行列,为寻找降糖新药开辟一种新的途径。而且,如果将其粗制品应用于食品和其他工业领域中,将带来更大的市场需求。

(3)GC 法测定单糖具有选择性强、分辨率高、灵敏度高( $< 1 \mu\text{g}$ )等特点,同时分析速

度快,尤其是随着毛细管和程序升温技术的普遍使用,糖类的气相色谱分析法得到了更广泛的应用。由于糖类自身挥发性小,因而气相色谱分析单糖时必须将其转化为三甲基硅醚、糖肟三甲基硅醚、糖腈乙酸脂、糖醇乙酸酯及三氟乙酸酯等易挥发且热稳定性又比较好的衍生物。本实验采用酸水解,将所生成的单糖制备成乙酰化衍生物进行测定,方法简便、灵敏、可靠。

(4)有关南瓜多糖的降糖作用和结构上的构效关系及南瓜多糖可促进动物糖尿病小鼠胰岛素分泌正常的作用机理和胰腺细胞形态学上的改变,需要进一步的研究探讨。

### 参 考 文 献

- 1 李秀钧,董视虎,程丽霞等. 中华内分泌代谢杂志, 1998(2): 72 ~ 77
- 2 Scheen A J. Drugs, 1997, 54(3): 355
- 3 Mooradian A D, Thurman J E. Drugs, 1999, 57(1): 19
- 4 谢 宇. 食品研究与开发, 1999(2): 29 ~ 32
- 5 桑万邦. 中国食品信息, 1991(7): 17
- 6 周汉奎. 食品科学, 1991(9): 59 ~ 62
- 7 Karunamay Nath et al. Carbohydr. Res., 1987, 161: 94 ~ 96

## Study on the Biological Effects and Extraction of the Blood Glucose Lowering Active Component from Pumpkin

Zhang Yongjun<sup>1</sup> Wang Lanzhou<sup>1</sup> Yao Huiyuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(College of Life Science, China Institute of Metrology, Hangzhou 310034)

<sup>2</sup>(College of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**ABSTRACT** In order to investigate the effect of unknown active component from pumpkin on normal mice and alloxan induced diabetic mice, the experiment adopted a kind of new technology to extract and gain the pumpkin polysaccharide from pumpkin powder. This crude polysaccharide was fractionated by ion-exchange chromatography on DEAE and the main group-element purified by gel filtration on Sephadex G-100. Its active part (PP-CG) was further purified on Sephadex G-200, and to be proved a homogeneous peak. By gas chromatography analysis, PP-CG composed of glucose, galactose, arabinose and rhamnose and its molecular weight is  $1.16 \times 10^5$  u by HPLC.

**Key words** pumpkin polysaccharide, blood glucose lowering, monosaccharide composition