

泥鳅黏液多糖的化学组成、理化性质及体外降糖活性

李亚楠^{1,2}, 郭明珠², 邵娟娟^{1*}, 桑亚新², 孙纪录^{2*}

(¹河北农业大学理工学院 河北沧州 061100

²河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000)

摘要 为对泥鳅的加工与流通副产物黏液进行开发利用,采用超声辅助的水提醇沉法,从大鳞副泥鳅黏液中提取一种泥鳅黏液多糖(PDMP)。采用紫外光谱、凝胶过滤色谱、高效液相色谱、傅里叶变换红外光谱、¹H NMR 和 ¹³C NMR 分析 PDMP 化学组成,采用 X 射线衍射、热重分析和扫描电镜研究 PDMP 的理化性质。结果表明,PDMP 的总糖含量为(95.51±2.27)%,硫酸基含量为(23.41±0.87)%,不含糖醛酸,含有乙酰基。PDMP 的分子质量为 362 928 u,由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖和木糖组成,物质的量比为 13.27:5.68:2.31:2.23:0.45。PDMP 中含有(1→)-和(1→6)-的 α -糖基和 β -糖基的吡喃糖。PDMP 热稳定较强,有一定的结晶性,表面具有均一密集的蜂窝状孔洞,内部具有大小不一的孔洞结构。体外降糖研究表明,PDMP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制活性的 IC₅₀ 值分别为 152 μ g/mL 和 550 μ g/mL。9 mg/mL 的 PDMP 对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率分别达到 65.02% 和 86.40%。本研究结果为 PDMP 在现代食品工业和医药领域的应用提供参考。

关键词 泥鳅黏液; 多糖; 化学组成; 理化性质; 降糖活性

文章编号 1009-7848(2023)10-0051-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.006

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)属鲤形目、鳅科、花鳅亚科、副泥鳅属,主要分布于长江、嘉陵江和岷江水系、辽河中下游、黄河及黑龙江等地区,是一种营底栖生活的小型鱼类^[1]。其营养价值高,具有极快的生长速度和较高的经济价值,近年来,逐渐成为广大养殖户选择的品种之一^[2]。

泥鳅体表能分泌出大量黏液,尤其是在冷链运输和加工预处理过程中。泥鳅黏液入药味甘、性平,具有补中益气、利尿除湿等功效^[3]。鱼皮的黏液层含有各种来自表皮杯状细胞和上皮细胞的分泌物,这些分泌物与许多重要的生物学功能有关^[4]。泥鳅黏液中含有超氧化物歧化酶、抗菌肽、多糖等多种生物活性物质^[5]。目前,在泥鳅运输和加工过程中产生的大量黏液被废弃,不仅造成极大的资源浪费,还带来环境污染问题。

泥鳅黏液多糖作为一类生物活性物质,已有

少数研究报道。Qin 等^[6]从普通泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)黏液中分离纯化出一种分子质量为 1.30×10^5 u 的泥鳅多糖(*Misgurnus anguillicaudatus* polysaccharide, MAP),该多糖具有很强的抗氧化能力、免疫活性和恢复肝脏损伤等功能。孙智华等^[7]利用泥鳅黏液制备出一种分子质量为 1.57×10^4 u 的具有保湿性的透明质酸,在化妆品和医药行业具有应用价值。Kimura 等^[8]从泥鳅黏液中分离并鉴定出一种含神经氨酸的脱胺糖蛋白。孙朋朋^[9]从泥鳅黏液中分离出含有 O-型糖基化结构的凝集素。目前,关于泥鳅的研究报道主要集中于养殖和遗传方面,对泥鳅黏液中的多糖研究较少,而且主要是针对普通泥鳅的黏液。对大鳞副泥鳅的黏液多糖及其抗糖活性鲜有报道。

本文从泥鳅副产物资源的综合利用角度出发,拟从大鳞副泥鳅黏液中分离多糖,对其化学组成、理化性质和结构进行研究,并探讨其体外抗糖活性,以为大鳞副泥鳅黏液资源应用到食品和医药行业提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 大鳞副泥鳅:购于河北农业大学科技市场。

收稿日期: 2022-10-02

基金项目: 河北省重点研发计划项目(21327107D);河北省现代农业产业技术体系淡水养殖创新团队建设项目(HBCT2018180206)

第一作者: 李亚楠,女,硕士生

通信作者: 邵娟娟 E-mail: lanxingcz@163.com

孙纪录 E-mail: fm1311sun@163.com

葡萄糖、苯酚、三氯乙酸、酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸,福晨化学试剂有限公司;无水乙醇,天津市富宇精细化工有限公司;溴化钾,天津市科密欧化学试剂有限公司;浓硫酸、氢氧化钠、氯化钠为分析纯级,天津市津东天正精细化学试剂厂;牛血清白蛋白(BSA)、考马斯亮蓝 G-250,北京索莱宝科技有限公司;甲醇、正丁醇,国药集团化学试剂有限公司;三氟乙酸,上海安普实验科技股份有限公司。

1.1.2 设备与仪器 TGL21M 台式高速冷冻离心机,长沙易达仪器有限公司;YTLG-12A 台式真空冷冻干燥机,上海叶拓科技有限公司;721G 可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;Multi-skan Spectrum 酶标仪,Thermo scientific 公司;高效液相(HPLC)色谱仪(LC-20A),日本岛津公司;核磁共振波谱仪(Bruker 400M),德国 Bruker 公司;Nicolet iS50 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;X 射线衍射仪(日本理学 Ultima IV),热重分析仪(NETZSCH STA 409 PC/PG),耐驰科学仪器商贸有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PDMP 的化学组成分析

1.2.1.1 PDMP 的制备 鲜活泥鳅→蒸馏水浸没暂养 12 h→收集黏液→浓缩→超声→醇沉→去蛋白→透析→冷冻干燥→泥鳅黏液多糖。

1.2.1.2 PDMP 的成分测定 采用苯酚硫酸法测定总糖含量^[10],3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量^[11],考马斯亮蓝法测定蛋白质含量^[12],采用 BaCl₂-明胶法测定硫酸基含量^[12],采用咔唑硫酸法测定糖醛酸含量^[12]。

1.2.1.3 紫外光谱分析 使用紫外(UV)分光光度计扫描,将 PDMP 样品制备 1 mg/mL 的去离子水溶液^[13],并在 200~400 nm 波长范围内记录光谱。

1.2.1.4 分子质量测定 根据文献采用 HPGPC 法^[14]测定 PDMP 的平均分子质量,以葡聚糖 T-10, T-40, T-70, T-500 和 T-2000 葡聚糖为分子质量标准品,测定获得“分子质量-保留时间标准曲线”。

1.2.1.5 单糖组成

1) 样品提取

a) 固体样本提取 取干净的色谱瓶,精确称量多糖样品 5 mg,加入 1 mL 2 mol/L TFA 酸溶液,105 °C 加热 6 h。通氮气,吹干。加入甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗 2~3 次。加入无菌水溶解,转入色谱瓶中待测。

b) 液体样本提取 取适量的上清液,旋转浓缩或氮气吹干。加入 1 mL 2 mol/L TFA 酸溶液,105 °C 加热 6 h。通氮气,吹干。加入甲醇清洗,再吹干,重复甲醇清洗 2~3 次。加入无菌水溶解,转入色谱瓶中待测。色谱系统采用的是 Thermo ICS5000 离子色谱系统(ICS5000,Thermo Fisher Scientific,USA),利用电化学检测器对单糖组分进行分析检测。

2) 仪器参数 采用 Dionex™ CarboPac™ PA20(150 mm×3.0 mm,10 μm)液相色谱柱;进样量为 5 μL。流动相 A(0.1 mol/L NaOH),流动相 B(0.1 mol/L NaOH,0.2 mol/L NaAc),流速 0.5 mL/min;柱温为 30 °C;洗脱梯度:0 min A 相/B 相(95:5,V/V),30 min A 相/B 相(80:20,V/V),30.1 min A 相/B 相(60:40,V/V),45 min A 相/B 相(60:40,V/V),45.1 min A 相/B 相(95:5,V/V),60 min A 相/B 相(95:5,V/V)。

1.2.1.6 傅里叶变换红外光谱 红外光谱(IR)测定:将 PDMP 和 KBr 按质量比 1:100 混合研磨均匀(提前于 105 °C 的烘箱中烘干),并压成 1 mm 薄片在 4 000~500 cm⁻¹ 范围内扫描,测定多糖的有机官能团。

1.2.1.7 核磁共振波谱(NMR)测定 PDMP 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 的测定:取 20 mg PDMP 溶解在 1 mL 氧化二氘(D₂O)中,使用 400 MHz 傅立叶变换核磁共振波谱仪。在 25 °C 下记录 ¹H 和 ¹³C 的 NMR 光谱^[10]。

1.2.2 理化性质分析

1.2.2.1 热稳定性测定 采用 STA449C 型同步热分析仪,测定 PDMP 的热稳定性^[15]。取 10 mg 样品,测试条件:温度范围 30~700 °C,升温速率(β)5 °C/min,氮气气氛,气体流量 20 mL/min。

1.2.2.2 结晶度测定 采用 X-射线衍射仪(XRD)测定 PDMP 的结晶度^[16]。XRD 在散射角范围(2 θ ,10°~80°)下进行,步长和曝光时间分别为 0.05 s 和 1 s。

1.2.2.3 微观结构观察 参照何坤明等^[7]的方法,将样品干燥至恒重,取适量进行黏台、镀金后,使用 HitachiS-4800 扫描电子显微镜在放大 500 倍和 2 000 倍观察 PDMP 表面的微观形态结构。

1.2.3 体外降血糖活性

1.2.3.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 α -葡萄糖苷酶的活性测定根据 Getachew 等^[6]的方法并略作改动,将 PDMP 分别配制成不同浓度梯度的多糖溶液(1.0,3.0,5.0,7.0,9.0 mg/mL),分别取 400 μ L 的样品与 50 μ L α -葡萄糖苷酶(0.2 U/mL)混合,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 10 min,反应所用缓冲溶液为 0.1 mol/L,pH 5.5 的磷酸盐缓冲溶液,然后加入 1 mg/mL 还原型谷胱甘肽和 PNPG,分别为 50 μ L 和 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min 后,通过加入 1 mL NaCO₃(0.1 mol/L)终止催化反应。以阿卡波糖为阳性对照。 α -葡萄糖苷酶抑制率计算方法:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中, A_s ——样品组的吸光值; A_b ——阴性空白对照组(不含样品和酶)的吸光值; A_c ——样品对照组(不含酶)的吸光值。

1.2.3.2 α -淀粉酶抑制活性的测定 将 100 μ L α -淀粉酶溶液和不同浓度的多糖溶液混合并在 25 $^{\circ}$ C 下反应 10 min,然后加入可溶性淀粉溶液 100 μ L,继续反应 10 min,随后加入 200 μ L 3,5-二硝基水杨酸并在沸水中加热 5 min,然后将混合物冷却至室温并用 3 mL 去离子水稀释。在 540 nm 波长处测定吸光度,以阿卡波糖为阳性对照。 α -淀粉酶抑制率计算方法:

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{(A_c - A_{bc}) - (A_s - A_{sc})}{A_c - A_{bc}}\right] \times 100 \quad (2)$$

式中, A_s ——样品组的吸光值; A_{sc} ——样品对照组(不含酶)的吸光值; A_c ——阴性对照组(不含样品)的吸光值; A_{bc} ——阴性空白对照组(不含样品和酶)的吸光值。

1.3 数据处理

3 次重复试验的结果以“平均值 \pm 标准差”表示,使用 Microsoft Office Excel 2010 处理数据,数据运用 SPSS 19.0 进行统计分析,Origin 2018 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 PDMP 的化学组成分析

2.1.1 PDMP 中的主要化学成分 表 1 显示了 PDMP 的化学成分。

如表 1 所示,PDMP 含有(2.87 \pm 0.09)%的蛋白质和(95.51 \pm 2.27)%的总糖,其还原糖含量为(13.28 \pm 0.10)%,硫酸基含量为(23.41 \pm 0.87)%,不含糖醛酸。以上研究结果表明制备的 PDMP 纯度较高,可以用于后续的测定。此外,多糖中含有大量的硫酸基,表明可能与多种功能活性相关,例如抗肿瘤、抗氧化、抗凝血等活性,有研究表明硫酸基与降血糖功能存在一定相关性,可进一步研究其降血糖活性。

2.1.2 PDMP 的紫外光谱 PDMP 通过紫外-可见光谱进行检测,吸收光谱如图 1 所示。

由图 1 可以看出,在 200 nm 波长处存在多糖的特征吸收峰,PDMP 在 260~280 nm 处无明显吸收峰,表明不存在核酸类和蛋白类杂质,说明 PDMP 的纯度较高,而在 280 nm 波长处,只出现微弱吸收峰,表明 PDMP 经脱蛋白处理后,有极少量蛋白与多糖紧密结合^[8],这与 Bradford 法测定蛋白质含量的结果一致,说明去除蛋白的效果明显。

表 1 PDMP 的主要化学成分

Table 1 Main chemical constituents of PDMP

成分	含量/%
总糖	95.51 \pm 2.27
蛋白质	2.87 \pm 0.09
还原糖	13.28 \pm 0.10
硫酸基	23.41 \pm 0.87
糖醛酸	0

注:含量值是“平均值 \pm SD”(n=3)。

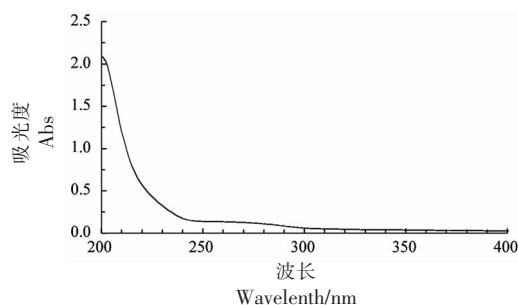


图 1 PDMP 的 UV 光谱

Fig.1 UV spectra of PDMP

2.1.3 PDMP的分子质量 多糖的分子质量被证实是影响多糖的理化和生物活性差异的重要指标^[14]。

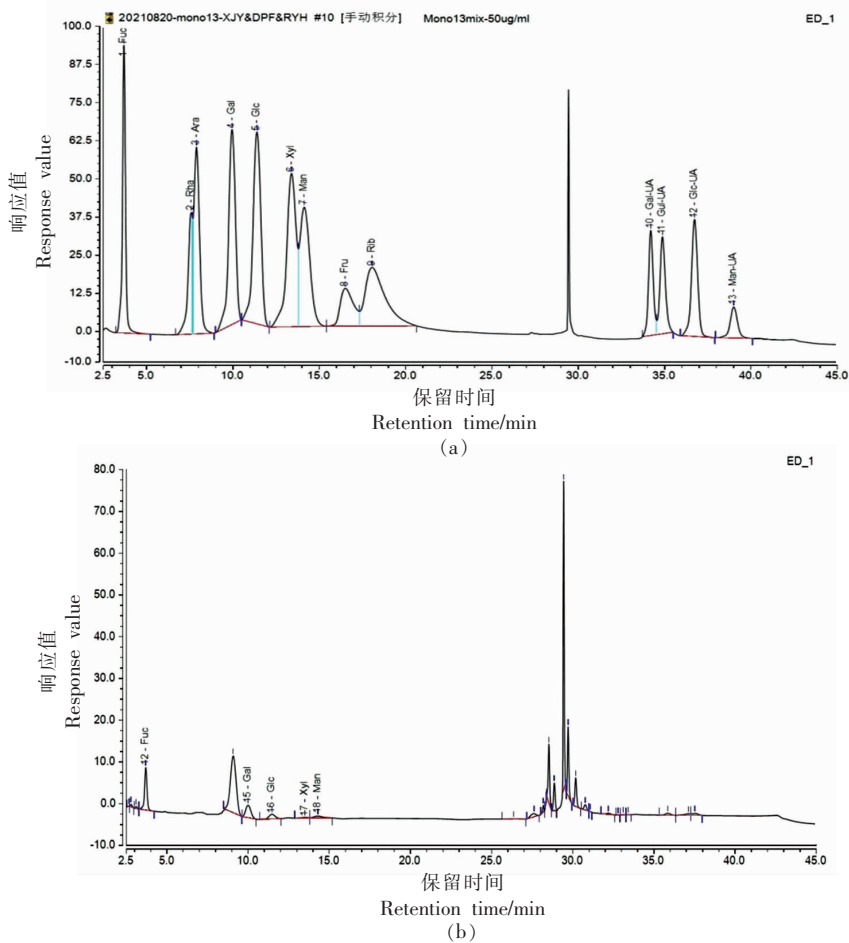
PDMP的高效凝胶渗透色谱(HPGPC)的测定结果显示,PDMP的主要组分的重均分子质量为362 928 u,数均分子质量为237 749 u。多分散性指数(Mw/Mn)为1.527,接近1,说明PDMP的平均分子质量分布较集中。PDMP的Mw为362 928 u。分子质量的表征有助于进一步研究其与活性的关系,并有助于了解其潜在的应用价值。

表2 PDMP的凝胶过滤色谱分析

Table 2 Analytical results of PDMP by GPC

峰号	RT/min	面积	Mn/u	Mw/u	Mv/u
1	15.65	166 802	237 749	362 928	319 047

2.1.4 PDMP的单糖组成 如图2a所示混合标准品中各单糖的出峰时间依次为3.692,7.584,7.892,9.95,11.392,13.392,14.125,16.509,18.067,34.192,34.867,36.725,38.992 min。



注:Fuc. 岩藻糖;Rha. 鼠李糖;Ara. 阿拉伯糖;Gal. 半乳糖;Glc. 葡萄糖;Xyl. 木糖;Man. 甘露糖;Fru. 果糖;Rib. 核糖;Gal-UA. 半乳糖醛酸;Glc-UA. 葡萄糖醛酸;Man-UA. 甘露糖醛酸;Gul-UA. 古罗糖醛酸。

图2 单糖标准品(a)和PDMP(b)的离子色谱图

Fig.2 Ion chromatograms of standard substance (a) and PDMP (b)

根据单糖标准品衍生化的保留时间鉴定PDMP的单糖组成,如图2b所示,PDMP的单糖组成主要由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖和木糖组成,其物质的量比为13.27:5.68:2.31:2.23:

0.45。根据已发表的泥鳅黏液多糖的文献表明,单糖组成有一定差异,已经报道的泥鳅黏液多糖的单糖组成的主要结构单体由半乳糖、岩藻糖和甘露糖(5:4:1)组成^[19];本文中PDMP主要组分岩藻

糖和半乳糖,所占百分比分别为 55.42% 和 23.74%,甘露糖、葡萄糖和木糖所占百分比分别为 9.66%,9.33%,1.86%。这可能是由于原料的种类、产地及生活习性不同导致。以上结果表明,PDMP 主要为岩藻半乳糖,此外 FT-IR 光谱分析中有 α -型糖苷键的信号,因此单糖组分中的糖有可能存在 α 异构型。

2.1.5 PDMP 的 FT-IR 光谱分析 FT-IR 分析是确定多糖基本结构特征的经典方法。FT-IR 光谱的指纹区域是基于对特定波数吸收峰的分析^[20],官能团分析基于范围从 4 000~1 333 cm^{-1} 的特征吸收峰面积,1 000 cm^{-1} 以下的指纹区域提供了更多关于复杂结构的信息^[21]。

如图 3 所示,在 3 423 cm^{-1} 附近的特征性强宽带表明氢键中存在 O-H 拉伸^[22],表明多糖链的分子间和分子内相互作用很强。2 930 cm^{-1} 和 1 400~1 200 cm^{-1} 处分别对应 C-H 伸缩振动和 C-H 变角振动^[23];1 642 cm^{-1} 和 1 554 cm^{-1} 处的双峰归因于 $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 中的 C=O 的伸缩振动及 PDMP 中的结晶水^[24-25];在 1 188,1 118 cm^{-1} 和 1 060 cm^{-1} 处的吸收峰是吡喃环骨架的 C-O 变角振动吸收峰^[26],表明分子中存在 C-O-H 和 C-O-C 结构^[27];在 1 060 cm^{-1} 和 615 cm^{-1} 处为硫酸根的伸缩振动峰^[29];出现

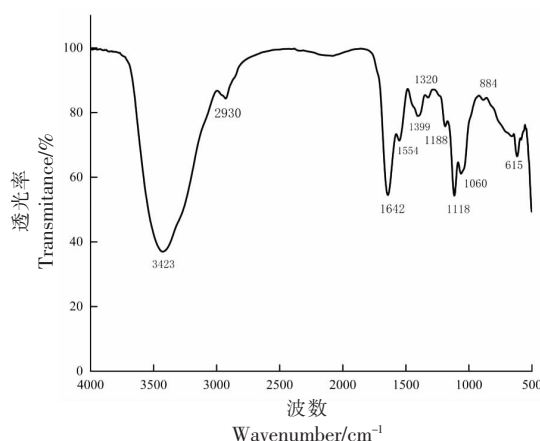


图 3 PDMP 的 FT-IR 光谱

Fig.3 FT-IR spectrum of PDMP

在 884 cm^{-1} 附近的吸收峰,表明吡喃糖的存在^[28],具体的连接键型(α -、 β -)需要后续的核磁共振验证。从上述结果可以推断 PDMP 有可能为含有硫酸根的硫酸化多糖。由于多糖的天然特性,不同糖残基产生的一些信号可能在指纹区域重叠,然而,大多数典型信号可以根据准确的单糖组成分析和 NMR 谱图进行分析比对。

2.1.6 PDMP 的 NMR 光谱分析 通过 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱以进一步研究糖基残基的连接,PDMP 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 图,如图 4 和 5 所示。

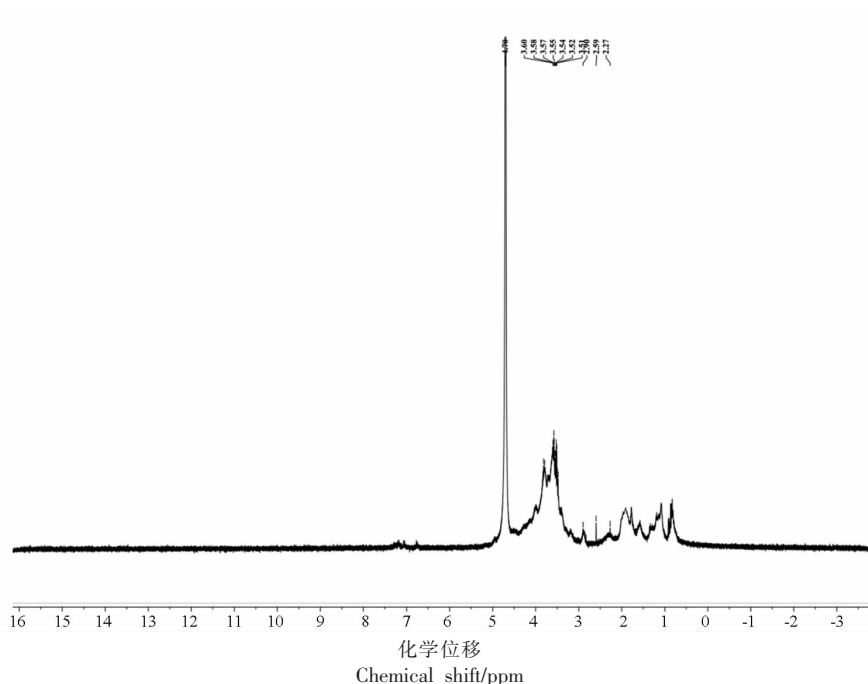
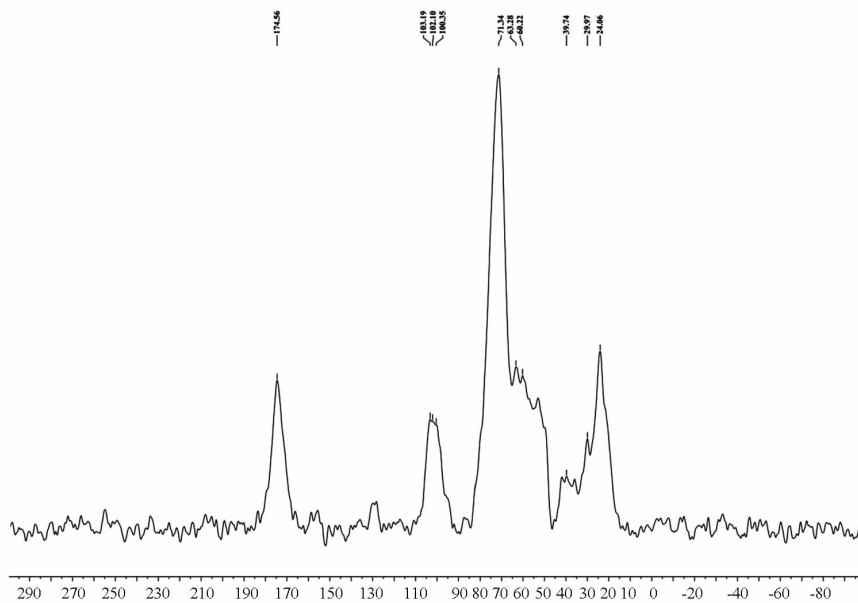


图 4 PDMP 的 ^1H NMR 光谱图

Fig.4 ^1H NMR spectra of PDMP

图5 PDMP的 ^{13}C NMR光谱图Fig.5 ^{13}C NMR spectra of PDMP

1) PDMP的 ^1H NMR光谱

在PDMP的 ^1H NMR谱图中,多糖中糖残基的异头质子的构型可以根据它们的化学位移(δ)从它们的 ^1H -NMR光谱中识别出来。一般来说,4.9~6.0 ppm范围内的异头质子是 α -构型,而4.0~4.9 ppm范围内的异头质子是 β -构型^[29]。在 ^1H NMR谱图中,PDMP在 δ 4.0~4.9 ppm处的吸收峰,表明了异头质子的存在, δ H大约在3.4~4.0 ppm的值代表了多糖中的非异头原子H2-H6。在 δ 5.0~5.3 ppm并未出现异头质子信号,说明PDMP中不存在 α -Galp A残基的异头氢质子信号^[30]。在 δ 1.8~2.3 ppm的共振信号归属于乙酰基($\text{CH}_3\text{CO}-$)的甲基质子信号,为GalNAc中甲基的(CH_3-)^[31],进一步印证了FT-IR和单糖组成的分析结果。

2) PDMP的 ^{13}C NMR光谱 与 ^1H -NMR相比, ^{13}C -NMR化学位移范围宽广,分辨率高,可以解析异头碳的构型,多糖残基中取代位点和分支点^[32]。 ^{13}C NMR谱中异头碳的共振峰位于 δ 95.0~110.0 ppm范围内。在PDMP的 ^{13}C NMR谱图中,异头碳的化学位移有100.35,102.10,103.19 ppm,表明存在 α -糖苷键和 β -糖苷键构型^[33],另一方面,吡喃糖的C-3和C-5的化学位移一般小于80 ppm,而呋喃糖一般介于82~84 ppm之间^[34]。图

中可以看出,多个碳的信号峰,除了异头碳的信号外,其它均小于80 ppm,因此判断PDMP为吡喃糖,这也与上文红外光谱测定的结果相一致。 δ C大约在60~90 ppm的信号峰,代表了多糖中的非异头原子C2-C6, ^{13}C -NMR图中 δ 71.34 ppm和 δ 63.28 ppm区域的峰分别对应于C2-C5和C-6的峰信号^[35],60~70 ppm之间有化学位移,表明C6位置羟基一部分发生取代,C2-C5信号的 δ 值基本全部集中在70~77 ppm之间,表明其绝大部分未被取代,还有一小部分被取代^[36],而图5中 δ 75~85 ppm没有峰信号,因此,C2-C5位置上的羟基没有被取代。在 δ 27.01 ppm,29.97 ppm和 δ 39.74 ppm处的碳信号均在小于78 ppm,进一步证实PDMP的糖环为吡喃糖环^[37]。 δ 174.56 ppm的峰信号乙酰基的存在^[38],证实了FT-IR的分析结果,表明PDMP可能为一种硫酸化多糖。由 ^1H NMR和 ^{13}C NMR的核磁信息,PDMP含有(1 \rightarrow)-和(1 \rightarrow 6)-糖苷键的 α -糖基和 β -糖基。党超^[11]从泥鳅鱼头中提取的泥鳅多糖中同时存在 α 型吡喃糖和 β 型吡喃糖,这与本研究的PDMP相似。

2.2 PDMP的理化性质分析

2.2.1 PDMP的热稳定性 图6为PDMP热降解质量变化与变化速率曲线。TG是样品质量随温度变化曲线,DTG是TG的一阶微分曲线,表示样品

失重速率与温度的关系,通过热重分析可以了解样品的热稳定性。

TG 结果显示随着温度的变化 PDMP 的质量损失率,在 200 °C 之前 PDMP 并没有因为升温而出现明显的失重,质量损失仅为 7.38%,这部分的质量损失主要是由于多糖物理吸附水的挥发^[37]。当温度超过 200 °C 时,PDMP 出现明显的质量损失,损失率达 52.79%,由 DTG 曲线可以看出,多糖在 300 °C 之前降解速率很快,242.10 °C 时降解速率达到最快,300 °C 之后降解开始逐渐降低,在 200 °C 到 400 °C 范围内有较大的质量损失,可能是分子质量相对较大或稳定性高的成分在这个阶段温度内被降解^[38]。400 °C 时开始趋于平缓,到达终末温度 600 °C 时,物质并没有完全分解,PDMP 质量残留率为 31.25%,主要是残余物成分慢慢碳化阶段,还与质量损失中的一些未分解物质有关^[39]。该结果表明,PDMP 的热稳定性较高,图 8 PDMP 的扫描电镜图显示比较规则的排列,分子间相互作用力较强,可能这种物理结构使其更不易热分解。

2.2.2 PDMP 的结晶性 X 射线衍射是确定物相、晶体结构和其它结构参数的有用工具^[40]。通过 X 射线衍射分析 PDMP 的结晶性能。

根据 PDMP 的 XRD 图,可以看出,PDMP 的衍射角在 30.60°,31.67°和 44.54°有明显尖峰,说明其含有粒度较大的微晶^[41];在 21.79°时有弥散宽尖峰,说明其不仅存在微晶体系,还存在微晶与非晶共存、亚微晶与非晶共存的多晶体系^[43]。这与蒋茂婷等^[42]提取的蒜皮水溶性多糖的结晶性有相似之处。以上结果表明 PDMP 的可塑性高,PDMP 是一种很有前途的功能性高分子碳水化合物。

2.2.3 PDMP 的表面形貌观察 经脱蛋白处理后的 PDMP 的表面形貌通过 SEM 在 500 倍和 2 000 倍放大倍数下观察。

如图 8 所示,样品分别以 100 μm 和 20 μm 标尺拍摄图片,PDMP 的表面形成大小均一密集的蜂窝状孔洞,内部有大小不一的孔洞结构,说明 PDMP 的成分相对均一,分子间相互作用力较强。

2.3 PDMP 的体外降糖活性评价

2.3.1 PDMP 的 α-淀粉酶抑制活性 α-淀粉酶是一种碳水化合物降解酶,它最初作用于高分子

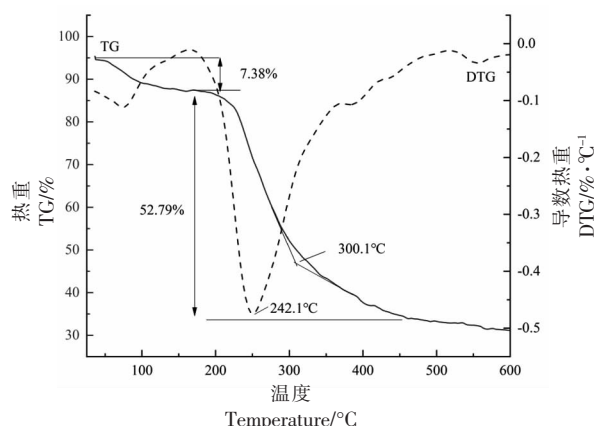


图 6 PDMP 的 TG 曲线(a)和 DTG 曲线(b)

Fig.6 TG curve (a) and DTG curve (b) of PDMP

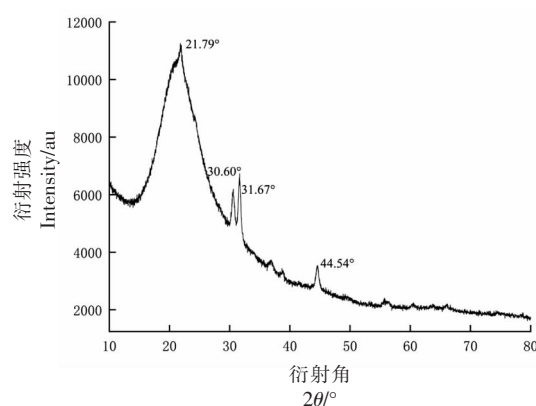


图 7 PDMP 的 X-射线衍射图

Fig.7 X-ray diffraction pattern of PDMP

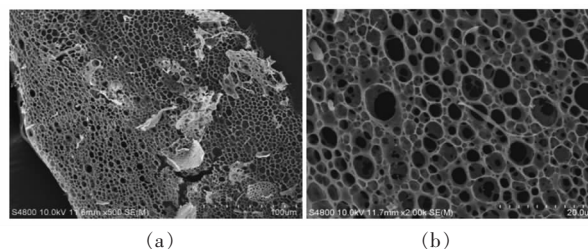


图 8 PDMP 的扫描电镜图

Fig.8 SEM images of PDMP

质量的糖类,并将它们分解成较小分子质量的低聚糖,然后通过 α-葡萄糖苷酶进一步将低聚糖降解为单糖,随后导致血液中的糖水平升高^[17]。

如图 9 所示,在不同浓度下,PDMP 对 α-淀粉酶都有抑制活性,在 1~9 mg/mL 范围内,PDMP 对 α-淀粉酶的抑制活性呈一定的剂量依赖关系,相同浓度下 PDMP 的抑制效果要低于阳性对照组阿

卡波糖。PDMP 和阿卡波糖的 50%抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $152 \mu\text{g/mL}$ 和 $476 \mu\text{g/mL}$ 。当质量浓度为 9 mg/mL 时,PDMP 和阿卡波糖的抑制率分别达到 65.02%和 88.70%。Lakshmanasenthil 等^[43]发现喇叭藻 (*Turbinaria ornate*) 中褐藻糖胶硫酸基含量为 $(33.00 \pm 0.42)\%$, 具有较强的 α -淀粉酶抑制作用, IC_{50} 值为 $33.60 \mu\text{g}$, 低于阿卡波糖 $125 \mu\text{g}$ 。本研

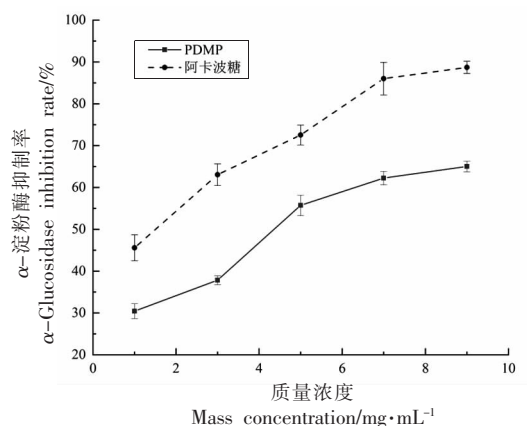


图9 PDMP 和阿卡波糖的 α -淀粉酶抑制活性
Fig.9 α -Amylase inhibitory activity of PDMP and acarbose

如图所示,在不同浓度下 PDMP 对 α -葡萄糖苷酶有抑制活性,在 $1 \sim 9 \text{ mg/mL}$ 范围内,PDMP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性呈一定的剂量依赖关系,相同浓度下 PDMP 的抑制效果要高于阳性对照组阿卡波糖。PDMP 和阿卡波糖的 50%抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $550, 136 \mu\text{g/mL}$ 。当质量浓度为 9 mg/mL 时 PDMP 和阿卡波糖的抑制率分别达到 86.40%, 74.35%。PDMP 表现出显著的对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。Xiao 等^[44]从马尾藻制备的硫酸化马尾藻多糖硫酸根含量为 35.80%, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果显著,在质量浓度为 1 mg/mL 时,抑制率达到 98.40%, 高于阿卡波糖。Zhong 等^[45]制备的硫酸化裙带菜多糖硫酸根含量为 38.79%, IC_{50} 值为 $50.50 \mu\text{g/mL}$, 比阿卡波糖更有效 (IC_{50} 值为 $337.30 \mu\text{g/mL}$)。以上结果说明含有硫酸基的天然 PDMP 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性较高,猜测可能与其本身含有大量硫酸根有一定关系,此外,含有较多的岩藻糖和半乳糖以及阿拉伯糖和木糖都具有显著的 α -葡萄糖苷酶活性,因此,PDMP 可能是缓解 II 型糖尿病的一种潜在物质,

究推测 PDMP 中硫酸基的存在是其抑制其活性的原因之一,可进一步深入研究其构效关系。

2.3.2 PDMP 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 降低餐后高血糖的 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以调节血糖水平减缓糖尿病的进展,是治疗 II 型糖尿病前期状态的关键因素^[18]。PDMP 体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性如图 10 所示。

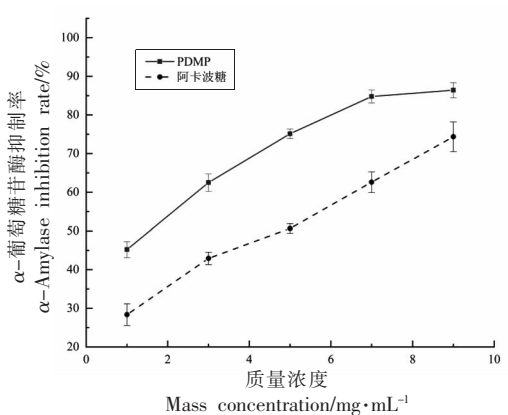


图10 PDMP 和阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶抑制活性
Fig.10 α -Glucosidase inhibitory activity of PDMP and acarbose

为后续深入研究其机制奠定理论基础。

3 结论

从大鳞副泥鳅黏液中分离出一种热稳定较强,有一定结晶性的多糖-PDMP,其总糖含量为 $(95.51 \pm 2.27)\%$,富含硫酸基,不含糖醛酸, M_w 为 362928 u 。PDMP 是由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖、木糖 5 种单糖组成的岩藻半乳糖,其摩尔比为 $13.27:5.68:2.31:2.23:0.45$ 。PDMP 含有 $(1 \rightarrow)$ -和 $(1 \rightarrow 6)$ -糖苷键的 α -糖基和 β -糖基的吡喃糖。此外,PDMP 在体外对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的抑制效果良好,展现出一定的降糖潜力。这些研究结果为 PDMP 在医药领域和现代食品工业的应用奠定了一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] 何泽贺,肖宇,刘建朝,等. 大鳞副泥鳅蛋白制备 ACE 抑制肽的酶解方式研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(7): 134-140.

- HE Z H, XIAO Y, LIU J C, et al. Study on enzymatic hydrolysis of ACE inhibitory peptide from loach (*Paramisgurnus dabryanus*) protein [J]. Food Research and Development, 2021, 42(7): 134–140.
- [2] 刘永富. 大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)与泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的种类鉴别方法及雌核发育初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- LIU Y F. The species identification method and preliminary study on gynogenesis of *Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015.
- [3] 张良栓, 李丽静, 王烜, 等. 泥鳅分泌多糖抗蛋白质非酶糖基化活性研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(5): 436–439.
- ZHANG L S, LI L J, WANG X, et al. Antiglycation of polysaccharide from secretion of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Harbin Medical University, 2010, 44(5): 436–439.
- [4] QIN C G, HUANG K X, XUA H B. Protective effect of polysaccharide from the loach on the *in vitro* and *in vivo* peroxidative damage of hepatocyte [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 592–597.
- [5] 杨瑜, 杨军, 李晓梅. 泥鳅及泥鳅滑液中生物活性成分的研究[C]// 中国药学会. 第九届全国中药和天然药物学术研讨会大会报告及论文集. 北京: 中国药学会学术会务部, 2007.
- YANG Y, YANG J, LI X M. Studies on bioactive components in loach and loach slide [C]// Chinese Pharmaceutical Association. Report and Proceedings of the 9th National Symposium on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine. Beijing: Academic Affairs Department of Chinese Pharmaceutical Association, 2007.
- [6] QIN C G, HUANG K X, XUA H B. Isolation and characterization of a novel polysaccharide from the mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3): 367–371.
- [7] 孙智华, 王建军, 侯喜林. 泥鳅黏液中透明质酸的制备及其理化性质的研究[J]. 药物生物技术, 2001, 8(1): 42–44.
- SUN Z H, WANG J J, HOU X L. Preparation and characterization of hyaluronic acid from mucilage of loach[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2001, 8(1): 42–44.
- [8] KIMURA M, HAMA Y, SUMI T, et al. Characterization of a deaminated neuraminic acid-containing glycoprotein from the skin mucus of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(51): 32138–32143.
- [9] 孙朋朋. 泥鳅粘液中凝集素的提取、分离、纯化及性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
- SUN P P. Study on extraction, isolation, purification and characterization of lectin from loach skin mucus [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.
- [10] 王思琪, 胡彦波, 翟丽媛, 等. 豆渣可溶酸性多糖的分离纯化及结构解析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 52–57.
- WANG S Q, HU Y B, ZHAI L Y, et al. Extraction, purification and structure analysis of soluble acidic polysaccharides from soybean dregs[J]. Food Science, 2021, 42(10): 52–57.
- [11] 党超. 即食泥鳅开发及副产物多糖提取与结构分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2015.
- DANG C. The development of ready-to-eat loach food and extraction, structural analysis of its byproduct polysaccharide [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2015.
- [12] 赵圆圆. 杏鲍菇子实体多糖的提取纯化、结构表征及降脂活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- ZHAO Y Y. Study on extraction, purification, structure characterization and lipid-lowering activity of polysaccharide from *Pleurotus eryngii* fruit body [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2020.
- [13] 伍芳芳. 猴头菇多糖的结构表征、免疫调节活性及其机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- WU F F. Structural characterization, immunomodulatory activities and underlying mechanism of *Hericium erinaceus* polysaccharide [D]. South China University of Technology, 2018.
- [14] ZHOU C, MI S, LI J, et al. Purification, characterisation and antioxidant activities of chondroitin sulphate extracted from *Raja porosa* cartilage[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 241: 116306.
- [15] 张润阳. 芝麻多糖的分级提取、结构表征和功能性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- ZHANG R Y. Gradient extraction, structural characterization and functionality of polysaccharides from *Seamum indicum* L.[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2020.

- [16] GETACHEW A T, LEE H J, CHO Y J, et al. Optimization of polysaccharides extraction from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) using subcritical water: Structural characterization and biological activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 852–861.
- [17] 何坤明, 王国锭, 白新鹏, 等. 山茱萸籽多糖分离纯化、结构表征及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 81–88.
- HE K M, WANG G D, BAI X P, et al. Isolation, purification, structure characterization and antioxidant activity of *Cornus officinalis* seed polysaccharides[J]. Food Science, 2021, 42(19): 81–88.
- [18] 高阳杨, 闫晓慧, 朱畅, 等. 葛氏鲈塘鳢鱼头多糖的制备、结构鉴定及体外生物活性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 64–70.
- GAO Y Y, YAN X H, ZHU C, et al. Preparation, structure identification and *in vitro* biological activity of polysaccharide from *Perccottus glenii* head [J]. Food Science, 2020, 41(18): 64–70.
- [19] ZHOU J, YAN J Y, BAI Z S, et al. Hypoglycemic activity and potential mechanism of a polysaccharide from the loach in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 121 (5): 199–206.
- [20] SEEDEVI P, MOOVENDHAN M, VAIRAMANI S, et al. Mucopolysaccharide from cuttlefish: Purification, chemical characterization and bioactive potential[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 167: 129–135.
- [21] CUI Y S, LI Y X, JIANG S L, et al. Isolation, purification, and structural characterization of polysaccharides from *atractylodis macrocephalae* rhizoma and their immunostimulatory activity in RAW264.7 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 163(15): 270–278.
- [22] WU Y T, HUO Y F, XU L, et al. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Porphyra haitanensis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 165: 2116–2125.
- [23] WANG Z Y, ZHAO Y Y, SU T T. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Rana chensinensis* skin[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 115: 25–31.
- [24] 杨大俏, 王锦旭, 李来好, 等. 近江牡蛎多糖的结构鉴定及免疫调节能力分析[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 38–46.
- YANG D X, WANG J X, LI L H, et al. Structural analysis and immunoregulatory activity of polysaccharides from *Crassostrea rivularis* [J]. Food Science, 2020, 41(10): 38–46.
- [25] 栾晓红. 两种海蛭多糖的提取、分离和结构分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- LUAN X H. Extraction, separation and structural characterization of polysaccharides from two species of *Solenidae* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [26] 郝正祺, 刘靖宇, 孟俊龙, 等. 绣球菌子实体单组分多糖结构表征及其免疫活性[J]. 中国食品学报, 2021, 11(14): 1–11.
- HAO Z Q, LIU J Y, MENG J L, et al. Structural characterization and immunomodulatory activities of a single-component polysaccharide from the fruiting body of *Sparassis crispa*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 11 (14): 1–11.
- [27] MIAO J, REGENSTEIN J M, QIU J Q, et al. Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *auricularia*—A review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 102–113.
- [28] 刘学贵, 张雪, 迈德, 等. 金樱子天然硒多糖的结构表征及其体外活性[J]. 食品工业, 2021, 42(10): 169–174.
- LIU X G, ZHANG X, AHIMED R, et al. The structure characterization and *in vitro* activity of natural selenium polysaccharides in *Rosa laevigata* michx[J]. The Food Industry, 2021, 42(10): 169–174.
- [29] WANG J, WANG Y H, YANG X Q, et al. Purification, structural characterization, and PCSK9 secretion inhibitory effect of the novel alkali-extracted polysaccharide from *Cordyceps militaris*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179: 407–417.
- [30] KTARI N, FEKI A, TRABELSI I, et al. Structure, functional and antioxidant properties in Tunisian beef sausage of a novel polysaccharide from *Trigonella foenum-graecum* seeds [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 169–181.
- [31] 孙凯华. 海参斑软骨多糖的提取、纯化、结构鉴定及

- 性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
- SUN K H. Extraction, purification, structure and properties of polysaccharides from lumpfish cartilage [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.
- [32] ZHANG H, ZOU P, ZHAO H T, et al. Isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharide from pinecones of *Pinus koraiensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117078.
- [33] LIU H C, FAN H X, ZHANG J, et al. Isolation, purification, structural characteristic and antioxidative property of polysaccharides from *A. cepa L. var. a-grogatum* Don[J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(1): 71-79.
- [34] PAN Q T, SUN Y L, LI X Y, et al. Extraction, structural characterization, and antioxidant and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Notarchus leachi* freeri eggs[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 116: 119-206.
- [35] SHANG X L, LIU C Y, DONG H Y, et al. Extraction, purification, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from wheat bran [J]. Journal of Molecular Structure, 2021, 1233: 130096.
- [36] 卓小月, 刘卫红, 杨志勇. 动物源活性多糖提取、纯化和结构鉴定技术的最新进展[J]. 当代化工研究, 2020(3): 44-47.
- ZHUO X Y, LIU W H, YANG Z Y. Advances of the animal-original polysaccharides: Extraction, purification and structure identification [J]. Modern Chemical Research, 2020(3): 44-47.
- [37] RUMIŃSKA W, MARKIEWICZ K H, WILCZEWSKA A Z, et al. Effect of oil pomaces on thermal properties of model dough and gluten network studied by thermogravimetry and differential scanning calorimetry[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129882.
- [38] 郑泉兴, 李巧灵, 张柯, 等. 植物纤维的热裂解过程[J]. 应用化学, 2022, 1(10): 1-12.
- ZHENG Q X, LI Q L, ZHANG K, et al. Pyrolysis process of plant fibers[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2022, 1(10): 1-12.
- [39] 王雪蓉, 王倩倩, 刘运传, 等. 基于热重分析法的苯基硅橡胶热分解行为研究[J]. 橡胶工业, 2021, 68(9): 699-704.
- WANG X R, WANG Q Q, LIU Y C, et al. Study on thermal decomposition behavior of phenyl silicone rubber by TGA[J]. China Rubber Industry, 2021, 68(9): 699-704.
- [40] 张润阳. 芝麻多糖的分级提取、结构表征和功能性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- ZHANG R Y. Gradient extraction, structural characterization and functionality of polysaccharides from *Seamum indicum L.*[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2020.
- [41] MULLER A, CORADI P C, NUNES M T, et al. Effects of cultivars and fertilization levels on the quality of rice milling: A diagnosis using near-infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and scanning electron microscopy[J]. Food Research International, 2021, 147: 110524.
- [42] 蒋茂婷, 冉艳红, 刘娜, 等. 蒜皮水溶性多糖的制备及结构表征[J]. 食品科学, 2021, 11(14): 1-15.
- JIANG M T, RAN Y H, LIU N, et al. Preparation and structural characterization of water-soluble polysaccharide from garlic skin [J]. Food Science, 2021, 11(14): 1-15.
- [43] LAKSHMANASENTHIL S, VINOTHKUMAR T, GEETHARAMANI D, et al. Fucoidan—a novel α -amylase inhibitor from *Turbinaria ornata* with relevance to NIDDM therapy[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(3): 66-70.
- [44] XIAO H, FU X, CAO C L, et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 407-414.
- [45] ZHONG Q W, ZHOU T S, QIU W H, et al. Characterization and hypoglycemic effects of sulfated polysaccharides derived from brown seaweed *Undaria pinnatifida* [J]. Food Chemistry, 2021, 341(1): 128148.

Chemical Composition, Physicochemical Properties and Hypoglycemic Activity *in Vitro* of Polysaccharide from Loach (*Paramisgurnus dabryanus*) Mucus

Li Yanan^{1,2}, Guo Mingzhu², Shao Juanjuan^{1*}, Sang Yaxin², Sun Jilu^{2*}

¹College of Science & Technology, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

²College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei)

Abstract In order to develop and utilize the by-product mucus of loach processing and circulation, a kind of *Paramisgurnus dabryanus* mucus polysaccharide (PDMP) was extracted from the mucus of *Paramisgurnus dabryanus* by ultrasonic-assisted water extraction and alcohol precipitation method. The chemical composition of PDMP was analyzed by UV spectrum, gel filtration chromatography, high performance liquid chromatography, Fourier transform infrared spectroscopy, ¹H NMR and ¹³C NMR. The physicochemical properties of PDMP were studied by X-ray diffraction, thermogravimetric analysis and scanning electron microscopy. The results showed that the total sugar content of PDMP was (95.51±2.27)%, and the sulfate content was (23.41±0.87)%. PDMP did not contain uronic acid and contained acetyl group. The molecular weight of PDMP was 362 928 u. PDMP was composed of fucose, galactose, mannose, glucose and xylose with a molar ratio of 13.27:5.68:2.31:2.23:0.45. PDMP contains (1→) -and (1→6) -α-glycosylation and β-glycosylation pyranose. PDMP had strong thermal stability and certain crystallinity, with uniform dense honeycomb holes on the surface and different sizes of holes inside. In addition, *in vitro* hypoglycemic studies showed that the IC₅₀ values of PDMP on α-amylase and α-glucosidase inhibitory activities were 152 μg/mL and 550 μg/mL, respectively. 9 mg/mL PDMP inhibited α-amylase and α-glucosidase activities by 65.02% and 86.40%, respectively. The results of this study deepened the understanding of loach mucus and provided a theoretical basis for the application of PDMP in modern food industry and medicine.

Keywords loach mucus; polysaccharide; chemical composition; physicochemical properties; hypoglycemic activity