

复方桦树茸降糖片的制备及其对2型糖尿病小鼠降血糖作用研究

李 鑫¹, 朱明微¹, 李瑞楚², 王柳婷¹

1. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030

摘要: 目的 确定复方桦树茸降糖片的制备工艺, 并考察其对2型糖尿病小鼠的降血糖作用。方法 采用热水浸提法提取桦树茸-苦荞(1:1)、桦树茸、苦荞的粗多糖, 采用大孔树脂对粗多糖进行纯化, 获得精多糖。以累积溶出率为指标, 单因素试验确定复方桦树茸降糖片的制粒方法、甘露醇占填充剂的比例、填充剂比例、湿法制粒的烘干时间, 采用Box-Behnken星点设计试验进一步优化其制备工艺。采用高糖高脂喂养联合ip链脲佐菌素(STZ)制备2型糖尿病小鼠模型, 考察二甲双胍($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 阳性药)和桦树茸多糖、苦荞多糖、复方桦树茸降糖片($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以多糖含量计)对2型糖尿病小鼠体质质量、空腹血糖、糖化血清蛋白(GSP)水平的影响。结果 优化处方为: 桦树茸-苦荞多糖占37%、淀粉占51%、甘露醇占12%, 湿法制粒, 于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥22 min后加1%硬脂酸镁, 压片, 所得片剂多糖含量为每片58.27 mg。动物实验结果表明, 与模型组相比, 各给药组小鼠体质质量显著升高($P<0.05$), 空腹血糖显著降低($P<0.01$), GSP水平显著降低($P<0.05, 0.01$); 与桦树茸多糖组及苦荞多糖组比较, 复方桦树茸降糖片组小鼠的空腹血糖显著降低($P<0.05$), GSP水平显著降低($P<0.05$)。结论 复方桦树茸降糖片制备工艺简单, 且具有良好降血糖功效。

关键词: 桦树茸; 苦荞; 复方桦树茸降糖片; 制备工艺; 降血糖

中图分类号: R283, R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)11-2239-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.11.010

Preparation of Compound *Inonotus obliquus* Hypoglycemic Tablets and its hypoglycemic effect on type II diabetes mice

LI Xin¹, ZHU Mingwei¹, LI Ruichu², WANG Liuting¹

1. College of Pharmacy, Harbin Commercial University, Harbin 150076, China

2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Objective To determine the preparation process of Compound *Inonotus obliquus* Hypoglycemic Tablets (CIHT) and to investigate its hypoglycemic effect on type II diabetes mice. **Methods** The crude polysaccharide compounds of *Inonotus obliquus-tartary buckwheat* (1:1), *Inonotus obliquus* and *Tartary buckwheat* were firstly extracted by hot water extraction. The crude polysaccharide was purified by macroporous resin to obtain refined polysaccharide. The granulation method, the proportion of mannitol to filling agent, the proportion of filling agent and the drying time of wet granulation were determined by single factor test with the cumulative dissolution rate as the index. Box-Behnken star design experiment was used to further optimize the preparation process. Type II diabetic mouse model was prepared by high-glucose and high-fat feeding combined with streptozotocin ip (STZ), to investigate the effects of metformin ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, positive drug), *Inonotus obliquus* polysaccharide, *Tartary buckwheat* polysaccharide and CIHT ($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, calculated by polysaccharide content) on body weight, fasting blood glucose and glycated serum protein (GSP) levels. **Results** The optimized formula was as follows: *Inonotus obliquus-Tartary buckwheat* polysaccharide accounted for 37%, starch accounted for 51%, mannitol accounted for 12%, wet granulation, dried at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 22 minutes, added 1% magnesium stearate and tableted, and the polysaccharide content was 58.27 mg per tablet. Animal experiments showed that, compared with model group, the body weight of mice in each administration group was significantly increased ($P<0.05$), fasting blood glucose was significantly decreased ($P<0.01$), and GSP level was significantly decreased ($P<0.05, 0.01$). Compared with *Inonotus obliquus* polysaccharide group and *Tartary buckwheat* polysaccharide group, the fasting blood glucose level and GSP level

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19C107)

第一作者: 李 鑫,男,副教授,研究方法为中药制剂新剂型研究。E-mail: 102105@hrbcu.cn

of mice in CIHT group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The preparation process of CIHT product is simple, and it has good hypoglycemic effect.

Key words: *Inonotus obliquus* (Fr.) Pila; *Tarary buckwheat*; Compound *Inonotus obliquus* Hypoglycemic Tablets; preparation technology; hypoglycemia

桦树茸是锈革孔菌科真菌桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* (Fr.) Pila^[1]的子实体,富含200多种有效成分^[2],其中桦褐孔菌多糖是主要的生物活性成分,具有降血糖、调血脂、维持胃肠稳态、抗氧化、抗肿瘤等药理作用^[3-5]。研究表明,苦荞多糖同样具备降血糖、调血脂、降血压等功效,常作为辅助降糖药,且效果显著^[6]。目前市场上桦树茸产品较少,多为初级加工品,技术含量较低。本研究将桦树茸配伍苦荞,并提取多糖成分,开发具有降糖作用的复方制剂,该复方制剂原料为天然可食用生物资源,使用安全性高、疗效稳定^[7],为对推动桦褐孔菌的进一步开发利用进行有益探索。

1 材料

1.1 主要仪器

AS3120A 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(荣华仪器厂);SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);R202-2 旋转蒸发器(上海夏丰实业公司);DZF-6020 型真空干燥箱(上海博讯实业公司);UV-7504 型紫外可见分光光度计(上海欣茂实业有限公司);FA22048 电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司);DP30 单冲压片机(北京国药龙立科技有限公司);RC-B3 型溶出度测试仪(天津市国铭医药设备有限公司);78X-2 型片剂四用测定仪(上海黄海药检仪器厂);Bio-rad imark 酶标仪(美国伯乐公司);三诺亲智糖仪(三诺生物传感股份有限公司)。

1.2 药材及主要试剂

桦树茸(黑龙江国药药材有限公司)经哈尔滨商业大学金哲雄教授鉴定为锈革孔菌科褐卧孔菌属 *I. obliquus* (Fr.) Pila;苦荞(黑龙江国药药材有限公司)经哈尔滨商业大学金哲雄教授鉴定为双子叶蓼科荞麦属植物苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn 的干燥种子;可溶性淀粉(天津市天力化学试剂有限公司);AB-8 型大孔吸附树脂(天津市汇达化工有限公司);硬脂酸镁(上海源叶生物科技有限公司);甘露醇(天津市致远化学试剂有限公司);蒸馏水(哈尔滨文景蒸馏水厂);葡萄糖(天津市天力化学试剂有限公司,质量分数 $\geq 99.5\%$);链脲佐菌素、柠檬酸、柠檬酸三钠、盐酸二甲双胍(批号

20210128)(北京博爱港生物技术有限公司);糖化血清蛋白(GSP)测定试剂盒、葡萄糖(GLU)测试盒(南京建成生物工程研究所);无水乙醇、苯酚、浓硫酸、浓盐酸、氢氧化钠均为分析纯。

1.3 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 70 只,雄性,体质量(20 ± 2)g,购自长春市亿斯实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SYXK(黑)2019-001,动物实验通过哈尔滨商业大学伦理委员会批准,编号为 HSDYXY-2021014。

2 方法与结果

2.1 多糖提取物的制备

分别将桦褐孔菌、苦荞粉碎成粗颗粒,按 1:1 比例混匀。精密称取 5 g 混合物,按料液比 1:30 加入蒸馏水,在 80 °C 浸提 3 h,滤过后将滤液浓缩,加入 4 倍 95% 乙醇。搅拌后静置 4 h,滤过,得沉淀物,即桦褐孔菌-苦荞的粗多糖。后根据参考文献报道方法^[8]采用大孔树脂对粗多糖进行纯化,获得精多糖。按相同方法制备桦树茸多糖和苦荞多糖。

2.2 多糖含量测定及方法学考察

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取葡萄糖对照品 10.0 mg 干燥至恒定质量,置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水定容,即得对照品溶液,质量浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密称取质量为 10.0 mg 的精多糖样品(提取干燥后),将其溶于蒸馏水中,用量瓶定容至 100 mL,即得供试品溶液,质量浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 检测波长的确定 精密吸取 1 mL 供试品溶液,另外吸取蒸馏水 1 mL 作为空白对照溶液,分别加入 1 mL 5% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,摇匀,置于 40 °C 水浴显色 30 min^[9],在 400~570 nm 波长进行扫描,截取扫描图。供试品溶液在 489 nm 处有最大吸收峰,故选择检测波长为 489 nm。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 对照品溶液,移入 10 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度线,摇匀。分别精密吸取 1 mL 溶液,加入 1 mL 5% 的苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,摇匀,置于 40 °C 水浴显色 30 min。在 489 nm 处测定吸光

度(A)值,绘制标准曲线。得到回归方程为 $A=0.0075C-0.0090$, $R^2=0.9995$ 。结果表明,葡萄糖的质量浓度在 $0\sim100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2.5 方法学考察

(1)精密度试验 将“2.2.1”项下溶液分别用蒸馏水配成质量浓度为 20 、 60 、 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。分别吸取 1 mL ,按“2.2.3”项下方法进行显色反应,在 489 nm 处测 A 值。在 1 d 内重复 3 次,计算日内RSD为 1.32% 、 0.23% 、 0.86% ;连续 3 d 进行测量,计算日间RSD为 1.18% 、 0.67% 、 0.59% ,说明仪器精密度良好。

(2)重复性试验 精密称取质量为 10.0 mg 的多糖样品,共 6 份,按照“2.2.2”项下方法将其配成质量浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。按“2.2.3”项下方法进行显色反应,在 489 nm 处测 A 值。计算得RSD为 0.82% ,说明该方法重复性良好。

(3)稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,将其依次静置 0 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 min ,按“2.2.3”项下方法进行显色反应,在 489 nm 处测 A 值,计算RSD为 1.06% ,说明供试品在 60 min 内稳定。

(4)回收率试验 精密量取“2.2.2”项下的供试品溶液 1.0 mL 9 份,分 3 组,每组分别精密加入 28 、 35 、 $42\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 1.0 mL ,摇匀后精密量取 1.0 mL ,按“2.2.3”项下方法进行显色反应,在 489 nm 处测 A 值。计算得平均回收率分别为 97.62% 、 100.71% 、 97.67% ,RSD分别为 1.93% 、 1.52% 、 1.23% 。

2.2.6 供试品的含量测定 取 10 mg 供试品,按照“2.2.2”项下制备供试品溶液,按“2.2.3”项下方法进行显色反应,在 489 nm 处测定 A 值,计算提取物的多糖含量。桦树茸-苦荞多糖的多糖质量分数为 60.1% ,桦树茸多糖的多糖质量分数为 65.0% ,苦荞多糖的多糖质量分数为 63.5% 。

2.3 复方桦树茸降糖片制备工艺研究

2.3.1 单因素试验

(1)制粒方法的选择 湿法制备:取桦树茸-苦荞多糖提取物,加入适量可溶性淀粉、甘露醇混匀,加少量 60% 乙醇制软材,制湿颗粒, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥,整粒后加入适量硬脂酸镁混匀压片。干法制备:取桦树茸-苦荞多糖提取物,加入适量可溶性淀粉、甘露醇混匀,直接压片。

以可溶性淀粉、甘露醇和硬脂酸镁为辅料,控制填充剂的用量为 50% ,甘露醇用量占填充剂用量

的 10% 。湿法制粒的颗粒烘干时间为 20 min 。以压片情况及累积溶出率为指标,考察 2 种制粒方法对药物溶出的影响。

累积溶出率的测定:采用 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的蒸馏水 900 mL 为溶出介质,以 $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速率匀速搅拌,应用“2.2”项建立的多糖检测方法,按《中国药典》2020年版(四部)项下0931关于溶出度与释放度测定法第二法浆法进行操作。

由图1可知,采用湿法制粒所得片剂累积溶出率高于干法制粒,且湿法制粒所得的片剂表面光滑,无杂斑。故采用湿法制粒法制备复方桦树茸降糖片。

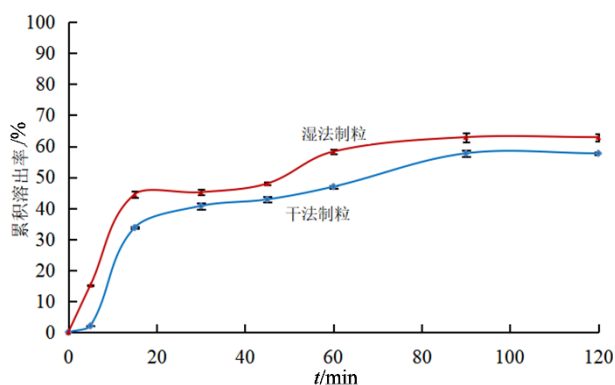


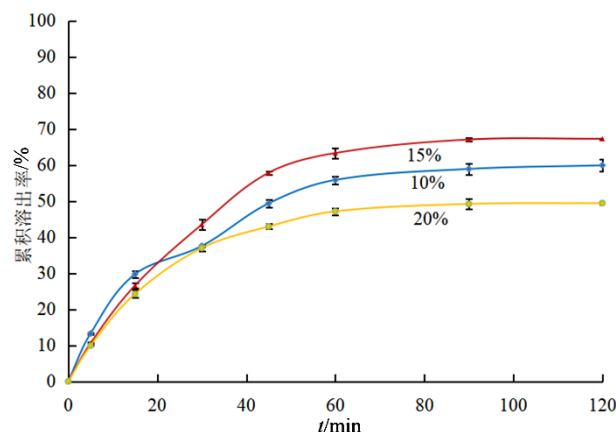
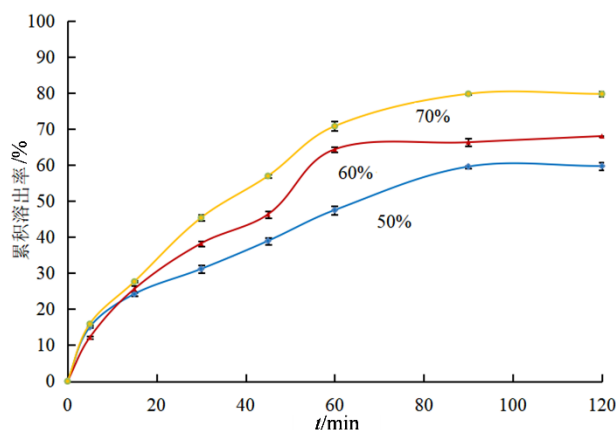
图1 制粒方法的考察结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Investigation results of granulation methods ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

(2)甘露醇比例选择 根据“单因素试验(1)”结果,制粒方法选择湿法制粒,控制填充剂用量占片剂质量的 60% ,选择甘露醇的用量占填充剂用量的 10% 、 15% 、 20% (其余以可溶性淀粉填充),湿法制粒的颗粒烘干时间为 15 min ,以压片情况及累积溶出率为指标,考察甘露醇比例对药物溶出的影响。结果表明,加入甘露醇的降糖片口感明显改善。由图2可知,甘露醇比例为 15% 时,累积溶出率最高,但此条件下所制片剂,出现部分松片现象,而甘露醇比例为 10% 时,无黏冲现象,且片剂表面光洁。综合考虑选择甘露醇比例为 10% 。

(3)填充剂比例的选择 控制甘露醇用量占填充剂用量的 15% ,依次选择填充剂比例为 50% 、 60% 、 70% ,湿法制粒的颗粒烘干时间为 12 min ,以压片情况及累积溶出率为指标,考察填充剂的用量对药物溶出的影响。由图3可知,填充剂比例为 70% 时药物累积溶出率最大,但出现部分松片现象,综合考虑选择填充剂用量为 60% 。

(4)烘干时间的选择 固定填充剂用量占片重

图2 甘露醇比例对累积溶出率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 Effect of mannitol ratio on cumulative dissolution ($\bar{x} \pm s, n=3$)图3 填充剂比例对累积溶出率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effect of filler ratio on cumulative dissolution ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的60%,甘露醇的用量占填充剂用量的15%(其余以可溶性淀粉填充),湿法制粒压片,选择湿颗粒的烘干时间分别为10、20、30 min,以压片情况及累积溶出率为指标,考察湿颗粒的烘干时间对药物溶出的影响。由图4可知,烘干时间为30 min时累积溶出率最高,但此烘干时间所制片剂出现部分松片现象,而烘干时间为20 min所制片剂无黏冲现象且表面光洁。综合考虑选择烘干时间为20 min。

2.3.2 星点设计优化复方桦树茸降糖片处方 根据单因素试验结果,以填充剂比例(A)、甘露醇比例(B)及烘干时间(C)为考察因素,设置低、中、高3个水平(分别用-1、0、1编码),以累积溶出率为指标,采用湿法制粒法压片,筛选最佳制备工艺处方。因素及水平见表1。试验安排见表2。

根据表2,利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对 Box-Behnken 设计试验各指标数据进行回归分析,得到编码式二次回归模型: $L=85.450\ 00+14.168\ 75$

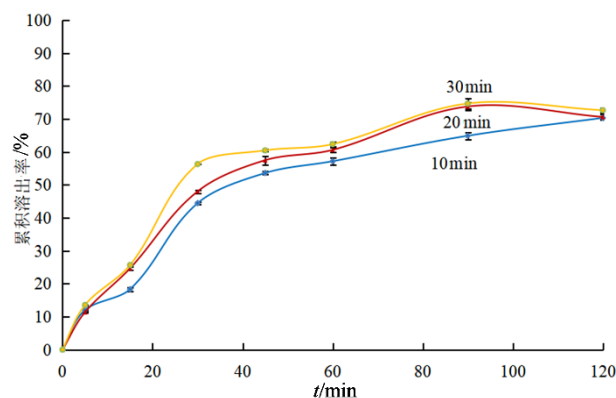
图4 湿颗粒烘干时间对累积溶出率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effect of drying time of wet granules on cumulative dissolution ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表1 响应面设计因素及水平

Table 1 Response surface design factors and levels

水平	因素		
	填充剂比例(A)/%	甘露醇比例(B)/%	湿颗粒烘干时间(C)/min
-1	55	10.0	10
0	60	12.5	20
1	65	15.0	30

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Response surface test design and results

编号	A	B	C	累积溶出率/%
1	0	-1	-1	77.49
2	-1	1	0	50.38
3	0	0	0	87.43
4	0	0	0	86.01
5	1	-1	0	88.69
6	0	0	0	84.24
7	0	0	0	86.11
8	-1	0	-1	56.24
9	-1	-1	0	58.52
10	1	0	-1	82.66
11	1	1	0	80.23
12	0	1	-1	73.35
13	0	1	1	82.39
14	0	-1	1	78.51
15	-1	0	1	57.39
16	1	0	1	84.30
17	0	0	0	83.46

$A-2.10\ 750\ B+1.60\ 625\ C-0.080\ 000\ AB+0.122\ 50\ AC+2.005\ 00\ BC-11.891\ 25\ A^2-4.103\ 75\ B^2-3.411\ 25\ C^2, F=34.18, P<0.000\ 1. P<0.000\ 1$ 表明此模型差异极显著。根据表3、4 方程系数显著性检

表3 方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance

来源	平方和	df	均方	F	P
模型	2446.50	9	271.83	34.18	<0.000 1
残差	55.67	7	7.95		
不对称性	45.58	3	15.19	6.02	0.057 8
变异系数/%			3.70		
R^2			$R^2=0.977 8$		
校正 R^2			$R^2=0.949 1$		

验,其中A因素 $P<0.000 1$,表明填充剂的用量对桦树茸苦荞降糖片的累积溶出率影响极其显著。平方项 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均 <0.05 ,说明 A^2 、 B^2 、 C^2 对综合累计溶出率影响显著。由图5可知,在BC条件下,对累积溶出率的影响不大,但在AB和AC条件下,对累积溶出率的影响显著,均有最大值。据图6分析,拟合值符合正态分布;图7也符合无规律分布。

表4 方程系数显著性检验结果

Table 4 Results of significance test of equation coefficient

模型实验	系数估计	自由度	标准误差	95%CI LOW	95%CI High	P值
截距	85.45	1	1.26	82.47	88.43	
A	14.17	1	1	11.81	16.53	<0.000 1
B	-2.11	1	1	-4.47	0.25	0.072 4
C	1.61	1	1	-0.75	3.96	0.151 2
AB	-0.08	1	1.41	-3.41	3.25	0.956 3
AC	0.12	1	1.41	-3.21	3.46	0.933 2
BC	2	1	1.41	-1.33	5.34	0.198 0
A^2	-11.89	1	1.37	-15.14	-8.64	<0.000 1
B^2	-4.1	1	1.37	-7.35	-0.85	0.020 3
C^2	-3.41	1	1.37	-6.66	-0.16	0.042 1

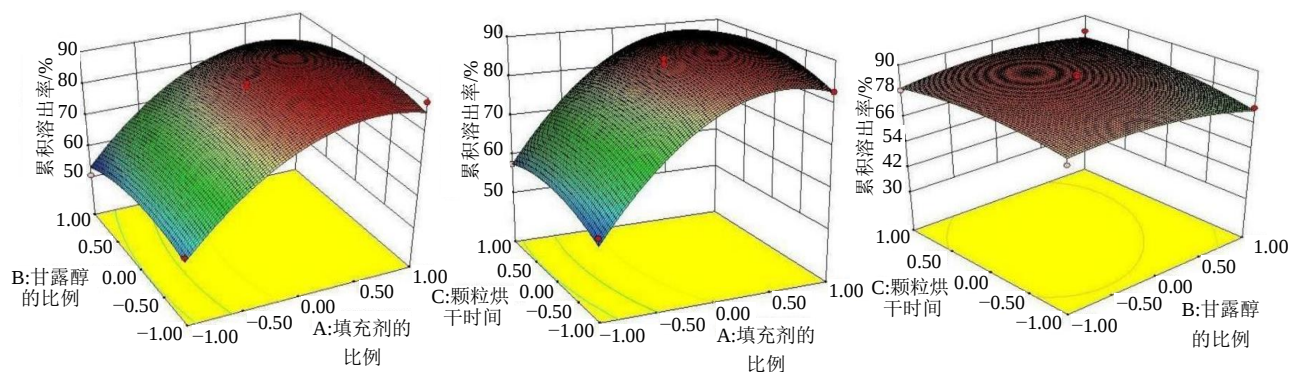


图5 响应面分析图

Fig. 5 Response surface analysis diagram

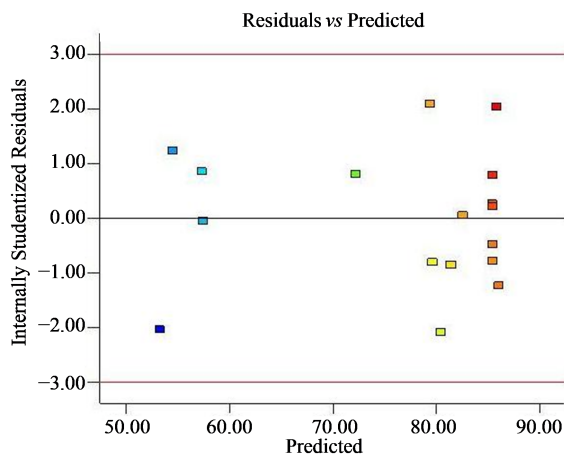


图6 残差的正态概率分布图

Fig. 6 Normal probability distribution map of residual

由方程计算最佳优化处方为填充剂比例为63%,黏合剂甘露醇比例为12%,湿颗粒烘干时间为22 min。所得片剂各项指标均符合《中国药典》规定,多糖含量为每片58.27 mg。

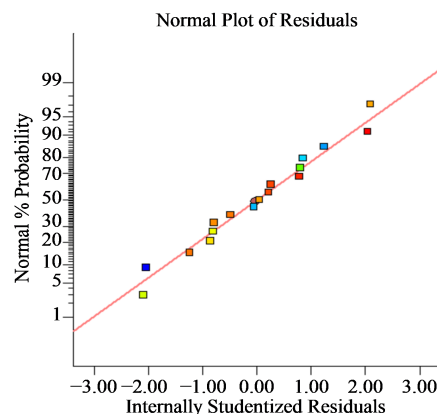


图7 残差值和预测值

Fig. 7 Residual value and predicted value

2.4 复方桦树茸降糖片对2型糖尿病小鼠的降血糖作用

2.4.1 2型糖尿病小鼠模型的建立 从70只健康ICR雄性小鼠中随机选取10只作为对照组,喂食普

通饲料,剩余小鼠喂食高脂饲料。3周后,除对照组外,其余小鼠禁食、自由饮水12 h后ip剂量为 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的链脲佐菌素(STZ),用pH 4.2~4.5的柠檬酸钠缓冲盐溶液溶解,造模1周后再次禁食12 h,尾静脉取血,用血糖仪进行3次平行测量。以空腹血糖 $>11.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 且有肥胖、多尿等症状的小鼠为2型糖尿病模型小鼠。

2.4.2 小鼠分组及给药方案 对造模成功的50只小鼠采用随机数字表法分为5组:模型组、二甲双胍($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,阳性药)组、桦树茸多糖组、苦荞多糖组、复方桦树茸降糖片组,每组10只。桦树茸多糖组、苦荞多糖组、复方桦树茸降糖片组给药剂量均为 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以多糖含量计,剂量通过预试验确

定),对照组和模型组给予等量生理盐水,每天ig给药1次,连续给药4周。

2.4.3 各组小鼠体质量变化比较 分别记录各组小鼠在造模前(适应性喂养1周后)、给药前(模型成功建立后)和给药1、2、3、4周的体质量。由表5可知,各组小鼠造模前体质量无显著差异。给药4周后,与对照组相比,模型组小鼠的体质量显著下降($P<0.01$);与模型组相比,各给药组小鼠体质量显著升高($P<0.05$),其中复方桦树茸降糖片组小鼠的体质量与桦树茸多糖组及苦荞多糖组相比,虽无显著性差异,但呈升高趋势。说明复方桦树茸降糖片可减轻糖尿病小鼠的消瘦症状,且效果略优于桦树茸多糖和苦荞多糖。

表5 各组小鼠体质量水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 5 Comparison of body weight of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	体质量/g					
		造模前	给药前	给药1周	给药2周	给药3周	给药4周
对照	—	25.0 $\pm$ 1.1	40.4 $\pm$ 3.4	41.8 $\pm$ 2.8	42.4 $\pm$ 3.5	43.4 $\pm$ 3.7	43.9 $\pm$ 4.0
模型	—	25.6 $\pm$ 1.3	41.8 $\pm$ 2.9	44.3 $\pm$ 3.1	39.1 $\pm$ 3.5	36.3 $\pm$ 3.9**	34.6 $\pm$ 4.1**
二甲双胍	5	25.4 $\pm$ 1.0	39.2 $\pm$ 2.0	40.7 $\pm$ 2.7	39.0 $\pm$ 3.5	38.8 $\pm$ 3.3	38.9 $\pm$ 3.3 [#]
桦树茸多糖	400	25.8 $\pm$ 1.2	41.7 $\pm$ 3.0	42.2 $\pm$ 2.1	41.5 $\pm$ 2.8	39.2 $\pm$ 2.2	38.2 $\pm$ 1.9 [#]
苦荞多糖	400	25.9 $\pm$ 1.2	42.1 $\pm$ 2.9	43.6 $\pm$ 2.9	41.1 $\pm$ 3.6	38.9 $\pm$ 2.8	38.1 $\pm$ 3.3 [#]
复方桦树茸降糖片	400	26.7 $\pm$ 1.5	41.5 $\pm$ 2.2	41.6 $\pm$ 4.4	40.0 $\pm$ 4.6	39.3 $\pm$ 3.1	38.7 $\pm$ 4.2 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

2.4.4 各组小鼠空腹血糖水平变化 分别在造模前、给药前和治疗1、2、3周后各组小鼠禁食12 h,尾静脉取血按试剂盒说明书测定各组小鼠空腹血糖。由表6可知,造模前各组小鼠的空腹血糖水平不具有显著差异性。给药前,与对照组相比,模型组小鼠的空腹血糖水平显著上升($P<0.01$),说明造模成功。给药3周后,模型组空腹血糖显著高于对照组($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的空腹血糖显著降低($P<0.01$);与桦树茸多糖组及苦荞多糖组比较,复方桦树茸降糖片组小鼠的空腹血糖显著降低($P<0.05$),说明复方桦树茸降糖片能有效降低糖尿病小鼠的血糖,且效果明显优于桦树茸多糖组及苦荞多糖组。

2.4.5 各组小鼠GSP水平比较 GSP与糖尿病并发症的发生直接相关,GSP在波长550 nm处有紫外吸收。根据此原理,给药结束后小鼠眼球取血,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离血清,按试剂盒说明书测定各组小鼠GSP水平。由表7可知,与对照组比较,模型组GSP

水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,各给药组动物GSP水平显著降低($P<0.05, 0.01$);与桦树茸多糖组及苦荞多糖组相比,复方桦树茸降糖片组小鼠血清中GSP水平显著降低($P<0.05$)。可见,复方桦树茸降糖片可降低GSP,且效果优于桦树茸多糖及苦荞多糖。

3 讨论

桦褐孔菌主要成分为多糖、三萜类,常用提取方法为水提法等^[10]。采用热水浸提法提取的多糖为粗多糖,其中含有大量的蛋白质和无机盐小分子等杂质,由于蛋白质对多糖的活性和结构有很大的干扰,采用Sevage法除去粗多糖中的蛋白质获得精多糖,进而提高多糖含量及纯度。但此方法除蛋白质的同时会引入新的杂质。为除去新引入的杂质,本研究使用大孔树脂进一步纯化。实验发现AB-8型大孔吸附树脂去除杂质效果优于其他类型树脂。可能是由于AB-8型大孔吸附树脂的成分二乙烯苯为环状类,对具有多环结构的多糖具有良好的吸附

表6 各组小鼠空腹血糖水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 6 Comparison of fasting blood glucose levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)				
		造模前	给药前	给药1周	给药2周	给药3周
对照	—	5.01±0.34	5.01±0.37	5.15±0.32	5.15±0.32	5.15±0.37
模型	—	5.26±0.75	11.50±4.04**	15.02±4.92**	19.07±5.80**	21.50±6.36**
二甲双胍	5	5.22±1.14	15.33±1.46 [#]	12.73±3.57	11.22±2.56 ^{##}	9.34±4.00 ^{##}
桦树茸多糖	400	5.10±0.65	13.79±2.37	13.65±3.91	13.74±4.64 ^{##}	13.63±3.54 ^{##}
苦荞多糖	400	5.04±0.95	13.88±1.67	14.55±5.02	15.17±5.71	14.75±4.75 ^{##}
复方桦树茸降糖片	400	5.00±0.87	13.00±3.29	11.55±5.03	11.17±5.06 ^{##}	9.79±4.94 ^{##} ▲△

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;与桦树茸多糖组比较:▲ $P<0.05$;与苦荞多糖组比较:△ $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs *Inonotus obliquus* polysaccharide group; △ $P<0.05$ vs *Tarary buckwheat* polysaccharide group表7 各组小鼠GSP水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 7 Comparison of GSP levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GSP/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	2.29±0.35
模型	—	2.97±0.38**
二甲双胍	5	2.05±0.25 ^{##}
桦树茸多糖	400	2.56±0.29 ^{##}
苦荞多糖	400	2.66±0.34 [#]
复方桦树茸降糖片	400	2.26±0.35 ^{##} ▲△

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;与桦树茸多糖组比较:▲ $P<0.05$;与苦荞多糖组比较:△ $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs *Inonotus obliquus* polysaccharide group; △ $P<0.05$ vs *Tarary buckwheat* polysaccharide group

效果。

成型性是中药片剂的重要考察指标,制备工艺及辅料的不同都会影响其成型性,进而影响中药片剂的质量。本研究在制备前期对多种辅料进行筛选。以乳糖为填充剂时,所得颗粒松散,成型性差,硬度低,出现大量松片、裂片的情况,将其与可溶性淀粉混合后情况改善不明显。选择少量甘露醇与乳糖配合使用时,所得片剂硬度、成型性均有所改善,但有明显的苦涩感。可溶性淀粉与主药的相容性较高,但所制片剂表面粗糙,存在掉粉的情况,而选择与甘露醇混合使用时可以得到有效改善,添加少量甘露醇不仅保留了桦树茸本身的清香,还可以适当增加甜度。因此本研究最终选择可溶性淀粉与少量甘露醇作为填充剂。

据报道桦树茸多糖和苦荞多糖均具有降糖作用,且不良反应小^[11-12]。查阅相关资料并未发现将两药联合使用治疗糖尿病的案例。片剂由于具备

携带方便、化学性质稳定、易于存储等优势在临床中被广泛应用。因此本课题将桦树茸与苦荞进行配伍,通过提取其多糖成分,制成片剂,期望更大程度地发挥降血糖功效。结果表明桦树茸多糖与苦荞多糖均具有降糖作用,且相比于单一多糖成分,配伍后混合多糖成分降糖效果更加显著。推断2种提取成分相互促进、共同发挥治疗糖尿病的作用。

本实验采用高糖高脂喂养联合注射STZ的方法制备2型糖尿病小鼠模型,成模率为85%,并对复方桦树茸降糖片降血糖作用进行初步研究,为该降糖片治疗2型糖尿病提供实验依据,但其降糖机制目前尚不清楚,需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 贺紫薇,刘旭,李东辉,等.桦褐孔菌研究进展[J].中医药信息,2020,37(2):119-123.
He Z W, Liu X, Li D H, et al. Research progress of *Inonotus obliquus* [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(2): 119-123.
- [2] 齐亨娟,周玉柏,曾毅.桦褐孔菌活性成分及药理作用的研究进展[J].智慧健康,2018,4(24):50-53.
Qi T J, Zhou Y B, Zeng Y. Research progress on active constituents and pharmacological action of *Betula brown-hole bacteria* [J]. Smart Healthc, 2018, 4(24): 50-53.
- [3] Eid J I, Al-Tuwaijri M M, Mohanty S, et al. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) polysaccharides exhibit genoprotective effects in UVB-exposed embryonic zebrafish (*Danio rerio*) through coordinated expression of DNA repair genes [J]. Heliyon, 2021, 7(2): e06003.
- [4] Jiang S P, Shi F L, Lin H, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharides induces apoptosis of lung cancer cells and alters energy metabolism via the LKB1/AMPK axis

- [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 1277-1286.
- [5] 陈晨, 李岩, 卓勤, 等. 桦褐孔菌诱导肺癌细胞周期阻滞和凋亡的研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(9): 79-82.
Chen C, Li Y, Zhuo Q, et al. Apoptosis and cycle arrest of lung cancer cells induced by *Inonotus obliquus* [J]. Food Nutr China, 2019, 25(9): 79-82.
- [6] 连晓芬, 谭晓霞, 林远, 等. 苦荞对2型糖尿病有效性和安全性的临床研究[J]. 中国实用医药, 2020, 15(35): 1-4.
Lian X F, Tan X X, Lin Y, et al. Clinical study on the efficacy and safety of *Tartarian buckwheat* on type 2 diabetes mellitus [J]. China Pract Med, 2020, 15(35): 1-4.
- [7] Choi J S, Ali M Y, Jung H A, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of alkaloids from *Rhizoma Coptidis* and their molecular docking studies [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 171: 28-36.
- [8] 邓蕾. 桦褐孔菌多糖缓释片的制备与质量研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2018.
Deng L. Study on preparation and quality of polysaccharide sustained-release tablets of *Inonotus obliquus* [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2018.
- [9] 马舒伟, 刘兴艳, 贾占东, 等. 不同提取方法对玄参多糖单糖组分和抗氧化活性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 220-224, 285.
- Ma S W, Liu X Y, Jia Z D, et al. Effect of different extraction methods on monosaccharide compositions and antioxidative activity of *Scrophularia ningpoensis* polysaccharide [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2020, 38(1): 220-224, 285.
- [10] 郑静茹, 曲中原, 陈大忠. 桦褐孔菌活性组分提取分析方法研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 382-389.
Zheng J R, Qu Z Y, Chen D Z. Research progress on extraction methods of *Inonotus obliquus* constituents [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(2): 382-389.
- [11] 赵佳茜, 朱长俊, 刘兰, 等. 桦褐孔菌多糖对小鼠的降血糖研究[J]. 生物化工, 2021, 7(4): 99-102.
Zhao J X, Zhu C J, Liu L, et al. Study on hypoglycemic effect of polysaccharides from *Inonotus obliquus* on mice [J]. Biol Chem Eng, 2021, 7(4): 99-102.
- [12] 何晓琴. 蒸汽爆破对苦荞麸皮膳食纤维理化特性及降血糖活性的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
He X Q. Effect of steam explosion on the physicochemical properties and hypoglycemic activity of Tartary buckwheat bran dietary fiber [D]. Chongqing: Southwest University, 2020.

[责任编辑 兰新新]