(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112791108 B
(45)授权公告日 2022.05.03

(21)申请号 202110176813.6
(22)申请日 2021.02.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112791108 A
(43)申请公布日 2021.05.14
(83)生物保藏信息
CGMCC NO.21068 2021.01.04
(73)专利权人 青岛农业大学
地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路700号
(72)发明人 田雪梅 张国利 李喆
(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所 37218
代理人 王翠翠
(51)Int.Cl.
A61K 36/07(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 3/06(2006.01)
A23L 33/10(2016.01)
审查员 霍春芳

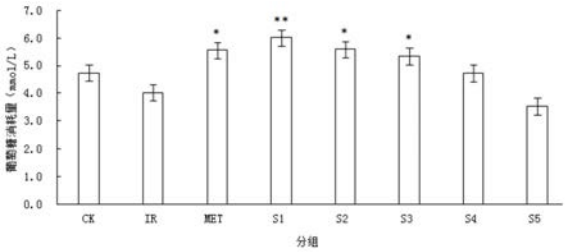
权利要求书2页 说明书15页
序列表1页 附图10页

(54)发明名称

一种桑黄活性成分的制备方法及其在辅助降血糖药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种桑黄活性成分的制备方法，包括以下步骤，取保藏编号为CGMCC NO.21068桑黄菌株(*Sanghuangporus sanghuang*)发酵液，将菌丝体过滤，分离得到桑黄发酵液，加热浓缩，加95%的乙醇浸泡处理，离心处理，收集上清液，用旋转蒸发仪进行乙醇回收，收集醇溶物，加水溶解后-20℃冷冻，真空冷冻干燥处理后粉碎既得桑黄发酵液醇溶样；桑黄发酵液醇溶样使用四种有机溶剂进行分级萃取，得到萃取物。本研究结果将为后续桑黄液体发酵活性物质的开发利用和降血糖等相关药品的研发提供一定的试验基础和理论依据，具有一定的理论意义和实际应用价值。



CN 112791108 B

1.一种具有降血糖的桑黄活性成分的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)取发酵10-12d的桑黄菌株发酵液,将菌丝体过滤,分离得到桑黄发酵液加热浓缩,加95 %的乙醇浸泡处理24 h,分层后,5000 rpm,5 min离心处理,收集上清液,用旋转蒸发仪进行乙醇回收,收集醇溶物,加水溶解后-20℃冷冻,真空冷冻干燥处理后粉碎既得桑黄发酵液醇溶样;

(2)桑黄发酵液醇溶样依次使用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇四种有机溶剂进行分级萃取,得到石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物;

其中所述桑黄菌株*Sanghuangporus sanghuang*保藏编号为CGMCC NO.21068。

2.一种具有降血糖的桑黄活性成分的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)取发酵10-12d的桑黄菌株发酵液,将菌丝体过滤,分离得到桑黄发酵液加热浓缩,加95 %的乙醇浸泡处理24 h,分层后,5000 rpm,5 min离心处理,收集上清液,用旋转蒸发仪进行乙醇回收,收集醇溶物,加水溶解后-20℃冷冻,真空冷冻干燥处理后粉碎既得桑黄发酵液醇溶样;

(2)桑黄发酵液醇溶样分别用石油醚和氯仿体积比 1:1 的混合溶剂,氯仿和乙酸乙酯体积比2:3的混合溶剂,石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇体积比2:2:3:3的混合溶剂萃取,依次获得1:1混和溶剂萃取物1,2:3混和溶剂萃取物2,2:2:3:3混和溶剂萃取物3;

其中所述桑黄菌株*Sanghuangporus sanghuang*保藏编号为CGMCC NO.21068。

3.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中桑黄发酵液醇溶样与石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的体积比为1:1-5。

4.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的萃取时间分别为2h。

5.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的萃取次数比2:2:6:8。

6.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述的桑黄菌株发酵液的发酵过程为:液体菌种接种量5-10%;培养的前2-3天,温度设定27-29℃,转速110r/min,避光振荡培养;培养的第3-8天,温度设定25-27℃,转速130-150r/min,避光振荡培养;培养的第8-12天,温度设定23-25℃,转速110-120r/min,避光振荡培养。

7.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述的液体菌种的制备方法为:

(1)无菌条件下将斜面菌种接种于固体培养基中,接种块面积为1 cm^2,接种完成后,27℃避光静置培养5-7 d;

(2)于500 mL三角瓶里装入250 mL体积的液体培养基,接种活化后的1 cm^2平板菌种块10块,26-28 ℃,150 rpm进行发酵活化培养7 d,获得初步发酵液体菌种;

(3)采用500 mL三角瓶装入250 mL体积的液体培养基,无菌操作接种,接种量10 mL,25-29 ℃,110-150 rpm恒温深层发酵培养10 d备用。

8.根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述的固体培养基制备:20 g麸皮、30 g玉米粉,全部放入蒸馏水中100 ℃25 min;400目纱布过滤一次后,向滤液中加入30 g葡萄糖、1 g KH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨,20 g琼脂,蒸馏水定容至1000 mL后进行直径9 cm平板分装;

液体培养基制备: 20 g麸皮、30 g玉米粉,全部放入蒸馏水中100 ℃25 min,400目纱

布过滤一次后，向滤液中加入30 g葡萄糖、1 gKH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨，蒸馏水定容至1000 mL后进行500 mL三角瓶分装。

9.一种权利要求1-8之一所述的制备方法制备的桑黄活性成分在制备降血糖药物中的应用。

10.一种权利要求1-8之一所述的制备方法制备的桑黄活性成分在制备降血脂药物中的应用。

一种桑黄活性成分的制备方法及其在辅助降血糖药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种桑黄活性成分的制备方法及其在辅助降血糖药物中的应用。

背景技术

[0002] 桑黄*Sanghuangporus sanghuang*是一种珍贵的多年生大型药用真菌，通常着生于桑属(*Morus L.*)植物上，又名桑耳、桑臣、桑黄菇，被誉为“森林黄金”，是一种名贵的中药材，在我国传统中医药中用于痢疾、盗汗、血崩、血淋、脐腹涩痛、脱肛泻血、带下、经闭等症治疗。

[0003] 随着国内外专家们对桑黄的抗癌机理及药用价值研究的越来越深入，桑黄已广泛被人们所认识，科学研究证明，桑黄多糖能提高人体免疫力，抑制肿瘤细胞的增殖，清除自由基，防止衰老，活化胰脏功能，降低血糖，有助于糖尿病患者康复，抗血栓，稳定血压等作用。桑黄多糖的提取是从桑黄子实体或者桑黄菌丝体通过醇沉提取，但是醇溶组分的研究较少，仅有CN111096983A专利中提到用火木层孔菌的菌丝体醇溶组分进行了降血糖活性研究，但火木层孔菌*Phellinus ignarius*与桑黄*S.sanghuang*分别为不同属的种类，没有可比性。关于将桑黄菌丝体过滤掉之后，用发酵液提取出的醇溶性活性成分的相关研究，尚未见报道。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题，本发明提供一种具有降血糖的桑黄活性成分的制备方法，将桑黄发酵液中的有效成分通过不同的萃取剂提取，得到有效降低血糖的桑黄活性成分。本文首次通过系统的溶剂法，获得桑黄发酵液不同溶剂萃取部位，通过细胞实验初步筛选出其降血糖活性部位，为进一步寻找桑黄降血糖作用的有效成分提供科学依据。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0006] 一种具有降血糖的桑黄活性成分的制备方法，包括以下步骤：

[0007] (1)取发酵10-12d的桑黄菌株发酵液，将菌丝体过滤，分离得到桑黄发酵液加热浓缩，加95 %的乙醇浸泡处理24 h，分层后，5000 rpm，5 min离心处理，收集上清液，用旋转蒸发仪进行乙醇回收，收集醇溶物，加水溶解后-20℃冷冻，真空冷冻干燥处理后粉碎既得桑黄发酵液醇溶样；

[0008] (2)桑黄发酵液醇溶样依次使用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇四种有机溶剂进行分级萃取，得到石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物。

[0009] 优选地，所述步骤(2)中的桑黄发酵液醇溶样分别用石油醚和氯仿体积比 1:1 的混合溶剂，氯仿和乙酸乙酯体积比2:3的混合溶剂，石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇体积比2:2:3:3的混合溶剂萃取。

[0010] 优选地，所述步骤(2)中桑黄发酵液醇溶样与石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的体

积比为1:1-5。

[0011] 优选地，所述步骤(2)中石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的萃取时间分别为2h。

[0012] 优选地，所述步骤(2)中石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇的萃取次数比2:2:6:8。

[0013] 优选地，所述的桑黄菌株发酵液的发酵过程为：液体菌种接种量5-10%；培养的前2-3天，温度设定27-29℃，转速110r/min，避光振荡培养；培养的第3-8天，温度设定25-27℃，转速130-150r/min，避光振荡培养；培养的第8-12天，温度设定23-25℃，转速110-120r/min，避光振荡培养。液体发酵的不同阶段，设定不同的温度和转速，以保证前期尽快定植，中期快速增长，后期减缓衰老且促进次生代谢产物的积累。

[0014] 优选地，所述的液体菌种的制备方法为：

[0015] (1)无菌条件下将斜面菌种接种于固体培养基中，接种块面积为1 cm^2，接种完成后，27℃避光静置培养5-7 d；

[0016] (2)于500 mL三角瓶里装入250 mL体积的液体培养基，接种活化后的1 cm^2平板菌种块10块，26-28 ℃，150 rpm进行发酵活化培养7 d，获得初步发酵液体菌种；

[0017] (3)采用500 mL三角瓶装入250 mL体积的液体培养基，无菌操作接种，接种量10 mL，25-29 ℃，110-150 rpm恒温深层发酵培养10 d备用。

[0018] 更优选地，所述的固体培养基制备：20 g麸皮、30 g玉米粉，全部放入蒸馏水中100℃25 min；400目纱布过滤一次后，向滤液中加入30 g葡萄糖、1 g KH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨，20 g琼脂，蒸馏水定容至1000 mL后进行直径9 cm平板分装；

[0019] 液体培养基制备：20 g麸皮、30 g玉米粉，全部放入蒸馏水中100 ℃25 min。400目纱布过滤一次后，向滤液中加入30 g葡萄糖、1 gKH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨，蒸馏水定容至1000 mL后进行500 mL三角瓶分装。

[0020] 上述所述的制备方法制备的桑黄活性成分在降血糖药物中的应用。同时也可以将其应用于降血脂药物。

[0021] 桑黄活性成分与医学上可接受载体制备成片剂、糖衣片剂、薄膜衣片剂、肠溶衣片剂、泡腾片剂、舌下片剂、胶囊剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、微囊剂、微球剂、微球剂、颗粒剂、丸剂、滴丸剂、散剂、膏剂、口服液、混悬剂、溶液剂、气雾剂、注射剂、注射乳剂、冻干粉针、缓释或控释制剂。

[0022] 有益效果

[0023] 本发明通过将桑黄发酵，提取发酵液中的石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物四组有效成分，具有明显的降低血糖的作用。

[0024] 桑黄发酵液活性物质醇沉样和醇溶样PartI和PartⅡ均具有一定体内促进葡萄糖消耗量，降低血糖的作用，并且具备一定潜在的降血脂功效。PartⅡ组分体内降血糖效果整体优于PartI组分，体内试验结果与体外试验结果基本一致。本研究结果将为后续桑黄液体发酵活性物质的开发和利用和降血糖、降血脂等药品的研发提供一定的试验基础和理论依据，具有一定的理论意义和实际应用价值。

[0025] 通过对桑黄发酵液4种萃取组分的初步GC-MS分析，推断4种萃取组分中含有部分具有抗菌、抗氧化、抗癌、降血糖等功效的活性成分。通过对桑黄醇溶样4种萃取组分的成分的比较分析，可更好的发现其潜在药理活性，为后续研究工作提供一定理论依据。为桑黄发

酵液醇溶组分的研究提供一定的理论依据。

[0026] 菌种保藏信息

[0027] 保藏时间:2021年1月4日;

[0028] 保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;

[0029] 保藏编号:CGMCC NO.21068 ;

[0030] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号 中国科学院微生物研究所;

[0031] 分类命名:*Sanghuangporus sanghuang*。

附图说明

[0032] 图1 PartⅠ对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0033] 图2 PartⅡ对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0034] 图3 EPS对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0035] 图4 EPS1对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响1;

[0036] 图5 EPS1对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响2;

[0037] 图6 PartI对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0038] 图7 PartI1对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0039] 图8 EPS对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0040] 图9 EPS1对胰岛素抵抗HepG2细胞活力的影响1;

[0041] 图10 EPS1对IR-HepG2细胞活力的影响2;

[0042] 图11建模后及给药4w后小鼠空腹血糖值比较;

[0043] 图12给药4w后小鼠空腹血糖降低率;

[0044] 图13给药4w后小鼠血液胰岛素水平;

[0045] 图14给药4w后小鼠血液总胆固醇水平;

[0046] 图15给药4w后小鼠血液甘油三酯水平;

[0047] 图16给药4w后小鼠血液低密度脂蛋白水平;

[0048] 图17给药4w后小鼠血液高密度脂蛋白水平;

[0049] 图18 石油醚萃取组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0050] 图19氯仿萃取组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0051] 图20乙酸乙酯萃取组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0052] 图21正丁醇萃取组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响;

[0053] 图22石油醚萃取组分对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0054] 图23氯仿萃取组分对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0055] 图24乙酸乙酯萃取组分对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0056] 图25正丁醇萃取组分对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0057] 图26混和溶剂萃取物1对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0058] 图27 混和溶剂萃取物2对IR-HepG2细胞活力的影响;

[0059] 图28 混和溶剂萃取物3对IR-HepG2细胞活力的影响。

具体实施方式

[0060] 下面对本发明的实施例作详细说明，本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0061] 实施例1

[0062] 1.材料与方法

[0063] 1.1材料

[0064] 1.1.1供试样品

[0065] 桑黄菌株，山东省应用真菌重点实验室保藏。

[0066] 本申请采用的菌种是从贵州省安顺市山区桑树活立木上采集新鲜子实体后通过组织分离和菌种纯化而得到，该菌株分类命名为桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)，已于2021年1月4日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC NO.21068。

[0067] 子实体形态特征：担子果多年生，无柄盖形，通常单生，新鲜时具酸味，木栓质，干后木质；菌盖马蹄形，向外伸出达5 cm，宽11 cm，基部厚6cm；菌盖表面黄褐色至灰褐色，被纤细的绒毛至光滑，具明显的环区和环沟；边缘钝，鲜黄色；孔口表面新鲜时黄色，干后褐色，略具折光反应；不育边缘明显，宽达3 mm；孔口多角形至圆形，每毫米6-7个；孔口边缘薄，全缘；菌肉黄色，比菌管颜色浅，硬木栓质，环区明显，具黑线，厚达5 cm；菌管褐色，木栓质，长达4 mm。

[0068] 显微结构特征：菌丝系统二体系；所有隔膜无锁状联合；菌丝组织在KOH中变黑。菌肉中生殖菌丝无色至淡黄色，薄壁至稍厚壁，多分枝，频繁分隔，直径2-3 μm；菌肉中骨架菌丝金黄色，厚壁，具宽或窄的内腔，不分枝，多分隔，近规则排列，直径3-4 μm。菌管中生殖菌丝无色至淡黄色，薄壁至稍厚壁，少分枝，多分隔，直径2-2.5 μm；菌管中骨架菌丝金黄色，厚壁，具宽或窄内腔，不分枝，不分隔，近规则排列，直径为2.5-3.7 μm；子实层刚毛常见，多为腹鼓状，暗褐色，厚壁，末端尖，大小为17-30 × 7-11 μm；子实层中无囊状体和拟囊状体；担子桶状，具4个小梗，基部具一简单分隔，大小为6-9 × 4-5 μm。担孢子广椭圆形，黄色，厚壁，平滑，IKI-，CB-，大小为(3.4-)3.6-4.6(-4.8) × (2.8-)3-3.5(-3.7) μm，平均长L = 4.03 μm，平均宽W = 3.18 μm，长宽比Q = 1.27 (n = 30/1)。

[0069] 菌种分子鉴定：子实体及菌丝体经试剂盒提取DNA，并以ITS5/ITS4引物扩增和测序，子实体和菌丝体共同的rDNA-ITS序列如下：

[0070] CGATGGGTACTGCGGAGGTCATTATCGAGTTTTGAAAGCGAGACCTGCTGCTGGTGCGAAATCGCGCATGTGCACGGTCTTCGCGCTCAAATCCAACTCAAACCCCTGTGCACCTTATATATCGCGAGTCGAAGTTAGTAGCCTGAGGTCTTGTAAGTAATTAGTAGAAGGGCGAAAGCGAGTCTTGCTCGTTAGGTAGCCTTTCGAAAATGAAAGCGAGTGCGTCGGGTGAAGACTTCGGCTTGTCGTTACAAAACACCTTATATTGTCTTTGTGAATGTAATGCTCCTTGTGGGCGAAAATAAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGTTTATCTCAAACCGCTCGTCTTTCTTAATTGAAGGGCTTGAGGTTTGGACTTGGAGGTTTACTGCTGGCGCCTTTCGAGGGGTCGGCTCCTCTTAAATACATTAGCTGGGCTTTGGCTCGCGTTTACGGTGTAATAGTTGATTCCATTCACCAACGAGCGCTTGCCTGACGAGCTTGCTTCTAGCCGTCCGCGTCGTCGGACAAGGAGTCACCTCCTTCT

TGACACCTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCCGACTTACTAATTAAAGGGGGGGGGGGGGGAAGAAATTGAA

[0071] 1.1.2供试细胞株

[0072] HepG2细胞。

[0073] 1.2方法

[0074] 1.2.1供试培养基的制备

[0075] 固体培养基制备:20 g麸皮、30 g玉米粉,全部放入蒸馏水中100 ℃约25 min。400目纱布过滤一次后,向滤液中加入30 g葡萄糖、1 g KH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨,20 g琼脂,蒸馏水定容至1000 mL后进行直径9 cm平板分装。

[0076] 液体培养基制备: 20 g麸皮、30 g玉米粉,全部放入蒸馏水中100 ℃约25 min。400目纱布过滤一次后,向滤液中加入30 g葡萄糖、1 gKH_2PO_4、0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,100 ℃加入4 g酵母抽提物、3 g蛋白胨,蒸馏水定容至1000 mL后进行500 mL三角瓶分装。

[0077] 1.2.2平板菌种活化培养

[0078] 无菌条件下将斜面菌种接种于固体培养基中,接种块面积约为1 cm^2,接种完成后,27 ℃避光静置培养5-7 d。

[0079] 1.2.3液体菌种活化发酵培养

[0080] 于500 mL三角瓶里装入250 mL体积的液体培养基,接种活化后的约1 cm^2平板菌种块10块,26-28 ℃,150 rpm进行发酵活化培养7 d,获得初步发酵液体菌种。

[0081] 采用500 mL三角瓶装入250 mL体积的液体培养基,无菌操作接种,接种量10 mL,25-29 ℃,110-150 rpm恒温深层发酵培养10 d备用。

[0082] 液体菌种接种量5-10%;培养的前2-3天,温度设定27-29℃,转速110r/min,避光振荡培养;培养的第3-8天,温度设定25-27℃,转速130-150r/min,避光振荡培养;培养的第8-12天,温度设定23-25℃,转速110-120r/min,避光振荡培养。

[0083] 1.2.4桑黄发酵液醇溶样以及发酵液醇沉样制备

[0084] 将桑黄菌株液体发酵培养至10 d的发酵液与菌丝体分离收集。采用200目纱网过滤。将分离得到的桑黄发酵液加热浓缩处理至2300 mL后,记录浓缩后体积,加以9200 mL体积的95 %的乙醇浸泡处理24 h。分层后,5000 rpm,5 min离心处理。收集沉淀,置于60 ℃烘箱中烘干处理,记为桑黄发酵液醇沉样,记为PartⅠ。

[0085] 收集上清液,用旋转蒸发仪进行乙醇回收,收集醇溶物,加水溶解后-20 ℃冷冻,真空冷冻干燥处理后粉碎既得桑黄发酵液醇溶样,标记为PartⅡ。

[0086] 1.2.5桑黄发酵液粗多糖EPS及EPS1组分的制备

[0087] 桑黄发酵液醇沉样PartⅠ 粉末2.5 g加250 mL蒸馏水溶解后,50 ℃超声波震荡溶解3 h后,磁力搅拌溶解30 min,5000 rpm离心10 min。滤渣继续用100 mL蒸馏水重复溶解两次并离心,合并3次离心上清液并浓缩,冷冻干燥后即得桑黄发酵液粗多糖(EPS)。

[0088] 取1.0g EPS样品,用10 mL蒸馏水溶解后,8000 rpm离心10 min除去不溶物,上清液通过葡聚糖凝胶Sephadex G-100进行分离纯化,收集其主峰,冷冻干燥后即得桑黄发酵液多糖(EPS1)。

[0089] 1.2.6试剂配制

[0090] 2 mg/mL盐酸二甲双胍溶液:盐酸二甲双胍0.01 g,5 mL完全培养基,可在37 ℃溶

解。过滤除菌，4 ℃保存，此为溶液A。用时可取200 μL溶液A，1800 μL溶剂调节浓度至200 μg/mL。

[0091] PartⅠ和PartⅡ以及EPS和EPS1溶液：精确取样品100 mg，溶于5 mL完全培养基中。37 ℃，100 W，40 min超声处理，5000 rpm，10 min离心后过滤除菌，得20000 μg/mL样品溶液，在加入细胞培养板孔中时，反应终浓度稀释至625 μg/mL，1250 μg/mL，2500 μg/mL，5000 μg/mL、10000 μg/mL，分别标记为S1-S5，4 ℃保存备用。

[0092] 1.2.7葡萄糖氧化酶法检测对葡萄糖消耗量的影响

[0093] 准备96孔细胞培养板，设置空白调零组(KB)、正常组(CK)、模型组(IR)、阳性对照组(MET)，桑黄发酵液醇沉样和醇溶样：PartⅠ(S1- S5)和PartⅡ(S1-S5)，桑黄发酵液醇沉样分离纯化所得EPS和EPS1组分，阳性对照组为100 μg/mL盐酸二甲双胍(MET)。

[0094] 1.2.8 MTT法检测对细胞活性的影响

[0095] 1.3不同组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响

[0096] 观察PartⅠ组分对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响结果，与IR相比(IR为模型组即胰岛素抵抗组，此时的细胞状态接近糖尿病状态细胞，葡萄糖消耗量异常偏低，若给药各浓度组对葡萄糖消耗量比模型组葡萄糖消耗量高，则说明具有促进葡萄糖消耗的作用，具有潜在的降血糖功效)，PartⅠ组分S1-S5各浓度组均具有一定的促进IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的作用，但效果不显著。

[0097] 与IR相比，PartⅡ在S1浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有极显著的促进作用，葡萄糖消耗量提高了49.4 %，在S2和S3两个浓度组均对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有显著的促进作用，葡萄糖消耗量分别提高了39.0 %和32.9 %，S4组也具有一定的促进葡萄糖消耗量的作用，但效果不显著。综合PartⅠ组分的试验结果分析可以发现，PartⅡ组分促进IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的作用优于PartⅠ组分，在S1-S3浓度范围内，具有良好的的降血糖功效。

[0098] EPS样品在S2浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有极显著促进的作用，葡萄糖消耗量提高了25.0 %，在S5浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有显著的促进作用，葡萄糖消耗量提高了6 %，其余浓度组效果不显著。

[0099] 与IR组相比，EPS1样品在S1-S4浓度范围内均对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有极显著的促进作用，葡萄糖消耗量分别提高了60.0 %、57.6 %、100.1 %和57.8 %，在S5浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量也有显著的促进作用，葡萄糖消耗量提高了39.3 %。因此继续设计更低的浓度梯度C1-C4进行试验，以评估其在低浓度时对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响。

[0100] EPS1样品C1-C4浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响如图5所示，在C3和C4浓度组均具有显著促进IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的作用 ，葡萄糖消耗量分别提高了12.8 %和17.2 %，效果与MET组相当。C1和C2两个最低浓度组虽然也有一定作用但效果不显著。

[0101] 从图6可以看出，与CK组相比(需要保证采用的各给药组度组对细胞活性不产生显著的抑制作用)，OD值代表细胞活性，OD值越高代表细胞活性越高，OD值越低代表活性越低。PartⅠ组分各组对细胞活性影响不显著，对胰岛素抵抗组细胞活性没有明显的抑制效果。

[0102] 从图7可以看出，与CK组相比，PartⅡ组分在低浓度S1-S3组没有对细胞活性产生

抑制效果,中高浓度 S4-S5组表现出显著的抑制细胞活性的效果。

[0103] 从图8可以看出,与CK组相比,EPS组分在S1-S5均没有显著抑制细胞活性的效果。

[0104] 从图9可以看出,与CK组相比,EPS1组分在S1-S5浓度组对细胞活力均无显著抑制作用。

[0105] 与CK组相比,EPS1组分C3-C4浓度组对细胞活力有一定抑制作用,其余浓度组对细胞活力均无显著的抑制作用。

[0106] 2.体内Ⅱ型糖尿病动物模型的建立

[0107] 胰岛素分泌过多导致的机体对胰岛素促进葡萄糖消耗量能力及降低血糖的效用下降所产生的胰岛素抵抗是Ⅱ型糖尿病主要发病原因。综合前人相关研究实践,本研究最终选用的模式动物为昆明小鼠。

[0108] 通过高糖高脂饲料联合链脲佐菌素注射诱导建立体内Ⅱ型糖尿病小鼠模型。试验可为后续体内Ⅱ型糖尿病动物模型水平对桑黄发酵液提取样品体内降血糖功效的评价提供试验和理论基础。

[0109] 3.桑黄发酵液活性成分体内降血糖功能评价

[0110] 利用高糖高脂饲料联合STZ腹腔注射诱导建立的Ⅱ型糖尿病小鼠模型,口服灌胃桑黄发酵液PartⅠ和PartⅡ两部分样品,通过检测空腹血糖下降情况以及血液中胰岛素、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白等指标综合评价供试样品的降血糖功效。

[0111] 3.1材料

[0112] 3.1.1供试样品

[0113] 桑黄发酵液醇沉PartⅠ样品,桑黄发酵液醇提PartⅡ样品,山东省应用真菌重点实验室提供。

[0114] 3.1.2供试动物

[0115] KM小鼠,雄性,5-6周龄,购买自山东省青岛市大任富城有限公司。

[0116] 3.2方法

[0117] 3.2.1供试试剂的配制

[0118] 供试样品的配制:PartⅠ、PartⅡ各设置100 mg/kg,200 mg/kg,400 mg/kg共3个剂量组,分别标记为PartⅠ-1、PartⅠ-2、PartⅠ-3和PartⅡ-1、PartⅡ-2、PartⅡ-3.按照小鼠体重,称取质量,溶解于0.9 %的氯化钠溶液中,过滤除菌。4 ℃保存,待用。

[0119] 盐酸二甲双胍的配制:盐酸二甲双胍采用的剂量为200 mg/kg,按照小鼠体重称取一定量的药品,溶解于相应体积的0.9 %的生理盐水溶液中,0.22 μm口径的滤膜进行细菌去除。4 ℃处理,待用。

[0120] EPS1(二次试验)溶液:准确称取样品40 mg,溶于4 mL完全培养基中,37 ℃,100 W,40 min超声处理,5000 rpm,10 min离心后过滤除菌,得5000 μg/mL 样品溶液。在加入细胞培养板孔中时,反应终浓度稀释至4 μg/mL,20 μg/mL,100 μg/mL,500 μg/mL分别标记为C1-C4,4 ℃保存备用。

[0121] 3.2.2Ⅱ型糖尿病模型小鼠灌胃喂养

[0122] 前期体外降血糖试验的结果表明桑黄发酵液PartⅠ和PartⅡ组分具有一定的促进葡萄糖消耗量的作用,后面通过体内Ⅱ型糖尿病小鼠模型试验进一步验证PartⅠ和PartⅡ组分的降血糖功效。将前期建模组—DM1分为8组,分别为模型组—DM、阳性药物组—MET,样

品组—Part-1、PartI-2、PartI-3、PartⅡ-1、PartⅡ-2、PartⅡ-3。每组小鼠分别在背部用不同颜色记号笔做好标记，并且每隔1d重新标记，添加鼠粮和水，清理鼠笼中的排泄物，保持小鼠生长环境的卫生干净。按照小鼠体重分别对应不同的灌胃剂量进行各组小鼠生理盐水、盐酸二甲双胍、PartI和PartⅡ不同剂量组的灌胃喂养。每d上午8点灌胃。每天灌胃1次，灌胃体积不超过0.8 mL。

[0123] 3.2.3小鼠空腹血糖降幅的检测

[0124] 每周固定1d晚上8点开始禁食不禁水，使小鼠空腹12 h后，次日早8点开始给小鼠尾静脉取血，使用血糖仪和试纸进行小鼠空腹血糖的检测，并做好记录。期间注意观察小鼠状态。

[0125] 3.2.4灌胃4w后小鼠取血及及检测内容

[0126] 灌胃4w后，检测小鼠的空腹血糖值。空腹血糖值低于11 mmol/L时，表明具有良好的降血糖效果。

[0127] 小鼠眼眶静脉丛取血检测胰岛素，总胆固醇，甘油三酯，高密度脂蛋白，低密度脂蛋白含量变化。

[0128] 小鼠小鼠眼眶静脉丛取血时，先用将透明盒子倒置，置入浸入乙醚的吸水布，后将小鼠放入倒扣的透明盒子中此操作均在搪瓷盘中进行。过15 s左右，取出已经昏迷的小鼠。毛细管蘸取适量的肝钠素，甩干后。进行小鼠眼眶静脉丛取血操作，可取0.4 mL-0.5 mL的血量。取出来的血液放置在冰盒上，做好标记，转移至4 ℃，1000 rpm，离心10 min。后，取上清转移至1.5 mL离心管中，1.5 mL离心管做好相对应的标记。在-20 ℃条件下可保存1个月。

[0129] 3.2.5 小鼠血液胰岛素值的检测

[0130] 表1标准品的稀释

[0131]

浓度（mIU/L）	标准品标号	稀释过程
8mIU/L	标准品A	体积对半稀释，使终浓度减半
4mIU/L	标准品B	体积对半稀释，使终浓度减半
2mIU/L	标准品C	体积对半稀释，使终浓度减半
1mIU/L	标准品D	体积对半稀释，使终浓度减半
0.5mIU/L	标准品E	体积对半稀释，使终浓度减半

[0132] 表2胰岛素测定方案

[0133]

	KB	BZ	CK	DM	MET	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3
加样μL	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
样品稀释液μL	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
温育	置37℃温度环境下，等待30分钟										
配液	1mL浓缩洗涤液,加入29mL蒸馏水进行下一步的试验										
洗涤	甩干孔中的液体，加洗涤液洗涤，30s后倒掉，进行3次该操作，倒扣于滤纸上控干										
加酶μL	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
温育	置37℃温度环境下，等待30分钟										
洗涤	甩干，孔中的液体，加洗涤液洗涤，30s后倒掉，进行3次该操作，倒扣于滤纸上控干										
显色CμL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
显色DμL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
反应	37℃避光,等待10分钟										
终止	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
测定	以空白孔调零，450nm波长依序测量各空的吸光度（OD值），测定应在加终止液后15分钟以内进行										
计算	用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程，将样品的OD值代入方程式，计算出样品的实际浓度										

[0134] 3.3结果与分析

[0135] 3.3.1小鼠空腹血糖值的检测

[0136] 由图11的试验结果可以看出:给药4w后,与建模后相比,供试各组空腹血糖值均出现不同程度的下降。其中,模型组(DM组)空腹血糖由17.4 mmol/L下降为11.1 mmol/L,虽有一定程度下降,但仍高于11.0 mmol/L的标准。推测DM组血糖下降的原因,可能是建模成功后停止高糖高脂饲料喂养,替换为普通鼠粮喂养所致。阳性对照组(MET组)和全部6个药物组的空腹血糖下降幅度均高于DM组,由15-20 mmol/L下降至7.0-8.0 mmol/L左右,达到正常水平,降血糖效果良好。

[0137] 根据建模后和给药4w后小鼠空腹血糖的下降情况,统计各供试小鼠空腹血糖降低率的结果见图12。其中,DM组血糖降低率最低为36.2 %,MET组血糖降低率为59.3 %,PartI-3和PartⅡ-3组血糖降低率分别达59.5 %和62.5 %,促进血糖下降的效果与MET组相当,表现出良好的体内降血糖效果。

[0138] 相同剂量的两个样品组比较,PartⅡ各组血糖降低率均略高于PartI的各个组。供试PartI和 PartⅡ两个样品的各剂量组血糖降低率均呈现一定程度的剂量依赖性。综合分析试验结果可发现,桑黄发酵液PartI和PartⅡ两个样品均具有良好的促进体内血糖降低的作用,其中,PartⅡ整体优于PartI。

[0139] 3.3.2小鼠血液胰岛素值的检测

[0140] 给药4w后小鼠血液胰岛素水平的变化见图13,与DM组相比,各给药组的小鼠血液胰岛素水平均有所上升, MET组差异极显著,供试 2个样品各浓度组均具有一定的促进胰岛素上升的作用,且表现出较明显的随浓度增加增幅变大的趋势,具有一定的剂量依赖性,但整体效果不显著。

[0141] 3.3.3小鼠血液总胆固醇的检测

[0142] 由图14中试验结果可以看出:给药4w后小鼠血液总胆固醇水平的变化。与DM组相比较,各给药组的小鼠血液总胆固醇水平均有所下降,而MET组和PartI-3以及PartⅡ3个浓度组的总胆固醇下降较显著,其余各给药组也具有一定的促进总胆固醇下降的作用但效果不显著。两个供试样品均表现出随浓度增大血液中总胆固醇水平下降幅度增大的趋势,具

有剂量依赖性。

[0143] 3.3.4小鼠血液甘油三酯的检测

[0144] 根据图15可以看出:与DM组相比较,各给药组的小鼠血液甘油三酯水平均有所下降,降幅偏小。其中PartⅡ-3浓度组的甘油三酯下降较显著,其余各样品浓度给药组也具有一定的促进甘油三酯下降的作用但不显著。参试2个样品均呈现随浓度升高血液中甘油三酯水平降幅增大的剂量依赖性特点。

[0145] 3.3.5小鼠血液低密度脂蛋白的检测

[0146] 图16中可以看出:给药4w后小鼠血液低密度脂蛋白水平的变化。与DM组相比较,各给药组的小鼠血液低密度脂蛋白水平均表现出了极显著的下降,且表现出随浓度增大降幅变大的剂量依赖性特点。

[0147] 3.3.6小鼠血液高密度脂蛋白的检测

[0148] 由图17可以看出:给药4w后小鼠血液高密度脂蛋白水平的变化。与DM组相比较,各给药组的小鼠血液高密度脂蛋白水平均有一定程度的上升,PartI-3组和PartⅡ-3组的高密度脂蛋白上升显著,PartI的全部浓度组和PartⅡ-3组促进小鼠血液高密度脂蛋白水平升高的效果优于MET组。

[0149] Ⅱ型糖尿病是由于胰岛素分泌不足或者胰岛素敏感性下降的机体代谢综合紊乱症。胰岛素分泌下降会导致血糖的代谢减少,体内血糖水平上升。Ⅱ型糖尿病的病发常伴随着高血压和高血脂等系列症状。甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白与高血压和高血脂的形成有密切的联系。甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白的上升会导致机体内脂质的含量升高,高密度脂蛋白的下降也会导致脂质含量升高,长此以往会使机体内的脂质含量异常增高,导致高血压和高血脂疾病的形成,对心脑血管疾病也有一定的诱发作用。

[0150] Ⅱ型糖尿病机体胰岛素含量较低,对血糖的消耗作用较低,在2个供试样品的作用下,胰岛素含量上升会导致对血糖的消耗加强,可降低机体内血糖含量。甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白含量升高以及高密度脂蛋白含量的下降会导致机体内脂质含量的异常升高,在2个供试样品的作用下,使Ⅱ型糖尿病机内异常升高和降低的指标有一定的下降和上升,通过降低脂质含量降低高血压和高血脂病发程度,进而对Ⅱ型糖尿病有一定的辅助治疗作用。

[0151] 通过检测桑黄发酵液活性物质对体内Ⅱ型糖尿病小鼠血液各项生理指标的影响发现:在糖尿病模型小鼠口服灌胃4w后,血糖明显下降,与降血糖活性相关的胰岛素、甘油三酯,总胆固醇,低密度脂蛋白等指标也均有所下降,高密度脂蛋白有所上升,且表现出明显的剂量依赖性特点。给药后胰岛素含量虽有一定的上升,但差异不明显,可能血糖降低是通过其他途径进行的,例如通过提高α-糖苷酶的活性加速血糖的分解或者通过促进肝糖原的合成等,关于降血糖的机理本试验尚未涉及,可在以后的试验中进行深入研究。

[0152] 试验结果表明:桑黄发酵液活性物质PartI和PartⅡ均具有一定体内促进葡萄糖消耗量,降低血糖的作用,并且具备一定潜在的降血脂功效。PartⅡ组分体内降血糖效果整体优于PartI组分,体内试验结果与体外试验结果基本一致。本研究结果将为后续桑黄液体发酵活性物质的开发和利用和降血糖、降血脂等相关药品的研发提供一定的试验基础和理论依据,具有一定的理论意义和实际应用价值。

[0153] 4.对粗提物利用不同溶剂进行萃取纯化并利用细胞试验进行活性追踪

[0154] 4.1桑黄发酵液醇溶石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取组分的制备

[0155] 桑黄发酵液醇溶样按照极性由小到大依次使用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇四种有机溶剂进行分级萃取。按照萃取体积比，V(桑黄发酵液醇溶):V(石油醚):V(氯仿):V(乙酸乙酯):V(正丁醇)=1:2:2:3:3，萃取次数比，V(石油醚):V(氯仿):V(乙酸乙酯):V(正丁醇)=2:2:6:8;每次萃取时间，各自2 h进行萃取。准备50 mL或者100 mL的旋蒸瓶，瓶口用皮筋绑上保鲜膜，在瓶身做好标记，于电子天平上称量原始瓶重，做好标记。依次萃取，合并收集每一级萃取相的几次萃取液，利用旋转蒸发仪依次按顺序在40 ℃回收石油醚、在55 ℃回收氯仿、在70 ℃回收乙酸乙酯以及在80℃回收正丁醇，收集萃取物，加水，-20 ℃保存，于真空冷冻干燥机冻干，记录总重量，最终萃取物净重为各记录总重量减去原始瓶重。用各萃取物净重比各被萃取液体体积即为各萃取物萃取率。最终，依次得到各萃取组分的萃取率为0.2 %，0.54 %，4.12 %，5.18 %。

[0156] 4.2葡萄糖氧化酶法检测对葡萄糖消耗量的影响

[0157] 准备96孔细胞培养板，设置空白调零组(KB)、正常组(CK)、模型组(IR)、阳性对照组(MET)，桑黄发酵液醇溶样4种萃取组分的不同剂量组C1-C5，阳性对照组为100 μg/mL盐酸二甲双胍(MET)。

[0158] 石油醚萃取物、氯仿萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物溶液：准确称取样品40 mg，溶于4 mL完全培养基中，37 ℃，100 W，40 min超声处理，5000 rpm，10 min离心后过滤除菌，得5000 μg/mL 样品溶液。在加入细胞培养板孔中时，反应终浓度稀释至4 μg/mL，20 μg/mL，100 μg/mL，500 μg/mL分别标记为C1-C4，4 ℃保存备用。

[0159] 如图18所示，与IR相比，石油醚萃取组分在C2-C4浓度范围内表现出极显著的促进葡萄糖消耗量的作用，葡萄糖消耗量分别提高了30.2 %、33.5 %、42.9 %。且与MET组相比，促进葡萄糖消耗量的作用相对优于MET组，具有良好的降血糖功效。

[0160] 从图19看出，与IR相比，氯仿萃取组分在C1-C3浓度范围内均对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有极显著的促进作用，葡萄糖消耗量分别提高了61.0 %、63.1 %、46.0 %，其中，较低浓度组C1-C2促进葡萄糖消耗量的作用与MET组相当，具有良好的降血糖功效，开发利用潜力大。

[0161] 从图20看出，与IR相比，乙酸乙酯萃取组分在C3浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有极显著的促进作用，葡萄糖消耗量提高了37.4 %，在C1和C2浓度组对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量有显著的促进作用，葡萄糖消耗量分别提高了18.7 %和19.9 % 。C4浓度组虽也表现出一定的促进葡萄糖消耗量的作用，但不显著。

[0162] 从图21看出，与IR组相比，正丁醇萃取组分在C1-C4浓度范围内表现出极显著的促进葡萄糖消耗量的影响，葡萄糖消耗量分别提高了19.2 %、26.2 %、26.4 %和34.3 %。但与MET组相比，促进葡萄糖消耗量的作用效果均低于MET组。

[0163] 2.2不同组分对IR-HepG2细胞活力的影响

[0164] 从图22可以看出，与CK组相比，石油醚萃取组分各浓度组均对细胞活性无显著抑制作用。

[0165] 从图23可以看出，与CK组相比，氯仿萃取组分在C1-C4没有抑制细胞活性的效果。

[0166] 从图24可以看出，与CK组相比，乙酸乙酯萃取组分在各浓度组对细胞活力均没有显著的抑制作用。

[0167] 从图25可以看出，与CK组相比，石油醚萃取组分在C1-C4浓度组均没有抑制细胞活性的效果。

[0168] 5成分鉴定

[0169] 5.1材料

[0170] 5.1.1供试样品

[0171] 桑黄发酵液醇提液石油醚萃取组分、氯仿萃取组分、乙酸乙酯萃取组分、正丁醇萃取组分。

[0172] 5.2方法

[0173] 5.2.1上样检测样品的处理

[0174] 5.2.2分析条件

[0175] 5.3结果与分析

[0176] 5.3.1石油醚萃取组分成分检测

[0177] 表3石油醚萃取组分化学成分检测结果

[0178]

序号	化合物名称	分子式	相似度	质量分数%
1	1-苯基 1-戊酮	$C_{11}H_{14}O$	91.7	0.4
2	酞酸二丁酯（气相液体固定液）	$C_{16}H_{22}O_4$	91.0	30.2
3	二十七烷	$C_{27}H_{56}$	88.8	5.4
4	十六酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	88.2	1.4
5	十六酸乙酯	$C_{18}H_{36}O_2$	87.6	2.4
6	油酸酰胺	$C_{18}H_{35}NO$	86.9	1.7
7	9,12-十八碳二烯酸 (Z,Z)-	$C_{18}H_{32}O_2$	85.2	1.4
8	10-十八烯酸,1-甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	84.3	1.4
9	棕榈酸异丙酯	$C_{19}H_{38}O_2$	84.0	1.9
10	邻苯二甲酸二正辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	83.8	1.1
11	1-甲酯，16-甲基十八酸	$C_{19}H_{38}O_2$	82.9	1.6
12	1,1- 二甲基 2,4- 二苯酚	$C_{14}H_{22}O$	82.8	0.1
13	8-丙氧基烷	$C_{18}H_{32}O$	81.2	0.2
14	4，6-二叔丁基间甲酚	$C_{15}H_{24}O$	80.7	0.2
15	对羟基苯丙酸,3,5-bis(1,1-二甲基乙醚)-4-羟基-，甲酯	$C_{18}H_{28}O_3$	80.4	1.2
16	三十七醇	$C_{37}H_{76}O$	79.3	0.8
17	雌二醇-1,3,5(10)-三亚乙基四胺-17β-醇	$C_{18}H_{24}O$	78.6	1.3
18	亚油酸乙酯	$C_{20}H_{36}O_2$	78.4	0.7
19	异胆酸乙酯	$C_{26}H_{44}O_5$	77.2	3.4

[0179]

20	叔十六硫醇	$C_{16}H_{34}S$	77.0	0.9
21	2,4,7,14-四甲基-4-乙烯基-三环[5.4.3.0(1,8)]十四酸-6-醇	$C_{20}H_{34}O$	76.8	1.3
22	9-十六碳烯酸	$C_{16}H_{30}O_2$	76.3	0.3
	四氢化-2,2,6-三甲基-6-(4-甲基-3-环己烯-1-丁基)-,			
23	[3S-[3α,6α(R*)]]-2H-吡喃-3-醇	$C_{15}H_{26}O_2$	75.5	3.3
24	7-甲基-Z-十四烯-1-醇乙酸酯	$C_{17}H_{32}O_2$	73.8	13.4
25	[3,4]苯[1,2-e]茂并芳庚-5,7b,9,9a-呋喃, 1a,1b,4,4a,5,7a,8,9-八氢-3-(羟甲基)-1,1,6,8-四甲基-, 5,9,9a-三醋酯纤维, [1aR-(1aα,1bβ,4aβ,5β,7aα,7bα,8α,9β,9aα)]-1H-环丙烷	$C_{26}H_{36}O_8$	72.2	0.6
26	(22R)- 6α,11β,21-三羟基-16α,17α-丙基亚甲氧基-1,4-二烯-3,20-二酮	$C_{25}H_{34}O_7$	71.8	0.6
27	3-苯氧基苯酚	$C_{12}H_{10}O_2$	70.7	1.5
28	1,3-二烯丙基三甲基硅醚	$C_{38}H_{76}O_5Si$	70.7	0.8
29	2-(3-乙酸基-4,4,14-三甲基雄甾-8-烯-17-基)-丙酸	$C_{27}H_{42}O_4$	70.3	1.0
30	[反]茂并芳庚-3,8-二酮, 5-[(乙酸)甲]-3a,4,6a,7,9,10,10a,10b-八氢-3a,10a-二羟-2,10-二甲基-, (3aα,6aα,10β,10aβ,10bβ)-(+)-苯	$C_{19}H_{24}O_6$	69.8	0.8
31	4,4-二甲基-3-[2-(1-羟基-1-甲基乙基)-3-甲基-3-亚丁烯基)-2,7-辛二酮	$C_{18}H_{30}O_3$	68.6	0.7
32	[3,4]苯[1,4-e]偶氮-5-酮,3,9,9a-三(乙酰氧基)-3 - [(乙酰氧基)甲基]-2-氯-1,1a,1b,2,3,4a,4a,7a,7b,8-,9-,9-十二烷-4a,7-二羟基-1,1,6-,8-四甲基(5H)环丙烷	$C_{28}H_{37}ClO_{11}$	68.1	0.6
33	1,2-苯二羧酸, 双(2-二甲苯基) 酯	$C_{16}H_{22}O_4$	39.7	10.2

[0180] 由表3的检测结果可以看出:桑黄发酵液醇溶样石油醚萃取组分中共检测出33种成分,相似度达到85 %以上的有7种,33种成分中多为脂质类脂性物质。其中,7-甲基-Z-十四烯-1-醇乙酸酯、异胆酸乙酯、1,2-苯二羧酸, 双(2-二甲苯基) 酯等文献报道具有抗菌活性,异胆酸乙酯具有抗氧化的活性。

[0181] 5.3.1氯仿萃取组分成分检测

[0182] 表4氯仿萃取组分化学成分检测结果

[0183]

序号	化合物名称	分子式	相似度	质量分数/%
1	2，3-二氢-3，5-二羟基-6-甲基 4H-吡喃-4-酮	$C_6H_8O_4$	93.5	1.1
2	二十七烷	$C_{27}H_{56}$	92.0	25.6
3	5-羟甲基糠醛	$C_6H_6O_3$	91.1	17.7
4	2,5-二甲酰基呋喃	$C_6H_4O_3$	90.8	7.1
5	[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,六氢-3-(2-甲基丙基)-吡咯	$C_{11}H_{18}N_2O$	90.2	39.0
6	麦芽酚	$C_6H_6O_3$	90.0	0.8
7	17-戊五烯	$C_{35}H_{70}$	79.0	0.3
8	[4.4.0]双环-5-烯-2-酮 1,5-二氮杂二环	$C_8H_{12}N_2O$	78.7	1.5
9	2,4-二甲基苯酚	$C_8H_{10}O_3$	73.7	0.3
10	阿斯利多	$C_{10}H_{16}O_3$	73.5	0.6
11	二甲醚橄榄醇	$C_{13}H_{20}O_2$	70.2	1.0
12	亚砷酸-三甲基硅基乙酯	$C_{18}H_{45}AsO_3Si_3$	73.3	0.2

[0184] 表4的结果显示:桑黄发酵液醇溶样PartⅡ氯仿萃取组分中共检测出12种成分,其中,相似度达到85 %以上的有6种,检测出的成分中含有苯酚类物质、脂肪类物质、生物碱类等活性物质。

[0185] 其中,二十七烷等具有抗菌活性,5-羟甲基糠醛、[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮,六氢-3-(2-甲基丙基)-吡咯等具有抗氧化活性和抗癌活性，5-羟甲基糠醛具有降血糖活性。

[0186] 5.3.3乙酸乙酯萃取组分成分检测

[0187] 表5乙酸乙酯萃取组分化学成分检测结果

[0188]

序号	化合物名称	分子式	相似度	质量分数/%
1	邻苯二甲酸二异辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	94.4	23.7
2	2，2'-亚甲基双[6 -（1,1-二甲基乙基）-4-甲基苯酚	$C_{23}H_{32}O_2$	83.5	23.0
3	4 甲基-·邻乙酰基-2-，3，6-三-O-乙基-α-D-半乳糖苷	$C_{15}H_{28}O_7$	73.0	18.2

[0189] 桑黄发酵液醇溶样乙酸乙酯萃取组分中共检测出3种成分,相似度85 %以上的仅1种。其中的2,2'-亚甲基双[6 -(1,1-二甲基乙基)-4-甲基苯酚和邻苯二甲酸二异辛酯文献报道具有抗氧化活性。

[0190] 5.3.4正丁醇萃取组分成分检测

[0191] 表6正丁醇萃取成分化学成分检测结果

[0192]

序号	化合物名称	分子式	相似度	质量分数/%
1	2-羟基丁酸丙酸酯	$C_7H_{14}O_3$	93.7	35.7
2	2-乙基 -1-己醇	$C_8H_{18}O$	91.2	8.9
3	2-甲基，（S）-1-丁醇	$C_5H_{12}O$	87.8	6.1
4	2-甲基丁酸丙酯	$C_8H_{16}O_2$	83.5	9.9
5	丁氧基羟基乙酸丁酯	$C_{10}H_{20}O_4$	78.7	3.9
6	2，2'-亚甲基双[6 -（1,1-二甲基乙基）-4-甲基苯酚	$C_{23}H_{32}O_2$	72.2	1.3

[0193] 表6试验结果显示:桑黄发酵液醇溶样正丁醇萃取组分中共分检测出6种成分,其中,相似度达到85 %的有3种。其中,2-甲基,(S)- 1-丁醇、2-羟基丁酸丙酸酯、2-乙基 -1-己醇等文献报道有抗菌活性,2-甲基丁酸丙酯具有抗氧化活性。

[0194] 6 结论与讨论

[0195] 对相关成分结构及功能的研究成果结合本研究所得GC-MS分析结果,推断4种萃取组分中含有部分具有抗菌、抗氧化、抗癌、降血糖等功效的活性成分。通过对桑黄醇溶样4种萃取组分的成分的比较分析,可更好的发现其潜在药理活性,为后续研究工作提供一定理论依据。

[0196] 实施例2

[0197] 本实施例中桑黄发酵液醇溶样与实施例1中的制备方法均相同,萃取剂不同:桑黄发酵液醇溶样分别用石油醚和氯仿体积比 1:1 的混合溶剂,氯仿和乙酸乙酯体积比2:3的混合溶剂,石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇体积比2:2:3:3的混合溶剂萃取,依次获得1:1混和溶剂萃取物1,2:3混和溶剂萃取物2,2:2:3:3混和溶剂萃取物3。

[0198] 上述萃取物分别按照实施例1中的方法进行试验,结果如图26-28:这三种混合溶剂萃取物对胰岛素抵抗HepG2细胞的活性均无显著影响。

[0199] 在实施例 1 研究基础上,已经优选出提取桑黄发酵液活性成分的萃取剂,为了进一步提高提取效率,进行了本实施例的试验。在试验时,选择了多种溶剂及混合溶剂的多种配比,为了节约说明书的篇幅,在此,只是列举了效果较好的混合溶剂及配比。通过本试验,发现,桑黄发酵液醇溶样分别用石油醚和氯仿体积比 1:1 的混合溶剂,氯仿和乙酸乙酯体积比2:3的混合溶剂,石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇体积比2:2:3:3的混合溶剂萃取,相比较于单独的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取剂,萃取效率更高,得到的活性成分效果更好。单独使用乙酸乙酯萃取,得到的成分效果不佳,但将其与石油醚、氯仿和正丁醇采用特定的配比复合使用时,却能提高萃取效率,得到效果更好的活性成分。

[0200] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 青岛农业大学

[0003] <120> 一种桑黄活性成分的制备方法及其在辅助降血糖药物或食品中的应用

[0004] <160> 1

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 764

[0008] <212> DNA

[0009] <213> 桑黄(Sanghuangporus sanghuang)

[0010] <400> 1

[0011] cgatgggtac tgcggaggtc attatcgagt tttgaaagcg agacctgctg ctggtgcgaa 60

[0012] atcgcgcatg tgcacggtct tcgcgctcaa atccaactca aacccctgtg caccttatat 120

[0013] atcgcgagtc gaagttagta gcctgaggtc ttgtaagtaa ttagtagaag ggcgaaagcg 180

[0014] agtcttgctc gttaggtagc ctttcgaaaa tgaaagcgag tgcgtcgggt gaagacttcg 240

[0015] gcttgtcgtt acaaaacacc ttatattgtc tttgtgaatg taatgctcct tgtgggcgaa 300

[0016] aataaataca actttcaaca acggatctct tggctctcgc atcgatgaag aacgcagcga 360

[0017] aatgcgataa gtaatgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca tcgaatcttt gaacgcacct 420

[0018] tgcgcccctt ggtattccga ggggcatgcc tgtttgagtg tcatgtttat ctcaaaccgc 480

[0019] tcgtctttct taattgaagg gcttgaggtt tggacttgga ggtttactgc tggcgccttt 540

[0020] cgaggggtcg gctcctctta aatacattag ctgggctttg gctcgcgttt acggtgtaat 600

[0021] agttgattcc attcaccaac gagcgcttgc ctgacgagct tgcttctagc cgtccgcgtc 660

[0022] gtcggacaag gagtcacctc cttcttgaca cctttgacct caaatcaggt aggattaccc 720

[0023] gccgacttac taattaaagg ggggggggggg gggaagaaat tgaa 764

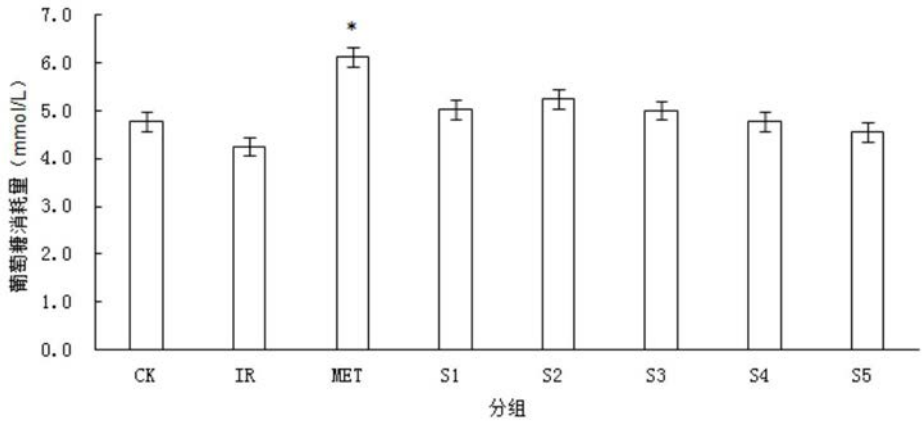

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图1

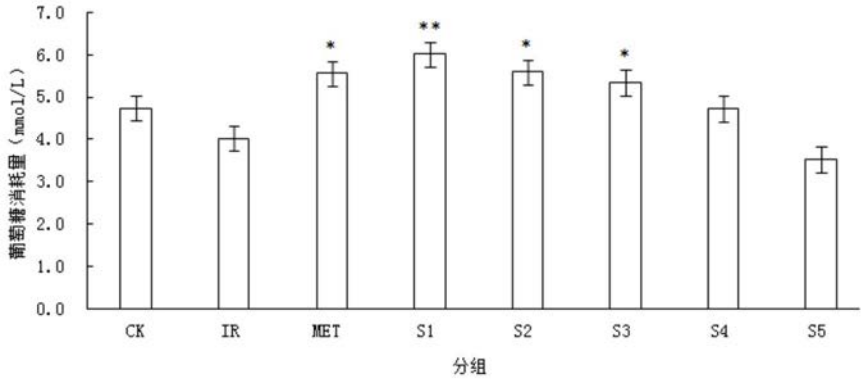

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
*
**
*
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图2

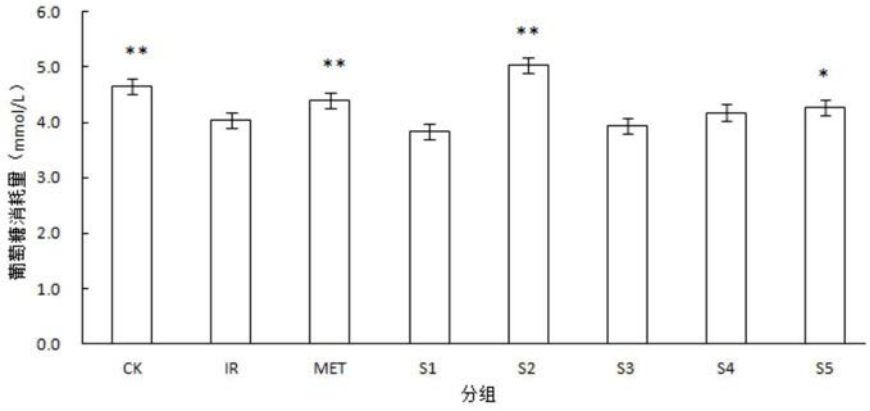

6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
**
**
**
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图3

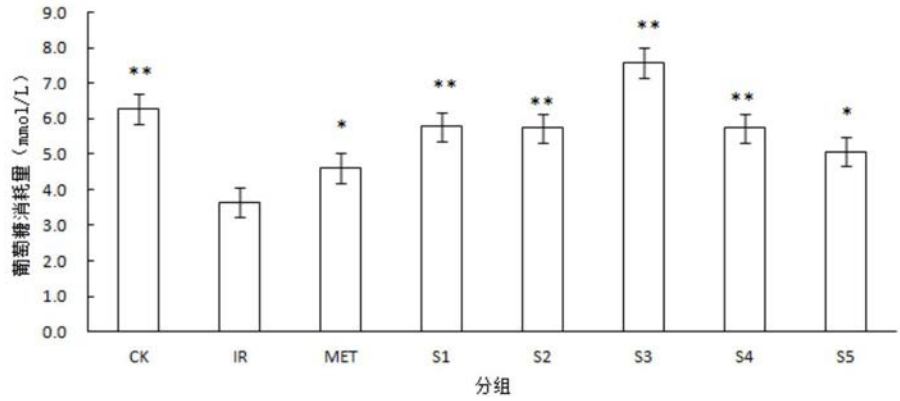

葡萄糖消耗量（mmol/L）
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
*
**
**
**
**
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图4

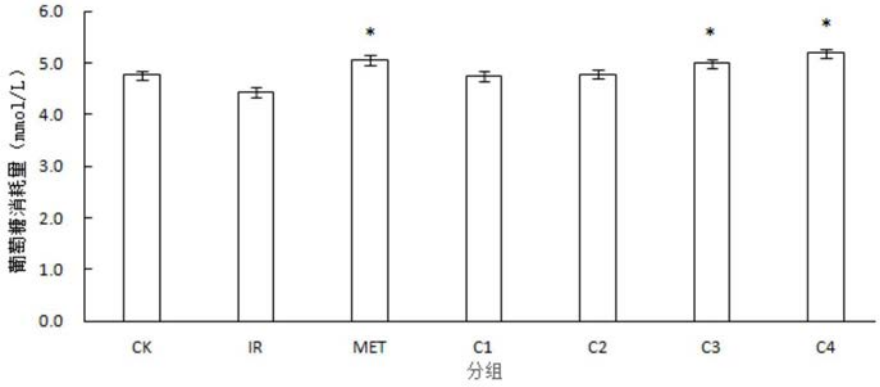

葡萄糖消耗量（mmol/L）
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
*
*
*
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图5

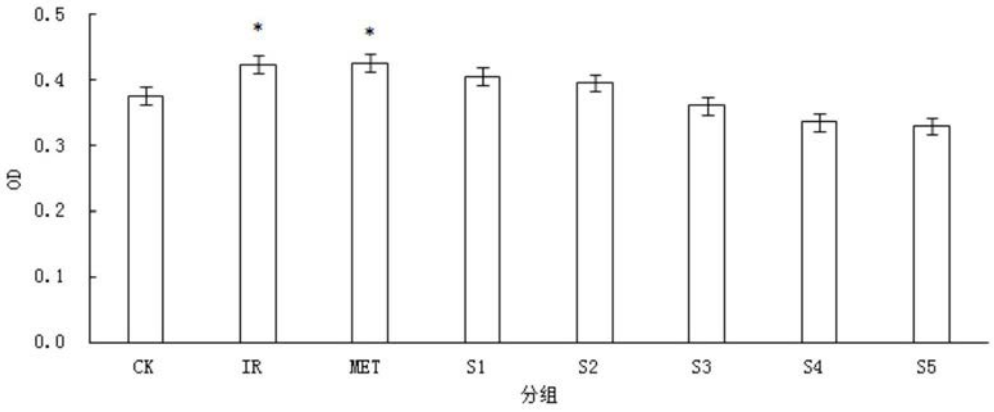

OD
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图6

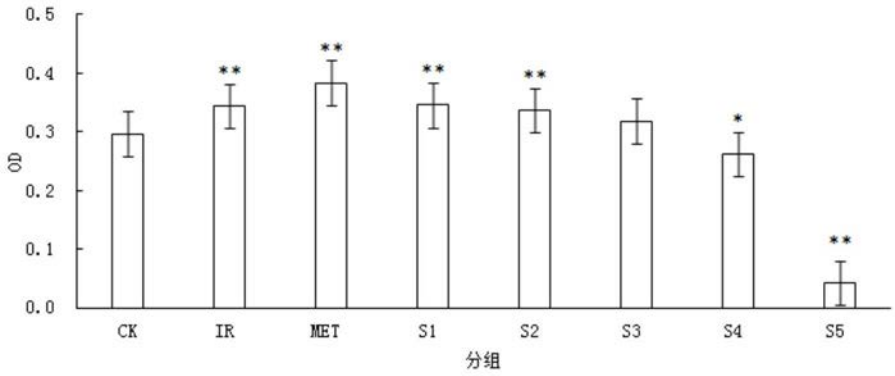

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD
**
**
**
**
*
**
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图7

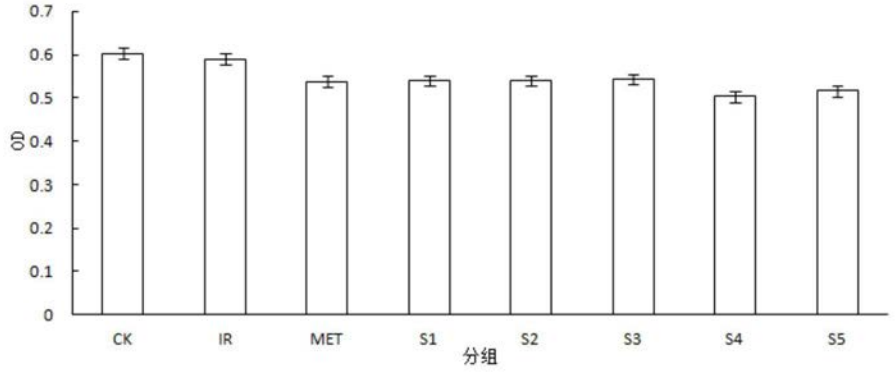

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图8

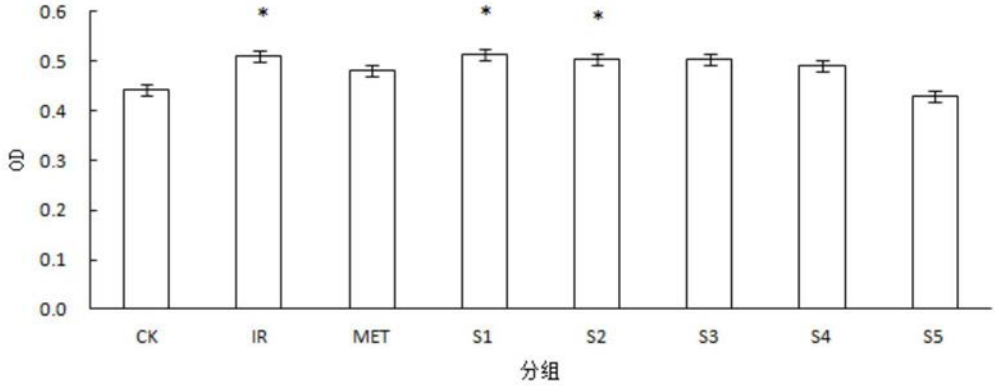

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD
*
*
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图9

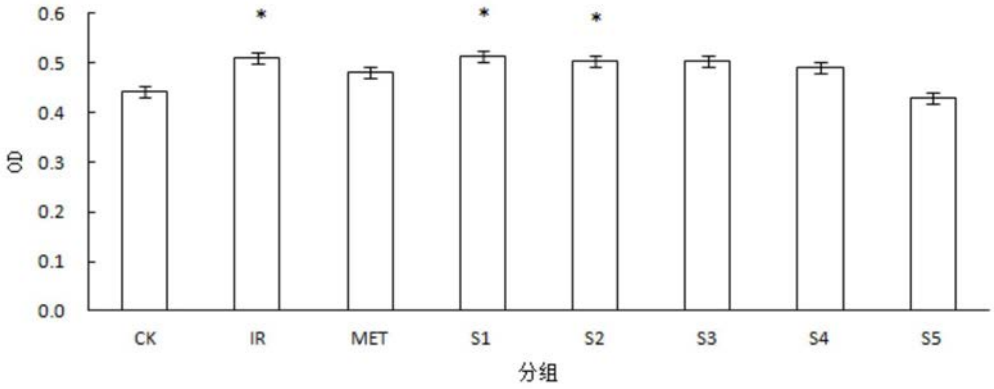

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD
*
*
*
CK
IR
MET
S1
S2
S3
S4
S5
分组

图10

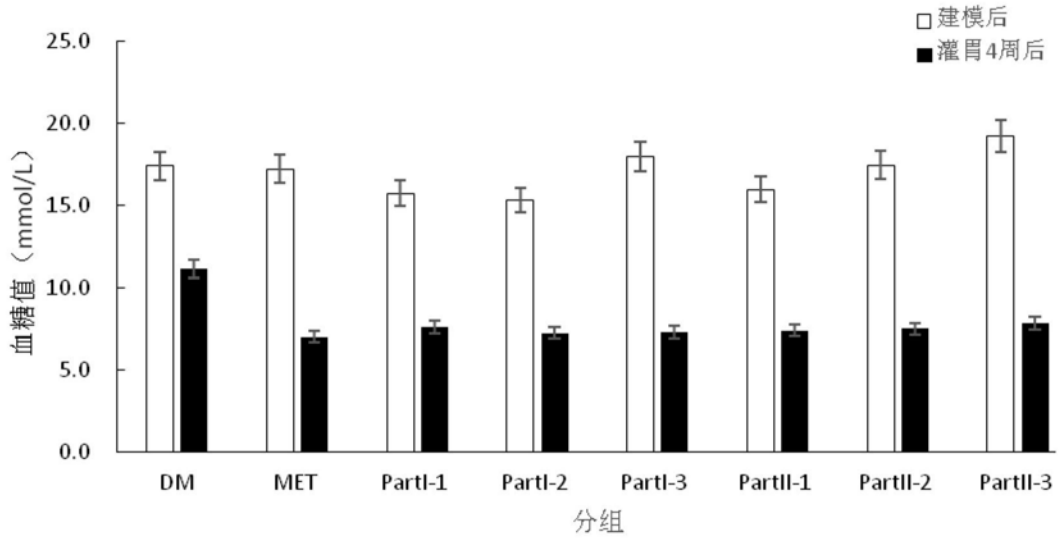

□建模后
■灌胃4周后
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
血糖值（mmol/L）
DM
MET
PartI-1
PartI-2
PartI-3
PartII-1
PartII-2
PartII-3
分组

图11

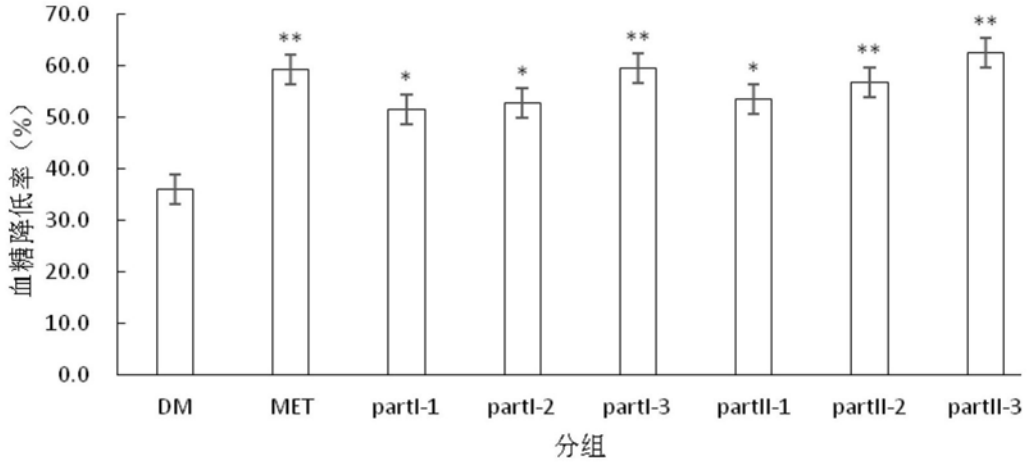

70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
血糖降低率（%）
**
*
*
**
*
**
**
DM
MET
partI-1
partI-2
partI-3
partII-1
partII-2
partII-3
分组

图12

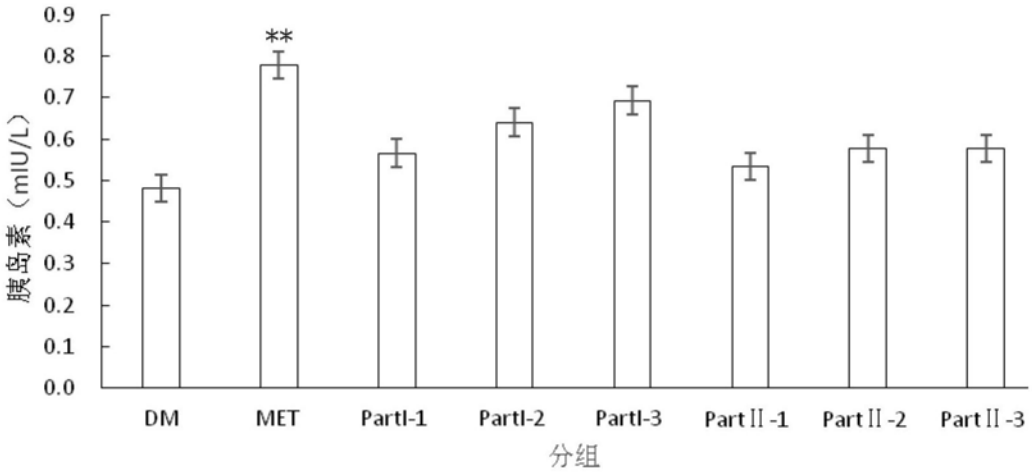

0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
胰岛素（mIU/L）
**
DM
MET
PartⅠ-1
PartⅠ-2
PartⅠ-3
PartⅡ-1
PartⅡ-2
PartⅡ-3
分组

图13

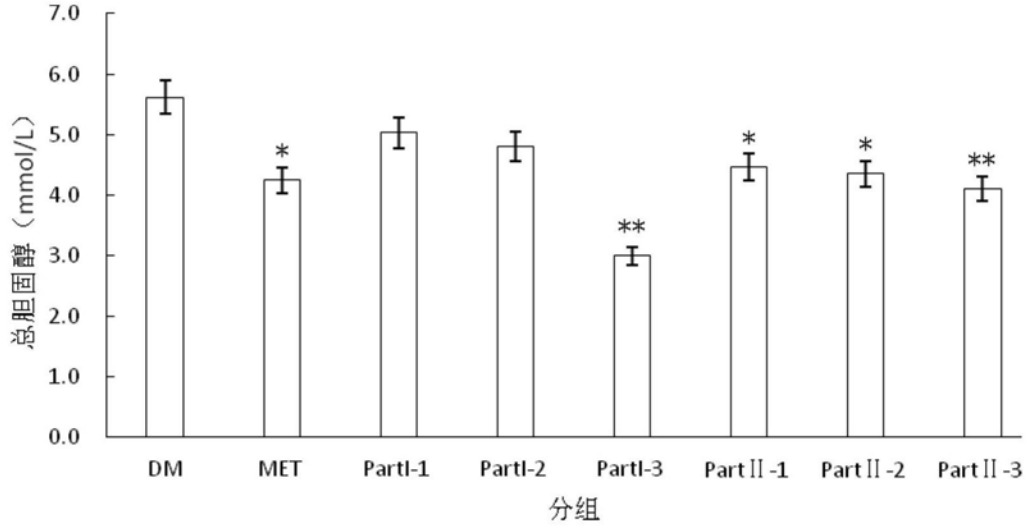

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
总胆固醇（mmol/L）
*
**
*
*
**
DM
MET
PartⅠ-1
PartⅠ-2
PartⅠ-3
PartⅡ-1
PartⅡ-2
PartⅡ-3
分组

图14

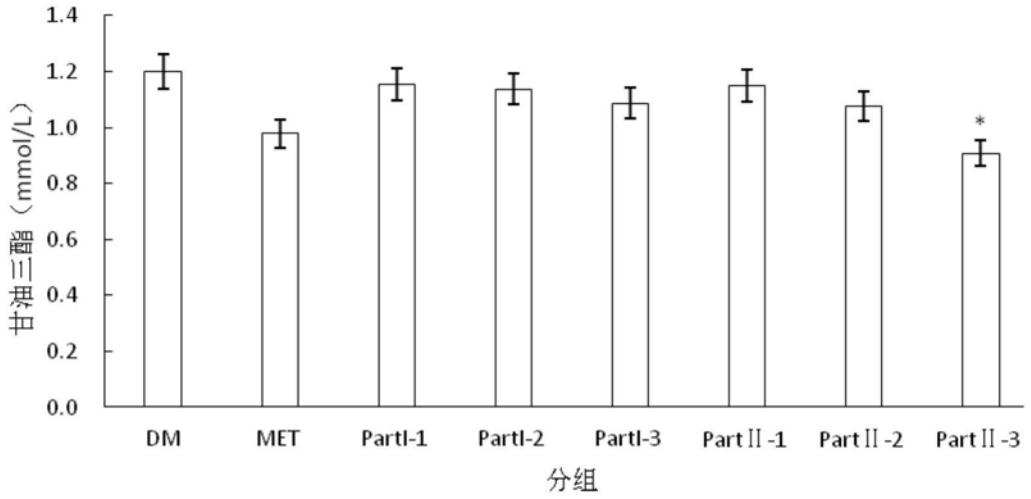

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
甘油三酯（mmol/L）
*
DM
MET
PartⅠ-1
PartⅠ-2
PartⅠ-3
PartⅡ-1
PartⅡ-2
PartⅡ-3
分组

图15

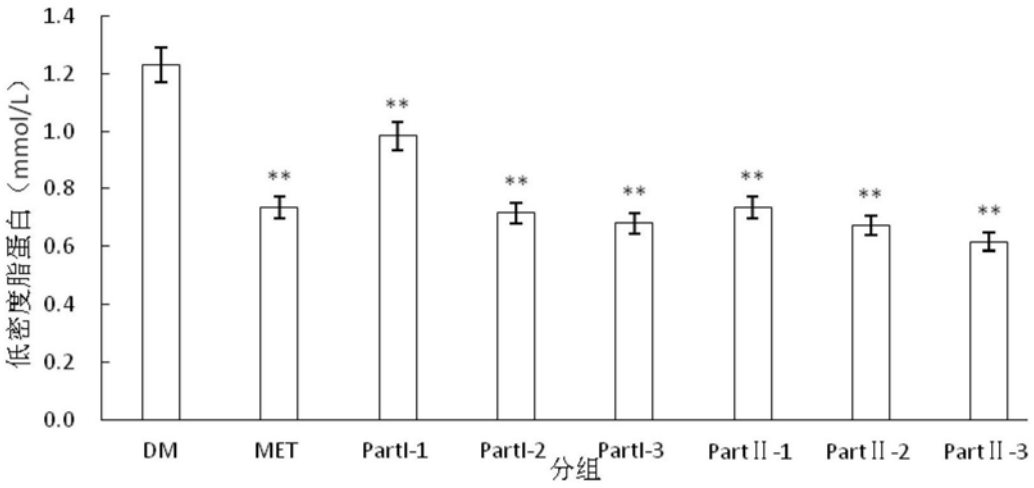

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
低密度脂蛋白（mmol/L）
**
DM
MET
PartⅠ-1
PartⅠ-2
PartⅠ-3
PartⅡ-1
PartⅡ-2
PartⅡ-3
分组

图16

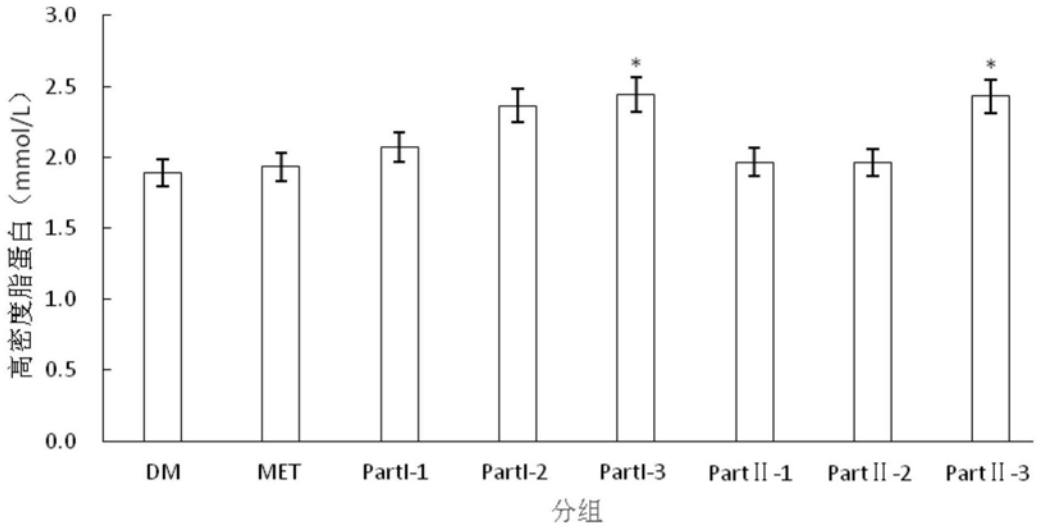

3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
高密度脂蛋白（mmol/L）
*
*
DM
MET
PartⅠ-1
PartⅠ-2
PartⅠ-3
PartⅡ-1
PartⅡ-2
PartⅡ-3
分组

图17

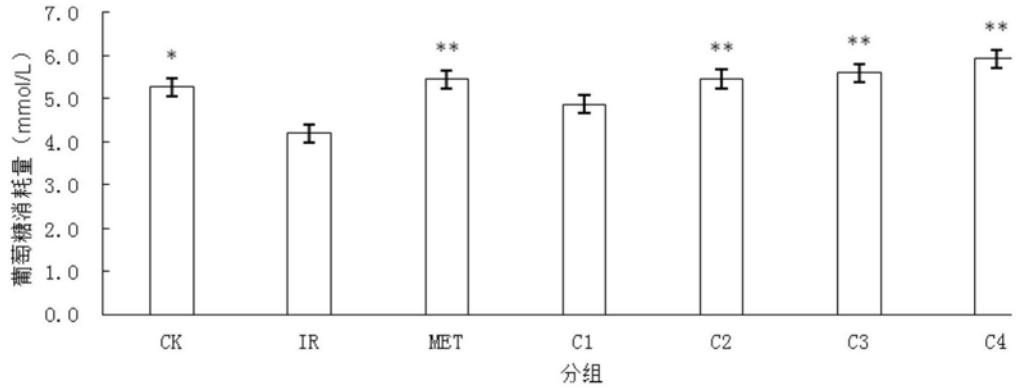

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
*
**
**
**
**
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图18

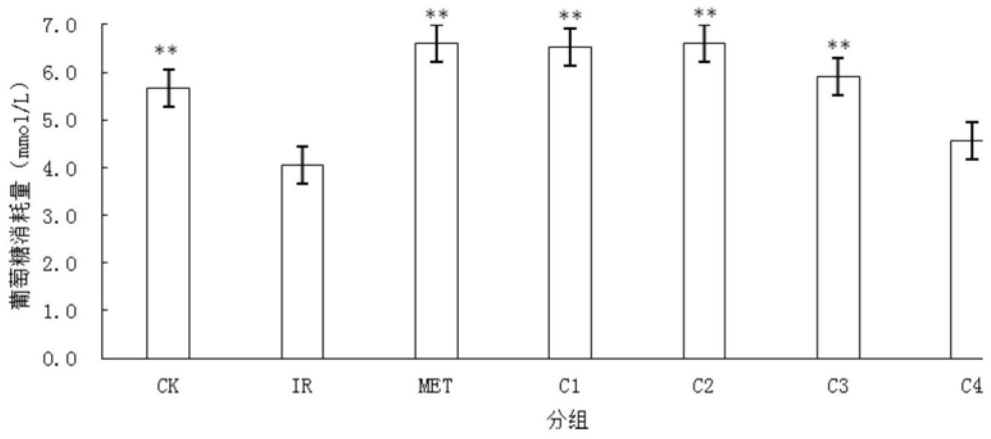

7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
**
**
**
**
**
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图19

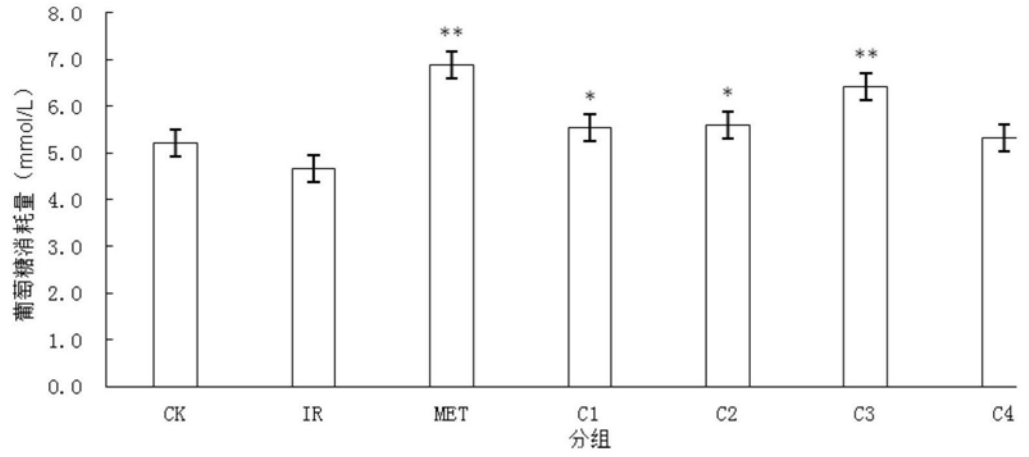

8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
**
*
*
**
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图20

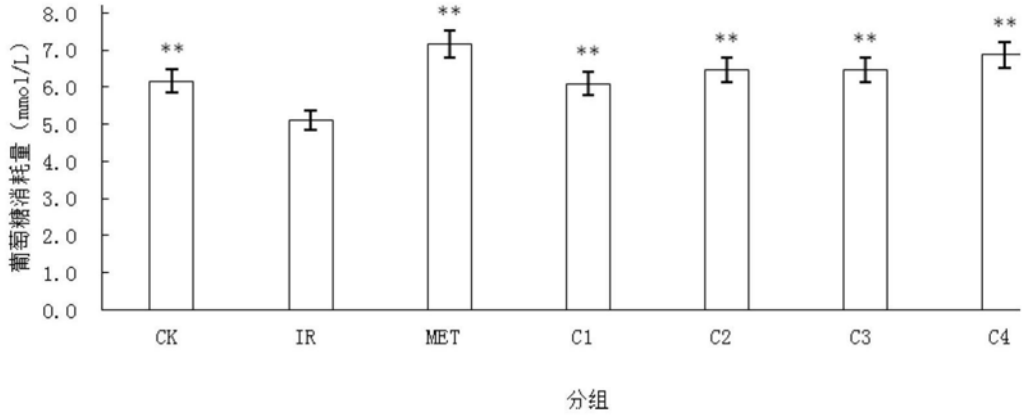

8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
葡萄糖消耗量（mmol/L）
**
**
**
**
**
**
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图21

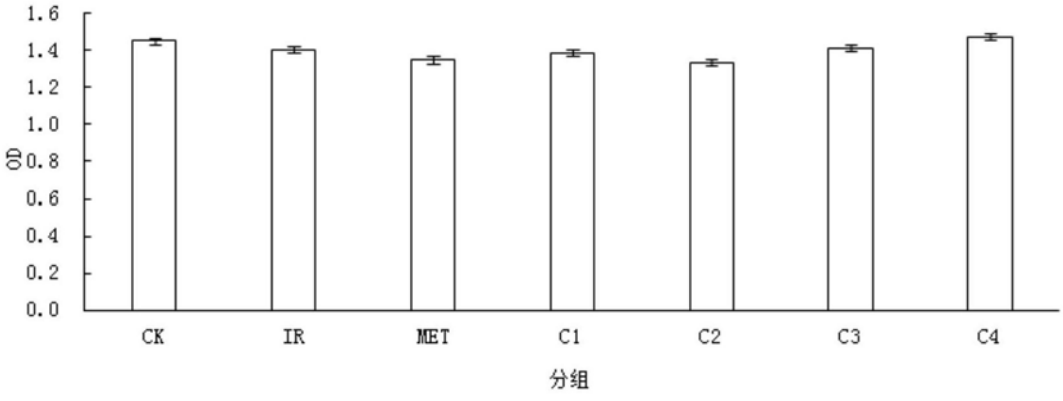

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图22

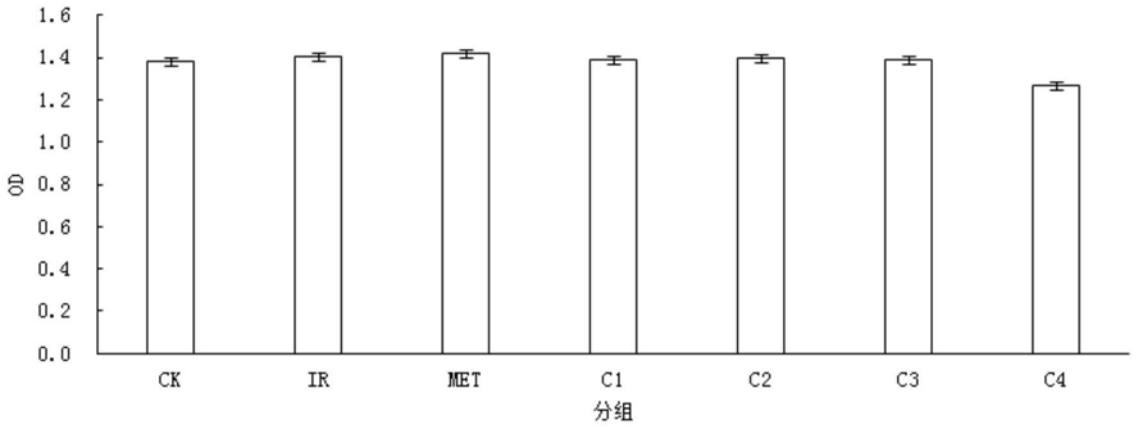

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图23

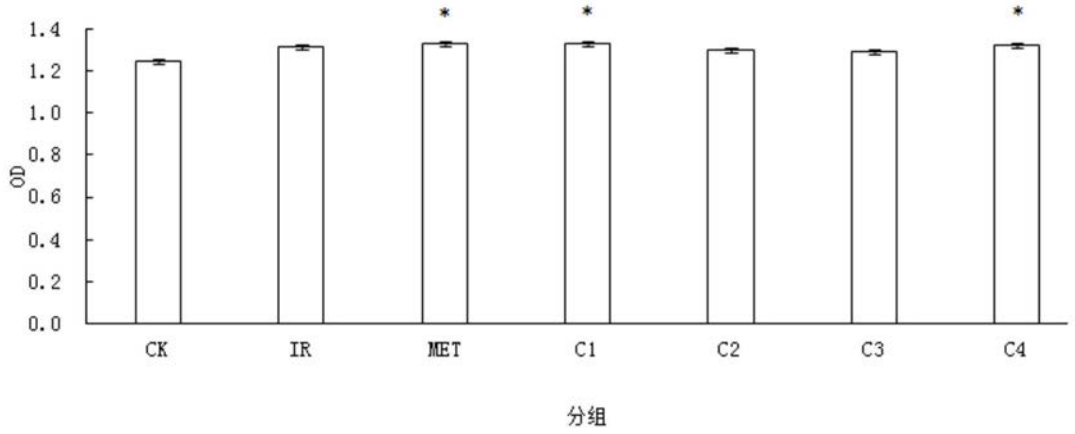

*
*
*
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图24

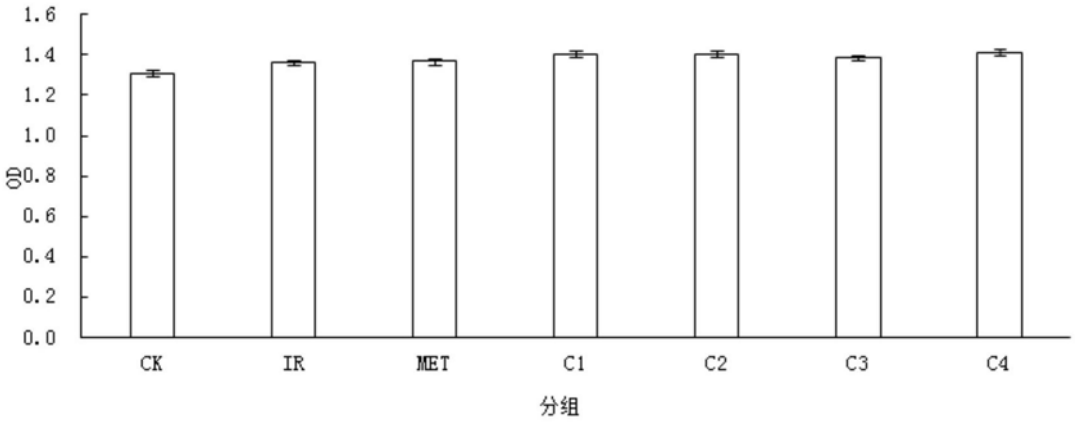

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图25

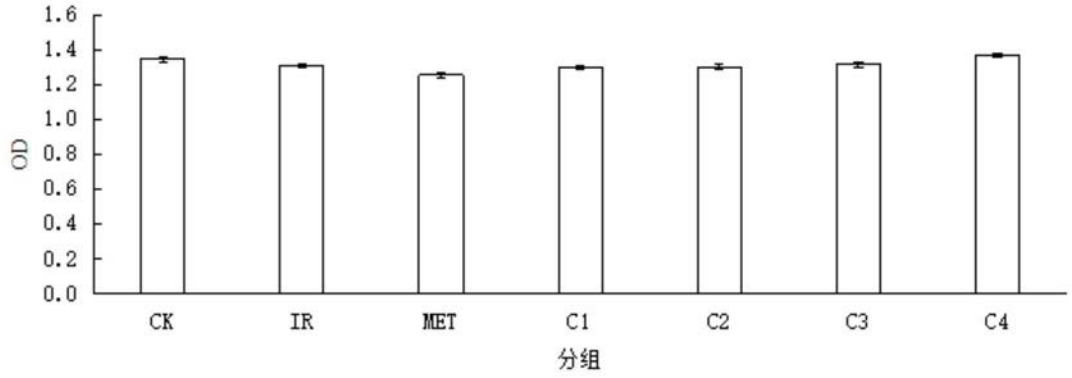

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图26

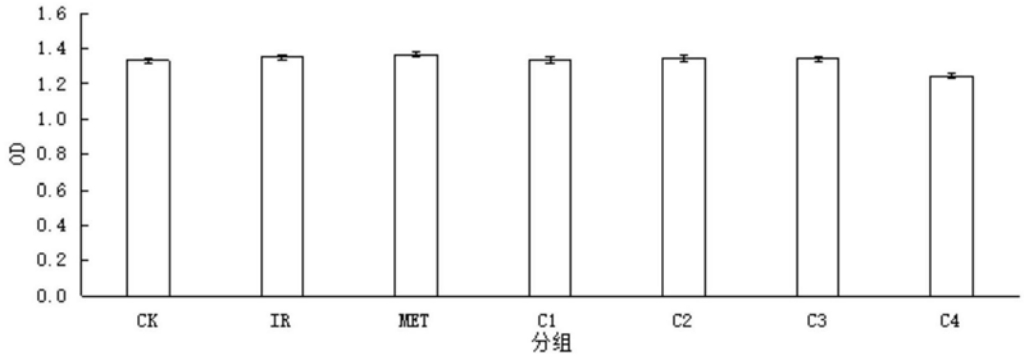

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图27

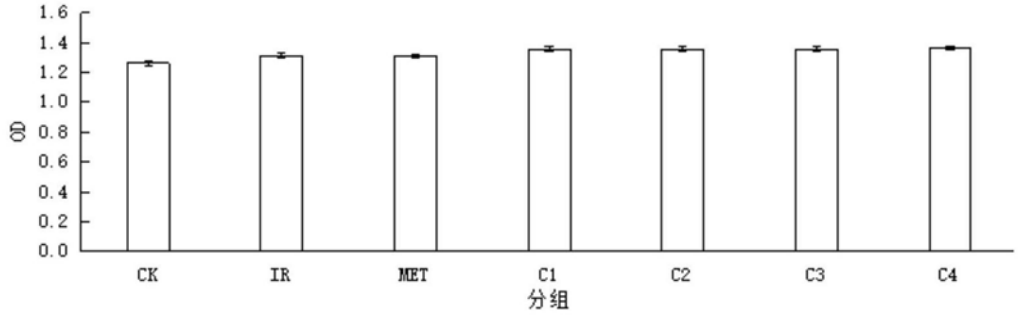

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD
CK
IR
MET
C1
C2
C3
C4
分组

图28