

中药鬼箭羽降糖有效部位的药效学和化学研究

郎素梅, 朱丹妮, 余伯阳^{*}, 赵佳丽, 王秋娟, 严永清

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 在对中药鬼箭羽药效学研究基础上, 提取分离其降糖作用的物质基础。方法: 用健康小鼠和四氯嘧啶所致的化学性糖尿病小鼠模型, 以血糖为指标研究鬼箭羽的降糖作用有效部位和物质基础, 采用硅胶和凝胶柱层析等分离纯化技术, 根据理化性质及光谱数据鉴定结构。结果: 鬼箭羽对健康小鼠血糖水平无明显影响, 但能显著降低四氯嘧啶所致糖尿病小鼠血糖水平, 其中水提取部位降糖作用最好。乙酸乙酯部位降糖作用仅次于水提取部位, 乙酸乙酯部位经聚酰胺柱色谱用 50%乙醇洗脱所得组分降糖效果明显。对 50%乙醇洗脱组分进行分离得到 4 个酚酸类化合物, 分别为对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid EA-1), 3,4 二羟基苯甲酸(protocatechuic acid, EA-2), 3 甲氧基-4 羟基苯甲酸(4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid EA-3), 3,5 二甲氧基-4 羟基苯甲酸(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid EA-4)。结论: 鬼箭羽对糖尿病小鼠有明显的降糖作用, 其活性物质主要来自于乙酸乙酯部位 50%乙醇洗脱所得的化学组分。从该部位分离的四个成分均为首次从该植物中分得。

【关键词】 鬼箭羽; 降糖作用; 有效部位; 活性成分; 药效学

【中图分类号】 R944.9; R945; R979.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-5048(2003)02-0128-04

鬼箭羽为卫矛科植物卫矛 *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. 的翅状附属物或其嫩枝, 味酸甘涩, 性微寒, 能通经活血, 民间使用鬼箭羽治疗糖尿病取得了较好的效果。国内外有关其化学成分的研究仅见甾醇、黄酮类化合物^[1~3] 的报道, 为进一步探明其降血糖的有效部位, 对鬼箭羽降糖的有效部位和活性成分进行了追踪。实验从不同提取部位着手, 选用正常动物和化学性糖尿病小鼠模型, 在整体水平上进行降糖药效学比较, 初步确定鬼箭羽降糖的有效部位为鬼箭羽水煎液的乙酸乙酯萃取部位, 再进行聚酰胺柱层析, 其 50%的乙醇洗脱部位, 从该部位分离得到 4 个酚酸类成分。为进一步研究鬼箭羽的有效成分, 阐明其降糖作用提供参考。

1 材料和仪器

1.1 仪器

熔点用 Kofler 微量熔点测定仪, 未校正; 核磁共振用 Bruker ACF-300 型核磁共振仪 (TMS 为内标); 质谱用 Agilent 1946C 质谱仪。

1.2 药材和药品

鬼箭羽药材购自南京市药材公司, 经余伯阳鉴

定为卫矛科植物 *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. 的嫩枝和翅状附属物。

柱层析及薄层层析硅胶均为青岛海洋化工厂产品。聚酰胺层析和聚酰胺薄膜层析为中国医药集团(上海)化学试剂厂产品。所用试剂均为分析纯。

优降糖(Glibenclamide)为天津市药物研究院药业有限责任公司生产, 批号 9902311。降糖灵(Phenformin)江苏省金坛市制药厂生产, 批号 9901202。四氯嘧啶(Alloxan), 美国 Sigma 公司生产。葡萄糖试剂盒由温州东瓯生物工程有限公司生产批号 200109022。

1.3 动物

昆明种小鼠, 雌雄各半, 由中国药科大学动物中心提供。

2 实验方法

2.1 鬼箭羽提取部位的分离

取鬼箭羽药材 5 kg, 用 6 倍水煎煮 2 次, 每次 2 h, 趁热过滤。滤液浓缩后得浸膏 250 g, 浸膏依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇萃取。所得提取部位用 0.5%CMC-Na 配成混悬液, 分别为水

提取物(I)、石油醚提取物(II)、乙酸乙酯提取物(III)、正丁醇提取物(IV)、萃后残余物(V)。

以上各提取物进行药效学筛选后,为了进一步确证其活性部位,把乙酸乙酯提取物采用聚酰胺柱层析。称取一定量鬼箭羽乙酸乙酯部位进行聚酰胺柱层析,依次用水、30%乙醇、50%乙醇、95%乙醇洗脱,水和30%组分合并,得到3个组分。即水加30%乙醇组分(III-1)、50%乙醇组分(III-2)和95%乙醇组分(III-3)。

2.2 对健康小鼠的降糖作用

取健康小鼠70只(体重18~22g)按体重随机分为7组,每组10只。眼眶静脉丛取血,用葡萄糖氧化酶法测血糖值。治疗组I 400 mg/kg; II 1.00 mg/kg; III 17.20 mg/kg; IV 38.60 mg/kg; V 344.00 mg/kg,对照组给0.5%CMC-Na,阳性药组给优降糖(100 mg/kg)。各组按0.2 ml/10g灌胃给药,每天1次,连续7d。末次给药前2h开始禁食(饮水不限),给药2h后测空腹血糖值(FSG)。

2.3 对糖尿病小鼠的降糖作用

2.3.1 造模^[4] 健康小鼠(体重22~25g)饲养3日后禁食16h(饮水不限),腹腔注射四氧嘧啶(临用现配,浓度1%,剂量:200 mg/kg),正常饲养,72h后,测空腹血糖值(FSG)。选取FSG>180 mg/kg的小鼠为糖尿病小鼠。

2.3.2 给药及测定 造模前随机选取健康小鼠12只作为正常组。造模后选取糖尿病小鼠84只,每组12只,按血糖值随机分为7组。治疗组给药同“2.2”,正常组和阴性对照给0.5%CMC-Na,阳性药

组给与降糖灵(110 mg/kg)。给药方式按0.2 ml/10g灌胃。连续给药7d,末次给药前2h禁食,给药后2h测FSG。

3.3.1 有效部位的确证 取乙酸乙酯部位化学组分III-1、III-2、III-3及鬼箭羽提取部位I、III按实验方法“2.3”进行药效学评价。

3 结 果

3.1 对健康小鼠的血糖影响

鬼箭羽各提取物对健康小鼠的降糖作用与对照组比较无明显差异($P > 0.05$)。表明该药对正常小鼠无降糖作用。

3.2 对四氧嘧啶所致的化学性糖尿病小鼠血糖的影响

由表1可见鬼箭羽的五个提取部位均有降糖作用。其降糖作用强度(从大到小)依次为:乙酸乙酯提取物(III)、水提取物(I)、萃取后残余物(V)、石油醚提取物(II)、正丁醇提取物(IV)。乙酸乙酯提取物与水提取物降糖效果相当,故先选择确定乙酸乙酯部位为进一步研究对象。

3.3 对四氧嘧啶所致的化学性糖尿病小鼠血糖的影响

由表2可见III-2组分与水提物(I)降糖的作用相当($P > 0.05$),故确证该部位为有效部位。

3.4 降糖有效部位化学成分的分离与结构鉴定

确定有效组分后,对该组分进行了化学成分的初步分离。取III-2组分的浸膏经硅胶和Sephadex LH-20柱色谱进行多次层析分离,得化合物EA-1~EA-4。

Tab 1. Hypoglycemic effect of GJY different parts on the fasting serum glucose (FSG) in alloxan induced diabetic mice. ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	Dose (mg/kg)	FSG(mg/dl)		Hypoglycemic percent (%)
		Before	After	
Normal		127.01±19.67	117.41±26.67	7.9±14.3
Model		391.13±45.86 ^{# ##}	380.34±55.14	2.5±10.8
Phenformin	110.00	363.08±58.20	145.87±92.74 ^{***}	61.1±19.9 ^{## ##}
I	400.00	419.55±85.35	199.38±94.38 ^{***}	51.5±23.5 ^{## ## △ +}
II	1.00	390.23±101.02	265.99±114.78	23.6±13.9 ⁺⁺
III	17.20	386.15±93.99	159.09±68.88 ^{***}	56.5±20.7 ^{## ## △}
IV	38.60	397.88±67.69	327.72±133.54	13.7±47.7 ⁺⁺⁺
V	344.00	414.35±122.4	257.87±70.50	34.4±3.8 ^{## ++}

* ** P<0.01 vs Model; # ## P<0.05; ## ## P<0.01 vs Normal; △ P>0.05 vs phenformin; + P>0.05; ++ P<0.05; +++ P<0.01 vs III

Tab 2. Hypoglycemic effect of different parts on the fasting serum glucose (FSG) in alloxan induced diabetic mice. ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	Dose (mg/kg)	FSG (mg/dl)		Hypoglycemic percent (%)
		Before	After	
Normal		139.03±22.74	139.18±32.13	0.615±10.35
Model		445.55±164.93	418.92±141.75	0.55±23.02
Phenformin	110.00	434.04±159.75	209.80±88.66	37.63±51.35 ***
I	400.00	439.70±144.80	241.21±114.34	36.41±28.87 ***
III	9.56	445.05±165.59	285.84±152.51	30.43±39.82 **
III-1	4.54	368.79±171.78	368.22±115.01	-14.6±49.87
III-2	3.20	386.57±169.07	246.24±150.61	32.61±31.45 *** △
III-3	0.64	411.51±149.52	300.00±158.23	25.24±26.16 **

* * P<0.05, *** P<0.01 vs Model; △P>0.05 vs I

3.3.1 结构鉴定

EA-1 无色粉末状结晶, mp 213~214℃。ESI-MS(*m/z*): 137[M-1]⁻。¹H NMR(300 MHz, Acetone-d₆) δ 9.62(1H, s, -COOH) 7.88(2H, d, J=8.8 Hz, 2-H and 6-H), 6.89(2H, d, J=8.8 Hz, 3-H and 5-H); ¹³C NMR(75 MHz, Acetone-d₆): 168.27(-COOH), 163.27(C-4), 133.34(C-3 and C-5), 123.33(C-1), 116.57(C-2 and C-6)。理化数据与光谱数据与Sadtler标准谱中该化合物的数据一致, 故确定该化合物为对羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid)。

EA-2 无色簇状结晶, mp 195~196℃。ESI-MS(*m/z*): 153[M-1]⁻。¹H NMR(300 MHz, Acetone-d₆) δ 7.51(1H, d, J=2.0 Hz, 2-H), 7.44(1H, dd, J=8.3, 2.0 Hz, 6-H), 6.88(1H, d, J=8.3 Hz, 5-H); ¹³C NMR(75 MHz, Acetone-d₆): 166.63(-COOH), 149.59(C-4), 144.44(C-3), 122.45(C-6), 122.01(C-1), 116.32(C-2), 114.51(C-5)。理化数据与光谱数据与文献^[6]报道一致, 故确定该化合物3,4-二羟基苯甲酸(protocatechuic acid)。

EA-3 无色针晶, mp 210~211℃。ESI-MS(*m/z*): 167[M-1]⁻。¹H NMR(75 MHz Acetone-d₆) δ 7.61(1H, dd, J=8.3, 1.9 Hz, 6-H), 7.58(1H, d, J=1.9 Hz, 2-H), 6.88(1H, d, J=8.2 Hz, 5-H), 3.91(3H, s, -OCH₃)。 ¹³C NMR(75 MHz, Acetone-d₆): 166.34(-COOH), 150.91(C-4), 146.91(C-3), 123.73(C-6), 121.77(C-1), 114.34(C-2), 112.45(C-5), 55.22(-OCH₃)。理化数据与光谱数据与文献^[7]报道一致, 故确定该化合物3-甲氧基-4-羟基苯甲酸(4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)。

EA-4 无色针晶, mp 205~207℃。ESI-MS(*m/z*): 197[M-1]⁻。¹H NMR(300 MHz, Acetone-d₆) δ

7.3(2H, s, 2-H and 6-H), 3.87(6H, s, -OCH₃); ¹³C NMR(75 MHz, Acetone-d₆): 168.32(-COOH), 149.00(C-3 and C-5), 142.01(C-4), 122.20(C-1), 108.84(C-2 and C-6), 57.34(-OCH₃)。理化数据与光谱数据与文献^[8]报道一致, 故确定该化合物3,5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid)。

4 讨论

实验结果显示鬼箭羽对健康小鼠血糖无明显影响, 提示其没有明显的刺激胰岛素释放作用或胰岛素样作用; 鬼箭羽对四氧嘧啶所致的血糖升高有明显的降低作用, 这表明鬼箭羽可能有改善受损伤的β细胞的功能或降低机体对胰岛素的拮抗性。

糖尿病中医辨证属于“消渴”病范畴。究其病机主要在于阴津亏损, 燥热偏胜, 而以阴虚为本, 燥热为标。燥热内生, 津干液枯, 气血涩滞, 久而为瘀。鬼箭羽味苦性寒, 能补阴生津, 又有活血化瘀之功, 其治疗消渴能兼顾标本, 切中消渴病病机。实验观察到鬼箭羽水煎液降糖效果最好, 其乙酸乙酯萃取部位, 再进行聚酰胺柱层析, 50%的乙醇洗脱部位降糖效果与水提物相当。至于所得到的4个化合物是否为其降糖作用的有效成分, 机理如何, 尚待进一步探讨。

参考文献

- [1] 陈科(Chen K), 陈蕙友(Chen YY), 潘德济(Pan DJ). 卫矛科植物鬼箭羽中的甾体成分[J]. 中草药(Chin Trait Herb Drugs), 1983, 14(9): 385-388
- [2] 陈科(Chen K), 潘德济(Pan DJ), 徐光漪(Xu GY). 鬼箭羽中的黄烷成分[J]. 中草药(Chin Trait Herb Drugs), 1986, 17(3): 97-100

- [3] Susumu Kitanaka, Michio Takido, Kazutoshi Mizue, et al. Cytotoxic cardenolides from woods of Euonymus alata[J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(3): 615-617.
- [4] 黄敏(Huang M), 王书奎(Wang SK), 王小峰(Wang XF)等. 不同禁食时间对四氯嘧啶糖尿病小鼠模型的血清胰岛素和血糖的影响[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2001, 32(3): 221-223
- [5] Sadtler 标准谱. H-NMR: 3160, ^{13}C -NMR: 6470.
- [6] Sadtler 标准谱. H-NMR: 19620, ^{13}C -NMR: 5219.
- [7] Sadtler 标准谱. H-NMR: 10068, ^{13}C -NMR: 9997.
- [8] Sadtler 标准谱. H-NMR: 3158, ^{13}C -NMR: 6458.

Hypoglycemic Effects of Extracts and Constituents from *Euonymus alatus*

LANG Su-Mei, ZHU Dang-Ni, YU Bo-Yang, ZHAO Jia-Li, WANG Qiu-Juan, YANG Yong-Qing
Department of TCM Recipe, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

【ABSTRACT】 AIM: To observe the hypoglycemic effects of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb and to determine its hypoglycemic effective extract. METHOD: Normal mice and alloxan induced diabetic mice were used to observe the hypoglycemic effects. RESULT: Ethyl acetate extract of *Euonymus alatus* shows hypoglycemic effects. Four compounds were isolated from active groups and they were identified as p-hydroxybenzoic acid, (EA-1), protocatechuic acid (EA-2), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, (EA-3) and 3, 5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid, (EA-4). CONCLUSION: The fasting serum glucose level in diabetic mice was reduced significantly, but similar effect on fasting serum glucose level was not produced in normal mice. EA-1 ~ EA-4 were firstly isolated from *Euonymus alatus*.

【KEY WORDS】 *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb; Hypoglycemic effects; Active extracts; Constituents

·新动态·

我国用天然药物治疗艾滋病进展迅速

近几年,国内科学家不断致力于用天然药物治疗艾滋病的研究,研制了多种药品,取得突破性进展。一些专家认为天然药物在治疗艾滋病方面已显露曙光。

- 中国科学院昆明植物研究所罗士德教授组织科技人员在中草药里筛选抗艾滋病药物。
- 沈阳永正企业集团自1991年起,开始从事研究利用中药治疗艾滋病。
- 成都恩威集团公司中医药研究所自90年代开始进行治疗艾滋病的研究。该所高级工程师薛永新发明研制的中药“干坤宁”已进入药物开发阶段。
- 青岛海洋大学发明研制的抗艾滋病海洋药物聚甘右酯是中国拥有知识产权的第一个抗艾滋病国家一类新药,近期将获准进入I期临床。

(摘自《中国医药情报》)