

水芹化学成分检测及降血糖作用

The detection of the chemical components in *Oenanthe javanica* and its hypoglycemic activity

郭晓青¹ 韦隆华¹ 代甜甜¹ 伍庆²

GUO Xiao-qing¹ WEI Long-hua¹ DAI Tian-tian¹ WU qing²

(1. 贵阳护理职业学院, 贵州 贵阳 550081; 2. 贵州师范大学山地环境重点实验室, 贵州 贵阳 550001)

(1. Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang, Guizhou 550081, China;

2. Key Laboratory of Mountain Environment, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

摘要:研究黔产野生水芹(后简称水芹)天然药物化学成分及水芹提取物对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿小鼠降血糖作用。应用天然药物化学成分单项预试验方法检测水芹化学成分类型,分光光度法测定总酚酸、总黄酮、总糖含量。用 STZ 建立小鼠糖尿模型,二甲双胍做阳性对照,水芹醇提取物灌胃,检测血糖。结果表明,水芹含酚类、黄酮类、糖类、生物碱等多种活性物质,总酚酸、总黄酮、总糖含量较高;水芹醇提取物具有一定的降血糖作用,高剂量组血糖均值从 27.6 降至 17.7。黔产水芹具有一定的研究开发价值。

关键词:水芹;提取物;链脲佐菌素;降血糖

Abstract: The chemical components of *Oenanthe javanica* from Guizhou and the hypoglycemic effect of its extracts on the diabetic mice induced by streptozotocin (STZ) was investigated in this paper. The chemical composition type in the wild *O. javanica* was detected in a single prediction experiment by using various chemical components of natural medicine. The total phenolic acids, flavonoids and sugar of *O. javanica* were determined by spectrophotometry. Diabetic mice model was established by STZ, and metformin was used as a positive control, the extracts from *O. javanica* was fed, blood glucose was measured. The results showed that *O. javanica* contained phenols, flavonoids, alkaloids and other active ingredients, and the total phenolic acids, flavonoids and sugar of *O. javanica* were found higher than other kinds of compounds. The extract from *O. javanica* showed a certain hypoglycemic activity, and according to the data, decreasing blood glucose from 27.6 to 17.7. Thus *O. javanica* from Guizhou contains a variety of natural drug chemical com-

position, showing a certain hypoglycemic effect, and it was valuable to research and explore it.

Keywords: *Oenanthe javanica*; extracts; streptozotocin; hypoglycemic effect

水芹[*Oenanthe javanica* (Bl.) DC.]属伞形科多年生宿根草本水生植物,又名小叶芹、水芹菜、河芹等,中国各地均有分布,喜生于湿洼地、水沟或田田间。水芹药用历史悠久,具有清热解毒、清肝利胆、抗肝炎、脉溢、驱风等功效^[1-3]。近年来的研究发现,水芹在提高免疫功能^[4]、抗心律失常^[5]、抗癌^[6]等方面也有一定的功效。目前中国对水芹抗凝血和抗血栓形成^[7]、增强免疫力^[8]、保肝退黄^[9-10]等方面的研究都取得较好的成效,但对水芹降血糖作用研究尚未见报道。

本试验拟以黔产野生水芹为研究对象,利用各类化学成分的溶解性和某些特性化学反应进行系统天然药物化学成分检识,通过分光光度法测定其主要活性成分,用 STZ 诱导糖尿小鼠模型,水芹提取物灌胃,试验降血糖作用,旨在为水芹天然药物化学活性成分提取分离、活性成分筛选以及寻找新的药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黔产野生水芹:贵州省贵阳、遵义等 8 地区 11 个点考察取样;

昆明小鼠:生产许可证号:SCXK(黔)2014-0001,动物质量合格证号:小鼠 0201403,贵州医科大学实验动物中心;

小鼠饲料:许可证号:SCXK(川)2015-01,四川省医学科学院,四川省人民医院实验动物研究所;

原儿茶酸、芦丁标准品:纯度>98%,上海源叶生物科技有限公司;

葡萄糖、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、硝酸钠等:分析

基金项目:贵州省科学技术基金项目(编号:黔科合 J 字[2014]2002 号);教育部喀斯特山地生物多样性保护与可持续利用创新团队(编号:IRT1227)

作者简介:郭晓青(1964—),女,贵阳护理职业学院教授。

E-mail:gyguoxiaoqing@163.com

收稿日期:2016-11-08

纯,国药集团化学试剂公司;

链脲佐菌素:纯度>98%,美国 Sigma 公司;

盐酸二甲双胍片:中美上海施贵宝制药有限公司。

1.2 仪器与设备

制冷水浴恒温振荡器:SHA-2 型,金坛市医疗仪器厂;

电热恒温鼓风干燥箱:GZX-GFC.101-3-S 型,上海博泰实验设备有限公司;

高速粉碎机:ZH-500 型,中南制药机械厂;

冷冻干燥机:DYYB-12 型,上海德洋意邦仪器有限公司;

紫外分光光度计:TU-1810 型,上海申光仪器仪表有限公司;

超纯水机:YC-ROI-20Z 型,四川怡创科技有限公司;

高压灭菌器:GR60DA 型,致微仪器有限公司;

血糖仪:AW06477503A 型,强生医疗器材有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 天然药物化学成分类型检识 利用寻找成分的溶解性能或某些特性,采用适宜的方法制备供试液,根据常见化学类型成分检识表^[1]进行检识。

(1) 以水为溶剂供试液的制备:取水芹粉末 20 g,加水 100 mL,浸泡 24 h,用吸管吸取少量水液作蛋白质、氨基酸检识。浸泡液再次在 55 °C 水浴加热浸泡 1 h,过滤,滤液作苷、糖、有机酸、酚、鞣质、生物碱类型成分检识。

(2) 以乙醇为溶剂供试液的制备:取水芹粉末 20 g,加 100 mL 95%乙醇室温浸渍 24 h,过滤,滤液加水稀释至含醇量为 65%~75%,置分液漏斗中,用 2/3 量的石油醚萃取两次。石油醚液体用作油脂和叶绿素检识。将乙醇溶液旋转蒸馏,回收乙醇,制成浸膏,浸膏一分为二,一份加 NaOH 溶解,过滤,滤液作苷类、黄酮、蒽醌、酚类、萜类、内酯、生物碱、甾体、有机酸检识。另一份浸膏用 5% HCl 溶解,上清液用作生物碱检识。残渣用乙酸乙酯溶解,分别用 5% NaHCO₃、2% NaOH,萃取数次,NaHCO₃液用作有机酸、多元酚检识,NaOH 液用作酚类检识,回收乙酸乙酯,残渣液用乙醇溶解,乙醇液用作萜类、内酯、甾体等检识。

(3) 以石油醚为溶剂供试液的制备:取水芹粉末 2 g,加 20 mL 石油醚,密闭浸渍 24 h,过滤,滤液作挥发油、甾体、油脂、甾萜等亲脂性成分鉴别。

1.3.2 主要活性成分含量的测定

(1) 待测液制备:准确称 2 g 水芹粉(80 目以下),加入 100 mL 体积分数为 65%乙醇溶液,搅拌均匀,在 70 °C 水浴中浸提 55 min,过滤,滤液用 65%乙醇 100 mL 容量瓶定容,即为总酚酸、总黄酮含量测定待测液。

准确称取一定量水芹粉,应用水浴回流方法,用石油醚脱脂,待石油醚挥发完全后,沸水溶解,用活性炭脱色,过滤,滤液定容,即为总糖含量待测液。

(2) 活性成分含量测定:取 1 mL 样液,按标准曲线建立的方法测定吸光度,根据式(1)求出活性成分含量。

$$G = \frac{C \times V}{W}, \quad (1)$$

式中:

G——活性成分含量,mg/g;

C——活性物质质量浓度,mg/mL,由标准曲线吸光度换算而得;

V——待测样液总体积,mL;

W——样品质量,g。

(3) 总酚酸含量测定:采用 Folin-Ciocalteu 法,根据参考文献^[12]的方法,得标准曲线回归方程 $y = 13.348x - 0.0088$, $R^2 = 0.9971$,标准液浓度在 0.000~0.028 mg/mL 范围线性关系良好。取 1 mL 待测液,按上述测定标准曲线方法测定其吸光度,按式(1)求出样品总酚酸含量。

(4) 总黄酮含量测定:采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法,根据文献^[13]的方法,得到芦丁吸光度与浓度的标准曲线回归方程 $Y = 6.1848X - 0.0036$, $R^2 = 0.9963$,标准液浓度在 0.000~0.036 mg/mL 范围呈现良好线性关系。取 1 mL 待测液,按测定标准曲线方法测定其吸光度,按式(1)求出样品总黄酮含量。

(5) 总糖含量测定:采用苯酚-硫酸比色法,根据文献^[12]的方法,得到标准曲线回归方程式为 $y = 19.455x + 0.0122$, $R^2 = 0.9947$,多糖在 0.000~0.032 mg/mL 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。取 1 mL 待测液,按上述测定标准曲线方法测定其吸光度,按式(1)求出样品总糖含量。

1.3.3 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型建立 选 70 只 35 g 左右雄性小鼠适应性喂养 1 周,期间抽查血糖是否正常。留 10 只做正常组,60 只相同条件下造模。用 0.1 mol/L、pH 4.0 的枸橼酸钠缓冲溶液做溶剂,将 STZ 配成 1% 的溶液,按 55 mg/kg 剂量对小鼠进行腹腔注射^[14-15],每天 1 次,连续 5 d。3 周后检测血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功。

1.3.4 水芹灌胃液制备 将水芹用去离子水清洗干净,沥干表面水分,置恒温干燥箱中 60 °C 干燥至恒重,粉碎后过 15 μ m 的筛得到水芹粉。用 95%乙醇做溶剂,按 1:50 (g/mL)料液比在微波炉中提取至沸腾,冷至室温,重复 2 次。抽滤,滤液旋转蒸馏,冷冻干燥,得到提取物粉。生理盐水作溶剂,吐温 80 作助剂,用 1%吐温 80 的生理盐水溶解提取物配制不同浓度的提取物溶液进行灌胃。

1.3.5 提取物对小鼠体质的影响及降血糖作用 将造模成功体质量接近的小鼠分为模型组、阳性对照组、给药组(低剂量、高剂量),每组 10 只。用 1%吐温 80 生理盐水溶解二甲双胍及水芹醇提取物。阳性对照小鼠以 380 mg/kg 二甲双胍剂量灌胃,给药低剂量、高剂量组小鼠分别以 400,800 mg/kg 水芹提取物灌胃,正常组和模型组用 1%吐温 80 生理盐水(NS)代替,灌胃液体积控制在 5~8 mL。每天 1 次,连续 3 周。给药 1 周后开始每周固定时间测定小鼠体重和空腹血糖。

2 结果与分析

2.1 水芹中化学成分分析

由表 1 可知,水芹中含有多种类型的物质,研究天然药物活性成分,必须进行化学成分检识试验,了解某些天然药物中所含化学成分类型的大致情况。天然药物中所含化学

表 1 水芹化学成分类型检测结果

Table 1 The detection results of chemical components of the *Oenanthe Javanica*

供试液	物质成分
水	蛋白质、氨基酸、糖类、酚类、黄酮类、鞣质、生物碱
乙醇	蛋白质、氨基酸、糖类、酚类、鞣质、内酯类、黄酮类、强心苷、生物碱
石油醚	内酯、挥发油

成分种类较多,但针对某一疾病有活性的成分往往只有一种或一类,化学成分检识试验为提取天然药物中某类活性成分以及活性追踪提供导向。

2.2 水芹天然药物活性成分测定分析

由表 2 可知,水芹总黄酮、总酚酸及总糖含量都较高,但各地区含量有差异。对天然药物的研究,其作用与有效成分的存在和含量的多少有关,而有效成分又受到天然药物的品种、产地、采收季节、加工方法等影响。该试验初步探究了贵州不同地区的 3 种活性成分含量情况,为建立不同地区的黔产野生水芹的质量评价体系提供依据。

表 2 各地区水芹总酚酸、总黄酮、总糖含量

Table 2 The content of total phenolic acids, flavonoids and sugar in *Oenanthe Javanica* in different regions ($n=3$) mg/g

地区	总酚酸含量	总黄酮含量	总糖含量
贵阳(乌当)	173.2	112.4	76.0
贵阳(开阳)	136.4	55.3	66.7
贵阳(观山湖)	162.2	52.7	78.2
安顺(安顺)	168.1	145.2	63.4
六盘水(红果)	171.6	121.6	62.5
铜仁(石阡)	138.3	110.2	72.1
毕节(纳雍)	138.6	60.6	60.8
遵义(习水)	131.5	51.7	74.3
黔东南(凯里)	139.1	27.5	68.8
黔南(瓮安)	161.7	119.8	62.5
黔西南(普安)	134.8	119.0	70.1

2.3 STZ 诱导的糖尿病小鼠成模情况

按 1.3.3 方法造模,每周检测体重和血糖,观察病状。3 周后,小鼠体重明显下降,表明明显出现了多饮、多食、多尿及体重急剧减少的“三多一少”症状,血糖均 ≥ 27.5 mmol/L,成模率为 100%。

2.4 给药后对小鼠体质的影响

由表 3 可知,正常组小鼠正常生长,模型组小鼠体质量一直下降,给药 3 周后体质量平均值从 31.67 g 降至 24.51 g。阳性对照组和水芹组体质量下降趋势得到控制,喂药第 2 周后体质量稍微增加了一点。模型组小鼠造模 7 周后全部死亡。阳性对照组小鼠死亡时间推迟了 2 周。水芹组小鼠死亡时间推迟了 3 周。给药后小鼠不仅是体重逐渐增加,死亡

表 3 小鼠体质量变化情况

Table 3 The changes of the mice's body weight ($n=3$)

组别	数量/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药前体质量/g	给药后体质量/g
正常组	10	NS	39.210±0.992	43.280±0.624
模型组	10	NS	31.670±1.651	24.510±0.624
阳性对照组	10	380	31.860±1.903	34.650±2.460
高剂量组	10	800	32.010±1.686	35.130±2.461
低剂量组	10	400	31.260±1.350	34.290±1.804

时间也延迟了,说明给药后对小鼠体质改善有一定的作用。

2.5 水芹提取物对小鼠血糖的影响

由表 4 可知,二甲双胍做阳性对照,对照组用量在 380 mg/kg,小鼠血糖基本达到正常值。水芹提取物具有一定的降血糖的作用,高剂量组血糖均值从 27.6 降至 17.7,低剂量组从 28.2 降至 20.8,高剂量和低剂量效果影响不显著。与二甲双胍比较,达不到二甲双胍的效果。水芹选择活性成分含量相对较高的安顺地区水芹,用醇提物的混合物灌胃,可能混合物中的某一个成分有降血糖的效果,用混合物灌胃达不到最佳效果。混合物水溶性也较差,这就对提高浓度、加大给药剂量造成了困难,这些问题有待进一步解决。

表 4 小鼠血糖变化情况

Table 4 The changes of the mice's blood sugar ($n=7$)

组别	数量/只	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药前空腹血糖	给药后空腹血糖
正常组	10	NS	6.80±0.99	7.10±0.92
模型组	10	NS	27.40±1.95	28.10±0.92
阳性对照组	10	380	29.10±2.03	9.10±1.71
高剂量组	10	800	27.60±1.87	17.70±4.32
低剂量组	10	400	28.20±1.98	20.80±4.34

3 结论

(1) 黔产水芹总酚酸、总黄酮、总糖含量都较高,不同地区总黄酮含量差异较大。贵阳安顺地区水芹总黄酮含量最高,为 145.2 mg/g,黔东南凯里水芹总黄酮含量最低,为 27.5 mg/g。该研究为建立不同地区水芹质量评价体系提供一定的导向。

(2) 水芹醇提物具有一定的降糖作用,同时对体质改善也起到积极的作用,但降糖效果没有二甲双胍好。该研究为水芹醇提物中降糖有效成分寻找或筛选等提供一定的依据。

(3) 水芹醇提物是混合物,降糖作用的活性物质是哪一种、混合物中的某些物质对降糖作用有没有协同效应等问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:512.

(下转第 171 页)

- gen[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221(1/2): 1-22.
- [4] 梅鑫东, 曾江南, 蒋柏泉. 酶法提取鱼鳞胶原蛋白的工艺优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 156-159.
- [5] 焦岩, 王振宇. 蓝靛果花色苷超声波辅助提取优化及其降血脂作用[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 52-59.
- [6] LI Hui, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*)[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2005, 12(4): 295-300.
- [7] 杨昱, 白靖文, 俞志刚. 超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 170-174.
- [8] RAN Xue-guang, WANG Lin-yue. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2013, 94(3): 585-590.
- [9] KYUNG K H, HO K Y, JI K Y, et al. Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*[J]. Fisheries Science, 2012, 78(2): 485-490.
- [10] 王雪蒙, 于玮, 马良, 等. 兔皮胶原蛋白的提取及其结构鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2016(4): 209-213.
- [11] 陈丽清. 超高压技术制备高品质明胶及其机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013: 22.
- [12] 杨玲, 赵燕, 鲁亮, 等. 鲟鱼鱼皮胶原蛋白的提取及其理化性能分析[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 41-46.
- [13] 于玮, 王雪蒙, 马良, 等. 猪皮胶原蛋白提取过程中酶解条件优化及其结构鉴定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2015(4): 106-113.
- [14] 周梦柔. 猪皮胶原蛋白明胶化过程中的微观结构变化研究及明胶提取率预测模型的构建[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 14.
- [15] 吴倩, 张丽芬, 陈复生. 超声波对蛋白质提取及改性影响的研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 256-259.
- [16] 齐越. 超声波辅助法酶解鹿皮胶原蛋白及其产品研发[D]. 吉林: 吉林大学, 2014: 21-30.
- [17] KIM H K, KIM Y H, PARK H J, et al. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*[J]. Fisheries Science, 2013, 79(5): 849-856.
- [18] LI De-fu, MU Chang-dao, CAI Su-mei, et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16(5): 605-609.
- [19] 杨萌萌, 郭兆斌, 余群力, 等. 超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(3): 121-126.
- [20] WANG Lin, LIANG Qiu-fang, CHEN Ting-ting, et al. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 38(38): 104-109.
- [21] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 500-507.
- [22] LIN Yung-kai, LIU Deng-cheng. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species[J]. Food Chemistry, 2006, 99(2): 244-251.
- [23] MUYONGA J H, COLE C G B, DUODU K G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332.
- [24] DOYLE B B, BENDIT E G, BLOUT E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides[J]. Biopolymers, 1975, 14(5): 937-957.
- [25] LIU Da-song, LIANG Li, REGENSTEIN J M, et al. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1441-1448.
- [26] SYLVESTER M F, YANNAS I V, SALZMAN E W, et al. Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction[J]. Thrombosis Research, 1989, 55(1): 135-148.
- [27] 康俊霞, 康永锋, 包斌, 等. Na^+ 、 Ca^{2+} 和 pH 值对鲮鱼皮胶原蛋白热变性温度的影响[J]. 食品科学, 2011(13): 66-70.

(上接第 155 页)

- [2] 全国中草药会编组编. 全国中草药汇编: 下[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 129.
- [3] 吴征镒. 新华本草纲要: 第一册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 369.
- [4] 张伟, 黄正明, 陈晓农. 水芹总酚酸对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(1): 17-19.
- [5] 刘鸽锋, 曹平良, 罗俊, 等. 水芹水提液抗心律失常的实验研究[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2010, 50(3): 40-42.
- [6] 张伟, 陈晓农, 黄正明, 等. 水芹总酚酸对人肝癌 2.2.15 细胞周期的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(4): 369-371.
- [7] 朴日龙, 张红英. 水芹正丁醇提取物抗凝血和抗血栓形成作用的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 280-283.
- [8] 张伟, 黄正明, 陈晓农. 水芹总酚酸对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军药学报, 2013, 29(1): 17-19.
- [9] 年国侠, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸对小鼠 CCl_4 肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学报, 2008, 24(6): 501-504.
- [10] 年国侠, 黄正明, 杨新波, 等. 水芹总酚酸退黄作用的实验研究[J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 124-127.
- [11] 吴剑峰. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 240-244.
- [12] 郭晓青, 陈晓靓, 杨春梅, 等. 紫苏叶活性成分及抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 178-181.
- [13] 郭晓青, 吴金鸿, 周焱富, 等. 明日叶水溶性总黄酮提纯工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 27-32.
- [14] MOHD A A, GHANYA A N, MIZATON H, et al. Hypoglycemic effect of Octomelessumatrana aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats and its molecular mechanisms[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2012, 11: 875-881.
- [15] FAIYAZ A N S, SIDDARAJU M H, UROOJ A. Effect of Buteamonosperma Lam. Leaves and bark extracts on blood glucose in streptozotocin-induced severely diabetic rats [J]. Pharmacognosy Res, 2012, 4: 33-36.