

枳椇果梗与枳椇子体内外降血糖活性及其物质基础研究

孔 阳¹, 闫 辉¹, 王昌钊², 施春阳¹, 田 斌¹

(¹ 陕西科技大学食品科学与工程学院 西安 710021

² 西安海关技术中心 西安 710068)

摘要 枳椇是食药同源的传统食品或药品,具有降糖降压、醒酒护肝等功效。然而,枳椇果梗和种子的混用给其应用和检验带来诸多不便。为确定枳椇降血糖的确切活性部位,对果梗与种子的水和 95%乙醇提取物在体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,以及在体内对链脲佐菌素(STZ)诱导的 II 型糖尿病模型小鼠降血糖活性及其物质基础进行研究。结果表明:枳椇子醇提取物(SEE)是种子抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质,属于竞争型抑制剂,IC₅₀ 为 0.97 mg/mL;枳椇果梗水提取物(PWE)是果梗的主要活性物质,属于混合型抑制剂,IC₅₀ 为 2.28 mg/mL。SEE 和枳椇子水提取物(SWE)抑制 α -葡萄糖苷酶活性均大于 PWE 和枳椇果梗醇提取物(PEE)。动物实验表明:4 种提取物都能不同程度地降低小鼠血糖,提高其糖耐量和体质量,而 SEE 降血糖效果最显著($P < 0.01$)。整体来看,降血糖活性顺序是 SEE>SWE>PWE>PEE,枳椇子是枳椇降血糖的主要活性部位,其降血糖功效强于果梗。利用硅胶、C₁₈ 中压液相色谱、Sephadex LH-20 柱色谱对枳椇子醇提取物进行分离纯化,得到 5 个化合物。采用 ESI-MS、¹HNMR、¹³CNMR、HSQC 和 HMBC 等方法确定化合物 1~5 分别是:槲皮素、二氢槲皮素、杨梅素、二氢杨梅素和槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。本研究结果为解决枳椇果梗和种子的混用问题提供了理论依据,为进一步开发利用枳椇资源提供了新途径。

关键词 枳椇; α -葡萄糖苷酶; 链脲佐菌素; 降血糖活性

文章编号 1009-7848(2023)12-0087-10 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2023.12.010

枳椇又名拐枣,为鼠李科植物枳椇(*Hovenia acerba* Lindl)的肉质果梗和种子。枳椇是我国原卫生部公布的食药同源的传统食品或药品^[1],具有降糖^[2-4]、抗氧化^[5-6]、醒酒护肝^[7]等功效。目前全国各类药学或植物学著作中关于枳椇的记载以及各地的使用情况较为混乱^[1]。例如,枳椇的药用部位在《中药材手册》中规定为干燥的果实及膨大的果梗部分^[8];《中药大辞典》等规定其药用部位为成熟的种子或带花序轴的果实^[9];《中华人民共和国卫生部标准中药材》及《四川中药志》、《浙江药用植物志》和《中国树木分类学》等均规定其药用部位为种子^[1]。我国北方如山东、东北等地使用肉质果梗或种子入药,而南方如湖南、广东、浙江等地选用种子入药,并且各地无论果梗或种子都混称为“枳椇子”,所载功效也基本一致。

国内外学者均报道了枳椇具有较好的降血糖

作用^[10-11],然而各文献中使用的材料不尽相同。枳椇果梗和种子的混用给人们的应用和食品药品检验带来诸多不便^[1]。关于二者的降糖活性对比鲜见研究报道。本文对枳椇果梗与枳椇子的体内外降血糖活性及其活性物质基础进行研究,旨在证实枳椇的降血糖活性部位和有效成分,明确其降血糖机理。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和动物

材料:枳椇果梗、枳椇子均采自陕西省安康市旬阳县,经王丽红讲师鉴定为中药枳椇(*Hovenia acerba* Lindl)。枳椇果梗阴干粉碎备用;枳椇子晒干,粉碎过 40 目筛备用。

药品试剂:链脲佐菌素、阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶,美国 Sigma 公司;盐酸二甲双胍,深圳市中联制药有限公司;血糖仪和试纸,罗氏诊断产品(上海)有限公司;其它试剂均为分析纯。

昆明小鼠:雄性,50 只,体质量(20 \pm 2)g,使用许可证号:SYXK2012(陕)2012-006,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

收稿日期:2022-12-21

基金项目:陕西省技术创新引导专项(2020QFY11-04)

第一作者:孔阳,女,博士,副教授

E-mail: kongyang@sust.edu.cn

1.2 仪器与设备

Varioskan flash 全波长扫描式多功能酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; BSA224S-CW 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; RE52-A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; HH-6 数显恒温水浴锅, 上海梅香仪器有限公司; UV-1100 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; TG16G 台式高速离心机, 苏州威尔准精密仪器有限公司; Eppendorf 可调式移液器: 0.5~40 μL , 100~1 000 μL , 德国 Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 枳椇子和果梗提取物的制备

枳椇子水提取物 (Seed water extract, SWE) 的制备方法: 称取枳椇子 50 g, 加水 500 mL, 煎煮 3 次 1 h/次, 趁热过滤合并滤液, 浓缩干燥得枳椇子水提取物^[12-13]。

枳椇子醇提取物 (Seed ethanol extract, SEE) 的制备方法: 称取枳椇子 50 g, 加 300 mL 95%乙醇, 回流提取 3 次, 1 h/次, 滤液浓缩干燥得枳椇子醇提取物^[14-15]。

枳椇果梗水提取物 (Pulp water extract, PWE) 制备方法: 称取枳椇果梗 50 g, 加水 500 mL, 煎煮 3 次, 1 h/次, 合并滤液, 加入 2 倍体积 95%乙醇, 静置 12 h 后离心, 取上清液浓缩, 得枳椇果梗水提取物浸膏^[12-13]。

枳椇果梗醇提取物 (Pulp ethanol extract, PEE) 制备方法: 称取枳椇果梗 50 g, 加 300 mL 95%乙

醇, 煎煮 3 次, 1 h/次, 滤液浓缩得枳椇果梗醇提取物浸膏^[14-15]。

1.3.2 对 α -葡萄糖苷酶的作用研究

α -葡萄糖苷酶抑制剂是一类以延缓肠道碳水化合物吸收而达到治疗糖尿病的口服降糖药物^[16], 其可以竞争性抑制位于小肠的各种 α -葡萄糖苷酶^[17], 使淀粉类分解为葡萄糖的速度减慢^[18], 从而减缓肠道内葡萄糖的吸收, 降低餐后高血糖^[19]。因此, 对枳椇子和枳椇果梗抑制 α -葡萄糖苷酶的活性进行了考察, 期望确定枳椇降血糖的主要活性部位。

1.3.2.1 抑制 α -葡萄糖苷酶的活性测定

准确吸取质量浓度分别是 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 mg/mL 的枳椇果梗或枳椇子提取物溶液 40 μL , 加入 pH 6.8 的磷酸钠缓冲溶液 (PBS) 50 μL , 0.5 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液 40 μL , 以 10 mmol/L pNPG 为底物, 混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温反应 20 min, 反应结束后, 迅速加入 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液 100 μL , 在 405 nm 下每 1 min 测定其吸光度 (OD)^[18-20], 阳性对照为阿卡波糖, 每组做 3 个平行。

最后, 通过公式计算 α -葡萄糖苷酶的抑制率:

$$\text{Inhibitory rate} = [(A-B) - (C-D)] / (A-B) \times 100\%$$

具体反应体系见表 1, 其中 A: 对照组; B: 空白组; C: 样品测定组; D: 样品空白组; E: 阳性对照组。

表 1 α -葡萄糖苷酶抑制剂活性测试反应体系

Table 1 α -glucosidase inhibitor activity test reaction system

试剂	A/ μL	B/ μL	C/ μL	D/ μL	E/ μL
PBS	50	50	50	50	50
提取物	等量溶剂	等量溶剂	40	40	40
pNPG	40	40	40	40	40
α -葡萄糖苷酶	40	等量溶剂	40	等量溶剂	40
碳酸钠	100	100	100	100	100

1.3.2.2 对 α -葡萄糖苷酶抑制动力学研究

试验分为 2 组, 每组做 3 个平行, 分别加入 40 μL α -葡萄糖苷酶溶液 (0.5 U/mL) 及 50 μL PBS, 第 1 组加入 40 μL 样品液 (0.25 mg/mL), 第 2 组加入 40 μL 样品液 (0.5 mg/mL), 第 3 组中分别加入 90 μL PBS、50 μL PNPG 作为阳性对照。混合液置于 37

$^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 随后分别加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μL pNPG (10 mmol/L) 溶液, 充分混匀, 反应 20 min 后再加入 100 μL 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应, 在 405 nm 处检测 OD 值, 得到各个反应体系的吸光度变化率随底物浓度增加的变化趋势, 测定酶促反应的反应速率 (V), 根据 Lineweaver-

Burk 双倒数图,判断抑制类型^[21-23]。

1.3.3 枳椇提取物对 STZ 致 II 型糖尿病模型小鼠血糖的影响

1.3.3.1 STZ 致 II 型糖尿病动物模型建立 STZ 注射溶液配制方法:用无菌柠檬酸缓冲溶液(pH 4.4~4.5)配制质量浓度为 6.25 g/L 的 STZ 溶液^[24]。

取雄性昆明小鼠 70 只,适应性饲养(自由饮水和取食)1 周后称量体质量达(20±2)g 的健康小鼠,随机抽取 10 只作为正常对照组,剩余小鼠全部进行造模。将小鼠禁食不禁水 12 h 后,按 25 mg/kg/次体质量剂量腹腔注射 STZ,连续 3 d。注射完后立即恢复饮食,3 d 后对小鼠禁食 6 h,从小鼠尾部静脉取血,测定其空腹血糖 FBG 值,FBG>11.1 mmol/L 者,造模成功^[24-25],将造模成功的小鼠按照要求分组给药。

1.3.3.2 分组、给药及评价 将造模成功的糖尿病小鼠随机分成 6 组:模型组、SWE 组、SEE 组、PWE 组、PEE 组、阳性对照组,每组 10 只自由饮水,每天称取适量饲料以控制摄食。

灌胃给药:SWE 组、SEE 组、PWE 组、PEE 组将样品配成水悬浮液按 100 mg/kg/d 灌胃,盐酸二甲双胍组按 100 mg/kg/d 灌胃,正常对照组和模型组给予 0.5%的 CMC-Na。每天 1 次,连续灌胃 21 d^[24-25]。

体质量和空腹血糖测试:饲养过程中观察各组小鼠精神状态、饮水量、尿量的相对变化,监测体质量增长情况,灌胃后分别在第 7,14,21 天禁食 6 h 后尾部采血测量血糖(FBG)^[24-25]。

糖耐量试验:小鼠禁食不禁水 12 h 后,按 2 g/kg 剂量,给小鼠灌胃 50%葡萄糖溶液,然后在灌胃 0,30,60,120,180 min 后测试小鼠血糖值的变化^[24-25]。

1.3.4 枳椇子降血糖活性成分的分离纯化及结构鉴定 将降血糖效果最好的枳椇子醇提物干浸膏共 158.5 g 用甲醇溶解后与等量硅胶混和均匀,待溶剂完全挥干之后,进行硅胶柱层析,以体积比石油醚/乙酸乙酯=1:1、石油醚/乙酸乙酯=1:2、乙酸乙酯/乙酸乙酯/甲醇=1:1、乙酸乙酯/甲醇=1:2、甲醇为溶剂进行梯度洗脱,得到 Fr.1~6 共六相,再进行 Flash 中压液相色谱、Sephadex LH-20 柱色谱分离及重结晶,Fr.3 经分离得到化合物 1(26 mg)、化

合物 2(19 mg);Fr.4 分别得到化合物 3(57 mg)、化合物 4(52 mg);Fr.5 得到化合物 5(27 mg)。测定 5 个化合物的 ESI-MS、¹HNMR 和 ¹³CNMR、HSQC 和 HMBC 等数据以鉴定其结构。

2 试验结果与讨论

2.1 对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制作用

2.1.1 枳椇果梗提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 对 PWE 和 PEE 进行体外 α -葡萄糖苷酶的抑制活性试验,结果如图 1 所示,PWE 与 PEE 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性随着质量浓度的升高而逐渐增强,在 0.1~10 mg/mL 范围内呈剂量-效应相关性。通过线性回归分析得到 PWE 抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 为 2.28 mg/mL,PEE 的 IC₅₀ 为 4.63 mg/mL,PWE 抑制作用明显强于 PEE,由此可见枳椇果梗的水提取物是其抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质,再根据文献果梗的水提取物主要成分为枳椇多糖^[11-13],推测枳椇果梗中主要起体外降血糖作用的是多糖类成分^[2,4]。

2.1.2 枳椇子提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 从图 2 可以看出,枳椇子提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用在 0.1~10 mg/mL 范围内呈剂量-效应相关性。随着 SWE 和 SEE 质量浓度的升高,其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用也逐渐增强^[18-20],并且 SEE 的抑制活性强于 SWE,当质量浓度 ≥ 5 mg/mL 时,SEE 的抑制率与阳性对照阿卡波糖接近。通过线性回归分析得到 SWE 抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 为 1.65 mg/mL,SEE 的 IC₅₀ 为 0.97 mg/mL,阿卡波糖 IC₅₀ 为 0.22 mg/mL,SEE 的抑制作用要强于 SWE,也就是说乙醇提取物 SEE 是枳椇子抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质。根据文献显示枳椇子醇提物的主要成分是黄酮类化合物^[11,14-15],因此推测黄酮类化合物是枳椇子的降血糖活性成分。

2.1.3 对 α -葡萄糖苷酶抑制动力学研究结果 为了进一步探究枳椇子和枳椇果梗提取物 α -葡萄糖苷酶的抑制机制,结合 2.2.1 节试验结果,SEE 是枳椇子抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质,PWE 是果梗抑制 α -葡萄糖苷酶的主要活性物质,因此又分别对 PWE 和 SEE 抑制 α -葡萄糖苷酶的动力学进行了研究,以确定二者的抑制类型。

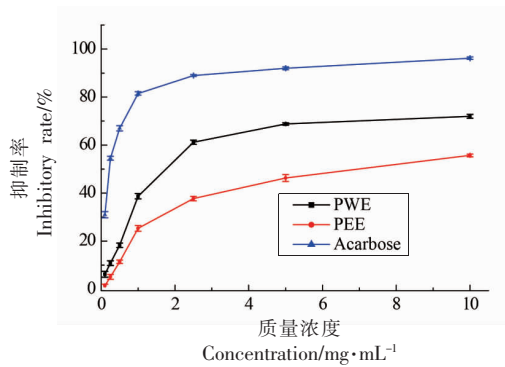


图1 枳椇果梗提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制曲线
Fig.1 Inhibition curve of α -glucosidase by PEW and PEE

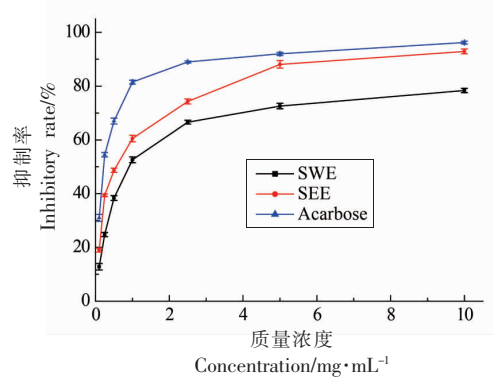


图2 枳椇子提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制曲线
Fig.2 Inhibition curve of α -glucosidase by SEW and SEE

酶抑制剂的作用类型主要包括竞争型、非竞争型、反竞争性型和混合型4种^[21]。利用Lineweaver-Burk 双倒数法分别对不同质量浓度 PWE 与 α -葡萄糖苷酶反应绘图^[22]。如图3所示,在加酶量相同时,随着 PWE 质量浓度的变化,反应速率的倒数与底物浓度的倒数呈线性关系,且所有直线相交于第二象限,说明 PWE 为混合型抑制剂^[23]。

根据 Lineweaver-Burk 双倒数法分别对不同质量浓度 SEE 与 α -葡萄糖苷酶反应绘图^[22]。如图4所示,在加酶量不变的情况下,随着抑制剂 SEE 浓度的增加,反应速率的倒数与底物浓度的倒数呈线性关系,但是所有的直线都相交于第一象限接近 Y 轴处,说明枳椇子的醇提取物 SEE 是一个明

显的竞争型抑制剂^[21-23]。

综上所述,SEE (IC_{50} 0.97 mg/mL)、SWE (IC_{50} 1.65 mg/mL)、PWE (IC_{50} 2.28 mg/mL) 和 PEE (IC_{50} 4.63 mg/mL),对 α -葡萄糖苷酶的抑制力由大到小为 SEE>SWE>PWE>PEE。随着抑制剂浓度的增加, α -葡萄糖苷酶的活性降低,呈浓度依赖性。并且 SEE 为 α -葡萄糖苷酶竞争型抑制剂,而 PWE 属于混合型抑制剂。SEE 和 SWE 在体外抑制 α -葡萄糖苷酶的效果均优于 PWE 和 PEE,因此枳椇子无论是水提取物还是醇提取物的体外降血糖活性均强于枳椇果梗,肉质果梗虽有一定降血糖作用但效果不及种子,说明枳椇药材的体外降血糖活性部位是种子。

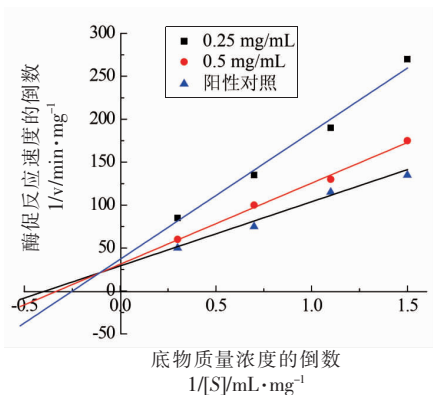


图3 枳椇果梗水提取物抑制 α -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.3 Inhibition Lineweaver-Burk curve of α -glucosidase by PWE

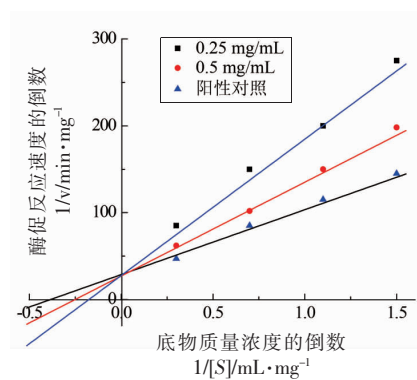


图4 枳椇子醇提取物抑制 α -葡萄糖苷酶的 Lineweaver-Burk 曲线

Fig.4 Inhibition Lineweaver-Burk curve of α -glucosidase by SEE

2.2 对 STZ 致 II 型糖尿病模型小鼠降血糖活性结果

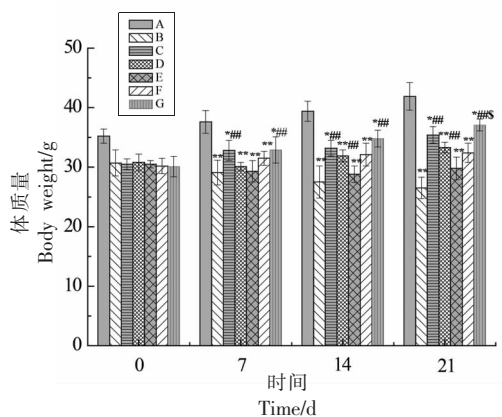
2.2.1 小鼠生活状态观察 正常对照组小鼠体质量明显增加,皮毛光亮,精神好,反应迅速。空腹血糖 $\text{FBG} > 11.1 \text{ mmol/L}$ 为造模成功小鼠,精神萎靡,反应迟缓,摄食量、饮水量、尿量明显增加,体型消瘦,明显呈“三多一少”状态^[24-25]。各给药治疗组的小鼠精神状态、体型、尿量和饮食等均有不同程度的改善,其中枳椇子提取物组的改善效果要比枳椇果梗提取物组的效果更明显,未给药的小鼠症状没有得到改善。

2.2.2 对小鼠体质量的影响 枳椇提取物 PWE、PEE、SWE 和 SEE 组按 100 mg/kg/d 的剂量灌胃给药;阳性对照组给予盐酸二甲双胍按 100 mg/kg/d 的剂量灌胃给药;空白组和模型空白组给予 0.5% 的 CMC-Na。各组小鼠每天灌胃给药 1 次,连续灌胃 21 d,分别在第 7, 14, 21 天称取体质量,结果见图 5。

试验结果表明,与模型组相比给药组的小鼠体质量均有较明显增加,SEE、SWE 和 PWE 组处理的小鼠体质量显著增加,SEE 组和 SWE 组体质量随着时间增加而逐渐增加,SEE 组效果最为明显在灌胃第 21 天时体质量增加具有显著性差异 ($P < 0.05$),效果优于阳性对照^[24-25],PWE 组的小鼠

体质量也呈现出先减后升的趋势,第 21 天时接近阳性对照;PEE 组在第 14 天时体质量降至最低之后开始上升,但最终结果略高于模型组。结果说明,SEE、SWE 和 PWE 可以不同程度的提高糖尿病小鼠体质量但作用效果不同,果梗水提取物见效较慢呈现先降后升的趋势。而枳椇子提取物时效性较快,给药后小鼠体质量持续增加,其中 SEE 组药效最好,优于阳性对照。

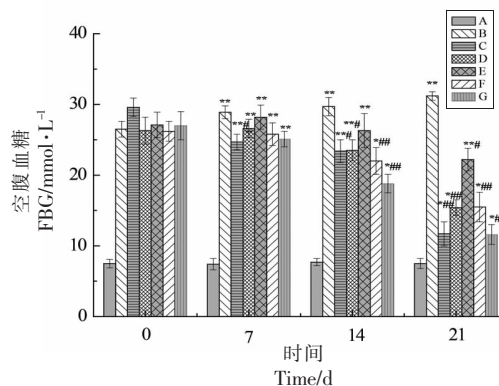
2.2.3 对小鼠空腹血糖的影响 试验结果如图 6 所示,灌胃给药前所有糖尿病小鼠的血糖都显著高于正常小鼠,当连续给药 7 d 后,测量各个小组的小鼠血糖值发现,SWE 与 SEE 样品组小鼠的血糖值都有所降低,PWE 和 PEE 组血糖略微升高,但 4 组血糖值都高于阳性对照组,说明此时的降血糖效果低于阳性对照。给药第 14 天时,与糖尿病组相比 SEE 组降血糖效果极明显 $P < 0.01$,SWE 组与 PWE 组小鼠血糖效果相当,有显著降血糖作用 $P < 0.05$,SEE、SWE 和 PWE 组降血糖效果均优于阳性对照组,而 PEE 组小鼠血糖下降不明显。给药第 21 天时,与糖尿病小鼠相比 SWE、SEE 和 PWE 组血糖降低均极显著 $P < 0.01$,表现出对血糖强的抑制作用,并且 SEE 组略优于阳性对照^[24-25],PEE 组小鼠血糖有所降低但不如其它 3 组样品。



注:A:正常对照组;B:糖尿病模型对照组;C:阳性对照组;D:PWE组;E:PEE组;F:SWE组;G:SEE组;与正常对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;与糖尿病对照组比较,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$;与阳性对照比较,\$表示 $P < 0.05$,\$\$表示 $P < 0.01$; $\bar{x} \pm s, n=10$ 。

图 5 样品对糖尿病小鼠体质量的影响

Fig.5 Influence of compounds on weight of diabetic mice



注:A:正常对照组;B:糖尿病模型对照组;C:阳性对照组;D:PWE组;E:PEE组;F:SWE组;G:SEE组;与正常对照组比较,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$;与糖尿病对照组比较,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$; $\bar{x} \pm s, n=10$ 。

图 6 样品对糖尿病小鼠空腹血糖的影响

Fig.6 Effects of compounds on fasting blood glucose in diabetic mice

整体来看,SEE组降血糖效果最好,略优于阳性对照,SWE组与PWE组效果相当。PWE与PEE组都呈现了先升高后降低的趋势,说明果梗提取物的起效时间较慢,而SWE与SEE组随时间的推移血糖处于持续逐渐下降的趋势,说明枳椇子提取物作用时效更快效果更好。整体来看,随着给药时间的增加枳椇提取物降血糖的效果也随之增加,说明降糖效果随给药时间的增加成正比例关系。

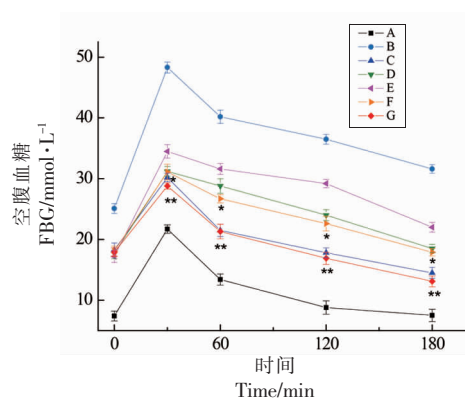
2.2.4 对糖尿病小鼠糖耐量的影响结果 小鼠禁食不禁水12h后,按2g/kg剂量灌胃50%葡萄糖溶液,然后在灌胃0,30,60,120,180min后测试小鼠血糖值的变化^[24-25],结果见图7。

从试验结果可以看出,给予小鼠灌服葡萄糖30min后,糖尿病对照组的小鼠血糖明显升高,而SEE组平均值为(28.8±0.5)mmol/L,显著($P<0.01$)低于糖尿病模型对照组(43.3±0.9)mmol/L,SWE与PWE组数值接近,二者与糖尿病小鼠对照组相比均具有统计学意义。之后,在灌胃60,120和180min后测得SEE组血糖平均值都显著($P<0.01$)低于糖尿病小鼠组,与阳性对照效果相当^[24-25]。整体来看,枳椇提取物可以不同程度地增强STZ糖尿病小鼠的葡萄糖耐受能力,活性顺序是SEE>SWE>PWE>PEE。试验结果显示,枳椇子水提物和醇提物比枳椇果梗提取物对STZ小鼠糖耐量的作用更为明显,尤其是枳椇子醇提物的效果最佳,而枳椇果梗醇提物的效果最差。另外,此试验结果与样品在体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用结果基本相符,也印证了SEE、PWE与SWE可以通过抑制葡萄糖吸收的关键酶从而降低血糖浓度,提高小鼠耐糖性。

2.3 枳椇子降血糖活性成分的分离及结构鉴定结果

将降血糖效果最好的SEE部分利用硅胶、Sephadex LH-20柱色谱、 C_{18} 中压液相色谱以及重结晶等方法纯化得到5个化合物,经过ESI-MS及 1H -NMR, ^{13}C -NMR核磁共振波谱分析最终确定了5个化合物的结构均为黄酮类化合物,见图8。

1) 化合物1 黄色无定型粉末,ESI-MS在 m/z 303.24处出现 $[M+H]^+$ 峰,所以分子质量是



注:A:正常对照组;B:糖尿病模型对照组;C:阳性对照组;D:PWE组;E:PEE组;F:SWE组;G:SEE组;与正常对照组比较,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$; $\bar{x}\pm s$, $n=10$ 。

图7 对STZ糖尿病小鼠糖耐量的影响

Fig.7 Influence of STZ diabetic mice on glucose tolerance

302.24, 推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$ 。 1H -NMR(400 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H :7.86(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-2'),7.56(1H,dd, $J=8.4,2.0$ Hz,H-6'),6.90(1H,d, $J=8.4$ Hz,H-5'),6.42(1H, $J=2.0$ Hz,H-8),6.19(1H,d, $J=2.0$ Hz,H-6),12.52为5-OH的氢信号,10.85是7-OH的氢信号。 ^{13}C -NMR(100 MHz, $DMSO-d_6$) δ_C :176.29(C-4),164.35(C-7),161.17(C-5),156.57(C-9),148.19(C-4'),147.23(C-2),145.51(C-3'),136.19(C-3),122.39(C-1'),120.41(C-6'),116.05(C-5'),115.49(C-2'),103.45(C-10),98.63(C-6),93.80(C-8)上述数据与文献^[26]对照基本一致。同时,化合物1与槲皮素标准品进行TLC分析显示 R_f 值完全一致,确定化合物1为槲皮素(Quercetin)。

2) 化合物2 白色无定型粉末,ESI-MS在 m/z 305.25处出现 $[M+H]^+$ 峰,所以分子质量是304.25,推测分子式为 $C_{15}H_{12}O_7$ 。 1H -NMR(400 MHz, $DMSO-d_6$) δ_H :6.94(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-2'),6.88(1H,dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.6$ Hz,H-6'),6.75(1H,d, $J=8.4$ Hz,H-5'),5.91(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-8),5.79(1H,d, $J=1.6$ Hz,H-6),4.97(1H,d, $J=11.6$ Hz,H-2),4.53(1H, $J=11.2$ Hz,H-3),11.93为5-OH的氢信号。 ^{13}C -NMR(100 MHz, $DMSO-d_6$) δ_C :198.31(C-4),167.33(C-7),163.76(C-5),163.01(C-9),146.29(C-4'),145.38(C-3'),128.61(C-1'),119.87(C-6'),115.79(C-2'),115.53(C-5'),

100.90(C-10), 96.46(C-6), 95.44(C-8), 83.49(C-2), 71.98(C-3) 上述数据与文献^[27]对照基本一致。同时, 化合物 2 与二氢槲皮素标准品 TLC 分析显示 Rf 值完全一致, 确定化合物 2 为二氢槲皮素(Dihydroquercetin)。

3) 化合物 3 淡黄色针状结晶, ESI-MS 在 m/z 317.24 处出现 $[M-H]^-$ 峰, 所以分子质量是 318.24, 推测分子式为 $C_{15}H_{10}O_8$ 。 ^1H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.25(2H, s, H-2', 6'), 6.38(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6); 12.52 是黄酮母核上 5 位羟基上的氢, 10.85 是 7 位羟基上的氢。 $^{13}C-NMR$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 176.21 (C-4), 164.32 (C-7), 161.17 (C-5), 156.51 (C-9), 147.25 (C-2), 146.16 (C-3', 5'), 136.34 (C-3), 136.30 (C-4'), 121.22 (C-1'), 107.56 (C-2', 6'), 103.41 (C-10), 98.60 (C-6), 93.65 (C-8) 上述数据与文献^[28]对照基本一致。同时, 化合物 3 与杨梅素标准品 TLC 分析显示 Rf 值完全一致, 确定化合物 3 为杨梅素(Myricetin)。

4) 化合物 4 淡黄色粉末, ESI-MS 在 m/z 321.27 处出现 $[M+H]^+$ 峰, 所以分子质量是 320.27, 推测分子式为 $C_{15}H_{12}O_8$ 。 ^1H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 11.92 (1H, s, 5-OH), 10.86 (1H, s, 7-OH), 8.96(2H, s, 3', 5'-H), 8.27(1H, s, 4'-OH), 6.39(2H, s, 2', 6'-H), 5.90(1H, d, $J=2.0$ Hz, 8-H), 5.86(1H, s, 6-H), 5.80(1H, d, $J=6.0$ Hz, 3-OH), 4.92(1H, d, $J=10.8$ Hz, 2-H), 4.43(1H, dd, $J=11.2$,

6.4 Hz, 3-H)。 $^{13}C-NMR$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 198.15 (C=O), 167.26 (C-7), 163.77 (C-5), 162.97 (C-9), 146.13 (C-3', 5'), 133.88 (C-4'), 127.54 (C-1'), 107.37 (C-2', 6'), 100.90 (C-10), 96.38 (C-6), 95.40 (C-8), 83.67 (C-2), 72.06 (C-3) 上述数据与文献^[29]对照基本一致。同时, 化合物 4 与二氢杨梅素标准品 TLC 分析显示 Rf 值完全一致, 确定化合物 4 为二氢杨梅素(Dihydromyricetin)。

5) 化合物 5 淡黄色结晶, 负离子 ESI-MS 分析在 m/z 463.37 处给出 $[M-H]^-$ 峰, 提示化合物的分子质量为 464.37, 推测其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 。 ^1H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 12.56 (1H, s, 5-OH), 8.05 (1H, s, 1'-H), 7.57 (1H, s, 6'-H), 6.85 (1H, s, 3'-H); δ_H 5.49, δ_H 3.57, δ_H 3.41, δ_H 3.23 和 δ_H 3.08 的 5 个氢信号说明有 β -D-吡喃葡萄糖。 $^{13}C-NMR$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 177.88 (C-4), 156.59 (C-2), 133.71 (C-3), 161.68 (C-5), 164.62 (C-6), 156.76 (C-7), 101.22 (C-8), 99.12 (C-4a), 93.95 (C-8a), 122.06 (C-1'), 116.62 (C-2'), 145.27 (C-3'), 148.91 (C-4'), 156.59 (C-5'), 121.59 (C-6') 为 B 环的碳信号, 104.3 (C-1''), 74.52 (C-2''), 76.92 (C-3''), 70.34 (C-4''), 70.06 (C-5'') 和 61.38 (C-6'') 为 β -D-吡喃葡萄糖碳信号, δ 177.88 和 δ 133.71 说明葡萄糖与 3-C 相连。上述数据与文献^[30]对照基本一致, 确定化合物 5 为槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖苷(Quercetin-3-O- β -D-glucoside)。

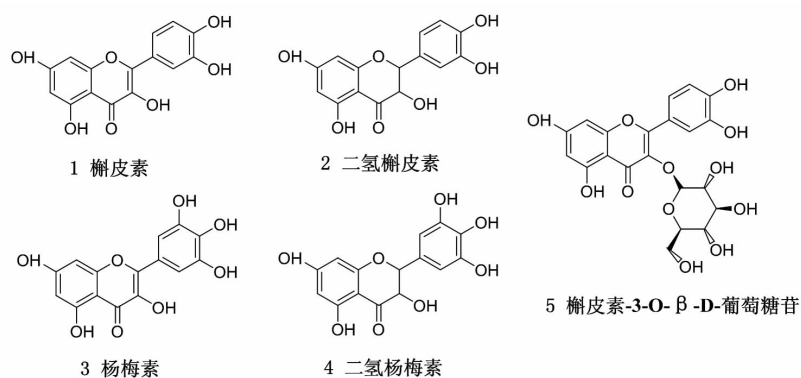


图 8 化合物 1-5 的结构式

Fig.8 The structural formula for the compounds 1-5

3 结论与展望

本文为了确定枳椇的降血糖活性物质基础,

对果梗与种子的水提物和醇提物在体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性、对 STZ 诱导 II 型糖尿病模型

小鼠活性以及有效物质基础进行了研究。结果表明,枳椇果梗与种子的4种提取物对 α -葡萄糖苷酶都有抑制作用,能够抑制STZ诱导II型糖尿病模型小鼠的体质量减轻和血糖升高,同时提高STZ小鼠糖耐量。枳椇提取物活性顺序是枳椇子醇提物>枳椇子水提物>枳椇果梗水提物>枳椇果梗醇提物。整体来看,枳椇种子无论是水提物还是醇提物的降血糖活性都高于枳椇果梗,是枳椇降血糖的主要活性部位,其中枳椇子醇提物降血糖效果最显著。从枳椇子中分离并鉴定出5个化合物均为黄酮,分别是槲皮素、二氢槲皮素、杨梅素、二氢杨梅素和槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷,说明以上5种黄酮类化合物是枳椇子降血糖的主要活性成分。

本论文研究结果证实,枳椇种子是中药枳椇的主要药用部位,枳椇子总黄酮的降血糖功效优于枳椇多糖^[10-11,31],枳椇子的药效物质基础为槲皮素、二氢槲皮素、杨梅素、二氢杨梅素和槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。本研究结果为解决枳椇果梗和种子的混用问题,为食品药品检验和枳椇的应用提供了理论依据,为进一步开发利用枳椇资源提供了新的途径。

参 考 文 献

- [1] 谢志民. 枳椇和枳椇种子的本草考证[J]. 中药材, 1994, 17(6): 44-45.
XIE Z M. Herbal textual research on *Hovenia dulcis* Thunb and *Hovenia dulcis* Thunb seeds[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1994, 17(6): 44-45.
- [2] 叶文斌, 樊亮, 王昱, 等. 拐枣多糖对糖尿病小鼠血糖血脂的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(1): 6-12, 5.
YE W B, FAN L, WANG Y, et al. Effects of polysaccharides extracted from *Hovenia acerba* Lindl. on glycemia and lipidemia in diabetic mice[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 6-12, 5.
- [3] 党竟兢, 王伟, 宋小宝, 等. 新型降血糖中药方剂对STZ诱导小鼠糖尿病的影响[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(9): 89-92.
DANG J J, WANG W, SONG X B, et al. Effects of a new hypoglycemic Chinese herbal prescription on STZ induced diabetes mellitus in mice [J]. Guizhou Agriculture Sciences, 2017, 45(9): 89-92.
- [4] 嵇扬, 陈善, 张癸荣, 等. 枳椇水提取液对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖和肝糖原含量的影响[J]. 中药材, 2002, 25(3): 190-191.
JI Y, CHEN S, ZHANG K R, et al. Effects of *Hovenia dulcis* thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2002, 25(3): 190-191.
- [5] 向进乐, 李志西, 李欢, 等. 枳椇果梗不同极性多酚及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(15): 25-29.
XIANG J L, LI Z X, LI H, et al. Separation and antioxidant activity of polyphenols with different polarities from *Hovenia acerba* fruit[J]. Food Science, 2011, 32(15): 25-29.
- [6] 张保, 李立天, 张萌, 等. 拐枣枝多糖提取工艺优化与其抗氧化性研究[J]. 中国酿造, 2016, 36(7): 155-169.
ZHANG B, LI L T, ZHANG M, et al. Optimization of extraction technology of *Hovenia acerba* sticks polysaccharides and its antioxidant activity[J]. China Brewing, 2016, 36(7): 155-169.
- [7] 龚明, 黄宽, 叶丽芝, 等. 枳椇子解酒方护肝活性成分提取工艺优化及药效学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(2): 125-129.
GONG M, HUANG K, YE L Z, et al. Optimization extraction process of hepatoprotective active constituent from *Hovenia dulcis* Thunb and pharmacodynamic studies[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2016, 21(2): 125-129.
- [8] 卫生部药政管理局. 中药材手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 249-250.
Ministry of Health Pharmaceutical Administration. Handbook of traditional Chinese medicines [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1959: 249-250.
- [9] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海: 上海科技出版社, 2005: 2233-2234.
Nanjing University of Chinese Medicine Dictionary of Chinese Materia Medica[M]. Second edition. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2005: 2233-2234.
- [10] 陆石英, 覃志高. 药食两用枳椇的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1865-1870.
LU S Y, QIN Z G. Research progress on *Hove*

- niaduleis* Lindl. for medicine and food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(6): 1865–1870.
- [11] 徐方方, 刘博, 张晓琦. 枳椇属化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4827–4835.
- XU F F, LIU B, ZHANG X Q. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Hovenia*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(20): 4827–4835.
- [12] 许洪波, 王娟娟, 唐志书, 等. 响应面法优化枳椇子多糖提取工艺及其体外生物活性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 719–724.
- XU H B, WANG J J, TANG Z S, et al. Optimization of extraction process for polysaccharides from fruits of *Hovenia acerba* by response surface methodology and study on its biological activities *in vitro*[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2019, 30(6): 719–724.
- [13] 冯自立, 党娅. 响应面法优化微波提取枳椇子多糖及其清除羟自由基活性研究[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 56–60.
- FENG Z L, DANG Y. Optimization by response surface analysis of microwave-assisted extraction and hydroxyl radical scavenging activity of polysaccharide from *Hovenia acerba* Lindl[J]. Food Science, 2013, 34(12): 56–60.
- [14] 田智勇, 柴郑, 徐亚菲, 等. 正交设计优选枳椇子中总黄酮的提取工艺[J]. 河南大学学报(医学版), 2015, 34(4): 247–251.
- TIAN Z Y, CHAI Z, XU Y F, et al. Optimizing the ultrasonic extracting method of total flavonoids from *Hovenia dulcis* Thunb by orthogonal design[J]. Journal of Henan University, 2015, 34(4): 247–251.
- [15] 朱新鹏, 陈芳, 秦绒, 等. 拐枣总黄酮超声波辅助提取工艺优化[J]. 包装与食品机械, 2020, 38(3): 22–27.
- ZHU X P, CHEN F, QIN R, et al. Optimization of ultrasonically assisted extraction of total flavonoids from *Hovenia acerba*[J]. Packaging and Food Machinery, 2020, 38(3): 22–27.
- [16] NAKAGAWA K. Studies targeting α -glucosidase inhibition, antiangiogenic effects, and lipid modification regulation: Background, evaluation, and challenges in the development of food ingredients for therapeutic purposes[J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2013, 77(5): 900–908.
- [17] ZHANG J T, SUN L J DONG Y S H, et al. Chemical compositions and α -glucosidase Inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits[J]. Food Chemistry, 2019, 299(30): 125102–125113.
- [18] ZHANG B, DENG Z, RAMDATH D, et al. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glycosidase and pancreatic lipase[J]. Food Chemistry, 2015, 172(1): 862–872.
- [19] HWANG J K, KONG T W, BAEK N I, et al. α -glucosidase inhibitory activity of hexagalloylglucose from the galls of quercus infectoria[J]. Planta Medica, 2000, 66(3): 273–274.
- [20] ONOSE S, IKEDA R, NAKAGAWA K, et al. Production of the α -glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus* species [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 516–523.
- [21] 姜丽丽, 张中民, 陈道玉, 等. 白藜芦醇对 α -葡萄糖苷酶的抑制动力学及抑制机制[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 70–74.
- JIANG L L, ZHANG Z M, CHEN D Y, et al. Inhibition kinetics and mechanisms of resveratrol on α -glucosidase[J]. Food Science, 2019, 40(11): 70–74.
- [22] 郭时印, 李林, 周虹, 等. 1-脱氧野尻霉素对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用机制[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 45–50.
- GUO S Y, LI L, ZHOU H, et al. Mechanism for the inhibitory effect of 1-deoxynojirimycin on α -glucosidase[J]. Food Science, 2019, 40(5): 45–50.
- [23] LUO C T, ZHENG H H, MAO S S, et al. Xanthones from *Swertia mussotii* and their α -glycosidase inhibitory activities[J]. Planta Medica, 2014, 80(2/3): 201–208.
- [24] 沈亚非, 徐焱成. 链脉佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(2): 79–80.
- SHEN Y F, XU Y C. Study on experimental diabetes animal model in rats induced by streptozotocin [J]. Journal of Practical Diagnosis and Therapy, 2005, 19(2): 79–80.
- [25] 王云威, 王景雪. 铁皮石斛多糖对 2 型糖尿病小鼠降糖降脂的作用[J]. 食品科学, 2020, 41(21): 127–132.
- WANG Y W, WANG J X. Hypoglycemic and lipid-

- lowering effects of polysaccharides from *Dendrobium officinale* stems in type 2 diabetic mice[J]. Food Science, 2020, 41(21): 127–132.
- [26] LIU T, LI Z Q, LI R Y, et al. Composition analysis and antioxidant activities of the *Rhus typhina* L. Stem[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 9(5): 332–338.
- [27] LI M C, XIE C J, MENG C W, et al. Chemical constituents from *Hovenia dulcis* Thunb. and their chemotaxonomic significance[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2021, 94: 104214.
- [28] ZHANG X Q, XU F F, WANG L, et al. Two pairs of new diastereoisomeric flavonolignans from the seeds of *Hovenia acerba* [J]. Phytochemistry Letters, 2012, 5(2): 292–296.
- [29] HU H C, LUO F, WANG M J, et al. New method for extracting and purifying dihydromyricetin from *ampelopsis grossedentata*[J]. ACS Omega, 2020, 5(23): 13955–13962.
- [30] 王昊, 夏明辉, 庞旭, 等. 荷叶中苷类成分的分离鉴定[J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(5): 368–373.
- WANG H, XIA M H, PANG X, et al. Isolation and identification of glycosides from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn[J]. Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2017, 36(5): 368–373.
- [31] 何荣军, 孙江亭, 吴石金, 等. 枳椇果实活性成分的研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(2): 100–105.
- HE R J, SUN J T, WU S J, et al. Research progress on active ingredients of *Hovenia dulcis* [J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2020, 49(2): 100–105.

Studies on the Hypoglycemic Activity and Substance Basis of *Hovenia acerba* Lindl Pulp and Seed *in Vitro* and *in Vivo*

Kong Yang¹, Yan Hui¹, Wang Changzhao², Shi Chunyang¹, Tian Bin¹

(¹School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021

²Xi'an Customs Technology Center, Xi'an 710068)

Abstract *Hovenia acerba* Lindl is a traditional food or medicine homologous to food and medicine, which has the effects of lowering blood sugar and pressure, relieving alcohol and protecting liver. However, the mixed use of *Hovenia acerba* Lind pulp and seed brings a lot of inconvenience to its application and inspection. In order to determine the active site of *Hovenia acerba* Lind, the effects of water and 95% ethanol extract from pulp and seed on α -glucosidase activity *in vitro* and Streptozocin (STZ) -induced hypoglycemic activity and its substance basis in type II diabetes model mice were studied. The results showed that seed ethanol extract (SEE) was the main active substance for inhibiting α -glucosidase, and the IC₅₀ of SEE was 0.97 mg/mL, which was a competitive inhibitor. The water extract of pulp (PWE) was the main active substance, and the IC₅₀ of PWE was 2.28 mg/mL, which was a mixed inhibitor. The inhibition activity of α -glucosidase in SEE and seed water extract (SWE) was higher than PWE and pulp ethanol extract (PEE). Animal experiments showed that the four extracts could reduce the blood glucose and improve the glucose tolerance and body weight of the mice to varying degrees, but the SEE had the most significant effect ($P < 0.01$). Overall, the order of hypoglycemic activity was SEE>SWE>PWE>PEE, seed is the main active part of *Hovenia acerba* Lind in lowering blood glucose, and its hypoglycemic effect is stronger than that of pulp. Five compounds were isolated and purified from the SEE by silica gel, C₁₈ medium pressure liquid chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. Compounds 1–5 were identified as quercetin, dihydroquercetin, myricetin, dihydromyricetin, and quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside by ESI-MS, ¹HNMR, ¹³CNMR, HSQC and HMBC. This study provided a theoretical basis for solving the problem of *Hovenia acerba* Lind pulp and seed mixing, and provided a new way for further development and utilization the resources.

Keywords *Hovenia acerba* Lindl; α -glucosidase; streptozocin; hypoglycemic activity