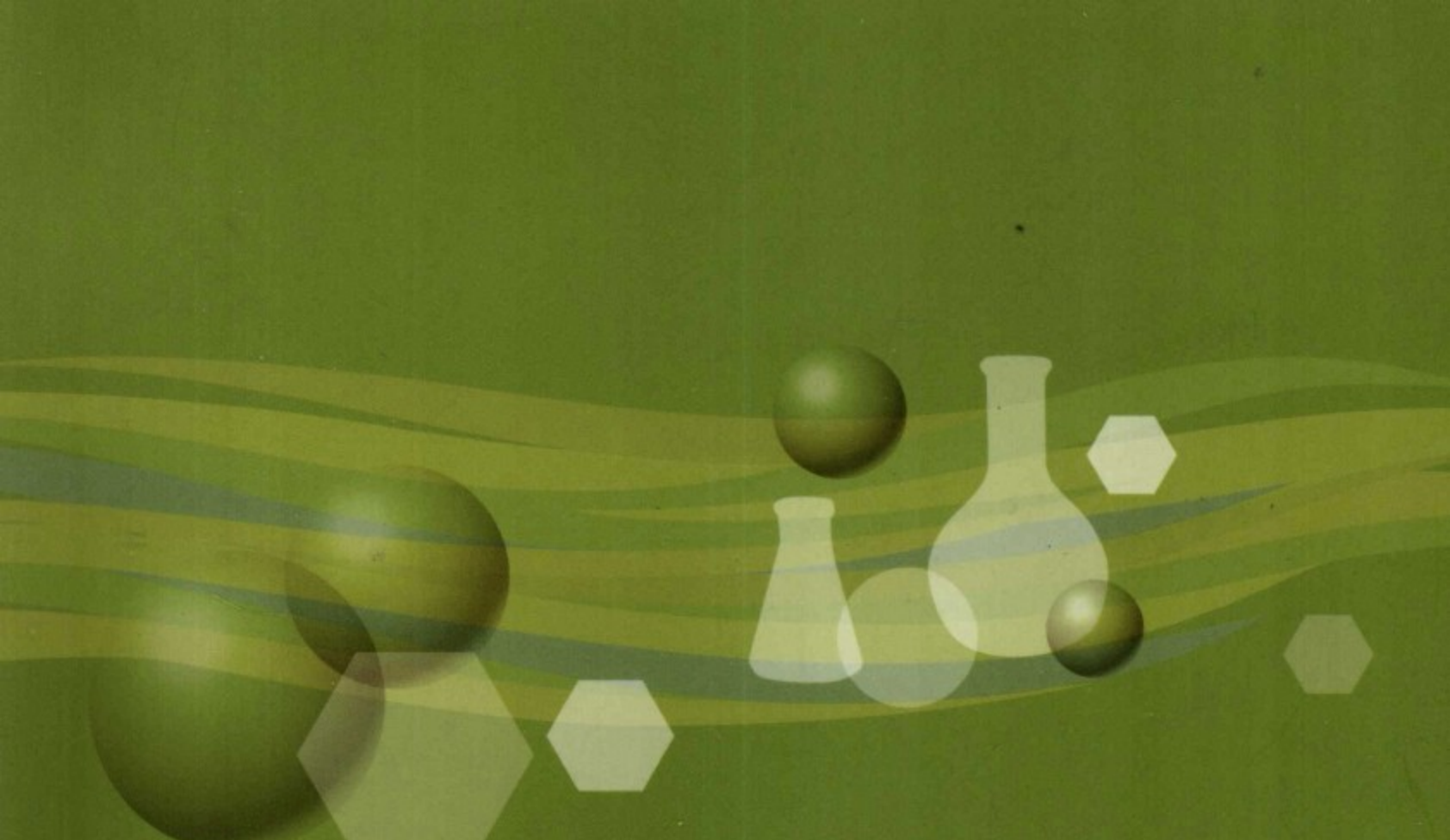


天然产物降血糖 功能性成分研究

靳学远 董海丽 著

上海交通大学出版社





天然产物

降血糖功能性成分研究

TIANRAN CHANWU
JIANGXUETANG GONGNENGXING CHENGFEN YANJIU

靳学远 董海丽 著

上海交通大学出版社

巍巍交大 百年书香
www.jiaodapress.com.cn
bookinfo@sjtu.edu.cn



责任编辑 / 陆义群
陈振杰
封面设计 / 朱 懿

天然产物降血糖功能性成分研究

TIANRAN CHANWU
JIANGXUETANG GONGNENGXING CHENGFEN YANJIU

ISBN 978-7-313-05738-9



9 787313 057389 >

定价: 22.00元

序

糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病,常伴随多种慢性并发症,造成多器官、多系统的广泛损害,具有较高的致残率,是继心脑血管疾病、癌症之后危害人类身体健康的第三大疾病。根据世界卫生组织研究报告,全球糖尿病患者已超过 1.5 亿,预计到 2025 年将突破 2 亿。美国大约有 1 600 万糖尿病患者,我国患者也已达 2 000 多万。糖尿病不仅因急性并发症导致生命危险,更重要的是各种严重的慢性并发症,如糖尿病性肾病、糖尿病性眼部疾患、糖尿病性神经病变、糖尿病性心脏病及糖尿病合并高血压、高血脂症等,糖尿病作为一种常见的慢性非传染性疾病,已经成为全球关注的严重公共卫生问题。

目前治疗糖尿病及其并发症的药物主要依赖于化学及生物化学类药物,但据报道,使用这些药物并不能使患者完全康复,且毒副作用大、价格昂贵。因此,从纯天然药物中去筛选和研究有效、安全、方便使用的降糖药物越来越引起人们的高度关注,天然产物中有效化学成分具有的良好药理活性和治疗糖尿病的良好效果,为将来治疗糖尿病新型药物的研发提供了可靠的依据。

在天然产物中,近年来发现了许多降血糖成分,如多糖、黄酮、皂苷、生物碱、植物多酚、萜类、蛋白质和氨基酸、不饱和脂肪酸、含硫化合物和苯丙素酚类等化合物。研究者对这些成分的降糖效果、降糖机理等进行了大量的研究,取得了丰硕成果。同时,在天然产物的提取、分离和纯化上,除传统的提取方法外,许多新技术得到广泛应用,如:物理场强化提取、仿生提取、酶法提取、超临界流体提取、树脂吸附纯化、超滤、分子蒸馏和超微粉碎技术等。这些新技术的应用极大地提高了天然产物化学成分的提取效率、收率和质量,展示了它们在天然产物提取分离方面广阔的应用前景。

淮南联合大学化工系的靳学远和董海丽两位老师近年来在天然产物降血糖成分的提取、分离纯化和活性分析方面进行了大量的工作,《天然产物降血糖功能性成分研究》一书是二位多年来工作的总结,从多糖、黄酮、皂苷、生物碱、植物多酚、萜类、蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸、含硫化合物和苯丙素酚类等天然化合物的提取、分离纯化和活性分析方面进行了详细的阐述,内容丰富。愿该书的出版,能为进一步提高天然降糖成分的研究水平,发扬光大我国传统医药产业起到积极的推进作用。

王 磊

2009 年 3 月于淮北相山

前 言

糖尿病是一种病情较复杂、较难治愈的影响健康和生命的内分泌代谢性疾病,常伴随多种慢性并发症,造成多器官、多系统广泛损害,具有较高的致残率,给病人及家庭带来极大的痛苦。随着我国社会经济的迅速发展,人民生活水平的提高,以及社会老龄化的迅速形成,糖尿病发病率呈逐年上升趋势,已迅速成为危害人民健康的主要疾病之一。降血糖药物通常包括口服降糖药、中药和胰岛素。西药虽短期降糖作用明显,但治疗毒副作用大,容易导致低血糖,而且价格昂贵,而天然药物降血糖作用温和持久、毒副作用小、并且具有综合治疗作用,可有效地延缓并发症的发生和发展。因此从天然药物中寻找降血糖有效成分的研究日益受到重视。近年来,已从天然药物中发现和分离出多种疗效显著的活性成分,而且还对其活性成分的化学结构进行了研究,为开发治疗糖尿病的药物增添了新的途径。

为了使广大读者更好地了解天然产物降血糖功能性成分的发展状况,传播这一领域的知识和技术,促进从天然药物中去筛选和研究有效、安全、方便使用的降糖药物,使传统中药及天然的抗糖尿病有效成分以其新颖的化学结构和较好的药理活性,为糖尿病药物的研制开发提供借鉴。作者根据掌握的国内外资料和研究工作的积累,已发表了多篇有影响的论文。在此基础上,作者根据近年来国内外在降血糖功能性成分这一领域的最新研究进展以及我们多年科研工作的积累,特撰写成此书。本书共分8章,前3章分别介绍糖尿病药物的研究进展、糖尿病药物筛选模型、天然产物活性成分分离纯化方法,后5章分别对多糖、黄酮、皂苷、生物碱、萜类、含硫化合物和不饱和脂肪酸等降血糖成分的近年来国内外研究进展进行了介绍。本书可作为从事医药、食品、营养、卫生、生化等领域的科研人员参考。

本书的第一、二、三、四章由淮南联合大学靳学远撰写,第五、六、七、八章由淮南联合大学董海丽撰写。本书旨在使读者熟悉和了解天然产物降血糖功能性成分的基本知识和相关开发技术,传播这一学科领域的知识,对促进我国天然产物降血糖功能性成分提取及利用有所裨益。鉴于该领域发展速度很快,加上作者学识有限,书中的遗漏和错误之处在所难免,敬请读者批评指正。

本书在撰写过程中得到了淮北煤炭师范学院院长王磊教授及邓凡政教授、华中农业大学韩鹤友教授、安徽师范大学叶世勇教授、淮南联合大学李跃中教授的热情支持和鼓励;王磊院长又在百忙中抽出时间为我们作序;郑州轻工业学院的纵伟教授对本书的初稿进行了评阅,提出了许多宝贵意见,并对有关章节进行补充修

改;西北农林科技大学杨胜祥博士对部分章节的内容筛选提出了很好的建议;淮南联合大学刘红、秦霞两位老师在文稿的整理、打印等方面付出了许多辛勤的劳动;书中引用了国内外同行发表的一些宝贵资料,在此一并致谢。

愿本书的出版能促进我国天然产物降血糖功能性成分研究的深入发展,鼓励创新思维,以期获得更高层次的研究成果,从天然药物中发现和分离出更多疗效显著的活性成分,开发出更多治疗糖尿病的新药,为治疗糖尿病做出贡献。

靳学远

2009年3月于安徽淮南

靳学远
解学
PDG

内 容 提 要

本书是一本介绍天然产物降血糖功能性成分的专著,作者根据近年来国内外在天然产物降血糖功能性成分这一领域的最新研究进展以及多年科研工作的成果撰写而成。

全书共分8章。首先介绍糖尿病的药物研究进展,然后介绍目前常用的糖尿病筛选模型,最后分别介绍多糖、黄酮、皂苷、萜类、硫键化合物、生物碱和不饱和脂肪酸的组成、分类、分离纯化方法以及具体的降血糖研究实例。

本书可作为从事食品、营养、医药、卫生、生化等领域的科研人员、生产管理人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

天然产物降血糖功能性成分研究/靳学远,董海丽著.

—上海:上海交通大学出版社,2009

ISBN978-7-313-05738-9

I. 天... II. ①靳... ②董... III. 糖尿病—
药物:天然有机化合物—研究 IV. R977.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 047081 号

天然产物降血糖功能性成分研究

靳学远 董海丽 著

上海交通大学出版社出版发行

(上海市番禺路 951 号 邮政编码 200030)

电话:64071208 出版人:韩建民

常熟市梅李印刷有限公司印刷 全国新华书店经销

开本:787mm×960mm 1/16 印张:11.25 字数:228 千字

2009 年 6 月第 1 版 2009 年 6 月第 1 次印刷

印数:1~1030

ISBN978-7-313-05738-9/R 定价:22.00 元

版权所有 侵权必究

目 录

第 1 章 糖尿病与降糖药物	1
1.1 糖尿病的分型	1
1.2 糖尿病新的诊断标准	4
1.3 糖尿病治疗药物	5
参考文献	31
第 2 章 糖尿病药物筛选	32
2.1 药物筛选模型的分类	32
2.2 糖尿病药物筛选动物模型	34
2.3 基于细胞水平的糖尿病药物筛选模型	39
2.4 基于酶水平的糖尿病药物筛选模型	42
参考文献	43
第 3 章 天然产物中功能性成分提取与分离	46
3.1 传统提取法	46
3.2 传统有效成分的分离和精制	47
3.3 超临界流体萃取	48
3.4 微波萃取	54
3.5 超声波萃取	59
3.6 分子蒸馏技术	64
3.7 膜分离技术	69
3.8 高速逆流色谱技术	72
3.9 大孔树脂吸附分离	76
参考文献	79
第 4 章 多糖及降血糖作用	84
4.1 多糖的提取	84
4.2 多糖的纯化	86
4.3 多糖的纯度鉴定	90

4.4 多糖的结构分析	90
4.5 多糖降血糖作用	94
参考文献	98
第5章 黄酮及降血糖作用	102
5.1 黄酮类化合物的结构与分类	102
5.2 黄酮类化合物的提取和纯化	103
5.3 黄酮的分析方法	108
5.4 黄酮降血糖研究	112
参考文献	114
第6章 皂苷及降血糖作用	118
6.1 皂苷的结构	118
6.2 皂苷的提取与纯化方法	121
6.3 皂苷的分析方法	125
6.4 降血糖皂苷	131
参考文献	140
第7章 生物碱及降血糖作用	144
7.1 生物碱的分类及结构类型	144
7.2 生物碱的提取和纯化	145
7.3 生物碱的分析	151
7.4 生物碱降血糖研究	155
参考文献	159
第8章 其他天然产物降血糖成分	162
8.1 植物多酚	162
8.2 萜类	163
8.3 蛋白质和氨基酸	166
8.4 不饱和脂肪酸	167
8.5 含硫化合物	167
参考文献	168

第 1 章 糖尿病与降糖药物

1.1 糖尿病的分型

1.1.1 先前所用的糖尿病的分型

世界各国先前所用的糖尿病的分型诊断标准是根据 1979 年美国糖尿病数据组(NDDG)和 1990 年及 1985 年 WHO 公布的标准来诊断和分类的。将糖尿病分为临床类型和统计学危险性类型两大类,其分类标准见表 1-1。

表 1-1 先前所用的糖尿病的分型诊断标准

临床类型	(1) 糖尿病:胰岛素依赖型糖尿病,非胰岛素依赖型糖尿病(肥胖型或非肥胖型),营养不良相关型糖尿病,其他类型(如胰腺疾病、内分泌疾病、药源性或化学物质引起、胰岛素或其受体异常,某些遗传综合征等) (2) (葡萄)糖耐量异常(肥胖或非肥胖) (3) 妊娠型糖尿病
统计学危险性类型	(1) 曾有糖耐量异常 (2) 潜在糖耐量异常

1.1.2 新的糖尿病分型

随着对糖尿病的病因和发病机制研究的深入,许多学者认为,对糖尿病的诊断标准和分类分型应加以修改。1995 年,美国糖尿病协会成立了国际性的专家委员会,提出了对 1980 年糖尿病诊断标准和分型的修改意见。1996 年 12 月,在英国召开了有 19 名专家参加的糖尿病及其并发症的诊断标准和分型的咨询委员会。1997 年 7 月,美国糖尿病协会(ADA)发表了糖尿病诊断标准及分型的修改报告。1999 年,得到 WHO 的认可并建议临床广泛采用,以取代先前的糖尿病诊断术语,新的糖尿病的分型如下:

1.1.2.1 1 型糖尿病

胰岛 β 细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏。分为自身免疫性(包括急性发病及缓慢发病)和特发性。临床可分为急性起病典型 1 型糖尿病(多见于青少年)、成人隐匿自身免疫型糖尿病和特发性 1 型糖尿病。

1.1.2.2 2 型糖尿病

根据病因不同可分为胰岛素抵抗为主伴胰岛素分泌不足,或胰岛素分泌不足

为主伴或不伴胰岛素抵抗, 占有糖尿病患者的 90% 以上, 其病因尚不十分明确。现认为由多基因遗传和环境因素(主要为运动不足和能量相对过剩)共同促发, 其遗传倾向较 1 型糖尿病更加明显。大多数这种病人为肥胖, 而肥胖本身可加重胰岛素抵抗。2 型糖尿病病人也可发生酮症, 其主要病因目前还不清楚。当病因和发病机制明确后, 可能有部分患者将从这一类中归入其他类型。

1.1.2.3 特异性糖尿病

特异性糖尿病包括一系列病因比较明确或继发性糖尿病, 主要有以下 8 类:

1) β 细胞遗传缺陷

现主要包括年轻起病成人型糖尿病(MODY)和线粒体糖尿病。MODY 根据基因异常的不同可分为 3 个亚型: MODY1, 位于 12 号染色体上的肝细胞核转录因子突变, 称为肝细胞核因子-4 α (HNF-4 α); MODY2, 位于 7 号染色体短臂的葡萄糖激酶基因突变; MODY3, 位于 20 号染色体上的肝细胞核转录因子突变, 称之为肝细胞核因子-1 α (HNF-1 α)。

线粒体糖尿病是 1992 年 Ven den Ouweland 等及 Ballinger 等分别确认由线粒体基因(mt)tRNA^{Leu} 基因的二氢尿嘧啶环上 mt3243A $\rightarrow$ G 点突变及 mt 大段缺乏引起, 临床表现为糖尿病及耳聋家系。

2) 胰岛素作用遗传缺陷

胰岛素受体缺失或突变, 其范围可以从高胰岛素血症和轻度的高血糖到严重的糖尿病, 常伴有黑棘皮症、多毛和女性男性化, 包括 A 型胰岛素抵抗、妖精症、Robson-Mendenhall 综合征、脂肪萎缩性糖尿病等。

3) 内分泌疾病

许多内分泌激素, 如生长激素、糖皮质激素、胰升糖素和肾上腺素等可拮抗胰岛素的作用, 这些激素过量分泌(如肢端肥大症、皮质醇增多症、胰升糖素瘤、嗜铬细胞瘤)可以引起糖尿病, 这些情况常发生在事先已存在胰岛素分泌缺陷的患者中。当上述疾病被消除后, 高血糖可得到缓解或恢复正常。

4) 胰腺疾病

任何一种引起弥漫性胰岛损伤的病变, 均可引起高血糖, 这些病变包括纤维钙化胰腺病、胰腺炎、外伤或胰腺切除、肿瘤或肿瘤浸润、囊性纤维化和血色病等。胰腺疾病所致的糖尿病多需长期应用胰岛素替代治疗。

5) 药源性或化学物质所致糖尿病

许多药物对糖代谢有不良影响, 在糖尿病易感的人群中可能诱发糖耐量异常或糖尿病发生。常见的药物如烟酸、糖皮质激素、甲状腺素、肾上腺拮抗剂、噻嗪类利尿药、大仑丁、喷他脒(pentamidine)、Vacor(毒鼠药)、 α -干扰素等。

6) 感染

先天性风疹及巨细胞病毒感染等可以伴随 β 细胞的破坏,但这些患者大部分具有1型糖尿病特征性组织相容性抗原(HLA)和免疫性标记物;除此之外,柯萨奇B₄病毒、巨细胞病毒、腺病毒以及流行性腮腺炎病毒等均可以引起这种类型的糖尿病。

7) 少见的免疫介导的糖尿病。

胰岛素自身免疫综合征:机体自发产生胰岛素自身抗体,高滴定度和高亲和力的抗体与胰岛素结合可降低胰岛素的生物活性,导致糖耐量受损或糖尿病发生,但当抗体与胰岛素解离,则可能导致低血糖发生,特别是在空腹状态下。

抗胰岛素受体抗体(黑棘皮病Ⅱ)可以通过与胰岛素受体结合,阻断靶组织中胰岛素受体与胰岛素的结合,从而导致糖耐量减退或糖尿病发生。但在某些情况下,这些抗体在与胰岛素受体结合后,其作用可以作为胰岛素受体的激动剂而导致低血糖的发生。在患有系统性红斑狼疮以及其他自身免疫性疾病的患者中,偶可发现有胰岛素受体抗体的存在。

Stiff Man 僵人综合征是中枢神经系统的一种自身免疫性疾病,其特征性表现为中枢性肌肉强直,并伴有痛性痉挛,患者体内通常有较高的 IGA 和 GAD 自身抗体的滴定度,大约有 1/3 的患者将发展为糖尿病。

此外,有报道,使用 α -干扰素治疗的患者可能发生糖尿病,并多伴随有胰岛细胞抗体的出现,在某些情况下可导致胰岛素严重不足。

8) 其他与糖尿病相关的遗传综合征

许多遗传综合征伴随有升高的糖尿病发病率,这些包括 Down 综合征、Friedreich 共济失调、Huntington 舞蹈症、Klinefelter 综合征、Lawrence Willin 综合征、肌强直性萎缩、先天性卵巢发育不良、Wolfram 综合征等。

1.1.2.4 妊娠型糖尿病

妊娠型糖尿病是指在妊娠期间发生或首次发现的葡萄糖耐量异常(IGT)和糖尿病,但需与妊娠前已患糖尿病合并妊娠者区分开来。应该强调的是,妊娠早期糖耐量正常者,并不表明以后不发生糖尿病:糖耐量诊断试验,ADA 仍沿用以前使用的方法,而 WHO 再次强调诊断时应用 75 g 葡萄糖做糖耐量试验。

1.1.3 新旧糖尿病分型区别

(1) 取消“胰岛素依赖型糖尿病(1DDM)”和“非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)”两个术语,因该分型是基于临床治疗,常给临床糖尿病的诊断和理解带来混乱。因非胰岛素依赖型糖尿病在许多情况下,需要使用或依赖胰岛素来控制病情,如胰岛 β 细胞功能继发性衰竭、严重的急性或慢性并发症等;而部分胰岛素依赖型糖尿病如 MDA,在早期并不一定依赖胰岛素也可使病情得到控制。所以继续保留 I 型糖

尿病和Ⅱ型糖尿病的提法,取消了罗马数字,建议采用阿拉伯数字表示为1型糖尿病和2型糖尿病。

(2) 取消了至今尚不能确认的营养不良相关性糖尿病,将其中纤维钙化性胰腺疾病置于新分型的胰外分泌病中,取消了2型糖尿病的非肥胖及肥胖亚型。

(3) 保留了妊娠期糖尿病,并在定义中限定了此种情况是指妊娠过程中初次发现的任何程度的糖耐量异常,不包括妊娠前已知的糖尿病。

(4) 增加了“特异型糖尿病”这个诊断术语,在特异型糖尿病中,根据病因和发病机制分为8个亚型,其中包括了1985年分型中的继发性糖尿病,同时将病因和发病机制比较明了的及新近发现的糖尿病亦归属其中,如1985年分型中的2型糖尿病亚型-MODY和线粒体糖尿病等。

1.2 糖尿病新的诊断标准

1.2.1 糖尿病新的诊断标准

(1) 有糖尿病症状并且随机血浆葡萄糖浓度 ≥ 11.1 mmol/L或空腹血浆葡萄糖浓度 ≥ 7.0 mmol/L或口服葡萄糖耐量试验(OGTT)2h血浆葡萄糖浓度 ≥ 11.1 mmol/L。

(2) 空腹血浆葡萄糖(FPG)的分类:FPG < 6.1 mol/L=正常水平;FPG ≥ 6.1 mol/L并且 < 7.0 mol/L=空腹葡萄糖受损;FPG ≥ 7.0 mol/L暂时诊断为糖尿病。

(3) OGTT中2h血糖的分类:OGTT中2h血浆葡萄糖(PG) < 7.8 mol/L=正常的葡萄糖耐量;OGTT中2h PG ≥ 7.8 mol/L并且 < 11.1 mmol/L=葡萄糖耐量低减;OGTT中2h PG ≥ 11.1 mmol/L=暂时诊断为糖尿病。

(4) FPG由8mol/L降为7.0 mmol/L的依据:OGTT中2h诊断的PG ≥ 11.1 mmol/L糖尿病人中,30%以上FPG < 7.8 mol/L,即FPG定为7.8 mol/L,不做OGTT,则1/3以上病人会漏诊;国外研究表明,FPG ≥ 7.0 mol/L与PG ≥ 11.1 mmol/L具有相当的值;FPG ≥ 7.0 mol/L时大、小血管并发症的危险性增加。

诊断时应注意:血糖为葡萄糖氧化酶法测定的静脉血浆葡萄糖;空腹指无能量摄入减少;随机指任何时候,无须考虑与进餐的关系;随机血糖不能用于诊断糖耐量受损(IGT)和空腹血糖降低(IFG);除非有显著高血糖伴急性代谢失代偿或明显症状,否则应该在1d内重复实验以确认诊断;存在急性感染、外伤、循环或其他应激情况下测定出的严重高血糖可能是暂时性的,不能因此而立即诊断为糖尿病,而应待应激恢复后复查。

1.2.2 新旧诊断标准的比较

(1) 新的诊断标准将FPG > 7.8 mmol/L下调至FPG > 7.0 mmol/L,因为一些

研究表明, $FPG > 7.0 \text{ mmol/L}$ 对糖尿病的诊断与 OGTT 中 $2\text{h PG} \geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 的符合率增加, 并且 $FPG \geq 7.0 \text{ mmol/L}$ 时微血管病变发生的危险性也增加。

(2) 推荐优先使用空腹血糖 $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$ 作为诊断糖尿病的常用方法; 糖耐量试验不作临床常规使用。因为前者较后者简便、经济、易行, 更易为检查者所接受, 且具有与 OGTT 中 $2\text{h PG} > 11.1 \text{ mmol/L}$ 诊断糖尿病相同的准确性。

总之, 修改后的糖尿病诊断标准与分型, 有利于对糖尿病包括糖尿病高危人群的早期发现和诊断, 最终目的还是希望通过对糖尿病的早期发现、早期诊断和早期干预治疗, 包括早期的行为干预如合理的饮食与运动以及严格的血糖控制, 以达到防止和减少糖尿病慢性并发症的目的。

1.3 糖尿病治疗药物

当前在我国所用的口服降糖药物主要有三大类: 胰岛素促泌剂、胰岛素增敏剂及 α -葡萄糖苷酶抑制剂。

1.3.1 胰岛素促泌剂

1.3.1.1 胰岛素促泌剂作用机制

胰岛素促泌剂是临床应用最广泛的口服降糖药, 包括磺酰脲类(SU)和格列奈类共近 10 种药物。

磺酰脲类药物研发初期所观察到的降糖作用是促进胰岛素的分泌, 目前对该类药物作用于胰岛 β 细胞促进胰岛素释放的机制已较明确, 主要通过 β 细胞膜上磺酰脲受体(SUR)结合而发挥促进胰岛素分泌的作用, 格列奈类也是经此途径达到胰岛素促泌效应, 两类药物与 SUR 的结合位点不同, 故有不同胰岛素促泌效应。磺酰脲类还可影响 β 细胞内胰岛素分泌颗粒膜上的氯通道, 促进分泌颗粒向胞膜移动, 增加胰岛素的释放。此外, 临床上观察到的磺酰脲类药物对胰外细胞的胰岛素增敏作用也得到进一步的证实。

1) 依赖 ATP 敏感的钾离子通道(K^+ -ATP)的途径

已知胰岛素促泌剂均通过与胰岛 β 细胞膜特异性受体蛋白结合, 关闭 K^+ -ATP 通道, 使细胞膜去极化, 开放钙离子通道, 细胞外钙离子内流, 促使含有胰岛素的颗粒向细胞膜移动并与之融合, 最终通过胞吐而分泌胰岛素, 不影响胰岛素的合成。

2) 不依赖钾离子通道(K^+ -ATP)的途径

近年来发现磺酰脲类药物并不局限于与 β 细胞膜上的 SUR 结合。分泌颗粒内 pH 降低是胰岛素分泌颗粒释放的必要条件, 胰岛素分泌颗粒膜上的 v 型质子泵($v\text{-H}^+\text{-ATPase}$)负责将 H^+ 泵入分泌颗粒内使颗粒内环境酸化, 这一过程需要颗粒膜上的 CIC-3 氯离子通道同时将 Cl^- 转运入颗粒内以保持电中性。磺酰脲类

药物与胰岛素分泌颗粒膜上相对分子质量为 65 000 的受体蛋白(gSUR)结合后,引起与之偶联的 CIC-3 氯离子通道活性增加,后者与分泌颗粒膜上的 $v\text{-H}^+\text{-ATPase}$ 协同作用,分别将细胞质中的 Cl^- 和 H^+ 转运入分泌颗粒内,使颗粒内的微环境极度酸化,从而引起胰岛素以胞吐方式分泌。

3) 胰外作用机制

磺酰脲类药物除对 β 细胞具有直接刺激作用外,近年采用葡萄糖钳夹技术研究发现磺酰脲药物还可使人体外周葡萄糖利用增加 10%~52%(平均 29%),但也有研究者认为,此作用可能继发于葡萄糖毒性作用的改善。大量研究报道,格列美脲在离体培养的脂肪细胞和肌肉中具有直接的模拟胰岛素和胰岛素增敏作用。格列美脲可激活细胞内特异的蛋白磷酸化酶而促进葡萄糖转运子的转位,激活糖原合成酶,降低糖原合成酶激酶 3 活性,从而促进外周组织的葡萄糖利用。

1.3.1.2 磺酰脲类

磺酰脲类药物的种类较多,按其发现的先后分为两代:第 1 代于 20 世纪 50 年代用于临床,包括甲磺丁脲及氯磺丙脲。第 2 代于 60 年代用于临床,目前被广泛应用的是第 2 代磺酰脲类药物,其中格列本脲、格列奇特、格列吡嗪、格列奎酮应用最为广泛。新一代的磺酰脲类降糖药格列美脲为长效降糖药,有胰岛素增敏和模拟胰岛素的作用。

第 2 代 SU 的特点有:①词首均以英文 gli 开头;②作用比第 1 代强;以毫克计,其生物活性比 D_{860} 强十多倍至数百倍;③剂量小,不良反应小;④失效率低。

SU 的基本结构包括磺酰脲基及酰脲基两个辅基。两个辅基的结合决定了此药的降糖作用,辅基的不同决定了各种 SU 类药物作用,有强弱与作用时间长短的不同。制剂有每片数毫克(如格列本脲)、数十毫克(如格列齐特、格列喹酮)及数百毫克[如甲苯磺丁脲(D_{860})]不等。毫克级片剂的作用强于十毫克级片剂,后者又强于百毫克级片剂。

1) 格列本脲

化学名称:N-[2-[4-[[[(环己氨基)羰基]氨基]磺酰基]苯基]乙基]-2-甲氧基-5-氯苯甲酰胺

结构式:格列本脲的结构式见图 1-1。

分子式: $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$

相对分子质量:494.01

药理毒理:

a. 刺激胰腺胰岛 β 细胞分泌胰岛素,先决条件是胰岛 β 细胞还有一定的合成和分泌胰岛素的功能。

b. 通过增加门静脉胰岛素水平或对肝脏直接作用,抑制肝糖原分解和糖原异

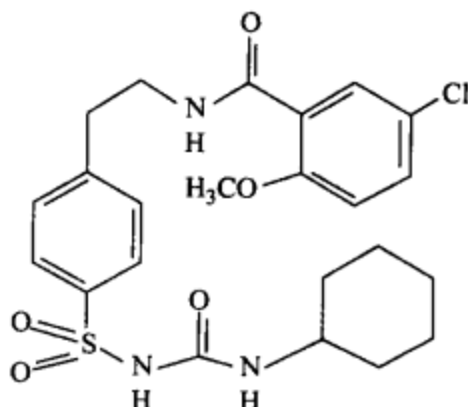


图 1-1 格列本脲结构式

生作用,肝生成和输出葡萄糖减少。

c. 也可能增加胰外组织对胰岛素的敏感性和糖的利用(可能主要通过受体后作用)。因此,总的作用是降低空腹血糖和餐后血糖。

药代动力学:口服吸收快,蛋白结合率很高,为 95%,口服后 2~5 h 血药浓度达峰值,持续作用 24 h。半衰期为 10 h。在肝内代谢,由肝和肾排出各约 50%。

适应证:适用于单用饮食控制疗效不满意的轻、中度 2 型糖尿病,病人胰岛 β 细胞有一定的分泌胰岛素功能,并且无严重的并发症。

用法用量:口服,开始 2.5 mg,早餐前或早餐及午餐前各一次,轻症者 1.25 mg,3 次/d,三餐前服,7 d 后递增每日 2.5 mg。一般用量为每日 5~10 mg,最大用量每日不超过 15 mg。

不良反应:

- 可有腹泻、恶心、呕吐、头痛、胃痛或不适。
- 较少见的有皮疹。
- 少见而严重的有黄疸、肝功能损害、骨髓抑制、粒细胞减少(表现为咽痛、发热、感染)、血小板减少症(表现为出血、紫癜)等。

药物相互作用:

- 与酒精同服时,可以引起腹部绞痛、恶心、呕吐、头痛、面部潮红和低血糖。
- 与 β 受体阻滞剂合用,可增加低血糖的危险,而且可掩盖低血糖的症状,如脉率增快、血压升高;小量使用选择性 β 受体阻滞剂如阿替洛尔(atenolol)和美托洛尔(metoprolol)造成此种情况的可能性较小。
- 氯霉素、胍乙啶、胰岛素、单胺氧化酶抑制剂、保泰松、羟保泰松、丙磺舒、水杨酸盐、磺胺类与本品同时使用,可加强降血糖作用。
- 肾上腺皮质激素、肾上腺素、苯妥英钠、噻嗪类利尿剂、甲状腺素可增加血糖水平,与本类药同用时,可能需增加本类药的用量。

e. 香豆素类抗凝剂与本类药同用时,最初彼此血浆浓度皆升高,但以后彼此血浆浓度皆减少,故需要调整两者的用量。

2) 格列齐特

化学名称:1-(3-氮杂双环[3.3.0]辛基)-3-对甲苯磺酰脲

结构式:格列齐特的结构式见图 1-2。

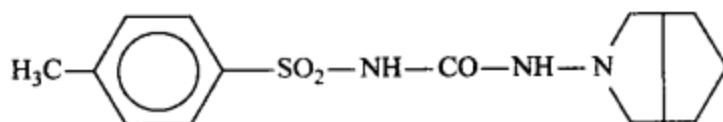


图 1-2 格列齐特结构式

分子式: $C_{15}H_{21}N_3O_3S$

相对分子质量:323.41

药理毒理:本品是第 2 代磺酰脲类降血糖药,作用较强,其机制是选择性地作用于胰岛 β 细胞,促进胰岛素分泌,并提高进食葡萄糖后的胰岛素释放,使肝糖原生成和输出受到抑制。本品经动物实验和临床使用证明能降低血小板的聚集和黏附力,有助于防治糖尿病微血管病变。

药代动力学:本品口服,在胃肠道迅速吸收,3~4 h 可达血浆峰值,血浆蛋白结合率为 92%,半衰期为 10~12 h,口服后主要在肝脏代谢,经尿排出。

用法用量:口服,开始用量 40~80 mg,1~2 次/d,以后根据血糖水平调整至一日 80~240 mg,分 2~3 次服用,待血糖控制后,每日改服维持量。老年病人酌减。

不良反应:偶有轻度恶心、呕吐、上腹痛、便秘、腹泻、红斑、荨麻疹,血小板减少、粒性白细胞减少、贫血等,大多数于停药后消失。

药物相互作用:与非甾体抗炎药(特别是水杨酸盐)、磺胺类抗菌药、双香豆素类抗凝剂、单胺氧化酶抑制剂、 β -受体阻断剂、苯二氮草类、四环素、氯霉素、双环己乙哌啶、氯贝丁酯、乙醇等药合用时,用量应减少,以免发生低血糖反应。

3) 格列吡嗪

化学名称:1-环己基-3-{4-[2-(5-甲基吡嗪-2-酰胺)-乙基]苯磺酰}脲

结构式:格列吡嗪的结构式见图 1-3。

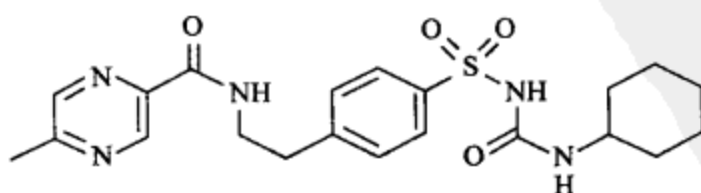


图 1-3 格列吡嗪结构式

分子式: $C_{21}H_{37}N_5O_4S$

相对分子质量:445.50

适应证:适用于经饮食控制及体育锻炼疗效不满意的轻、中度2型糖尿病患者。

药理毒理:本品是第2代磺酰脲类口服降糖药。能促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素、增强胰岛素对靶组织的作用;亦能刺激胰岛 α 细胞使胰高血糖素分泌受抑制,尚有抑制肝糖原分解,促进肌肉利用和消耗葡萄糖的作用。

药代动力学:口服后通过小肠吸收,30 min 见效。 $t_{1/2}$ 为2~4 h,达血药浓度峰值需1~2 h,维持降血糖长达10 h以上,药物在体内代谢成无活性物质,排泄药量的97%3 d内全部由肾脏排出体外,不会造成药物积蓄性低血糖。

用法用量:口服,剂量因人而异,一般推荐剂量2.5~20 mg/d,早餐前30 min服用。日剂量超过15 mg,宜在早、中、晚分3次餐前服用。单用饮食疗法失败者:起始剂量一日2.5~5 mg,以后根据血糖和尿糖情况增减剂量,每次增减2.5~5.0 mg。若一日剂量超过15 mg,分2~3次餐前服用。已使用其他口服磺酰脲类降糖药者则停用其他磺酰脲药3 d,复查血糖后开始服用本品。从5 mg起逐渐加大剂量,直至产生理想的疗效。最大日剂量不超过30 mg。

药物相互作用:

a. 本药与双香豆素类、单胺氧化酶抑制剂、保泰松、磺胺类药、氯霉素、环磷酰胺、丙磺舒、水杨酸类药合用可增加其降血糖作用。

b. 与肾上腺素、肾上腺皮质激素、口服避孕药、噻嗪类利尿剂合并使用时,可降低其降血糖作用。

c. 与 β 受体阻断药并用时应谨慎。

d. 若有缩短本品在胃肠道滞留时间的胃肠道疾病,可影响本品的药代动力学和药效。

4) 格列喹酮

化学名称:1-环己基-3-[对-[2-(3,4-二氢-7-甲氧基-4,4-二甲基-1,3-双氧基-2-(1H)-异喹啉基)-乙基]苯基磺酰基]脲

结构式:格列喹酮结构式见图1-4。

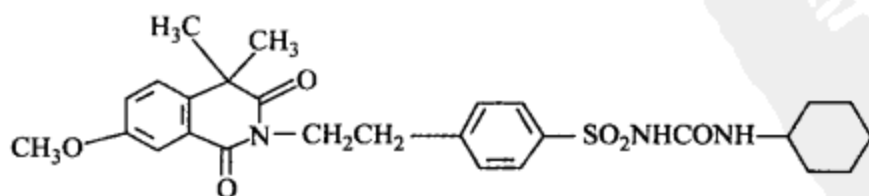


图1-4 格列喹酮结构式

分子式: $C_{27}H_{33}N_3O_6S$

相对分子质量:527.60

药效学:

a. 促进胰腺胰岛 β 细胞分泌胰岛素,先决条件是胰岛 β 细胞还有一定的合成和分泌胰岛素的功能。

b. 通过增加门静脉胰岛素水平或对肝脏直接作用,抑制肝糖原分解和糖原异生作用,肝生成和输出葡萄糖减少。

c. 也可能增加胰外组织对胰岛素的敏感性和糖的利用(可能主要通过受体后作用)。

药动学:格列喹酮口服后几乎全部迅速吸收,1 h 后血药浓度即达高峰,而后其血浆水平很快下降,8 h 后血药浓度已很低。该药主要分布在肝、脾、胃肠道,它不能通过血-脑屏障。

胚胎学研究结果表明,大鼠即便是静脉注射(iv)3 000 mg/kg 高剂量组也没有引起胚胎学的改变。毒理研究表明,本品毒性极小,iv 给小鼠 $LD_{50} > 15$ g/kg。由于格列喹酮在肝脏内很快代谢,所以其半衰期较短, ^{14}C 示踪研究表明其 80% 以上代谢产物为脱甲基物,所有的代谢产物几乎无降血糖活性,并由胆汁排出。正常人与肾损伤的糖尿病患者对格列喹酮的排泄无差异,在肾球滤过率 < 60 ml/min 时仍可服用。肝脏内催化分解格列喹酮的酶分布很大且活力很强,因此在慢性肝病如肝硬化患者体内,此药代谢分解未见减慢。对胆汁阻塞的病人其血浆格列喹酮水平与正常志愿者相同,此时肾脏对格列喹酮代谢产物的排泄产生代偿性增多。在一项 24 个月的研究中,20 名患有不同程度肝硬化的糖尿病人使用格列喹酮治疗,证明该药仍然是安全和有效的。但肝功能严重损坏者,肝糖生成能力降低,可能会增加发生低血糖的危险性,因此对有严重肝功能损坏者,以不用格列喹酮及任何磺酰脲类降血糖药为妥。

综上所述,格列喹酮具有以下的特点:作用达到最大效应时间短,半衰期短又决定了其作用时间短,而且易于调节血糖水平,长时间使用不会产生药物的积蓄及持久性低血糖(4.5);对神经呼吸及心血管系统无不良影响;口服吸收快、完全,95% 经粪便排泄;对肾功能不全、肝脏病变不严重的糖尿病人仍可考虑使用;对口服其磺酰脲类降血糖药无效者,改用本品往往有效;酒精对本品控制血糖的作用无影响;毒性极小,小鼠静注 $LD_{50} > 15$ g/kg。

药理作用:本品为第 2 代磺酰脲类口服降血糖药。本品的作用机制与其他口服磺酰脲类降血糖药相同,在治疗早期以促进内源性胰岛素分泌为主,经一段时间治疗后其主要作用在于改善周围组织对胰岛素的敏感性。它是目前磺酰脲类口服降血糖药中唯一不受肾功能影响的药物,故可用于肾功能受损的糖尿病患者。

适应证:适用于单用饮食控制疗效不满意的轻、中度非胰岛素依赖型糖尿病,

病人胰岛 β 细胞有一定的分泌胰岛素功能,并且无严重的并发症。本品作用温和,可根据患者的病情调整剂量,较少发生低血糖反应,适用于单用饮食疗法不能满意地控制成年发病型糖尿病,特别是用于肾功能不全的糖尿病患者。

用法用量:口服开始 30 mg,早餐前或早餐前及午餐前各 1 次,也可 15 mg,3 次/d,三餐前服,必要时 7 d 后每日递增 30 mg。一般每日剂量 90~120 mg,最大剂量每日不超过 180 mg。

药物相互作用:磺酰脲类降血糖药的作用可被下列因素增强:体力活动、应激、酒精,某些药物如水杨酸类、磺胺类、保泰松制剂、抗结核药、氯霉素、四环素类、香豆素衍生物、环磷酰胺及单胺氧化酶抑制药。另一方面,同时给予氯丙嗪、拟交感神经药、皮质激素、甲状腺素、口服避孕药及含烟酸的制剂可降低其降血糖作用。

1.3.1.3 格列奈类(非磺酰脲胰岛素促泌剂)

起源于 20 世纪 90 年代,其有别于磺酰脲类,不仅在结构中具有氨基酸,且表现在作用靶位上,以“快开—速闭”,快速地促进胰岛素分泌,降低 2 型糖尿病患者的餐后血糖(PBG),又称餐时降血糖药,包括瑞格列奈和那格列奈。

1) 瑞格列奈

瑞格列奈(repaglinide)是一种新型的胰岛素促分泌剂,被称为“膳食葡萄糖调节剂”,用于饮食治疗和运动作为单一疗法时的辅助用药,以降低 2 型糖尿病病人与饮食有关的血糖浓度。瑞格列奈是氨基乙酰基苯甲酸衍生物。

化学名称:S(+)-2-乙氧基-4-{2-[(3-甲基-1-(2-(1-哌啶基)苯基)丁基)氨基]-2-氧代乙基}苯甲酸

结构式:瑞格列奈结构式见图 1-5。

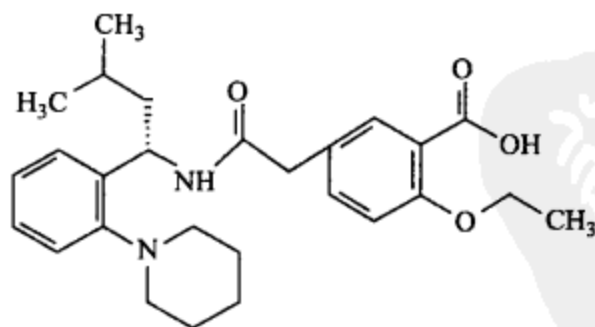


图 1-5 瑞格列奈结构式

分子式: $C_{27}H_{36}N_2O_4$

相对分子质量: 452.59

药理毒理:非磺酰脲类促胰岛素分泌剂,本品与胰岛 β 细胞膜外依赖 ATP 的钾离子通道上的相对分子量为 36 000 蛋白特异性结合,使钾通道关闭, β 细胞去极化,钙通道开放,钙离子内流,促进胰岛素分泌,其作用快于磺酰脲类,故餐后降血

糖作用较快。

药代动力学:据国外文献报道,瑞格列奈片经胃肠道快速吸收、导致血浆药物浓度迅速升高。服药后 1 h 内血浆药物浓度达峰值。然后血浆浓度迅速下降,4~6 h 内被清除。血浆半衰期约为 1 h。瑞格列奈片与人血浆蛋白的结合大于 98%。瑞格列奈片几乎全部被代谢,代谢物未见有任何临床意义的降血糖作用。瑞格列奈片及其代谢产物主要自胆汁排泄,很少部分(小于 8%)代谢产物自尿排出。粪便中的原形药物少于 1%。

适应证:用于饮食控制及运动锻炼不能有效控制高血糖的 2 型糖尿病(非胰岛素依赖性)患者。瑞格列奈片可与二甲双胍合用。与各自单独使用相比,两者合用对控制血糖有协同作用。

用法用量:瑞格列奈片应在主餐前服用(即餐前服用)。在口服瑞格列奈片 30 min 内即出现促胰岛素分泌反应。通常在餐前 15 min 内服用本药。服药时间也可掌握在餐前 0~30 min 内。请遵医嘱服用瑞格列奈片,剂量因人而异,以个人血糖而定。推荐起始剂量为 0.5 mg,以后如需要可每周或每两周作调整。接受其他口服降血糖药治疗的病人可直接转用瑞格列奈片治疗,其推荐起始剂量为 0.5 mg。最大的推荐单次剂量为 4 mg,进餐时服用。但最大日剂量不应超过 16 mg。对于身体衰弱和营养不良的患者,应谨慎调整剂量。如果与二甲双胍合用,应减少瑞格列奈片的剂量。尽管瑞格列奈主要由胆汁排泄,但肾功能不全的患者仍应慎用。

不良反应:

a. 低血糖:这些反应通常较轻微,通过给予碳水化合物较易纠正;若较严重,可输入葡萄糖。

b. 视觉异常:已知血糖水平的改变可导致暂时性视觉异常,尤其是在治疗开始时。只有极少数病例报告瑞格列奈片治疗开始时发生上述的视觉异常,但在临床试验中没有因此而停用瑞格列奈片的病例。

c. 胃肠道:临床试验中有报告发生胃肠道反应,如腹痛、腹泻、恶心、呕吐和便秘。与其他口服降血糖药物相比,这些症状出现的频率以及严重程度均无差别。

d. 肝酶系统:个别病例报道用瑞格列奈片治疗期间肝功酶指标升高。多数病例为轻度和暂时性,因酶指标升高而停止治疗的病人极少。

e. 过敏反应:可发生皮肤过敏反应,如瘙痒、发红、荨麻疹。由于化学结构不同,没有理由怀疑可能发生与磺酰脲类药物之间的交叉过敏反应。

药物相互作用:下列药物可增强瑞格列奈片的降血糖作用。

a. 单胺氧化酶抑制剂(MAOI),非选择性 β 受体阻滞剂、ACEI、非甾体抗炎药、水杨酸盐、生长抑素、酒精以及促合成代谢的激素。 β 受体阻滞剂可能会掩盖低血糖症状。酒精可能会加重或延长由瑞格列奈片所致的低血糖症状。

b. 下列药物可减弱瑞格列奈片的降血糖作用:口服避孕药,噻嗪类药,皮质激素,达那唑,甲状腺激素和拟交感神经药。

c. 瑞格列奈片不影响地高辛、茶碱和华法林的药代动力学特性,西咪替丁也不影响瑞格列奈片的药代动力学特性。

d. 体外研究结果显示瑞格列奈片主要由 P450(CYP3A4)诱导剂代谢。所以, CYP3A4 抑制剂如酮康唑、伊曲康唑、红霉素、氟康唑、米比法地尔可能升高瑞格列奈片血浆水平;而能诱导 CYP3A4 的化合物如利福平或苯妥英可能降低瑞格列奈片血浆水平。因不了解其诱导或抑制的程度,应禁忌上述药物与瑞格列奈片合并使用。

2) 那格列奈

那格列奈(nateglinide)为 D-苯丙氨酸衍生物,代表了新一代具有氨基酸结构的新型餐时血糖调节剂,具有起效快、作用时间短的特点,主要用于 2 型糖尿病的治疗,该药物由日本的味之素,山之内及 Roussel-Morshitu 三家公司共同研制开发,于 1999 年 8 月上市,2001 年被美国批准单独或与二甲双胍合用治疗 2 型糖尿病。

化学名称:N-(反式-4-异丙基环己基-1-甲酰基)-D-苯丙氨酸

结构式:那格列奈结构式见图 1-6。

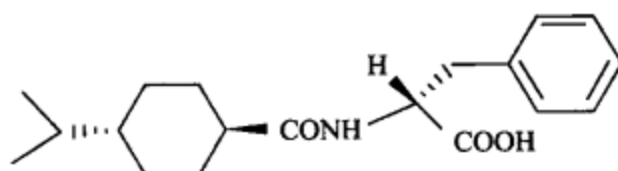


图 1-6 那格列奈结构式

分子式: $C_{19}H_{27}NO_3$

相对分子质量: 317.43

药理毒理:那格列奈为氨基酸衍生物,属口服抗糖尿病药,用于 2 型糖尿病人的治疗。那格列奈的作用依赖于胰岛 β 细胞的功能。那格列奈通过与 β 细胞膜上的 ATP 敏感性 K^+ 通道受体结合并将其关闭,使细胞去极化,钙通道开放,钙内流,从而刺激胰岛素的分泌,降低血糖水平。那格列奈促胰岛素分泌作用依赖于血液葡萄糖水平,在葡萄糖水平较低时,促胰岛素分泌作用减弱。那格列奈有高度的组织选择性,与心肌和骨骼的亲和力低。毒理研究遗传毒性:本品 Ames 试验、小鼠淋巴瘤试验、中国仓鼠肺细胞染色体畸变试验、小鼠体内微核试验均未表现出致突变作用。生殖毒性:大鼠给药剂量达 600 mg/kg(约为患者餐前口服,每日 3 次,治疗剂量 120mg 时暴露量的 16 倍)时,对生育力无影响。大鼠给药剂量达 1000mg/kg 时(同上。约为临床治疗暴露量的 60 倍),未见致畸胎作用。兔给药剂量为 500 mg/kg

时(同上,约为临床治疗暴露量的 40 倍),对胚胎发育有不利影响,出现胆囊发育不全或小胆囊的发生率增加。那格列奈可通过大鼠乳汁分泌,其在乳汁与血浆中的曲线下面积(AUC)0~48 h 的比值为 1:4。大鼠给予那格列奈 1 000 mg/kg 时(同上,约为临床治疗暴露量的 60 倍),其后代体重较轻。致癌性:SD 大鼠、B6C3F1 小鼠连续 2 年经口给予本品,剂量分别达 900 mg/(kg·d)(其 AUC 暴露量在雄性、雌性动物上分别为人临床治疗剂量下的 30 倍和 40 倍)和 400 mg/(kg·d)(其 AUC 暴露量在雄性、雌性动物上分别为人临床治疗剂量下的 10 倍和 30 倍)时,均未表现出致癌性。

药动学:据文献报道,吸收和生物利用度:餐前服用那格列奈后迅速被吸收,平均峰值药物浓度通常出现在服药 1 h 内。以溶液形式口服时,那格列奈几乎完全并迅速吸收($\geq 90\%$)。口服的绝对生物利用度约为 72%。每日三餐前给 2 型糖尿病患者那格列奈 60~240 mg 共 1 周后,那格列奈显示出线性的药代动力学特征,AUC 和 $C_{\max}$ 均如此。并且 $T_{\max}$ 不依赖于药物剂量。分布:依据静脉给药数据估计的那格列奈稳态分布容积大约是 10 L。体外研究表明,那格列奈大部分(97%~99%)与血浆蛋白结合,主要是血浆白蛋白和少量的 α 酸性糖蛋白。在那格列奈 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ 测试范围内其与血浆蛋白结合的能力与药物浓度无关。代谢:那格列奈在清除前主要通过混合功能氧化酶系代谢。在人体主要的代谢产物来自于异丙基侧链的羟化,羟化或发生于次甲基碳原子或发生于某一甲基基团,其活性分别较那格列奈低 5~6 倍和 3 倍。较少的代谢产物是那格列奈的二醇、异丙醇和酰基葡萄糖醛酸苷。只有那格列奈的少量异丙醇代谢产物具有活性,强度与那格列奈相当。细胞色素 P450 酶、CYP2C9 是那格列奈代谢主要的催化剂,其次是 CYP3A4,这些结论是用肝微粒体和含单一表达人 CYP 同工酶的微粒体进行的体外实验而得出的。排泄:那格列奈及其代谢产物的清除迅速彻底。服药后 6 h 内大约 75% 的那格列奈可在尿中回收。大部分(83%)的那格列奈在尿中排泄,另 10% 从粪便中排泄。大约所服药物的 6%~16% 以原形在尿中排泄。在健康志愿者和 2 型糖尿病患者中那格列奈血浆浓度迅速降低且那格列奈清除半衰期平均为 1.5 h,与较短的清除半衰期相一致。那格列奈剂量加倍至 240 mg,每日 3 次,也无明显蓄积。食物影响:餐后服用那格列奈,其吸收(AUC)程度不受影响。但吸收速度降低,表现为峰浓度($C_{\max}$)降低和血浆达峰时间($T_{\max}$)延迟。因此推荐餐前服用那格列奈,通常餐前 1 min 服用,也可餐前 30 min 内服用。

适应证:本品可以单独用于经饮食和运动不能有效控制高血糖的 2 型糖尿病病人。也可用于使用二甲双胍不能有效控制高血糖的 2 型糖尿病病人,采用与二甲双胍联合使用,但不能替代二甲双胍。那格列奈不适用于对磺酰脲类降糖药治疗不理想的 2 型糖尿病病人。

不良反应:低血糖:与其他抗糖尿病药物一样,服用那格列奈后,可观察到低血糖的症状。这些症状包括出汗、发抖、头晕、食欲增加、心悸、恶心、疲劳和无力。这些症状一般较轻且较易处理,如需要可进食碳水化合物。临床研究报告显示出现低血糖症状,且证实血糖降低(血糖 <3.3 mmol/L)的患者比例为2.4%。肝功能:极少患者出现血清氨基转移酶增高,其程度较轻且为一过性,很少导致停药。过敏:极少有皮疹、瘙痒和荨麻疹等过敏反应的报道。其他反应:临床试验发现的其他不良事件,包括胃肠道反应(腹痛、消化不良、腹泻)、头痛以及糖尿病人群可能同时伴发的一些临床症状(如呼吸道感染)等在那格列奈治疗组与安慰剂治疗组中发生的比例相似。

用法用量:通常成年人每次60~120 mg(2~4片),3次/d,餐前1~15 min以内服用。建议从小剂量开始,如果效果不明显时可逐步增加剂量。肝损害患者的剂量:对轻度至中度肝病患者药物剂量不需调整。尚未对严重肝病患者服药情况进行研究,因此严重肝病患者应慎用那格列奈。肾损害患者的剂量:肾损害患者无需调整剂量。在中度至严重肾功能不全[肌酐清除率15~50 ml/(min $\cdot$ 1.73 m²)]的糖尿病患者和需透析的患者,那格列奈的生物利用度和半衰期与健康人相比,其差别未达到具有临床意义的程度。

注意事项:对本品过敏者、妊娠期妇女、重症感染、手术前后和严重外伤患者、糖尿病性昏迷和胰岛素依赖型糖尿病患者禁用。

- a. 严重肝肾功能不全者,应减量或慎用。
- b. 缺血性心脏病、脑下垂体和副肾上腺功能不全、腹泻、呕吐、营养不良患者慎用。
- c. 高龄患者和儿童慎用。
- d. 使用中定期检测血糖,在与其他降血糖药如胰岛素增敏剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂等联合应用时注意调整使用剂量。

药物相互作用:体外研究表明,那格列奈主要通过细胞色素 P450 酶 CYP2C9 (70%)代谢,部分通过 CYP3A4(30%)代谢。体外实验发现其可抑制甲磺丁脲的代谢,据此判断那格列奈在体内是 CYP2C9 的潜在抑制剂。体外实验表明该药对 CYP3A4 的代谢反应无抑制作用。总之,这些发现说明,该药与其他药物间出现具有临床意义的药代动力学方面相互作用的潜在可能性较低。那格列奈对下列药物的药代动力学特征无影响:华法林(CYP3A4 和 CYP2C9 的底物)、双氯芬酸(CYP2C9 的底物),曲格列酮(CYP3A4 诱导剂)和地高辛。因此合用时无论那格列奈、地高辛、华法林或双氯芬酸均无需调整剂量。同样,那格列奈与其他口服抗糖尿病药物,如与二甲双胍或格列本脲间不存在具有临床意义的药代动力学方面的相互作用。那格列奈与血清蛋白的结合率较高(98%),主要是与清蛋白结合。

体外用蛋白结合率高的药物进行的替换实验发现它们对那格列奈的蛋白结合无影响。这些药物是呋塞米、普萘洛尔、卡托普利、尼卡地平、普伐他汀、格列本脲、华法林、苯妥英钠、乙酰水杨酸、甲磺丁脲和二甲双胍。同样,那格列奈对普萘洛尔、格列本脲、尼卡地平、华法林、苯妥英钠、乙酰水杨酸、甲磺丁脲的血清蛋白结合无影响。内科医师应考虑一些对糖代谢有影响的药物与那格列奈的相互作用;口服抗糖尿病药的降血糖作用可被某些药物所加强,这些药物包括非甾体类抗炎药、水杨酸盐、单胺氧化酶抑制剂和非选择性 β 受体阻滞剂。口服抗糖尿病药的降血糖作用可被某些药物所削弱。这些药物包括噻嗪类、可的松、甲状腺制剂和拟交感神经药。接受那格列奈治疗的患者加用或停用上述药物时应严密观察血糖的变化。

1.3.2 胰岛素增敏剂

近年来研究表明,胰岛素抵抗在 2 型糖尿病的发生、发展中起着极为重要的作用。胰岛素增敏剂主要改善肝脏、肌肉及脂肪组织对胰岛素的敏感性,增加肌肉、脂肪组织对葡萄糖的利用率,达到降血糖的目的。

1.3.2.1 胰岛素增敏剂的类型

胰岛素增敏剂的类型目前主要有双胍类和噻唑烷二酮类化合物。

1) 双胍类

双胍类降糖药的化学结构包括两个结合在一起的胍基(图 1-7)。对正常人并无降血糖作用,但可使升高的血糖降低,故有人称之为抗高血糖药。

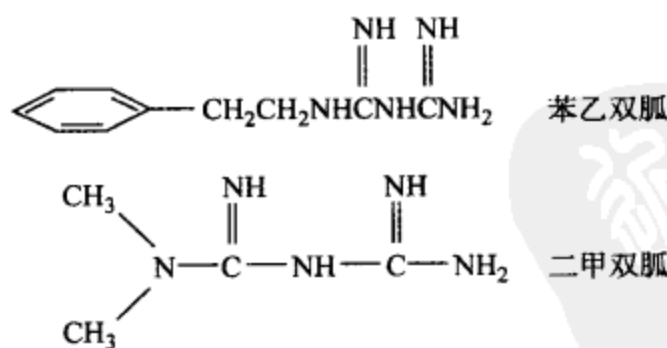


图 1-7 双胍类降糖药的化学结构

2) 噻唑烷二酮类

TZD 包括一系列具有 2,4-噻唑烷二酮结构的化合物,如环格列酮(ciglitazone)、吡格列酮(pioglitazone)、曲格列酮(troglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)和恩格列酮(englitazone)等(化学结构如图 1-8 所示),它们均有不同的侧链取代基,因而药理特点各有不同。

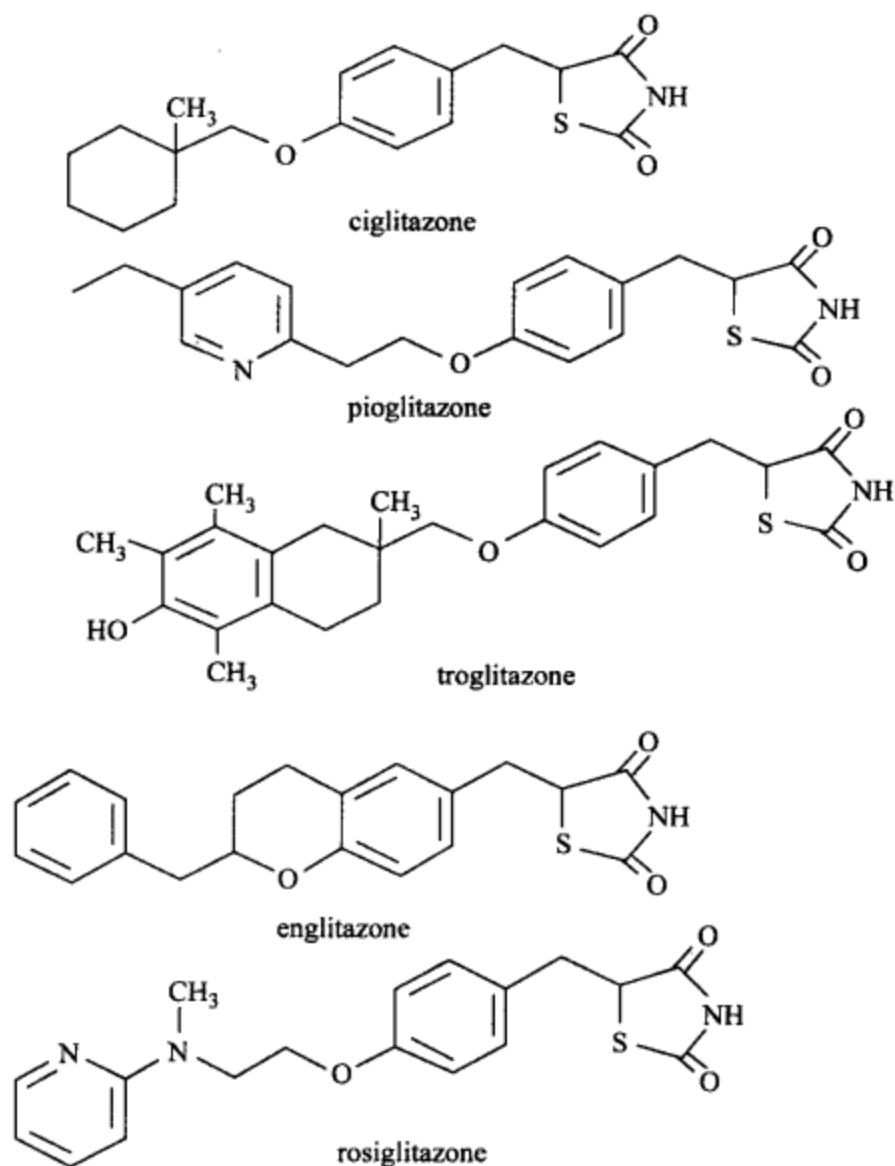


图 1-8 噻唑烷二酮类的化学结构

1.3.2.2 胰岛素增敏剂作用机制

1) 双胍类作用机制

双胍类对糖尿病病人有降血糖的作用,对正常人无降血糖作用,其降血糖作用不依赖正常的胰腺功能和胰岛的 β 细胞,而是增加外周组织对葡萄糖的摄取,抑制肝糖原异生,抑制胃肠道吸收葡萄糖,增加胰岛素与受体的结合能力,增加胰岛素敏感性,降低血浆中胰高血糖素水平,促进肌肉等外周组织摄取葡萄糖。二甲双胍很少由肝代谢,多以原形由尿排出。

2) 噻唑烷二酮类作用机制

噻唑烷二酮(thiazalidinedione)类药物能提高肌肉组织对葡萄糖的摄取和氧化,增加糖原及脂肪合成,减少肝糖原输出及糖原分解,降血糖、降血脂,降低基础胰岛素水平,增加胰岛素效应。

1.3.2.3 各种双胍类胰岛素增敏剂

1) 苯乙双胍

化学名称: 苯乙双胍

结构式: 苯乙双胍的结构式见图 1-7。

药理作用: 促进肌肉细胞对葡萄糖的摄取和糖酵解, 减少肝脏产生葡萄糖而起抗高血糖作用。

功用作用: 可用于成人非胰岛素依赖型糖尿病及部分胰岛素依赖型糖尿病。对于经磺酰脲类治疗无效的多数幼年型糖尿病、瘦型糖尿病, 应用本品后亦可降低血糖, 减少血糖波动性。治疗成年型及稳定型糖尿病, 可与磺酰脲类合用, 效果较两药单用为佳。对一些不稳定型或幼年型的糖尿病, 可与胰岛素合用, 较易控制血糖, 可减少胰岛素用量。对肥胖型糖尿病患者, 尚可利用其抑制食欲及肠吸收葡萄糖而减轻体重。

用法用量: 口服: 1 次 25 mg, 75~100 mg/d, 分次服。开始时 1 次 25 mg, 2~3 次/d, 饭前服用, 可逐渐增至 50~100 mg/d。一般于服药 1 周后血糖即降低。但欲达到正常血糖水平尚需继续用药 3~4 周。如与胰岛素或磺酰脲类药合用时, 剂量应根据病情作适当调整。

药物相互作用:

- a. 本品与双香豆素类药合用时, 其抗凝血作用加强, 可致出血倾向。
- b. 服用本品后, 加压素的升压作用增强。
- c. 服用本品时, 若服含醇饮料, 可发生腹痛、酸血症及体温过低。

注意事项:

- a. 胃肠道反应有厌食、恶心、呕吐、口中金属味等, 服大剂量时可发生腹泻。
- b. 应用本品时, 因组织中葡萄糖无氧酵解增加而产生大量乳酸, 可引起严重的乳酸性酸血症, 发生后死亡率约 50%。
- c. 充血性心力衰竭, 肝、肾功能不全患者尤为危险, 糖尿病并发酮症酸中毒和急性感染时禁用。孕妇慎用。
- d. 治疗过程中, 尤其在开始调节剂量时, 需密切观察, 要防止发生低血糖、昏迷或酸血症。

2) 二甲双胍

化学名称: 二甲双胍

结构式: 二甲双胍的结构式见图 1-7。

药理毒理:

- a. 本品为双胍类降糖药, 不是通过刺激胰岛 β 细胞增加胰岛素的分泌, 而是直接作用于糖的代谢过程, 促进糖的无氧酵解, 增加肌肉、脂肪等外周组织对葡萄糖

的摄取和利用,从而保护已受损的胰岛 β 细胞功能免受进一步损害,有利于糖尿病的长期控制。

b. 本品抑制肠道吸收葡萄糖,并抑制肝糖原异生,减少肝糖输出,可使糖尿病患者血糖及糖化血红蛋白降低。

c. 本品无促使脂肪合成的作用,对正常人无明显降血糖作用。

d. 本品与磺酰脲类降糖药比较,不刺激胰岛素分泌,甚少引起低血糖症,而两者合用时可起到协同作用,以提高降血糖的疗效。

药代动力学:口服二甲双胍主要在小肠吸收。空腹状态下口服二甲双胍0.5g的绝对生物利用度为50%~60%。同时进食略减少药物的吸收速度和吸收程度。国内口服本品药代动力学试验结果表明,口服后达血药浓度中位时间为2h,平均血浆药物清除半衰期约为4h。二甲双胍几乎不与血浆蛋白结合,按照常用临床剂量和给药方案口服本品,可在24~48h内达到稳态血浆浓度。本品主要经肾脏排泄,口服本品24h内肾脏排泄90%。

适应证:

a. 本品首选用于单纯饮食控制及体育锻炼治疗无效的2型糖尿病,特别是肥胖的2型糖尿病。

b. 对于1型或2型糖尿病,本品与胰岛素合用,可增加胰岛素的降血糖作用,减少胰岛素用量,防止低血糖发生。

c. 本品也可与磺酰脲类口服降糖药合用,具有协同作用。

用法用量:应遵医嘱服药。本品应从小剂量开始使用,根据病人状况,逐渐增加剂量。通常本品的起始剂量为0.5g,2次/d;或0.85g,1次/d;随餐服用。可每周增加0.5g,或每2周增加0.85g,逐渐加至每日2g,分次服用。成人最大推荐剂量为每日2550mg。对需进一步控制血糖患者,剂量可以加至每日2550mg(即每次0.85g,3次/d)。每日剂量超过2g时,为了更好地耐受,药物最好随三餐分次服用。

不良反应:本品常见不良反应包括腹泻、恶心、呕吐、胃胀、乏力、消化不良、腹部不适及头痛。其他少见者为大便秘结、低血糖、肌痛、头昏、头晕、指甲异常、皮疹、出汗增加、味觉异常、胸部不适、寒战、流感症状、潮热、心悸、体重减轻等。二甲双胍可减少维生素 B_{12} 的吸收,但极少引起贫血。本品在治疗剂量范围内,引起乳酸性酸中毒罕见。

禁忌:

a. 肾脏疾病或下列情况禁用本品:心力衰竭(休克)、急性心肌梗死和败血症等引起的肾功能障碍[血清肌酐水平 $>133\mu\text{mol/L}$ (男性), $\geq 124\mu\text{mol/L}$ (女性)或肌酐清除异常]。

b. 需要药物治疗的充血性心衰和其他严重心、肺疾患。

- c. 严重感染和外伤,外科大手术,临床有低血压和缺氧等。
- d. 已知对盐酸二甲双胍过敏。
- e. 急性或慢性代谢性酸中毒,包括有或无昏迷的糖尿病酮症酸中毒,和糖尿病酮症酸中毒需要用胰岛素治疗。

f. 酗酒者。

g. 接受血管内注射碘化造影剂者,可以暂时停用本品。

h. 维生素 B₁₂、叶酸缺乏未纠正者。

注意事项:

a. 口服本品期间,定期检查肾功能,可以减少乳酸中毒的发生,尤其是老年患者更应定期检查肾功能。接受外科手术和碘剂 X 线摄影检查前患者暂时停止口服本品。

b. 肝功能不良:某些乳酸性酸中毒患者合并有肝功能损害,因此有肝脏疾病者应避免使用本品。

c. 应激状态:在发热、感染和外科手术时,服用口服降糖药患者易发生血糖暂时控制不良,此时必须暂时停用本品,改用胰岛素。待应激状态缓解后恢复使用。

d. 对 1 型糖尿病患者,不宜单独使用本品,而应与胰岛素合用。

e. 应定期进行血液学检查。本品治疗引起巨幼红细胞性贫血罕见。如发生应排除维生素 B₁₂ 缺乏。

f. 既往服用盐酸二甲双胍片治疗,血糖控制良好的 2 型糖尿病患者出现实验室化验异常或临床异常(特别是乏力或难于言表的不适),应当迅速寻找酮症酸中毒或乳酸性酸中毒的证据,测定包括血清电解质、酮体、血糖、血酸碱度、乳酸盐、丙酮酸、二甲双胍水平,存在任何类型的酸中毒都应立即停用,开始其他恰当的治疗方法。

g. 单独接受盐酸二甲双胍片治疗的患者正常情况下不会产生低血糖,但当进食过少,或大运动量后没有补充足够的热量,与其他降糖药联合使用(如磺酰脲类药物和胰岛素),饮酒等情况下会出现低血糖,需予注意。

h. 老年、衰弱或营养不良的患者,以及肾上腺和垂体功能减低、酒精中毒的患者更易发生低血糖。老年患者和服用 β 受体阻滞剂的患者低血糖很难辨认,需注意。

i. 患者应当了解盐酸二甲双胍片治疗的潜在危险和益处,以及选择治疗的方式。他们也应知道同时控制饮食、规律运动的重要性,以及规律检测血糖、糖化血红蛋白、肾脏功能和血液学参数的重要性。

j. 需向患者解释乳酸酸中毒的危险性、症状和容易发生乳酸性酸中毒的情况。当出现不能解释的过度呼气、肌痛、乏力、嗜睡或其他非特异性的症状时,应立即停药,及时就诊。在二甲双胍治疗的初期常出现胃肠道症状,一旦患者坚持某一剂量治疗后出现胃肠道症状,通常与药物本身无关,随后出现的胃肠道症状可能是由于乳酸性酸中毒或其他严重的疾病造成的。

药物相互作用:

- a. 单剂联合使用二甲双胍和格列苯脲未发现二甲双胍的药代动力学参数改变。
- b. 二甲双胍与呋塞米(速尿)合用,二甲双胍的 AUC 增加,但肾清除率无变化;同时呋塞米的 $C_{\max}$ 和 AUC 均下降,终末半衰期缩短、肾清除率无改变。
- c. 经肾小管排泄的阳离子药物(例如,氨氯吡咪、地高辛、吗啡、普鲁卡因胺、奎尼丁、奎宁、雷尼替丁、氨苯蝶啶、甲氧苄氨嘧啶和万古霉素)理论上可能与二甲双胍竞争肾小管转运系统,发生相互作用,因此建议密切监测、调整本品及(或)相互作用药物的剂量。
- d. 二甲双胍与西咪替丁合用,二甲双胍的血浆和全血 AUC 增加,但两药单剂合用,未见二甲双胍清除半衰期改变,西咪替丁的药代动力学未见变化。
- e. 如同时服用某些可引起血糖升高的药物,如噻嗪类药物或其他利尿剂、糖皮质激素、酚噻嗪、甲状腺制剂、雌激素、口服避孕药、苯妥英、烟酸、拟交感神经药、离子通道阻滞剂和异烟肼等时要密切监测血糖,而在这些药物停用后,要密切注意低血糖的发生。
- f. 二甲双胍不与血浆蛋白结合,因此与蛋白高度结合的药物例如水杨酸盐、氨苯磺胺、氯霉素、丙磺舒等与磺酰脲类药物相比不易发生相互作用,后者主要与血清蛋白结合。
- g. 除氯磺丙脲,患者从其他的口服降糖药转为用本品治疗时,通常不需要转换期。服用氯磺丙脲的患者在换用本品的最初 2 周要密切注意,因为氯磺丙脲在体内有较长滞留,易导致药物作用过量,发生低血糖。
- h. 二甲双胍有增加华法林的抗凝血倾向。
- i. 树脂类药物与本品同服,可减少二甲双胍吸收。

1.3.2.4 几种噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂

1) 吡格列酮

化学名称:(±)5-[4-[2-(5-乙基-2-吡啶)乙氧基]苯甲基]-2,4-噻唑烷二酮盐
酸盐

结构式:吡格列酮的结构式见图 1-8。

分子式: $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$

相对分子质量:392.90

药理作用:噻唑烷二酮类抗糖尿病药物,属胰岛素增敏剂,作用机制与胰岛素的存在有关,可减少外周组织和肝脏的胰岛素抵抗,增加依赖胰岛素的葡萄糖的处理,并减少肝糖的输出。与磺酰脲类不同,本品不是一个胰岛素促分泌药,其作用机制是高选择性的激动过氧化物酶小体生长因子活化受体- γ [PPAR- γ],PPAR- γ 的活化可调节许多控制葡萄糖及脂类代谢的胰岛素相关基因的转录。实验表明,

本品可减少胰岛素抵抗的高血糖、高胰岛素血症及高三酰甘油。本品引起的代谢变化导致了依赖胰岛素的组织应答的增加。由于本品提高了循环胰岛素的作用(即降低胰岛素抵抗),因此它不能降低缺乏内源性胰岛素的血糖。

药物相互作用:

a. 服避孕药:同时应用另一噻唑烷二酮和含乙炔雌二醇、炔诺酮的口服避孕药时,两者的血浆浓度都会降低约 30%,这可能会使避孕作用消失。同时应用盐酸吡格列酮和口服避孕药的药代动力学评价尚未进行。所以,对于同时使用盐酸吡格列酮和口服避孕药的患者,避孕应更谨慎。

b. 格列吡嗪:对于健康受试者,同时应用盐酸吡格列酮(45 mg 1 次/d)和格列吡嗪(5.0 mg 1 次/d)共 7d,未改变格列吡嗪的稳态药代动力学指标。地高辛:对于健康受试者,同时应用盐酸吡格列酮(45 mg 1 次/d)和地高辛(0.25 mg 1 次/d)共 7d,未改变地高辛的稳态药代动力学指标。

c. 华法林:对于健康受试者,同时应用盐酸吡格列酮(45 mg 1 次/d)和华法林,未改变华法林的稳态药代动力学指标。而且,接受长期华法林治疗的患者,服用盐酸吡格列酮不会对凝血酶原时间产生有临床意义的影响。

d. 二甲双胍:对于健康受试者服用 7 d 盐酸吡格列酮(45 mg 1 次/d)后,再同时予二甲双胍(1000 mg)和盐酸吡格列酮(45 mg),未改变二甲双胍的单剂药代动力学指标。

e. 吡格列酮的代谢需细胞色素 P450 的 CYP3A4 同工形式。需此酶代谢的药物还有:红霉素、阿司咪唑、钙通道阻滞剂、西沙必利、肾上腺皮质激素、环孢素、HMG-CoA 还原酶抑制剂、他克莫司(tacrolimus)、三唑仑、三甲曲沙(trimetrexate)等,抑制此酶的药物有:酮康唑、伊曲康唑等。盐酸吡格列酮与上述药物的相互作用尚未进行特定的、正式的药代动力学试验。在体外,酮康唑显著抑制吡格列酮的代谢。由于尚需收集更多数据,同时服用酮康唑和盐酸吡格列酮的患者应更频繁地评估血糖控制情况。

不良反应:

a. 低血糖。

b. 吡格列酮组贫血症发生率为 1.0%,安慰剂组为 0。与胰岛素联合用药,吡格列酮组与安慰剂组贫血症发生率均为 1.6%。与磺酰脲类联合治疗,吡格列酮组贫血症发生率为 0.3%,安慰剂组为 1.6%。与二甲双胍联合治疗,吡格列酮组贫血症发生率为 1.2%,安慰剂组为 0。血红蛋白平均降低 2%~4%。

c. 水肿。

d. 可能引起血浆容积增加,终致前负荷诱导型心脏肥大。

e. 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高,吡格列酮组有 0.26%(4/1526)的患者、安慰剂组有 0.25%(2/793)的患者 ALT 水平达到正常上限的 3 倍。偶尔出现

肌酸激酶水平短暂升高。

用法用量:起始剂量 15 mg 或 30 mg,最大剂量为 45 mg/d,1 次/d。在早餐前服用,如漏服 1 次,第 2 天不可用双倍剂量。联合治疗:与磺酰脲类药物合用时,本品初始剂量可为 1 片或 2 片,每日一次。磺酰脲类药物剂量可维持不变,当发生低血糖时,应减少磺酰脲类药物的使用;与二甲双胍类药物联合使用时,本品的初始剂量可为 1 片或 2 片,二甲双胍类药物可维持不变。一般而言,二甲双胍无须降低剂量也不会引起低血糖;与胰岛素合用时,本品的初始剂量可为 1 片或 2 片,胰岛素剂量可维持不变,当出现低血糖或血糖浓度降低至 6.1 mmol/L 以下时,可降低胰岛素用量 10%~25%,根据个体情况进行调整。

注意事项:

a. 本品只有在胰岛素存在情况下才发挥抗高血糖的作用,因此,不适用于 1 型糖尿病患者或糖尿病酮症酸中毒的患者。

b. 对有胰岛素抵抗的绝经前停止排卵的患者,用噻唑烷二酮类包括吡格列酮治疗,可导致重新排卵。

2) 曲格列酮

曲格列酮(troglitazone)是新一代口服降糖药,系噻唑烷二酮的衍生物。它主要通过降低胰岛素抵抗,增加肝脏、骨骼肌、脂肪等外周组织对葡萄糖的利用,抑制肝糖原的生成起降血糖的作用,对胰岛 β 细胞功能无直接作用。美国食品与药品管理局(FDA)宣布,曲格列酮作为一种治疗糖尿病的新药,对所有的 2 型糖尿病病人有效。

结构式:曲格列酮的结构式见图 1-8。

作用机制:曲格列酮直接与过氧化物酶增生激活受体 PPAR- γ 结合,并激活该核受体,后者与全反式维甲酸受体 X 结合,形成异二聚体,与特定的反应元件结合,通过某些辅活化因子(coactivator)和辅抑制因子(corepressor)介导,激活或抑制某些基因的转录以增强胰岛素的效应。PPAR- γ 在脂肪形成的级联反应中起关键作用,并与 2 型糖尿病的发病有关。

研究发现,曲格列酮增加人骨骼肌细胞 PPAR- γ 的 mRNA 的表达;使外周组织对葡萄糖和/或 2-脱氧葡萄糖的摄取增强;促进胰岛素与浆膜结合;增加外周组织细胞上葡萄糖转运蛋白-1(Glut 1)和葡萄糖转运蛋白-4(Glut 4)的表达;抑制果糖-1,6-二磷酸酶及其活性,使肝糖原的合成降低。曲格列酮在体外与骨骼肌细胞培养发现其糖原的合成活动增加。抑制长链脂肪酸氧化。葡萄糖诱导后胰岛素受体敏感性的下降是通过蛋白激酶 C 介导的,曲格列酮能逆转高糖对胰岛素受体激酶的抑制。

曲格列酮改善外周组织对胰岛素的敏感性,降低血浆胰岛素水平。研究显示,每日服用曲格列酮 100 mg 以上即可使血浆胰岛素水平下降。美国一项 292 例 2 型糖尿病的研究发现,单用曲格列酮 200~800 mg/d 治疗 6~12 周后,血浆胰岛素

水平下降 5%~34%, C 肽水平下降 22%。而相当剂量的格列本脲片使胰岛素水平增加 22%。葡萄糖钳夹试验显示治疗后病人的葡萄糖利用增加, 较大剂量的曲格列酮使葡萄糖的利用增加约 45%。曲格列酮降低胰岛素原水平。14 例 2 型糖尿病病人用曲格列酮 200~800 mg/d 使空腹胰岛素原、免疫活性胰岛素分别下降 42% 和 26%, 平均空腹胰岛素原/免疫活性胰岛素比值从 38% 下降至 33%。

曲格列酮治疗后肝糖原生成下降。肝糖原的生成和空腹血糖水平显著相关。一项 93 例 2 型糖尿病病人的研究证实, 大于 600 mg/d 的剂量使用 6 个月后肝脏糖原生成显著降低。

曲格列酮治疗使高密度脂蛋白(HDL)水平升高, 三酰甘油水平降低, 游离脂肪酸水平下降, 提高脂蛋白的抗氧化能力。单予曲格列酮 600~800 mg/d, 3~6 个月后, 高密度脂蛋白(HDL)水平提高 8%~12%。在 1 项 114 例 2 型糖尿病研究中发现, 治疗后 HDL 上升 16%, 三酰甘油下降 32%。在体外实验中, 浓度为 0.5~25 mg/L 的曲格列酮明显抑制 HDL 及低密度脂蛋白(LDL)氧化, 且这种作用呈剂量依赖性。20 名正常人每日服用 800 mg 后, LDL 抗氧化能力提高 24%。在欧洲及美国的研究中, 大剂量应用使游离脂肪酸水平明显下降。

曲格列酮在体外抑制血管平滑肌细胞增殖、游走, 促进阻力血管舒张。平滑肌的增殖和游走与血管的再狭窄有关。这种抑制作用在 5~40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内是呈剂量依赖性的, 而不是药物的毒性作用引起。

药物动力学: 曲格列酮口服后迅速吸收, 2~3 h 达血浆峰浓度, 血浆峰浓度及浓度-时间曲线下面积与剂量呈相关性。2~5 d 达药物稳态浓度, $t_{1/2}$ 约为 9 h。曲格列酮在体内主要与蛋白结合(>99%), 这种结合是可逆的。在动物实验中, 该药物主要分布在肝脏, 小部分分布在脂肪, 在脑组织中含量极低。曲格列酮的主要代谢产物是硫酸盐结合物、葡萄糖醛酸结合物和酮, 其中硫酸盐结合物在血浆中的浓度最大。曲格列酮主要由胆道排泄, 在粪便中排出, 尿中仅有少量的药物及代谢产物。

临床应用:

a. 单独用于治疗 2 型糖尿病。多项研究在原用降糖药停用 3 周以上或在饮食控制的基础上, 加用曲格列酮或安慰剂, 比较 2 组疗效, 疗程一般为 3~6 月。证实曲格列酮对糖代谢有肯定疗效。治疗后空腹血糖下降 20% 以上, 其下降幅度与剂量呈相关性。糖化血红蛋白(HbA_{1c})及胰岛素水平显著下降, 200 mg/d 组平均下降 15%, 600 mg/d 组下降 42%。与磺酰脲类相比, 曲格列酮降糖作用缓慢、温和, 并能明显降低胰岛素水平, 而磺酰脲类使胰岛素水平升高。1 项 541 例 2 型糖尿病的研究显示, 曲格列酮 200~600 mg/d 与格列本脲 12 mg/d 相比, 2 组治疗后空腹血糖水平和 HbA_{1c} 无明显差异, 但最低剂量的曲格列酮降低 HbA_{1c} 的作用低于格列本脲, 单用曲格列酮使胰岛素水平下降, 而格列本脲使胰岛素水平上升。

b. 与磺酰脲类合用治疗 2 型糖尿病。多起报道认为,对采用磺酰脲类治疗后,疗效不满意的 2 型糖尿病病人,加用曲格列酮,可使糖代谢改善,与安慰剂组有明显差别。一项 137 例的研究显示,在原用磺酰脲类治疗无效的基础上加用曲格列酮后,空腹血糖从 10.6 mmol/L 下降至 8.3 mmol/L, HbA_{1c} 从 9.1% 降至 7.7%,并在以后的维持治疗期间血糖和 HbA_{1c} 分别维持在 8.4~9.1 mmol/L 和 7.7%~8.2%。血浆胰岛素水平也显著降低。从治疗后胰岛素、空腹血糖、HbA_{1c} 水平来看,格列本脲和曲格列酮联合治疗比单用格列本脲要有效得多。

c. 与双胍类合用治疗 2 型糖尿病。目前只有少数报道。原单用二甲双胍(metformin)治疗组在加用曲格列酮后,与单用二甲双胍治疗相比,空腹血糖下降 32%, HbA_{1c} 下降 13%,提示两药合用具有相加作用。

d. 与胰岛素合用。在原有胰岛素治疗的基础上加用曲格列酮,比加大胰岛素剂量更为有效。在血糖控制在正常范围的情况下,加用曲格列酮可减少胰岛素的用量。17 例用胰岛素治疗的 2 型糖尿病病人,加用曲格列酮 400 mg/d 治疗 12 周后,空腹及餐后 1h 血糖分别下降 23% 和 20%, HbA_{1c} 下降 8%。

不良反应:许多临床试验证明,曲格列酮无严重不良反应。其不良反应在停药后即可消失。曲格列酮治疗的常见不良反应有胃肠道症状,如恶心、呕吐、腹胀、腹泻、上腹部疼痛等。可有水肿、呼吸道感染、可逆性黄疸(肝活检显示为特应性的药物反应)。实验室检查的异常有红细胞计数、血红蛋白、血细胞比容降低,乳酸脱氢酶升高。单用曲格列酮未见有低血糖反应,与磺酰脲类或胰岛素联用低血糖的发生率为 3%~5%。

作为一类新的口服降糖药曲格列酮具有广阔的应用前景。目前,已被用于与胰岛素抵抗有关的其他疾病治疗,如多囊卵巢综合征、妊娠糖尿病等。

3) 罗格列酮

化学名称:罗格列酮

结构式:罗格列酮的结构式见图 1-8。

药理作用:2 型糖尿病的主要病理生理学特征为胰岛素抵抗。本品属噻唑烷二酮类抗糖尿病药。通过提高靶组织对胰岛素的敏感性而有效地控制血糖。本品为过氧化物酶体增殖激活受体 γ 的高选择性、强效激动剂。人体内胰岛素的主要靶组织如肝脏、脂肪和肌肉组织中,均存在 PPAR 受体。本品激活 PPAR- γ 核受体,可对参与葡萄糖生成、转运和利用的胰岛素反应基因的转录进行调控。此外,PPAR- γ 反应基因(PPAR- γ responsive genes)也参与脂肪酸代谢的调节。临床研究中空腹血糖(FPG)和 HbA_{1c} 的检测结果表明,该药可改善血糖控制情况,同时伴有血胰岛素和 C 肽水平降低,也可使餐后血糖和胰岛素水平下降。本品对血糖控制的改善作用较持久,可维持达 52 周。

药代动力学:国内临床研究资料表明,本品与马来酸罗格列酮具有相似的安全性和疗效,单次口服 8 mg 马来酸罗格列酮(史克必成公司生产)与单次口服相同剂量的本品具有生物等效性。

适应证:用于 2 型糖尿病。单一服用本品,并辅以饮食控制和运动,可控制 2 型糖尿病患者的血糖。对于饮食控制和运动加服本品或单一抗糖尿病药物,而血糖控制不佳的 2 型糖尿病患者,本品可与二甲双胍或磺酰脲类药物联合应用。对服用最大推荐剂量二甲双胍或磺酰脲类药物,且血糖控制不佳的患者,本品不可替代原抗糖尿病药物,则需在其基础上联合应用。饮食控制是 2 型糖尿病治疗的首选措施。限制热量、减轻体重和增加运动均有助于提高胰岛素的敏感性,因而其不仅是 2 型糖尿病的基础治疗,而且对有效地保持药物疗效有重要的作用。在开始服用本品前,应控制影响血糖控制的病症,如感染。

用法用量:糖尿病的治疗应个体化,本品的起始用量为 4 mg/d,1 次/d,每次一片。经 12 周的治疗后,若空腹血糖控制不理想,可加量至 8 mg/d,1 次/d 或分两次服用(早、晚各 1 次)。不同剂量和用法的血糖降低情况详见临床作用和临床试验章节。本品可于空腹或进餐时服用。**单药治疗:**本品的起始用量为 4 mg/d,1 次/d,每次一片。临床试验表明,服用 4 mg/次、2 次/d 可更明显降低患者的空腹血糖和 HbA_{1c} 水平。**与磺酰脲类药物或二甲双胍合用:**在使用抗糖尿病药物的同时加服本品,无须改变原二甲双胍或磺酰脲类药物的治疗剂量。**与其他药物合用:**与磺酰脲类药物合用时,本品的起始用量为 4 mg/d,1 次/d,每次一片。如患者出现低血糖,需减少磺酰脲类药物用量;与二甲双胍合用时,本品的起始用量通常为 4 mg/d,1 次/d,每次一片。在合并用药期间,不会发生因低血糖而需调整二甲双胍用量的情况。**最大推荐剂量:**本品最大推荐剂量为 8 mg/d,可单次或分 2 次服用。临床研究表明,此剂量单药服用或与二甲双胍合用均安全有效。目前尚无本品以 4 mg 以上剂量与磺酰脲类药物合用的足够临床试验资料。临床试验表明,8 mg/d 剂量降低空腹血糖和 HbA_{1c} 最明显。老年患者服用本品时无须因年龄而调整剂量。肾损害患者单用本品无须调整剂量;因肾损害患者禁用二甲双胍,故对此类患者,本品不可与二甲双胍合用。若 2 型糖尿病患者有活动性肝脏疾患的临床表现或血清氨基转移酶升高(达正常上限 2.5 倍),则不应服用本品。

与其他药物相互作用:

a. 经细胞色素 P450 代谢的药物:体外药物代谢试验表明,在临床使用剂量下,罗格列酮不抑制主要的 P450。体外试验资料证实,罗格列酮主要通过 CYP2C8 代谢,极少部分经 CYP2C9 代谢。尼莫地平和口服避孕药(炔雌醇和炔诺酮)主要经 CYP3A4 途径代谢,因此与本品(4 mg,2 次/d)合用,不会对上述 2 种药物产生具有临床意义的药代动力学影响。

b. 格列本脲:对于服用格列本脲后病情稳定的糖尿病患者,本品(2 mg/次, 2次/d)与格列本脲(3.75 mg/d至10 mg/d)合用7 d,不会改变其24 h的平均稳态血糖水平。二甲双胍:对于健康受试者,本品(2 mg/次, 2次/d)与二甲双胍(500 mg/次, 2次/d)合用4 d,不会改变本品及二甲双胍的稳态药代动力学参数。

c. 阿卡波糖:健康受试者服用阿卡波糖(100 mg/次, 3次/d)7 d,对单剂口服本品的药代动力学参数无影响。

d. 地高辛:健康受试者连服本品(8 mg/次, 1次/d)14 d,对地高辛(0.375 mg/次, 1次/d)的稳态药代动力学参数无影响。

e. 华法林:连续服用本品对华法林对映体的稳态药代动力学参数无影响。

f. 乙醇:服用本品的2型糖尿病患者单次饮用中等量的乙醇,不会增加其急性低血糖发生的危险性。

g. 雷尼替丁:健康受试者服用雷尼替丁(150 mg/次, 2次/d)4 d,不会改变罗格列酮单剂口服或静脉给药的药代动力学参数。该结果表明胃肠道pH值升高不影响本品的口服吸收。

配伍禁忌:无已知配伍禁忌,鉴于罗格列酮仅在胰岛素存在的条件下才可发挥作用,故本品不宜用于1型糖尿病或糖尿病酮症酸中毒患者。本品与胰岛素或其他口服降糖药合用时,患者有发生低血糖的危险,必要时可减少合用药物的剂量。

由于马来酸罗格列酮与本品具有相同的活性成分,国内临床研究表明两者具有相似的安全性。因此,本品的不良反应可参照马来酸罗格列酮的资料。此外,还有环格列酮和恩格列酮等噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂。

1.3.3 α -葡萄糖苷酶抑制剂

1.3.3.1 α -葡萄糖苷酶抑制剂作用机制

α -葡萄糖苷酶抑制剂作用原理是抑制小肠上段的葡萄糖苷酶,阻断碳水化合物分解成葡萄糖,延缓吸收,能改善餐后血糖的高峰;还具有增加外周组织对胰岛素的敏感性、减轻胰岛素抵抗作用;适用于2型糖尿病患者、肥胖者、高胰岛素血症者。

1.3.3.2 α -葡萄糖苷酶抑制剂种类

1) 阿卡波糖(acarbose,拜唐平)

主要抑制淀粉酶,与磺酰脲类、双胍类或胰岛素合用时可降低餐后血糖,使胰岛素的用量减少10%~30%;是2型糖尿病合并肾功能受损患者的首选药。

化学名称:O-4,6-双脱氧-4-[[[(1S,4R,5S,6S)4,5,6-三羟基-3-(羟基甲基)-2-环己烯]氨基]-(-D-吡喃葡萄糖基(1→4)-O-(-D-吡喃葡萄糖基(1→4)-D-吡喃葡萄糖

药理作用:本品为口服降血糖药。其降糖作用的机制是抑制小肠壁细胞和寡糖竞争,而与 α -葡萄糖苷酶可逆性地结合,抑制酶的活性,从而延缓碳水化合物的

降解,造成肠道葡萄糖的吸收缓慢,降低餐后血糖的升高。

药代动力学:本药口服后很少被吸收,避免了吸收所致的不良反应,其原形生物利用度仅为1%~2%,口服200mg后, $t_{1/2}$ 为3.7h,消除 $t_{1/2}$ 为9.6h,血浆蛋白结合率低,主要在肠道降解或以原形方式随粪便排泄,8h减少50%,长期服用未见积蓄。

用法用量:用餐前即刻整片吞服或与前几口食物一起咀嚼服用,剂量因人而异。一般推荐剂量为:起始剂量为每次50mg,3次/d。以后逐渐增加至每次0.1g,3次/d。个别情况下,可增至每次0.2g,3次/d。或遵医嘱。

不良反应:常有胃肠胀气和肠鸣音,偶有腹泻,极少见有腹痛。如果不控制饮食,则胃肠道不良反应可能加重。如果控制饮食后仍有严重不适的症状,应咨询医生以便暂时或长期减小剂量。个别病例可能出现诸如红斑、皮疹和荨麻疹等皮肤过敏反应。

禁忌证:

- a. 对阿卡波糖过敏者禁用。
- b. 糖尿病昏迷及昏迷前期,酸中毒或酮症患者禁用。
- c. 有明显消化和吸收障碍的慢性胃肠功能紊乱患者禁用。
- d. 患有由于肠胀气而可能恶化的疾患(如Roemheld综合征、严重的疝、肠梗阻、肠道术后和肠溃疡)的病人禁用。
- e. 肝重肾功能损害的患者禁用。

注意事项:

- a. 病人应遵医嘱调整剂量。
- b. 如果病人在服药4~8周后疗效不明显,可以增加剂量。如果病人坚持严格的糖尿病饮食仍有不适时,就不能再增加剂量,有时还需要适当减少剂量,平均剂量为每次0.1g,3次/d。
- c. 个别病人,尤其是在使用大剂量时会发生无症状的血清氨基转移酶升高,故应考虑在用药的前6~12个月监测血清氨基转移酶的变化。停药后血清氨基转移酶值会恢复正常。
- d. 如出现低血糖,应使用葡萄糖纠正,而不宜使用蔗糖。
- e. 如果本品与磺酰脲类药物、二甲双胍或胰岛素一起使用时,血糖可能下降至低血糖的水平,则需减少磺酰脲类药物、二甲双胍或胰岛素的剂量。
- f. 服用本品期间,避免同时服用抗酸剂、消胆胺、肠道吸附剂和消化酶类制剂,以免影响本品的疗效。

g. 同时服用新霉素可使餐后血糖更为降低,并使本品胃肠反应加剧。

2) 米格列醇(miglitol tablets,奥恬平)

由德国拜耳制药公司20世纪80年代研究开发的一种新型降糖药,是一种新

的小肠 α -葡萄糖苷酶抑制剂。其结构与葡萄糖相似,能够可逆地竞争性抑制单糖 α -葡萄糖苷酶,减少单糖的代谢,药理作用及不良反应与阿卡波糖相似,能有效降低1型糖尿病患者的血糖。

药理作用:米格列醇属于氧化野尻霉素衍生物,它可延迟摄入的糖分的消化,从而导致餐后血糖浓度只有轻微升高,因此降低血糖。米格列醇可降低2型糖尿病患者的糖基化血红蛋白水平。通过糖基化血红蛋白水平而反映出的系统的非酶蛋白糖基化作用,随时间不同而影响血糖浓度。

药物相互作用:磺酰脲可引起低血糖症。米格列醇与磺酰脲联用,若发生低血糖症,应及时调整药物的剂量。

不良反应:胃肠道反应:胃肠道症状是米格列醇最常见的不良反应。主要表现为腹痛、泻泻、胃胀气,其中腹痛和腹泻的发生率会随着持续给药而有所减轻。皮肤反应:使用米格列醇时皮疹发病率为4.3%,通常是暂时性的。异常实验室指标:使用米格列醇的患者血清铁含量降低,但是大多数病人都是暂时性的且未伴见血色素降低和其他血液学指标的异常。

用法用量:糖尿病患者使用米格列醇或其他降糖药都无固定的剂量。米格列醇的剂量必须参照其疗效与病人耐受量具体而定,但不可超过最大推荐量(100 mg, 3次/d)。初始剂量:推荐的初始剂量为25 mg,每日正餐前服用,3次/d;维持剂量:50 mg,3次/d;最大剂量:100 mg,3次/d。

禁忌证:

- a. 糖尿病酮症致中毒者禁用。
- b. 炎性肠病,结肠溃疡,部分性肠梗阻,易感染性肠梗阻者禁用。
- c. 慢性肠道疾病伴有明显胃肠功能失调,或进一步加重出现肠胀气炎性肠病者禁用。
- d. 对该药物或其成分过敏者禁用。

注意事项:

- a. 低血糖证:由于米格列醇本身的作用机理使得单独用药时不会引起餐后或快速低血糖证。
- b. 血糖控制失调:当糖尿病患者伴有发热、外伤、感染或手术时,会产生暂时性血糖控制失调。此刻必须进行临时胰岛素治疗。
- c. 肾损害:在肾损害患者中,米格列醇血清浓度随着肾损害程度和肾功能的降低成比例地上升。伴有严重肾功能低下的糖尿病患者不推荐使用本品。

3) 伏格列波糖(Voglibose,倍欣)

由武田(Takeda)公司1994年在日本以“倍欣”(Basen)上市。与阿卡波糖作用相似,但作用部位不同:阿卡波糖既可抑制淀粉酶,对麦芽糖酶、异麦芽糖酶、血清

氨基转移酶和蔗糖酶也有作用,而伏格列波糖主要抑制后 4 种酶,其对 α -葡萄糖苷酶抑制作用强,是阿卡波糖的 190~270 倍,主要用于改善糖尿病餐后高血糖。

不良反应:有时出现低血糖。腹部胀满、排气增加。偶尔出现肠梗阻样症状。偶见伴有黄疸、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)升高的严重肝功能障碍、腹泻、便秘、食欲不振、恶心、呕吐、过敏反应。

注意事项:正在服用其他糖尿病药物的患者、有腹部手术史或肠梗阻史的患者、伴有消化和吸收障碍的胃肠道疾病的患者、重度疝、结肠狭窄、溃疡患者、严重肝肾功能障碍的患者、妊娠及哺乳妇女和老年患者慎用。

药物相互作用:和胰岛素及磺酰脲类药物并用时,有出现低血糖的报道。 β 受体阻滞剂、水杨酸制剂、单胺氧化酶抑制剂、氯贝特类高脂血症治疗剂、华法林能增强糖尿病药物降血糖的作用。肾上腺素、肾上腺素皮质激素、甲状腺激素能降低糖尿病药物降糖的作用。

1.3.4 其他降糖药物

1.3.4.1 普兰林肽

普兰林肽是一种人工合成的胰淀素类似物,2005 年 3 月获美国 FDA 批准,可用于 1 型和 2 型糖尿病。摄食后胰岛 β 细胞在分泌胰岛素的同时成比例分泌胰淀素;胰淀素(胰岛淀粉样肽)是由 37 个氨基酸残基组成的一种调节血糖的肽类激素,具有减慢胃排空、延缓葡萄糖的吸收、抑制餐后胰高血糖素的分泌、减少餐后肝糖原释放的作用。普兰林肽将胰淀素 25 位的丙氨酸、28 位和 29 位的丝氨酸用脯氨酸代替形成稳定的、可溶性物质,但其胰淀素样作用不改变,适用于使用胰岛素控制但血糖不佳患者的辅助治疗。

1.3.4.2 肽升血糖素样肽-1(GLP-1)

GLP-1 是一种糖尿病和肥胖症的潜在治疗药,由肠道 L 细胞合成并分泌。其作用机制有引起葡萄糖刺激的胰岛素分泌、抑制胰升糖素分泌、增加胰岛素原合成和提高胰岛素敏感性,减缓胃排空率和中枢性抑制食欲。临床试验已经证实 GLP-1 可降低 2 型糖尿病患者血糖。

1.3.4.3 糖异生抑制剂

这类药物主要是通过抑制长链脂肪酸的氧化,从而抑制糖原异生,增强葡萄糖的氧化而产生降血糖作用,同时还具有一定的降血脂及抗酮血症作用。已有 Emeriamine Emoxir 等进入 2 期临床应用。

西药和胰岛素注射液虽短期降糖作用明显,但治疗毒副作用大,容易导致低血糖,而且价格昂贵。因此,从天然药物中去筛选和研究有效、安全方便使用的降糖药物,已为世界各国医药工作者所瞩目。目前从天然药物中发现的降糖成分有黄

酮、生物碱、多糖、皂苷、萜类、不饱和脂肪酸等。因此,本书主要介绍天然降血糖成分的研究情况。

参考文献

- [1] 邓尚平. 临床糖尿病学[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2000.
- [2] 叶山东. 临床糖尿病学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005.
- [3] 蔡万春,张吉勇. 糖尿病分型及诊断新标准[J]. 宁夏医学杂志,2008,8:510-511.
- [4] 徐静,常玉. 糖尿病分型的重要意义[J]. 现代中西医结合杂志,2005,14(14):1882.
- [5] 田慧,卢艳慧,龚燕萍. 胰岛素促泌剂类药物的临床应用[J]. 中国医刊,2007,42(10):21-22.
- [6] 王瑶,高妍,潘长玉,等. 格列吡嗪缓释片与格列齐特对2型糖尿病患者胰岛素抵抗和胰岛细胞功能的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2003,19(1):13-14.
- [7] Cozma L S, Luzio S D, Dunseath G J, et al. Comparison of the effects of three insulintropic drugs on plasma insulin levels after a standard meal[J]. Diabetes Care, 2002, 25: 1271-1279.
- [8] 包玉清,贾伟平,朱敏,等. 快速相胰岛素分泌功能的评价[J]. 中华内分泌代谢杂志,2004,20(2):129-130.
- [9] Porksen N, Hollmgdal M, Juhl C, et al. Pulsatile insulin secretion, detection, regulation, and role in diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51: 245-247.
- [10] Rhodes C J. Type 2 diabetes: a matter of β -cell life and death[J]. Science, 2005, 307: 380-383.
- [11] Weir G C, Bonner-Weir S. Five Stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes[J]. Diabetes, 2004; 53 (suppl3): S16.
- [12] 汤文璐,王永铭,陈斌艳,等. 老年糖尿病的降糖药物治疗进展[J]. 中国临床药学杂志,2002,11(6):377-379.
- [13] 杜金山. 口服治疗糖尿病药物现状及进展[J]. 天津药学,2001,13(6):14-16.
- [14] 陈燕铭,曾龙驿,张围超,等. 瑞格列奈治疗2型糖尿病临床疗效[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(8):498-450.
- [15] 秦华,金华. 新型2型糖尿病治疗药那格列奈[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(1):43-44.
- [16] Bailey C J. Bigumfides, NIDDDM[J]. Diabetes Care, 1992, 15: 755-757.
- [17] 方玲. 新的胰岛素增敏剂-吡格列酮[J]. 中国临床药学杂志,2002,11(1):59-60.
- [18] 林毅,彭永德. 胰淀素类似物普兰林肽[J]. 世界临床药物,2006,27(11):673-675.
- [19] 盛清凯,姚惠源. 苦瓜中植物胰岛素的分离及其降糖作用研究[J]. 食品科学,2005,26(1):223-225.

第2章 糖尿病药物筛选

药物筛选模型是用于证明某种物质具有药理活性(生物活性、治疗作用)的实验方法,这些实验方法是寻找和发现药物的重要条件之一。人们在长期寻找药物的实践过程中,建立了大量用于新药筛选的各类模型,在新药发现和研究中发挥了积极作用。随着生命科学的发展,新的药物筛选模型不断出现,这些新的筛选模型不仅促进了新药的发现,而且对药物筛选的方法、理论、技术都产生了巨大影响。应用于药物筛选的模型有多种,根据所选用的材料和药物作用的对象以及操作特点,可以将这些模型大致分为三类:整体动物水平模型、组织器官水平模型和细胞分子水平模型。不同的筛选模型建立的理论基础不同,因此药物发现的过程也不同。糖尿病药物筛选过程中,所采用的模型也为这几类模型。

2.1 药物筛选模型的分类

2.1.1 整体动物模型与传统筛选程序

用整体动物进行药物筛选,是长期以来备受重视的方法。单纯从新药筛选的角度看,整体动物筛选法的优点是可以从动物身上直观地反映出药物的治疗效果、不良反应以及毒副作用。由动物模型获得的筛选结果,对预测被筛选样品的临床效果、不良反应和应用前景具有十分重要的价值。人类有目的、有计划地应用动物进行药物筛选,是现代医药学发展的结果。动物筛选法的应用,使药物研究产生又一次飞跃,利用该模型发现了大量新型药物,直到20世纪70年代中期,动物实验一直是药物筛选的基本方法。

但整体动物筛选法也有缺点:采用动物模型进行药物筛选时,由于动物的特殊性,决定了药物筛选过程主要依赖于手工操作,而且只能对有限的样品进行筛选,使整体动物模型筛选新药具有明显的局限性,效率低、成本高。因此,人类目前在实验动物身上复制出的病理模型还十分有限。此外,由于动物实验需要时间长、劳动强度大、操作技术要求高、受试样品需要量大(约5g)等因素的限制,因而发展缓慢,已不能满足现代药物研究进行大规模筛选的需要。

糖尿病动物模型主要分自发性遗传性动物模型、诱导性动物模型和转基因动物模型。

2.1.2 组织器官水平的筛选模型和体外药物筛选方法

随着现代医学和现代药理学的发展,采用动物的组织、器官制备的药物筛选模型越来越多,如离体血管实验、心脏灌流实验、组织培养实验等方法。通过观察药物对特定组织或器官的作用,可以分析药物作用原理和可能具有的药理作用。组织、器官水平的筛选模型可以反映生理条件下的药物作用,也可以制备成病理模型,观察药物对病理条件下组织器官的作用。应用组织器官模型筛选药物,是药物筛选技术的一大进步。

应用离体组织器官模型筛选药物,在一定程度上克服了整体动物模型的不足。首先降低了筛选样品的用量。用整体动物进行药物筛选,对样品的需求量一般在1~5 g以上(根据用量和动物大小),而采用组织器官水平的筛选模型筛选药物,样品用量一般仅需整体动物的1/10或更少;第二,降低劳动强度,扩大筛选规模,减少动物用量,特别是有些模型仅使用一小部分组织器官(如血管条实验法),同一时间内可以进行多样品的筛选,提高了筛选效率,降低了筛选成本;第三,减少了影响药物作用的因素,易于评价药物作用。

组织器官水平的药物筛选模型在药物筛选和药理学研究中发挥了十分重要的作用,特别是在药理学研究中,具有独特的优势,目前仍在广泛应用。但是,应用组织器官水平的筛选模型进行药物筛选也存在明显的缺点,主要是规模小、效率低、反应药物作用有限、对样品的需求量仍然较大,不易实现一药多筛,此外,人工操作技术要求高等也是影响其在药物筛选中应用的主要原因之一。

2.1.3 细胞、分子水平药物筛选模型和高通量药物筛选

细胞生物学、分子药理学、分子生物学、生物化学、病理学等学科的发展,为观察药物作用提供了新的方法,大量分子细胞水平的药物筛选模型不断出现并应用到药物研究和药物筛选实践中。与整体动物和组织器官水平的筛选模型相比较,细胞、分子水平的药物筛选模型具有材料用量少、药物作用机制比较明确、可实现大规模的筛选等特点,已经成为目前药物筛选的主要方法。细胞分子水平药物筛选模型的应用为自动化操作奠定了基础,使药物筛选由传统的手工筛选形式转变为由计算机控制的自动化大规模筛选的新技术体系,形成了高通量药物筛选。

采用细胞水平和分子水平筛选模型进行药物筛选,在两个方面表现出极大的优势,一是大样本量的筛选,由于药物筛选是对未知的探索 and 发现过程,只有扩大筛选对象和筛选范围,才有可能发现真正高效的药物;二是实现了一药多筛,由于这类筛选模型消耗样品很少(μg 级),可以使珍贵的样品在多个模型上进行筛选,扩大发现新药的可能。这种筛选方法符合药物筛选和药物发现的基本规律。

糖尿病细胞水平和分子水平筛选模型如醛糖还原酶抑制剂的微量筛选模型、3T3-L1 细胞葡萄糖代谢模型等。

2.2 糖尿病药物筛选动物模型

糖尿病动物模型主要分为自发性遗传性动物模型、诱导性动物模型和转基因动物模型。

2.2.1 自发性糖尿病动物模型

目前,人们筛选成功并能够作为种系保存下的糖尿病动物模型主要是啮齿类动物糖尿病模型。该模型绝大多数采用有自发性糖尿病(DM)倾向的近交系纯种动物,如 BB(Biobreeding)鼠、NOD(non-obesity diabetes)小鼠、GK(Goto-kakisaki)鼠和中国地鼠(Chinese hamster)等动物造模。自发性糖尿病动物模型是指动物未经过任何有意识的人工处置,在自然情况下发生糖尿病的动物模型。已用于研究的自发性糖尿病动物约有 20 种,可分为两类:一类为缺乏胰岛素,起病快、症状明显,并伴有酮症酸中毒,如 BB(Biobreeding)鼠、NOD(non-obesity diabetes)小鼠和 LETL 大鼠,它们可以作为 1 型糖尿病的动物模型使用。这些动物没有肥胖,发病之初呈现胰岛炎的症状,人类组织相关性抗原(MHC)参与发病过程,这些都与人 1 型糖尿病的特征相似。利用这些模型可以对人 1 型糖尿病的发病机制进行深入研究。另一类为胰岛素抵抗性高血糖症,其特点是病程长,不合并酮症,为 2 型糖尿病动物模型。常用的 2 型糖尿病自发性动物模型有中国地鼠(Chinese hamster)、GK(Goto-Kakisaki Wistar rats)大鼠、NSY(Nagoya-Shibata-Yasuda)鼠和 OLETF 大鼠。

2.2.1.1 NOD 小鼠

NOD 小鼠自发产生胰岛素依赖型糖尿病,是 1 型糖尿病的良好模型。NOD 小鼠的糖尿病在病因学上表现出受遗传与环境因素的双重影响。免疫系统在 NOD 小鼠的糖尿病发生发展中起重要作用。

NOD 小鼠为一自发性非肥胖糖尿病小鼠,其发病年龄和发病率有着较为明显的性别差异,雌鼠发病年龄较雄鼠明显提早,发病率亦远高于雄鼠,NOD 小鼠 3~5 周龄时开始出现胰岛炎,浸润胰岛的淋巴细胞常为 CD4⁺ 或 CD8⁺ 淋巴细胞,于 13~30 周龄时发生明显糖尿病。与 BB 大鼠不同的是,NOD 小鼠一般不出现酮症酸中毒,无外周血淋巴细胞减少,但同样需要胰岛素治疗以维持生存。在 NOD 鼠胰岛炎初期,血浆和胰岛灌注液中胰岛素的基础值和对葡萄糖的反应值均减低,同时胰高血糖素和胰高血糖素样物质的免疫活性增加。NOD 小鼠葡萄糖激酶、丙酮酸激酶等活性下降,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和丙酮酸激酶的活性增加,肝组织中血

清氨基转移酶、乳酸脱氢酶、支链氨基酸以及肾脏组织中的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶和 α -甘露糖苷酶等活性也均降低。NOD小鼠伴发糖尿病是遗传、免疫和自由基损伤多因素综合作用的结果,NOD小鼠这些特点与1型糖尿病患者相似,是一种较好的研究关于1型糖尿病遗传学、免疫学、病毒学特征及其预防和治疗等方面的动物模型。

2.2.1.2 BB大鼠

BB大鼠产生自发性胰岛素依赖型糖尿病,是1型糖尿病的良好模型。BB大鼠的糖尿病也是由自身免疫反应引起的。BB大鼠模型是由加拿大渥太华Biobreeding实验室培育而成。大约50%~80%BB鼠可发生糖尿病,雄性与雌性大鼠发病率相当。BB大鼠一般于60~120日龄时发生糖尿病,发病前数天可见糖耐量异常及胰岛炎。发病的大鼠具有1型糖尿病的典型特征:体重减轻、多饮、多尿、糖尿、酮症酸中毒、高血糖、低胰岛素、胰岛炎、胰岛 β 细胞减少。需依赖于胰岛素治疗才能生存。BB大鼠另一个特点是其血液中淋巴细胞减少,易于感染。此外,BB大鼠发生淋巴细胞甲状腺炎的频率较高,其血清常可检测出抗平滑肌、抗骨骼肌、抗壁细胞和抗甲状腺球蛋白的自身抗体。这些抗体针对胰岛 β 细胞。BB大鼠糖尿病与MHC-I类基因密切相关,糖尿病趋向和糖尿病抵抗的BB大鼠具有同样的糖尿病易感基因。

2.2.1.3 LETL(long evans tukushima lean)大鼠

LETL也是一种1型糖尿病的动物模型,通常于8~20周龄时发生糖尿病,雄性大鼠发病率约为21%,雌性大鼠发病率约为15%,如果在5~7周龄时使用环磷酰胺处理大鼠则其在16周龄时糖尿病发病率增加1倍。LETL大鼠无外周血淋巴细胞减少,在明显糖尿病症状发生前4~5d,胰岛可见有明显的淋巴细胞浸润。

2.2.1.4 嗜沙肥鼠(Psammonys Obesus, PO)

PO大鼠是生活在沙漠地区的啮齿类动物,该鼠具有明显的胰岛素抵抗,在高热能饮食条件下(数天~两周),90%的PO大鼠可自发出现高胰岛素血症,并伴有明显的高血糖,随后出现胰岛素水平降低。PO大鼠的糖尿病发病大致可分为以下4个阶段:①起始阶段:该阶段内血糖及血清胰岛素水平均正常;②高胰岛素血症期:该期血糖仍保持正常,但血清胰岛素明显升高;③高胰岛素和高血糖期:该期内血糖 $>11.1\text{ mmol/L}$;④低胰岛素高血糖期:该期由于胰岛 β 细胞分泌功能损害导致低胰岛素和高血糖,大鼠需应用胰岛素治疗以维持生存。Duhault等发现PO大鼠在2型糖尿病晚期呈胰岛素依赖性,胰腺组织学显示有胰岛炎存在,说明其具有迟发1型糖尿病(latent autoimmune diabetes mellitus in adult, LADA)的特点,故PO大鼠可能适用于LADA的研究。

2.2.1.5 中国仓鼠(Chinese hamster)

中国仓鼠是自发性遗传性 2 型糖尿病动物模型,是通过近亲繁殖选择糖耐量异常的个体近交而获得,现已有几个亚系,表现出高血糖、非肥胖等症状,各亚系间糖尿病的严重程度不尽相同。

2.2.1.6 GK 大鼠(Goto-Kakizaki Wistar Rats)

GK 大鼠是一个常用的自发性非肥胖 2 型糖尿病模型,GK 雌、雄鼠发病率相当,一般于 3~4 周龄时发生明显的糖尿病,在高血糖发生前,常有一段血糖正常时期(从出生后到断奶),相当于人类的糖尿病前期。其特征有:葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能受损, β 细胞数目减少 60%,肝脏对胰岛素的敏感性降低,导致肝糖原生成过多;肌肉和脂肪组织呈中度胰岛素抵抗。GK 大鼠血压也较正常 Wistar 大鼠高(低盐摄入约高 15 mmHg,高盐摄入约高 24 mmHg);此外,GK 大鼠具有与人类 2 型糖尿病微血管并发症相似的改变如运动神经传导速率减慢、神经纤维有节段性脱髓鞘、轴突变性、视网膜血管内皮生长因子(VEGF)表达增加、视网膜局部血流减少、白蛋白尿、肾小球基膜增厚、肾小球肥大和硬化等。

2.2.1.7 Zucker DM 肥胖大鼠(zucker diabetic fatty, ZDF)

Zucker 肥胖大鼠表现为 1 型糖尿病性状,受常染色体隐性遗传基因影响,有肥胖、中度高血压、高胰岛素血症、高血脂、高血糖、胰岛素抵抗等症状,有研究者发现其肥胖与血脑屏障上的瘦素载体减少也有关,瘦素由载体载入中枢神经系统与受体结合能够启动调节摄食和机体能量平衡机制。

2.2.1.8 NSY(Nagoya-Shibata-Yasuda)小鼠

NSY 小鼠具有 1 型糖尿病特征,是从 JCl-ICR 小鼠亲株根据葡萄糖耐量选择繁殖产生的近交系小鼠具有年龄依赖性自发性糖尿病特点。48 周龄雄性发病率 98%,雌性 31%,该鼠在任何年龄,都没有太严重的肥胖和胰岛素血症,胰岛素分泌对葡萄糖的刺激反应紊乱。NNSY 小鼠将有助于人们对 1 型糖尿病遗传学倾向及病理发生的进一步研究。

2.2.1.9 OLETF(ostuka long-evans tokushima fatty)大鼠

OLETF 大鼠是河野等利用 Long-Evans 系大鼠建立的自发性 2 型糖尿病动物模型。该鼠由于胆囊收缩素(CCK)-A 受体 mRNA 的表达完全缺失,导致其食欲亢进和肥胖,消化道对 CCK-8 刺激无反应,胰腺的内、外分泌功能均降低。此模型具有 2 型糖尿病的特征如多食、多饮和多尿,能缓慢地自然产生 2 型糖尿病。OLETF 大鼠自 8 周龄起血清三酰甘油、胆固醇和餐后血糖均明显高于对照鼠,随着年龄的增长,血清三酰甘油和餐后血糖不断升高。12 周龄起出现明显的胰岛素抵抗;18 周龄时,胰岛素敏感性约为对照组的 20%;24 周龄时,血浆胰岛素代偿性增加;30 周龄时,血(TG)水平达到对照组的 5 倍;40 周龄以后,胰岛的分泌功能降低;65 周以

后,血糖值高达 25 mmol/L,而免疫反应性胰岛素(IRI)水平却低于 40 pmol/L。OLETF 大鼠尿蛋白自 30 周龄起明显增多,且随年龄的增加而迅速增加,雄性鼠 55 周龄时,尿蛋白含量可达 800 mg/d 以上。组织学研究发现,OLETF 大鼠胰腺呈进行性纤维化。20 周龄时,胰腺即有明显的纤维化、胰岛增大;40 周龄时,胰岛被结缔组织取代;70 周龄时,胰腺极度萎缩,胰腺组织被脂肪和结缔组织代替。此外,OLETF 大鼠在 22 周龄时,即可出现肾小球基膜增厚;40 周龄以后,雄性 OLETF 大鼠肾小球增大,肾小球膜基质增生及肾小球基膜增厚;70 周龄时,几乎在每一个肾小球周围都可见被扩张的毛细血管包围的 PAS-阳性结节,这种结节性的改变膨胀到肾小球膜基质,OLETF 大鼠的肾脏变化类似人的 DM 结节性肾小球硬化症。以上胰腺和肾脏不同阶段的病理变化,与临床 2 型糖尿病患者的病理表现极为相似,为研究 2 型糖尿病及其并发症的发病机制和胰岛素抵抗干预措施的评价提供了良好的实验动物模型。

2.2.1.10 db/db 小鼠

db/db 小鼠糖尿病发病系瘦素受体突变所致,呈常染色体隐性遗传。该鼠在 10~14d 龄时就出现多食、高胰岛素血症,但 4 周龄时血糖仍维持正常,随后该鼠体重逐渐增加,出现高血糖。2~3 月龄时尽管胰岛素水平为正常时的 6~10 倍,但血糖水平可达 22~33 mmol/L;3~6 月龄时胰岛素水平逐渐下降至低于正常水平,该期小鼠体重明显下降,并出现酮症,组织学显示显著的 β 细胞坏死,如缺乏胰岛素治疗,该小鼠存活不超过 10 月。db/db 小鼠另一个特点为:其血清胰高糖素的水平较正常对照升高 2 倍以上。db/db 小鼠是适用于研究 2 型糖尿病发病机制的动物模型。

2.2.1.11 ob/ob 小鼠

ob/ob 小鼠为 2 型糖尿病动物模型,属常染色体隐性遗传。ob/ob 小鼠糖尿病发病是由于 ob 基因突变,造成其编码的瘦素(leptin)蛋白缺乏,引起肝脂肪生成和肝糖原异生显著增加,高血糖又刺激胰岛素分泌,引起胰岛素抵抗,刺激脂肪的形成,ob/ob 小鼠体重可达 90 g 之多。ob/ob 小鼠症状的轻重取决于遗传背景,纯合体动物表现为肥胖,明显的高血糖及高胰岛素血症,而 ob/ob/6J 小鼠胰岛素水平可达正常小鼠的 10~50 倍,但其血糖常只有轻度的升高。组织学显示 ob/ob 小鼠胰岛 β 细胞显著增生、肥大,而胰岛 A 细胞、D 细胞及 PP 细胞数量明显减少。

2.2.1.12 KK 鼠

近交系 KK 小鼠是糖尿病典型的多基因疾病动物模型,表现为 2 型糖尿病特征:高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等症状,并出现糖尿病性肾病、视网膜病变等并发症。KK 小鼠有明显的多食,从 5 周龄起,血糖、血胰岛素水平逐步升高,至 5 月龄时体重可达 50 g,非空腹血糖常低于 17 mmol/L,非空腹血胰岛素可达

1200 $\mu\text{g/ml}$, 1 岁龄时, 多食、高血糖、高胰岛素血症、肥胖及肝脏对胰岛素的敏感性可自发恢复正常, 但糖尿病 KK 小鼠生命常明显缩短。此外, KK 小鼠空腹胰高糖素水平升高, 且不受葡萄糖抑制。组织学显示 β 细胞有脱颗粒和糖原浸润, 随后出现胰岛肥大和肝脂肪化和脂肪组织增多。

2.2.2 诱发性动物模型

建立诱发性动物模型的方法主要有化学药物损伤、病毒感染、催肥、手术等方法。常用的诱导糖尿病动物模型的药物主要有两种: 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和四氧嘧啶(alloxan, AX)。四氧嘧啶和链脲佐菌素引起 β 细胞损伤的机制有所不同, 但主要都是通过诱导产生大量的氧自由基造成损伤的。四氧嘧啶可以引起兔、猫、犬、鼠、羊、猴等动物的胰岛 β 细胞破坏, 导致糖尿病症状, 而豚鼠对四氧嘧啶有一定的抗药性。由于四氧嘧啶破坏 β 细胞的同时, 也造成肝、肾等器官和组织的中毒性损害, 因此其应用受到一定限制。链脲佐菌素具有致糖尿病的作用, 对 β 细胞有很强的选择性杀伤作用。能够诱导大鼠、豚鼠、小鼠、地鼠、兔、犬、猴等动物产生糖尿病。四氧嘧啶和 STZ 诱导的糖尿病动物模型时, 动物都有血糖升高, 血糖降低, 持续高血糖 3 个时相的变化。

2.2.2.1 STZ 诱发性动物模型

STZ 是一种含亚硝基的化合物, 进入体内可通过以下机制特异性地破坏胰岛 β 细胞: ①STZ 直接破坏胰岛 β 细胞: 主要见于注射大剂量 STZ 后。STZ 注射后可引起 β 细胞内辅酶 I(NAD) 的浓度下降, NAD 依赖性能量和蛋白质代谢停止, 导致 β 细胞死亡。②通过诱导一氧化氮(NO)的合成, 破坏胰岛 β 细胞; ③STZ 激活自身免疫过程, 进一步导致 β 细胞的损害: 小剂量注射 STZ 可破坏少量胰岛 β 细胞, 死亡的胰岛 β 细胞可作为抗原被巨噬细胞吞噬, 产生 Th1 刺激因子, 使 Th1 细胞系占优势而产生 IL-2 及 IFN- γ , 在胰岛局部促使炎性细胞浸润, 并活化释放 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 、NO 和 H_2O_2 等物质杀伤细胞。死亡细胞又可作为自身抗原, 再次提呈给抗原提呈细胞进行处理, 释放细胞因子, 放大细胞损伤效应, 最终诱发糖尿病。

2.2.2.2 四氧嘧啶(AX)诱发性动物模型

四氧嘧啶进入体内后能迅速被胰岛 β 细胞摄取, 影响细胞膜的通透性和细胞内 ATP 的产生, 抑制葡萄糖介导的胰岛素分泌。四氧嘧啶主要通过产生氧自由基破坏 β 细胞结构, 导致细胞的损伤及坏死, 从而阻碍胰岛素的分泌, 使血清胰岛素水平降低。因四氧嘧啶同时也造成肝、肾组织中毒性损害。另外, 部分采用四氧嘧啶制造的糖尿病动物模型可自发缓解, 故目前已经很少应用。

2.2.2.3 手术方法

部分破坏或者全部切除动物胰腺也可诱发糖尿病,据胰腺损伤的程度不同形成糖尿病动物模型。常采用犬、猫和大鼠等造模,全部或大部分切除实验动物的胰腺,但保存胰十二指肠动脉吻合弓。如果连续2 d 血糖值超过11.1 mmol/L 或进行葡萄糖耐量试验120 min 时的血糖值仍未恢复到注射前水平则认为糖尿病造模成功。其机制是全部或大部分切除胰腺后, β 细胞缺失而产生永久性糖尿病。

2.2.2.4 其他糖尿病动物模型

(1) 激素性糖尿病动物模型:注射垂体前叶提取物、生长素、肾上腺皮质激素、甲状腺素或胰高血糖素均可直接或间接产生糖尿病。

(2) 病毒性糖尿病动物模型:柯萨奇病毒等一些病毒通过诱导机体产生自身免疫反应引起糖尿病,使用环孢菌素A 等免疫抑制剂可以提高造模的成功率。

(3) 免疫性糖尿病动物模型:静脉注射抗胰岛素抗体或用同种或异种胰岛素的弗氏佐剂复合物及抗血清免疫或用同种或异种胰腺+弗氏佐剂免疫动物均可在数小时后产生一过性高血糖。其机制是内源性胰岛素与输入的抗体结合导致内源性胰岛素降低而致糖尿病。

2.2.3 转基因动物模型

目前转基因动物的研究越来越多,技术将逐渐成熟,在糖尿病研究中将有很大应用。转基因动物(transgenic animal)技术是通过遗传工程的手段对动物基因组的结构或组成进行人为的修饰或改造,并通过相应的动物育种技术使得这些经修饰改造后的基因组在世代间得以传递和表现。利用这一技术,人们可以在动物基因组的特定位点引入所设计的基因突变,模拟造成人类遗传性疾病的基因结构或数量异常;可以通过对基因结构进行修饰,在动物发生、发育的全过程中研究体内基因的功能及其结构/功能的关系。有关1型、2型糖尿病和青少年发病的成人型糖尿病(maturity-onset diabetes of youth, MODY)的转基因糖尿病动物均有报道。

随着对糖尿病研究的逐步深入,相应的糖尿病动物模型发展势在必行,转基因动物的建立将为糖尿病研究提供更科学有效的工具。

2.3 基于细胞水平的糖尿病药物筛选模型

细胞水平筛选模型由于选取人源组织细胞或人源转化细胞株,使得靶标构象和所处环境更接近天然的生理状态,所以基于细胞筛选模型可提供化合物胞内药理活性、膜通透性和毒理性等传统生化分析不能得到的活性数据。目前,用于筛选抗2型糖尿病药物的细胞水平筛选模型基本上可归结为基于靶点和基于表型的

模型。

2.3.1 基于靶点的细胞模型

基于靶点的筛选模式由于具有明确通道的药物作用靶点,所筛选出的药物其作用机制相对较明确,因而是当前最主要的药物筛选模式。在研究模型中,主要针对的靶点有受体、胰岛素信号通路、钙通道和 ATP 敏感性钾通道等。其中以受体和胰岛素信号通路为靶点的细胞模型多采用报告基因技术,即先构建出表达靶标蛋白和含靶标调控序列及由该序列调控的报告基因的质粒,再将这 2 种质粒共转染于适合的细胞,如候选药物对靶点有效就可诱导报告基因的高水平表达。

2.3.1.1 以膜受体为靶点的筛选模型

胰高血糖素样肽(GLP)-1 受体、葡萄糖依赖的胰岛素释放多肽(GIP)、生长抑素受体、毒蕈碱受体、胆囊收缩素受体、肾上腺素受体及其调节剂均可能影响胰岛素的分泌,因此可作为抗糖尿病药物的筛选靶点。其中 GLP-1 是强效的降血糖激素,它与受体结合后能发挥多种活性,包括刺激胰岛素基因的转录和葡萄糖依赖的胰岛素生成和分泌,促进胰岛细胞生成、减缓其凋亡,抑制胰高血糖素分泌和肝糖输出,减缓胃排空和食物摄入,增加外周葡萄糖消耗等。由于 GLP-1 受体被激活可有效改善糖尿病患者的血糖水平,已受到广泛的关注。

2.3.1.2 以核受体为靶点的筛选模型

过氧化物酶体增殖体激活受体(peroxisome proliferators—activated receptor, PPAR)- γ 是一个与多种基因调节有关的核受体。当 PPAR- γ 被激活后,可与维甲酸 x 受体(RXR)形成异源二聚体,再与 PPAR- γ 的反应元件(PPRE)结合,调控下游靶基因的转录活化,从而发挥一系列生理活性。大量研究发现,它能激活与脂肪细胞分化有关的基因,与 2 型糖尿病密切相关,以其为靶点筛选出的 PPAR- γ 激动剂噻唑烷二酮(TZD),具有良好的胰岛素增敏作用。因此,近年来出现了以 PPAR- γ 为靶点的药物筛选。

2.3.1.3 以胰岛素信号通路为靶点的细胞模型

胰岛素是由胰腺岛 β 细胞分泌的一种激素。胰岛素通过其信号转导途径介导调节靶细胞葡萄糖转运、糖代谢和能量代谢等多种复杂生物化学过程,达到维持血糖稳定的作用。信号转导通路中关键酶及细胞因子的活性改变均会影响胰岛素的生理活性,如系胰岛素受体(IR)的酪氨酸激酶、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)、IR 底物 1/2(IRS-1/2)、小 G 蛋白(Ras)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、底物酶(JAK)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)及信号转导物和转录激活物(signal transducer and activator of transcription, STAT)5 等。因此,这些酶或细胞因子均将或已成为抗糖尿病药物研究中的重要靶标。其中 STAT5 是胰岛素信号转导中的重要转录因

子,有 STAT5A 和 STAT5B 2 类亚型。酵母双杂交实验发现,STAT5B 是 IR 的底物,IR 激活后可使 STAT5B 磷酸化,从而激活下游的信号转导通路。通过报告基因检测方法发现,在胰岛素诱导肝葡萄糖激酶基因表达过程中,STAT5B 与肝葡萄糖激酶启动子的结合可能起了重要的调节作用,因此认为,胰岛素靶基因的表达部分依赖 STAT5B 的激活。可见,对 STAT5B 信号通路的调控在糖尿病研究中有着重要作用。STAT5B 作为抗糖尿病新药研究的靶点,可通过 STAT5B 的转录激活来筛选具有胰岛素样活性的化合物或 STAT5B 激活剂。

2.3.1.4 以钙通道和钾通道为靶点的细胞模型

分泌胰岛素的胰腺岛 β 细胞是一种电兴奋性内分泌细胞钙通道和钾通道的活性改变对胰岛素的分泌均具有重要的调节作用。胰岛 β 细胞分泌胰岛素是由钙离子浓度升高直接触发的。当葡萄糖浓度升高到刺激阈以上时,葡萄糖进入 β 细胞内代谢产生能量,ATP 使细胞膜上的 K_{ATP} 通道关闭,膜去极化,诱发动作电位,钙通道开放,胞外钙内流,胞质内的钙离子浓度升高,进一步激活胞内钙库的释放,钙离子浓度急剧升高,从而启动胰腺岛 β 细胞分泌胰岛素。胰岛素释放减少或过度释放均可导致 2 型糖尿病的发生。因此,以钙通道和钾通道为靶点筛选与胰岛素释放有关的抑制剂或激动剂,已成为研发抗糖尿病药物的新思路。

2.3.2 基于表型的细胞模型

基于表型的药物筛选模型通过筛选那些能造成细胞产生期望生理变化的化合物,将有助于新蛋白、新靶点的发现。目前,在 2 型糖尿病药物筛选中应用较多的有胰岛素抵抗细胞模型和葡萄糖消耗转运细胞模型。

2.3.2.1 胰岛素抵抗细胞模型

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病患者主要的病理生理特征。胰岛素抵抗状态下,机体对胰岛素的正常反应性降低,造成 β 细胞代偿性分泌增加。当该代偿性分泌能力最终衰竭而不足以控制血糖时,就会发展成为 2 型糖尿病。为探讨胰岛素抵抗发生机制及筛选改善胰岛素抵抗药物,常需使用胰岛素抵抗细胞模型。国外已成功复制数种胰岛素耐受细胞模型,主要包括高胰岛素诱导培养、高葡萄糖培养、游离脂肪酸(FFA)诱导等模型,其中以高胰岛素培养模型最为稳定、可靠,使用也最为广泛。

2.3.2.2 葡萄糖消耗转运细胞模型

在胰岛素作用的靶细胞中,某些化合物可上调酪氨酸激酶活性,促进细胞对葡萄糖的吸收。在细胞水平上建立葡萄糖消耗、转运模型已被用来评价化合物的降糖活性。周丽斌等利用 3T3-L1 前脂肪细胞,成功建立了葡萄糖消耗转运模型并证明小檗碱能显著增加脂肪细胞对葡萄糖的消耗转运,从而为进一步深入探讨小檗

碱的降血糖机制提供依据。

2.4 基于酶水平的糖尿病药物筛选模型

2.4.1 α -葡萄糖苷酶抑制剂糖尿病药物筛选模型

α -葡萄糖苷酶包括位于小肠腔的葡萄糖淀粉酶、小肠刷状缘的麦芽糖酶、麦芽糊精酶和蔗糖酶等。正常人进食后,食物中的碳水化合物如淀粉先经 α -淀粉酶作用生成麦芽糖、麦芽三糖、 α -糊精等,随后和蔗糖一起通过蔗糖酶等糖苷酶水解作用生成葡萄糖、半乳糖和果糖,经肠壁细胞吸收而被机体利用。糖尿病患者因代谢障碍而导致血糖浓度发生异常改变。预防和治疗这类疾病的有效方法之一是限制或延缓多糖在消化道内分解,为此就必须降低 α -葡萄糖苷酶活性。

2.4.1.1 以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷为底物的酶抑制剂筛选模型

4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)是麦芽糖类似物。以 PNPG 为底物测定中草药提取物或降糖活性成分对 α -葡萄糖苷抑制活性大小,从中草药中筛选强活性降糖活性因子是目前最常用、最经典的筛选方法。基本操作过程:首先向磷酸钾缓冲液的酶活力测定系统中加入 α -葡萄糖苷酶,37℃保温 10 min,加入 PNPG 后,37℃反应 10 min,加入 Na_2CO_3 终止反应,在 400 nm 处测定酶作用下释放的硝基酚的吸光度。然后再取筛选样品加入酶活力测定系统中,先将酶 37℃保温 10 min,再加底物 37℃反应 10 min,加入 Na_2CO_3 终止反应,在 400 nm 处测定酶作用下释放的硝基酚的吸光度。最后将两次吸光度值相比即得抑制百分率。这一筛选方法的建立为 α -葡萄糖苷酶的体外筛选奠定了基础,筛选过程经济、快捷,并可进行体外直接筛选,因此,这一筛选模型特别适用于 α -葡萄糖苷酶的初步筛选。

2.4.1.2 以淀粉、蔗糖、麦芽糖为底物的酶抑制剂筛选模型

作为第二代酶,抑制剂筛选模型以淀粉、蔗糖、麦芽糖等 α -葡萄糖糖苷酶直接水解物为底物的筛选模型。具体筛选过程与以 PNPG 为底物的筛选模型基本相同,只是所用底物不同。其具有以下优点:

(1) 具有 PNPG 底物筛选模型的经济、快捷,可在体外进行筛选等优点。

(2) 筛选得到的 α -葡萄糖苷酶靶向作用具体,作用机制确切。葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶、麦芽糖酶等 α -葡萄糖苷是体内碳水化合物消化吸收的关键酶,其作用底物分别为淀粉、蔗糖、麦芽糖等。如果一种物质抑制 α -淀粉酶水解淀粉、或抑制蔗糖酶水解蔗糖、或抑制麦芽糖酶水解麦芽糖,则该物质就具有相应酶抑制活性;如果同时具有 2 种或 2 种以上的酶抑制作用,则该物质就具有 2 种或 2 种以上相应酶的抑制活性。

(3) 与 PNPG 底物筛选模型相比,假阳性率较低。另外,这种筛选模型还具有

定向筛选的特点。基于上述优点,第二代酶-抑制剂筛选模型是一种行之有效的筛选方法。

2.4.2 醛糖还原酶抑制剂糖尿病药物筛选模型

醛糖还原酶(aldose reductase, AR)是以 NADPH 为辅酶,是聚醇代谢通路中的关键限速酶。大量动物实验和临床研究表明,醛糖还原酶抑制剂(ARI)可以有效地改善糖尿病患者聚醇代谢通路异常,从而达到预防与延缓糖尿病并发症的目的。

本法首先将除底物 D-甘油醛以外的其他组分混合,置于 25℃ 保温 10 min,然后加入 5 mol/L 底物 DL-甘油醛启动酶促反应,在 25℃ 下连续监测 340 nm 处反应体系吸光度的变化 5 min。以不含底物的样品为空白对照,通过吸光度的变化检测对 AR 的抑制作用。

药物筛选模型是发现新药的重要手段。随着细胞生物学、分子生物学、计算机科学、现代色谱学等学科及重组受体、转基因动物、基因探针等基因工程技术的不断深入,各类新的糖尿病药物筛选型应运而生,必将使药物的发现方法和效率得到质的飞跃。

参考文献

- [1] 孙兆峰,王利,夏作理. 2 型糖尿病动物模型研究概要[J]. 中国微循环,2008,12(3): 187-189.
- [3] 王宝金,代解杰. 糖尿病动物模型的研究进展[J]. 上海实验动物科学,2003,23(2):116-118.
- [4] 查彦红,谷卫. 糖尿病动物模型的研究进展[J]. 浙江医学,2007,29(12):1342-1345.
- [5] 孙子林,葛祖恺. 糖尿病动物模型及其进展[J]. 中国糖尿病杂志,1999(4):227-228.
- [6] 谢宁,吴颂,王晓博,等. 糖尿病动物模型研究进展[J]. 新乡医学院学报 2007,24(6): 629-631.
- [7] 蒋滢,张波,府伟灵. 药物筛选模型的分类及应用[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(10): 918-920.
- [8] 杨潇,陈祥贵,代娟. 基于细胞水平的 2 型糖尿病药物筛选模型研究进展[J]. 中国药房, 2006,17(19):1503-1509.
- [9] 张志琪,张延妮,田振军. 药物筛选模型和技术及其在中药活性成分研究中的应用[J]. 中国中药杂志 2003,28(10):907-909.
- [10] 胡娟娟,杜冠华. 药物筛选模型研究进展[J]. 基础医学与临床,2001,21(4):302-304.
- [11] 吴酬飞,许杨,李燕萍. 葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. 国际药理学杂志, 2008,35(2):9-11.
- [12] Park S H, Marso S P, Zhou Z M, et al. Neointimal hyperplasia after arterial injury is

- increased in a rat model of Non—Insulin-Dependent Diabetes Mellitus[J]. *Circulation*, 2001, 104: 815-819.
- [13] Walder Ken, Oakes N, Fahey R P, et al. Profile of dyslipidemia in psammomys obesus, an animal model of the metabolic syndrome[J]. *Endocrine regulations*, 2002, 36: 1-8.
- [14] Jorn A, Tidge M, Ziv E, et al. Gradual loss of pancreatic beta-cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in Psammomys obesus (sand rat)[J]. *Virchows Arch*, 2002, 440(1): 63-69.
- [15] 张丽锋, 毕会民, 王蜀鄂, 等. 葛根素对胰岛素抵抗大鼠脂肪组织中糖原合成酶激酶 3 β 表达的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(12): 1340-1343.
- [16] Liang Y W, Juan C C, Hwang L S, et al. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model[J]. *Eur. J. Nutr*, 2004, 43: 116-124.
- [17] 席守民, 廉馨, 王宗保, 等. 高脂高蔗糖饲料诱导贵州小香猪发生糖尿病和动脉粥样硬化病变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (1): 5-10.
- [18] 赵宝珍, 白秀平, 荣青峰. 实验 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. *中国药物与临床*, 2002, 2(6): 383-385.
- [19] 洪丽莉, 许冠荪, 申国明, 等. SD 鼠 2 型糖尿病模型的建立[J]. *实验动物科学与管理*, 2005, 22(4): 1-3.
- [20] 刘欣秋, 雷鸣. 实验性非胰岛素依赖性糖尿病模型探讨[J]. *黑龙江医药科学*, 2001, 24(3): 18-19.
- [21] 双卫兵, 王志慧, 王东文, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的制备及其验证[J]. *山西医科大学学报*, 2005, 36(3): 275-279.
- [22] ItO T, Tanimoto M, Yamada K, et al. Glomerular changes in the KK-Ay/Ta mouse: a possible model for human type 2 diabetic nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2006, 11(1): 9-35.
- [23] Wolf G. Insulin resistance associated with leptin deficiency in mice: a possible model for noninsulin-dependent diabetes mellitus[J]. *Nutr. Rev*, 2001, 59(6): 177-179.
- [24] Rahimian R, Masih-Khan E, Lo M, et al. Hepatic over-expression of peroxisome proliferators activated receptor gamma 2 in the ob/ob mouse model of non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 33(12): 721-726.
- [25] Kyoko M, Shigeki N, Minoru O, et al. Disturbance of response to acute thermal pain in naturally occurring cholecystokinin-a receptor gene knockout Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats[J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 101: 280-285.
- [26] Giuliano K A. High-content profiling of drug-drug interactions: cellular targets involved in the modulation of microtubule drug action by the antifungal ketoconazole[J]. *J Biomol. Screen*, 2003, 8(2): 125-135.

- [27] Gasparri F, Mariani M, Sola F, et al. Quantification of the proliferation index of human dermal fibroblast cultures with the ArrayScan high-content screening reader[J]. J Biomol Screen, 2004, 9(3): 232-243.
- [28] Vogt A, Kalb E N, Lazo J S. A scalable high-content cytotoxicity assay insensitive to changes in mitochondrial metabolic activity[J]. Oncol Res, 2004, 14(6): 305-314.
- [29] 张莉, 杜冠华. 高内涵药物筛选方法的研究及应用[J]. 药学学报, 2005, 40(6): 486-490.
- [30] Gurwitz D, Haring R. Ligand-selective signaling and high-content screening for GPCR drugs[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(24): 1108-1109.
- [31] Conway B R, Minor L K, et al. Quantitative analysis of agonist-dependent parathyroid hormone receptor trafficking in whole cells using a functional green fluorescent protein conjugate[J]. J Cell Physiol, 2001, 89(3): 341-355.
- [32] 刘方, 余绍玲. 2型糖尿病4种治疗方案的成本-效果分析[J]. 中国药房, 2005, 16(2): 113-134.
- [33] 谢洁琼, 吕秋军. 基于报告基因和PPAR- γ 信号通路的药物筛选模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 504-506.
- [34] Kim Y M, Jeong Y K, Wang M H, et al. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia[J]. Nutrition, 2005, 21(6): 756-761.
- [35] Hansawasdi C, Kawabata J. Alpha-glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2[J]. Fitoterapia, 2006, 77(7/8): 568-573.
- [36] Wang L, Zhou T Y, Tang X, et al. Purification and characterization of a novel α -amylase inhibitor from wild amaranth *Amaranthus paniculatus* weeds[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2004, 20(4): 43-439.
- [37] 沈忠明, 李英, 姜宏, 等. 降糖中药对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(2): 69-70.
- [38] 全吉淑, 尹学哲, 张帅. 大豆胚芽提取物体外对小肠黏膜蔗糖酶、麦芽糖酶及葡萄糖转运活性的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 161-163.

鄧子知覺
PDG

第3章 天然产物中功能性成分提取与分离

天然药物大多来自植物、动物、矿物和微生物,并以植物来源为主。天然药物之所以能够防病治病,其物质基础是其中所含的有效成分。因此,首要问题是解决天然产物中有效成分的提取与分离技术问题。本章先对传统的提取与分离技术进行概述,然后重点介绍近年来在天然产物中功能性成分提取与分离上采用的一些新技术。

3.1 传统提取法

3.1.1 溶剂提取法

溶剂提取法是根据天然药物中各种化学成分在溶剂中的溶解性能差异,选用对有效成分溶解度大、对无效成分溶解度小的溶剂将有效成分从药材组织中尽可能多地溶解出来的方法。

3.1.1.1 溶剂提取方法的原理

化合物亲水性和亲脂性程度的大小与其分子结构直接相关,一般来说,两种基本母核相同的成分,其分子中官能团的极性越大或极性官能团数目越多,则整个分子的极性就越大,表现出亲水性越强,而亲脂性就越弱。其分子中非极性部分越大或碳链越长,则极性越小,亲脂性越强,而亲水性就越弱。

因此,天然产物的极性大体可分为3类:即极性(亲水性)、非极性(亲脂性)、中等极性(即亲水又亲脂),依据相似相溶的规律,极性成分易溶于极性溶剂,亲脂性成分易溶于非极性溶剂,通过对欲提取成分及与其共存成分的极性差异来选择溶剂。如提取苷元、游离生物碱常用亲脂性溶剂氯仿、乙醚;苷类成分由于结构中含糖分子,羟基数目增多,表现出比其苷元有较强的亲水性,则可选择极性较大的溶剂如乙酸乙酯、正丁醇等。

选择适当的溶剂是提取步骤的关键。溶剂的极性大体可根据介电常数 ϵ 的大小来判断。

3.1.1.2 溶剂提取方法

1) 浸渍法

浸渍法又称冷渍法,适用于遇热易破坏成分以及含大量淀粉、树胶、果胶、动液

质等多糖成分的药材,多用水、乙醇作溶剂。本法提取时间长,效率不高,特别是在用水作溶剂浸渍时,提取液易发霉变质,因此,必要时可加适量的防腐剂。

2) 渗漉法

本法在渗滤过程下,不断加入新溶剂,与渗滤液一直保持相当的浓度差,故提取效率比浸渍法高。但存在溶剂用量大、费时较长的缺点。

3) 煎煮法

煎煮法是我国最早使用的传统的浸出方法,为热浸法,提取效率比冷浸法高。一般将药材饮片或粗粉置陶瓷、砂罐、铜制器皿或搪瓷器皿(避免铁器)中,加水浸泡过药材表面,加热煮沸1h左右。加热时最好时常搅拌,避免焦糊。一般煎煮2~3次,第二、三次,可酌情减少时间。煎煮法简便易行,能煎出大部分有效成分,但煎出液中杂质较多,且易发生霉变,有些不耐热或挥发性成分易损失;对含有多糖类的药材,煎煮后药液致稠过滤困难。

4) 回流提取法

将药材粗粉置于圆底烧瓶中,添加乙醇或其他低沸点有机溶剂至烧瓶容量的 $1/2 \sim 2/3$ 处,接上球形或直形冷凝管,置水浴上加热回流适时,趁热滤取提取液,药渣再用新溶剂回流2~3次,若遇成分在溶剂中不易溶解或药材质地坚实不易浸出时,适当延长每次提取时间或增加提取次数,合并过滤液,浓缩即得提取物。该法提取效率较高,但溶剂用量较大,操作也较麻烦。因药材与水浴接触,受热温度较高、时间较长,不适用于对热不稳定成分的提取。

3.1.2 水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法适用于能随水蒸气馏出而不被破坏的天然药物成分的提取。中草药中的挥发油、某些小分子生物碱、小分子酚性物质等都可采用本法提取。

3.1.3 升华法

有些固体物质在低于其熔点的温度下加热,不经过中间液体阶段,直接转化为蒸汽,这种现象称为升华;蒸汽遇冷又凝结为原来的固体,这种现象称为凝华。天然药物中具有升华性的成分如咖啡碱、樟脑等,其提取可用升华法。

3.2 传统有效成分的分离和精制

用各种方法得到的提取物是包含诸多成分的混合物,要想得到所需成分或单体化合物,需要经反复分离精制。提取液一般体积较大,所含成分浓度较低,因此需对提取液通过蒸发或蒸馏进行浓缩。具体方法有常压蒸馏、薄膜蒸发、减压蒸馏等。

3.2.1 两相溶剂萃取法

两相溶剂萃取法是指往提取液中加入一种与其互不相溶的溶剂配成两相溶剂系统,利用混合物中各种成分分配系数的差异而将所需成分萃取出来的分离方法。分离的难易可用分离因子 β 值来表示。一般来说,当 $\beta > 100$,若想达到基本分离只需做一次简单萃取;当 $100 \geq \beta > 10$,则需萃取10~12次才能达到分离;当 $\beta \approx 1$ 时,即表明两种成分性质非常相近,无法利用此法达到分离目的。

3.2.2 沉淀分离

沉淀分离是指在溶液中加入溶剂或沉淀剂,通过化学反应或者改变溶液的pH值、温度、压力等条件,使分离物以固相物质形式沉淀析出的一种方法。能否将分离物从溶液中析出,取决于分离物的溶解度或容度积,关键在于选择适当的沉淀剂和控制条件,沉淀的目的在于通过沉淀使目标成分达到浓缩和除去杂质,或是将已纯化的产品由液态变成固态。

3.3 超临界流体萃取

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)是一种以超临界流体代替常规有机溶剂对中药有效成分进行提取分离的新型技术,尽管早在100多年前就发现了超临界流体的独特溶解现象,但直至20世纪70年代才引起人们的普遍重视。1978年,联邦德国的Zosel博士将超临界二氧化碳(SC—CO₂)萃取工艺用于咖啡豆脱除咖啡因而成为超临界萃取的第一个工业化项目。由于超临界二氧化碳脱除咖啡因工艺明显优于传统的有机溶剂萃取工艺,因此自此以后,超临界萃取工艺被视为高效节能的提取分离技术在很多领域得到广泛的研究和应用。超临界流体萃取天然药物活性成分的萃取技术已达到工业化生产的规模,在许多产品中得以应用。

3.3.1 超临界流体萃取的基本原理

超临界流体萃取分离过程是利用超临界流体的溶解能力与其密度的关系,即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响而进行的。当气体处于超临界状态时,成为性质介于液体和气体之间的单一相态,具有和液体相近的密度,黏度虽高于气体,但明显低于液体,扩散系数为液体的10~100倍。因此对物料有较好的渗透性和较强的溶解能力。能够将物料中某些成分提取出来。在超临界状态下,将超临界流体与待分离的物质接触,使其有选择性地依次把极性大小、沸点高低和相对分子质量大小不同的成分萃取出来。并且超临界流体的密度和介电常数随着密

闭体系压力的增加而增加,极性也增大。利用程序升压可将不同极性的成分进行分步提取。当然,对应各压力范围所得到的萃取物不可能是单一的,但可以通过控制条件得到最佳比例的混合成分,然后借助减压、升温的方法使超临界流体变为普通气体,被萃取物质则自动完全或基本析出。从而达到分离提纯的目的,并将萃取分离两个过程合为一体。

3.3.2 超临界 CO₂ 流体萃取技术特点

3.3.2.1 实现提取物无溶剂残留

超临界 CO₂ 流体萃取中,CO₂ 容易制取,且在生产中可以重复循环使用,从而有效地降低了成本,且能实现提取物无溶剂残留问题。

3.3.2.2 萃取效率高、速度快

由于超临界 CO₂ 流体的溶解能力和渗透能力强,扩散速度快,且萃取是在连续动态条件下进行,萃取出来的产物不断地被带走,因而提取较完全。

3.3.2.3 有效成分不易破坏

超临界流体 CO₂ 临界温度低,操作温度低,能更好地保存有效成分不被破坏。尤其适合对热敏感性强、容易氧化分解的成分的提取。

3.3.2.4 操作参数易于控制

仅就萃取剂本身而言,超临界萃取的萃取能力取决于流体的密度,而液体的密度很容易通过调节温度和压力来加以控制,这样易于确保产品质量的稳定。

3.3.2.5 其他方面

CO₂ 作为超临界流体优于其他的超临界流体,代替了传统方法中的有毒溶剂,同时具有灭菌作用,有利于保证和提高产品质量,而且用超临界 CO₂ 提取,操作参数(温度和压力)容易控制,有利于提高有效成分的提取率和保证产品质量的稳定。

3.3.3 超临界流体的过程系统

超临界流体萃取过程基本上由萃取阶段和分离阶段组成。图 3-1 为超临界流体萃取流程简图。萃取阶段系混合物在超临界状态下与高度压缩的流体相接触,使被分离的物质溶解在超临界流体中(或者杂质被脱除)。然后进入分离阶段,即通过改变温度或压力使萃取物从溶液中析出。最后,保留溶剂相进行再压缩,循环使用。

按照所采用操作方法不同,超临界流体萃取有等温变压萃取、等压变温萃取及吸附萃取等典型流程。

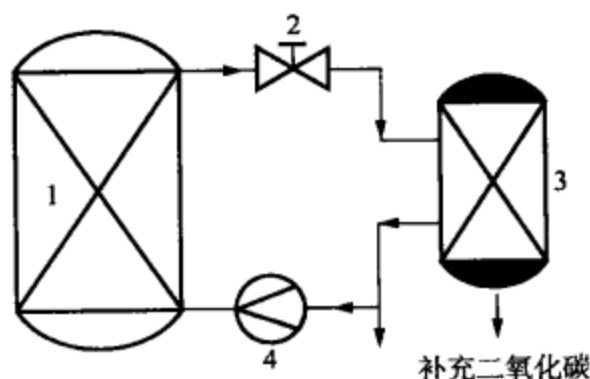


图 3-1 超临界流体萃取过程

1-萃取釜;2-减压阀;3-分离阀;4-加压阀

3.3.3.1 等温变压萃取流程

等温变压流程是利用不同压力下超临界流体萃取能力的不同,通过改变压力使溶质与超临界流体相分离,等温指在萃取器和分离器中流体的温度基本相同。这种流程较为简便,使萃取剂通过压缩机达到超临界状态,超临界流体进入萃取器萃取,萃取后的超临界流体经膨胀阀降压变成气体,密度降低,其溶解度下降,被萃取物析出,经分离器分离从底部取出,经分离器分离的气体萃取剂被压缩机压缩成为超临界流体,再进入萃取器。如此循环,从而得到被分离的萃取物。

3.3.3.2 等压变温萃取流程

等压变温流程是利用不同温度下物质在超临界流体中的溶解度差异,通过改变温度使溶质与超临界流体相分离。这种流程通常是萃取后的超临界流体经加热使之温度升高,溶解度降低,被萃取物在分离器中分离从下部取出,气体则经压缩加压后克服阻力,再经冷却恢复了状态后再循环操作。等压法和等温法流程适用于被萃取物为需要精制的产品。

3.3.3.3 吸附萃取流程

这种流程是在分离器中放置只能吸附溶质不能吸附萃取剂的吸附剂,负载着被萃取物的超临界流体进入分离器后,被萃取物被吸附剂吸附分离,超临界流体经适当加压,再回萃取器进行循环操作。

吸附萃取流程适用于萃取除去杂质的情况,即采用超临界流体将物质中的杂质萃取,然后将被吸附剂吸附除去,于是萃取器中留下的除去剩余物则为提纯产品。

3.3.4 影响超临界流体萃取的因素

3.3.4.1 超临界流体的选择

超临界流体密度综合了温度、压力对溶解能力的影响。在温度和溶质蒸汽压

一定时,超临界流体密度增大,溶解能力提高;而密度一定时,升温可提高溶质的挥发度,也可提高溶解能力。另外,考虑到超临界流体的选择性,应该选择与待分离组分性质相似的超临界流体进行选择萃取。

3.3.4.2 操作条件的选择

1) 压力的影响

压力大小是影响超临界流体萃取的关键因素之一。不同化合物在不同超临界流体压力下的溶解度曲线表明,尽管不同化合物在超临界流体中的溶解度存在差异,但随着超临界流体压力的增加,化合物超临界的溶解度一般都呈急剧上升的现象。但当压力增至一定程度时,溶解能力增加缓慢;同时,从经济角度来看,高压会增加设备投资费用,并给操作技术带来一定的难度,因而压力也并非越大越好。

2) 温度的影响

与压力相比,温度对超临界流体萃取过程的影响要复杂得多。一般温度增加,物质在超临界流体中的溶解度变化往往出现最低值。温度对物质在超临界流体中的溶解度有两方面的影响:一个是温度对超临界流体密度的影响,随着温度的上升,超临界流体的流体密度降低,导致超临界流体的溶剂化效应下降,使物质在其中的溶解度下降;另一个是温度对物质蒸汽压的影响,随着温度升高,物质蒸汽压增大,使物质在超临界流体中的溶解度增大,这两种相反的影响导致一定压力下,溶解度等压线出现最低点,在最低点温度以下,前者占主导地位,导致溶解度曲线呈下降趋势,在最低点温度以上,后者占主要地位,溶解度曲线呈上升趋势。

3) 夹带剂

一般来说,超临界流体对于极性弱和相对分子质量小的分子有很好的溶解度,而对于相对分子质量较大和极性集团较多的分子溶解度很小,就需向溶质和超临界流体组成的二元体系中加入第三组分,来改变原来溶质的溶解度,在超临界液体萃取的研究中,通常将具有改变溶质溶解度的第三组分称为夹带剂。一般地说,具有很好溶解性能的溶剂,也往往是很好的夹带剂,如甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等。

4) 物料

萃取时,应先将物料颗粒的直径减小,以提高萃取的速率。固态物料可以捣碎或研细,而液态物料可涂布在细薄的基质上或以机械搅拌和喷雾等方法增加物料的表面积与体积之比。

5) 试料比

试料比即萃取剂与物料的质量比。当试料比过小时,萃取剂用量少,待分离组分易达到饱和,萃取率低;当试料比过大时,虽可提高萃取率,但萃取剂用量多,不经济。

6) 溶剂流量及萃取时间

一般情况下,超临界流体流量越大,则萃取时间越长,萃取效率越高。以不同的流量进行萃取,所需的时间也不同,流量越大,则所需时间越短。另外,萃取量也会随时间长短而不同。萃取刚开始时,由于超临界流体和物料未能良好接触,故萃取量较小;随着时间的延长,传质达到良好状态,萃取量增大,萃取后期,由于萃取对象中待分离组分的含量减少,故萃取量又降低。

3.3.5 超临界流体萃取技术应用

3.3.5.1 生物碱类

生物碱在生物体内大多数与酸性成分结合以盐的形式存在。因此用纯 CO_2 难以有效萃取,故需要在提取前用氨水等碱性试剂使之完全转化为游离碱,同时还要使用适当改性剂以增强流体溶解能力或提高选择性。目前应用超临界流体技术研究开发了一批较有价值的生物碱。

周雪晴等用超临界 CO_2 萃取技术研究从海南催吐萝芙木中提取利血平生物碱的最佳工艺,得到最佳提取条件为:萃取压力 35 MPa,萃取温度 60°C ,夹带剂为 100 g 样品用 25 ml 乙醇,萃取时间 2 h。用高效液相色谱法对萃取产物中的利血平含量进行了测定。将萃取所得产物用硅胶柱色谱进一步分离提纯,得到了质量分数为 99.8% 的利血平针状结晶。

Brachet A 等从曼陀罗属植物中分离得到了天仙子胺和东莨菪碱,并且在古柯叶中分离出了可卡因。

3.3.5.2 蒽醌类

醌类化合物是分子中具有不饱和环二酮结构的一类天然色素,它以游离态或苷的形式存在于大黄、何首乌、紫草、芦荟等药材中,传统的提取法为溶剂提取。由于醌类化合物的极性较大,故采用超临界 CO_2 法萃取时,除了需要较高的压力外,还要加入合适的夹带剂。

梁瑞红等采用超临界萃取技术萃取新疆紫草中的紫草素及其衍生物,不仅产品色泽好,产率高,无氧化现象,还可提取出一些新成分。

未作君等采用超临界流体萃取大黄中的 5 种有效蒽醌类物质(大黄酚、大黄素、芦荟大黄素、大黄酸和大黄素甲醚),在最优条件下,大黄游离蒽醌的萃取率达 1.15%。

3.3.5.3 黄酮类

超临界 CO_2 萃取技术对黄酮类化合物是一种非常有效的提取方法,得到了广泛应用。何扩等采用乙醇浸提与超临界 CO_2 萃取的方法从银杏叶中提取黄酮类化合物,结果表明,在较低的操作压力下,可有效地提取出银杏叶中的黄酮类化合

物,银杏黄酮的提取率达到 2.61%,纯度达到 27.7%,其纯度是直接乙醇提取的 2.43 倍。

对于极性较强的黄酮类化合物,单纯用超临界 CO_2 萃取效率不高,因此要加入适当夹带剂增加其极性,通常用乙醇或甲醇作为夹带剂。张富昌等通过对新疆雪莲超临界预萃取,然后再用一定浓度的乙醇溶液提取。以总黄酮为指标,考察了乙醇溶剂的提取温度、时间、液料比、乙醇浓度等因素对总萃取率的影响,与常规溶剂法比较,总黄酮提取率比常规溶剂法高 10.07%~128.4%,经高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱验证提取组分基本一致。扩展了超临界技术在天然产物领域中的应用方法。

3.3.5.4 皂苷类

皂苷类的相对分子质量较大,羟基多,极性大,用纯超临界 CO_2 提取时其产率低,但加入夹带剂或加大压力则可提高产率。

Shu 等人利用超临界 CO_2 萃取菝葜根茎中的皂苷,发现加入夹带剂后萃取率明显提高,甲醇、乙醇及氯仿均可作为夹带剂,但是从毒性方面考虑,一般多用乙醇作为夹带剂。

吕晓玲等研究了超临界 CO_2 萃取油茶皂苷的工艺,确定最佳萃取条件为,压力 25 MPa、温度 50℃、体积分数 65%乙醇为夹带剂, CO_2 流量 25~30 L/h,萃取时间 3 h。在最佳萃取条件下油茶皂苷的收率为 15.23%,纯度 78.65%。

3.3.5.5 挥发油

挥发油类成分相对分子质量较小,具有亲脂性和低沸点,采用超临界 CO_2 萃取易得到,且操作温度低,可大量保存热不稳定及易氧化的成分。

罗金岳等采用超临界 CO_2 萃取技术,研究了从野菊花中提取精油的工艺并鉴定其主要化学成分。得到较适宜的萃取工艺条件,萃取温度 35℃、分离温度 30℃、萃取时间 90 min、萃取压力 25 MPa、 CO_2 流量为 30 kg/h,精油得率 9.65%。经气相色谱质谱分析法(GC-MS)分析鉴定了野菊花精油成分 43 个,主要是萜类及其含氧衍生物、烷烃类化合物和酯类化合物等。

Mara 等利用 P-R 方程计算柠檬烯- CO_2 、香芹酮- CO_2 二元体系相平衡,依据相平衡选择合适的超临界萃取的温度和压力,并对柠檬烯和香芹酮的萃取条件进行优化。萃取压力 8 MPa、温度 50℃下,萃取物中香芹酮最大质量分数为 80%,压力 12 MPa、温度 50℃时柠檬烯最大质量分数为 17%。

由于超临界流体萃取技术具有许多突出优点,因而在中药有效成分提取方面得到了广泛应用,并成为实现中药现代化的关键技术之一。然而超临界流体萃取技术也存在一些不足之处,如对强极性和高相对分子质量物质难以有效提取、局限于单味中药有效成分的提取、工业化程度较低等。从中药现代化的角度,今后不仅

要进一步加强超临界流体萃取中药有效成分的工艺研究,而且要加强超临界流体萃取中药有效成分的基础理论、过程强化和工程化研究。可以预见,随着研究的不断深入,超临界流体萃取技术在中药有效成分提取方面将发挥出更大的作用。

3.4 微波萃取

微波萃取技术又称微波辅助提取(microwave assisted extraction, MAE)是指使用适合的溶剂在微波反应器中从天然药用植物、矿物、动物组织中提取各种化学成分的技术和方法。1986年,Ganzler首先报道了利用微波萃取从土壤、种子、食品、饲料中分离各种类型化合物的样品制备新方法。与传统的水蒸气蒸馏、索氏抽提等技术相比较,微波萃取技术可以缩短实验和生产时间、降低能耗、减少溶剂用量以及废物的产生,同时可以提高收率和提取物纯度,其优越性不仅在于降低了实验操作费用和生产成本,更重要的是这种技术更加符合“绿色”环保的要求。运用微波萃取技术提取天然药物的化学成分具有很高的实用价值,有待开展多方面的深入研究。

现在利用微波萃取技术对传统中药提取技术进行改革,提高天然药物中有效成分的收得率、降低生产成本、提高质量、改善生产条件等,已经受到科技工作者的广泛关注。

3.4.1 微波萃取的原理

微波是指波长 λ 为0.001~1 m,即频率在30 MHz~30 GHz之间的电磁波,它具有波动性、高频性、热特性和非热特性四大基本特性。微波的频率与分子转动的频率相关联,它作用于极性分子上能促进分子的转动,常用的微波频率2450 MHz。微波能量是通过离子传导和极性分子的偶极旋转两种作用直接传递到物质上,导致分子整体快速转向及定向排列,从而产生撕裂和相互摩擦而发热。当微波透过溶剂到达植物内部维管束和腺细胞内时,细胞内温度突然升高,连续的高温使其内部压力超过细胞空间膨胀的能力,从而导致细胞破裂;细胞内的物质自由流出,传递到周围被溶解,不同物质的介电常数不同,其吸收微波能的程度不同。根据这种不同结构物质吸收微波能力的差异,使得萃取体系中的某些组分被选择性加热,因此被萃取物质从体系中分离进入萃取剂,达到天然产物化学成分被提取的目标。

3.4.2 微波萃取技术的特点

微波萃取技术的特点:

- (1) 由于微波萃取一般只是物理过程,并不破坏样品基体。
- (2) 微波加热是内加热,样品容器因能被微波穿透所以不导热,微波直接加热

样品,所以具有体系升温速度快、无热梯度、无滞后效应等特点,萃取时间短,萃取效率高。

(3) 萃取时的温度、压力、时间可进行有效的控制,故可保证萃取过程中欲分析组分不会分解。

(4) 微波萃取受溶剂亲和力的影响小,可供选择的溶剂种类多,故微波的选择性要好于传统萃取,还可萃取一些极性物质。

(5) 微波萃取还具有设备简单、适用范围广、重现性好、节省时间、节省试剂、污染轻等特点。

3.4.3 微波萃取技术设备

3.4.3.1 微波萃取实验研究设备

目前用来进行微波萃取实验研究的微波萃取设备主要有三类。一类是直接使用普通家用微波炉或用家用微波炉改装的微波萃取装置,通过调节脉冲间断时间的长短来调节微波输出能量,目前国内大部分的研究均采用该类设备,但一般仅能大概了解微波对于成分萃取的作用,而无法得到较为准确的多项实验数据,更无法用来摸索生产工艺条件;第二类是美国的 CEM 公司和意大利的 Milestone 公司生产的适用于溶解、萃取和有机合成的系列微波实验设备产品,这些产品一般都有功率选择和控温、控压、控时装置,属于样品中特定成分分析用微波萃取设备,方便快捷,但不适合用于较大量天然药物成分提取及生产工艺改进等实验研究,且价格昂贵。国内中科院深圳南方大恒公司和上海新科微波技术应用研究所研制的 WK2000 微波快速反应系统和 MK2 III 型光纤自动控压微波消解系统属于该类产品的仿制国产产品,许多单位用来进行提取分析实验,取得较多的实验成果。

3.4.3.2 微波萃取工业设备

微波应用工程系统采用的微波频率为 915 MHz 和 2 450 MHz,目前国内用于微波提取的微波频率 2 450 MHz,其波长为 12 cm,对水的穿透大多为 2~3 cm 之间,根据微波工程的特征,其提取设备有两种类型。

1) 管道式微波提取设备

由微波源、微波作用腔、输送管道以及两个储料罐组成,在一个储料罐内将粉状物料与溶媒混合,用泵送入微波工程材料制造的管路中,微波工程材料对微波是透明的,物料与溶媒流过微波作用腔时被微波直接加热、萃取,使得有效成分转移,提取完成送至另一储料罐,管道形式有单管型、阵列型、螺旋型,国外设备用螺旋管方式较为普遍,由于微波穿透深度有限,2 450 MHz 频率的微波系统采用管道直径在 3~6 cm 之间,此类型结构简单,制造成本低,提取时间短,适应连续作业,可控性强,不足之处是只适用粉状物料的提取。大型设备的管道过长容易发生堵塞,能

量转换效率一般,压力可变性差,不适应多种工艺参数调整。

2) 罐式微波提取设备

与常规动态提取罐结构相仿,不同之处是将蒸汽夹套加热改为微波腔加热,将平面加热改为立体加热,热源由蒸汽夹套壁改为料液本身发热,此类型可适用对块状、片状、颗粒状、粉状物料提取,可以保温、恒温、常压、正压、负压提取,可满足不同天然植物提取的工艺参数要求,适用广泛。装机微波功率容量可从数百瓦到数百千瓦,罐体容积从几十毫升到数立方米。现场实践证明,1台 1m^3 微波提取设备处理能力相当于 $5\sim 8\text{m}^3$ 常规动态提取罐处理能力。缺点是提取生产线微波装机功率较大,制造难度高,生产线上只能分批次作业,加料、进出液、出渣等辅助时间较长,降低了整机利用率,同时微波穿透深度有限,提取设备必须配备搅拌器,实现动态提取。目前商品化的聚焦式微波装置主要是美国CEM公司和法国PROLAB公司开发的产品,现在已经完全自动化操作,免去了反应前的试剂添加和反应后的蒸发浓缩等步骤,从整体上提高了效率,降低了劳动量,在使用上更安全灵活,可一次性完成提取、蒸发浓缩和定容等全过程,由于采用多通道聚焦非脉冲微波辐射主机并能自动控制其温度变化,因此具有广泛的应用前景。20世纪90年代初由加拿大环境保护部和加拿大CWT-TRAN公司合作开发了微波萃取系统,并取得了美国、墨西哥、日本、韩国和西欧的专利。该系统针对工业应用的不同需要,日处理能力在 $1\sim 500\text{t}$,中国科学院深圳南方大恒公司已研制出WK-2000微波快速反应系统。另外,广州的科威、南京的三乐、杰全等微波设备公司都生产了相应的微波萃取罐及处理装置。

3.4.4 微波萃取的影响因素

影响萃取效果的因素很多,如萃取溶剂、萃取温度、萃取时间、基体物质、溶剂pH值等。

3.4.4.1 萃取溶剂的影响

在微波萃取中,溶剂的极性对萃取效率有很大的影响,应尽量选择对微波透明或部分透明的介质作为萃取剂,也就是选择介电常数较小的溶剂,还要求萃取剂对目标成分要有较强的溶解能力,对萃取成分的后续操作干扰较少。当欲提取物料中不稳定或挥发性的成分时,如中药中的精油,宜选用对微波射线高度透明的溶剂;若需除去此类成分,则应选用对微波部分透明的萃取剂,这样萃取剂可吸收部分微波能转化成热,从而驱除或分解不需要的成分。

已见报道用于微波萃取的溶剂有:甲醇、丙酮、二氯甲烷、乙腈、乙酸、正己烷、苯、甲苯等有机溶剂和硝酸、盐酸、氢氟酸、磷酸等无机试剂以及己烷-丙酮、二氯甲烷-甲醇、水-甲苯等混合溶剂。对于不同的基体,使用的溶剂可能完全不同。

3.4.4.2 萃取温度和萃取时间的影响

萃取温度应低于萃取溶剂的沸点,不同的物质最佳萃取回收温度不同。微波萃取时间与样品量、溶剂体积和加热功率有关,不同的萃取样品和溶剂微波能吸收的能力不同,所需要的汽化热不同,最佳萃取时间也不同。一般情况下,萃取时间在10~15 min内。萃取回收率随萃取时间的延长有所增加,但增长幅度不大,可忽略不计。

3.4.4.3 基体物质的影响

基体物质对微波萃取结果的影响可能是因为基体物质中含有对微波吸收较强的物质,或是某种物质的存在导致微波加热过程某些成分发生了化学反应。

3.4.4.4 其他因素的影响溶剂

pH值、试样中的水分或湿度、目标物质的性质及状态、微波剂量等因素对萃取的效率以及溶剂回收率也有不同程度的影响,应根据实际情况来选择最佳条件。

3.4.5 微波萃取的应用

目前利用微波辅助提取天然植物有效成分涉及生物碱类、蒽醌类、黄酮类、皂苷类、多糖、挥发油等。

3.4.5.1 生物碱类

胡瑞君等利用微波辅助提取技术提取桑叶中生物碱DNJ。以无菌过滤水为溶剂,以微波处理为辅助条件,考察了微波功率、微波处理时间、固液比和提取次数这些因素对生物碱DNJ得率的影响,确定了最佳提取工艺条件为:微波功率为400 W、微波处理时间为1.5 min、固液比(g:ml)为1:40、提取次数为2次。

Zhang等利用微波从博落回的果实中提取生物碱,与浸泡法和超声波提取进行比较得出微波辅助提取是最有效的提取方法。微波辅助提取5 min,血根碱的产量为 (17.10 ± 0.4) mg/g,白屈菜赤碱的产量为 (7.04 ± 0.14) mg/g。

Brachet等进行了微波萃取可卡因的研究,萃取时间仅为30 s即可将可卡因从可可叶中萃取出来。

3.4.5.2 蒽醌类

邓佳等采用微波提取方法,在微波功率750 W条件下,提取决明子中蒽醌,通过正交试验,确定微波提取决明子中蒽醌的最佳工艺条件为:乙醇浓度70%,料液比1:5,提取温度60℃,提取时间10 min,在此条件下获得的总蒽醌提取率为65%。

胡秀丽等利用具有压力控制附件的密闭微波萃取装置,提取大黄中的蒽醌类化合物。通过正交试验,考察了微波提取条件(包括溶剂、提取压力、微波辐射时间和料液比)对萃取率的影响。结果表明:溶剂为70%乙醇,提取压力为300 kPa,微波辐射时间为2 min,料液比为1:30(mg/ml)时提取效果最佳,与索氏提取法及超

声波萃取法相比,该方法具有萃取速度快、提取率高及溶剂用量少等特点。

3.4.5.3 黄酮类

甄云鹏等在提取苦荞壳中总黄酮的工艺实验中,使用和微波辅助提取,对影响提取结果的因素做了比较,结果表明,当介质为乙醇时的微波萃取效果明显优于其他提取方法。

秦大伟等采取先用微波预处理,然后溶剂提取嘉菊总黄酮的工艺条件,对嘉菊总黄酮进行提取,考察了微波预处理时间、汽化剂浓度对提取率的影响,并对后续提取工艺进行研究。确定最佳处理工艺:采用 75%乙醇、微波处理时间 75s 后进行回流提取,效果最好。

3.4.5.4 皂苷类

高虹等研究微波辅助提取(MAE)联合大孔树脂提取地榆中皂苷化合物的方法与工艺条件。以提取含量为指标,正交实验研究微波提取影响因素,然后联合大孔树脂精制 MAE 提取物,以吸附量为指标,研究大孔树脂精制提取产物。MAE 提取含量是溶剂提取法的 2.11 倍,产物中精制皂苷化合物含量高,吸附以 S-8 树脂用量为皂苷的 16~20 倍时,吸附率达 86.86%以上。

Kwon 等利用微波在常压下用 1:10(g:ml)的料液比用乙醇从 60 目人参中提取人参皂苷,研究微波功率和乙醇浓度对提取效果的影响,结果表明乙醇浓度为 60%~65%、功率为 160 W 较好。

3.4.5.6 多糖

黄琨等使用微波辅助法提取葛根可溶性多糖并优化其提取工艺。对影响葛根多糖提取工艺的因素进行研究。确定优化后的较佳工艺条件为:浸取时间 25 min、微波功率 800 W、浸取温度 100℃、料液比 1:20。葛根多糖的提取率为 57.74%。

Lundqvist 等人应用微波加热从云杉碎片中提取得到水溶性半纤维素多糖,提取得率较高。

3.4.5.7 挥发油

Armstrong 等采用微波辅助提取技术以丙酮为溶剂从柑橘中提取柑橘油,并与传统方法进行了比较:比回流提取节省了 20 倍的提取时间,可减少杂质的引入。

Lucchesi 等利用微波照射干馏(无溶剂微波萃取)法从罗勒、薄荷花、百里香中提取香精油,实验结果表明,无溶剂微波萃取法适宜于香精油的提取。

目前,虽然国内外微波辅助萃取技术的研究才刚起步,有关微波萃取的文献多为应用及实验研究,而对微波萃取设备的研制相对较少,但是由于微波萃取技术具有其他传统萃取方法所不能比拟的优点,比如它克服了传统萃取方法中药材细粉易凝聚、易焦化的弊病,具有选择性高、操作时间短、溶剂消耗量少、有效成分得率高等优点,而且与超临界、超声提取法等新型提取方法相比也具有很大的优势,它

设备简单、易于操作、投资小、适用面广等,因此微波萃取技术在天然植物尤其是中药提取中有良好的应用前景,已经成为当前和今后新型提取技术研究的热点之一。但如何针对中药复方的特点设计微波萃取方案以及工业化微波萃取设备的开发等仍然是有待研究的主要问题。

3.5 超声波萃取

超声波是指频率在 20 Hz 以上、人的听觉阈以外的声波,具有频率高、波长短、功率大、穿透力强等特点。超声波提取是利用超声波具有的机械效应、空化效应及热效应,通过增加递质分子的运动速度,增强递质的穿透力以提取中药有效成分的方法。研究表明,超声波技术可用于皂苷、生物碱、黄酮、多糖等绝大多数中药有效成分的提取,且具有省时、节能、避免常规提取法对热敏性物质的破坏、溶剂用量少、提取效率高等优点。

3.5.1 超声波提取的原理

3.5.1.1 空化效应

空化效应是超声提取的主要动力。液体中往往存在一些真空或含有少量气体或蒸汽的小泡,当一定频率的大量超声波作用液体时,尺寸适宜的小泡能产生共振现象,它们在声波的稀疏阶段迅速胀大,在声波的压缩阶段又被绝热压缩,直至湮灭。小泡在湮灭过程中,能够产生几千摄氏度的高温和几千个大气压的高压冲击波,这就是空化现象。这种强烈的冲击作用能使物料破碎,也能造成生物细胞壁及整个生物体破裂,从而加速细胞内物质的释放、扩散及溶解。

3.5.1.2 机械效应

超声波在传播过程中,会引起介质质点交替的压缩与伸张,构成了压力的变化,这种压力的变化将引起机械效应。对于中药提取过程,这种机械效应包括简单的骚动效应和溶剂与药材组织之间的摩擦。这种骚动效应可使蛋白质变性,细胞组织变形,而超声波引起的介质质点的加速度与超声波振动频率的平方成正比,有时超过重力加速度的数万倍,由于溶剂和药材组织获得的加速度不同,即溶剂分子的速度远大于药材组织的速度,从而使它们之间产生摩擦,这种力量足以断开两碳原子之间的化学键,使生物分子解聚,使中药材中的有效成分溶解于溶剂之中。

3.5.1.3 热效应

由于介质吸收超声波以及介质内摩擦的消耗,分子产生剧烈振动,超声能转化为介质的内能,引起溶剂和药物组织温度升高,超声波在穿透溶剂和药物组织分界面时,温度上升更快,这是因为分界面上特性阻抗不同,产生反射形成驻波,引起分子间的相对摩擦而发热,因此,控制超声波强度,可使药物组织内部温度瞬间升高,

加速有效成分溶出。

除了以上效应外,超声波还有许多次级效应,如击碎、乳化、扩散等效应,也都有利于植物中有效成分的转移,超声波在促进传质的同时还能促进水合,这也有助于中药有效成分的提取。

3.5.2 超声波提取技术的特点

超声波提取技术适用于天然产物,特别是我国传统中草药有效成分的提取,是提取工艺的新方法、新工艺。与常规的煎煮法、水蒸馏法、溶剂浸提法相比具有如下特点:提取温度低,避免了常规的煎煮法和回流法长时间加热对中药有效成分的不良影响,产物生物活性高,适合于热敏性物质的提取;适用性广,超声提取与目标提取物的性质(如极性)关系不大,绝大多数中药材的各类成分均可用超声提取;减少能耗,由于超声提取无需加热或加热温度低,提取时间短,因此能大大降低能耗,提高经济效益;此外,超声波还具有一定的杀菌作用,能保证萃取液不易变质。

3.5.3 超声波提取装置简介

超声波提取中草药有效成分的装置主要由以下几个部分组成:提取罐、高频发生器、超声波换热器、循环泵等。其中,提取罐可以用常规提取罐(多功能式)进行改装,也可以新制作一台提取罐。在提取罐中仅以特殊的结构把超声波换热器固定在罐体内。高频发生器安装于罐外,多个超声换热器组合成为一个高频振动箱,并在提取液中形成高频振荡,产生“空化作用”。这个由换能器组成的高频振动箱,可根据提取罐的形状,安装在罐内不同的部位,例如:罐的底部、侧面或中间,视被提取物料的性状及提取罐的形状而定,分别用于水提取或醇提取。这种提取方式均是动态提取,当提取液中被提取物的有效成分达到一定浓度(质量含量)即可以停止循环,把提取液转入下道工序去浓缩,罐内药渣由罐底出料阀放出。

3.5.4 影响超声波提取的因素

3.5.4.1 超声波频率和强度

超声波的热效应、机械作用、空化效应是相互关联的。通过控制超声波的频率与强度,可以突出其中某个作用,减小或避免另一个作用,以达到提高有效成分提取率的目的。超声波的频率越高越容易获得较大的声强。一般情况下,超声波强度为 0.5 W/cm^2 时,就已经能产生强烈空化作用。超声波作用于生物体所产生的热效应受超声波频率影响显著。一般来说,超声波频率越低,产生的空化效应、粉碎、破壁等作用越强。强烈空化效应影响下使溶剂中瞬时产生的空化泡迅速崩溃,促使植物组织中的细胞破裂,溶剂渗透到植物细胞内部,使细胞中的有效成分进入溶

剂,加速相互渗透、溶解。故在超声波作用下,不需加热也可增加有效成分的提取率。

许多实验证明,超声波频率越低,天然产物有效成分提取率越高。但超声波频率越低,空化作用越强,对植物组织的损伤越强,有可能带来一些不期望的结果。20 kHz 是超声波的最低频率,但未见如此低频超声波破坏有效成分的报道。20 kHz 最低频率超声波是否对药物有效成分造成破坏作用,还有待于进一步研究。但是,对某些植物,超声波提取使用的频率越高,有效成分提取率却越高。这说明超声波频率对有效成分的影响,它与组分的化学形式、生物形式以及存在的环境、生物体相关。

3.5.4.2 超声波提取时间与提取率

超声波提取时间对天然产物提取率 and 对其有效成分的影响已引起人们广泛注意。大致有这样3种情况:

(1) 一些有效成分提取率,随超声波作用时间增加而增大。

(2) 提取率随超声波作用时间的增加逐渐增高,一定时间后,超声波作用时间再延长,提取率增加缓慢。

(3) 提取率随超声波作用时间增加,在某一时刻达到一个极限值后,提取率反而减小。

造成有效成分在超声波作用达到一定时间后,提取率增加缓慢或呈下降趋势的原因可能有两个:一是在长时间超声波作用下,有效成分发生降解,致使提取率降低;二是超声波作用时间太长,使提取粗品中杂质含量增加,有效成分含量反而降低,影响提取率的增加。

3.5.4.3 溶剂的选择

超声波提取无需加热,因此,溶剂选择是否得当将会影响到待提取样品中有效成分的提取率。在选择提取溶剂时,最好结合有效成分的理化性质进行筛选。采用超声波技术将植物中的有效成分大部分提出,往往需要用一定溶剂将药材浸渍一段时间,再进行超声波处理,这样可以增加有效成分在溶剂中的溶解度,提高提取率。

3.5.4.4 对酶的特殊作用

低强度的超声波可以提高酶的活性,促进酶的催化反应。而高强度的超声波会抑制酶的活性,甚至使酶失活。在中草药中存在大量有生物活性的苷类及许多能促进相应的苷酶解的酶。因此,如何在植物有效成分的提取中,利用超声波对酶的双向作用,解决由酶引起的种种问题,有待于今后进一步的研究。

3.5.5 新型超声波技术

中草药所含成分相当复杂,随着技术的发展,超声波技术表现出较强的优势。

目前超声波技术在中草药有效成分的提取主要采用单频超声波,但单频超声波在应用上仍存在一定缺陷,如声场不够均匀,比较容易产生驻波,从而影响提取效果。近年来,双频、三频超声波技术的应用,以及超声波和其他技术的耦合,使中草药的有效成分得到更有效的提取。

3.5.5.1 双频超声波技术

双频超声波是两个声波相向发出超声,可以相对减少声场、声强的不均匀性。其中一超声波产生的空化泡内爆所生成的新空化核,既可供超声波束的自身再空化,又可为另一束超声波提供新的空化核,显著地增加空化事件,减少驻波所造成的死角,提高声化学产额。相对于单频超声波,双频超声波能更有效地破坏中草药的细胞壁,使细胞内有效成分更易释放,从而提高提取率。

3.5.5.2 三频超声波技术

在双频正交辐照的基础上加入一束低频超声波就构成三频正交辐照,三频超声波同时正交辐照时对样品的机械扰动较单频、双频作用明显增大,使样品中空化核数量增多,因此三频超声波较单频、双频超声波更能增强声化学的产额。

3.5.5.3 超声-微波协同萃取技术

超声-微波协同萃取技术中,超声和微波的作用相互强化,超声波的空化效应和微波的选择性加热能使细胞的细胞壁和细胞膜被冲破,使溶剂能进入细胞内,而超声波的热效应和微波的加热效应又能加速细胞内的有效成分的扩散,提高提取率。

3.5.5.4 纤维素酶-超声波萃取技术

该技术将超声波和纤维素酶的应用结合起来用于中药有效成分的提取,能强化对植物细胞壁的破坏而更好地促进细胞内成分的释放、扩散和被提取。为了强化提取过程,破坏细胞壁是关键,纤维素是细胞壁的主要成分,纤维素酶会作用于细胞的细胞壁,使细胞壁部分降解,甚至破裂;在纤维素酶作用基础上,超声波的空化、机械效应会使细胞壁破碎,使溶剂进入细胞内;超声波的热效应能进一步促进细胞内有效成分的扩散,提高提取率。

3.5.5.5 超声波强化超临界萃取技术

该技术的机制不是源于超声波空化,而是超声波在微环境内产生的机械效应和热效应。超声波可引起质点的振动,在超临界流体内实行“微搅拌”,减小内扩散阻力,强化物料内部的传质;另外,超声波能的传递使溶质活化,降低过程的能垒,增大溶质的运动,因此,超声波能对超临界流体萃取过程产生强化效应。

3.5.6 超声波萃取的应用

目前利用超声波辅助提取天然植物有效成分涉及生物碱类、蒽醌类、黄酮类、皂苷类、多糖、挥发油等。

3.5.6.1 生物碱类

黄东亮等采用超声波技术及渗漉法提取颠茄草有效成分莨菪碱,并比较两法的莨菪碱提取率及提取时间,发现两法莨菪碱得率相当,但超声波法提取时间为20 min,比渗漉法大大缩短。

Zuo等提取药物配方中的烟碱,发现用超声波提取法提取不到20 min就可获得常规冷浸法24 h的提取效率,并且溶剂用量只有常规方法的1/6。

3.5.6.2 蒽醌类

张海晖等研究超声波技术对大黄中蒽醌类成分提取率的影响,并与传统提取方法做比较。以超声波强化提取法为试验组,以常规煎煮法及乙醇回流法将对照组进行平行试验。结果发现以水为提取溶剂,采用超声波强化提取10 min,对游离蒽醌的提取率即与水煎煮法煎煮60 min提取效果相当;以乙醇为提取溶剂的提取效果明显好于水,几种方法相比较,以乙醇作为提取溶剂超声波萃取法对大黄蒽醌的提取效果最好。

杨黎燕等采用超声波提取决明子中的蒽醌类成分,于40 kHz下采用超声波提取决明子中的蒽醌类成分并与热回流法提取效果进行对比。结果得到各因素对超声波提取决明子中蒽醌提取率的影响程度依次为:乙醇浓度>料液比>提取时间。与传统热回流提取法的比较结果表明,超声波20 min的提取率相当于热回流1.5 h的提取率,大大降低能耗,节约成本。

3.5.6.3 黄酮类

超声波提取法用于黄酮类成分中草药的提取应用研究报道更多。例如,梁惠花等以85%的乙醇为溶剂,采用DL2720超声波仪提取坝上油菜蜂花粉中的总黄酮,发现该法可提高提取率,节省提取时间。

郭孝武采用正交试验法,探讨了超声法提取杜仲叶黄酮类物质的最佳工艺及机制,得到超声波提取法提取杜仲叶总黄酮类物质的最佳工艺为:以60倍药材量的40%乙醇水溶液为浸出溶剂浸泡药材24 h后,用超声波提取45 min,提取率可达25.43%;超声波提取的机制主要是通过空化作用实现,其使杜仲叶细胞壁破裂,加速细胞中总黄酮类物质直接向溶剂中溶解,从而使有效成分快速完全地提取。

3.5.6.4 皂苷类

Wu等用超声波提取技术提取人参皂苷,比常规提取方法快3倍,提取效率高,更易于纯化,并且由于其提取温度低,所得的人参皂苷的活性也较常规方法高。

贲永光等采用双频超声波(40 kHz/25 kHz)技术对三七总皂苷提取进行强化,选择乙醇质量分数、料液比、超声波作用时间及提取温度因素进行正交试验,得出影响总三七总皂苷提取率的大小次序先后为:乙醇质量分数>超声波作用时间>料液比>提取温度,优选出双频超声波提取最佳工艺条件,并且同采用单频超声波

提取进行了比较。结果表明:在相同的超声波电功率下,双频超声波释放效果远大于单频 25 kHz 超声波和单频 40 kHz 超声波。

3.5.6.5 多糖

姜华等采用超声波强化热水浸提法提取黑鲍菇粗多糖,考察了水料比、提取温度、提取时间和超声波处理时间对粗多糖得率的影响。确定黑鲍菇粗多糖的最佳提取工艺条件为:水料比 40:1(g:ml)、提取温度 60℃、提取时间 3 h、超声波处理时间 15 min,在此条件下粗多糖得率为 6.907%。

Hromdkova 采用超声波提取的方法从荞麦壳中提取半纤维素物质,在提取的初期分别加入超声波和不加入超声波进行对照。采用化学方法和分光镜技术分析提取物中得到的多糖物质的含量和组成。经分析比较发现,同传统萃取方法相比,超声波提取方法不仅可以提高半纤维素物质的产量,而且所得到的半纤维素物质也同样显示出重要的免疫调节活性,保持了原有的结构和分子特性。

3.5.6.6 挥发油

梅清华等针对传统水蒸气蒸馏法提取杏仁中的挥发性止咳成分存在耗时长、药材利用率不高的问题,研究了将超声波应用于杏仁挥发性成分的提取。采取先用超声波处理杏仁药材,再用水蒸气蒸馏法提取相同时间,以挥发性成分中 HCN 的收率为指标优化杏仁中挥发性成分超声波提取的最佳工艺。结果超声波提取最佳工艺为加药材 4 倍量水,400 W 功率,间歇超声 15 min,无需浸泡,可大大缩短传统水蒸气蒸馏法的工时,提高收率。

Athanasios 等同时用水蒸馏提取法、微波辅助水蒸馏提取法和超声波提取法提取大蒜中的挥发油,比较发现 3 种方法所得的挥发油的得率和性质不尽相同,但超声波提取法可减少热敏性化合物的破坏,且实验操作简单,具有工业化生产的价值。

超声波技术虽然有较多的优势,但在应用过程中还存在一些亟待解决的问题。超声波提取设备的工程化是其向产业化发展的最大障碍,由于没有适合大生产的提取设备,目前有关超声波提取的研究报道所用的设备绝大部分都是普通的超声波清洗器,该设备对于少量样品的分析具有无可比拟的优势,但其样品处理能力太小,达不到工业生产的要求。这种条件下得出的结论,还需要得到大生产的验证。

3.6 分子蒸馏技术

分子蒸馏(molecular distillation)是在高真空条件下进行的非平衡蒸馏,能解决大量常规蒸馏技术所不能解决的问题。与常规分离提纯技术相比,分子蒸馏具有浓缩效率高、质量稳定可靠、操作易规范化等优点。此技术已经广泛应用于高纯物质的分离,特别适合天然物质的提取与分离。

3.6.1 分子蒸馏基本原理

蒸馏技术是利用物质挥发度的差异实现液体混合物分离的一系列技术的总称。常规蒸馏是建立在气液相平衡的基础上,根据组分间的相对挥发度不同而进行分离,即液体成分的沸点越低,其挥发度就越大,分离操作是在混合物目标成分的沸点温度下进行,将气、液两相分别收集,达到轻重组分分离之目的。

分子蒸馏也称短程蒸馏(short path distillation)是一种在高真空度条件下进行分离操作的连续蒸馏过程。分子蒸馏的基本原理源于分子运动理论,核心概念是分子运动自由程的差异。根据分子运动理论,液体混合物受热后分子运动加剧,当分子获得足够能量时即从液面逸出而成为气相分子,随着液面上方气相分子的增加,有一部分气体就会返回液体,在外界条件保持恒定的情况下,最终会达到分子运动的动态平衡,从而在宏观上液体系统达到了平衡。根据热力学原理,在一定温度条件下,压力越低,气体分子的平均自由程越大;由于不同组分分子的相对分子质量不同,导致轻(小)分子的平均自由程大,重(大)分子的平均自由程小。此时,若在离液面小于轻分子的平均自由程而大于平均自由程处设置冷凝板进行捕集,使轻分子不断被捕集,从而破坏了轻分子的动态平衡而使混合液中的轻分子不断逸出,而重分子因达不到捕集器而很快趋于动态平衡,不再从混合液中逸出,从而达到了混合液分离的目的。图 3-2 为分子蒸馏原理示意图。

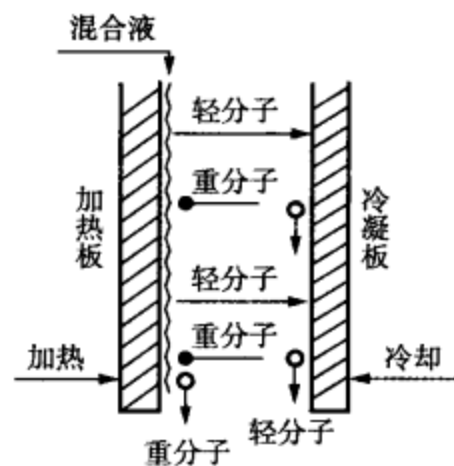


图 3-2 分子蒸馏原理示意图

分子蒸馏装置就是通过降低蒸发空间的压力,使其达到相当于绝对压力为 $1.33 \sim 1.33 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ 的高真空度,使冷凝表面靠近且平行于蒸发表面,当其间的垂直距离略小于轻分子的平均自由程而大于重分子的平均自由程时,从蒸发表面汽化逸出的气体分子就可以不与其他分子碰撞,直接到达冷却表面而冷凝,实现混合液体的不同组分的分离。在设计实践中,要使蒸发器表面与冷凝器表面的距离小于分子的平均自由程往往是不经济的,即分子蒸馏处理量较小,因此通常是采用蒸发器表面与冷凝器表面之间的距离稍大于分子的平均自由程,并控制在同一数量级的范围内,既保持原来设备具有的温和分离条件,即短程蒸馏的特点,又使物料处理量大大增加。同时,为了使馏出物能完全冷凝,蒸发面与冷凝面间需保持约 100°C 的较大温度差;在蒸发器与冷凝器之间有真空系统相连,既保证使分子的平均自由程减至最短,又可保证单向分子的流动,实现了组分在较低温度下的分离。

3.6.2 分子蒸馏的技术特点

分子蒸馏是一种在非平衡状态下的蒸馏,从根本上区别于常规蒸馏,因此,它具备许多常规蒸馏无法比拟的优点。

1) 操作温度低

常规蒸馏是靠不同物质的沸点差进行分离的,而分子蒸馏是靠不同物质的分子运动平均自由程的差别进行分离,只要蒸汽分子由液相逸出就可实现分离,而并非达到沸腾状态。因此,分子蒸馏是在远离沸点下进行操作。

2) 蒸馏压强低

分子蒸馏方法本身,需要被分离物质的蒸汽分子有足够大的分子运动平均自由程,这必须通过降低蒸馏体系的压强来获得,由于分子蒸馏装置的独特结构形式,蒸馏体系中可比较容易获得很高的真空度(0.1~100 Pa)。

3) 被分离物质受热时间短

分子蒸馏是靠不同物质分子运动平均自由程的差别来实现分离的,因而装置中加热面与冷凝面距离要小于轻分子的运动平均自由程,这样,由液面逸出的轻分子在几乎不发生碰撞就可到达冷凝面,所以受热时间很短。

4) 产品品质和产品收率高

分子蒸馏常被用来分离那些常规蒸馏难以提纯的物质,并通常可以得到高收率、高品质的产品。所以,该技术在科学研究和工业生产中受到了普遍的重视。

3.6.3 分子蒸馏装置的组成单元

分子蒸馏全套装置由以下系统组成(图 3-3)。

3.6.3.1 蒸发系统

这是整个装置的核心设备,以分子蒸馏器为核心,常用的有刮膜式分子蒸馏器和离心式分子蒸馏器。可以是单级,也可以是两级或多级。该系统中除蒸馏器外,往往还内置一级或多级冷阱。

3.6.3.2 脱气系统

脱气系统在分子蒸馏装置中是必不可少的,其作用是在物料进入蒸馏器之前将所溶解的易挥发组分尽量排出,以避免易挥发组分进入高真空状态下的分子蒸馏器内,而导致物料暴沸,影响蒸馏过程的顺利进行。

3.6.3.3 物料输入、输出系统

由计量泵、级间物料泵和物料输出泵等组成,主要完成系统的连续进料与排料功能。

3.6.3.4 加热系统

根据热源不同而设置不同的加热系统,目前有电加热、导热油加热及微波加热等方式。

3.6.3.5 真空获得系统

分子蒸馏是在极高真空下操作,因此,该系统也是全套装置的关键之一,组合方式多种多样,具体的选择需要根据物料特点确定。

3.6.3.6 控制系统

通过自动控制或电脑控制。

从图 3-3 中可以看出,分子蒸馏的分离过程是一个复杂的系统工程,取决于许多组成单元的共同作用。

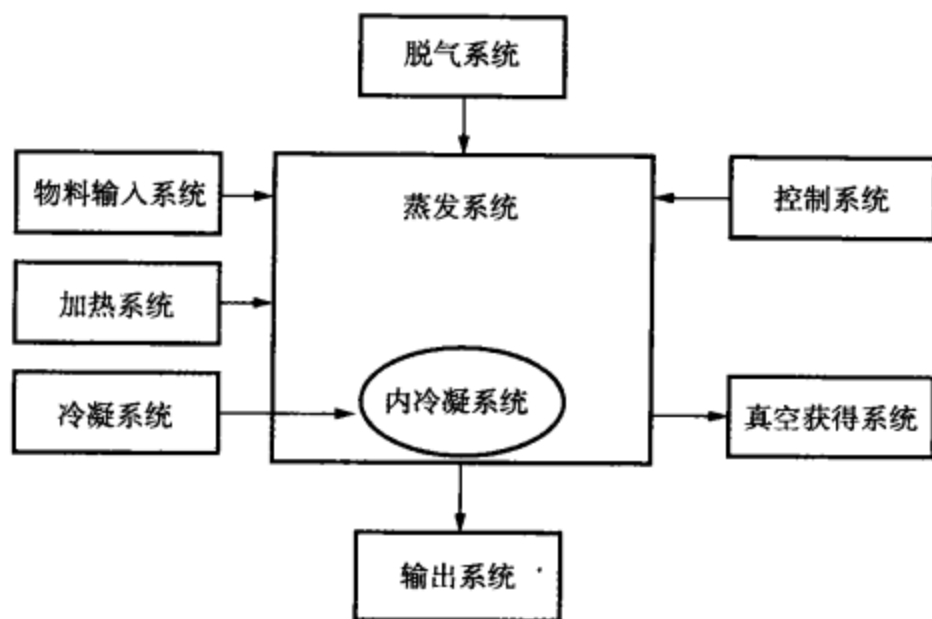


图 3-3 分子蒸馏全套装置系统组成

3.6.4 影响分子蒸馏的影响因素

3.6.4.1 蒸馏系统温度

蒸发器内部冷热面必须要有足够的温度差,一般理论上要求蒸发面与冷凝面的温度差在 $70\sim 100^{\circ}\text{C}$ 之间,实际中还应尽可能地增大温度差为好,同时也必须要考虑被分离物质的热稳定性,必须注意的是温度的升高使得分子运动加剧,分子运动自由程也相应的增加,为此应结合实际情况来选择合理的蒸馏温度。

3.6.4.2 蒸馏系统的真空度

系统中真空度高不仅可以增大轻重分子的平均自由程,使设备中蒸发面与冷凝面间距设计更易于保证其分子蒸馏条件,而且高真空度下气相与液相表面的蒸汽压差大,能够保证在低温度下液体分子向气相中的良好的传递过程,使分离速率

大大提高。此外,高真空度下分离体系中几乎无氧气存在,这就保证了分离在绝氧条件下完成,因此,当其他条件恒定时,真空度决定了混合液体中不同成分分子的平均自由程,由分子蒸馏原理可知,只要选择不同的真空度及冷热面温度,便可达到不同成分分离的目的,也就是说分子蒸馏可以通过多级蒸馏过程而达到几种成分的分离,实际中有人认为将压力小于 0.013 Pa 的蒸馏过程称为分子蒸馏,把压力为 1.33~0.013 Pa 的蒸馏过程称为准分子蒸馏。

3.6.4.3 液膜厚度

液相中的扩散速度是控制分子蒸发速度的主要因素,因此液膜层厚度应尽量薄。一般薄膜厚度为 0.05~0.5 mm 比较适宜。如果过薄,则不但技术上难以实现,而且单位时间蒸发量也要减少。

3.6.4.4 惰性气体

分子蒸馏器中残余惰性气体对物质传递效率的影响取决于其分压的大小。当惰性气体分压远低于被蒸馏液体的饱和蒸汽压时,其影响很小,当惰性气体分压高于被蒸馏液体的饱和蒸汽压时,其影响很明显,会迅速将物质传递效率降低到扩散控制过程的水平。但是惰性气体的存在对分离效率没有明显影响。

3.6.4.5 蒸发面与冷凝面的距离

基于分子蒸馏的原理,蒸发面与冷凝面之间的距离应保持在轻分子平均自由程和重分子平均自由程之间,方能实现良好的分离效果。这样不仅满足了分子蒸馏的先决条件,并且有助于缩短物料汽化分子处于沸腾状态的时间,仅数秒钟即达到快速分离。在实际中,其蒸发面与冷凝面的距离应根据系统内的真空度而定,因为一定的真空度下就对应着该混合液中轻重分子的平均自由程的大小,一般蒸发面与冷凝面的距离范围为 20~30 mm 为佳,因而真空度也应保持在 10 mmHg 以下。然而在冷凝面与蒸发面相距如此近的情况下,要保持其温度差在 100℃ 左右,在常压下几乎难以实现,但在高真空度下,两面间几乎没有气体分子,因而冷热面间就几乎没有对流传热介质和导热传热介质,有的只是辐射传热,所以在高真空度下保证如此高的温度差也较易实现。

3.6.4.6 原料的预处理

在分子蒸馏前,必须对原料脱水、脱溶剂、脱氧气处理。否则这些杂质会给蒸馏造成过大的负担,使系统真空度下降,腐蚀设备,引起爆沸并影响产品质量。此外,物料进料温度的高低直接决定蒸发面积的有效利用程度,物料最好预热到蒸发温度进料。

3.6.5 分子蒸馏在天然产物分离中应用

广藿香全草含挥发油 1%,挥发油主要成分为广藿香酮、广藿香醇及苯甲醛、

丁香酚、桂皮醛、倍半萜烯等。胡海燕等采用三级分子蒸馏,在温度 40~60℃、压力 8~10 Pa 下,使粗油中有效部位的含量由 30% 提高到 80%,馏分中低沸点组分(单及倍半萜、烯类化合物)的相对含量明显下降,挥发油中高沸点的有效成分广藿香酮和广藿香醇与其他低沸点组分能较好的分离。

王发松等用分子蒸馏技术开展了从毛叶木姜子果油中分离纯化柠檬醛的工艺研究,所得柠檬醛的纯度达到了 95%,产率为 53%,损失率仅为 15%。

综上所述,分子蒸馏技术作为一种特殊的新型分离技术,主要应用于高沸点、热敏性物料的提纯分离。实践证明,此技术不但科技含量高,而且应用范围广,是一项工业化应用前景十分广阔的高新技术。它在天然药物活性成分及单体提取和纯化过程的应用还刚刚开始,尚有很多问题需要进一步探索和研究。

3.7 膜分离技术

按照膜的功能可分为分离膜、识别膜、反应膜、能量转化膜、电子功能膜等。其中,分离膜的应用最为广泛,也是本章所介绍的内容。分离膜的根本原理在于膜具有选择透过性,按照分离过程中的推动力和所用膜的孔径不同,可分为微滤(micro filtration, MF)膜、超滤(ultra filtration, UF)膜、反渗透(reverse osmosis, RO)膜、渗析(dialysis, D)膜、电渗析(electro dialysis, ED)膜、气体分离(gas separation, GS)膜、渗透汽化(pervaporation, PV)膜、乳化液膜(emulsified liquid membrane, ELM)等,膜过程分类及特征见表 3-1。

表 3-1 膜过程分类及特征

膜过程	膜类型	推动力	透过物质	被截留物质
微滤	多孔膜、非对称膜	压力差 (0.1~2 khf/cm ²)	水、溶剂溶解成分、胶体	悬浮物质(胶体、细菌等)、各种微粒
超滤	非对称膜	压力差 (1~10 khf/cm ²)	溶剂和离子及小分子量物质(相对分子质量小于 1000)	生物制品、胶体及各类大分子(相对分子质量 1000~30 000)
反渗透	非对称膜	压力差 (10~70 khf/cm ²)	水	全部悬浮物、溶解物和胶体
渗析	非对称膜、离子交换膜	浓度差	离子、低分子量有机质、酸、碱	相对分子质量大于 1000 的溶解物和胶体
电渗析	离子交换膜	电位差	离子	所有非解离和大分子颗粒

3.7.1 膜分离技术的特点

膜分离技术以选择性透过膜为分离介质,当膜两侧存在某种推动力(如压力

差、浓度差、电位差等)时,原料侧组分选择性的透过膜,以达到分离、提纯的目的。该技术具有以下特点:

- (1) 常温操作,适于热敏感物质的分离、浓缩和纯化。
- (2) 分离过程不发生相变化(除渗透汽化外)。
- (3) 能耗低。
- (4) 分离系数较大。

所以,膜分离技术是现代分离技术中一种效率较高的分离手段,可以部分取代传统的过滤、吸附冷凝、重结晶、蒸馏和萃取等分离技术,在分离工程中具有重要作用。

3.7.2 微滤

微滤是最早使用的膜技术,是以多孔薄膜为过滤介质,使不溶物浓缩过滤的操作。截留粒子的范围约为 $0.1\sim 10\mu\text{m}$,目前常用的微滤膜有金属膜、无机陶瓷膜、高分子膜等。在工业上,微滤膜主要应用于截留颗粒物,液体的澄清以及大部分细菌的去除,并作为超滤、反渗透过程的前处理。金属膜、无机膜具有耐高温、耐酸碱、耐有机溶剂等特点,较高分子膜有更广的应用范围,且易于再生,并可重复使用,不足之处是其价格较高。

3.7.3 超滤

超滤是 20 世纪六七十年代发展起来的一种膜分离技术,以微孔滤膜为过滤介质,在常温下,依靠一定的压力和流速,使药液流经膜表面,迫使低分子物质透膜,高分子杂质被截留。超滤膜能截留相对分子质量在上千至数十万的大分子,除能完成微滤的除颗粒、除菌、澄清作用外,还能除去微滤膜不能除去的病菌、热原、胶体和蛋白质等大分子化合物,主要用于物体的分离、提纯、浓缩。在医药行业中超滤膜是发展最快的膜分离技术。

3.7.4 纳滤

纳滤膜是近年来国外发展起来的另一滤膜系列——纳米过滤。它介于反渗透与超滤之间,能分离除去相对分子质量为 $300\sim 1000$ 的小分子物质,填补了由超滤和反渗透所留下的空白部分。纳滤膜集浓缩与透析为一体,可使溶质的损失达到最小。

3.7.5 反渗透膜

反渗透膜是从水溶液中除去无机盐及小分子物质的膜分离技术。反渗透膜所

用的材料为有机膜,其分离特点是膜仅能透过水等小分子物质,而截留各种无机盐、金属离子和分子。反渗透膜在医药行业中的应用主要是制备各种高品质的医用水、注射用水、医用透析水,可代替离子交换树脂,主要用于水的脱盐纯化。

3.7.6 膜分离技术存在的问题及解决方法

3.7.6.1 膜的污染问题

由于中药液大都含有蛋白、脂肪、纤维、鞣质及胶体物质,膜在操作时极易被污染和阻塞,造成膜通量锐减。而现有的清洗方法难以达到恢复通量的目的。所以料液的预处理及清洗成了膜技术应用的关键,另外开发新型的不易被污染的膜材料及进行膜面改良也是控制膜污染的有效措施。

3.7.6.2 浓度极化现象

由于滤膜上筛孔极小,沉积在膜面的物质易形成一层等高浓度的凝胶层,使膜的通过速度和截流性能受到很大影响,称为浓度极化现象。应采取相应措施,如降低料液黏度;在超滤各阶段合理的调节压力,分别采用恒速和恒压滤过;或与其他分离方法如澄清法、离心法联用等。

3.7.6.3 膜的性能有待提高

膜材料的品种少,膜孔径分布宽,性能欠稳定,如常用的亲水性膜材料对溶质吸附少,截留分子量较小。但热稳定性差,机械强度、抗化学药品性、抗细菌侵蚀能力通常不高,疏水性膜材料机械强度高、耐高温、耐溶剂、耐生物降解,但膜透水速度低、抗污染能力较低。另外,由于滤膜本身的孔径不可能完全均匀一致,滤过时部分微粒、热原从较大的滤孔滤出,而导致初滤液不合要求。故应用时应采用多级超滤法来提高药液质量,并研究开发性能优良的滤膜,克服其自身的缺点。

3.7.7 膜分离技术在天然产物分离中应用

3.7.7.1 微滤在天然产物分离中应用

高红宁等用无机陶瓷微滤膜对苦参水提液进行微滤澄清研究,对水提液微滤前后在性状、固形物、指标成分等方面进行对比分析。苦参水提液微滤前为深黄色的浑浊液体,微滤后成为颜色变浅的澄清透明液体。苦参水提液中固形物去除率为 39.50%,有效成分的保留率优于醇沉法。

李媛媛等以栀子黄色素萃取液为原料,研究陶瓷膜微滤过程中不同膜孔径、不同操作压力对渗透通量和色素液品质的影响,确定孔径 200 nm 的陶瓷膜、0.125 MPa 压力下微滤为栀子黄色素纯化的最佳工艺条件,栀子黄微滤渗透液再经聚酰胺膜纳滤,1.5 MPa 压力下浓缩倍数达到 3 倍以上。

3.7.7.2 超滤在天然产物分离中应用

顾春雷等采用陶瓷膜技术过滤粗葛根素溶液,采用 GH4040 型超滤膜处理微滤渗透液,在 37℃ 和 1.0 MPa 下超滤渗透通量可以达到 13.02 L/(m²·h),葛根素的截留率约为 87%。表明采用膜技术分离纯化葛根素具有良好的发展前景。

Takeot 等人用超滤和纳滤技术从菊苣根中精制和浓缩低聚糖,经过滤后单糖和二糖含量从原来的 9% 降至 2.6%,且浓缩产物含量达到 20%。

3.7.7.3 纳滤在天然产物分离中应用

王士勇等对银杏叶提取物(GBE)生产中大孔树脂洗脱液中的银杏叶提取物(GBE)浓缩过程进行试验研究,为了节约能耗,降低生产成本,采用纳滤浓缩技术替代原生产中的低温真空蒸发工艺。研究中考察了不同膜片、操作压差、循环流速和料液浓度对分离性能的影响,确定了适宜的操作条件。在该操作条件下测得所选用膜的平均渗透通量可达 10.0 L/(m²·h) 以上,将料液中的银杏叶提取物(GBE)浓度可由 1% 左右增浓至 10% 左右,与原工艺相比节能 90% 以上。

3.7.7.4 膜分离技术集成在天然产物分离中应用

多种膜分离技术联合应用可获得单种膜分离技术所不能达到的效果。肖文军等人采用微滤、超滤和纳滤集成技术从七叶参中提取皂苷取得了满意的效果。

董艳等通过不同截留相对分子质量的超滤膜对地黄多糖分离纯化,再利用纳滤膜对超滤液进行浓缩纯化。低聚糖得率为 46.63%,质量分数达到 93.3%,凝胶过滤法验证低聚糖制品的相对分子质量低于 6000,能有效分离纯化地黄低聚糖。

膜分离技术应用于中药现代研究中具有许多传统方法无法比拟的优点,具有良好的应用前景。虽然目前膜分离技术在中药领域的应用尚存在一些问题,但随着药液预处理手段的不断改善及与其他先进分离方法的联合使用,适用于中药特殊要求的膜材料及膜成套设备的研究开发,存在的问题一定会得到解决。可以预见,随着中药现代化研究的不断深入,膜分离技术必将在 21 世纪推动中药产业的发展,并带来巨大的经济效益和社会效益。

3.8 高速逆流色谱技术

高速逆流色谱技术(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)是当前国际上较新型无固体载体的液-液分配技术,最初由美国国立健康研究院 Ito 教授研制开发,在生物、医药、天然产物化学、环境分析、食品等领域有广泛的应用。HSCCC 依靠缠绕在自转轴上的聚四氟乙烯(PTFE)蛇形管在共转轴上进行特殊的同步行星式运动模式而产生的离心场作用,使两互不相溶的两液相的其中一相由于离心力保留在柱中,另一相作为流动相,并使流动相单向、低速通过固定相,在短时间内实现样品在互不相溶的两相溶剂系统中高速分配,继而达到连续逆流萃

取分离目的,被分离的各组分依据其在两相中分配系数的差异得到分离。

3.8.1 HSCCC 的工作原理

HSCCC 同逆流色谱技术一样,也是基于液液分配原理。当仪器工作时,互不相溶的两相溶剂在绕成线圈的聚四氟乙烯管内具有单向性流体动力平衡性质,溶剂在聚四氟乙烯管内作高速行星运转时,如用其中一相溶剂作固定相,则恒流泵可以输送另一相溶剂载着样品穿过固定相。两相溶剂在螺旋管中实现高效的接触、混合、分配和传递。由于样品中各组分在两相中的分配能力不同,导致在聚四氟乙烯管中移动的速度也不同。因而,能使样品中各组分得到分离。Ito 将所用的溶剂系统分为三类:亲水性系统,由极性小的非水相与水相组成,两相极性相差很大;亲油性系统,由高极性的非水相与水相组成,两相极性相差不大;还有一类处于两者之间,为中间系统。对于不同的组分可以采用不同的溶剂系统,控制不同的条件加以分离分析。

3.8.2 HSCCC 的优点

3.8.2.1 应用范围广,适应性好

由于溶剂系统的组成与配比可以是无限多的,因而从理论上讲 HSCCC 可以适用于任何极性范围的样品的分离,所以在分离天然化合物方面具有其独到之处。而且聚四氟乙烯管中的固定相不需要载体,因而消除了气液色谱中由于使用载体而带来的吸附,特别适用于分离极性物质和其他具有生物活性的物质。

3.8.2.2 操作简便,容易掌握

仪器操作简单,对样品的预处理要求低,仅需一般的粗提物即可进行 HSCCC 的制备分离或分析。

3.8.2.3 回收率高

由于该色谱技术没有固定载体,不存在吸附和降解,理论上样品的回收率可达 100%。在实验中只要调整好分离条件,一般都有很高的回收率。

3.8.2.4 重现性好

如果样品不具有较强的表面活性作用,酸碱性也不强,那么多次进样,其分离过程都保持稳定,峰的保留相对标准偏差小于 2,而且重现性相当好。

3.8.2.5 分离效率高,分离量较大

由于 HSCCC 与一般色谱的分离方式不同,能实现梯度操作和反相操作,亦能进行重复进样,使其特别适用于制备性分离,产品纯度高,不存在载体对样品的吸附和沾染。制备量大,溶剂消耗少。

3.8.3 溶剂体系的选择

欲用 HSCCC 进行成功的分离,选择适宜的溶剂系统非常重要。不同的溶剂系统,具有不同的上、下相之比,其黏度、极性、密度等性质相差甚远,对相同的成分具有不同的溶解、分配能力,形成分配系数的差异,对分离效果产生不同的影响。目前,溶剂体系的选择还没有一套完整的理论依据。一般来讲,选择的条件为:

(1) 溶剂可分层。

(2) 不造成样品的分解或变性。

(3) 固定相能实现足够高的保留值:一般要求固定相的保留值大于 50%(体积比)。

(4) 样品在溶剂系统中有合适的分配系数值:被分离物质的分配系数(K)范围要在 0.5~2($K=C_u/C_l$, C_u 是上相中溶质浓度, C_l 是下相中溶质浓度),测量 K 值可以用浓度测定法和色谱法(TLC 或 HPLC)。

(5) 溶剂易挥发除去。

对于未知组成的样品,一般根据经验来选择溶剂体系。通常是先选用氯仿/甲醇/水(2:1:1,体积比,下同)或正己烷/乙酸乙酯/甲醇/水(1:1:1:1)溶剂体系进行尝试,然后再进行适当的改变。溶剂体系选择后,通常以平衡两相中的上相为固定相,下相为流动相。另外,两相中的酸碱性不同,会对溶液中酸碱性较敏感的化学成分分离造成影响。近年来,溶剂体系的选择已经发展到用超临界 CO_2 以及制冷剂 1,1,2,2-四氟乙烯作流动相。

3.8.4 影响 HSCCC 分离的因素

高速逆流色谱仪的转速、流动相流速、进样体积是影响提取效果的主要因素。通常情况下:

(1) 转速越高,越易产生乳化现象。

(2) 流动相流速越大,固定相流失加重。

(3) 进样量太大,峰间距变窄,峰形变宽。

在选定了溶剂体系后,有时需要对三个仪器运行参数(转速、流动相流速、进样体积)进行正交试验、以确定最佳分离条件。

3.8.5 HSCCC 在天然产物成分分离中的应用

目前利用 HSCCC 分离天然植物有效成分涉及生物碱类、蒽醌类、黄酮类、皂苷类、多糖、挥发油等。

3.8.5.1 生物碱类

分离生物碱成分常用的溶剂体系是正己烷-乙酸乙酯-甲醇(或者乙醇、正丁醇)-水体系以及三氯甲烷-甲醇-水体系,有时会向溶剂体系中添加酸性改性。

Fuquan 等以三氯甲烷-甲醇-0.3 mol/L HCl(4:1.5:2, V/V)为溶剂体系,从乌头的总生物碱粗提物中分离出高乌碱、N-去乙酰基高乌碱。

褚建军等用制备型高速逆流色谱,从黄连、黄柏、十大功劳和金果榄等4种中药中分离出了几种小檗碱类生物碱。分离的溶剂体系主要由四氯化碳、氯仿、甲醇和稀盐酸以不同的体积比组成。

3.8.5.2 黄酮类

高速逆流色谱在天然产物黄酮成分的分离与分析方面的应用非常成功。

Du 等利用高速逆流色谱成功地从淫羊藿中分离出了淫羊藿苷,所用的溶剂体系为 $V(\text{正己烷}):V(\text{正醇}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=1:4:2:6$,淫羊藿苷的纯度为 86.2%,重结晶后淫羊藿苷的纯度能达到 98%以上。

Li 等利用高速逆流色谱从黄芩中成功分离出了黄芩苷、汉黄芩苷和木蝴蝶素,所用溶剂体系为 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=1:1:8:10$,纯度都在 93%以上。

3.8.5.3 醌类

分离醌类常用的溶剂是三氯甲烷-甲醇-水体系。Tian 等以石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(2:3:2:1.7, V/V)为溶剂系统从丹参中分离得到丹参醌 II A、二羟基丹参醌 I A、丹参醌 I A 和隐丹参醌。

3.8.5.4 苷类化合物

据文献总结,在苷类化合物的分离中,主要用了三类溶剂体系,即正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、醋酸乙酯(氯仿)-甲醇(乙醇)-水和醋酸乙酯-正丁醇-水。

正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水体系主要分离极性较小的单糖苷类,可根据化合物极性差别调整不同比例的甲醇、醋酸乙酯等来调节体系的极性,达到分离目的。

Du 等从穿心莲中提取穿心莲内酯和新穿心莲内酯,通过对正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水体系不同比例的测试,确定了正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:4:2.5:2.5)体系。

醋酸乙酯(氯仿)-甲醇-水体系主要分离单糖苷、双糖苷类。Ma 等从黄芪中分离异黄烷醇和紫檀烷苷尝试了醋酸乙酯-乙醇-乙酸-水(10:1:0:10, 5:1:0.1:5等比例)体系,结果证明(4:1:0.25:5)体系对目标化合物分离效果最好,固定相保留率 60%。

醋酸乙酯-正丁醇-水体系用于分离极性较大的双糖苷类。一般通过调整正丁醇比例来分离不同极性物质。Zhou 等从山栀子中分离栀子苷,由于栀子苷基本溶于正丁醇,所以选用了含正丁醇的体系。首先选用了醋酸乙酯-正丁醇-水(10:1:10)体系, K 太小。又尝试了正丁醇-乙酸-水(4:1:5)体系,但固定相保留率小于

20%。最后选择了醋酸乙酯-正丁醇-水(2:1:3)体系。

3.8.5.5 其他类

Andreas 等以甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水(1:3:1:5,V/V)体系从胡麻中分离得到木质素双糖苷。Wei 等以正丁烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1,V/V)和(5:5:6:4,V/V)梯度分离,从蛇床子中分离出欧芹酚甲醚和花椒毒酚。

HSCCC 是一种独特的不用固态载体的液相分配色谱技术,是一种能实现连续有效分离的实用分离制备技术。该项技术既可以定性分析又可以定量制备,样品量可由数毫克到数克,注入体积可由数毫升到数十毫升,真正实现一机多用;分离所需有机溶剂少,可以保护生态环境;能直接与质谱仪或红外光谱仪联用进行高纯度分析。不可否认,HSCCC 也有其不足之处,主要是溶剂体系选择的困难制约了 HSCCC 的应用。尽管如此,HSCCC 在制备粗品的优势是不可替代的。随着液相色谱技术的迅猛发展,HSCCC 将不断创新,日臻完善。

3.9 大孔树脂吸附分离

大孔吸附树脂(macroporous absorption resin)属于功能高分子材料,是近 30 年来发展起来的一类有机高聚物吸附剂,是吸附树脂的一种,由聚合单体和交联剂、致孔剂、分散剂等添加剂经聚合反应制备而成。聚合物形成后,致孔剂被除去,在树脂中留下了大大小小,形状各异、互相贯通的孔穴。因此大孔吸附树脂在干燥状态下其内部具有较高的孔隙率,且孔径较大,在 100~1000 nm 之间,故称为大孔树脂。

近年来广泛用于天然产物的提取分离工作中,得到了普遍认可和重视。

3.9.1 大孔树脂吸附分离的特点

大孔树脂的表面积较大,交换速度较快,机械强度高,抗污染能力强,热稳定性好,在水溶液和非水溶液中均可使用,大孔吸附树脂具有很好的吸附性能,它理化性质稳定,不溶于酸、碱及有机溶剂,对有机物选择性能好,不受无机盐类及强离子、低分子化合物存在的影响,可以通过物理吸附从水溶液中有选择地吸附有效成分。大孔树脂是吸附性和筛选性原理相结合的分选材料,基于以上特点,有效成分根据吸附力的不同及相对分子质量的大小,在大孔吸附树脂上,通过不同浓度的溶剂的洗脱,从而达到不同有效成分及有效部位分离的目的。

3.9.2 大孔树脂吸附分离极性

根据树脂的表面性质,大孔吸附树脂按其极性强弱,分为非极性、中极性和极性三类。

非极性吸附树脂是由偶极距很小的单体聚合制得的不带任何功能基,孔表面

疏水性较强,如由苯乙烯和二乙烯苯缩合而成,故又称芳香族吸附树脂,因具有比较大的孔,适用于大分子物质的吸附,且洗脱性良好,被吸附物可以容易被洗脱下来。最适于由极性溶剂(如水)中吸附非极性物质。中极性吸附树脂是含酯基的吸附树脂,其表面兼有疏水和亲水两部分,既可由极性溶剂中吸附非极性物质,又可由非极性溶液中吸附极性物质。极性与强极性树脂是指含酰胺基、氰基、酚羟基等含氮、氧、硫不同极性功能基的吸附树脂,该类树脂最适用于由非极性体系里分离极性物质。

3.9.3 大孔吸附树脂的型号

由于大孔吸附树脂的孔度、孔径、比表面积及构成类型不同而被分为许多型号,故性质各异,在应用时必须根据情况加以选择。

树脂型号主要有:国外,美国 Rohm-Hass 公司生产的 XAD 系列和日本 organo 公司生产的 HP-10、20、30、40(非极性),其他牌号吸附树脂还有:Parapet P-S、Parapet Q、Parapet R、Parapet S、Parapet N、Chromosorb 系列等。国内主要有天津制胶厂的 D、D101(非极性)、D_A、MD;南开大学 D 系列;上海试剂厂 101、102、401、402;南大化工厂 AB-8(弱极性);上海医药工业研究所 SIP 系列等。

3.9.4 影响大孔吸附树脂分离的因素

3.9.4.1 树脂结构的影响

大孔树脂的吸附性能主要取决于吸附剂的表面性质,即树脂的极性(功能基)和空间结构(孔径、比表面积、孔容),一般非极性化合物在水中可以为非极性树脂吸附,极性树脂则易在水中吸附极性物质。

3.9.4.2 被分离的化合物结构的影响

一般来说,被分离化合物的极性的强弱和分子体积大小直接影响到吸附效果,极性较强的分子一般适于在中极性的树脂上分离,极性弱的分子适于在非极性树脂上分离。

3.9.4.3 洗脱剂的影响

常见的洗脱剂有甲醇、乙醇、丙酮等,在实际工作中乙醇应用较多。通常情况下洗脱剂极性越小,其洗脱能力越强,一般先用蒸馏水洗脱,再用浓度逐渐增高的乙醇、甲醇洗脱,对于有些具有酸碱性的物质还可以用不同浓度的酸、碱液结合有机溶剂进行洗脱。

3.9.4.4 上样溶剂的影响

通常一种成分在某种溶剂中溶解度大,则在该溶剂中,树脂对该物质的吸附能力小,反之亦然。一般而言,碱性物质在碱液中吸附,酸液中解吸;酸性物质在酸液

中吸附,碱液中解吸。

3.9.4.5 吸附温度的影响

大孔树脂的吸附作用主要是由于它具有巨大的表面积,是一种物理吸附,低温不利于吸附,但在吸附过程中又会放出一定的热量,所以操作温度对其吸附也有一定的影响。

3.9.4.6 其他影响因素

提取液在上柱之前一般要经过预处理,预处理不好则会使大孔树脂吸附的杂质过多,从而降低其对有效成分的吸附。洗脱液的流速、树脂的粒径、树脂柱的高度也会产生一些影响,通常较高的洗脱液流速、较小的树脂粒径和较低的树脂高度有利于增大吸附速度,但同时也使单柱的吸附量有所降低。玻璃柱的粗细也会影响分离效果,当柱子太细,洗脱时树脂易结块,壁上易产生气泡,流速会逐渐降为零。

3.9.5 大孔吸附树脂在天然产物分离中的作用

3.9.5.1 生物碱类

大孔吸附树脂易于吸附水溶性成分。任海或在提取和分离麻黄碱时发现,应用大孔吸附树脂直接用于麻黄草提取液的麻黄碱分离提取,可以获得较高的回收率。

刘韶等研究大孔树脂分离和纯化两面针中总生物碱的工艺条件。以总生物碱的吸附量和解吸率为考察指标,对8种不同类型的树脂进行评价。结果XDA-5型大孔吸附树脂对两面针中总生物碱具有较好的分离能力。通过大孔树脂分离纯化后,终产品中总生物碱的纯度为33.25%,保留率达到90.15%。

3.9.5.2 黄酮类

薛淑萍等以桑叶中总黄酮吸附量、解吸附量和解吸率为指标,选择D-101、ADS-7、ADS-17三种的大孔吸附树脂,研究提取分离桑叶总黄酮的工艺条件。在实验条件下,D-101型树脂提取桑叶总黄酮的含量可接近40%,而且所得产品纯度较高。

张国梅研究了大孔吸附树脂纯化山楂总黄酮的工艺可行性:以山楂总黄酮含量、浸膏得率为指标,对大孔树脂型号、上样量、水洗量、洗脱剂浓度及洗脱剂用量等5个因素进行了考察。最后选择D301大孔树脂,先以25倍上样量的水洗脱杂质,继以20倍量的50%乙醇洗脱,山楂总黄酮转移率可接近90%。

3.9.5.3 皂苷类

皂苷类化合物水溶性大,特别适合大孔吸附树脂的提取分离。

张卫军等考察5种不同型号树脂对苦瓜皂苷静态吸附和解吸的性能试验,筛选出一种对苦瓜皂苷吸附和解吸均有较好效果的树脂,即AB-8型大孔吸附树脂。动态吸附和解吸试验表明,AB-8型树脂对苦瓜皂苷的动态饱和吸附量为69.21 mg/g,动态解吸率为90.7%,对洗脱液进行收集浓缩,冷冻干燥得苦瓜皂苷粗品,总皂苷

含量为 63.2%。

古燕翔等以对苜蓿皂苷的吸附量和解吸率为指标筛选大孔吸附树脂。研究表明, X-5 吸附树脂具有较好的吸附性能和解吸效果。进一步对大孔吸附树脂分离纯化苜蓿皂苷的工艺条件进行试验分析, 确定苜蓿皂苷分离富集的最佳操作条件为: 上样浓度 8 mg/ml, 色谱柱的径高比 1:7, 药材: 树脂比例为 1:3; 吸附完全后, 先以水洗脱, 除去杂质, 再以 50% 乙醇洗脱, 可以得到纯度较好的苜蓿皂苷。

3.9.5.4 其他类

周永刚等采用 SIP1905 型大孔树脂分离丹参中的丹酚酸, 用毛细管电泳法测定含量, 确定最佳的工艺条件。结果表明, 丹酚酸 B 的吸附容量为 8.72 mg/g, 洗脱液为 4 倍量 20% 的乙醇, 洗脱率为 96.28%。另外, 大孔树脂还用来纯化大黄总蒽醌、赤芍总苷、白芍总苷、茶多酚等, 均取得了较满意的效果。

近年来大孔树脂作为一种有效的分离纯化手段, 在中药有效成分的提取分离上得到运用, 并取得了良好的效果。但大孔树脂吸附纯化理论尚在争论中, 不少应用规律仍未完全清楚。随着有关基础研究的深入, 应用范围的扩大以及相关标准、法规的不断完善, 该技术必将在中药研究方面发挥重要作用。

除上述新技术外, 还有超微粉碎技术、固相微萃取技术等新的提取技术。研究表明, 这些新技术能极大提高中草药化学成分的收率与质量, 节约大量的时间和能源, 在中药提取分离方面具有广泛的应用前景。但从目前研究来看, 这些技术还存在着不同层次的局限性, 特别是现在多为实验室研究阶段。如何应用到生产中, 需要解决的技术问题还很多, 需要研究单位和企业联手, 解决生产中遇到的问题, 相信随着这些新技术在中药提取领域中的应用进一步完善, 中药这一传统产业一定会焕发出新的光彩。

参考文献

- [1] 倪志伟, 李军玲. 超临界 CO₂ 萃取在天然产物提取中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(14): 5715-5716.
- [2] 周雪晴, 冯玉红, 张冲, 等. 超临界 CO₂ 萃取结合柱色谱分离罗芙木生物碱[J]. 精细化工, 2007, 24(2): 154-155.
- [3] Brachet A, Mateus L, Cherkaoui S. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of atropine alkaloids in plant extracts[J]. Analysis, 1999, 27(9): 772-778.
- [4] 梁瑞红, 谢明勇, 施玉峰. 紫草色素超临界萃取与有机溶剂萃取之比较[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 130-132.
- [5] 未作君, 林立, 倪晋仁, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取大黄游离蒽醌的研究[J]. 高等学校化学工程学报, 2006, 20(2): 197-202.

- [6] 何扩,李玉峰,张秀媛,等.超临界流体萃取银杏叶黄酮类物质的研究[J].山西食品工业,2005(4):2-5.
- [7] 张富昌,苏建玲,刘力,等.超临界耦合常规溶剂法提取新疆雪莲中的总黄酮[J].中药材,2007,30(11):1456-1458.
- [8] Shu X S, Gao Z H, Yang X L. Supercritical fluid extraction of saponins from tubers of *Smilax china*[J]. *Fitoterapia*, 2004, 75: 656-661.
- [9] 吕晓玲,李肇奖. CO₂ 超临界萃取油茶皂苷的研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(1):23-26.
- [10] 罗金岳,王贝.超临界 CO₂ 提取野菊花中的精油[J]. 生物质化学工程,2007,41(6):11-14.
- [11] Mare E M B, Polyana A D E E, Ming L C, et al. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: Global yields, kinetic data, and extract chemical composition[J]. *J Supercrit Fluids*, 2005, 34(2): 149-156.
- [12] 肖蕾,胡松青,李琳.中药有效成分提取分离技术研究进展[J]. 中药材,2002,25(11):826-828.
- [13] Ganzler K, Salgó A A, Valkó K K. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1986(371): 299-306.
- [14] 胡瑞君,车振明,徐丹,等.微波辅助提取桑叶生物碱 DNJ 的工艺研究[J]. 食品科技,2007,8:139-141.
- [15] Zhang F, Chen B, Xiao S, et al. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br [J]. *Separation and Purification Technology*, 2005, 42(3): 283-290.
- [16] Brachet A, Christen P, Veuthey J L. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves[J]. *Phytochem Ana*, 2002, 13(3): 162-169.
- [17] 邓佳,刘学文.微波法提取决明子中蒽醌工艺条件的优化研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(9):35-38.
- [18] 胡秀丽,刘忠英,邓新煜,等.密闭微波辅助萃取大黄蒽醌类有效成分的研究[J]. 东北师大学报:自然科学版,2007,39(4):106-109.
- [19] 甄云鹏,范必威,周莉.微波萃取苦荞壳中总黄酮工艺研究[J]. 2007,19(B05):119-123.
- [20] 秦大伟,李树英,孟霞,等.微波预处理提取嘉菊总黄酮的工艺研究[J]. 中成药,2008,30(6):845-848.
- [21] 高虹,黎碧娜,郑鹏,等.微波联合树脂提取地榆中皂苷化合物的研究[J]. 中药材,2007,30(7):868-870.
- [22] Kwon J H, Jacqueline M R. Application of the microwave-assisted process (MA P-(TM)) to the fast extraction of ginseng saponins [J]. *Food research interna*. 2003, 36(5): 491-498.
- [23] 黄琨,黄少伟,池汝安.微波辅助提取葛根多糖工艺研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2008,17(2):1-3.

- [24] Lundqvist J, Telemann A, Junell L, et al. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 48: 29-39.
- [25] Armstrong B F, Neas E D. Development of a microwave distillation system for the analytical laboratory[J]. Separation Science and Technology, 1990, 25(13-15): 2007-2016.
- [26] 黄东亮, 黄小玲. 超声波提取颠茄草有效成分莨菪碱的技术[J]. 中国药业, 2002, 11(10): 58-59.
- [27] Zuo Y G, Zhang L L, Wu J P, et al. Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 526: 35-39.
- [28] 张海晖, 裘爱泳, 刘军海, 等. 超声技术提取大黄蒽醌类成分[J]. 中成药, 2005, 27(9): 1075-1078.
- [29] 杨黎燕, 赵新法. 超声波提取决明子蒽醌成分的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 1726-1727.
- [30] 梁惠花, 刘晓河, 王志宝. 坝目油菜蜂花粉中总黄酮的超声提取及含量测定[J]. 张家口医学院学报, 2003, 20(4): 8-10.
- [31] 郭孝武. 超声提取杜仲叶中黄酮类物质工艺研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2005, 33(4): 59-61.
- [32] Wu Y J, Lin L D g, Chau F T. Ultrasound assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8(3): 347-352.
- [33] 贲永光, 丘泰球, 李金华. 双频超声强化对三七总皂苷提取的影响[J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2007, 28(1): 12-16.
- [34] 姜华, 蔡德华, 姜晓萍. 超声波强化提取黑鲍菇粗多糖工艺优化[J]. 化学与生物工程, 2008, 25(6): 72-73.
- [35] Hromdkova Z, Ebringerova A. Ultrasonic extraction of plant materials-investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2003, 10(3): 127-133.
- [36] 梅清华, 励石寒, 郑艳平等. 超声波对杏仁中挥发性成分的提取研究[J]. 广东药学, 2005, 15(2): 44-45.
- [37] Athanasios C, Kimbaris N G, Siatis D J. Daferera, et al. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*) [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13: 54-60.
- [38] 刘红梅. 分子蒸馏技术在天然产物分离与提纯方面的应用[J]. 河南化工, 2003, 4: 10-12.
- [39] 杨西岳. 分子蒸馏技术及其在天然产物分离工程中的应用[J]. 天然产物分离, 2004, 4(4): 8-10.
- [40] 胡海燕, 彭劲甫, 黄世亮, 等. 分子蒸馏技术用于广藿香油纯化工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 320-322.
- [41] 王发松, 黄世亮. 姜油的分子蒸馏与化学成分分析[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(3):

- 125-127.
- [42] 吕宏凌,王保国. 微滤、超滤分离技术在中药提取及纯化中的应用进展[J]. 化工进展, 2005, 24(1):5-7.
- [43] 高红宁,郭立玮,金万勤,等. 陶瓷微膜技术澄清苦参水提液的研究[J]. 水处理技术, 2002, 28(2):108-109.
- [44] 李媛媛,高彦祥. 膜分离技术纯化栀子黄色素的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(6):113-117.
- [45] 顾春雷,于奕峰. 膜法分离纯化葛根素的实验研究[J]. 河北科技大学学报, 2007, 28(2): 108-109.
- [46] Tukeo K, Mitsutoshi N, Hiroshi N, et al. Availability of membran technology for purifying and concentrating oligoscharides[J]. Europen Food Research and Technology, 2002, 214(5): 435-475.
- [47] 王士勇,都丽红,许莉. 纳滤分离技术在银杏叶提取物生产中的试验研究[J]. 化工装备技术, 2008, 29(3):15-18.
- [48] 蒋宁,胡东帆. 用乳状液膜法从植物从浸液中提取生物碱的实验研究[J]. 吉林中医药, 1991(3):39-40.
- [49] 梁锋,张成功,马铭,等. 乳状液膜分离提取荷叶中 3 种生物碱[J]. 精细化工, 2007, 24(6): 565-570.
- [50] 肖文军,刘仲华,龚志华,等. 膜技术分离七叶参皂甙研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 52-56.
- [51] 董艳,高瑞昶,潘勤,等. 超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究[J]. 中草药, 2008, 39(3):3:359-363.
- [52] 白兰莉,蒋柏泉,肖正强,等. 膜分离技术在天然产物有效分离中的应用[J]. 江西化工, 2004, 4:4-6.
- [53] Ito Y, Sandlin J, Bowers W G. High—speed preparative countercurrent chromatography with a coil phanet centrityge[J]. J Chromatogria, 1982, 244(2): 247-258.
- [54] Fuquan Y, Ho Y. Preparative separation of lappaconitine, ranaconitine, N-deacetylappaconitine and N-deacetylranaconitine from crude alkaloids of sample *Aconitum sinomontanum* Nakai by high-speed counter-current chromatograp[J]. J Chromatographyia, 2002, 943(2): 219-225.
- [55] 褚建军,颜继忠. 制备型高速逆流色谱分离中药中的生物碱[J]. 浙江工业大学学报, 2006, 34(1):59-61.
- [56] Du Q Z, Xia M, Ito Y. Purification of ieariin from the extract of *Epimedium segittatum* using high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr, 2002, 962(1-2): 239-241.
- [57] Li H B, Chen F. Isolation and purification of baicalein, wogonin and omxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baiealensis* by high-speed counter-current chinmatography[J]. J Chromatogr. A, 2005, 1074(1-2): 107-110.
- [58] Tian G L, Yzhang T, Zhang Y B, et al. Separation of tanshinones from *Salvia mihiorrhiza*

- Bunge by multidimensional counter-current chromatography [J]. J Chromatography, 2002, 945: 281-285.
- [59] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography, 2005, 1065(2): 145-168.
- [60] Du Q Z, Jerz G, Winterhalter P, et al. Separation of andrographolide and neoandrographolide from the leaves of *Andrographis paniculata* using high-speed counter-current Chromatography [J]. J Chromatography, 2003, 984(1): 147-151.
- [61] Ma X F, Tu P F, Chen Y J, et al. Preparative isolation and purification of isoflavan and pterocarpan glycosides from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography, 2004, 1023(2): 311-315.
- [62] Zhou T T, Fan G R, Hung Z Y, et al. Large scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatography, 2005, 1100(1): 76-80.
- [63] Andreas D H, Flabben S, Winterhalter P. Isolation of the lignan secoisolarictrigenin diglucoside from flax (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography, 2002, 943(2): 299-302.
- [64] Wei Y, Zhang T Y, Ho Y C. Preparative isolation of osthol and xanthoxol from *Commersonia* Fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatography, 2004, 1033(2): 373-377.
- [65] 任海或. 大孔吸附树脂分离提取麻黄碱的研究[J]. 离子交换与吸附, 2002, 18(2): 97.
- [66] 刘韶, 章伟, 雷鹏, 等. 大孔吸附树脂纯化两面针总生物碱[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 377-379.
- [67] 薛淑萍, 张立伟. 大孔吸附树脂提取分离桑叶总黄酮的条件优化[J]. 山西中医学院学报, 2006, 7(1): 51-53.
- [68] 张国梅. 大孔吸附树脂纯化山楂总黄酮的研究[J]. 中药材, 2008, 31(4): 607-609.
- [69] 张卫军, 刘金福, 张平平, 等. 大孔吸附树脂对苦瓜皂甙吸附特性的研究[J]. 食品研究与开发, 2008(2): 5-8.
- [70] 古燕翔, 张国良, 魏芸, 等. 大孔吸附树脂分离富集苜蓿皂甙的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(3): 504-507.
- [71] 董珂. 大孔树脂技术在中药研究中的应用概况[J]. 药学实践杂志, 2006, 24(1): 13-15.
- [72] Lucchesi, Marie E, Chemat, et al. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation[J]. J Chromatography A, 2004, 1043(2): 323-327.

第4章 多糖及降血糖作用

多糖又称多聚糖(polysaccharide),是由醛糖或酮糖通过脱水形成糖苷键,并以糖苷键线性或分枝连接而成的链状聚合物。一般聚合度大于10,相对分子质量为数万至数百万。多糖是构成生命活动的四大基本物质之一,广泛存在于生物体中,与生命的多种生理功能密切相关。

多糖广泛分布于动物、植物及微生物中,目前已发现的活性多糖有几百种,按来源不同,多糖可分为真菌多糖、高等植物多糖、藻类地衣多糖、动物多糖、细菌多糖五大类,许多研究表明,多糖具有降血糖活性作用。

4.1 多糖的提取

多糖是极性大分子化合物,易溶于水,不溶于乙醇,常用的提取方法有热水浸提法、稀碱液浸提法、稀酸液浸提法、超声抽提法、酶提法,以及超临界流体萃取法等。

4.1.1 溶剂提取法

水提醇沉法目前在植物活性多糖提取中应用最多。多糖常与其他分子共存于植物中,可利用多糖不溶于有机溶剂的性质在提取液中加入乙醇等使多糖从提取液中沉淀出来,达到初步分离纯化的目的。用苯酚替代乙醇,可避免醇沉提取对多糖理化性质的影响;另外,温和提取方式也能取得理想效果。

研究发现影响水提醇沉法物料中有效成分提取的因素主要有固液比、提取温度、提取时间、提取液 pH 值、离子种类及浓度等,因此可通过优化工艺条件来提高多糖的提取率。

康琰琰等在中性水溶液中,确定的昆布多糖最佳水浸提工艺条件为料液比 1:60、90℃、浸提 4 h,多糖得率达 18.31%。还有研究者根据多糖的结构不同,考虑在水提取液中加碱来提取含有糖醛酸的多糖。

以多糖提取率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计对仙鹤草多糖的提取工艺条件进行优化,实验结果表明,仙鹤草多糖的最佳提取工艺为:浸提温度为 80℃,浸提时间 12 h,料液比 1:15,在此条件下仙鹤草多糖提取率为 2.5%,浸提温度是影响得率的主要因素。

4.1.2 微波提取法

微波加热是靠微波电子管发出的电磁波,感应生电又转化成分子的动能而发热,具有快速、高效、安全的特点;其次微波的频率很高,能透入物体的深度较深,对细胞的结构有较大作用。

王莉等利用连续微波反应器,用石油醚、乙醚除去药材中的脂溶性杂质,用80%乙醇除去所含单糖、低聚糖及苷等干扰性成分后,再运用微波技术用水提醇沉法分别制得板蓝根多糖和甘草多糖,并用苯酚-硫酸比色法对其多糖含量进行测定,得率均较传统方法提取明显提高,反应时间缩短12倍。

聂金媛等人将微波辅助提取新技术应用于茯苓水溶性多糖的提取过程,在微波占空比42%,时间18 min,固液比1:50时提取率为2.792%。微波辅助提取法与其他方法对比,与传统回流法中提取相比,时间大大缩短,提取率是传统法的两倍;与超声提取相比,只用不到一半的时间,提取率提高63.5%。另外,与酶法相比,提取时间明显缩短,提取率也略高。微波法不论在节能、高效,还是在操作方面都具有优越性。

4.1.3 超声波提取法

研究者采用超声波辅助提取多糖,超声波技术作用于植物细胞破壁,大大地加快了反应速度,有效提高收率。Kobayashi等试验结果显示,与酸提醇沉法相比,超声波法的海带多糖粗提物提取率虽然只高出5%,但提出物中的多糖含量增加了42%,大分子杂质由1.92%减少到0.97%。

韩兵兵等通过单因素法对超声波法提取大枣多糖的实验条件进行优化,并与常规的水浴提取法做了比较。结果显示,超声波法提取具有高效、节能、省时的特点。

超声波可能会导致可溶性多糖发生降解,并溶解在乙醇溶液中,这些是超声波的不足之处。然而,超声波并不影响水溶性多糖的生物性能,因此,超声波辅助提取法是一种高效实用的多糖提取方法。

4.1.4 酶法提取

在多糖提取过程中,细胞原生质体中的有效成分向提取介质扩散时,必须克服细胞壁及细胞间质的双重阻力。通过选用一些恰当的酶类,如纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等作用于药用植物细胞,使细胞壁及细胞间质中的纤维素、半纤维素、果胶等物质降解,破坏细胞壁的致密结构,引起细胞壁及细胞间质结构产生局部疏松、膨胀、崩溃等变化,减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对有效成分从胞内向提取介质扩散的传质阻力,从传质角度促使有效成分提取率提高。

酶法提取过程一般分成 2 个步骤,一是酶解处理,用酶降解细胞壁和胞间连接物;二是提取有效成分,然后通过提高温度使酶失活,再用溶剂浸提有效成分。

孙兴权等采用酶制剂(胰匀浆)提取林蛙多糖(TCPS),通过正交试验确定了提取林蛙多糖(TCPS)的适宜条件为:酶制剂用量 20%,pH9.0,水解温度 50℃,水解时间 6 h。最后,TCPS 粗提物的产率按鲜组织计算达 1.4%,高于其他条件的 2~3 倍。

傅博强等为了保持茶多糖的活性,采用低温水提、酶提二次结合法提取茶多糖,酶提最佳工艺参数为 55℃、茶叶与水的质量比为 1:14、纤维素酶用量 2.2 L/g(以茶叶质量计),反应时间为 120 min,相对水提法,酶法的多糖提取率增加了 63.3%。

4.1.5 超临界提取法

利用超临界流体从液体或固体中萃取糖及苷类化合物时,用纯 CO₂ 提取糖及苷类化合物的产率低,这是因为这类化合物相对分子质量较大、羟基多、极性大,如加入携带剂和加大压力则可提高产率。

廖周坤等用 SEF-CO₂ 萃取装置试验从藏药雪灵芝中萃取总皂苷粗品及多糖,确定最佳多糖萃取条件为:10 MPa、45℃、6.4 h,其中加不同极性夹带剂的梯度 SFE 萃取法与传统溶剂萃取工艺相比,多糖收率可以提高至 1.62 倍。

盛桂华等以瓜蒌为实验材料,以瓜蒌多糖得率为评价指标,通过“四因素、三水平”的响应曲面实验设计,对超临界 CO₂ 萃取瓜蒌多糖最佳条件进行确定。结果最佳提取条件为:萃取压力 20.1 MPa,萃取温度 55.2℃,携带剂乙醇浓度 50.2%,携带剂用量 12.0 ml/100 g,此条件下瓜蒌多糖得率为 0.95%,与模型拟合良好。

4.1.6 高速逆流色谱提取法

高速逆流色谱可以从复杂的天然粗制品中提取不同特性的有效成分,为天然药物的发展提供了有利条件。但高速逆流色谱分离大分子天然产物时,基本局限于有机相和/或水相溶剂体系,有机溶剂通常不能溶解生物大分子或使生物大分子发生不可逆的结构和性质改变,因此需要将双水相体系引入逆流色谱分离。

杜琪珍等用双水相系统在高速逆流色谱仪和低速逆流色谱仪上实现了香菇多糖的分离,已从香菇多糖粗提物中分离出相对分子质量为 91000 和 293000 的高度均一多糖。

4.2 多糖的纯化

多糖的纯化是获得粗的活性多糖提取液后,除去共存杂质,进行混合糖的相互分离,随糖类组分的复杂性不同而有所区别。一般分为两个过程:多糖除杂、多糖分离。

4.2.1 多糖除杂

4.2.1.1 色素的脱除

植物多糖提取物中含有酚类化合物而使其颜色较深,可用吸附剂(纤维素、硅藻土、活性炭等)、离子交换柱(DEAE-纤维素)、氧化剂(H_2O_2)等脱除。活性炭比表面积大,吸附能力强,只需向多糖液中加入 0.1%~0.3% 活性炭,吸附后滤过,即完成脱色操作。此法成本低廉,适合工业化生产。DEAE-纤维素是目前实验室常用的方法,多糖液上离子交换柱后,分别用蒸馏水和碱溶液洗脱,分步收集,不仅达到脱色的目的,还可得水洗馏分中性多糖和碱洗馏分酸性多糖。阴阳离子混合树脂和大孔吸附树脂也应用于多糖的脱色中。

陈存武采用颗粒活性炭为脱色剂,研究了脱色时间、脱色温度、活性炭用量等因素对黄精多糖提取液的脱色率以及多糖保留率的影响,并用正交实验探究其最佳脱色条件。结果表明:用 2% 活性炭,在 50℃ 时脱色 40 min 的效果好,是最佳脱色条件。

夏玮考察了 5 种不同型号大孔吸附树脂对桑叶粗多糖溶液的脱色作用,较为系统地研究了吸附工艺条件对树脂脱色能力的影响。结果表明:AB-8 树脂具有较好的脱色效果,以 4.6 BV/h (1 BV=8 ml) 的流速对 3% 粗多糖溶液进行吸附脱色时,处理量 5 BV (树脂床体积),脱色率可达 82%,多糖回收率达到 83%;并对树脂的再生性能进行了评价。脱色前后桑叶粗多糖的高效凝胶过滤色谱表明 AB-8 树脂可能对不同相对分子质量范围的多糖都有一定的吸附作用。

采用过氧化氢和次氯酸钠两种脱色方法对 100 mg 枸杞多糖进行脱色。结果表明,采用过氧化氢进行脱色,在温度为 90℃,pH9,过氧化氢添加量为 6.00 ml 条件下,脱色时间为 8 min,多糖含量为 30.48%;采用次氯酸钠进行脱色,在温度为 35℃,盐酸加入量为 0.50 ml,次氯酸钠的添加量为 2.00 ml 条件下,脱色时间为 1 min,多糖含量为 32.16%。次氯酸钠脱色效果优于过氧化氢脱色。

4.2.1.2 多糖中小分子杂质的脱除

小分子杂质如低聚寡糖的残留往往影响多糖的生物活性,需要进一步脱除,提高纯度。对于多糖可选用截流相对分子质量 5 000~10 000 的透析膜,通过逆向流水透析除去小分子杂质。使用时,透析袋要留一半以上的空间,以防透析袋胀破。另外,透析操作周期长,往往需要 2~3 d,常温操作有可能造成多糖的霉变,必要时可加入少量防腐剂或在低温条件下进行。透析法简单易行,技术成熟,但是透析除杂的效率不高。膜分离技术发展很快,选择适宜孔径的膜可有效去除小分子杂质,缩短生产周期,因此研究使用膜分离技术无疑是多糖脱除杂质的一条新途径。

4.2.1.3 去蛋白

多糖的去蛋白方法主要有:Sevag 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法和酶解法。微生物多糖去蛋白常采用 Sevag 法、三氟三氯乙烷法;植物多糖去蛋白常用三氯乙酸法,也可以用蛋白质水解酶使样品中的蛋白质部分降解后,再用 Sevag 法效果会更好。

毛英丽等比较了 Sevag 法、酶解法、酶解法与 Sevag 法结合 3 种方法在葡萄多糖脱蛋白中的应用,3 种方法经脱蛋白处理后,都会存在一定的蛋白质,这是因为葡萄多糖本身就含有糖蛋白缀合物。其中采用酶解法与 Sevag 法结合的方法蛋白脱除率最高,多糖损失率较低,且操作条件温和、利于保持多糖活性、避免过多使用有机溶剂,适合葡萄多糖中游离蛋白的脱除。其最佳处理条件为酶用量 0.14%、pH6.5,处理温度 60℃,处理时间为 2 h,Sevag 法脱蛋白 4 次。经过最佳条件脱蛋白,蛋白脱除率为 72.14%,多糖损失率为 10.91%。

4.2.2 多糖分离

主要有透析法、金属盐沉淀法和制备性区域电泳等,目前大多采用 DEAE-凝胶或其他各种不同类型的凝胶柱层析以及离子交换色谱法。

4.2.2.1 分级沉淀

不同多糖在不同浓度的低级醇或酮中具有不同溶解度,按比例由小到大加入这些醇或酮(常用的是甲醇、乙醇和丙酮)分部沉淀。

4.2.2.2 季铵盐沉淀法

长链季铵盐能与酸性多糖成盐形成水不溶性化合物,可分离酸性及中性多糖。常用的季铵盐是十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)及其碱(CTA—OH)和十六烷基吡啶(CPC),实验时必须严格控制多糖混合物的 pH 值小于 8 及无硼砂存在,否则中性多糖也会沉淀出来,一般地说,酸性强或相对分子质量大的酸性多糖首先沉淀出来。

4.2.2.3 色谱分离

1) 凝胶色谱

凝胶柱层析是根据多糖分子的大小和形状不同进行分离。常用的凝胶有葡聚糖凝胶(Sephadex)及琼脂糖凝胶(Sepharose)。

魏江洲等用热水抽提法提取海螺蛸多糖粗品,用 DEAE-Sepharose F. F 柱及 Sepharose CL-6B 柱对海螺蛸多糖粗品进行分离,最后使用 Sephacryl S-300 柱进一步纯化,最后得到相对均一的多糖 CPS-1。

李雪华利用热水提取,乙醇沉淀提取荔枝多糖,荔枝多糖经分离提取、除蛋白、去色素及纯化和用 Sephadex G-25 层析柱进行分级后,得到多糖 A1 和 A2 两部分。

经测定其含量 A1 为 13.5%, 得率为 0.726%, A2 含量为 17.8%, 得率为 0.957%。

2) 离子交换色谱法

通过载体表面带电基团与样品离子和淋洗离子进行可逆交换、离子偶极作用和离子吸附实现色谱分离。不同多糖尤其是多糖与蛋白质结合在一起的复合多糖,在一定 pH 条件下,所带电荷不同,则可根据各多糖上电荷的差异而达分离目的。

阴离子交换柱层析法是目前在多糖纯化中应用最普遍的一种方法,特别是对于体积较大的多糖溶液,大多数首先采用阴离子交换柱层析。通过柱层析,多糖溶液得到浓缩及初步纯化(有的多糖通过该步骤即可得到各种均一多糖组分)。至今应用的阴离子交换剂有二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-cellulose),DEAE-葡聚糖(DEAE-Sephadex)及 DEAE-琼脂糖(DEAE-Sephadex)3 种,其中以 DEAE-cellulose 应用得最为广泛。

夏玮等对桑叶水提取的粗多糖在离子交换纤维素上的吸附量进行了考察,然后利用离子交换纤维素柱层析将粗多糖分为 4 个电荷性质不同的亚组分 SD0、SD0.1、SD0.2、SD0.3。通过桑叶粗多糖在离子交换纤维素的吸附解吸行为可知,桑叶多糖主要以酸性多糖的形式存在。

4.2.2.4 膜分离

1) 超滤

不同的超滤膜具有允许不同相对分子质量和形状的物质通过的性质,多糖溶液通过各种已知的超滤膜能达到分离。

超滤膜技术已广泛应用于各类多糖的分离、浓缩、纯化等研究中,包括中药药源多糖如灵芝多糖、大黄多糖、六味地黄汤多糖、黄芪多糖、紫芝多糖、人参多糖;海洋活性多糖如鲨鱼软骨粘多糖、褶纹冠蚌多糖、紫菜多糖、褐藻糖胶、卡拉胶;发酵多糖如蜜环菌菌索多糖;PS-9415 发酵液多糖、冬虫夏草多糖;食用植物多糖如茶多糖、香菇多糖、金针菇多糖、芦荟多糖、枸杞多糖等。采用超滤膜技术处理多糖具有收率高、不易破坏多糖的生物活性、能耗低等特点,适于工业化生产。

李树珍等采用截留相对分子质量 60 000 的聚砜中空纤维超滤膜超滤黄芪水溶液。超滤法比传统的水煮醇沉法所得多糖含量高 20% 左右,可以降低口服给药剂量。韩鲁佳等将超滤法(膜截留相对分子质量为 6 000)与树脂吸附法相结合,同时得到高含量的多糖和皂苷产品。

2) 微滤

微滤能有效去除比膜孔大的微粒和微生物,具有能耗低、无二次污染、分离效率高等特点,在多糖提取中可用于多糖液体的澄清和多糖精制。

韩永萍等就无机陶瓷微滤膜处理虫草粗多糖溶液过程中膜污染和操作条件进行了研究,确定有效清洗方法和操作工艺条件,为膜法纯化虫草菌丝体粗多糖的应

用奠定基础。结果表明,采用 80℃ 热水与 1% NaOH 溶液交替清洗并伴有间歇、短时反冲洗,可使膜的清水通量恢复率达到 95%。此外,在试验确定的 60℃, 0.3~0.4 MPa 压差操作条件下处理虫草粗多糖溶液,多糖收率在 70% 以上,同时可除去大部分不溶固形物和蛋白质胶体等大分子有机物杂质。

4.3 多糖的纯度鉴定

对分离纯化的多糖需要进行纯度鉴定,常用的纯度鉴定方法有 4 种:超离心、高压电泳、凝胶层析和高效液相色谱(HPLC),现在应用较多的是 HPLC 法。也有人将旋光测定作为一种纯度测定标准。

多糖纯度不能用通常化合物的纯度标准来衡量,最好的纯度标准是建立多项指标,每一项指标测定一种不同的特性。一般要有 3 种以上方法测定的结果,才能对某一多糖的均一性做出结论。

如李小定等人分别采用了纸层析、Sephadex G-200 凝胶柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法对经纯化得到的 4 种灰树花多糖级分进行纯度鉴定,结果显示 4 种多糖级分经纸层析鉴定均为单一斑点,经 Sephadex G-200 凝胶柱层析法鉴定均为单一对称峰,经聚丙烯酰胺凝胶电泳显示为单一谱带,表明 4 种级分为均一多糖。

4.4 多糖的结构分析

多糖的结构研究是多糖化学研究的关键。而多糖的化学研究首先是提取、分离、纯化以获得不同的多糖组分,经纯度鉴定证明为均一性多糖后,进行各组分的理化特性如溶解度、旋光度、黏度、相对分子质量的测定,然后进行平面和立体的化学研究以及结构改造和修饰。

多糖的结构分为初级结构和高级结构,共四级:一级结构为初级结构,二、三、四级结构为高级结构。多糖的一级结构是指糖基的组成,糖基排列顺序,相邻糖基的连接方式,异头碳构型以及糖链有无分支,分支的位置与长短等。多糖的二级结构是指多糖主链间以氢键为主要次级键而形成的有规则的构象。多糖的三级结构和四级结构是指以二级结构为基础,由于糖单位之间的非共价相互作用,导致二级结构在有序的空间里产生的有规则的构象。由于组成单糖种类与数目等的不同,糖的结构十分复杂。要完全阐明一个糖的结构,一般需要提供以下几方面的信息:①相对分子质量及组成单糖的种类与物质的量比;②各糖环的构象(呋喃型或吡喃型)与异头碳的构型;③各糖残基间的连接方式,糖残基的连接顺序;④二级结构及空间构象等。

4.4.1 一级结构的研究方法

多糖一级结构的研究方法有很多,目前多集中为化学分析方法、仪器(物理)分析方法、生物学分析方法等。但是由于多糖结构的复杂性,决定了任何一种单一的方法都不可能确定多糖的结构,需要多种方法联合使用。

4.4.1.1 经典化学分析方法

1) 甲基化反应

甲基化分析一般是将糖所有自由羟基全部反应生产甲醚,然后水解释放出甲基化单糖,再经 NaBH_4 还原成糖醇,进而乙酰化水解生成的羟基,得到甲基化的糖醇乙酰衍生物,经气相色谱法(GC)或者 HPLC 分析,确定组成糖链的各单糖种类和比例,各单糖的连接位置,即糖苷键的位置。

2) 高碘酸氧化

高碘酸可以选择性地断裂糖分子中连二羟基或连三羟基,生成相应的多糖醛、甲醛或甲酸。反应定量进行,每开裂一个 C—C 键消耗一分子高碘酸。通过测定高碘酸消耗量及甲酸的释放量,可以判断糖苷键的键型和比例。

3) Smith 降解

Smith 降解是将高碘酸氧化产物还原成稳定的多羟基化合物后,进行部分酸水解,用 GC 或 HPLC 鉴定水解产物,由水解的产物可以推断多糖中单糖的连接顺序和键型。

4) 酸水解

酸水解可鉴别多糖中单糖组分。

4.4.1.2 仪器分析方法

1) 紫外光谱(UV)

在 260~280 nm 处用于检测多糖中是否含有蛋白质、核酸、多肽类。

2) 红外光谱(IR)

IR 可帮助识别吡喃糖和呋喃糖、帮助确定糖苷键类型、糖的构型以及多糖链上羟基的取代情况等信息。

3) 核磁共振波谱

用核磁共振波谱技术来研究糖链结构的一大特点就是不破坏样品。目前用于确定多糖结构半糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目。一般用 ^1H NMR 图测定简单多糖, ^{13}C NMR 测定复杂的多糖,因为后者的化学位移较宽些。

4) 高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC)

高效液相色谱在糖类分析中主要是用于常量和微量的单糖和寡糖的分离,及多糖相对分子质量测定。GC 法分析多糖受到样品挥发性和热稳定性的限制,样品

多需衍生化,而 HPLC 则可以直接进样,因此常用 GC 与 HPLC 结合来分析多糖水解后单糖的组成及比例。

5) 质谱法(MS)

利用质谱法研究糖类可得到糖链序列连接和结构鉴定方面的重要信息。包括场致电离、场解析电离、化学解析或称直接化学电离、快速原子轰击法以及电喷雾电离质谱和基质辅助的激光解析质谱。其中快速轰击质谱分析法(FAB-MS),对于热不稳定或难挥发化合物可给出强的准分子离子而推测其相对分子质量,测定范围可以达到聚合度高于 30 的糖相对分子质量。同时在快速原子轰击(FAB)谱中,强度大的碎片离子往往是糖链断裂后的各残基离子,因此,还可以对糖链进行序列分析。

6) 电泳技术

毛细管电泳(CE)技术不仅可以测定多糖的相对分子质量,还可用于寡糖的组成分析、纯度鉴定和结构归属,并对寡糖的酶解产物进行定性和定量分析,从而得到寡糖链的完整结构。但因绝大多数糖类化合物不带电荷,极性很大,而且没有发色基团或荧光基团,需先进行衍生化、与硼酸盐配合、电离或加入表面活性剂等技术处理。

荧光基团标记的糖的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGEFS)技术是一种糖结构分析的简便方法,它是通过对糖类分子的还原端羰基进行荧光基团衍生化标记后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,这既增强了糖分子的检测灵敏度,又使通常呈中性的糖类分子带上电荷在电泳系统中进行分离,可以对多个样品平行地进行分离和定性分析。

十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳-聚偏氟乙烯薄膜电迁移技术(SDS-PAGE-PVDF)是最新发展起来的一种专门用于糖蛋白分离的技术,该技术将电泳凝胶上的糖蛋白基本上定量地转移到聚偏氟乙烯(PVDF)薄膜上,在此膜上可以直接进行酸水解,然后分析其氨基酸和糖基组成;也可在此膜上进行溴化氢降解,各种蛋白酶、糖肽酶和糖苷酶的水解,以及将 PVDF 膜直接置于蛋白质 GC 序列仪或 MS 上进行序列分析,从而获得 pmol 级糖蛋白的肽链和糖链顺序以及糖肽连接方式。

4.4.1.3 生物学法

主要是酶解法,此外还有免疫学法。酶解的方法主要用来分析糖肽连接方式。Edge 等人将酶解方法的操作简化为只要将纯化的多糖样品等分为几个试样,再将每个试样与某种精确设定的外切糖苷酶混合物保温酶解,合并每次酶水解的产物,再对产物库进行一次凝胶渗透色谱分离。再把分离图谱与计算机数据库中的图谱进行对照即可确定结构。

抗原和抗体会相互结合,一定结构的多糖(寡糖)会抑制抗原-抗体的相互结

合,不同的糖(半抗原)有不同的抑制常数。当某种未知结构的糖链对抗原和抗体的结合产生了抑制,通过测定其抑制常数,再与已知结构的糖链相比较,有相近抑制常数的多糖其结构也相似,这就是利用免疫方法分析糖链结构的原理。

4.4.2 高级结构的研究方法

4.4.2.1 X射线衍射法

当对某物质(一般为晶体)进行X射线衍射分析时,该物质会产生不同程度的衍射现象。物质的组成、晶型、分子内成键方式、分子的构型、构象等决定该物质产生特有的衍射图谱。对于多糖,还可以推测其对称性、螺距等螺旋体参数。多糖的立体结构常用经典的单晶X射线衍射法。进行X射线衍射的样品必须是高度有序的,至少在样品中存在足量的微晶,而多糖通常是不能结晶的,不适用于常规X射线衍射法,因此,在做多糖样品X衍射前须经过诱导,最简单的方法是将多糖溶液置于纤维扩张器中,让其在控制的湿度下干燥。此外,另一种X射线衍射法的方法(纤维衍射)可用于多糖的X射线衍射分析。

4.4.2.2 电子显微镜(EM)和扫描隧道显微镜(STM)

EM是研究长链高分子的外形长度、伸展状态、柔顺性大小以及空间构象的一种潜在的强有力手段,于宪潮等利用透射电镜对核盘菌多糖分子在不同条件下的形貌进行了观察,得出了一系列有意义的规律。刘如林等利用透射电镜和扫描电镜对小核菌多糖中的单分子形貌,不同处理后分子形貌的变化及其聚集形态结构进行了研究,发现小核菌多糖在水溶液中以特定形状的聚集态存在,有比较规则的高级结构。

4.4.2.3 原子力显微镜法(AFM)

原子力显微镜(AFM)具有高分辨率和直观可视化的特点。利用AFM可以观察多糖分子的形貌、凝胶网络和糖的亚细胞结构,它的样品制备简单,可对生物分子在近生理条件下检测它们的动态结构信息。蔡林涛等采用云母片做载体,用原子力显微镜观察虫草多糖高度分枝,并具有小环和螺旋的结构形貌,Marszalek等通过AFM观察了吡喃环椅式与船式构象的转变机制。

4.4.2.4 核磁共振(NMR)

高分辨率的NMR可用于研究多糖链的构型、构象、共聚物序列分布和立体构型的规整性、螺旋链-线团转变及多糖分子的相互作用。NMR技术能研究和提供有关不同条件下多糖分子微观结构信息,多糖分子的构象变化对于NMR信号的重要参数OE和弛豫时间等都有一定影响,通过追踪这些参数的变化就能探测多糖分子构象的变化。

4.4.2.5 圆二色谱(CD)

手性分子都具有光学活性。当单色左旋与右旋的圆偏振光通过某一种样品时,该样品对左、右旋圆偏振光的吸收不同。这叫做圆二色性。多糖作为一种高分子,CD也可用于糖的构象分析。Gaiol等测定了黄原胶和甘露葡聚糖混合物在溶液及胶状下的CD,数据处理结果表明黄原胶的侧链参与了胶化过程。

4.5 多糖降血糖作用

4.5.1 多糖降血糖作用机制

国内外近年来对植物多糖的降血糖作用及其机制进行了广泛的研究,取得了一定进展。多数研究表明植物多糖的降血糖作用主要表现在降低肝糖原、促进外周组织器官对糖的利用;促进降糖激素和抑制升糖激素作用;保护胰岛细胞;调节糖代谢酶活性这5个方面。还有一些学者提出了植物多糖的一些可能降糖作用机制,如增加胰岛素受体或提高其亲和力、改善微循环、防止脂质过氧化等等。

4.5.2 具有降血糖作用的多糖

4.5.2.1 概述

迄今已分离出上百种植物的多糖,在已报道的降血糖多糖植物中,国内工作者主要对茶叶、丹皮、枸杞、南瓜、海带以及人工虫草等植物进行了研究。现将部分国内外研究的含降血糖多糖的植物列于表4-1。

表4-1 具有降血糖作用的天然产物

多糖类型	来源植物
葡聚糖	乌头、杨树菇、黄芪、关苍术、大麦、薏苡仁、灵芝、海带、人参、稻、甘蔗
葡萄甘露聚糖	甘蔗
半乳甘露聚糖	知母、大蟬草、青钱柳、人参
甘露聚糖	山药
硫酸化岩藻糖	海带
杂多糖	乌头、杨树菇、沉香木、知母、黄芪、关苍术、木耳、积雪草、莼菜、红瓜、薏苡仁、虫草丝、山药、柿、麻黄、刺五加、葫芦巴、墨角藻、灵芝、舞菇、武靴叶、猴头、黄葵、向梓茸、香菇、紫草、枸杞、桑树、芭蕉、稻、人参、丹皮、桑黄、紫菜、番石榴、南瓜、麦冬、大黄、黄精、红景天、甘蔗、羊栖菜、海藻、狼果、大豆、螺旋藻、黄酸枣、茶、椒、银耳、瓜蒌
黏多糖	秋葵、刚毛黄蜀葵、药蜀葵、圆锥绣球花、冬葵、车前草

4.5.2.2 各种降糖多糖

1) 人参多糖

从朝鲜人参中分离的 paraxanA、B、C、D、E、F、G、H; 从中国红参中分离的 paraxanI、J、K; 从日本人参中分离的 paraxanQ、R、S、T、U; 对于正常及四氧嘧啶诱发的高血糖小鼠均有显著降血糖作用, 活性顺序为 $H > F > C; U > T > S > R > Q$ 。

2) 茶多糖

丁仁凤等报道, 茶多糖主要通过抑制肠道蔗糖酶和麦芽糖酶的活性, 使进入体内的碳水化合物减少, 或者是由于多糖特有的黏附作用, 使肠道内碳水化合物缓慢释放, 起到降血糖作用。

蔡鸿恩用粗老茶治糖尿病, 临床观察其效率达 70%。李布青等报道茶多糖在降低四氧嘧啶血糖模型小鼠的血糖浓度的同时肝糖原大量增加, 说明茶多糖对糖代谢的影响与胰岛素类似。王丁刚等报道, 给正常小鼠口服不同剂量茶多糖后, 血糖浓度均不同程度下降, 腹腔注射降血糖作用明显大于口服。

药理实验证明, 茶多糖进入人体后, 对糖代谢的影响与胰岛素类似, 能促进糖的合成代谢来降低血糖。它通过提高机体抗氧化功能, 清除体内自由基, 减弱自由基对胰岛 β 细胞的损伤并改善受损的胰岛 β 细胞功能, 使胰岛素分泌增加, 诱导葡萄糖激酶的生成, 促进糖分解, 使血糖下降。

3) 南瓜多糖

许多研究者进行了南瓜多糖的降血糖功能研究。熊学敏等研究了南瓜多糖对四氧嘧啶糖尿病大鼠的降血糖作用, 结果表明, 其效果优于消渴丸对照组 ($P < 0.01$)。孔庆胜等研究南瓜多糖降糖作用发现南瓜多糖对正常及糖尿病模型小鼠具有降支链氨基酸的作用, 推测南瓜多糖能促进胰岛素分泌, 从而起到降糖作用。彭红等研究了南瓜多糖对正常和四氧嘧啶诱导的高血糖模型大鼠血糖的影响, 并进行了南瓜多糖与其他降糖药物的协同实验, 结果表明, 南瓜多糖对高血糖模型大鼠有较好的降糖效果, 但对正常大鼠降糖效果不明显。南瓜多糖与胰岛素降血糖有明显的协同作用, 但与达美康的协同作用不明显。

4) 枸杞多糖

黄正明等研究了枸杞多糖对小鼠链脲佐菌素性胰岛损伤及血糖的影响, 发现无论是治疗给药还是预防加治疗, 枸杞多糖对链脲佐菌素所致糖尿病小鼠均有明显的降血糖作用, 并显示较好的剂量依赖性, 但枸杞多糖治疗组胰岛素水平既不像中毒组那样明显降低, 也不像阳性对照药那样中等度升高, 却保持在略低于正常的水平, 证明枸杞多糖的降血糖作用与胰岛素分泌无关, 可能是通过其他途径。此外, 枸杞多糖在降低血糖的同时还能减少糖尿病动物的饮水量和进食量, 说明枸杞多糖能改善糖尿病动物的烦渴多饮及多食等症状。

5) 黄芪多糖

黄芪多糖对血糖水平的影响具有双向调节作用。它能使葡萄糖负荷后的小鼠血糖水平显著下降,也能明显对抗肾上腺素引起的小鼠血糖升高反应,而且它还能明显对抗苯乙双胍引起的小鼠实验性低血糖,还可降低由四氧嘧啶所致糖尿病大鼠的血糖水平。

6) 知母多糖

王靖等从知母中提取粗多糖,并进行脱蛋白后用于降血糖研究。结果表明无论是灌胃还是腹腔注射,均能降低正常小鼠和四氧嘧啶型小鼠的血糖,也能降低正常小鼠肝糖原的含量。

7) 苦瓜多糖

董英等研究苦瓜多糖最佳降糖活性成分的降血糖功能及其机制。通过比较苦瓜水提多糖和苦瓜碱提多糖对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠的降糖效果,初步分析其降糖机制。结果,苦瓜碱提多糖 200 和 400 mg/kg 体重都可显著降低 STZ 糖尿病小鼠的血糖葡萄糖耐量及肝糖原的含量,果糖胺的含量同样也有所降低。相对分子质量最大的苦瓜碱提多糖降糖活性最好。表明大相对分子质量苦瓜多糖的降糖效果较好,其机制可能是通过减弱 STZ 对胰岛 β 细胞的损伤或改善受损 β 细胞的功能,从而起到调节血糖的作用。

8) 苍术多糖

段国峰研究发现苍术多糖对四氧嘧啶型小鼠的血糖有良好的降低作用,而且呈现一定的剂量依赖性,推测可能与其化学特性、多糖清除自由基、保护细胞膜结构、增强免疫功能有关,从而减少四氧嘧啶对胰岛细胞的损伤程度,改善胰岛素的分泌。

9) 大黄多糖

李道中等采用四氧嘧啶及肾上腺素制备高血糖小鼠模型,大黄多糖连续灌胃 10 d 后,测定各组小鼠血糖或胰岛素。结果大黄多糖对四氧嘧啶及肾上腺素高血糖模型小鼠均有抑制作用,对正常小鼠血糖也有降低作用;同时可以提高四氧嘧啶模型小鼠血清胰岛素含量。表明掌叶大黄多糖有明显降糖作用。

10) 桑叶多糖

目前有关桑叶多糖降血糖作用的报道较多。陈福君等将桑叶中提取的桑叶总多糖给四氧嘧啶糖尿病小鼠喂药,结果表明:桑叶多糖有显著的降血糖作用,桑叶多糖对糖尿病小鼠糖代谢有调整作用,可提高糖尿病小鼠的耐糖能力及糖的储存能力,增加肝糖原含量而降低肝葡萄糖含量;桑叶多糖有促进正常小鼠胰岛 β 细胞分泌胰岛素的作用,在血糖水平下降的同时,明显提高了胰岛素水平。桑叶多糖降血糖作用的机制可能是通过促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素而发挥作用的。

11) 百合多糖

Liu 等人分离纯化出 2 种百合多糖 LP₁ 和 LP₂, 将 2 种百合多糖灌胃给予四氧嘧啶引起的糖尿病小鼠。结果: 200 mg/kg 剂量 LP₁ 的降血糖效果接近 150 mg/kg 剂量的苯乙双胍; 200 mg/kg 剂量 LP₂ 的降血糖效果超过 150 mg/kg 剂量的苯乙双胍, 即 LP₁ 和 LP₂ 对四氧嘧啶引起的糖尿病模型小白鼠具有明显的降血糖作用。

12) 绞股蓝多糖

魏守蓉等报道, 绞股蓝多糖可降低四氧嘧啶大鼠的血糖及改善糖耐量, 且不会导致低血糖, 其降糖机制可能与延缓碳水化合物在肠道的吸收有关。绞股蓝多糖治疗组治疗仅 5 d 就使空腹血糖显著下降, 大鼠体内外实验都显示出绞股蓝多糖稳定的降糖活性, 且与一般的降糖药不同, 对正常血糖无影响。

13) 丹皮多糖

研究丹皮多糖(PSM2b)对 α -葡萄糖苷酶作用的影响, 探索其降血糖作用的途径, 通过建立体外酶-抑制剂模型, 测定丹皮多糖 PSM2b 及其分级分离组分对酶作用的抑制率。结果显示 PSM2b 的分级分离组分 PSM2b-1, PSM2b-2, PSM2b-3 在体外对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用。

刘超等观察了丹皮多糖对正常小鼠血糖及葡萄糖致小鼠血糖的影响。结果表明, 丹皮多糖粗品 100 mg/kg 剂量、200 mg/kg 剂量灌胃给药可使正常小鼠血糖显著降低, 200 mg/kg 剂量、400 mg/kg 剂量灌胃给药对葡萄糖诱发的小鼠高血糖有显著降低作用。

14) 青钱柳多糖

李磊等采用超声波萃取法提取多糖成分, 用四氧嘧啶所致糖尿病小鼠模型验证青钱柳多糖的生物活性。结果, 青钱柳中多糖复合物含量为 9.6%。灌胃青钱柳多糖 4 周后, 小鼠血糖值比糖尿病模型组降低了 41.3%。给予小鼠葡萄糖后, 青钱柳多糖组小鼠血糖值显著低于糖尿病模型组。表明青钱柳中含有多糖复合物, 这种复合物具有显著的降血糖活性并能增强糖尿病小鼠对葡萄糖的耐受力。

15) 黑木耳多糖

韩春然用纤维素酶和蛋白酶从黑木耳中提取出 2 种多糖组分。以糖尿病小鼠为研究对象, 空白正常小鼠为对照, 研究了黑木耳多糖的降血糖功能, 使用剂量分别为 100, 200, 400 mg/kg。结果表明剂量在 200 mg/kg 以上时, 黑木耳多糖能显著降低糖尿病小鼠的血糖值, 但对正常小鼠的血糖值没有影响, 表明黑木耳多糖能够提高糖尿病小鼠的糖耐量。

16) 银耳多糖

姜秀莲等报道, 银耳多糖 250、500、1000 mg/kg 能明显降低四氧嘧啶所致糖尿

病小鼠的血糖水平,亦可显著降低高血糖动物及正常动物血糖含量,升高血清胰岛素水平。

17) 灵芝多糖

黄智璇等研究灵芝多糖对四氧嘧啶致高血糖小鼠、去甲肾上腺素致高血糖小鼠及正常小鼠血糖水平的影响。通过制备四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型及去甲肾上腺素致高血糖小鼠模型,给药2周后取血测定血糖水平。结果灵芝多糖能明显降低四氧嘧啶所致糖尿病小鼠及去甲肾上腺素所致高血糖小鼠的血糖水平,其中高剂量组与模型对照组相比均有显著意义,而对正常小鼠血糖水平影响较小,低、中、高剂量组与正常对照组相比均无显著意义。表明灵芝多糖对四氧嘧啶致高血糖小鼠及去甲肾上腺素致高血糖小鼠具有明显降血糖作用,而对正常小鼠血糖水平影响较小。

18) 海藻多糖

螺旋藻多糖(PSP)能有效地降低血糖, 100×10^{-6} 、 200×10^{-6} 浓度时血糖降低率分别为23.6%与30.1%。石莼多糖在不同剂量50、200 mg/kg时,均可明显降低四氧嘧啶引起的大鼠高血糖反应,但对正常小鼠无影响。羊栖菜多糖也有良好的降血糖作用,而且可作为降血脂药物的功能成分对高血脂患者以及由高血脂引起的动脉粥样硬化、肥胖和冠心病患者产生极为有益的影响。

19) 虫草多糖

季晖从人工冬虫夏草菌丝中提取粗多糖(CHWc),口服剂量500 mg/kg对正常小鼠无降血糖作用,腹腔注射100、50 mg/kg显著降低正常小鼠、四氧嘧啶和链脲佐菌素所致糖尿病小鼠,提示CHWc可能对胰岛 β 细胞有保护作用。

植物多糖作为一类重要的天然活性物质,其最大优点是毒副作用小。来源广泛。目前已有许多多糖在降血糖方面显示了诱人的前景。我国多糖资源丰富,尤其是来源于中草药的植物多糖具有较大的开发潜力。随着多糖的分离纯化、结构、合成、药理及临床研究的不断深入,降血糖多糖类药物将具有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 康琰琰,王一飞,门晓媛,等. 昆布多糖提取工艺及理化性质分析[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 59-62.
- [2] 张凯,戴玲,岳晓婧. 仙鹤草多糖的提取及部分理化性质[J]. 中国林副特产, 2008(5): 24-26.
- [3] 王莉,鲁建江,顾承志. 微波技术在板蓝根多糖提取及含量测定中的应用[J]. 中药材, 2001, 24(3): 180-182.
- [4] 聂金媛,吴成岩,吴世容,等. 微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究[J]. 中草药, 2004, 35(12):

1346-1348.

- [5] Li J, Han X H, Li Z H, et al. Isolation and determination of pachyman in *Poria cocos* (Schw) Wolf[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2000, 17(1): 49-50.
- [6] 刘金荣,江发寿,但建明,等.独尾草多糖的超声提取及含量测定[J]. *中草药*, 2002, 33(4): 322-323.
- [7] Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T. Borate-Rhamnogalacturonan II Bonding Reinforced by Ca^{2+} Retains Pectic Polysaccharides in Higher-Plant cell walls[J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 199-204.
- [8] 韩兵兵,李鹏飞,赵国燕.超声强化提取大枣多糖的研究[J]. *农产品加工*, 2005, 3: 53-55.
- [9] Hromdkova Z, Ebringerova A, Valachovic P. Ultrasoundassisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian[J]. *Ultrason Sonochem*, 2002(9): 37-44.
- [10] 傅博强,谢明勇,周鹏,等.纤维素酶法提取茶多糖[J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, 21(4): 362-366.
- [11] 孙兴权,付蕾,曹云龙,等.林蛙多糖(TCPS)提取工艺的初步研究. *吉林农业大学学报*[J], 2001, 23(4): 108-110.
- [12] 廖周坤,姜继祖,王化远,等.超临界 CO_2 萃取藏药雪灵芝中总皂苷及多糖的研究[J]. *中草药*, 1998, 29(9): 601-603.
- [13] 盛桂华,周泉城,超临界 CO_2 萃取瓜蒌多糖工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 5: 207-209.
- [14] 张拥军,蒋家新,杜琪珍.流色谱技术及其在生物多糖分离中的应用[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(2): 309-311.
- [15] 许会生,赵广荣,张铁军,等.当归多糖的提取分离研究进展[J]. *江西科学*, 2007, 1: 42-45.
- [16] 陈存武,张莉,王玉领,等.黄精多糖提取液的活性炭脱色研究[J]. *中国林副特产* 2008, 6: 1-3.
- [17] 夏玮,吕庆,张文清,等.大孔吸附树脂脱色桑叶多糖的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(2): 141-143.
- [18] 黄文书,杨海燕,李焕荣,等.枸杞多糖的脱色工艺[J]. *食品研究与开发*, 2008, 3: 95-98.
- [19] 毛英丽,王忠民,李瑾瑜,等.葡萄多糖脱蛋白方法的研究食品研究与开发[J], 2008: 42-44.
- [20] 魏江洲,张建鹏,刘军华.海螺蛸多糖的提取分离及活性组分 CPS-1 的纯化[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(1): 17-21.
- [21] 李雪华,谢云峰,周劲帆,等.荔枝多糖分离纯化及纯度鉴定[J]. *广西医科大学*, 2005, 22(3): 366-368.
- [22] 夏玮,吕庆,张文清,等.桑叶多糖 SDS-1 和 SDT-1 的系统分离纯化[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2007, 5: 678-682.
- [23] 胡亚芹,曹杨.超滤膜技术在多糖提取方面的应用[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(2): 228-230.
- [24] 李树珍,赵红霞,白卫国,等.不同提取工艺多糖含量的比较[J]. *中草药*, 1995, 26(8): 408-410.

- [25] 韩鲁佳, 阎巧娟, 江正强, 等. 黄芪多糖及皂苷提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2000, 16(5): 118-120.
- [26] 韩永萍, 林强, 何绪文. 无机陶瓷微滤膜处理虫草菌丝体粗多糖溶液的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 90-93.
- [27] 李小定, 吴谋成, 曾晓波, 等. 灰树花多糖的分离、纯化与理化性质[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 186-188.
- [28] 刘如林, 杨春. 小核菌多糖分子形貌的电镜研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 1995, 28(1): 68-71.
- [29] 蔡林涛, 李萍, 陆阻宏, 等. 原子力显微镜观察虫草多糖的结构形貌. 电子显微镜学报, 1999, 18(1): 103-105.
- [30] Marszalek P E, EL H Li, Yazal J, et al. Atomic levels control pyranose ring conformation of the national Academy of Sciences of the United States of America. 1999, 96(14): 7894-7898.
- [31] Gaio T, Ester C, Alberto B, et al. Xanthan and glucomannan mixtures: synergistic interactions and gelation[J]. Bioma-cromo-lecules, 2002(3): 498-504.
- [32] 朱晓霞, 罗学刚. 多糖提取与纯化技术应用进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 186-188.
- [33] 封聚强, 赵骏. 中药多糖的分子量及结构研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 624-625.
- [34] 张智芳, 林文庭, 陈灿坤. 植物多糖提取工艺的研究进展[J]. 海峡预防医学杂志, 2008, 14(3): 18-19.
- [35] 王文平, 郭祀远, 李琳. 生物活性多糖的结构及构效关系研究进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 19(19): 2363-2365.
- [36] 张万秋, 朱大勇, 林治华. 生物多糖的研究进展[J]. 重庆工学院学报(自然科学版), 2008, 2: 39-41.
- [37] Oshima Y, Konno C, Hikino Hi. Isolation and hypoglycemic activity of Panaxam I, J, K and L, glycans of Panax ginseng roots[J]. J Ethnopharmacol, 1985, 14: 255-257.
- [38] 丁仁凤, 何普明, 揭国良. 茶多糖和茶多酚的降血糖作用研究[J]. 茶叶科学, 2005, 25(3): 219-222.
- [39] 蔡鸿恩. 中西医结合茶治疗糖尿病初步疗效观察报告[J]. 茶叶通报, 1979, 2: 58-59.
- [40] 李布青, 张慧玲. 中低档绿茶中茶多糖的提取及降血糖作用[J]. 茶叶科学, 1996, 16(1): 67-72.
- [41] 王丁刚. 茶叶多糖的降血糖、抗炎及碳粒廓清作用[J]. 茶叶科学, 1991, 2: 173-174.
- [42] 熊学敏, 叶士玲, 许春波, 等. 南瓜多糖对四氧嘧啶糖尿病大鼠的降糖作用[J]. 江西中医学院学报, 1998, 10(4): 174-176.
- [43] 孔庆胜, 蒋滢. 南瓜多糖的分离纯化及其降支链氨基酸作用[J]. 济宁医学院学报, 2002, 25(1): 29-31.
- [44] 彭红, 黄小荣, 欧阳友生, 等. 南瓜多糖的提取工艺及其降糖作用的研究[J]. 食品科学,

- 2002,23(8):260-263.
- [45] 黄正明,杨新渡,王建华,等. 艳枸杞多糖对小鼠链脲佐菌素性胰岛损伤及血糖的影响[J]. 世界华人消化杂志,2001,12:1419-1421.
- [46] 李先荣,康永,程霞,等. 注射用黄芪多糖药理作用的研究,对血糖及其肝糖原含量的影响[J]. 中成药,1989,11(9):32-34.
- [47] 王靖,葛盛芳,陈琦,等. 知母多糖降血糖活性研究[J]. 中草药,1996,27(10):605-606.
- [48] 董英,张慧慧. 苦瓜多糖降血糖活性成分的研究[J]. 营养学报,2008,30(1):54-56.
- [49] 段国峰,欧阳臻,樊一桥,等. 茅苍术多糖防治小鼠高血糖的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,6:1211-1212.
- [50] 李道中. 掌叶大黄多糖对高血糖小鼠及正常小鼠的降糖作用[J]. 中国医院药学杂志,2007,3:309-310.
- [51] 陈福君,卢军. 桑的药理研究(Ⅰ)—桑中降血糖有效组分对糖尿病动物糖代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报,1996,13(1):24-27.
- [52] Liu C M, Fu G, Z. T, et al. Functional polysaccharide from Lilies[J]. Transactions of the asae, 2005, 48(1): 257-261.
- [53] 魏守蓉,薛存宽,何学斌,等. 绞股蓝多糖降血糖作用实验研究[J]. 中国老年学杂志,2005,25(4):418-420.
- [54] 戴玲,赵帜平,沈业寿,等. 丹皮多糖对 α -葡萄糖苷酶作用的影响[J]. 生物学杂志,2006,23(2):23-24.
- [55] 刘超,陈光亮. 丹皮多糖对正常及高血糖小鼠的降血糖作用[J]. 安徽中医学院学报,1998,17(6):45-47.
- [56] 李磊,谢明勇. 青钱柳多糖降血糖作用研究[J]. 中药材,2002,25(1):39-41.
- [57] 韩春然,马永强,唐娟. 黑木耳多糖的提取及降血糖作用[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(5):111-114.
- [58] 姜秀莲,洪铁,金春花,等. 银耳多糖对四氧嘧啶糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 长白中医药研究与开发,1995,4(2):48.
- [59] 黄智璇,欧阳蒲月. 灵芝多糖降血糖作用的研究[J]. 亚太传统医药,2008,4(8):24-25.
- [60] 熊皓平,吉宏武,邵海艳. 海藻多糖化学及生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2007,B05:165-169.
- [61] 季辉. 人工虫草碱提取物的降血糖作用研究[J]. 中国药理通报,1993,9(5)386-387.

第 5 章 黄酮及降血糖作用

黄酮类化合物是一类在自然界广泛分布的多酚类物质。现已发现数百种不同类型的黄酮类化合物具有广泛的生物活性和药理活性。大量研究表明,黄酮类化合物具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗菌、抗病毒和调节免疫、防治血管硬化等功效。降血糖作用也是许多黄酮类化合物的重要活性。黄酮类化合物以纯天然、高活性、见效快、作用广泛等特点日益受到关注。

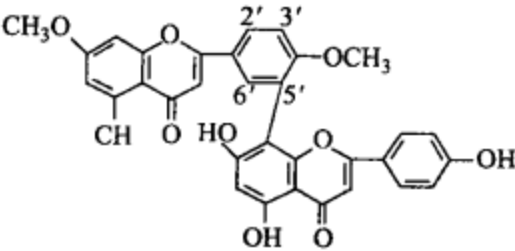
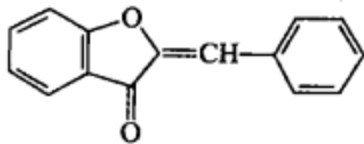
5.1 黄酮类化合物的结构与分类

黄酮类可看作是 2-苯基色原酮的一系列衍生物,目前黄酮类化合物是泛指具有 15 个碳原子的多元酚化合物。芳环(A 环、B 环)之间以一个三碳链(C 环)相连,用 $C_6-C_3-C_6$ 表示。其中 C 环部分可以是脂链,也可以与 B 环部分形成六元或五元的氧杂环。根据三碳链氧化程度、三碳链是否成环状、B 环连接位置可以衍生出许多的结构,因此,黄酮类化合物可分为黄酮类和黄酮醇类、二氢黄酮类和二氢黄酮醇类、查耳酮类、双黄酮类、异黄酮类以及其他黄酮类等,基本结构见表 5-1。

表 5-1 不同类型黄酮类化合物的基本结构

名 称	基本结构	名 称	基本结构
2-苯基色原酮		黄酮类和黄酮醇类	
二氢黄酮类和二氢黄酮醇类		查耳酮	
异黄酮类		橙酮类	
花色素类		黄烷-3-醇类	

(续表)

名 称	基本结构	名 称	基本结构
银杏素		黄烷-3,4-二醇类	

5.2 黄酮类化合物的提取和纯化

5.2.1 黄酮类化合物的提取

黄酮类化合物种类多,性质差异较大,在植物体内因存在部位不同,结合的状态也不同,在花、果、叶等组织中一般以苷的形式存在;而在木部坚硬组织中则以游离状态存在;在皮、根茎、根等部位也曾发现有苷的结合形式,所以要根据其存在部位、结合形式等来选择适合的提取方法。

5.2.1.1 按所用溶剂不同分类

1) 热水提取法

由于黄酮苷类物质易溶于水,所以对黄酮苷类物质含量较高的原料,可以采取热水提取法。浸提、煮提均可,提取次数一般为2~3次,但由于水的极性大,易把蛋白质、糖类等溶于水的成分浸提出来,从而使提取液存放时易腐败变质,为后续的分离带来困难,但是,因为消耗溶剂的成本比其他方法低,设备简单,仍为一种可取的提取方法。在提取过程中要考虑加水量、浸泡时间、煎煮时间及煎煮次数等因素。

郭京波等以水做溶剂,同时提高浸提温度、延长浸提时间和增加液料比(60倍),可以明显提高芦丁的产率。

阮俊等采用正交试验法考察了野菊花总黄酮提取方法,分别用乙醇和水提取,结果发现用乙醇提取所得黄酮提取率为3.37%,用水提取所得黄酮提取率为3.29%,乙醇提取略优于水提取。但考虑到生产实际中野菊花在提取过程中吸收2~3倍的溶剂,造成生产成本显著提高,因而最终选用价廉的水作为提取溶剂。

2) 有机溶剂萃取法

对黄酮类化合物进行有机溶剂提取,多数选用乙醇与甲醇作萃取溶剂。

陈乃富用乙醇对蕨菜浸提,可得到约为蕨菜干重1/4的粗黄酮粉,其含量达27.03%,发现蕨菜比银杏叶等的黄酮含量要高,为蕨菜干重的7.28%。所以蕨菜

是黄酮类化合物的良好来源。

高金燕等以西芹作为测试样品,使用无水乙醇为提取剂,按西芹鲜重与提取剂的比例(w/v)1:2,在80℃下回流提取2~4h,西芹样品中的黄酮物质被提取的量较多,提取效果较好。

3) 碱提取酸沉淀法

黄酮类成分大多具有酚羟基,易溶于碱水(如碳酸钠、氢氧化钠、氢氧化钙水溶液)和碱性稀醇,因此,可先用碱性水提取,碱性提取液加酸后黄酮苷类即可沉淀析出。提取时应控制酸碱的浓度,以免在强碱下加热时破坏黄酮类化合物的母核,当有邻二酚羟基时可加硼酸保护。此方法简便易行,橙皮苷、黄芩苷、芦丁等都可用此法提取。

丁利君等用pH值为10的氢氧化钠溶液从菊花中提取黄酮类物质时,效果较好。曹永刚用碱性较强的饱和石灰水从槐米中提取芦丁,使芦丁成盐溶解,效果较好。

5.2.1.2 按所用装置不同分类

1) 回流提取法

本法是加热回流提取黄酮类化合物的一种方法,所用回流剂一般有水、醇及混合溶剂,此法操作简便,但效率不够高,一般很难一次性完全提出黄酮化合物,需要反复回流提取。

2) 索式提取法

该法是用索式提取器,多次提取黄酮,其溶剂可反复利用,操作方便,价格低廉且提取效率高,但此法所需时间较长,索式提取黄酮类化合物的方法已广泛为人们所利用。

3) 超声波提取

超声波提取黄酮类物质,是目前比较新的方法。超声波提取原理是利用超声波在液体中产生“空穴作用”,破坏植物细胞和细胞膜结构,从而增加细胞内容物通过细胞膜的穿透能力,有助于黄酮类化合物的释放与溶出;超声波使提取液不断震荡,有助于溶质扩散。

刘海鹏等用超声波提取银杏叶总黄酮比回流法提取率高,且操作简便,节省时间,其最佳条件为:提取时间25 min,温度10℃,连续提取3次,总黄酮提取率达96%。

张胜帮等采用超声波醇提法,研究了提取淡竹叶中黄酮类化合物的各种影响因素,通过正交试验设计,寻找最佳提取条件。结果表明,以60%乙醇为溶剂,固液比为1:30,经20 kHz超声波提取30 min,再经70℃水浴回流3h为最佳,在最佳实验条件下得到2.27%的收率。在影响因素中,影响程度从大到小依次为:溶剂、

回流温度、超声波作用时间、超声强度、回流时间、溶剂浓度、固液比。

4) 微波法提取

微波法原理是利用磁控管所产生的 2 450 MHz 超高频率的快速震动,使材料内分子间相互碰撞、挤压,利于有效成分的浸出。此法不仅具有反应高效性和强选择性等特点,还具有操作简单、副产物少、产率高及产物易提纯等优点。浸出过程中材料细粉不凝聚、不糊化,克服了热水法易凝聚、糊化的不足。

刘峙嵘等采用微波法提取银杏叶中黄酮类化合物,与传统的乙醇水溶液法提取效果进行对照,传统的抽提时间为 11 h,而微波辐射 5 min 后,只需要抽提 1.5 h 就可。利用微波处理的提取率是用传统方法提取率的 2.2 倍。所以微波法萃取黄酮类化合物省时、提取率高,是一种有发展前景的新工艺。

刘忠英等利用微波辅助提取法提取刺五加中的黄酮类化合物,通过正交实验考察了微波提取条件,结果表明用 50%乙醇为溶剂,提取压力为 700 kPa,提取时间为 10 min,料液比为 1:20 时黄酮提取率最佳,与索氏提取法相比,提取率可提高 40%。

5) 超临界萃取法提取

超临界萃取法在黄酮化合物的提取上也得到广泛应用。

谷玉洪等用超临界 CO₂ 提取蜂胶中总黄酮,对萃取物的处理,方法简单方便,萃取物中黄酮类成分含量高,SFE-CO₂ 萃取的最佳条件为:粉碎粒度为 20 目,萃取压力 35 MPa,萃取温度 40℃,蜂胶与夹带剂用量比例为 1:2,方法可行,适合工业化生产。

邓启焕等以银杏叶有效成分分离为对象,建立了一套超临界流体小试、中试装置和实验方法,所得的提取物中银杏黄酮含量为 28%,银杏内酯含量为 7.2%,均高于国际现行公认的质量标准。

6) 酶提取法

植物的有效成分往往被包裹在细胞壁内,提取时细胞壁造成传质阻力,使提取效果受到很大的限制,酶的作用可使细胞壁疏松、破裂,因此需要减小传质阻力,加速有效成分的释放,从而提高提取效率。

对银杏中黄酮类物质进行提取,在酶浓度 0.40 mg/ml,时间 120 min,酶解温度 50℃,乙醇浓度 0% 条件下,与传统的乙醇提取工艺相比,总黄酮得率提高了 18.92%;对牡丹花中黄酮类物质进行提取,以 0.2 mg/ml 的纤维素酶和 0.1 mg/ml 的果胶酶的复合酶液,在 50℃ 酶解 120 min,与传统的工艺相比,总黄酮得率提高了 19.8%。

7) 双水相萃取分离法

双水相萃取技术(ATPE)分离原理是物质在双水相体系中的选择性分配。该

法设备投资少,操作简单,无有机溶剂残留污染。由于天然植物中所含的化合物众多,而双水相萃取技术具有较高的选择性和专一性,因此利用这些技术有希望为从天然植物中提取有效药用成分开辟一条新的思路。

8) 半仿生提取法

半仿生提取法(SBE)是近几年提出的新方法。它是从生物药剂学的角度,将整体药物研究法与分子药物研究法相结合,模拟口服药物经胃肠道转运吸收的环境,采用活性指导下的导向分离方法,具有有效成分损失少、成本低、生产周期短的特点。在操作中,根据仿生学原理,人体胃、小肠、大肠的体液酸度最佳 pH 值分别为 2.0、7.5、8.3,先将原料用一定 pH 的酸水提取,继以一定 pH 的碱水提取,提取液分别过滤、浓缩。

如对香椿叶中黄酮类物质进行提取,采用半仿生提取法,以 pH2 盐酸溶液和 pH7.5、pH8.5 的氯化氨-氨水的缓冲溶液作为提取液,在 80℃每次提取 1h,提取 3 次,黄酮提取量明显增加;对杜仲叶中黄酮类物质进行提取,采用半仿生提取法,以磷酸氢二钠-柠檬酸的缓冲溶液作为提取液,当 pH 值为 2.0、pH7.5、pH8.3 时,在 70℃每次提取 1h,提取 3 次,黄酮得率达 0.044%,高于酶解法。

5.2.2 黄酮类化合物的纯化

5.2.2.1 金属试剂配位沉淀法

金属试剂配位沉淀法是利用铝盐、铅盐、镁盐能与具有邻二酚羟基结构的黄酮类化合物形成配合物沉淀,可以把它们与其他化合物分开,加酸解离还原。如铅盐沉淀法即将植物原料的乙醇提取液蒸干,浓缩物用水溶解,加醋酸铅饱和水溶液沉淀黄酮类物质,滤集沉淀,洗净后,悬浮于乙醇中,通硫化氢脱铅,过滤,浓缩乙醇液即可。现很少用硫化氢脱铅,而用硫酸盐、磷酸盐或阳离子交换树脂脱铅。

5.2.2.2 聚酰胺柱层析法

聚酰胺柱层析法分离效果好,样品容量大,适于在制备分离工艺中应用。但洗脱速度慢,死吸附较大(损失有时高达 30%),常有低相对分子质量的酰胺低聚物杂质混入,装柱时用 5%甲醇或 10%盐酸预洗除去低聚物。

聚酰胺柱通常用水-乙醇或甲醇-氯仿梯度洗脱,当用水-乙醇洗脱时,黄酮苷先于黄酮苷元洗脱,当以氯仿-甲醇为洗脱液时,黄酮苷元先于黄酮苷洗脱。有研究者认为,当用含水溶剂系统洗脱时,聚酰胺作为弱极性固定相,其色谱行为类似反相分配色谱,当用有机溶剂洗脱时,聚酰胺作为极性固定相,其色谱行为类似正相分配色谱。

李文魁等以甲醇-氯仿为洗脱剂,用聚酰胺层析柱对各种黄酮苷类进行分离,效果较好。高木修造等利用硅胶层析柱(氯仿-甲醇作洗脱剂)和聚酰胺层析柱

(水-甲醇作洗脱剂)配合分离,从黄芩中分离出 11 种黄酮类化合物;利用聚酰胺层析柱,水和乙醇梯度洗脱,从金钱草中分离到 5 种黄酮类化合物。

5.2.2.3 硅胶柱层析法

主要适于分离异黄酮、二氢黄酮、二氢黄酮醇、高度甲基化(或乙醚化)的黄酮及黄酮醇类。少数情况下,在加水去活化后也可用于分离极性较大的化合物,如多羟基黄酮醇及其苷类等。常使用混合溶剂进行梯度洗脱。由于黄酮类化合物与硅胶有很强的吸附能力,难洗脱,而且与硅胶中很多金属离子配位而不能被洗脱,所以应预先用浓盐酸处理硅胶除去金属离子,以避免干扰分离效果。

5.2.2.4 葡聚糖凝胶柱层析法

黄酮类化合物的分离,主要使用两种型号的凝胶:Sephadex G 型和 Sephadex LH-20 型,其原理主要是吸附作用的凝胶对黄酮类化合物的吸附程度取决于游离羟基的数目,但分离黄酮苷时,分子筛的性质起主导作用。在洗脱时,黄酮苷类大体上是按相对分子质量由大到小的顺序流出柱体。

李教社等用葡聚糖凝胶柱层析从密蒙花中分离得到了 8 个黄酮类化合物。

5.2.2.5 制备薄层色谱

利用薄层色谱法快速、简便、高分辨效率等特点分离制备纯物质的方法称为制备薄层色谱法,常用硅胶做吸附剂。李教社等用制备薄层色谱从密蒙花中分离得 3 个黄酮苷类化合物蒙花苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷和秋英苷。

5.2.2.6 大孔树脂分离

脂溶性黄酮应选择非极性或弱极性树脂,如 D101、AB8、HPD100 等;黄酮苷等应选择合成原料中加有甲基丙烯酸甲酯或丙烯腈的树脂,如 D201、D301、HPD600、NKA-9 等。大孔吸附树脂色谱常用的洗脱剂包括水、不同浓度的乙醇、甲醇和丙酮等。

刘火安等利用大孔树脂从葛根中分离纯化总黄酮,找到分离效果最好的 SP70,其最佳工艺处理后的葛根总黄酮的含量可达 80% 以上,表明大孔吸附树脂 SP70 分离纯化总黄酮效果较好,适合工业生产。

田景振等研究了大孔树脂分离纯化淫羊藿总黄酮的工艺条件及树脂前处理的方法,经 DM130 型大孔吸附树脂吸附处理后,总干燥物中淫羊藿总黄酮含量达 75.39%。确定了 DM130 型大孔吸附树脂分离纯化淫羊藿总黄酮的吸附性能和洗脱参数,且工艺简单,成本低,易于工业化生产。

5.2.2.7 高效制备液相色谱

高效制备液相采用高压泵输送流动相,在色谱柱后连有检测器,实现了连续检测,且因色谱柱用较小颗粒填料填充而成,柱效大大高于经典的柱色谱,具有柱效高、分离迅速等特点,是制备、纯化难分离物质的极好手段,制备量可达到半克量和

克量级、甚至更多。

Krauz 等研究从一些裸子植物树叶中使用反相高效液相色谱(HPLC)法分离多种黄酮类化合物,使用不同的 RP-18 柱以及平放或倾斜的洗脱方式确定最佳分离条件。

5.3 黄酮的分析方法

5.3.1 分光光度法

分光光度法具有重复性好、准确、简便易掌握和不需要复杂的仪器设备等优点,加之所需试剂便宜易得,因此该方法应用于测定植物中黄酮含量最为广泛。

5.3.1.1 直接测定法

大多数黄酮类化合物分子中存在桂皮酰基和苯甲酰基组成的交叉共轭体系,其 MeOH 谱 200~400 nm 的区域内存在两个紫外吸收带,峰带 I (300~400 nm) 和峰带 II (220~280 nm)。其中峰带 II 的吸收峰较强,是定量分析的重要依据。运用 L-B 定律的数学运算,紫外分光光度法可测定出样品中黄酮类化合物的含量。该法不使用显色剂,直接在其特征吸收峰处对供试样进行测定。

刘玉芬等采用直接测定法对剑麻花中总黄酮的含量进行测定,在 258 nm 处测定吸光度,以芦丁为标准样,测得总黄酮含量为 1.56%,相对标准差(RSD)为 0.07%,表明本法具有良好的重现性。

5.3.1.2 比色法

黄酮类化合物分子中若具有 3-羟基、5-羟基或邻二酚羟基,易于与金属盐类如铝盐、锆盐、铈盐、镁盐等反应,生成有色金属配位化合物。常用于黄酮类化合物含量测定的金属盐试剂有 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 AlCl_3 等。

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法是最常用的总黄酮含量检测方法,它主要以 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 为显色剂,在碱性条件下,利用其与黄酮形成红色螯合物为特征,以芦丁为对照品,测定其吸收度,从而得到待测物质的黄酮含量。

元晓梅等研究了测定山楂及山楂制品中总黄酮含量的硝酸比色法,提出样品经乙醇抽提,聚酰胺吸附提纯,用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色,于 510 nm 下检测,以芦丁为标准品计算含量,该法将常用的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 显色法与聚酰胺柱吸附提纯相结合,成功地解决了山楂中所含色素和其他多元酚干扰问题。

5.3.1.3 差示分光光度法

在黄酮类化合物测定中,由于叶类植物中含有大量的叶绿素干扰测定,虽然用石油醚处理样品可除去大量叶绿素,但由于植物成分的复杂性,在黄酮类成分主要吸收范围内仍可能有其他成分产生吸收而干扰测定。差示分光光度法利用样品溶

液中黄酮类成分与 AlCl_3 配位后,在特征吸收波长处吸光度值发生显著变化,所测得的配位前后的吸光度差值与样品中黄酮类成分在一定浓度范围内呈线性关系,而样品中共存的其他组分(如叶绿素)在此波长下不发生吸收性质改变,因而对测定无影响,可较好地解决背景吸收的问题。

康旭珍以芦丁为观测指标,差示分光光度法测定桑叶总黄酮化合物的含量,以控制桑叶的品质。在 420 nm 波长下,芦丁对照品在 2.575~15.450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内,差示吸收值与浓度呈良好线性关系,平均加样回收率为 102.64%,RSD 为 1.08% ($n=6$)。方法具有操作简单、结果真实准确、重现性好等优点,可作为桑叶品质控制检测方法。

彭燕采用差示分光光度法分析测定白花蛇舌草注射液中总黄酮的含量,不经分离,可直接测定无干扰。在 2~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 线性范围内,差示吸收值与浓度呈良好线性关系,平均回收率和 RSD 分别为 100.54% 和 1.38%。方法快速、简便、准确,适用于制剂的质量控制。

5.3.1.4 双波长和导数分光光度法

双波长法可用于测定吸收光谱曲线重叠的混合物的含量而无须用解联立方程,还可分析高浓度及混浊样品,其灵敏度和准确度比普通分光光度法好。

朱远平以乙醇为提取剂,微波辅助提取法提取金柚皮中的总黄酮。应用双波长分光光度法,测定金柚皮中的总黄酮含量,测定波长 510 nm,参比波长 588 nm,平均回收率 99.32%,RSD=0.64% ($n=5$)。结果表明,梅州产金柚的柚皮中总黄酮平均含量达 1.0% 以上,该方法稳定可靠,重复性好。

刘玉芬等应用双波长分光光度 K 系数法测定了荷花、玉兰树叶中主要黄酮类成分芦丁、槲皮素和山萘酚。选择 297 nm/293 nm、381 nm/397 nm 和 428 nm/451 nm 为分析波长对,3 种组分的线性范围分别为 0.635~12.7 mg/L、0.576~11.5 mg/L 和 0.456~9.12 mg/L;样品测定结果的相对标准偏差 ($n=5$) 分别为 0.1%、0.9% 和 2.1%;样品加标回收率分别为 103.0%、98.4%、97.7%。

5.3.2 薄层扫描法

薄层扫描法是样品经薄层层析分离后,直接在薄层扫描仪上,在选定 λ_R 和 λ_S 范围内扫描(或单波长法),得薄层斑点的面积积分值,由回归方程计算含量。该法不受其他成分干扰,方法简便、准确。

何桂霞等采用薄层扫描法测定藤茶中二氢杨梅素和杨梅素的含量,点样于硅胶 G-CMC-Na 薄层板,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(10:8:5)为展开剂层析,用 3% FeCl_3 乙醇溶液喷雾显色后,覆盖玻璃板并密封四周,二氢杨梅素和杨梅素斑点呈紫色,对薄层色谱图进行扫描测定各斑点的面积积分值,3 h 内面积值稳定,通过标准曲线

计算样品中的含量,结果显示:藤茶中二氢杨梅素和杨梅素的含量分别为 38.17%~38.81%和 1.72%~1.78%。

闵庆旺等选用硅胶 G 预制薄层板,醋酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)为展开剂,芦丁为内标物进行单波长反射法锯齿扫描, $\lambda=275\text{ nm}$ 测定愈风宁心片中葛根素的含量,线性范围为 0.38~3.8 μg 。

5.3.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法是在液相色谱的基础上引入气相色谱的理论和技術,并加以改进而发展起来的一种重要的分离、分析方法,具有分离效能高、分析速度快、灵敏度高等特点。高效液相色谱法在使用中,以 C18 柱与 C8 柱最为常用,填充粒径的大小对分离黄酮类化合物的能力有影响,一般是 $10\text{ }\mu\text{m}>5\text{ }\mu\text{m}>7\text{ }\mu\text{m}$,目前柱内填充粒径以 $10\text{ }\mu\text{m}$ 和 $5\text{ }\mu\text{m}$ 用得最多。一般黄酮类化合物分析时多用甲醇-水为流动相,并加入少量酸,加酸的目的是为改善分离效果,防止拖尾,使峰形尖锐。便于进一步定量,但酸量或 pH 取决于色谱柱的稳定性。使用最多的酸是醋酸,此外,尚有用磷酸、高氯酸、磷酸二氢钾以及甲酸代替醋酸来调节流动相的 pH 值。紫外-可见检测系统对于低于微克量的样品十分灵敏,检测波长多选在化合物吸收最为灵敏地吸收波长处。对于黄酮、黄酮醇及黄烷酮等黄酮及其相应的苷,检测波长一般在 254~280 nm 之间,亦有在 340~360 nm 之间的;花青素及花青素苷的检测波长选在 520~540 nm 之间,查耳酮在 340 nm 处检测,黄酮、黄烷酮及黄酮的乙酰化衍生物则在 300 nm 处检测,色原酮在 250 nm 处检测。

牡荆素是山楂黄酮中主要活性成分之一,崔延萍等应用反相高效液相色谱法,以 InertsilODS-3($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$)为色谱柱,四氢呋喃-乙腈-甲醇-水-磷酸(19.4:1:1:94:0.1)为流动相,流速 1.0 ml/min,检测波长 254 nm,测定山楂中牡荆素鼠李糖苷含量。

藤茶素片由藤茶经乙醇提取精制,其主要成分为二氢杨梅素,郑虹以二氢杨梅素为对照品,采用 Allsphere ODS 柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(15:85),检测波长 290 nm,流速 1.0 ml/min,柱温 30°C ,测定藤茶素片中的二氢杨梅素含量,精密度高,稳定性好,二氢杨梅素溶液在 0.0744~0.3720 mg/ml 的浓度范围内具有良好的线性关系。

5.3.4 超临界流体色谱法

超临界流体色谱法综合了 HPLC 和气相色谱的优点。SFC 多采用超临界 CO_2 为流动相,这是因为 CO_2 的临界温度(31.1°C)接近室温,临界压力(7.38 MPa)不太高,且化学惰性,无毒,无腐蚀性等。超临界 CO_2 仅适于非极性化合物的分离,对

极性化合物的分离则需要加入极性夹带剂(如甲醇、异丙醇等)以增强其溶剂力。

刘志敏等人利用超临界色谱成功地分离测定了银杏叶提取物水解后的3个苷元—槲皮素、山奈酚、异鼠李素的含量,以苯基柱为固定相,CO₂/乙醇/H₃PO₄(体积比90/9.98/0.02)为流动相,3个黄酮苷元获得良好分离,实现了各苷元的定性及定量分析,利用各苷元的转换因子计算出银杏叶提取物中的总黄酮含量。

王学军等建立了超临界流体色谱法同时测定银杏叶提取物中槲皮素和芦丁的含量,采用C18色谱柱,流动相为超临界CO₂-0.05%三氟乙酸的乙醇溶液,检测波长360 nm,槲皮素和芦丁的平均回收率分别为99.2%和101.3%,RSD分别为2.3%和2.8%。

5.3.5 毛细管电泳法

毛细管电泳法具有速度快、选择性高、分离效率高、经济及样品前处理简单、进样体积小、溶剂消耗少和抗污染能力强等优点。毛细管电泳因其电泳迁移技术的差异可分为区带电泳、等速电泳、等电点电泳、凝胶电泳和电动色谱柱电泳5种类型。最普通的分离方式是在溶液中使用单一的缓冲溶液,称之为毛细管区域电泳(CZE)。在黄酮类化合物的分离中,主要采用的方法是CZE。

Bo等人用熔融石英毛细管,缓冲溶液为硼酸盐,运行电压30 kV,检测波长210 nm,分离分析甘草根中的黄酮类化合物。Urbdanek等人采用CITP和CZE在线联用法分离并测定金丝桃类植物的叶或花的甲醇提取物中的芦丁、异槲素、槲素等黄酮类化合物。吴婷等用毛细管电泳电化学检测法同时测定了益母草及3种益母草冲剂中的根皮苷、橙皮素、芦丁、山奈酚、洋芹素和槲皮素6种黄酮类化合物的含量。

5.3.6 荧光光度法

利用黄酮类化合物与某些金属离子的配合物在紫外线照射下可产生荧光,在一定条件下,荧光强度与该物质的浓度成正比的性质可建立黄酮类化合物的荧光光度法。这种测定法尚不多见。

朱炯波等根据黄酮类化合物本身具有荧光的性质,研究了荧光分析法直接测定显齿蛇葡萄中总黄酮含量的条件。以芦丁为标样,激发及发射波长分别为424 nm和530 nm,以pH值为2的95%乙醇作溶剂,2~4 h内稳定,检出限为 2.07×10^{-9} mol/L,样品测定重现性较好。

5.3.7 其他方法

极谱法灵敏、方便、快速。徐礼桑等以硫酸铵为底液,用导数脉冲极谱法测定了三白草中总黄酮含量。库仑滴定法是利用黄酮类化合物的分子结构中带有羟基

的性质,可与溴发生取代反应。徐礼桑等用库仑滴定法测定了三白草中总黄酮和金丝桃苷的含量,与比色法结果基本一致,但库仑滴定法操作方便、快速。配位滴定法是利用黄酮类与某些金属离子具有很强的配位作用形成一定组成的沉淀,经过滤洗涤后溶于适当溶剂中,再以二乙胺四乙酸(EDTA)滴定沉淀中的金属离子。也有文献报道采用气相色谱法(GC),但由于多数黄酮类化合物的沸点较高,难于汽化,进行 GC 测定之前要先将样品制成黄酮衍生物,比较繁琐,因此应用不是很普遍。

5.4 黄酮降血糖研究

黄酮类化合物是一类存在于多种植物中的功能性化合物,除传统意义上的抗炎、抗变态反应、抗病毒、解热和保肝作用外,近年来黄酮类化合物的药降血糖作用又得到了深入的研究。

5.4.1 藤茶总黄酮

钟正贤等研究了广西藤茶总黄酮(GXTF)的降血糖作用,采用四氧嘧啶所致糖尿病模型、肾上腺素和葡萄糖引起的高血糖小鼠模型,以及正常小鼠口服给药,测定各模型小鼠的血糖水平;并对 GXTF 进行了急性毒性试验。结果 GXTF 对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠有较好的治疗作用,对肾上腺素、葡萄糖引起的高血糖小鼠也有明显的降血糖作用,但对正常小鼠血糖无明显影响。急性毒性试验表明,其最大灌胃量为 26.0 g/kg。表明 GXTF 对多种动物模型具有较好的降血糖作用,且毒性很小。

5.4.2 荞麦总黄酮

荞麦种子总黄酮能改善高脂血症及链尿佐菌素所致糖尿病大鼠血清脂蛋白的失调,不同程度地抑制总胆固醇、三酰甘油,apo-B 和低密度脂蛋白胆固醇的升高,明显升高高密度脂蛋白胆固醇、apo-A 和降低动脉硬化指数。它能降低血糖,改善糖耐量,而对胰岛素影响不明显。

5.4.3 老鹰茶总黄酮

吕雄文等观察老鹰茶总黄酮(TFLC)的降血糖作用,并探讨其作用机制。采用 TFLC 连续 5 d 灌胃正常小鼠,观察其降血糖作用。采用肾上腺素腹腔注射、四氧嘧啶尾静脉注射和链脲佐菌素腹腔注射制备糖尿病小鼠和大鼠模型,观察 TFLC 的降糖作用以及对血清胰岛素(INS)和血脂的影响。结果:TFLC 可降低正常小鼠的血糖值;显著对抗由肾上腺素引起的小鼠血糖升高,明显降低四氧嘧啶糖尿病小

鼠血糖,并升高血清胰岛素(INS)水平,显著降低链脲佐菌素所致糖尿病大鼠模型的血糖和血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量,同时升高血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量。表明 TFLC 具有明显的降血糖作用,其机制与其促进血清胰岛素分泌和调节脂质代谢紊乱有关。

5.4.4 柿叶黄酮

资源非常丰富的柿叶含有许多化学物质,其主要成分之一是黄酮。胡忠泽采用柿叶黄酮进行了小鼠降血糖实验,虽能降低高血糖,提高糖尿病小鼠葡萄糖耐受能力,同时试验中也观察到柿叶黄酮未能使小鼠体重快速增加,说明柿叶黄酮不能完全纠正糖尿病时所产生的物质代谢紊乱。己糖激酶是葡萄糖代谢过程中的关键酶之一,试验表明,高剂量柿叶黄酮可能是通过直接或间接的形式提高己糖激酶活性,加强葡萄糖在细胞中的代谢和利用,以降低糖尿病小鼠的血糖浓度。试验还表明,高剂量柿叶黄酮能显著提高糖尿病小鼠肝脏抗氧化酶活性,降低 MDA 含量,说明可通过增强清除自由基的能力,而保护糖尿病机体免受自由基的氧化损伤。

5.4.5 柠檬黄酮

Miyake 用柠檬粗提的黄酮类圣草柠檬素和橙皮苷治疗糖尿病小鼠,均表现出体内对氧应激的保护效应,表现为胰腺中脱氧鸟苷(GDP)氧化生成的 8-羟脱氧鸟苷指标明显下降。葡萄糖降解的旁路途径之一即生成 GDP 葡萄糖及其他脱氧糖,由此可调节血糖水平。

5.4.6 桑叶黄酮

俞灵莺对糖尿病大鼠灌胃桑叶总黄酮,观察给药前后血糖变化;剥离小肠刷状缘膜,匀浆后加桑叶总黄酮测定对双糖酶活性的抑制率;大鼠小肠注入麦芽糖,30、60、120 min 后取门静脉、外周静脉血,测门-外周静脉血糖差。结果桑叶总黄酮使糖尿病大鼠血糖降低;对蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶活性抑制率依次达 68.0%、47.1%和 27.8%;使注入麦芽糖后门-外周静脉血糖浓度差降低。表明桑叶总黄酮通过抑制大鼠小肠双糖酶活性有显著的降血糖作用。

5.4.7 银杏叶黄酮

考察银杏叶总黄酮对链脲佐菌素(STZ)致糖尿病大鼠的治疗作用。方法:采用注射高剂量链脲佐菌素建立大鼠 1 型糖尿病模型,给予银杏叶总黄酮治疗,观察总黄酮对糖尿病大鼠血糖和血脂的改善作用及对与葡萄糖吸收相关酶 Akt 活性的影响。结果:银杏叶总黄酮可降低糖尿病大鼠的血糖,对糖尿病大鼠的血脂代谢有

显著的改善作用,与模型组比较,高密度脂蛋白(HDL)明显升高($P<0.01$),而三酰甘油、胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)显著降低($P<0.01$),增加 Akt 的酶活性。表明银杏叶总黄酮有改善糖尿病大鼠血糖和血脂的作用。

近年来对黄酮类化合物的结构、功能等都有了深刻的了解,并应用各种高新技术从各种植物中分离、提取了大量的黄酮类化合物,掀起了黄酮类化合物的研究热潮,但对降血糖机制、构效关系、稳定性等方面仍缺乏全面的认识,因此应加强此方面的工作。

另外,随着研究的加深,开发出了一大批黄酮类药物与食品,但其结构复杂,并且作用位点较多,因而对一些病症缺乏针对性和选择性,限制了其进一步开发和利用,这也是今后研究者所要解决的重要问题。

总之,黄酮类化合物作为一类具有很强降血糖作用的化合物,具有众多优点,其在医药、食品等领域中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 郭京波,王向东,张燕,等.不同提取方法对苦荞类黄酮提纯得率的影响分析[J].食品科学,2006,27(10):433-436.
- [2] 阮俊,黄永林.野菊花总黄酮提取方法研究[J].中成药,2004,26(2):153-154.
- [3] 陈乃富,张莉.蕨菜黄酮类化合物的提取与分析[J].中国林副特产,2004,6:1-4.
- [4] 高金燕,曾小花,王毅辉.从西芹中提取黄酮类物质的初步研究[J].中国食品添加剂,2004,3:19-21.
- [5] 丁利君,吴振辉,蔡创海,等.菊花中黄酮类物质提取方法的研究[J].食品工业科技,2002,23(2):20-22.
- [6] 曹永刚.芦丁提取工艺的研究[J].中国医药工业杂志,1993,24(2):51-53.
- [7] 梁丹,张保东.黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J].周口师范学院学报,2007,24(5):87-89.
- [8] 王晓,江婷,程传格,等.超声波强化提取牡丹花黄酮[J].山东科学,2004,17(3):13-15.
- [9] 张胜帮,赵玲玲.淡竹叶中黄酮类化合物的提取研究[J].食品科学,2006,27(10):255-258.
- [10] 刘峙嵘,俞自由,方裕勋,等.微波萃取银杏叶黄酮类化合物[J].东华理工学院学报,2005,28(2):151-154.
- [11] 刘忠英,晏国全,凤泉,等.刺五加中黄酮类化合物的微波辅助提取研究[J].分析化学,2004,32(3):360-363.
- [12] 谷玉洪,罗蒙,徐飞,等.超临界 CO_2 提取蜂胶中总黄酮的工艺研究[J].中草药,2006,37(3):380-383.
- [13] 邓启焕.二类超临界流体萃取银杏叶有效成分的实验研究[J].中草药,1999,30(6):419-423.
- [14] 吴梅林,周春山,陈龙胜,等.酶法提取银杏黄酮类化合物研究[J].天然产物研究与开发,

- 2004,16(6):557-560.
- [15] 王晓,耿岩玲,李福伟,等. 酶法提取牡丹花总黄酮[J]. 山东科学,2005,18(4):14-16.
- [16] 刘增琪,景涛,中药提取分离技术的应用进展[J]. 天津药学,2003,15(4):64-65.
- [17] 陈丛瑾,黄克瀛,李德良. 正交试验法优选香椿叶总黄酮的半仿生提取工艺[J]. 食品科技,2007(6):119-121.
- [18] 陈晓娟,周春山. 酶法及半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮[J]. 精细化工,2006,23(3):257-259.
- [19] 李文魁,潘景歧,吕木坚,等. 朝藿素 D 的分离和结构[J]. 药学学报,1996,31(1):29-32.
- [20] Lebreton P. Flavonoids of *Baotisia australis*[J]. *Phytochemistry*,1967(6):1675-1677.
- [21] 李教社,赵玉英,王彬,等. 密蒙花黄酮类化合物的分离和鉴定[J]. 药学学报,1996,31(11):849-854.
- [22] 刘火安,王伯初,戴传云,等. 利用大孔树脂从葛根中分离纯化总黄酮[J]. 中国药学,2006,15(2):121-126.
- [23] 葛淑兰,田景振. 大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(5):365-367.
- [24] Krauze-Baranowska M. HPLC Separation of O-acylated flavonoids and biflavones from some species of gymnospermae[J]. *J Chromatographia*, 2004(60):9-15.
- [25] 梁丹,张保东. 黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 周口师范学院学报,2007,24(5):87-89.
- [26] 赖毅勤,周宏兵. 近年来黄酮类化合物提取和分离方法研究进展[J]. 食品与药品,2007,9(04A):54-57.
- [27] 郭雪峰,岳永德. 黄酮类化合物的提取分离纯化和含量测定方法的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8083-8086.
- [28] 张胜帮,赵玲玲. 黄酮类化合物的提取纯化研究进展[J]. 温州大学学报,自然科学版,2007,28(5):25-28.
- [29] 孙智敏,李发堂,殷蓉,等. 黄酮类化合物提取工艺研究进展[J]. 河北化工,2005,4:7-8.
- [30] 李凤林,李青旺,高大威. 天然黄酮类化合物含量测定方法研究[J]. 江苏调味副食品,2008,25(4):8-12.
- [31] 刘玉芬,夏海涛,杨树平. 紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮的含量[J]. 食品科学,2005,26(9):418-419.
- [32] 元晓梅,蒋明蔚,胡正芝. 聚酰胺吸附-硝酸铝显色法测定山楂制品中的总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业,1996,4:27-31.
- [33] 康旭珍. 差示分光光度法测定桑叶总黄酮含量[J]. 光谱实验室,2005,22(3):506-508.
- [34] 彭燕,王本富,苗爱东,等. 差示分光光度法测定白花蛇舌草注射液中总黄酮的含量[J]. 新疆中医药,2007,25(4):77-78.
- [35] 朱远平,牟利辉. 双波长分光光度法测定金柚皮中总黄酮的含量[J]. 广东化工,2007,34(12):90-92.

- [36] 刘玉芬,李咏梅,李平,等. 双波长分光光度-K 系数法同时测定荷花玉兰花叶中三种黄酮成分[J]. 理化检验:化学分册,2008,44(7):668-669.
- [37] 何桂霞,裴刚,周天达,等. 薄层扫描法测定藤茶中二氢杨梅素的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2000,17(4):275-277.
- [38] 何桂霞,裴刚,冯映冰,等. 薄层扫描法测定藤茶中杨梅素的含量[J]. 湖南中医学院学报,1999,19(3):18-19.
- [39] 闰庆旺,谭生健. 薄层扫描法测定盘风宁心片中葛根素的含量[J]. 药物分析杂志,1994,14(1):57.
- [40] 崔延萍,崔树玉. 山楂中牡荆素鼠李糖苷含量测定[J]. 中草药,2000,31(12):906-906.
- [41] 郑虹,叶秋. 高效液相色谱法测定藤茶素片中二氢杨梅素的含量[J]. 海峡药学,2006,18(3):67-69.
- [42] 刘志敏,赵琐奇,王仁安. 超临界流体色谱法测定银杏叶提取物中的黄酮类化合物[J]. 分析化学,1999,27(2):214-216.
- [43] 王学军,许振良,赵锁奇. 银杏叶提取物中槲皮素和芦丁的超临界流体色谱法测定[J]. 中国医药工业杂志,2005,36(7):415-417.
- [44] Bo T, Li K A, Liu H W. Fast determination of flavonoids Glycyrrhizae radix by capillary zone electro phoresism[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 458: 345-354.
- [45] Urbdanek M, Blechtovd L, Pospisilovd M, et al. On-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of Hypericum perforatum leaves or flowers[J]. Chromatography A, 2002, 958: 261-271.
- [46] 吴婷,管月清,郑双杰,等. 毛细管电泳-电化学检测益母草及其冲剂中的黄酮类化合物[J]. 分析科学学报,2006,22(4):406-409.
- [47] 朱炯波,张敏,龚竹琼,等. 荧光分析法测定显齿蛇葡萄中总黄酮的含量[J]. 现代食品科技,2005,21(2):155-157.
- [48] 徐礼桑,张秀琴,刘爱茹. 三白草中黄酮的微分脉冲极谱测定[J]. 药物分析杂志,1988,8(4):223-225.
- [49] 徐礼桑,徐叶周. 三白草中总黄酮及金丝桃甙的库伦滴定[J]. 药学学报,1986,21(3):306-308.
- [50] 俞灵莺,李向荣. 植物黄酮类抗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,2000,27(6):331.
- [51] 钟正贤,覃洁萍. 广西藤茶总黄酮降血糖的实验研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(9):687-689.
- [52] 韩淑英,吕华,朱丽莎,等. 荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗酯质过氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报,2001,17(6):694-696.
- [53] 刘淑梅,韩淑英,张宝忠. 荞麦种子总黄酮对糖尿病高脂血症大鼠血脂、血糖及脂质过氧化的影响[J]. 中成药,2003,25(8):662-663.
- [54] 吕雄文,李李俊,邹宇宏,等. 老鹰茶总黄酮降血糖作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,

2008,15(2):119-121.

- [55] 胡忠泽,杨久峰,谭志静. 柿叶黄酮对糖尿病小鼠降血糖作用及机制探讨[J]. 营养学报, 2006,28(6):540-541.
- [56] 俞灵莺,李向荣. 桑叶总黄酮对糖尿病大鼠小肠双糖酶的抑制作用[J]. 中华内分泌代谢杂志,2002,18(4):313-315.
- [57] 王国光,张翠,李伟,等. 银杏叶总黄酮对糖尿病大鼠的降糖作用研究[J]. 亚太传统医药, 2008,4(8):31-32.

蘇子知覺
PDG

第6章 皂苷及降血糖作用

皂苷是一类广泛存在于中草药中的化学成分,在自然界有各种各样的皂苷,它们的化学性质、生物活性各有不同,是一类较复杂的化合物。它们是糖的衍生物,主要是由糖的半缩醛羟基与非糖结合的化合物,非糖部分称为苷元。苷又称为配糖体,它们是糖或糖醛酸末端基碳原子与另一非糖物质连接而成的化合物。组成苷的糖主要为五碳醛糖和六碳醛糖。其中羟基性质最活泼,它是半缩醛羟基。当它与非糖化合物缩合时,形成苷。皂苷是苷类化合物中的一种。其水溶液经振荡后能形成大量泡沫,所以称为皂苷。

皂苷广泛存在于植物中,在百合科、薯蓣科、玄参科、豆科、远志科、五加科等植物中含量较高。许多中草药和植物中如人参、柴胡、远志、大豆等都含有皂苷,并且是它们的主要有效成分。

近年来研究发现,许多皂苷具有降血糖功能作用。

6.1 皂苷的结构

皂苷按其皂苷元的化学结构可分为两大类:一类是皂苷元为甾体化合物的,称为甾体皂苷;另一类是皂苷元为三萜类化合物的,称为三萜皂苷。

甾体皂苷的皂苷元属甾体化合物,是环戊烷并多氢菲的衍生物,其基本骨架主要为螺旋甾烷。三萜皂苷的皂苷元属三萜类化合物,其基本骨架由6个异戊二烯单位组成。无论是甾体皂苷或者三萜皂苷,其苷元与低聚糖链常通过苷元上的C₃羟基结合成苷。

6.1.1 甾体皂苷

甾体皂苷在植物中分布不如三萜皂苷普遍,主要分布在百合科、薯蓣科、石蒜科、五加科和豆科等植物中。中草药中穿山龙、知母、龙舌兰、五加皮、红柳,葫芦巴中均含有。

甾体皂苷元由27个碳原子组成,基本骨架为螺旋甾烷及异螺旋甾烷,结构通式如图6-1所示。

甾体皂苷结构特点:

(1) 分子中有六个环,其中A、B、C、D为甾环,E环为四氢呋喃,F环为四氢吡喃。通过C₂₂以螺缩酮的形式相连,它们与甾体母核共同组成了螺旋甾烷的结构;

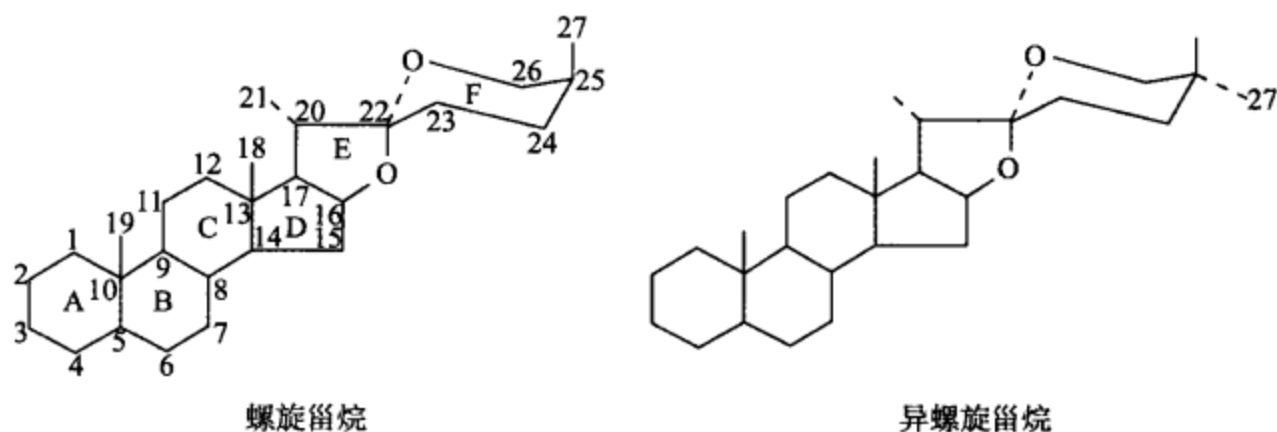


图 6-1 甾体皂苷结构通式

C_{22} 为螺原子。

(2) 一般 B/C 和 C/D 环的稠合均为反式($8\beta, 9\alpha, 13\beta, 14\alpha$), A/B 环的稠合有顺式和反式($5\beta\text{-H}$, 或 $5\alpha\text{-H}$)。

(3) C_3 连有羟基, 为 β 型, 并多与糖结合成苷。

(4) 分子中 C_{25} 是不对称碳原子。当 C_{25} 位上甲基位于环平面上的直立键时为 β 型, 其绝对构型为 I 型, 又称 S 构型(25L 或 25S), 即螺旋甾烷型。如其 C_{25} 位上甲基位于环平面下的平伏键时为 α 型, 其绝对构型为 D 型, 又称 R 构型(25D 或 25R), 称为异螺旋甾烷。一般来讲, 异螺旋甾烷型化合物较螺旋甾烷型化合物稳定。

(5) 甾体皂苷元不含羧基, 呈中性, 故甾体皂苷元又称中性皂苷。

6.1.2 三萜皂苷

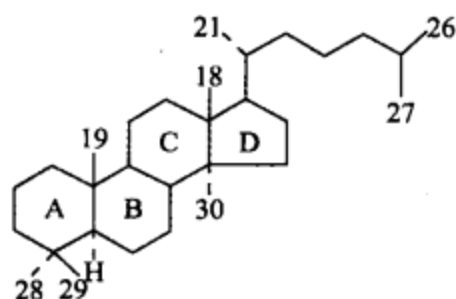
此类皂苷在植物中分布较广, 种类较多, 在蝶形花科、五加科、伞形花科、石竹科、含羞草科、毛茛科、无患子科、藜科、报春花科、茜草科、葫芦科、山榄科、茶科、远志科等植物中比较集中。含有三萜皂苷的中草药有紫菀、款冬、蒲公英等。三萜皂苷由于糖的种类、数目和连接方式不同可形成多种不同的苷。

根据苷元的结构可分为四环三萜皂苷和五环三萜皂苷两大类。

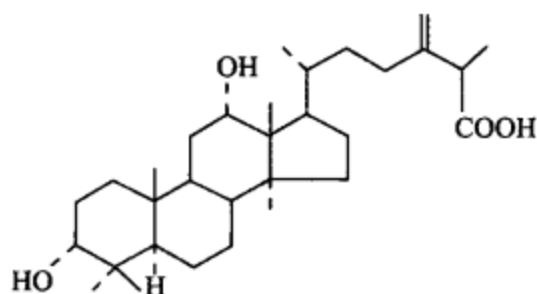
6.1.2.1 四环三萜皂苷

此种类型的皂苷数量较少, 其基本母核组成与甾体相似, 大部分具有环戊烷并多氢菲的结构, 其 A/B, B/C, C/D 均为反式。环上有 5 个甲基, 编号为 18 的甲基在羊毛脂甾烷中位于 C_{13} 位上, 如猪苓酸; 在达玛烷型中, 位于 C_8 位, 如 20(5)-原人参醇[20(5)protopanaxadiol]。

1) 羊毛脂甾烷型

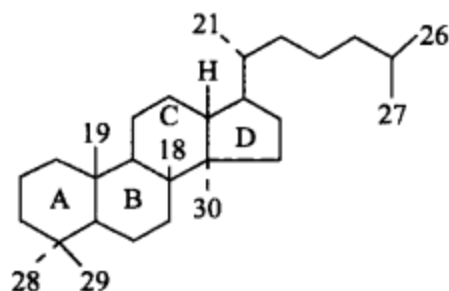


羊毛脂甾烷

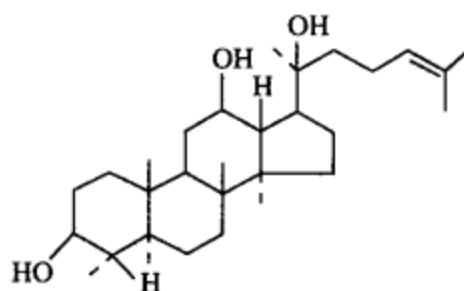


猪苓酸A

2) 达玛烷型



达玛烷



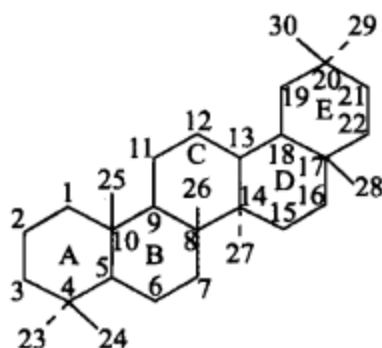
20(S)-原人参二醇

6.1.2.2 五环三萜皂苷

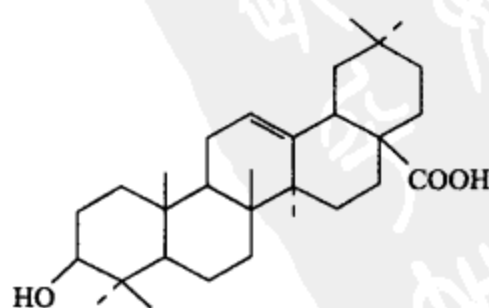
五环三萜皂苷在中药中较为常见,主要有以下3种类型。

1) 齐墩果烷型

齐墩果烷型又称 β -香树脂烷型,其基本骨架是多氢核的五环母核。环的稠合方式为A/B、B/C、C/D环均为反式,而D/E环为顺式。母核上有8个甲基,其中C₄、C₂₀上各有两个甲基。一般在C₃上连有 β -OH,常与糖结合成苷;如果有羧基,则多在C₂₀、C₃₀或C₂₄位上。此羧基常与钙、镁等离子结合成盐。存在于植物体的此类皂苷元以齐墩果酸最常见,是植物界广泛存在的一种三萜皂苷元。甘草中的甘草次酸、人参中的C型人参皂苷元(结构见后),均为齐墩果烷型。



齐墩果烷型

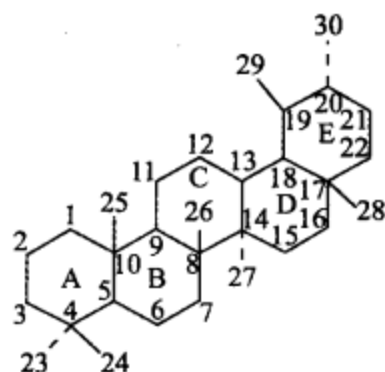


齐墩果酸

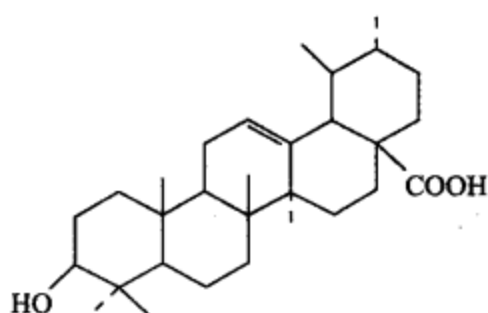
2) 乌苏烷型

乌苏烷型又称 α -香树脂烷型或熊果烷型,与齐墩果烷型不同之处是E环上C₂₉

甲基由 C_{28} 移至 C_{29} 位上, 如乌苏酸。



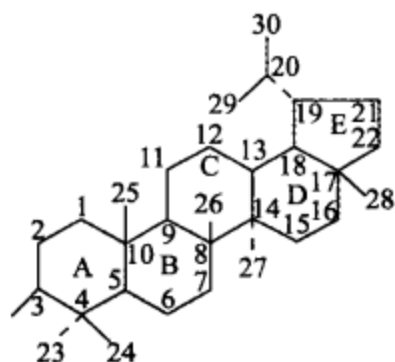
乌苏烷型



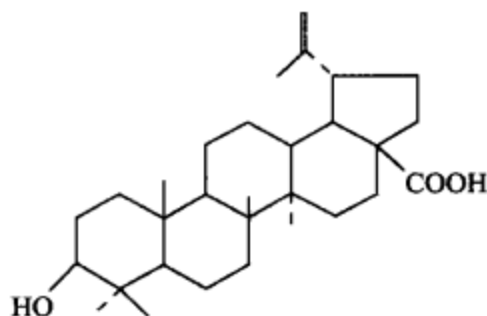
乌苏酸

3) 羽扇豆烷型

中药中此类成分较少, 与齐墩果烷型不同之处是 E 环为五元环, 且在 E 环 C_{19} 位有异丙基以 α 构型取代, D/E 环是反式稠合。如白桦脂酸。



羽扇豆烷型



白桦脂酸

6.2 皂苷的提取与纯化方法

6.2.1 皂苷类化合物的提取

6.2.1.1 甲醇(乙醇)提取

皂苷广泛存在于植物的各种组织中, 由于皂苷易溶于热水、热甲醇和热乙醇中, 因此甲醇或乙醇常用作天然产物的浸提剂。提取后, 回收溶剂, 将残渣溶于水中滤除不溶物, 于水溶液中加入石油醚、苯或乙醚等亲脂性强的有机溶剂做两相萃取, 不溶于这些强亲脂性溶剂的留溶于水中, 而油脂、色素等亲脂性杂质则转溶于亲脂性溶剂中, 与皂苷分离。除去杂质后, 改用亲水性强的丁醇为溶剂继续由溶液中做两相萃取, 则皂苷转溶于丁醇, 一些亲水性强杂质包括糖类仍留于水中, 与皂苷分离。收集丁醇溶液, 减压蒸干, 获得粗制的皂苷。也可以先用石油醚等强亲脂性溶剂处理中草药原料, 然后用乙醇为溶剂加热提取, 放冷提取液, 由于多数皂苷难溶于冷乙醇, 就可能析出沉淀。

魏晓玲和贺玉薇等通过正交试验,利用乙醇提取苜蓿皂苷,结果发现提取苜蓿皂苷时乙醇的最佳浓度为70%、最适温度为80℃。但上述研究的结果并不完全相同,前者发现提取苜蓿皂苷最适宜的固液比为1:20,而后者则认为最适宜的固液比为1:10,这可能与试验设置的固液比梯度及幅度不同等有关。苜蓿经70%乙醇提取、过滤后,再用石油醚和正丁醇分别萃取,然后将萃取液混合、浓缩,在水浴锅上蒸干至恒重,即可得到苜蓿皂苷的粗提物。

6.2.1.2 超声波提取

王昌利等采用超声法以穿山龙为原料提取薯蓣皂苷时,证明该法具有省时、节能、提取率高等优点。宋小妹等实验证明超声法可以明显提高绞股蓝总皂苷的提取率。刘勇等研究了超声波法提取苜蓿皂苷的最佳工艺条件,结果表明甲醇浓度、甲醇用量、提取时间以及提取次数对苜蓿皂苷提取量都有极显著的影响,其最佳提取工艺为:50%甲醇,甲醇用量为苜蓿草粉的15倍量,超声波提取2次,每次提取30 min。目前,超声波提取技术虽已广泛应用于中药质量分析和少量提取中,但用于大规模生产还较少,有待进一步摸索。

6.2.1.3 微波提取

朱晓韵等首次探索了用微波技术提取罗汉果甜苷的方法,并优选出提取工艺:投料物液比为1:8,微波输出功率为750 W,提取时间为15 min。与常规水煮法比较,微波提取罗汉果甜苷效率高,是一种省时、省能、操作简便的提取方法。

龚盛昭等以95%乙醇为溶剂,进行了微波场协同提取远志皂苷的研究,得到了微波场协同提取远志皂苷的最佳工艺条件: $m(\text{溶剂})/m(\text{远志粉})=18$, $t=10\text{ min}$,微波功率300 W提取2次。将提取液真空浓缩后,用丙酮-乙醚混合液沉析,生成淡黄色沉淀,过滤,沉淀真空干燥,即得远志皂苷粗产品,产率6.34%。与直接加热提取法进行了比较,结果表明微波场协同提取能大大缩短提取时间,并能提高远志皂苷产率。

6.2.1.4 超临界萃取

已有相当多的文献报道用超临界CO₂方法提取皂苷的研究。葛发欢等采用SFE-CO₂从黄山药中萃取薯蓣皂苷,与传统法比较,收率提高1.5倍,生产周期大大缩短。又将之运用于柴胡皂苷的提取,弥补了传统工艺因温度高、受热时间长而导致某些皂苷含量降低甚至损失殆尽的不足。

盛桂华等以瓜蒌为实验材料,瓜蒌皂苷得率为评价指标,通过“四因素、三水平”的响应曲面实验设计,对超临界CO₂萃取瓜蒌皂苷最佳条件进行确定。最佳提取条件为萃取压力29.8 MPa,萃取温度54℃,携带剂乙醇浓度55%,携带剂用量4.35 ml/100 g,此条件下瓜蒌皂苷得率为4.13%。超临界CO₂萃取瓜蒌皂苷的最佳条件得率较高,切实可行,条件稳定。

6.2.1.5 半仿生提取法

孙秀梅等采用半仿生提取法提取甘草中的甘草次酸,发现较常规水煎煮法有显著提高。

6.2.1.6 酶法提取

传统的方法是用水、乙醇或有机溶剂浸泡法提取皂苷等成分。这种方法提取率极低,因为皂苷在植物中呈游离和非游离状态,浸泡法只能提取游离皂苷,不能提取非游离皂苷。采用酶法处理。处理后不仅能提取游离皂苷,也可提取非游离皂苷。提取率可提高数倍。

研究了苦瓜皂苷的酶法提取和大孔树脂纯化工艺。与高温水提法相比,苦瓜皂苷的复合酶解提取具有提取速度快、条件温和的优点。利用微孔技术精制提取液,除去一些大分子化合物和多糖。微滤后的精制液上 LSA-20 大孔树脂柱进行纯化,乙醇洗脱,冷冻干燥洗脱液所得的产品苦瓜皂苷含量可达 79%。

6.2.2 皂苷类化合物的纯化

6.2.2.1 分段沉淀法(溶剂沉淀法)

利用皂苷可溶于醇,难溶于乙醚、丙酮等溶剂的特性。将粗皂苷首先溶于少量的甲醇或乙醇然后逐滴加入乙醚、丙酮或两者混合物,随着丙酮或乙醚的加入,溶液的极性逐渐降低,皂苷可以因为极性不同而析出。

6.2.2.2 胆甾醇沉淀法

利用胆甾醇可与甾体皂苷形成难溶于水的分子复合物的性质,与其他水溶性成分分离而达到精制甾体皂苷的目的。具体步骤是:先将皂苷溶于少量的乙醇溶液中,然后加入胆甾醇的饱和醇溶液,直至不再析出沉淀为止,收集沉淀洗涤并干燥,再用乙醚加热回流,生成的分子复合物便分解,胆甾醇溶于乙醚,而甾体皂苷游离析出。由于胆甾醇价格昂贵,本法一般仅用于科研。

6.2.2.3 铅盐沉淀法

将粗皂苷溶于少量乙醇中,加入过量的饱和中性乙酸铅溶液,搅拌,使酸性皂苷沉淀完全,滤取沉淀。于滤液中再加入饱和碱性乙酸铅溶液,中性皂苷又能沉淀出来,滤取沉淀,然后将所得沉淀分别悬浮于乙醇中进行脱铅处理,脱铅后将滤液减压浓缩,浓缩液加入乙醚,析出沉淀后即得酸性和中性皂苷两部分。

6.2.2.4 色谱法分离

1) 分配色谱法

由于皂苷的极性大,所以常采用分配色谱法分离。分配色谱与液-液连续萃取法相似,它是利用混合物各组分在两种互不相溶的液相间分配系数不同而进行分离,常以硅胶、硅藻土和纤维素作为载体,以吸附大量的液体作为流动相。皂苷

极性大,采用分配色谱法分离效果更好。如从美远志根中,用硅胶柱色谱,以3%草酸水溶液为固定相,氯仿:甲醇:水为26:14:37作为流动相,分离得4种单一的皂苷,即远志皂苷A、B、C、D。

2) HPLC

现在国外已普遍应用HPLC分离结构相似的皂苷。虽比较费时摸索最佳分离条件,但效果较好。

在正相色谱中,近年分离皂苷使用的层析柱主要有ODSSilicagel、 μ -BondapakC₁₈、S-10-ODSODS、ODS-120A、Nu-cleosilC₁₈、羟基磷灰石等。如使用制备型反向HPLC,在ODS硅胶柱上,用甲醇/水(体积比为1:9)作为流动相,可成功地分离三七皂苷。

反相色谱中,近年来反相键合相得到普遍应用。使用较多的预填充反相硅胶柱主要有Llchroprep R-8(Merck,体积分数60%~80%甲醇洗脱)和LobarR_p-8(Merck,体积分数60%~80%甲醇洗脱),常使用的反相多孔聚合物有DIAION HP-20KOGelBG4600。利用这些方法,分离了五加科植物中多种新三萜皂苷。

3) 树脂法

离子交换树脂:在分离含葡萄糖醛酸时,常使用阳离子交换树脂除去离子,常用的AmberliteMB-3和Dowex 50Wxl、XS等。如在分离纯化绞股蓝和丝瓜的皂苷,使用Amberlite、XAD-2树脂,以水、体积分数20%甲醇依次洗脱分离丝瓜皂苷。

大孔吸附树脂:在对总皂苷的粗分离和除去水溶性色素、多糖和无机盐等杂质方面显示出其独特的效果。在试验中用水作为洗脱剂,除去一些水溶性杂质,然后再用不同浓度乙醇进行洗脱,可得到各皂苷部位。大孔吸附树脂常用型号有:D-101、D-201、MD-05271、CAD-40、AB-8等,特点是吸附容量大、再生简单、效果可靠,尤其适用于苷类、黄酮类、皂苷类、生物碱类等成分的提取分离及大规模生产。如许舒雯等利用D-101大孔吸附树脂提取苜蓿皂苷,结果表明其最佳工艺条件是:药液上样量与树脂用量比例为2:3,采用4个柱体积的25%稀醇、60%乙醇进行一次性洗脱,收集60%乙醇洗脱液,回收、浓缩、真空减压干燥后获得苜蓿皂苷。余从洪等采用AB-8型大孔吸附树脂分离纯化苜蓿皂苷,结果发现其最佳工艺是:药液上样量与树脂用量比例为3:1,采用4倍树脂床蒸馏水洗去水溶性杂质、4倍树脂床体积的70%乙醇洗脱,经AB-8大孔吸附树脂分离提纯,苜蓿皂苷的含量可达到30%以上。上述2个试验的研究结果均表明大孔吸附树脂适宜于苜蓿皂苷的分离、纯化,但提取工艺条件存在一定差别,这可能是因为选择的大孔吸附树脂柱型号不同所致。

陈勋等用大孔树脂能快速分离提取苦瓜皂苷,通过实验,分离提取苦瓜皂苷工艺为:提取溶剂为80%乙醇,浸提时间12h,用80%乙醇洗脱。此工艺操作简单,

快速分离效果好。生产成本低、耗时少、所得产品纯度高为优点,适合工业化大规模生产。

4) 液滴逆流色谱法

液滴逆流分配层析(DCCC)技术是较常用的液—液分离技术,原理是利用物质在互不溶解的两相液滴中分配系数不同而达到分离目的。最主要的优点是没有固定吸附剂,不存在被分离物质的不可逆吸附问题,尤其对极性大的皂苷化合物具有特别意义。

近年,国外已有将 DCCC 应用到皂苷的分离;如 Takabe 等采用 DCCC 从通脱木的甲醇提取物中分离到 4 种新三萜皂苷, Akai 采用同样的方法从柴胡属植物中分得了 2 种新皂苷。

5) 闪柱层析

闪柱层析(Flash chromatography, FC)的特点是层析柱短,采用球型硅胶且加压而使洗脱速度快,因此分离周期短,溶剂所需量少,且有较好的分离效果。Nonaka 等结合了正相硅胶闪柱层析和制备型薄层层析,从而分离了紫苜蓿(*Medicago sativa*)根中的皂苷。实验证明,FC 适用于较大量皂苷的分离,所以大有发展前途。

6.3 皂苷的分析方法

6.3.1 生物测定法

在生物测定法中,早期使用的是溶血指数计算皂苷含量。利用皂苷所具有的溶血作用测定中草药中皂苷的含量。皂苷溶血作用强弱用溶血指数表示,所谓溶血指数是指在一定条件下,中草药浸出液使血液中红细胞完全溶解的最低溶血浓度的倒数,也即稀释倍数。这种测定方法的缺点是不能排除植物样本中其他具有溶血作用成分的干扰。

另外一种生物测定方法是根据苜蓿皂苷的抗真菌功能,用绿色木霉作为供试菌。以对供试菌的抑制率作为苜蓿皂苷的含量指标。但据 Nonakat 报道,不同种类的苜蓿皂苷对绿色木霉的抑制活性不同。在分离获得的 8 种皂苷中,有 1 种皂苷单体对绿色木霉的抑制活性相对较低,说明该方法也有一定的局限性。

6.3.2 重量法

此法为经典的方法。主要利用皂苷在某些试剂中的最大溶解性或不溶性,而采取萃取或沉淀的方法来制取样品。它较适用于在没有标样作参照物的条件下进行。缺点是操作过程较长,误差较大不够精确。测定精确的关键在于材料的处理

和提纯上,同时在溶液的转移和沉淀的转移上都要防止丢失。

6.3.3 分光光度法

分光光度法是根据物质的吸收光谱及光的吸收定律,对物质进行定性、定量分析的一种方法。

6.3.3.1 直接测定法

大豆皂苷苷元三萜烯结构在紫外波长 205 nm 处附近有最大吸收峰,且在此波长处各个单体组分之间吸收差异不大,通过紫外检测器扫描后峰数目较少,这就为紫外分光光度法测定其含量创造条件。由于大豆皂苷标准样品难以制得,一般选用与其结构相似物质作为标准物。谷克仁等利用齐墩果酸作标准品绘制标准曲线,并建立相应回归方程,由此测定大豆总皂苷含量。杨华明用紫外分光光度法测定糖肽酮萜素中大豆总皂苷含量,其使用标准品为人参皂苷,并测定其在紫外波长 205 nm 处吸光度值和绘制标准曲线。

甘草酸的 40%~60% 乙醇溶液在紫外波长 252 nm 有吸收峰,而在 0.03~0.1 mol NH₄OH 溶液中峰的位置在 258 nm 处。远志皂苷的 50% 甲醇溶液在 309 nm 处有最大吸收峰。可利用这些吸收峰直接测定。

6.3.3.2 比色法

皂苷与显色剂溶液在加热条件下反应显色,颜色深浅与皂苷含量成正比,因此可以在一定波长范围内测出其吸光值,然后再换算成皂苷的含量。但该法专属性较差,显色剂如浓硫酸、高氯酸、硫酸-醋酐等可与许多皂苷元生成颜色。

1) 浓硫酸

可与许多甾体皂苷元反应后在紫外或可见光区有吸收。甾体皂苷与硫酸反应常呈黄色,但需在较高的温度(80~90℃)反应 30~60 min。硫酸浓度、反应温度、时间等的改变都将影响吸收度。另外,样品中植物残渣、树脂、糖等的存在都会影响测定的结果,特别是糖或糖苷的存在对吸收峰的位置和吸收度都有影响。

采用紫外光谱扫描的方法测定刺楸中的甾体皂苷。甾体皂苷与浓硫酸作用后在紫外波长 251 nm 处产生特征吸收峰,平均回收率为 100.2%,稳定性实验变异系数为 1.16%,精密度较高,变异系数 1.35%,测试方法较为简便可行。

2) 高氯酸

薯蓣皂苷元因不饱和结构与高氯酸在室温下即可生成黄色。薯蓣皂苷元可用此法测定,而其他皂苷元则不受干扰,但绿莲皂苷元除外。因为绿莲皂苷元与高氯酸也有类似反应,薯蓣皂苷元加高氯酸后在室温放置 10 min,在紫外波长 410 nm 处有最大的吸收,生成颜色在 30 min 内稳定可作定量。

汪忠波采用分光光度法,以香草醛-高氯酸显色,在波长 545 nm 处测定吸光

度,齐墩果酸线性关系良好,用方法结果准确,重复性好,专属性强,可用于竹节参中齐墩果酸皂苷含量的测定。

3) 硫酸-醋酐、硫酸-醋酐-冰醋酸试剂

薯蓣皂苷元与改良利伯曼试剂在 70℃ 水浴加热 4 min 生成颜色可在紫外波长 400 nm 处测量吸收度。人参中总皂苷以硫酸-冰醋酸为试剂在 60℃ 放置 25 min 后在 520 nm 处进行测定。常春藤皂苷元与醋酐-浓硫酸(1:1)反应后在 525 nm 处测量吸收度。甘草酸为三萜皂苷,经水解得甘草次酸,然后以氢化法还原为脱氧甘草次酸,再以 Huang 试剂[冰醋酸-醋酐-浓硫酸(30:60:10)]处理,在 529 nm 处比色。

4) 芳香醛-硫酸或高氯酸

在使用芳香醛为试剂的颜色反应中以香草醛最普遍,其显色灵敏,试剂空白溶液色浅。香草醛试剂常用于人参皂苷、甘草皂苷元、柴胡皂苷元、常春藤皂苷元、齐墩果酸、替告皂苷元和海柯皂苷元的测定。一般以 5% 香草醛-冰醋酸、高氯酸 60℃ 放置 15 min 后在 560 nm 处测定吸收度。

吴芬等研究报道,苜蓿皂苷以香草醛-高氯酸体系显色后,最大吸收波长为 560 nm,在 50 min 内测定结果基本稳定。

5) 其他试剂

亚甲蓝与甘草酸形成结合物可在 640 nm 处比色,2,6-二丁基-对-甲酚与甘草酸显色在 575 nm 比色。甲醛-硫酸试剂与具有 Δ^5 结构生成紫色进行测定。

6.3.4 薄层色谱法

6.3.4.1 薄层色谱-光密度计量法

一维和二维薄层色谱法是很有效的技术,已成功应用于大量植物浓缩物中分离和检测皂苷。这种技术主要的问题是:

(1) 合适标准物的平行移动使得不同薄板之间的误差和由喷雾剂产生的颜色反应之间的差异减少到最小。

(2) 薄板上的点带检测是要通过复杂的监测仪器来完成,并且要高速地处理整个薄板来获取数据。

常用硅胶板,并用氯仿-甲醇-水或正丁醇-乙酸-水展开体系测定皂苷,苯-丙酮体系测定糖苷。常使用于目测法的展开体系包括三氯化锑的氯仿饱和溶液、利伯门-伯查德试剂、磷钨酸、硫酸硒的十水合硫酸溶液,10%(体积分数)的硫酸乙醇溶液、苯酚硫酸液、5 g/L 对茴香醛溶液和体积比为 1:99 的硫酸-乙酸溶液。峰面积和标准皂苷总面积之间存在着线性关系,并发现当皂苷量在 1~5 μg 之间时其回收率达 98%,标准偏差在 3%。

林秀玉等以薄层扫描法测定益心颗粒中人参皂苷 Rg1 的含量。在现行的色

谱条件下,薄层斑点清晰,供试品色谱中,人参皂苷 Rg1 斑点与其他组分分离度良好,方法专属性、稳定性、回收率试验均良好,为益心颗粒剂质量分析提供了可靠的分析方法。

6.3.4.2 薄层色谱-比色法

大量研究结果表明,薄层色谱-比色法能定量定性分析皂苷。从植物中提取的皂苷部分可以用薄层色谱(TLC)方法分离出来并将条带刮下来,溶解到其他溶剂中。然后再用浓硫酸,高氯酸、硫酸-醋酐等显色剂显色,用比色法测定含量。

6.3.5 HPLC 法

国外已普遍应用 HPLC 分离结构相似的皂苷,近年分离皂苷使用的层析柱主要有 ODDSSilicagel、NucleosilC₁₈、S-10-ODS、 μ -Bondapak C₁₈、羟基磷灰石等。王水等人采用固相萃取和高效液相色谱相结合的测定苦瓜皂苷 A 含量的方法。样品经石墨碳固相萃取管(3 ml/250 mg)纯化后以高效液相色谱检测。色谱柱为 C₁₈,流动相为 V(乙腈):V(甲醇):V(50 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液)=25:20:60,流速为 0.8 ml/min,检测波长为 208 nm。该方法具有很好的重现性,日内或日间的相对标准偏差和相对平均误差均小于 10%,样品回收率大于 90%。

HPLC 法可分离各种皂苷,然而关键在于检测方法,因大部分皂苷显色基团不活泼,用紫外检测仪限于极短波长处。用 HPLC-UV 检测洗脱是困难的,对如此众多类型的皂苷在一次洗脱分离时靠常规检测方法也是困难的。光散射检测器(ELSD)是一种通用检测方法,其流动相由热气流使之热气化喷雾,再进入加热管,溶剂在此挥发。所得分析检测的物质颗粒通过一狭窄光束散射光由光电倍增管收集。光散射检测器(ELSD)的响应取决于被分析物质颗粒的数量和大小。由于 ELSD 仅对不挥发被分析物产生效应,即使在梯度洗脱时也能提供平稳的基线。光散射检测器已成功地应用于不挥发性成分如糖类,脂类及表面活性剂的分析,也用在皂苷的检测上。

石雪萍用 HPLC-ELSD 法测定苦瓜中皂苷 B 的含量。采用色谱柱为 Zorbax SBC18(4.6 mm×150 mm),ELSD 检测器,柱温 30℃,流动相为甲醇:水(70:30),流速 1.0 ml/min, N₂ 压力 2.0×10^5 Pa。皂苷 B 的保留时间在为 7.295 min,在浓度为 0.1058~5.290 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之间有很好的线性关系。实验结果表明此方法可以作为苦瓜皂苷的定量测定方法。

6.3.6 GC 法

由于皂苷是一个极性大分子,不容易被气化,且它在高温情况下易裂解为小分子物质,这就导致气相色谱法应用于皂苷分析受到限制。所以这种方法几乎都用

来分析皂苷糖配体。

例如,分离含有4个或更少糖配基大豆皂苷时,这种糖配体糖链必须不能是通过酯键与母体相连,否则在进样时糖配体会断裂。气相色谱法(GC)分析大豆皂苷第一步将原皂苷水解,这个过程非常重要,因为水解条件将会影响水解产物种类,很容易得到人工次生物,Ireland和Dziedzic正是在对大豆皂苷进行GC分析前水解步骤中得到皂苷精醇A、皂苷精醇B并发现皂苷精醇B、皂苷精醇C和皂苷精醇D。

人工次生物生成也为气相分析造成困难,裂解糖苷也可用标准物进行对照其保留时间。这种方法由于其局限性,现在很少用它进行皂苷分析。

6.3.7 液滴逆流层析法

选择互不相溶的溶剂系统,先将下层溶剂充入全管作固定性,要分离的样品溶于上下层(1:1)的混合溶剂中,从加样口注入纯的上层溶剂作流动相,由微型泵送入,流动相通过玻璃细管崩为小液滴连续上升,流动相液滴通过全管时按物质分配系数之差进行分离,以流分收集器自动收集流分,再用适当试剂显色或在紫外光区定量,用此法以氯仿-甲醇-正丙醇-水(45:60:6:40)混合液的下层作固定相,上层作流动相可分离人参和三七中不同流分,然后加水稀释后加酚试剂和浓硫酸显色于400 nm处进行测定。此法也被成功地应用于柴胡中柴胡皂苷a、c、d的分离。

6.3.8 毛细管电泳法分析

毛细管电泳法分析皂苷已有报道。如通过胶束电动毛细管电泳法对人参皂苷进行分析,加入pH7的硼酸盐缓冲液和25(体积分数)乙酸及75 mmol/L的胆酸盐作为改良剂。检测条件为:102 cm $\times$ 50 μ m的柱,在柱温30 $^{\circ}$ C,电压30 kV,检测波长200 nm下检测。三萜类化合物的分离是通过胶束毛细管电泳法(MECC)来测定的,其中加入磷酸-硼酸缓冲液,十二烷基硫酸钠和5%(体积分数)的丙酮溶液。72 cm $\times$ 50 μ m的柱加热到50 $^{\circ}$ C,20 kV是为了分离作准备的。这种技术的亲水化合物的电子移动时间比亲油化合物的电子移动时间要短,洗脱作用也与能观察到的流动相相似。

丁原菊等利用环糊精衍生物2-O-丙酮基-2-O-羟丙基-环糊精(2-AHP- β -CD)作为手性选择剂,提出了一种毛细管电泳快速分离、测定柴胡中柴胡皂苷a、d对映体的方法。考察了手性选择剂浓度、缓冲液浓度及其pH值对分离效果的影响,确定了最佳分离条件。结果表明,在214 nm检测波长处,在硼砂缓冲溶液中,2-AHP- β -CD能使柴胡皂苷a、d异构体在7 min内得到分离。利用该法测定了柴胡

中柴胡皂苷 a, d 的含量, 并进一步研究了方法的线性范围、检测限及精密度。

6.3.9 库仑滴定法

具有 Δ^5 的皂苷元易与卤素发生加成反应, 以含有溴化钾的酸性溶液作电解液, 在阳极上发生溴与之反应, 用双指示电极法确定终点, 此法测定薯蓣皂素中薯蓣皂苷元含量较为快速、简便。

6.3.10 极谱法

Δ^9 -海柯皂苷元、 Δ^9 -曼诺皂苷元、甘草次酸等因其结构上具有 α - β 不饱和酮, 故在滴汞电极上产生还原波, 所以用极谱法测定皂苷类化合物具有一定特点, 可以在其他皂苷元存在下进行测定, 因为大多数皂苷类化合物在滴汞电极上不发生电极反应。

徐斌等采用线性扫描极谱技术, 研究了薯蓣皂苷元(简称皂素)的极谱催化波及应用。结果表明, 在 pH5.3 $\pm$ 0.5 的 B-R 缓冲溶液、0.1 mol/L KCl 和 8×10^{-3} mol/L H_2O_2 的底液中, 皂素产生极谱催化波, 其一阶导数波的峰电位在 -1.05 V (vs. SCE) 处, 峰电流与皂素浓度在 $(1.0 \sim 8.0) \times 10^{-8}$ mol/L 范围内有良好的线性关系, 建立了测定皂素的新分析方法, 并测定了黄姜中皂素的含量。

6.3.11 电位滴定法

薯蓣皂苷元在含有 0.8 mol/L NaAc 和 0.08 mol/L $HgCl_2$ 的冰醋酸中用电位法以 0.01 mol/L Br_2 的醋酸溶液进行滴定。甘草酸利用形成甘草酸铵在甲醛存在下用 0.01 mol/L KOH 溶液进行滴定。

6.3.12 酸碱滴定法

测定甘草中甘草酸, 先以酸性丙酮浸出甘草粉末中甘草酸, 然后加入浓氨液使变成甘草酸铵沉淀, 沉淀以丙酮洗净后溶于丙酮中, 加入甲醛溶液后用 0.1 mol/L NaOH 滴定。

酸碱滴定法目前也已成为测齐墩果酸的法定方法。

6.3.13 非水滴定法

利用皂苷元分子结构中的羰基与盐酸羟胺反应后释出定量盐酸, 然后用酸碱滴定法进行滴定, 应用此法测定海柯皂苷元较为方便、快速、准确, 不需要特殊设备, 而 Δ^9 -海柯皂苷元的存在影响测定。

6.4 降血糖皂苷

6.4.1 苦瓜皂苷

6.4.1.1 苦瓜皂苷的组成和结构

苦瓜皂苷主要包括甾体类皂苷和三萜类皂苷两种。1965年, Sucrow 从苦瓜的干燥果实中提取分离出甾体类苦瓜苷(charantin 或 foetidin), 并证明它是 B-谷甾醇-B-D-葡萄糖苷和 5,26-豆甾二烯醇-3-O-D 葡萄糖苷等分子混合物。1966年, LotlikaM 从苦瓜果实中获得具有显著降糖活性的植物甾醇。1990年, 朱照静分离出化合物 24- β -乙基-5 α -胆甾-7, 反式 22E, 25(27)-三烯-3 β -羟基-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷; 1995年, 常凤岗从苦瓜果实中首次分离出胡萝卜甾醇, 国外学者还分离出更多的甾体类化合物。

苦瓜中的三萜类皂苷主要包括葫芦素烷型四环三萜和乌苏酸型五环三萜皂苷。1980年, 日本学者 Okab, 分得 2 种五羟葫芦烷三萜糖苷, 即苦瓜皂苷 A、B(momordicosides A、B), 次年 Yumi 等人从苦瓜种子正丁醇提取部分中得到 3 个新的三萜葡萄糖苷, 命名为苦瓜皂苷 C、D、E(momordicosides C、D、E), 并继续在 1982 年报道从未成熟果实的甲醇提取液中分离得到无苦味的苦瓜皂苷 G、F₁、F₂、I(momordicosides G、F₁、F₂, I) 以及有苦味的苦瓜皂苷 K、L(momordicosides K、L)。

葫芦素烷型苦瓜皂苷的结构有以下几种:

(1) 苦瓜素苷 F₁: 葫芦烷-6,23-二烯-3 β -羟基-5,19-环氧-25 甲氧基-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

(2) 苦瓜素苷 F₂: 葫芦烷-6,23-二烯-3 β ,35-二羟基-5,19-环氧-3-O- β -D-吡喃阿洛糖苷。

(3) 苦瓜素苷 G: 葫芦烷-6,23-二烯-3 β -羟基-5,19-环氧-25-甲氧基-3-O- β -D-吡喃阿洛糖苷。

(4) 苦瓜素苷 I: 葫芦烷-6,23-二烯-3 β ,35-二羟基-5,19-环氧-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

(5) 苦瓜素苷 L: 葫芦烷-5,23-二烯-3 β ,7 β ,19-三醇-25-甲氧基-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

(6) 苦瓜素苷 K: 葫芦烷-5,23-二烯-3 β ,7 β -二羟基-19-氧-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

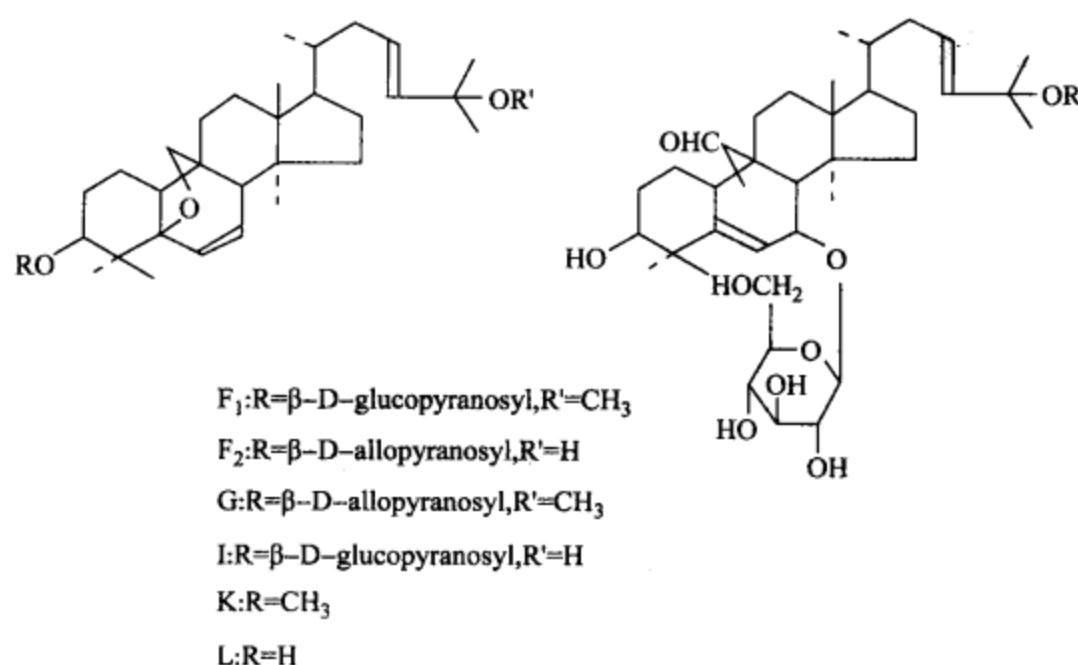


图 6-2 几种苦瓜皂苷的结构

6.4.1.2 苦瓜皂苷的降血糖作用

大量的研究表明苦瓜皂苷具有降血糖作用。潘华等通过食用苦瓜素试图使高血糖模型小鼠血糖值恢复到正常水平,静脉注射 48 mg/kg 四氧嘧啶 3 d 后,选择高血糖模型动物分别用不同剂量苦瓜素连续灌胃 10 d,然后取血测血糖。结果表明,苦瓜素对肾上腺素(20 mg/kg)、葡萄糖(2 g/kg)和四氧嘧啶引起的高血糖均具有明显降血糖作用。孙宝莹等给正常大鼠和患四氧嘧啶糖尿病的大鼠服用苦瓜皂苷、格列本脲(优降糖)。结果显示治疗组血糖由给药前的 (14.18 ± 3.56) mmol/L 降至为给药后的 (5.93 ± 1.29) mmol/L ($P < 0.001$),对照组由给药前的 (13.01 ± 1.91) mmol/L 降至为给药后的 (4.88 ± 1.1) mmol/L ($P < 0.001$)。给家兔口服苦瓜皂苷,可降低血糖,作用方式与甲苯磺丁脲相似而较强;对摘除胰脏的猫,降血糖作用并未完全消失。可见其降血糖包括对胰脏及非胰脏的两种作用。王梅芳等报道,由苦瓜中提取的苦瓜皂苷制成的降糖胶囊 11 号,治疗 2 型糖尿病 100 例,疗程 3 个月,多数病人在服药 2 个月内临床症状消失,有效率达 82%。

6.4.1.3 苦瓜皂苷的降血糖机制

苦瓜皂苷降血糖作用的原因之一,可能是与糖皮质激素有关。王先远等实验结果表明,使用苦瓜皂苷的大鼠,禁食后血糖水平略有升高 4%~7%,重新进食后血糖水平明显降低。这说明苦瓜皂苷可使机体进食后维持适度血糖浓度,供给机体需要,防止血糖过高。苦瓜皂苷的这种作用可能部分与糖皮质激素有关。因为禁食应激致使血浆 TC 增高,苦瓜皂苷进一步增强此升高趋势($P < 0.05$),高水平糖皮质激素促进了机体分解代谢,致使糖异生增加。从而增加对血糖的供应,所以

高剂量苦瓜皂苷组血糖含量明显高于低剂量组;而进食后 TC 水平明显降低,低水平糖皮质激素导致机体合成代谢升高。

苦瓜皂苷降血糖作用的原因之二,可能是与其参与调节酶活性有关。文献报道,苦瓜可抑制葡萄糖-6-磷酸酶和果糖-1,6-二磷酸酶活力,从而抑制糖异生,调节细胞色素氧化酶 P450 活性,增强红细胞、肝脏中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活力,加速葡萄糖氧化;同时,葡萄糖-6-磷酸酶是糖原分解代谢酶-糖原磷酸化酶的抑制剂,葡萄糖-6-磷酸酶活性下降,对后者活性的抑制减轻,糖原分解代谢减弱,机体转而依靠血糖供能,这既降低了血糖水平,又可使糖原保持较高水平,这也正是两实验组动物肌糖原和肝糖原增加的原因。

苦瓜皂苷降血糖作用的原因之三,苦瓜皂苷可能具有催化葡萄糖转化为脂肪之功能,所以进食后血糖水平显著降低。饥饿状态下,胰岛素水平较低。进食后,由于血糖升高,胰岛素分泌也明显升高。虽然有研究认为,苦瓜可能有助于糖尿病大鼠 β 细胞的更新或者是使遭破坏的 β 细胞恢复,从而显著增加糖尿病大鼠胰岛 β 细胞数(尽管其数量依然明显低于正常大鼠),但研究结果显示苦瓜皂苷并不影响血中胰岛素水平。原因可能是苦瓜中的其他有效成分而不是苦瓜皂苷作用于胰岛 β 细胞。这也从另一个方面说明,苦瓜皂苷可能是通过调节糖皮质激素水平,调节酶活力,刺激糖原合成来降低血糖水平的。至于苦瓜皂苷降血糖作用是否与其参与调节苯胺羟化酶、 γ -谷氨酸转移酶、碱性磷酸酶和丙氨酸氨基转移酶活力有关,尚需继续探讨。

6.4.2 刺五加皂苷

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 为五加科(Araliaceae)五加属(*Acanthopanax*)植物刺五加的干燥根及根茎。该植物主要分布在中国东北、华北、俄罗斯远东地区及日本北海道、朝鲜等地,我国黑龙江野生资源丰富。近年来研究发现刺五加皂苷具有降血糖作用。

6.4.2.1 刺五加皂苷的组成和结构

Kujawa 等从刺五加根的甲醇提取物中分离出 2 种三萜皂苷,为原报春花素 A (Protoprimulagenin A) 的糖苷。近些年对刺五加茎叶的研究不断深入,张芳红等从叶中分离得到齐墩果酸为配基的五加叶苷 I、K、L 和 M 等 J。Shao 等在刺五加叶中发现了 13 种新的化合物,命名为 Ciwujianoside(刺五加苷)-A1、A2、A3、A4、B、C1、C2、C3、C4、D1、D2、D3 和 E,均为三萜皂苷,A3、A4、D3 的苷元为首次从自然界中分离出来。Sang-Yong Park 等人从无刺刺五加(*Acanthopanax senticosus* forma *inermis*)叶的甲醇提取物获得 4 种新的三萜类化合物,均为 3,4-开环-羽扇豆烷型-三萜苷(其结构见图 6-3)。

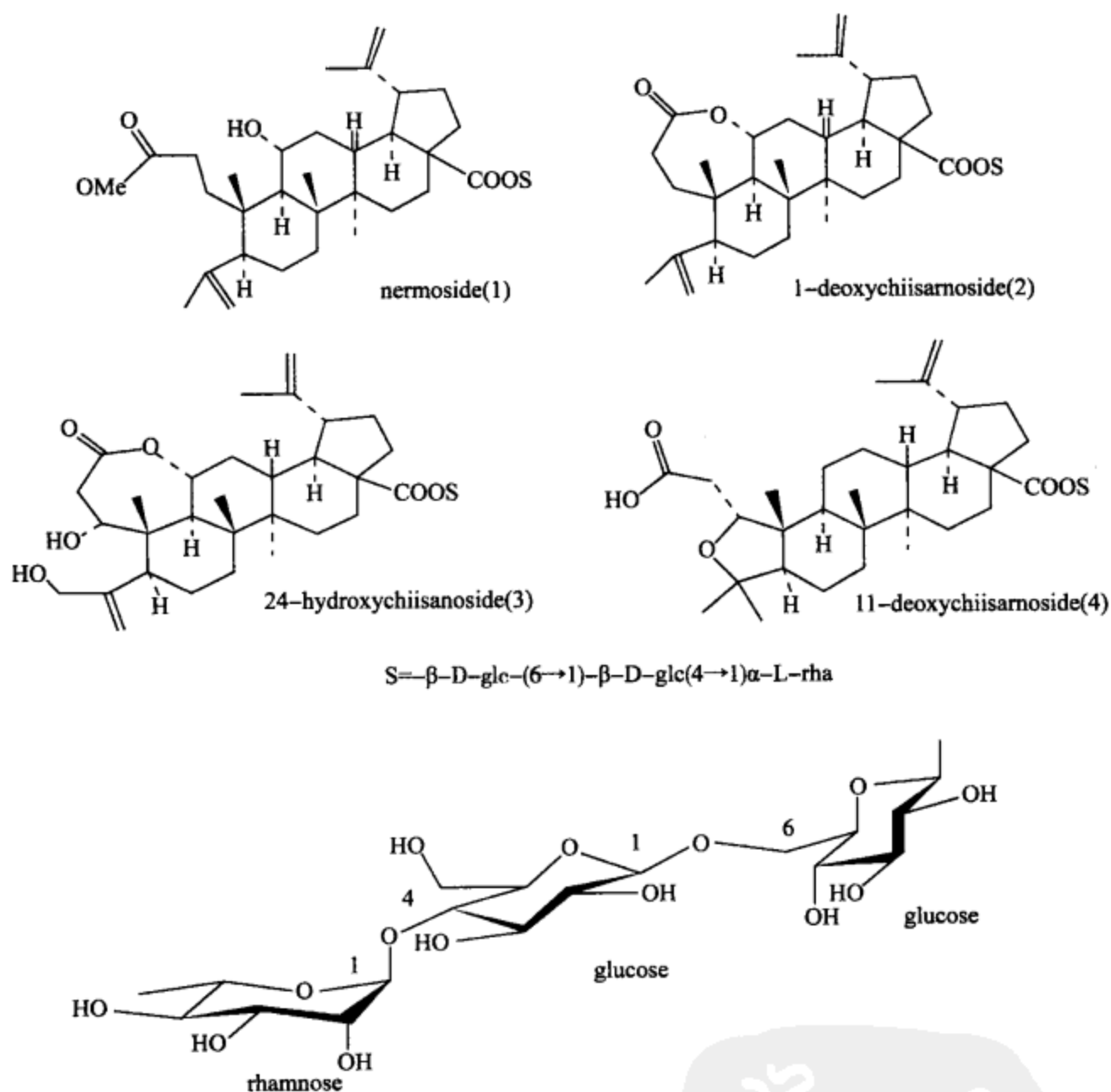


图 6-3 4 种新的三萜苷化合物

6.4.2.2 刺五加皂苷的降血糖作用

辛建华采用静脉注射四氧嘧啶诱导大鼠化学性糖尿病,观察大鼠血糖、血脂和氧自由基代谢的情况,刺五加显著降低空腹血糖(FBG)、血清胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和脂质过氧化物(LPO),升高全血超氧化物歧化酶(SOD)活性,提示刺五加具有降糖作用,同时具有降血脂、改善氧自由基代谢紊乱的药理活性,有助于糖尿病并发症的防治。

刘传密将患有 2 型糖尿病患者 25 例在常规西药治疗的基础上加用黄芪注射液联合刺五加注射液,总有效率 92%;而单用西药治疗总有效率 55%。有显著性差异($P<0.05$)。

6.4.2.3 刺五加皂苷的降糖作用机制

孟德欣等在刺五加皂苷治疗糖尿病并发心肌病变的研究中发现,糖尿病心肌病变时心肌的乳酸脱氢酶(LDH)和异柠檬酸脱氢酶(ICDH)活性均明显降低。使用刺五加叶皂苷治疗后,其活性均有明显升高,这说明刺五加叶皂苷能改善糖尿病心肌的能量代谢障碍,增强心肌功能。其机制可能为:

(1) 减弱链脲佐菌素(STZ)对胰岛 β 细胞的损伤,改善受损伤的 β 细胞的功能,增加胰岛素的分泌,从而降低中间代谢产物乙酰辅酶A等的含量,减少了其对心肌酶活性的抑制。

(2) 降低氧自由基对酶的损害,氧自由基可使酶分子发生聚合交联,影响酶的活性;修饰酶分子活性中心的氨基酸,使酶活性部位的巯基氧化,导致酶活性丧失;与酶分子中金属离子反应从而影响酶的活性。刺五加皂苷降低心肌中的氧自由基,使酶免受自由基的侵害,从而升高酶的活性。

王柏欣等应用小剂量腹腔内间断注射四氧嘧啶复制了大鼠糖尿病模型。糖尿病对照组大鼠在5周内处于高血糖水平,刺五加皂苷灌胃喂养4周后,大鼠血糖水平虽然高于正常对照组,但显著低于糖尿病对照组及本组饲以刺五加皂苷前的血糖水平,这一结果说明刺五加皂苷对实验性糖尿病大鼠血糖水平有降低的作用。糖尿病对照组大鼠的血浆、胰腺和肌肉组织内过氧化脂(LPO)含量明显高于正常对照组的结果表明,四氧嘧啶引起了大鼠体内过氧化反应增强,而喂饲刺五加皂苷的大鼠体内这些组织的LPO含量明显低于糖尿病组,与正常对照组基本一致。这说明刺五加皂苷能对抗四氧嘧啶引起的过氧化反应增强的作用。实验中,王柏欣等也对抗氧自由基的超氧化物歧化酶(SOD)活性做了检测。糖尿病对照组大鼠红细胞和胰腺组织SOD活性明显降低。结果提示:刺五加叶皂苷降低糖尿病大鼠血糖的作用是与其提高抗氧自由基酶类活性、消除过氧化伤害从而对抗四氧嘧啶的毒性是密切相关的。

扈清云等研究刺五加叶皂苷(ASS)对2型糖尿病大鼠胰岛素分泌影响及胰腺的形态学改变。应用放射免疫学方法对正常组和模型组大鼠,在给予ASS后其空腹及口服葡萄糖后血浆中胰岛素变化测定;HE染色法观察正常组和模型组胰腺的形态学改变。结果:ASS可增强2型糖尿病大鼠胰岛素分泌,对正常大鼠无影响;在模型组可见胰岛数量减少,胰岛细胞稀疏,排列不规则。表明ASS可以促进2型糖尿病大鼠胰岛素分泌,对胰岛 β 细胞具有保护作用。

6.4.3 其他皂苷降糖作用

6.4.3.1 甘草皂苷

甘草为豆科甘草属植物,截止到目前在我国已发现的有乌拉尔甘草(G.

Uralensis)、光果甘草(*G. Glabra*)、胀果甘草(*G. Inflata*)、刺果甘草(*G. Pavidiflora*)、黄甘草(*G. Kansuensis*)、粗毛甘草(*G. Aspera*)、园果甘草(*G. Squamulosa*)和云南甘草(*G. Yunnanensis*)等8个品种,其中被药典收载作为药用的主要是乌拉尔甘草、黄甘草、胀果甘草、光果甘草4种。甘草中三萜皂苷种类较多,目前从甘草分离的三萜皂苷有:乌拉尔甘草皂苷甲、乌拉尔甘草皂苷乙、甘草酸、甘草皂苷 A3、甘草皂苷 D3、甘草皂苷 B2、黄甘草皂苷、胀果皂苷、甘草皂苷 E2、甘草皂苷 C2、云南甘草次皂苷 D 等。

甘草三萜皂苷具有一定的结构特点。甘草三萜皂苷一般为在3-羟基上的氧苷,糖的类型多为D-葡萄糖酸,也有的为D-葡萄糖。除3- β -羟基糖苷外,也有的在C30的羧基上和C21位羟基上。糖的个数一般为双糖,也有的为三糖苷。糖的接点大多为1'位,极个别的为2'位。

6.4.3.2 大豆皂苷

根据其化学结构可分为三萜皂苷和甾体皂苷两大类。

日本的Kitagawa等人 and Kudou 等人分别详细地研究了大豆中的皂苷类物质,并对分离到的大豆皂苷进行命名。Kitagawa 等确认大豆中存在以大豆皂苷原 B(soyasapogenol B)为配基的大豆皂苷 I、II、III、IV 和 V 型5种,以及以大豆皂苷原为配基的大豆皂苷 A1、A2、A3、A4、A5 及 A6 等6种。如果操作条件温和,还可分离到 C-22 末端糖链全乙酰化的 A 系列大豆皂苷, Kudou 等把此类成分命名为 Aa-Ah。在发现 DDMP 大豆皂苷之前,以大豆皂原 B 为配基的 B 系列大豆皂苷分别命名为 Ba、Bb、Bb'、Bc 及 Bc',而以大豆皂原 E 为配基的 E 系列命名为 Bd 和 Be。

Shimoyomada 研究指出,大豆皂苷在大豆中的分布主要集中于胚轴,是子叶中皂苷含量的8~15倍。Shiraiwa 等对数百个大豆品种的分析表明,大豆胚轴中皂苷含量为0.62%~6.12%均远远高于子叶中的皂苷含量,而大豆种皮中几乎不含皂苷成分。

全吉淑等在普通饲料中添加20 g/kg 富含大豆皂苷的大豆胚轴提取物,饲喂 Wistar 正常大鼠和 GK/Jcl(Goto-Kakizaki)2 型糖尿病大鼠20周,观察其血糖和葡萄糖耐量变化及对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性。结果发现长期食用大豆皂苷的大豆胚轴提取物能显著降低2型糖尿病大鼠血糖水平,明显改善其葡萄糖耐量,同时能改善正常大鼠葡萄糖耐量。在糖尿病相关酶的抑制试验中,B类、E类和 DDMP 皂苷显示很强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,其50%抑制浓度(IC₅₀)值为10~40 $\mu\text{mol/L}$;表明大豆胚轴提取物具有降低糖尿病大鼠血糖水平和改善糖耐量的作用,其部分作用机制可能是通过大豆皂苷对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用而实现的。

6.4.3.3 葫芦巴

葫芦巴(*Trigonella Foenum-graecum* L.)系豆科蝶形花亚科植物,其皂苷成分含量很高,具有降血糖作用。

葫芦巴中皂苷都是以 diosgenin (25R) 及其差向异构体 Yamogenin (25S)、Tigogenin 及其差向异构体 Neotigogenin 和呋甾醇为苷元,前两者又称为“螺甾烷醇”类皂苷元,而后者称为呋甾醇类皂苷元。迄今为止,从葫芦巴中分得的皂苷的糖链一般都连在 3 位羟基上,个别在 6 位上也有糖链。糖的种类一般是葡萄糖、鼠李糖、木糖,而 Graecunin. E 是首次从葫芦巴中分离得到的天然界中罕见的四糖链皂苷。目前发现的葫芦巴皂苷的成分如下: Diosgenin、3-O-2-1-Rhammoside- β -d-Glucoside-dopsngenin、3-1-Rhammoside- β -D-Glucoside-dopsngenin、3-O-D-Glucoside-diosagenin、Yamogenin、Gotogenin、Neogitogenin、Tigogenin、Neotigogenin、Trigoneoside Ia、Trigoneoside II a、Trigoneoside III a、Trigoneoside III b、22-O-methyl-52-furostan-3 β , 22, 26-triol, 3-O-2-[-rhap (1-2) β -dglu (1-3)- β -D-glucopyranode-26-O- β -D]-glucopyranoside、Trigofoenoside A、Trigofoenoside A1、Trigofoenoside B、Trigofoenoside B1、Trigofoenoside C、Trigofoenoside C1、Trigofoenoside D、Trigofoenoside D1、Trigofoenoside E、Trigofoenoside E1、Trigofoenoside F、Trigofoenoside F1、Trigofoenoside G、Trigofoenoside G1、Sarsasapogenin 等。

卢芙蓉等观察葫芦巴总皂苷(TFG)与磺脲类降糖药(SU)合用对继发性失效 2 型糖尿病的临床疗效。72 例单纯使用 SU 而血糖控制不良的 2 型糖尿病患者,按就诊顺序随机分为对照组(36 例)和治疗组(36 例),在服用 SU 的基础上,分别加服安慰剂和 TFG,观察其疗效。结果:治疗组总有效率明显高于对照组($P < 0.01$);与治疗前相比,治疗组空腹血糖、餐后 2h 血糖、糖化血红蛋白、临床症状积分显著下降($P < 0.01$),体重指数和肝肾功能无明显变化。表明 TFG 联合 SU 治疗 2 型糖尿病,显示了较好的降糖效果,同时能改善临床症状,且有较好的安全性。

6.4.3.4 绞股蓝皂苷

绞股蓝[*Cynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makion]为葫芦科(Cucurbitaceae)多年生草质藤本植物,别名小苦药、公罗锅底、五叶藤、遍地生根等,日本因其有甜味称为甘茶蔓。绞股蓝是一种非常重要的中草药,其具有一定的降糖作用。

1976 年日本学者永井正博(Masahiro Nagai)首次揭示了绞股蓝含有达玛烷型人参皂苷类成分。1976~1987 年 10 年间,日本学者竹本常松等人相继从中分离鉴定了 82 种皂苷,其中 4 种皂苷即 Gyp-3、4、8、12 分别与 4 种人参皂苷即 Gin-Rb1、Rb3、Rd、F2 同物异名,自此也掀起了各国对绞股蓝的研究热潮。截至目前,共分离得到 84 种皂苷,与人参相同的多达 6 种。

绞股蓝皂苷的基本化学结构是 18 种达玛烷型的苷元(图 6-4)。其中 Gyp-39、

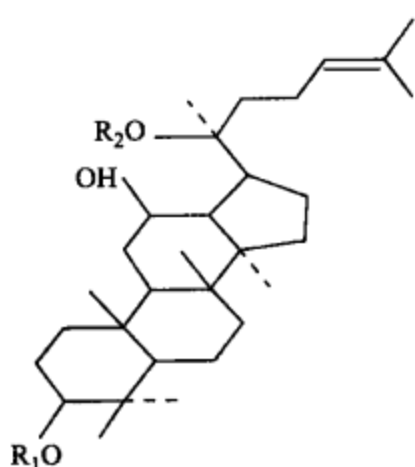


图 6-4 绞股蓝皂苷的基本化学结构

40、51、53 属于 R-构型,其余为 S-构型。除了 4 种与 人参皂苷同物异名外,还有许多绞股蓝皂苷产生的 次生苷、苷元和次级苷元与人参皂苷的水解产物相 同。从结构分析,有的绞股蓝皂苷正好是其他皂苷 失去部分糖基的产物。由于达玛烷型皂苷具有热不 稳定性,而一般的皂苷提取都要经过热处理,因此尚 难确定 84 种绞股蓝皂苷是否全部是植物体的原生 成分。

陈宏卫等观察绞股蓝皂苷对链脲佐菌素造模的 糖尿病大鼠血糖的影响。结果发现绞股蓝皂苷治疗 4 周后,糖尿病大鼠空腹血糖、胰岛素、血清三酰甘 油、总胆固醇水平、血清过氧化脂质含量均比对照组 明显降低,血清超氧化物歧化酶活性明显升高。提示绞股蓝皂苷具有降糖、降脂及 可能有抗氧化作用。

6.4.3.5 罗汉果皂苷

罗汉果,学名“光果木鳖”是我国传统的药用植物,在广西民间的药用历史已有 300 多年。

自从 1975 年 Lee 首先报道罗汉果果实中含有三萜甜味苷以来,迄今已从罗汉 果果实中分离并鉴定了罗汉果皂苷Ⅳ、罗汉果皂苷Ⅴ、罗汉果皂苷Ⅲ、罗汉果皂苷 ⅡE、罗汉果皂苷ⅢE、罗汉果皂苷Ⅵ、罗汉果皂苷A、罗汉果新苷、赛门苷Ⅰ、11-O- 罗汉果皂苷Ⅴ、罗汉果二醇苯甲酸酯共 11 种葫芦素烷三萜苷类(cucurbitane glycoside)化合物。这些化合物除少数为无甜或苦味物质外,大多为甜味成分或微 甜物质,其中罗汉果皂苷Ⅴ为罗汉果果实中含量和甜度(为蔗糖甜度的 256~344 倍)均较高的成分,是主要的甜味成分。赛门苷Ⅰ是目前发现的葫芦素烷三萜苷中 最甜的成分,在万分之一浓度时为 5%蔗糖甜度的 563 倍。研究表明罗汉果皂苷是 一种三萜烯葡萄糖苷,其配糖苷原是三萜烯醇。两条由四个以下葡萄糖单位组成 的葡萄糖苷侧链以 β -糖苷键与苷原相连,在侧链葡萄糖之间的连接键为 β -1,6 和 β -1,2 糖苷键。罗汉果皂苷属葫芦素烷型化合物,它们具有共同的苷原罗汉果醇 (图 6-5),其主要差别在于连接的糖基不同和个别苷的 11 位-OH 被氧化成=O,其 基本结构见图 6-6。

陈维军等探讨罗汉果皂苷提取物(mogroside extract, MG)对 1 型糖尿病小鼠脾 脏淋巴细胞亚群及细胞因子表达的影响。给予 Bal b/c 小鼠腹腔注射 200 mg/kg·bw 四氧嘧啶造模(T1DM)。成模后按血糖随机分为,糖尿病对照组,低、高剂量 MG 治疗组(150、300 mg/kg·bw);正常小鼠也按血糖随机分为正常对照组以及低、高剂

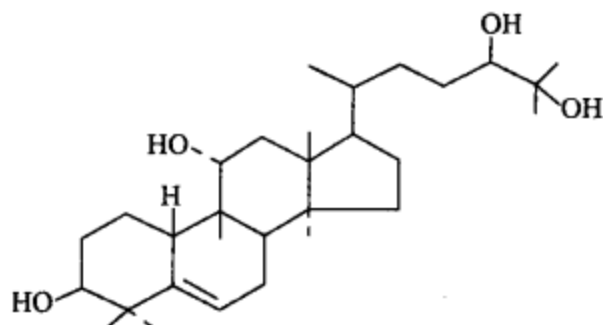


图 6-5 罗汉果醇的结构

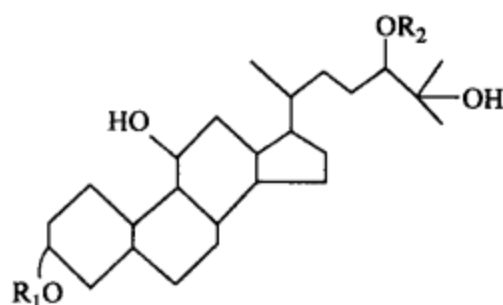


图 6-6 罗汉果皂苷的结构

量 MG 组。连续灌胃 30 d, 实验结束时测小鼠血糖水平, 流式细胞仪检测脾脏淋巴细胞 CD4、CD8 亚群以及细胞因子 IFN- α , TNF- α 和 IL-4 的表达, 并观察胰腺组织学变化。结果与正常对照组相比, T1DM 小鼠血糖显著升高, 脾脏 CD8 淋巴细胞数目显著增加, CD4/CD8 比值降低; IFN- α 、TNF- α 的表达水平升高。MG 尤其是低剂量组能降低血糖, 改善胰腺的病变程度以及下调 IFN- α 、TNF- α 的表达水平, 增加 T1DM 小鼠脾脏 CD4 淋巴细胞数目, 使 CD4/CD8 比值恢复正常。此外, 还可显著增加正常小鼠和 T1DM 小鼠脾脏淋巴细胞 IL-4 的表达水平, 但对正常小鼠其他各项指标无明显影响。表明 MG 能通过免疫调节机制对 T1DM 小鼠脾脏淋巴细胞的抗原表达进行调控, 拮抗 T1DM 时出现的细胞免疫功能失衡, 进而对 T1DM 起到一定的治疗作用。

6.4.3.6 蒺藜皂苷

蒺藜 (*Tribulus terrestris* L.) 为蒺藜科蒺藜属植物, 其果实、花及根在我国有悠久的用药历史。

目前已经分离的蒺藜皂苷有: 延龄草苷、薯蓣二葡萄糖苷、纤细薯蓣苷、原薯蓣苷、原纤细薯蓣苷、蒺藜苷 F、新海柯皂苷、Tribulosin、terrestrosin A、terrestrosin B、terrestrosin C、terrestrosin D、terrestrosin E、terrestrosin F、terrestrosin G、terrestrosin H、terrestrosin I、terrestrosin J、terrestrosin K、海柯皂苷元-3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷、26-O- β -glucopyranosyl-3-O- $\{[\beta$ -D-xylopyranosyl(1-3)] $\}$ - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucopyranosyl]-5 α -furost-20(22)-en-12-one-3 β , 26-diol, 26-O- β -glucopyranosyl-3-O- $\{[\beta$ -D-xylopyranosyl(1-3)] $\}$ - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-glucopyranosyl]-5 α -furostan-12-one-3 β , 22, 26-triol、海柯皂苷元-3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1-2)- β -D-吡喃葡萄糖(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷、海柯皂苷元-3-O- β -D-吡喃木糖(1-3)- β -D-吡喃葡萄糖(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷、26-O- β -D-吡喃葡萄糖-3 β , 5 α , 25R-呋甾-22-甲氧基-3-O- β -D-吡喃-木糖(1-2)- β -D-吡喃木糖(1-3)- β -D-吡喃葡萄糖(1-4)- β -D-吡喃鼠李糖(1-2)- β -D-吡喃-半乳糖苷、26-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(25R,S)-5 α -呋甾-

22-羰基-20(22)-烯-3 β -26-二醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷、26- β -D-吡喃葡萄糖基-(25R)-5 α -呋甾-12-羰基-3 β , 22, 26-三醇-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基(1-2)- β -D-吡喃半乳糖苷、26-O- β -D-glucopyranosyl-(25S)-5 β -furost-22(22-en-3 β , 26-diol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)-[β -Dglucopyranosyl(1-4)]- β -D-galactopyranoside、25(S)-5 β -spirostan-3 β -ol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)-[β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranosideI、新海柯皂苷元-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基(1-2)- β -D-吡喃葡萄糖基(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷、新海柯皂苷元 3-O- β -D-吡喃葡萄糖(1-4)- β -D-吡喃半乳糖苷。

李明娟等研究蒺藜皂苷的降血糖作用。以四氧嘧啶所致糖尿病小鼠,以苯乙双胍(降糖灵)为阳性对照药,灌胃 10d 后,测定小鼠血清葡萄糖、三酰甘油、胆固醇及超氧化物歧化酶(SOD)等生化指标。结果蒺藜皂苷能显著降低正常小鼠和四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的血糖水平,降糖率分别为 26.25%和 40.67%;蒺藜皂苷在降低血糖的同时,能够显著降低糖尿病小鼠血清三酯酰甘油水平,其降低率为 23.35%,对血清胆固醇含量也有一定的降低趋势;同时蒺藜皂苷还能够显著提高血清 SOD 活力。表明蒺藜皂苷具有明显的降血糖作用。

参考文献

- [1] 魏晓玲,孙海洲,卢德勋,等. 苜蓿总苷提取工艺的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2007, 3: 28-29.
- [2] 贺玉薇,王松柏,王代军,等. 苜蓿皂苷提取工艺研究[J]. 草原与草坪, 2005, 5: 27-29.
- [3] 王昌利,张振光,杨景亮. 超声提高薯蓣皂苷得率的实验研究[J]. 中成药, 1994, 16(4): 7-9.
- [4] 宋小妹,崔九成,张军. 超声法提取绞股蓝总皂苷的工艺研究[J]. 中成药, 1998, 20(5): 4-6.
- [5] 刘勇,王永雄. 超声波法提取苜蓿皂苷最适条件的研究[J]. 草业与畜牧, 2006(9): 8-10.
- [6] 朱晓韵,何超文. 微波技术在鲜罗汉果甜苷提取中的应用[J]. 广西轻工业, 2002, 2: 11-13.
- [7] 龚盛昭,曾海宇,陈秋基. 微波场协同提取远志皂苷的研究[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(1): 36-38.
- [8] 葛发欢. 超临界 CO₂ 从黄山药中萃取薯蓣皂素的工艺研究[J]. 中草药, 2000, 31(3): 181-184.
- [9] 盛桂华,周泉城. 超临界 CO₂ 萃取瓜蒌皂苷研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(9): 56-58.
- [10] 孙秀梅. 芍甘止痛颗粒剂 4 种提取方法比较[J]. 中国中药杂志, 1996, 11: 3-5.
- [11] 高晓明,张效林,李振武. 苦瓜皂苷的复合酶法提取与大孔树脂纯化工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2006, 23(3): 51-53.
- [12] 李丽华,陈锦屏. 皂苷的提取纯化方法及其生物活性的研究进展[J]. 农产品加工, 2008, 1: 60-62.
- [13] 金婷. 皂苷的保健药理作用与提取分离研究进展[J]. 食品工程, 2008, 1: 19-22.

- [14] 许舒雯,龚祝南,丛晓东,等. 大孔树脂分离纯化苜蓿皂苷工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2006,34(13):3176-3177.
- [15] 余从洪,郭江宁,温锦涛,等. AB-8 大孔树脂分离纯化苜蓿总皂苷的研究[J]. 中国健康文摘,2006,3(9):1-2.
- [16] 古燕翔,张国良,魏芸,等. 大孔吸附树脂分离富集苜蓿皂苷的研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19:504-507.
- [17] 陈勋. 苦瓜皂苷快速分离纯化方法研究[J]. 食品科学,2004,25(2):114-117.
- [18] Takabe S. Triterpenoid Glycosides from the Roots of *Tetrapanax papyrifera* K KOCH. III: Structure of Four New Saponins[J]. Chem. Pharm. Bull, 1985, 33: 4701-4703.
- [19] Akai E. Minor Triterpenoid Saponins from the leaves of *Bupleurum rotundifolium* L[J]. Chem. Pharm. Bull, 1985, 33: 4685-4687.
- [20] Nonaka M. Chemical constituents from the Roots of *Medicago sativa*[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 73-75.
- [21] Jurzysta M. A simple method of quantification of biologic active alfalfa saponins by *Trichoderma viride* growth[J]. Biul. Branz Hod Roslin, 1979, 1: 16-18.
- [22] Nonaka M. Variable sensitivity of *Trichoderma viride* to *Medicago sativa* saponins[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 73-75.
- [23] 何云,王艳荣,王彦华,等. 苜蓿皂苷提取测定研究进展[J]. 广东农业科学,2008,1:82-84.
- [24] 黄贤校,谷克仁,周菲. 紫外分光光度法测定大豆皂苷含量[J]. 粮食与油脂,2005,10: 44-45.
- [25] 杨华明,祁红伟. 紫外分光光度法测定糖肽酮萜素中大豆总皂苷含量[J]. 中国饲料,2004, 22:24-25.
- [26] 董怀海,符文英. 比色法测定大豆总皂苷的研究[J]. 中国油脂,2001,26(3):57-59.
- [27] 张健,李芳. 蒺藜甾体皂苷的测试[J]. 中医药研究,2000,16(4):48-49.
- [28] 汪忠波,敖明章. 分光光度法测定竹节参中齐墩果酸皂苷含量[J]. 安徽农业科学,2007, 35(26):8094-8095.
- [29] 吴芬,赵大云,史贤明. 利用皂苷元特征显色测定苜蓿皂苷含量的快速检测方法[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(3):226-229.
- [30] 林秀玉,安丽君. 薄层扫描法测定益心颗粒中人参皂苷 Rg₁ 的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2001,28(3):186-186.
- [31] 石雪萍,姚惠源. 植物皂苷测定方法的进展[J]. 理化检验. 化学分册,2007,436:518-520.
- [32] 石雪萍,姚惠源. HPLC-ELSD 测定苦瓜皂苷的含量[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(3): 471-473.
- [33] 丁原菊,陆玮洁,主沉浮,等. 毛细管电泳法对柴胡中柴胡皂苷 a 与 d 对映体的分离和测定 [J]. 山东大学学报:工学版 2006,36(5):120-124.
- [34] 徐斌,艾征. 薯蓣皂苷元的极谱催化波及其应用[J]. 分析化学,2005,33(7):981-984.
- [35] 杜志德,来玉梅. 皂苷及其苷元分析方法研究进展[J]. 西北药学杂志,1991,1:42-44.

- [36] 李健,张令文. 苦瓜皂苷的研究进展[J]. 食品研究与开发,2005;3:21-24.
- [37] 赵海雯. 苦瓜皂苷降血糖功能的研究概况[J]. 农产品加工. 学刊,2007. 9:24-25.
- [38] 潘华,乔伟伟. 苦瓜素对小鼠降血糖作用[J]. 上海实验动物科学,2002,3:187-189.
- [39] 孙宝莹等. 苦瓜皂苷的药效学实验研究[J]. 河南中医药学刊,1994,9(6):19-21.
- [40] 王梅芳. 中药及其复方制剂治疗Ⅱ性糖尿病的研究近况[J]. 中成药,2001,23(4):281-285.
- [41] 王先远,金宏,许志勤,等. 苦瓜皂苷降血糖作用及机制初探[J]. 氨基酸和生物资源,2001,23(3):42-45.
- [42] Kujaws E S. Triterpenoid Saponins of *Eleutherococcus Senticosus* Roots[J]. J Nat Prod, 1991, 54(4): 1044-1045.
- [43] 张芳红,钟静芬,金家骅,等. 齐墩果酸在甘肃产八种五加科植物中的分布规律[J]. 中药材,1994,17(9):29-31.
- [44] Shao C J. Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms[J]. Chem Pharm Bull, 1989, 37(1): 42-44.
- [45] Park S Y, Chang S Y, Yook C S, et al. New 3, 4-seco-Lupane-type triterpene glycosides from *Acanthopanax seticosus* forma *inermis*[J]. J Nat Prod, 2000, 63: 1630-1633.
- [46] 张晶,刘芳芳,陈彦池,等. 刺五加化学成分及药理学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2007,2:6-9.
- [47] 辛建华. 刺五加注射液治疗四氧嘧啶化学性糖尿病实验研究[J]. 武汉大学学报(医学版),2002,23(2):155-157.
- [48] 刘传密. 黄芪注射液联合刺五加注射液治疗2型糖尿病25例疗效观察[J]. 中国药房,2001,12(10):612.
- [49] 孟德欣,邢德刚,张义栋. 刺五加叶皂苷对实验性非胰岛素依赖型大鼠心肌酶的影响[J]. 黑龙江医药科学,2001,24(5):10-12.
- [50] 王柏欣,王淑湘,谭宏,等. 刺五加叶皂苷对糖尿病大鼠脂质过氧化物的作用[J]. 黑龙江医药科学,2004,27(2):1-2.
- [51] 扈清云,李艳君,王景涛,等. 刺五加叶皂苷对2型糖尿病大鼠胰岛素分泌影响的形态学研究[J]. 黑龙江医药科学,2003,2696:21-22.
- [52] 徐志栋,王敏,康怀萍. 甘草属植物三萜成分研究概况[J]. 河北轻化工学院学报,1998,19(1):10-15.
- [53] Fenwick G R, Price K R, Tsukamoto C, et al. Saponins[A]. //In: Mello F J PD, Duffus CM, Duffus J H (eds.), Saponins in toxic substances in cmp plants[M]. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991: 285-327.
- [54] Kudou S, Okubo K, Uchida T T, et al. Soybean saponin and isoflavonoids: structure and an -tivial activety against humen ipmunodefeieney virus in vitro[C]. ACS Symposium Seiries, 1994, 546: 330-339.
- [55] Shiraiwa M, Yamauchi A. Inheritance of group A saponin in soybean seed[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(6): 1347-1352.

- [56] Shiraiwa M. Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(2): 315-322.
- [57] 孟凡钢, 富健, 王新风, 等. 大豆皂苷研究进展与应用[J]. *中国农业科技导报*, 2007, 9(4): 66-72.
- [58] 全吉淑, 尹学哲, 田中真实, 等. 大豆胚轴提取物的降糖作用及其机制研究[J]. *营养学报*, 2004, 26(3): 207-210.
- [59] 周淑晶. 中药葫芦巴的化学成分研究进展[J]. *中药研究与信息*, 2000, 2(50): 18-21.
- [60] 卢芙蓉, 沈霖, 秦铀, 等. 葫芦巴总皂苷联合磺酰脲类降糖药治疗 2 型糖尿病 36 例临床观察[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(2): 184-187.
- [61] 张涛, 袁弟顺. 绞股蓝的功效成分与绞股蓝皂苷研究进展[J]. *江西农业学报*, 2008, 20(9): 60-63.
- [62] Masahiro N. Wo glycosides of nonel demmarane alcohol from *Gynostemma pergapphy llm* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(3): 779-783.
- [63] 竹本常松. 葫芦科植物的成分研究-绞股蓝的皂苷成分[J]. *国外医学: 中医中药分册*, 1985, 7(4): 30-32.
- [64] 覃章铮, 赵蕾, 毕世荣, 等. 绞股蓝的皂苷成分及资源[J]. *天然产物研究与开发*, 1992, 4(1): 83-98.
- [65] 陈宏卫, 张在和. 绞股蓝皂苷对糖尿病大鼠降糖作用的观察[J]. *中国糖尿病杂志*, 1997, 5(4): 229-230.
- [66] 齐一萍, 唐明仪. 罗汉果果实的化学成分与应用研究[J]. *福建医药杂志*, 2001, 23(5): 158-160.
- [67] Matsumoto K, Kasai R, Ohtani K, et al. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Simtia grosvenori*[J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(7): 2030-2032.
- [68] Kasai R, Nie R. L., Nash K., et al. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Simtia grosvenofi* a Chinese folk medicine[J]. *Agri Biol Chem*, 1989, 53(12): 3374-3376.
- [69] 张俐勤, 戚向阳. 罗汉果皂苷及药理活性研究进展[J]. *广西热带农业*, 2005, 6: 22-24.
- [70] 陈维军, 宋方方, 刘烈刚, 等. 罗汉果皂甙提取物对 1 型糖尿病小鼠细胞免疫功能的影响[J]. *营养学报*, 2006, 28(3): 221-225.
- [71] 初洪波, 谢生旭, 徐雅娟. 蒺藜中甾体皂苷成分的研究进展[J]. *中国医药研究*, 2005, 6: 232-233.
- [72] 李明娟, 王熠非. 蒺藜皂苷的降血糖作用[J]. *中药材*, 2002, 25(6): 420-422.
- [73] 王水. 固相萃取和高效液相色谱相结合快速测定苦瓜苷 A 的含量[J]. *色谱*, 2001, 19(2): 128-131.

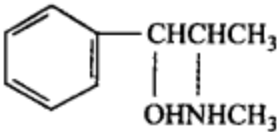
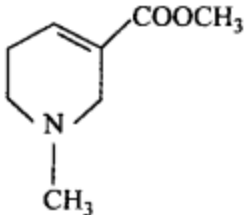
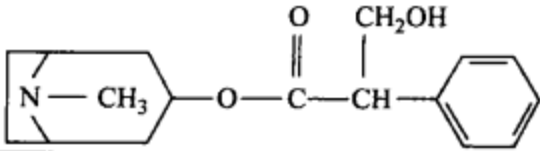
第 7 章 生物碱及降血糖作用

生物碱(alknoids)是存在于生物界的一类含氮有机化合物,多数具有复杂的氮杂环结构,具有碱性和显著的生物活性。但也也有些例外,如麻黄碱的氮原子不在环上,秋水仙碱氮原子不在环上,又不呈碱性,但因为其均来源于植物体,又都有显著的生物活性,故仍列为生物碱。生物碱在植物界的分布较广,在双子叶植物中尤为普遍,如防己科、罂粟科、夹竹桃科、毛茛科、豆科、马钱科、茄科的植物中多数含有生物碱。单子叶植物中的百合科、石蒜科、兰科,裸子植物中的红豆杉科、云尖杉科、麻黄科及羊齿科植物中的石松科、木贼科、卷柏科等的一些植物中也有生物碱,甚至少数菌类植物亦含有生物碱。目前,仅地衣类和苔藓类植物中尚未发现生物碱存在。

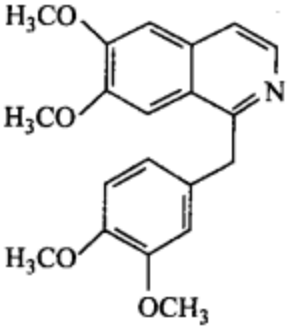
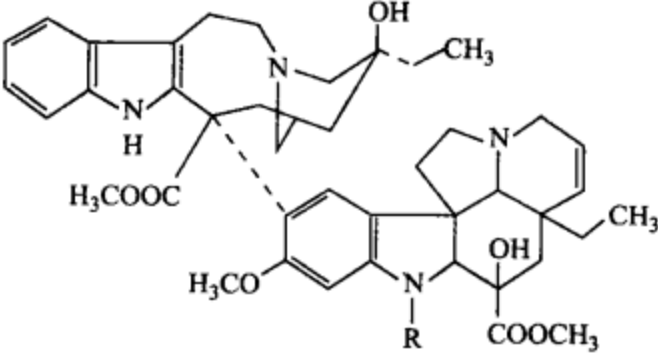
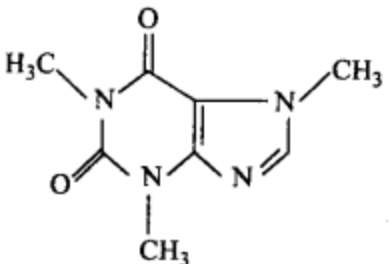
7.1 生物碱的分类及结构类型

生物碱的分类方法较多,按其植物来源可分为茄科生物碱、百合科生物碱、罂粟科生物碱等;按其生理功能可分为降压生物碱、驱虫生物碱、镇痛生物碱、抗疟生物碱等;按其性质可分为挥发碱、酚性碱、弱碱、强碱、水溶碱等。但是,最常用的分类方法是按其化学结构进行分类。结构已经研究清楚的生物碱可分为如下主要类型:有机胺类生物碱、吡啶类、莨菪烷类生物碱、异喹啉类生物碱、吲哚类生物碱和其他类生物碱(表 7-1)。

表 7-1 生物碱的分类及结构类型

结构类型	代表化合物	名 称
有机胺类生物碱		麻黄碱(ephedrine)
吡啶类生物碱		槟榔碱(arecoline)
莨菪烷类生物碱		莨菪碱(hyoscyatnine)和阿托品

(续表)

结构类型	代表化合物	名 称
异喹啉类生物碱		罂粟碱(papaverine)
吲哚类生物碱		长春碱(vinblastine)R=CH ₃ 长春新碱(vincristine)R=CHO
其他类生物碱		咖啡因(caffeine)

7.2 生物碱的提取和纯化

7.2.1 生物碱类化合物的提取

生物碱的提取方法较多,按照所用溶剂或提取条件的不同,可分为不同的几类。

7.2.1.1 按照所用不同溶剂进行分类

生物碱在生物体内以多种形式存在,在提取生物碱时,要考虑生物碱的性质和存在形式,选择适宜的提取溶剂和方法。除个别具有挥发性的生物碱(如麻黄碱)可用水蒸气蒸馏法提取外,大多数用溶剂提取法。

1) 水提取法

根据生物碱盐易溶于水,难溶于有机溶剂的性质,直接以水作为溶剂,采用最

佳的提取工艺来提取生物碱。此法操作简便,成本较低,但提取次数较多,水用量大。

2) 酸性水溶液提取法

对于那些碱性较弱不能直接溶解于水的生物碱的提取,可采用偏酸性的水溶液,使生物碱与酸作用生成盐而得到提取。酸水提取法常用 0.5%~1% 的硫酸、盐酸和乙酸等为溶剂,选用浸渍法或渗流提取法。酸水提取法的优点是使生物碱大分子有机酸盐变为小分子无机酸盐,增大在水中的溶解度,提取方法比较简单。但此法因体积较大、浓缩困难、水溶性杂质多。

蝙蝠葛粗总碱的提取,采用 0.5% 硫酸溶液提取,再利用大多数游离的生物碱难溶于水的性质,采用碱水沉淀法制得粗总碱,然后采用苯回流连续提取的方法,萃取出脂溶性部分,再利用蝙蝠葛酚性生物碱可溶于一定生物碱的性质,用 50% 氢氧化钠萃取出总酚性生物碱。

3) 碱性水溶液提取法

对化学结构非常独特、化学性质与一般生物碱不同,且在酸性条件或中性条件下不稳定的生物碱,可以采用此法提取。原有的以乙醇作为溶剂的渗流提取法,不仅成本高,而且存在防火等级高、提取时间长、能耗大等诸多问题,远不如使用稀 NaOH 溶液为好。

4) 有机溶剂萃取法

在有机溶剂萃取法中通常采用以下 2 类有机溶剂进行提取。

一是可利用醇进行提取,利用生物碱及其盐都可溶于甲醇和乙醇的性质进行提取。甲醇的溶解性能比乙醇好,但毒性较大,除实验室和特殊要求外,生产中多数选用乙醇为生物碱的提取溶剂。此法提取液易浓缩,水溶性杂质少(如多糖和蛋白质等),提取液浓缩后,需采用酸水溶解,碱化后用有机溶剂萃取法做进一步纯化。

吴茱萸总生物碱的提取即用 70% 甲醇(10 倍药材量)回流提取 24 h 并趁热过滤,滤液在减压条件下于 40℃ 浓缩干燥,再进一步分离活性成分。血脂康原料药溶于 80% 乙醇液 40 ml 回流提取、浓缩。用浓 HCl 酸化过滤调 pH 至 2。用氨水使生物碱盐还原为生物碱,再用乙醚萃取两次,经分离后将脂溶性和水溶性生物碱盐分别溶于水。在 200~800 nm 范围用紫外分光光度计扫描,分别在 300 nm、200 nm 和 210 nm 处均有吸收,证实提取物确为生物碱。

二是可用亲脂性溶剂提取,利用生物碱易溶于亲脂性有机溶剂的性质进行提取。由于生物碱以盐的形式存在于生物组织中,在用亲脂性溶剂提取时,先用碱水(氨水和石灰乳等)将药材粗粉润湿,既可使药材吸水膨胀,又能使生物碱游离,再用亲脂性有机溶剂(氯仿等)回流和连续回流提取。如果提取液中杂质多,也可采

用酸水溶解,碱化后用有机溶剂萃取法做纯化处理。此法溶剂价格高,安全性差,对设备要求严格,须防止溶剂泄露。

何春松在华北乌头生物碱的提取中,将华北乌头根及花粉碎过3号筛,分别用10%Na₂CO₃溶液湿润,加苯冷浸1周,过滤,滤液用HCl提取,将盐酸提取液碱化至pH值为10,用氯仿提取,即得乌头碱。

7.2.1.2 按照所用提取条件不同进行分类

1) 冷浸提法

对于不宜热浸,特别是从含淀粉较多物质中提取生物碱,一般采用冷浸取法,如从苦豆子种子中提取生物碱,就是在冷的稀盐酸水中浸出。

2) 回流提取法

加热回流是提取生物碱一种方法,使用回流溶剂一般有水、醇及混合溶剂。此法操作简便,但效率不够高,有时可能不能一次完全提取生物碱,要反复回流提取。

3) 索氏提取法

此法是利用索氏提取器,多次提取生物碱,可以反复利用溶剂,提取效率高且操作方便。索氏提取生物碱的方法已广泛为人们所利用。

4) 超声波提取法

余永婷对超声波方法和传统回流方法提取苦豆子中生物碱进行试验比较,同时对超声波影响苦豆子生物碱提取率的多个因素进行均匀实验分析。结果表明:超声波提取总苦豆子生物碱效果较好;超声波法提取的最佳方法条件为:乙醇浓度65%,提取剂pH0.5,超声波提取频率28kHz,超声波提取时间20min,生物碱的提取率为75.76%。

许瑞波等研究了以乙醇为溶剂超声辅助提取荠菜中总生物碱的工艺。首先通过预试验确定荠菜中生物碱的存在,然后通过单因素和正交实验设计考察各因素对荠菜总生物碱提取率的影响。实验结果表明:70%乙醇为提取溶剂,料液比(原料质量:乙醇体积)为1:10,水浴温度70℃,超声波提取20min,再重复浸泡、超声波提取1次,加酸浸泡时间为30min,原料粉无需脱色处理,在此条件下荠菜中总生物碱的提取效果最好。

5) 微波提取法

陶清以紫外-可见分光光度法为检测手段,研究了乙醇-水混合溶剂中吴茱萸总生物碱的微波提取条件,试验中分别以微波功率、萃取时间和萃取溶剂的用量、浓度及酸度等为因素,设计了五因素四水平的正交试验,考察了它们对总生物碱成分提取率的影响。结果表明,最佳提取条件为:在700W微波功率下,用浓度70%、酸度pH2的乙醇-水混合溶剂25ml/g,提取6min,此条件下总生物碱的提取率可达0.4898%。

杜甫佑以离子液体溶液为溶剂,研究了离子液体微波辅助萃取石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱。考察了离子液体的种类和浓度对萃取石蒜生物碱的影响,并与传统有机溶剂和传统萃取技术进行了对比研究。结果表明,1.0 mol/L 氯化1-丁基-3-甲基咪唑盐溶液为溶剂,液固比(ml:g)15:1,80℃微波辅助萃取10 min,石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱的萃取率分别为2.730、0.857和0.179 mg/g。与传统的萃取方法比较,本方法快速高效、环境友好。

6) 超临界提取法

刘义等研究了SEF技术提取吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的提取工艺,并用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量,结果表明采用SEF技术萃取吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的提取工艺速度快。

李仙义等人采用SEF-CO₂技术从荜茇中萃取胡椒碱,经系统观察法考察了SEF的最佳萃取条件,并用反向高效液相色谱法进行分离测定,得出了最佳萃取条件为:萃取压力38.5 MPa,萃取温度70℃,夹带剂甲醇量0.4 ml,静态萃取时间5 min及动态萃取体积5 ml。

7) 膜提取法

汤洪利用Span-80作为表面活性剂、煤油作为有机溶剂从黄柏皮中提取黄连素,着重研究了提取量与水溶液pH值、膜内盐酸浓度以及膜中Span-80的用量之间的关系,从而建立了一个合适的提取模型;汤洪还研究用乳化液膜直接从某些植物水浸液中提取生物碱的可能性,研究结果表明,液膜萃取技术可用于多种生物碱的提取且能取得比较满意的效果。莫凤奎报道了利用Span-80作为表面活性剂,煤油作为有机溶剂从北豆根中提取北豆根总碱。考察了膜材料、外相pH值、内相盐酸浓度、表面活性剂种类以及用量等因素对北豆根总碱提取率的影响,得出了一个萃取北豆根总碱的最佳条件,萃取率达到85%。

7.2.2 生物碱的纯化

经过溶剂提取后的生物碱溶液除生物碱及盐类之外还存在大量其他脂溶性或水溶性杂质,需要进一步纯化处理,将生物碱成分从中分离出来。通常使用的是有机溶剂萃取、色谱和树脂吸附,随着新技术如分子印迹、膜分离技术的发展和运用,大大简化了过程、提高了纯化效率。

7.2.2.1 有机溶剂萃取

有机溶剂萃取是利用提取物中各成分在两种互不相溶的溶剂中分配系数不同达到分离的方法,萃取时组分在两相溶剂中的分配系数越大分离效率越高,分离效果越好。对于亲脂性生物碱,利用非极性和低极性有机溶剂如苯、乙醚、氯仿等与水进行液液萃取;对于水溶性生物碱,利用极性较大的有机溶剂如乙酸乙酯、丁醇

等与水溶液萃取。有时可用多种溶剂配置成两相互不相溶的溶剂进行萃取。有机溶剂萃取是生物碱纯化的经典技术,应用广泛,具有操作简单、容易放大的优点,但分离效率和纯度较低,使用大量有机溶剂,操作安全性不佳。

蒋益虹在分离荷叶生物碱时,首先采用酸水液回流提取,提取液用 0.5% 的 HCl 调节 pH 值至 2~3,用滤纸过滤,用氯仿分 2 次萃取酸水液,弃去氯仿层,酸水中加入 NaOH 调节 pH 值至 7 左右,静置,用滤纸过滤,再加 NaOH 调节 pH 值至 9~11,再用氯仿分 3 次萃取至水中无生物碱为止,合并氯仿液,在旋转蒸发仪中蒸干,得纯化的生物碱。

7.2.2.2 色谱法

在生物碱柱色谱纯化中,一般使用硅胶柱色谱、氧化铝柱色谱和 HPLC 法。

1) 硅胶柱色谱

主要是利用二氧化硅作为填料,是较为常用的柱色谱分离方法。硅胶是中性无色颗粒,其性能稳定。硅胶层析柱适用范围广,既能用于非极性生物碱也能用于极性生物碱,且成本低,操作方便,是常见的生物碱的分离方法。

张兰兰等研究了钩吻总生物碱中钩吻素子的提取与分离,经过溶剂回流提取后,用碱性硅胶柱层析、梯度洗脱法分离钩吻素子并用薄层层析法和紫外分光光度法定性鉴别。结果从钩吻中分离得到了无色棱柱状钩吻素子晶体。

2) Al_2O_3 柱色谱

以 Al_2O_3 作为填料的层析分离法,适合于酸性大、活化温度较高的生物碱的分离。比如采用 Al_2O_3 层析方法正向分离非酚性粉防己碱与粉防己若林碱,其 R_f 值适中,展开后放置 10 min 以显色剂喷湿润效果为最好且稳定,可得到较好的效果。这种柱色谱分离法也是较为常用的生物碱分离的方法之一。这是由于许多生物碱极性较小,氧化铝对它们吸附较小,而杂质常被吸附。

3) HPLC 制备色谱法

吴茱萸碱和吴茱萸次碱的结构十分相似,因而其分离纯化难度很大。一般普遍使用的分离纯化方法很难将这两种生物碱完全分离开来。Wen 等用 HPLC 制备色谱法成功分离吴茱萸次碱和吴茱萸碱,色谱分离条件为色谱柱 Venusil XBP-C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(85:15),流速 0.5 ml/min,波长为 225 nm。

刘婧靖等用制备高效液相色谱制备荷叶碱,最后得到的荷叶碱针状晶体质量分数大于 98%,制备收得率大于 49%。

7.2.2.3 树脂法

目前,已成功用于工业化生产的树脂仍以大孔型吸附树脂、凝胶型离子交换树脂、大孔型离子交换树脂为主,也有氢键、筛分等多种功能的新型吸附树脂用于生

物碱的提取研究中,取得了令人满意的结果。不同结构的树脂在生物碱的纯化中有各自的优缺点。

1) 大孔型吸附树脂

大孔吸附树脂可通过物理吸附从水溶液(或其他溶液)中选择性地吸附有机物。近年来,大孔树脂在生物碱等精制纯化等领域中应用越来越广泛。大孔吸附树脂在生物碱纯化中具有吸附容量大、提取效率高的显著优点,但其主要的吸附作用力为疏水性相互作用,虽然文献报道的用于生物碱纯化的树脂牌号很多,但基本上都以聚苯乙烯骨架为主,树脂的吸附选择性差,对生物碱的提取纯度较低。

在生物碱的纯化中,生物碱溶液的 pH 值、温度、生物碱的初始浓度以及随后洗脱液的性质都对纯化过程有不同程度的影响。

赵骏等以荷叶的醇提液分别在 D101、D4006、AB-8、NKA-9 型四种树脂上进行平行吸附试验,同时采用不同浓度的乙醇进行梯度洗脱,结果显示:树脂型号和乙醇浓度对提取效果都有较大影响,且乙醇浓度是主要因素,采用梯度洗脱可使荷叶碱产率达 0.8%,产品纯度(重量百分比)在 50%~70%之间。

王普等采用 HPD-100 型大孔吸附树脂—柱色谱联用法,以不同体积分数的甲醇水溶液洗脱,分离荷叶中的阿朴啡类生物碱,结果显示:3 种主要的阿朴啡类生物碱得到了分离富集,80%的甲醇水洗脱液中富集了 75.58%的 N-降荷叶碱和 65.03%的 O-降荷叶碱,95%的甲醇水洗脱液中富集了 69.46%的荷叶碱。

2) 凝胶型离子交换树脂

凝胶型离子交换树脂带有离子性功能基,骨架结构为低交联网状结构,在干态时无孔,在水溶液由于离子性基团的亲水性而溶胀成为交联网络结构,从而在树脂相内产生网孔,其结构由三部分组成不溶性的三维空间网状结构,连接在骨架上的离子性功能基团和功能基团所带的相反电荷的可交换离子,其对吸附质的主要作用力是静电力,反离子可扩散进入树脂的网孔内进行离子交换。根据反离子所带电荷的不同,可分为阳离子和阴离子型交换树脂。

生物碱盐在水中可解离出生物碱阳离子,能和阳离子交换树脂发生离子交换反应,被交换到树脂上。将酸水提取液通过强酸型阳离子交换树脂柱,使酸水中生物碱阳离子与树脂上的阳离子进行交换,而杂质随溶液流出柱。树脂用氨水碱化,使生物碱从树脂上游离出来,树脂用有机溶剂回流洗脱。洗脱液浓缩后即可得到游离的总生物碱。这种处理方法所得到的生物碱纯度高,有机溶剂用量少。

迟玉明等对离子交换树脂用于角蒿总生物碱的纯化进行了研究,研究结果表明强酸性阳离子交换树脂 DOWEX50、WX2 对角蒿生物碱成分的交换能力最强,且被树脂吸附的生物碱成分可用氨性乙醇溶液快速洗脱。霍务贞等采用 D 型弱酸

性阳离子交换树脂进行了喘平复方生物碱的纯化研究,并对影响树脂纯化生物碱的诸多因素,如上柱液 pH 值、上柱液浓度、吸附流速、洗脱剂种类和用量等进行了系统考察,得到了最优化的分离条件。在生物碱的纯化研究中使用最多的仍为磺酸型聚苯乙烯阳离子交换树脂,如孙丽艳等利用 001x7 型强酸性离子交换树脂提取博落回中总生物碱,周先礼等采用 001xl 树脂从小叶翠花中提取了较高纯度的生物碱类有效成分。

3) 大孔型离子交换树脂

大孔型离子交换树脂综合大孔吸附树脂和凝胶型离子交换树脂的结构特点,合成了一类新型的吸附树脂,它一方面保持了传统大孔吸附树脂的刚性骨架、巨大的比表面积和大孔的存在,因而有效地降低了交换过程中的传质阻力,保证了使用过程中好的机械强度;另一方面,在树脂骨架上引入了离子性基团,因而具有凝胶型离子交换树脂高的吸附选择性。王洪新等考察了不同骨架结构的离子交换树脂对苦豆子生物碱的纯化效果,结果表明 HZ002 型凝胶树脂吸附率只有 38.67%,732 型凝胶树脂的吸附率达 84.3%,但是它的解吸率只有 67.40%,而 D001 型大孔树脂吸附率为 78.13%、解吸率高达 84.56%,因此对于苦豆子生物碱来说,最好的纯化树脂为 D001 型磺酸型大孔阳离子树脂。

7.2.2.4 高速逆流色谱法

目前,运用高速逆流色谱分离法分离提纯生物碱实例很多,如袁黎明等利用高速逆流色谱分离苦参中生物碱,分离效果良好;宇敏等采用高速逆流色谱对红河青叶胆中总生物碱进行分离,一次进样可达 20mg,并能得到 3 种生物碱,可确定分子中氮的功能基形式及分子中其他功能基。

7.2.2.5 分子印迹

分子印迹技术(molecular imprinting technology, MIT)是 20 世纪末出现的一种高选择性分离技术,通过印迹、聚合、去除印迹分子 3 步制备分子印迹聚合物,以其特定的分离机制而具有极高的选择性,可以作为高度专一的固相萃取材料。黄晓冬等制备了辛可宁(cinchonine)分子印迹聚合物手性整体柱,可在 2min 内实现非对映异构体辛可宁和辛可尼丁(cinchonidine)分离。目前 MIT 分离生物碱的技术尚属研究阶段,需要在热力学及动力学性质、MIP 制备、降低成本等方面作进一步探索。

7.3 生物碱的分析

目前分析生物碱的方法主要有:滴定法、分光光度法、薄层扫描法、高效液相色谱法、毛细管电泳法和近红外光谱法等。

7.3.1 滴定法

7.3.1.1 酸碱滴定法

此法为测定生物碱的经典方法。分为直接滴定法和回滴定法。虽然滴定法的灵敏度较低,但由于其操作简便,成本低廉,且准确性、稳定性均较好,所以目前仍用于某些生物碱的含量测定中。何军等比较了紫外分光光度法和酸碱滴定法在测定附子总生物碱含量中的差异,发现滴定法准确性、稳定性要优于紫外分光光度法,但滴定法灵敏度较低,测定所需样品量多,而紫外分光光度法测定操作步骤繁琐,测定结果重现性较差。

7.3.1.2 两相滴定法

利用某些生物碱较易溶于水的性质,在水相中加入与水相不相混溶的有机溶剂,并置于分液漏斗中进行滴定反应,将滴定过程中产生的化合物定量地萃取到有机相中,由此测得生物碱的含量。该法快速简便,所需设备简单。

7.3.1.3 非水滴定法

以非水溶剂作为滴定介质,不仅能增大生物碱的溶解度,而且还能在一定程度上改变其化学性质,增大了滴定突跃,达到滴定弱碱性生物碱的目的。Krisztina 等通过比较 13 种生物碱类的非水滴定法和其他测定方法的差别,得出非水滴定法对于 pK_a 值大于等于 7 的生物碱具有良好的准确度和精密度,可用于此类生物碱的含量测定。

7.3.2 分光光度法

紫外分光光度法(酸性染料比色法)根据所用酸性染料的不同,可分为溴麝香草酚蓝法、溴甲酚蓝法和甲橙提取比色法。酸性染料比色法消除两相滴定法因终点观察困难所带来的误差,且分光光度计为常备仪器,使用较为方便,所以应用很广泛。

紫外分光光度法较早地应用于茶叶中生物碱的测定。茶叶嘌呤生物碱结构上的嘌呤环具有共轭双链体系,具有独特的吸收光谱,在 272~274 nm 具有最大吸收值。GB8312-1987 中即采用了此法茶叶水浸出物中加饱和碱式醋酸铅和 0.01 mol/L 盐酸除去叶蛋白、茶多酚等物质后,在波长 274 nm 下测定咖啡碱的含量。GB8312-2002 茶咖啡碱测定中的第二法仍然保留了此法。

天然产物中存在较多杂质干扰,可先用薄层法分离,再进行分光光度法测定。接骨片中土的宁的定量分析中,由于接骨片中成分干扰大,故先用氨性氯仿提取后,再用 3% 硫酸对氯仿液进行萃取,再将酸液碱化后用氯仿萃取,氯仿蒸干,残液以甲醇定容作为供试品。将供试品液定量点于薄层板上,展开,用硫酸液洗下土的宁斑点。洗脱液离心处理后,取上清液在 254 nm 处测定吸收度,计算含量。

7.3.3 薄层扫描法

生物碱常选用氧化铝为吸附剂,以氯仿为基本溶剂作展开剂,如果生物碱极性很弱,则在展开剂中添加一些极性较小的有机溶剂(如石油醚和环己烷等);如果生物碱的极性较强,向展开剂中添加一些极性较大的有机溶剂(如甲醇和乙醇等)。各溶剂的比例需经过实验获得,溶剂系统的极性必须与生物碱的极性相适应,才能获得较理想的分离效果。如选用硅胶做吸附剂,通常需要在加碱的条件下才能获得集中的斑点。加碱的方法有3种:第一种方法是在湿法制板时,用0.1~0.5 mol/L的氢氧化钠溶液代替水,使硅胶薄层显碱性;第二种方法是向展开剂中加入一定量的二乙胺或氨水;第三种方法是在色谱槽中放一盛有氨水的小杯。第三种方法都可使生物碱的薄层色谱在碱性环境中进行,从而获得满意的分离效果。如果吸附薄层色谱法分离生物碱效果不理想时,采用分配薄层色谱法。以硅胶或纤维素为支持剂,甲酰胺作为固定相,用甲酰胺饱和的亲脂性有机溶剂作移动相进行展开。展开后,有颜色或荧光的生物碱可直接在可见光或紫外灯下观察斑点;无颜色者,可选用改良碘化铅钾试剂显色,大多数生物碱显橘红色。如展开剂或固定相中有较难挥发的碱或甲酰胺时,必须先挥去碱或甲酰胺,再喷显色试剂。

测量的方式主要有透射法、反射法和荧光法。

苏键等用薄层扫描法对复方山豆根口服液中苦参碱的定量分析,样品碱化后,用氯仿萃取,分取氯仿层蒸干,残渣加甲醇溶解定容后,点于含CMC-Na的硅胶G板上,氨气饱和展开,改良碘化铋钾溶液显色,应用双波长反射法锯齿扫描测定峰面积,薄板分离成功,测定方法准确。

陈舜让等采用透射荧光分析法测定了安定片中延胡索乙素的含量,其平均回收率为97.24%,RSD为2.8%,克服了紫外薄层扫描法所需点样量大,精密度低的缺点。周华平等采用反射锯齿扫描法测定了香莲丸中盐酸小檗碱的含量,试验的平均回收率为99.75%,RSD为1.56%。

7.3.4 高效液相色谱法

高效液相色谱法分离生物碱时主要采用反相分配色谱。常用的条件如下:固定相 C_{18} 烷基键合相。要求游离硅醇基越少越好,最好为封端的固定相。流动相:甲醇(乙腈)-水,约0.01~0.1 mol/l磷酸缓冲液、碳酸铵或乙酸钠(pH值4~7)。在相同的实验条件下,各种生物碱均有一定的保留时间,可作定性参数。即被测样品与已知对照品保留时间相同,则两者为同一化合物;如果实验条件不同,可将适量已知对照品加入被测样品小,在一定色谱条件下测定,峰面积增加的生物碱与已知对照品为同一化合物。

张捷等用正相 HPLC 测定了左金丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量,色谱柱为 Intersil C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(55:45),流速 1 ml/min,波长 225 nm。

洪玉梅等用 RPHPLC 测定了吴茱萸及其炮制品中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量,色谱柱为 Alltima ODSC18(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水-四氢呋喃-磷酸(51:48:1:0.05),柱温 25℃,流速 1 ml/min,波长 225 nm。RP-HPLC 简便、灵敏、准确,可用于评价吴茱萸及其制剂的质量。

7.3.5 毛细管电泳法

苦参类生物碱药物的碱性强、极性大,在采用 HPLC 法分析时,往往因为被色谱柱吸附太强,造成峰形不好甚至拖尾,而采用 HPCE 法可以避免这个问题。罗兴平等应用 HPCE 法测定苦豆子总生物碱注射液中苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱的含量。电泳条件:缓冲液为 100 mmol/L。硼砂, pH9.2;运行电压 8 kV(恒压分析);柱温 25℃;检测波长 215 nm;盐酸麻黄碱为内标,该方法简便、准确、重现性好。

7.3.6 近红外光谱法

近红外光谱分析不需要样品的前处理,并且具有快速、准确、稳定及多种成分同时定量分析等优点,生物碱等都有各种含氢基团,在近红外谱区有吸收,所以采用近红外光谱法可以实现这些茶叶品质成分含量的快速测定,但采用近红外光谱建立生物碱定量分析的模型测得结果实际上是生物碱的总量,不能对单一生物碱的含量进行分别测定。

进入 20 世纪 90 年代国际分析界逐步形成了近红外光谱分析的热潮,因此出现了一些用近红外光谱测定茶叶中的品质成分包括生物碱的文献。如陈全胜等运用近红外光谱技术建立了绿茶中咖啡碱和茶多酚的定标模型,用于茶叶品质成分的快速检测,咖啡碱的相关系数为 0.9688。

瞿海斌等采用近红外漫反射光谱法对黄连浸膏粉中小檗碱、巴马亭、药根碱和总生物碱含量进行快速无损检测。以 HPLC 分析值作参比,采用偏最小二乘回归算法建立二阶导数光谱信息与各组分含量间的定量校正模型,并对未知样品中各组分含量进行预测。该方法结果准确可靠,重现性、稳定性均良好,适用于工业现场的原位和在线检测。

7.3.7 其他

7.3.7.1 纸色谱

纸色谱这是以水作固定相的分配色谱。当生物碱以离子状态层析时,选择极

性较大的展开剂、如正丁醇-冰乙酸-水(4:1:5上层)。也可以将滤纸用一定的 pH 缓冲溶液处理,选择极性较小的展开剂,或选用多缓冲纸色谱的方法,当生物碱以分子状态层析时,用甲酰胺作固定相,以甲酰胺饱和的亲脂性有机溶剂(苯和氯仿等)做展开剂。纸色谱法所使用的显色剂与薄层色谱相同,但试剂中不能含有硫酸。

7.3.7.2 气相色谱法

Li 等采用气相色谱法分离并测定了贝母中 7 种生物碱含量,实验结果发现该方法可成功用于贝母属植物中生物碱的质量控制。Marques 等采用气相色谱-质谱联用方法测定了生物样品中土的宁的含量,并将其应用于检测土的宁类生物碱对人体的致死量和治疗量的确定中,实验发现该方法简便、专属、灵敏,可用于土的宁类生物碱的临床监测中。

7.3.7.3 荧光猝灭法

苦参碱和氧化苦参碱均具有叔胺氮,能使乙酸乙烯酯荧光试剂产生荧光猝灭。庞志功等用丙二酸和醋酐缩合自制乙酸乙烯酯荧光试剂,利用苦参碱、氧化苦参碱对其有定量猝灭作用,达到测定苦参碱、氧化苦参碱的目的。

7.4 生物碱降血糖研究

7.4.1 黄连生物碱降血糖研究

黄连又名川连、鸡爪连,来源于毛茛科植物黄连、三角叶黄连或云南黄连的干燥根茎,现代药理实验研究表明,黄连有效成分及提取物具有广泛的降血糖生理活性,其中重要的成分是其生物碱类成分。

7.4.1.1 黄连生物碱的种类

各种黄连根茎均含多种异喹啉类生物碱,小檗碱(Berberine, Ber)又名黄连素(图 7-1),为黄连的主要成分,含量为 5%~8%。不同的黄连的有效成分也不同,迄今已得数十种生物碱类成分:

(1) 黄连根茎含小檗碱(Berberine)、表小檗碱(Epiberberine)、黄连碱(Coptisine),甲基黄连碱(Worenine)、小檗红碱(Berberubine)、掌叶防己碱(Palmatine)、非洲防己碱(Columbamine)、药根碱(Gatrorrhizine)、木兰花碱(Magnoflorine)、阿魏酸(Ferulic acid)、黄柏酮(Obakunone)、黄柏内酯(Obakulactone)。

(2) 三角叶黄连根茎含小檗碱、表小檗碱、黄连碱、甲基小檗碱、药根碱、木兰花碱。

(3) 云南黄连根茎含小檗碱、掌叶防己碱、药根碱、黄连碱、甲基黄连碱、木兰花碱。

近年来的研究发现,黄连生物碱降糖作用的主要成分是小檗碱。

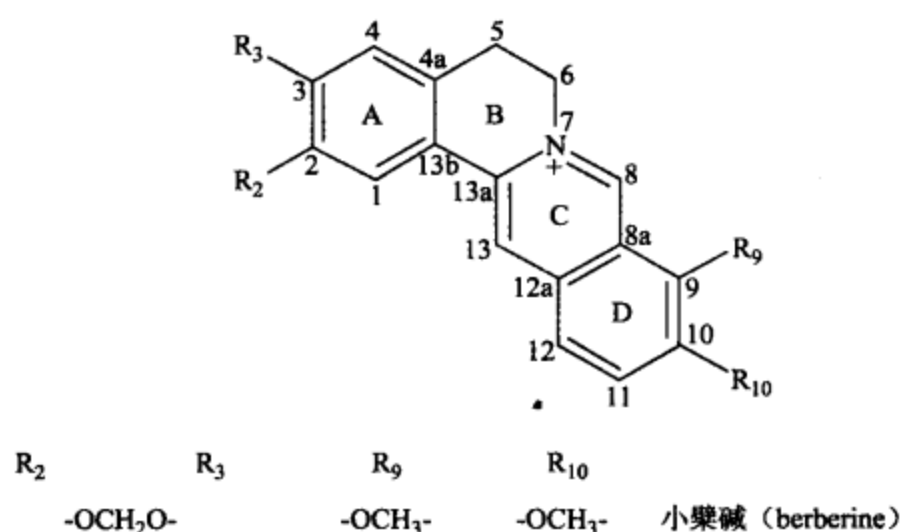


图 7-1 小檗碱的结构

7.4.1.2 小檗碱的降糖作用及机制

1) 小檗碱的降糖作用机制

促进胰岛 β 细胞修复:小檗碱对胰岛 β 细胞的修复具有促进作用。闫秀敏等的研究表明,小檗碱的修复功能可致胰岛素释放增加,抑制糖原异生,促进糖酵解,从而产生降血糖作用,同时具有胰岛 β 细胞的再生功能。唐玲光认为,小檗碱可抑制糖原异生,促进外周组织的葡萄糖酵解,具有抗升糖激素的作用,促进胰岛 β 细胞再生和功能的恢复,提高抗病能力等。

促进葡萄糖转运:目前认为胰岛素主要通过两条途径促进葡萄糖转运:PI-3K/Akt 和 CAP/Cbl 途径。但小檗碱可能并非通过已知的胰岛素信号转导途径发挥作用,其在 $0.1 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 浓度时可显著增加脂肪细胞的葡萄糖转运和消耗,但不增强 Akt 激酶活性,并传统胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物不同,小檗碱明显降低 CAPmRNA 的表达。

周丽斌等做了体内葡萄糖消耗和葡萄糖转运试验, $0.1 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 小檗碱使 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量显著增加,呈剂量依赖关系,该作用不需要胰岛素存在; $0.1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 小檗碱使脂肪细胞的葡萄糖转运显著增加,但小檗碱浓度达到 $50 \mu\text{mol/L}$ 时转运能力显著降低,表明抑制了葡萄糖转运。

促进肝细胞对葡萄糖的利用:糖尿病时,肝糖原合成减少、糖异生增加是导致高血糖的重要原因。HepG2 细胞是一种与人肝细胞表型极为相似的肝胚胎瘤细胞株。小檗碱($20 \mu\text{mol/L}$)对 HepG2 细胞进行体外降糖实验表明其具有非胰岛素依赖性的降糖作用。郑洪艳等的研究表明,小檗碱 $5 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 可使 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量增加 $32\% \sim 60\%$,其降糖效能随着培养液中葡萄糖浓度的升高而降低,但没有刺激 pTC3 细胞分泌胰岛素的作用。

影响脂肪细胞分化:脂肪细胞分化直接影响糖脂代谢,进而影响代谢性疾病如2型糖尿病的发生发展。有研究表明,小檗碱不但能促进脂肪细胞对葡萄糖的摄取,还能抑制前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,抑制分化相关基因 PPAR- γ 和 C/EBP α mRNA 的表达。在增加细胞葡萄糖摄取的同时不会引起体脂的聚积而造成体重增加,适合于治疗肥胖和胰岛素抵抗相关的代谢性疾病2型糖尿病。

减少葡萄糖的肠道:小檗碱的降血糖作用可通过抑制蔗糖酶、麦芽糖酶等二糖酶的活性,影响葡萄糖的吸收,从而起到降低血糖、改善糖尿病症状的作用。Fu 和 Xiong 研究了小檗碱的吸收,结果表明小檗碱在肠道内几乎不吸收,但能有效抑制小肠上皮细胞上二糖酶的活性。其抑制蔗糖酶活性的 ID 为 1.830 mg/L,对麦芽糖酶也有抑制作用,但无明显的剂量关系。

抑制 α -糖苷酶:小檗碱是一种新型 α -糖苷酶抑制剂,由于阿卡波糖等 α -糖苷酶抑制剂抑制碳水化合物的吸收,肠道菌群发酵会产生腹痛、腹泻等不良反应;而小檗碱自身具有一定的杀菌抑菌作用,有效地避免了这种不良反应的发生。

2) 小檗碱的降糖作用

郭彬等用四氧嘧啶建立糖尿病小鼠模型,进行药效学试验,并以格列齐特为对照进行临床疗效观察。结果小檗碱对糖尿病小鼠有降血糖作用且有量效关系,可提高其糖耐量和血清胰岛素水平;临床有效率治疗组为 80.00%,对照组为 76.67%,两组疗效明显但无显著性差异($P>0.05$)。结果表明小檗碱对糖尿病小鼠和2型糖尿病患者均有降血糖作用。

7.4.2 桑叶生物碱降血糖研究

桑叶为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶,是常用中药之一。现代药理研究表明,桑叶具有降血糖、降血脂等功能作用,桑叶中的生物碱具有降低血糖的作用。

7.4.2.1 桑叶中的生物碱

桑叶内含有生物碱类物质,其中以 1-脱氧野尻霉素最引人关注。1-脱氧野尻霉素是一种哌啶生物碱,其化学名称是 3,4,5-三-羟基-2-羟甲基四氢吡啶,简称 DNJ (1-de-oxynojirimycin),DNJ 的化学结构如图 7-2 所示。

其首先由 M. Yagi 等从桑根皮中分离得到并定名。此后 Yoshikuni 也从桑叶中分离出 DNJ,并测出其含量为 0.11%。此外,日本学者 Asano 等还从桑叶中分离出多羟基生物碱,包括 N-甲基-1-DNJ、2-氧- α -D-半乳糖吡喃糖苷-1-NJ、1,4-二脱氧-1,4-亚胺基-D-阿拉伯糖醇等。

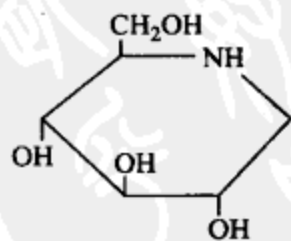


图 7-2 DNJ 的化学结构

7.4.2.2 桑叶中的生物碱降糖作用

Yoshikuni 研究了 DNJ 对喂以不同碳水化合物的大鼠血糖值的影响,结果表明:DNJ 能降低食后高血糖,且 DNJ 剂量越大,血糖值峰高度越低,呈剂量效应。这是因为 DNJ 是所有哺乳动物 α -葡萄糖苷酶的有效抑制剂,对 α -葡萄糖苷酶葡萄糖苷酶表现为竞争性抑制,它常作用于底物结合位点或其附近,与底物竞相与酶结合,由于 DNJ 与 α -葡萄糖苷酶的亲和力大于二糖与 α -葡萄糖苷酶的亲和力,因此 DNJ 阻碍了二糖与 α -葡萄糖苷酶的结合,结果 α -葡萄糖糖苷酶不能对二糖进行分解,使得二糖不能水解成葡萄糖而直接被送入大肠。

7.4.2.3 DNJ 的降血糖机制

饮食中的糖类,如淀粉,由于唾液 α -淀粉酶的作用,边水解边进入胃中,到了胃内尚未与唾液混合的部分,约 70% 仍在进行水解。然后进入十二指肠,在胰液 α -淀粉酶作用下继续加水分解,生成蔗糖、麦芽糖等二糖。二糖运送到小肠时,借助存在于小肠上部的微纤毛膜表面的 α -糖苷酶水解为葡萄糖和果糖等单糖,通过肠壁吸收进入体内,导致血液中葡萄糖浓度急剧上升。将食物与 DNJ 一起摄入时,食物也到达小肠被分解成二糖,同时 DNJ 也进入小肠与其中的 α -糖苷酶结合,由于 DNJ 与 α -糖苷酶的亲和力大于二糖与 α -糖苷糖苷酶的亲和力,因此 DNJ 阻碍了二糖 α -糖苷酶的结合,结果 α -糖苷酶不能对二糖进行分解,而使二糖不能水解成葡萄糖而直接被送入大肠。由于 DNJ 的作用,进入血液的葡萄糖减少,因而降低了血糖值。

7.4.3 其他生物碱降血糖研究

汉防己甲素(tetrandrine)是从防己科植物粉防己根中提取的活性成分,注射四氧嘧啶前后一定时间给予防己甲素 100mg/kg,均可预防四氧嘧啶所致的高血糖的发生;动态观察 1 周,预防组血糖浓度稳定,无升高趋势。进一步的实验表明,正常大鼠给予防己甲素后数小时内血清葡萄糖水平明显升高,而葡萄糖可有效地预防四氧嘧啶引起的胰岛细胞损伤,因此,防己甲素预防四氧嘧啶致高血糖作用的发生可能与防己甲素升血糖作用有关。

未加工的麻黄草本、麻黄生物碱和 1-麻黄碱对 STZ 糖尿病小鼠有降糖效果,能使 STZ 所致的萎缩的胰岛细胞恢复再生,促进胰岛细胞分泌胰岛素,从而达到治疗糖尿病高血糖的效果。从豆科植物羽扇豆分离得到的多花碱对 STZ 糖尿病小鼠有降血糖的效果。从 *Stephania* 分离得到防己醇灵是一种双苄基异喹啉类生物碱。防己醇灵以剂量依赖方式明显降低糖尿病鼠的血糖水平,防己醇灵的降糖效果是 *Stephania* 的水提取物的 3.9 倍。

生物碱具有降血糖生物活性,在植物体内还具有良好分布和较强输导能力,是

高效、低毒、无污染、对人畜安全的天然产物,在医药和农药领域有着广阔应用前景。随着研究进一步深入,使用化学合成方法对其结构进行修饰;筛选强活性生物碱;用药方式改进和创新等,都是未来对降血糖生物碱进行进一步研究的热点内容。

参考文献

- [1] 张灿. 蝙蝠葛酚性生物碱的提取工艺研究[J]. 中草药, 1997, 28(5): 17-19.
- [2] 李春梅. 吴茱萸甲醇提取物及其生物碱成分对血液循环的影响[J]. 国外医学. 中医中药分册, 1999, 2(5): 9.
- [3] 张建波. 血脂康中生物碱的提取和鉴定[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(1): 47-49.
- [4] 何春松. 华北乌头中生物碱的提取与薄层层析[J]. 黑龙江医药, 1996, 9(4): 198-199.
- [5] 李建萍, 邸丽芝, 许和. 粉防己中非酚性生物碱的提取与分离[J]. 中草药, 2002, 5: 402-404.
- [6] 甄攀, 杨风珍. 吴茱萸总生物碱提取条件的考察[J]. 中国中药杂志, 2000, 8: 504-505.
- [7] 余永婷. 超声波提取苦豆子生物碱的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2008, 3: 69-72.
- [8] 许瑞波, 王明艳, 刘炜炜, 等. 超声辅助提取芥菜中总生物碱的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10): 39-42.
- [9] 陶清, 周兴旺, 吕鉴泉. 正交试验法优化吴茱萸总碱的微波提取[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(B11): 494-498.
- [10] 杜甫佑, 肖小华, 李攻科. 离子液体微波辅助萃取石蒜中生物碱的研究[J]. 分析化学, 2007, 35(11): 1570-1574.
- [11] 刘文, 李建银, 邱德文, 等. 超临界流体萃取吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(8): 32-34.
- [12] 李仙义, 袁海龙, 苟奎斌, 等. 超临界二氧化碳流体从草茛中萃取胡椒碱[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(10): 57-59.
- [13] 汤洪, 马智兰. 用乳状液膜法从黄柏皮中提取黄连素的研究[J]. 膜科学与技术, 1989, 9(2): 53-55.
- [14] 汤洪, 马智兰. 用液态膜从植物水浸液中提取生物碱的实验研究[J]. 膜科学与技术, 1988, 8(3): 25-27.
- [15] 莫凤奎, 王晶. 乳状液膜法提取北豆根总碱[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(4): 55-57.
- [16] 蒋益虹. 荷叶生物碱的提取工艺优化[J]. 浙江大学学报, (农业与生命科学版), 2004, 30(5): 519-523.
- [17] 张兰兰, 王志睿, 黄昌全, 等. 钩吻总生物碱中钩吻素子的提取与分离[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(9): 1006-1008.
- [18] Wen D W, Li C C, Liu Y P, et al. Determination of evodiamine and rutecarpine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 385: 1075-1081.
- [19] 刘婧婧, 罗旭彪, 陈波, 等. 制备高液相色谱分离纯化荷叶碱[J]. 中草药, 2006, 37(1):

- 55-57.
- [20] 赵骏,李小年. 利用大孔吸附树脂纯化荷叶生物碱[J]. 中药材,2003,26(9):669-670.
- [21] 王普,罗旭彪,陈波,等. 利用大孔吸附树脂纯化荷叶阿朴啡类生物碱[J]. 中草药,2006,37(3):355-358.
- [22] 李立坤,夏建军,施荣富,等. 天然植物中生物碱的提取及树脂法在其纯化中的应用[J]. 离子交换与吸附,2007,23(5):475-480.
- [23] 耿敬章,徐福星. 生物碱生理功能及其提取分离研究进展[J]. 粮食与油脂,2007,4:44-46.
- [24] 喻朝阳,王晓琳. 生物碱提取与纯化技术应用进展[J]. 化工进展,2006,25(3):259-263.
- [25] 周文华,杨辉荣,岳庆磊. 生物碱提取和分离方法的研究新进展[J]. 当代化工,2003,32(2):111-113.
- [26] 王楠楠,唐玉海,韩小年,等. 生物碱类物质含量测定方法研究进展[J]. 西北药学杂志,2006,21(6):287-289.
- [27] 何军,祝林,奉建芳. 附子总生物碱含量测定方法比较[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(6):20-22.
- [28] Krisztina T N, Gergely T V. Alkalimetry in alcohol-water mixtures with potentiometric end-point detection critical remarks on a newer method of European Pharmacopoeial[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 507(3): 275-280.
- [29] 陈舜让,施亦斌. 薄层扫描法测定安定片中延胡索乙素的含量[J]. 中药材,2001,27(9):679-682.
- [30] 周华平,宋广聪,王仁英. 薄层扫描法测定香莲丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 基层中药杂志,2000,14(5):15-16.
- [31] 苏键,王宝琴. 复方山豆根口服液的检验方法[J]. 中国中药杂志,1998,23(4):225-227.
- [32] 张捷,张锋,谭生建,等. HPL 测定左金丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 中国中药杂志,2003,28(12):1193-1194.
- [33] 洪玉梅,范强,王智民. 吴茱萸及其炮制品中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量比较[J]. 中国中药杂志,2005,30(7):559-560.
- [34] 罗兴平,聂凌云,翟宗德. 高效毛细管电泳法同时测定苦豆子总碱注射液中 3 种生物碱的含量[J]. 解放军药学学报,2005,21(6):458-460.
- [35] 瞿海斌,刘全,程翼宇. 近红外漫反射光谱法测定黄连浸膏粉中生物碱含量[J]. 分析化学,2004,32(4):477-480.
- [36] Li S. L., Li P., Lin G.. Simultaneous determination of seven major isosteroidal alkaloids in bulbs of Fritillaria by gas chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 873: 221-228.
- [37] Marques E. P., Gil F., Proenca P.. Analytical method for the determination of strychnine in tissues by gas chromatography/mass spectrometry: two case reports[J]. Forensic Science International, 2000, 110: 145-152.
- [38] 庞志功,汪宝琪,王翔,等. 用荧光猝灭法测定苦参碱和氧化苦参碱[J]. 药物分析杂志,

- 1998,18(6):378-380.
- [39] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2006, 9(5): 469-470.
- [40] 郭彬, 赵恒侠. 小檗碱降血糖作用的药效学试验与临床疗效观察[J]. 中国药业, 2006, 15(21): 30-31.
- [41] 闫秀敏, 黎明, 邢雪林. 浅谈黄连素的药理与临床应用[J]. 中国医药卫生, 2005, 6(3): 62-64.
- [42] 唐玲光. 黄连素巧治糖尿病[J]. 医药与保健, 2005, 13(6): 40.
- [43] 郑洪艳, 徐为人. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(6): 708-711.
- [44] 周丽斌, 杨颖, 唐金凤, 等. 小檗碱对脂肪细胞糖代谢的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22(5): 412-414.
- [45] 陈洪源, 明智强, 谢佳乐, 等. 小檗碱降血糖机制的研究进展[J]. 食品与药品, 2008, 10(3): 69-71.
- [46] 李波, 朱维良, 陈凯先. 小檗碱及其衍生物的研究进展[J]. 药学学报, 2008, 43(8): 773-787.
- [47] Yoshikuni Y. . Inhibition of α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia by moroline and its N-alkyl derivatives[J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(1): 121-128.
- [48] Asano N. . Sugars with nitrogen in the ring isolated in the leaves of *Moms Bombycis*[J]. Carbohydr Res 1994, 253: 235.
- [49] 孙桂荣. 汉防己甲素对四氧嘧啶糖尿病大鼠高血糖的预防作用[J]. 佳木斯医学院学报, 1991, 14(4): 271-273.
- [50] Xiu L. M. , Miura A. B. , Yamamoto K. , et al. Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes[J]. Am. J. Chin. Med. 2001. 29(3-4): 493-500.
- [51] Kubo H. , Kobayashi J. , Higashiyama K. , et al. Hypoglycemic effect of (7R*, 9aS*)-7-phenyl-octahydroquinolizin-2-one in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(9): 1114-1177.
- [52] Tsutsumi T. , Kobayashi S. , Liu Y. Y. , et al. Anti-hyperglycemic effect of fangchinoline isolated from *Stephania tetrandt* "Radix in streptozotocin-diabetic mice[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(3): 313-317.

第 8 章 其他天然产物降血糖成分

天然产物中降血糖成分众多,目前研究清楚的天然降血糖成分除皂苷、多糖、黄酮、生物碱等成分外,还有许多其他成分也具有降血糖作用,如植物多酚、萜类、蛋白质和氨基酸、不饱和脂肪酸、含硫化合物和苯丙素酚类等化合物。

8.1 植物多酚

8.1.1 植物多酚的种类

植物多酚是多羟基酚类化合物的总称,广泛存在于蔬菜、水果、豆类、谷物类、茶等植物中。植物多酚以苯酚为基本骨架,以苯环的多羟基取代为特征,从低相对分子质量的简单酚类到相对分子质量大至数千的单宁类,按结构可分为酚酸类(phenolic acids)、类黄酮类(flavonoids)及 1,2-二苯乙烯(stilbenes)和木酚素类(lignans),目前,已经分离鉴定了 8000 多种多酚类物质。

8.1.1.1 酚酸类

植物性食物中酚酸含量十分丰富,最常见的是咖啡酸(caffeic acid),其他如阿魏酸(ferulic acid)。咖啡酸主要以酯的形式存在,如存在于许多蔬菜、水果及咖啡中的绿原酸(chlorogenic acid)。

8.1.1.2 类黄酮类

类黄酮物质为人类膳食中含量最为丰富的多酚类物质。在植物体内,类黄酮可作为抗氧化剂、抗微生物物质、受光体、色素。类黄酮进一步又分为黄酮类(flavones)、二氢黄酮类(flavanones)、黄酮醇类(flavonols)、黄烷醇类(flavanols)、异黄酮类(isoflavonoids)、花色素类(anthocyanidins)、原花色素类(proanthocyanidins)。

8.1.1.3 1,2-二苯乙烯类化合物

1,2-二苯乙烯类化合物在植物中的分布并不十分广泛,但近年来对白藜芦醇(resveratrol)的研究使人们对这类化合物发生了兴趣。白藜芦醇化学名为 3,4,5-三羟基-1,2-二苯乙烯(3,4,5-trihydroxystilbene),存在顺式、反式 2 种类型,通常为无色针状结晶,难溶于水,易溶于乙醇、乙酸乙酯、丙酮、氯仿等,常与葡萄糖结合成苷的形式存在,少量以游离态的形式存在于葡萄、虎杖、藜芦、决明子和花生等天然产物中。

8.1.1.4 木酚素

木酚素类物质最早在人类的血浆和尿液中发现,后来的分析发现,在亚麻籽及亚麻油中含有一定数量的木酚素。亚麻木酚素是与人体雌激素结构十分相似的植物雌激素。

8.1.2 植物多酚的降血糖作用

茶多酚是茶叶中主要功效成分之一,它具有抗氧化、清除自由基的作用,对糖尿病有一定的预防和治疗作用。

Sabu 等发现茶多酚对正常大鼠和以四氧嘧啶造模的糖尿病大鼠的血糖水平都有一定影响。在 500 mg/kg 体重的剂量下,它可抑制正常大鼠服用葡萄糖后血糖的升高,显著提高其葡萄糖耐量;以 50 mg/kg·bw 和 100 mg/kg·bw 的剂量给糖尿病大鼠灌服 18 d 后,其血糖水平分别下降 29.8% 和 44.1%。汤圣兴等的研究显示大剂量(0.8 g/kg·bw)的茶多酚可抑制糖尿病大鼠口服蔗糖和淀粉后血糖的升高,改善其糖耐量,但不能抑制其口服葡萄糖后血糖的升高。

茶多酚对糖尿病并发症也有一定的作用,如对糖尿病的心血管并发症有一定的作用。在 15~120 mg/L 的浓度范围内,茶多酚可对正常大鼠的右室乳头肌产生正性肌力作用,使其心肌收缩能力增强;同时对于早期糖尿病大鼠的心肌病也有类似作用,但随着病程发展,心肌损害严重到一定程度,茶多酚就不能产生相应的作用。

茶多酚对糖尿病作用的机制方面,就目前的研究成果来看,其主要机理是提高胰岛素敏感性,抑制葡萄糖运转载体和相关酶类的活性以及抗氧化作用。

沈忠明等研究报道,给正常小鼠灌胃 100 mg/kg 剂量的虎杖(*Polygonum cuspidatum*)鞣质,连续 8 d。结果正常小鼠血糖降至 4.98 mmol/L。而且对四氧嘧啶糖尿病小鼠的血糖含量也有影响。鞣质结构特殊,其作用特点,一方面可能是通过与消化道内的许多酶作用,特别是抑制 α -糖苷酶的活性,从而调控了机体对葡萄糖等成分的吸收,起到降血糖的作用;另一方面可能是通过调控体内蛋白酪氨酸磷酸酯酶、6-磷酸葡萄糖激酶、琥珀酸脱氢酶等的活性,使机体趋向于加快血液中葡萄糖的利用,从而起到降血糖的作用。

8.2 萜类

8.2.1 萜类的种类

萜类化合物是由异戊二烯为基本结构单元构建的一类化合物,也可称为类异戊二烯(isoprenoid),包括所有的异戊二烯聚合物及其衍生物。萜类化合物结构多

样,包括直链、单环和多环等,其中的烃类称为萜烯,开链萜烯的分子组成符合通式 $(C_5H_8)_n(n=2)$ 。此外,它还以各种含氧衍生物(如醇、醛、羧酸、酮、酯类以及苷等)的形式存在。萜类化合物的分类主要以异戊二烯单元的数目为依据。 C_{10} 家族曾被认为是最小的萜类,故命名为单萜(monoter. pene), C_5 的异戊二烯则被称为半萜。根据此法可命名倍半萜(sesquiterpene, C_{15})、二萜(diterpene, C_{20})、三萜(triterpene, C_{30})、四萜(tetaterpene, C_{40})及多萜(polyterpene, $>C_{40}$)(图 8-1)。

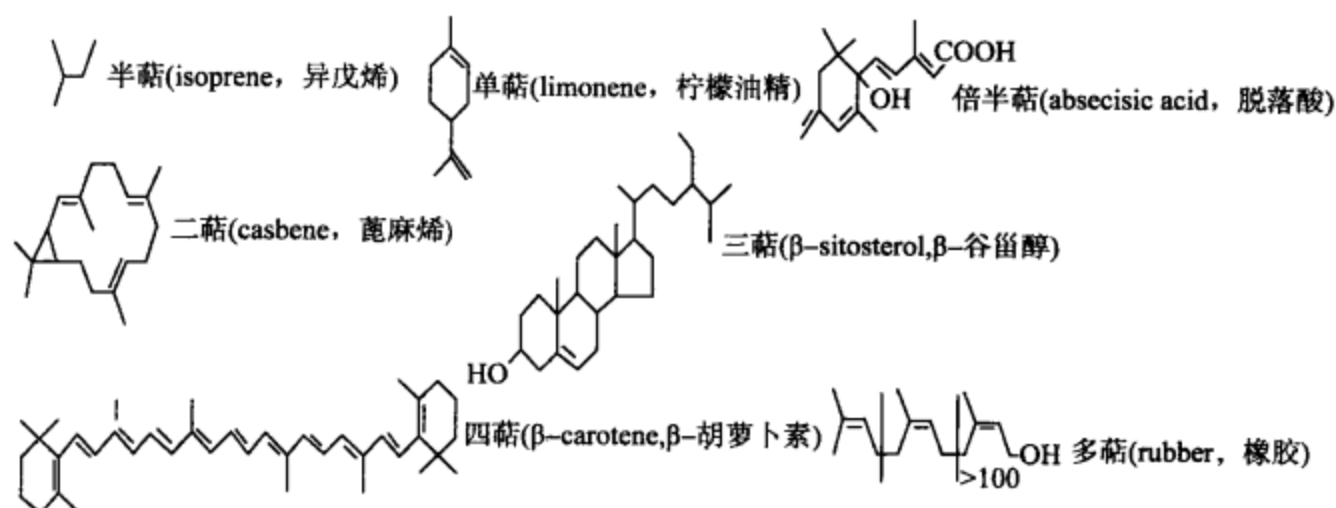


图 8-1 萜类化合物的结构式

8.2.2 萜类的降血糖作用

8.2.2.1 单萜

在研究地黄(*Rehmannia glutinosa*)成分中发现其所含梓醇的酰化产物具有良好的降血糖活性,但地黄中梓醇的含量远比梓属植物中的低,而且从地黄中提取梓醇也比从梓属植物中提取难得多。

8.2.2.2 倍半萜

现代研究表明白术(*tractylodes maerocephala*)根茎含有挥发油,油中主要成分为苍术酮、苍术醇、白术内脂 A、B, 3β -乙酰氧基苍术酮, 3β -羟基苍术酮及维生素 A 等,具有加速体内葡萄糖代谢和阻止肝糖原分解的活性。其主要活性成分 atractan A 对四氧嘧啶诱发的高血糖小鼠有显著的降血糖作用。从苍术(*Atractylodelancea*)根茎中分离得到一种倍半萜类化合物 β -桉叶油醇,它能增强糖尿病人使用肌松药琥珀酰胆碱所致的神经肌肉阻断作用。构效关系研究指出, β -桉叶油醇结构中环己烷和环外亚基,是发生作用的药效基团,亚甲基与结构中羟基间的距离,是决定活性大小的要素。这种倍半萜成分对于糖尿病神经系统并发症的治疗具有积极的意义。

8.2.2.3 二萜

从大戟科有毒植物 *Cluytia richardiana* L 的叶中提得的岩蔷薇型二萜类化合

物 saudiin, 给四氧嘧啶糖尿病小鼠腹腔注射 40 mg/kg, 可使血糖水平降低一半, 且长达 6 h 以上。从 *Croton cajupara Benth* 中获得的生物活性物质—二萜 trans-dehydrocrotonin 对 STZ 所致糖尿病鼠具有降低血糖和血清中三酯酰甘油的作用。

从甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (甜菊属, 菊科) 叶中分得化合物 stevioside (42), 其苷元也为 ent-贝壳杉烯型二萜, 该化合物有降血糖作用。在巴拉圭, 甜叶菊干叶的水浸液有治疗糖尿病的作用是众所周知的常识; 在我国用甜叶菊对糖尿病患者进行实验, 结果取得降血糖、尿糖及改善三多症状的效果, 总有效率达 86%。且有甜味, 无热值, 适宜糖尿病人食用。

8.2.2.4 三萜

熊果酸 (Ursolic acid), 又名乌索酸、乌苏酸。在自然界分布广泛, 如山楂、熊果、乌梅、陆英、芦笋、野蔷薇果、车前草、女贞子等植物中均含有, 目前已知存在于至少 26 个科 63 种植物中。熊果酸为五环三萜类化合物。

山茱萸 (*Comuofficinalis*) 的醇提取物不仅对四氧嘧啶和肾上腺素性糖尿病大鼠有明显的降血糖作用, 而且对链脲佐菌素所形成的糖尿病大鼠也有类似作用, 但对正常大鼠血糖无明显影响。进一步分析发现其有效成分为熊果酸, 故认为山茱萸中熊果酸可能对糖尿病人有治疗效果。为分析熊果酸降糖机制, 陈军采用熊果酸为先导化合物, 对其进行结构修饰和抑制兔肌肉糖原磷酸化酶活性的测试。结果: 共合成 15 个熊果酸衍生物, 其结构经 IR、¹H NMR、MS 和元素分析确证; 生物活性测试显示: 熊果酸是一个糖原磷酸化酶抑制剂, 首次从抑制肝脏糖生成的角度提出了熊果酸的降血糖机制。为研究大叶紫薇总三萜的降血糖作用, 纵伟等将大鼠随机分成正常组、模型组、大叶紫薇总三萜高剂量组和低剂量组, 正常组与模型组喂服生理盐水, 高、低剂量组分别按大鼠体重的 0.025% 和 0.01% 喂服大叶紫薇总三萜喂服 28d 后, 测葡萄糖耐量、血糖、尿糖、血脂、体重和糖化血红蛋白以考察大叶紫薇总三萜对糖尿病大鼠的降血糖作用。结果表明大叶紫薇总三萜能非常显著地改善糖尿病大鼠的葡萄糖耐量, 降低糖尿病大鼠的血糖、尿糖、血清 TC、TG、LDL-C 和糖化血红蛋白, 升高 HDL-C。表明大叶紫薇总三萜对糖尿病大鼠有降糖效果。

化合物 2,3-dihydroxy-urs-12-en-28-oic acid 和 3,6,19-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid 为乌苏烷型三萜, 是从枇杷 *Eriobotrya japonica* (枇杷属, 蔷薇科) 的甲醇部分中分离的, 两者对遗传型糖尿病小鼠的尿糖有显著的抑制作用。将两个化合物对正常大鼠口服给药 (剂量分别为 10 mg/kg 和 0.1 mg/kg), 可降低其血糖水平 (与对照组 100 mg/100 ml 相比, 相对血糖浓度均为 70 mg/100 ml)。化合物 gymnemoside b 和 gymnemic acids III, V, VII 为齐墩果烷型三萜, 是从匙羹藤 *Gymnema sylvestre* (匙羹藤属, 萝藦科) 的叶子中得到的, 此 4 个化合物 (剂量均为 100 mg/kg) 对抑制高糖饮食大鼠的血清葡萄糖水平有一定作用, 但作用不是很强。化合物 senegin- II 为齐墩果烷

型三萜,是从美远志 *Polygala senega* (远志属,远志科)中得到的,对正常小鼠口服给药,剂量为 0.5 mg/kg,2.5 mg/kg,5 mg/kg 时,均能显著降低正常小鼠的血糖。

8.2.2.5 环烯醚萜苷类

化合物 rehmamnoside D 是从 *Rehmannia glutinosa* (地黄属,玄参科)中分离得到的,对自发性糖尿病小鼠有较弱的降糖作用。

8.3 蛋白质和氨基酸

许多植物中的氨基酸有降血糖作用,荔枝核是荔枝(*Sonn*)的种子,主要成分为 α -(亚甲环丙基)甘氨酸,给小鼠皮下注射可使血糖下降,其作用机制是提高机体及周围组织对葡萄糖的利用率。

人参根中分出一种多肽,该多肽的氨基酸顺序为:Glu-Thr-Val-Glu-Ile-Ile-Asp-Ser-Glu-Gly-Gly-Gly-Asp-Ala,王本祥研究了此多肽对糖代谢的影响。将人参多肽按 50、100 和 200 mg/kg 的剂量给大鼠一次静脉或小鼠多次皮下给药,能降低正常糖和肝糖原,但对总血脂无明显影响。同时表明,对肾上腺、四氧密啶及葡萄糖所引起的高血糖有抑制作用,并能增强肾上腺素对肝糖原的分解。

苦瓜是葫芦科苦瓜属植物苦瓜的果实,具有消暑清热明目解毒的作用。印度学者 Khanna 采用有机酸、醇提取,薄层层析方法从苦瓜果实中分离出一种多肽-P,二维薄层和氨基酸分析表明,多肽-P 含有 17 种氨基酸,共 166 个残基,最小相对分子质量约为 11 000,且含有牛胰岛素中所没有的甲硫氨酸。该多肽有降低血糖的作用。自此,国内外学者即开始了这方面的大量研究。Nag 等从苦瓜得到一种水溶性提取物 MC6,其在 SDS-PAGE 凝胶电泳上以单一条带形式迁移,相对分子质量小于 10 000;MC6 及其所含 3 种肽 MC6.1、MC6.2、M6.3 均有降血糖作用,口服给药后也有降血糖活性。

Sirintom 等使用 Khanna 法提取苦瓜降糖多肽-P,在正常和链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠上,皮下注射均能显著降低血糖浓度;苦瓜降糖多肽-P 降血糖作用的起效时间在糖尿病大鼠和正常大鼠分别为 4 h 和 6 h,皮下注射后,能提高血浆胰岛素浓度 24 倍。在大鼠原位胰腺灌注实验中,用药后 5 min 内胰岛素分泌明显增加,持续 30 min,但对胰高血糖素分泌无促进作用。10 mg/ml 苦瓜降糖多肽-P 能增强 C₂C₁₂ 肌细胞和 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的摄取;大鼠脂肪细胞培养 4 h 和 6 h 后,苦瓜降糖多肽-P 能显著提高其对葡萄糖摄取。苦瓜降糖多肽-P 的缓慢降血糖作用可能是由于其促胰岛素分泌和拟胰岛素样作用。

人参多肽按 50,100,200 mg/kg 剂量给大鼠一次静脉注射或小鼠多次皮下注射给药,能显著降低正常血糖和肝糖原,对肾上腺素、四氧密啶及葡萄糖所致高血糖均有抑制作用,并能增强肾上腺素对肝糖原的分解。其降糖作用除了促进糖原

分解或抑制乳酸合成肝糖原作用外,主要是刺激了琥珀酸脱氢酶和细胞色素氧化酶的活性,使糖的有氧氧化作用增强。

从日本香豌豆种子中分离得到的香豌豆素及其衍生物 γ -L-谷氨酸-L-香豌豆素均对小鼠显示降血糖活性。双花耳草的干燥全草水提物对四氧嘧啶糖尿病兔具有降血糖作用,其降糖成分是由 13 种氨基酸、肽或蛋白质等组成的。从苦瓜中分离得到的有效降血糖肽 2 植物多肽,又称植物胰岛素,它可刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素从而起到降糖作用。药西瓜果实是地中海国家抗糖尿病的传统药物,从药西瓜成熟种子中提取的氨基酸混合物能够迅速明显刺激胰岛素的分泌。

降血糖氨基酸 A 即亚甲基环丙基丙氨酸,来源于无患子科植物阿开木未成熟的果实。在 0.01~1.0 mmol/L 的浓度下,能促进兔胰岛分泌胰岛素,但由于出现酸尿和肝脏线粒体毒害,影响了进一步的开发利用。南瓜的降血糖作用一直是学者们关注的课题,熊学敏将南瓜经水提醇沉淀获得的多糖类组分做动物实验证实有显著的降血糖效果,但没有发现南瓜多糖组与南瓜非多糖组的降血糖效果差异;蔡同一等研究揭示南瓜种子的降血糖作用与精氨酸有关。

8.4 不饱和脂肪酸

螺旋藻是一种多细胞原始海藻,在实验中观察到螺旋藻能降低正常小鼠血糖,而对胰岛素功能丧失引起的高血糖无影响。其主要机制可能与螺旋藻含的 γ -亚麻酸有关。 γ -亚麻酸是前列腺素 E1 的前体又是花生四烯酸的来源。由 γ -亚麻酸组成的磷脂可以增强细胞膜上磷脂的流动性,增强细胞膜受体对激素(包括胰岛素)的敏感性,而且由 γ -亚麻酸合成的前列腺素 E1 活性物质,也可增强腺苷酸环化酶的活性,提高胰岛 β 细胞分泌胰岛素的功能。

共轭亚油酸(CLA)能使肥胖 ZDF 糖尿病大鼠受损的葡萄糖耐性迅速恢复正常,增加胰岛素分泌和提高胰岛素敏感性,显著降低脂肪组织中游离脂肪酸的流通量($P<0.05$),同时能提高脂肪组织中 Ap2 mRNA 的稳态水平。这些活性与其激活过氧化物酶体增生因子激活受体 PPAR- γ 相关,推测 CLA 的抗糖尿病机制类似于噻唑烷二酮(thiazolidinedione)类抗糖尿病药物。

亚麻子(flaxseed)是亚麻科亚麻属植物亚麻的种子。亚麻子中存在大量的不饱和脂肪酸,其中 α -亚麻酸通过作用于肌细胞胰岛素的 P13B/PKB 信号通路影响 GLUT4 的蛋白表达水平,增加骨骼肌对胰岛素的敏感性,减轻或避免骨骼肌胰岛素抵抗和糖代谢障碍。

8.5 含硫化合物

Salacia reticulata Wight 的根和茎在印度草医学中广泛用于治疗早期糖尿

病。以 α -葡萄糖苷酶抑制活性为指导, Yoshikawa 等从其甲醇提取物的水溶性部分中跟踪分离到抗糖尿病活性成分 salacinol。该化合物对麦芽糖和蔗糖性大鼠高血糖具有显著的抑制活性, 比对照药物阿卡波糖活性更强; 体外试验表明 salacinol 是一种有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂; 通过考察其衍生物的活性, 表明含硫酸盐阴离子的侧链是 salacinol α -葡萄糖苷酶抑制活性所必需的基团。

用大蒜素 70 mg/kg 连续灌胃给药 15 d, 对四氧嘧啶致糖尿病大鼠具有明显的降血糖作用 ($P < 0.01$), 同时能明显升高 C 肽含量。其对糖尿病的治疗作用与增加胰岛素分泌、改善受损的胰岛 β 细胞功能有关。

洋葱挥发油中的含硫化合物是二硫化合物的混合物, 主要成分是丙烯基丙基二硫化合物, 在普通老鼠、四氧嘧啶糖尿病兔子和人体的实验中, 挥发油中的含硫化合物呈现出降血糖的功能, 洋葱中硫化物的硫键不饱和性和氧化功能是其具有生化活性的原因。1992 年, Sheela 首次从洋葱中分离出具有降血糖的有机硫化合物 S-烯丙基半胱氨酸亚砷。有机硫化合物 S-甲基半胱氨酸亚砷和 S-烯丙基半胱氨酸亚砷与体重减轻、高血糖、肝蛋白与肝糖原含量降低及小鼠糖尿病的其他特征的显著改善有关。

天然降糖产物普遍存在以下特点: ①降血糖的同时, 还有降血脂, 改善糖尿病动物的糖耐量等功能; ②几乎无毒性反应, 可口服给药; ③作用温和、缓慢而持久; ④性质稳定; ⑤天然产物中, 往往多种降糖成分并存; ⑥多糖类品种最多, 作用较强; 生物碱品种少, 降糖作用显著; 萜类和苷类主要影响糖代谢; 硫键化合物降糖活性取决于二硫键; 黄酮类主要影响 B 细胞功能, 作用缓慢而持久。目前还有很多天然产物具有显著的降血糖作用, 例如青钱柳、仙人掌、紫红獐芽菜、橄榄叶、银杏叶、番茄汁、桑白皮、大豆胚轴、花粉、蜂胶等, 由于其化学结构复杂, 降糖成分未能研究确切清楚。因此, 进一步阐明有效成分的化学结构与降血糖活性之间的相关性, 为开发治疗糖尿病的新药指明方向, 将是一件非常有意义的工作。从天然药物中寻找高效稳定、毒副作用小的降血糖活性成分已成为研究和开发降糖药物的新方向, 有非常广阔的前景。

参考文献

- [1] 冯丽, 宋曙辉, 赵霖, 等. 植物多酚种类及其生理功能的研究进展[J]. 江西农业学报, 2007, 19(10): 105-107.
- [2] 沈忠明, 殷建伟, 袁海波. 虎杖鞣质的降血糖作用研究. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 220-221.
- [3] Sabu M. C., Smitha K. Ramadasan. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes[J]. J Ethnopharmacol,

- 2002, 83: 109-116.
- [4] 汤圣兴, 陈月平, 王安才, 等. 茶多酚对链脲佐链菌素诱发糖尿病大鼠降糖作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(3): 17-18.
- [5] 马靛, 丁鹏, 杨广笑, 等. 植物类萜生物合成途径及关键酶的研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(增刊): 22-27.
- [6] 王奇志, 梁敬钰. 梓属植物化学成分研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(7): U002-U004.
- [7] 高玫梅, 许实波. 药用天然物中降血糖有效单体成分及其药理作用的研究进展[J]. 中药材, 1999, 10: 542-544.
- [8] 陈军, 柳军, 龚彦春, 等. 新型糖原磷酸化酶抑制剂熊果酸衍生物的合成及其生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 397-402.
- [9] 纵伟, 张勇, 夏文水. 大叶紫薇总三萜对糖尿病大鼠的降糖效果研究[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2006, 21(2): 50-52.
- [10] Msilva R., Santos F. A., Rao V. S., et al. Blood glucose and triglyceride lowering effect of trans dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats[J]. Diabetes Obes Metab, 2001, 3(6): 452-456.
- [11] 王本祥, 杨明, 金玉莲, 等. 人参多肽降血糖作用[J]. 药学学报, 1990, 25(6): 401-405.
- [12] 刘红雨, 付中平, 周吉燕, 等. 苦瓜降糖多肽研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(7): 89-91.
- [13] Kharma P., Jain S. C., Panagariya A., et al. Hypoglycemic activity of polypeptide-P from a plant source[J]. J Nat Prod, 1981, 44(6): 648-655.
- [14] Ng T. B., Wong C. W., Li W. W., et al. Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds[J]. J Ethnopharmacol, 1986, 15(1): 107-117.
- [15] Ng T. B., Wong C. W., Li W. W., et al. Peptides with antilipolytic and lipogenic activities from seeds of the bitter melon *Momordica charantia* (family Cucurbitaceae)[J]. Gen Pharmacol, 1987, 18(3): 275-281.
- [16] Bishwajit N., Sharma M. S., et al. Orally active fraction of *Momordica charantia*, active peptides thereof, and their use in the treatment of diabetes[C]. US6127338. 2000-10-03.
- [17] 王秋霞, 贾美艳, 唐荣平. 天然药物中降血糖成分的研究进展[J]. 中国民族民间医药杂志, 2005, 75: 190-193.
- [18] 陈军, 柳军, 龚彦春, 等. 新型糖原磷酸化酶抑制剂熊果酸衍生物的合成及其生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 397-402.
- [19] 王辉, 李景明, 马钊等. 洋葱中含硫化合物的生理功效[J]. 食品工业科技, 2005, 26(5): 187-189.
- [20] 康洁, 陈若芸, 于德泉. 天然的抗糖尿病有效成分及药理活性[J]. 中医药通报·中药化学, 2006, 5(2): 55-59, 31.