

不同采摘时期蒲公英功效成分的含量变化规律及降糖作用研究

李诗语, 姜 斌, 赵玉娟, 孙成彪, 沈明浩*

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118)

摘 要: 以长白山野生蒲公英作为原料, 探讨不同采摘时期蒲公英中黄酮类、皂苷类、肌醇类物质含量的变化规律, 进而研究不同采摘时期蒲公英降血糖作用的差异, 寻找出降血糖效果最好的蒲公英生长时期。采用乙醇浸提法提取蒲公英中的黄酮、皂苷及肌醇类物质, 分别对几种物质的含量进行提取测定; 并将各个时期得到的蒲公英水溶液用四氧嘧啶致糖尿病小鼠进行降血糖实验研究。结果表明: 7月中旬到8月中旬期间采摘的蒲公英均有良好的降血糖效果。其中, 在7月下旬的蒲公英降血糖效果最好, 使四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖值在15 d内下降49.3%; 而且该时期的蒲公英中黄酮类物质含量为8.41 mg/g, 皂苷类物质含量为0.41 mg/g, 中肌醇的含量为15.90 mg/g, *D*-手性肌醇的含量为4.95 mg/g。

关键词: 蒲公英; 黄酮; 皂苷; 中肌醇; *D*-手性肌醇

Variations in Functional Components and Hypoglycemic Effect of Dandelion at Different Harvesting Periods

LI Shi-yu, JIANG Bin, ZHAO Yu-juan, SUN Cheng-biao, SHEN Ming-hao*

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The whole herbs of wild dandelion from the Changbai Mountain harvested at different periods were analyzed for the contents of flavonoids, saponins and inositols as well as hypoglycemic effect with the aim of finding out the best harvesting period for better hypoglycemic effect of dandelion. The contents of flavonoids, saponins and inositols in dandelion, all of which were extracted with ethanol from the plant, were determined. Besides, the hypoglycemic effect of decoctions of dandelion harvested at different periods was investigated in mice with diabetes mellitus induced by alloxan. Results showed that dandelion between mid-July and mid-August had an excellent hypoglycemic effect, reaching the strongest level in late July by reducing blood sugar levels in alloxan-diabetic mice by 49.3% within 15 days. Moreover, dandelion in late July contained 8.41 mg/g flavonoids, 0.41 mg/g saponins, 15.90 mg/g myo-inositol and 4.95 mg/g *D*-chiral inositol.

Key words: Changbai Mountain; flavonoids; saponins; myo-inositol; *D*-chiral inositol

中图分类号: Q949.91

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 07-0238-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201407047

随着现代社会人类生活水平的提高、饮食习惯的改变、体力劳动减少以及精神压力的增大, 糖尿病患者也在逐年增多^[1]。根据世界卫生组织的统计数据表明, 糖尿病人的死亡情况目前仅次于意外死亡和肿瘤死亡, 位居第三。我国糖尿病患者也逐年猛增, 为了预防、减少和延缓患病率, 糖尿病及其并发症的发生和发展, 就必须全面控制好病人的病情, 包括纠正异常的高血糖、高血脂等^[2-3]。最近, 我国医学研究人员发现, 蒲公英具有良好的降血糖效果, 其降血糖成分主要为黄酮类物质和皂苷类物质。黄酮类物质有助于改善“胰岛素抵抗”, 从而使血糖过高的病人恢复正常血糖值。同时大量的实

验研究表明皂苷类物质抗高血糖作用的靶点和途径比较广泛, 除了能直接修复损坏的胰岛细胞, 增加胰岛素水平, 维持正常血糖外, 在调节血脂、改善糖耐量、增加肝糖原含量、抗氧化等多个方面也都具有良好的活性。近年来, 肌醇类物质的降血糖作用已成为了一个热点, 其中尤以中肌醇和*D*-手性肌醇、*D*-松醇、红杉醇^[4-6]的研究报道居多。大量临床药理、毒理研究同样表明, *D*-手性肌醇由于在改善胰岛素抵抗方面具有非常好的疗效, 且没有任何毒副作用, 为糖尿病的治疗带来革命性的创新^[7-9]。

本实验以长白山野生蒲公英作为原料, 对不同采摘时期的野生蒲公英全草中降血糖成分(黄酮类、皂苷

收稿日期: 2013-03-21

作者简介: 李诗语(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: lishiyu5211@126.com

*通信作者: 沈明浩(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品毒理与安全、胚胎毒理。E-mail: shenmh2003@yahoo.com

类、肌醇类物质)含量的变化进行研究,旨在寻找到降血糖功效最高的蒲公英生长时期,为功能性食品的开发提供有利依据,这对开发天然降血糖功能性保健食品具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与动物

不同采摘时期(2012年5月15日,2012年5月30日;2012年6月15日,2012年6月30日;2012年7月15日,2012年7月30日;2012年8月15日,2012年8月30日,2012年9月15日,2012年9月30日,2012年10月15日)的长白山地区的野生蒲公英。

昆明种健康小鼠(批号:SCXK-(吉)2003-0001)、昆明种四氧嘧啶致糖尿病模型小鼠(血糖值超过13 mmol/L),18~22 g,SPF级,购于吉林大学实验动物中心。

1.2 试剂

无水乙醇、正丁醇、NaOH、甲醇、硝酸、丙酮、正丙醇、 AlCl_3 、NaCOOH、四氧嘧啶、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯) 北京化工厂;石油醚 天津市富宇精密化工有限公司;氯化胆碱标准品、雷氏铵盐 国药集团化学试剂有限公司;芦丁标准品 中国药品生物制品检定所;上述试剂除特别标出均为分析纯。

1.3 仪器与设备

电热套 上海越众仪器设备有限公司;EYELA A-1000S抽滤装置 日本Tokyo Rikakikai公司;RE52-98旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;流回装置、KQ-250B超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;UV-1800紫外分光光度计、Essentia LC-15C岛津高效液相色谱仪 日本岛津公司;DK-S28水浴锅 上海精宏实验设备有限公司;FW100型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱 中国南京恒裕电子仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 样粉的制备

取约100 g不同采摘时期长白山野生蒲公英全草置于60℃鼓风干燥箱内进行烘干至恒质量,烘干后的蒲公英经过超微粉碎机粉碎,置于-20℃的冰箱中备用。

1.4.2 功效成分的提取及含量测定

1.4.2.1 黄酮的提取

准确称取蒲公英全草样粉各10 g,制成滤纸包,100℃水浴、75%乙醇回流约5 h,将提取液旋转蒸发回收乙醇至干后用正丁醇萃取若干次(每次约20 mL),并将萃取液旋蒸至干,再用85%的乙醇25 mL进行溶解,超声清洗器振荡2 min,过滤至50 mL容量瓶,用85%乙醇洗

涤滤纸定容至刻度,摇匀,取10 mL滤液于100 mL容量瓶中,用60%乙醇定容至刻度摇匀备用^[10]。

1.4.2.2 黄酮含量的测定

芦丁对照品溶液的制备(标液的制备):准确称取干燥至恒质量的芦丁对照品50.0 mg于50 mL容量瓶,用85%乙醇定容至刻度,再吸取10 mL于100 mL容量瓶,用60%乙醇定容至刻度,备用。

标准曲线的绘制:准确量取芦丁对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL至10 mL具塞试管中,各加入60%乙醇5 mL,1 mol/L AlCl_3 0.3 mL,放置6 min后,再加入2 mol/L NaCOOH 2.5 mL,最后用60%乙醇定容至刻度,放置40 min,在波长460 nm处,测吸光度,以吸光度(y)为纵坐标、溶液质量浓度(x/(mg/L))为横坐标作图,得到回归方程 $y=0.1011x+0.0117$ ($R^2=0.9979$)。

分别准确量取不同时期及不同部位的蒲公英提取液2 mL各3份,置于10 mL具塞试管中,分别加入1 mol/L AlCl_3 溶液0.3 mL,放置6 min,再分别加入2 mol/L NaCOOH 溶液2.5 mL,加60%乙醇至刻度,放置40 min,于波长460 nm处测定吸收度^[10-11],按回归方程计算不同时期蒲公英中总黄酮的含量。

1.4.2.3 皂苷的提取

准确称取蒲公英全草样粉各10 g,制成滤纸包,100℃水浴、75%乙醇回流约5 h,将提取液旋转蒸发回收乙醇至干后用石油醚萃取脱脂,取水相部分用正丁醇进行萃取,合并提取液于旋转蒸发仪中,旋蒸至干,再用甲醇溶解定容至50 mL,摇匀备用。

1.4.2.4 皂苷含量的测定

标准溶液的制备:准确称取2.5 mg齐墩果酸标准品于25 mL容量瓶中,甲醇溶解定容至刻度,吸取1 mL到10 mL具塞试管,自然挥去甲醇后加入香草醛-冰乙酸溶液0.2 mL 50 g/L,高氯酸0.8 mL,盖塞振荡摇匀后65℃水浴15 min,冰水冷却5 min,准确加入冰乙酸5 mL,摇匀备用^[11]。

标准曲线的绘制:依次准确吸取0、0.2、0.4、0.6、0.8 mL标准溶液于10 mL具塞试管中,甲醇溶液定容至刻度,在波长546.5 nm处测定其吸光度^[12-14]。以吸光度(y)为纵坐标、溶液质量浓度(x/(mg/L))为横坐标作图,得到回归方程 $y=0.7236x+0.0037$ ($R^2=0.9999$)。

依次准确吸取0.2、0.4、0.6 mL皂苷提取液分别于10 mL具塞试管中,甲醇溶液定容至刻度,在波长546.5 nm处测定其吸光度。

1.4.2.5 肌醇类物质的提取

准确称取蒲公英全草样粉各10 g,100℃水浴、75%乙醇回流约5 h,将提取液用旋转蒸发仪蒸发留水相部分,并用正丁醇萃取若干次(每次约20 mL),留水相部分定容至50 mL。取1 mL定容液体依次通过ODS柱

(C₁₈柱)和阴性离子交换柱,通过ODS柱的过滤吸附作用和阴性离子交换柱的离子交换作用来除去提取水中部分中的糖分及其他杂质。然后用蒸馏水清洗,定容至10 mL^[15]。

1.4.2.6 肌醇类物质的含量测定

使用高效液相色谱仪对肌醇类物质进行含量测定,分析条件为:离子交换柱为CarboPac MA1,是一种强阴离子交换柱。流动相为NaOH溶液(A液100 mmol/L:0~10 min, B液500 mmol/L:10~40 min)。检出器为Pulsed Amperometry检出器。流速为0.4 mL/min。进样量为25 μ L。

1.5 不同时期蒲公英水煮液的降血糖实验

分别准确称取不同采摘时期的新鲜蒲公英,将1 kg的蒲公英平均分成3份,每次加1 L蒸馏水,充分浸泡30 min后,用小火煮沸30 min后用水浴浓缩水煮液。将3次的蒲公英浓缩液混合,并保证使3次总量不超过1 L,用蒸馏水定容至1 L,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

选取糖尿病模型小鼠10只,雌雄各半,作为模型对照组,另取质量相似的健康昆明种小鼠10只,雌雄各半,作为空白对照组。选取糖尿病模型小鼠110只,每组10只,雌雄各半,进行蒲公英水煮液的降血糖实验,每天按照20 mg/(kg $\cdot$ d)的剂量灌胃1次,模型对照组和空白对照组分别给予同等剂量的生理盐水,连续15 d。仔细观察小鼠外貌体征的改变,并于末次灌胃后对其禁食12 h,然后通过眼眶静脉取血法取血,3 500 r/min,离心10 min,收集血清,测定空腹血糖值。

$$\text{血糖变化率/\%} = \frac{\text{给药后小鼠血糖值/(mmol/L)} - \text{给药前小鼠血糖值/(mmol/L)}}{\text{给药前小鼠血糖值/(mmol/L)}} \times 100$$

1.6 数据统计

采用SPSS16.0统计学软件进行数理统计,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,样本均数经方差分析、*t*检验,以 $P < 0.05$ 为存在统计学差异。

2 结果与分析

2.1 蒲公英中黄酮含量的变化

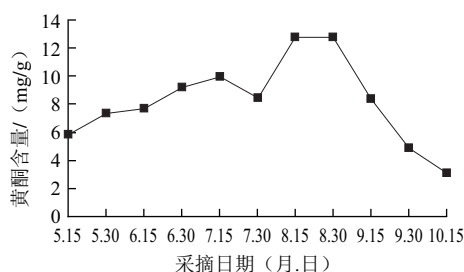


图1 不同采摘时期蒲公英全草中黄酮含量

Fig.1 Flavonoids contents in dandelion during different harvesting periods

由图1可知,随着时间的变化,蒲公英中的黄酮含量呈上升趋势,而8月15日采摘的蒲公英其全草中黄酮含量最高,约为12.78 mg/g,8月30日采摘的蒲公英中黄酮含量略有下降,随后便出现了大幅度的下降。

2.2 蒲公英中皂苷含量的变化

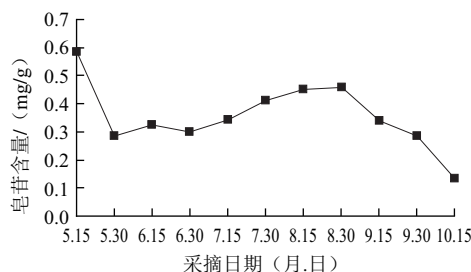


图2 不同采摘时期蒲公英全草中皂苷含量

Fig.2 Saponin contents in dandelion during different harvesting periods

由图2可知,随着采摘时期的变化,蒲公英中的皂苷含量逐渐增加,其中5月30日至8月30日采摘的蒲公英全草中的皂苷含量呈小幅度的上升,8月30日皂苷含量达到最高,为0.46 mg/g,随后便出现明显下降。

2.3 蒲公英中肌醇类含量的变化

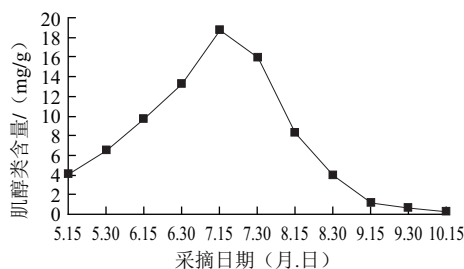


图3 不同采摘时期蒲公英全草中肌醇的含量

Fig.3 Myo-inositol contents in dandelion during different harvesting periods

由图3知,随着采摘时期的变化,蒲公英中的中肌醇含量逐渐增加,其中7月15日采摘的蒲公英全草中的中肌醇含量最高,为18.72 mg/g。

2.4 不同采摘时期蒲公英中D-手性肌醇含量的变化

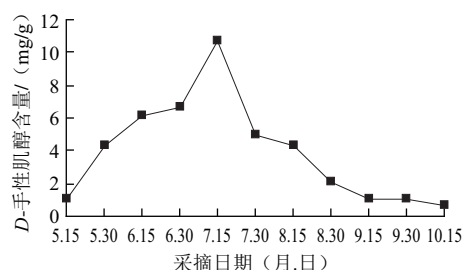


图4 不同采摘时期蒲公英中D-手性肌醇含量

Fig.4 D-chiral inositol contents in dandelion during different harvesting periods

由图4可知,随着采摘时期的变化,蒲公英中的D-手性肌醇含量逐渐增加,其中7月15日采摘的蒲公英全草中的D-手性肌醇含量最高,为10.64 mg/g,随后便出现大幅度下降。

2.5 不同采摘时期的蒲公英水煮液长期灌胃对小鼠血糖影响

表1 不同采摘时期的蒲公英水煮液长期灌胃对小鼠血糖值影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of long-term administration of dandelion decoctions from different harvesting periods on blood sugar in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	血糖值/(mmol/L)			
	0 d	5 d	10 d	15 d
模型组	22.13±1.37	27.54±2.13	30.37±1.35	25.69±1.03
空白对照组	8.34±1.71	11.32±1.84	9.41±1.16	7.28±1.29
5月15日剂量组	21.34±3.34	24.05±1.23	29.22±0.75	26.24±4.60
5月30日剂量组	23.16±1.75	27.24±0.02	31.06±0.07	30.31±3.14
6月15日剂量组	20.63±3.42	23.31±2.43	28.27±1.43	27.86±2.41
6月30日剂量组	21.30±2.41	26.24±1.04	29.03±0.72	28.13±2.01
7月15日剂量组	20.45±1.08	18.54±1.01	18.37±0.83	17.27±0.74
7月30日剂量组	20.04±0.41	15.33±0.56	13.35±0.49	10.16±0.37
8月15日剂量组	19.75±0.92	13.32±0.41	11.87±0.76	12.04±0.58
8月30日剂量组	22.43±1.07	27.34±1.03	24.27±1.75	19.31±2.03
9月15日剂量组	21.05±0.31	24.54±0.17	30.04±1.35	26.63±1.57
9月30日剂量组	22.43±1.67	22.92±2.13	27.21±0.78	25.42±0.03
10月15日剂量组	20.19±2.32	21.04±1.36	26.31±0.32	25.18±1.46

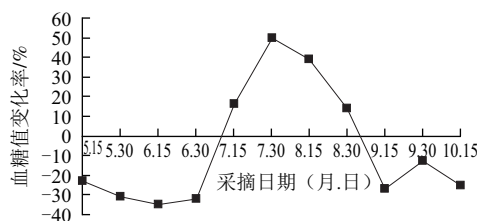


图5 不同采摘时期蒲公英水煮液导致小鼠血糖值的变化率

Fig.5 Percent change in blood sugar level in mice induced by dandelion decoctions from different harvesting periods

由表1可知,模型组和空白对照组小鼠血糖值保持比较稳定的水平;由图5可知,剂量组中从7月中旬到8月末(4个时期)采摘的蒲公英水煮液均有良好的降血糖效果,在15 d内血糖值分别降低了15.6%、49.3%、38.1%和13.9%;其中,7月末采摘的蒲公英水煮液的降糖效果最好。其他时期采摘的蒲公英,其水煮液降血糖效果并不明显。

3 讨论

本实验以长白山野生蒲公英作为原料,研究了不同采摘时期的蒲公英中黄酮类、皂苷类、肌醇类物质含量变化情况,并寻找到了最佳采摘时期有最佳降血糖功效的蒲公英。实验结果表明:在7月份之前的蒲公英降血糖效果不明显,这可能是降血糖物质累积的含量过低,达不到良好的降血糖效果;从7月中旬到8月中旬采摘的蒲

公英均有良好的降血糖效果,其中7月下旬采摘的蒲公英使四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖值在15 d内下降49.3%。而且该时期的蒲公英中黄酮类物质含量为8.41 mg/g、皂苷类物质含量为0.41 mg/g、中肌醇的含量为15.90 mg/g、D-手性肌醇的含量为4.95 mg/g;8月下旬开始蒲公英的降血糖效果逐渐减弱,这可能是由于降血糖物质含量下降,逐渐趋向于痕量,导致降血糖的能力减弱。黄酮类物质有助于克服病人体内的“胰岛素抵抗因子”,从而使血糖过高的病人恢复正常血糖值;皂苷类物质抗高血糖的作用的靶点和途径比较广泛,能直接修复损坏的胰岛细胞,增加胰岛素水平^[16];肌醇类物质中肌醇可以直接参与磷脂酰肌醇的合成,当身体内葡萄糖含量增高时,可以刺激胰岛素B细胞更多的生成磷脂酰肌醇,而生成的磷脂酰肌醇又可以反馈调节胰岛素B细胞功能,包括促进胰岛素分泌等,从而形成了一个自分泌胰岛素反馈调节环^[17]。D-手性-肌醇并不是通过提高血液中胰岛素水平来降低血糖浓度的,而是有可能通过提高了胰岛素的敏感性来达到降低血糖浓度的目的^[18-20]。至于有关几种降血糖物质之间有无联合的降血糖功效还需要进一步进行实验分析。

4 结论

本实验以长白山地区的野生蒲公英作为原料,对不同采摘时期的蒲公英中黄酮类、皂苷类、肌醇类物质含量进行测定,并研究不同采摘时期的蒲公英降血糖作用的差异。结果表明:从7月中旬到8月中旬采摘的蒲公英均有良好的降血糖效果。其中,在7月下旬的蒲公英降血糖效果最好,使四氧嘧啶致糖尿病小鼠的血糖值在15 d内下降49.3%。而且该时期的蒲公英中黄酮类物质含量为8.41 mg/g;皂苷类物质含量为0.41 mg/g;中肌醇的含量为15.90 mg/g;D-手性肌醇的含量为4.95 mg/g。

参考文献:

- [1] 李立明. 糖尿病生存质量研究[J]. 中华流行病学杂志, 1998, 12(3): 12-14.
- [2] DAVIS A. Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance[J]. Diabetes Care, 2000, 23(7): 1000.
- [3] SON S M, MOON K D, LEE C Y. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 9: 237-252.
- [4] BATES S H, JONES R B, BAILEY C J. Insulin-like effect of pinitol[J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 130 (8): 1944-1948.
- [5] 詹天荣, 姜红祥. 右旋肌醇甲醚的植物资源与医药功效[J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(1): 17-19.
- [6] LAKSHIMI V, GUPTA P, TIWARI P, et al. Antihyperglycemic activity of *Rhizophora apiculata* BI. in rats [J]. Natural Product Research, 2006, 20(14): 1295-1299.
- [7] LAMER J. D-Chiro-inositolits functiona role in insulin and its deficit

- in insulin resistance[J]. International Journal of Experimental Diabetes Research, 2002, 3(1): 47-60.
- [8] BRESSLER R, JONSON G. Pharmacological regulation of blood glucose levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Archives of International Medicine, 1997, 157: 836-848.
- [9] AHREN B, LANDIN-OLSSON M, JANSSON P A, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemic, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type II diabetes[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004, 89(5): 2078-2084.
- [10] 王立娟. 蒲公英总黄酮的提取及其抑菌性能[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(8): 42-45.
- [11] 王立娟. 桔皮总黄酮的提取条件[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 70-72.
- [12] 李华. 大豆皂苷提取方法的比较[J]. 食品科技, 2008, 33(1): 122-125.
- [13] BAUER A K, DWYER N L. The lung tumor promoter, butylated hydroxyl toluene(BHT), cause chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice[J]. Toxicology, 2001, 169(1): 1-15.
- [14] NORBERG G. Cadmium and human health: a perspective based on recent studies in China[J]. Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 2003, 16: 307- 309.
- [15] 姜斌, 沈明浩. 功能性肌醇类物质提取与降血糖功能研究[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(5): 11-17.
- [16] 胡勇, 李维林, 林厚文, 等. 白背三七地上部分降血糖作用研究[J]. 西南林学院学报, 2007, 27(1): 55-58.
- [17] KIM M J, YOON H, KIM J H, et al. Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2007, 77 (Suppl 1): 247-251.
- [18] XIA T, WANG Q. *D*-Chiro-inositol found in cucurbita ficifolia(*Cucurbitaceae*) fruit extracts plays the hypoglycemic role in streptozotocin-diabetic rats[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2006, 58(11): 1527-1532.
- [19] ORTMEYER H K. Dietary myo-inositol result s in lower urine glucose and in lower post prandial plasma glucose in obese insulin resistant Rhesus monkeys[J]. Obesity Research, 1996, 4(6): 569-575.
- [20] SCIOSCIA M , KUNJARA S, GUMAA K, et al. Altered urinary release of inositol phosphoglycan A-type in women with gestational diabetes mellitus[J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2007, 64(4): 217-223.