

泽泻降糖活性提取物化学成分研究

许文^{1,2}, 罗奋熔², 赵万里², 李小艳², 李雪君², 刘灿坤², 于志文¹, 吴水生^{2*}

1. 福建中医药大学 生物医药研发中心, 福建 福州 350122

2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘要: 目的 研究泽泻 *Alisma orientalis* 根茎具降糖活性的提取物的化学成分。方法 通过用泽泻水、醇提物干预高脂饮食诱导的小鼠胰岛素抵抗模型, 从整体上观察泽泻提取物对小鼠糖耐量的影响, 然后采用硅胶、ODS、制备液相等分离方法对具有降糖活性的醇提物进行分离, 通过核磁共振和质谱等波谱数据鉴定化合物结构。结果 对于高脂饲养小鼠胰岛素抵抗模型, 泽泻水、醇提物均可改善糖耐量。进一步从泽泻醇提物中分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为谷甾醇 (1)、棕榈酸 (2)、十七烷酸 (3)、二十烷酸 (4)、11-去氧泽泻醇 B (5)、23-乙酰泽泻醇 B (6)、23-乙酰泽泻醇 C (7)、泽泻醇 B (8)、24-乙酰泽泻醇 A (9)、泽泻醇 G (10)、24-乙酰泽泻醇 F (11)、泽泻醇 L (12)、泽泻醇 C (13)、泽泻醇 F (14)、泽泻醇 A (15)、16-羰基-24-乙酰泽泻醇 A (16); 其中 9 种三萜类成分具有促进 HepG2 细胞葡萄糖摄取活性。结论 化合物 3、4 为首次从泽泻中分离得到, 泽泻水、醇提物均可改善高脂诱导小鼠胰岛素抵抗, 泽泻三萜类成分可能是其降糖药效物质基础之一。

关键词: 泽泻; 三萜; 降糖活性; 24-乙酰泽泻醇 A; 23-乙酰泽泻醇 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3238-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.005

Chemical constituents from *Alisma orientalis* extracts with hypoglycemic effect

XU Wen^{1,2}, LUO Fen-rong², ZHAO Wan-li², LI Xiao-yan², LI Xue-jun², LIU Can-kun², YU Zhi-wen¹,
WU Shui-sheng²

1. Centre of Biomedical Research & Development, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in *Alisma orientalis* extracts with hypoglycemic effect. **Methods** To study the *in vivo* hypoglycemic effects of *A. orientalis* extracts, high fat diet (HFD)-induced insulin resistance male C57BL/6J mice were treated with water and ethanol extracts of *A. orientalis* in diet, and glucose tolerance test was carried out following the intervention. Silica gel, ODS, and preparative HPLC were used to isolate the compounds. Their chemical structures were elucidated on the basis of NMR and MS spectral data. **Results** Sixteen compounds were identified as sitosterol (1), palmitic acid (2), heptadecanoic acid (3), eicosanoic acid (4), 11-deoxy-alisol B (5), 23-acetate alisol B (6), 23-acetate alisol C (7), alisol B (8), 24-acetate alisol A (9), alisol G (10), 24-acetate alisol F (11), alisol L (12), alisol C (13), alisol F (14), alisol A (15), and 16-oxo-24-acetate alisol A (16), and nine of the triterpenes could improve glucose uptake in HepG2 cells. **Conclusion** Compounds 3 and 4 are isolated from *A. orientalis* for the first time. The water and ethanol extracts of *A. orientalis* could improve glucose tolerance test. Triterpenes may be one of the therapeutic material basis in hypoglycemic activities in *A. orientalis*.

Key words: *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; triterpenes; hypoglycemic; 24-acetate alisol A; 23-acetate alisol B

泽泻 *Alismatis Rhizoma* 为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。中医理论认为其甘、淡, 寒, 归肾、膀胱经, 利水渗湿, 泄热, 化浊降脂。从 20 世纪 60 年代起至今, 国内

外学者从泽泻中分离得到的化学成分有近百种, 以原萜烷型四环三萜类成分为主要成分^[1]。现代药理学研究也表明, 泽泻具有较好的降糖作用^[2-5], 但其药效物质基础尚未完全阐明。为了进一步研究泽泻

收稿日期: 2014-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1205022); 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAI01B06); 福建省自然科学基金资助项目 (2014J01352); 福建省卫生厅青年科研资助课题 (2013-2-55); 校管课题 (X2012023); 福建省大学生创新创业大学生创新创业训练计划项目 (201310393016)

作者简介: 许文 (1986—), 男, 研究实习员, 研究方向为中药复方药效物质基础。E-mail: yaoxuexuwen@qq.com

*通信作者 吴水生 (1965—), 男, 教授, 博士生导师。Tel: (0591)22861135 E-mail: wushuishengwss@163.com

降糖作用的物质基础, 本实验对泽泻水提物和醇提物进行体内降糖活性考察, 在明确其降糖作用的基础上对提取物进行化学成分研究。对高脂饲喂致小鼠胰岛素抵抗模型, 泽泻水、醇提物均可明显改善糖耐量。对泽泻醇提物进行化学成分研究, 共分离得到 16 个化合物, 分别鉴定为谷甾醇 (sitosterol, 1)、棕榈酸 (palmitic acid, 2)、十七烷酸 (heptadecanoic acid, 3)、二十烷酸 (eicosanoic acid, 4)、11-去氧泽泻醇 B (11-deoxy-alisol B, 5)、23-乙酰泽泻醇 B (23-acetate alisol B, 6)、23-乙酰泽泻醇 C (23-acetate alisol C, 7)、泽泻醇 B (alisol B, 8)、24-乙酰泽泻醇 A (24-acetate alisol A, 9)、泽泻醇 G (alisol G, 10)、24-乙酰泽泻醇 F (24-acetate alisol F, 11)、泽泻醇 L (alisol L, 12)、泽泻醇 C (alisol C, 13)、泽泻醇 F (alisol F, 14)、泽泻醇 A (alisol A, 15)、16-羰基-24-乙酰泽泻醇 A (16-oxo-24-acetate alisol A, 16)。其中化合物 3、4 为首次从泽泻中分离得到, 泽泻三萜类成分可能是其降糖药效物质基础之一。

1 仪器和材料

Bruker AEANCE III 核磁共振仪 (德国布鲁克公司); Waters SQD2 MS (美国 Waters 公司); Waters Auto Purification 自动纯化系统制备液相 (美国 Waters 公司); 中低压制备色谱仪 (苏州利穗公司); 色谱柱 (福州裕华实验器材有限公司); 薄层色谱硅胶、柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶、ODS-C₁₈ 反相填料 50 μm (北京绿百草有限公司); 血糖测定仪购自江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; FLUO STAR Omega 多功能荧光酶标仪 (德国 BMG LABTECH 公司); HERACELL 150i 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); 2-NBDG (美国 Invitron 公司); 罗格列酮 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清、胰酶、DMEM 低糖 (美国 HycLone 公司), 其余所用试剂均为分析纯。

泽泻干燥块茎购自福建金山医药有限公司, 经福建中医药大学药用植物实验室范世明高级实验师鉴定为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 许可证号 SCXK (京) 2009-0004, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; 普通饲料 (5% 脂肪)、高脂饲料 (45% 脂肪) 及高脂添加泽泻水提物、醇提物饲料均由广东省医学实验动物中心加工制作。人肝癌 HepG2

细胞 (中国科学院上海细胞库)。

2 方法与结果

2.1 泽泻提取物制备

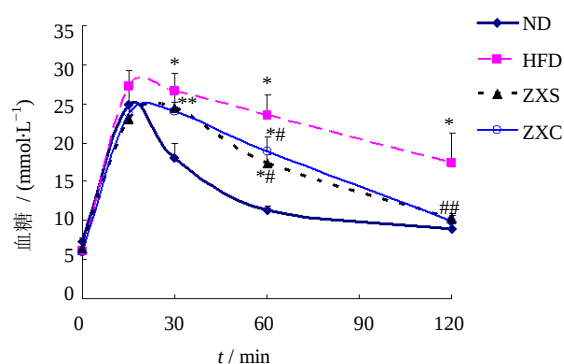
泽泻粗粉 2 kg 用 8 倍量的 80% 乙醇溶液加热回流提取 3 次, 时间均为 2 h, 抽滤得提取液, 减压回收溶剂得泽泻醇提物 200 g。另取泽泻粗粉 1 kg 用 8 倍量的蒸馏水, 加热回流提取 3 次, 时间均为 2 h, 抽滤得提取液, 减压回收溶剂得泽泻水提物 100 g。

2.2 高脂饮食诱导小鼠胰岛素抵抗模型及泽泻干预作用

雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 体质量 (15.0±1.2) g, 饲养于福建医科大学 SPF 级实验动物中心。适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分为对照组 (ND 组)、高脂饮食组 (HFD 组)、泽泻水提物干预组 (ZXS 组)、泽泻醇提物干预组 (ZXC 组), 每组 10 只, ND 组给予普通饲料, HFD 组给予高脂饲料, ZXS 组和 ZXC 组前 8 周先给予高脂饲料造模, 在第 9 周进行糖耐量实验验证造模成功后, ZXS 组给予泽泻水提物混合高脂饲料 (相当于每千克高脂饲料含泽泻生药量 100 g 的水提物, 按进食量换算给药量为生药量 12 g/kg), ZXC 组则给予泽泻醇提物混合高脂饲料 (相当于每千克高脂饲料含泽泻生药量 100 g 的醇提物, 按进食量换算给药量为生药量 12 g/kg), 每周记录体质量, 在小鼠喂养至第 11 周时, 进行糖耐量实验: 实验前小鼠禁食, 然后 ip 葡萄糖溶液 (1.5 g/kg), 并于 0、15、30、60、120 min 尾静脉取血, 并用血糖仪测定血糖浓度值; 所得血糖值-时间的曲线下面积 AUC 由 DAS 2.0 软件分析得出。从 AUC 统计分析结果表明泽泻醇提物和水提物均能有效改善糖耐量曲线, 结果见图 1、2, 表明泽泻醇、水提物均有降糖作用。

2.3 泽泻醇提物化学成分分离

将泽泻醇提物 100 g, 用硅胶拌样, 以不同比例石油醚-醋酸乙酯 (50:1→0:1) 梯度洗脱, 得到 5 个洗脱部分 Fr. 1~5 (50:1、10:1、4:1、1:1、0:1), 其中 Fr. 1 采用硅胶柱色谱法分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (50:1→15:1) 的不同比例的洗脱液经反复硅胶柱色谱分别得到化合物 1 (85 mg)、2 (15 mg)、3 (20 mg)、4 (24 mg)。Fr. 2 采用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (10:1→1:1) 不同比例的洗脱液经 TLC 跟踪检识, 馏份经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱法分离得到化合物 5 (20 mg)。Fr. 3 采用硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋



与 ND 组比较: * $P < 0.05$; 与 HFD 组比较: # $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs ND group; # $P < 0.05$ vs HFD group, same as below

图1 泽泻提取物对高脂饲料小鼠糖耐量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of *A. orientalis* extracts on HFD-induced abnormality mice in glucose tolerance
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

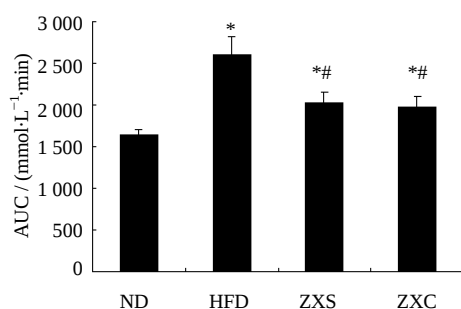


图2 各组葡萄糖耐量血糖值-时间曲线下面积
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Area under curve of glucose tolerance test
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

酸乙酯 (5:1→1:1) 洗脱, 流经经中压-ODS 色谱制备得化合物 6 (585 mg)、化合物 7 (383 mg)。Fr. 4 采用中压-ODS 色谱制备分离和 Waters 自动纯化系统制备液相制备, 得到化合物 8 (255 mg)、9 (120 mg)、10 (12 mg)、11 (8 mg)。Fr. 5 采用中压-ODS 色谱制备分离和 Waters 自动纯化系统制备液相制备, 得到化合物 12 (20 mg)、13 (22 mg)、14 (10 mg)、15 (55 mg)、16 (11 mg)。

2.4 结构鉴定

化合物 1: 无色针状结晶 (醋酸乙酯), 硫酸乙醇加热显红色, 与 β -谷甾醇对照品共薄层, 斑点 Rf 值相同。ESI-MS m/z : 437 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{29}H_{50}O$, 相对分子质量为 414。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.45 (1H, ddd, $J = 6.4, 10.8, 16.0$ Hz, H-3),

5.37 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 37.2 (C-1), 31.5 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 31.6 (C-7), 31.9 (C-8), 50.1 (C-9), 36.5 (C-10), 21.1 (C-11), 28.2 (C-12), 42.2 (C-13), 56.7 (C-14), 24.3 (C-15), 39.6 (C-16), 55.9 (C-17), 12.2 (C-18), 19.4 (C-19), 36.1 (C-20), 18.7 (C-21), 33.9 (C-22), 26.0 (C-23), 45.8 (C-24), 29.1 (C-25), 19.0 (C-26), 19.8 (C-27), 23.0 (C-28), 11.8 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[6], 故鉴定化合物 1 为 β -谷甾醇。

化合物 2: 白色粒状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 硫酸乙醇显紫红色, ESI-MS m/z : 279 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{16}H_{32}O_2$, 相对分子质量 256。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-16), 1.28 (2H $\times$ 12, brs, H-4~15), 1.63 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.1 (C-1), 34.1 (C-2), 31.9 (C-3), 29.7 (C-4), 29.6~29.0 (C-5~13), 24.7 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16)。以上数据与文献报道基本一致^[7], 故鉴定化合物 2 为棕榈酸。

化合物 3: 白色粉末, 5% 的硫酸乙醇显紫红色, ESI-MS m/z : 293 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{17}H_{34}O_2$, 相对分子质量 270。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-17), 1.28 (2H $\times$ 13, brs, H-4~16), 1.63 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.1 (C-1), 34.1 (C-2), 31.9 (C-3), 29.72 (C-4), 29.7~29.1 (C-5~14), 24.7 (C-15), 22.7 (C-16), 14.1 (C-17)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 3 为十七烷酸。

化合物 4: 白色粉末状结晶 (石油醚-醋酸乙酯), 硫酸乙醇显紫红色。ESI-MS m/z : 335 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{20}H_{40}O_2$, 相对分子质量 312。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, H-20), 1.28 (2H $\times$ 16, brs, H-4~19), 1.63 (2H, m, H-3), 2.34 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.1 (C-1), 34.1 (C-2), 31.9 (C-3), 29.7 (C-4), 29.7~29.1 (C-5~17), 24.7 (C-18), 22.7 (C-19), 14.1 (C-20)。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 4 为二十烷酸。

化合物 5: 白色粉末, 硫酸乙醇显紫色, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 479 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{48}O_3$, 相对分子质量 456。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.81, 1.00, 1.06, 1.07,

1.20, 1.23, 1.31 (各 3H, s, 30, 19, 28, 29, 18, 26, 27-CH₃), 1.03 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 2.47 (1H, dd, $J = 5.2, 14.0$ Hz, H-12), 2.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-24), 3.23 (1H, m, H-23); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 31.9 (C-1), 33.8 (C-2), 220.2 (C-3), 47.0 (C-4), 48.2 (C-5), 20.0 (C-6), 34.0 (C-7), 40.6 (C-8), 43.9 (C-9), 36.2 (C-10), 22.6 (C-11), 22.9 (C-12), 140.4 (C-13), 57.3 (C-14), 31.1 (C-15), 28.8 (C-16), 133.7 (C-17), 23.5 (C-18), 22.8 (C-19), 27.7 (C-20), 20.2 (C-21), 38.9 (C-22), 69.3 (C-23), 67.8 (C-24), 59.2 (C-25), 19.1 (C-26), 24.7 (C-27), 29.1 (C-28), 19.7 (C-29), 23.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **5** 为 11-去氧泽泻醇 B。

化合物 **6**: 无色棱晶 (甲醇), 硫酸乙醇液加热显紫红色斑点, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 537 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₂H₅₀O₅, 相对分子质量 514。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.96, 1.04, 1.05, 1.06, 1.14, 1.31, 1.33 (各 3H, s, 30, 19, 28, 29, 18, 26, 27-CH₃), 1.02 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 1.72 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.06 (3H, s, OAc), 2.55 (1H, dd, $J = 5.6, 13.2$ Hz, H-12), 2.73 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-24), 3.80 (1H, m, H-11), 4.61 (1H, m, H-23); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 30.9 (C-1), 33.7 (C-2), 220.0 (C-3), 46.9 (C-4), 48.4 (C-5), 20.0 (C-6), 34.1 (C-7), 40.7 (C-8), 50.0 (C-9), 36.9 (C-10), 70.2 (C-11), 34.5 (C-12), 138.0 (C-13), 57.0 (C-14), 30.6 (C-15), 29.1 (C-16), 134.2 (C-17), 23.1 (C-18), 25.6 (C-19), 27.8 (C-20), 20.0 (C-21), 36.7 (C-22), 71.4 (C-23), 65.0 (C-24), 58.4 (C-25), 19.4 (C-26), 24.6 (C-27), 29.5 (C-28), 20.1 (C-29), 23.8 (C-30), 169.9 (C-31), 21.1 (C-32)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **6** 为 23-乙酰泽泻醇 B。

化合物 **7**: 无色柱晶 (甲醇), 硫酸乙醇液加热显无色斑点, 置于 365 nm 紫外灯下显示蓝色斑点, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 551 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₂H₄₈O₆, 相对分子质量 528。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.89, 1.07, 1.08, 1.10, 1.23, 1.29, 1.32 (各 3H, s, 30, 29, 28, 19, 26, 27, 18-CH₃), 1.19 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.76 (1H, ddd, $J = 4.0, 10.8, 14.8$ Hz, H-22), 1.88 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-9), 2.06 (3H, s, OAc), 2.62 (1H, m, H-20), 2.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-24), 2.89 (1H, dd, $J = 5.6, 14.0$ Hz, H-12), 4.00 (1H, m, H-11), 4.52 (1H, m,

H-23); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 30.8 (C-1), 33.5 (C-2), 220.0 (C-3), 46.9 (C-4), 48.4 (C-5), 19.9 (C-6), 34.8 (C-7), 40.1 (C-8), 48.8 (C-9), 36.9 (C-10), 69.8 (C-11), 35.6 (C-12), 176.8 (C-13), 49.7 (C-14), 45.7 (C-15), 207.9 (C-16), 138.5 (C-17), 23.0 (C-18), 25.5 (C-19), 26.6 (C-20), 20.0 (C-21), 35.6 (C-22), 71.8 (C-23), 64.9 (C-24), 58.6 (C-25), 19.7 (C-26), 24.6 (C-27), 29.5 (C-28), 19.2 (C-29), 23.1 (C-30), 170.0 (C-31), 21.1 (C-32)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **7** 为 23-乙酰泽泻醇 C。

化合物 **8**: 白色无定形粉末, 硫酸乙醇液显黄色, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 495 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₀H₄₈O₄, 相对分子质量 472。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.99, 1.05, 1.06, 1.07, 1.12, 1.24, 1.31 (各 3H, s, 30, 19, 28, 29, 18, 26, 27-CH₃), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.55 (1H, ddd, $J = 3.6, 10.4, 14.0$ Hz, H-22 α), 1.73 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-24), 2.79 (1H, dd, $J = 5.6, 13.2$ Hz, H-12), 2.90 (1H, m, H-22 β), 3.21 (1H, m, H-23), 3.87 (1H, ddd, $J = 5.6, 10.4, 10.8$ Hz, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 31.0 (C-1), 33.7 (C-2), 220.2 (C-3), 46.9 (C-4), 48.5 (C-5), 20.0 (C-6), 34.3 (C-7), 40.6 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 69.9 (C-11), 34.4 (C-12), 138.0 (C-13), 57.0 (C-14), 30.6 (C-15), 29.1 (C-16), 134.9 (C-17), 23.3 (C-18), 25.5 (C-19), 27.7 (C-20), 20.1 (C-21), 38.8 (C-22), 69.1 (C-23), 67.8 (C-24), 59.2 (C-25), 19.1 (C-26), 24.9 (C-27), 29.5 (C-28), 20.0 (C-29), 23.9 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **8** 为泽泻醇 B。

化合物 **9**: 无色针晶 (乙腈), 硫酸乙醇液显红色斑点, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 555 [M+Na]⁺, 分子式 C₃₂H₅₂O₆, 相对分子质量 532。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.99, 1.00, 1.06, 1.07, 1.14, 1.16, 1.30 (各 3H, s, 18, 19, 29, 30, 28, 26, 27-CH₃), 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.75 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.19 (3H, s, OAc), 2.81 (2H, m, H-12, 20), 3.85 (2H, overlapped, H-11, 23), 4.60 (1H, brd, $J = 1.2$ Hz, H-24); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 31.0 (C-1), 33.7 (C-2), 220.1 (C-3), 46.9 (C-4), 48.5 (C-5), 20.0 (C-6), 34.3 (C-7), 40.5 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 70.0 (C-11), 34.5 (C-12), 137.9 (C-13), 57.0 (C-14), 30.5 (C-15), 29.1 (C-16),

135.2 (C-17), 23.2 (C-18), 25.5 (C-19), 27.9 (C-20), 19.9 (C-21), 39.7 (C-22), 69.0 (C-23), 78.7 (C-24), 73.8 (C-25), 27.4 (C-26), 26.5 (C-27), 29.5 (C-28), 20.0 (C-29), 24.1 (C-30), 170.8 (C-31), 20.7 (C-32)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **9** 为 24-乙酰泽泻醇 A。

化合物 **10**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 495 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{48}O_4$, 相对分子质量 472。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.99, 1.01, 1.06, 1.07, 1.14 (各 3H, s, 30, 19, 29, 28, 18, 26-CH₃), 1.68 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 1.74 (1H, d, $J = 10.8$, H-9), 2.82 (1H, dd, $J = 5.2, 13.2$ Hz, H-12), 3.35 (1H, ddd, $J = 3.2, 6.4, 10.0$ Hz, H-23), 3.79 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-24), 3.88 (1H, m, H-11), 4.95 (1H, brs, H-26a), 4.99 (1H, brs, H-26b); ¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 30.6 (C-1), 33.7 (C-2), 220.1 (C-3), 46.9 (C-4), 48.5 (C-5), 20.3 (C-6), 34.6 (C-7), 40.6 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 70.1 (C-11), 34.2 (C-12), 137.5 (C-13), 57.0 (C-14), 31.0 (C-15), 29.1 (C-16), 135.5 (C-17), 23.3 (C-18), 25.6 (C-19), 28.3 (C-20), 20.0 (C-21), 38.3 (C-22), 70.5 (C-23), 79.5 (C-24), 144.5 (C-25), 114.0 (C-26), 17.9 (C-27), 29.5 (C-28), 20.0 (C-29), 24.0 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **10** 为泽泻醇 G。

化合物 **11**: 白色粉末, 硫酸乙醇液显蓝色斑点, ESI-MS m/z : 553 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{32}H_{50}O_6$, 相对分子质量 530。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.85, 1.06, 1.06, 1.07, 1.12, 1.24, 1.37 (各 3H, s, 30, 19, 29, 28, 18, 26, 27-CH₃), 1.16 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 1.75 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.19 (3H, s, OAc), 2.70 (1H, m, H-12), 2.81 (1H, m, H-20), 3.79 (1H, m, H-11), 4.27 (1H, brd, $J = 12.0$ Hz, H-23), 4.46 (1H, dd, $J = 5.2, 8.0$ Hz, H-16), 4.74 (1H, brd, $J = 2.4$ Hz, H-24); ¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 30.7 (C-1), 33.5 (C-2), 219.8 (C-3), 46.9 (C-4), 48.1 (C-5), 19.8 (C-6), 33.8 (C-7), 40.5 (C-8), 49.6 (C-9), 36.9 (C-10), 70.5 (C-11), 34.3 (C-12), 137.3 (C-13), 55.3 (C-14), 39.1 (C-15), 80.9 (C-16), 132.5 (C-17), 24.2 (C-18), 25.5 (C-19), 26.6 (C-20), 18.2 (C-21), 34.0 (C-22), 72.5 (C-23), 77.3 (C-24), 72.8 (C-25), 26.6 (C-26), 27.8 (C-27), 29.6 (C-28), 20.0 (C-29), 23.6 (C-30), 171.2 (C-31), 20.8 (C-32)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 **11** 为 24-乙酰泽泻醇 F。

化合物 **12**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 491 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{44}O_4$, 相对分子质量 468。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.97, 0.97, 1.08, 1.12, 1.12, 1.19, 1.32 (各 3H, s, 19, 30, 29, 28, 18, 26, 27-CH₃), 1.25 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 2.41 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.71 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-24), 3.02 (1H, m, H-22), 3.14 (1H, m, H-23), 6.18 (1H, dd, $J = 2.0, 10.0$ Hz, H-12), 6.72 (1H, dd, $J = 3.2, 10.0$ Hz, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 32.2 (C-1), 33.3 (C-2), 219.0 (C-3), 47.2 (C-4), 46.1 (C-5), 19.2 (C-6), 31.2 (C-7), 39.1 (C-8), 48.1 (C-9), 36.0 (C-10), 138.5 (C-11), 122.1 (C-12), 171.5 (C-13), 47.7 (C-14), 44.4 (C-15), 208.0 (C-16), 138.2 (C-17), 24.1 (C-18), 24.9 (C-19), 25.8 (C-20), 19.4 (C-21), 38.4 (C-22), 69.4 (C-23), 67.5 (C-24), 59.0 (C-25), 19.3 (C-26), 24.7 (C-27), 29.2 (C-28), 19.2 (C-29), 21.9 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **12** 为泽泻醇 L。

化合物 **13**: 白色粉末, 硫酸乙醇液加热显无色斑点, 置于 365 nm 紫外灯下显示蓝色斑点。ESI-MS m/z : 509 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{46}O_5$, 相对分子质量 486。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.91, 1.07, 1.08, 1.11, 1.13, 1.16, 1.29 (各 3H, s, 30, 29, 28, 19, 26, 27, 18-CH₃), 1.23 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 1.89 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-24), 2.92 (1H, m, H-20), 3.16 (1H, dd, $J = 5.6, 14.0$ Hz, H-12), 3.06 (1H, m, H-23), 4.05 (1H, m, H-11); ¹³C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 30.8 (C-1), 33.5 (C-2), 219.3 (C-3), 46.9 (C-4), 48.4 (C-5), 19.9 (C-6), 34.9 (C-7), 39.9 (C-8), 48.6 (C-9), 36.9 (C-10), 69.4 (C-11), 35.7 (C-12), 176.5 (C-13), 49.7 (C-14), 45.5 (C-15), 208.1 (C-16), 139.3 (C-17), 23.2 (C-18), 25.4 (C-19), 26.2 (C-20), 20.0 (C-21), 37.7 (C-22), 69.7 (C-23), 67.6 (C-24), 59.3 (C-25), 19.4 (C-26), 24.8 (C-27), 29.5 (C-28), 19.1 (C-29), 23.5 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **13** 为泽泻醇 C。

化合物 **14**: 白色粉末, 硫酸乙醇液显蓝色斑点。ESI-MS m/z : 511 $[M+Na]^+$, 分子式 $C_{30}H_{48}O_5$, 相对分子质量 488。¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.90, 1.08, 1.09, 1.10, 1.26, 1.27, 1.32 (各 3H, s, 30, 19, 29, 28, 18, 26, 27-CH₃), 1.19 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-21), 1.76 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.66 (1H, dd, $J = 5.6,$

12.4 Hz, H-12), 2.86 (1H, m, H-20), 3.07 (1H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-24), 3.82 (1H, ddd, $J = 5.6, 10.8, 10.8$ Hz, H-11), 4.05 (1H, brd, $J = 11.6$ Hz, H-23), 4.48 (1H, dd, $J = 4.8, 8.8$ Hz, H-16); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 30.7 (C-1), 33.9 (C-2), 219.8 (C-3), 46.9 (C-4), 48.2 (C-5), 19.9 (C-6), 33.6 (C-7), 40.5 (C-8), 49.6 (C-9), 36.9 (C-10), 70.5 (C-11), 34.9 (C-12), 136.9 (C-13), 55.3 (C-14), 39.4 (C-15), 80.1 (C-16), 133.1 (C-17), 24.4 (C-18), 25.4 (C-19), 26.6 (C-20), 18.3 (C-21), 33.9 (C-22), 72.6 (C-23), 77.2 (C-24), 73.3 (C-25), 26.5 (C-26), 27.0 (C-27), 29.6 (C-28), 20.0 (C-29), 23.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 **14** 为泽泻醇 F。

化合物 **15**: 白色粉末, 硫酸乙醇液显红色斑点, Liebermann-Burchard 反应显阳性。ESI-MS m/z : 513 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$, 相对分子质量 490。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.00, 1.06, 1.06, 1.07, 1.14, 1.22, 1.27 (各 3H, s, 18, 19, 29, 30, 28, 26, 27- CH_3), 1.01 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 1.66 (1H, m, H-22), 1.75 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-9), 2.79 (1H, dd, $J = 5.6, 13.2$ Hz, H-12), 3.01 (1H, brs, H-24), 3.79 (1H, dd, $J = 3.2, 9.6$ Hz, H-23), 3.88 (1H, m, H-11); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 31.0 (C-1), 33.7 (C-2), 220.2 (C-3), 46.9 (C-4), 48.5 (C-5), 20.0 (C-6), 34.3 (C-7), 40.5 (C-8), 49.7 (C-9), 36.9 (C-10), 70.0 (C-11), 34.5 (C-12), 137.5 (C-13), 57.0 (C-14), 30.5 (C-15), 29.2 (C-16), 135.6 (C-17), 23.1 (C-18), 25.6 (C-19), 28.3 (C-20), 20.1 (C-21), 40.0 (C-22), 69.4 (C-23), 77.5 (C-24), 74.2 (C-25), 27.3 (C-26), 26.0 (C-27), 29.5 (C-28), 20.0 (C-29), 24.1 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **15** 为泽泻醇 A。

化合物 **16**: 白色粉末, ESI-MS m/z : 569 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_7$, 相对分子质量 546。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.89, 1.07, 1.08, 1.12, 1.13, 1.24, 1.33 (各 3H, s, 18, 19, 29, 30, 28, 26, 27- CH_3), 1.16 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 1.94 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-9), 2.20 (3H, s, OAc), 3.20 (1H, dd, $J = 6.0, 14.0$ Hz, H-12), 3.79 (1H, dd, $J = 2.4, 9.2$ Hz, H-23), 4.05 (1H, m, H-11), 4.60 (1H, brd, $J = 1.2$ Hz, H-24); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 31.9 (C-1), 33.5 (C-2), 219.5 (C-3), 46.9 (C-4), 48.4 (C-5), 20.8 (C-6), 34.9 (C-7), 40.1 (C-8), 48.7 (C-9), 36.9 (C-10), 69.8

(C-11), 39.4 (C-12), 177.4 (C-13), 50.1 (C-14), 45.6 (C-15), 209.4 (C-16), 140.0 (C-17), 22.9 (C-18), 25.3 (C-19), 25.6 (C-20), 20.0 (C-21), 36.1 (C-22), 72.6 (C-23), 78.4 (C-24), 69.5 (C-25), 27.1 (C-26), 26.8 (C-27), 29.5 (C-28), 19.2 (C-29), 23.4 (C-30), 170.9 (C-31), 21.3 (C-32)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **16** 为 16-羰基-24 乙酰泽泻醇 A。

3 泽泻三萜体外降糖活性实验

泽泻三萜 **5~16**, 分别采用 MTT 法测定对 HepG2 细胞的安全给药浓度, 其中 11-去氧泽泻醇 B (**5**)、23-乙酰泽泻醇 C (**7**)、24-乙酰泽泻醇 F (**11**)、泽泻醇 L (**12**)、泽泻醇 C (**13**)、泽泻醇 F (**14**)、16-羰基-24-乙酰泽泻醇 A (**16**) 及阳性药罗格列酮 (Ros) 最终选择给药浓度为 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$, 而 23-乙酰泽泻醇 B (**6**)、泽泻醇 B (**8**)、24-乙酰泽泻醇 A (**9**)、泽泻醇 G (**10**)、泽泻醇 A (**15**) 最终选择 5 和 10 $\mu\text{mol/L}$, 在上述浓度下各化合物对 HepG2 细胞活力无影响。三萜化合物体外降糖活性评价采用基于 HepG2 细胞的 2-NBDG 法^[14-17], 2-NBDG [2-(*N*-7-硝基-2, 1, 3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧葡萄糖] 是带荧光标记的葡萄糖类似物。将 HepG2 细胞以每孔 1×10^4 个细胞密度接种至 96 孔荧光板, 用 DMEM 低糖培养基配制上述浓度的泽泻单体化合物处理 24 h 后, 更换培养液, 使用 DMEM 低糖培养液 (含 100 $\mu\text{mol/L}$ 2-NBDG) 培养 90 min, 弃上清, PBS 清洗 3 次后加入 70 μL 含 1% Triton X-100 PBS 液, 避光裂解细胞 10 min 后, 加 30 μL DMSO 振荡摇匀后立即于荧光酶标仪 λ_{ex} 485 nm 和 λ_{em} 520 nm 处检测 (同时检测背景荧光强度, 即无细胞处理组)。通过比较给药后细胞荧光强度变化来反馈给药组对细胞葡萄糖摄取活性的影响, 葡萄糖摄取活性 = (药物组荧光强度 - 背景荧光强度) / (空白组荧光强度 - 背景荧光强度)。结果见图 3。

实验结果表明, 与阳性药罗格列酮相似, 泽泻三萜类成分, 如 16-羰基-24 乙酰泽泻醇 A (**16**)、24-乙酰泽泻醇 A (**9**)、泽泻醇 C (**13**)、泽泻醇 A (**15**) 等 9 个三萜化合物对细胞葡萄糖摄取均具有明显的促进作用, 而 11-去氧泽泻醇 B (**5**)、泽泻醇 B (**8**) 和泽泻醇 G (**10**) 对细胞葡萄糖摄取作用不明显。

4 讨论

泽泻在古医籍上的记载很多, 被《神农本草经》列为上品, 临床上用于调脂、化浊、利尿等, 对于泽泻的降糖作用的研究也有报道, 杨新波等^[18-20]报

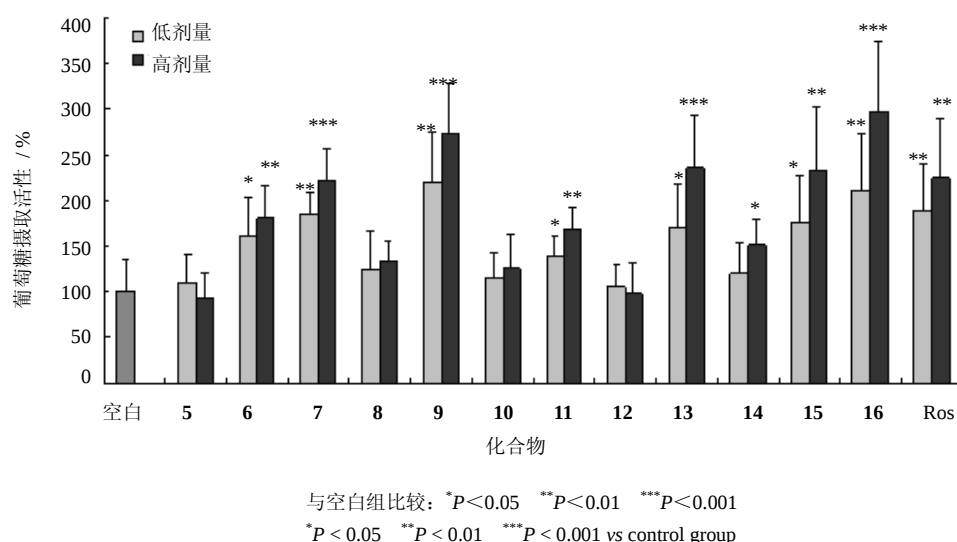


图3 泽泻中三萜类化合物促进 HepG2 细胞葡萄糖摄取活性评价 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Effect of triterpenes from *A. orientalis* on glucose uptake in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

道了泽泻提取物降糖作用,其选择的模型主要是链脲佐菌素(STZ)或者四氧嘧啶造成胰岛细胞的破坏后的高血糖症,针对的是I型糖尿病模型,泽泻提取物表现良好的降糖作用。另外,对于泽泻三萜的降糖作用的研究目前报道较少, Lin等^[3]考察了3种泽泻三萜成分对法尼醇受体(FRX)的作用,结果表明23-乙酰泽泻醇M和23-乙酰泽泻醇A能通过FRX途径起降糖作用; Li等^[4]研究表明泽泻三萜类化合物:泽泻醇F、泽泻醇B、24-乙酰泽泻醇A具有 α -葡萄糖苷酶抑制作用,其并采用体外细胞葡萄糖消耗模型评价泽泻三萜提取物,表明其具有显著促进葡萄糖吸收的活性,但未阐明其活性单体成分。本实验首先通过模拟正常高脂饮食的高脂饲料诱导建立C57BL/6J小鼠胰岛素抵抗模型^[21],采用温和的自然喂养泽泻提取物干预模型小鼠,结果表明泽泻水提和醇提物对于胰岛素抵抗的II型糖尿病均有很好的作用,该药效作用目前还未见报道。在此基础上,针对泽泻醇提物进行化学成分研究,从中分离鉴定16种成分,所得化合物主要为泽泻三萜类成分,采用2-NBDG葡萄糖摄取法评价所得三萜单体促进葡萄糖摄取活性,表明多种泽泻三萜均具有促进葡萄糖摄取活性,因此,初步认为三萜类成分可能是泽泻降糖作用的药效物质基础之一。此外,本研究还发现泽泻水提物也具有非常好的降糖作用,也将对其药效物质基础进行进一步研究。

参考文献

- [1] Liu X, Li S L, Zhou Y, et al. Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1514-1522.
- [2] Tadakazu M, Yoshio I, Takeo H, et al. Biological-active triterpenes of *Alismatis Rhizoma*. I. Isolation of the alisol [J]. *Chem Pharm Bull*, 1970, 18(7): 1347-1353.
- [3] Lin H R. Triterpenes from *Alisma orientalis* act as farnesoid X receptor agonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(14): 4787-4792.
- [4] Li Q, Qu H B. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1046-1053.
- [5] Hisashi M, Tadashi K, Iwao T, et al. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of Alismaketones-B 23-acetate and C 23-acetate [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9(21): 3081-3086.
- [6] 杨杰, 王丽莉, 周鑫堂, 等. 黄花草木犀化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(6): 622-625.
- [7] 于宗贵, 刘建宇, 宫益霞, 等. 朝鲜白头翁非皂苷类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(23): 3264-3269.
- [8] 李火云, 焦珂, 张鹏, 等. 拟缺香茶菜化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 154-160.
- [9] 陈晓东, 田伟, 邓仁华, 等. 那藤化学成分研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 671-673.

- [10] Nakajima Y, Satoh Y, Katsumata M, *et al.* Terpenoids of *Alisma orientate* Rhizome and the crude drug *Alismatis rhizome* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(1): 119-127.
- [11] 周雪峰, 尹仁杰, 阮汉利, 等. 泽泻抑制尿酸钙结石形成活性成分的 2D NMR 分析 [J]. *波谱学杂志*, 2005, 22(2): 196-200.
- [12] Masayuki Y, Norimichi T, Toshiyuki M, *et al.* Studies on *Alismatis Rhizoma*. III. Stereostructures of new protostane-type triterpenes, Alisols H, I, J-23-acetate, K-23-acetate, L-23-acetate, M-23-acetate, and N-23-acetate, from the dried rhizome of *Alisma orientale* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47(4): 524-528.
- [13] Hu X Y, Guo Y Q, Gao W Y, *et al.* Two new triterpenes from the rhizomes of *Alisma orientalis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(5): 481-484.
- [14] Wang L, Xu M L, Rasmussen S K, *et al.* Vomifoliol 9-O-a-arabinofuranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside from the leaves of *Diospyros Kakistimulates* the glucose uptake in HepG2 and 3T3-L1 cells [J]. *Carbohydr Res*, 2011, 346(10): 1212-1216.
- [15] Ha D T, Trung T N, Hien T T, *et al.* Selected compounds derived from *Moutan Cortex* stimulated glucose uptake and glycogen synthesis via AMPK activation in human HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 417-424.
- [16] Vidyashankar S, Sharath K L M, Barooah V, *et al.* Liv52 up-regulates cellular antioxidants and increase glucose uptake to circumvent oleic acid induced hepatic steatosis in HepG2 cells [J]. *Phytomedicine*, 19(13): 1156-1165.
- [17] Jung D W, Ha H H, Zheng X X, *et al.* Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects [J]. *Mol Bio Syst*, 2011, 7(2): 346-358.
- [18] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 泽泻提取物对链脉佐菌素高血糖小鼠的治疗和保护作用 [J]. *解放军药学报*, 2002, 18(6): 336-350.
- [19] 杨新波, 黄正明, 曹文斌, 等. 泽泻提取物对正常及四氧嘧啶小鼠糖尿病模型的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2002, 8(3): 24-26.
- [20] 杨新波, 黄正明, 陈红艳, 等. 泽泻不同溶剂提取物对糖尿病小鼠血糖及血液生化指标的影响 [J]. *解放军药学报*, 2006, 22(6): 419-421.
- [21] Yu Z, Shao W, Chiang Y, *et al.* Oltipraz upregulates the nuclear respiratory factor 2 alpha subunit (NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(4): 922-934.