

## 第五章 黄腐酸及黄腐酸钠的降血糖作用研究

随着社会的进步,人们的饮食结构发生了重大变化,糖尿病患病率也不断的上升。目前,全世界的糖尿病患者达到1.5亿人,预计到2025年糖尿病发病率将呈爆发趋势,将增至3亿。由于人们对健康的需要不断地增加,糖尿病已日益为人们所关注<sup>[65]</sup>。

现在人们对降糖药的要求不仅仅限于降血糖;还要求在降糖的同时,有降血脂,改善糖尿病患者的糖耐量等功能,有无毒副性反应,作用温和、缓慢而持久,性质稳定的优点。因为在天然产物中,往往多种协同因子共同作用,多种降糖成分并存。因此,在天然药物中寻找安全有效的降血糖及防治糖尿病并发症的药物具有重要意义。

本文根据李宝才等人报道普洱茶茶褐素和黄腐酸在化学性质方面(结构和官能团)存在一定的相似性,提出黄腐酸在生理活性及治疗功能方面与茶色素应具有相似性,推测黄腐酸及黄腐酸钠应具有降血糖功能。

糖尿病会导致人和动物血清中胰岛素、糖耐量、体重降低,而摄食量、饮水量、尿量增加,血清中葡萄糖、胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸含量升高。因此,测定上述指标可反映人和实验动物是否产生高血糖或患糖尿病。本论文对于血清葡萄糖、胆固醇、甘油三酯、糖耐量、小鼠的体重等几项生化指标进行初步讨论,验证黄腐酸及黄腐酸钠的降血糖作用。

### 5.1 主要实验仪器及试剂材料

#### 5.1.1 主要实验仪器

酶标仪:	Molecular Devices公司
微型离心机:	上海安亭科学仪器厂
天平:	常熟双杰测试仪器厂
移液枪(2 $\mu$ l):	大龙医疗设备(上海)有限公司
注射器(1 mL):	金坛市第二注射器厂.

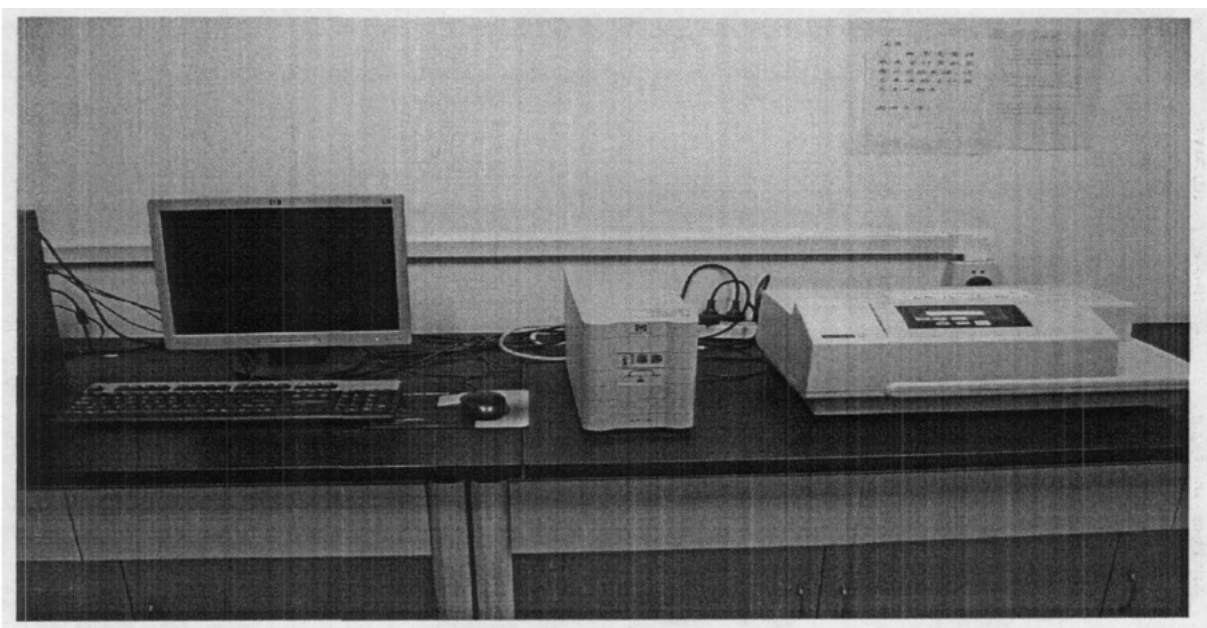


图 5.1 酶标仪

Fig.5.1 The enzyme mark instrument

### 5.1.2 主要试剂及材料

四氧嘧啶:	Sigma公司
葡萄糖酶法血糖测定盒:	上海荣盛生物药业有限公司
甘油三酯试剂盒:	上海荣盛生物药业有限公司
胆固醇试剂盒:	上海荣盛生物药业有限公司
葡萄糖:	天津市风船化学试剂科技有限公司
盐酸二甲双胍:	深圳海王药业有限公司

腐植酸及黄腐酸钠: 本实验室人员制备。

“旱地龙”黄腐酸钠: 由新疆汇通旱地龙腐植酸有限公司提供。

“双龙”黄腐酸钠: 由新疆双龙腐植酸有限公司提供。

昆明小鼠: 购买雄性昆明小鼠数只, 适应性喂养 2-3 d, 选取体重 18~22 g 小鼠进行实验。

## 5.2 实验方法

### 5.2.1 对正常小鼠血糖的影响<sup>[66-69]</sup>

取64只昆明种雄性小鼠, 随机分为8组, 每组8只, 即空白对照组、盐酸二甲双胍对照组(200 mg/kg·d)、低(200 mg/kg·d)、中(400 mg/kg·d)、高(800 mg/kg·d)剂量黄腐酸

及黄腐酸钠组(实验室自制), 各组动物按0.2 ml/10g体重灌胃给药。每天灌胃给药, 连续7 d, 空白对照组灌胃等体积蒸馏水。末次给药禁食不禁水12 h后, 于小鼠尾静脉取血, 按血糖测定试剂盒操作测定血糖值。

### 5.2.2 四氧嘧啶造模实验<sup>[70-72]</sup>

选取雄性小鼠, 禁食不禁水12 h, 将四氧嘧啶用无菌生理盐水新鲜配成2%溶液腹腔给药, 腹腔注射给药剂量250 mg/kg。为防止死亡在腹腔注射给药后4.5~5 h, 用质量分数50%葡萄糖灌胃, 每只剂量为0.2 mL/10g。一周后, 静脉取血检测空腹血糖, 以血糖在11.1 mmol/L 以上的小鼠为糖尿病模型小鼠, 成模动物整体表现出“三多一少”的症状, 即进食、饮水和尿量增多, 体重减轻等糖尿病体征。将成模小鼠纳入实验。

### 5.2.3 糖尿病小鼠的口服葡萄糖耐量实验初试<sup>[73-75]</sup>

糖尿病人服用葡萄糖后, 由于胰岛细胞受到破坏, 使葡萄糖不能被代谢或转化其他物质, 耐糖功能低下, 导致葡萄糖的含量迅速上升。服用葡萄糖30~60 min后, 血浆中血糖含量达到最高峰, 血糖峰值超过正常(200 mg/dl), 且高峰延迟, 以后下降, 2 h后不能降到正常水平。因此, 葡萄糖耐量实验对糖尿病诊断具有重大的参考价值。

取40只模型小鼠, 分4组, 即: 模型对照组、盐酸二甲双胍阳性对照组(200 mg/kg·d)、黄腐酸组(400 mg/kg)、黄腐酸钠盐组(400 mg/kg)。每天灌胃给药, 灌胃7 d, 第7 d给药前禁食12 h, 测空腹血糖。给药后1 h灌胃2.5 g/kg葡萄糖, 分别于0.5 h, 1 h, 2 h尾静脉采血测定血糖值。

### 5.2.4 对糖尿病小鼠血糖的影响(糖耐量实验)<sup>[66,69,72,76-79]</sup>

造模成功的小鼠按血糖值和体重随机分为11组, 每组8只: 空白对照组(正常小鼠), 模型对照组, 二甲双胍阳性对照组(200mg/kg·d), (新疆旱地龙公司)黄腐酸钠组(400 mg/kg·d), (新疆双龙公司)黄腐酸钠组(400 mg/kg·d), 低(200 mg/kg·d)、中(400 mg/kg·d)、高(800 mg/kg·d)剂量黄腐酸及黄腐酸钠组(实验室自制), 空白对照组和模型对照组均给予等体积的蒸馏水, 各组动物按0.2 ml/10g体重灌胃给药。每天灌胃一次, 连续灌胃12 d, 于第11 d晚小鼠禁食不禁水12 h, 次日晨灌胃1.5 h后静脉取血测定血清中血糖, 甘油三酯及胆固醇含量。实验期间分别于5 d、11 d晚禁食12 h, 次日晨静脉取血检测血糖, 每天观察测量小鼠体重, 对其进行记录。第12d晚分别对模型组、对照组、低、中、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠组小鼠禁食12 h, 次日晨静脉取血测空腹血

糖。测血糖后，灌胃给药，1 h后灌胃2.5g/kg葡萄糖，分别于0.5 h，1 h，2 h尾静脉采血测定血糖值。

测定方法：根据葡萄糖酶法血糖测定盒、甘油三酯试剂盒和胆固醇试剂盒的说明书的操作方法分别测定血清中血糖、胆固醇和甘油三酯的含量。

取血方法：尾静脉取血，4℃静置1 h后离心(3 000 r/min，1 min)制备血清。

### 5.2.5 统计学处理数据

采用 spss 统计软件中的单因素方差分析或 *student-t* 检验统计分析实验的结果，以  $X \pm S$  表示， $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异非常显著。

## 5.3 结果与分析

### 5.3.1 对正常小鼠血糖值的影响结果

表 5.1 黄腐酸及黄腐酸钠对正常小鼠血糖的影响结果( $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ )

Table 5.1 The results of fulvic acid and sodium fulvate on blood glucose of normal mice( $\bar{x} \pm s$ ， $n=10$ )

组别 groups	血糖 blood glucose (mmol/L)
空白组 normal group	6.49±0.94
对照组 control group	6.05±0.51
低剂量黄腐酸组 low dose of FA group	5.83±0.97
中剂量黄腐酸组 middle dose of FA group	4.93±0.88**##
高剂量黄腐酸组 high dose of FA group	4.88±1.00**#
低剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	5.13±0.82**#
中剂量黄腐酸钠组 middle dose of SF group	4.91±0.84**##
高剂量黄腐酸钠组 high dose of SF group	4.90±0.67**##

注：与空白组比较：\*\* $P < 0.01$ ；与对照组比较，# $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank group , \*represents  $P < 0.05$ , \*\*represents  $P < 0.01$ ; compared with control group, #represents  $P < 0.05$ , ##represents  $P < 0.01$ .

从表5.1 可以看出，与空白组小鼠血糖相比，中、高剂量黄腐酸组，低、中、高剂量黄腐酸钠组中小鼠的血糖均有非常明显降低趋势，且数据具有统计学意义( $p < 0.01$ )。与盐酸二甲双胍对照组小鼠血糖相比，中剂量黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸钠组小鼠血糖降低非常明显，数据具有统计学意义( $P < 0.01$ )；高剂量黄腐酸组、低剂量黄腐酸钠组小鼠血糖降低较明显，数据有统计学意义( $P < 0.05$ )。从以上结果可以看出，不同剂量的黄腐酸及黄腐酸钠对正常小鼠的血糖有不同程度的降低，说明黄腐酸及黄酸钠可能促进小鼠体内血糖的代谢，或者加快小鼠体内葡萄糖转化为其他化合物，从而降低血糖。

### 5.3.2 糖尿病小鼠的口服葡萄糖耐量实验初试(7d)

表 5.2 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠糖耐量的影响结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Table 5.2 The results of fulvic acid and sodium fulvate on oral glucose tolerance of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )**

组别 groups	血糖 blood glucose (mmol/L)			
	0 h	0.5 h	1 h	2 h
模型组 model group	22.44±4.26	26.19±2.03	25.92±1.94	24.56±1.81
对照组 control group	19.25±2.67	26.10±3.02	20.69±3.86*	19.44±3.36*
黄腐酸组 FA group	19.35±6.64	24.88±2.28	20.52±4.10*	19.60±3.90*
黄腐酸钠组 SF group	19.46±6.20	24.94±4.07	21.10±3.37*	20.90±2.40*

注：与模型对照组比较：\* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with model group, \*represents  $P < 0.05$ .

从表5.2看出，灌胃2.5g/kg葡萄糖后0.5 h，各组小鼠血糖较空腹血糖均有比较明显的升高，其中模型组上升最明显；1 h、2 h后，各组小鼠血糖明显下降，与模型组相比，盐酸二甲双胍对照组、黄腐酸组、黄腐酸钠组中小鼠血糖下降比较明显，且具有统计学意义( $P < 0.05$ )。从上述结果可得出，盐酸二甲双胍、黄腐酸、黄腐酸钠对于快速降低小鼠体内血糖具有较明显的作用。

### 5.3.3 对糖尿病小鼠血糖的影响结果

表 5.3 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠血糖的影响结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 5.3 The results of fulvic acid and sodium fulvate on blood glucose of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别 groups	血糖 blood glucose (mmol/L)	
	6 d	12 d
空白组 normal group	5.01±0.55	5.14±0.46
模型组 model group	21.17±3.93	18.90±4.92
对照组 control group	13.91±3.82*	12.93±3.10*
“旱地龙”黄腐酸组 “Handilong” FA group	15.37±4.92*	18.08±5.98
“双龙”黄腐酸组 “Shuanglong” FA group	18.47±4.65	13.64±1.64*
低剂量黄腐酸组 low dose of FA group	17.00±6.59	16.44±5.71
中剂量黄腐酸组 middle dose of FA group	16.94±4.82	13.33±3.31*
高剂量黄腐酸组 high dose of FA group	13.95±5.24*	13.17±1.92*
低剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	17.17±5.82	15.30±6.21
中剂量黄腐酸钠组 middle dose of SF group	16.36±2.56*	13.79±2.20*
高剂量黄腐酸钠组 high dose of SF group	16.28±2.59*	14.61±3.19*

注：与模型组比较，\* $P<0.05$ 。

Note: compared with modle group, \*represents  $P<0.05$ .

由表 5.3 可以看出，在灌胃第 6 d 时，与模型组相比，盐酸二甲双胍阳性对照组，“旱地龙”黄腐酸组，高剂量黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸钠组小鼠血糖均较明显降低，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )。第 12 d 时，阳性对照组，“双龙”黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸钠组小鼠血糖均较明显降低，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )。由以上结果可以看出，盐酸二甲双胍降血糖的效果最明显，中、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠具有比较明显的降血糖的作用，“旱地龙”黄腐酸，“双龙”黄腐酸也能不同程度地降低血糖。

### 5.3.4 对糖尿病小鼠甘油三酯、总胆固醇的影响

表 5.4 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠甘油三酯、总胆固醇的影响结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Table 5.4 The results of fulvic acid and sodium fulvate on the total cholesterol and triglyceride of diabetic mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )**

组别 groups	甘油三酯 TG (mmol/L)	总胆固醇 TC (mmol/L)
空白组 normal group	0.88±0.29	1.97±0.40
模型组 model group	1.35±0.26	2.91±0.35
对照组 control group	1.00±0.29*	2.19±0.34*
“旱地龙”黄腐酸组 “Handilong” FA group	1.05±0.20*	2.23±0.39**
“双龙”黄腐酸组 “Shuanglong” FA group	0.92±0.37*	2.15±0.33**
低剂量黄腐酸组 low dose of FA group	1.04±0.35	2.64±0.67
中剂量黄腐酸组 middle dose of FA group	1.01±0.24*	2.03±0.29**
高剂量黄腐酸组 high dose of FA group	0.99±0.16*	2.01±0.60**
低剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	1.01±0.37	2.20±0.043*
中剂量黄腐酸钠组 middle dose of SF group	0.94±0.19*	2.06±0.30**
高剂量黄腐酸钠组 high dose of SF group	0.92±0.11**	2.06±0.33**

注：与模型组比较：\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: compared with model group, \*represents  $P < 0.05$ , \*\* represents  $P < 0.01$ .

由表 5.4 可以看出，小鼠体内甘油三酯：与模型组相比，盐酸二甲双胍阳性对照组，“旱地龙”黄腐酸组、“双龙”黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸组，中剂量黄腐酸钠组小鼠甘油三酯有较明显降低，数据具有统计学意义( $P < 0.05$ )，高剂量黄腐酸钠组小鼠甘油三酯有非常明显降低，数据具有统计学意义( $P < 0.01$ )。小鼠体内总胆固醇：与模型组相比，盐酸二甲双胍阳性对照组、低剂量黄腐酸钠组小鼠体内总胆固醇有较明显的降低，数据具有统计学意义( $P < 0.05$ )，“旱地龙”黄腐酸组、“双龙”黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸组，中、高剂量黄腐酸钠组小鼠总胆固醇有非常明显的降低，

数据具有统计学意义( $P < 0.01$ )。以上结果说明盐酸二甲双胍、“旱地龙”黄腐酸、“双龙”黄腐酸,中、高剂量黄腐酸,低、中、高剂量黄腐酸钠均能不同的降低甘油三酯、总胆固醇。

### 5.3.5 糖尿病小鼠的口服葡萄糖耐量实验(13d)

表 5.5 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠糖耐量的影响结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

**Table5.5 The results of fulvic acid and sodium fulvate on oral glucose tolerance test of diabetic mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )**

组别 groups	血糖 Blood glucose (mmol/L)			
	0 h	0.5 h	1 h	2 h
模型组 model group	19.07 $\pm$ 5.59	38.98 $\pm$ 9.39	33.47 $\pm$ 7.22	32.40 $\pm$ 8.47
对照组 control group	13.13 $\pm$ 2.93*	32.16 $\pm$ 8.27	31.70 $\pm$ 6.70	22.89 $\pm$ 5.16*
低剂量黄腐酸组 low dose of FA group	16.46 $\pm$ 5.87	35.83 $\pm$ 10.21	32.69 $\pm$ 11.58	26.20 $\pm$ 8.31
中剂量黄腐酸组 middle dose of FA group	13.61 $\pm$ 1.62*	26.95 $\pm$ 6.12*	23.32 $\pm$ 5.55*#	21.39 $\pm$ 3.71*
高剂量黄腐酸组 high dose of FA group	13.13 $\pm$ 2.85*	32.01 $\pm$ 8.56	30.76 $\pm$ 7.98	20.60 $\pm$ 6.56*
低剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	14.64 $\pm$ 6.22	26.97 $\pm$ 7.83	26.10 $\pm$ 6.11	22.39 $\pm$ 10.10
中剂量黄腐酸钠组 middle dose of SF group	12.23 $\pm$ 3.15*	25.59 $\pm$ 8.56*	24.37 $\pm$ 4.17*#	18.32 $\pm$ 3.26*#
高剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	14.23 $\pm$ 3.33	30.38 $\pm$ 8.63	28.94 $\pm$ 7.44	18.00 $\pm$ 5.14**

注：与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与对照组比较: # $P < 0.05$ 。

Note: compared with modle group, \*represents  $P < 0.05$ , \* represents  $P < 0.01$ ; Compared with control group , #represents  $P < 0.01$ .

由表5.5可以看出,与模型组空腹血糖相比,盐酸二甲双胍阳性对照组,中、高剂量黄腐酸组,中剂量黄腐酸钠组小鼠空腹血糖有较明显的降低,数据具有统计学意义( $P < 0.05$ )。0.5 h时,与模型组相比,中剂量黄腐酸组,中剂量黄腐酸钠组小鼠血糖有较明显的降低,数据具有统计学意义( $P < 0.05$ )。1 h时,与模型组、盐酸二甲双胍阳性对照组相比,中剂量黄腐酸组,中剂量黄腐酸钠组小鼠血糖有较明显的降低,数据具有统计学意义( $P < 0.05$ )。2 h时,与模型组相比,盐酸二甲双胍阳性对照组,中、高剂



量黄腐酸组，中剂量黄腐酸钠组小鼠血糖有较明显的降低，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )；高剂量黄腐酸钠组鼠血糖有非常明显的降低，数据具有统计学意义( $P<0.01$ )；与盐酸二甲双胍阳性对照组相比，中剂量黄腐酸钠组鼠血糖有明显降低，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )。由以上结果可得出，盐酸二甲双胍、中、高剂量黄腐酸，中、高剂量黄腐酸钠均有快速降血糖的作用，且中剂量黄腐酸组，中剂量黄腐酸钠的效果最佳。

### 5.3.6 糖尿病小鼠体重变化结果

表 5.6 黄腐酸及黄腐酸钠对糖尿病小鼠体重的影响结果( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table5.6 The results of fulvic acid and sodium fulvate on body weight of diabetic mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别 groups	体重	body weight (g)
	6 d	12 d
空白组 normal group	25.79 $\pm$ 2.16	26.70 $\pm$ 2.24
模型组 model group	21.83 $\pm$ 1.88	21.95 $\pm$ 2.42
对照组 control group	22.32 $\pm$ 3.81	22.87 $\pm$ 4.37
“旱地龙”黄腐酸组 “Handilong” FA group	25.54 $\pm$ 3.12*	25.24 $\pm$ 1.79*
“双龙”黄腐酸组 “Shuanglong” FA group	22.63 $\pm$ 3.68	22.75 $\pm$ 3.83
低剂量黄腐酸组 low dose of FA group	23.91 $\pm$ 2.71	24.28 $\pm$ 3.47
中剂量黄腐酸组 middle dose of FA group	24.16 $\pm$ 2.71	24.19 $\pm$ 4.04
高剂量黄腐酸组 high dose of FA group	24.91 $\pm$ 2.60*	25.92 $\pm$ 3.44*
低剂量黄腐酸钠组 low dose of SF group	23.16 $\pm$ 4.94	25.77 $\pm$ 4.63
中剂量黄腐酸钠组 middle dose of SF group	24.30 $\pm$ 1.48*	25.11 $\pm$ 3.15
高剂量黄腐酸钠组 high dose of SF group	24.71 $\pm$ 1.27*	25.24 $\pm$ 2.47*

注：与模型组比较，\* $P<0.05$ 。

Note: compared with modle group, \*represents  $P<0.05$ .

由表 5.6 可以看出，第 6 d 时，与模型组相比，旱地龙黄腐酸组，高剂量黄腐酸

组，中、高剂量黄腐酸钠组小鼠体重有较明显升高，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )。第 12 d 时，早地龙黄腐酸组，高剂量黄腐酸组，高剂量黄腐酸钠组小鼠体重有较明显升高，数据具有统计学意义( $P<0.05$ )。由以上结果可以看出，黄腐酸、黄腐酸钠能不同程度的升高的糖尿病小鼠体重，其中早地龙黄腐酸、高剂量黄腐酸、高剂量黄腐酸钠的效果最好。

## 5.4 讨论与结论

糖尿病是一种受到多种病因影响的代谢疾病，它是由胰岛素分泌障碍及胰岛素作用缺陷引起的糖、蛋白质和脂肪代谢紊乱的疾病，能引发一系列的临床综合症，主要特点是慢性高血糖。糖尿病的典型症状是“三多一少”，即饮水多，饮食多，尿多和体重减少，控制不好将会引发许多全身性并发症，例如：眼盲、代谢疾病等，严重威胁人类健康。

四氧嘧啶诱导小鼠糖尿病的机制为：四氧嘧啶进入体内后能迅速被胰岛 B 细胞摄取，产生氧自由基破坏 B 细胞的组织结构，使其变性和坏死，导致胰岛素合成减少，阻碍胰岛素的分泌，使血清中胰岛素水平显著降低<sup>[80]</sup>，体内血糖不能被代谢或转化其他化合物，最终导致血糖水平升高。本实验以四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠为研究对象，研讨黄腐酸及黄腐酸钠的降血糖的效果，实验结果证明，黄腐酸及黄腐酸钠具有降血糖的作用。

黄腐酸的氧化程度高，含有羧基、醇羟基和酚羟基多种含氧官能团，具有多种理化性质，现已经证明黄腐酸及黄腐酸钠具有调节内分泌，抗炎作用，调节血液循环，增强免疫力等作用，在治疗许多疾病方面具有比较明显的作用。本实验证明黄腐酸及黄腐酸钠具有降血糖的作用，作者认为其降血糖原因有(3)，如下：(1)激活己糖激酶等一些酶的活性，促进糖的氧化磷酸化和糖、甘油三酯、总胆固醇的代谢，加速糖转化为蛋白质、脂肪、和糖元等其他的物质，或加速糖、甘油三酯、总胆固醇的代谢，从而降低体内血糖、甘油三酯、总胆固醇的含量。(2)能清除自由基。四氧嘧啶是通过产生氧自由基破坏胰岛 B 细胞，导致糖尿病，而黄腐酸及黄腐酸钠能通过清除氧自由基，减轻对胰岛 B 细胞的破坏作用，增加胰岛素的合成，降低体内血糖含量。(3)黄腐酸能通过刺激胰岛  $\alpha$ -受体来抑制以高血糖素分泌，降低血糖，因此可以推断出黄腐酸可能保护胰岛 B 细胞的作用。以上是对黄腐酸及黄腐酸钠降低血糖机制的初步探索，具体机制还需要进一步的研究。

通过以上实验证明，黄腐酸及黄腐酸钠能不同程度的降低小鼠体内血糖、总胆固醇、甘油三酯的含量，增加小鼠的体重，增强小鼠的糖耐量。因此，得出黄腐酸及黄腐酸钠具有降血糖的作用。

## 第六章 结语与讨论

近年来,对黄腐酸及黄腐酸钠研究越来越深入,使得其在医药、保健品领域的应用越来越广。现已经证明黄腐酸及黄腐酸钠在止血、消炎、增强免疫力、调节内分泌、促进血液循环等许多方面有显著的效果。本课题对黄腐酸及黄腐酸钠的提取、纯化、毒性实验进行了研究,并根据黄腐酸与茶褐素在结构上存在相似性,在功能和性质上也应该存在相似性的基础上,提出黄腐酸及黄腐酸钠应该具有醒酒、降血糖的作用,开展了相关的研究。现将本论文的结论、创新之处及存在的问题和进一步的工作总结如下:

### 6.1 主要的研究结果与讨论

1. 以寻甸褐煤为原料,采用双氧水氧化法提取制备粗品黄腐酸;采用 AB-8 大孔吸附树脂柱两次纯化黄腐酸,以降低黄腐酸的灰分,最终得到纯度为 96.28%黄腐酸产品。在基础上通过酸碱中和法制备黄腐酸钠。这为以后药理实验打下坚实的基础。

2. 采用限度法考察黄腐酸及黄腐酸钠的急性毒性,以 5g/kg 剂量的黄腐酸及黄腐酸钠作为限度剂量,结果小鼠无死亡,小鼠的体重比实验前有所增加。在黄腐酸长毒实验初步探索中,小鼠体重明显增加,最后解剖腐植酸喂养小鼠内脏与正常小鼠基本无差异。黄腐酸及黄腐酸钠毒性实验的结果为用药的安全性提供了一定可靠依据,也为以后开发黄腐酸及黄腐酸钠成为一种保健品奠定了基础。

3. 测定乙醇的半数致死量,考查黄腐酸预防小鼠乙醇急性中毒的情况;根据动物行为学,实验观察各组小鼠的醉酒时间以及醉酒小鼠的只数;并采用安捷伦气相色谱仪,分别测定给药后 30、60、90min 小鼠血液中乙醇的变化。结果:黄腐酸能减少小鼠急性中毒导致死亡的只数,具有明显预防乙醇急性中毒的效果。与模型组相比,3%、5%黄腐酸组中小鼠醉酒时间明显缩短( $P<0.05$ );与海王金樽组相比,1%、3%、5%黄腐酸组中小鼠醉酒时间均明显缩短( $P<0.05$ ),且 5%黄腐酸的醒酒防醉效果最佳。与模型组相比,30、90 min 时,1%、5%黄腐酸组中小鼠血浆中乙醇浓度明显降低( $P<0.05$ );60 min 时,乙醇浓度降低非常明显( $p<0.01$ )。与海王金樽组相比,60、90 min 时,1%、5%黄腐酸组中小鼠血浆中乙醇浓度明显降低( $P<0.05$ )。结果表明,黄腐酸具有预防小鼠急性乙醇中毒的效果,能明显缩短小鼠醉酒的时间,减少醉酒小鼠的只数,降低小

鼠血浆中乙醇的浓度，具有明显醒酒防醉的功能。

4. 采用腹腔注射四氧嘧啶的方法进行糖尿病小鼠造模。以小鼠血清中血糖、总胆固醇、甘油三酯等生化指标为依据，考察黄腐酸及黄腐酸钠的降血糖的作用。实验主要考察黄腐酸及黄腐酸钠对正常小鼠血糖，对糖尿病小鼠口服葡萄糖耐量，以及对糖尿病小鼠血糖、总胆固醇和甘油三酯的影响。结果：中、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠能较明显的降低正常小鼠血糖( $P<0.01$ )；中、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠能明显降低糖尿病小鼠血糖、总胆固醇、甘油三酯的含量( $p<0.05$  或者  $p<0.01$ )，低剂量黄腐酸钠、“旱地龙”、“双龙”黄腐酸有不同程度的影响；“旱地龙”黄腐酸、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠对小鼠体重增加有明显的影响( $P<0.05$ )；对于口服糖耐量试验，中、高剂量黄腐酸及黄腐酸钠能明显降低糖尿病小鼠血糖( $p<0.05$ )。结果表明，黄腐酸及黄腐酸钠能够明显降低小鼠体内血糖、总胆固醇、甘油三酯的含量，增加糖尿病小鼠的糖耐量和体重，具有降血糖的作用。

以上实验结果表明，黄腐酸及黄腐酸钠具有醒酒、降血糖的作用，为以后黄腐酸及黄腐酸钠在医药保健品领域进一步的开发利用提供了一定的药学依据。

## 6.2 论文的创新之处和优点

近年来，有许多报道证明了黄腐酸及黄腐酸钠在止血、消炎、抗病毒、调节免疫系统、抗菌、抗溃疡等方面的显著效果。但至今为止，对黄腐酸及黄腐酸钠醒酒、降血糖作用研究还未见。

本课题的创新和优点：

1.黄腐酸的提取方法有硫酸法、碱溶酸析法、离子交换树脂法、硫酸丙酮法、硝酸氧化法等方法。本所采用的方法双氧水氧化法，此方法的优点是无污染，成本低，产率高，由原来 1%左右升高到 20%左右，特别适用制备医药级黄腐酸。

2.在大孔吸附树脂再生过程中，本课题组发现酸性酒精再生大孔吸附树脂效果较好。

3.在黄腐酸的纯化实验中，采用大孔吸附树脂进行纯化的优点：大孔吸附树脂应用广泛，价格便宜，可以重复使用，且大孔吸附树脂的前处理和纯化工艺已经成熟，实验中可以加以借鉴。纯化前，将黄腐酸提取物浓缩后冷冻保存，能大大降低灰分。

4.本课题是根据茶褐素和黄腐酸在化学性质方面(结构和官能团)存在一定的相似性，由此提出了黄腐酸在生理活性及治疗功能方面与茶色素应具有相似的基础上，首

次提出黄腐酸应该具有醒酒、降血糖的作用。

### 6.3 存在的问题和进一步的工作

1. 在实验中，人为原因、动物自身的原因和环境原因都会对实验动物产生影响，其中环境因素更是不可忽略，例如：温度、湿度、声光、风等都会对实验动物产生不利影响。本实验动物养在不太规范的饲养环境中，可能会对实验动物造成一些影响。

2. 将进一步完善黄腐酸的纯化实验，将黄腐酸纯化为药用级的黄腐酸。

3. 长期毒性实验对新药非临床安全性研究具有重大的指导意义。在论文中，只对黄腐酸的长期毒性进行了初步的探索，长期毒性实验还需要进行血液学、血液生化学、尿液分析、计算脏器系数的指标的检测。下一步的工作将进一步对黄腐酸及黄腐酸钠长期毒性实验进行详细考察，为将来黄腐酸及黄腐酸钠申请新药和保健品打下基础。

4. 本课题组人员将进一步考察黄腐酸及黄腐酸钠降血脂、抗溃疡和解酒保肝方面的作用，进一步探索黄腐酸及黄腐酸钠在医药领域的应用。

5. 以上实验主要是对黄腐酸药效方面的考察，下一步的工作还将黄腐酸做成不同药物剂型进行药代方面的研究。

6. 本课题组人员也将进一步进行黄腐酸的质量标准的考察。

## 参考文献

- [1] Hartenstein R. Sludge decomposition and stabilization. *Science*, 1981: 212 (4496): 743–749.
- [2] Keyser P, Pujar BG, Eaton RW, Ribbons DW. Biodegradation of the phthalates and Their esters by bacteria. *Environmental Health Perspectives*, 1976, 18(2): 159–166.
- [3] 宋晓旻, 崔平, 杨敏. 风化煤催化氧解制备腐植酸. *安徽工业大学学报*, 2007, 24(2): 163-168.
- [4] Burges NA, Hurst HM, Walkdenene B. The phenolic constituents of humic acid and their relationship to the lignin of the plant cover. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1964, 28: 1547–1554.
- [5] Lian HD, Quan Y, Hong LY. Changes of chemical properties of humic acids from crude and fungal transformed lignite. *Fuel*, 2006 (85): 2402–2407.
- [6] Stovenson FJ. Geochemistry of soil humic substances. In: Aiken GR, Mcknight DM, Weshaw RL, Maccarthy P, editor. New York: John Wiley and Sons Inc., 1985. 13–52.
- [7] Stevenson IL, Schnitzer M. Transmission electron microscopy of extracted fulvic and humic acids. *Soil Scienc*, 1982, 113(3): 179–185.
- [8] Thurman EM, Malcolm RL. Structural study of humic substances: New approaches and methods. In: Christman RF, Gjessing ET, editor. Michigan: Ann. Arbor. Science Publishes, 1983. 1–35.
- [9] 马秀欣, 赵宏波. 我国泥炭、褐煤和风化煤的资源优势及其应用领域闭. *中国煤炭*, 2004, 30(9):47-49
- [10] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论. 北京: 化学工业出版社, 2007. 257-259.
- [11] Schepetkin I, Khlebnikov A, Kwon BS. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Develop Res*, 2002, 57: 140-159.
- [12] 刘立威, 段新荣, 宋艳秋, 等. 黄腐植酸钠保留灌肠治疗溃疡性结肠炎的操作及护理. *齐齐哈尔医学院学报*, 2001, 22(2): 179.
- [13] 陈川云, 朱建芳. 黄腐酸治疗流行性腮腺炎的临床观察. *腐植酸*, 1997, (3): 30.
- [14] 王洪杰, 祝亚勤, 李燕敏, 等. 草炭黄腐植酸钠对风湿性和类风湿性关节炎的临

床疗效观察. 中医药学报, 1996, (3): 23.

- [15] 李伟, 王力. 复方腐植酸钠药膜治疗轻、中度宫颈炎的临床探讨. *Heilongjiang Medicine and pharmacy*. 2006, 29(1): 71.
- [16] 苏桂华, 王云忠, 潘世华. 黄腐酸药浴治疗良性关节肿痛328例. 腐植酸, 1996, (2): 35-45.
- [17] 陈霞, 李红, 刘芬, 杨世杰. 黄腐酸钠抗炎作用的初步研究. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(4): 361-362.
- [18] 祝亚勤, 王洪杰, 李秀宏, 等. 草炭腐植酸钠抗溃疡作用的研究. 腐植酸, 1998, (3): 24-26.
- [19] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论. 北京: 化学工业出版社, 2007.267-268.
- [20] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论. 北京: 化学工业出版社, 2007.273.
- [21] 祝亚勤, 范卓文, 曹玲, 等. 草炭腐植酸钠半数致死量的测定. 腐植酸, 1998, (3): 27-28.
- [22] Hseu YC, Huang HW, Wang SY, et al. Humic acid induces apoptosis in human Endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, 182: 34-43.
- [23] Kuo ZB, Chen MZ. A clinical therapy of blackfoot disease. *Journal of Formosan Medical Association*. 1969, 68: 275-289
- [24] Zhai SS, Kimbrough RD, Meng B, et al. Kashin-Beck disease: a cross-sectional study In seven villages in the Peoples' Republic of China. *Journal Toxicology and Environmental Health*, 1990, 30(2): 239-59.
- [25] Cooksey RC, Gaitan E, Lindsay RH, et al. Humic substances, a possible source of Environmental goitrogens. *Organic Geochemistry*, 1985, 8(1): 77-80.
- [26] Gaitan E, Jolley RL, Lee NE, et al. Phthalate ester possible progoitrogens in water supply of a Columbia district with endemic goiter. *Journal of American Chemical Society Division of Environmental Chemistry*, 1983, 23: 175-178.
- [27] Lu FJ, Guo HR, Chiangs HS, Hong CL. Relationships between the fluorescent intensity of well water and the incident rate of bladder cancer. *Journal of Chinese Oncology Society*, 1986, 2 (3): 14-23.
- [28] Chen YJ, Sue LC, Huang TS, et al. Humic acid induced growth retardation in a Sertoli cell line, TM4. *Life Sciences*, 2001, 69: 1269-1284.

- [29] Zenkevics H, Klavins M, Vose V, et al. Humic acid reduces gonadotropin activity and hormonal sensitivity of frog oocytes . *Aquatic Toxicology*, 2005, 75: 380–383.
- [30] Tsuisuki K, Kuwaisuka S. International Humic Substance News letter. *Soil Sci Plant Nutr*, 1978, (4): 547-552.
- [31] M. Schnitzer. *Agron. Absrt. Amer. Soc. Agorn.*, 1971: 77.
- [32] 元琦. 我国腐植酸综合利用. 江西腐植酸, 1986,(2 ): 1-7.
- [33] 王兴洲, 王柳. 腐植酸化物的药理作用及其应用. 饲料博览, 1992(1): 6-7.
- [34] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论. 北京: 化学工业出版社, 2007.267.
- [35] 林永信. 腐植酸在医药及日化领域应用前景广阔. 腐植酸, 2001(1): 45.
- [36] Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology*, 1994, 106: 1085-1105.
- [37] Luisa V, Lorenzo L, Anna F, et al. Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med*, 2008, 19: 561-567.
- [38] 项伟, 夏延斌. 我国解酒制品研制现状. 食品科技, 2005, 3: 49-52.
- [39] Richard MW, James LM, John ER, et al. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26: 348-254.
- [40] Huang MF. The effect of low degree ethanol on stomach mucous membrane blood and cell protection. *Acta Academic Medicine Hubei*, 1996, 17(1): 43.
- [41] Sun LC. Herbaceous dealcohol. *Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1992, 23(1): 55-56.
- [42] 潘长玉. 中国糖尿病控制现状--指南与实践的差距. 国外医学内分泌学分, 2005, 25(3): 174-178.
- [43] 袁春玲, 郭伟英. 天然药物降血糖成分的研究进展. 辽宁医学院学报, 2007, 28(6): 86-88.
- [44] 刘进. 治疗糖尿病的新进展. 保健品, 2007(7): 60-61.
- [45] 吴志成, 吴斌. 糖尿病食物疗法. 上海: 科学技术出版社, 2000. 11.
- [46] 刘进才. 治疗糖尿病的新进展 . 保健品, 2006, 6: 60-61.
- [47] 李宝才, 龚加顺, 张惠芬, 等. 腐植酸与普洱茶茶色素. 腐植酸, 2007(1): 19-26.
- [48] 张水花, 刘建珍, 李宝才, 等. 化学降解云南年青褐煤制备黄腐酸的化学组成及结构表征. 第七届全国绿色环保肥料新科技技术及中国腐植酸工业协会学术年会,



北京(国二招), 2008: 320-322.

- [49] 李宝才, 戴以忠, 张惠芬, 等.  $\text{HNO}_3$ 氧化褐煤制取黄腐酸. 云南化工, 1994, 4: 5-8.
- [50] 徐家毅, 郭贤权. 大孔树脂结构的测定. 高分子通报, 1999, 6: 5-2.
- [51] 黄丽容, 陆金环, 谭健星, 等. AB-8大孔吸附树脂纯化降香总黄酮的工艺研究. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 270-274.
- [52] 成绍鑫. 腐植酸类物质概论. 北京: 化学工业出版社, 2007. 282-290.
- [53] 袁伯俊, 廖明阳, 李波主编. 药物毒理学试验方法与技术. 北京: 化学工业出版社. 2007. 200-229.
- [54] 黄爽. 神农本草经. 北京: 中医古籍出版社, 1982. 215.
- [55] 袁伯俊, 廖明阳, 李波主编. 药物毒理学试验方法与技术. 北京: 化学工业出版社. 2007. 141-207.
- [56] 悦敏, 王岳飞, 朱冰泉, 等. 茶多福胶囊预防小鼠急性乙醇中毒的实验研究. 浙江预防医学, 2002, 14(12): 6-7.
- [57] 白雪松, 韩春姬, 李 克. 复方轮叶党参的醒酒作用实验研究. 延边大学医学学报, 2004, 27 (3): 166-169.
- [58] 杨收祥, 于文涛. 酒速愈对急性酒精中毒小鼠的药效学研究. 中草药, 2005, 36: 179-180.
- [59] 徐庆, 韦玉先, 唐祖年, 等. 冰糖醋醒酒作用的实验研究. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 446-448.
- [60] Giuliana B, Salvatore S, Giovanni V, et al. IDN 5082, a standardized extract of *Salvia miltiorrhiza*, delays acquisition of alcohol drinking behavior in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 85: 93-97.
- [61] 毛连根, 俞洁行. 茶叶提取物对小鼠的醒酒作用. 茶叶科学, 2000, 20(2): 155-157.
- [62] 储全根, 张登山, 汪克明, 等. 李氏解酒方解酒作用的实验研究. 安徽中医学院学报, 2007, 26(5): 27-28.
- [63] 周一平. 用spss软件计算新药的 $\text{LD}_{50}$ . 药学进展, 2003, 23(5): 314-316.
- [64] 陈旭东, 吴伟康, 颜建云. 白酒灌胃大鼠的氧自由基变化及抗自由基中药的治疗作用. 温州医学院学报, 2002, 32(6): 354-356.
- [65] 杜冠华, 张莉. 实验药理学. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004, 367.
- [66] 吴斐华, 梁敬钰, 余平, 等. 毛平车前降血糖调血脂作用的研究. 中国中药杂志,

2005, 30(15): 1179-1183.

- [67] Mou XL, Lu JL, Wu T. Antihyperglycemic activity of Hypoglycemic Ziyabiti Tablet in normal and diabetic mice. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2005, 27(8): 926-930.
- [68] 王玉芬, 韩双红, 孙国英, 等. 糖尿乐胶囊降血糖作用的实验研究. *中药材*, 2002, 25(6): 426-428.
- [69] A.A. Adeneye, O.P. Ajagbonna, O.W. Ayodele. Hypoglycemic and antidiabetic activities on the stem bark aqueous and ethanol extracts of *Musanga cecropioides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia*, 2007, (78): 502-505.
- [70] 贾仁勇, 殷中琼, 吴小兰, 等. 青刺果黄酮对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠的降糖作用. *中药材*, 2008, 31(3):399-403.
- [71] 王元凤, 金征宇. 不同溶剂分级提取的茶多糖的组成及降血糖活性. *天然产物研究与开发*, 2006, 18: 813-817.
- [72] 马正东, 魏文树. 灵菊七提取物降血糖作用的实验研究. *海峡药学*, 2008, 20(2): 25 -27.
- [73] 李建文主编. 药理实验方法学----新技术与新方法(第二版). 北京: 化学工业出版社. 2008. 250.
- [74] 梁燕, 王岳飞, 谢争珍, 等. 茶桑混合袋泡茶降血糖作用的实验研究. *茶叶科学* 2008, 28(5): 358-362.
- [75] Routhu K, Alluri R, and Kilari EK. Hypoglycemic and Antihyperglycemic Effect of *Gmelina asiatica* LINN. in Normal and in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Biol. Pharm. Bull*, 2005, 28(4): 729-732.
- [76] 李晨岚, 王大鹏, 蔡兵, 等. 黄杞叶提取物降血糖作用的研究. *中草药*, 2008, 39 (11):1696-1698.
- [77] 易醒, 谢明勇, 温辉梁, 等. 青钱柳对四氧嘧啶糖尿病小鼠降血糖作用的研究. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(3): 52-57.
- [78] 陈 瑞, 黎晓敏, 殷中琼, 等. 青刺果多糖对糖尿病小鼠血糖、血脂含量的影响. *时珍国医国药*, 2007, 18(12):2967-2969.
- [79] P. Stanely Mainzen Prince, N. Kamalakkannan, Venugopal P. Menon. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzigium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 91: 209-213.
- [80] 李建文主编. 药理实验方法学---新技术与新方法(第二版). 北京: 化学工业出版社. 2008. 245.

(来源: 昆明理工大学, 2009, 2: 63)