

灵菊七脂溶性成分抑制 α - 葡萄糖苷酶活性及其成分分析

李凤伟, 杨文骏, 刘亚会, 杜杰, 徐乃江, 高健*

盐城工学院, 盐城 224051

摘要: 体外测定了灵菊七石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 并采用 GC-MS 联用仪分析灵菊七石油醚萃取物的化学成分。结果表明, 灵菊七石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶有较好的抑制活性, 浓度在 5 mg/mL 时, 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 59.6%。经 GC-MS 分析从灵菊七石油醚萃取物中鉴定出 17 个化合物, 占流出峰总面积的 78.1%。石油醚萃取物中的萜类化合物可能是其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的主要物质。

关键词: 灵菊七; 石油醚萃取物; 气相色谱\质谱; 抑制; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: R93

文献标识码: A

GC-MS Analysis of Liposoluble Constituents from *Gynura medica* and Its α -Glucosidase Inhibitory Activity Investigation

LI Feng-wei, YANG Wen-jun, LIU Ya-hui, DU Jie, XU Nai-jiang, GAO Jian*

Yancheng Institute of Technology, Jiangsu Yancheng 224051, China

Abstract: The α -glucosidase inhibitory activity of petroleum ether extracts of *Gynura medica* was tested *in vitro*. The chemical components of the petroleum ether extracts of *G. medica* were analyzed by GC-MS. The results indicated that the petroleum ether extracts of *G. medica* had a very good inhibitory activity, the inhibitory rate was 59.6% with the concentration of 5 mg/mL. Seventeen compounds composed 78.1% of the total peaks were separated and identified. The main constituents of petroleum ether extracts that inhibited α -glucosidase may be terpenoids.

Key words: *Gynura medica*; petroleum ether extracts; GC-MS; inhibit; α -glucosidase

灵菊七 (*Gynura medica*), 是菊科菊三七属的一新种植物, 具有毒性小、服用安全、易于种植等优点^[1]。民间以灵菊七叶、茎冲茶煮水服用, 对治疗糖尿病有较好的疗效^[2]。刘莹^[3]等采用糖尿病大鼠进行实验, 发现灵菊七醇提、水提物对葡萄糖、肾上腺素所致的小鼠高血糖均有明显的抑制作用, 初步验证了灵菊七具有降血糖作用, 并证明了其毒性极小, 但是灵菊七降血糖作用的物质基础尚未阐明。本研究通过体外法测定灵菊七石油醚组分抑制 α -葡萄糖苷酶能力, 用 GC-MS 联用仪分析灵菊七石油醚组分, 经质谱库检索, 确定灵菊七石油醚萃取物中的化学成分, 从而判断灵菊七石油醚组分中抑制 α -葡萄糖苷酶的可能物质, 为更广泛筛选灵菊七中的活性成分和该药材的开发利用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

灵菊七, 购于安徽省安福明日叶开发有限公司。经笔者鉴定为菊科菊三七属灵菊七 *Gynura medica*, 标本保存在盐城工学院生物资源实验室。

无水碳酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、石油醚、二甲基亚砷、95% 乙醇 (分析纯); α -葡萄糖苷酶、4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷 (Sigma-Aldrich 公司); 阿卡波糖 (拜耳医药保健有限公司)。

1.2 主要仪器设备

酶标仪 (Model 680 BIO-RAD); 移液枪 (Eppendorf 公司); 旋转蒸发仪 (上海亚荣); PHS-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); 96 孔板 (Corning 公司); 气质联用仪为 Agilent6890N 型 GC 和 Agilent5975 型 MS 并配有 NIST05 图谱系统。

1.3 灵菊七石油醚萃取物制备

灵菊七药材 4 kg, 粉碎, 加 4 倍量 95% 乙醇, 50

收稿日期: 2013-01-14 接受日期: 2013-04-24

基金项目: 盐城工学院人员引进项目 (kjc2012035); 江苏省高校自然科学基金项目 (12KJD18007); 江苏省高校科研成果产业化推进项目 (JHB2012-52)

* 通讯作者 Tel: 86-515-88298190; E-mail: gaojianedu@163.com

℃超声提取 1 h, 室温冷浸 12 h, 提取三次, 合并滤液, 减压浓缩得到总提取物。总提取物加水悬浮, 依次用石油醚(60 ~ 90 °C)、乙酸乙酯、正丁醇萃取三次, 萃取液减压浓缩得到各部分萃取物, 低温保存。

1.4 石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

取一定量的石油醚萃取物在 50 °C 下水浴蒸干至恒重, 用 6% DMSO 的磷酸缓冲液配制成 0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5 mg/mL 样品溶液。另取阿卡波糖作为阳性对照, 与样品配制相同浓度 8 个组分。6% DMSO 的磷酸缓冲液作为空白组溶液。 α -葡萄糖苷酶抑制活性测试方法参考 Ren Shen 等人方法^[4], 取样品(或阳性药品)溶液 40 μ L 于 96 孔板中, 加入 α -葡萄糖苷酶溶液 40 μ L, 于 37 °C 恒温水浴中孵育 5 min, 然后加入 PNP(4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷)溶液 20 μ L, 轻微振荡使其混匀, 置于 37 °C 水浴中孵育 30 min, 取出后加入 100 μ L,

pH 9.8 的 Na_2CO_3 溶液以停止反应(反应物总体积达到 200 μ L), 并于 405 nm 处读取吸光度值(OD)。样品及阳性药品对 α -葡萄糖苷酶抑制活性实验结果按照下面公式计算:

$$\text{阳性(样品)的抑制率}\% = 100 \times [\text{OD}_{\text{空白}} - (\text{OD}_{\text{阳性}} - \text{OD}_{\text{阳性背景}})] / \text{OD}_{\text{空白}}$$

1.5 GC-MS 分析条件

HP-5MS 毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); 载气: 高纯氦气; 进样口温度: 270 °C; 进样分流比 80:1; 溶剂延迟 3.0 min; 初始柱温为 50 °C。程序升温, 10 °C/min 升到 270 °C, 柱前压: 7.62 psi。离子源 EI, 电离能量 70 eV, EM 电压: 1882 V, 质量范围 50 ~ 550 amu。

2 结果与讨论

2.1 灵菊七石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶抑制活性结果

表 1 石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率

Table 1 α -glucosidase inhibitory rate of petroleum ether extracts of *G. Medica*

样品浓度 Sample concentration(mg/mL)	0.01	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00
阳性样品抑制率 Control inhibitory rate(%)	21.4	26.6	27.9	40.1	55.3	71.7	80.7	87.8
石油醚层抑制率 Petroleum ether extract inhibitory rate(%)	18.8	20.0	22.6	31.5	43.0	47.4	50.0	59.6

由表 1 可以看出石油醚萃取物对 α -葡萄糖苷酶有一定抑制作用, 抑制活性会随着样品浓度的增加而升高, 样品浓度在 0.10 ~ 5.00 mg/mL 时, 石油醚萃取物抑制活性随着样品浓度增加而升高的程度较为明显, 但是石油醚萃取物的抑制活性要低于阿卡波糖。实验结果说明石油醚萃取物中含有抑制 α -葡萄糖苷酶的活性物质, 具体成分有待进一步分析。

2.2 灵菊七石油醚萃取物化学成分 GC-MS 分析结果

灵菊七石油醚萃取物的 GC-MS 分析, 其 GC-MS 总离子流色谱图如图 1 所示, 采用 NIST05 图谱检索, 并结合质谱图中基峰、负荷比以及相对丰度与标准谱图的比较, 在石油醚层中鉴定出个 17 个化合物, 用数据处理机峰面积归一法, 测定石油醚组分中各成分的相对含量, 占总色谱峰面积的 78.1%, 化学成分结果见表 2。

3 结论

经 GC-MS 分析, 灵菊七石油醚萃取物中共检测出 55 个色谱峰, 鉴定了其中 17 个化合物, 占流出峰总面积的 78.1%, 主要为脂肪酸、脂肪酸酯、芳香酯、植酮、萜类化合物、甾类化合物, 这些化合物均为首次从该植物中鉴定出来, 其它组分结构有待另行分析确定。经酶活测定发现灵菊七石油醚萃取物有

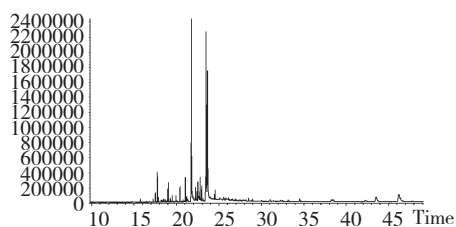


图 1 灵菊七石油醚萃取物 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of petroleum ether extracts of *G. medica*

表 2 灵菊七石油醚成分的气质联用分析结果

Table 2 Compounds identified from petroleum ether extracts of *G. medica* by GC-MS

编号 No.	化合物 Compound	保留时间 Time (min)	分子量 M/W	分子式 M/F	相对含量 Relative content (%)
1	1,2,3,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-(1-甲基乙基)-萘(Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl))-,(1s-cis)-)	15.783	204	C ₁₅ H ₂₄	0.196
2	匙梭醇(1H-Cycloprop[e]azulen-7-o; . decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1α,4α,7β,7αβ,7bα)]-)	17.499	220	C ₁₅ H ₂₄ O	0.711
3	萘澄茄油烯醇(Cubenol)	17.749	222	C ₁₅ H ₂₆ O	2.334
4	二氢猕猴桃内酯(2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-)	18.722	180	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0.158
5	叶绿醇(3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol)	19.018	296	C ₂₀ H ₄₀ O	1.553
6	植酮(2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-)	19.932	268	C ₁₈ H ₃₆ O	0.446
7	棕榈酸甲酯(Hexadecanoic acid, methyl ester)	20.438	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.198
8	十六酸乙酯(Hexadecanoic acid, ethyl ester)	21.056	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1.983
9	棕榈酸(n-Hexadecanoic acid)	21.766	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	22.985
10	亚油酸甲酯(9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester)	22.246	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	1.108
11	硬酯酸甲酯(Octadecanoic acid, methyl ester)	22.305	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	0.31
12	顺式十八碳-9-烯酸(Oleic Acid)	23.443	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	2.235
13	亚油酸(9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-)	23.502	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	20.887
14	亚麻酸(9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-)	23.647	278	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	16.518
15	维生素 E (Vitamin E)	38.251	430	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	0.452
16	豆固醇(Stigmasterol)	43.517	412	C ₂₉ H ₄₈ O	2.281
17	γ-谷甾醇(γ-Sitosterol)	46.207	414	C ₂₉ H ₅₀ O	4.999

抑制 α-葡萄糖苷酶的活性,浓度在 5 mg/mL 时,对 α-葡萄糖苷酶的抑制率为 59.6%。Choudhary^[5] 等首次发现倍半萜类衍生物具有 α-葡萄糖苷酶抑制活性,研究人员从伞形植物蒙古大茴香 *Ferula mongolica* 的根中以 α-葡萄糖苷酶为靶向分离出 8 种倍半萜衍生物,其抑制酶活的 IC₅₀ 分别为 56.06、32.21、63.68、79.87、82.41、20.50 和 9.31 μM。本研究发现灵菊七中含有萜类物质,推测灵菊七中含有的萜类化合物可能是石油醚组分中抑制 α-葡萄糖苷酶活性的主要成分,这与文献 Choudhary 报道内容一致。灵菊七中含有维生素 E (Vitamin E),是一种脂溶性维生素,也是最主要的抗氧化剂之一,灵菊七脂溶性成分的药用价值有待进一步开发利用。α-葡萄糖苷酶抑制剂是目前应用于糖尿病治疗的较为重要的一类药物,由于目前使用的西药 α-葡萄糖苷酶抑制剂大多具有一定的毒副作用,从中药或天然产物中寻找 α-葡萄糖苷酶抑制剂已成为一个世界性的热点^[6-10]。本课题组将对灵菊七的化学成分进行全面的分析,为进一步研究灵菊七降血糖成分

作用机理提供研究基础以及全面开发利用灵菊七这一药用资源提供理论依据。

参考文献

- 1 Yang YK (杨永康), Wu JK (吴家坤). A new species of *Gynura* (Compositae). *Chin Acad Med Mag Organ* (中国医学生物技术应用杂志), 2004, 2: 55-58.
- 2 Liu Y (刘莹), Xu XJ (徐向进), Chen MJ (陈明珠). Hypoglycemic activity of new species of *Gynura Medica*. *Chin Pharm Newspaper* (中国医药报), 2006. 03. 02.
- 3 Liu Y (刘莹), Zhu DP (朱东屏), Xu XJ (徐向进), et al. The effects of extracts of *Gynura medica* on diabetic rats. *Pharm J Chin People's Liberation Army* (解放军药学报), 2006, 4: 287-290.
- 4 Ren S, Xu DD, Pan Z, et al. Two flavanone compounds from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α-glucosidase inhibitory activities. *Food Chem*, 2011, 4: 1760-1763.
- 5 Choudhary M, Irfan B, Nur-e-alam M, et al. New α-glucosidase inhibitors from the Mongolia medicinal plant *Ferula mongolica*. *Helv Chim Acta*, 2001, 8: 2409-2416.