

西青果三萜成分的分离纯化及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究杨兰苹¹, 朱靖博^{1,2*}, 丁燕¹, 王振中³, 肖伟³¹大连工业大学食品学院; ²大连工业大学植物资源化学与应用研究所, 大连 116034; ³江苏康缘药业股份有限公司, 连云港 222001

摘要: 研究西青果中三萜类化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 利用薄层色谱指导柱分离、高效液相色谱结合体外抑制 α -葡萄糖苷酶筛选模型的方法进行活性研究。本实验从乙酸乙酯萃取物中分离得到 3 个三萜类化合物, 经鉴定为 arjunic acid, arjunolic acid, arjungenin, 其中 arjunic acid ($IC_{50} = 2.97 \mu\text{mol/mL}$), arjunolic acid ($IC_{50} = 0.82 \mu\text{mol/mL}$) 具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性。

关键词: 西青果; α -葡萄糖苷酶; 高效液相色谱; arjunic acid; arjunolic acid

中图分类号: R932

文献标识码: A

Isolation, Purification and α -Glucosidase Inhibitory Ability of Triterpenes from the Fruits of *Terminalia Chebula* Retz.

YANG Lan-ping¹, ZHU Jing-bo^{1,2*}, DING Yan¹, WANG Zhen-zhong³, XIAO Wei³¹School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University;²Institute of chemical research and Application on plant, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China;³Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lian yun gang 222001, China

Abstract: In order to recognize α -glucosidase inhibitory ability of triterpenes from the fruits of *T. Chebula* Retz, the triterpenes were isolated and purified by TLC-guide method and the bioactivity in vitro was investigated by means of the inhibitory activity against to α -Glucosidase combined with HPLC. Three compounds were obtained from the acetic ether extract and identified as arjunic acid, arjunolic acid, arjungenin, among them, arjunic acid ($IC_{50} = 2.97 \mu\text{mol/mL}$) and arjunolic acid ($IC_{50} = 0.82 \mu\text{mol/mL}$) had the ability against to α -glucosidase.

Key words: *Terminalia chebula* Retz.; α -Glucosidase; HPLC; arjunic acid; arjunolic acid

萜类化合物作为有效的天然的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 正在引起许多天然产物学家的注意^[1]。Rahman 等^[2]从 *Cichorium intybus* 中获得的三萜 cichoridiol 体外对 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 为 $51.9 \mu\text{M}$, 康文艺等^[3]在滇丁香中分离得到的齐墩果酸也显示了较高的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 其 IC_{50} 值为 2.88 mg/L 。西青果为使君子科榄仁属植物诃子 (*Terminalia chebula* Retz.) 的干燥幼果, 其主要化学成分为三萜类、酚酸类和鞣质类化合物^[4], 近几年研究发现西青果提取物具有很强的抑制 α -葡萄糖苷酶的作用^[5,6]。本次研究针对西青果中的萜类化合物进行分离, 在得到单体化合物后对其活性进行测定。

1 仪器与材料

500 MHz AVANCE 型核磁共振波谱仪; Ulti-Mate3000 高效液相色谱分析仪, 美国 DIONEX 公司; R501 型旋转蒸发器, 巩义市英峪高科仪器厂; DK-S26 型电热恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; SK-1 型快速混匀器, 常州国华仪器有限公司; JC-84 型多功能提取器, 衡阳市制药设备厂制造; BM-08 型多功能蒸汽锅炉, 衡阳市制药设备厂制造。

α -葡萄糖苷酶(酿酒酵母, 纯度 $\geq 10\text{U/mg}$), sigma 公司; 对硝基苯酚, PNP, 分析纯, 中国国药(集团)上海化学试剂公司; 对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷, PNPG, 纯度 99%, sigma 公司; 牛血清白蛋白, BSA, 纯度 $\geq 95\%$, sigma 公司; 阿卡波糖, 50 mg/片, 拜耳医药保健有限公司; 柱色谱和薄层色谱硅胶, 青岛海洋化工有限公司; 西青果, 产地广东, 哈尔滨市盛泰中药饮片加工厂生产。

收稿日期: 2013-10-22 接受日期: 2013-12-03

基金项目: 中药制药过程新技术国家重点实验室资助项目 (SK12010Z0201); 辽宁省高等学校重大科技平台项目 (2011-191)

* 通讯作者 Tel: 86-411-86332109; E-mail: zhujingbo@sina.com

2 实验方法

2.1 萜类化合物的提取与分离

西青果 3.0 kg 粉碎后,甲醇加热回流提取 3 次,每次 1.5 小时,合并三次提取液,浓缩得甲醇提取物 1.58 kg。用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得乙酸乙酯萃取物 500 mg。乙酸乙酯部位经常压硅胶柱色谱,氯仿-甲醇梯度(10:0~4:6)洗脱分离后得到 fr1~fr8 个组分,fr2(0.8 g)组分用高压硅胶制备柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱,由 20:1 洗脱,再经 LH-20 柱纯化得到 Arjunic acid(22.0 mg)。fr3(11.7 g)组分经高压硅胶柱色谱,氯仿-甲醇体系反复洗脱、LH-20 柱纯化后得到 Arjunolic acid(64 mg)和 Arjungenin(65.4 mg)。

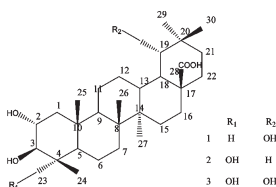


图 1 化合物 1~3 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1-3

2.2 单体化合物抑制活性的测定

2.2.1 检测方法

实验采用高效液相色谱法,反应体系按照体外 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型^[7]。抑制率计算公式如下:

A 为不加待测样品时 PNP 的浓度(扣除相应空白)mmol/L;

B 为加入待测样品后 PNP 的浓度(扣除相应空白)mmol/L。

色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:45%-乙腈,55%-0.1%的甲酸水,等度洗脱 8 min;流速:1 mL/min;检测波长:315 nm,柱温:常温。

2.2.2 标准曲线的制作

准确称取 0.0209 g PNP,用超纯水溶解超声,定容到 25 mL,配制成 6 mmol/L 的 PNP 母液,将母液稀释成 0.0025、0.005、0.01、0.05、0.1、0.2 mmol/L。按照上述色谱条件进行测定,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

2.2.3 活性测试

反应体系:25 μ L 0.067 mol/L pH=6.8 的磷酸

盐缓冲液;15 μ L 0.1 U/mL α -葡萄糖苷酶;5 μ L 待测样品,震荡混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min;加入 20 μ L 4 mmol/L 的 PNP,开启反应,震荡均匀后,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min;加入 80 μ L 0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 终止反应;用超纯水定容到 250 μ L,混匀后过 0.45 μ m 的膜,用液相色谱检测,通过反应产物 PNP 的浓度,按照上述公式计算出各组分的抑制率,并利用 Origin 软件,计算出各组分、活性单体的 IC₅₀ 值。

3 实验结果与讨论

3.1 结构鉴定

化合物 1 白色结晶性粉末(CH₃OH);¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ :5.31 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-12), 3.62 (1H, ddd, J = 25.6, 16.4, 3.2 Hz, H-2), 3.25 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 3.05 (1H, s, H-19), 0.77, 0.81, 0.93, 0.96, 0.10, 1.02, 1.30 (each 3H, s, 7CH₃);¹³C NMR (CD₃O₃, 100 MHz) δ :182.4 (C-28), 144.8 (C-13), 124.9 (C-12), 84.7 (C-3), 82.6 (C-19), 69.6 (C-2), 56.9 (C-5), 48.9 (C-9), 48.1 (C-1), 46.8 (C-17), 45.3 (C-18), 42.8 (C-14), 40.9 (C-4), 40.6 (C-8), 39.5 (C-10), 36.2 (C-20), 34.1 (C-7), 34.0 (C-22), 29.6 (C-29), 29.6 (C-21), 29.4 (C-15), 28.8 (C-27), 28.7 (C-23), 25.3 (C-30), 25.2 (C-16), 25.0 (C-11), 19.8 (C-6), 17.9 (C-26), 17.5 (C-25), 17.1 (C-24)。以上数据与文献^[8]报道一致,为 Arjunic acid。

化合物 2 白色结晶性粉末(CH₃OH);¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ :5.27 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-12), 3.70 (1H, ddd, J = 25.2, 16.4, 3.2 Hz, H-2), 3.52 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-23), 3.33 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-3), 3.32 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-23), 0.72, 0.84, 0.93, 0.96, 1.05, 1.20 (each 1H, s, 6CH₃);¹³C NMR (CD₃O₃, 100 MHz) δ :183.0 (C-28), 144.5 (C-13), 123.5 (C-12), 78.3 (C-3), 69.8 (C-2), 66.5 (C-23), 49.4 (C-9), 48.3 (C-5), 48.0 (C-17), 47.8 (C-1), 47.4 (C-19), 44.3 (C-4), 43.2 (C-18), 42.9 (C-14), 40.7 (C-8), 39.2 (C-10), 35.0 (C-21), 33.9 (C-7), 33.7 (C-22), 33.5 (C-29), 31.8 (C-20), 28.9 (C-15), 26.7 (C-27), 24.8 (C-16), 24.2 (C-11), 24.1 (C-30), 19.2 (C-6), 17.9 (C-25), 17.6 (C-26), 14.0 (C-24)。以上数据与文献^[9]报道一致,为 Arjunolic acid。

化学物 3 白色结晶性粉末(CH_3OH); ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.32 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12), 3.70 (1H, ddd, $J = 25.2, 16.4, 3.2$ Hz, H-2), 3.51 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-23), 3.36 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 3.25 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-23), 3.08 (1H, s, H-19), 0.71, 0.78, 0.94, 0.97, 1.30, 1.31 (each 1H, s, 6 CH_3); ^{13}C NMR (CD_3O_3 , 100MHz) δ : 183.1 (C-28), 145.0 (C-13), 124.8 (C-12), 82.7 (C-19), 78.5 (C-3), 69.8 (C-2), 66.6 (C-23), 49.5 (C-9), 49.3 (C-5), 47.9 (C-1), 47.0 (C-17), 45.4 (C-18), 44.3 (C-4), 42.9 (C-14), 40.9 (C-8), 39.3 (C-10), 36.2 (C-20), 34.3 (C-7), 33.5 (C-22), 29.7 (C-29), 29.6 (C-15), 28.9 (C-11), 28.8 (C-21), 25.3 (C-27), 25.3 (C-30), 25.0 (C-16), 19.4 (C-6), 18.0 (C-25), 17.5 (C-26), 14.0 (C-24)。以上数据与文献^[8]报道一致,为 Arjungenin。

3.2 α -葡萄糖苷酶抑制剂的活性

西青果甲醇提取物水溶液经石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取后得到四个部分,其中乙酸乙酯相、正丁醇相和水相在 5 mg/mL 的浓度下对 α -葡萄糖苷酶的抑制率均达到 100%,石油醚相没有活性。乙酸乙酯相得到的两个三萜酸活性单体,其活性均高于阿卡波糖。

表 1 化合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

Table 1 α -Glucosidase inhibitory activity of compounds of *T. chebula*

样品 Sample	浓度 Concentration (mg/mL)	抑制率 Inhibitory rate (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/mL}$)
化合物 1	5.0	100	2.97
化合物 2	5.0	100	0.82
化合物 3	5.0	0	-
阳性对照	5.0	73.74	3.87

注:阳性对照为阿卡波糖。

3.3 讨论

萜类化合物在以往的研究中主要报道其有消炎、杀菌、抗病毒、抗肿瘤、保肝等药理作用[10],对于其抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究很少。本次实

验得到 3 个三萜化合物,其中 2 个单体对 α -葡萄糖苷酶具有抑制活性,且活性均高于阿卡波糖。本次研究的结果也进一步验证了萜类化合物为有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,为今后天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂药物的开发可以作一指导作用。

参考文献

- 1 Ma YY(马燕燕), Lu XX(鲁晓翔). Reviews on screening for α -glucosidase inhibitors of natural products. *C & O(粮食和油脂)*, 2010, 7-10.
- 2 Rahman A, Zareen S, Choudhary MI, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of triterpeoids from *Cichorium intybus*. *J Nat prod*, 2008, 71:910-913.
- 3 Kang WY(康文艺), Zhang L(张丽), Song YL(宋艳丽). α -Glucosidase inhibitors from *Lucalia pinciana*. *Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2009, 34:406-409.
- 4 Liu YM(刘玉梅), Song BA(宋宝安), Yang S(杨松), et al. Research advance in Chemical Components and Bioactivities and of *Terminalia Chebula* Retz. *J Guizhou University(贵州大学学报)*, 2007, 24:208-212.
- 5 Indu Sasidharan, A. Sundaresan, V. M. Nisha, et al. Inhibitory effect of *Terminalia Chebula* Retz. fruit extracts on digestive enzyme related to diabetes and oxidative stress. *J Enzym Inhibit Med Chem*, 2012, 27:578-586.
- 6 Gao H, Huang YN, Xu PY, et al. Inhibitory effect on α -Glucosidase by the fruits of *Terminalia Chebula* Retz. *F Chem*, 2007, 105:628-634.
- 7 Zhu WJ(朱文佳). Studies on the inhibitory effects of active component from TCM on α -Glucosidase. Dalian Polytechnic University(大连工业大学), MD. 2010.
- 8 Yang JR(杨俊荣), Sun FY(孙芳云), Li ZH(李志宏), et al. Chemical constituents from *Terminalia chebula* Retz. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2008, 20:450-451.
- 9 Lu PP(卢普平), Liu XK(刘星), Li XC(李兴从). Studies on the triterpenes of *Terminalia Chebula* Retz. *Acta Bot Sin(植物学报)*, 1992, 34:126-132.
- 10 Cai XH(蔡小华), Xie B(谢兵), Du HJ(杜海军), et al. Advance in research on chemical constituents and pharmacological action of *Terminalia Chebula* Retz. *Prog Pharm Sci(药学进展)*, 2008, 32:212-215.