

银椴苷的制备和对 α -淀粉酶的抑制作用

张 玉¹, 马燕燕^{1,2}, 赵登高^{1,2}, 周爱玉², 杜志云², 张 焜^{1,2*}

¹五邑大学化学与环境工程学院, 江门 522062; ²广东工业大学轻工化工学院天然药物与绿色化学研究所, 广州 510006

摘要: 银椴苷是从藏药绿萝花中分离得到的一种重要的黄酮类化合物, 具有降血糖等活性。本文从藏药绿萝花中制备得到银椴苷, 采用以 2-氯 4-硝基苯基- α -D-吡喃麦芽糖苷 (CNP-G3) 为底物的方法进行 α -淀粉酶活性测试, 首次报道了银椴苷对 α -淀粉酶的抑制作用, 并进行了 α -淀粉酶抑制动力学实验和小鼠淀粉耐量实验。实验结果表明, 银椴苷对 α -淀粉酶具有很强的抑制作用, 其半数抑制率 (IC_{50}) 为 12.1 μ M。动力学分析表明银椴苷对 α -淀粉酶的抑制呈非竞争性抑制, 抑制常数 (K_i) = 9.72 μ M。小鼠淀粉耐量实验表明, 银椴苷对正常小鼠淀粉负荷糖耐量有明显的改善作用 ($P < 0.05$)。

关键词: 银椴苷; 藏药绿萝花; α -淀粉酶; 非竞争型抑制; 淀粉耐量

中图分类号: R962

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.008

Preparation and α -Amylase Inhibition Activity of Tiliroside

ZHANG Yu¹, MA Yan-yan^{1,2}, ZHAO Deng-gao^{1,2}, ZHOU Ai-yu², DU Zhi-yun¹, ZHANG Kun^{1,2*}

¹School of Chemistry & Environmental Engineering, Wuyi University, Jiangmen 529020, China;

²Institute of Natural Medicinal Chemistry & Green Chemistry, Department of Pharmaceutical Engineering, School of Light Industry and Chemical Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: The aim of the research was to study the inhibition of tiliroside to α -amylase, which was isolated from the flowers of *Edgeworthia gardneri*. Tiliroside was evaluated for its inhibitory activity against α -amylase. The mode of inhibition for α -amylase and oral sucrose tolerance test was also investigated. Tiliroside showed significant α -amylase inhibitory activity ($IC_{50} = 12.1 \mu\text{M}$) in a noncompetitive fashion with a K_i of 9.72 μM . The results obtained from oral sucrose tolerance test revealed that tiliroside is able to inhibit α -amylase at the intestinal level with consequent decrease of the postprandial peak in mice. This is the first report on the α -amylase inhibition of tiliroside. In vitro and in vivo experiments showed that the inhibition of α -amylase is one of the mechanisms of antihyperglycemic activity of *E. gardneri*.

Key words: tiliroside; *Edgeworthia gardneri*; α -amylase; noncompetitive inhibition mode; oral sucrose tolerance test

藏药绿萝花为瑞香科结香属植物滇结香 (*Edgeworthia gardneri*) 的干燥花蕾。西藏当地百姓将绿萝花泡水饮用, 用于预防和治疗糖尿病、冠心病、高血压、高血脂、血管炎、脉管炎等疾病^[1]。银椴苷是从绿萝花中分离得到的一种重要的黄酮类化合物。银椴苷能够降低糖尿病小鼠的空腹血糖和正常小鼠的餐后血糖^[2]。为了绿萝花降糖药物和保健品的进一步开发, 银椴苷降血糖的机制需要进行更加深入的研究。

α -淀粉酶 (EC3.2.1.1) 是水解 α -1,4 糖苷键的淀粉水解酶, 在人体内碳水化合物的消化和吸收的过程中具有重要的作用。抑制 α -淀粉酶的活性, 可

以阻碍食物中碳水化合物的水解和消化, 降低口服淀粉后血糖的升高, 从而达到预防和治疗糖尿病的目的^[3]。

本文采用以 2-氯 4-硝基苯基- α -D-吡喃麦芽糖苷 (CNP-G3) 为底物的方法检测 α -淀粉酶活性^[4,5], 首次报道了银椴苷对 α -淀粉酶的抑制作用, 并进行了 α -淀粉抑制动力学实验和小鼠淀粉耐量实验。

1 仪器与材料

猪胰腺 α -淀粉酶 (美国 Sigma 公司), 2-氯 4-硝基苯基- α -D-吡喃麦芽糖苷 (Carbosynth 中国公司), SpectraMax Paradigm 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); LC-6AD 高效液相 (日本岛津公司); Bruker AVANCE III 400 MHz 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore

公司);强生稳豪倍易型血糖仪(美国强生公司);所用试剂均为市售分析纯或色谱纯。昆明小鼠,雄性,清洁级,体重 23 ~ 25 g,由广东省实验动物中心提供。

实验药材藏药绿萝花于 2014 年 9 月购自西藏神奇保健品有限公司,经西南民族大学李莹讲师鉴定为瑞香科植物滇结香(*Edgeworthia gardneri*)的干燥花蕾。标本(X201409)存放于广东工业大学轻工化工学院。

2 实验方法

2.1 银椴苷的制备

绿萝花(10 kg)打碎成粉末,用乙醇(40 L)浸泡 3 次,每次 7 d。合并 3 次提取液,减压回收溶剂得总浸膏(670 g)。总浸膏用水(2 L)分散,分别用石油醚(2 L \times 3),乙酸乙酯(2 L \times 3),正丁醇(2 L \times 3)依次萃取得 4 相。乙酸乙酯相(101 g)通过小孔树脂(MCI)进行柱层析,以 9:1 的甲醇水进行洗脱,得到三个组分,F1~F3。F1 组分(70 g)在 1000 mL 甲醇中重结晶,得到淡黄色固体(55 g),再次使用 500 mL 甲醇重结晶后得白色晶体(17 g),产率 0.17%。

2.2 银椴苷纯度的测定

采用 HPLC 法测定用于实验的银椴苷的纯度。样品溶液的制备:银椴苷用色谱甲醇溶解,摇匀,稀释配制得到 0.1 mg/mL 的溶液;色谱条件:色谱柱 YMC-Pack ODS-A(150 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:45% 甲醇/水;检测波长为 314 nm,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μ L。

2.3 α -淀粉酶活性检测

α -淀粉酶活性检测方法参照 Staerk 等人的方法^[4]。实验原理是 α -淀粉酶水解 CNP-G3 释放出 2-氯 4-硝基苯酚,2-氯 4-硝基苯在 405 nm 处有吸收。因此,反应体系在 405 nm 吸光度值的大小即可表明 α -淀粉酶的活力高低。实验步骤:1. 配制含有 0.2% NaN_3 、60 mM NaCl、1 mM 乙酸钙、pH = 6.0 浓度为 0.1 mM 的磷酸盐缓冲液。2. 将 α -淀粉酶和 CNP-G3 溶解于上述磷酸盐缓冲液,浓度分别为 2.0 U/mL 和 10.0 mM,-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用,将化合物溶于二甲基亚砜(DMSO)溶液中。3. 在 96 孔板中,加入 165 μ L 磷酸盐缓冲液、10 μ L 被测化合物溶液、5 μ L α -淀粉酶储存液(终浓度 0.05 U/mL),空白组加入 10 μ L DMSO。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,加入 20 μ L CNP-

G3 储存液(终浓度 1.0 mM),立刻测量在 405 nm 处吸光度,每 3 min 测量一次,共测量 30 min。

$$\text{抑制率} = \frac{S_{\text{空白}} - S_{\text{样品}}}{S_{\text{空白}}} \quad (1)$$

式(1)中, $S_{\text{空白}}$ 为空白组 30 min 内在 405 nm 处吸光度的增加值。 $S_{\text{样品}}$ 为样品组 30 min 内在 405 nm 处吸光度的增加值。每组实验至少重复三次,阿卡波糖为阳性对照。

2.4 化合物 8 抑制 α -淀粉酶的动力学

缓冲液等条件同 2.1,在 96 孔板中分别测定在不同浓度银椴苷和不同 CNP-G3 浓度的条件下,终浓度为 0.05 U/mL 淀粉酶时在 405 nm 的吸光度。酶促反应的速度(v)用每 min 生成的 2-氯 4-硝基苯酚的浓度来表示。CNP-G3 的终浓度为 10、5、2.5、1.25、0.625 mM,银椴苷的终浓度分别为 25、18.75、12.5、6.25、0 μ M。通过 Origin 软件,以酶促反应速度的倒数(v^{-1})对底物 CNP-G3 浓度的倒数($[s]^{-1}$)进行作 Lineweaver-Burk 图。通过米氏方程求出抑制剂常数(K_i)、米氏反应常数(K_m)、最大反应速度(v_{max})^[6]。

2.5 银椴苷对小鼠淀粉耐量的影响

银椴苷使用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)悬浮。小鼠分成 3 组,每组 10 只,禁食过夜后,给予银椴苷 300 mg/kg、阿卡波糖 10 mg/kg(阳性组)、0.5% CMC-Na(对照组)。尾静脉采血后立即淀粉溶液 4 g/kg 灌胃给药 1 次,给淀粉后 0.5、1.0、2.0 h 尾静脉采血,使用强生血糖仪测量血糖含量。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 t 检验方法。

3 实验结果

3.1 银椴苷的核磁数据

银椴苷:黄色固体(甲醇),¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ_{H} 6.14 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 7.97 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.84 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 5.44 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 7.36 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2''', H-6'''), 6.77 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3''', H-5'''), 7.32 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7'''), 6.10 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8'''), 12.55 (1H, s, H-5-OH), 10.84 (1H, s, H-7-OH), 10.15 (1H, s, H-4'-OH), 10.01 (1H, s, H-4'''-OH);¹³C NMR (DMSO, 100 MHz):(δ_{C} 156.2 (C, C-2), 133.0 (C, C-3), 177.3 (C, C-4), 161.0 (CH, C-5), 98.6 (CH, C-6),

164.0 (C, C-7), 93.5 (CH, C-8), 156.3 (C, C-9), 103.8 (C, C-10), 124.8 (C, C-1'), 130.6 (CH, C-2'), 115.6 (CH, C-3'), 159.8 (C, C-4'), 115.6 (C, C-5'), 130.6 (CH, C-6'), 100.96 (CH, C-1''), 74.1 (CH, C-2''), 76.2 (CH, C-3''), 69.9 (C, C-4'), 74.0 (C, C-5'), 62.9 (CH₂, C-6'), 120.7 (C, C-1'''), 129.9 (CH, C-2'''), 114.9 (CH, C-3'''), 159.6 (C, C-4'''), 114.9 (CH, C-5'''), 129.9 (CH, C-6'''), 144.4 (C, C-7'''), 113.6 (CH, C-8'''), 166.0 (C, C-9'''). 以上数据与文献报道基本一致^[7],故鉴定化合物为银椴苷。

3.2 银椴苷的纯度测定

本文采用 HPLC 法测定用于实验的银椴苷的纯度,结果如图 1 所示,银椴苷的纯度大于 99%。

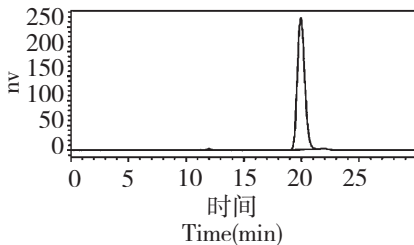


图 1 实验用银椴苷的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of tiliroside

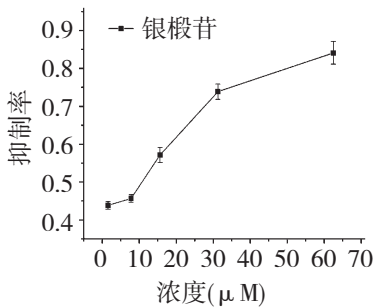


图 2 银椴苷对 α -淀粉酶的抑制曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 α -Glucosidase inhibition rate of tiliroside ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 α -淀粉酶活性检测

本文测定了银椴苷对猪胰腺 α -淀粉酶的抑制作用。实验结果表明,银椴苷对 α -淀粉酶具有很强抑制作用。以银椴苷浓度对抑制率做抑制曲线图(图 2)。从图 2 可得出银椴苷对猪胰腺 α -淀粉酶的半数抑制浓度(IC₅₀)为 12.1 μ M。而绿萝花乙醇提取物的 IC₅₀ 值为 148.5 μ M,阳性对照阿卡波糖的 IC₅₀ 值为 0.6 μ M。

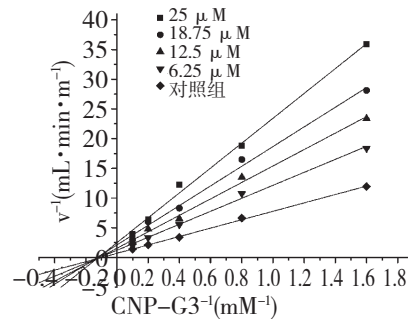


图 3 银椴苷对 α -淀粉酶的抑制动力学曲线

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots of the reaction of α -amylase at different concentrations of substrate and tiliroside

3.4 银椴苷抑制 α -淀粉酶的动力学

鉴于银椴苷对 α -淀粉酶表现出很强的抑制作用,本文对银椴苷对 α -淀粉酶的抑制类型进行了研究。通过 Lineweaver-Burk 作图法,得到了银椴苷对 α -淀粉酶的抑制动力学曲线(图 3)。从图 3 可见,5 条不同抑制浓度的直线在 X 轴交于一点,说明银椴苷对 α -淀粉酶的抑制呈非竞争性抑制。此时米氏方程可表示为:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{(1 + \frac{[I]}{K_i})([S] + k_m)} \quad (2)$$

式(2)中, [I] 为抑制剂浓度。当 [I] = 0 时,由无抑制剂对照组的横截距和纵截距分别得出 $K_m = 10.1 \text{ mM}$, $v_{\max} = 1.42 \text{ mg/mL} \cdot \text{min}$,通过米氏方程得出 $K_i = 9.72 \text{ } \mu\text{M}$ 。

3.5 银椴苷对小鼠淀粉耐量的影响

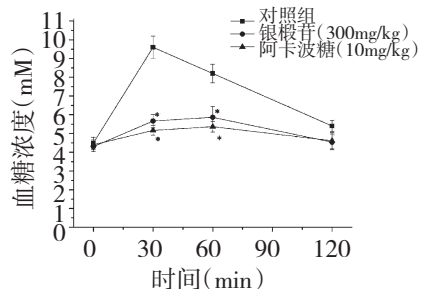


图 4 银椴苷对小鼠淀粉耐量的影响

Fig. 4 Effect of tiliroside on sucrose tolerance in normal mice
注:与对照组比较, * $P < 0.05, n = 10$

Note: * $P < 0.05$, compared with control, $n = 10$

为了确认银椴苷的体内活性,本文还测试了银椴苷对小鼠淀粉耐量的影响(图 4)。由图 4 可知,银椴苷(300 mg/kg)的降血糖效果与阳性对照组阿

卡波糖(10 mg/kg)相似。与对照组相比,银椴苷(300 mg/kg)能降低正常小鼠的淀粉负荷后的血糖高峰值,推迟达峰时间,具有明显的统计学意义($P = 0.02$),表明银椴苷对正常小鼠淀粉负荷糖耐量有明显的改善作用。由此可知,银椴苷在体内能够抑制 α -淀粉酶的活性。

4 讨论

淀粉类食品一直是人体糖类最主要的来源。糖尿病病人长时间的高血糖是导致病人多系统多脏器损害的最主要原因^[8]。因此,抑制 α -淀粉酶减少淀粉分解为单糖,继而降低餐后血糖水平对糖尿病人非常有益。 α -淀粉酶的检测长期应用以淀粉为底物测定其活力的方法,实验步骤长,费时费力,不适合 α -淀粉酶抑制剂的快速筛选^[9]。本文检测 α -淀粉酶的方法使用猪胰腺 α -淀粉酶,以CNP-G3为底物。此方法在96孔板上进行,样品使用量小,测试时间短,是一种快速高通量筛选 α -淀粉酶抑制剂的好方法。

本文从绿萝花中制备银椴苷,首次报道了银椴苷对 α -淀粉酶的抑制作用。 α -淀粉酶抑制动力学分析表明,银椴苷对 α -淀粉酶的抑制是非竞争性抑制,表明银椴苷与 α -淀粉酶的底物CNP-G3的作用位点不同。由于银椴苷的水溶性不好,在酶促反应中银椴苷的实际浓度与理论值有较大误差,导致银椴苷的 IC_{50} 值与 K_i 值有一定的误差^[10]。最后,动物实验表明银椴苷在体内能够抑制 α -淀粉酶的活性。

参考文献

- 1 Wang S(王赛), Liu Q(刘群), Han JT(韩金潭), et al. Studies on treatment of fatty rats animal model with *Scindapsus aureus*. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2014, 30(4): 85-88.
- 2 Ma YY, Zhao DG, Zhou AY, et al. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of phenolics from the flowers of *Edgeworthia gardneri*. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 8162-8169.
- 3 Lv FX(吕凤霞), Lu ZX(陆兆新). The research advance on α -amylases inhibitor. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23: 152-155.
- 4 Okutan L, Kongstad KT, Staerk D, et al. High-resolution α -amylase assay acombined with high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy for expedited identification of α -amylase inhibitors: proof of concept and α -amylase inhibitor in cinnamon. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 11465-11471.
- 5 Zhao DG, Zhou AY, Du Z et al. Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*. *Fitoterapia*, 2015, 107: 122-127.
- 6 Yan J, Zhang G, Pan J, et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 213-223.
- 7 Lu J(贾陆), Jing LL(敬林林), Zhou SA(周胜安), et al. Study on chemical constituents of *Urena lobata* L. I. Flavonoid constituents. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2009, 40: 662-665.
- 8 Blonde L. Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. *Am J Med Sci*, 2012, 343: 17-20.
- 9 Tietz NW. Support of the diagnosis of pancreatitis by enzyme tests-old problems, new techniques. *Chin Chem Acta*, 1997, 257: 85-98.
- 10 Brindis F, Rodríguez R, Bye R et al. (*Z*)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor. *J Nat Prod*, 2011, 74: 314-320.
- 19 Zheng J(郑江), Gao YH(高亚辉), Zhu XL(朱小莉), et al. Comparative study on the adhesive capabilities of sodium alginate and guar gum as bone adhesives. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 2007, 26(3): 27-29.
- 20 Yu XS(余雪松), Huang CB(黄赤兵), Zhang YF(张银甫), et al. Adhesiveness and biocompatibility of plant adhesive. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15: 8792-8796.

(上接第25页)