

波叶山蚂蝗 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

张龙^{1,2}, 王俊霞³, 顾雪竹⁴, 张前军^{1*}

(1. 贵州大学化学与化工学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省产品质量监督检验院, 贵阳 550002;
3. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 评价波叶山蚂蝗提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。方法: 通过建立体外 α -葡萄糖苷酶抑制模型, 对波叶山蚂蝗石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取物进行活性筛选。结果: 波叶山蚂蝗 3 个提取物均有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 抑制活性均远远大于阳性对照阿卡波糖 ($IC_{50} = 1\ 103.01\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 其中以石油醚部位 (DSPE) 活性最好 ($IC_{50} = 45.16\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。乙酸乙酯部位 (DSEA) 和正丁醇部位 (DSME) 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性呈显浓度依赖性。结论: 波叶山蚂蝗 3 个提取部位有较显著的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 具有开发应用的价值。

[关键词] 波叶山蚂蝗; α -葡萄糖苷酶; 抑制活性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0070-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014070070

α -Glucosidase Inhibitory Activity of Extracts from *Desmodium sequax*

ZHANG Long^{1,2}, WANG Jun-xia³, GU Xue-zhu⁴, ZHANG Qian-jun^{1*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineer of Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Institution of Supervision and Inspection Product Quality of Guizhou Province, Guiyang 550002, China;
3. Institute of Chinese Materia Medica, Pharmaceutical College, Henan University, Kaifeng 475004, China;
4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate α -glucosidase inhibitory activity of extracts from *Desmodium sequax*. **Method:** By establishing α -glucosidase inhibitory model *in vitro*, the activity of petroleum ether extract, ethyl acetate extract and methanol extract from *D. sequax* was screened. **Result:** Three extracts from *D. sequax* showed good inhibitory activity, which showed far greater activity than that of acarbose ($IC_{50} = 1\ 103.01\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Petroleum ether extract (DSPE) had the highest inhibitor activity ($IC_{50} = 45.16\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). α -glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate extract (DSEA) and methanol extract (DCME) had concentration-dependent. **Conclusion:** Three extracts had more significant α -glucosidase inhibitory activity and great development and application value.

[Key words] *Desmodium sequax*; α -glucosidase; inhibitory activity

豆科山蚂蝗属植物为灌木、亚灌木或草本, 全世界约 350 种, 遍布世界各地, 盛产于热带和亚热带地区, 我国约有 27 种, 分布于全国, 多集中于西南部至

东南部; 贵州省有 12 种, 民间多作药用^[1]。山蚂蝗属植物性味甘、苦、凉, 具有祛风利湿、活血消肿、解毒止痛、清热利尿等功效, 民间主要用于治疗胃痛、毒蛇咬伤、小儿疳积、肝炎、乳腺炎、腮腺炎、尿道炎、淋巴结炎、创伤、痢疾等疾病。山蚂蝗属植物在抗氧化、预防泌尿系统结石、保肝、抗炎镇痛、治疗心脑血管疾病、解痉等方面有很好的生物活性^[2]。

目前, 国内外研究者已从山蚂蝗属植物广金钱草、长叶排钱草、小槐花、南美山蚂蝗、饿蚂蝗、*D. alatum*、葫芦茶、排钱草、台湾山蚂蝗、椴叶山蚂蝗、*D. canum*、银叶山蚂蝗、*D. adhaesivum*、*D.*

[收稿日期] 20130413(005)

[基金项目] 贵州省中药现代化项目(黔科合中药字[2010]5029); 教育部春晖计划项目(Z2011036); 贵阳市科技计划项目(2012204)

[第一作者] 张龙, 硕士研究生, 从事天然有机化学研究, Tel: 13765823402, E-mail: 281824960@qq.com

[通讯作者] * 张前军, 教授, 从事天然有机化学研究, Tel: 13007880021, E-mail: qianjunzhang@126.com

sandwicense、大叶山蚂蝗、三点金、大叶拿身草、小叶三点金中分离得到多种化合物,主要包括挥发油、烷烃类、酸类、萜类、甾体、黄酮类、生物碱类等^[3-4]。其生物活性主要有抗氧化、保肝、抗炎等^[5-7]。

α -葡萄糖苷酶抑制剂可竞争性抑制小肠内 α -葡萄糖苷酶的活性,使淀粉类分解为葡萄糖的速度减慢,从而减缓肠道内葡萄糖的吸收,可以明显降低2型糖尿病人餐后血糖水平,减少糖尿病并发症的发生。 α -葡萄糖苷酶抑制剂由于其独特的优势,目前已被广泛用于糖尿病及其并发症的防治,临床上主要使用阿卡波糖和伏格列波糖等。

波叶山蚂蝗为豆科山蚂蝗属植物,又名瓦子草、野豆子、牛巴嘴、山蚂蝗、过路黄、檀草、长波叶山蚂蝗,分布四川、湖北、贵州、云南、台湾等地,味微苦、涩,性平,具有清热泻火、活血祛瘀、敛疮之功效,主治风热目赤、胞衣不下、血瘀经闭、烧伤等^[8]。山蚂蝗属植物具有良好生物活性,本课题组也持续对山蚂蝗属植物进行了系统的化学与生物活性的筛选^[9-14]。为了综合开发利用波叶山蚂蝗植物,作者对波叶山蚂蝗的化学成分及生物活性进行系统研究,从波叶山蚂蝗植物分离得到的化合物主要有烃类、酸类、萜类、甾体、黄酮类。通过建立体外 α -葡萄糖苷酶抑制模型,并对波叶山蚂蝗石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取物进行活性筛选。

1 材料

波叶山蚂蝗于2010年9月采自贵州省安顺市,经贵阳中医学院陈德媛教授鉴定为豆科山蚂蝗属植物波叶山蚂蝗 *Desmodium sequax* Wall. 标本存于贵州大学化学与化工学院化学系。

α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase, EC 3. 2. 1. 20), 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (4-*N*-trophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG, 026 K1516), 阿卡波糖 (Acarbose, Lot 16869), 二甲亚砜 (DMSO) 均购自美国 Sigma 公司,其他试剂均为分析醇。

Multiskan MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Electron 公司), LRH-150 型恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司), DELTA 320 型 pH 计 (美国 Mettler-Toledo 公司), 电子天平 (美国 Mettler-Toledo 公司), TGL-16 型高速离心机 (江苏金坛市中大仪器厂)。

2 方法

2.1 波叶山蚂蝗浸膏的提取 将波叶山蚂蝗全草阴干,粉碎,用75%的乙醇室温下浸泡3次,每次7d,合并提取滤液后浓缩,得到提取总浸膏。总浸膏分散于水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,

减压浓缩得到波叶山蚂蝗石油醚部位 (DSPE)、乙酸乙酯部位 (DSEA)、正丁醇部位 (DSME)。

2.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

2.2.1 标准曲线制作 根据采用的反应体系,用磷酸缓冲液 (pH 6.8) 配制 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNP, 稀释成 400, 300, 200, 150, 100, 50, 25, 5, 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别取 7 种不同质量浓度的 PNP 溶液各 160 μL , 加入 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液 80 μL , 混匀, 在 405 nm 下测定 A 值, 测 3 组取平均值。以 A 值为纵坐标, 对硝基苯酚浓度为横坐标, 做出标准曲线。

2.2.2 α -葡萄糖苷酶活力测定 112 μL 磷酸钾缓冲液 (pH 6.8), 加入 20 μL 0.2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶和 8 μL DMSO, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温 15 min 后加入 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG 20 μL , 摇匀, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 15 min。再加入 80 μL 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液, 于 405 nm 波长下测 A 值。

酶活力单位定义: 37 $^\circ\text{C}$ 、pH 6.8 条件下, 每分钟水解底物所产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量, 规定为一个酶活力单位 (U)^[15]。

2.2.3 检测方法 将波叶山蚂蝗各提取物以 DMSO 溶解, 并存储于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中。以张丽等^[16-18]建立的 96 微孔板筛选方法, 405 nm 处检测其 A 值。同时做相同体系下的样品空白组, 不加样品、酶与底物的空白对照组、不加样品的阴性对照组和以阿卡波糖为抑制剂的阳性对照组。并用 Origin 软件求出相应的 IC_{50} 值。

$$\text{酶活性抑制率} = (A \text{ 样品阴性} - A \text{ 样品空白}) / (A \text{ 阴性} - A \text{ 空白}) \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 波叶山蚂蝗不同提取部位 α -葡萄糖苷酶抑制活性比较分析 图 1 显示, 初筛时, 在同一质量浓度下 (1 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 波叶山蚂蝗 3 个提取物 α -葡萄糖苷酶抑制率从大到小依次为乙酸乙酯部位 > 石油醚部位 > 正丁醇部位, 且初筛抑制率均高于阳性对照阿卡波糖。但是, 初筛时抑制率大其 IC_{50} 值不一定大, 仅从某一浓度的抑制率评价其活性并不可靠, 应结合 IC_{50} 值综合判断。为进一步研究抑制活性, 对提取物的初筛浓度依次对半稀释, 进行 IC_{50} 计算。表 1 显示, 3 个提取物中, 石油醚部位 ($\text{IC}_{50} = 45.14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) α -葡萄糖苷酶抑制活性最高, 其次为其次为乙酸乙酯部位 ($\text{IC}_{50} = 92.77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和正丁醇部位 ($\text{IC}_{50} = 175.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 均远远高于阳性对照阿卡波糖 ($\text{IC}_{50} = 1\ 103.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明波叶山蚂蝗各提取物均具有好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

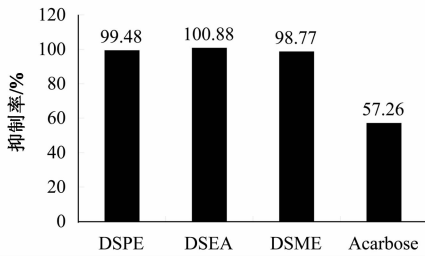


图 1 波叶山蚂蝗不同提取部位 α -糖苷酶初筛抑制活性

表 1 波叶山蚂蝗提取部位 α -葡萄糖苷酶抑制活性

提取物	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
石油醚部位 (DSPE)	99.48	45.14
乙酸乙酯部位 (DSEA)	100.88	92.77
甲醇部位 (DSME)	98.77	175.6
阿卡波糖 (Acarbose)	57.26	1 103.01

注:阿卡波糖为阳性对照,初筛质量浓度均为 1 500 mg·L⁻¹。

3.2 提取物浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

图 2 显示, DSEA 和 DSME 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性均随质量浓度增加而增加, 呈浓度依赖性。DSPE 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性较高, 质量浓度 < 0.187 5 mg·L⁻¹ 时, 抑制率随浓度的增大而呈线性增加 (浓度与其清除率的相关系数为 0.945 7), 当质量浓度 > 0.187 5 mg·L⁻¹, 再增加提取物质量浓度抑制活性缓慢增加。

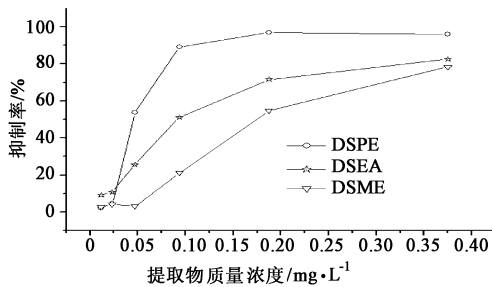


图 2 提取物浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的影响

4 结论

本文采用体外 α -葡萄糖苷酶体外抑制模型对波叶山蚂蝗提取物 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行研究, 发现波叶山蚂蝗提取物均具有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 且提取物的活性高于阳性对照阿卡波糖。另外, DSEA 和 DSME 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性均随浓度增加而增加, 呈浓度依赖性。DSPE 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性较高。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:3130.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 41 卷[M]. 北京:科学出版社, 1995:49.
- [3] 陈涛,谭德福,汪均值. 胆石通胶囊防治胆石症的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11(1):28.
- [4] 许实波,丘晨波,钟如云,等. 广金钱草总黄酮对心脑血管效应[J]. 中山大学学报, 1980, 4:98.
- [5] 毛绍春,李竹英,李聪. 山蚂蝗属 3 种植物的抗氧化性能研究[J]. 云南大学学报:自然科学版, 2007, 29(4):393.
- [6] 顾丽贞. 四川大金钱草与广金钱草抗炎作用的研究[J]. 中药通报, 1988, 13(7):40.
- [7] 简洁莹. 广金钱草提取物对实验性心肌缺血的保护作用[J]. 广东医学, 1983, 4(6):33.
- [8] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 2005:17.
- [9] 李传宽,张前军,康文艺,等. 饿蚂蝗中总黄酮含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):58.
- [10] 黄钟碧,张前军,康文艺,等. 假地豆的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17):93.
- [11] 张前军,于海林,李传宽,等. 饿蚂蝗对四氯化碳致急性肝损伤小鼠保护作用研究[J]. 中成药, 2011, 33(11):1993.
- [12] 吴颖,张前军,陈青,等. 叶长柄山蚂蝗化学成分研究[J]. 中成药, 2010, 32(3):465.
- [13] 李传宽,张前军,黄钟碧,等. 饿蚂蝗化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18):2420.
- [14] 张前军,刘瑜新,康文艺,等. 饿蚂蝗抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2010, 32(11):1980.
- [15] Kang W Y, Song S L, Zhang L. α -Glucosidase inhibitory and antioxidant properties and antidiabetic activity of *Hypericum ascyron* L [J]. Med Chem Res, 2011, 20:809.
- [16] 康文艺,张丽,宋艳丽. 茜草抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5):1104.
- [17] 康文艺,王金梅,张丽. 河南产连翘叶抑制 α -糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(9):1156.
- [18] 康文艺,张丽,宋艳丽. 滇丁香中抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4):406.

[责任编辑 蔡仲德]