

南方红豆杉枝叶不同提取部位抑制 α -葡萄糖苷酶及抗氧化活性筛选

薛平, 汤彬, 陈建伟, 王玉, 姚晓, 李祥*
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**考察南方红豆杉枝叶不同提取部位体外抑制 α -葡萄糖苷酶活性和抗氧化活性。**方法:**对南方红豆杉的醇提液、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位采用体外 α -葡萄糖苷酶抑制模型进行酶抑制活性研究,并通过其清除 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基和 Fe^{3+} 还原能力(FRAP)测定南方红豆杉提取物的体外抗氧化作用。**结果:**南方红豆杉提取物均有不同程度抑制 α -葡萄糖苷酶活性,以乙酸乙酯部位效果最佳(IC_{50} 27.854 1 $mg \cdot L^{-1}$),其次醇提物(IC_{50} 29.215 5 $mg \cdot L^{-1}$)和正丁醇部位(IC_{50} 38.913 0 $mg \cdot L^{-1}$),水部位(IC_{50} 74.505 9 $mg \cdot L^{-1}$)石油醚部位(IC_{50} 128.729 5 $mg \cdot L^{-1}$)最弱。抗氧化活性依次为醇提液(DPPH IC_{50} 6.370 7 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 4.266 $mmol \cdot g^{-1}$) > 乙酸乙酯部位(DPPH IC_{50} 9.535 8 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 3.275 $mmol \cdot g^{-1}$) > 正丁醇部位(DPPH IC_{50} 20.461 3 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 1.498 $mmol \cdot g^{-1}$) > 水部位(DPPH IC_{50} 26.685 5 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 0.678 $mmol \cdot g^{-1}$) > 石油醚部位。**结论:**初步确定南方红豆杉抑制 α -葡萄糖苷酶活性有效成分主要在乙酸乙酯与正丁醇部位,抗氧化及其相关成分主要在乙酸乙酯部位。

[关键词] 南方红豆杉; 枝叶; 抑制 α -葡萄糖苷酶活性; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0246-04

Study on Inhibition of Alpha-glucosidase and Antioxidation of from Leaves and Twigs of *Taxus chinensis* var *mairei* in vitro

XUE Ping, TANG Bin, CHEN Jian-wei, WANG Yu, YAO Xiao, LI Xiang*
(Pharmacology College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** Inhibition of alpha-glucosidase and antioxidation of different extracts from the branches and leaves of *Taxus chinensis* var *mairei* were studied *in vitro* to supply the separating base of the effective

[收稿日期] 20120817(014)

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(yssk-2010);紫衫中医功效基础研究(2011YX6-008)

[第一作者] 薛平,在读硕士生,从事中药活性物质基础研究,Tel:025-51998182,E-mail:xuepinggo@163.com

[通讯作者] *李祥,教授,博士生导师,从事中药活性物质基础研究,Tel:025-51998182,E-mail:lixiang_8182@163.com

[6] 陈芳,唐于平,陶静,等. 当归-黄芪药对不同配比的应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15):235.

[7] 王欢,唐于平,丁安伟,等. 当归-川芎药对不同配比的中医应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1):44.

[8] 马越鸣,程能能,孙瑞元. 中药研究中多指标量-效关系的综合分析[J]. 药理医药学杂志, 1999, 12(2):108.

[9] 陶秀梅. “肾阳虚”模型及症候的代谢组学研究[D]. 上海:上海交通大学, 2009:44.

[10] 张维文. 从历代补血方剂探讨补血法处方规律[D]. 北京:北京中医药大学, 2005:31.

[11] 杨洪波. 《傅青主女科》中当归类方的药证关联分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):282.

[12] 苗明三,苗艳艳,方晓艳. 大枣多糖对大鼠气血双虚模型胸腺、脾脏中组织形态及骨髓象的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2):42.

[13] 钟海平,郑红斌. 浅谈“脾胃转枢”与“脾统四脏”[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(4):270.

[责任编辑 聂淑琴]

chemical components. **Method:** The inhibitory activities of α -glucoside were assayed in external. The antioxidant activities of these extracts were assessed by two complementary test systems, namely 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. **Result:** The ethyl acetate extract showed strong activity in the inhibitory activities of α -glucoside. (IC_{50} 27.854 1 $mg \cdot L^{-1}$) The ethanol extract (IC_{50} 29.215 5 $mg \cdot L^{-1}$) and n-butanol extract (IC_{50} 38.913 0 $mg \cdot L^{-1}$) displayed lower activity. Petroleum ether fraction (IC_{50} 128.729 5 $mg \cdot L^{-1}$) and water fraction (IC_{50} 74.505 9 $mg \cdot L^{-1}$) have a little activity. The antioxidant activities: ethanol extract (DPPH IC_{50} 6.370 7 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 4.266 $mmol \cdot g^{-1}$) > ethyl acetate extract (DPPH IC_{50} 9.535 8 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 3.275 $mmol \cdot g^{-1}$) > n-butanol extract (DPPH IC_{50} 20.461 3 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 1.498 $mmol \cdot g^{-1}$) > water fraction (DPPH IC_{50} 26.685 5 $mg \cdot L^{-1}$, FRAP 0.678 $mmol \cdot g^{-1}$) > petroleum ether fraction. **Conclusion:** The components of inhibition α -glucoside could be testified in the ethyl acetate extract and n-butanol extract. Antioxidative components were in the ethyl acetate extract.

[Key words] *Taxus chinensis* var *mairei*; branches and leaves; inhibitory activities of α -glucoside; antioxidation

南方红豆杉(又名美丽红豆杉)是中国所特有的红豆杉科红豆杉属植物。其幼嫩枝叶,性味苦,平;有润肺止咳,散瘀杀虫的功效,用于肺结核,虚劳咳嗽等症;民间也用于治疗糖尿病^[1]。

目前南方红豆杉作为盆栽、绿化植物大量种植,每年有大量的废弃的修剪枝叶,其主要有挥发油、黄酮类、萜类与木质素等类成分^[2-4]。以往对于南方红豆杉的研究主要集中于紫杉烷类化合物抗肿瘤的开发与利用,然而文献表明其紫杉烷类含量相对较低。对此笔者旨在对该植物枝叶的不同部位进行体外降血糖和抗氧化初步筛选,为进一步的研究与开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 KQ-500型超声波清洗器(江苏昆山); SHIMADZU AY220型电子天平;中华 PTHW型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司);ELISA酶标仪(美国 BIO-RAD 有限公司),雷磁 PHSJ-3F型实验室计(上海精密科学仪器有限公司),Spectrum 752型紫外-可见分光光度计(上海仪器有限公司),costar 96孔细胞培养板。

1.2 药物与试剂 药材:南方红豆杉产地为江苏无锡红豆杉种植基地,经南京中医药大学鉴定教研室陈建伟教授鉴定为红豆杉科红豆杉属南方红豆杉 *Taxus chinensis* var *mairei* 枝叶。2,4,6-三吡啶基三嗪[2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, 2010022]、对硝基苯酚(p-Nitrophenol, 33920)均购自于上海阿拉丁有限公司;三氯化铁、硫酸亚铁(国药集团化学试剂有限公司);抗坏血酸(VC, 20111016, 中国医药集团上海化学试剂公司);1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, SLBB7613V);4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄

糖苷(4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG, BCBG2931V);阿卡波糖(acarbose, Lot16869)均购自Sigma公司;纯净水(杭州娃哈哈集团);其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 提取部位的制备 南方红豆杉枝叶用10倍90%乙醇,8倍50%醇各提取一次,合并药液将药液浓缩至无醇味后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,萃取余下的水溶液为水部位,得到各个部位。

2.2 抑制 α -葡萄糖苷酶活性成分的筛选^[5-6]

2.2.1 抑制 α -葡萄糖苷酶活性测定 参考文献反应体系^[5-6],96微孔板上加磷酸钾缓冲液(pH 6.8)110 μ L,再加入0.2 $U \cdot mL^{-1}$ α -glucosidase 20,10 μ L样品溶液,混匀,37 $^{\circ}C$ 恒温15 min后,加入2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ PNPG 20 μ L,混匀后37 $^{\circ}C$ 恒温反应15 min。最后加入80 μ L 0.2 $mol \cdot L^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液,于405 nm波长下测吸光度(A)。

以阿卡波糖为阳性对照,同时设定对照组(缓冲液+酶液+底物),空白组对照组(缓冲液)。

$$\text{酶活性抑制率} = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$$

2.2.2 标准曲线的测定 用磷酸缓冲液(pH 6.8)配制1 000 μ mol \cdot L⁻¹对硝基苯酚,稀释成400,300,200,150,100,50,25,5,0 μ mol \cdot L⁻¹,分别取每不同浓度的PNP溶液各160 μ L,加入0.2 $mol \cdot L^{-1}$ Na_2CO_3 溶液80 μ L,混匀,在405 nm下测定A,测3组取平均值。以A为纵坐标,对硝基苯酚浓度为横坐标,做出标准曲线 $Y = 0.336X - 0.027$ ($R^2 = 1$)。

2.2.3 α -葡萄糖苷酶活力的测定 根据反应体系加入110 μ L磷酸钾缓冲液(pH 6.8),加入20 μ L 0.2 $U \cdot mL^{-1}$ α -葡萄糖苷酶,10 μ L DMSO,37 $^{\circ}C$ 恒温

15 min 后加入 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNPG $20 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温反应 15 min。再加入 $80 \mu\text{L}$ $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 溶液, 于 405 nm 波长下测 A 。

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

2.3 体外抗氧化活性测定

2.3.1 清除 DPPH 自由基活性试验^[7] 参考文献在 96 孔板中精密加入 $20 \mu\text{L}$ 样品溶液, 再加入 $80 \mu\text{L}$ $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液, 混匀, 室温下反应 30 min, 在 517 nm 下测定 A , 每份样品平行测定 3 份, VC 作为阳性对照 (A_{VC}), 以 95% 乙醇代替不同样品溶液作为空白对照 (A_{K})。

$$\text{清除率} = [1 - (A - A_{\text{K}}) / A_{\text{VC}}] \times 100\%$$

2.3.2 还原 Fe^{3+} 能力测定^[7] 将 25 mL $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲溶液 (3.1 g 醋酸钠和 16 mL 冰醋酸用蒸馏水配成 1 L , PH 3.6), 2.5 mL $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPTZ 溶液 ($0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶解), 2.5 mL $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 混合配制成 FRAP 试剂。

在 96 孔板中分别加入 $10 \mu\text{L}$ 样品溶液和 $100 \mu\text{L}$ FRAP 工作液, 混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 10 min, 在 593 nm 下测定吸光度, 每份样品重复 3 次。空白对照为 95% 乙醇代替样品溶液, VC 为阳性对照。以 FeSO_4 标准溶液表示, 样品总抗氧化能力表示为每克提取物干重中相当于 FeSO_4 的毫摩尔数 ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)。

2.3.3 标准曲线 将 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液稀释成 $0.31, 0.62, 1.25, 2, 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 **2.3.2** 方法测定吸光度, 得到标准曲线: $Y = 1.845X - 0.021$, $R^2 = 0.999$ 。

3 结果

3.1 各提取部位抑制 α -葡萄糖苷活性 南方红豆杉不同部位对 α -葡萄糖苷活性的抑制作用见表 1, 抑制 α -葡萄糖苷活性为乙酸乙酯部位 > 醇提液 > 正丁醇部位 > 水部位 > 石油醚部位 > 阿卡波糖。

3.2 各提取部位清除 DPPH 自由基能力 对南方红豆杉不同部位药液按表 2 浓度设置, 测其清除率。其各部位清除 DPPH 自由基能力: 醇提液 > 乙酸乙酯部位 > 正丁醇部位 > 水部位 > 石油醚部位, 详见表 2。

3.3 各部位还原 Fe^{3+} 的能力 按照 **3.2** 方法测定各部位还原 Fe^{3+} 的能力, 结果见表 3。其结果与对 DPPH 自由基清除能力结果相一致。

4 讨论

糖尿病是严重危害人类健康的多发病和难治

表 1 南方红豆杉不同提取物抑制 α -葡萄糖苷活性能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取部位	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率 /%	IC_{50} / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
南方红豆杉醇提液	6.464	9.38 ± 2.21	29.215 5
	12.928	19.01 ± 4.22	
	25.856	58.81 ± 3.53	
	51.712	81.37 ± 2.11	
	103.424	85.88 ± 3.30	
	206.849	86.05 ± 7.32	
南方红豆杉那石油醚部位	27.303	0	128.729 5
	54.607	28.32 ± 2.34	
	109.213	40.74 ± 1.78	
	218.427	68.70 ± 3.51	
	436.854	79.6 ± 3.29	
	南方红豆杉乙酸乙酯部位	6.456	9.30 ± 5.19
12.911		13.60 ± 3.28	
25.822		66.93 ± 2.18	
51.645		83.09 ± 3.19	
103.289		85.47 ± 3.26	
206.578		91.79 ± 2.35	
南方红豆杉正丁醇部位	6.811	6.30 ± 1.79	38.913 0
	13.622	14.13 ± 2.38	
	27.244	35.01 ± 1.98	
	54.488	64.14 ± 3.29	
	108.977	84.24 ± 3.27	
	南方红豆杉水部位	14.858	1.00 ± 3.19
29.716		18.72 ± 4.12	
59.431		42.81 ± 1.29	
118.862		71.93 ± 2.37	
237.724		93.43 ± 1.28	
阿卡波糖		125	2.85 ± 2.38
	250	6.99 ± 1.38	
	500	28.78 ± 3.51	
	1 000	49.85 ± 2.90	
	2 000	68.74 ± 1.65	

病^[8]。 α -葡萄糖苷酶主要位于小肠刷状缘上, 其作用为对淀粉、蔗糖等碳水化合物进行利用吸收。抑制该酶可以减缓葡萄糖的产生, 降低餐后血糖^[9-10]。同时也有人认为在中医药的角度上看糖尿病为一种炎症^[11]。

南方红豆杉为抗肿瘤类中药代表, 民间有使用其叶子进行糖尿病治疗, 然而目前对于该药材的降血糖作用较少。本实验从两个方面初步摸索其降血

表 2 南方红豆杉提取物对 DPPH 自由基清除能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取部位	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
南方红豆杉醇提液	1.551	21.08 ± 0.12	6.370 7
	3.103	45.48 ± 0.25	
	6.206	52.54 ± 0.15	
	12.411	63.08 ± 0.09	
	24.822	68.36 ± 0.21	
	6.553	17.08 ± 0.32	
南方红豆杉石油醚部位	13.106	19.99 ± 0.11	115.289 1
	13.106	23.34 ± 0.13	
	26.211	39.15 ± 0.35	
	104.845	52.27 ± 0.05	
	209.690	58.69 ± 0.54	
南方红豆杉乙酸乙酯部位	1.549	20.25 ± 0.06	9.535 8
	3.099	27.17 ± 0.13	
	6.197	46.84 ± 0.22	
	12.395	58.02 ± 0.40	
	24.789	63.51 ± 0.29	
南方红豆杉正丁醇部位	3.269	16.404 ± 1.78	20.461 3
	6.539	26.88 ± 0.56	
	13.077	38.99 ± 0.67	
	26.154	57.24 ± 0.18	
	52.309	68.99 ± 0.38	
南方红豆杉水部位	3.566	14.55 ± 0.29	26.685 5
	7.132	24.81 ± 0.56	
	14.263	39.57 ± 0.39	
	28.527	51.61 ± 0.33	
	57.054	65.41 ± 0.41	
VC	0.638	20.56 ± 0.29	1.126 6
	1.275	50.84 ± 0.17	
	2.550	74.50 ± 0.25	
	5.100	85.90 ± 0.68	
	10.200	94.52 ± 0.33	

糖有效部位,体外实验发现南方红豆杉的乙酸乙酯部位在抗氧化与抑制 α -葡萄糖苷活性方面都具有显著地药效,其他部位也均有不同程度的药效。除本实验进行的体外研究外,还需进一步的体内试验,才能确定其降血糖有效部位,为进一步深入研究与

表 3 南方红豆杉提取物还原 Fe³⁺ 的能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

提取物	终质量浓度 /mg·L ⁻¹	A	FRAP /mmol·g ⁻¹
南方红豆杉醇提液	11.283	0.954 7 ± 0.004	4.266 ± 0.01
南方红豆杉石油醚部位	95.314	0.185 7 ± 0.011	0.107 ± 0.01
南方红豆杉乙酸乙酯部位	11.268	0.477 0 ± 0.018	3.275 ± 0.01
南方红豆杉正丁醇部位	23.777	0.702 0 ± 0.019	1.498 ± 0.01
南方红豆杉水部位	25.933	0.335 7 ± 0.015	0.678 ± 0.01
VC	5.455	0.492 ± 0.012	7.99 ± 0.01

开发奠定基础。

[参考文献]

- [1] 湖北省革命委员会卫生局. 湖北中草药志[M]. 十堰:湖北人民出版社, 1978:473.
- [2] 谢志慧, 杜玲玲, 李效贤, 等. 南方红豆杉研究新进展[J]. 中国药业, 2009(15):3.
- [3] 孔繁晟. 云南红豆杉枝叶中抗癌活性成分的提取工艺与黄酮类化合物的研究[D]. 广州:南方医科大学, 2007.
- [4] 李存芳, 刘勇, 董玫, 等. 南方红豆杉化学成分的研究进展[J]. 中草药, 2007(8):1121.
- [5] 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(4):406.
- [6] 陈百泉, 李昌勤, 常星, 等. 头花蓼对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8):151.
- [7] 陈瀚, 李进, 李祥, 等. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):184.
- [8] 张永鹏, 刘静, 李永民. 中医药治疗糖尿病临床证治研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):277.
- [9] 马继雄, 马祥忠, 曾阳. 美丽鳞毛蕨粗多糖对 α -葡萄糖苷酶及小鼠耐糖量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9):243.
- [10] 高小平, 张蔚瑜, 邹文俊, 等. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2003(6):536.
- [11] Xie W, Du L. Diabetes is an inflammatory disease: evidence from traditional Chinese medicines [J]. Diabetes Obes Metab, 2011, 13(4):289.

[责任编辑 聂淑琴]