

新疆昆仑雪菊 5 种提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

张燕¹, 李琳琳¹, 木合布力·阿布力孜¹, 王丽凤³, 景兆均⁴, 毛新民^{2,3*}

1. 新疆医科大学药学院药理教研室, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学第一附属医院糖尿病 VIP 实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学实验室, 乌鲁木齐 830011;
4. 新疆雪菊生物有限公司, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的:研究昆仑雪菊(CTF)提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。方法:用水提法和有机溶剂萃取法制备昆仑雪菊的提取物,得到雪菊乙酸乙酯提取物、雪菊正丁醇提取物、雪菊总黄酮、雪菊水提物和雪菊中性黄酮;用体外 α -葡萄糖苷酶抑制模型,对 5 种雪菊提取物进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,并与阳性对照药阿卡波糖进行比较。结果:昆仑雪菊的 5 种提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性均有较强的抑制作用,有 4 个提取物的抑制率高于阿卡波糖,其中雪菊中性黄酮的活性最强,在 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其酶抑制率高达 87.26%。阿卡波糖及 5 种提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的 IC_{50} 分别为:阿卡波糖 IC_{50} 858.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,雪菊乙酸乙酯提取物 IC_{50} 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,雪菊正丁醇提取物 IC_{50} 139.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,雪菊总黄酮 IC_{50} 163.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,雪菊水提物 IC_{50} 367.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,雪菊中性黄酮 IC_{50} 5.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:昆仑雪菊提取物能显著抑制 α -葡萄糖苷酶活性。

[关键词] 新疆昆仑雪菊; α -葡萄糖苷酶;抑制活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0166-04

[收稿日期] 20101110(011)

[基金项目] 自治区重点实验室开放课题基金项目(XJDX0208-2008-06);新疆医科大学硕士研究生创新基金项目(MC2010-24)

[第一作者] 张燕,在读研究生,从事抗糖尿病新药研究, Tel:13669906044 E-mail: zhangyan52u@sina.com

[通讯作者] *毛新民,教授,博士生导师,从事糖尿病药理学, Tel:0991-4365305, E-mail: mxm3277@sina.com

- [3] Abdel Wahab N, Mason R M. Connective tissue growth factor and renal disease; some answers, more questions [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, 13(1):53.
- [4] 王琰,王慕邹. 莪术的质量研究[J]. *药学学报*, 2001, 36(11):849.
- [5] 刘迟,胡仲仪. 莪术对肾间质病变引起的早期慢性肾功能衰竭影响的临床观察[J]. *上海中医药杂志*, 2004, 38(11):15.
- [6] 朱善岚,黄品芳,王友芳. 莪术的药理作用研究进展[J]. *海峡药学*, 2007, 19(4):9.
- [7] Schena F P, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 (Suppl 1):30.
- [8] Wahab N A, Schaefer L, Weston B S, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(12):2650.
- [9] Wahab N A, Yevdokimova N, Weston B S, et al. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Biochem J*, 2001, 359(1):77.
- [10] Wahab N A, Weston B S, Robet T, et al. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle; role in cellular heptrophy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(11):2437.
- [11] 宁勇,刘晓城. 莪术对糖尿病性肾纤维化的防治机制[J]. *中国药师*, 2006, 7(6):413.
- [12] 杨玲,钱伟,侯晓华,等. 莪术提取物对肝纤维化大鼠血管紧张素 II 及其 I 型受体的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(4):303.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Extracts from *Coriopsis tinctoria* Flowers of Xinjiang Kunlun Mountain on α -glucosidase Activity

ZHANG Yan¹, LI Lin-lin¹, MOURBOUL ABLISE¹, WANG Li-feng³, JING Zhao-jun⁴, MAO Xin-min^{2,3*}

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, China;

2. VIP Laboratory of Diabetes, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

3. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

4. Biological Technology of *Coreopsis tinctoria* Flowers from the Kunlun Mountain of Xinjiang Ltd Company, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect extracts from Xinjiang *Coriopsis tinctoria* flowers (CTF) on α -glucosidase activity. **Method:** Five extracts of CTF were prepared by water extraction and organic solvent abstraction. Including CTF ethylacetate extraction, CTF normal butyl alcohol extraction, CTF total flavanone, CTF water extraction and CTF neutral flavanone. The inhibitory effects of these extracts to α -glucosidase activity were investigated by in vitro enzymatic method; and acarbose was used as positive reference substance. **Result:** The extracts of CTF showed obviously inhibitory action against α -glucosidase activity in which 4 extracts have higher effects compared to those of acarbose, among them, the extract of CTF neutral flavanone was more effective for enzyme inhibition with a inhibitory rate of 87.26%. The CTF IC₅₀ of the five extracts were: Acarbose IC₅₀ 858.0 mg·L⁻¹, CTF ethylacetate extraction IC₅₀ 12.5 mg·L⁻¹, CTF normal butyl alcohol extraction IC₅₀ 139.5 mg·L⁻¹, CTF total flavanone IC₅₀ 163.5 mg·L⁻¹, CTF water extraction IC₅₀ 367.6 mg·L⁻¹, CTF neutral flavanone IC₅₀ 5.8 mg·L⁻¹. **Conclusion:** *Coriopsis tinctoria* flowers extracts had remarkable inhibitory effect to α -glucosidase activity. This finding provides important information for pharmacological screening of new anti-diabetic agent from CTF plant.

[Key words] Xinjiang *Coriopsis tinctoria* flowers extract; α -glucosidase; inhibitory activity

糖尿病是一组由遗传和环境因素相互作用而引起的,是因胰岛素分泌绝对或相对不足以及靶组织对胰岛素敏感性降低所致机体糖、脂肪、蛋白质、水和电解质等代谢紊乱的临床综合征^[1]。饮食中的淀粉、糊精、麦芽糖、蔗糖等碳水化合物在小肠刷状缘上 α -葡萄糖苷酶的作用下,释放葡萄糖并经小肠吸收进入血液,是餐后血糖升高的主要原因,餐后血糖升高可引起胰岛素敏感性降低从而加重病情并导致严重的并发症。因此, α -葡萄糖苷酶抑制剂可以减缓肠道葡萄糖的生成速度,防治餐后高血糖症和缓解高胰岛素血症,同时可以提高糖耐量,从而可达到防治糖尿病及其并发症发生的目的。寻找合适的抑制剂用于调控 α -葡萄糖苷酶的活性是防治糖尿病的有效途径之一^[2]。

研究表明高寒菊科植物和多种菊花的提取物具有降低 α -葡萄糖苷酶活性的作用^[3-5]。本文在此基础上制备新疆昆仑雪菊的提取物,并利用体外实验

观察其对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。

1 材料

1.1 样品 昆仑雪菊于2009年10月采自新疆和田的昆仑山区,由新疆雪菊生物科技公司采摘并提供;由新疆医科大学药学院的胡君萍博士鉴定为菊科金鸡菊品种。学名为两色金鸡菊 *C. tinctoria*, 本实验所用的为其干燥的花序。

1.2 试剂 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase, G5003-100UN, 美国 Sigma 公司);4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(4-N-trophenyl- α -D-glucopyranoside, PNPG, 026K1516, 美国 Sigma 公司);阿卡波糖(acarbose, 德国拜耳公司)和二甲基亚砷(DMSO, 美国 Sigma 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 RE-52A 旋转蒸发仪;水浴锅;循环水式真空泵;干燥箱;Coda 全自动酶标仪(法国 Bio-Rad 公司);HI3221 型 pH 计(HANNA);Exceed-cd-16 型纯水仪(台湾艾柯);电子天平(梅特勒-托利多仪器

有限公司);96 微孔板;各种移液枪及枪头等。

2 方法

2.1 提取物的制备 将新疆昆仑雪菊干燥花序粉碎,称取 20 g,分别用按以下提取流程制备提取物:将菊花用水提取,过滤浓缩成小体积,依次用乙酸乙酯、氯仿、正丁醇萃取,分别将 3 种萃取物和水层减压浓缩成膏并干燥,得到雪菊乙酸乙酯提取物、雪菊正丁醇提取物、雪菊总黄酮、雪菊水提物;将雪菊总黄酮按文献方法^[6]沉淀皂苷后,获雪菊中性黄酮,其提取率 14.8%。

2.2 α -糖苷酶抑制活性的筛选方法

2.2.1 α -葡萄糖苷酶活力的测定^[7-8] 酶活力单位定义:37℃,pH 6.8 条件下,每 1 min 水解底物产生 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对硝基苯酚的酶量,定义为 1 个酶活力单位(U)。

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

2.2.2 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 400,300,200,150,100,50,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别取 7 种不同浓度的 PNP 溶液各 160 μL ,加入 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 的水溶液 80 μL ,混匀,在 405 nm 下测定 A,测 6 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。

2.2.3 昆仑雪菊提取物对 α -糖苷酶抑制活性的抑制作用^[9] 测定组:将 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 112 μL ,加入 0.2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -D-葡萄糖苷酶 20 μL ,抑制剂 8 μL (待测目标产物)溶液,在 37℃ 下保温 15 min。加入 20 μL PNPG,在 37℃ 下保温 15 min 后,再加入 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 水溶液 80 μL ,于 405 nm 波长下测 A,为 A_{ti} 。

体系空白组:相对于测定组不加抑制剂和 α -D-葡萄糖苷酶,用蒸馏水作空白,为 A_b 。

未加抑制剂测试组:相对于测定组不加抑制剂,为 A_{i0} 。

未加酶空白组:相对于测定组不加 α -D-葡萄糖苷酶,为 A_{bi} 。

按下式计算目标化合物(抑制剂)对 α -D-葡萄糖苷酶活性的抑制率。

$$\text{抑制率} = (\Delta A - \Delta AE_i) / \Delta A \times 100\%$$

ΔA = 未加酶抑制剂与底物反应后的吸光度变化值($A_{i0}-A_b$); ΔAE_i = 加入酶抑制剂后与底物反应后的吸光度变化值[($A_{ti}-A_b$)-($A_{bi}-A_b$)]。

昆仑雪菊 5 种提取物对 α -糖苷酶抑制活性的抑制作用:

112 μL 磷酸钾缓冲液(pH 6.8),加入 0.2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶 20 μL ,待测样本溶液 8 μL ,37℃ 恒温 15 min 后加入 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PNPG 20 μL ,37℃ 恒温反应 15 min。再加入 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 水溶液 80 μL ,于 405 nm 波长下测 A。

3 结果

3.1 5 种昆仑雪菊提取物及阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性 从表 1 中我们得知 5 种昆仑雪菊的提取物中,雪菊总黄酮的提取率最高,为 14.8%,其他 4 种提取物的提取率和文献中同类提取物相似^[5]。从表 1 得知阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随着浓度的增加成上升趋势,存在较好的量效关系。这 5 种提取物中,雪菊乙酸乙酯提取物、雪菊正丁醇提取物、雪菊总黄酮和雪菊中性黄酮随着浓度的增加,其 α -葡萄糖苷酶的抑制作用也不断增加。但雪菊水提物随着提取物浓度的增加其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用却降低了,当其浓度大于 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,它的抑制率就变为负值,即可能在浓度比较大时雪菊水提物的抑制作用就转化为促进作用。

3.2 昆仑雪菊 5 种提取物 IC_{50} 昆仑雪菊的 5 种提取物均能抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,由表 1 知其抑制作用的强弱顺序为:雪菊中性黄酮 > 雪菊乙酸乙酯提取物 > 雪菊正丁醇提取物 > 雪菊总黄酮 > 雪菊水提物。抑制作用较强的为雪菊中性黄酮,其 IC_{50} 为 5.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验的雪菊乙酸乙酯提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用的 IC_{50} 为 12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与同类研究[4]相比,雪菊乙酸乙酯提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性较强。

4 讨论

新疆昆仑雪菊,属菊科金鸡属一年生草本植物。金鸡属在新疆主要分布于和田地区海拔 3 000 m 左右的昆仑山区。长期以来昆仑雪菊被当地居民当花茶饮用,新疆维吾尔医院也作为一种维药材应用,具有清热解毒、活血化瘀、和胃健脾之功,是具有广阔前景和研究价值的新品种。

近年来,随着高新技术在食品科学和中药现代

表1 5种CTF提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

样品	样品提取率/%	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%	IC_{50} / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
雪菊乙酸乙酯提取物	4.2	0.005	35.13	12.5
		0.01	50.81	
		0.05	67.15	
		0.075	92.89	
		0.1	104.8	
雪菊正丁醇提取物	10	0.005	26.51	139.5
		0.01	23.20	
		0.1	53.26	
		0.2	58.48	
雪菊总黄酮	14.8	0.3	107.74	163.5
		0.375	28.36	
		0.5	47.52	
		1	76.38	
		1.5	89.69	
雪菊水提取物	10	2	95.50	367.6
		0.5	36.30	
		1	14.39	
		2	3.033	
		3	5.467	
雪菊中性黄酮	3.2	4	0.7785	5.8
		0.001	30.60	
		0.005	32.62	
		0.01	42.88	
		0.05	87.26	
Acarbose	-	0.06	93.00	858.0
		0.625	47.47	
		1.25	50.33	
		2.5	74.5	
		5	84.66	
		10	90.57	

化中的应用,从药食两用植物中筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的的研究获得重视,学者们发现了许多天然的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,如杜仲槲皮素、杨梅酮、木犀草素、大豆异黄酮、大豆皂苷、茶多酚、桑叶总黄酮,以及大黄、山茶萸、赤芍、五倍子、广西血竭、五味子和虎杖等提取物。新疆特色植物昆仑雪菊成分的分离提取和提取物的降血糖作用开始受广泛关注。

在昆仑雪菊的5种提取物里,雪菊中性黄酮对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用最强。雪菊水提取物的抑制率不稳定,当浓度大于 $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,它的抑制率就变为负值,猜想可能是当浓度较小时雪菊水提取物对 α -葡萄糖苷酶的活性具有抑制作用,随着浓度的增大雪菊水提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用就转化为促

进作用,即增强 α -葡萄糖苷酶的活性。由于本实验的提取物中含有大量的脂溶性成分,因此我们采用的DMSO进行溶解,经试验并参照文献[10]确定,当DMSO所占反应体系的体积百分数小于1%时不会对 α -葡萄糖苷酶产生抑制作用。

此实验结果阿卡波糖在浓度为 $1.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的抑制率为50.33%与文献[4]中相似。本文采用 α -葡萄糖苷酶体外筛选模型,对昆仑雪菊5种提取物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行了考察,发现5种提取物均具有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,且大部分提取物的活性高于阿卡波糖。本课题组前期的动物实验结果表明雪菊提取物对糖尿病大鼠的血糖、血脂具有一定得改善作用,因此可在此基础上进行更深一步的研究开发出新的降糖药物。

[参考文献]

- [1] 杨秀芳. 虎杖中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的初步研究[J]. 中成药, 2008, 30(1): 14.
- [2] 顾觉奋. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究及应用[J]. 药学进展, 2009, 33(2): 62.
- [3] 黄元. 高寒菊科植物提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(6): 566.
- [4] 刘瑜新, 康文艺, 张东娣. 七种菊花对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 精细化工, 2009, 26(4): 351.
- [5] Duh P D, Tu Y Y, Yen G C. Antioxidant activity of water extract of harng jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) [J]. Lebensm Wiss Technole, 1999, 32(5): 269.
- [6] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 336.
- [7] 李婷. 一种用微孔板筛选 α -葡萄糖苷酶抑制剂的方法[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(10): 1128.
- [8] 彭圣明. 白杨素偶联一氧化氮供体衍生物的合成及 α -葡萄糖苷酶抑制和促血管生成活性研究[D]. 长沙: 湘潭大学, 2009.
- [9] 木合布力·阿布力孜. 新疆昆仑雪菊化学成分初步定性研究[J]. 新疆医科大学, 2010, 33(6): 628.
- [10] 赵建华. 芦笋边角料提取分离及活性研究[D]. 太原: 山西大学, 2009.

[责任编辑 聂淑琴]