

山茱萸中 α -葡萄糖苷酶抑制活性因子的筛选(I)

马庆一¹, 陈丽华^{1,2}, 杨海延¹, 王庆玲¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院 河南 郑州 450002; 2. 平顶山学院化学与化工学院 河南 平顶山 467002)

摘要: 从山茱萸中提取、分离并部分纯化得到水粗提物以及多糖、鞣质、皂甙、有机酸等组分。它们的得率分别为 9.60%、2.00%、2.40%、0.75%、4.10%。酶反应动力学检测结果表明, 除有机酸外各组分均对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用, 其中皂甙和鞣质效果较佳, 优于两倍量拜堂平。实验证实了山茱萸是天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂的良好来源, 而山茱萸鞣质和皂甙是降糖功能因子的良好候选物。

关键词: 山茱萸; α -葡萄糖苷酶抑制剂; 皂甙; 鞣质; 血糖

Screening α -Glucosidase Inhibitors from *Cornus officinalis*(I)

MA Qing-yi¹, CHEN Li-hua^{1,2}, YANG Hai-yan¹, WANG Qing-ling¹

(1. Zhengzhou Institute of Light Industry, College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou 450002, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Pingdingshan University, Pingdingshan 467002, China)

Abstract: In this experiment the crude eq-extracts and the components of polysaccharides, tannins, saponins and organic acids were obtained from *Cornus officinalis* by extraction, isolation and partial purification with yields respectively 9.60%, 2.00%, 2.40%, 0.75%, 4.10%. The results of enzymatic kinetics assays showed that all of the components have inhibitory activities against α -glucosidase except organic acids. Saponins and tannins showed better inhibition effect than double concentration of Glucobay. The experiment confirmed that *Cornus officinalis* is a good source of α -glucosidase inhibitors and *Cornus officinalis* saponins and tannins may become promising candidates for blood sugar reducing function factors.

Key words: *Cornus officinalis*; α -glucosidase inhibitor; saponin; tannin; blood sugar

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0167-04

糖尿病是严重威胁人类健康的慢性病之一, 其发病率仅次于心脑血管疾病、癌症而居第三位^[1]。近年研究发现, 餐后高血糖可能加重糖尿病病情并导致严重并发

症^[2-3]。因此, 减轻餐后高血糖在防治糖尿病, 其中特别是 型上具有重要作用。

食物中碳水化合物等在唾液和胰 α -淀粉酶作用下先

收稿日期: 2005-10-30

作者简介: 马庆一(1944-), 男, 教授, 博士后, 研究方向为保健食品功能因子和食品添加剂。

H7 脂多糖鸡卵黄抗体实现对大肠杆菌 0157:H7 的检测。

E. coli 0157:H7 的感染防治及检测一直是国内外的研究热点, 相继研究出的多种抗感染方法, 多存在制备技术要求高、特异性结合反应强度低、成本高等缺陷, 难以推广使用。本文通过制备特异性鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 替代抗血清一定程度上解决了此方面的缺憾。

参考文献:

- [1] 柯岩, 安云庆. 大肠杆菌脂多糖核心型及其检测方法[J]. 微生物学免疫学进展. 2000, 28(4): 90-94.
- [2] PANTOJA L D, VINUESA, J L, GONZALEZ D B, et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2000, 11(6): 657-73.
- [3] 宋宏新, 马娜, 程军. 抗大肠杆菌0157鸡卵黄抗体的初步研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(5): 407-409.
- [4] PATON A W, VOSS E, MANNING P A, et al. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of *Shiga toxin-producing Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells[J]. Microb Pathog, 1998(24): 57-63.

水解为寡糖,然后经小肠上皮绒毛膜刷状缘上 α -葡萄糖苷酶的作用生成单糖再进入血液。这一控制血糖生成的关键酶活性的抑制可以阻滞寡糖水解,延缓糖的吸收,躲过血糖的峰值,使其平稳且缓慢地维持在一定水平上^[4]。

山茱萸果实中含有多种糖甙、鞣质、维生素、有机酸、糖类和矿物质等有效成分,有补益肝肾、收敛补血,利尿、降血糖、血压等功效^[5-6]。高小平等对126种常用中草药进行 α -葡萄糖苷酶抑制活性筛选时,发现山茱萸水煮醇沉提取物浓度为0.28mg/ml时的抑制率高达96%,活性明显强于拜堂平^[7]。王浴铭等报道山茱萸的醇提取物对正常大鼠的血糖无明显影响,而对由肾上腺素或四氧嘧啶诱发的糖尿病模型动物有明显降血糖的作用,并认为山茱萸可能对I型糖尿病有治疗作用^[8]。罗培等采用正交设计法优化山茱萸中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取工艺,结果显示其40%乙醇提取物在体内活性最好^[9]。

总的看来,目前所报道的山茱萸降血糖的实验工作大多十分粗浅,仅仅停留在初级水平上。本课题的设计旨在系统调查山茱萸中各类化学物质对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的贡献,从而为进一步研究构效关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂和材料

ZFQ85A 旋转蒸发器 上海医械专机厂;80-1离心沉淀器 上海手术器械厂;TGL-18C高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂;85-2 磁力搅拌器 江苏中大仪器厂;ZF-C 三用紫外灯 上海康禾光电仪器有限公司;756 紫外可见分光光度计 上海分析仪器厂;QYQ 微量移液器 北京表云航空仪表有限公司。

α -葡萄糖苷酶 Sigma 公司;4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) E.Merck 公司;对硝基苯酚(PNP)仪征市鼎信化工有限公司;APD-600大孔树脂 西安树脂厂;阴离子交换树脂 郑州俐波试剂有限公司;拜糖平 郑州药店;其余试剂均为国产分析纯。山茱萸 郑州中药城。

1.2 方法

1.2.1 山茱萸中活性成分的提取

1.2.1.1 山茱萸中总物质的提取

称取烘干、粉碎过40目筛的山茱萸粗粉50g置于500ml蒸馏水中(固液比1:10, W/V)50℃下搅拌提取2h,趁热抽滤,滤渣再加水(固液比1:8, W/V)重复上述操作。所得滤液与上次合并,减压浓缩至100ml左右,先加入活性炭和硅藻土各5%(W/V)脱色,抽滤,滤液再加聚酰胺树脂(15%, W/V)放置过夜进一步脱色。抽滤,滤液浓缩至30ml,即得总物质水粗提液,冷藏,待用做组分定性检测及酶动力学测定。

1.2.1.2 山茱萸中皂甙的提取

称取上述山茱萸粗粉50g,用500ml95%乙醇^[10](固液比1:10, W/V)加热回流2h,趁热抽滤,滤渣再用95%乙醇(固液比1:8, W/V)加热回流2h,趁热抽滤,合并两次滤液。将滤液减压浓缩至浸膏状,加水定容到100ml,过滤,向滤液中滴加4%明胶至不再产生沉淀为止^[11],离心,上清液浓缩至100ml,依次用石油醚(100ml $\times$ 3)、乙醚(60ml $\times$ 3)萃取。弃去乙醚层,水层用正丁醇(100ml $\times$ 3)萃取。弃去水层,有机相减压浓缩至浸膏状。再用12ml甲醇溶解,加入100ml乙醚使沉淀完全析出,弃去上清液,沉淀用10ml水溶解。参考朱英^[12]的文献继续用大孔吸附树脂分离纯化皂甙,定性检测后,将纯组分浓缩至3ml为皂甙液,留待酶抑制动力学测定。

1.2.1.3 山茱萸中鞣质的提取^[13]

称取山茱萸粉末50g,置于带塞三角瓶内,加入1:1丙酮/水混和溶液(固液比1:5, W/V),置于暗处,室温冷浸24h,减压抽滤,滤渣继续用1:1丙酮/水混和溶液(固液比1:4, W/V)暗处冷浸24h,减压抽滤,合并两次滤液,依次用石油醚、二氯甲烷(1:1, V/V)各萃取3次,水相加入4%明胶,离心,于上清液中继续加入4%明胶至不再有沉淀生成,离心,合并沉淀物,用5倍体积的丙酮与水(1:1)混合液于水浴温度30~40℃下浸提,重复3次,浸提液减压除去丙酮,高速离心(9000r/min),所得澄清液体,定容,避光,冷藏,待进行组分定性检测及酶抑制动力学测定。

1.2.1.4 山茱萸中多糖的提取^[14]

称取山茱萸粗粉50g,加入95%乙醇(固液比1:10, W/V)加热回流2h,趁热抽滤,滤渣再用95%乙醇(固液比1:8, W/V)回流提取2h,趁热抽滤,滤渣用水(固液比1:8, W/V)在50~60℃水浴下搅拌提取2h,趁热抽滤,滤渣用水(固液比1:6, W/V)回流提取2h,趁热减压抽滤,合并两次滤液,减压浓缩,再加入聚酰胺树脂脱色过夜,减压抽滤,真空浓缩,定容,冷藏,待进行其组分的定性检测及酶抑制动力学测定。

1.2.1.5 山茱萸中有机酸的提取

称取山茱萸粗粉50g,用95%乙醇(固液比1:10, W/V)加热回流2h,趁热抽滤,滤渣中加入95%乙醇(固液比1:8, W/V)加热回流2h,趁热抽滤,合并滤液,滤液浓缩至干,用水溶解,加入4%明胶沉淀除去鞣质,至不再产生沉淀为止。离心,上清液中加入中性醋酸铅,过滤,弃去上清液,沉淀悬浮在水中,通入H₂S气体生成硫化铅沉淀并将有机酸还原,过滤,滤液置于大烧杯中,向液体中吹入压缩空气,除去过量的H₂S气体,浓缩,定性检测,再用阴离子交换树脂纯化有机酸^[15],收集最终纯化的有机酸洗脱液,真空浓缩,

定容, 冷藏, 待进行其组分的定性检测及酶抑制动力学测定。

1.2.2 山茱萸中活性成分的定性检测^[16-17]

检测多糖: α -萘酚试验(Molisch 紫环反应)。

检测鞣质: 三氯化铁试验; 明胶试验: 香草醛-盐酸试验。

检测皂甙: 泡沫试验; 醋酐浓硫酸试验(Liebrmann Burchard 反应); 氯仿-浓硫酸实验(Tschugaeff 反应)。

检测有机酸: 溴甲酚绿实验。

1.2.3 山茱萸中各成分抑制效果的测定

1.2.3.1 α -葡萄糖苷酶活性的测定^[18]

(1)在带塞的试管中加入 3ml pH6.81 的缓冲液和 0.75ml 的 PNPG(2mmol/L), 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 10min 后, 加入 15 μ l 的 α -葡萄糖苷酶(酶的浓度为 5.0mg/ml), 在 37 $^{\circ}$ C 下分别反应 2、4、6、8、10、15min 后, 以 4% Na_2CO_3 终止反应, 在 400nm 处测定其吸光度。同时选未加酶的反应液为空白, 以消除 PNPG 自身水解产生的对硝基苯酚(PNP)对测定波长下吸光度的贡献所造成的偏差。

(2)在(1)方法中, α -葡萄糖苷酶活性测定实验于室温下直接在比色皿中进行(其它皆与方法 1 同), 每 1min 读一次吸光度值并记录。

1.2.3.2 拜堂平抑制活性的测定

反应体系组成的设计结果见表 1。

表 1 拜堂平抑制活性检测反应体系的组成

Table 1 Reactant system for evaluating the inhibitory activity of Acarbose on α -glucosidase

组别	pH6.81 缓冲液(ml)	2mmol/L PNPG(ml)	5.0mg/ml 酶(μ l)	10mg/ml 拜堂平(ml)
对照组	2	0.75	0	1
样品组	2	0.75	15	1

注: 反应液中拜堂平的实际浓度为 2.67mg/ml。

将拜堂平、PNPG, 缓冲液混合置于比色皿中, 静置 10min 后加入 15 μ l α -葡萄糖苷酶, 快速激烈振荡后开始计时, 在 400nm 下每分钟读取一次吸光度值, 以不加酶的相同混合液为空白, 以消除 PNPG 和拜堂平本身对吸光度的影响。

1.2.3.3 山茱萸中各成分抑制活性的测定

反应体系见表 2, 操作同 1.2.3.2, 以反应 15min 时的吸光值为基准计算各组分的抑制率, 并与拜堂平相比较。

抑制率 = $(A_{\text{无抑制剂}} - A_{\text{抑制剂}}) / A_{\text{无抑制剂}}$

2 结果与分析

2.1 提取率

从山茱萸中提取、分离并部分纯化得到水粗提物、多糖、鞣质、皂甙、有机酸。各组分的得率分别为

表 2 各提取液抑制活性的反应体系

Table 2 Reactant system for evaluating the inhibitory activity of extracts form *Coruns officinails* on α -glucosidase

组别	pH6.81 缓冲液(ml)	2mmol/L PNPG(ml)	5.0mg/ml 酶(μ l)	稀释后 提取液(ml)
对照组	3-X	0.75	0	X
样品组	3-X	0.75	15	X

注: 各提取液干物质的实际浓度为 1.33mg/ml。

9.60%、2.00%、2.4%、0.75%、4.10%。

2.2 山茱萸中活性成分的定性检测

山茱萸中各组分的定性检测结果如表 3 所示,

表 3 山茱萸各组分的定性检测结果

Table 3 Results of qualitative analysis

实验	水粗提物	皂甙	多糖	鞣质	有机酸
α -萘酚	+	+	+	+	-
泡沫试验	+	+	-	-	-
氯仿-浓硫酸	+	+	-	-	-
醋酐-浓硫酸	+	+	-	-	-
明胶实验	+	-	-	+	-
石灰水实验	+	-	-	+	-
三氯化铁	+	-	-	+	+
溴甲酚绿	+	-	-	-	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

2.3 实验条件的确定和 α -葡萄糖苷酶活性的测定

分别计算 37 $^{\circ}$ C 和室温 26 $^{\circ}$ C 下测得的吸光度随时间的变化数值, 并共同绘制成 A~t 曲线, 如图 1。

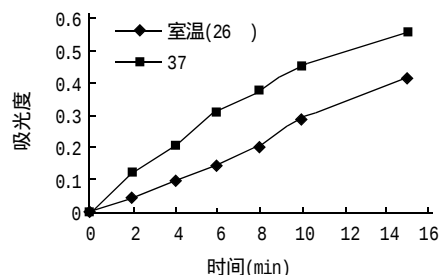


图 1 两种温度下 A~t 曲线图

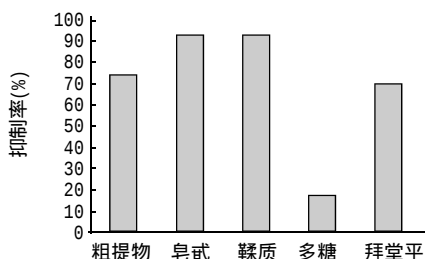
Fig.1 Effects of tempreture on the activity of α -glucosidase

从图 1 中可以看出, 虽然在两个温度下吸光度在某一特定时间点的数值以及其随时间变化曲线的斜率均随温度的升高而增加, 但两曲线的形状和变化趋势十分相像(即在同样的时间点上完成从直线到上翘弧线至平台的过渡), 仅有的差别是绝对数值的不同, 因此可以将传统的 Tremblay^[19]测定法改为在室温下比色皿中直接测定。

2.4 各组分对 α -葡萄糖苷酶活性的作用效果及其与拜堂平的比较

各组分对酶的抑制效果及与拜堂平的比较见图 2。

由图 2 实验结果说明: (1)山茱萸水粗提物对 α -葡萄糖苷酶有明显的抑制活性。其抑制率为 74.70%(室温、



图中数据为各组分浓度 1.333mg/ml, 拜堂平浓度 2.667mg/ml 时所测。

图2 各成分的抑制率图
Fig.2 Effects of extracts on the inhibitory activity of α -glucosidase

浓度为 1.333mg/ml、反应时间为 15min), 略高于两倍浓度的拜堂平(2.667mg/ml 时的抑制率 68.51%); (2) 山茱萸皂甙和鞣质是优良的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 它们的抑制率分别为 92.75% 和 94.33%, 且它们是水粗提物抑制活性的主要贡献者; (3) 山茱萸多糖具有微弱的抑制活性, 抑制率为 16.99%, 而有机酸则有些许的激活作用。这些成分的存在削弱了水粗提物的抑酶活性。

随着生活水平的提高和营养结构的改变, 糖尿病发病率愈来愈高, 而且日趋低龄化, 因此迫切需要开发出防治糖尿病的有效中药和中成药。我国中药资源丰富, 具有广泛的开发和利用前景, 本实验证实山茱萸是开发 α -葡萄糖苷酶抑制剂的良好来源, 而山茱萸鞣质和皂甙可能是降糖功能因子的良好候选物。

参考文献:

[1] 刘霞, 冯长根. 酶抑制剂在抗糖尿病药物中的应用研究[J]. 中国医

学杂志 2003, 38(2): 89-91.

- [2] 李治州, 许激扬, 陈代杰. 氧化葡萄糖酸菌转化制备米格列醇关键中间体[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 45-48.
- [3] GASTER B, HIRSCHL B. The effects of improved glycemic control on complication in type 2 diabetes[J]. Arch Intern Med, 1998, 158: 134-141.
- [4] 小野顺子. α -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 日本医学介绍, 1999, 20(1): 22-24.
- [5] 陈可冀, 等. 抗衰老中药学[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1989: 227.
- [6] 李仪奎, 等. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 36.
- [7] 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, 15(6): 536-538.
- [8] 王浴铭, 杨云, 刘翠萍. 山茱萸临床应用与药理作用[J]. 河南中医学院学报, 1999, 14(1): 61-62.
- [9] 罗培, 莫正纪. 优化山茱萸中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取工艺[J]. 华西药杂志, 2004, 19(4): 273-274.
- [10] 励建荣, 夏道宗. 山茱萸中马钱素的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002: 23(10): 45-47.
- [11] 徐勤. 鞣质的研究进展[J]. 华夏医学, 2004, 17(1): 113-115.
- [12] 朱英, 罗永明, 付小梅. 大孔树脂分离油茶皂甙和黄酮的研究[J]. 林产化学与工业, 1999(1): 40-42.
- [13] 沈忠明, 殷建伟, 袁海波, 等. 虎杖鞣质的降血糖作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 220-221.
- [14] 李平, 王艳辉, 马润宇. 山茱萸多糖提取过程研究[J]. 北京化工大学学报, 2003, 30(1): 13-16.
- [15] 杨红. 中药化学使用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [16] 北京医学院, 北京中医学院. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980.
- [17] 裴月湖. 天然药物化学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [18] 李英, 沈忠明, 杨万山, 等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及其性质研究[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 24-28.
- [19] PIERRE C, TREMBLAY R R. p-Nitrophenol- α -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen[J]. The Journal of Clinical Chemical Chemistry, 1978, 24: 208-211.



纳米微生物的发现

经过了长达 11 年锲而不舍的努力, 美国加州大学柏克莱(Berkeley)分校的科学家, 终于发现了 3 种极其微小, 几乎和较大的病毒粒子一样大小的细菌。

参与这个研究计划的科学家, 认为这个新发现的微生物, 应该是新发现属于古菌(Archaea)微生物种里的一门(phylum), 这种用现在的光学显微镜看不到的细菌, 可能已经在地球上生存了超过十亿年以上。

主要参与这个研究计划的 Brett Baker 教授表示, 能发现这个新种的微生物, 是目前技术上的一大突破, 因为这个新种的微生物, 以一般培养细菌的方式, 根本没有办法可以培育出来, 这次研究人员利用赛雷拉公司(Celera Corp)所发展随机定序(shotgun sequencing)法, 完整的拼凑出新种微生物的基因序列, 才确定这个新发现。

研究人员还表示, 这个新发现的古菌(Archaea)微生物, 存活在较酸性的排放废水中, 以及富含铁和硫化物的土壤中, 因此不排除像火星(Mars)这个环境, 也有存在的可能。