

11种中药总皂苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用研究^Δ

窦芳*, 汤海峰, 奚苗苗, 文爱东[#](第四军医大学西京医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R285;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1732-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.02

摘要 目的:研究11种常用于治疗2型糖尿病中药的总皂苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用。方法:通过体外模型试验分别测定11种抗2型糖尿病中药总皂苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率,比较其抑制作用。结果:11种抗2型糖尿病中药总皂苷中,除太子参总皂苷、知母总皂苷对 α -葡萄糖苷酶有活化作用,麦冬总皂苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶均有活化作用外,其余中药总皂苷均对2种酶有抑制作用,且太白穗木总皂苷具有较强的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用,其抑制率分别为 $(67.86 \pm 0.62)\%$ 和 $(55.31 \pm 1.23)\%$ 。结论:太白穗木总皂苷对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶具有良好的抑制作用。

关键词 总皂苷; α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶; 抗2型糖尿病

Study on Inhibitory Effect of Total Saponins of 11 TCM on α -glucosidase and α -amylase

DOU Fang, TANG Hai-feng, XI Miao-miao, WEN Ai-dong (Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of total saponins of 11 TCM for type 2 diabetes mellitus on α -glucosidase and α -amylase. METHODS: The inhibitory ratio of total saponins of 11 TCM for type 2 diabetes mellitus on α -glucosidase and α -amylase were examined by in vitro models, the inhibition was compared. RESULTS: There are 2 kinds of enzyme inhibition of total saponins of Chinese medicine, except for the total saponins of *Pseudostellaria heterophylla*, the total saponins of *Anemarrhena asphodeloides* performed inhibitory effect on α -glucosidase, and the total saponins of *Ophiopogon japonicus* performed inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase. The total saponins of *Aralia taibaiensis* performed strong inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase, with inhibitory ratio of $(67.86 \pm 0.62)\%$ and $(55.31 \pm 1.23)\%$. CONCLUSIONS: Extracts of *A. taibaiensis* show good inhibitory effect on α -glucosidase and α -amylase.

KEY WORDS Total saponins; α -glucosidase; α -amylase; Anti-type 2 diabetes mellitus

目前,中药治疗2型糖尿病及其并发症在我国有着较好的临床效果和应用前景^[1]。从药用植物中分离出的许多活性成分具有一定的抗糖尿病作用^[2],其中皂苷是一类极具潜力发展为糖尿病治疗药物的活性物质^[3]。近年来研究显示,皂苷能显著降低血糖和血浆中的甘油三酯含量^[4-5]。尽管皂苷治疗2型糖尿病已被广泛应用,但其确切的药理机制尚不清楚^[6]。一种常用于治疗糖尿病的途径是通过降低碳水化合物水解酶的活性,限制或者延缓碳水化合物在消化道内的分解,以达到延缓葡萄糖的吸收来降低餐后血糖水平。医学界已将 α -葡萄糖苷酶抑制剂列为第三类口服降糖药,如阿卡波糖。本研究选择常用于治疗2型糖尿病的11种富含皂苷的中药,对其总皂

苷的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制活性进行筛选。

1 材料

1.1 仪器

Ingenite R200 PRO型多功能全波段酶标仪(澳大利亚 Tecan 公司);JZX0005347型电子天平、KZX0002650型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);DHG-9240A型恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);KQ52000DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZFC型三用紫外分光光度计(上海康华生化仪器制造厂);RE 2000型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHA-B型恒温振荡器(上海嘉鹏科技有限公司);pHS-3C型pH计(上海雷赫兹生物科技发展有限公司)。

<http://www.chinacourt.org/html/article/200810/17/25885.shtml>

[4] 季李华. 中药知识产权保护现状分析与对策初探[J]. 南京

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81001673);陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项项目资助(No.2010ZDKG-62);陕西省自然科学基金研究计划项目资助(No.2010JQ4018)

* 药师, 硕士。研究方向: 中药活性成分及质量标准。电话: 029-84775475-8035。E-mail: doufang1@126.com

[#] 通信作者: 主任药师, 博士。研究方向: 中药药理学。电话: 029-84773636。E-mail: adwen-2004@hotmail.com

中医药大学学报: 社会科学版, 2007, 8(2): 98.

[5] 李喜全, 赵静, 牛云霄. 用仲景文化打造中医药旗舰——宛西制药企业文化建设调查[J]. 科技创新导报, 2009, 7(31): 155.

[6] 伍洪波. 近年中国药品商标申请情况与分析[J]. 中药药信息杂志, 2000, 7(1): 22.

[7] 吴杰, 冯剑波. 中医药知识产权保护的现状及对策探讨[J]. 中国药房, 2009, 20(27): 82.

(收稿日期: 2012-06-12 修回日期: 2012-10-17)

1.2 药材

三七 *Panax notoginseng*、西洋参 *Panacis quinquefolia* *folium*、茯苓 *Poria cocos*、太子参 *Pseudostellaria heterophylla*、知母 *Anemarrhena asphodeloides*、远志 *Polygalace Radix*、麦冬 *Ophiopogon japonicus*、天冬 *Asparrausi officinalis*、太白橐木 *Aralia taibaiensis*、刺五加 *Acanthopanax senticosus* 和黄芪 *Astragali Radix*, 除太白橐木外, 其余 10 种中药均于 2009 年 5 月购自西安康健医药有限责任公司, 太白橐木于 2009 年 5 月采自陕西省凤县的秦岭山脉。以上药材均经第四军医大学西京医院药剂科汤海峰教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

阿卡波糖片(杭州中美华东制药有限公司, 批号: 110915, 规格: 50 mg/片); α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶、 α -淀粉酶抑制剂、对硝基苯基 α -D-葡萄糖苷酶、齐墩果酸(美国 Sigma 公司); 还原型谷胱甘肽(日本协和公司); 麦芽糖(天津一方科技有限公司); 土豆淀粉(上海基康生物科技有限公司); 磷酸氢二钾、氢氧化钠、无水磷酸钠、氯化钠、冰醋酸、正丁醇、氯仿(分析纯, 天津市富宇精细化工有限责任公司); 香草醛(分析纯, 西安中信精细化工有限责任公司); 四水酒石酸钠钾(分析纯, 中国派尼化学试剂厂); 3,5-二硝基水杨酸(分析纯, 广州光华化学有限公司)。

2 方法

2.1 11种中药总皂苷的提取

将 11 种干燥的中药粉碎, 分别称取约 20 g, 加入 10 倍量 80% 乙醇(料液比为 1:10, *W/V*), 80 °C 回流提取 60 min, 共提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 浓缩回收乙醇。粗浸膏用蒸馏水分散, 用氯仿(1:3, *V/V*) 萃取除去脂溶性杂质, 用水饱和的正丁醇萃取 3 次(1:3, *V/V*), 合并 3 次萃取液, 用旋转蒸发器在 60 °C 下减压回收, 在 60 °C 水浴上蒸干^[7-8], 即得各中药总皂苷。

2.2 中药总皂苷的含量测定

采用香草醛-冰醋酸法^[9]。称取 0.25 g 香草醛, 置 5 ml 的量瓶中, 震荡以冰醋酸溶解并定容, 得 5% 香草醛-冰醋酸溶液, 临用前现配。将 0.2 ml 齐墩果酸、中药总皂苷和甲醇分别置 10 ml 的具塞试管中, 按顺序向每个试管中分别加入 0.2 ml 5% 香草醛-冰醋酸溶液和 0.8 ml 高氯酸溶液, 每个试管盖上塞子振摇使其混合均匀。然后, 将试管放入 60 °C 水浴中加热 15 min, 移出用流水冷却至室温。在每个试管中分别加入 5.0 ml 冰醋酸, 摇匀。于 553 nm 波长处测定吸光度(*A*)值。中药提取物中总皂苷的含量用齐墩果酸的等量物来表示(Oleanolic acid equivalents, OAE, $\mu\text{g}/\text{mg}$)。提取率(%) = 干燥提取物质量/中药药材质量。

2.3 11种中药总皂苷对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的测定

参考文献^[10]方法并稍作改动。依次取 0.2 mol/L 磷酸氢二钾(pH 6.8) 20 μl , 1 mg/ml 中药总皂苷 20 μl , 1 mg/ml 还原型谷胱甘肽 50 μl 和 1 U/ml α -葡萄糖苷酶 20 μl , 混匀后于 37 °C 孵育 10 min, 再加入 5 mmol/L 对硝基苯基 α -D-葡萄糖苷酶 50 μl , 混匀后于 37 °C 孵育 15 min, 最后加 200 mmol/L 碳酸钠 1 000 μl 终止反应, 供试品混合均匀后在 400 nm 波长处测定 *A* 值, 即在酶的作用下底物释放出的硝基酚量。平行测定 3 次, 取平均值。按下式计算中药总皂苷对 α -葡萄糖苷酶的抑制率: 抑制率(%) =

$[1 - (A_{400 \text{ nm sample}} - A_{400 \text{ nm blank}}) / A_{400 \text{ nm control}}] \times 100\%$ 。式中, $A_{400 \text{ nm sample}}$ 表示供试品的 *A* 值; $A_{400 \text{ nm blank}}$ 表示空白的 *A* 值(排除样品和酶干扰); $A_{400 \text{ nm control}}$ 表示排除样品干扰的 *A* 值。并用 Logit 法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.4 11种中药总皂苷对 α -淀粉酶抑制作用的测定

参考文献^[11]方法并稍作改动。依次取已制备 1 mg/ml 中药总皂苷 20 μl , 去离子水 180 μl , 20 U/ml α -淀粉酶抑制剂 200 μl 和 1 U/ml α -淀粉酶 200 μl , 混匀后于 25 °C 孵育 5 min, 再加入 1.0% 土豆淀粉 200 μl , 混匀后于 25 °C 孵育 3 min, 取出 100 μl 混合液加显色剂 50 μl , 混匀后于 100 °C 水浴 15 min, 最后加去离子水 450 μl 。混合均匀后在 540 nm 波长处测定 *A* 值。平行测定 3 次, 取平均值。按下式计算中药总皂苷对 α -淀粉酶的抑制率: 抑制率(%) = $(1 - A_{540 \text{ nm sample}} / A_{540 \text{ nm control}}) \times 100\%$ 。式中, $A_{540 \text{ nm sample}}$ 表示供试品的 *A* 值; $A_{540 \text{ nm control}}$ 表示排除样品干扰的 *A* 值。并用 Logit 法计算 IC₅₀。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件统计分析。试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 ANOVA 进行多组均数间统计学检验, 两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 11种中药总皂苷提取率的计算结果

三七总皂苷的提取率为 1.05%, 西洋参总皂苷的提取率为 1.06%, 茯苓总皂苷的提取率为 2.41%, 太子参总皂苷的提取率为 0.92%, 知母总皂苷的提取率为 1.50%, 远志总皂苷的提取率为 3.73%, 麦冬总皂苷的提取率为 1.18%, 天冬总皂苷的提取率为 5.67%, 太白橐木总皂苷的提取率为 0.82%, 刺五加总皂苷的提取率为 1.21%, 黄芪总皂苷的提取率为 3.65%。远志和茯苓总皂苷超声后可溶于水, 其余中药总皂苷易溶于水。各总皂苷溶液于试验前新鲜制备。

3.2 中药总皂苷的含量测定结果

三七总皂苷含量为(340.5 ± 3.98) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 西洋参总皂苷含量为(411.9 ± 4.27) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 茯苓总皂苷含量为(104.1 ± 15.89) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 太子参总皂苷含量为(321.2 ± 3.26) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 知母总皂苷含量为(332.1 ± 4.05) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 远志总皂苷含量为(221.7 ± 3.10) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 麦冬总皂苷含量为(222.9 ± 4.52) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 天冬总皂苷含量为(160.4 ± 2.06) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 太白橐木总皂苷含量为(453.7 ± 2.62) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 刺五加总皂苷含量为(420.1 ± 12.30) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 黄芪总皂苷含量为(183.5 ± 6.38) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。结果, 太白橐木提取物中总皂苷含量最高。

3.3 11种中药总皂苷对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

大部分中药总皂苷具有不同程度的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 但太子参总皂苷、知母总皂苷和麦冬总皂苷表现出对 α -葡萄糖苷酶的活化作用, 抑制率为负值。与其他中药总皂苷比较, 远志总皂苷和太白橐木总皂苷有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 抑制率分别为(45.71 ± 1.29)%、(67.86 ± 0.62)%。太白橐木总皂苷和阿卡波糖片的 IC₅₀ 分别为(0.06 ± 0.01)、(0.03 ± 0.02) mg/ml, 表明太白橐木总皂苷有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。11 种中药总皂苷(反应终质量浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对 α -葡萄糖苷酶的抑制率见图 1。

3.4 11种中药总皂苷对 α -淀粉酶的抑制作用

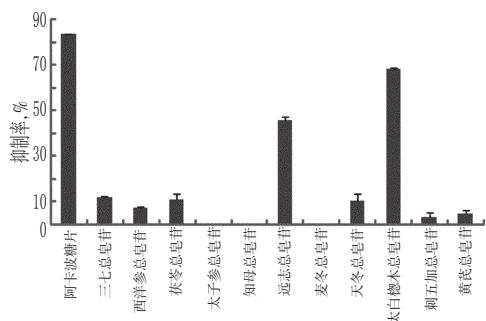


图1 11种中药总皂苷(反应终质量浓度为125 μg/ml)对α-葡萄糖苷酶的抑制率(n=5)

Fig 1 Inhibitory ratio of total saponins of 11 TCM (the final reaction concentration is 125 μg/ml) on α-glucosidase (n=5)

大部分中药总皂苷都具有不同程度的α-淀粉酶的抑制作用,但麦冬总皂苷表现出对α-淀粉酶的活化作用,抑制率为负值。与其他中药总皂苷比较,太白椴木总皂苷具有较强的α-淀粉酶抑制作用,抑制率为(55.31 ± 1.23)%。太白椴木总皂苷和阿卡波糖片的IC₅₀分别为(0.02 ± 0.03)、(0.01 ± 0.02) mg/ml。11种中药总皂苷(反应终质量浓度为25 μg/ml)对α-淀粉酶的抑制率见图2。

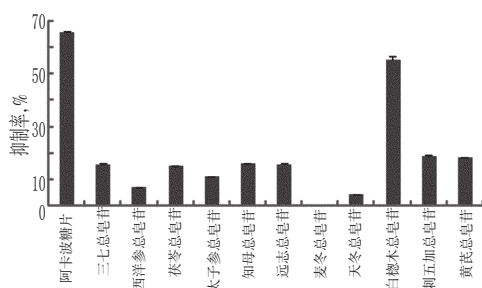


图2 11种中药总皂苷(反应终质量浓度为125 μg/ml)对α-淀粉酶的抑制率(n=5)

Fig 2 Inhibitory ratio of total saponins of 11 TCM (the final reaction concentration is 125 μg/ml) on α-amylase (n=5)

4 讨论

从11种中药总皂苷对α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的作用结果可知,大部分中药总皂苷可能含有抑制α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的活性成分。

麦冬总皂苷表现出对α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的活化作用,抑制率为负值,可初步推断麦冬可能为α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶活化剂。如果这种活化作用发生在2型糖尿病患者体内,则会加速葡萄糖产生的速度,导致血糖升高。但是,酶反应产物的增加也可能是由于麦冬总皂苷中的某些成分与酶结合,使其构象发生变化所致。中医临床常给予消渴证患者服用麦冬,但并未见太多不良反应,推测是因为酶的活化仅是糖尿病众多发病环节中的一环,麦冬可能作用于其他环节,综合作用

使得患者不显现血糖升高的效果。

在所考察的11种中药总皂苷中,太白椴木总皂苷虽然抑制率小于阿卡波糖片,但它同时具有最强的α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶抑制作用,其抑制率远高于其他中药总皂苷。因此,太白椴木总皂苷中可能含有抑制α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的活性成分,故有必要将其作为目标药物进行分离鉴定,以期发现新的活性成分。

参考文献

- [1] Xi MM, Hai CX, Tang HF, *et al.* Antioxidant and anti-glycation properties of total saponins extracted from traditional chinese medicine used to treat diabetes mellitus[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(2): 228.
- [2] Bi L, Tian X, Dou F, *et al.* New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 234.
- [3] Xi M, Hai C, Tang H, *et al.* Antioxidant and antiglycation properties of triterpenoid saponins from *Aralia taibaiensis* traditionally used for treating diabetes mellitus [J]. *Redox Rep*, 2010, 15(1): 20.
- [4] Abdel-Zaher AO, Salim SY, Assaf MH, *et al.* Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 101(1/2/3): 129.
- [5] Oishi Y, Sakamoto T, Udagawa H, *et al.* Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica charantia* saponin fraction[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(3): 735.
- [6] Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. α-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(3): 449.
- [7] 窦芳, 汤海峰, 洪良建, 等. 太白椴木中椴木总皂苷提取纯化工艺研究[J]. *西北药学杂志*, 2012, 27(2): 101.
- [8] 窦芳, 陈晓莉, 文爱东. 正交试验法优选肠泻停胶囊的提取工艺[J]. *陕西中医*, 2012, 33(12): 1 667.
- [9] 王立业, 贾强, 阎玺庆, 等. 紫外分光光度法测定七叶莲中总皂苷的含量[J]. *中国药房*, 2008, 19(12): 1 175.
- [10] Kim YM, Wang MH, Rhee HI. A novel α-glucosidase inhibitor from pine bark[J]. *Carbohydr Res*, 2010, 339(3): 715.
- [11] Yu Z, Yin Y, Zhao W, *et al.* Anti-diabetic activity peptides from albumin against α-glucosidase and α-amylase [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 2 078.

(收稿日期:2012-07-21 修回日期:2013-03-19)