

13种太白橐木皂苷单体对 α -葡糖苷酶和 α -淀粉酶活性的影响[△]

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)23-2119-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.03

摘要 目的:研究13种太白橐木皂苷单体对 α -葡糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制作用。方法:通过体外模型试验测定13种太白橐木皂苷单体对 α -葡糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率。结果:皂苷单体4、12对 α -葡糖苷酶的抑制作用较强,其半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(0.83±0.05)、(1.07±0.04) μ mol/L;皂苷单体12对 α -淀粉酶的抑制作用较强,其IC₅₀为(1.02±0.03) μ mol/L。结论:皂苷单体4、12对 α -葡糖苷酶,皂苷单体12对 α -淀粉酶均具有较好的抑制作用,可为后期试验提供一定参考。

关键词 太白橐木;总皂苷提取物; α -葡糖苷酶; α -淀粉酶;抗糖尿病

Effects of 13 Kinds of Saponin Monomer Isolated from *Aralia taibaiensis* on the Activities of α -glucosidase and α -amylase

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

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of 13 kinds of saponin monomer isolated from *Aralia taibaiensis* on the activities of α -glucosidase and α -amylase, and to discuss its hypoglycemic mechanism. METHODS: The inhibitory effects of 13 kinds of saponins monomer against the activities of α -glucosidase and α -amylase were examined using in vitro models. RESULTS: Saponin monomer 4 and 12 showed strong inhibitory effect on α -glucosidase in the inhibitory test in vitro. IC₅₀ values were (0.83±0.05) μ mol/L and (1.07±0.04) μ mol/L, respectively. Saponin 12 showed strong inhibitory effect on α -amylase with IC₅₀ of (1.02±0.03) μ mol/L. CONCLUSIONS: Saponin monomer 4 and monomer 12 show strong inhibitory effect on α -glucosidase, and inhibitory effect of saponin monomer 12 on α -amylase is the best in the all. The study can provide reference for further test.

KEY WORDS *Aralia taibaiensis*; Total saponins extract; α -glucosidase; α -amylase; Antidiabetes

本课题组前期对11种中药总皂苷进行活性筛选,结果发现在11种中药总皂苷中太白橐木总皂苷具有较强的抗糖尿病活性,因此选择太白橐木总皂苷作为重点药物进行深入研究,探讨其皂苷单体成分的药理活性^[1-2]。对前期试验所得到的太白橐木总皂苷(正丁醇萃取物)利用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶(Sephadex) LH-20柱色谱、十八烷基硅烷(ODS)反相柱色谱、Lobar柱色谱和反相高效液相色谱(HPLC)法进行分离,得到13个皂苷单体成分,通过其理化性质以及波谱学解析鉴定其化学结构。本文着重报道本课题组对这13个皂苷单体的 α -葡糖苷酶和 α -淀粉酶活性进行筛选。

1 材料

1.1 仪器

Infinite R200 PRO型多功能全波段酶标仪(澳大利亚Tecan公司);AL204 JZX0005347型电子天平、PL203 KZX 0002650型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);DHG-9240A型电势恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);KQ 52000DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZFC

[△]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资助项目(No.2010ZDKG-62);陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目(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

型三用紫外分光光度仪(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(上海赫兹生物科技有限公司)。

1.2 药材

太白橐木于2008年9月采自陕西省凤县的秦岭山脉,经第四军医大学西京医院药剂科汤海峰教授鉴定为真品。药材经提取分离得到皂苷单体用于本研究。

1.3 药品与试剂

阿卡波糖(杭州中美华东制药有限公司,批号:110915,规格:50 mg/片); α -葡糖苷酶、 α -淀粉酶、 α -淀粉酶抑制剂、对硝基苯基 α -D-糖苷酶购自美国Sigma公司;还原型谷胱甘肽(日本协合公司);麦芽糖(天津一方科技有限公司);土豆淀粉(上海永恒生物科技有限公司);磷酸氢二钾、氢氧化钠、无水磷酸钠、氯化钠购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司;冰醋酸、正丁醇、氯仿购自天津市富宇精细化工有限责任公司;香草醛(西安中信精细化工有限责任公司);四水石酸钠钾(中国派尼化学试剂厂);3,5-二硝基水杨酸(广州光华化学有限公司)。

2 方法

2.1 太白橐木皂苷成分的提取与分离

提取得到的正丁醇萃取物^[3]利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20柱色谱、ODS反相柱色谱、Lobar柱色谱和反相HPLC制备等手段进行分离^[4],从中得到13个皂苷单体。结合波谱技术确定其化学结构。

2.2 皂苷单体对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的测定

参考文献^[5]方法并稍作改动。依次取已制备的0.2 mol/L磷酸氢二钾(pH 6.8)20 μ l, 1 mg/ml样品20 μ l, 1 mg/ml还原型谷胱甘肽50 μ l和1 u/ml α -糖苷酶20 μ l, 混匀后于37 $^{\circ}$ C孵育10 min, 再加入5 mmol/L对硝基苯基 α -D-葡萄糖苷酶50 μ l, 混匀后于37 $^{\circ}$ C孵育15 min, 最后加200 mmol/L碳酸钠1 000 μ l终止反应。供试品混合均匀后在400 nm波长处测定吸光度(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。按下式计算样品对 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, $A_{400\text{ nm sample}}$ 表示样品的A值; $A_{400\text{ nm blank}}$ 表示空白的A值(排除样品和酶的干扰); $A_{400\text{ nm control}}$ 表示排除样品干扰的A值。并用Logit法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 皂苷单体对 α -淀粉酶抑制作用的测定

参考文献^[6]方法并稍作改动。依次取已制备的1 mg/ml样品20 μ l, 去离子水180 μ l, 20 u/ml α -淀粉酶抑制剂200 μ l和1 u/ml α -淀粉酶200 μ l, 混匀后于25 $^{\circ}$ C孵育5 min, 再加入1.0%土豆淀粉200 μ l, 混匀后于25 $^{\circ}$ C孵育3 min, 取出100 μ l混合液加显色剂50 μ l, 混匀后于100 $^{\circ}$ C水浴15 min, 最后加去离子水450 μ l。供试品混合均匀后在540 nm波长处测定A值。平行测定3次, 取平均值。按下式计算样品对 α -淀粉酶的抑制率: 抑制率(%) = $(1 - A_{540\text{ nm sample}} / A_{540\text{ nm control}}) \times 100$, $A_{540\text{ nm control or sample}} = A_{540\text{ nm test}} - A_{540\text{ nm blank}}$ 。式中, $A_{540\text{ nm sample}}$ 表示样品的A值; $A_{540\text{ nm blank}}$ 表示空白的A值(排除样品和酶的干扰); $A_{540\text{ nm control}}$ 表示排除样品的干扰的A值。并用Logit法计算IC₅₀。

2.4 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件统计分析, 试验数据均表示为 $\bar{x} \pm s$, 使用ANOVA进行多组均数之间差异的统计学检验, 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 化合物的结构鉴定

13种皂苷单体的结构式见图1。

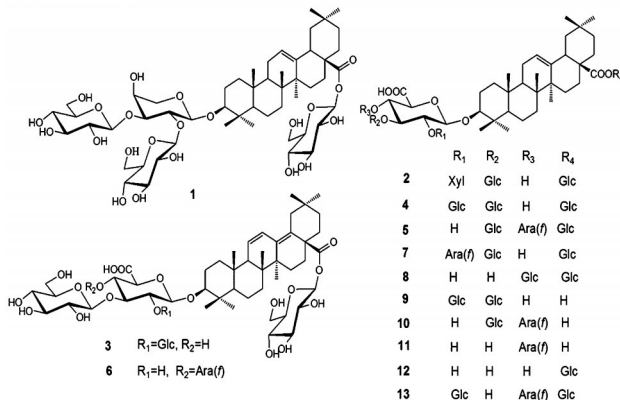


图1 13种皂苷单体的结构式

Fig 1 Structure of 13 kinds of saponin monomer

3.2 皂苷单体对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

皂苷单体4、9、12表现出不同程度的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 抑制率分别为(51.62 \pm 4.19)%、(31.58 \pm 3.11)%、(54.84 \pm

1.82)% , 可见皂苷单体12的抑制活性最强。其他皂苷单体则表现出对 α -葡萄糖苷酶的活化作用, 抑制率为负值。太白橐木总皂苷及皂苷单体对 α -葡萄糖苷酶的抑制率见图2(nd为未检测到活性)。

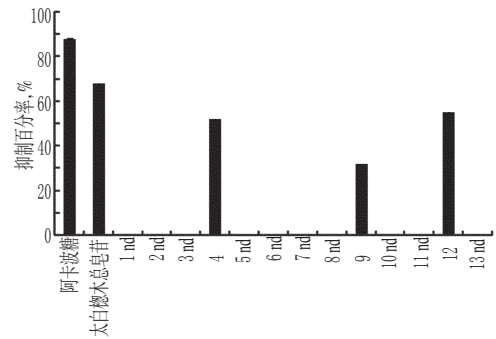


图2 太白橐木总皂苷及皂苷单体对 α -葡萄糖苷酶的抑制率(n=5)

Fig 2 Inhibitory ratio of total saponins of *Aralia taibaiensis* and saponin monomer on α -glucosidase (n=5)

3.3 皂苷单体对 α -淀粉酶的抑制作用

皂苷单体3、4、9、11、12表现出不同程度的 α -淀粉酶抑制作用, 抑制率分别为(4.32 \pm 0.46)%、(40.80 \pm 0.89)%、(35.60 \pm 3.40)%、(25.68 \pm 0.66)%、(54.54 \pm 1.34)% , 可见皂苷单体12比皂苷单体3、4、9、11的活性强, 而皂苷单体3仅表现出非常弱的抑制活性。其他皂苷单体则显示对 α -淀粉酶的活化作用, 抑制率为负值。太白橐木总皂苷及皂苷单体对 α -淀粉酶的抑制率见图3(nd为未检测到活性)。

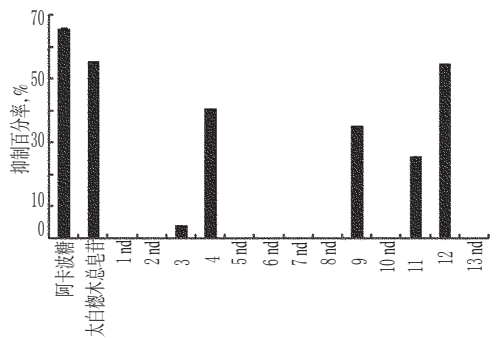


图3 太白橐木总皂苷及皂苷单体对 α -淀粉酶的抑制率(n=5)

Fig 3 Inhibitory ratio of total saponins of *Aralia taibaiensis* and saponin monomer on α -amylase (n=5)

3.4 皂苷单体4、12对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀测定

由上述试验结果可知, 皂苷单体4、12表现出不同程度的 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 且抑制率 > 50% , 故进一步研究其剂量依赖关系, 测定化合物的IC₅₀值。太白橐木皂苷和皂苷单体4、12的IC₅₀分别为(0.48 \pm 0.01) mg/ml、(0.83 \pm 0.05) μ mo/L、(1.07 \pm 0.04) μ mo/L。太白橐木总皂苷和皂苷单体12对 α -葡萄糖苷酶的抑制百分率见图4; 皂苷单体4、12对 α -葡萄糖苷酶的IC₅₀见表1。

3.5 皂苷单体12对 α -淀粉酶的IC₅₀测定

由上述试验结果可知, 皂苷单体12有较强的 α -淀粉酶抑制作用, 且抑制率 > 50% , 故进一步研究其剂量依赖关系, 测

定化合物的IC₅₀。太白橐木总皂苷、皂苷单体12的IC₅₀分别为(0.77 ± 0.03) mg/ml、(1.02 ± 0.03) μmo/L。太白橐木总皂苷和皂苷单体12对α-淀粉酶的抑制百分率见图5;皂苷单体4、12对α-淀粉酶的IC₅₀见表1。

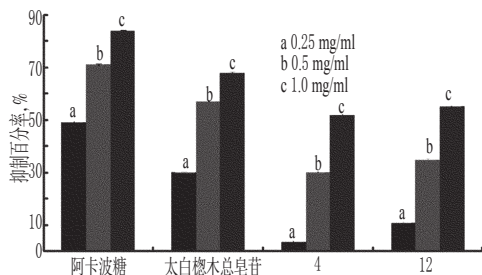


图4 太白橐木总皂苷和皂苷单体4、12对α-葡萄糖苷酶的抑制百分率(n=5)

Fig 4 Inhibitory ratio of total saponins of *Aralia taibaiensis* and Saponin monomer 4, 12 on α-glucosidase(n=5)

表1 太白橐木总皂苷和皂苷单体对α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的IC₅₀($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 IC₅₀ of of total saponins of *Aralia taibaiensis* and Saponin monomer inhibiting α-glycosidase and α-amylase ($\bar{x} \pm s, n=5$)

样品	α-葡萄糖苷酶	α-淀粉酶
阿卡波糖	0.25 ± 0.02 mg/ml	0.39 ± 0.02 mg/ml
阿卡波糖	0.38 ± 0.03 μmol/L	0.60 ± 0.03 μmol/L
太白橐木总皂苷	0.48 ± 0.01 mg/ml	0.77 ± 0.03 mg/ml
皂苷单体4	0.83 ± 0.05 μmol/L	
皂苷单体12	1.07 ± 0.04 μmol/L	1.02 ± 0.03 μmol/L

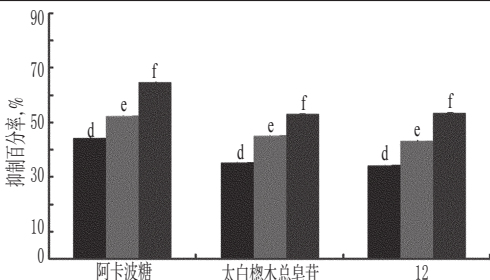


图5 太白橐木总皂苷和皂苷单体12对α-淀粉酶的抑制百分率(n=5)

Fig 5 Inhibitory ratio of total saponins of *Aralia taibaiensis* and saponin monomer on α-amylase(n=5)

4 讨论

本刊讯 2013年5月13日,国家卫生和计划生育委员会主任李斌在京会见了来访的世界卫生组织西太平洋地区主任申英秀(Shin Young-soo)。

李斌积极评价申英秀担任世卫组织西太区主任期间推动中国与世卫组织加强合作,表示愿在人感染H7N9禽流感疫情防控、医药卫生体制改革、“西部卫生行动”、主要疾病及卫生

本研究对13个皂苷单体抑制α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的活性测试结果显示,部分皂苷单体表现出不同程度的α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶活性抑制作用,其中皂苷单体4、12抑制α-葡萄糖苷酶作用较强,皂苷单体12抑制α-淀粉酶活性最强,并分别测出了这3个单体的IC₅₀。与前期试验结果相似^[7-9],太白橐木总皂苷抑制α-葡萄糖苷酶和α-淀粉酶的活性明显高于单体成分的活性。在测试中太白橐木总皂苷的药理活性均比皂苷单体的药理活性好,表明各单体成分间可能存在一定的协同抗糖尿病作用。因此,有必要进一步探讨和分析这些活性成分间的具体协同作用方式。

参考文献

- [1] 张冉, 刘泉, 申竹芳, 等. 应用α-葡萄糖苷酶抑制高通量筛选明显筛选降血糖中药[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(10): 740.
- [2] Bhandari MR, Nilubon JA, Gao H, et al. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.) [J]. *Food Chem*, 2008, 106(1): 247.
- [3] 窦芳, 汤海峰, 洪良健, 等. 太白橐木中太白橐木总皂苷提取纯化工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(2): 101.
- [4] 洪良健, 窦芳, 田向荣, 等. 橐木化学成分的研究[J]. 中南药学, 2012, 10(3): 8.
- [5] Kim YM, Wang MH, Rhee HI. A novel α-glucosidase inhibitor from pine bark [J]. *Carbohydr Res*, 2010, 339(3): 715.
- [6] 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): 2078.
- [7] 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.
- [8] 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.

(收稿日期:2012-07-21 修回日期:2013-01-08)

国家卫生和计划生育委员会主任李斌会见世界卫生组织西太区主任申英秀

安全风险应对等领域深化双方的合作关系。

申英秀赞赏中国政府的H7N9人感染禽流感疫情防控工作,建议中国继续加强疫情监测和与农业等相关部门的协调配合。申英秀表示,世卫组织西太区愿加强与中国在各个领域的合作,共同提高中国人民的健康水平。