

珍珠透骨草降血糖活性部位筛选研究

张林林, 张辉, 孙佳明

(长春中医药大学中药与生物工程研发中心, 长春 130117)

5 **摘要:** 目的: 筛选珍珠透骨草降血糖有效部位。方法: 珍珠透骨草乙醇提取物经氯仿, 乙酸乙酯, 正丁醇不同极性溶剂进行萃取得到各部位, 采用体外 α -葡萄糖苷酶及 α -淀粉酶体外抑制活性模型, 测试珍珠透骨草各萃取部位对 α -葡萄糖苷酶及 α -淀粉酶的抑制活性, 筛选并确定珍珠透骨草降血糖的有效部位。结果: 珍珠透骨草的氯仿部位 α -葡萄糖苷酶抑制作用明显强于其他极性部位, 且接近于阿卡波糖, 而各萃取部位 α -淀粉酶抑制作用明显弱于阿卡波糖。结论: 氯仿萃取部分为珍珠透骨草降血糖的有效部位。

10 **关键词:** 珍珠透骨草; α -葡萄糖苷酶; α -淀粉酶; 体外抑制; 有效部位

The screening study on hypoglycemic active site of *Speranskia tuberculata*

15 Zhang Linlin, Zhang Hui, Sun Jiaming

(Development Center of Traditional Chinese Medicine and Bioengineering, Changchun University of Chinese Medicine, ChangChun 130117)

20 **Abstract:** Purpose: Screening the hypoglycemic effective parts of *Speranskia tuberculata*. Method: The ethanol extract of *Speranskia tuberculata* is extracted successively by chloroform, ethyl acetate, n-butanol and gets the extraction sites, then uses α -glucosidase enzyme and α -amylase inhibitory activity model in vitro to test the inhibitory activity of each extraction site of *Speranskia tuberculata* on α -glucosidase enzyme and α -amylase. Screening and determining the hypoglycemic effective parts of *Speranskia tuberculata*. Result: The α -glucosidase inhibitory effect of *Speranskia tuberculata* chloroform parts is obviously stronger than other polar parts. and is close to acarbose, while the α -amylase inhibition effect of every extraction site was significantly weaker than acarbose. Conclusion: The chloroform extraction part is the hypoglycemic effective parts of the *Speranskia tuberculata*.

25 **Keywords:** *Speranskia tuberculata*; α -glucosidase; Alpha amylase; inhibition in vitro; effective fractions

0 引言

30 糖尿病是一种由于体内胰岛素绝对或相对不足而导致的葡萄糖、蛋白质、脂质代谢紊乱, 以血糖升高为基本特征的综合症^[1]。其中II型糖尿病为最常见的糖尿病类型, 占糖尿病病人的90%以上。近年来II型糖尿病患者并发冠心病、脑血管和外周血管疾病发病率显著增高, 其中80%的患者死于糖尿病心血管并发症, 随着生物技术的巨大进步, 快速、高效的体外药物活性筛选技术迅速发展, 与体内试验相比具有需要样品量少、药物作用机制较明确、可实现大规模的活性筛选及一药多筛等特点, 将为抗糖尿病的新药研发带来更多的机遇和发展空间。因此, 从资源丰富的中药中寻找高效、低毒、价廉的降血糖药物已成为该领域研究的一个重要方向。

40 本实验通过比较珍珠透骨草乙醇提取物的不同溶剂萃取部位对 α -葡萄糖苷酶及 α -淀粉酶的抑制作用, 筛选珍珠透骨草降血糖有效部位, 为合理开发中药新资源提供科学依据。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题: 应用液-质-活三维谱技术快速研究珍珠透骨草降血糖活性成分(课题编号 20102227120002)

作者简介: 张林林, (1988-), 女, 硕士研究生, 中药有效成分与应用开发研究。

通信联系人: 孙佳明, (1976-), 男, 硕士生导师, 副研究员, 中药有效成分与应用开发研究。E-mail: sun_jiaming2000@163.com

1 材料与试剂

1.1 材料

珍珠透骨草，又名地构叶，采于吉林省白城地区沙丘地带，经长春中医药大学张辉教授
45 鉴定为是大戟科地构叶属植物 *Speranskia tuberculata* (bge.) Baill.的带有根茎的干燥全草。

1.2 试剂与仪器

α -葡萄糖苷酶、淀粉酶（美国 Sigma 公司）；其余试剂均为分析纯。酶标仪（Bio-Rad）；
紫外可见分光光度计（Varian 公司）；旋转式恒温振荡器（苏州培英实验设备有限公司）；96
微孔板，各型号移液枪及枪头等。

50 2 方法与结果

2.1 珍珠透骨草对 α -葡萄糖苷酶抑制剂活性

2.1.1 阿卡波糖样品溶液的配制

精密量取阿卡波糖溶液，用二甲基亚砷溶解配成浓度分别为 350 μ g/ml,待用。

2.1.2 珍珠透骨草不同极性部位样品溶液的制备

55 取干燥的珍珠透骨草 150g，粉成粗粉（40 目），用 15 倍量 95%乙醇回流提取两次，
每次 1 小时，过滤，滤渣再用 15 倍量 70%乙醇回流提取两次，每次 1 小时，过滤，合并乙
醇液，减压回收溶剂至无醇味，用水混悬，依次用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取，萃取至各
溶剂颜色不再变化为止，回收溶剂，得氯仿膏，乙酸乙酯膏，正丁醇膏和水膏^[2-3]。

60 准确称取干膏各 0.35mg，用二甲基亚砷溶解完全，分别定量转移至 1ml 的容量瓶中，
加入二甲基亚砷至刻度，备用。

2.1.3 α -葡萄糖苷酶抑制剂作用测定

65 准确移取 5 μ l 底物、5 μ l 样品、5 μ l 的 α -葡萄糖苷酶抑制剂依次加入 96 空板中，将 96
空板置振荡器中 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，取出后向 96 空板中准确移取葡萄糖测定试剂 180 μ l，再
将 96 空板置振荡器中 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟，采用葡萄糖氧化酶法，用 Benchmark 酶标仪
(Bio-Rad)，在 490 nm 波长下测定 OD 值，以葡萄糖的生成量，计算 α -葡萄糖苷酶抑
制活性；阿卡波糖作为本法的阳性对照，同时设定空白对照是不加酶液和抑制剂，分别代之
以缓冲液和二甲基亚砷。由于粗提物本身有颜色，设阴性对照组。以缓冲液代替底物溶液，
其余操作同上。以上每个样品重复 3 次取平均值^[4-5]。酶活性抑制率(%) 计算: (阴性一样
品)/(阴性一空白) x 100%。

70 2.1.4 结果

珍珠透骨草不同极性部位的抑制活性，按 2.1.3 项下方法分别测定各极性部位的 α -葡萄
糖苷酶活性抑制率，并与阿卡波糖比较，计算各极性部分的抑制率，结果见表 1。

75

80

表 1 α -葡萄糖苷酶活性抑制率Tab. 1 Inhibition of the activity of α -glucosidase

各萃取部位	样品质量浓度 (mg/ml)	酶活性抑制率 (%)
氯仿	5	79.03
乙酸乙酯	5	69.77
正丁醇	5	57.69
水	5	32.17
阿卡波糖	5	83.02

结果显示, 珍珠透骨草各极性部位的 α -葡萄糖苷酶活性抑制的大小为: 阿卡波糖>氯仿>乙酸乙酯>正丁醇>水。氯仿部位的抑制率几乎与阿卡波糖接近, 故氯仿部位为珍珠透骨草抑制 α -葡萄糖苷酶活性的有效部位。

85

2.2 珍珠透骨草对 α -淀粉酶抑制剂活性

2.2.1 α -淀粉酶活力测定

α -淀粉酶水解淀粉为还原糖^[6-11], 3, 5-二硝基水杨酸与还原糖反应显示出红棕色, 540nm 处比色, 定量测定 α -淀粉酶的活性。参照 DNS (3, 5-二硝基水杨酸) 比色法, 反应体系: 0.3mL α -淀粉酶 37℃ 预热 5min, 加入 0.4mL 1% 的淀粉溶液在 37℃ 下反应 5min; 加入 0.5mL DNS, 沸水浴 5min 后, 取出冷却, 定容至 25mL, 540nm 下测定吸光值。

90

2.2.2 α -淀粉酶抑制作用测定

参照 2.2.1 项下方法, 在反应体系中加入不同浓度的抑制剂溶液 1mL, 阳性对照为阿卡波糖, 空白对照为不加抑制剂 (以蒸馏水补足), 其他与抑制剂管操作相同。背景对照为对应浓度的抑制剂溶液, 不加酶液 (以蒸馏水补足), 其他与抑制剂管操作相同, 其反应体系如表 1 所示。反应终止后用蒸馏水稀释定容到 25mL, 于波长 540nm 处测其吸光值。抑制剂对 α -淀粉酶的抑制率: 抑制率 = $(1 - A_{00}/A_{01}) \times 100\%$, $A_{00} = A_3 - A_4$, $A_{01} = A_1 - A_2$ 式中 A_1 , A_2 , A_3 , A_4 分别为 540 nm 处空白管、空白对照管、抑制剂管和背景对照管的吸光值。

95

100

表 2 α -淀粉酶活性抑制体系表Tab. 2 The activity of α -amylase inhibitory system

	酶液 (ml)	抑制剂 (ml)	淀粉溶液 (ml)	DNS (ml)
空白管	0.3	—	0.4	0.5
空白对照管	—	—	0.4	0.5
抑制管	0.3	1	0.4	0.5
背景对照管	—	1	0.4	0.5

2.2.3 实验结果

珍珠透骨草不同极性部位的抑制活性, 按 2.2.3 项下方法分别测定各极性部位的 α -淀粉酶活性抑制率, 并与阿卡波糖比较, 计算各极性部分的抑制率结果见表 3。

105

表 3 α -淀粉酶活性抑制率Tab. 3 Inhibition of α -amylase enzyme activity

各萃取部位	样品质量浓度 (mg/ml)	酶活性抑制率 (%)
氯仿	20	16.54
乙酸乙酯	20	18.78
正丁醇	20	11.37
水	20	22.48
阿卡波糖	20	75.32

110 结果显示, 珍珠透骨草各极性部位的 α -淀粉酶活性抑制的大小为: 阿卡波糖>水>乙酸乙酯>氯仿>水。各个部位的抑制率与阿卡波糖差距很大, 因此各极性部位对 α -淀粉酶活性抑制不明显。

3 讨论

115 中国人的传统饮食当中以淀粉为主, 其代谢除了与 α -葡萄糖苷酶密切相关, 也必然涉及 α -淀粉酶的作用, 本实验对传统中药珍珠透骨草进行提取, 考查各不同极性部位 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性, 以筛选其降血糖活性部位。

120 初步筛选结果表明, 珍珠透骨草各极性部位对 α -葡萄糖苷酶均有一定的抑制的活性, 其中氯仿部位的活性最强, 与阿卡波糖相当。而珍珠透骨草不同极性部位对 α -淀粉酶的抑制活性较弱, 均明显弱于阿卡波糖。因此, 氯仿部位为珍珠透骨草降血糖活性部位, 其化学成分还需进一步深入研究。

[参考文献] (References)

- 125 [1]吴酬飞,许杨,李燕萍. α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2008,35(1):9-12.
[2]王丹,孙佳明,王贵金,等. 紫外分光光度法测定珍珠透骨草中总黄酮的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2007, (6) :61.
[3]索金红,伊勋非. 珍珠透骨草的化学成分及药理作用[J]. 内蒙古民族大学学报,2009,24(5):506-508.
[4]陈海敏,严小军,林伟. α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物的研究进展[J]. 海洋科学,2005,29 (11) : 73-76.
[5]李英,张兰,杨万山,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选和初步研究[J]. 上海大学学报(自然科学版),2000 ,6 (2) :129 - 132.
130 [6]朱晓薇,张银玲,张华等. 刺山柑提取物不同极性部位的降血糖作用研究[J]. 食品科技. 2011,36(1):154-156.
[7]赵修南,贾启燕,单俊杰. α -淀粉酶抑制剂筛选方法的优化[J]. 国际药学研究杂志. 2008,35(5):321-324.
[8]陈浙江,袁萍,叶晓平. 治疗糖尿病常用中药对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性研究[J]. 中成药. 2008,30(11):1661-1664
[9]王斯慧,白银花,黄琬凌. 苦荞黄酮对 α -淀粉酶的抑制作用研究[J]. 食品工业. 2012,48(3):109-111.
135 [10]王斯慧,黄琬凌,陈庆松. 芦丁、槲皮素对 α -淀粉酶抑制活性研究[J]. 食品与发酵科技. 2012,48(3):34-37.
[11]刘文虎,王斯慧,曾凡骏. 葛根、桑叶、山药 3 种天然产物对 α -淀粉酶抑制作用研究[J]. 食品工业. 2012,33(10):110-112.