

阔叶五层龙根提取物对 α -糖苷酶抑制活性的研究

原 源¹, 黄光辉^{2,4}, 李 霞², 王 燕³, 孙连娜² (1. 解放军第85医院, 上海 200052; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 福建卫生职业技术学院药理学系, 福建 福州 350101; 4. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的 研究阔叶五层龙根各提取物体外 α -糖苷酶抑制活性。方法 将阔叶五层龙根80%乙醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 得到4个不同极性部位, 并对80%乙醇总提取物与4个不同极性部位进行 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶体外抑制活性筛选。结果 阔叶五层龙根各提取物均具有一定的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶体外抑制活性, 其中对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性大小: 正丁醇部位 > 石油醚部位 > 乙酸乙酯 > 总提取物; 对 α -淀粉酶的抑制活性大小: 石油醚部位 > 正丁醇部位 > 总提取物 > 乙酸乙酯部位。结论 阔叶五层龙根各提取物均具有较好的 α -糖苷酶抑制活性和很好的开发价值。

[关键词] 阔叶五层龙; α -糖苷酶; 抑制活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)03-0185-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.03.006

α -Glucosidase inhibitory activity of extracts from roots of *Salacia amplifolia* Merr. ex Chun F. C.

YUAN Yuan¹, HUANG Gang-hui^{2,4}, LI Xia², WANG Yan³, SUN Lian-na² (1. The 85th hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Fujian Health college, Fujian Fuzhou 350101, China; 4. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To investigate different extracts of *Salacia amplifolia* Merr. ex Chun F. C. on inhibitory activity to α -glucosidase. **Methods** The 80% aqueous ethanol extracts from roots of *S. amplifolia*, which were partitioned sequentially with petroleum ether, EtOAc and n-BuOH respectively to yield four different fractions. And the inhibitory activity of these five extracts for the α -glucosidase and α -amylase were determined by *in vitro* experiments. **Results** Five kinds of extracts showed moderate inhibitory activity at the same time and close to acarbose to a certain degree. Inhibitory activity of α -glucosidase were, n-BuOH fraction > petroleum ether fraction > EtOAc fraction > total fraction. The inhibitory of α -amylase activity followed by petroleum ether fraction > n-BuOH fraction > total fraction > EtOAc fraction, respectively. **Conclusion** The extracts from *S. amplifolia* had good inhibitory activity on α -glucosidase, which could be exploited the diabetes drugs as α -glucosidases inhibitors in future.

[Key words] *Salacia amplifolia*; α -glucosidase; inhibitory activity

餐后高血糖症是2型糖尿病患者的重要症状^[1,2],对 α -糖苷酶的抑制可以有效缓解2型糖尿病病人餐后的高血糖症状。阿卡波糖(acarbose,拜唐平)、伏格列波糖(倍欣)等控制和调节 α -糖苷酶活性的药物已在临床得到广泛应用。但目前临床应用的 α -糖苷酶抑制剂品种太少,没有更多的选择余地,且阿卡波糖会引起某些不良反应,如胃肠道不适(气胀、腹痛、腹泻)等。因此,从中药或天然产物中寻找高效低毒的 α -糖苷酶抑制剂已成为近年国际

研究热点^[3-6]。

阔叶五层龙(*Salacia hainanensis* Chun et How)为翅子藤科(Hippocrateaceae)五层龙属(*Salacia*)植物,又名海南桫欏木,为攀缘灌木,主要分布于海南各地,为海南特有植物^[7,8]。阔叶五层龙在民间用其根入药,具有通经活络、祛风除湿的作用,用于风湿性关节炎、腰肌劳损、体虚无力的治疗。目前国内对该植物的降血糖作用已有少量报道^[9,10],但是主要集中在体内的研究,为此,笔者通过两种 α -糖苷酶体外抑制模型,对阔叶五层龙根不同极性提取物进行系统的降糖活性筛选,为进一步研究与开发阔叶五层龙提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂 酶标仪(Biocell 2010, BIO-

[基金项目] 上海科委资助课题(08DZ1971503);上海市卫生局局级科研项目(2011年度第64项)。

[作者简介] 原 源(1974-),女,博士。Tel:(021)8118319, E-mail: yuanbol22@163.com。

[通讯作者] 孙连娜。Tel:(021)81871308, E-mail: sssnmr@yahoo.com.cn。

RAD), 低速离心机(Sigma), 恒温水浴锅(DK-8D, 上海精宏实验设备有限公司); 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)(Sigma); 葡萄糖检测试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司); 阿卡波糖(Bayer AG, Wuppertal, German); α -淀粉酶(Wako Pure Chemicals Ind., Ltd., Osaka, Japan); 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物 雄性 Wistar 大鼠, 300 ~ 350 g(第二军医大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(沪)2007-0003, 等级: 清洁级)。

1.3 药材 阔叶五层龙药材采自海南省兴隆县, 经第二军医大学生药教研室张汉明教授鉴定为翅子藤科五层龙属植物阔叶五层龙(*Salacia hainanensis* Chun et How)的干燥根, 标本存放于第二军医大学生药教研室。

2 实验方法

2.1 阔叶五层龙根各提取物的制备 阔叶五层龙根粉碎后取 1.0 kg, 用 3 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次, 提取液减压浓缩后, 取 1/5 浓缩至干, 即得阔叶五层龙根总提取物。另 4/5 加适量水混悬后, 依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 得到石油醚部位、乙酸乙酯萃取部位、正丁醇部位和剩下的水部位。取上述得到的阔叶五层龙根 5 种提取物用少量二甲亚砜溶解(DMSO)溶解, 用磷酸缓冲液(PBS)配成 0.5 g/ml 的供试溶液, 置 4 °C 冰箱备用。

2.2 α -葡萄糖苷酶活性测试 将大鼠禁食 24 h 后, 断头处死, 立即取出上端小肠 20 g, 用 4 °C 预冷的生理盐水冲洗 2 次, 翻转小肠后再漂洗, 将洗净的小肠置于冰台上, 用滤纸擦干小肠上的黏液, 用载玻片轻刮下小肠黏膜。将刮取物按约 1 : 10 加入 4 °C PBS(pH = 6.8), 在冰浴上匀浆, 4 °C 离心(4 000 r/min) 30 min。取上清液(即酶液)分装于 -20 °C 保存备用。以 pNPG 为底物, 用 96 孔细胞培养板, 设 8 个组, 分别为酶活性对照组(缓冲液 + 底物 + 酶液)、空白对照组(缓冲液 + 底物)、阳性对照组(阿卡波糖 + 缓冲液 + 底物 + 酶液)、5 个样品测定组(样品 + 缓冲液 + 底物 + 酶液), 每组 6 个复孔。操作方法为: 预先往板孔里加入 25 μ l 样品溶液(用 0.1 mol/L, pH = 7.0 磷酸缓冲液稀释), 然后加入 25 μ l 30 mmol/L 的蔗糖溶液, 37 °C 温孵 10 min, 加入酶提取液 50 μ l, 样品的终浓度为 556 μ g/ml, 37 °C 温孵 20 min, 加入 160 μ l 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止酶反应。采用葡萄糖氧化酶法, 在 405 nm 波长下测定吸光度(A), 样品对酶活性的抑制率(%)按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_{\text{酶活性对照}} - A_{\text{样品}})}{(A_{\text{酶活性对照}} - A_{\text{空白对照}})} \times 100\%$$

2.3 α -淀粉酶活性测试 用 96 孔细胞培养板, 设 7 个组, 分别为空白对照组(蒸馏水)、阳性对照组(阿卡波糖)、5 个样品测定组, 每组 6 个复孔。操作方法为: 预先往板孔里加入 25 μ l 样品溶液, 空白对照组加等量蒸馏水, 分别于其中三个孔加入 12.5 μ l α -淀粉酶溶液, 另三个孔加 12.5 μ l 蒸馏水, 37 °C 温孵 10 min, 然后于每个孔加入 12.5 μ l 淀粉溶液, 37 °C 温孵 10 min, 分别于各孔加入 500 μ l 显色试剂终止反应, 在 630 nm 波长下测定吸光度(A), 吸光度所反映的是被酶水解的淀粉的量, 直接反映淀粉酶的活性。抑制率(%)计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - \frac{(A_{\text{样品不加酶}} - A_{\text{样品加酶}})}{(A_{\text{空白对照不加酶}} - A_{\text{空白对照加酶}})}] \times 100\%$$

3 结果

3.1 阔叶五层龙根提取物 α -葡萄糖苷酶抑制活性 在同一质量浓度(556 μ g/ml)下, 将阳性对照药阿卡波糖的抑制率记为 100%, 阔叶五层龙根不同提取物的正丁醇萃取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用最强, 抑制率达到 113.16%; 其次, 石油醚萃取物也表现出较强的抑制作用, 抑制率为 102.63%, 这两种提取物的抑制活性都高于阳性对照阿卡波糖(acarbose)组。阔叶五层龙根 5 个不同提取物 α -葡萄糖苷酶的抑制活性大小依次为: 正丁醇部位 > 石油醚部位 > 乙酸乙酯 > 总提取物, 结果见表 1。

表 1 阔叶五层龙根不同提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性(n = 5)

名称	浓度(μ g/ml)	抑制率(%)
总提取物	556	46.05
石油醚部位	556	102.63
乙酸乙酯部位	556	72.37
正丁醇部位	556	113.16
水部位	556	0
阿卡波糖	556	100

3.2 阔叶五层龙根提取物 α -淀粉酶抑制活性 在同一质量浓度(556 μ g/ml)下, 将阳性对照药阿卡波糖的抑制率记为 100%, 阔叶五层龙根不同提取物对 α -淀粉酶具有一定的抑制活性, 各溶剂提取物对 α -淀粉酶抑制活性大小依次为: 石油醚部位(90.62%) > 正丁醇部位(73.44%) > 总提取物(56.25%) > 乙酸乙酯部位(10.39%), 结果见表 2。可见阔叶五层龙不同溶媒提取物对 α -淀粉酶抑制活性有一定的差别。(下转第 237 页)

2.4 提高药品余液的监管力度,严防药品使用漏洞

加大麻醉药品和精神药品余液的回收、处置力度,建立有效监控措施,防止因药品余液监管不力而导致的药品流失隐患。具体的做法包括建立完善的实验室记录,要求详细注明药品的使用种类和数量;规范麻醉药品和精神药品残余量处置记录,并要求上述两个记录在特殊药品的使用种类和数量上能统一一致。另外,实验室回收和销毁麻醉药品应由两人共同完成,并及时在记录上双签名备案。

2.5 采用信息化手段,提升麻醉药品和精神药品管理效率

采用信息化方式管理药品已是比较成熟的管理手段。目前各级医疗机构对麻醉药品和精神药品的管理大都采用计算机化管理,这种管理手段可以直观地了解到特殊管理药品在本医疗机构内流转的顺序、位置等详细信息,减少人员的工作量,显著提升管理的准确性,而且采用信息化的管理手段也可有效杜绝麻醉药品和精神药品管理的漏洞,提高管理的效率。实验室也可以借鉴医疗机构麻醉药品和精神药品的计算机管理经验和方法,结合实验室

药品使用的特点和流程,开发出一套科学规范的药品管理程序,并在程序运行过程中,根据实际情况不断调整程序,以建立完善的信息化管理药品的制度。

3 结语

麻醉药品管理和精神药品管理是一项长期而细致的工作,要使得实验室麻醉药品和精神药品的管理和使用步入科学化、规范化的道路,采用专人管理,对实验室人员进行安全管理的教育,不断加大检查和监督力度,引入信息化手段提高管理效率等做法尤为重要。可见,只有通过实验室人员在实践中探索新方法、新措施,才能把把麻醉药品、第一类精神药品的管理工作推向一个新高度。

【参考文献】

[1] 吴蓬,杨世明.药事管理学[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2007:166.

[收稿日期] 2012-11-19

[修回日期] 2012-12-25

(上接第186页)

表2 阔叶五层龙根不同提取物对 α -淀粉酶的抑制活性($n=5$)

名称	浓度($\mu\text{g/ml}$)	抑制率(%)
80%乙醇提取物	556	56.25
石油醚萃部位	556	90.62
乙酸乙酯部位	556	10.39
正丁醇部位	556	73.44
水部位	556	3.13
阿卡波糖	556	100

4 小结

上述实验研究表明阔叶五层龙根总提取物具有一定的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制活性。同时四个不同极性的萃取部位的酶抑制活性筛选结果显示,正丁醇部位和石油醚部位对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶都表现出较强的抑制作用,乙酸乙酯部位对 α -葡萄糖苷酶也表现出部分抑制作用。因此,结合两种体外 α -糖苷酶抑制活性研究,初步明确阔叶五层龙根活性部位是正丁醇部位、石油醚部位及乙酸乙酯部位,为下一步活性成分分离提供参考,并为进一步阐明阔叶五层龙根的药效物质基础奠定基础。

【参考文献】

[1] Lraj H, Vida R. Chronic complications of diabetes mellitus in newly

diagnosed patients[J]. Int J Diabetes Mell, 2010, 2(1): 61.

[2] Mohamed A, Barra R, Naziaa U, et al. Cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Diabetes Mell, 2011, 3(2): 181.

[3] Kim KY, Nama KA, Kurihara H, et al. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(16): 2820.

[4] Ortiz-Andrade RR, García-Jiménez S, Castillo-España P, et al. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 109(1): 48.

[5] Mbaze LM, Poumale HM, Wansi JD, et al. α -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae)[J]. Phytochemistry, 2007, 68(5): 591.

[6] Huang YN, Zhao YL, Gao XL, et al. Intestinal α -glucosidase inhibitory activity and toxicological evaluation of *Nymphaea stellata* flowers extract[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(2): 306.

[7] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第46卷, 北京: 科学出版社, 1981, 46: 6.

[8] 广东省植物研究所. 海南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977, 443.

[9] 郭澄, 张纯. 国外植物药治疗糖尿病的研究进展[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1997, 19(3): 51.

[10] 袁干军, 田育望, 王志琪. 阔叶五层龙根乙醇提取物的降血糖作用[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(4): 253.

[收稿日期] 2013-01-31

[修回日期] 2013-04-27