紫甘薯茎叶中绿原酸及异绿原酸对α-葡萄糖苷酶的抑制作用

刘雪辉[1]，李觅路[1]，谭斌[2]，陈惠衡[1]，陆英[1,2]
（1.湖南农业大学园艺园林学院，湖南长沙 410128）
（2.国家植物功能成分利用工程技术研究中心，湖南长沙 410128）

摘要：本实验通过高速逆流色谱从紫甘薯茎叶中制备分离得到绿原酸（1）、4,5-O-咖啡酰基奎宁酸（2，异绿原酸C）、3，5-O-咖啡酰基奎宁酸（3，异绿原酸A）及3,4-O-咖啡酰基奎宁酸（4，异绿原酸B）等四个高纯度天然化合物，并以4-硝基酚-α-D-吡喃葡萄糖苷（PNPG）为底物分别测定了四个化合物及紫甘薯茎叶提取物对α-葡萄糖苷酶的抑制作用。结果显示上述4个化合物及紫甘薯茎叶粗提物抑制α-葡萄糖苷酶的IC_{50}值分别为：7.556 μg/mL、1.419 μg/mL、0.209 μg/mL、9.339 μg/mL和5.371 μg/mL，均远远低于阳性对照阿卡波糖的IC_{50}（355.4 μg/mL），而进一步的酶抑制反应动力学分析结果显示化合物及提取物对α-葡萄糖苷酶表现为竞争性抑制类型。试验表明紫甘薯茎叶提取物具有显著的α-葡萄糖苷酶抑制作用，为甘薯茎叶资源作为降糖保健品或药品开发提供理论依据。

关键词：紫甘薯茎叶；绿原酸；异绿原酸；α-葡萄糖苷酶；抑制作用
文章篇号：1673-9078(2014)3-103-107

Inhibitory Effects of Chlorogenic Acid and Isochlorogenic Acid from Purple Sweet Potato Leaves on α-glucosidase

LIU Xue-hui[1], LI Mi-Lu[1], TAN Bin[2], CHEN Hui-heng[1], LU Ying[1,2]
(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2.National Research Center of Engineering Technology For Utilization of Functional Ingredients From Botanicals, Changsha 410128, China)

Abstract: Chlorogenic acid (1), 4,5-O-caffeoylquinic acid (2), 3,5-O-caffeoylquinic acid (3) and 3,4-O-caffeoylquinic acid (4) were isolated and prepared from purple sweet potato leaves by high speed counter-current chromatography (HSCCC). Then the inhibitory effect of these compounds and crude extract of sweet potato leaves on α-glucosidase were examined by using PNPG as substrate. The results indicated that four compounds and crude extract of sweet potato leaves exhibited certain inhibitory effects on α-glucosidase, with IC_{50} value of 7.556 μg/mL, 1.419 μg/mL, 0.209 μg/mL, 9.339 μg/mL and 5.371 μg/mL, respectively, which were far less than the positive control acarbose (IC_{50} 355.4 μg/mL). In addition, the kinetic analysis showed the inhibitory effects of the four compounds on α-glucosidase were competitive, and the *Ki* were 27.18 μg/mL, 2.06 μg/mL, 8.42 μg/mL and 19.58 μg/mL, respectively. Therefore, sweet potato leaf extract has significant α-glucosidase inhibition, and could provide a theoretical basis for sweet potato leaves as a resource of hypoglycemic drug development or health care.

Key words: stems and leaves of sweet potato; chlorogenic acid; isochlorogenic acid; α-glucosidase; inhibition

世界卫生组织2011年的统计表明，全球的糖尿病患者已经达到3.66亿人，其中绝大多数属II型糖尿病。现代流行病研究表明，餐后高血糖是葡萄糖耐受受损（IGT）病人发展为II型糖尿病的重要因素，与糖尿病大血管、微血管并发症的发生与发展均有密切关系，且餐后高血糖较空腹高血糖对糖尿病并发症的发生和发展影响更大[1]。因此，降低餐后血糖是预防糖尿病，减少其并发症，降低死亡率的重要举措之一。

α-葡萄糖苷酶抑制剂通过竞争性抑制小肠上段α-葡萄糖苷酶活性，选择性地抑制碳水化合物分解为葡萄糖，从而避免餐后血糖骤然升高，而不影响蛋白质和脂肪的吸收，引起了许多国内外学者极大的兴趣[2-3]。目前被批准用于临床治疗糖尿病的α-葡萄糖苷酶抑制剂主要有阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇等，该类药物的研究成功，为糖尿病口服降糖药物治疗开辟了一个新的途径，已被第3次亚太地区糖尿病治疗药物指南推荐为餐后降血糖的一线药物[4~5]。然而，这些药物具有引发腹泻、肠鸣、腹痛等消化道症状的副作用，

收稿日期：2013-11-04
基金项目：湖南省科技厅资助（2012NK3088）
通讯作者：陆英（1970-），女，博士，副教授，主要从事天然产物开发与利用

并有少量诱发肾脏肿瘤、急性肝损伤和急性肝炎的报道[6-7]。此外，这些药物价格昂贵，一定程度上限制了其临床应用。

近年来，因此人们不断从天然产物中发现多个α-葡萄糖苷酶抑制剂，包括多糖、生物碱类、黄酮类、酚类等[8~12]，开发高效、低毒的天然植物源α-葡萄糖苷酶抑制成为人们关注的热点之一。我国及东南亚民间长期流传着用甘薯茎叶预防和治疗糖尿病的风俗。现代药理研究进一步表明，甘薯茎叶乙醇提取物具有中等程度促进大鼠胰岛素的释放，降低血糖水平和葡萄糖-6-磷酸酶的活性的作用[13]。为进一步探寻甘薯茎叶的降血糖作用及其机理机制，课题组通过高速逆流色谱（HSCCC）法从紫甘薯茎叶中的制备分离得到绿原酸、4,5-O-咖啡酰基奎宁酸、3,5-O-咖啡酰基奎宁酸及3,4-O-咖啡酰基奎宁酸四个高纯度化合物，并进一步研究了这四个化合物及紫甘薯茎叶提取物对α-葡萄糖苷酶的抑制作用，为甘薯茎叶资源作为降糖保健品或药品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

α-葡萄糖苷酶、酵母，Sigma公司；拜唐平，北京拜耳医药保健有限公司；对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷PNPG，Sigma公司；对硝基酚 PNP（分析纯），天津科密欧化学试剂有限公司；D101树脂，南开大学化工厂；乙酸乙酯、正己烷、乙醇（分析纯），天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

UV-2600紫外可见分光光度计，尤尼柯（上海）仪器有限公司；LC-20AT高效液相色谱，日本岛津公司（配有SPD-M20A检测器）；WondasilTM C18色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；TBE-300A型高速逆流色谱仪（柱体积280 mL，柱内径1.6 mm，配有TBD-2000紫外检测器、TBP-50A恒流泵），中国上海同田生化技术有限公司；LX-300恒温器，北京长流科技仪器公司。

紫甘薯（川山薯）茎叶，于2012年10月上旬采自湖南农业大学园艺园林学院甘薯基地，置60 ℃烘干。

1.2 实验方法

1.2.1 高效液相色谱（HPLC）条件

采用梯度洗脱，A：水（0.2%磷酸），B：乙腈。

洗脱程序：0→25 min（B:12%→25%），20→40 min（B:25%→55%），流速1 mL/min，检测波长326 nm，柱温35 ℃。

1.2.2 紫甘薯提取物的制备

称取200 g粉碎的甘薯茎叶，用60%乙醇在80 ℃的水浴锅中回流提取1 h，料液比1:10，共提取2次，合并提取液，55 ℃真空浓缩回收乙醇至无醇味，稀盐酸调pH 3后抽滤，滤液以3 BV/h流速通过装有500 mL AB-8大孔吸附树脂的层析柱（4.5×50 cm），吸附完毕后水洗至颜色较浅，再用3000 mL 60%乙醇以3 BV/h流速洗脱，洗脱液浓缩至小体积，冷冻干燥得紫甘薯茎叶提取物2.8 g。

1.2.3 紫甘薯中绿原酸及异绿原酸的制备

采用本课题组建立的HSCCC制备分离甘薯茎叶中绿原酸及异绿原的方法[14]，即以正己烷-乙酸乙酯-无水乙醇-水（0.5%乙酸）（1:5:2:4，*V/V*）为溶剂系统，上相为固定相，下相为流动相，流速2 mL/min，转850 r/min，从紫甘薯茎叶提取物制备分离得到绿原酸（1）、4,5-O-咖啡酰基奎宁酸（2）、3,5-O-咖啡酰基奎宁酸（3）及3,4-O-咖啡酰基奎宁酸（4）4个化合物。

1.2.4 样品对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

参照文献方法[15~16]进行，以对硝基苯基-α-D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物测定样品对α-葡萄糖苷酶的抑制作用。反应体系为：在2.0 mL 0.2 mol/L磷酸缓冲盐（pH 6.8）溶液中加入样品溶液0.1 mL，还原型谷胱甘肽（1 mg/mL）50 μL，α-葡萄糖苷酶（0.57 U/mL）0.1 mL，混合后37 ℃水浴15 min，加入PNPG（20 mmol/mL）0.2 mL，37 ℃水浴加热15 min，再加入10 mL Na_2CO_3（0.1 mol/L）终止反应，在400 nm波长下测定吸光值，每个浓度重复5次。以阿卡波糖为阳性对照，按下式计算抑制率：

$$酶活性抑制率（\%）=[A_{空白}-(A_{样品}-A_{背景})]/A_{空白}\times 100$$

注：$A_{空白}$：无样品加入反应的吸光值；$A_{样品}$：加入样品反应的吸光值；$A_{背景}$：无酶液加入的吸光值。

1.2.5 酶抑制反应动力学分析

在其他反应条件一定，改变底物浓度（20、15、10、5 mmol/mL），添加或不添加样品的条件下，测定酶促反应速度，以1/V对1/[S]作图，得到Lineweaver-Burk曲线，确定抑制类型。

2 结果与分析

2.1 HSCCC 制备分离紫甘薯茎叶中的绿原酸类化合物

紫甘薯茎叶提取物的HSCCC分离见图1，通过HSCCC从该提取物中制备分离得到4个化合物，根据文献[14]确定为：3-O-咖啡酰基奎宁酸（1，绿原酸），4, 5-O-双咖啡酰基奎宁酸（2，异绿原酸C），3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸（3，异绿原酸A），3,4-O-双咖啡酰基奎宁酸

（4，异绿原酸B），纯度均大于94%。

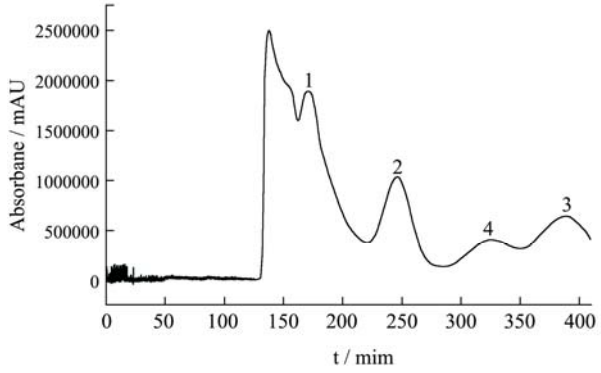


图 1 紫甘薯茎叶中绿原酸及异绿原酸的 HSCCC 分离图谱

Fig.1 HSCCC chromatogram of chlorogenic acid andisochlorogenic acid from sweet potato leaves

2.2 紫甘薯茎叶提取物的 HPLC 分析

经1.2.2制备方法获得的紫甘薯茎叶提取物的HPLC图见图2。根据标准曲线计算该提取物中化合物1、2、3和4的含量分别为9.95%、5.80%、6.94%和3.24%，即绿原酸类化合物的总量为25.83%。

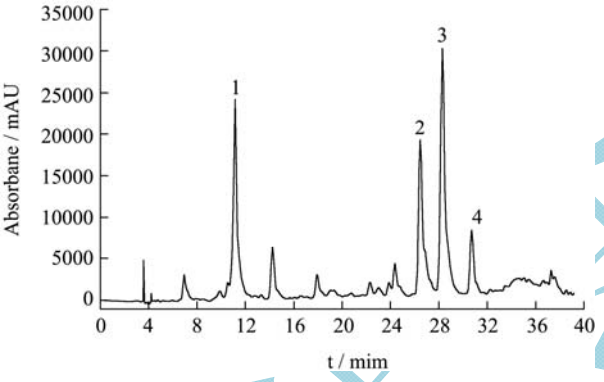


图 2 紫甘薯茎叶提取物的 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC analysis of the purple sweet potato leaves extract

2.3 样品对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

不同质量浓度的样品对α-葡萄糖苷酶的抑制作用见图3，由图可见，在试验浓度范围内，化合物2、3在低浓度时即显示出较强的抑制活性，化合物1、4随着浓度的增大抑制活性增大较快。

4个化合物、提取物及阳性对照阿卡波糖对α-葡萄糖苷酶抑制作用曲线分别为y_1=25.37ln(x)-1.3078 (R^2=0.9774)，y_2=20.48ln(x)+42.828(R^2=0.9918)，y_3=8.4273ln(x)+63.211 (R^2=0.9734)，y_4= 31.526ln(x)-20.436 (R^2=0.9896)，$y_{提}$=13.39ln(x)+27.491（R^2=0.9881），$y_{阿}$=19.742ln(x)-65.949（R^2=0.9971），由方程可见抑制率与样品浓度对数具有良好的相关性。根据曲线计算化合物、提取物及阿卡波糖的半抑制浓度IC_{50}值分别为：7.556 μg/mL、1.419 μg/mL、0.209 μg/mL、9.339 μg/mL、5.371 μg/mL、355.4 μg/mL。由此可见，紫甘薯中的绿原酸类化合物及提取物对α-葡萄糖苷酶均具有很强的抑制作用，均远远强于阳性对照。4个绿原酸类化合物的抑制作用由强到弱为：3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸＞4,5-O-双咖啡酰基奎宁酸＞3-O-咖啡酰基奎宁酸＞3,4-O-双咖啡酰基奎宁酸化合物。

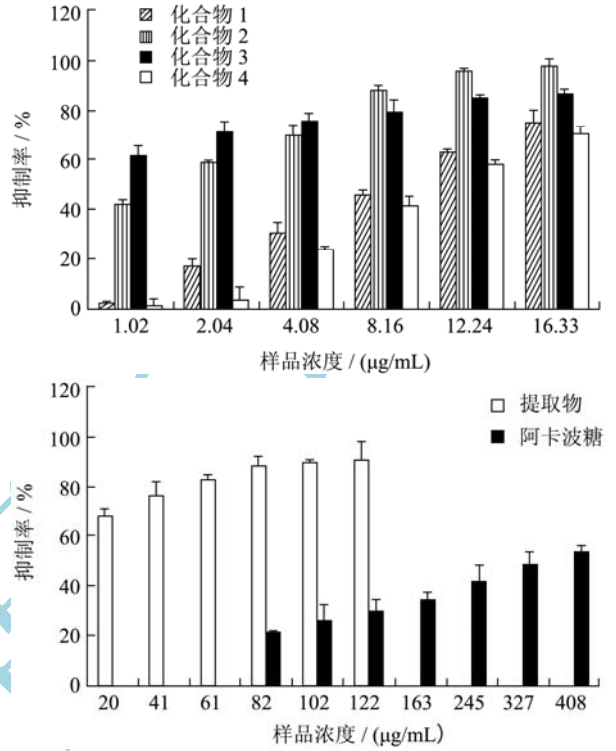


图 3 紫甘薯茎叶中 4 个化合物及提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制效果

Fig.3 Inhibitory effect of compounds and extract from sweet potato leaves on α-glucosidase

2.4 化合物及提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制作用的动力学分析

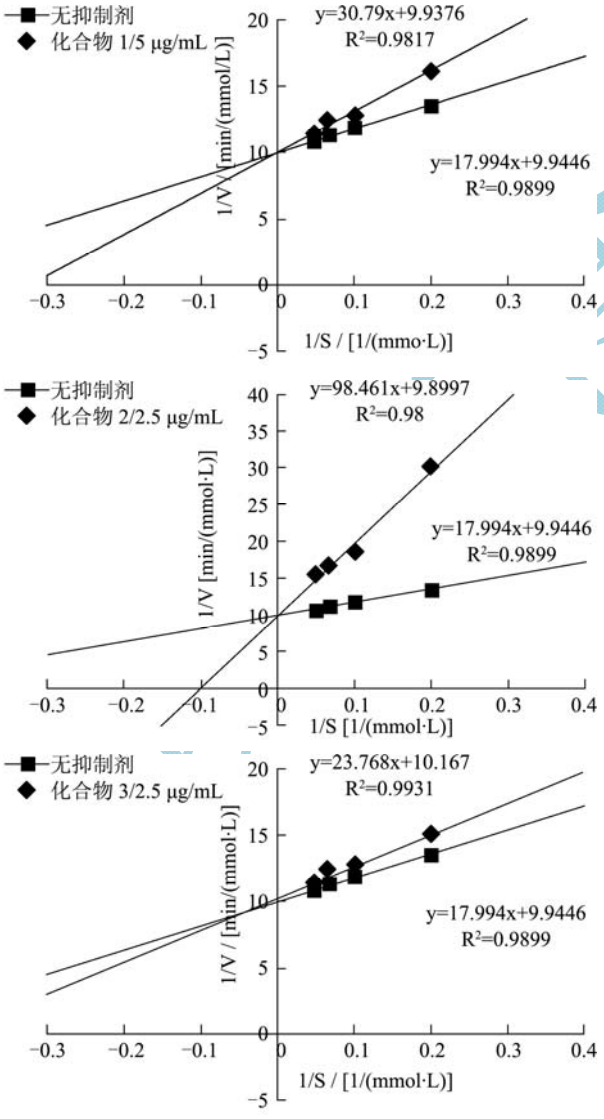
为确定样品对α-葡萄糖苷酶的抑制型，固定α-葡萄糖苷酶的浓度，在添加或不添加样品的条件下，测定了不同底物浓度下反应体系的反应速率，绘制的Lineweaver-Burk曲线见图4。统计学分析显示，反应体系中加入样品后，α-葡萄糖苷酶催化底物PNPG的酶促反应Km较不加样品反应的显著变大（P<0.001），而最大反应速度Vmax基本保持不变（P>0.05），即化合物及提取物对α-葡萄糖苷酶均属竞争性抑制作用。

3 结论

3.1 文献报导儿茶素、表儿茶素、原儿茶酸、咖啡酸、香豆酸、白藜芦醇等酚类物质都具有一定的α-葡萄糖苷酶抑制活性，本研究进一步表明紫甘薯茎叶中的绿原

酸，4,5-O-咖啡酰基奎宁酸，3,5-O-咖啡酰基奎宁酸，3,4-O-咖啡酰基奎宁酸及提取物对α-葡萄糖苷酶均具有很强的抑制作用，且均强于临床常用的α-葡萄糖苷酶抑制阿卡波糖。化合物2、3、4为同分异构体，均为二咖啡酰基奎宁酸，但因为咖啡酰基取代位置不同，它们对酶的抑制作用有较大差别，推测抑制剂与酶结合的部位为咖啡酰基部分，且酰基不同在同位置的取代也影响其与酶的结合。同时，提取物中绿原酸类化合物的总量为25.83%，但其抑制作用也很强，一方面可能是多个化合物间的协同作用，另一方面可能是提取物中多糖及未知成分对α-葡萄糖苷酶也具有强的抑制作用。抑制类型研究表明，四个绿原酸类人物化合物均呈竞争性抑制类型，可以竞争酶的结合位点，是更为高效的抑制剂。

3.2 从本研究结果可以推测，甘薯茎叶降血糖的作用途径之一可能是对小肠中的α-葡萄糖苷酶具有强大的抑制作用，研究结果为甘薯资源的综合开发利用奠定理论基础。



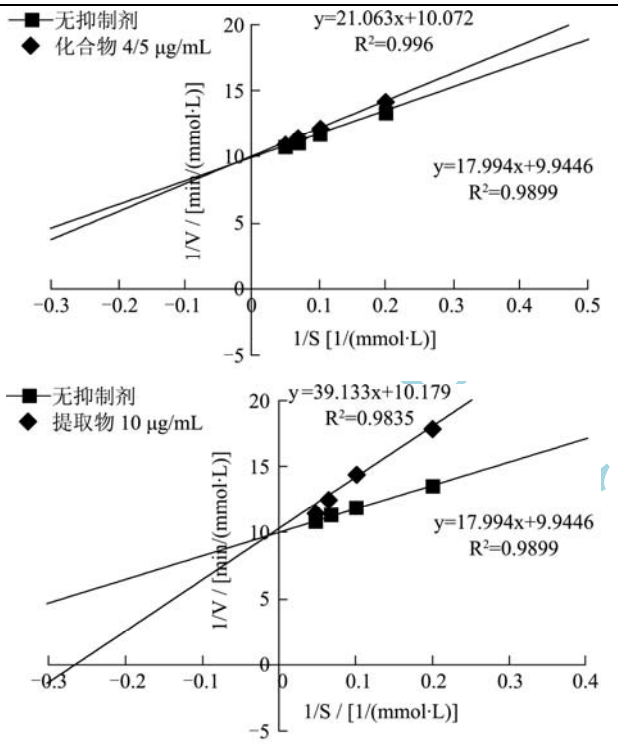


图 4 样品抑制 α-葡萄糖苷酶活性的 Lineweave-Burk 曲线

Fig. 4 Lineweave-Burk Plots of samples against α-glucosidase activity

参考文献

[1] Mahler RJ, Adler ML. Type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999, 84(4): 1165-1171

[2] Gruters R A, Neefjes J J, Tersmette M, et al. Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase [J]. Nature, 1987, 330: 74-77

[3] Fischer P, Collin M, Karlsson G, et al. The alpha-glucosidase inhibitor N-butyldeoxynojirimycin inhibits human immunode ficiency virus entry at the level of post-CD4 binding [J]. Journal of virology, 1995, 69(9): 5791-5797

[4] Chen X, Fan Y, Zheng Y, et al. Properties and production of valienamine and its related analogues [J]. Chemical reviews, 2003, 103(5): 1955-1978

[5] Asano N, Nash RJ, Molyneux RJ, et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application [J]. Tetrahedron: Asym metry, 2000, 11(8): 1645-1680

[6] De La Vega J, Crespo M, Escudero J, et al. Acarbose-induce d acute hepatitis. Report of two events in the same patient [J]. Gastroenterologia y hepatologia, 2000, 23(6): 282-284

[7] Chitturi S, George J. Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihyperte nsives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs [J]. Seminars in liver disease, 2002, 22(2): 169-184

[8] 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
Gao X P, Zhang W Y, Zou W J, et al. Screening for alpha-glucosidase inhibitors from extracts of traditional Chinese medicine [J]. Natural product research and development, 2003, 15(6): 536-538

[9] 朱运平,李秀婷,李里特.天然 α-葡萄糖苷酶抑制剂来源及应用研究现状[J].中国食品学报,2011,11(4):154-160
Zhu Y P, Li X T, Li L T. The Source of the Natural α-glucosidase Inhibitor and its Appliction Research Situation [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(4): 154-160

[10] Kim HS, Kim YH, Hong YS, et al. Alpha-glucosidase inhibitors from commelina communis [J]. Planta. Med., 1999, 65: 437-439

[11] 赵元,张莲英,胡晓燕,等.1 种新的天然α-葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及其活性测定[J].中国生化药物杂志, 2007, 28(1):20-22
Zhao Y, Zhang L Y, Hu X Y, et al. Purification and activity of a new natural a-glucosidase inhibitor [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2007, 28(1): 20-22

[12] 徐林峰,沈忠明,殷建伟.五味子中提取 α-葡萄糖苷酶抑制剂的研究[J].中国生化药物杂志,2001,22(3):127-129
Xu L F, Shen Z M, Yin J W. Study on the characteristics of α-glucosidase inhibitor from Schizandra Chinensis [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2001, 22(3): 127-129

[13] 冯彩宁.红薯叶黄酮降血糖作用研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2009
Feng C N. Hypoglycemic effect of flavonoids from Sweet potato leaves [D]. Xian Yang: Northwest A & F University, 2009

[14] Li JY, Dong GP, Li ML, et al. Efficient counter-current chromatographic isolation and structural identification of phenolic compounds from sweet potato leaves [J]. Journal of liquid chromatography & related technologies, 2012, 35 (11): 1517-1527

[15] Gao H, Kawabata J. α-Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2, 3, 4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α-glucosidase inhibitors [J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2005, 13(5): 1661-71

[16] YE X-P, SONG C-Q, YUAN P, et al. α-glucosidase and α-amylase inhibitory activity of common constituents from traditional chinese medicine used for diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, 8(5): 349-352

现代食品科技