

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 μ g/mL、1.419 μ g/mL、0.209 μ g/mL、9.339 μ g/mL和5.371 μ g/mL, 均远远低于阳性对照阿卡波糖的 IC_{50} (355.4 μ g/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

文章编号: 1673-9078(2014)3-103-107

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

LIU Xue-hui¹, LI Mi-Lu¹, TAN Bin², CHEN Hui-heng¹, 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 μ g/mL, 1.419 μ g/mL, 0.209 μ g/mL, 9.339 μ g/mL and 5.371 μ g/mL, respectively, which were far less than the positive control acarbose (IC_{50} 355.4 μ g/mL). In addition, the kinetic analysis showed the inhibitory effects of the four compounds on α -glucosidase were competitive, and the K_i were 27.18 μ g/mL, 2.06 μ g/mL, 8.42 μ g/mL and 19.58 μ g/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。现代流行病学研究表明, 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,

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

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,

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 \times 4.6 mm, 5 μ m); 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, 北京长流科技仪器有限公司。

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 $^{\circ}$ C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 \rightarrow 25 min (B:12% \rightarrow 25%), 20 \rightarrow 40 min (B:25% \rightarrow 55%), 流速1 mL/min, 检测波长326 nm, 柱温35 $^{\circ}$ C。

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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 \times 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酸的方法^[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 μ L, α -葡萄糖苷酶(0.57 U/mL) 0.1 mL, 混合后37 $^{\circ}$ C水浴15 min, 加入PNPG(20 mmol/mL) 0.2 mL, 37 $^{\circ}$ C水浴加热15 min, 再加入10 mL Na₂CO₃(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:

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

注: $A_{\text{空白}}$: 无样品加入反应的吸光值; $A_{\text{样品}}$: 加入样品反应的吸光值; $A_{\text{背景}}$: 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%。

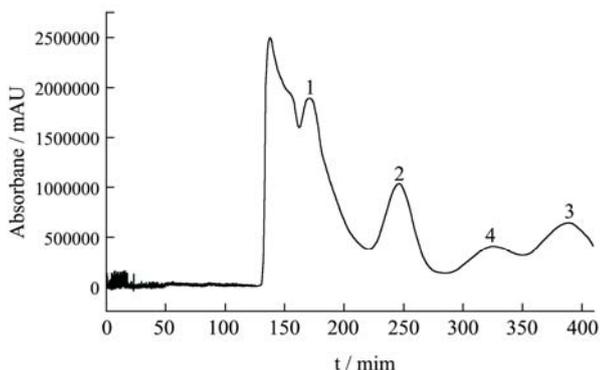


图1 紫甘薯茎叶中绿原酸及异绿原酸的 HSCCC 分离图谱

Fig.1 HSCCC chromatogram of chlorogenic acid and iso-chlorogenic 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%。

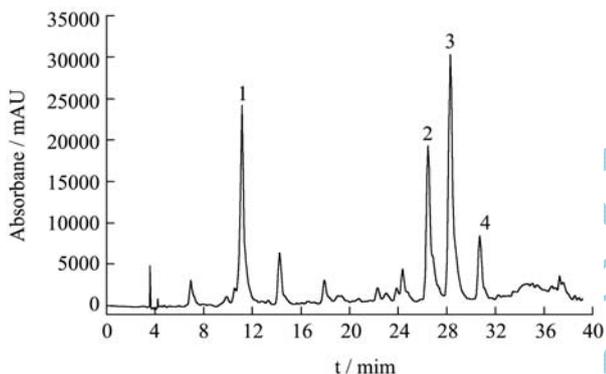


图2 紫甘薯茎叶提取物的 HPLC 图谱

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 $y_1=25.37\ln(x)-1.3078$ ($R^2=0.9774$), $y_2=20.48\ln(x)+42.828$ ($R^2=0.9918$), $y_3=8.4273\ln(x)+63.211$ ($R^2=0.9734$), $y_4=31.526\ln(x)-20.436$ ($R^2=0.9896$), $y_{提}=13.39\ln(x)+27.491$ ($R^2=0.9881$), $y_{阿}=19.742\ln(x)-65.949$ ($R^2=0.9971$), 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 $\mu\text{g/mL}$ 、1.419 $\mu\text{g/mL}$ 、0.209

$\mu\text{g/mL}$ 、9.339 $\mu\text{g/mL}$ 、5.371 $\mu\text{g/mL}$ 、355.4 $\mu\text{g/mL}$ 。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。

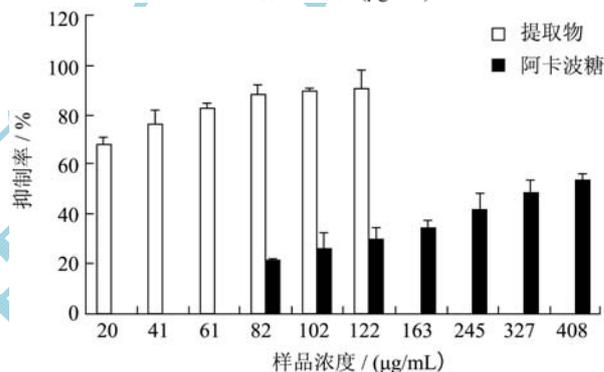
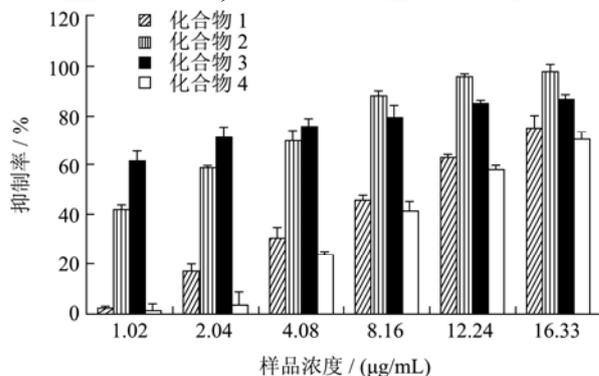


图3 紫甘薯茎叶中4个化合物及提取物对 α-葡萄糖苷酶抑制效果

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 K_m 较不加样品反应的显著变大 ($P<0.001$), 而最大反应速度 V_{max} 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。

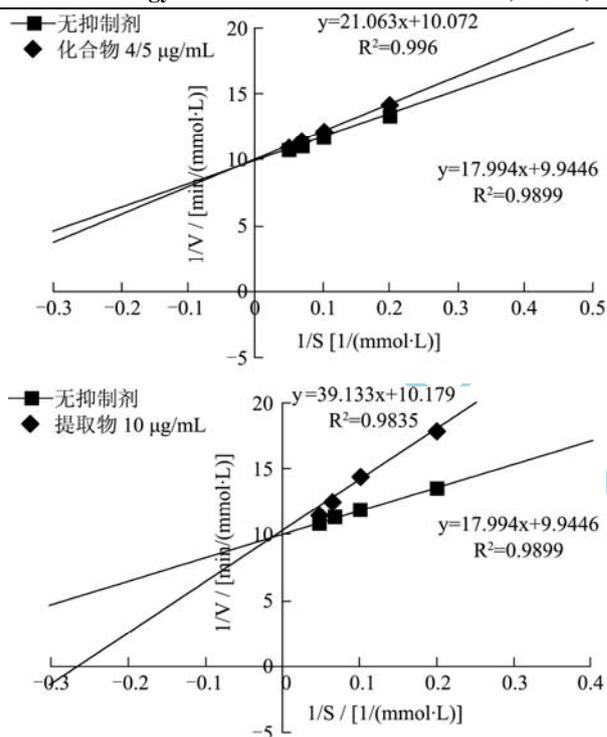
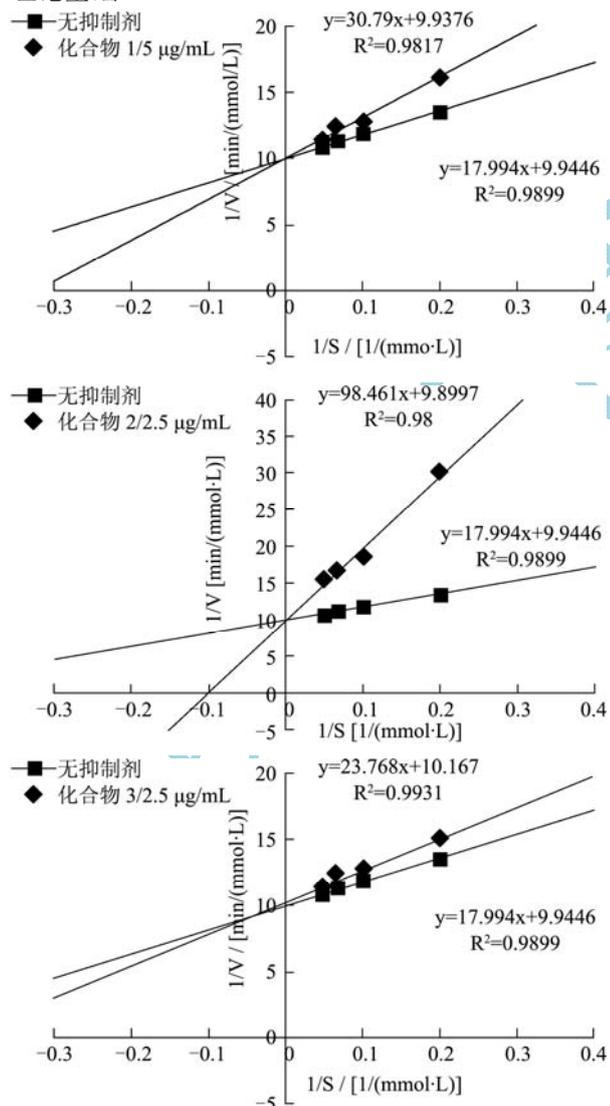


图4 样品抑制 α -葡萄糖苷酶活性的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig. 4 Lineweaver-Burk Plots of samples against α -glucosidase activity

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, Neeffjes 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 immunodeficiency 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: Asymmetry, 2000, 11(8): 1645-1680
- [6] De La Vega J, Crespo M, Escudero J, et al. Acarbose-induced 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, antihypertensives, 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 Application 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 α -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