

胡芦巴生品、酒制品抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶活性的有效部位筛选及其酶动力学分析

刘颖, 郑彧\*, 郭忠成, 叶斌斌, 贾天柱  
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

〔摘要〕 目的:比较胡芦巴生品和酒制品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性作用的差别,筛选抑制活性的有效部位,并研究其酶反应动力学。方法:利用萃取法获得胡芦巴生品和酒制品 80% 甲醇提取物的石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层、水层 4 个不同极性部位,采用体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型和  $\alpha$ -淀粉酶抑制模型,测定生胡芦巴和酒胡芦巴 4 个不同极性部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制作用。通过酶促动力学与 Lineweaver-Burk 曲线推断各有效部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶及  $\alpha$ -淀粉酶抑制类型。结果:生胡芦巴和酒胡芦巴只有水层对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用,酒制品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用优于生品,生胡芦巴和酒胡芦巴水层萃取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶作用为非竞争可逆。生胡芦巴和酒胡芦巴的乙酸乙酯层和正丁醇层对  $\alpha$ -淀粉酶有抑制作用,酒制品的抑制作用优于生品,且均为非竞争可逆。结论:胡芦巴经酒制后可在一定程度上增加对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶及  $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制作用,酒胡芦巴水层萃取物有开发成  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的价值,酒胡芦巴的乙酸乙酯和正丁醇提取物具有开发成  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的价值。

〔关键词〕 胡芦巴; 酒制品; 酶活性;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶;  $\alpha$ -淀粉酶; 萃取部位; 酶反应动力学  
〔中图分类号〕 R283.1;R285.5;R943.1;R283.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2017)04-0025-04  
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040025

Screening of Effective Fraction from Raw and Rice-wine Products of Trigonellae Semen with Inhibiting Activity Against  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase and Analysis of Its Inhibition Kinetics

LIU Ying, ZHENG Yu\*, GUO Zhong-cheng, YE Bin-bin, JIA Tian-zhu  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To compare the inhibition effect of raw and rice-wine products of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase for screening of effective fraction with inhibiting activity. Then try to analyze its reaction kinetics. **Method:** Four different polar fractions, including petroleum ether fraction, ethyl acetate fraction, *n*-butanol fraction and water fraction, were extracted from 80% methanol extract of raw and rice-wine products of Trigonellae Semen.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory model and  $\alpha$ -amylase inhibition model *in vitro* were adopted to measure inhibition effect of different polar fractions on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. Then their inhibitory types were inferred by enzymatic dynamics and Lineweaver-Burk curve methods. **Result:** The water fraction from raw and rice-wine products of Trigonellae Semen had inhibition effect on  $\alpha$ -glucosidase with non-competitive and reversible type, the rice-wine product of Trigonellae Semen was better than raw product. The ethyl acetate and *n*-butanol fraction from raw and rice-wine products of Trigonellae Semen had inhibition effect on  $\alpha$ -amylase with non-competitive and reversible type, and the rice-wine product of Trigonellae Semen was better than raw product. **Conclusion:** The inhibition effect of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase can be increased after being processed by rice-wine. The water fraction from rice-wine product has medicinal development

〔收稿日期〕 20160523(017)  
〔基金项目〕 辽宁省教育厅一般项目(L2015350)  
〔第一作者〕 刘颖,在读硕士,从事中药炮制机制研究,Tel:15242670640,E-mail:1406876227@qq.com  
〔通讯作者〕 \* 郑彧,副教授,从事中药炮制机制研究,Tel:18604036276,E-mail:zhengyu1982@aliyun.com

values as a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, the ethyl acetate and *n*-butanol fraction from rice-wine product has medicinal development values as new  $\alpha$ -amylase inhibitors.

[ **Key words** ] Trigonellae Semen; rice-wine product; enzyme activity;  $\alpha$ -glucosidase;  $\alpha$ -amylase; extraction site; enzyme reaction kinetics

目前,西药治疗是糖尿病的主要治疗措施,但存在诸多副作用,寻找天然药物作为降糖中药已成为新的研究热点<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶是小肠黏膜上调节血糖的关键酶,可通过影响葡萄糖的释放和吸收来调节餐后血糖。现已有许多学者通过体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶抑制模型筛选出了降糖效果好的中药。胡芦巴是药食同源的植物,历代本草对其功效都有详尽的记载,具有补肾壮阳、降血糖等很好的药用价值<sup>[2]</sup>。现对胡芦巴的降糖研究主要集中在胡芦巴生品,而关于其炮制品的研究却鲜有报道。糖尿病的重要致病机制是肝失疏泄以致气瘀,可采用疏肝理气、活血化瘀的方法对其进行治疗<sup>[3-6]</sup>,故推测酒胡芦巴可能有很好的降糖功效。本实验拟研究酒胡芦巴不同极性部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶活性的抑制作用并进行酶动力学分析,为合理使用酒胡芦巴治疗糖尿病提供一定的理论依据。

1 材料

UVmini-1240 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),AL104 型电子天平(上海梅特勒-托利多公司)。胡芦巴药材购自辽宁省药材公司,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* 的干燥成熟种子;对硝基酚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶(美国 Sigma 公司,批号分别为 N100371,G5003), $\alpha$ -淀粉酶(美国 BR 公司,批号 9000-90-20),阿卡波糖片(杭州中美华东制药有限公司,批号 110704),塔牌黄酒(浙江塔牌绍兴酒有限公司,批号 GB/T13662,酒精度 13.0%)。

2 方法与结果

2.1 胡芦巴炮制品的制备

2.1.1 生胡芦巴 取胡芦巴药材,除去杂质,即得。  
2.1.2 酒胡芦巴 取胡芦巴生品 40 g,加 30% 黄酒,拌匀,闷润 70 min,于 180  $^{\circ}\text{C}$  烘 15 min,烘制完毕取出,放凉,装袋备用<sup>[7]</sup>。

2.2 酒胡芦巴及生胡芦巴不同萃取部位的制备 分别取生胡芦巴、酒胡芦巴 14 g,加 10 倍量 80% 甲醇回流提取 3 次,每次 60 min,合并滤液。将滤液置于水浴锅上挥发至无醇味,将剩余液体加水进行混

悬。混悬液依次用等体积石油醚、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取 3 次,浓缩,得生胡芦巴及酒胡芦巴的石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层和水层,生药质量浓度均为 2.8 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>。

2.3  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性试验 参照  $\alpha$ -葡萄糖苷酶使用说明书,以 PNPG 为底物,反应体系为取 67 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)480  $\mu$ L,加入待测样品 20  $\mu$ L,3 mmol 还原谷胱甘肽 20  $\mu$ L 和 PNPG 50  $\mu$ L,摇匀,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱保温 10 min,加入 0.15~0.3 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 20  $\mu$ L,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 20 min,加无水乙醇 590  $\mu$ L 终止反应,400 nm 处测定吸光度  $A(n=3)$ ,利用 SPSS 17.0 软件求出相应的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>),按  $[A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})]/A_{\text{空白}} \times 100\%$  计算抑制率,式中  $A_{\text{空白}}$  为不加样品反应后的  $A$ , $A_{\text{样品}}$  为加入样品反应后的  $A$ , $A_{\text{背景}}$  为只加样品的  $A$ 。见表 1。结果发现生胡芦巴及酒胡芦巴只有水层对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用,呈现一定的剂量依赖性;且酒制品对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用明显优于生品。

表 1 生胡芦巴和酒胡芦巴不同极性萃取部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用

Table 1 Inhibition of different polar fractions from 80% methanol extract of raw and rice-wine products of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -glucosidase

| 组别   | 萃取部位 | IC <sub>50</sub> 范围 |            | IC <sub>50</sub> 平均值 |
|------|------|---------------------|------------|----------------------|
|      |      | 最低值                 | 最高值        |                      |
| 生胡芦巴 | 水    | 1 633. 531          | 3 313. 633 | 2 196. 445           |
|      | 石油醚  | -                   | -          | -                    |
|      | 乙酸乙酯 | -                   | -          | -                    |
|      | 正丁醇  | -                   | -          | -                    |
| 酒胡芦巴 | 水    | 1 334. 584          | 2 377. 405 | 1 715. 364           |
|      | 石油醚  | -                   | -          | -                    |
|      | 乙酸乙酯 | -                   | -          | -                    |
|      | 正丁醇  | -                   | -          | -                    |

2.4  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性试验<sup>[8]</sup> 反应体系为取 67 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)420  $\mu$ L,加入 0.25% 淀粉溶液 50  $\mu$ L 和待测样品 80  $\mu$ L,置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱保温 10 min,加入 0.46 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -淀粉酶 20  $\mu$ L,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min,加盐酸 580  $\mu$ L 终止反应,用 0.01 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 碘液 75  $\mu$ L 显色。于 660 nm 处测定  $A(n=3)$ ,按  $(A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})/A_{\text{样品}} \times 100\%$  计算 IC<sub>50</sub> 和抑制率。见表 2。结果发现生胡芦巴和酒胡芦巴乙

酸乙酯层和正丁醇层对  $\alpha$ -淀粉酶有一定的抑制作用,呈现一定的剂量依赖性;且酒制品优于生品。

表 2 生胡芦巴和酒胡芦巴不同极性萃取部位对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用

Table 2 Inhibition of different polar fractions from 80% methanol extract of raw and rice-wine products of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -amylase

| 组别   | 萃取部位 | IC <sub>50</sub> 范围 |           | IC <sub>50</sub> |
|------|------|---------------------|-----------|------------------|
|      |      | 最低值                 | 最高值       | 平均值              |
| 生胡芦巴 | 水    | —                   | —         | —                |
|      | 石油醚  | —                   | —         | —                |
|      | 乙酸乙酯 | 380.099             | 1 834.022 | 763.573          |
|      | 正丁醇  | 716.690             | 1 032.165 | 853.339          |
| 酒胡芦巴 | 水    | —                   | —         | —                |
|      | 石油醚  | —                   | —         | —                |
|      | 乙酸乙酯 | 219.900             | 753.065   | 417.439          |
|      | 正丁醇  | 601.826             | 510.407   | 712.886          |

2.5  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的动力学试验  $\alpha$ -葡萄糖苷酶浓度(0.16 U·mL<sup>-1</sup>)不变,6 个不同浓度的底物(0.312 5,0.625,1.25,2.5,5,10 mmol·L<sup>-1</sup>),2 个不同抑制剂浓度(2.8,1.4 g·mL<sup>-1</sup>),按 2.3 项下方法测定 A,以底物浓度的倒数(1/S)为横坐标,以反应速度的倒数(1/V)为纵坐标,绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,判断酒胡芦巴不同极性部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制类型,见图 1。

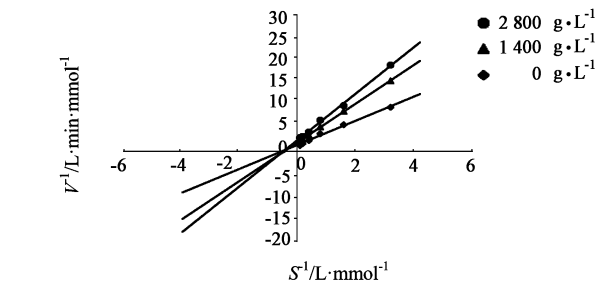


图 1 酒胡芦巴水层对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制类型

Fig.1 Inhibition type of water fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -glucosidase

底物浓度(10 mmol·L<sup>-1</sup>),设置 6 个不同的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶浓度(0.02,0.04,0.05,0.08,0.16 U·mL<sup>-1</sup>),2 个不同抑制剂质量浓度(350,175 g·L<sup>-1</sup>),按 2.3 项下方法测定 A,以酶浓度为横坐标,反应速率为纵坐标,判断酒胡芦巴不同极性部位对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用是否可逆,见图 2。

2.6  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用的动力学试验  $\alpha$ -淀粉酶浓度(0.46 U·mL<sup>-1</sup>)不变,设置 6 个不同浓度的底物(0.312 5,0.625,1.25,2.5,5,10 mmol·L<sup>-1</sup>),按 2.4 项下方法测定 A。以 1/S 为横坐标,以 1/V 为纵坐标,绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线,判断酒胡芦巴不同极性部位对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型,见图 3,4。

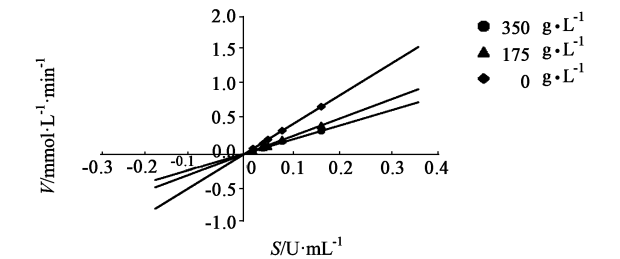


图 2 酒胡芦巴水层对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的可逆与不可逆测定

Fig.2 Reversible and irreversible determination of inhibition of water fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -glucosidase

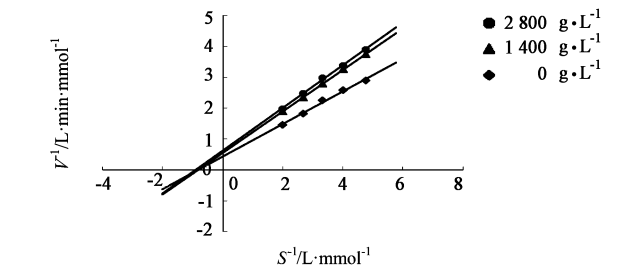


图 3 酒胡芦巴乙酸乙酯层对  $\alpha$ -淀粉酶抑制类型

Fig.3 Inhibition type of ethyl acetate fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -amylase

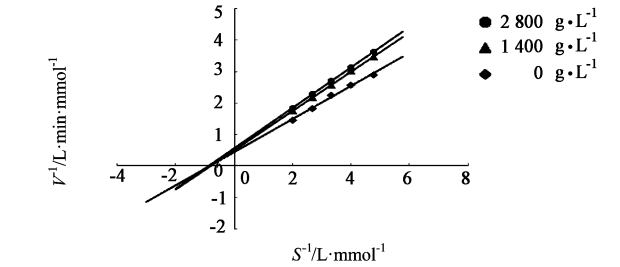


图 4 酒胡芦巴正丁醇层对  $\alpha$ -淀粉酶抑制类型

Fig.4 Inhibition type of *n*-butanol fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of Trigonellae Semen on  $\alpha$ -amylase

底物浓度(0.25%)不变,设置 6 个不同的  $\alpha$ -淀粉酶浓度(0.15,0.23,0.31,0.46,0.62 U·mL<sup>-1</sup>),2 个不同抑制剂质量浓度(350,175 g·L<sup>-1</sup>),按 2.4 项下方法测定 A,以酶浓度为横坐标,反应速率为纵坐标,判断酒胡芦巴及生胡芦巴不同极性部位对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用是否可逆,见图 5,6。

由图 2,5~6 可知,在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶体系中分别加入不同浓度的酒胡芦巴不同极性部位萃取物,所得的直线均通过原点,且直线的斜率随着所加萃取物浓度的增加而减少。说明酒胡芦巴水层萃取物对在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用是可逆的,酒胡芦巴乙酸乙酯层和正丁醇层萃取物对在  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用是可逆的。由图 1,3~4 可知,在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶体系中分别加入不同浓

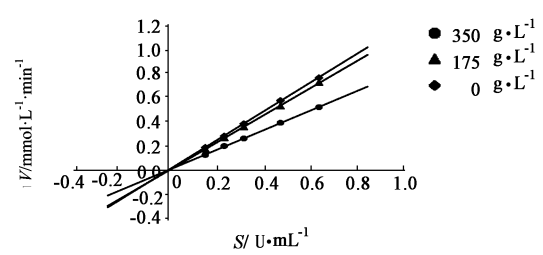


图 5 酒葫芦巴乙酸乙酯层对  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的可逆与不可逆测定  
Fig. 5 Reversible and irreversible determination of inhibition of ethyl acetate fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of *Trigonellae Semen* on  $\alpha$ -amylase

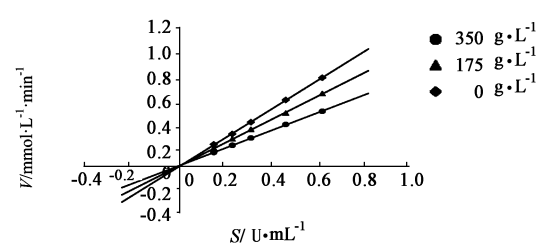


图 6 酒葫芦巴正丁醇层对  $\alpha$ -淀粉酶抑制活性的可逆与不可逆测定  
Fig. 6 Reversible and irreversible determination of inhibition of *n*-butanol fraction from 80% methanol extract of rice-wine product of *Trigonellae Semen* on  $\alpha$ -amylase

度的酒葫芦巴不同极性部位萃取物,反应速度随抑制剂浓度增大而变小,米氏常数保持不变。说明酒葫芦巴水层萃取物对在  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用是非竞争的,酒葫芦巴乙酸乙酯层和正丁醇层萃取物对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用是非竞争的。

3 讨论

葫芦巴是一味很好的降糖中药,国内外许多学者对其降糖化学成分和作用机制进行了研究,发现 4-羟基异亮氨酸可刺激胰岛  $\beta$  细胞产生胰岛素。半乳甘露聚可增加胰岛素敏感性。葫芦巴碱可降低糖尿病大鼠体内甘油三酯、胆固醇、游离脂肪酸水平。纤维和树胶类成分可通过延缓胃排,减慢胃肠道对葡萄糖的吸收<sup>[9-10]</sup>。而关于其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用尚未见报道。前期研究发现当生药质量浓度为  $2.8\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,酒葫芦巴及生葫芦巴的 80% 甲醇提物对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖酶的抑制率均  $>90\%$ ,为了进一步筛选出对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖酶有抑制作用的活性部位,本实验对酒葫芦巴及生葫芦巴的 80% 甲醇提取物不同极性部位对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖酶的抑制作用进行了研究。结果发现酒葫芦巴和生葫芦巴只有水层对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用,推测葫芦巴中对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用的成分主要为多糖类和皂苷类等极性大的成分。酒葫芦巴和生葫芦巴乙酸乙酯层和正丁醇

层对  $\alpha$ -淀粉酶均有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯层抑制率更高,推测可能是与一些黄酮类成分有关。葫芦巴经炮制后各极性部位对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖酶的抑制率均增强,可能是炮制后某些化学成分发生了量变或质变。

在美国,葫芦巴已被批准作为降糖保健产品,常与降糖药合用,以增强药物的降血糖效果<sup>[11-12]</sup>。葫芦巴是我国传统的降糖中药,而迄今为止关于其降糖保健类产品尚未得以开发。中医理论认为糖尿病归属于消渴病,活血化瘀法是中医治疗糖尿病的主要方法之一<sup>[4]</sup>。黄酒有很好的活血化瘀作用,故葫芦巴经酒制后可增强其降糖功效。本实验发现酒葫芦巴和生葫芦巴的部分极性部位对  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -葡萄糖酶有很好的抑制作用,且是非竞争可逆型,这可为酒葫芦巴的降糖保健产品开发提供一定的理论依据。

[参考文献]  
[1] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.  
[2] 张广伦, 张卫明. 葫芦巴及其综合利用[J]. 中国林副特产, 2011(4): 96-98.  
[3] 祝湛予. 用活血化瘀法为主治疗糖尿病病例报告[J]. 新医药学杂志, 1978(5): 8-9.  
[4] 李中南, 方朝晖, 张建军, 等. 糖尿病从瘀论治探析[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(2): 154-157.  
[5] 杨丽霞, 姜良恩, 王志程, 等. 中草药黄酮类化合物防治糖尿病肾病的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 230-234.  
[6] 王旭, 徐奚如. 瘀血与消渴病关系探析[J]. 杏林中医药, 2011, 31(4): 279-281.  
[7] 郑彧, 肖洪贺, 常成栋, 等. 正交法优选酒制葫芦巴炮制工艺[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1733-1736.  
[8] 庄玲玲, 丁婷, 吴慧平. 夏枯草提取物对  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用的初步研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(19): 2243-2245.  
[9] Srichamroen A, Field C J, Thomson A B, et al. The modifying effects of galactomannan from Canadian-grown fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on the glycemic and lipidemic status in rats[J]. J Clin Biochem Nutr, 2008, 43(3): 167-174.  
[10] Jetté L, Harvey L, Eugeni K, et al. 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2009, 10(4): 353-358.  
[11] 李秀茹, 但小梅, 戴宇, 等. 葫芦巴化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 148-151.  
[12] 石艳, 王路飞, 李相军, 等. 葫芦巴多糖 A2 对糖尿病大鼠肾脏 CTGF 表达的影响[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(9): 1093-1096.

[责任编辑 刘德文]