

## 鼠曲草提取物及组分对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用

陆英<sup>1,2</sup>, 邓林燕<sup>1</sup>, 朱丽娜<sup>1</sup>, 李觅路<sup>1\*</sup>

(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:**采用分析型高效液相色谱仪对鼠曲草提取物进行分离、鉴定,并测定了鼠曲草提取物及其中3个组分对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响。结果表明:从鼠曲草提取物中分离出7个组分,并鉴定出3个组分,分别为3,5-O-咖啡酰基奎宁酸,3,4-O-咖啡酰基奎宁酸,2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖;当 $\alpha$ -淀粉酶质量浓度达到1.67 mg/mL时,鼠曲草提取物、3,5-O-咖啡酰基奎宁酸、3,4-O-咖啡酰基奎宁酸、2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖的抑制率分别为32.37%、84.53%、63.07%、71.22%,半抑制浓度 $IC_{50}$ 分别为2.71、0.90、1.28、1.16 mg/mL;对2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖进行动力学分析的结果显示,2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖为可逆非竞争性抑制类型。

**关键词:**鼠曲草;提取物; $\alpha$ -淀粉酶;抑制作用

中图分类号:S567.210.1

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2015)04-0412-04

## Inhibition effects of extract and its compositions from *Gnaphlium affine* D.Don on $\alpha$ -amylase

Lu Ying<sup>1,2</sup>, Den Linyan<sup>1</sup>, Zhu Lina<sup>1</sup>, Li Milu<sup>1\*</sup>

(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:** Isolation and identification of composition from *Gnaphlium affine* D.Don extract were conducted with high performance liquid chromatography. Inhibition effects of extract and its three compositions on  $\alpha$ -amylase activity were determined. The results showed that seven compositions were isolated from the extract and three of them were identified as 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 2',4,4'-trihydroxy -6'-methoxychalcone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. The inhibition rates of extract, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, and 2',4,4'-trihydroxy -6'-methoxychalcone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside were 32.37%, 84.53%, 63.07% and 71.22% respectively when the concentration of  $\alpha$ -amylase was 1.67 mg/mL, and half inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were 2.71, 0.90, 1.28 and 1.16 mg/mL. The kinetic analysis showed that the inhibition of 2',4,4'-trihydroxy -6'-methoxychalcone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside on  $\alpha$ -amylase was reversible and non-competitive.

**Keywords:** *Gnaphlium affine* D.Don; extract;  $\alpha$ -amylase; inhibition

鼠曲草(*Gnaphlium affine* D.Don)为菊科鼠曲草属植物,又名佛耳草、清明菜等。鼠曲草提取物具有抗氧化及光防护<sup>[1]</sup>、抗炎抑菌<sup>[2]</sup>、抑制醛糖还原酶<sup>[3]</sup>、保肝<sup>[4]</sup>、昆虫拒食<sup>[5]</sup>等作用。鼠曲草能抑制血小板凝集和黏连,预防中风、糖尿病及动脉粥样硬化等疾病的发生<sup>[6]</sup>。

$\alpha$ -淀粉酶抑制剂是糖苷水解酶抑制剂中的一种,它能有效抑制肠道内唾液及胰淀粉酶的活性,降低食物中淀粉糖类物质的分解吸收,从而起到降低血糖、血脂的作用<sup>[7]</sup>。在农业上, $\alpha$ -淀粉酶抑制剂能抑制昆虫消化道内 $\alpha$ -淀粉酶的活性,刺激昆虫过量分泌消化酶,产生厌食反应,导致

昆虫发育不良或死亡。近年来,  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂在医学及农业上得到了广泛应用。

笔者制备鼠曲草提取物, 分离鉴定了鼠曲草提取物中的几个多酚类化合物, 并研究了鼠曲草提取物及几个组分对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用及其中的一个组分抑制类型, 旨在为鼠曲草资源的进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试鼠曲草与试剂

鼠曲草于 2012 年 4 月中旬购于湖南吉首。

猪胰 $\alpha$ -淀粉酶(SIGMA公司); 阿卡波糖(北京拜耳医药保健有限公司); 可溶性淀粉(汕头市西陇化工有限公司); 葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司); 二水磷酸氢二钠、氯化钠、正磷酸、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、四水酒石酸钾钠等均为国产, 分析纯。

### 1.2 仪器

LC-10AT 高效液相色谱(日本岛津公司), Wondasil™ C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); HH 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂); UV-2600 型紫外可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司); SK-1 快速混匀器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

### 1.3 鼠曲草提取物的制备、分离和鉴定

鼠曲草提取物的制备: 新鲜的鼠曲草于室内自然阴干, 置 60 °C 烘箱中干燥后粉碎。取鼠曲草粉碎原料 200 g, 用 70%乙醇, 料液比为 1 : 30, 在 80 °C 回流提取 1 h, 提取 2 次, 合并提取液, 过滤减压浓缩至无醇味, 用盐酸调节 pH 至 3.0, 将提取液通过 D101 树脂(3 cm×60 cm, 450 mL)上样, 流速 4 BV/h, 吸附后静置 0.5 h, 用 1 BV 水洗去水溶性杂质, 再用 4 BV 的 60%乙醇以 3 BV/h 的流速洗脱, 减压浓缩后冷冻干燥, 得鼠曲草提取物 6.44 g, 于 4 °C 冰箱中保存。

鼠曲草提取物的分离和鉴定: 采用分析型高效液相色谱仪对提取物进行分离鉴定。色谱条件如下: 流动相 A 泵为 0.5% 冰乙酸, B 泵为甲醇。梯度洗脱: 0 min(70%A 泵+30% B 泵)→15 min(55%A 泵+45% B 泵)→25 min(55%A 泵+45% B 泵)→40 min(30%A 泵+70% B 泵), 流速为 1 mL/min, 柱温

为 30 °C, 进样量为 20  $\mu$ L, 检测输出波长 328 nm。

### 1.4 鼠曲草提取物及组分对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用试验

#### 1.4.1 最适酶浓度和最适反应时间的选择

取 7 支试管, 分别加入质量浓度为 0.02 mg/mL 的  $\alpha$ -淀粉酶 0.1 mL, 置于 37 °C 水浴中预热 10 min, 加入 37 °C 预热的 1% 淀粉溶液 0.1 mL, 酶反应开始后准确计时, 每间隔 1 min 加入 0.2 mL DNS 终止反应, 置沸水中水浴 8 min, 迅速冷却后用 5 mL 蒸馏水稀释, 用分光光度计于 540 nm 处测定吸光值。改变酶浓度(0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL), 同法测定吸光值, 作图确定最适酶浓度和最适反应时间。

#### 1.4.2 鼠曲草提取物及组分对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用试验

取 0.1 mL 质量浓度为 0.06 mg/mL 猪胰  $\alpha$ -淀粉酶溶液于试管中, 分别加入 0.1 mL 不同浓度(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL) 的样品溶液(以阿卡波糖为阳性对照), 混合均匀并置于 37 °C 水浴中预热 10 min, 加入 0.1 mL 37 °C 预热的 1% 淀粉溶液, 混匀, 反应 3 min 后立即加 0.2 mL DNS 显色剂, 置沸水中水浴 8 min, 迅速冷却后用 5 mL 蒸馏水稀释, 用分光光度计于 540 nm 处测定吸光值  $A_1$ 。以空白管为对照, 不加抑制剂(以蒸馏水补足), 其他与抑制剂管操作相同, 测定吸光值  $A_0$ 。背景管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, 测定吸光值  $A_2$ , 按下列公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_1} \times 100\%$$

#### 1.5 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖抑制类型的鉴别试验

2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖的质量浓度为 3 mg/mL, 底物为 1% 淀粉溶液, 以缓冲溶液替代样品溶液, 在不同的酶浓度(0.02、0.04、0.06、0.08 mg/mL) 下按 1.4.2 反应测定吸光值。当体系中不存在抑制剂时, 酶活性测定的速率直线通过原点; 当体系中存在不可逆抑制剂时, 酶反应速率直线不通过原点, 相当于将原点平行向右移动, 若有一定量的可逆性抑制剂时, 可得到一条通过原点、斜率低于无抑制剂组的直线。如果 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖是可逆性抑制类型化合物, 则进一步进行可逆

性抑制类型(竞争型和非竞争型)的鉴别试验。试验操作如下:固定酶质量浓度为0.06 mg/mL, 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O-β-D-葡萄糖质量浓度为3 mg/mL, 以淀粉溶液为底物, 在不同浓度(0.5%、1%、1.5%和2%)的淀粉溶液下, 按1.4.2 反应测定吸光值, 通过双倒数作图法判断是竞争型或非竞争型抑制类型。两条直线的交点在纵轴为竞争型抑制剂, 在横轴上的为非竞争型抑制剂。

## 2 结果与分析

### 2.1 鼠曲草提取物的 HPLC 分析

鼠曲草提取物的 HPLC 色谱图见图 1。由图 1 可见, 提取物中含有多个组分, 其中含量相对较高的有 7 个组分, 在 330 nm 和 220 nm 左右有较大吸收, 具有明显的酚酸类化合物的紫外吸收特征<sup>[9]</sup>, 推测为多酚类化合物。本课题组从鼠曲草提取物中制备分离得到了 7 个组分, 并鉴定出编号为 3、5、7 的组分分别为 3,5-O-咖啡酰基奎宁酸、3,4-O-咖啡酰基奎宁酸、2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O-β-D-葡萄糖。

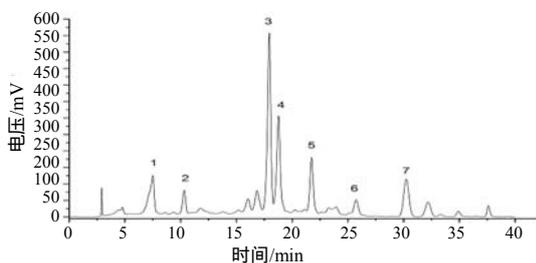


图 1 鼠曲草提取物的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of the extract from *Gnaphalium affine* D. Don

### 2.2 鼠曲草提取物及组分对 α-淀粉酶的抑制作用及抑制类型鉴别结果

#### 2.2.1 最适酶浓度和最适反应时间的确定

不同质量浓度的 α-淀粉酶在 7 min 内的反应动力学进程曲线见图 2。当酶质量浓度等于或低于 0.08

mg/mL 时, 在 3 min 之内反应均为线性反应。同时, 为利于建立科学的反应动力学方程, 使测定的反应速率(以 A/min 表示)在 (0.03~0.25)/min 较好<sup>[9]</sup>, 因此, 选取最佳酶浓度 0.06 mg/mL, 反应时间 3 min 进行酶反应动力学的测定。

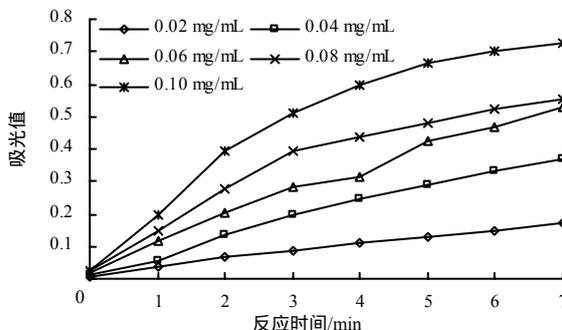


图 2 不同质量浓度 α-淀粉酶的反应进程曲线

Fig.2 The reaction curve under different concentrations of α-amylase

#### 2.2.2 鼠曲草提取物及 3 个组分对 α-淀粉酶活性的影响

不同浓度的鼠曲草提取物及化合物对 α-淀粉酶的抑制活性见表 1。在试验浓度范围内, 样品对 α-淀粉酶活性均有一定抑制作用, 随着浓度的增加, 抑制能力逐渐增强。当提取物、组分 3、5、7 及阳性对照阿卡波糖质量浓度为 1.67 mg/mL 时, 抑制率分别为 32.37%、84.53%、63.07%、71.22%、94.12%。对样品浓度与抑制率进行线性拟合, 得到线性方程为:  $y_{提}=17.265x + 3.237 (R^2 = 0.9984)$ ;  $y_3=45.429x + 9.247 (R^2 = 0.9976)$ ;  $y_5=34.041x + 6.555 (R^2 = 0.9994)$ ;  $y_7=40.239x + 3.293 (R^2=0.993)$ ;  $y_{阿}=28.92x + 47.194 (R^2=0.9889)$ 。根据方程计算出提取物及化合物 3、5、7 对 α-淀粉酶的半抑制浓度  $IC_{50}$  分别为 2.71、0.90、1.28、1.16 mg/mL, 均高于阿卡波糖的半抑制浓度 (0.10 mg/mL)。

表 1 样品对 α-淀粉酶的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of compounds from *Gnaphalium affine* D. Don on α-amylase

体系中样品浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	抑制率/%				
	提取物	化合物 3	化合物 5	化合物 7	阿卡波糖
0.33	8.99	23.02	17.73	18.71	56.83
0.67	15.11	41.37	29.01	27.37	66.55
1.00	20.14	54.68	41.37	43.88	74.70
1.33	25.90	69.78	51.80	56.48	88.37
1.67	32.37	84.53	63.07	71.22	94.12

### 2.2.3 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型

不同浓度的  $\alpha$ -淀粉酶在有或无 2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖存在的条件下的反应速率见图 3。无抑制组的速率方程为  $y=0.4885x$  ( $R^2=0.986$ )，抑制组的速率曲线方程为  $y=0.2695x$  ( $R^2=0.9878$ )，此直线通过原点，由此可知，化合物 7 对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制类型是可逆性抑制。由图 4 可知，抑制组双倒数曲线方程为  $y=288.91x+54.848$  ( $R^2=0.9784$ )，无抑制组双倒数曲线方程为  $y=145.81x+27.94$  ( $R^2=0.9974$ )，方程直线在横轴上相交，为非竞争性抑制。

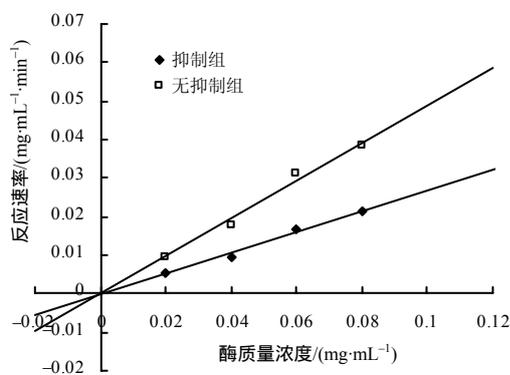


图3 化合物7在不同酶浓度下的反应速率

Fig.3 The reaction rate in different enzyme concentrations at reaction system containing compound 7

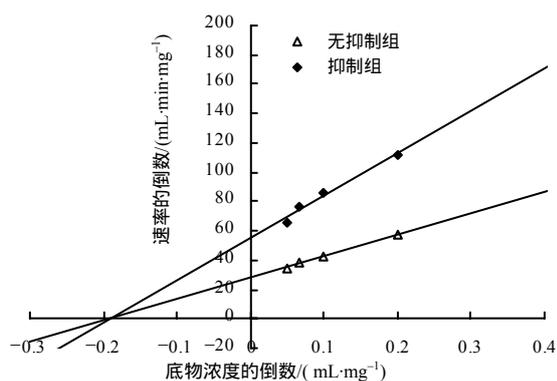


图4 化合物7对胰 $\alpha$ -淀粉酶的可逆抑制类型的双倒数曲线

Fig.4 Lineweaver-burk plot for inhibition of compound 7 on  $\alpha$ -amylase

## 3 结论

植物多酚由于具有良好的抗氧化和自由基清除活性而受到广泛关注。近些年进一步研究<sup>[10-12]</sup>表明，一些植物的多酚如蓝莓提取物、茶多酚等具有较强的 $\alpha$ -淀粉酶抑制活性。本试验结果表明，鼠

曲草提取物及其中的3个多酚类化合物对胰 $\alpha$ -淀粉酶均具有较强的抑制作用，且呈明显的量效关系，但不同化合物的抑制活性存在一定差异，3,5-O-咖啡酰基奎宁酸、3,4-O-咖啡酰基奎宁酸为异绿原酸类化合物的同分异构物，但二者抑制 $\alpha$ -淀粉酶的  $IC_{50}$ 分别为0.90、1.28 mg/mL；2',4,4'-三羟基-6'-甲氧基-查尔酮-4'-O- $\beta$ -D-葡萄糖是一种查尔酮，它的  $IC_{50}$ 为1.16 mg/mL，同时它为可逆的非竞争性抑制类型。

## 参考文献:

- [1] Aquino R, Morelli S, Tomaino A, et al. Antioxidant and photo-protective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H B K leaves and their major flavonoids[J]. J Ethnopharmac, 2002, 79(2): 183-191.
- [2] 潘明. 鼠曲草提取物抑菌作用初步研究[J]. 四川食品与发酵, 2006, 42(6): 53-56.
- [3] Aritomi M, Kawasaki T. Dehydro-para-asebotin, a new chalcone glucoside in the flowers of *Gnaphalium affine* D. Don[J]. Chert Pharm Bull, 1974, 22(8): 1800-1805.
- [4] 姜丽君, 朴锦花, 刘宇, 等. 鼠曲草提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤保护作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1901-1902.
- [5] Masanori Morimoto, Sumiko Kumeda, Koichiro Komai. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don [J]. J Agric Food Chem, 2000(48): 1888-1891.
- [6] 王柯慧. 寻找预防糖尿病并发症的天然产物: 对醛糖还原酶及血小板聚集的抑制效应[J]. 国外医学中医中药分册, 1996, 18(1): 49-50.
- [7] 吕凤霞, 陆兆新.  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 152-154.
- [8] 张东明. 酚酸化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 196-197.
- [9] 陈曾, 刘兢, 罗丹. 生物化学试验[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1994.
- [10] 阮妙芸, 张根义. 茶多酚对淀粉酶抑制作用的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4371-4373.
- [11] 张冬英, 余霜, 黄业伟, 等. 普洱茶对  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用的影响研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 77-79.
- [12] McDougall G J, Shpiro F, Dobson P S, et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 2760-2766.

责任编辑: 尹小红

英文编辑: 梁和