

霍丽妮,刘华钢,廖艳芳,等. 两粤黄檀体外抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):242-244.

两粤黄檀体外抗氧化及 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

霍丽妮¹, 刘华钢¹, 廖艳芳², 黄茂春³, 陈 睿³, 韦建华⁴, 胡 越³

(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 广西化工研究院, 广西南宁 530001;

3. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西南宁 530022; 4. 广西中医药大学, 广西南宁 530001)

摘要:研究了兩粵黃檀莖不同溶剂(95% 乙醇、丙酮、乙酸乙酯)提取物的抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。采用清除 DPPH 自由基、清除 ABTS⁺ 自由基和铁离子(Fe²⁺) 还原能力检测体外抗氧化活性; 体外建立酶反应体系, 以 pNPG 作为底物, 检测其 α -葡萄糖苷酶抑制活性。结果表明, 兩粵黃檀莖乙酸乙酯提取物具有优异的抗氧化能力及 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 兩粵黃檀莖乙酸乙酯提取物具有作为天然抗糖尿病药物研究和开发的潜力。

关键词:兩粵黃檀; DPPH; ABTS⁺; 还原能力; α -葡萄糖苷酶抑制活性; 乙酸乙酯提取物

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0242-03

糖尿病是一组以高血糖以及糖、脂肪、蛋白质代谢紊乱为特征的慢性疾病^[1]。氧化应激(oxidative stress, OS)是指机体在遭受各种有害刺激时, 体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)产生过多导致体内氧化与抗氧化作用失衡, 引起细胞和组织损伤导致糖尿病等许多疾病的恶化^[2-3]。在糖尿病中, 自由基是通过葡萄糖的氧化、蛋白质的非酶糖基化和对糖化蛋白的氧化降解 3 种途径形成, 因此, 抗氧化物质对于糖尿病病人非常有好处, 不仅可以维持体内抗氧化水平, 而且能够治疗糖尿病引起的并发症^[4]。 α -葡萄糖苷酶能催化淀粉或蔗糖消化的最后一步而产生丰富的糖类物质, 因此能抑制 α -葡萄糖苷酶活性的物质也被认为具有抗糖尿病作用^[5]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂如阿卡波糖、米格列醇和伏格列波糖能延缓在饮食中对糖类物质的摄取以及抑制餐后高血糖症, 对治疗糖尿病和肥胖症非常有效^[6-7]。合成的降血糖药具有胃胀气、腹痛等副作用^[8], 从药用植物中寻找抗糖尿病药物被认为更加经济和安全。

根据《中国植物志》记载, 黄檀属植物(*Dalbergia*)在我国有 28 种, 目前, 只有 2 种被研究, 尤其是降香(*Dalbergia odor-*

ifera) 被研究得最多^[9-11]。许多药理活性均表明降香具有抗糖尿病、抗氧化、抗高血糖、抗炎、抗肿瘤以及抗菌等作用, 从该属植物中开发出糖尿病药物非常有意义。兩粵黃檀(*Dalbergia benthami* Prain), 又名蕉藤麻、兩粵檀, 藤本, 生于疏林和灌木丛中, 分布在广东、广西、海南等地; 药用部位为茎, 可用于通经活血, 主治跌打损伤、筋骨疼痛和气滞血瘀所致月经不调等症^[12]。目前, 对该植物的研究报道较少, 本课题组针对前述的糖尿病的 2 个关键靶点, 采用各种体外模型对该植物的抗氧化和 α -葡萄糖苷酶抑制活性进行研究, 以期找到更好的治疗糖尿病的药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 兩粵黃檀经广西中医药大学韦松基教授鉴定为豆科黄檀属植物(*Dalbergia benthami*), 将茎自然晾干, 粉碎。

1.1.2 仪器 美国安捷伦 8453 紫外可见分光光度计; 美国赛默飞世尔 Multiskan MK3 酶标仪; 德国赛多利斯 BS224S 电子天平; 上海亚荣生化仪器厂 RE-52A 型旋转蒸发仪。

1.1.3 试剂 DPPH(二苯代苦味酰自由基)、ABTS[2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)]、 α -葡萄糖苷酶(来源于酿酒酵母)购于美国 Sigma Aldrich 公司; BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)购于上海国药集团化学试剂有限公司; 阿卡波糖购于南宁药店, 厂家为拜耳医药保健有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 兩粵黃檀莖提取物的制备 將兩粵黃檀莖阴干, 粉碎

脂, 1992(1):32-34.

[10] 弭向辉. 花椒挥发油的提取分离及其抗菌和抗肿瘤作用研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2004.

[11] 李志洲. 苦瓜中黄酮类化合物的提取及抗氧化性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(4):264-266.

[12] 张 鹏. 银杏叶黄酮的微波提取及其抗氧化性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12):5496-5497, 5730.

liolum[J]. *Planta Medica*, 1996, 62(2):175-176.

[7] Chang C T, Doong S L, Tsai I L, et al. Coumarins and antiHBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*[J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(7):1419-1422.

[8] 李克坤. 花椒叶液在炸伤及烧伤中的应用[J]. 西北国防医学杂志, 1991, 12(3):42.

[9] 樊经建. 花椒、花椒叶芳香油及椒籽油的成分分析[J]. 中国油

收稿日期: 2014-01-05

基金项目: 广西教育厅课题(编号: 2013YB137); 广西卫生厅中医药民族医药继承创新工程课题(编号: GZZC13-01/GZZC13-02)。

作者简介: 霍丽妮(1982—), 女, 广西德保人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事中药有效成分分离提取和活性研究工作。E-mail: huolini@126.com。

通信作者: 陈 睿, 硕士研究生, 工程师, 主要从事中药有效成分分离提取和活性研究工作。E-mail: 58251323@163.com。

后称取 50 g, 用 100 mL 95% 乙醇室温下搅拌 24 h, 过滤后滤渣加等量溶剂同法再提取 2 次, 过滤, 合并 3 次滤液。滤液置旋转蒸发器中减压蒸馏, 回收溶剂, 残留物低温真空干燥至干, 得两粤黄檀茎乙醇浸膏 (EE), 得率为 17.82%。同法制备丙酮浸膏 (AE) 和乙酸乙酯浸膏 (EAE), 得率分别为 3.36% 和 2.40%。

1.2.2 DPPH 体系抗氧化试验^[13] 取 0.15 mL 两粤黄檀茎提取物溶液 (0.5 ~ 2.0 mg/mL), 加入到 4 mL DPPH (0.2 mg/mL) 溶液中, 室温 (25 °C) 放置 20 min, 以不加提取液的 DPPH 为空白对照, 以相同浓度 BHT 为阳性对照, 在最大波长处 (517 nm) 测吸光度, 试验平行进行 3 次。根据下列公式计算各种提取液对 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{清除率} = (1 - D_1/D_0) \times 100\%$$

式中: D_1 为加提取液或 BHT 后 DPPH 溶液的吸光度; D_0 为未加提取液或 BHT 时 DPPH 溶液的吸光度。

1.2.3 清除 ABTS⁺ 自由基的能力测定^[13] 用蒸馏水将 ABTS 配制成 7 mmol/L 准备液, 取 5 mL 与 88 μ L 140 mmol/L 过硫酸钾固体混合, 室温避光放置 2 d, 形成 ABTS⁺ 储备液。将该储备液用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释, 使其在 732 nm 下吸光度为 (0.70 \pm 0.05)。将 15 μ L 提取液 (0.5 ~ 2.0 mg/mL) 与 3.2 mL ABTS⁺ 溶液混合, 以 PBS 溶液作为参比, 并以相同浓度 BHT 为阳性对照, 在室温下放置 3 min 后测其吸光度, 试验平行进行 3 次。清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = (D_{\text{control}} - D_{\text{test}})/D_{\text{control}} \times 100\%$$

式中: D_{control} 为不加药液的 ABTS⁺ 的吸光度; D_{test} 为加药液的 ABTS⁺ 的吸光度。

1.2.4 还原能力测定^[13] 取 300 μ L 两粤黄檀提取液 (0.5 ~ 2.0 mg/mL), 加入 2.5 mL PBS 溶液 (pH 值 = 7.4)、2.5 mL KFe (CN)₄ (1%), 于 50 °C 恒温 20 min 后, 加入 2.5 mL 三氯乙酸溶液 (10%), 离心 10 min。取上清液 2.5 mL, 加入 2.5 mL 蒸馏水, 0.5 mL FeCl₃ (1%), 混匀, 以蒸馏水为参比, 并以相同浓度 BHT 为阳性对照, 在 700 nm 处测定吸光度。试验平行进行 3 次。

1.2.5 α -葡萄糖苷酶的抑制活性测定 两粤黄檀对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性按照 Sancheti 的方法^[14], 建立 96 微孔板筛选方法, 在 405 nm 处检测 D 值。每孔分别加入 160 μ L 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.8)、10 μ L 1 mmol/L 的 pNPG、10 μ L α -糖苷酶溶液 (1 U/mL) 以及 10 μ L 不同浓度的样品溶液。以不加 4-硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (pNPG) 和 α -葡萄糖苷酶的反应体系作为阴性对照组, 同时将阿卡波糖作为阳性对照组。将上述反应体系在 37 °C 保温 30 min 后, 加入 10 μ L 0.2 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液 4 mL 终止反应, 然后用酶标仪在 405 nm 波长处测 D 值。样品对 α -葡萄糖苷酶抑制率的计算公式为:

$$\text{抑制率} = (D_{\text{空白}} - D_{\text{样品}})/D_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中: $D_{\text{空白}}$ 为不加药液的 α -葡萄糖苷酶溶液的吸光度; $D_{\text{样品}}$ 为加药液的 α -葡萄糖苷酶溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 DPPH 体系抗氧化试验结果

DPPH \cdot 是一种稳定的自由基, 广泛被用作衡量抗氧化

物清除自由基的工具。两粤黄檀茎各提取物 and BHT 清除 DPPH 自由基的能力对比见图 1。从图 1 可看出, EAE、AE 和 EE 对 DPPH 自由基均有清除作用, 并且清除率与提取物浓度成正比。EAE 表现出最强的清除能力, 在浓度从 0.5 mg/mL 升高到 2.0 mg/mL 时, 清除率也从 43.73% 逐步升高到 68.26%。在较低浓度 (0.5 ~ 1.0 mg/mL) 时, EAE 和 AE 的清除能力比阳性对照 BHT 要强, 但在较高浓度 (1.2 ~ 2.0 mg/mL) 时, 各提取物的清除能力均弱于 BHT。计算得到 EAE、AE、EE 以及 BHT 对 DPPH \cdot 的抑制中浓度 (IC₅₀) 分别为: (0.60 \pm 0.05)、(0.86 \pm 0.11)、(1.97 \pm 0.25)、(0.91 \pm 0.16) mg/mL, 在 3 种溶剂提取物中, 清除 DPPH \cdot 的能力强弱顺序为 EAE > AE > EE。

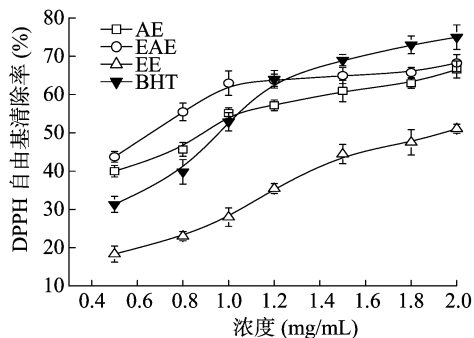


图1 两粤黄檀茎各提取物对DPPH自由基的清除能力

2.2 ABTS⁺ 自由基清除能力

试验结果 (图 2) 表明, EAE、AE 和 EE 均具有很好的清除 ABTS⁺ 的能力, 清除率与药液浓度成正比。在浓度从 0.5 mg/mL 增加到 2.0 mg/mL 时, EAE 的清除率从 45.24% 升高至 85.52%, 抗氧化活性和 BHT 对照相近。计算得到 EAE、AE、EE 以及 BHT 的 IC₅₀ 分别为: (0.63 \pm 0.02)、(0.79 \pm 0.03)、(1.58 \pm 0.25)、(0.55 \pm 0.05) mg/mL, 清除 ABTS⁺ 的能力强弱顺序为 EAE > AE > EE, 与清除 DPPH 自由基能力一致。

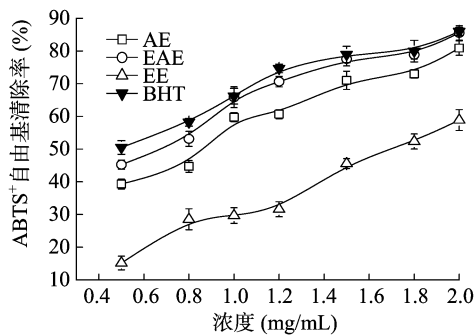


图2 两粤黄檀茎各提取物对ABTS+自由基的清除能力

2.3 还原能力

两粤黄檀茎各提取物都具有还原能力, 在所测浓度范围内, 呈现出较好的量效关系 (图 3)。在 3 种提取物中, EAE 的还原能力远高于其他 2 种提取物, EE 的还原能力最弱, 在所测最高浓度 2.0 mg/mL 时, 吸光度仅为 0.3。在浓度范围为 0.8 ~ 2.0 mg/mL 内, EAE 的还原能力与 BHT 较为接近。而在浓度为 0.5 mg/mL 时, BHT 的还原能力均小于各个提取物。用 EC₅₀ 值 (吸光度达到 0.5 时的有效浓度) 表示各提取

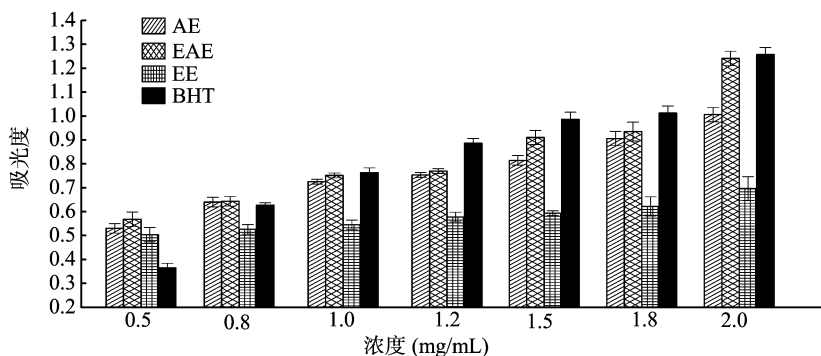
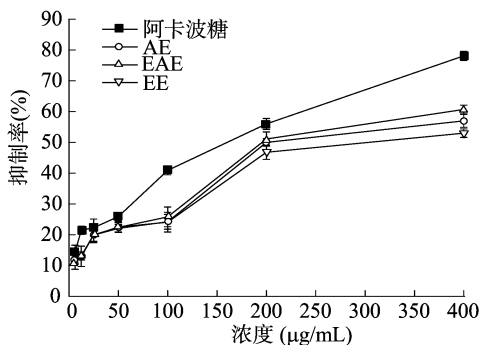


图3 两粤黄檀茎各提取物还原能力

物的还原能力, 结果为 $EAE [(0.51 \pm 0.02) \text{ mg/mL}] > AE [(0.52 \pm 0.03) \text{ mg/mL}] > EE [(0.60 \pm 0.03) \text{ mg/mL}] > BHT [(0.65 \pm 0.05) \text{ mg/mL}]$ 。

2.4 α -葡萄糖苷酶抑制活性

对 α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究一直是降糖机制研究中很活跃的方面。从图 4 可以看出, 各提取物和阳性对照阿卡波糖在浓度范围内 ($6.25 \sim 400.00 \mu\text{g/mL}$) 抑制率均随浓度升高。各提取物到达一定浓度 ($200 \mu\text{g/mL}$) 后, 抑制率趋于平缓。各提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性从大到小依次为 $EAE [IC_{50} = (279.86 \pm 2.97) \mu\text{g/mL}] > AE [IC_{50} = (330.15 \pm 2.03) \mu\text{g/mL}] > EE [IC_{50} = (396.07 \pm 2.06) \mu\text{g/mL}]$, 但抑制活性均弱于阿卡波糖 [$IC_{50} = (122.34 \pm 1.58) \mu\text{g/mL}$]。表明乙酸乙酯提取物具有较佳的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

图4 两粤黄檀茎提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

3 结论

研究表明, 两粤黄檀茎各溶剂提取物对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基均具有较强的清除能力, 对 Fe^{3+} 具有较强的还原能力, 并且对 α -葡萄糖苷酶均具有较强的抑制效果, 3 种提取物的抗氧化以及 α -葡萄糖苷酶抑制活性顺序均为 $EAE > AE > EE$ 。两粤黄檀茎提取物, 特别是乙酸乙酯提取物具有较好的开发天然抗糖尿病药物的潜力, 该结果为两粤黄檀在食品、医学领域进一步开发利用提供了一定的参考依据。

参考文献:

[1] Kameswararao B, Kesavulu M M, Apparao C. Evaluation of antidiabetic effect of *Momordica cymbalaria* fruit in alloxan-diabetic rats

[J]. Fitoterapia, 2003, 74(1/2): 7-13.

[2] Yen F L, Wu T H, Lin L T, et al. Concordance between antioxidant activities and flavonol contents in different extracts and fractions of *Cuscuta chinensis* [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 455-462.

[3] Khan R A, Khan M R, Sahreen S, et al. Assessment of flavonoids contents and *in vitro* antioxidant activity of *Launaea procumbens* [J]. Chemistry Central Journal, 2012, 6(1): 43-54.

[4] Adefegha S A, Obboh G. In vitro inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in rat pancreas [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(10): 774-781.

[5] Mohamed Sham Shihabudeen H, Hansi Priscilla D, Thirumurugan K. Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats [J]. Nutrition & Metabolism, 2011, 8(1): 46-50.

[6] Mooradian A D, Thurman J E. Drug therapy of postprandial hyperglycemia [J]. Drugs, 1999, 57: 19-29.

[7] Kim Y M, Wang M H, Rhee H I. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark [J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(3): 715-717.

[8] Choi C W, Choi Y H, Cha M R, et al. α -Glucosidase inhibitors from seed extract of *Paeonia lactiflora* [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2009, 52(6): 638-642.

[9] Zhao Q, Guo J, Zhang Y. Chemical and pharmacological research progress of Chinese drug "JiangXiang" (*Lignum Dalbergiae Odoriferae*) [J]. J Chin Pharm Sci, 2000, 9(1): 1-5.

[10] 马海民, 程颖华. 丹参檀香浸膏对糖尿病慢性并发症防治的作用 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(27): 3773.

[11] 王辉, 梅文莉, 赵夏博, 等. 降香檀的化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(10): 20-23.

[12] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 343.

[13] 霍丽妮, 廖艳芳, 陈睿, 等. 狐狸尾不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 155-158.

[14] Sancheti S, Sancheti S, Seo S Y. Evaluation of antiglycosidase and anticholinesterase activities of *Boehmeria nivea* [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 23(2): 236-240.