

桑叶中 α -葡萄糖苷酶活性调节成分的研究

马庆一, 时国庆, 陈春涛, 孙佳, 陈晓燕
(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 从桑叶中提取、分离并部分纯化了多糖和黄酮。酶反应动力学研究表明, 桑叶多糖是良好的 α -葡萄糖苷酶竞争性抑制剂, 其抑制率约比拜糖平片高8倍多, 抑制率随浓度升高而增大, 作用时间为5min时抑制效果最好。桑叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶有激活作用, 是潜在的升糖功能因子。在桑叶黄酮加入乳化剂硬脂酸单甘酯, 可改善黄酮在水中的分散度, 解决了水溶性不佳的黄酮酶活性调节剂的动力学测定问题。

关键词: α -葡萄糖苷酶抑制剂; 多糖; 黄酮; 糖尿病; 桑叶

Studies on Inhibitor Effects and Activator of α -glucosidase in Mulberry Leaves

MA Qing-yi, SHI Guo-qing, CHEN Chun-tao, SUN Jia, CHEN Xiao-yan
(College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Polysaccharide and flavones were extracted, isolated, and partially purified from mulberry leaves. The results from studies by using enzymatic kinetics showed that, mulberry leave polysaccharide was an excellent competitive inhibitor of α -glucosidase for glucose releasing. Its inhibitory rate increased with increasing concentration. The optimum acting time for polysaccharide inhibition was 5min. Mulberry leave flavone was found as an activator of α -glucosidase, a potential functional factor for increasing blood sugar. Glycerol monostearate, as an emulsifier, was introduced into the enzymatic reaction solvent system to enhance the homogeneity of flavones in water.

Key words: inhibitor of α -glucosidase; polysaccharide; flavones; diabetes; mulberry leaves

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0108-04

糖尿病是严重威胁人类健康的慢性病之一。预计到2010年, 全球糖尿病患者将达2.2亿。据中国糖尿病协会报告, 我国目前已成世界糖尿病第三大国, 其发病率仅次于心脑血管疾病、癌症而居第三位^[1], 患者超过4000万, 且呈上升趋势, 并迅速向低龄人群扩散^[2], 因此, 如何有效防治糖尿病已成中国乃至世界食品及医药界的重点攻关课题。

α -葡萄糖苷酶是饮食中碳水化合物经消化并最终释放出葡萄糖的关键酶。在消化道内, 淀粉分子首先水解为以寡糖为主的糊精, (在 α -葡萄糖淀粉酶作用下), 或麦芽糖(在 β -葡萄糖苷酶的作用下), 二者均不能直接被肠壁细胞吸收, 须赖以小肠绒毛上皮细胞刷状膜上的 α -葡萄糖苷酶, 最终释出葡萄糖^[3]。 α -葡萄糖苷酶分子中拥有与寡糖等的络合位点, 其抑制剂可竞争性地占据它, 延缓单糖生成, 从而达到平抑血糖的目的^[4]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可有效地减少餐后高血糖对机体的危

害, 显著减少糖尿病并发症, 降低其死亡率。

桑叶有降糖功效已屡见于传统医书的记载。日本率先出现野尻霉素、桑叶多糖等桑叶降血糖活性成分的报道^[5], 在中国亦有桑叶、桑枝提取物降糖产品的问世, 但迄今为止, 虽有少数药物有一定疗效, 但真正疗效好且价格可以接受的产品尚需时日, 主要的瓶颈在于目前对桑叶各成分的降糖效果以及其相互作用的研究还略显不足, 而本工作则是对此领域的一个成功的尝试。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

微量移液器 QYQ 北京表云航空仪表有限公司; 紫外可见分光光度计 756MC 上海分析仪器厂; 电热恒温水浴锅 HH-S11-2 北京长安科学仪器厂; 旋转蒸发器

收稿日期: 2005-01-28

作者简介: 马庆一(1944-), 男, 教授, 博士后, 研究方向为保健食品功能因子和食品添加剂。

ZFQ85A 上海医械专机厂; 三用紫外灯 ZF-C 上海康禾光电仪器有限公司; 高速台式离心机 TGL-18C 上海安亭科学仪器厂; 粉碎机 FFC-15 山东即墨农业机械厂; 自动收集器 2110 Coupler ail emendation await et empennage; 离心沉淀器 80-1 上海手术器械厂; 磁力搅拌器 85-2 江苏中大仪器厂。

1.1.2 试剂

α -葡萄糖苷酶 本系微生物实验室自备; 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) E.Merck 公司; 对硝基苯酚(PNP) 仪征市鼎信化工有限公司; 薄层硅胶(GF254-R) 青岛海洋化工有限公司; 桑叶 郑州中药城; 拜糖平 郑州药店; APD-600 大孔树脂 西安树脂厂; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 桑叶多糖的提取、精制和跟踪测定

取风干、粉碎至 40 目桑叶 40g, 依次用 300ml 乙醚、300ml 乙醇索氏提取 2h, 置于电热套中, 加入 300ml 水, 回流提取 3h, 抽滤得粗提液, 再真空浓缩至 100ml, 以等体积 95% 乙醇处理, 得到的沉淀用丙酮、乙酸乙酯、乙醚各洗涤三次, 溶于 40ml 热水, 加入活性炭及硅藻土各 10g 静置过夜脱色, 抽滤得粗多糖液, 用大孔吸附树脂纯化, 以蒸馏水洗至还原糖检测反应呈阴性为终点^[6]。洗脱液浓缩至 40ml, 加乙醇(2:1, V/V)沉淀, 抽干, 置入干燥器备用。

多糖的跟踪检测(Molish 反应): 取层析液 1ml 于试管中, 加入数滴 1% α -萘酚试剂, 沿管壁加入少量浓硫酸。样品液与浓硫酸接触面产生紫红色环, 表明可能存在还原糖或甙类。

1.2.2 桑叶黄酮的提取、分离和跟踪测定

取风干、粉碎至 40 目桑叶 40g, 置于 1000ml 圆底烧瓶中, 加入 95% 乙醇 400ml, 水浴回流 2h, 过滤。重复上述操作三次, 合并滤液, 浓缩至干, 加入 40ml 水, 抽滤。滤液用石油醚(1:1, V/V)萃取三次, 取水相, 用食盐饱和并调节 pH 至 1, 再用乙酸乙酯(1:1, V/V)萃取三次, 合并乙酸乙酯相。用 5% NaHCO_3 水溶液(1:2, V/V)处理乙酸乙酯相, 取水相调 pH 至 1 食盐晶体饱和, 用乙酸乙酯反萃取。重复此操作三次。浓缩最终的乙酸乙酯相, 定容至 40ml。置于冰箱中备用。

黄酮的跟踪检测: 取乙酸乙酯相 1ml 于试管中, 加入少量镁粉, 滴入浓盐酸数滴, 产生的泡沫处显红色则可能含有黄酮类物质^[7]。

1.2.3 黄酮含量的测定

芦丁标准曲线的制作: 配制 0.145mg/ml 芦丁标准品液, 取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml 分别置于 25ml 容量瓶中, 加 50% 乙醇至 6ml, 加 5% 亚硝酸钠

1ml, 摇匀静置 6min, 加 10% 硝酸铝 1ml, 摇匀静置 6min, 加 10% 氢氧化钠 10ml, 用 50% 乙醇定容, 摇匀静置 15min, 以不加芦丁的溶液为空白, 509nm 波长处测定吸光度。

样品总黄酮含量的测定: 取样品乙酸乙酯溶液 1ml, 稀释 50 倍, 操作同上。

1.2.4 桑叶成分的酶反应动力学实验

1.2.4.1 溶液配制

PNPG 20mmol/L(6.03g PNPG溶于100ml蒸馏水中) 稀释至不同浓度备用;

硬脂酸单甘酯乳浊液 13mg 硬脂酸单甘酯溶于 13ml 蒸馏水中, 均质^[8];

多糖溶液 4.0g/L(精制多糖样品 0.400g 溶于 100ml 水中), 稀释至不同浓度备用;

黄酮溶液 精制黄酮乙酸乙酯溶液, 测含量, 稀释至不同浓度备用;

拜糖平 取 2 片拜糖平(每片 50mg)研碎, 溶于水, 定容至 25ml, 离心, 取上清液备用。

1.2.4.2 PNP 标准曲线的绘制

PNP 的标准曲线的绘制 选取 0~71.8 $\mu\text{mol/L}$ 的十个浓度, pH 为 7.0 时 400nm 处测定吸光值做标准曲线。

1.2.4.3 抑制率的测定

取 4 个塑料试管, 分别加入 1ml 1mmol/L 的 PNPG 和 1ml pH7.0 缓冲溶液 37℃ 下, 保温 5min 后, 加入试剂。如下:

试管 1 1ml 蒸馏水

试管 2 0.5ml 蒸馏水+0.5ml 抑制剂

试管 3 0.5ml 蒸馏水+0.5ml 酶

试管 4 0.5ml 抑制剂+0.5ml 酶

将 4 个试管 37℃ 下保温 15min 后, 分别加入 2.5ml Na_2CO_3 (0.2mol/L), 终止反应, 于 400nm 读数。试管 3 以试管 1 为对照, 测吸光值为吸光值 1; 试管 4 以试管 2 为对照, 测吸光值为吸光值 2。

抑制率 = (吸光值 1 - 吸光值 2) / 吸光值 1 \times 100%

注: 抑制剂为多糖时, 加入的为蒸馏水; 抑制剂为黄酮时, 取 0.5ml 的黄酮乙酸乙酯溶液于蒸发皿中自然烘干后, 加入 0.5ml 水, 移入试管, 搅拌, 蒸馏水用同体积的硬脂酸单甘酯乳浊液代替。

黄酮抑制率 = (吸光值 2 - 吸光值 1) \times 100% / 吸光值 1

1.2.4.4 抑制剂作用时间对抑制率的影响

取黄酮浓度为 0.64mg/ml, 多糖为 1.33mg/ml, 分别作用 1、2、5、10、15、20min 终止反应, 测定抑制率。

1.2.4.5 抑制剂浓度对抑制率的影响

取浓度分别为 0、0.155、0.32、0.64、1.28、1.796、

2.02、2.89mg/ml 的黄酮溶液, 测定抑制率。

取浓度分别为 2.0、1.33、1.0、0.8、0.65、0.57、0.50、0.40mg/ml 多糖溶液, 测定抑制率。

取拜糖平溶液 0.5ml, 测定抑制率。

1.2.4.6 抑制类型的确定

多糖浓度为 1.33mg/ml, 分别加入 PNPG(浓度为 2、3、5、10mmol/L)测定抑制率, 确定抑制类型。

2 结果与讨论

2.1 提取率

2.1.1 从 40g 桑叶中共得到多糖 0.4g, 提取率为 1%。

2.1.2 芦丁标准曲线的绘制配制芦丁标准溶液, 以浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标作图为一曲线见图 1。

所得线性回归方程为: $Y=7.1129x-0.0016$, 黄酮测定值为 0.279。据此计算其浓度为 0.04mol/L, 黄酮的总提取率为 2.4%(以芦丁计)。

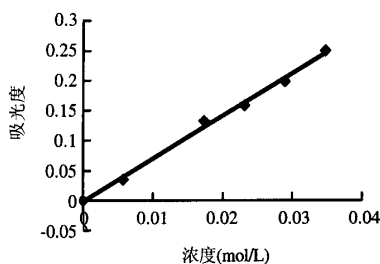


图1 芦丁标准曲线

Fig.1 Standard curve of rutin

2.2 抑制剂的浓度对抑制效果的影响

2.2.1 PNP 标准曲线的绘制

以不同浓度的 PNP, 在 pH 为 7.0 时, 400nm 处测吸光值, 结果见图 2。

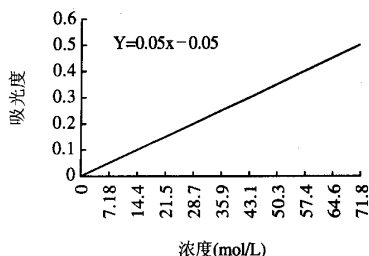


图2 PNP 标准曲线

Fig.2 Standard curve of PNP

2.2.2 抑制剂浓度对抑制效果的影响

在六个不同多糖溶液浓度下, 测得其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 如图 3 所示。

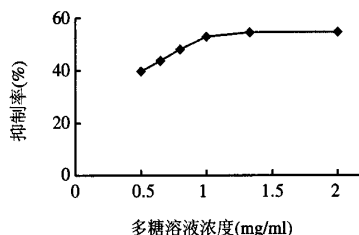


图3 多糖浓度对抑制效果的影响

Fig.3 Effect of polysaccharide concentration on inhibitory activity

从图 3 可以看出, 多糖浓度在 0.5~1.0mg/ml 时, 其抑制率与浓度呈线性关系; 当浓度 ≥ 1.0 mg/ml 时, 其增大坡度趋平。抑制率的多糖浓度为 2.00mg/ml 时达到最大值, 为 59.87%。

选取拜糖平溶液为抑制剂标准对照物。每次加入 0.5ml 拜糖平溶液, 测其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 三次测定结果的平均值为 38.57%(对应于拜糖平片 2mg), 略低于多糖浓度为 0.50mg/ml(0.5ml 溶液, 净重为 0.25mg)时的抑制率 39.73%。由此可见, 桑叶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率约比拜糖平片高 8 倍多一些, 但其成本要低得多, 因此具有良好的开发价值。

选取七个不同的黄酮浓度, 研究其对 α -葡萄糖苷酶活性的调节作用。结果出人意料地发现, 桑叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶有激活作用, 其激活倍数见图 4。

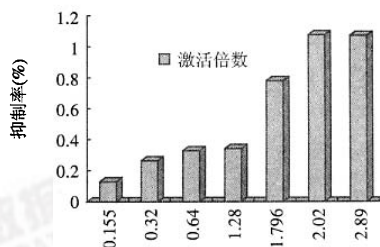


图4 不同浓度黄酮的激活作用

Fig.4 Activation for various flavonoid concentration

当黄酮浓度为 2.02mg/ml 时, 其对 α -葡萄糖苷酶的激活倍数达到最大值 1.074, 即酶活性为原来的 2.074 倍。此结果披露的事实说明了, 若欲将桑叶提取物用来降低餐后血糖, 应当剔除其中的黄酮, 方能最大限度地增强降糖效果。而经分离纯化后的桑叶黄酮可能是潜在的功能因子, 用于低血糖病人或运动员等激烈运动前补充热量。

2.3 抑制剂作用时间对抑制效果的影响

选取不同的抑制剂作用时间, 测得各自相应的时间下, 多糖对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率, 结果见图 5。

由图 5 可见, 抑制剂作用时间在 0~5min 之间时, 抑制率呈上升趋势。超过 5min 后, 则不再升高。可见

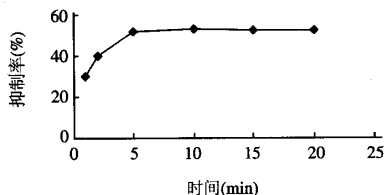


图5 多糖作用时间对抑制率的影响

Fig.5 Effect of action time with polysaccharide on inhibition rate

作用时间 5min 已足于达到最大抑制效果。

在不同作用时间下, 黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的激活倍数列举如图 6。

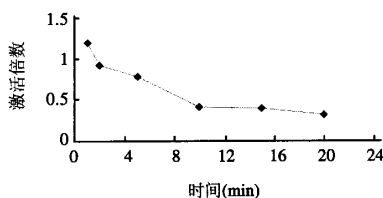


图6 黄酮作用时间对激活倍数的影响

Fig.6 Effect of action time with flavonoid on activation folds

如图 6 所示, 黄酮对 α -葡萄糖苷酶活性的激活倍数随作用时间的延长而下降。

2.4 多糖抑制剂抑制类型的判断

以多糖浓度为 1.33mg/ml, 取四个不同的底物浓度, 测得它们的抑制率如图 7 所示。

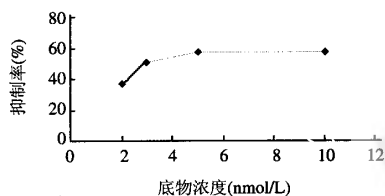


图7 底物浓度对抑制率的影响

Fig.7 Effect of substrate concentration on inhibition rate

由上图可以看出, 抑制率随底物浓度的增大而增加, 桑叶多糖应为竞争性抑制剂。

2.5 硬脂酸单甘酯用于提高黄酮在酶反应溶液中的分散度

由于桑叶黄酮在水中溶解度有限, 在酶反应溶液中呈现悬浮状态, 不能完全均相, 势必影响酶反应的正常进行和动力学测定。在本实验中, 我们在反应液中加入乳化剂硬脂酸单甘酯(0.5mg/ml), 以图改善黄酮在水中的分散度, 从取得的结果看来, 利用加乳化剂的方法解决水溶性欠佳的酶活性调节剂的动力学测定问题是行之有效的。加入乳化剂以后, 可能会降低透光率, 影响测定, 但这一问题在试验中并未出现, 估计是因为加入量较少的缘故。

3 结 论

3.1 桑叶多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率约比蔗糖平片高 8 倍多, 且其成本较低, 具有良好的开发价值。

3.2 桑叶多糖浓度在 0.5~1.0mg/ml 时, 抑制率与浓度呈线性关系; 当浓度 ≥ 1.0 mg/ml 时, 其增大坡度趋平。抑制率的多糖浓度为 2.00mg/ml 时达到最大值, 为 59.87 %。

3.3 抑制剂作用时间 5min 时, 达到最大抑制效果。

3.4 桑叶多糖为竞争性抑制剂。

3.5 桑叶黄酮对 α -葡萄糖苷酶有激活作用。浓度为 2.02mg/ml 时, 酶活性为原来的 2.074 倍。此事实说明, 若欲将桑叶提取物用来降低餐后血糖, 应当剔除其中的黄酮, 而桑叶黄酮是潜在的升糖功能因子。

3.6 加入乳化剂硬脂酸单甘酯, 可改善黄酮在水中的分散度, 解决了水溶性欠佳的黄酮酶活性调节剂的动力学测定问题。

参考文献:

- [1] 戴岳, 刘学英. 地肤子总甙降糖作用的研究[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 36-38.
- [2] 车今智, 傅德贤, 欧阳藩. 植物药治疗糖尿病的研究概况[J]. 中草药, 2004, 35(1): 112-113.
- [3] 李宏, 黄金山, 胡浩, 等. 桑叶对 α -葡萄糖苷酶活力影响及降糖机理研究[J]. 中国蚕业, 2003, (5): 19-20.
- [4] 邹宇晓, 廖森泰, 刘学铭, 等. 桑树资源治疗糖尿病研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 265-268.
- [5] 欧阳臻, 陈钧. 桑树的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 江苏大学学报, 2003, 24(6): 39-43.
- [6] 赵骏, 钟蓉, 王洪章, 等. 桑树多糖提取工艺优选[J]. 中草药, 2000, 31(5): 347-348.
- [7] 杨普香. 桑叶黄酮类化合物的测定方法研究[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 81.
- [8] 张万福. 食品乳化剂[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.

欢迎订阅 2006 年《食品科学》杂志