

酸味中药抗糖尿病活性成分群筛选*

郑伟锋 杨梅 邓翀**

(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 比较12种酸味中药抗 α -淀粉酶活性差异。方法 通过体外模型实验测定 α -淀粉酶活性的方法,对12味酸味中药进行 α -淀粉酶抑制活性筛选。结果 石榴皮、金樱子、山茱萸 α -淀粉酶抑制半数抑制率生药量分别为0.0203 mg、0.0413 mg、0.0579 mg。结论 石榴皮、金樱子、山茱萸抗 α -淀粉酶活性相对较强。对其进一步分离、纯化并提取活性部位,可望获得抑制活性更强的中药 α -淀粉酶抑制剂。

关键词:酸味中药; α -淀粉酶; 糖尿病

中图分类号: R 587.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2015)06-0091-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.06.033

Screening of Active Constituents in Sour Chinese Medicine Against Diabetes

Zheng Weifeng, Yang Mei, Deng Chong

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

Abstract Objective: To compare the difference of 12 kinds of sour Chinese medicine against α -amylase activity. **Methods:** The α -amylase activity was determined by vitro model test and its inhibition from the 12 kinds of sour Chinese medicine were screened. **Results:** The half inhibiting rate of α -amylase activity of Shiliupi, Jinyingzi and Shanzhuyu were 0.0203 mg, 0.0413 mg and 0.0579 mg respectively. **Conclusion:** The activity of α -amylase of Shiliupi, Jinyingzi and Shanzhuyu is relatively strong. The active part was further separated, purified and extracted and it is expected to be more powerful than the Chinese medicine in inhibiting α -amylase activity.

Keywords sour Chinese medicine, α -amylase, diabetes

糖尿病发病率高、流行快、经济消耗大,已成为威胁全球人类健康的严重疾病,至今没有根治的方法,这意味探讨治疗糖尿病方法已成为人类迫在眉睫的研究课题。现代医学在防止糖尿病方面主要以控制血糖、血压等基础治疗为主。但随着患者病程的发展会逐渐出现耐药性;而中医药从整体出发多成分、多靶点的特点在防治糖尿病方面逐渐受到重视。朱德增教授十几年的临床经验和研究^[1,2]结果表明:酸味中药复方具有防治糖尿病的科学性、有效性。基于此,本研究提出酸味中药可能通过“酸入肝”,防治糖尿病的研究思路。

本项目通过筛选酸味中药防治糖尿病活性成分群,为酸味中药临床防治 II 型糖尿病提供依据,为中医药防治糖尿病开辟新思路和新方法。

1 仪器与试药

UV1102 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司);GB204 型电子分析天平(梅特勒·托利多);SG8200HD 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHB-3 型循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);KDM 型可控调电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司);HH-2 型水浴锅(金坛市顺发仪器有限公司);移液器(大龙兴创实验仪器

* 基金项目:陕西省级大学生创新创业训练计划项目(1690)

** 通讯作者:邓翀(1978-),男,博士,副教授,主要从事中药炮制化学及中药炮制原理研究。E-mail: fmmudz217@126.com.

(北京)有限公司)。

白芍等 12 味药材均购于西安万寿路药材市场;3,5-二硝基水杨酸(上海科丰化学试剂有限公司,批号 20140108); α -淀粉酶(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号 20120205);可溶性淀粉(天津市田里化学试剂有限公司,批号 20110308);其它试剂均为国产分析纯。

2 实验内容

2.1 供试品的制备

2.1.1 样品的制备 精密称定白芍等药材各 10.0 g,10 倍量蒸馏水提取两次,每次 1 h,过滤合并滤液,水浴浓缩至 50 mL。

2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 DNS 的制备 精密称定 3,5-二硝基水杨酸 3.25 g 置于 200 mL 蒸馏水中,37 °C 水浴中搅拌溶解,称定氢氧化钠 13.0 g 置于 162.5 mL 蒸馏水中,于超声波清洗器中超溶。量取丙三醇(甘油)22.5 mL,将丙三醇、氢氧化钠水溶液与 3,5-二硝基水杨酸溶液混合,摇匀,定容至 500 mL^[3]。有研究表明^[4]:DNS 的量在相同体积时所测的吸光度均无太大的变化,在 100 min 内 DNS 试剂很稳定,其浓度不随放置时间的变化而变化,所以 DNS 量的选择可在 1~5 mL,放置时间可在 100 min 内。

2.1.2.2 磷酸盐缓冲液的制备 制备 0.12 mol·L⁻¹ PH=6.1 磷酸盐缓冲液,精密称定磷酸氢二钠 2.1561 g,置于 30 mL 蒸馏水中超声溶解;磷酸二氢钠 5.3711 g,置于 170 mL 蒸馏水中超声溶解;合并二者溶液,调 pH 至 6.1,摇匀即得。

2.1.2.3 柠檬酸缓冲液的制备 制备 0.2 mol·L⁻¹ PH=5.6 柠檬酸缓冲液,精密称定柠檬酸 2.1968 g,于 110 mL 蒸馏水中玻璃棒搅拌溶解;柠檬酸钠 8.5256 g,于 290 mL 蒸馏水中玻璃棒搅拌溶解;合并二者溶液,调 pH 至 5.6,摇匀即得。

2.1.2.4 淀粉溶液的制备 制备 1% 淀粉溶液,精密称定淀粉 2.0146 g,量取已配制的柠檬酸缓冲液 200 mL,将淀粉置于柠檬酸缓冲液,在 37 °C 水浴中加热搅拌溶解,摇匀即得。

2.1.2.5 α -淀粉酶溶液的制备 制备 8 mg·mL⁻¹ α -淀粉酶溶液,精密称定 α -淀粉酶 3.6066 g,置于 450 mL 蒸馏水中,在 37 °C 水浴中搅拌溶解,即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 波长范围考察 精密量取 α -淀粉酶溶液 3.0 mL 置于试管中(标记为 A),再另取一试管不加 α -淀粉酶溶液做空白对照(标记为 B)。分别移取 0.1 mL 磷酸盐缓冲液、0.1 mL 柠檬酸缓冲液、0.2 mL 1% 淀粉溶液,用蒸馏水定容至 4 mL,摇匀,37 °C 水浴锅内水浴 30 min。再分别移取 0.75 mL DNS 加入各试管,摇匀,100 °C 水浴锅内水浴 10 min,取出试管放至室温,将各试管溶液与蒸馏水 1:4 稀释混匀。在 800~200 nm 范围内,以 B 溶液做空白调零,对 A 溶液进行全波段扫描,得单一吸收峰,其最大吸光度为 0.958,此时的波长为 470 nm,故选 $\lambda_{\max}=470$ nm 为检测波长^[5]。

2.2.2 α -淀粉酶的线性范围考察 精密量取 α -淀粉酶溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL 分别置于 7 支试管中,随行试剂做空白对照。参照“2.2.1”项下方法加入其它试剂分别得浓度 0.0844、0.1687、0.2531、0.3375、0.4218、0.5062、0.5906 mg/mL 的 α -淀粉酶标准溶液。定其吸光度并计算线性回归方程得 $Y=1.5967X+0.1216$, $R^2=0.9971$, $r=0.9985$ 。说明 α -淀粉酶溶液在浓度范围 0.0844~0.5906 mg/mL 之间线性关系良好。

2.2.3 α -淀粉酶稳定性 取 3.0 mL α -淀粉酶溶液于试管中,另取一试管加 3.0 mL 蒸馏水做空白对照。参照“2.2.1”项下方法加入其它试剂,在 470 nm 下测定吸光度值。每隔 5 min 测定吸光度值,平行测定 18 次。记录数据,计算得 RSD 值为 0.5%,说明 α -淀粉酶溶液在 90 分钟内比较稳定。

2.2.4 样品溶液取样量考察 取 10 支试管分别标记为空白对照管、 α -淀粉酶管、0.1、0.4、0.7、1.0 mL 四个不同浓度的样品管、0.1、0.4、0.7、1.0 mL 四个不同浓度的样品空白对照管,参照“2.2.1”项下方法加入其它试剂,其中因因果溶液颜色较深,与蒸馏水按 1:5 各自稀释混匀测定吸光度。

α -淀粉酶活性抑制率 = $[A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$ ^[6],式中: A_0 为未加样品组吸光度; A_1 为样品组吸光度; A_2 为样品对照组吸光度。

结果中取抑制率在 10%~80% 之间时的取样量做浓度梯度,测定系列吸光度值,计算抑制率。

3 结果

在筛选的 12 味酸味中药中,提取的药物对 α -

淀粉酶都有抑制作用。个体差异见测定数据表1。

表1 酸味中药抑制 α -淀粉酶活性测定数据比较

酸味中药		用药量与相应 α -淀粉酶抑制率									
白芍	用药量(mg)	0.3810	0.6774	1.0584	1.5241	2.0745	2.7095	3.4293	4.2337	5.1228	
	抑制率(%)	13.94	18.15	44.47	63.48	76.57	81.66	85.57	85.62	95.35	
山茱萸	用药量(mg)	0.0106	0.0715	0.1865	0.3577	0.5790	0.8565	1.1180	1.5738	2.0136	2.5077
	抑制率(%)	13.33	60.50	69.32	81.18	89.77	90.90	90.90	92.59	90.10	94.35
覆盆子	用药量(mg)	0.3797	0.6750	1.0548	1.5188	2.0673	2.7002	3.4174	4.2189	5.1049	6.0752
	抑制率(%)	29.42	33.40	44.84	48.88	56.58	72.91	72.24	80.80	89.42	83.68
金樱子	用药量(mg)	0.0017	0.0085	0.0207	0.0381	0.0608	0.0887	0.1219	0.1604	0.2042	0.2532
	抑制率(%)	9.47	22.32	38.62	48.49	59.20	73.76	82.77	90.75	95.93	97.14
诃子	用药量(mg)	0.1692	0.3806	0.6687	1.0574	1.5226	2.0724	2.7069	3.4259	4.2295	
	抑制率(%)	17.62	39.59	51.71	66.76	77.84	80.01	78.44	80.62	82.97	
乌梅	用药量(mg)	0.0017	0.0419	0.1356	0.2829	0.4838	0.7383	1.0463	1.4080	1.8231	2.2919
	抑制率(%)	8.38	19.91	24.59	26.14	44.24	46.40	59.56	63.03	74.03	88.35
青果	用药量(mg)	0.0088	0.0284	0.0594	0.1015	0.1549	0.2195	0.2954	0.3825	0.4808	0.5904
	抑制率(%)	10.20	30.73	31.55	37.62	46.85	45.84	61.52	72.81	85.26	93.06
木瓜	用药量(mg)	0.6765	1.0570	1.5520	2.0717	2.7059	3.4247	4.2280	5.1159	6.0883	
	抑制率(%)	11.96	22.62	37.12	52.55	64.16	71.18	79.73	85.68	90.97	
石榴皮	用药量(mg)	0.0068	0.0106	0.0152	0.0207	0.0271	0.0343	0.0423	0.0512	0.0609	0.0715
	抑制率(%)	26.23	32.48	44.04	50.47	56.39	63.96	65.47	66.16	72.63	82.07
山楂	用药量(mg)	0.0106	0.0342	0.0714	0.1328	0.1863	0.2641	0.3553	0.4601	0.5784	0.7102
	抑制率(%)	12.83	25.29	30.33	47.52	59.73	68.47	76.33	83.33	87.94	91.20
五倍子	用药量(mg)	0.0106	0.0424	0.0954	0.1696	0.2650	0.3814	0.5193	0.6784	0.8584	
	抑制率(%)	20.34	23.39	36.15	54.38	67.01	67.90	75.04	86.84	89.73	
马齿苋	用药量(mg)	1.0538	1.5174	2.0655	2.6976	3.4142	4.2150	5.1002	6.0696	7.1234	8.2614
	抑制率(%)	24.62	27.94	32.74	38.52	47.72	54.67	59.36	65.71	75.94	76.10

根据表1实验数据,计算各酸味中药半数抑制率相应的用药量见表2。

表2 酸味中药抑制 α -淀粉酶活性半数抑制率结果

酸味中药	用药量(mg)
白芍	1.1939
青果	0.2396
山茱萸	0.0579
木瓜	1.9809
覆盆子	1.5976
山楂	0.1437
金樱子	0.0413
石榴皮	0.0203
诃子	0.6281
五倍子	0.1518
乌梅	0.8228
马齿苋	3.6592

分析表2数据:达到半数抑制率时,石榴皮、金樱子、山茱萸这三味中药用药量相对较小,表明其抗 α -淀粉酶活性相对较强,这就意味着在筛选的12味酸性药材中,要达到相同的抗糖尿病效果时,石榴皮等这三味药物比较强。

4 讨论

α -淀粉酶抑制剂抑制食物中淀粉的代谢来影响人体消化道对糖类吸收,其机理为 α -淀粉酶抑制剂能有效的抑制肠道内唾液淀粉酶和胰液淀粉酶活性,阻碍食物中碳水化合物的水解和消化,减少糖分的摄取,降低机体的血糖和血脂水平,从而使机体胰岛素分泌减少,而起到降低用餐后的血糖含量的作用^[7-9]。故本研究根据酸味中药“酸克甘”防治糖尿病的研究思路筛选出来防治糖尿病的酸味中药作 α -淀粉酶抑制剂,具有可行性、可信性、可靠性。(下转第122页)

皮6g,前胡3g,鲜茅根30g,黛蛤散12g(布包),鲜梨一个(连皮去核切片入煎)。”

7 石斛

《中国药典》记载干石斛:“甘,微寒。归胃、肾经。益胃生津,滋阴清热。用于阴伤津亏,口干烦渴,食少干呕,病后虚热,目暗不明。”^[1]干品清热主要用于清虚热,但鲜石斛还被医家用于清实热。

《本草利害》:“虚证宜干,实证宜鲜。”施今墨先生治疗糖尿病常用鲜石斛,并评按:“口渴引饮,消谷善饥,是肺胃热甚,每有石膏、石斛,并大剂投之。”在治疗风湿病热痹“两膝关节足跗肿胀疼痛,影响睡眠,口渴而又不思饮,手足心均发热”时清热祛湿,曾用方:“赤白芍各10g,地骨皮10g,炒山梔10g,北柴胡4.5g,炒丹皮6g,炒丹参6g,鲜生地10g,鲜石斛10g,东白薇6g,嫩青蒿4.5g,桑寄生15g,嫩桑枝15g,油松节24g,左秦艽4.5g,炙草节6g”。《医学衷中参西录》石膏解中治疗“伏温病,壮热烦渴,脉来洪实兼数,大解十日未行”用“生石膏二两,合增液汤,加鲜金钗石斛、香青蒿各三钱。病家疑忌,见者皆以为药性过寒凉。”皆能看出鲜石斛能解实热。

古中医众多书籍中记载了历代医家鲜药治病

(上接第93页)

查询文献发现体内抗 α -淀粉酶活性筛选的6味酸味中药中,五味子、山茱萸、金樱子对 α -淀粉酶的抑制作用相对比较明显^[10]。而本实验结果说明了在体外抗 α -淀粉酶活性筛选的12味酸味中药中,石榴皮、山茱萸、金樱子对 α -淀粉酶活性抑制作用相对最强。由此可见,本实验结果与动物体内实验所得结果并无明显差异。石榴皮在体内对 α -淀粉酶活性抑制作用有待进一步研究。

参考文献

[1]朱德增,周松华,谷丽敏.“酸胜甘”法治疗糖尿病[J]. 中医杂志,1997,38(12):725-726.

[2]曹玉莉,殷桂香,朱德增.酸味中药复方对糖尿病大鼠肾脏AGEs及其受体基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2009,27(2):294-296.

[3]李卫彬,阳文辉,黄锁义.DNS法测定黄柏中总糖的含量[J]. 右江民族医学院学报,2008,30(1):13-14.

[4]田芳年,马连荣,莫肖云.DNS法测定红枣总糖含量

的宝贵经验,现代研究也证实很多鲜药、干药成分有所区别。上述几种中药鲜用时有干药没有的特殊功效,并有不少单味药使用效果甚佳,是干药不能替代的,有很大的研究及临床价值。中医运用鲜药治疗疾病的历史悠久,但由于保存条件等原因鲜药一度退出中药市场,更多有特殊功效和药性发生变化的鲜药,还有更多待我们研究、挖掘,加以推广。

参考文献

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:化学工业出版社,2010:82-255.

[2]陈祖泽.介绍生菜蕺汁治疗血崩症[J]. 中级医刊,1982,(1):51-52.

[3]李忠良.生菜蕺汁治疗血崩[J]. 山东中医杂志,1996,(8):378.

[4]韩轶,戴璨,汤璐璐.艾叶挥发油抗病毒作用的初步研究[J]. 氨基酸和生物资源,2005,(2):14-16.

[5]侯迎迎.艾叶乙酸乙酯部位抗乙肝病毒活性研究及成分分析[D]. 郑州:郑州大学,2013.

[6]高鹤.几种常见单味中草药体外抗菌活性研究[J]. 现代畜牧兽医,2013,(5):42-45.

(收稿日期:2015-02-25 编辑:文颖娟)

[J]. 化工技术与开发,2009,38(9):45-46.

[5]赵蓉,李多伟,任涛.DNS比色法测定白芸豆中 α -淀粉酶抑制剂活性的方法研究[J]. 中成药,2013,35(3):573-576.

[6]蒙跃龙,董彬厂,邓肿.醋制南五味子抗 α -淀粉酶活性部位筛选[J]. 陕西中医,2012,33(11):1547-1548.

[7]周亚兵,朱德增,罗若茵,等.酸味中药复方对2型糖尿病大鼠糖代谢的调节作用[J]. 成都中医药大学学报,2004,27(1):13-16.

[8]浙江,袁萍,叶晓平,等.治疗糖尿病常用中药对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性研究[J]. 中成药,2008,30(11):1661-1664.

[9]吕凤霞,陆兆新. α -淀粉酶抑制剂的研究进展[J]. 食品科学,2002,23(3):152-155.

[10]齐海艳,柴思佳,邓肿,等.6味酸性中药对急性糖尿病小鼠肝脏氧化应激及病理变化的影响[J]. 时珍国医国药,2014,25(7):1573-1575.

(收稿日期:2015-03-20 编辑:文颖娟)