

蜂胶和杨树胶中黄酮类成分及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究

魏 萍 丁 月 鲁 群 谭 军 张久亮 刘 睿

华中农业大学食品科学技术学院/武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心/
环境食品学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过乙醇提取、液液萃取结合柱层析分离得到河南蜂胶和杨树胶中不同极性组分, 利用高效液相色谱分析判定分离效果、确定分离成分; 采用 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选模型评价各分离组分的体外降血糖活性; 通过链脲佐菌素诱导的小鼠高血糖模型进行口服糖耐量实验, 评价该分离组分体内抑制肠道内 α -葡萄糖苷酶的功效。结果显示, 蜂胶及其同源杨树胶的 50% 乙醇洗脱组分体外抑制 α -葡萄糖苷酶效果最优, IC_{50} 值分别为 39.03 ± 2.76 和 $28.28 \pm 3.79 \mu\text{g/mL}$, 并能有效抑制糖尿病小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶活性, 显著降低糖尿病小鼠的餐后血糖水平, 有利于血糖水平恢复和保持血糖稳定; 高效液相色谱分析结果发现, 蜂胶及其同源杨树胶的 50% 乙醇洗脱组分中皆含有槲皮素、山奈酚、异鼠李素、芹菜素、白杨素和高良姜素等黄酮类化合物。

关键词 杨树胶; 蜂胶; α -葡萄糖苷酶; 高效液相色谱; 黄酮类化合物

中图分类号 S 896.6; S 897 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0092-08

近年来, 蜂胶在医药和保健行业的成功应用使得人们对蜂胶的植物来源和胶源植物的化学成分愈加关注。研究报道, 北半球温带地区蜂胶的植物来源是杨属中的黑杨派杨树^[1]。同时研究表明, 蜂胶提取物与其胶源植物杨树芽提取物的成分具有遗传相似性, 如两者含有组成成分相似的黄酮类和酚酸类等生物活性物质^[2]。此外, 杨树芽提取物已被证明具有良好的抗氧化、抗肿瘤、防腐抑菌、降尿酸和防治溃疡等^[3-8]作用。所以, 杨树胶作为杨树芽提取物制成品, 也即蜂胶的胶源物质, 其对人类健康调控方面的潜力十分值得探究和发掘。

蜂胶的降血糖作用是近年来其众多药理活性中的研究热点。蜂胶不仅可以明显改善自发性糖尿病大鼠的糖脂代谢及抑制胰岛素抵抗^[9], 而且对 I 型糖尿病大鼠血液和肝肾的氧化应激损伤有不同程度的改善^[10]。然而, 关于蜂胶的胶源植物即杨树芽提取物在降血糖方面的相关研究却少见报道。

α -葡萄糖苷酶主要分布于小肠黏膜刷状细胞表面, 能够催化多糖和寡糖分子水解生成葡萄糖从而

被人体吸收, 引起血糖的升高^[11]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂类药物能够通过降低 α -葡萄糖苷酶的活性、调节餐后胃肠激素的方式而有效控制餐后血糖的升高, 达到降血糖的效果^[12]。自 1990 年代起, 糖苷酶抑制剂就开始作为治疗糖尿病的一种途径受到人们的关注。然而阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇等化学合成类 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有一定的副作用, 通常表现为腹部不适、胀气和腹泻等不良反应, 所以植物类来源的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂受到研究者们的青睐^[13]。基于蜂胶已被证明的良好降血糖活性, 深入研究蜂胶的胶源植物提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果及其作用的主要成分, 对于开发植物来源的天然 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 以及探究其降血糖的作用机制有着重要意义。

本研究通过考察河南蜂胶及其胶源物质杨树胶在体内和体外条件下对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果, 以评价其降血糖的可能性; 并通过高效液相色谱对其中主要作用成分进行分析, 挖掘蜂胶胶源物质中的降血糖功效成分, 期望为开发植物来源的降血糖

收稿日期: 2017-12-14

基金项目: 武汉市委组织部“黄鹤英才计划”(武人才办[2017]1 号); 武汉市蜂产品质量控制工程技术研究中心(2016020605111000); 武汉市应用基础研究计划(2015020101010073); 武汉市软科学研究计划(2015040606010256)

魏 萍, 硕士研究生, 研究方向: 蜂产品化学与分子营养. E-mail: wwwxiaop@126.com

通信作者: 刘 睿, 博士, 教授, 研究方向: 蜂产品化学与分子营养. E-mail: liurui@mail.hzau.edu.cn

产品提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蜂胶、同源杨树胶采自河南; α -葡萄糖苷酶(G5003)购于Sigma公司;*p*-硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷S10137、阿卡波糖、咖啡酸、对香豆酸、阿魏酸购自上海源叶生物科技有限公司;芦丁、白杨素、杨梅黄酮、槲皮素、山奈酚、高良姜素购自芜湖威尔塔医药科技有限公司;乙腈(色谱纯)购自Fisher公司;所有分离用有机溶剂均为国产分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

健康SPF级雄性昆明种小鼠,体质量(20 ± 2)g,购于武汉生物制品研究所有限责任公司,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2012-2013。饲养条件:室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\% \pm 5\%$,分笼饲养,饲料充足,饮水不限。

1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪,Waters e2695,Waters 中国有限公司;多功能酶标仪,Motiskan GO 赛默科技有限公司;罗氏罗康全血糖仪,活力型,德国罗氏诊断公司。

1.3 试验方法

1)河南蜂胶和杨树胶粗提取物的制备与分离。分别取蜂胶、杨树胶固状胶体粉碎后,各准确称取40.0 g粉末,用石油醚超声除去蜡质后,再分别以400 mL 75%乙醇超声提取1 h,过滤得到上清液,合并3次上清液得到提取液;提取液真空旋蒸浓缩后冻干,分别得到蜂胶粗提取物(crude extraction of propolis, CEP)、杨树胶粗提取物(crude extraction of poplar resin, CEPR)。

2)种粗提取物分别经XAD-2大孔树脂吸附,再以30%、50%、80%和95%乙醇依次洗脱,得到蜂胶30%乙醇洗脱液即蜂30%(30% ethanol eluent of propolis, 30% EEP),依此类推得到蜂50%(50% EEP)、蜂80%(80% EEP)、蜂95%(95% EEP);杨树胶不同比例乙醇洗脱液即杨30%(30% ethanol eluent of poplar resin, 30% EEPR)、杨50%(50% EEPR)、杨80%(80% EEPR)、杨95%(95% EEPR)各分离组分。

2)河南蜂胶和杨树胶中总酚、总黄酮含量的测定。总酚含量的测定:蜂胶、杨树胶的粗提取物及各

分离组分中总酚含量的测定参照张红城等^[14]采用的Folin-Ciocalteu比色法。建立没食子酸标准曲线,得回归方程 $Y=0.1084x+0.018(R^2=0.9994)$ 。样品测定时根据不同分离组分的浓度不同取样量也不同,而吸光度取值0.2~0.8。

总黄酮含量的测定参照董捷等^[15]采用的亚硝酸铝显色法。建立芦丁标准曲线,得回归方程 $Y=0.0071x+0.0084(R^2=0.9995)$ 。样品测定时根据不同分离组分的浓度不同而取样量也不同,吸光度取值0.2~0.8。

3)河南蜂胶和杨树胶的HPLC分析。样品制备:将蜂胶、杨树胶粗提取物和各分离组分溶解于色谱甲醇中,并配制为1 mg/mL的同质量浓度溶液,然后通过0.45 μm 有机微孔滤膜过滤得到HPLC分析液。

HPLC条件:参照王冰^[16]建立的方法加以改进。色谱柱:Thermo Hypersil GOLD C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm)色谱柱;流动相为乙腈-0.3%甲酸;梯度洗脱:0~10 min, 15~20 min, 25~30 min, 30~35 min, 40~50 min, 50~70 min, 70~75 min, 75~80 min, 乙腈体积分数相应为15%~20%, 30%~35%, 35%~40%, 40%~45%, 45%~50%, 50%~60%, 60%~90%, 90%~15%;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长280 nm;流速0.8 mL/min。

4)体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定。参考Jeon等^[17]的方法并加以改进。将蜂胶、杨树胶的粗提取物及各分离组分分别以二甲亚砜溶解配制成100 mg/mL的母液,用pH 6.8的磷酸盐缓冲液将样品稀释到不同浓度,取40 μL 稀释后的样品溶液于96孔板中,加入0.25 U/mL的 α -葡萄糖苷酶液20 μL 混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温孵育10 min;然后加入0.5 mmol/L的

-NPG溶液40 μL ,混合均匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应25 min;最后加入0.1 mol/L的 Na_2CO_3 溶液50 μL 终止反应,于405 nm波长下测定吸光度值。计算抑制率,并用SPSS 16.0软件计算半抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{抑制率} = \frac{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)}{A_1 - A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, A_1 为样品溶剂(0.25% DMSO)+酶液+p-NPG反应后的吸光度; A_2 为样品溶剂+缓冲液+p-NPG反应后的吸光度; A_3 为样品(各浓度提取物溶液)+酶液+p-NPG反应后的吸光度; A_4 为样品+缓冲液+p-NPG反应后的吸光度。

5) 糖尿病小鼠口服糖耐量的测定。糖尿病小鼠模型的建立: 小鼠基础饲料适应性喂养 1 周后用高糖高脂饲料喂养 4 周, 4 周时间后连续 3 d 按照小鼠体质量每千克腹腔注射 STZ 溶液 65 mg。1 周后将小鼠禁食 12 h 测定空腹血糖值 (fasting blood glucose, FBG), FBG 值 ≥ 7.8 mmol/L 的小鼠视为 II 型糖尿病造模成功。

口服糖耐量实验 (oral glucose tolerance test, OSTT): 选取 40 只造模成功的糖尿病小鼠随机分成 4 组, 使各组小鼠 FBG 平均值无显著差异。分别设为空白对照组 (DMG)、阳性对照组 (ABG)、蜂 50% 组 (50% EEPG) 和杨 50% 组 (50% EEPRG); 空白组 (DMG) 灌胃相同剂量的 0.5% 羧甲基纤维素钠, 阳性组 (ABG) 灌胃阿卡波糖溶液, 蜂 50% 组 (50% EEPG) 灌胃蜂胶 50% 乙醇洗脱组分, 杨 50% 组 (50% EEPRG) 灌胃杨树胶 50% 乙醇洗脱组分, 以上灌胃剂量按照小鼠体质量每千克分别为 25、200、200 mg。给药 30 min 后按照小鼠体质量每千克灌胃 3 g 蔗糖溶液, 并于口服糖溶液后 0、30、60、120 min 时测定血糖值, 以血糖值对应的时间作出糖耐量曲线^[18], 计算糖耐量曲线下面积 (area under the curve of glucose, AUC), 进一步反映各组样品对糖尿病小鼠肠内 α -葡萄糖苷酶的抑制作用^[19]。

$$\text{AUC}/((\text{mmol} \cdot \text{h})/\text{L}) = 0.5 \times (0.5 \times A + B + 1.5 \times C + D) \quad (2)$$

式(2)中, A、B、C、D 分别为第 0、30、60 和 120 min 测定的血糖值, mmol/L。

1.4 数据处理

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 数据均以平均值 \pm 标准误差表示, 多组间比较用单因素方差分析方法, 两组间比较采用最小显著差 r 检验, $P < 0.05$ 时判为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 河南蜂胶和杨树胶粗提取物及各分离组分的总酚、总黄酮含量

河南蜂胶和杨树胶粗提取物及各分离组分的总酚、总黄酮含量测定结果见表 1。由表 1 可知, 河南蜂胶粗提取物中总酚、总黄酮含量与之前 Ahn 等^[20]报道的中国蜂胶对应的含量类似, 同源杨树胶粗提取物中的总酚、总黄酮含量略低于蜂胶, 但明显高于其他一些天然产物提取物中的多酚含量, 如龙眼 (27.4 mg/g)^[21]。而在本研究采用的分离条件

下, 蜂胶及杨树胶提取物中的酚类化合物、黄酮类化合物主要集中在 50% 乙醇溶液洗脱的组分。通常分离组分的生物活性与其多酚含量呈正相关性, 预示杨树胶的粗提取物及各分离组分很可能都具有较好的生理活性功能。

表 1 粗提取物及各分离组分的总酚和总黄酮含量

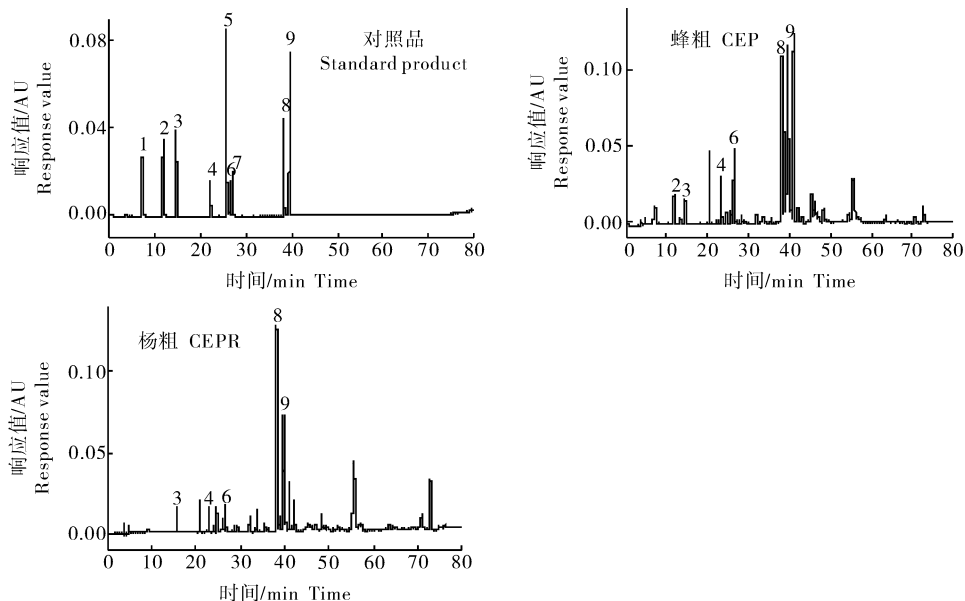
Table 1 The yield, total phenol and total flavonoids content of crude extract and separate components mg/g

样品 Sample	总酚 Total phenols	总黄酮 Total flavonoids
蜂粗 CEP	181.49 \pm 13.77	301.61 \pm 19.02
杨粗 CEPR	137.78 \pm 9.51	147.00 \pm 5.83
蜂 30% 30% EEP	107.60 \pm 14.00	158.42 \pm 26.68
杨 30% 30% EEPR	73.03 \pm 9.63	13.88 \pm 4.53
蜂 50% 50% EEP	224.04 \pm 17.87	446.89 \pm 14.22
杨 50% 50% EEPR	207.00 \pm 20.93	203.86 \pm 15.94
蜂 80% 80% EEP	185.14 \pm 15.21	306.41 \pm 16.99
杨 80% 80% EEPR	169.00 \pm 13.72	151.21 \pm 18.37
蜂 95% 95% EEP	68.05 \pm 12.74	91.12 \pm 4.79
杨 95% 95% EEPR	78.42 \pm 10.73	74.67 \pm 9.96

注: 蜂粗表示蜂胶粗提取物, 蜂 30%、蜂 50%、蜂 80% 与蜂 95% 分别表示蜂胶提取物的 30%、50%、80% 及 95% 乙醇溶液洗脱组分; 杨粗表示杨树胶粗提取物, 杨 30%、杨 50%、杨 80% 与杨 95% 分别表示杨树胶提取物的 30%、50%、80% 及 95% 乙醇溶液洗脱组分。下同。Note: CEP represents the crude extraction of propolis, 30% EEP, 50% EEP, 80% EEP and 95% EEP represent the 30%, 50%, 80% and 95% ethanol eluent of propolis extraction respectively; CEPR represents the crude extraction of poplar resin, 30% EEPR, 50% EEPR, 80% EEPR and 95% EEPR represent the 30%, 50%, 80% and 95% ethanol eluent of poplar resin extraction respectively. The same as below.

2.2 河南蜂胶和杨树胶中黄酮等成分的 HPLC 分析

1) 河南蜂胶和杨树胶粗提取物中黄酮成分的 HPLC 分析。在本研究采用的色谱分离条件下, 9 种蜂胶中常见多酚的对照品和蜂胶、杨树胶粗提取物中的成分达到基线分离, 结果见图 1。通过与对照品的保留时间进行对比, 可初步确定河南蜂胶粗提取物与同源杨树胶粗提取物中皆含有的黄酮类化合物为白杨素 (chrysin)、高良姜素 (galangin)、槲皮素 (quercetin) 和山奈酚 (kaempferol), 两者都含有的酚酸类化合物是异阿魏酸 (isoferulic acid)。由图 1 可看出, 河南蜂胶粗提取物与同源杨树胶粗提取物的出峰情况非常相似, 其中 8 号峰 (白杨素)、9 号峰 (高良姜素) 是两者中含量最丰富的成分。



蜂粗、杨粗分别指代蜂胶粗提取物和杨树胶粗提取物 CEP means the crude extraction of propolis, CEPR means the crude extraction of poplar resin; 1.咖啡酸 Coffeic acid; 2.*p*-香豆酸 *p*-Coumaric acid; 3.异阿魏酸 Isoferulic acid; 4.槲皮素 Quercetin; 5.芹菜素 Apigenin; 6.山奈酚 Karmferol; 7.异鼠李素 Isorhamnetin; 8.白杨素 Chrysin; 9.高良姜素 Galangin.图2同 The same as Fig.2.

图1 对照品和蜂胶粗提取物、杨树胶粗提取物的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference and propolis crude extract and poplar resin crude extract

2)各分离组分的 HPLC 分析。图 2 结果表明,本研究通过 XAD-2 大孔树脂吸附并以不同体积分数乙醇溶液进行洗脱,所得各个洗脱液组分中的物质组成不尽相同。对比图 1 中 9 种蜂胶中常见多酚类化合物对照品的保留时间可知,蜂 30% 出现了酚酸类物质,即保留时间在 15 min 左右的异阿魏酸;蜂 50% 和杨 50% 中皆含有保留时间在 22~42 min 之间的槲皮素、山奈酚、芹菜素、异鼠李素、白杨素和高良姜素等黄酮类物质;而蜂 80%、杨 80% 中主要成分为保留时间在 37~42 min 之间的白杨素和高良姜素,且相对含量有所增加。

由此可见,本研究采用的分离方法可以在一定程度上实现蜂胶和杨树胶粗提取物中酚酸类和黄酮类物质的分离,当采用低体积分数(30%)的乙醇溶液洗脱,洗脱液极性较强,蜂胶中水溶性酚酸类物质被分离;当采用较高体积分数($\geq 50\%$)的乙醇溶液洗脱,洗脱液极性减弱,得到黄酮类物质^[22-23]。在工业生产中,大孔树脂常用于分离纯化植物提取物^[24],其不溶于酸、碱以及各种有机溶剂,是一种多孔性交联聚合物。本研究所采用的 XAD-2 大孔树脂属于广谱吸附树脂,常用于分离植物提取物样品

中的黄酮类物质。

2.3 河南蜂胶和杨树胶粗提取物及各分离组分对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

表 2 显示了蜂胶、杨树胶的粗提取物和不同体积分数乙醇洗脱所得各组分在体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果。蜂胶粗提取物及各分离组分对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值范围是 $(23.05 \pm 2.91) \sim (121.35 \pm 6.44) \mu\text{g/mL}$;而杨树胶粗提取物及其各个分离组分对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值范围是 $(28.28 \pm 3.79) \sim (157.86 \pm 2.54) \mu\text{g/mL}$ 。可见两者的 IC_{50} 值范围相当,并且都小于阳性对照组阿卡波糖的半数抑制质量浓度 $(272.97 \pm 4.11 \mu\text{g/mL})$ 。这表明蜂胶、杨树胶的粗提取物及分离组分对 α -葡萄糖苷酶的体外抑制效果皆优于阿卡波糖。

由表 2 可以看出,蜂胶 50% 乙醇洗脱组分 (IC_{50} 为 $39.03 \pm 2.76 \mu\text{g/mL}$) 和杨树胶 50% 乙醇洗脱组分 (IC_{50} 为 $28.28 \pm 3.79 \mu\text{g/mL}$) 的抑制效果优于其他分离组分,说明 50% 乙醇洗脱组分为体外抑制 α -葡萄糖苷酶的主要作用成分,HPLC 分析结果表明,两者皆含有槲皮素、芹菜素、山奈酚、异鼠李素、白杨素和高良姜素等黄酮类化合物。

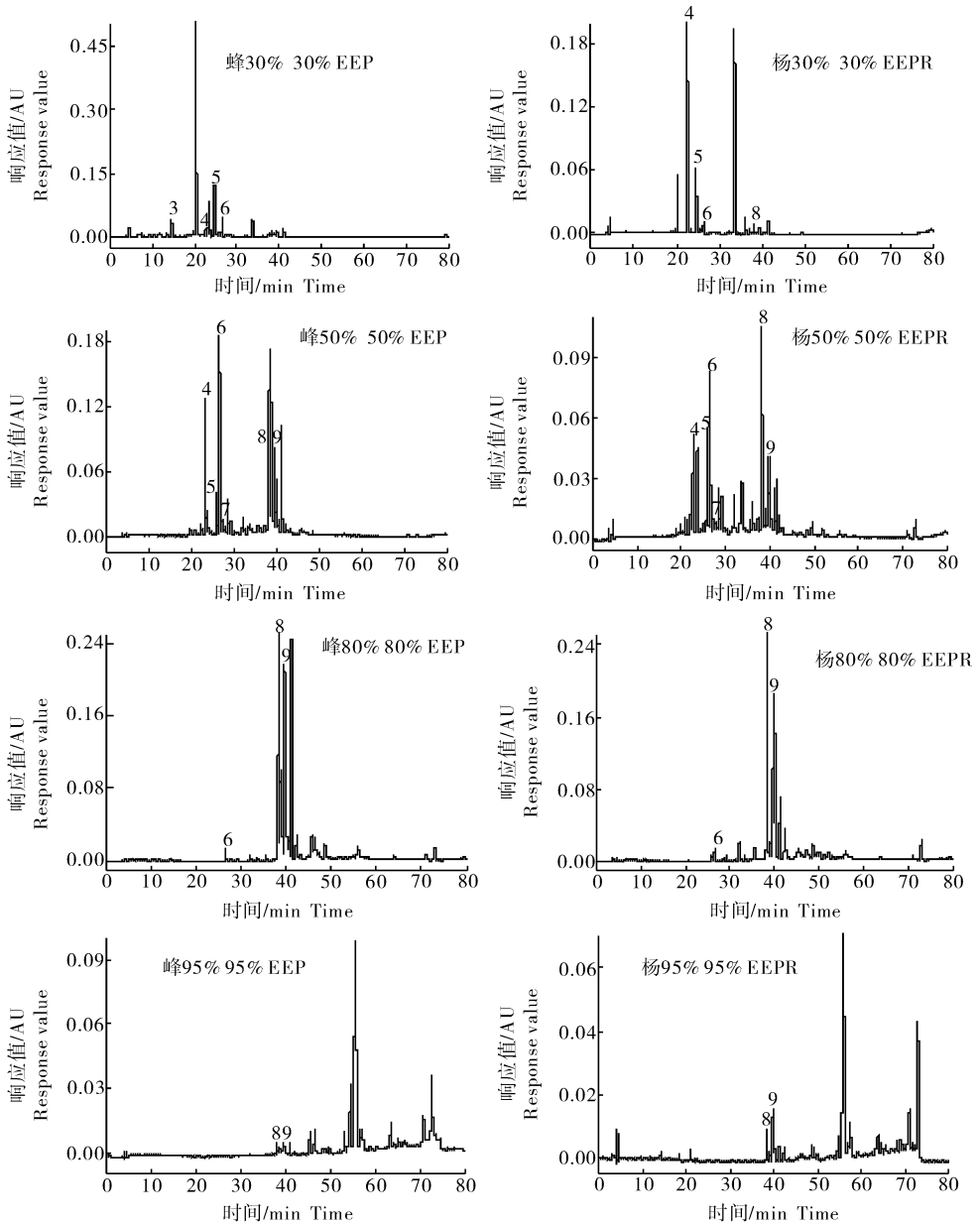


图 2 各分离组分的 HPLC 图

Fig.2 HPLC chromatograms of separated components

表 2 粗提取物及各分离组分抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} values of crude extraction and each component for α -glucosidase inhibition

$\mu\text{g}/\text{mL}$

样品 Sample	蜂胶 Propolis	杨树胶 Poplar resin	阿卡波糖 Acarbose
30%乙醇洗脱组分 30% ethanol eluent	72.68±1.62	157.86±2.54	/
50%乙醇洗脱组分 50% ethanol eluent	39.03±2.76	28.28±3.79	/
80%乙醇洗脱组分 80% ethanol eluent	121.35±6.44	91.49±3.67	/
95%乙醇洗脱组分 95% ethanol eluent	70.14±2.35	91.73±5.61	/
粗提取物 Crude extraction	23.05±2.91	55.67±6.30	/
阿卡波糖 Acarbose	/	/	272.97±4.11

2.4 河南蜂胶和同源杨树胶的 50% 乙醇洗脱组分对糖尿病小鼠 OSTT 的影响

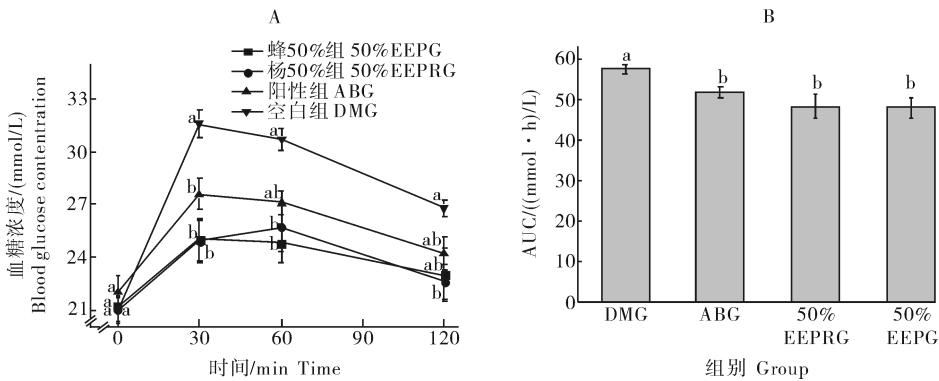
葡萄糖苷酶的功效^[25]。蜂 50%、杨 50%在体外 α -葡萄糖苷酶抑制实验中效果最佳,所以选用两者在 STZ 诱导的糖尿病小鼠中进口服糖耐量实验,进一步评

OSTT 通常用于评估药物在体内抑制肠内 α -葡

估它们的降血糖作用。图3结果显示,与空白组相比,杨50%组和蜂50%组按体质量每千克以200 mg的剂量口服给药后显著($P < 0.05$)降低了糖尿病小鼠的餐后血糖水平(图3A),在给小鼠口服蔗糖溶液后30、60和120 min时皆观察到降血糖效果;并且与阳性组(按体质量每千克灌胃阿卡波糖溶液25 mg)相比,杨50%组和蜂50%组小鼠的血糖变化曲线更平缓,餐后血糖变化更缓和;而阳性组、杨50%组和蜂50%组的血糖曲线下面积(AUC,图3B)相比空白组都有显著性减小($P < 0.05$)。OSTT结果进一步验证了河南蜂胶和杨树胶的50%乙醇洗脱组分在体内均能有效抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,表明杨树胶中的黄酮类物质能够发挥与蜂胶类似的良好降血糖作用。

OSTT是一种糖负荷实验,可以反映糖尿病小鼠机体对血糖的调节能力。正常小鼠进行糖耐量实验时,血糖会在15~30 min时上升至最高峰,120

min时回到空腹水平,说明机体可以正常进行糖代谢;而糖尿病小鼠或糖耐量异常小鼠则与正常小鼠的血糖波动反应不同,会出现血糖在15~60 min持续处于高值状态,血糖值在120 min内难以恢复正常水平,且血糖曲线下面积显著增加^[26]。由图3A可以看出,空白组糖尿病小鼠灌胃蔗糖溶液后血糖升高幅度很大,血糖值在第30 min达到峰值,120 min时仍明显高于初始血糖水平,表明空白组糖尿病小鼠的糖耐量受损严重;而杨50%组、蜂50%组小鼠的血糖值在30 min时的升高幅度明显小于空白组($P < 0.05$),并且杨50%组小鼠血糖峰值的出现后移至60 min处,在120 min时血糖值基本恢复至初始血糖水平,显著区别于空白组($P < 0.05$),说明杨树胶50%乙醇洗脱组分能防止糖尿病小鼠餐后血糖的迅速升高,与蜂胶50%乙醇洗脱组分的作用效果类似,有利于血糖水平恢复和保持血糖稳定。



采用 Duncan's 法对样本实验结果进行显著性分析,同一列中不同的上标表示该数值在 $P < 0.05$ 水平上有显著性差异,上标含相同字母即为无显著性差异。The results of the experiment were analyzed by Duncan's method. The different superscripts in the same column indicated that the value had a significant difference at the $P < 0.05$ level. The superscript containing the same letter had no significant difference.

图3 糖尿病小鼠的 OSTT 实验(A)及其相应曲线下面积(B)

Fig.3 The OSTT result in diabetic mice (A) and the area under its corresponding curve (B)

3 讨论

本研究选取的河南蜂胶及同源杨树胶,经乙醇提取、乙酸乙酯萃取得到粗提取物,再经大孔树脂吸附和不同体积分数乙醇洗脱分离得到各个组分。所得粗提取物和各分离组分皆具有良好的体外抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,且抑制活性强于市售 α -葡萄糖苷酶抑制剂阿卡波糖。阿卡波糖是目前控制糖尿病人餐后血糖的主流药物,作为一种非常有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,其作用原理就是通过竞争性抑

制人体肠道内 α -葡萄糖苷酶的活力,减缓糖的吸收,起到降低餐后血糖的效果。本研究条件下测得阿卡波糖的 IC_{50} 值与 Susmita 等^[27]、Binh 等^[28]测定的结果相当,证明本研究所选测定条件和测定结果可信。

河南蜂胶及其同源杨树胶中,50%乙醇洗脱的组分具有最高的 α -葡萄糖苷酶体外抑制活性,其 IC_{50} 值分别 39.03 ± 2.76 和 $28.28 \pm 3.79 \mu\text{g/mL}$ 。经 HPLC 分析可知两者皆含有槲皮素、山奈酚、芹菜素、异鼠李素、白杨素和高良姜素等黄酮类化合物,

上述成分可能是杨树胶 50% 乙醇洗脱组分、蜂胶 50% 乙醇洗脱物中抑制 α -葡萄糖苷酶的主要功效成分。研究报道黄酮类物质具有极好的 α -葡萄糖苷酶抑制效果,如槲皮素的 IC_{50} 值为 $32 \mu\text{g}/\text{mL}$,山奈酚的 IC_{50} 值为 $33.18 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[29],因此,与蜂胶有着相当含量黄酮类物质的杨树胶,其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用和可能存在的降血糖活性都值得研究者们关注和深入探究。

糖尿病小鼠的 OSTT 可以反映糖尿病小鼠胰岛细胞的功能和机体对血糖的调节能力,评价糖耐量受损和胰岛素抵抗现象的发生^[19]。本研究在口服糖耐量实验部分所采用的给药剂量,尤其是阳性对照阿卡波糖与蜂 50%、杨 50% 的给药剂量是在参照 Chen 等^[18]实验结果的基础上,结合蜂 50% 和杨 50% 的溶解性可能对其在糖尿病小鼠体内的吸收与代谢作用的影响,经过多次剂量摸索和重复实验而确定。结果表明,杨树胶 50% 乙醇洗脱组分能有效防止糖尿病小鼠餐后血糖的迅速升高,体内抑制 α -葡萄糖苷酶效果良好,能够延缓机体对糖的吸收。

本研究所获得的结果能为杨树胶在 α -葡萄糖苷酶抑制剂的开发和利用方面提供实验依据;此外,杨树胶 50% 乙醇洗脱组分中抑制 α -葡萄糖苷酶的具体作用成分,及其体内抑制和体外抑制效果与作用机制有待更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 胡浩,董捷,张红城,等.工蜂采集蜂胶的行为观察及胶源植物的研究[J].食品科学,2014,135(15):54-58.
- [2] 曹炜,符军放,索志荣,等.蜂胶与杨树芽提取物成分的比较研究[J].食品与发酵工业,2007,33(7):162-165.
- [3] STEPHANIE D,PASCALI P,PHILIPPE C,et al.Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud extract; individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging [J]. Journal of agricultural food chemistry, 2011, 59(11):4527-4536.
- [4] 郑光耀,康宏兴,薄采颖,等.杨树芽提取物体外抗肿瘤活性研究[J].林产化学与工业,2009,29(6):38-42.
- [5] MARCO S,PICCONI M,PAGIOTTI R,et al.Antibiofilm and antioxidant activity of propolis and bud poplar resins versus *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2017(5):1-11.
- [6] YANG S Z,LIU L M,LI D M,et al.Use of active of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action [J].Food chemistry, 2016,196:610-618.
- [7] HAVLIK J,RADA V,PLACHY V.Xanthine oxidase-inhibitory and hypouricemic action of black poplar bud extract [J]. *Planta medica*, 2011,77(12):213.
- [8] 李骄,郑光耀,李海涛,等.杨树芽提取物对实验性胃溃疡的防治作用[J].现代中药研究与实践,2012,26(3):36-39.
- [9] 杨明,隋殿军,陈文学,等.蜂胶总黄酮对自发性糖尿病大鼠脂肪代谢的影响及抗氧化作用[J].中国药理学杂志,2015,50(3):217-220.
- [10] ZHU W,CHEN M,SHOU Q,et al.Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats [J].Evidence-based complementary and alternative medicine, 2011(5):1-8.
- [11] WOOD I, TRAYHUM P.Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins [J]. British journal of nutrition, 2013,89(1):3-9.
- [12] GHANI U.Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: finding needle in the haystack [J].European journal of medicinal chemistry, 2015,103(48):133-162.
- [13] 王光新.北方部分地区蜂胶成分分析及抗糖尿病机理研究[D].南京:南京农业大学,2011:82-84.
- [14] 张红城,董捷,李慧,等.六种蜂花粉多酚和黄酮类物质含量测定及抗氧化性的研究[J].食品科学,2007,28(9):500-504.
- [15] 董捷,张红城,秦健,等.十种蜂花粉提取物中总多酚和总黄酮含量测定[J].食品科学,2008,29(12):246-249.
- [16] 王冰.不同地理源蜂胶酚类物质分析及其对变形链球菌抑制作用研究[D].武汉:华中农业大学,2014:17-18.
- [17] JEON S,OH S,KIM E,et al. α -Glucosidase inhibition and antiglycation activity of laccase-catalyzed catechin polymers [J]. Journal of agricultural food chemistry, 2013, 61(19):4577-4584.
- [18] CHEN J,WU Y C,ZOU J W,et al. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives [J].Bioorganic & medicinal chemistry, 2016,24(7):1488-1494.
- [19] JAN R,BIRGIT R,SUSANNE N,et al.Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice [J]. Current protocols in mouse biology, 2015,5(1):65.
- [20] AHN M R,KUMAZAWA S,USUI Y,et al.Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various area of China [J].Food chemistry, 2007,101(4):1383-1392.
- [21] HE N,WANG Z Y,YANG C X,et al.Isolation and identification of polyphenolic compounds in longan pericarp [J].Separation and purification technology, 2009,70(2):219-224.
- [22] 舒俊生,黄桂东,毛健.滁菊 95% 乙醇提取液中黄酮类和酚酸类物质的鉴定及分离[J].中国食品学报,2013,13(4):207-212.
- [23] 胡志军,郝利君,王南溪,等.D101 大孔吸附树脂分离纯化橘皮中的黄酮类物质[J].食品科学,2010,31(8):65-69.
- [24] 叶春,张婧.大孔树脂对野菊花总黄酮吸附分离特性的影响[J].食品科学,2010,31(12):127-131.
- [25] XI P,ZENG G W,LI Y J,et al.Inhibitory kinetics and mechanism of keampferol on α -glucosidase [J].Food chemistry, 2016, 190:207-215.

- [26] BRINDIS F, RODIGUEZ R, BYE R, et al. Z-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -glucosidase inhibitor[J]. Journal of natural products, 2011, 74(3): 314-320.
- [27] SUSMITA D, MAINAK D, KOEL C, et al. Metabolomic and chemometric study of *Achras sapota* L. fruit extracts for identification of metabolites contributing to the inhibition of α -amylase and α -glucosidase[J]. European food research and technology, 2016, 242(5): 733-743.
- [28] BINH T D, DAN S, KIM A, et al. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes[J]. Journal of ethnopharmacology, 2016, 186: 189-195.
- [29] 苏尧尧, 垂柳叶 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离及活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 13-35.

Flavonoids in propolis and poplar resin and their inhibition of α -glucosidase activity

WEI Ping DING Yue LU Qun TAN Jun ZHANG Jiuliang LIU Rui

College of Food Science & Technology, Huazhong Agricultural University /

Wuhan Engineering Research Center of Bee Products on Quality and Safety Control /

Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract Through ethanol extraction and liquid-liquid extraction combined with column chromatography, the different components in Henan propolis and the poplar resin were isolated. The separation effect and the separation components was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The *in vitro* hypoglycemic activity of each isolated fraction was evaluated by the α -glucosidase inhibitor screening model, at the same time, oral glucose tolerance test (OSTT) was carried out in hyperglycemia mouse model induced by streptozotocin (STZ) to further verify the inhibitory effect of the isolated fraction α -glucosidase efficacy in the intestines. The results showed that the 50% ethanol elution fraction of propolis and its homologous poplar resin extract had the best inhibitory effect on α -glucosidase *in vitro*, their IC_{50} are $39.03 \pm 2.76 \mu\text{g/mL}$ and $28.28 \pm 3.79 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, this component could effectively inhibit the intestinal α -glucosidase activity in diabetic mice ($P < 0.05$), conducing to the recovery of blood glucose and maintain the blood sugar stability. Liquid chromatographic analysis showed that the 50% ethanol component of propolis and its homologous poplar resin both included quercetin, apigenin, kaempferol, chrysin, isorhamnetin and galangin and other flavonoids compound.

Keywords poplar resin; propolis; α -glucosidase; high performance liquid chromatography; flavonoids

(责任编辑:陆文昌)