

山药多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用动力学研究

Study on inhibition kinetics of polysaccharide from yam on α -glucosidase

李培

LI Pei

(蚌埠学院实验与设备管理中心, 安徽 蚌埠 233030)

(Laboratory and Equipment Management Center & Bengbu College, Bengbu, Anhui 233030, China)

摘要: 以山药为材料, 经酶解法提取山药多糖, 通过紫外扫描和红外光谱鉴别其组分和结构, 以 PNPG 为底物建立酶-抑制剂体外模型, 研究山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力, 采用双倒数作图法确定其抑制类型。结果表明: 紫外扫描显示提取组分不含核酸和蛋白质, 红外光谱显示提取组分具有多糖特征吸收峰, 酶-抑制剂体外模型结果表明提取的山药多糖对 α -葡萄糖苷酶具有较强的抑制作用, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用为竞争性抑制, 抑制常数 K_i 为 65.78 mg/mL。
关键词: 山药; 多糖; 红外光谱; 双倒数作图; 竞争性抑制; 抑制常数

Abstract: The research extracted polysaccharide from the Chinese yam by the methods of enzymolysis. UV scanning and infrared spectroscopy were used to identify the components and structure. Using PNPG as the substrate, the enzyme-inhibitor model was used to study the inhibition ability of polysaccharide from the Chinese yam of the α -glucosidase, and the double reciprocal plot method was used to determine the type of inhibition. The UV scanning results showed that the extract does not contain nucleic acids and proteins, and the infrared spectra showed that the extracts had the characteristic absorption peak of polysaccharide. The enzyme-inhibitor model showed that the polysaccharide from the Chinese yam had stronger inhibition effect on the activity of α -glucosidase. The inhibition type was competitive inhibition, with inhibition constant factor K_i of 65.78 mg/mL.

Keywords: yam; polysaccharide; infrared spectrum; double reciprocal plot; competitive inhibition; inhibition constant

糖尿病是一类分泌代谢疾病, 其发病率随生活水平的提高而逐年增长, 对人们身体健康的威胁日益严重^[1]。临床上

将糖尿病分为几种类型, 其中 II 型糖尿病(又称非胰岛素依赖型糖尿病)患者占 90% 以上, 一般表现为餐后高血糖^[2-3]。目前治疗 II 型糖尿病的药物主要有磺脲类(如格列本脲)、双胍类(如二甲双胍)、噻唑烷二酮类(如吡格列酮)、苯甲酸衍生物类(如那格列奈)和 α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖)^[4]。其中 α -葡萄糖苷酶抑制作为治疗 II 型糖尿病的有效药物, 越来越受到人们的青睐。 α -葡萄糖苷酶存在于人体的小肠刷状缘上, 能催化含有 α -糖苷键的底物水解产生葡萄糖, 从而促进这些碳水化合物的吸收和利用^[5]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂能够和 α -葡萄糖苷酶活性中心结合, 从而降低 α -葡萄糖苷酶活性, 延缓或抑制葡萄糖在消化道内的消化、吸收, 进而控制餐后血糖浓度。目前使用的 α -葡萄糖苷酶抑制剂有人工合成的和天然产物中提取两类。人工合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂除了价格昂贵之外, 在临床上还会产生一些副作用^[6], 因此, 人们将研究目标逐渐转向天然产物中的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。此类抑制剂来源广泛, 在很多植物、微生物及海洋无脊椎动物中都含有, 主要为黄酮、酚酸、生物碱、萜及多糖类物质^[7-10]。山药为药食同源植物, 研究发现, 山药多糖为其主要活性成分, 有降血糖功效, 具有广阔的开发前景^[11-12]。何凤玲等^[13]研究发现山药多糖可显著降低糖尿病小鼠的血糖水平, 但就目前的报道来看, 山药多糖的研究主要体现在提取工艺优化及抗氧化活性方面, 但其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用未见报道, 本研究拟通过体外模型研究山药多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用特点及抑制类型, 旨在为山药多糖的开发利用及拓宽其利用领域提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

山药粉: 蚌埠丰原大药房;

纤维素酶: 50 U/mg, 南宁庞博生物工程有限公司;

α -葡萄糖苷酶: 50 U/mg, 上海佳和生物科技有限公司;

α -淀粉酶: 4 U/mg, 上海沪宇生物科技有限公司;

阿卡波糖: HPLC 99%, 上海江莱生物科技有限公司;

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013Z199)

作者简介: 李培(1979-), 男, 蚌埠学院讲师, 硕士。

E-mail: lp314@163.com

收稿日期: 2015-12-08

无水乙醇、苯酚、氯仿:分析纯,杭州双林化工试剂厂;
正丁醇:分析纯,济南奥晖化工有限公司;
水杨酸:分析纯,天津市津北精细化工有限公司;
浓硫酸:分析纯,常州中胜伟业化工有限公司;
抗坏血酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠:分析纯,天津博迪
化工股份有限公司;
氯化铁:分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;
铁氰化钾:分析纯,无锡市展望化工试剂有限公司;
对硝基酚:优级纯,南京大唐化工有限责任公司;
对硝基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷:超级纯,北京索莱宝科
技有限公司;
谷胱甘肽:分析纯,北京索莱宝科技有限公司;
碳酸钠:分析纯,北京鹏彩精细化工有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻干燥器:ALPHA1-2型,德国CHRIST公司;
超速冷冻离心机:MZKRO 22R型,科大创新股份中桂
公司;
电热恒温水浴锅:HHS-4型,江苏金坛市金城国胜实验
仪器厂;
全波长酶标仪:Multiskan GO型,赛默飞世尔科技有限
公司;
紫外可见分光光度计:TU-1901型,北京普析通用仪器
有限责任公司;
傅里叶红外光谱仪:FTIR-8400S型,日本岛津公司;
透析袋:MD34(8000-14000)型,美国联合碳化。

1.3 方法

1.3.1 山药多糖的提取

(1) 原料预处理:山药粉过40目筛,备用。
(2) 多糖的提取:取上述山药粉末25g,置于500mL圆
底烧瓶中,按料液比1:10(g/mL)加入蒸馏水,加入3%的
纤维素酶于60℃作用60min,添加1%的 α -淀粉酶继续保
温30min后,灭酶,4000r/min离心5min取清液,Sevag法
除蛋白^[14],放入透析袋,于蒸馏水中透析12h,按1:4(体积
比)加入无水乙醇,4℃静置过夜,4000r/min离心5min,取
沉淀,真空冷冻干燥,得山药多糖。

1.3.2 紫外及红外检测

(1) 紫外检测:紫外可见分光光度计于190~400nm波
段进行紫外扫描。

(2) 红外检测:傅里叶红外光谱仪于400~4000 cm^{-1}
波段进行红外扫描。

1.3.3 PNP标准曲线的绘制 用蒸馏水配制浓度分别为
2.0,4.0,6.0,8.0,10.0mmol/L的对硝基酚(PNP)标准溶液。
于96孔板中加入上述标准液10 μL 、50mmol/L pH 6.8的
磷酸盐缓冲液90 μL 、0.2mol/L的 Na_2CO_3 100 μL ,混匀,测
定其吸光度(405nm),绘制PNP浓度—吸光度标准曲线。

1.3.4 山药多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的测定方法 试
验分空白组,不加抑制剂的阴性组、加抑制剂组(山药多糖)
和对照组(阿卡波糖)。在96孔板中加入50mmol/L pH 6.8
的磷酸盐缓冲液70 μL 、5mmol/L还原型谷胱甘肽5.0 μL 、

1.0U/mL α -葡萄糖苷酶5.0 μL ,然后再分别加入不同浓度
的抑制剂(山药多糖)10 μL ,混匀后置于35℃的恒温箱中保
温10min,加入20mmol/L PNPG 10 μL ,于35℃保温
10min,之后加入0.1mol/L Na_2CO_3 100 μL 终止反应,用酶
标仪测定吸光值(405nm),根据式(1)计算抑制剂对 α -葡萄
糖苷酶的抑制率^[15]。

$$Y = \frac{(A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}) - (A_{\text{抑制剂组}} - A_{\text{空白组}})}{A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——抑制率,%;

$A_{\text{空白组}}$ ——不加山药多糖和 α -葡萄糖苷酶测定的吸
光值;

$A_{\text{阴性组}}$ ——加 α -葡萄糖苷酶,不加山药多糖测定的吸
光值;

$A_{\text{抑制剂组}}$ ——加山药多糖和 α -葡萄糖苷酶测定的吸
光值。

1.3.5 阿卡波糖对照试验 以阿卡波糖为阳性对照,比较
20min内,相同浓度的山药多糖和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶
抑制能力。

1.3.6 山药多糖的抑制动力学试验

(1) 山药多糖质量浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影
响:按上述 α -葡萄糖苷酶抑制作用测定方法,设定反应温度
35℃、反应时间10min、反应pH 6.8,分别添加10,20,30,
40,50mg/mL的山药多糖进行反应,考察山药多糖的质量
浓度与抑制作用的关系。

(2) 反应温度对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影响:按上述
 α -葡萄糖苷酶抑制作用测定方法,设定质量浓度40mg/mL、
反应时间10min、反应pH 6.8,分别设定反应温度为25,30,
35,40,45℃,考察反应温度与抑制作用的关系。

(3) 反应时间对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影响:按上述
 α -葡萄糖苷酶抑制作用测定方法,设定质量浓度40mg/mL、
反应温度35℃、反应pH 6.8,分别设定反应时间为5,10,
15,20,25min,考察反应时间与抑制作用的关系。

(4) 反应pH对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的影响:按上述
 α -葡萄糖苷酶抑制作用测定方法,设定质量浓度40mg/mL、
反应温度35℃、反应时间10min,分别设定反应pH为6.0,
6.4,6.8,7.2,7.4,考察反应pH与抑制作用的关系。

1.3.7 山药多糖抑制剂类型的确认 在37℃、反应时间
20min,抑制剂量一定的条件下,分别加入浓度为40,20,10,
5mmol/L的底物溶液,测定 α -葡萄糖苷酶活力。然后其他
条件不变,分别加入质量浓度为20,40,60mg/mL抑制剂溶
液,测定 α -葡萄糖苷酶活力。用Lineweaver-Burk双倒数作
图法确定抑制作用类型。

2 结果与分析

2.1 光谱分析结果

由图1可知,提取的山药多糖在280nm和260nm无明
显特征吸收峰,表明无核酸和蛋白质,说明去蛋白效果明显。
由图2可知,2931 cm^{-1} 为饱和C—H伸缩振动的吸收峰,与

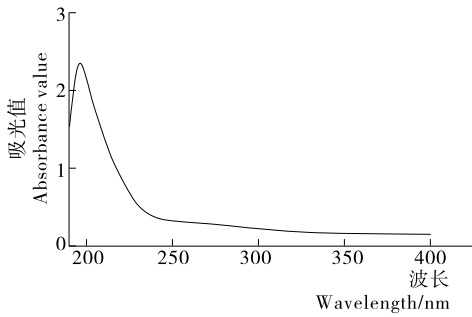


图 1 山药多糖的紫外图谱

Figure 1 The UV spectrum of polysaccharide from yam

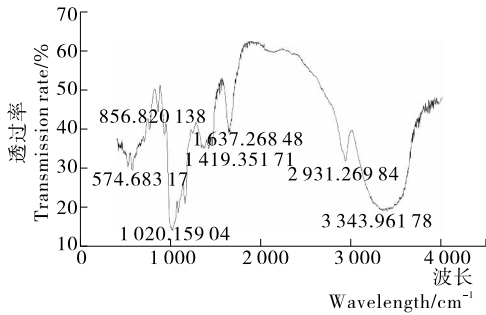


图 2 山药多糖的红外图谱

Figure 2 The infrared spectrum of polysaccharide from yam

1 419 cm^{-1} 的 C—H 弯曲振动构成糖类特征吸收峰, 3 343 cm^{-1} 有一宽峰, 为 O—H 的伸缩振动, 表明多糖分子存在氢键(分子内和分子间), 1 637 cm^{-1} 为糖类水合振动峰, 1 020 cm^{-1} 的吸收峰是糖环上、糖苷键上和糖醛酸上 C—O 伸缩振动所引起的, 856 cm^{-1} 有一较弱吸收峰, 为 β -糖苷键吸收峰, 表明含有 β -糖苷键。

2.2 PNP 标准曲线制作结果

由图 3 可知, 通过吸光值—PNP 浓度曲线的线性拟合得回归方程 $y = 15.506x + 0.028 2$, $R^2 = 0.995 7$, 其线性范围为 0.00~0.05 mmol/L。

2.3 阿卡波糖对照试验结果

由图 4 可知, 在考察时间内, 山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力比阿卡波糖的抑制能力略低, 但相差不多, 且随反应时间的延长而增强。

2.4 抑制动力学试验结果

2.4.1 山药多糖质量浓度对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 由图 5 可知, 在山药多糖质量浓度达到 40 mg/mL 之前, 对

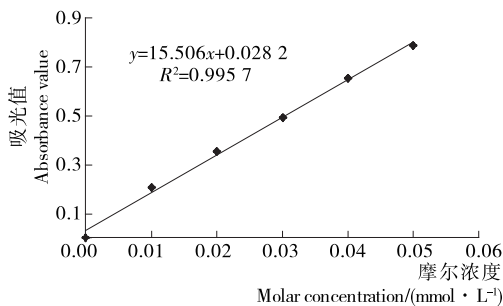


图 3 PNP 标准曲线

Figure 3 Standard curve of PNP

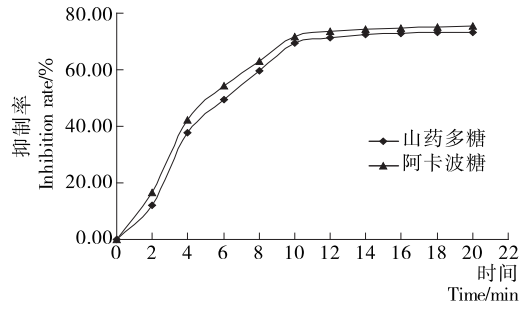


图 4 山药多糖和阿卡波糖对照试验

Figure 4 The control test of polysaccharide from yam and acarbose

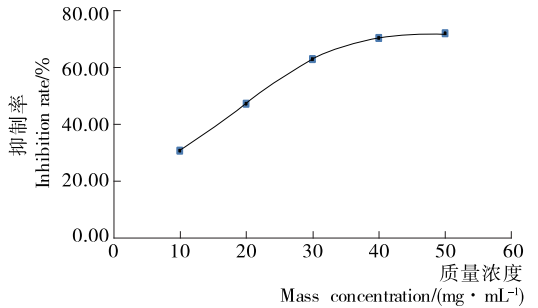


图 5 质量浓度对抑制作用的影响

Figure 5 The effect of inhibitor concentration on inhibitory efficiency

α -葡萄糖苷酶的抑制率随山药多糖质量浓度的增加而迅速增加, 之后继续增加山药多糖浓度, 抑制率增加幅度减缓很多, 曲线趋于平缓, 可能是山药多糖浓度达到 40 mg/mL 时, 和酶的结合已趋于饱和, 再继续增加多糖浓度, 对抑制率的提高并不是很显著。

2.4.2 反应温度对山药多糖抑制作用的影响 由图 6 可知, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随反应温度的升高而增加, 当反应温度达到 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 抑制率达到最大, 之后, 随着温度的升高, 抑制率有降低趋势, 可能是高温使酶结构发生改变, 导致与抑制剂的结合变困难。说明山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的最佳作用温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.3 作用时间对山药多糖抑制作用的影响 由图 7 可知, 作用时间在 10 min 之内, 山药多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随着作用时间的延长而迅速增加, 当作用时间超过 10 min 后, 抑制率增加幅度变得非常缓慢, 可能是作用 10 min 时, 山药多糖和酶的结合已趋于饱和, 表明山药多糖

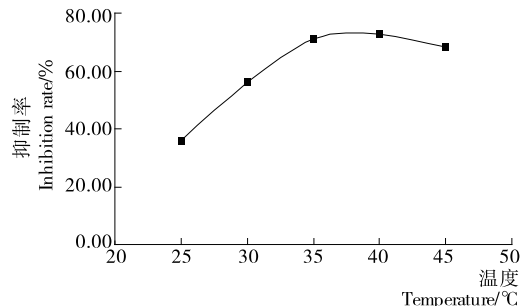


图 6 反应温度对抑制作用的影响

Figure 6 The effect of temperature on inhibitory efficiency

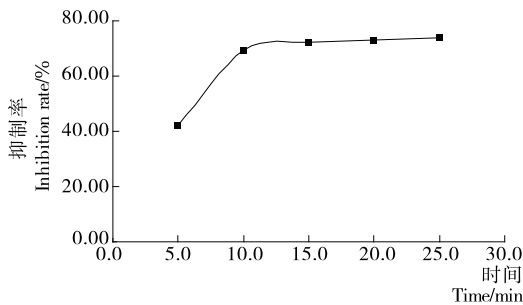


图7 反应时间对抑制作用的影响

Figure 7 The effect of reaction time on inhibitory efficiency

与α-葡萄糖苷酶的结合较为迅速,作用较快。

2.4.4 反应 pH 对山药多糖抑制作用的影响 由图 8 可知,山药多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用最适 pH 偏中性,在 pH 7.2 时,抑制率达到最大,当 pH 超过 7.2,随反应体系 pH 升高,抑制率呈下降趋势,可能是 pH 过高使酶活性中心基团及山药多糖可解离基团的解离发生改变,导致两者的作用变困难。表明最佳作用 pH 为 7.2。

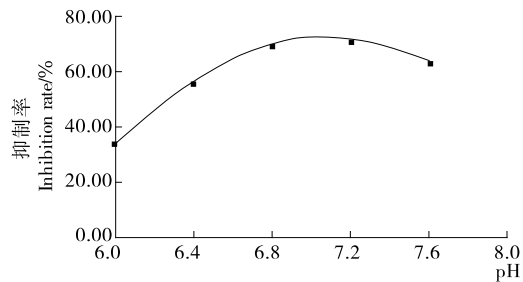


图8 反应 pH 对抑制作用的影响

Figure 8 The effect of pH on inhibitory efficiency

2.5 抑制作用类型的试验结果

由图 9 可知,在山药多糖存在下,α-葡萄糖苷酶对 PNPG 酶促反应的双倒数作图呈线性关系,随着山药多糖质量浓度的增加,双倒数直线斜率逐渐增大,但与纵轴交点不变,表明抑制剂浓度增大, K_m 增大, V_{max} 不变,是典型的竞争性抑制类型。其 $V_{max}=0.0199 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, $K_i=65.78 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

3 结论

本试验通过酶解法提取山药活性成分,采用紫外和红外对其检测,表明该提取物不含核酸和蛋白质,具有糖类特征

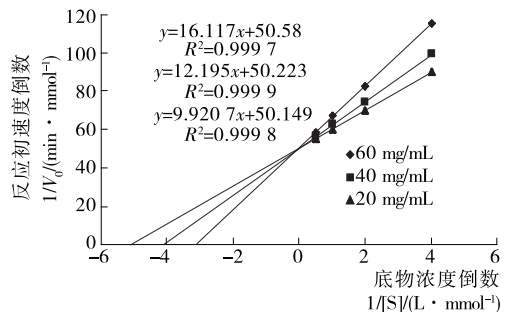


图9 抑制作用的双倒数图

Figure 9 Double reciprocal plot of inhibition

吸收峰,为多糖类组分;通过山药多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制动力学试验结果表明,其对 α-葡萄糖苷酶有较强的抑制能力,其效果和阿卡波糖较接近;且其最佳的作用条件为:山药多糖质量浓度 40 mg/mL,温度 40 °C,时间 10 min, pH 7.2,表明山药多糖与 α-葡萄糖苷酶的亲和力较高,对其抑制作用的温度和 pH 较为温和;通过双倒数作图法研究其抑制类型,结果表明山药多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制是典型的竞争性抑制动力学类型,其 $K_i=65.78 \text{ mg}/\text{mL}$ 。本试验仅仅通过建立体外模型,了解山药多糖对 α-葡萄糖苷酶抑制作用,但其体内外活性差异很大,因此该模型无法评价山药多糖在体内的作用,其降糖效果还需进一步通过动物试验进行验证。

参考文献

- [1] 刘杰, 向燕茹, 丁嘉瑜, 等. 青钱柳抑制 α-葡萄糖苷酶有效成分筛选及其对 II 型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 363-369.
- [2] 陈丽华, 潘自红, 曹云丽, 等. 知母中活性成分对 α-葡萄糖苷酶的抑制研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 147-157.
- [3] LEE B H, ESKANDARI R, JONES K, et al. Pinto Modulation of starch digestion for slowglucose release through “toggling” of activities of mucosal α-glucosidases[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(38): 31 929-31 938.
- [4] 张钟, 吴文婷, 王萍, 等. 荔枝水溶性多糖作为 α-葡萄糖苷酶抑制剂的活性测定[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 175-179.
- [5] 季芳, 肖国春, 董莉, 等. 药用植物来源的 α-葡萄糖苷酶抑制剂研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1 633-1 640.
- [6] 于配配, 朱月莲, 熊思驰, 等. 微生物源 α-葡萄糖苷酶抑制剂分离纯化及鉴定[J]. 生物技术, 2013, 23(3): 69-73.
- [7] WANG Zhi-wei, WANG Jun-song, JUN Luo, et al. α-Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of Uncaria laevigata[J]. Fitoterapia, 2013, 90: 30-37.
- [8] ZHANG Jian-wei, ZHAO Shan, YAN Pei-pei, et al. α-Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of Castanea mollissima Blume[J]. Molecules, 2014, 19(6): 8 373-8 386.
- [9] WANG Zhi-bin, JIANG Hai, XIA Yong-gang, et al. α-Glucosidase inhibitory constituents from acanthopanax senticosus harm leaves[J]. Molecules, 2012, 17(6): 6 269-6 276.
- [10] 杨少波, 张其安, 王娟. 降血糖天然食品资源及其降血糖机理研究进展[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(4): 211-215.
- [11] 官波, 郑文成. 山药多糖的提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 98-101.
- [12] 陈艳. 山药的药理作用与产品开发[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(1): 60-62.
- [13] 何凤玲, 叶小利, 李学刚, 等. 山药中降糖活性成分的筛选与比较[J]. 食品工业科技, 2011, 32(6): 373-375.
- [14] 苗慧琴, 霍秀文, 王阳, 等. 山药多糖脱蛋白方法研究[J]. 食品科技, 2014, 39(1): 210-214.
- [15] 孟文, 何炜, 钟英丽, 等. 紫甘薯花青素体外抑制 α-葡萄糖苷酶活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 32-36.