

木犀草素-锌(Ⅱ)配合物的合成及对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用研究[△]

滕 杨*, 罗时旋, 侯丽然, 侯 巍, 楚 婧, 高金波[#](佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2172-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.04

摘要 目的:合成木犀草素-锌(Ⅱ)配合物,并考察其对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用及其类型。方法:取等物质的量的木犀草素与醋酸锌反应合成木犀草素-锌(Ⅱ)配合物;采用紫外光谱(UV)法、红外光谱(IR)法、热重差热分析(TG-DTA)法结合元素分析确定其结构;考察在不同pH(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)和温度(40、45、50、55、60、65、70℃)条件下木犀草素及其配合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用并计算最大抑制率与半数抑制浓度(IC₅₀);测定酶抑制活性并确定抑制作用类型。结果:经UV、IR、TG-DTA与元素分析,木犀草素-锌(Ⅱ)配合物的分子式为C₁₅H₉O₆Zn(COOCH₃)(H₂O)·H₂O,合成产率为76.68%;木犀草素及其配合物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的最大抑制率分别为32.75%、42.70%,IC₅₀分别为2.52、1.50 mmol/L,抑制常数随浓度增加而减小。结论:木犀草素-锌(Ⅱ)配合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性高于木犀草素,抑制类型均为竞争型抑制。该结果为木犀草素-锌(Ⅱ)配合物的进一步研究奠定了一定的试验基础。

关键词 木犀草素;配合物;锌; α -葡萄糖苷酶;抑制作用

Study on the Synthesis of Luteolin-Zn (Ⅱ) Complex and Its Inhibitory Effects on the Activity of α -glucosidase

TENG Yang, LUO Shi-xuan, HOU Li-ran, HOU Wei, CHU Jing, GAO Jin-bo (Pharmacy College, Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize luteolin-Zn (Ⅱ) complex and observe its inhibitory effects on the activity of α -glucosidase and the type of inhibition. METHODS: Luteolin-Zn (Ⅱ) complex was synthesized with luteolin and zinc acetate which had the same mole. Ultraviolet spectroscopy (UV), infrared spectroscopy (IR) and thermogravimetry-differential thermal analysis (TG-DTA) were combined with elemental analysis to determine the structure of the complex. The inhibitory effects of luteolin and its complex on α -glucosidase at different pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) and temperatures (40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C) were observed and the maximum inhibition rate and median inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated. The inhibition of the activity of α -glucosidase and the types were determined. RESULTS: According to UV, IR, TG-DTA and elemental analysis, the molecular formula of luteolin-Zn (Ⅱ) complex was C₁₅H₉O₆Zn (COOCH₃)(H₂O)·H₂O with the synthesis rate of 76.68%; the maximum inhibition rate for the inhibitory effects of luteolin and its complex on α -glucosidase was respectively 32.75% and 42.70%; the IC₅₀ was respectively 2.52 mmol/L and 1.50 mmol/L; the inhibition constant reduced with the concentration increasing. CONCLUSIONS: The inhibitory activity of luteolin-Zn (Ⅱ) complex against α -glucosidase is higher than that of luteolin, and both are competitive inhibitor. The results provide an experimental basis for the further study of luteolin-Zn (Ⅱ) complex.

KEYWORDS Luteolin; Complex; Zn; α -glucosidase; Inhibitory effect

α -葡萄糖苷酶抑制剂能通过抑制小肠刷状缘 α -葡萄糖苷酶的活性,延缓葡萄糖的生成和吸收,因而可有效降低餐后高血糖,从而降低由此引发的各种疾病^[1]。但是 α -葡萄糖苷酶抑制剂大都是由生物合成或半生物合成,种类少、价格贵、副作用大^[2]。因此,寻找高效、低毒、经济的 α -葡萄糖苷酶抑制剂越来越受到人们的重视。木犀草素(Luteolin)主要以苷元的形式存在,具有抗氧化、抗肿瘤、保护心脏、保护呼吸系统作用以及免疫调节等活性^[3]。微量元素锌是人体许多重要代谢途径中酶的组成部分,参与胰岛素的合成、分泌、贮存等^[4-5],但单独补充无机锌元素易引发毒副作用^[6-7]。为此,本研究以木犀草素为原料,

在合成木犀草素-铬配合物的基础上^[8-9],参照文献[10]自主合成木犀草素-锌(Ⅱ)配合物,以降低无机锌元素的毒性,并考察木犀草素及其配合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用与抑制类型,旨在为开发具有一定降糖作用的新药奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

VERTEX70型傅里叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司);UV7501型紫外-可见分光光度计(无锡分析仪器有限公司);Vario El型元素分析仪(德国Elementar公司);79-1型磁力加热搅拌器(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司);PB-S型酸度计(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

α -葡萄糖苷酶(纯度:≥10 u/mg)、对-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG,底物,纯度:99%)均购自美国Sigma公司;木犀草素(南京苏朗医药有限公司,批号:20131104,纯度:98%);醋

△ 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.D201211)

* 讲师。研究方向:天然药物活性分析。E-mail: tengyang19820405@163.com

通信作者:教授。研究方向:天然药物活性分析。E-mail: gaojinbo2001@163.com

酸锌(分析纯,上海化学试剂总厂);还原型谷胱甘肽(上海源叶生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 木犀草素-锌(II)配合物的合成

在无水乙醇介质中,加入等物质的量的木犀草素与醋酸锌,在60℃条件下搅拌溶解至溶液澄清时,用1 mol/L NaOH调pH至9.0,升高温度至80℃,磁力搅拌的同时水浴回流反应4 h后,沉淀静置离心,用少量乙醇洗涤数次,40℃真空干燥,得配合物。产率为76.68%。

2.2 木犀草素-锌(II)配合物的结构表征

2.2.1 木犀草素及其配合物的紫外光谱分析 以溶剂二甲亚砜(DMSO)为空白,扫描木犀草素及其配合物的紫外光谱。结果,木犀草素的2个紫外最大吸收波长分别为254、349 nm,而配合物分别红移到267、386 nm。这是由于A环上5-OH的氢被取代使得两峰发生红移,说明5-OH的氢与锌(II)发生了络合反应。木犀草素及其配合物的紫外吸收光谱见图1。

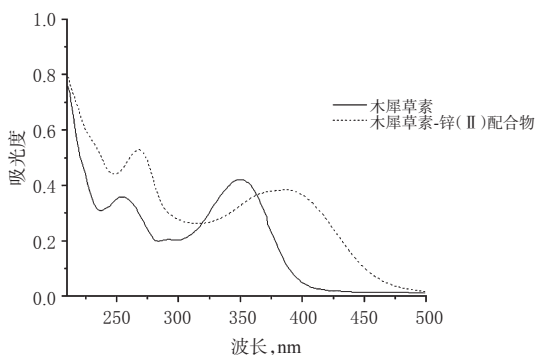


图1 木犀草素及其配合物的紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectra of luteolin and its complex

2.2.2 木犀草素及其配合物的红外光谱分析 采用KBr压片法对木犀草素及其配合物进行红外光谱的测定,并进行峰归属分析。木犀草素及其配合物的红外吸收光谱见图2;木犀草素及其配合物的红外吸收频率与归属见表1。

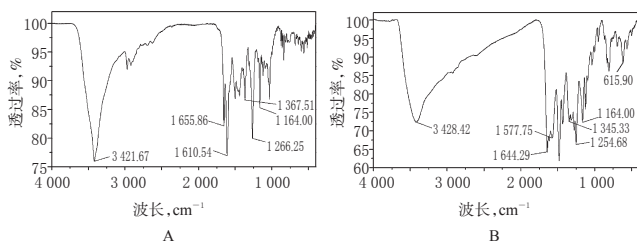


图2 木犀草素及其配合物的红外吸收频率与归属

A. 木犀草素; B. 木犀草素-锌(II)配合物

Fig 2 IR absorption spectra of luteolin and its complex

A. luteolin; B. luteolin-Zn(II) complex

表1 木犀草素及其配合物的红外吸收频率及归属(cm^{-1})

Tab 1 Main IR absorption frequencies and attribution of luteolin and its complex(cm^{-1})

| 化合物 | $\nu_{\text{C=O}}$ | $\nu_{\text{C=C}}$ | $\nu_{\text{C-OH}}$ | $\nu_{\text{C-O-C}}$ | $\nu_{\text{O-H}}$ | $\nu_{\text{O-Zn}}$ |
|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| 木犀草素 | 1656 | 1611 | 1266 | 1164 | 3422 | - |
| 木犀草素-锌(II)配合物 | 1644 | 1578 | 1255 | 1164 | 3428 | 616 |

注:“-”为未检测到

Note:“-” means not detected

从红外光谱数据可看出,两种化合物均表现出了其特有的酚羟基。木犀草素羰基的伸缩振动吸收峰约在 1656 cm^{-1} 处,而形成配合物后移至约 1644 cm^{-1} ,这是因为配位作用使得C=O键向低波数方向分别移动,说明配体木犀草素C环上的羰基氧参与了配位。配体的苯环 π 键共轭体系的吸收峰约在 1611 cm^{-1} 处,配合物中该吸收峰分别降至 1578 cm^{-1} 与 1569 cm^{-1} 处,这是由于形成配合物后出现了一个新的环型结构,使得共轭效应增强所致。木犀草素在 1266 cm^{-1} 处有1个酚羟基的C—O键伸缩振动与O—H键面内变形振动偶合所致的吸收峰,形成配合物后此峰稍受影响,移至约 1255 cm^{-1} ,这表明酚羟基参与了配位成键。木犀草素结构中醚C—O—C的伸缩振动吸收峰在 1164 cm^{-1} 处,在配合物的红外光谱数据中该峰没有发生位移,这说明环醚键并未发生开环,同时也说明了醚氧原子未参与配位。在约 616 cm^{-1} 处发现有Zn—O键伸缩振动吸收峰,表明木犀草素与金属离子结合形成了配合物。

2.2.3 配合物的热重差热分析(TG-DTA) 在流动空气、升温速度为 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 的条件下,对所合成的配合物进行了TG-DTA图谱测定。木犀草素-锌(II)配合物的TG-DTA图见图3。

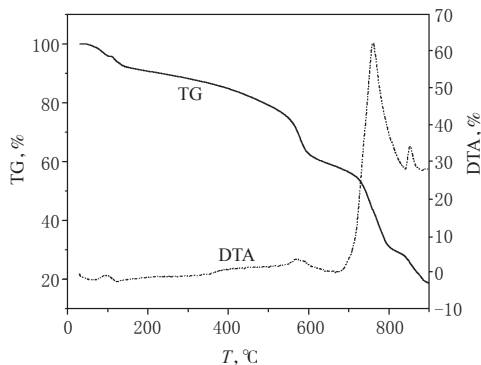


图3 木犀草素-锌(II)配合物的TG-DTA图

Fig 3 TG-DTA of luteolin-Zn(II) complex

由图3可知,在低于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 时有1个失水吸热峰,失质量率约4.01%,与1个水分子的量相对应(理论失质量为4.04%);在 $110\sim 180\text{ }^\circ\text{C}$ 之间,失质量率约4.29%,相当于1个水分子的量。这说明该配合物含1个结晶水和1个配位水。

2.2.4 元素分析 以元素分析仪分别测定两种化合物中C、H元素的含量,并利用等离子发射光谱法分别对Zn金属离子的含量进行了测定。木犀草素及其配合物的元素分析结果见表2。

表2 木犀草素及其配合物的元素分析结果

Tab 2 Results of elements analysis of luteolin-Zn(II) complex

| 化合物 | C, % | | H, % | | Zn, % | |
|---------------|-------|-------|------|------|-------|-------|
| | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 |
| 木犀草素 | 60.47 | 62.94 | 3.37 | 3.49 | - | - |
| 木犀草素-锌(II)配合物 | 44.30 | 45.81 | 3.51 | 3.62 | 14.83 | 14.67 |

注:“-”为未检测到

Note:“-” means not detected

经紫外、红外、TG-DTA与元素分析,木犀草素-锌(II)配合物的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6\text{Zn}(\text{COOCH}_3)(\text{H}_2\text{O})\cdot\text{H}_2\text{O}$;推测出其可能的化学结构如图4所示。

2.3 木犀草素及其配合物对酶抑制活性的测定

2.3.1 溶液的制备 (1) α -葡萄糖苷酶溶液:准确称取 α -葡萄糖苷酶10.0 mg,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 5.0)溶解并定容至10 ml

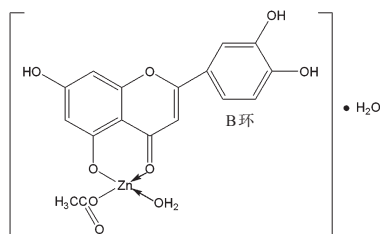


图4 木犀草素-锌(II)配合物的化学结构式

Fig 4 Chemical formula of luteolin-Zn(II) complex

量瓶中。(2)谷胱甘肽溶液:准确称取10.0 mg还原型谷胱甘肽,用蒸馏水溶解并定容至10 ml量瓶中。(3)PNPG溶液:准确称取0.087 36 g PNPG,用25 ml PBS(pH 5.0)溶解并定容至10 ml量瓶中,其浓度为0.011 6 mol/L。

2.3.2 α -葡萄糖苷酶最优反应条件的考察 反应体系为1 mg/ml谷胱甘肽50 μ l、1 mg/ml α -葡萄糖苷酶200 μ l,用PBS(一定pH)稀释至1.5 ml。于不同温度下保温10 min后,加入0.011 6 mol/L PNPG 0.5 ml,反应30 min后,用0.2 mol/L Na_2CO_3 5 ml终止反应,于400 nm波长处测定反应体系的吸光度(A_0),并以 A_0 表示 α -葡萄糖苷酶活性水平。

(1)pH对酶活性的影响 pH对酶反应活性的影响十分重要。在温度为50 $^{\circ}\text{C}$, pH分别为4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0时,对酶活性进行测定。结果表明,pH为5.0时酶活性最佳。

(2)温度对酶活性的影响 在pH为5.5,温度分别为40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 时,对酶活性进行测定。结果表明,温度为55 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性最佳。

2.3.3 酶抑制活性的测定及计算 分别取200 μ l 4.5×10^{-5} 、 8.5×10^{-5} 、 11.0×10^{-5} 、 14.0×10^{-5} 、 16.5×10^{-5} 、 19.0×10^{-5} mol/L木犀草素及其配合物溶液加入反应体系中,于55 $^{\circ}\text{C}$ 下保温10 min,方法同上,在400 nm波长处测定 A_0 。抑制率: $p(\%) = (A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%$,式中: A_0 为不加待测溶液时反应体系的吸光度, A_1 为加入待测液溶液后反应体系的吸光度。不同浓度木犀草素及其配合物的酶抑制率见表3;木犀草素及其配合物的浓度-抑制率曲线见图5。

表3 不同浓度木犀草素及其配合物的酶抑制率(%)

Tab 3 Inhibition rates of luteolin with different concentrations and its complex (%)

| 化合物 | 不同浓度下($\times 10^{-5}$ mol/L)酶抑制率 | | | | | |
|---------------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 4.5 | 8.5 | 11.0 | 14.0 | 16.5 | 19.0 |
| 木犀草素 | 21.01 | 23.55 | 25.28 | 27.01 | 29.67 | 32.75 |
| 木犀草素-锌(II)配合物 | 21.08 | 26.11 | 28.66 | 31.92 | 36.05 | 42.70 |

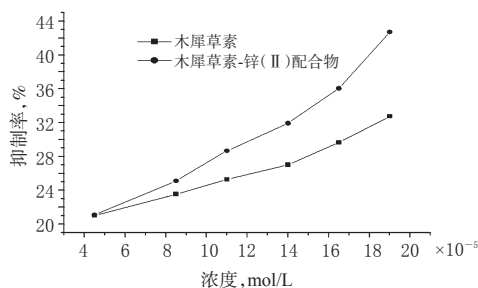


图5 木犀草素及其配合物的浓度-抑制率曲线

Fig 5 Curve of concentration-inhibition rate of luteolin and its complex

由表3、图5结果可知,木犀草素及其锌配合物对 α -葡萄糖苷酶均能产生抑制作用,且随着浓度的增大抑制作用也随之增强。在试验浓度内木犀草素及其锌配合物对酶的最大抑制率分别为32.75%和42.70%,其半数抑制浓度(IC_{50})分别为2.52、1.50 mmol/L。

2.4 抑制作用类型的确定

在其他条件不变的条件下,取浓度为0.011 6 mol/L的PNPG溶液0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 ml,各加入木犀草素及其配合物0、1.0、2.0 ml分别测定反应速度,用Lineweaver-Burk双倒数作图法确定抑制作用类型。结果表明,木犀草素及其配合物对 α -葡萄糖苷酶抑制效果随抑制剂的质量浓度增加而增大,米氏常数(K_m)随抑制剂质量浓度的增加而变小,最大反应速度(V_{max})保持不变。由此可知两者的抑制类型属于竞争性抑制。根据竞争性抑制动力学方程,可求出其两者的抑制常数(K_i)分别为 3.02×10^{-3} 、 5.41×10^{-3} mol/L, V_{max} 分别为1.77、2.00 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 。

3 讨论

木犀草素-锌(II)配合物的合成条件为:以无水乙醇为溶剂, pH为9.0,温度为80 $^{\circ}\text{C}$ 。平均产率为76.68%。

α -葡萄糖苷酶在pH为4.5~5.5之间均可发挥较强的活性,且pH为5.0时其作用最佳;当pH达到7时,该酶活性则迅速下降。在温度为45~60 $^{\circ}\text{C}$ 时, α -葡萄糖苷酶均能发挥其良好活性,且在温度为50 $^{\circ}\text{C}$ 时活性最强;当温度高达70 $^{\circ}\text{C}$,大部分酶已经失活。

木犀草素及其配合物均能抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,随着浓度的增加其抑制作用也随之增强,而且木犀草素-Zn(II)配合物的抑制作用比原配体木犀草素更强。这也说明微量元素Zn(II)与木犀草素的配位位置没有影响到其降糖活性的作用基团,且使其作用增强。

木犀草素及其配合物之所以具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用,其原因可能是由于B环3'和4'位置上的羟基对酶活性发挥了重要的抑制作用,这也是木犀草素及其配合物对 α -葡萄糖苷酶活性主要的抑制机制;当木犀草素与 Zn^{2+} 形成络合物后,由于电子云的移动作用结果,使得B环上羟基的活性增强,从而增强了其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用;此外其可将无机锌转化为有机锌,从而更利于人体吸收和利用,并平衡其体内微量元素,可能会增强糖尿病患者的疗效。因此,期望将其开发成一种具有双重功效的降糖补锌剂,也为天然黄酮类物质的开发与利用开辟了一条新的途径。

参考文献

- [1] 顾觉醒,陈紫娟. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究与应用[J].药学进展,2009,33(2):62.
- [2] 马燕燕,鲁晓翔.天然产物 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选研究进展[J].粮食与油脂,2010(6):7.
- [3] 李兴霞,郭澄.木犀草素的药理活性研究[J].中国药房,2007,18(18):1 421.
- [4] Zhao J, Wang LF. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complex[J]. J Inorg Biochem, 2007, 83(1):41.
- [5] 张瑞敬,陶成玉,罗云虎.血清中微量元素三价铬的含量与糖尿病的关系分析[J].微量元素与健康研究,2011,28(4):9.
- [6] 吴胜华,李吕木.有机微量元素研究与应用进展[J].农产

马栗籽提取物对衰老模型小鼠氧化损伤的改善作用^Δ

高江霞^{1*}, 王艳红², 孟敏², 翟晶², 葛斌^{2#} (1. 甘肃省人民医院耳鼻喉科, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2175-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.05

摘要 目的: 研究马栗籽提取物(EEHS)对衰老模型小鼠氧化损伤的改善作用。方法: 采用sc给予D-半乳糖(120 mg/kg), 每天1次, 连续42 d以复制小鼠衰老模型。60只小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、维生素E(阳性对照, 50 mg/kg)组与EEHS高、中、低剂量(300、150、75 mg/kg)组, 后5组小鼠复制模型的同时ig给药, 每天1次, 连续42 d。测定小鼠血清、肝脏和脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性与丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清、肝脏和脑组织中SOD、GSH-Px活性减弱, iNOS活性增强, MDA、NO含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, EEHS高、中、低剂量组小鼠血清、肝脏和脑组织中SOD、GSH-Px活性增强, iNOS活性减弱, MDA、NO含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: EEHS对衰老模型小鼠的氧化损伤有一定改善作用, 其机制可能与增加机体抗氧化酶活性, 提高清除自由基、抗氧化能力有关。

关键词 马栗籽提取物; D-半乳糖; 衰老; 小鼠; 氧化损伤; 抗氧化作用

Improvement Effects of Extract from Hippocastanum Seeds on the Oxidative Damage of Aging Mice Model

GAO Jiang-xia¹, WANG Yan-hong², MENG Min², ZHAI Jing², GE Bin² (1. Dept. of Otolaryngology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the improvement effects of extract from hippocastanum seeds (EEHS) on the oxidative damage of aging model mice. **METHODS:** D-galactose (120 mg/kg) was sc given to mice by hypodermic injection once a day for consecutive 42 d to establish aging models. 60 mice were randomly divided into normal control group (isometric normal saline), model group (isometric normal saline), vitamin E group (positive control, 50 mg/kg), and EEHS high, medium and low doses groups (300, 150, 75 mg/kg). During the establishment of models, the drugs were given to the last five groups of mice, ig, once a day, for consecutive 42 d. The activities of the superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the contents of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in the serum, liver and brain tissues of the mice were determined. **RESULTS:** Compared with normal control group, the activities of the SOD and GSH-Px in the serum, livers and brain tissues of the mice in model group were decreased, the activity of the iNOS therein increased, and the contents of MDA and NO were increased, with significant difference ($P < 0.01$). Compared with model group, the activities of the SOD and GSH-Px in the serum, livers and brain tissues of the mice in the EEHS high, medium and low dose groups were increased, the activity of the iNOS therein was decreased, and the contents of MDA and NO were decreased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** EEHS has certain improvement effects on the oxidative damage of the aging model mice by a mechanism that may be related to the enhancement of the activity of antioxidant enzyme, the elimination of free radical and the improvement in oxidation resistance.

KEYWORDS Extract from hippocastanum seeds; D-galactose; Aging; Mice; Oxidative damage; Antioxidant effects

- 品加工, 2007(12):56.
- [7] 刘维会, 刘雪婷. 微量元素锌与糖尿病[J]. 中国疗养医学, 2009, 18(4):354.
- [8] 滕杨, 侯丽然, 侯巍, 等. 木犀草素-铬配合物的合成及其

Δ基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(No.145RJZA051)
*副主任护师。研究方向: 临床护理学。E-mail: 279985941@qq.com

#通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 新药临床前研究。E-mail: gjy0630@126.com

- 清除 DPPH 自由基活性的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(39):3 666.
- [9] 韩炜, 邢燕, 康廷国. 木犀草素生物活性研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(4):60.
- [10] 陈玲玲, 吴春, 李俊生. 木犀草素-锌(II)配合物的制备及清除自由基活性研究[J]. 化学与黏合, 2009, 31(6):19.

(收稿日期: 2014-07-27 修回日期: 2014-10-12)

(编辑: 张静)