

# $\alpha$ - 葡萄糖苷酶抑制剂的制备和活性研究进展

李玉萍<sup>1</sup>, 白冰<sup>1</sup>, 叶军<sup>2</sup>, 刘华<sup>1</sup>, 刘莹<sup>1</sup>, 张魏<sup>1</sup>

(1.江西科技师范学院生命科学学院, 江西 南昌 330013;

2.厦门大学生命科学学院生命医学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 文中综述了国内外用天然植物和微生物制备具有降血糖作用的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的工艺过程, 并对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的检测方法进行了总结。

**关键词:**  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂; 制备; 检测

## Reviews on Preparation and Determination of $\alpha$ -glucosidase Inhibitor

LI Yu-ping<sup>1</sup>, BAI Bing<sup>1</sup>, YE Jun<sup>2</sup>, LIU Hua<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>

(1.College of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China

2. Department of Biomedical Science, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** The preparation process of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from natural plant and microorganism with hypoglycemic activity was detailedly discussed in this paper. And the main determination methods of this inhibitor were detailedly summarized.

**Key words:**  $\alpha$ -glucosidase inhibitor; preparation; determination

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)09-0617-04

$\alpha$ -葡萄糖苷酶(glucosidase, EC 3.2.1.20)又叫 $\alpha$ -D-葡萄糖苷水解酶或麦芽糖酶(maltase), 是一种存在于小肠绒毛粘膜细胞刷状缘的在机体的代谢过程中起着关键作用的酶<sup>[1-2]</sup>, 参与了人体对摄入的淀粉和蔗糖等碳水化合物的消化吸收、糖蛋白和糖脂的加工, 与许多因代谢紊乱失调而引起的疾病、免疫反应、神经细胞的分化、肿瘤的转移以及病毒和细菌的感染有密切关系<sup>[3-7]</sup>。目前, 临床上通过抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性来治疗某些疾病已有报道, 研究最为成熟的是治疗糖尿病的口服降糖药物 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂, 已被第三次亚太地区糖尿病治疗药物指南推荐为降餐后血糖的一线药物<sup>[3,8-9]</sup>。因此, 研究开发 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂成为近年来药物化学的热点, 许多学者在生产和制备高纯度的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂方面进行了大量的研究工作。

### 1 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的简介

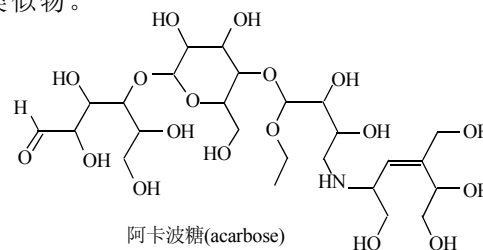
$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是一类以延缓肠道碳水化合物吸收而达到治疗糖尿病的口服降糖药物。其作用机制为: 竞争性抑制位于小肠的各种 $\alpha$ -葡萄糖苷酶, 使淀粉类分解为葡萄糖的速度减慢, 从而减缓肠道内葡萄糖的吸收, 降低餐后高血糖。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂不刺

激 $\beta$ 细胞分泌胰岛素, 但可增加胰岛素的敏感性<sup>[8-9]</sup>。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的成分随来源物的不同而不同, 依文献记载桑叶中被认为是多糖和生物碱<sup>[10]</sup>; 茶叶中多是茶多糖<sup>[11]</sup>; 虎杖中为糖类聚合物和鞣质<sup>[12]</sup>; 杜仲中为槲皮素<sup>[13]</sup>; 知母中为皂甙<sup>[14]</sup>等。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的竞争类型也不尽相同, 就目前的研究而言知母是竞争型<sup>[14]</sup>而虎杖则为非竞争型<sup>[12]</sup>。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂及其衍生物的结构变化如: 羟基构象、C-1位取代、聚合度、阳离子等的变化都会影响其与酶的结合能力, 与酶有高结合力的物质要满足一定的结构要求, 如恰当的羟基构象、阳离子、共价连接的环形的半椅或椅状构型等<sup>[15]</sup>。

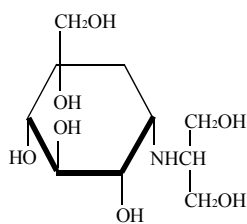
目前,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂主要有3种: 阿卡波糖、伏格列波糖和米格列醇, 其化学结构都有低聚糖结构类似物。



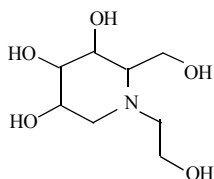
收稿日期: 2008-04-22

基金项目: 江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]285号); 江西科技师范学院人才创新基金项目

作者简介: 李玉萍(1964-), 女, 教授, 博士, 研究方向为功能因子的机能性。E-mail: liyp20012000@yahoo.com.cn



伏格列波糖(voglibose)



米格列醇(miglitol)

## 2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的制备

随着研究的深入,人们不断地从天然产物中发现 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。目前,国内外对于 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研制大都经历以下程序:原料 $\rightarrow$ 粉碎 $\rightarrow$ 水提 $\rightarrow$ 离心去沉淀 $\rightarrow$ 上清液活性炭脱色 $\rightarrow$ 大孔吸附树脂柱、离子交换柱、凝胶柱层析等 $\rightarrow$ 过滤浓缩 $\rightarrow$ 抽滤 $\rightarrow$ 醇沉 $\rightarrow$ 浓缩 $\rightarrow$ 目的物干燥 $\rightarrow$  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。但是根据原料的不同, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的制备过程又存在着较大的差别。

### 2.1 不同方法制备的天然植物 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂

#### 2.1.1 大孔吸附树脂

大孔吸附树脂在天然产物的分离提取中有着广泛的应用。制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的过程如下:药材 $\rightarrow$ 粉碎 $\rightarrow$ 95%乙醇冷浸 $\rightarrow$ 回流提取、滤过 $\rightarrow$ 滤液减压浓缩 $\rightarrow$ 大孔吸附树脂柱 $\rightarrow$ 水洗至无色 $\rightarrow$ 70%乙醇洗脱、回收乙醇至干浸膏 $\rightarrow$  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。山茱萸上D101大孔吸附树脂柱<sup>[16]</sup>,虎杖上HZ802大孔吸附树脂柱<sup>[12]</sup>,用70%乙醇水溶液洗脱,分离效果较好。

#### 2.1.2 超临界流体萃取

修姗姗<sup>[17]</sup>、倪网东<sup>[18]</sup>等采用SFE技术,利用超临界CO<sub>2</sub>萃取装置,在粒径为40~65目之间、萃取压力为15~25MPa、萃取温度为40℃、萃取时间为2h、CO<sub>2</sub>流量25~30kg/h的萃取条件下能较好的制备 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂。该状态下流体所具有的高渗透能力和高溶解能力来萃取分离化合物,具有产品无溶剂残留,产物性质稳定、操作方便省时、萃取效率高、能耗少等优点。中药药全粉成分复杂,采用经典的提取方法费时费力,而经超临界提取的产物降糖活性有很大提高,远远优于全粉<sup>[17]</sup>。

### 2.1.3 高效液相色谱

Watanabe J等<sup>[13]</sup>曾测得杜仲对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为92%,经甲醇提取、乙酸乙酯萃取、HPLC分离得到5种 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂分别为:槲皮素、儿茶素- $\alpha$ (7,8-b.c)-4d-(3,4-二羟基)- $\alpha$ (3H)吡喃糖、儿茶素- $\alpha$ (7,8-b.c)-4 $\beta$ -(3,4-二羟基)- $\alpha$ (3H)葡萄糖、山奈酚 $\alpha$ -3-O- $\beta$ 葡萄糖和杜仲醇,其中槲皮素抑制效果最好。全吉淑<sup>[19]</sup>等采用C<sub>18</sub>柱层析法和HPLC分离大豆胚轴提取物,精制出B类、E类和DDMP皂苷单体,采用比色法测定了大豆皂苷单体对酵母 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用,结果发现大豆皂苷具有很强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性,且呈明显的剂量依赖性关系,属非竞争性抑制,能降低糖尿病大鼠血糖,改善糖耐量。

另外,研究人员还从多种植物包括地榆、青果、大黄、五倍子、赤芍、鸡血藤、甘草、葛根、锁阳、榧子、草豆蔻、五味子、钩藤、南沙参、丁香、菟丝子、丹参、连翘、山楂、紫苏子、海索草等<sup>[20]</sup>。

### 2.2 微生物由来的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂

20世纪60年代,日本科学家梅译滨夫提出了酶抑制剂概念起并开创了从微生物代谢物中寻找抗生素外的其它生物活性物质时代。1966年在链霉素的代谢物中,发现了野尻霉素(nojirimycin)<sup>[21]</sup>,后发现由链霉菌、芽孢杆菌和枯草杆菌产生的1-脱氧野尻霉素(nojirimycin B)对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有强烈的抑制作用<sup>[22]</sup>。1977年德国又从游离的放线菌Acetinoplanesstrain SE50、SE82和SE18的代谢物中提取近似低聚糖的阿卡波糖(acarbose)<sup>[23-24]</sup>。近年来,国内也有相关报道:郎国竣<sup>[25]</sup>等通过HD-1大孔酚醛系弱酸性阳离子交换树脂柱层析、HZ806大孔吸附树脂柱层析、硅胶薄层层析、高效液相制备色谱等方法对放线菌506157的次级代谢产物进行分离纯化,得到的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂纯样品(纯度95%以上)其体外活性约为药物拜唐平的10倍。

### 2.3 化学半合成的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂

人们以天然产物或微生物发酵产物为母体,根据天然抑制剂的结构进行修饰,通过化学半合成的方法得到了多种抑制剂。其中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂是一类可降低餐后高血糖的药物,主要有伏格列波糖和米格列醇。

#### 2.3.1 伏格列波糖

人工合成伏格列波糖有两条路线:一条是由有效霉素产生菌发酵并分离其产物有效霉素A,经过生物转化得到关键中间体valienamine,再通过化学合成;另一条途径是同样利用有效霉素产生菌进行发酵时,直接从其发酵代谢物产物中分离关键中间体valienamine,再通过化学合成获得<sup>[3-5]</sup>。其化学合成是将valiolamine与1,3-

二羟基丙酮反应, 形成薛夫氏碱, 随后还原制得, 反应中氨基和仲氨基形成的脱水缩合键与天然假性寡糖类  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂有所不同, 由于其分子中不具有糖苷键, 与天然产物相比, 对水解酶类、酸和碱都很稳定。

### 2.3.2 米格列醇(N-羟乙基-1-脱氧野尻霉素)

米格列醇属于新的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂, 结构与葡萄糖的化学结构类似, 属于 1-脱氧野尻霉素衍生物。制备方法通常是先由野尻霉素或 1-脱氧野尻霉素产生菌发酵, 制备获得野尻霉素或 1-脱氧野尻霉素, 然后再经过化学合成-生物转化-化学合成, 得到终产物。雷晓燕曾成功合成了 N-羟乙基-1-脱氧野尻霉素和 N-甲基-1-脱氧野尻霉素<sup>[26]</sup>。

## 3 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的测定

酶活性测定的常用方法: 比色法、分光光度法、荧光法、同位素法、离子选择电极法、旋光法、极谱法和高效液相色谱法等。

### 3.1 测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的方法

目前由于分光光度计的推广, 加之分光光度法简便、准确等特点使它在近年来已逐步取代比色法而成为目前最流行的方法。其原理是以无色的对硝基苯酚- $\alpha$ -D-葡萄糖苷(pNPG)作反应底物, 经  $\alpha$ -葡萄糖苷酶水解  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键后释放出对硝基苯酚(PNP), 在碱性条件下后者是黄色的, 最后通过监测 405 或 410 nm 下的 PNP 产生量作为  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶活性大小的判定标准。其中酶活力单位定义: 在 37℃、pH6.8 条件下, 1min 内水解 PNP 释放 1 $\mu$ mol 对硝基苯酚(PNP)所需的酶量。抑制剂活力单位定义: 在相同条件下降低 1 个酶活力单位所需的抑制剂量<sup>[27]</sup>。

### 3.2 测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性时的影响因素

因为酶反应体系受到包括: 酶、底物、抑制剂、保护剂、温度、pH 值、反应时间和终止方式八个因素的影响。研究者们建立了一个合适的酶-抑制剂模型: 以 PNP 为底物检测酶活性时, 底物浓度取 0.02~1.0mmol/L, 最适 pH 值为 6.8(采用磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液), 最适温度为 37℃, 最佳反应时间为 10min, 检测所用的波长 410nm<sup>[10,13,20,27]</sup>。

## 4 结 语

随着糖尿病、肥胖症等患者数量的增加和发生低龄化, 尽快研发各种新的降糖因子, 包括以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂型药物迫在眉睫。虽然  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的研究早在 20 世纪 70 年代中期国外即已开始, 但  $\alpha$ -葡萄糖苷酶及其抑制剂的研究属于一个新的研究领域。国外

主要倾向于化学和生化合成相结合, 从国内该方面的研究来看, 目前大多还局限于从中草药中粗提或尝试从微生物中提取, 对其活性成分进行分离、纯化和药理研究的报道很有限, 深入研究尚待加强。

另外, 从  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂类药物效果来讲, 以中草药为原料的中成药服用安全, 但因纯度偏低, 影响疗效; 国外的合成药疗效虽好, 但对人体的毒副作用大。因此, 期待未来的研究着重于对中草药提取物活性因子进行分离纯化和充分研究其构效关系的基础上, 运用基因工程技术对活性因子的基因结构进行分子修饰和协同复配, 获得抑制活性更强的中药  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂, 并进一步开发利用于临床治疗糖尿病。

### 参考文献:

- [1] 岳振峰, 陈小霞, 彭志英.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶研究现状及进展[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26 (3): 63 - 67.
- [2] 李宪瑾, 范晓. 海藻中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的分离鉴定及其活性机理的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001.
- [3] HORII S, FUKASE H. Synthesis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral anti-diabetic agents [J]. The Journal of Medical Chemistry, 1986, 29: 1038-1046.
- [4] CHEN X L, FAN Y X, ZHENG Y G, et al. Properties and production of valienamine and its related analogues [J]. Chem Rev, 2003, 103: 1955-1977.
- [5] ASANO N, NASH R J, MOLYNEUX R J, et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2000, 11: 1645-1680.
- [6] PILI R, CHANG J, PARTIS R A, et al. The alpha-glucosidase I inhibitor castanospermine alters endothelial cell glycosylation, prevents angiogenesis, and inhibits tumor growth [J]. Cancer Research, 1995, 55 (13): 2920-2926.
- [7] PILI R, CHANG J, MUHLHAUSER J, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of fibroblast growth factor-1: angiogenesis and tumorigenicity in nude mice [J]. Int J Cancer, 1997, 73(2): 258-263.
- [8] FLORIS A, PETER L, REINIER P, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2005, 28 (1): 154-163.
- [9] LEVETTAN C. Oral antidiabetic agents in type 2 diabetes [J]. Curr Med Res Opin, 2007, 23(4): 945-952.
- [10] 原爱红, 马骏, 蒋晓峰, 等. 桑叶中糖苷酶抑制活性组分的筛选[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 223-227.
- [11] 倪德江, 陈玉琼. 绿茶、乌龙茶、红茶的茶多糖组成、抗氧化及降血糖作用研究[J]. 营养学报, 2004, 26(2): 57-60.
- [12] 沈忠明, 殷建伟, 袁海波. 虎杖鞣质的降血糖作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004(3): 45-47.
- [13] WATANABE J, KAWABATA J, KURIHARA H, et al. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(1): 177-178.
- [14] 杨军衡, 曾雷, 易诚, 等. 中药知母新皂苷成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 18-19.
- [15] 陈海敏, 严小军, 林伟.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的构效关系[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(6): 780-784.
- [16] 罗培, 莫正纪. 优化山茶菜中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的提取工艺[J]. 华西药学杂志, 2004, 19(4): 273-274.
- [17] 修姗姗, 雍克岚, 陈莉莉, 等. 血竭超临界提取物的降血糖作用及其

- 机制研究[J].天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 766-768.
- [18] 倪网东, 满瑞林, 李乐于, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取虎杖中有效成分的研究[J]. 化学工程师, 2006, 132(9): 3-7.
- [19] 全吉淑, 尹学哲, 工藤重光. 大豆胚轴中大豆皂甙的提取及其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 食品研究与开发, 2006 (10): 206-210.
- [20] 林玉桓, 王翔林, 王颖, 等. 34 种中药对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的抑制作用[J]. 大连轻工业学院学报, 2004(4): 36-38.
- [21] INOVE S, TSURUOKA T, NIIDA T. The structure of nojirimycin,  $\alpha$  piperidinose sugar antibiotic[J]. J Antibiot, 1966, 19: 288-291.
- [22] NIWA T, TSURUOKA T, GOI H, et al. Novel glycosidase inhibitors nojirimycin B and D-mannonic-delta-lactam. Isolation, structure determination and biological property[J]. J Antibiot, 1984, 37: 1579-1581.
- [23] SCHMIDT D, FROMMER W, MULLER L, et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin[J]. Naturwissenschaften, 1977, 64: 535-536.
- [24] MARTIN A E, MONTGOMERY P A. Acarbose: an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor[J]. Am J Health Syth Pharm, 1996, 53(9): 2277-2290.
- [25] 郎国竣, 杨贇, 高菊芳. 微生物源  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂 506157 的分离纯化及结构鉴定[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(10): 38-40.
- [26] 雷晓燕. 微生物转化法在制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂中的应用研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2000.
- [27] PIERRE C, TREMBLAY R R, DUBE J Y. P-Nitrophenol- $\alpha$ -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen[J]. J Clin Chem, 1978, 24: 208-211.

## 《茶叶科学》征订征稿启事

《茶叶科学》——中文核心期刊, 中国科学引文及中国学术期刊综合评价数据库来源期刊, CA、CAB 等收录。主要报道涉茶科技成果, 内容包括茶树栽培、育种、病虫害防治、茶叶加工、生化、机械、技术经济、茶饮料、茶食品和保健品、茶的医用保健等。

《茶叶科学》为双月刊, 大 16 开本, 每期定价 10 元, 全年订价 60 元。为简化手续, 订刊只需在汇款单上写清收刊地址、收件人、订购数量等详细信息即可, 并可一次订购今后 1~3 年的期刊。款到即寄期刊及发票。免邮费。

来稿务求主题合适, 内容新颖, 论据可靠, 方法正确, 文字简练。撰写格式请参考本刊近期发表的文章 ([www.tea-science.com](http://www.tea-science.com))。各类基金项目论文、博士论文、国外论文优先录用。来稿一经录用, 酌收版面费, 同时酌付稿酬。

**邮汇及寄稿:** 浙江省杭州市梅灵南路 9 号《茶叶科学》编辑部, 邮编 310008

**银行汇款:** 杭州市农行西湖支行, 帐号: 19-000101040005296, 中国农业科学院茶叶研究所。汇款时请注明“茶叶科学”。

**电 话:** (0571) 86651482 (投稿及订刊); 86651902(编辑部主任)

**E-mail:** cykx@vip.163.com (投稿及订刊) zyx99@vip.163.com(编辑部主任)

**传 真:** (0571) 86650056 **网 址:** [www.tea-science.com](http://www.tea-science.com)

## 《粮油加工》杂志征订启事

邮发代号: 2-826 (月刊)

创刊于 1970 年的《粮油加工》(原《粮油加工与食品机械》), 该刊为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊全文入编期刊、万方数据期刊数字化期刊群收录期刊等。

《粮油加工》杂志奉行“立足粮油工业, 关注行业热点, 探求行业发展, 注重实用技术”的办刊理念。

《粮油加工》杂志每月 8 日出版, 大 16 开本, 每期定价 8.00 元, 全年 96.00 元。国内统一刊号: CN11-5534/TS, 国际标准连续出版物号: ISSN1673-7199, 邮发代号: 2-826, 广告经营许可证: 京朝工商广字第 0004 号。全国各地邮局(所)均可订阅。逾期可随时与杂志社联系补订。

地址: (100083) 北京德胜门外北沙滩 1 号 16 信箱

电话: (010) 64882643 64882565 传真: (010) 64882329 64870803

E-mail: cnlyjg@163.com lyjg@sohu.com

<http://www.lyjg.net>