

文章编号:1673-1689(2006)03-0067-05

大叶紫薇叶中降血糖活性成分的筛选

纵伟¹, 夏文水^{*1}, 崔宝良², 万金志³

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡杰西医药科技有限公司, 江苏 无锡 214036;
3. 中山大学 药学院, 广东 广州 510089)

摘要:为筛选大叶紫薇叶中具有降血糖活性的成分,采用 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗模型作为检测手段,对大叶紫薇叶提取物采用 HP-20 树脂吸附、溶剂萃取、制备薄层分离和制备高效液相分离,导向筛选具有降血糖作用的各分离组分。结果发现,大叶紫薇叶中 corosolic acid、熊果酸和总三萜具有降血糖活性。

关键词:大叶紫薇; 3T3-L1 细胞; 降血糖; 结构

中图分类号:S 685.99

文献标识码:A

Screening of *Lagerstroemia speciosa* Leaves Constituents Hypoglycemic Activity

ZHONG Wei¹, XIA Wen-shui^{*1}, CUI Bao-liang², WAN Jin-liang³

(1. School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Jiexi Pharmaceutical Technology Co. Ltd., Wuxi 214036, China; 3. College of Pharmacy, Zongshan University, Guanzhou 510089, China)

Abstract: To screen of *Lagerstroemia speciosa* leaves constituents with hypoglycemic activity, 3T3-L1 adipocytes were stimulated by seperation component to measure the effect of glucose consumption activity. The components in *Lagerstroemia speciosa* leaves extract were separated by HP-20 resin, solvent extraction, PTLC and PHPLC. The result showed that the components of corosolic acid, ursolic acid and total triterpenes have the effect of hypoglycemic activity.

Key words: *Lagerstroemia speciosa* leaves; 3T3-L1 adipocytes; hypoglycemic activity; structure

大叶紫薇(*Lagerstroemia speciosa* L.)为千屈菜科的落木乔木,主要生长于澳洲和亚洲,在我国广东、广西、福建等地也有种植,在菲律宾和亚洲其他国家,大叶紫薇被称为 banaba,大叶紫薇的叶、花、果和茎传统上被用来制作保健饮料,具有降血糖、抗氧化和减脂等功能^[1-5]。近年来,大叶紫薇对

糖尿病的治疗作用日益引起人们的重视,日本、美国、菲律宾等许多国家对其降糖和治疗糖尿病的功效成分和药理作用进行了广泛研究^[6-9]。明确大叶紫薇中的降血糖活性成分,对开发大叶紫薇产品具有重要的意义。

3T3-L1 细胞是一种成纤维细胞,在胰岛素、地

收稿日期:2005-01-19; 修回日期:2005-03-15.

基金项目:河南省科技攻关项目(324010016).

作者简介:纵伟(1965-),男,安徽萧县人,副教授,工学博士;* 通讯作者。

塞米松、3-甲基-1-异丁基等作用下,具有转变为脂肪细胞的能力,近年来,被广泛应用于有关糖尿病的研究中^[10-11],作者采用 3T3-L1 前脂肪细胞葡萄糖消耗实验模型作为降血糖有效成分的筛选模型,对大叶紫薇中的降血糖活性成分进行筛选。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大叶紫薇叶 (*Lagerstroemia speciosa* L.),产于广西和广东。corosolic acid;纯度 $\geq 95\%$,Chromadex 公司产品;硅胶 G;青岛海洋化工厂产品。正丁醇、乙酸乙酯、石油醚、冰醋酸、香草醛、高氯酸等均为分析纯;葡萄糖氧化酶试剂盒、葡萄糖、L-谷氨酰胺;上海华美生物公司产品;胰岛素、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、地塞米松;美国 Sigma 公司产品;3T3-L1 细胞,美国 ATCC 提供。

CO₂培养箱、超净工作台酶标仪、显微镜、旋转真空浓缩器、冷冻干燥机、Waters600HPLC、Pyris-1 型差示扫描量热仪(DSC)、R200D 型电子微量天平、UV-754 紫外可见分光光度计、Waters Platform ZMD 4000 液相色谱仪、岛津 IR-440 红外光谱仪、恒温水浴锅、电热烘箱、超声发生器等。

1.2 实验方法

1.2.1 3T3-L1 细胞的培养及诱导分化 将 3T3-L1 细胞接种于培养瓶中,用含质量分数 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液培养,待细胞铺满瓶壁后,换用诱导分化培养液培养 48 h,然后换以含 1 $\mu\text{g/mL}$ 的胰岛素培养液再培养 48 h,再换用含质量分数 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液培养继续培养,每 48 h 换培养液一次,待 90% 以上的 3T3-L1 细胞呈现脂肪细胞表型时,再用于葡萄糖消耗实验。

1.2.2 葡萄糖消耗能力的测定 将诱导分化成熟的 3T3-L1 细胞换上含质量分数 0.2% BSA 的含药培养液,在 24 孔培养板中温育 48 h,然后检测培养液中的葡萄糖残量,计算含药培养的葡萄糖消耗值,同时测定空白对照组的葡萄糖消耗值,按下式计算样品的葡萄糖消耗值能力。

$$E\% = \frac{(C_0 - C_1)}{(C_0 - C_2)} \times 100\%$$

式中: E 为三萜化合物对 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗提高率%; C_0 为培养前孔中葡萄糖浓度(mmol/L); C_1 为加三萜化合物组培养后孔中葡萄糖浓度(mmol/L); C_2 为对照组培养后孔中葡萄糖浓度(mmol/L)。

1.2.3 提取分离步骤 大叶紫薇叶先经热水和乙醇分别提取,得热水提取物(WE)和乙醇提取物(AE),热水提取物经过浓缩后上 HP-20 大孔树脂柱分别以水和乙醇进行洗脱,得水提取物水洗部分(WE_W)和醇洗部分(WE_A);乙醇提取物浓缩,真空干燥后后分别以石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取各 3 次,分别得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物,其中乙酸乙酯萃取物经过制备薄层分离后得 8 条条带,分别为 PTLC₁、PTLC₂……PTLC₈,其中 PTLC₆ 经过制备高效液相进一步分离为 PHPLC₁ 和 PHPLC₂。对其中的强活性单体化合物进行结构分析。

1.2.4 制备薄层分离 将萃取物在经活化(105 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)的 1 mm 厚的质量分数 0.5% 羧甲基纤维素钠-硅胶 G 薄板上条状点样,同时在点样部分旁点上相同的溶液作为对照样,在层析缸中展开,展开后取出,挥干溶剂,在对照样的部分喷质量分数为 10% 的硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中 10 min 显色,然后刮取于红紫色部分相对应的样品部分的条带,用甲醇为溶剂,经 200 W 超声提取、洗脱 3 次,每次 10 min,洗脱液合并后真空浓缩,加少量水冻结,冷冻干燥。

1.2.5 制备高效液相分离 采用 Waters600 溶剂泵系统, Waters600 控制单元和 Waters2487 双波长检测器;色谱柱: $\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$ C₁₈ 10 μm , 7.8 mm $\times$ 250 mm;流量:3 mL/min;检测波长:206 nm 进样量:100 μL ;流动相:V(体积分数 60% 乙腈):V(体积分数 0.2% 甲酸)=60:40。

1.2.6 高活性组分定性反应 对高活性组分分别进行醋酐-浓硫酸反应(Liebermann-Burchard 反应, LB 反应),五氯化锑反应(Kahlenberg 反应),三氯醋酸反应(Rosen-Heimer 反应),氯仿-浓硫酸反应(Salkowski 反应)和冰醋酸-乙酰氯反应(Tschugacff 反应)。

1.2.7 熔点测定 准确称量 1~2 mg 样品平铺于铝制坩埚内,使之与低面紧密接触,仪器先用铟和锌准确校正后,对样品进行差示扫描量热(DSC)测定,扫描速率 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,用冰浴作为降温介质,氮气为清扫气体。

1.2.8 红外光谱测定 采用岛津 IR-440 红外光谱仪器,溴化钾压片,扫描波长 400~4 000 cm^{-1} 。

1.2.9 紫外光谱测定 将样品溶于乙醇溶液中,在 190~300 nm 的波长范围内,每隔一定的波长测定溶液的吸光度值,绘制溶液的吸光度曲线。

1.2.10 质谱测定 质谱条件:离子方式:EIS(m/z

200~1500);毛细管电压:3.88 kV,锥孔电压:38 V;离子源温度:120 ℃;脱溶剂气温度:250 ℃;光电倍增器电压:650 V;分析器真空度:2.6~5.0 mPa;体积流量:4.2 L/h。

1.2.11 核磁共振测定 核磁共振仪上测定氢谱(¹H-NMR),全去偶碳谱(¹³C-NMR),以四甲基硅烷(TMS)为内标物。

2 结果和讨论

2.1 各组分的活性

将大叶紫薇叶的水提取物、醇提取物和醇提取物各萃取组分进行葡萄糖消耗实验,结果见表 1。

表 1 水提取物、醇提取物和醇提取物各萃取组分葡萄糖消耗率($\bar{X}\pm s,n=3$)

Tab.1 Effect of all extracton fraction on glucose consumption activity in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{X}\pm s,n=3$)				%
组别	剂 量/(g/L)			
	0.1	1.0	10.0	
水提取物	103.0±6.4	107.5±8.6	103.8±12.0	
醇提取物	109.8±12.4	130.1±7.9**	123.3±11.7*	
石油醚萃取物	140.0±12.8**	174.8±12.0**	154.1±12.8**	
乙酸乙酯萃取物	180.8±9.8**	188.7±7.9**	181.6±6.4**	
正丁醇萃取物	127.1±18.1	133.1±13.5*	135.7±12.8**	

* $P<0.05$,与空白相比显著; * * $P<0.001$ 与空白相比非常显著

从表 1 中可见,0.1 g/L、1.0 g/L 和 10.0 g/L 的水提取物和 0.1 g/L 乙醇提取物 $P>0.05$,与空白相比不显著,而 10.0 g/L 乙醇提取物 $P<0.05$,与空白相比显著;1.0 g/L 乙醇提取物 $P<0.001$ 与空白相比非常显著,表明促进葡萄糖消耗能力的活性成分可能存在于乙醇提取物中。乙醇提取物的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取物中,石油醚和乙酸乙酯萃取物活性都非常显著($P<0.001$)。采用 1 mm 厚的硅胶 G 薄板,对乙醇提取物的石油醚和乙酸乙酯萃取物进行分离,发现石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物三萜类组分基本相同,由于石油醚萃取物呈油状,分离困难,因此,采用乙酸乙酯萃取物进行分离,得 8 个组分 PTLC₁-PTLC₈,对各组分进行葡萄糖消耗实验,结果见表 2。

从表 2 可见,组分 PTLC₃和 PTLC₆具有明显的

促进葡萄糖消耗能力,经过 HPLC 分析,组分 PTLC₃为单一组分,而 PTLC₆为单二个组分,PTLC₆经过制备液相分离,得 PHPLC₁和 PHPLC₂,对这二组分进行活性测定,结果见表 3。

表 2 制备薄层各组分葡萄糖消耗率($\bar{X}\pm s,n=3$)
Tab.2 Effect of PTLC fraction on glucose consumption activity in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{X}\pm s,n=3$)

组别	剂 量/(g/L)			%
	0.1	1.0	10.0	
PTLC ₁	118.8±9.8	116.2±15.0	118.0±12.0	
PTLC ₂	104.9±4.1	124.4±16.5	107.5±3.8	
PTLC ₃	221.4±15.8**	241.4±14.7**	226.0±16.9**	
PTLC ₄	129.3±9.8*	133.5±12.8*	126.7±7.5*	
PTLC ₅	124.4±7.5*	125.2±10.5*	120.0±7.1*	
PTLC ₆	255.6±10.2**	278.9±7.5**	262.4±4.1**	
PTLC ₇	111.3±5.6	118.3±7.5*	121.1±5.3	
PTLC ₈	103.4±5.7	104.5±6.5	101.5±5.0	

* $P<0.05$,与空白相比显著; * * $P<0.001$ 与空白相比非常显著

表 3 制备液相各组分葡萄糖消耗率($\bar{X}\pm s,n=3$)
Tab.3 Effect of PHPLC₁和 PHPLC₂ on glucose consumption activity in 3T3-L1 adipocytes ($\bar{X}\pm s,n=3$)

组别	剂 量/(g/L)			%
	0.1	1.0	10.0	
PHPLC ₁	256.0±4.9**	278.9±7.9**	263.4±6.8**	
PHPLC ₂	124.4±7.9*	135.3±12.0*	126.6±7.8*	

* $P<0.05$,与空白相比显著; * * $P<0.001$ 与空白相比非常显著

从表 3 可见,组分 PHPLC₁具有明显的促进葡萄糖消耗率的作用。

2.2 活性组分结构分析

2.2.1 PTLC₃和 PHPLC₁的定性反应 活性分析表明,PTLC₃和 PHPLC₁具有较强的活性,因此,对 PTLC₃和 PHPLC₁进行定性反应,结果如表 4。

表 4 各种定性反应

Tab. 4 The reaction of L-B, Kahlenberg, Rosen-Heimer, Salkowski and Tschugacff

反应名称	现 象	
	PTLC ₃	PHPLC ₁
L-B	黄→红→紫→蓝，最后褪色	黄→红→紫→蓝，最后褪色
Kahlenberg	蓝色	蓝色
Rosen-Heimer	红→紫	红→紫
Salkowski	氯仿层呈红色，有绿色荧光	氯仿层呈蓝色，有绿色荧光
Tschugacff	淡红色	紫红色

三萜类化合物在无水情况下，与强酸(硫酸、磷酸、高氯酸等)作用，会出现呈色反应或呈荧光，主要是以上试剂使羟基脱水、增加双键结构，再经双键移位，双分子缩合等反应生成共轭双烯系统，又在酸作用下形成阳碳离子盐而呈色，所以产生一系列呈色反应。分离的各组分各种颜色反应均呈阳性，表明各分离组分可能含有三萜类化合物，但由于三萜类组分所发生的一些呈色反应，甾体化合物也有类似反应，所以，所分离的化合物是否为三萜化合物还需要进一步进行红外、核磁等结构分析。

2.2.2 PTLC₃ 结构分析 结构分析结果如下：
m. p: 283-287 ℃；UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$: 204 nm；IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 3540 cm^{-1} (-OH), 1720 cm^{-1} (C=O)；ESI- m/z : 455 (M-1)；ESI+ m/z : 479 (M+Na)。

$^1\text{H-NMR}(\text{C}_5\text{D}_5\text{N}) \delta (\times 10^{-6})$: 0.90, 1.01, 1.02, 1.03, 1.24 (3Heach, 0,5×CH₃), 0.96, 1.00 (3H each, d, 2×CH₃), 5.49 (1H, t, $J=3.5$ Hz, H-12)

$^{13}\text{C-NMR}(\text{C}_5\text{D}_5\text{N}) \delta (\times 10^{-6})$: 39.2 (C-1), 28.2 (C-2), 78.3 (C-3), 39.4 (C-4), 56.0 (C-5), 18.9 (C-6), 33.7 (C-7), 39.6 (C-8), 48.2 (C-9), 37.5 (C-10), 17.5 (C-11), 125.7 (C-12), 139.4 (C-13), 42.8 (C-14), 28.8 (C-15), 25.0 (C-16), 48.2 (C-17), 53.7 (C-18), 40.1 (C-19), 39.5 (C-20), 31.2 (C-21), 37.4 (C-22), 28.9 (C-23), 15.7 (C-24), 16.5 (C-25), 17.5 (C-26), 23.7 (C-27), 179.8 (C-29), 21.4 (C-30)。

以上数据与文献报道的熊果酸相同^[12]，鉴定为熊果酸。

2.2.3 PHPLC₁ 结构分析 对斑点 PHPLC₁ 进行质谱分析，其相对分子质量为 472，与文献报道的 corosolic acid 的相对分子质量相同，表明其可能为 corosolic acid。为了进一步证明，将其与 corosolic acid 对照品进行

ESI-和 ESI+的谱图比较，结果见图 1，发现它们基本相同。进一步进行薄层对照，结果见图 2，两者的 R_f 相同，进一步证明 PHPLC₁ 化合物为 corosolic acid。

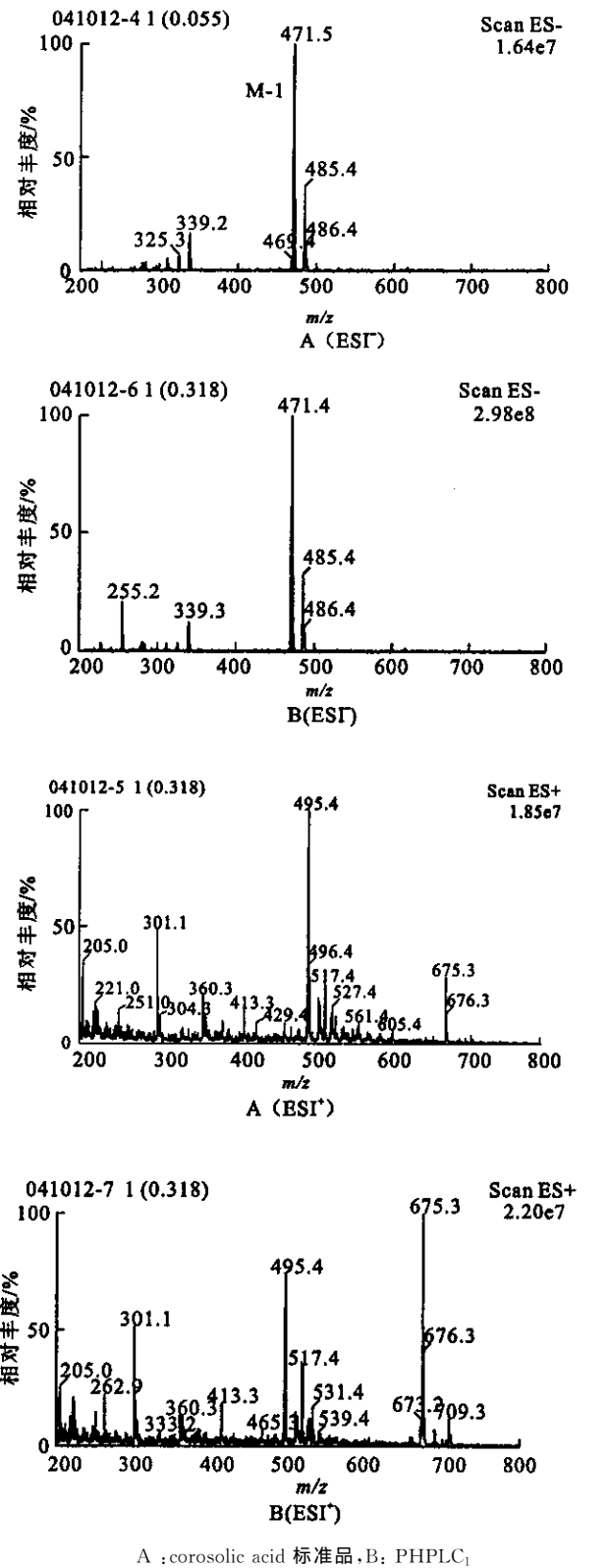


图 1 Corosolic acid 标准品和 PHPLC₁ 的质谱比较

Fig. 1 Comparision of corosolic acid standard and PHPLC₁ fraction by MS

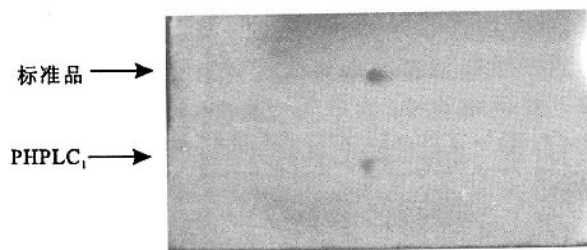


图 2 Corosolic acid 标准品 和 PHPLC₁ 的薄层比较

Fig. 2 Comparision of corosolic acid standard and PHPLC₁ fraction by TLC

3 结 论

1)大叶紫薇叶中三萜化合物 corosolic acid 对促进 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗影响显著,具有降血糖的功能。

2)首次发现大叶紫薇叶中存在熊果酸,与总三萜化合物都具有显著促进 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗的能力,也具有降血糖的功能作用。

参考文献:

- [1] Hamamoto Syoichi, Kogami Hideharu, Kohata Katsuya. Glucose effect on blood glucose in rats[J]. **Yakuri to Chiryo**, 1999, 27(6):1075—1077.
- [2] Ikeda Y, Chen J-T, Matsuda T. Effectiveness and safety of banaba tablet containing extract from banaba in patients with mile type 2 diabetes[J]. **Japanese Pharmacology & Therapeutics**, 1999, 27:829—835.
- [3] Tomonori U, Iwao Ti, Masumizu M K. Antioxidative activity of water extracts of *Lagerstroemia speciosa* leaves[J]. **Biosic Biotech Biochem**, 1997, 61(10):1772—1774.
- [4] Tomonori U, Iwao S, Takami T. Isolation of xanthine oxidase inhibitors lagerstroemia[P]. 日本专利:JP 2000290188, 2002.
- [5] Yoshio Ikeda, Jui-Tung Chen, Takemi Mtsuda. Effectiveness and safety of banabamin tablet containing extract from banaba in patients with mild type 2 diabetes[J]. **Japan Pharmacology & Therapeutics**, 1999, 27:829.
- [6] Murakami C, Myoga K, Kasai R, et al, Screening of plant constituents for effect on glucose transport activity in Enrich as-cites tumour cells[J]. **Chemical and Pharmaceutical bulletin**, 1993, 41:2129—2231.
- [7] Kazama Masayoshi, Toyo Koso, Kangaku K. Influence of banaba-kuwa extracted on plasma glucose level in rat[J]. **Food Style**, 2002, 6(4):98—102.
- [8] Takeo H, Haruko M, Royji K, et al. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells[J]. **Planta Med**, 2002, 68:173—175.
- [9] Fan Liu, Kim J K, Li Y S, et al, An extract of *Lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cell[J]. **Biochemical and Molecular Action of Nutrients**, 2001, 131(9):2242—2247.
- [10] Reiko Kamei, Michinori K, Yoshinori K, et al. 2'-benzyloxylcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes[J]. **Life Sci**, 2003, 73:2091—2099.
- [11] Yup Kang, Hye Y K. Glucose uptake-stimulatory activity of amomi semen in 3T3-L1 adipocytes[J]. **J of Ethnopharmacol-ogy**, 2004, 92:103—105.
- [12] Hung Chien-Ya, Yen Gow-Chin. Extraction and identification of antioxidative components of Hsiao-tsao(*Mesona procumbens* Hemsl)[J]. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 2001, 34(5):306—311.

(责任编辑:朱 明)