

# 老鼠簕生物碱 A 及其衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

阳春苗, 郑广进, 龙盛京\*, 陈永好, 韦贤(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

**摘要:** 目的 研究老鼠簕生物碱 A 及其衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响, 以期为进一步深入研究提供实验基础及结构依据, 并拓展老鼠簕生物碱 A 及其衍生物的应用范围。方法 以老鼠簕生物碱 A 及其衍生物为待测样品, 阿卡波糖为阳性对照, 采用 Bernfeld 法测定比较各化合物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响。结果 a-1、a-2、a-3、a-4、a-5、b-7 在样品浓度为 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 g·L<sup>-1</sup> 时均对 $\alpha$ -淀粉酶有抑制作用, 且在实验浓度范围内随着浓度增加抑制率增大, 浓度为 10.0 g·L<sup>-1</sup> 时抑制率分别为 10.24%、71.52%、63.79%、19.71%、52.76%、38.96%。而 a-7、b-3、b-1 随浓度的增大, 表现出增强 $\alpha$ -淀粉酶水解活性的趋势。结论 推测老鼠簕生物碱 A 结构中的酚羟基是其对 $\alpha$ -淀粉酶起抑制作用的基本药效基团, 对老鼠簕生物碱 A 进行结构修饰时, 保留 4-位酚羟基并在 7-位引入氯原子、酰基或含羟基取代基均有利于抑制 $\alpha$ -淀粉酶的活性; 而以乙酰氧基取代 4-位酚羟基, 并使 7-位用含羧基取代基取代或 3-位无取代或以小分子基团取代时均有利于增强 $\alpha$ -淀粉酶的水解活性。

**关键词:** 老鼠簕生物碱 A; 衍生物;  $\alpha$ -淀粉酶; 抑制作用

中图分类号: R962.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)03-0205-04

## Study on Effect of *Ilicifolius Alkaloids A (4-Hydroxy -2-benzoxazolone, HBOA) and Its Derivatives on $\alpha$ -Amylase Activity*

YANG Chunmiao, ZHENG Guangjin, LONG Shengjing\*, CHEN Yonghao, WEI Xian(Pharmaceutical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To provide an evidence to do further study on inhibiting  $\alpha$ -amylase and explore the application areas of *Ilicifolius Alkaloids A (4-Hydroxy-2-benzoxazolone, HBOA)*. The effects of HBOA and its derivatives on  $\alpha$ -amylase activity were also studied in this paper. **METHODS** With Acarbose as positive control, the effects of HBOA and its derivatives on  $\alpha$ -amylase activity were compared by Bernfeld method. **RESULTS** a-1, a-2, a-3, a-4, a-5, b-7 could inhibit the activity of  $\alpha$ -amylase, and the inhibition rate increased when the concentration increased in the experimental concentration range. Their inhibition rates were 10.24%, 71.52%, 63.79%, 19.71%, 52.76%, 38.96% on the 10.0 g·L<sup>-1</sup> concentration. While a-7, b-3, b-1 could reinforce the activity of  $\alpha$ -amylase. **CONCLUSION** The author suggested that in order to better define the inhibition effects of  $\alpha$ -amylase there is a need to synthesize some HBOA derivatives which carry chlorine atom, acyl group or hydroxyl group at position 7 of the HBOA and retain the phenolic hydroxyl group at position 4. However, taking acetoxyl group at position 4 and carboxyl group at position 7 or small group can non-yl at position 3 could reinforce the activity of  $\alpha$ -amylase.

**KEY WORDS:** *ilicifolius alkaloids A*; derivatives;  $\alpha$ -amylase; inhibition effects

$\alpha$ -淀粉酶是一种能水解淀粉、糖原和有关多糖中的 O-葡萄糖键的酶, 从分子内部随机切开 $\alpha$ -1, 4-糖苷键, 生成 $\alpha$ -糊精和葡萄糖等还原糖, 其广泛分布于动物、植物和微生物中。 $\alpha$ -淀粉酶是一种十分重要的酶制剂, 大量应用于粮食加工、食品工业、酿造、发酵、纺织品工业和医药行业等, 它占了整个酶制剂市场份额的 25%左右<sup>[1]</sup>。国内外研究机构对 $\alpha$ -淀粉酶及影响其活性的条件给予了极大关注, 对能增强 $\alpha$ -淀粉酶水解功能的条件和物质进行研究及筛选在工业上具有一定的发展前景。

$\alpha$ -淀粉酶抑制剂是属于糖(苷)水解酶抑制剂

中的一种, 它能有效地抑制肠道内唾液及胰淀粉酶的活性, 阻碍食物中碳水化合物的水解和消化, 减少糖分的摄取, 降低血糖和血脂含量水平, 进食后不产生高血糖症, 从而使胰岛素分泌减少, 脂肪合成降低, 体重减轻<sup>[2]</sup>。因此, 在医药行业中 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂被广泛用于预防和治疗糖尿病、高血脂等疾病。从 20 世纪 30 年代至今, 国内外研究机构对 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂进行了大量研究及筛选, 研究对象主要集中在真菌、细菌及植物提取物几个方面。

老鼠簕为一种药用红树林植物。本课题组前

基金项目: 广西科学基金资助项目(桂科基 0342003-4)

作者简介: 阳春苗, 女, 硕士生 Tel: 15240658411 E-mail: chunmiaomiao@163.com \*通信作者: 龙盛京, 男, 教授, 硕导  
Tel: 15878171783 E-mail: shjlong@126.com

期主要从事红树林植物爵床科老鼠簕的提取分离工作, 经过大量的提取分离工作得到几个生物碱单体, 通过波谱分析、结构确证其中的一个化合物是老鼠簕生物碱 A(4-羟基苯并恶唑-2-酮, 英文名为 4-Hydroxy-2-benzoxazolone, 简称 HBOA), 该化合物为首次报道在天然植物中存在<sup>[3]</sup>, 其后以成熟方法对 HBOA 进行了化学全合成。有文献报道, 绿茶、红茶、普洱茶及巴拉圭茶多酚等茶多酚提取物对 $\alpha$ -淀粉酶均具有不同程度的抑制作用<sup>[4-7]</sup>。基于 HBOA 的酚羟基结构基础, 笔者初步研究了老鼠簕生物碱 A 及其衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响, 以期对 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的进一步深入研究提供实验基础及结构依据, 并拓展老鼠簕生物碱 A 及其衍生物的应用范围。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 材料**  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -Amylase, 4 000 U $\cdot$ mg<sup>-1</sup>, 厦门星隆达化学试剂有限公司), 阿卡波糖(规格: 每片 50 mg, 杭州中美华东制药有限公司, 批号: 101002), 老鼠簕生物碱 A 及其衍生物(笔者所在课题组合成, 已通过 IR、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、MS 确定结构, 部分理化性质见表 1 和表 2), 柠檬酸,

柠檬酸钠, 3,5-二硝基水杨酸, 氢氧化钠, 丙三醇和可溶性淀粉均为分析纯。

**1.1.2 仪器** 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司), 恒温水浴锅(北京市医疗设备厂), 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), 漩涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂), 超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 老鼠簕生物碱 A 及其衍生物的合成** 老鼠簕生物碱 A 及其衍生物由本课题组化学全合成, 并经 MS、IR、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 确定结构, 其中 HBOA 的化学结构见图 1。本实验待测样品共 14 个, 按其结构中 4-位取代基不同分为 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物和 4-乙酰氧基取代苯并恶唑-2-酮衍生物两类, 分别见表 1 和表 2。

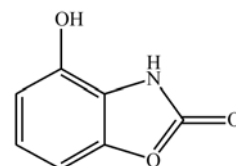


图 1 HBOA 的化学结构

Fig 1 The chemical structure of HBOA

表 1 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物

Tab 1 4-Hydroxy-2-benzoxazolone derivatives

编号	化合物名称	产率/%	性状	mp/°C
a-1	4-羟基苯并恶唑-2-酮	71.69	白色有光泽片状结晶体	293-294
a-2	7-氯-4-羟基苯并恶唑-2-酮	61.46	白色粉末状固体	226-228
a-3	7-丁酰基-4-羟基苯并恶唑-2-酮	72.85	白色针状晶体	168-170
a-4	7-(1-(2-羟乙基氨基)乙基)-4-羟基苯并恶唑-2-酮	91.10	浅黄色絮状物	270-271
a-5	7-(1-(2-羟乙基氨基)丁基)-4-羟基苯并恶唑-2-酮	45.45	浅黄色絮状物	255-257
a-6	2-(1-(4-羟基苯并恶唑-2-酮-7-基)亚丁基氨基)乙酸	56.12	白色絮状固体	180-182
a-7	2-(1-(4-羟基苯并恶唑-2-酮-7-基)亚丁基氨基)丙酸	56.16	白色絮状固体	144-146
a-8	6-(1-(4-羟基苯并恶唑-2-酮-7-基)亚丁基氨基)己酸	44.91	浅棕色粉末状固体	138.5-140

表 2 4-乙酰氧基取代苯并恶唑-2-酮衍生物

Tab 2 4-Acetoxy-2-benzoxazolone derivatives

编号	化合物名称	产率/%	性状	mp/°C
b-1	4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	89.10	白色针状晶体	191-193
b-2	3-乙酰基-4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	48.51	白色针束状结晶	91-93
b-3	3-甲基-4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	86.95	白色针状晶体	97-98
b-4	3-正丁基-4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	64.27	白色晶体	49-50.5
b-5	3-苄基-4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	81.27	白色固体	111-112
b-6	7-氯-4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮	56.58	白色粉末状固体	259-261

**1.2.2  $\alpha$ -淀粉酶活性测定** 采用 Bernfeld 法<sup>[8]</sup>测定。取 0.2 mL 用 0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 柠檬酸缓冲液(pH=5.6)配制的 10 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的 $\alpha$ -淀粉酶溶液于试管中, 加入 0.4 mL 可溶性淀粉溶液(20 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>)和 0.4 mL

柠檬酸缓冲液, 充分混匀, 至于 37°C 水浴中孵育 30 min 后, 加入 6.5 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的 3,5-二硝基水杨酸溶液 3.0 mL, 混匀, 于沸水浴中反应 10 min, 室温冷却后, 取其反应液 0.5 mL, 加入蒸馏水 4.5 mL,

混匀。用紫外可见分光光度计于 520 nm 下测定吸光值。

**1.2.3 老鼠筋生物碱 A 及其衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响** 按“1.2.2”项下方法，总反应体系体积为 1 mL，其中可溶性淀粉溶液 0.4 mL， $\alpha$ -淀粉酶溶液 0.2 mL，待测样品溶液 0.2 mL， $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸钠缓冲溶液 0.2 mL，充分混匀，将反应体系至于  $37^\circ\text{C}$  水浴中孵育 30 min 后，加入 3,5-二硝基水杨酸溶液 3.0 mL，混匀，至于沸水浴中反应 10 min，室温冷却后，取其反应液 0.5 mL，加入蒸馏水 4.5 mL，混匀。测定  $A_{520\text{nm}}$  值。阳性对照管以 0.2 mL 的阿卡波糖溶液代替待测样品溶液。老鼠筋生物碱 A 及其衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响用抑制率来表示，酶抑制率按下式计算：

$$\text{抑制率}(\%) = (A1 - A2) / A1 \times 100\%$$

A1 为未添加待测样品的酶活，A2 为添加待测样品后的酶活。

**1.2.4 老鼠筋生物碱 A 及其衍生物以及阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )计算** 根据老鼠筋生物碱 A 及其衍生物以及阿卡波糖不同浓度样品反应后测得的吸光度，进行非线性拟合，得出各化合物抑制率的回归方程，并由方程计算出各化合物对 $\alpha$ -淀粉酶的半数抑制浓度。

## 2 结果

### 2.1 阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶半数抑制浓度测定

阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶抑制作用的量-效曲线见图 2。结果表明，阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用在浓度大于  $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  后抑制率趋于平缓，最大抑制率约为 80%。

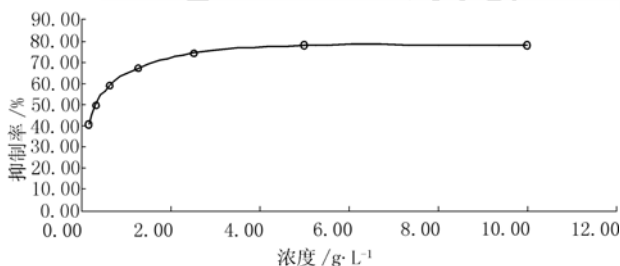


图 2 阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶抑制作用

Fig 2 The inhibition effects of Acarbose on  $\alpha$ -amylase

### 2.2 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响

不同浓度的 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响的量-效曲线见图 3，结果表明，a-1、a-2、a-3、a-4、a-5 在样品浓度为  $0.625$ ，

$1.25$ ， $2.5$ ， $5.0$ ， $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时均对 $\alpha$ -淀粉酶有抑制作用，在实验浓度范围内随着浓度增加抑制率增大，浓度为  $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时抑制率分别为 10.24%、71.52%、63.79%、19.71%、52.76%。在同一浓度下 a-2、a-3、a-4、a-5 的抑制率均大于 a-1 的抑制率。a-6、a-8 在低浓度时对 $\alpha$ -淀粉酶无抑制作用，高浓度时出现较小抑制率，a-7 基本无抑制作用而表现出微弱的增强 $\alpha$ -淀粉酶水解功能。

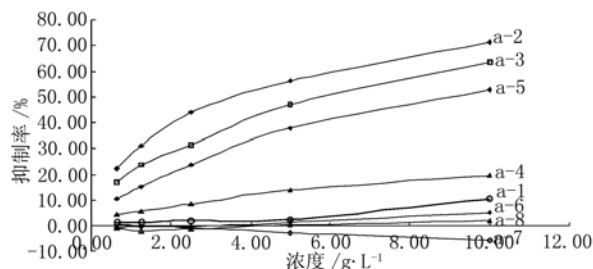


图 3 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响  
Fig 3 The inhibition effects of 4-hydroxy-2-benzoxazolone derivatives on  $\alpha$ -amylase

### 2.3 4-乙酰氧基取代的苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响

不同浓度的 4-乙酰氧基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响的量-效曲线见图 4，结果表明，b-6 对 $\alpha$ -淀粉酶有抑制作用，在实验浓度范围内随着浓度增加抑制率增大，最高浓度时抑制率为 38.96%。b-2 在低浓度时对 $\alpha$ -淀粉酶无抑制作用，高浓度时呈现抑制活性。其余 4 个待测 4-乙酰氧基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶无抑制作用，其中 3-位以小分子取代或无取代的 b-3、b-1 随浓度的增大，表现出增强 $\alpha$ -淀粉酶水解活性的趋势。

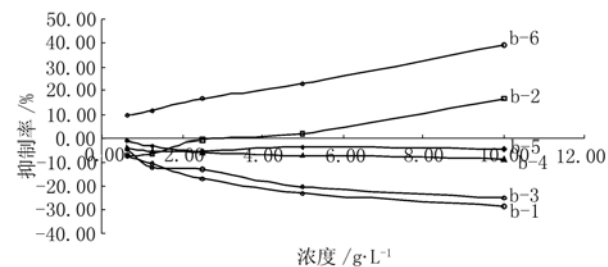


图 4 4-乙酰氧基取代苯并恶唑-2-酮衍生物对 $\alpha$ -淀粉酶活性影响  
Fig 4 The inhibition effects of 4-acetoxy-2-benzoxazolone derivatives on  $\alpha$ -amylase

### 2.4 老鼠筋生物碱 A 及其衍生物以及阿卡波糖对 $\alpha$ -淀粉酶的 $\text{IC}_{50}$ 计算

对图 2、图 3、图 4 中的曲线进行非线性拟合，

得出各化合物抑制率的回归方程及  $IC_{50}$  见表 3。结果表明, 所有的化合物都呈现一定的量效关系, 其中化合物 a-2、a-3 和 a-5 的  $IC_{50}$  值分别为 3.380,

5.595, 8.307  $g \cdot L^{-1}$ , 这些  $IC_{50}$  值都在本实验设定的实验浓度范围之内, 但均大于阳性药阿卡波糖的  $IC_{50}$  值。

表 3 老鼠筋生物碱 A 及其衍生物以及阿卡波糖对  $\alpha$ -淀粉酶的半数抑制浓度

Tab 3  $IC_{50}$  of HBOA derivatives and Acarbose on  $\alpha$ -amylase

化合物	回归方程	$R^2$	$IC_{50}/g \cdot L^{-1}$
阿卡波糖	$y=0.300x^3-5.190x^2+25.654x+40.967$	0.965	+0.381
a-1	$y=0.022x^3-0.200x^2+0.798x+0.616$	1.000	+15.807
a-2	$y=0.140x^3-2.690x^2+18.940x+11.311$	1.000	+3.380
a-3	$y=0.005x^3-0.434x^2+9.053x+12.061$	0.999	+5.595
a-4	$y=-0.014x^3+0.118x^2+1.837x+3.237$	1.000	+20.915
a-5	$y=-0.002x^3-0.327x^2+8.241x+5.254$	1.000	+8.307
a-6	$y=-0.012x^3+0.227x^2-0.541x-0.388$	0.999	+27.379
a-7	$y=0.003x^3-0.036x^2-0.633x+0.703$	0.998	-37.095
a-8	$y=-0.034x^3+0.523x^2-1.559x-0.645$	0.987	+20.248
b-1	$y=-0.040x^3+0.892x^2-7.487x-2.769$	1.000	-11.689
b-2	$y=0.083x^3-1.224x^2+6.740x-11.516$	0.993	+12.905
b-3	$y=-0.046x^3+0.949x^2-7.236x-1.622$	0.950	-14.803
b-4	$y=-0.017x^3+0.300x^2-1.895x-3.007$	0.991	-19.295
b-5	$y=-0.085x^3+1.363x^2-5.822x+2.287$	0.998	-14.257
b-6	$y=0.038x^3-0.577x^2+5.176x+6.524$	0.999	+11.841

注: “+” — 抑制酶活性; “-” — 增强酶活性

Note: “+”— inhibitory activity; “-”— enhanced activity

### 3 讨论

由实验结果可看出, 4-羟基取代苯并恶唑-2-酮衍生物中, 7-位分别以氢原子、氯原子、酰基、羟基取代基取代的衍生物对  $\alpha$ -淀粉酶有抑制作用, 其中, 以氯原子、酰基取代时抑制率较高,  $IC_{50}$  分别为 3.380  $g \cdot L^{-1}$  和 5.595  $g \cdot L^{-1}$ , 高浓度时抑制率与阿卡波糖相当, 7-位含羟基取代基衍生物抑制作用次之, 而 7-位含羧酸取代基衍生物几乎无抑制作用, 甚至表现为增强  $\alpha$ -淀粉酶活性的作用。4-乙酰氧基苯并恶唑-2-酮衍生物大多无  $\alpha$ -淀粉酶抑制作用, 而 b-6 有中等强度的抑制率, 与 a-2 比较, 其抑制率约为同浓度下 a-2 抑制率的一半。故推测, 老鼠筋生物碱 A 结构中的酚羟基是其对  $\alpha$ -淀粉酶起抑制作用的基本药效基团, 而事实上, 多酚类物质是多种酶促反应的有效抑制剂<sup>[9]</sup>, 另外, 4-乙酰氧基、7-羧酸取代基能拮抗酚羟基的抑制作用, 使衍生物对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制作用减弱, 甚至转为相反作用——增强  $\alpha$ -淀粉酶的水解作用。对老鼠筋生物碱 A 进行结构修饰时, 保留 4-位酚羟基并在 7-位引入氯原子、酰基或含羟基取代基均有利于抑制  $\alpha$ -淀粉酶的活性, 而以乙酰氧基取代 4-位酚羟基, 并使 7-位用含羧酸取代基取代或 3-

位无取代或以小分子基团取代时均有利于增强  $\alpha$ -淀粉酶的水解活性。

### REFERENCES

- [1] FENG J F. Application an research advances of  $\alpha$ -amylases [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology(现代农业科技), 2010, (17): 354-355.
- [2] LV F X, LU Y X. The research adveance on  $\alpha$ -amylases inhibitor [J]. Food Sci(食品科学), 2002, 23(3): 152-155.
- [3] PENG X, LONG S J. Chemical constituents in stem of *Acanthus ilicifolius* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(7): 971-973.
- [4] XIONG J H, LIU Z H. Extraction and purification of polyphenols from *ilex paraguarensis* and its effects on activity of ptyalin [J]. J Hunan Agricultural Univ (Nat Sci)(湖南农业大学学报: 自然科学版), 2006, 32(3): 313-315.
- [5] RUAN M Y, ZHANG G Y. Study on the inhibition of tea polyphenol on amylase [J]. J Anhui Agricultural Sci(安徽农业科学), 2008, 36(11): 4371-4373.
- [6] LIU Z Q, HUANG H H. Inhibition effects of extracts from green tea and black tea on  $\alpha$ -amylase [J]. Mod Food Sci Technology(现代食品科技), 2010, 26(7): 680-683.
- [7] ZHANG D Y, YU S, HUANG Y W, et al. Study on effects of pu-erh tea on inhibition of a-amylase [J]. Sci Technology Food Industry(食品工业科技), 2009, 30(2): 77-79.
- [8] JIA G F. Preparation and determination of alpha-amylase inhibitor [J]. Food and Drug(食品与药品), 2007, 9(2): 34-36.
- [9] DI Y, SHI B. Plant polyphenols(植物多酚) [M]. Beijing: Science Press, 2000: 111-117.

收稿日期: 2011-07-27