

引文格式: 孙振春, 姜天丽, 葛永辉, 等. 烟草花多酚对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(5): 808–815. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202211040

烟草花多酚对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制分析*

孙振春¹, 姜天丽^{1,2}, 葛永辉², 杨 慧¹, 苏贤坤^{1**}

(1. 贵州省烟草科学研究院, 贵州 贵阳 550081; 2. 贵阳学院 食品与制药工程学院, 贵州 贵阳 550005)

摘要: 【目的】研究烟草花多酚对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及机制。【方法】采用酶抑制、酶动力学、荧光光谱和分子对接等试验方法对烟草花多酚的体外降糖活性及机理进行研究。【结果】烟草花多酚对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶的半抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 0.188 5 mg/mL 和 0.002 5 mg/mL, 抑制类型均为混合型抑制, 且多酚与 2 种酶均发生静态猝灭, 分子对接显示小分子与酶蛋白之间通过疏水和氢键等作用结合而发挥抑制作用。【结论】烟草花多酚的体外降糖活性显著, 具有天然酶抑制剂开发的潜力。

关键词: 烟草花; 多酚; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2023) 05-0808-08

Inhibitory Effects and Mechanism Analysis of Polyphenols from Tobacco Flower on α -Amylase and α -Glucosidase

SUN Zhenchun¹, JIANG Tianli^{1,2}, GE Yonghui², YANG Hui¹, SU Xiankun¹

(1. Guizhou Tobacco Science Research Institute, Guiyang 550081, China;

2. Food and Pharmaceutical Engineering Institute, Guiyang College, Guiyang 550005, China)

Abstract: [Purpose] To study the inhibitory effects and mechanism of polyphenols from tobacco flower on α -amylase and α -glucosidase. [Methods] The hypoglycemic activity and mechanism of polyphenols from tobacco flower *in vitro* were studied by enzyme inhibition, enzyme kinetics, fluorescence spectroscopy and molecular docking experiments. [Results] The 50% inhibiting mass concentration (IC_{50}) of polyphenols on α -amylase and α -glucosidase were 0.1885 mg/mL and 0.0025 mg/mL, respectively; the inhibition type was mixed type, and the static quenching of polyphenols and the enzyme protein occurred. The molecular bonding showed that the inhibition activity between small molecules and enzyme protein was formed through hydrophobic and hydrogen bonding. [Conclusion] Polyphenols from tobacco flower have significant hypoglycemic effect *in vitro* and have the potential to develop natural enzyme inhibitors.

Keywords: tobacco flower; polyphenols; α -amylase; α -glucosidase

收稿日期: 2022-11-22

修回日期: 2023-09-10

网络首发日期: 2023-10-09

*基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司项目 (2021XM25); 贵州省生物制药工程研究中心项目 (黔教合 KY 字 [2019]051); 贵州省特种经济作物示范型国际合作基地项目 (黔科合平台人才 [2020]4102); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2021] 一般 138)。

作者简介: 孙振春 (1991—), 男, 河南三门峡人, 博士, 助理研究员, 主要从事烟草化学研究。

E-mail: zhenchunsun@hotmail.com

**通信作者 Corresponding author: 苏贤坤 (1979—), 男, 湖北监利人, 博士, 副研究员, 主要从事烟草栽培与多用途开发利用研究。E-mail: 65613687@qq.com

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20231007.1702.007>



糖尿病是全球十大死亡原因之一的慢性代谢性疾病,根据2017年国际糖尿病联合会的统计,全球20~79岁人群糖尿病患病率为8.8%,预计到2030年,糖尿病将影响4.39亿成年人,其特征是由于环境和遗传因素的相互作用而引起的持续性高血糖,且易引起多器官损伤和并发症^[1-2]。在体内,淀粉最初由唾液和胰腺 α -淀粉酶水解,产生还原糖,如麦芽糖、麦芽三糖和麦芽低聚糖等,然后在小肠中的胰腺 α -葡萄糖苷酶作用下消化成葡萄糖^[3],因此,糖尿病预防和治疗的重要途径之一就是抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性。目前,市场上使用的糖尿病治疗药物不但昂贵,而且还有很多副作用,如磺酰脲类药物与患者心力衰竭具有相关性,二甲双胍缺乏心血管保护功效^[4-5],从天然植物资源中开发安全有效的天然酶抑制剂具有重要意义。

早在《滇南本草》和《本草汇言》中就有记载:烟草可以杀疟疾,治热毒恶疮、风湿和关节痛等;现代医学更发现其对淋巴结炎、带状疱疹和急性胃肠炎等疾病有明显的疗效^[6]。多酚类物质几乎存在于所有植物中,由于其结构的多样性和药理活性,研究人员一直致力于挖掘其作为药物的用途。烟草中多酚含量丰富^[7-8],且种植采摘过程中会产生大量废弃物,将其作为天然产物提取源,不但具有资源多样性、结构和化学多样性的优势,还可能为潜在的活性物质提供多元的可再生来源。因此,本研究选择烟草废料中利用最少的烟草花作为试验对象,评价多酚类物质对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制能力,通过酶动力学、荧光光谱和分子对接试验对其抑制类型、猝灭类型和对接位点进行分析,以期对烟草花多酚防治糖尿病提供药理基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

供试云烟87烟草花,于盛花期采自贵州省平坝区,自然晒干后打粉,过60目筛,避光保存。

1.1.2 试剂与仪器

α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、阿卡波糖和对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)购自阿拉丁试剂有限公司;甲酸、乙腈和甲醇为色谱纯;可溶

性淀粉、DNS显色剂、酒石酸钾钠和磷酸氢二钠等试剂均为国产分析纯。

IKA RV 10型旋转蒸发仪,德国IKA公司;VaCo 2型冷冻干燥机,德国Zirbus公司;Thermo Vanquish UHPLC超高效液相色谱仪、Q-Exact-ive HF高分辨质谱,美国Thermo Fisher Scientific公司;C18色谱柱,美国Agilent technologies公司;HITACHI F-7000荧光光谱仪,日本日立公司;SynergyH4酶标仪,美国Bio Tek公司。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草花多酚的提取

取烟草花粉末100.00 g,加入60%乙醇溶液700 mL,在70℃下超声1 h,过滤2次,滤液浓缩后用D101大孔树脂富集多酚,上样和洗脱流速为2.0 mL/min,80%乙醇溶液洗脱,收集洗脱液后浓缩,冷冻干燥成粉末^[9]。

1.2.2 多酚含量的测定

称取一定质量的1.2.1节多酚提取物粉末(记为 m_1),参考李应金等^[10]的方法和GB/T 21733—2008^[11],采用酒石酸亚铁比色法测定多酚提取量(记为 m_2),结果以绿原酸当量表示,得到标准曲线 $Y=0.0002x-0.0082$, $R^2=0.9990$,有效质量浓度为0~160 $\mu\text{g/mL}$ 。按公式计算多酚含量:多酚含量= $m_2/m_1\times 100\%$ 。

1.2.3 多酚成分的测定

参考文献[12-13]的方法并稍作改进。采用液相色谱—质谱联用(LC-MS/MS)技术对烟草花提取液进行分析,并对多酚类物质的成分进行鉴定。称取混合均匀的样品100.00 mg置于2 mL离心管中,加入70%甲醇1 mL和3 mm规格钢珠,研磨振荡破碎3 min,冷却后低温超声10 min;4℃下离心10 min,取上层清液稀释2~100倍。色谱分离条件:柱温30℃,流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈,流量0.3 mL/min,进样量2 μL 。洗脱程序为:5% B,0~2 min;30% B,2~7 min;78% B,7~14 min;95% B,14~20 min。正离子模式参数为:加热器温度325℃,鞘气310 kPa,辅助气103 kPa,电喷雾电压3.5 kV,毛细管温度330℃。使用Compound Discoverer 3.3进行保留时间校正、峰识别和峰提取等工作;使用Thermo mzCloud在线数据库和Thermo mzValut本地数据库,根据二次质谱信息鉴定多酚成分。

1.2.4 酶抑制活性的测定

参考文献 [14] 的方法并稍作改进。于 0.25 mL 不同质量浓度 (0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.20 和 0.40 mg/mL) 待测液中加入 α -淀粉酶溶液, 37 °C 水浴 10 min, 加入 1% 淀粉溶液 0.50 mL, 恒温 5 min, 加入 DNS 显色剂 1.00 mL, 沸水浴 5 min, 冷却后加水至 10.00 mL。于 520 nm 处测定吸光度值 A_1 ; 对照组用 PBS 代替待测液, 测得吸光度值 A_0 ; 基数组用 PBS 代替底物, 测得吸光度值 A_2 。选择阿卡波糖作为阳性对照, 按上述方法进行测定。计算 α -淀粉酶的抑制率: 抑制率=[1-(A_1-A_2)/ A_0] $\times$ 100%。

参考文献 [15] 的方法并稍作改进。分别取不同质量浓度 (0.0010、0.0025、0.0050、0.0075、0.0100、0.0150 和 0.0200 mg/mL) 待测液 1 mL、0.2 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液 1 mL 和 10 mmol/L pNPG 1 mL 混匀, 水浴 30 min, 加入 Na_2CO_3 溶液 5 mL 终止反应。于 405 nm 处测定吸光度值 B_1 ; 用 PBS 代替待测液, 测得吸光度值 B_0 ; 用 PBS 代替酶溶液, 测得吸光度值 B_2 。选择阿卡波糖作为阳性对照, 按上述方法进行测定。计算 α -葡萄糖苷酶的抑制率: 抑制率=[1-(B_1-B_2)/ B_0] $\times$ 100%。

1.2.5 抑制动力学研究

参考文献 [16] 的方法并稍作改进。设定底物淀粉溶液质量分数分别为 0.2%、0.4%、0.6% 和 0.8%, α -淀粉酶质量浓度为 1 mg/mL, 测定不同烟草花多酚质量浓度 (0、0.020、0.040 和 0.060 mg/mL) 和不同底物浓度 ($[S]$) 下的酶促反应速率 (V)。设定底物 pNPG 浓度分别为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L, α -葡萄糖苷酶含量为 0.2 U/mL, 测定不同烟草花多酚质量浓度 (0、0.005、0.010 和 0.020 mg/mL) 和不同底物浓度 ($[S]$) 下的酶促反应速率 (V)。以 $1/V$ 为纵坐标、 $1/[S]$ 为横坐标作图, 得到酶促反应速率与底物浓度的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线关系图; 再以多酚质量浓度为横坐标、 $1/V$ 为纵坐标绘制多酚质量浓度与酶促反应速率的 Dixon 图。

Lineweaver-Burk 图中 $1/V_{\max}$ 值为 y 轴截距, K_m 和 $V_{\max}$ 的比值为斜率, 交点横坐标绝对值为竞争性抑制常数 (K_{ic}); Dixon 图中, 交点横坐标绝对值为非竞争性抑制常数 (K_{iu})^[17], 以此进一步

判断抑制类型。

1.2.6 荧光光谱分析

参考文献 [18] 的方法并稍作改进。分别取质量浓度为 0、10、20、40、60 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 的烟草花多酚溶液与 1 mg/mL α -淀粉酶溶液混合; 取以上同质量浓度的样品溶液与 2.5 U/mL α -葡萄糖苷酶溶液混合, 18 和 37 °C 下水浴 30 min, 之后进行荧光光谱扫描。激发波长 280 nm、狭缝宽度 5 nm 时进行检测。用 Stern-Volmer 方程表示荧光猝灭:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{FQ}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]。$$

式中: F_0 和 F 分别为 α -淀粉酶或 α -葡萄糖苷酶蛋白与多酚相互作用前后的荧光强度; $[Q]$ 为多酚质量浓度; K_q 为猝灭速率常数; τ_0 为荧光物质在无猝灭剂影响下的平均寿命; K_{FQ} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。

1.2.7 分子对接分析

根据液相色谱—质谱仪分析的结果, 选择含量最丰富的芦丁进行分子对接模拟, 以间接预测多酚可能的结合位点。 α -淀粉酶 (PDB ID: 1DHK) 和 α -葡萄糖苷酶 (PDB ID: 3WY1) 的基本立体结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取, 芦丁的结构文件从 Pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取, 从 Play Molecule 网站 (<https://playmolecule.com/>) 预测最佳结合口袋, 对接口袋大小均为 $40\times40\times40$ 。利用 pymol 软件对蛋白进行去水和去配体等操作, 用 autodock tools 软件将蛋白和小分子进行对接。

2 结果与分析

2.1 多酚含量

多酚提取物中多酚含量纯化前为 198.67 mg/g, 纯化后为 412.12 mg/g。

2.2 化学成分

由表 1 可知: 烟草花中多酚类物质以芦丁、2-羟基肉桂酸和山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量最为丰富。

2.3 烟草花多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

由图 1 可知: 烟草花多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制率随其质量浓度的增加而增加,

表 1 烟草花提取物中的多酚类化学成分
Tab. 1 Chemical constituents of polyphenols in tobacco flower extracts

化合物 compound	分子式 molecular formula	保留时间/ min retention time	理论分子量 theoretical molecular weight	检测分子量 detection of molecular weight	检测偏差 error	相对含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) relative content
2-羟基肉桂酸 2-hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃	1.22	164.05	164.05	-0.35	405.28
对羟基苯甲醛 4-hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	1.22	122.04	122.04	0.91	52.59
5,7-二羟基-4-甲基香豆素 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin	C ₁₀ H ₈ O ₄	6.91	192.04	192.04	-1.01	161.76
泽兰黄酮 nepetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	9.29	316.06	316.06	-2.11	32.49
7-羟基香豆素 7-hydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₃	5.27	162.03	162.03	-1.03	164.68
山柰酚 kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	6.84	286.05	286.05	-2.64	51.76
山柰酚-7-O-葡萄糖苷 kaempferol-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	6.84	448.10	448.10	-2.15	33.16
山柰酚-3-O-芸香糖苷 kaempferol 3-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	6.84	594.16	594.16	-1.84	351.82
间苯三酚 phloroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	3.86	126.03	126.03	0.79	33.11
异槲皮苷 isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	6.49	464.10	464.09	-1.38	32.53
二氢槲皮素 taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	7.05	304.06	304.06	-1.62	73.03
绿原酸 chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	5.27	354.10	354.09	-1.91	237.63
槲皮素 quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	6.49	302.04	302.04	-2.13	61.10
芦丁 rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	6.49	610.15	610.15	-1.46	448.83

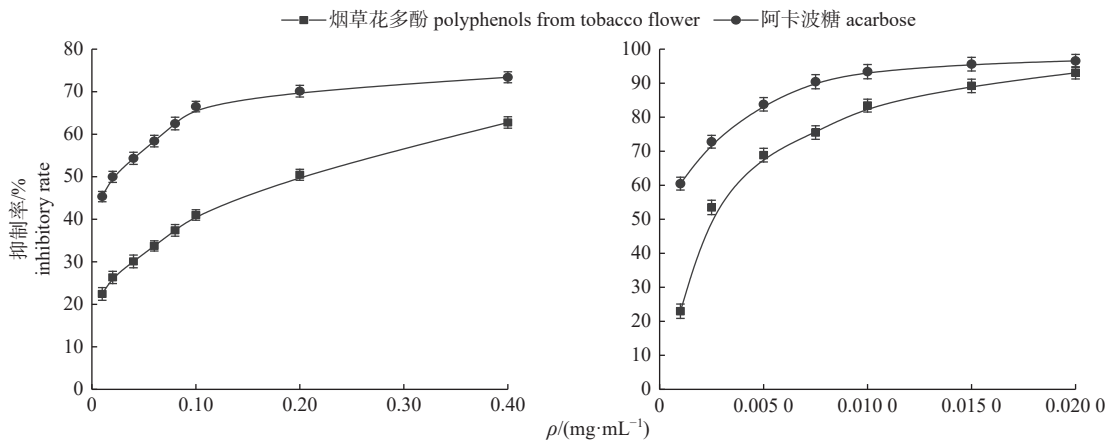


图 1 烟草花多酚对 α -淀粉酶 (左) 及 α -葡萄糖苷酶 (右) 的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of polyphenols from tobacco flower on α -amylase (left) and α -glucosidase (right)

在烟草花多酚质量浓度为 0.20 mg/mL 时, 其对 α -淀粉酶的抑制率为 62.76%, 拟合后的半抑制质量浓度 (IC_{50}) 为 0.188 5 mg/mL; 而在 0.02 mg/mL 时, 其对 α -葡萄糖苷酶的抑制率已达到 93.05%, 拟合后 IC_{50} 为 0.002 5 mg/mL, 与阿卡波糖的抑制率相当。表明烟草花多酚具有较好的体外降糖活性。

2.4 酶促反应动力学分析结果

由图 2 可知: 随烟草花多酚质量浓度的增加, V_{max} 值减小, K_{m} 值增大, 不同质量浓度直线分别相交于第二、三象限, 说明烟草花多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶属于竞争与非竞争混合型

抑制, 多酚可以与底物竞争结合酶的活性中心, 阻碍酶与底物形成产物, 还可以与酶的其他部位结合, 改变酶活性中心构象, 最终发挥酶抑制作用。经计算 (图 3), 烟草花多酚对 α -淀粉酶的 K_{ic} 值为 0.841 6 mg/mL、 K_{iu} 值为 0.026 2 mg/mL, 对 α -葡萄糖苷酶的 K_{ic} 值为 0.166 3 mg/mL、 K_{iu} 值为 0.006 8 mg/mL, 其竞争性抑制常数 > 非竞争性抑制常数, 说明烟草花多酚对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶都是竞争性强于非竞争性的混合型抑制。根据抑制动力学定义, $1/K_{\text{ic}}$ 值和 $1/K_{\text{iu}}$ 值越大, 抑制剂与酶结合能力越强, 相较之下, 多酚与 α -葡萄糖苷酶的结合力更强。

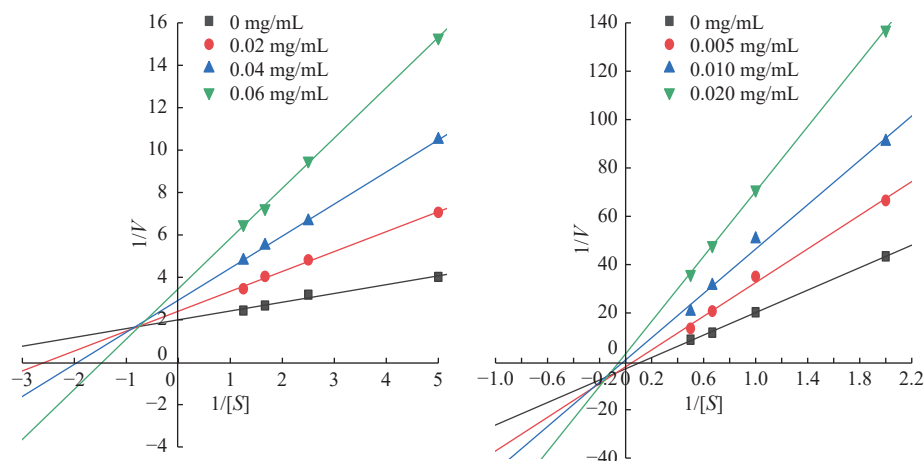


图 2 烟草花多酚对 α -淀粉酶(左)及 α -葡萄糖苷酶(右)抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 2 Lineweaver-Burk diagram of inhibition of polyphenols from tobacco flower on α -amylase (left) and α -glucosidase (right)

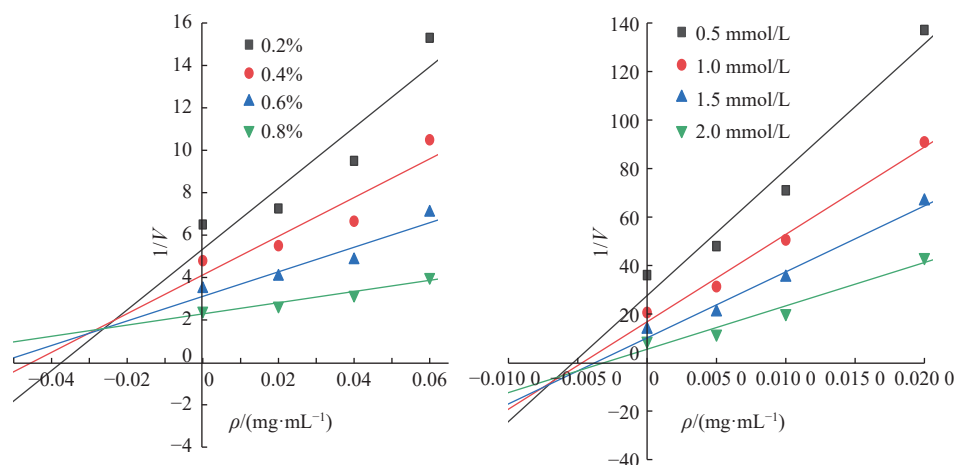


图 3 烟草花多酚对 α -淀粉酶(左)及 α -葡萄糖苷酶(右)抑制作用的 Dixon 图

Fig. 3 Dixon diagram of inhibition of polyphenols from tobacco flower on α -amylase (left) and α -glucosidase (right)

2.5 荧光光谱分析

由图 4 可知：在波长 300~400 nm 范围内，荧光强度均随多酚质量浓度的增加而减小，经计算，在 18 和 37 $^{\circ}\text{C}$ ，多酚与 α -淀粉酶的猝灭速率常数 (K_q) 分别为 1.89×10^{11} 和 1.18×10^{11} ，与 α -葡萄糖苷酶的 K_q 值分别为 1.15×10^{11} 和 9.16×10^{10} ， K_q 值均随温度升高而减小，且大于最大散射碰撞猝灭常数 [$2 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$]。可见，多酚与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶发生了静态猝灭，且随多酚质量浓度的变化，荧光猝灭效果更加明显。

2.6 分子对接结果

经 Play Molecule 预测得到芦丁与 α -淀粉酶蛋白的最优结合中心点坐标为 (X, Y, Z: 92.7, 24.9, 6.4)，芦丁与 α -葡萄糖苷酶蛋白的 B 链具有最优结合位点，坐标为 (X, Y, Z: 23.5, 18.3, -33.7)，对

接分数分别为 -5.52 和 -6.65 kcal/mol，再次验证了多酚与 α -葡萄糖苷酶结合更紧密。

由图 5 可知：芦丁小分子与 α -淀粉酶氨基酸残基 LEU-237、GLY-238、GLY-20、GLN-19、ASP-21、ASN-35、ALA-22、LEU-18、THR-23、VAL-24、LYS-13、SER-270、GLU-272、VAL-265、THR-264、TRP-284、LYS-261、LYS-257、ALA-260、SER-311 形成相互作用，与 α -葡萄糖苷酶氨基酸残基 TYR-235、ASN-233、PRO-230、ILE-146、ALA-229、GLY-228、LEU-227、PHE-206、ASP-274、GLY-273、THR-203、PHE-297、ILE-272、ASP-202、GLU-271、TYR-295、TYR-65、ARG-200、ASP-333、VAL-334、HIS-332、VAL-335、ASP-62、ARG-400、GLY-399、PHE-397、TYR-389、PHE-147、PHE-166 形成相互作用。

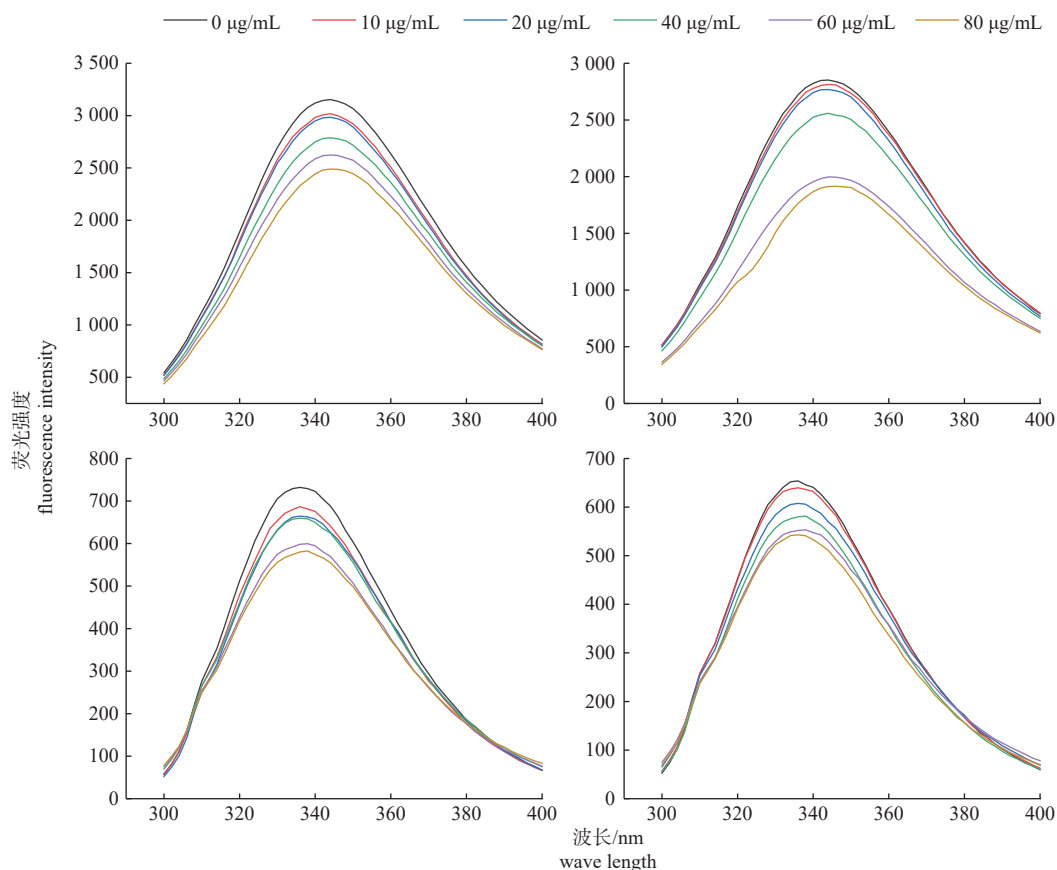


图 4 烟草花多酚在 18 °C (左) 和 37 °C (右) 时对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶荧光强度的影响

Fig. 4 Effects of polyphenols from tobacco flower on α -amylase and α -glucosidase fluorescence intensity at 18 °C (left) and 37 °C (right)

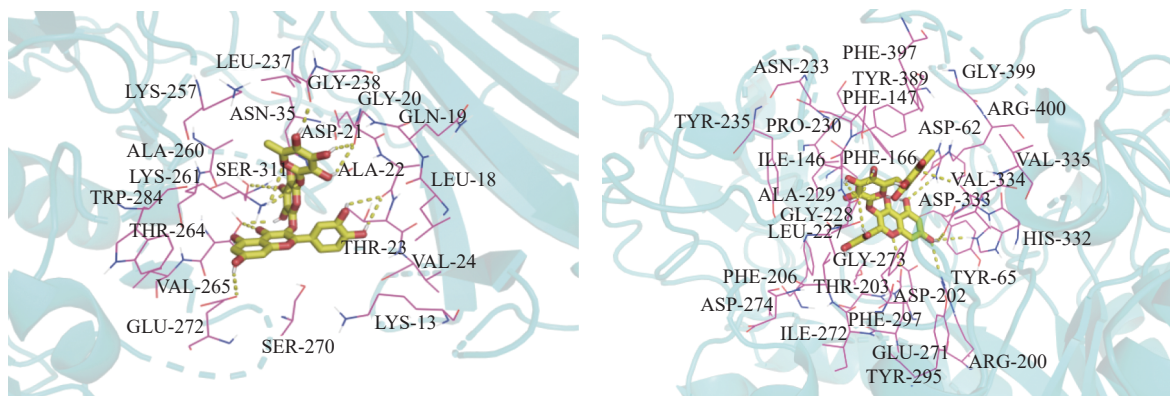


图 5 芦丁分别与 α -淀粉酶(左)和 α -葡萄糖苷酶(右)对接 3D 图

Fig. 5 3D image of rutin docking with α -amylase (left) and α -glucosidase (right)

由图 6 可知: 残基 GLY-20、LEU-237、GLU-272、ALA-22、SER-311、THR-264 与配体之间形成氢键, 残基 LYS-261 与配体之间发生 π -阳离子相互作用, 配体还与残基 LYS-261、THR-23 附近的疏水腔结合, 导致其周围包埋度增加, 形成更稳定的复合物, 从而对 α -淀粉酶抑制作用产生

较大影响。对于 α -葡萄糖苷酶, 配体与残基 GLY-228、TYR-389、ARG-200、ASP-333 之间形成氢键, 残基 ARG-400 与配体形成静电作用, 残基 PHE-297 与配体的芳香环之间形成 π - π 共轭疏水堆积作用, π 键使体系的能量降低, 结合得更牢固, 从而为 α -葡萄糖苷酶抑制作用做出较大贡献。

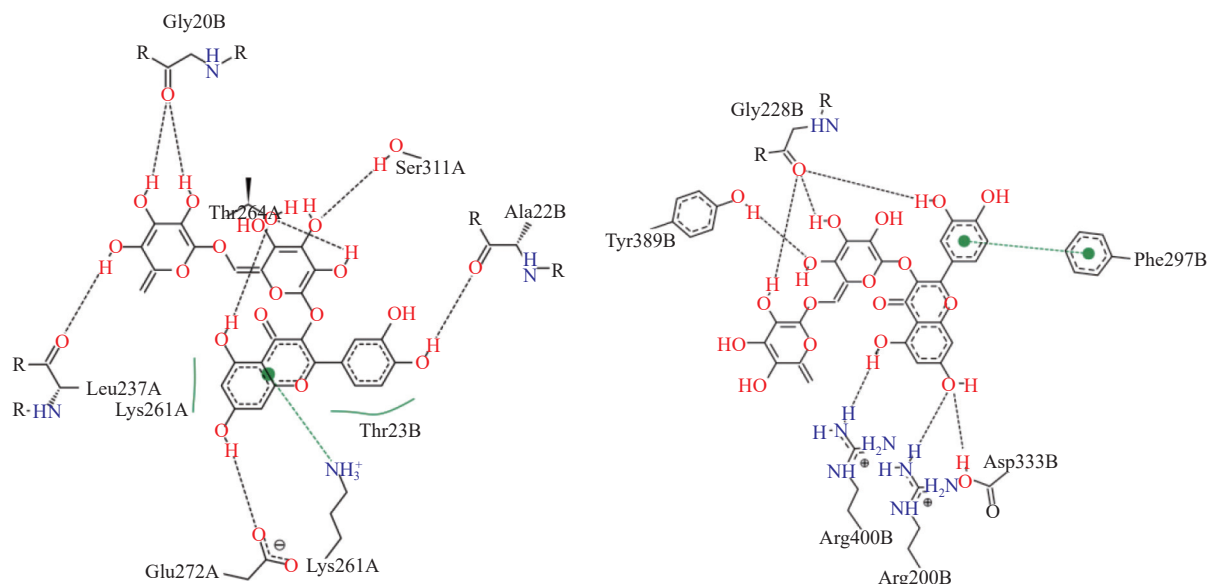


图 6 芦丁分别与 α -淀粉酶(左)和 α -葡萄糖苷酶(右)对接 2D 图

Fig. 6 2D image of rutin docking with α -amylase (left) and α -glucosidase (right)

3 讨论

多酚类化合物调节血糖的机制较多,本研究首次检测了烟草花中 14 种多酚类成分。有研究证明:绿原酸可以调节 6-磷酸葡萄糖酶活性来减少肝葡萄糖输出,还可以通过促进肝脏中 PPAR- α 的表达来降低血浆、肝脏和肌肉中甘油三酯的含量^[19-20];山柰酚可以增强肝组织的糖酵解酶活性,促进组织对葡萄糖的利用,还可以抑制 IKK/NF- κ B 通路来改善炎症,保护胰岛素信号转导功能^[21-22];芦丁能减少小肠对碳水化合物的吸收,抑制组织糖异生,刺激 β 细胞分泌胰岛素,保护胰岛免受变性^[23];槲皮素可以激活 Nr2 信号通路,增强抗氧化酶表达,减轻大鼠胰腺氧化损伤,改善胰岛素抵抗^[24]。基于酚类物质研究天然产物酶抑制剂具有药理学基础,为烟草花多酚的体外降糖活性提供了理论依据。

酶抑制活性很大程度上取决于多酚的化学结构、体积以及官能团位置、数量和种类等因素。没食子酸中的羰基与苯环共轭,促进其与酶的 π -共轭体系稳定;类黄酮环 B 上的相邻羟基促进氢原子与酶活性位点形成氢键;花色苷的 1 和 2 号及 3 和 4 号碳原子形成 2 个双键,也增强了酶抑制能力^[25-26]。烟草花中含有芦丁和槲皮素等酚类成分,有研究证实这些多酚物质对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶具有一定的抑制活性,但抑制能力远

低于烟草花多酚^[27-28],这可能是由于烟草花多酚类化合物丰富,具有大量的羟基、羰基和苯环等活性基团,也可能是由于有更多平面结构,更容易进入酶蛋白的疏水区域,从而与酶蛋白结合效果更佳而发挥更强的抑制作用^[29-30]。

4 结论

烟草花多酚以质量浓度依赖性抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性,抑制机理为竞争与非竞争混合型,其对酶蛋白的内源性荧光具有淬灭作用,并且通过氢键、疏水、 π -阳离子和静电等作用与酶蛋白结合,从而发挥降糖活性。本研究为烟草花多酚作为预防和治疗高血糖症的植物源天然产品开发提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] KHAN R M M, CHUA Z J Y, TAN J C, et al. From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research[J]. *Medicina*, 2019, 55(9): 546. DOI: 10.3390/medicina55090546.
- [2] MATHIS D, VENCE L, BENOIST C. Beta-cell death during progression to diabetes[J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 792. DOI: 10.1038/414792a.
- [3] SUN L J, SONG Y, CHEN Y J, et al. The galloyl moiety enhances the inhibitory activity of catechins and theaflavins against α -glucosidase by increasing the polyphenol-enzyme binding interactions[J]. *Food & Function*, 2021, 12(1): 215. DOI: 10.1039/D0FO02689A.
- [4] XU Y, WANG T S, YANG Z R, et al. Sulphonylureas monotherapy and risk of hospitalization for heart failure

- in patients with type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study in China[J]. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 2020, 29(6): 635. DOI: [10.1002/pds.5024](https://doi.org/10.1002/pds.5024).
- [5] BERGMARK B A, BHATT D L, MCGUIRE D K, et al. Metformin use and clinical outcomes among patients with diabetes mellitus with or without heart failure or kidney dysfunction[J]. *Circulation*, 2019, 140(12): 1004. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040144](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.040144).
- [6] 田友清, 丁平, 张云庆. 烟草药用研究概述[J]. *中国药业*, 2015, 24(9): 126.
- [7] ZOU X D, AMRIT B K, RAUF A, et al. Screening of polyphenols in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and determination of their antioxidant activity in different tobacco varieties[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(39): 25361. DOI: [10.1021/acsomega.1c03275](https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03275).
- [8] 欧阳璐斯, 赖燕华, 王予, 等. 高效液相色谱—分段检测法同时测定烟草中14种多酚类化合物[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(3): 411. DOI: [10.3969/j.issn.1004-4957.2021.03.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-4957.2021.03.018).
- [9] 张献忠, 钟烈洲, 黄海智, 等. 大孔树脂纯化废次烟叶中烟草多酚的工艺[J]. *化工进展*, 2012, 31(12): 2626. DOI: [10.16085/j.issn.1000-6613.2012.12.039](https://doi.org/10.16085/j.issn.1000-6613.2012.12.039).
- [10] 李应金, 吴玉萍. 烟草中多酚总含量的检测[J]. *光谱实验室*, 2006, 23(5): 1127. DOI: [10.3969/j.issn.1004-8138.2006.05.062](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-8138.2006.05.062).
- [11] GB/T 21733—2008. 茶饮料[S].
- [12] WANG X M, CHANG X Y, LUO X M, et al. An integrated approach to characterize intestinal metabolites of four phenylethanoid glycosides and intestinal microbe-mediated antioxidant activity evaluation *in vitro* using UHPLC-Q-exactive high-resolution mass spectrometry and a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-based assay[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 7(10): 826. DOI: [10.3389/fphar.2019.00826](https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00826).
- [13] CHEN Y H, ZHANG R P, SONG Y M, et al. RRLC-MS/MS-based metabonomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer[J]. *Analyst*, 2009, 134(10): 2003. DOI: [10.1039/b907243h](https://doi.org/10.1039/b907243h).
- [14] 王闪. 酶法合成绿原酸酰化衍生物及其抗氧化和 α -淀粉酶/葡萄糖苷酶抑制活性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [15] 王晓婷. 蛹虫草多糖分子结构与 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [16] 潘玥. 蓝莓叶多酚提取物对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用及其在低GI米糕中应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- [17] CORNISH-BOWDEN A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors[J]. *Biochemical Journal*, 1974, 137(1): 143. DOI: [10.1042/bj1370143](https://doi.org/10.1042/bj1370143).
- [18] 宋菲, 陈开健, 唐敏敏, 等. 槟榔多酚提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制动力学研究[J]. *热带作物学报*, 2021, 42(5): 1455. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2021.05.035](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2021.05.035).
- [19] LI S Y, CHANG C Q, MA F Y, et al. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in golden hamsters fed on high fat diet[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, 22(2): 122. DOI: [10.1016/S0895-3988\(09\)60034-9](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(09)60034-9).
- [20] ARION W J, CANFIELD W K, RAMOS F C, et al. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, 339(2): 315. DOI: [10.1006/abbi.1996.9874](https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9874).
- [21] JORGE A P, HORST H, DE SOUSA E, et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on 14 C-glucose uptake in rat soleus muscle[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2004, 149(2/3): 89. DOI: [10.1016/j.cbi.2004.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.07.001).
- [22] 罗成. 山奈酚对胰岛素抵抗的防治作用及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- [23] AHMAD G. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 96: 305. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001).
- [24] 李阳, 苏艳瑜, 李国豪, 等. 槲皮素通过Nrf2通路对糖尿病大鼠胰腺氧化损伤的拮抗作用机制[J]. *食品科学*, 2021, 42(5): 208. DOI: [10.7506/spkx1002-6630-20200223-260](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20200223-260).
- [25] LO PIPARO E, SCHEIB H, FREI N, et al. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(12): 3555. DOI: [10.1021/jm800115x](https://doi.org/10.1021/jm800115x).
- [26] TADERA K, MINAMI Y, TAKAMATSU K, et al. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2006, 52(2): 149. DOI: [10.3177/jnsv.52.149](https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149).
- [27] 王斯慧, 黄琬凌, 陈庆松, 等. 芦丁、槲皮素对 α -葡萄糖苷酶活性抑制研究[J]. *中国酿造*, 2012, 31(1): 133. DOI: [10.3969/j.issn.0254-5071.2012.01.040](https://doi.org/10.3969/j.issn.0254-5071.2012.01.040).
- [28] 王斯慧, 黄琬凌, 陈庆松, 等. 芦丁、槲皮素对 α -淀粉酶抑制活性研究[J]. *食品与发酵科技*, 2012, 48(3): 34. DOI: [10.3969/j.issn.1674-506X.2012.03-009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-506X.2012.03-009).
- [29] SUN L J, MIAO M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(4): 541. DOI: [10.1080/10408398.2018.1544883](https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544883).
- [30] ASEKUNOWO A K, ASHAFA A O T, OKOH O, et al. Polyphenolic constituents, antioxidant and hypoglycaemic potential of leaf extracts of *Acalypha godseffiana* from Eastern Nigeria: *in vitro* study[J]. *Journal of Medicinal Plants for Economic Development*, 2019, 3(1): a36. DOI: [10.4102/jomped.v3i1.36](https://doi.org/10.4102/jomped.v3i1.36).

责任编辑: 何馨成