

基于细胞胰岛素抵抗及酶抑制模型筛选肉桂降糖成分和质谱分析

代亚丽, 阚启鑫, 杨芷莹, 梁子琦, 林倩如, 赵力超, 曹庸*

(华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

摘要: 该研究以肉桂粉为原料, 利用水、无水乙醇、石油醚和乙酸乙酯制备 4 种不同溶剂提取物。通过建立 3T3-L1 前脂肪细胞胰岛素抵抗模型, 评价各提取物的降糖活性。再利用 α -淀粉、葡萄糖苷酶抑制活性实验, 追踪并分离纯化提取物中降糖组分, 后进行物质鉴定。其中, CCK-8 细胞毒性评价结果表明, 4 种溶剂提取物对 3T3-L1 细胞在质量浓度 $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ 时均表现出很低的细胞毒性; 乙酸乙酯提取物在作用细胞质量浓度为 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 均表现出较好的降糖活性; 该提取物虽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性不如水提物, 但对 α -淀粉酶抑制活性最强。结合细胞实验结果, 选用乙酸乙酯提取物进一步分离。经硅胶柱层析分离后得到的 F5 洗脱物表现出良好的降糖效果, 其对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶抑制率分别为 66.08%、98.21%。质谱分析发现 F5 洗脱物中主要物质是相对分子量分别为 132.06 和 162.07 的反式肉桂醛及 4-甲氧基肉桂醛。故反式肉桂醛及肉桂醛具有一定的降糖活性, 可为肉桂作为降糖膳食补充剂的进一步开发利用提供参考依据。

关键词: 肉桂; 3T3-L1 前脂肪细胞; 降糖; α -淀粉酶; α -葡萄糖苷酶; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2025)06-109-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0563

Identification of Hypoglycemic Components in Cinnamon Using Cell-based Insulin Resistance and Enzyme Inhibition Models and Mass Spectrometry Analysis

DAI Yali, KAN Qixin, YANG Zhiying, LIANG Ziqi, LIN Qianru, ZHAO Lichao, CAO Yong*

(Guangdong Key Laboratory of Functional Food Active Substances, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Four different extracts of cinnamon powder were prepared using the solvents water, anhydrous ethanol, petroleum ether, and ethyl acetate. A model of insulin resistance was established using 3T3-L1 preadipocytes to evaluate the hypoglycemic effects of different solvent extracts. Next, α -amylase and α -glucosidase inhibition assays were performed to track and isolate the hypoglycemic components in the extracts. Thereafter, these components were identified. CCK-8 cell viability results showed that all four solvent extracts exhibited low cytotoxicity toward 3T3-L1 cells at concentrations

引文格式:

代亚丽, 阚启鑫, 杨芷莹, 等. 基于细胞胰岛素抵抗及酶抑制模型筛选肉桂降糖成分和质谱分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 109-118.

DAI Yali, KAN Qixin, YANG Zhiying, et al. Identification of hypoglycemic components in cinnamon using cell-based insulin resistance and enzyme inhibition models and mass spectrometry analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 109-118.

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA23073016); 广东省农业农村厅乡村振兴战略专项科技兴农项目(2023LZ04)

作者简介: 代亚丽(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性物功能研究, E-mail: 1362564018@qq.com;

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物功能研究, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

below 100 $\mu\text{g/mL}$. In addition, the ethyl acetate extract demonstrated good hypoglycemic activity at concentrations of 10, 20, and 50 $\mu\text{g/mL}$. In contrast, the ethyl acetate extract was less effective at α -glucosidase inhibition than the water extract, but displayed the highest α -amylase inhibitory activity. Based on these observations and our cell-based experiment results, the cinnamon extract in ethyl acetate was selected for further isolation. The F5 fraction obtained by silica gel column chromatography exhibited strong hypoglycemic effects, and the α -amylase and α -glucosidase inhibition rates were 66.08% and 98.21%, respectively. According to mass spectrometry analysis, the main constituents of the F5 fraction were trans-cinnamaldehyde and 4-methoxycinnamaldehyde, with relative molecular weights of 132.06 and 162.07, respectively. Trans-cinnamaldehyde and cinnamaldehyde exhibited specific hypoglycemic activities. These findings can serve as a valuable resource for further development and utilization of cinnamon as a hypoglycemic dietary supplement.

Key words: cinnamon; 3T3-L1 preadipocytes; hypoglycemic; α -amylase; α -glucosidase; separation and purification

糖尿病是一种多种病因诱发的慢性疾病，主要分为 I 型糖尿病、II 型糖尿病（T2DM）以及妊娠糖尿病等类型^[1]。其中 II 型糖尿病（T2DM）发病率极高，近年来全球范围内 T2DM 的发病率和患病率均呈现出持续上升的趋势^[2]。天然降糖成分具有温和的特点，作为降糖膳食补充剂有助于降低药物副作用的风险。因此，从具有药食同源属性的传统中药材或天然药物中发掘安全的降血糖物质，开发出对预防和治疗 II 型糖尿病的功能性食品已成为研究热点。

肉桂，作为樟科植物肉桂的干燥树皮，目前主要集中在酚类、醛类、二萜类、糖苷类、木脂素类以及挥发油等多种化合物上。现代药理学研究揭示，肉桂具有多种药理活性，包括抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血糖以及神经保护等作用^[3]，这些发现为肉桂的药用价值提供了科学依据。目前肉桂主要集中于肉桂混合物的降糖活性研究，如研究发现肉桂粉末能有效降低糖尿病小鼠的空腹血糖水平和食物摄入量，改善糖耐量和空腹血清胰岛素水平，显示出其在糖尿病治疗中的潜力^[4]。而其系统地探究其降糖的物质基础鲜有报道。因此，本研究通过体外培养 3T3-L1 前脂肪细胞并构建胰岛素抵抗模型，检测肉桂四种提取物处理后 3T3-L1 细胞的细胞毒性、分化水平及葡萄糖含量，研究探讨肉桂提取物对 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗的影响；再以 α -葡萄糖苷酶及淀粉酶的抑制作用为追踪手段，筛选肉桂较优体外降糖活性部位并进行成分鉴定，以期为进一步分离出肉桂改善糖尿病的基础物质，也为更深入开发肉桂资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验原料

肉桂粉，购买于中国北京同仁堂有限公司；罗

格列酮、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX）、胰岛素、地塞米松、阿卡波糖、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷、 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶，反式肉桂醛及 4-甲氧基肉桂醛标准品，购买于上海源叶生物科技有限公司；可溶性淀粉，购买于广东环凯微生物科技有限公司；碳酸钠，购买于天津市福晨试剂厂；3T3-L1 前脂肪细胞，中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器设备

无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯（AR），购买于广州化学试剂厂；葡萄糖试剂盒，购自南京建成生物工程研究所有限公司；蒸馏水，购买于屈臣氏集团（香港）有限公司；胎牛血清，购买于汉强（广州）生物有限公司；DMEM 低糖培养基，购买于赛默飞世尔科技（中国）有限公司；0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA）、新生牛血清，购买于赛默飞世尔科技（中国）有限公司；PBS 缓冲液，购买于杭州吉诺生物医药技术有限公司；二甲基亚砜，购买于天津天茂化学试剂厂；DNS 试剂，购买于上海源叶生物科技有限公司；CCK-8 试剂盒，购买于上海皓元生物医药科技有限公司；乙腈（GR），购买于美国 J.T.Baker 公司。

VersaMax 酶标仪，美国 Molecular Devices 公司；PL203 千分之一电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；立 FD-1PF 式冷冻干燥机，北京德天佑仪器有限公司；KQ500-B 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；XW-80A 漩涡混合器，上海精科实业有限公司；BDS200 倒置生物显微镜，重庆奥特光学仪器有限公司；LVG-4AG-S8 超净工作台，苏州净化公司；TC-2323 二氧化碳培养箱，美国 Sheldon 公司；MINI-6K 微型离心机，杭州米欧仪器有限公司；Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司，LTQ Orbitrap Velos Pro ETD 质谱仪，

美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料提取

称量一定量的肉桂粉分别用石油醚、乙酸乙酯、无水乙醇和水浸提至 500 mL 烧杯中, 采用超声波辅助 (30 min, 固体: 溶剂比例 = 1:20) 提取, 离心 (4 500 r/min, 10 min) 后过滤取上清液, 重复操作 3 次后集齐滤液, 经旋转蒸发仪进行浓缩, 对石油醚、乙酸乙酯和无水乙醇提取的浓缩液使用冷冻离心干燥仪将溶剂挥干; 对水提取的浓缩液使用真空冷冻干燥将溶剂挥干。得到四种黏稠物质即粗提物。

1.3.2 硅胶柱层析分离

对降糖活性最优组的肉桂粗提物采用柱层析法进行洗脱。按照质量比样品: 硅胶 = 1:40 称取硅胶, 将硅胶倒入硅胶柱内, 填充均匀后, 将拌好样品的硅胶倒入硅胶柱内, 同样拍打柱身并不断旋转柱体, 使样品层均匀。层析液按照极性从小到大依次加入, 顺序为: 石油醚 < 乙酸乙酯 < 乙醇 < 水。以每瓶 400 mL 收集流出液, 共收集 12 瓶 (每个溶剂各 3 瓶) 后进行浓缩冻干, 备用。

1.3.3 质谱分析

体外酶抑制活性测定后, 称取 5 mg 洗脱物, 用色谱级乙腈将其配置成 5 mg/mL 浓度的样品, 超声 15~20 min 后涡旋过膜备用。采用液相分析初步检测洗脱物分离情况, 使用色谱柱: C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 使用检测波长: 280 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL。以纯水溶液为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 按照 0~5 min 10%~50%, 5~20 min 50%~60%, 20~25 min 60%~95%, 25~35 min 95%, 35~36 min 95%~10%, 36~45 min 10% 梯度洗脱; % 为体积分数。

在 Orbitrap 质谱仪上进行成分鉴定, 并在正、负离子模式下使用电喷雾电离 (ESI) 探针。质谱条件如下: 扫描范围设置为 m/z 50~1 500, 全扫描 MS/dd-MS₂ 在正离子和负离子模式下 m/z 范围为 100~1 500。使用 C18 色谱柱, 在 40 °C 温度下进行分离。由乙腈 (溶剂 A) 和纯水 (溶剂 B) 组成的流动相。色谱条件: 0~10 min, 10%~90% A; 10~16 min, 90% A; 16~18.5 min, 90%~10% A; 18.5~22 min, 10% A; % 为体积分数。流量为 0.3 mL/min, 样品注射体积为 20 μL。所有数据均使用 Xcalibur 3.0 软件, 根据各成分的元素组成计算精确质量数,

结合分子离子、碎片离子信息, 利用 compound discoverer 软件并比对相关文献报道内容, 从而鉴定化学成分。

1.3.4 3T3-L1 细胞实验

1.3.4.1 细胞培养

对冻存的 3T3-L1 前脂肪细胞进行复苏后, 将细胞接种至 25 T 细胞培养瓶中, 加入完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清 FBS, 1% 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素) 培养, 细胞需放置于 37 °C, $\phi=5\%$ CO₂ 培养箱。

1.3.4.2 3T3-L1 胰岛素抵抗模型的构建

诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化成为成熟的脂肪细胞, 在 3T3-L1 脂肪细胞分化过程加入高浓度的胰岛素和异丁基黄嘌呤、地塞米松, 诱导其产生胰岛素抵抗, 即构建成功 IR-3T1-L1 模型, 进行给药处理。

具体步骤: 细胞密度长至 80% 左右后进行细胞计数, 得到每毫升 1×10^5 个密度的细胞悬液, 使用完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清) 将该细胞密度以每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 待细胞融合 2~3 d 后, 更换诱导分化培养基 I (DMEM, 10% 新生牛血清, 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, 1 μmol/mL 地塞米松, 10 μg/mL 胰岛素) 刺激分化, 继续培养 2~3 d 后更换诱导分化培养基 II (DMEM, 10% 胎牛血清, 10 μg/mL 胰岛素), 即建模完成。以上培养基均含有 100 U/mL 的青霉素和 100 mg/mL 的链霉素, % 为体积分数。

1.3.5 酶抑制活性测定

1.3.5.1 α -淀粉酶抑制活性

α -淀粉酶可以水解淀粉内部的 α -1,4-糖苷键, 水解产物为糊精、低聚糖和单糖^[5], 酶作用反应一般按两阶段进行。首先, 链淀粉快速地降解, 产生低聚糖, 此阶段链淀粉的黏度及与碘发生呈色反应的能力迅速下降。第二阶段的反应比第一阶段慢很多, 包括低聚糖缓慢水解生成最终产物葡萄糖和麦芽糖。

通过添加可溶性淀粉溶液测量实验组、样品对照组、空白组、空白对照组的测量 α -淀粉酶活性抑制率。运用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-Dinitrosalicylic Acid, DNS) 法测定酶活力, 淀粉酶在加热的条件下催化还原糖生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸^[6] (540 nm 下有检测波长), 从而判断样品是否具有 α -淀粉酶抑制活性。

1.3.5.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性

α -葡萄糖苷酶, 是一种 α -D-葡萄糖苷酶, 糖尿病与 α -葡萄糖苷酶相关, 严重影响人类健康^[7]。该酶主要在细胞外起作用。它从多糖的非还原末端水解底物的 α -葡萄糖苷键, 产生 α -D-葡萄糖。

对硝基苯基- β -吡喃半乳糖苷 (p-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside, PNPG) 与 α -葡萄糖苷酶在碱性条件下会发生显色反应生成对硝基苯酚 (P-Nitrophenol, PNP) 及葡萄糖, PNP 在 405 nm 处有吸收波长, 从而能够判断样品是否具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.3.6 检测指标

1.3.6.1 细胞毒性

倒置显微镜下观察培养板中细胞生长状态, 细胞计数得到密度为每毫升 1×10^5 个细胞悬液, 将细胞悬液以 100 μ L 每孔接种于 96 孔板中, 放入二氧化碳培养箱中继续培养 48 h。设置空白对照组、阴性对照组以及不同浓度梯度的样品组, 置于二氧化碳培养箱中继续培养 24 h; 每孔加入 10 μ L cck-8 溶液, 继续培养 90 min 后随即将孔板置于酶标仪中检测 450 nm 处吸光度值, 按照公式 (1) 计算细胞存活率, 并根据结果确定后续实验样品的作用浓度。

$$V = \frac{B_1 - B_2}{B_3 - B_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

V ——细胞存活率, %;

B_1 ——样品组的 OD 值;

B_2 ——调零组的 OD 值;

B_3 ——空白组的 OD 值。

1.3.6.2 油红O分化指标的测定

3T3-L1 细胞分化结束后, 加入一定量的油红 O 固定液, 在室温固定 30 min 后用 PBS 及 $\varphi=60\%$ 异丙醇浸洗, 随后加入新鲜配制的油红 O 染色液, 浸染 20 min; PBS 溶液洗至无染液残留后加入 Mayer 苏木素染色液复染 1 min, 加入 PBS 溶液润洗并覆盖细胞, 并于显微镜下观察并拍照记录。

1.3.6.3 样品对IR-3T3-L1细胞葡萄糖摄取的影响

为了研究 IR-3T3-L1 细胞在不同处理条件下对葡萄糖的消耗情况, 实验收集各组细胞的上清培养液, 并按照葡萄糖检测试剂盒测定每组细胞残留的葡萄糖浓度。按照公式 (2) 计算葡萄糖含量。

$$G = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times C \quad (2)$$

式中:

G ——葡萄糖含量, mmol/L;

A_1 ——处理组 OD 值;

A_0 ——空白组 OD 值;

A_2 ——标准品 OD 值;

C ——标准品的浓度。

1.3.6.4 α -淀粉酶抑制活性的测定

取 α -淀粉酶液溶液与不同质量浓度的提取物样品液置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10 min, 加入 1 wt.% 淀粉溶液, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10 min, 使用显色剂 DNS 溶液终止反应, 在酶标仪上于 540 nm 处测定吸光度, 按照公式 (3) 计算抑制率。以阿卡波糖为阳性对照。

$$V_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中

V_2 ——酶抑制率, %;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——样品空白组吸光度;

A_3 ——空白组吸光度;

A_4 ——空白对照组吸光度。

1.3.6.5 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

取 α -葡萄糖苷酶溶液与不同质量浓度的样品液置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10 min, 加入 10 mmol/L PNPG 溶液, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10 min, 最后使用 0.1 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 在酶标仪上于 405 nm 处测定吸光度, 按照公式 (3) 计算抑制率。以阿卡波糖为阳性对照。

1.3.7 数据与分析

所有试验均重复 3 次。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 (SD)。使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 被认为具有显著差异。使用 Prism 8 制作图表。

2 结果与讨论

2.1 细胞毒性

CCK-8 是基于比色法, 利用 CCK-8 法可测定不同浓度样品下细胞生长情况, 确定最适作用剂量^[8]。将样品配置成不同的质量浓度 (10、20、50、100、200、500、800、1 000 μ g/mL) 作用于 3T3-L1 细胞, 检测样品对细胞的存活率有无影响, 其中不加样品的组别为 control 组, 当细胞存活率 $> 90\%$ 时, 判断样品对细胞无毒害作用^[9]。

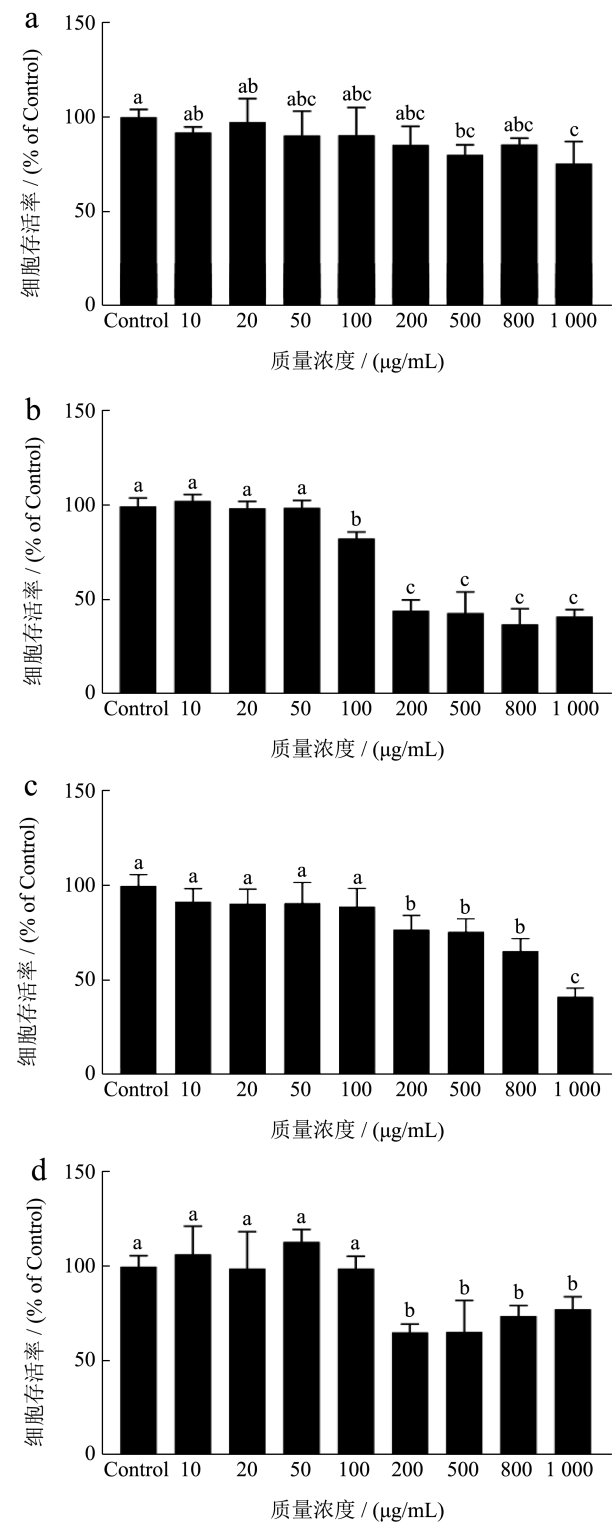


图1 不同质量浓度的肉桂水提取物 (a)、醇提取物 (b)、石油醚提取物 (c)、乙酸乙酯提取物 (d) 对细胞存活率的影响
Fig.1 Effects of cinnamon water extract (a), ethanol extract (b), petroleum ether extract (c) and ethyl acetate extract (d) on cell viability at different concentrations

注：与 Control 对比， $P<0.05$ 。a~d 四个柱状图中不同字母代表组间存在显著性差异，如 a 与 b 代表两组间有显著性差异，a 与 ab 则代表两组间无显著性差异。

肉桂水提取物作用质量浓度 $\leq 800\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率 $>90\%$ ，在这个浓度范围内其对细胞无毒害作用。由图1可知肉桂醇提取物作用质量浓度 $\leq 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率 $>90\%$ ，在这个浓度范围内其对细胞无毒害作用。肉桂石油醚及乙酸乙酯提取物作用质量浓度 $\leq 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率 $>90\%$ ，在这个浓度范围内其对细胞无毒害作用。为了更好地对比四种提取物的降糖功效，选择安全性较高的10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度于后续3T3-L1前脂肪细胞胰岛素抵抗模型中进行给药干预，以探究四种溶剂得到的肉桂提取物对IR-3T3-L1的改善效果。

2.2 油红O分化测定

进行油红O染色可以观察确定3T3-L1细胞中脂质积累的程度，从而判断3T3-L1脂肪细胞的分化^[10]。图2可以看出，各肉桂提取物以作用质量浓度10 $\mu\text{g/mL}$ 给药处理后进行油红O染色的结果中，仍能明显观察到3T3-L1分化形成的脂滴。但相比于正常分化组，给药组的脂滴普遍体积减小，推测肉桂四种提取物对脂肪分化有影响作用。

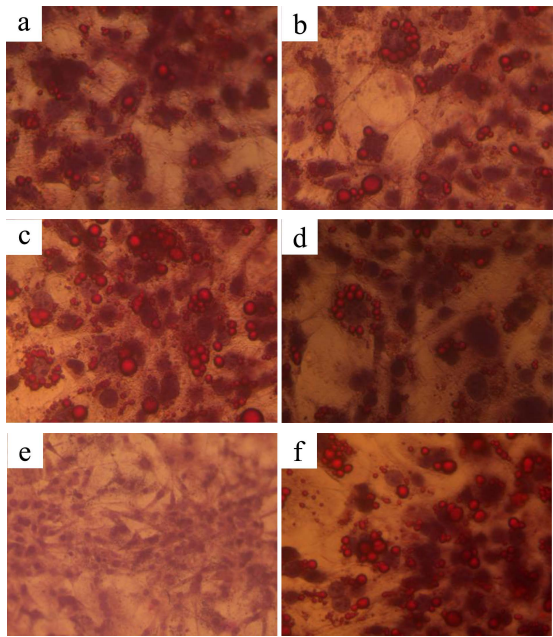


图2 肉桂醇提取物 (a)、水提取物 (b)、乙酸乙酯提取物 (c)、石油醚提取物 (d) 作用质量浓度10 $\mu\text{g/mL}$ 给药处理及空白对照组 (e)、空白组 (f) 在显微镜10×25倍数下的油红O结果图

Fig.2 Oil red O result graph of cinnamon ethanol extract (a), water extract (b), ethyl acetate extract (c), petroleum ether extract (d) at concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ and blank control group (e), blank group (f) at 10×25 power under microscope

2.3 葡萄糖含量测定

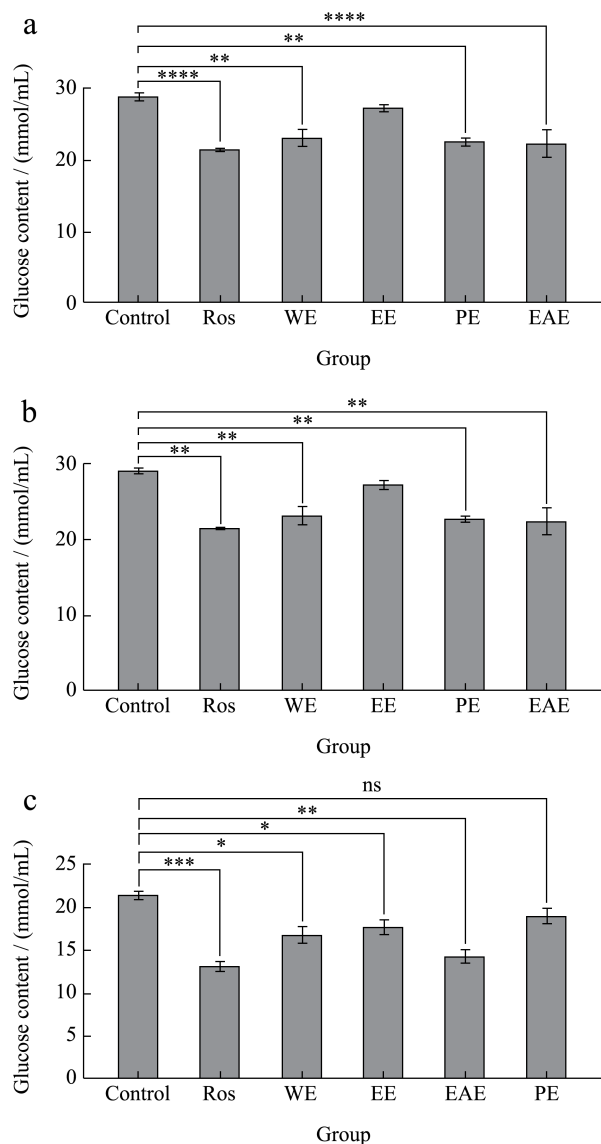


图3 不同肉桂提取物对成熟的3T3-L1细胞消耗葡萄糖的影响

Fig.3 The effects of different cinnamon extracts on glucose consumption of mature 3T3-L1 cells

注：a-c的肉桂提取物质量浓度分别为10、20、50 µg/mL。与control组比较，* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ ；**** $P < 0.0001$ 。

II型糖尿病(T2DM)伴有异常的葡萄糖代谢^[11]，由图3可以得出：在作用质量浓度10 µg/mL时，与Control组对比，除肉桂醇提取物组葡萄糖含量无显著降低，其他样品组葡萄糖含量均显著性下降，因此在这个浓度范围内肉桂醇提取物不具有明显的降血糖活性，而乙酸乙酯提取物作用组接近于阳性组的降糖效果；在作用质量浓度20 µg/mL时，与Control组对比，除肉桂醇提取物葡萄糖含量无

显著降低，其他样品组葡萄糖含量均显著性下降，因此在这个浓度范围内肉桂醇提取物不具有明显的降血糖活性，且肉桂乙酸乙酯、石油醚、水提取物作用组接近于阳性组的降糖效果；在作用质量浓度50 µg/mL时，与Control组对比，除肉桂石油醚提取物葡萄糖含量无显著降低，其他样品组葡萄糖含量均显著性下降。因此在这个质量浓度范围内肉桂石油醚提取物不具有明显的降血糖活性，且肉桂乙酸乙酯提取物作用组接近于阳性组的降糖效果。

2.4 α-淀粉酶抑制活性测定

2.4.1 肉桂提取物的α-淀粉酶抑制活性测定

抑制α-淀粉酶的活性被认为是控制高血糖的有效策略^[12]。通过图4可以看出，α-淀粉酶抑制活性测定中四种不同溶剂得到的肉桂粗提取物的α-淀粉酶抑制率随着质量浓度的上升逐渐提高，说明在一定质量浓度下肉桂各提取物均能对α-淀粉酶起到抑制作用，且在2.5 mg/mL的作用质量浓度时，肉桂水提取物对α-淀粉酶抑制率接近于阳性药物阿卡波糖组。

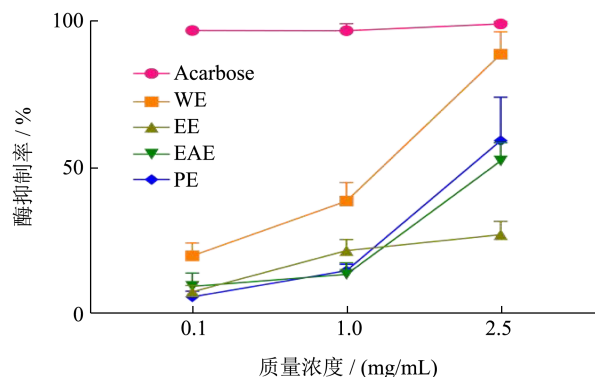


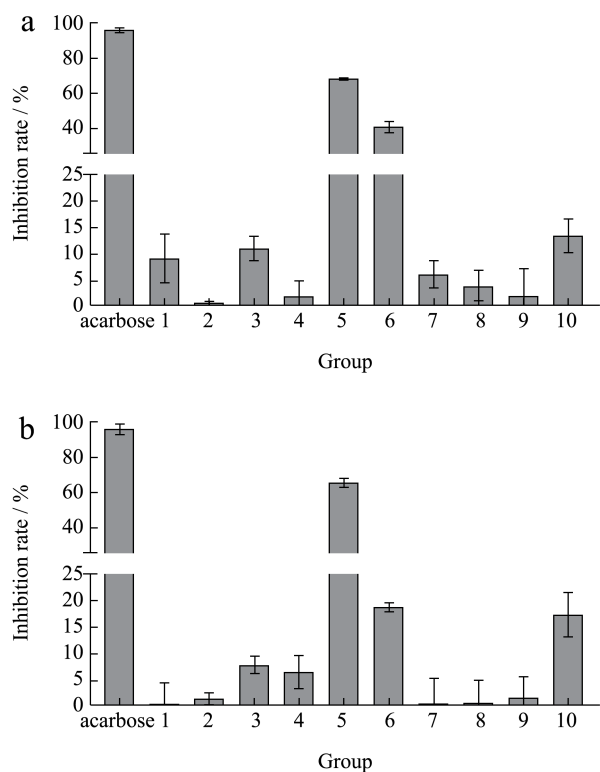
图4 不同质量浓度四种肉桂粗提取物样品α-淀粉酶抑制率

Fig.4 The alpha-amylase inhibition rates of the four kinds of cinnamon extracts at different concentrations

注：WE为肉桂水提取物，EE为醇提取物，PE为石油醚提取物，EAE为乙酸乙酯提取物。图6同。

2.4.2 洗脱物的α-淀粉酶抑制活性测定

分别对肉桂的乙酸乙酯分部收集流出液，至流出液中所含成分显著减少或不再含有时，再改变洗脱剂的品种。以每瓶400 mL收集流出液，共收集12瓶（每个溶剂各3瓶），其中水萃取物1、2、3得率分别为0.47%、1.39%、0.21%；乙醇萃取物1、2、3得率分别为14.74%、5.72%、13.42%；乙酸乙酯萃取物1、2、3得率为32.71%、19.70%、8.73%；石油醚萃取物由于得率较低不足验证实验于是汇集为一组，共10组样品用于后续测定。

图 5 10 种硅胶柱层析洗脱物的 α -淀粉酶抑制率Fig.5 α -amylase inhibition rate of 10 silica gel column eluates

注: a 质量浓度 0.1 mg/mL, b 质量浓度 1 mg/mL, 图 7 同。

由图 5 可以看出, 在作用质量浓度为 0.1 mg/mL 时, 除洗脱物组 1、3、5、6、7、8、10, 其他洗脱物组的 α -淀粉酶抑制活性几乎没有, 其中 5、6 组洗脱物的淀粉酶抑制活性最高; 在作用质量浓度为 1 mg/mL, 除 3、4、5、6、10 组, 其他组洗脱物的淀粉酶抑制活性几乎没有, 其中 F5 组洗脱物的淀粉酶抑制活性最高, 该 α -淀粉酶抑制率为 66.08%

2.5 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

2.5.1 肉桂粗提物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

药用植物是 α -葡萄糖苷酶抑制剂的重要来源, 它可以延缓葡萄糖从复杂碳水化合物中的释放, 延缓葡萄糖的吸收, 从而控制 II 型糖尿病的特征性高血糖症^[13]。通过 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定对四种不同的肉桂粗提物的降血糖活性验证, 由图 6 可以得出: 在 0.1、1、2.5 mg/mL 的浓度范围内时, 肉桂乙酸乙酯组的 α -葡萄糖苷酶以及 α -淀粉酶的抑制活性随着浓度逐渐增大其抑制率逐渐增高。

2.5.2 洗脱物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

由图 7 可知, 洗脱物 2~10 在 0.1、1 mg/mL 均随着质量浓度的提高对 α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐提高, 且接近阳性药物阿卡波糖的 α -葡萄糖苷酶的抑制能力, 说明洗脱物 2~10 均有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 其中洗脱物 3、4、5、6、7、8、10 效果最为理想。其中作用质量浓度为 1 mg/mL 时, F5 洗脱物 α -葡萄糖苷酶抑制率为 98.21%。

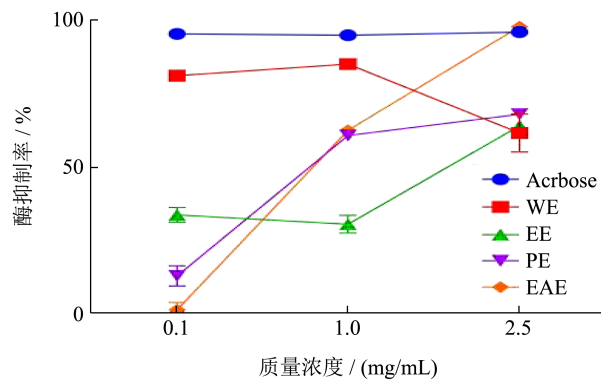
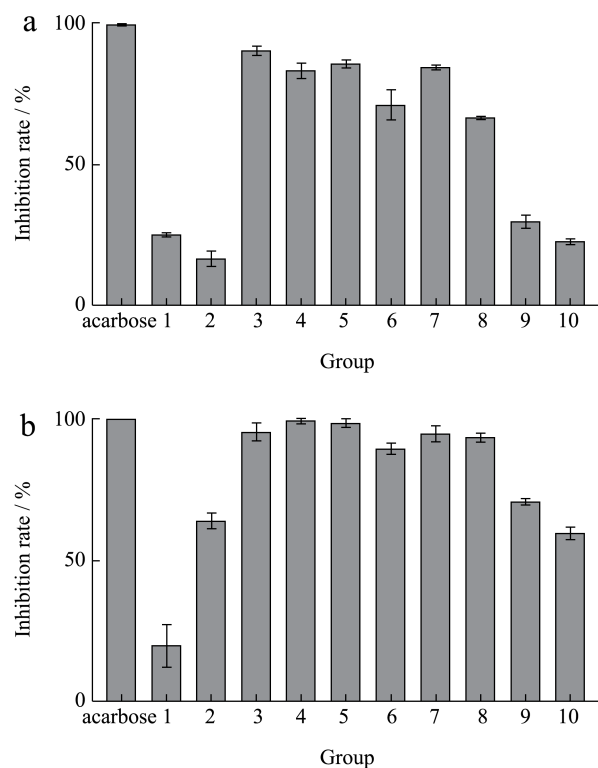
图 6 不同质量浓度下四种肉桂粗提物样品 α -葡萄糖苷酶抑制率

Fig.6 The alpha-glucosidase inhibition rates of the four kinds of cinnamon extracts at different concentrations

图 7 10 种硅胶柱层析洗脱物的 α -葡萄糖苷酶抑制率Fig.7 α -glucosidase inhibition rate of 10 silica gel column eluates

2.6 F5洗脱物结构鉴定

由图 8 可知, 经过高效液相色谱法定性考察, 在 280 nm 波长下超高效液相色谱图具有唯一一个特征峰, 但不排除该洗脱物中包含极性相同或相似的物质难以被分开, 而呈现出同一液相峰。由图 9 可知, 出峰时间为 8.10、8.88 min 的正离子扫描的 m/z 为 133.064 2 和 163.074 9, 是 $[M+H]^+$ 峰, 表明该化合物的相对分子量为 132.06 和 162.07。

将质谱数据带入 compound discoverer 软件并比及相关文献^[14,15], 推测为反式肉桂醛及甲氧基肉桂醛。故用同样的样品前处理方法及质谱扫描条件对纯度为 98% 的反式肉桂醛及甲氧基肉桂醛分析标品进行检测分析比对。由图 10、11 可知, 反式肉桂醛和 4- 甲氧基肉桂醛标品在质谱中扫描的 m/z 为 133.064 6、163.075 0。与 F5 洗脱物质谱中扫描的 m/z 为 133.064 2、163.074 9 在仪器误差范围内接近, 则进一步验证了 compound discoverer 软件的成分分析结果, F5 洗脱物中主要已知成分为反式肉桂醛及甲氧基肉桂醛。

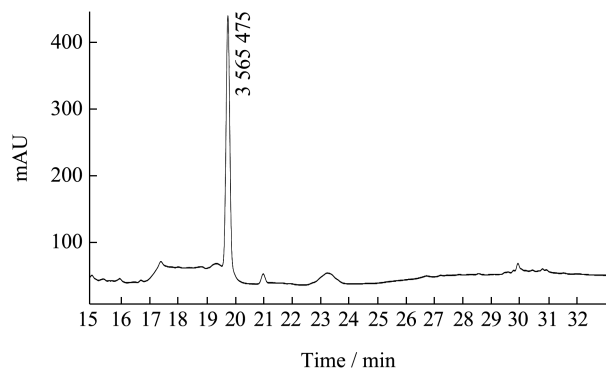


图 8 F5 洗脱物在 280 nm 下的超高效液相色谱图

Fig.8 F5 elution High-performance liquid chromatography at 280 nm

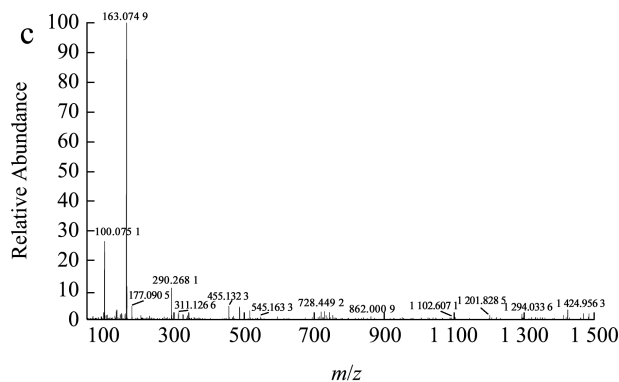
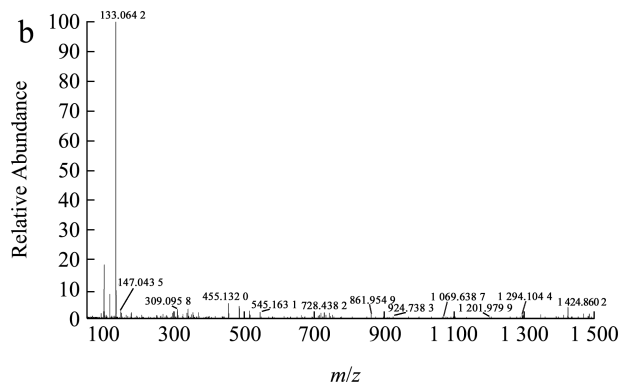
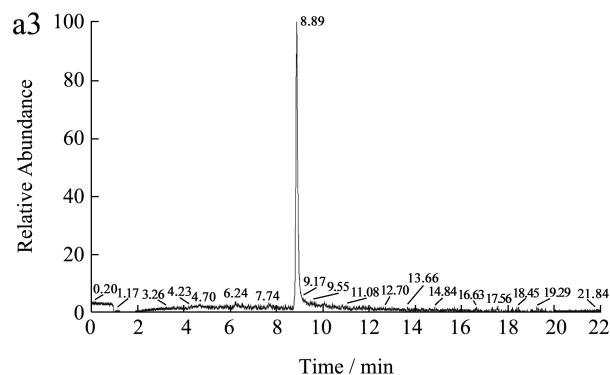
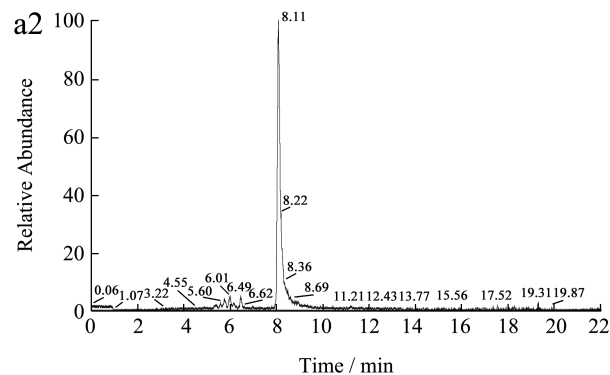
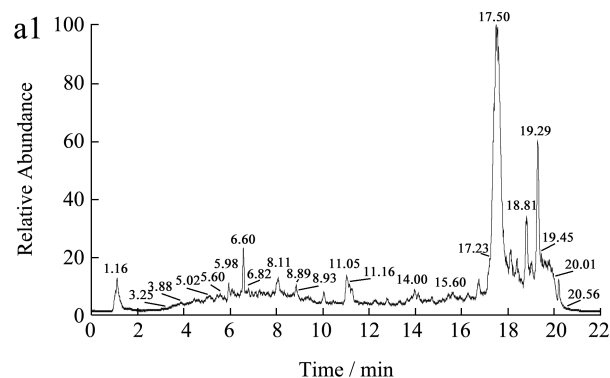


图 9 F5 洗脱物中筛出的主要成分的总离子流图 (a)、一级质谱图 (b、c)

Fig.9 F5 total ion flow diagram (a) and primary mass spectrometry (b, c) of the main components screened from the eluates

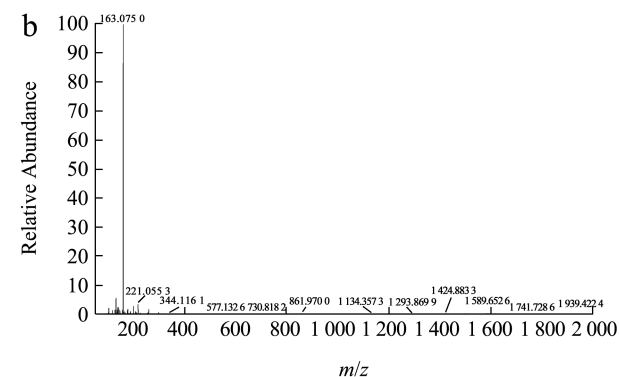
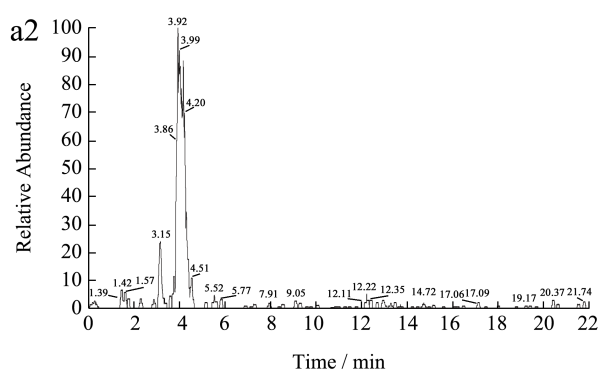
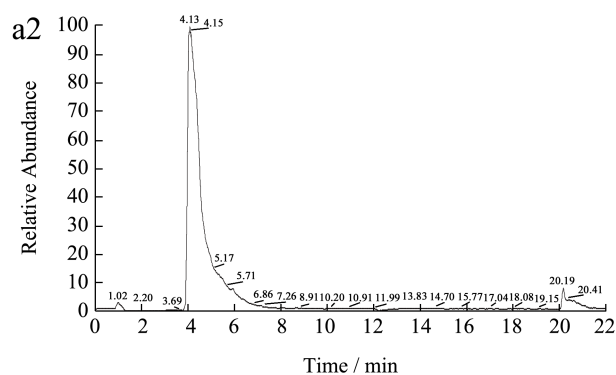
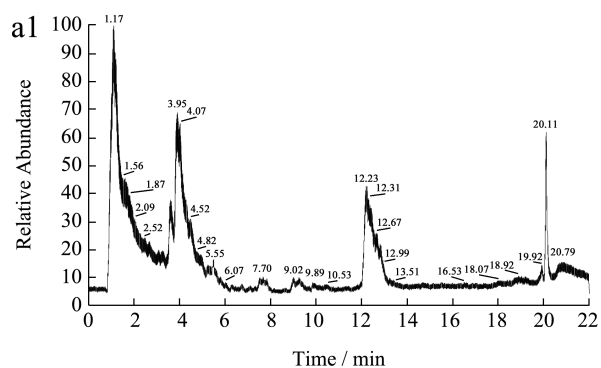


图 11 4-甲氧基肉桂醛标准品的总离子色谱图及一级质谱图

Fig.11 Total ion chromatogram and primary mass spectrogram of 4-methoxycinnamaldehyde standard

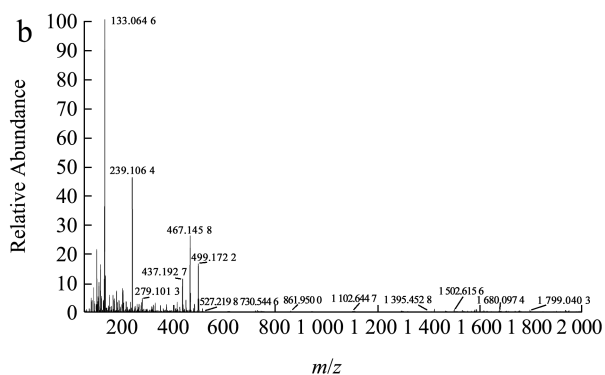


图 10 反式肉桂醛标准品的总离子色谱图及一级质谱图

Fig.10 Total ion chromatogram and primary mass spectrogram of trans-cinnamaldehyde standard

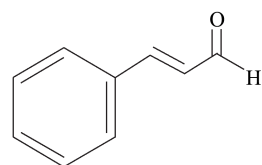
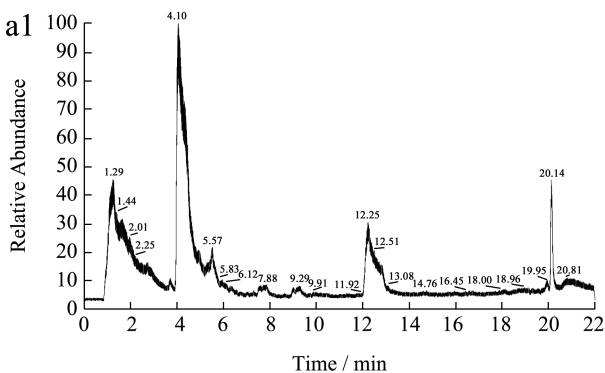


图 12 反式肉桂醛的结构

Fig.12 Chemical structure of trans-cinnamaldehydem

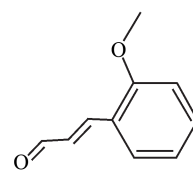


图 13 4-甲氧基肉桂醛的结构

Fig.13 Chemical structure of 4-methoxy cinnamaldehyde

已有研究证明反式肉桂醛与 4-甲氧基肉桂醛主要集中在肉桂精油中,反式肉桂醛及 4-甲氧基肉桂醛的结构式分别如图 12、13 所示^[16]。目前对于肉桂醛的研究已有较多报道,如研究发现提取方法和溶剂类型对肉桂醛和反式肉桂醛含量有显著影响^[17]、肉桂醛具有有效的抗菌活性^[18]等。关于反式

肉桂醛降糖活性的研究也有部分报道,如发现被反式肉桂醛能作为良好的 α -淀粉酶抑制剂,对 α -淀粉酶抑制率为71.60%,可有效用于控制高血糖和糖尿病^[19],而4-甲氧基肉桂醛降糖研究鲜有报道,但并未有很深入的机制研究。

3 结论

本研究通过对肉桂进行了溶剂浸提法实现初步分离,采用水、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯四种不同极性的溶剂浸泡肉桂粉,通过超声辅助提取,将离心后得到的上清液浓缩冻干后的四种肉桂粗提物利用体外 α -淀粉及葡萄糖苷酶进行降糖活性结合IR-3T3-L1模型葡萄糖含量结果比对,与Control组对比,肉桂乙酸乙酯提取物降糖活性最好,接近于阳性组的降糖效果,且油红O实验中肉桂给药组能够显著抑制3T3-L1细胞分化成脂肪细胞,并显著降低细胞的脂滴。选用肉桂的乙酸乙酯提取物进行硅胶柱层析进一步分离,得到的洗脱物中F5组洗脱物的淀粉酶及葡萄糖苷酶抑制活性最高,其质量浓度为1 mg/mL时对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到98.21%。洗脱物经高效质谱检测分析,得出洗脱物中主要的已知成分为反式肉桂醛及4-甲氧基肉桂醛。

综上所述,反式肉桂醛和4-甲氧基肉桂醛具有良好的降糖活性。但对两者对糖尿病的作用机制研究不够深入,相关研究仍需进一步深入。因此,未来应加强对肉桂或植物性天然降糖活性成分对糖尿病预防及辅助降糖机理的研究,以期对相关保健食品的开发提供更为坚实的科学依据。

参考文献

- [1] MAGLIANO D J, BOYKO E J D A. IdF Diabetes Atlas [M]. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.
- [2] QU Q, HE P, ZHANG Y, et al. The intervention of probiotics on type 2 diabetes mellitus in animal models [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2024, 68(1): e2200815.
- [3] DAS G, GONCALVES S, BASILIO H J, et al. Cardiovascular protective effect of cinnamon and its major bioactive constituents: an update [J]. Journal of Functional Foods, 2022, 97: 105045.
- [4] LIU Y, LIU F, XING D, et al. Effects of cinnamon powder on glucose metabolism in diabetic mice and the molecular mechanisms [J]. Foods, 2023, 12(20): 3852.
- [5] KULKAMI S, DWIVEDI P, DANAPPANVAR A N, et al. Identification of α -amylase inhibitors from flavonoid fraction of *Feronia elephantum* and its integration with in-silico studies [J]. In Silico Pharmacology, 2021, 9(1): 50.
- [6] HSIAO H Y, CHEN R, CHOU C C, et al. Hand-held colorimetry sensor platform for determining salivary alpha-amylase activity and its applications for stress assessment [J]. Sensors, 2019, 19(7): 1571.
- [7] YOU Z L, LI Y, ZHANG K, et al. Inhibitory effect of plant essential oils on α -glucosidase [J]. Food Science and Biotechnology, 2022, 31(12): 1593-1602.
- [8] CAI L, QIN X, XU Z, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and cck-8 method [J]. Acs Omega, 2019, 4(7): 12036-12042.
- [9] WOLFE K L, LIU R H. Cellular antioxidant activity (caa) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(22): 8896-8907.
- [10] KIANI Z, HASSANPOUR-F M, ASGHARI Z, et al. Eation of a polyherbal formulation (tetraherbs): antidiabetic efficacy in rats [J]. Comparative Clinical Pathology, 2018, 27(6): 1437-1445.
- [11] WANG N, XU T Y, ZHANG X, et al. Improving hyperglycemic effect of fgf-21 is associated with alleviating inflammatory state in diabetes [J]. International Immunopharmacology, 2018, 56: 301-309.
- [12] SHEN H, WANG J, AO J, et al. Structure-activity relationships and the underlying mechanism of alpha-amylase inhibition by hyperoside and quercetin: multi-spectroscopy and molecular docking analyses [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 285: 121797.
- [13] MATA R, CRISTIANS S, ESCANDON-R S, et al. Mexican antidiabetic hers: valuable sources of inhibitors of alpha-glucosidases [J]. Journal of Natural Products, 2013, 76(3): 468-483.
- [14] 刘琛.樟属传统药肉桂、桂枝和锡兰肉桂整体质量控制研究[D].南昌:南昌大学,2020.
- [15] HE D H, SLEBODNICK C, RAKOTONDRAIBE L H. Bioactive drimane sesquiterpenoids and aromatic glycosides from *Cinnamosma fragrans* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(8): 1754-1759.
- [16] 李秀竹,陈婷婷,刘佳怡,等.肉桂精油主要活性成分对芒果胶孢炭疽菌的抑制[J].热带生物学报,2018,9(1):81-89.
- [17] SHU C, GE L, LI Z, et al. Antibacterial activity of cinnamon essential oil and its main component of cinnamaldehyde and the underlying mechanism [J]. Frontiers in Pharmacology, 2024, 15: 1378434.
- [18] NIU A, WU H, MA F, et al. The antifungal activity of cinnamaldehyde in vapor phase against aspergillus niger isolated from spoiled paddy [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 159: 113181.
- [19] ANJALI SADAF A, KHARE SK. Evaluation of trans-cinnamaldehyde as an anti-hyperglycemic compound through inhibition of α -amylase [J]. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 2022, 59(2): 183-188.