

高效液相色谱法测定灰兜巴对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

孙彦敏, 彭亮*, 李知敏

江西科技师范大学药学院, 南昌 330013

摘要: 研究灰兜巴醇提石油醚萃取、醇提乙酸乙酯萃取、醇提正丁醇萃取、醇提萃取剩余部分和水提部分对于 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用, 并通过高效液相色谱检测在药物与酶反应过程中振荡对于 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响。结果显示, 灰兜巴各提取部分均表现出良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 为一种良好的 α -葡萄糖苷酶抑制剂, 且振荡对其抑制率的影响较大, 在反应过程中应使酶与药物充分结合。

关键词: 灰兜巴; α -葡萄糖苷酶; 抑制活性; 高效液相色谱

中图分类号: R932

文献标识码: A

Determination of α -Glucosidase Inhibitory Activity of Huidouba Extracts by HPLC

SUN Yan-min, PENG Liang*, LI Zhi-min

Jiangxi Science and Technology Normal University, Pharmaceutical College, Nanchang 330013, China

Abstract: In this study, the α -glucosidase inhibitory activities of petroleum ether fraction of ethanol extract, ethyl acetate fraction of ethanol extract, n-butyl alcohol fraction of ethanol extract, remaining fraction of ethanol extract and aqueous extract of Huidouba were investigated. The influence of shaking during drug enzyme reaction process on the inhibition rate of α -glucosidase was examined by HPLC. The data suggested that Huidouba extracts showed obvious inhibitory effect on α -glucosidase. In addition, during its reaction with α -glucosidase, shaking showed relative large influence on the inhibition rate of α -glucosidase.

Key words: Huidouba; α -glucosidase; inhibitory activity; HPLC

糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病, 已成为严重威胁人类健康的慢性病之一。不管在发达国家还是在发展中国家, 由于人们的生活和饮食习惯, 糖尿病已成为一种常见病。 α -葡萄糖苷酶抑制剂作为一种新型糖尿病治疗药物, 其重要性已经得到越来越多的关注。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可通过阻止 α -葡萄糖苷酶在小肠内的消化而减少低聚糖和二糖消化为单糖的量, 从而降低血糖吸收速率^[1]。 α -葡萄糖苷酶抑制剂通过调节 α -葡萄糖苷酶活性可治疗病毒感染、肿瘤、肥胖症、溶酶体贮积症^[2]、高三酰甘油血症^[3]等多种疾病, 其临床应用广泛。目前, 临床上的 α -葡萄糖苷酶抑制剂大多是生物合成药或者半合成药, 其价格昂贵且副作用大, 临床研究表明部分患者在使用 α -葡萄糖苷酶抑制剂类降糖药物后, 会出现肠胃腹泻、痉挛等不同程度的不良反应^[4], 部分西药的毒副作用可能会加重其他器官组

织的负担, 如心血管系统、肾脏系统等, 导致糖尿病并发症的严重, 因此, 从天然药物中寻求安全有效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂的目标越来越迫切^[5]。

灰兜巴又名闭口袋, 近千年来, 在峨眉山地区被当地居民用来防治糖尿病^[6]。其有“仙山灵药”、“糖尿病克星”和“天然纯绿色的大自然珍宝”的美誉^[7]。目前, α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG)^[8] 作为底物, PNPG 在 α -葡萄糖苷酶的催化作用下可分解为 PNP, 以 PNP 作为检测峰可衡量中药对于 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选多选紫外分光光度法作为检测手段, 但是试剂消耗大, 且重现性差, 尤其对复杂样品或者有颜色干扰的样品, 其假阳性高^[9]。而 PNP 在 HPLC 上有一明显的峰^[10], 故本研究采用 HPLC 测定灰兜巴各提取部分对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用, 根据 PNP 峰面积的变化值来计算灰兜巴抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 作为衡量标准, 并在反应过程中比较振荡和不振荡对抑制率的影响。

收稿日期: 2013-08-26 接受日期: 2013-12-19

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (20122BAB215017; 20122BAB215019)

* 通讯作者 E-mail: pengliang8036@163.com

1 材料与仪器

1.1 实验材料

灰兜巴购自峨眉山灰兜巴批发零售中心

1.2 实验试剂

α -葡萄糖苷酶、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)及还原型谷胱甘肽均购自美国 Sigma 公司产品;对硝基苯酚(PNP)购自上海源叶生物科技有限公司;pH 6.8 磷酸钾(PBS)缓冲液、无水碳酸钠(Na_2CO_3)、二甲亚砜(DMSO)、甲酸、无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为国产分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯。

1.3 实验设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪,安捷伦有限公司;美国 Vortex-Genie2 涡旋振荡器,美国 Scientific Industries 公司;FA2004N 电子天平,上海精密科学仪器有限公司;XS203S 电子精密天平,瑞士梅特勒-托利多;LR 4000 旋转蒸发仪,德国海道夫。

2 实验方法

2.1 灰兜巴提取物的制备

称取一定量的灰兜巴置于圆底烧瓶中,以 1:10 (M/V) 料液比向其中加入 75% 的乙醇,85 °C 回流提取 1.5 h,反复 3 次,合并滤液,收集滤渣待用。将所得的乙醇提取液浓缩至无醇味,用 1:1 (V/V) 石油醚萃取 8 次,合并萃取液后,减压浓缩至干,得到灰兜巴石油醚萃取部分,记为 HDB-1。将石油醚萃取后的剩余溶液,用 1:1 (V/V) 乙酸乙酯萃取 8 次,合并萃取液,减压浓缩至干,得到灰兜巴乙酸乙酯萃取部分,记为 HDB-2。将乙酸乙酯萃取后的剩余溶液,用 1:1 (V/V) 正丁醇萃取 8 次,合并萃取液,减压浓缩至干,得到灰兜巴正丁醇萃取部分,记为 HDB-3。将正丁醇萃取剩余后的溶液减压浓缩至干,得到灰兜巴萃取剩余部分,记为 HDB-4。将醇提后的灰兜巴滤渣用蒸馏水在 95 °C 下提取 1.5 h,重复 3 次,合并滤液并减压浓缩至干,得灰兜巴水提取液,记为 HDB-5。

2.2 HPLC 分析条件

色谱条件:Kromasil 100-5 C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱;Agilent C_{18} (4.6 mm \times 12.5 mm, 5 μm) 保护柱;流动相:A 为乙腈,B 为含 0.1% 甲酸的水溶液,梯度洗脱条件为 0 ~ 8 min, 20% ~ 30% A; 8 ~ 13 min, 30% ~ 80% A; 13 ~ 18 min, 80% ~

20% A; 18 ~ 28 min, 20% A; 流速:1.0 mL/min; 进样量:20 μL ; 柱温:25 °C; 检测波长:314 nm。

2.3 PNP 标准曲线的制备

精密称取 0.0209 g PNP 标准品,用磷酸盐缓冲溶液超声溶解,定容于 25 mL 容量瓶中,配制成 0.84 mg/mL 的 PNP 母液,将母液分别稀释成 0.0025、0.005、0.01、0.05、0.1 mmol/L 浓度。

将上述不同浓度的 PNP 标准品按照 2.2 中色谱条件测定,以峰面积为横坐标,浓度为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4 HPLC 方法学考察

精密度试验:精密吸取 0.01 mmol/L PNP 溶液,连续进样 6 次,记录 PNP 峰面积的 RSD 值;稳定性试验:精密吸取 PNP 溶液,分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 不同时间进样 20 μL ,记录峰面积,计算 RSD 值,检测 PNP 的稳定性;重现性试验:在相同条件下重复做样 6 次,按 2.2 项中色谱条件检测,记录峰面积,计算 RSD 值;回收率试验:不加反应药液,将 α -葡萄糖苷酶替换为 PNP 标准溶液做阴性对照,按 60%、80%、100%、120%、140% 水平分别添加对照品,进行测定,计算回收率。

2.5 灰兜巴不同提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性实验流程

取 2 个试管,分别加入 67 mmol/L pH 6.8 的磷酸钾缓冲液 1.0 mL, 3 mmol/L 谷胱甘肽溶液 0.2 mL, 0.04 mg/mL α -葡萄糖苷酶溶液 0.3 mL, 及 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL 灰兜巴醇提石油醚萃取物、醇提乙酸乙酯萃取物、醇提正丁醇萃取物、萃取剩余物、水提物均 0.3 mL, 混匀,37 °C 水浴保温 10 min 后,加入 0.2 mg/mL 的 PNPG 溶液 0.5 mL, 反应 10 min 后,再加入 0.1 mol/L 碳酸钠溶液 8 mL 终止反应,其反应液过 0.45 μm 微孔滤膜后,用 HPLC 按 2.2 项所述色谱条件进行检测,PNP 峰面积记为 A_1 。

另取试管,用等体积溶解样品的试剂作空白,实验步骤同上,PNP 峰面积记为 A_2 。

按以下公式计算 α -葡萄糖苷酶抑制率:

$$\text{酶活性抑制率} = (A_2 - A_1) / A_2 \times 100\%$$

2.6 振荡对药物抑制率影响的研究

分别取 0.08 mg/mL 的 HDB-1, 0.05 mg/mL 的 HDB-2, 0.3 mg/mL 的 HDB-3, 2 mg/mL 的 HDB-4 和 2 mg/mL 的 HDB-5 为样品检测,按 2.5 中反应条件,在水浴反应过程中分别对其每 2 min 振荡 5s; 不

振荡,每组实验重复 5 次。最终用碳酸钠终止反应,将反应完毕的溶液 0.45 μm 微孔滤膜过滤,以 2.2 中的色谱条件用高效液相进行定量分析,计算其抑制率并比较振荡和不振荡对灰兜巴抑制 α -葡萄糖苷酶活性作用影响的差异。

3 实验结果

3.1 PNP 标准工作曲线

按照 2.3 的方法绘制标准曲线,求得回归方程为 $Y = 6599.6X + 1.2734$, $R^2 = 0.9998$,说明 PNP 在 0.0025 ~ 0.1 mmol/L 浓度范围内线性关系良好。

3.2 HPLC 方法学考察

精密度的试验:PNP 峰面积的 RSD 值为 0.295%,表明仪器精密度良好;稳定性试验:分别在 0、1、2、

3、4、5、6 h 不同时间检测 PNP 的稳定性,其 RSD 值为 0.65%,证明 PNP 在此条件下稳定性良好;重复性试验:PNP 峰面积的 RSD 值为 0.79%,表明此反应条件操作可重复性较好,有良好的重现性;回收率试验:实验测得的回收率分别为 98.08%、101.13%、100.97%、99.24%、101.29%,由此证明标准曲线准确性良好。

3.3 振荡对酶抑制率的影响

分别取 0.08 mg/mL 的 HDB-1,0.05 mg/mL 的 HDB-2,0.3 mg/mL 的 HDB-3,2 mg/mL 的 HDB-4 和 2 mg/mL 的 HDB-5,按 2.5 中反应条件,在水浴反应过程中分别对反应溶液每 2 min 振荡 5 s;不振荡。反应结束后,按照 2.2 的色谱条件进行检测,并计算酶抑制率。实验结果见表 1,HPLC 谱图见图 1。

表 1 振荡对灰兜巴提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of shaking on the α -glucosidase inhibition rate ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	振荡后抑制率 Inhibition rate with shaking	未振荡的抑制率 Inhibition rate without shaking
0.08 mg/mL HDB-1	54.80% \pm 1.63	30.85% \pm 2.15
0.05 mg/mL HDB-2	36.05% \pm 3.36	18.36% \pm 3.15
0.3 mg/mL HDB-3	48.23% \pm 2.74	27.15% \pm 1.86
2 mg/mL HDB-4	8.54% \pm 2.02	6.22% \pm 3.01
2 mg/mL HDB-5	4.15% \pm 3.01	2.56% \pm 3.06

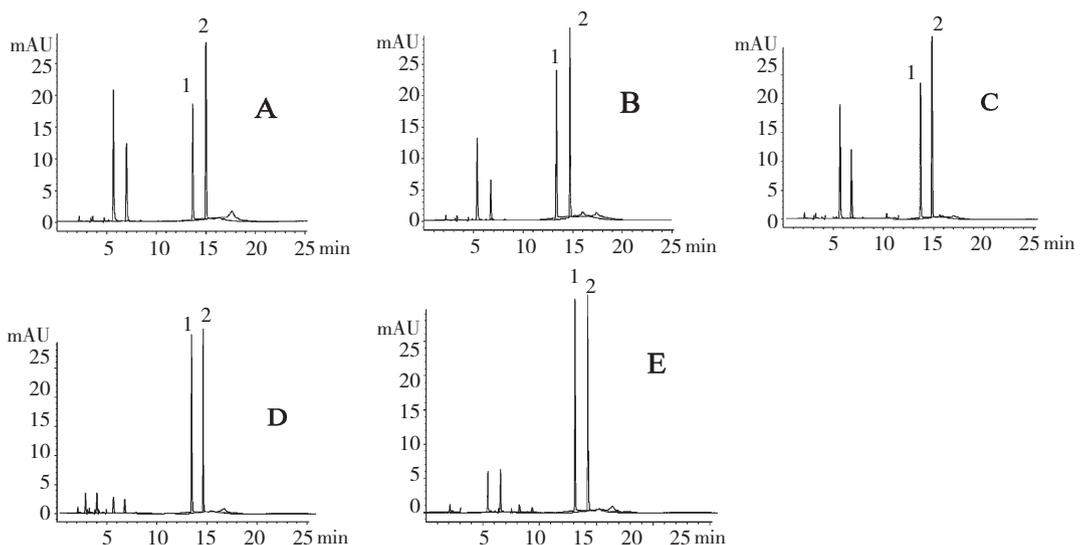


图 1 灰兜巴各提取物部分振荡与不振荡的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reaction with and without shaking

1 和 2 分别代表振荡和不振荡条件下 HPLC 色谱图的 PNP 峰;A:HDB-1;B:HDB-2;C:HDB-3;D:HDB-4;E:HDB-5

1 and 2 represents PNP peak with and without shaking, respectively; A: HDB-1; B: HDB-2; C: HDB-3; D: HDB-4; E: HDB-5

由表 1 和图 1 的结果可以看出,振荡对反应结果的影响很大,5 种灰兜巴提取部分在振荡后,抑制率均明显较不振荡要高。因此,在后续的酶抑制试验中,反应溶液采用每 2 min 振荡 5 s,以保证反应结果的准确性和重复性。

3.4 灰兜巴各提取部分抑制 α -葡萄糖苷酶的活性

按照 2.2 的反应条件和色谱条件进行试验,并计算酶抑制率,试验结果见图 2,同时根据 2.5 的反应条件,但不加 α -葡萄糖苷酶,以考察灰兜巴各提取部分中是否存在与 PNP 结构相似的成分,以及在酶反应条件下,灰兜巴各提取部分是否会使 PNP 分解产生 PNP,试验结果的 HPLC 谱图见图 3。

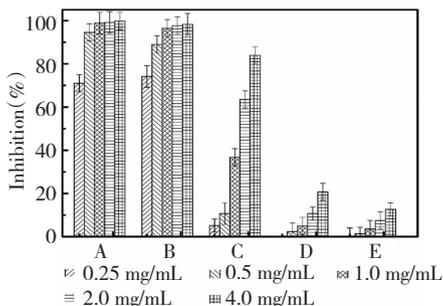


图 2 灰兜巴各提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率

Fig. 2 Inhibitory activity of different HDB extracts on α -glucosidase

A: HDB-1; B: HDB-2; C: HDB-3; D: HDB-4; E: HDB-5

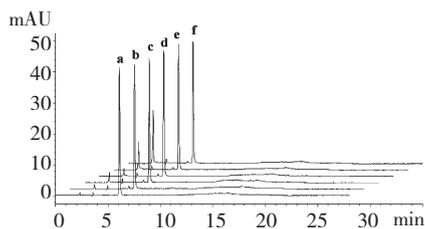


图 3 不加 α -葡萄糖苷酶的反应结果

Fig. 3 The reaction result without α -glucosidase

注: a~f 分别代表纯 PNP 溶液、HDB-1、HDB-2、HDB-3、HDB-4 和 HDB-5 不加 α -葡萄糖苷酶反应后的 HPLC 色谱图

Note: a-f represents HPLC chromatograms of PNP standard, HDB-1, HDB-2, HDB-3, HDB-4 and HDB-5 reacted without α -glucosidase, respectively

由图 3 可看出,不加 α -葡萄糖苷酶的反应液在 13.9 min 附近没有峰出现,证明灰兜巴各提取部分在 PNP 峰处无干扰峰出现,不会对试验结果产生干扰。图 2 表明灰兜巴具有良好的 α -葡萄糖苷酶抑制作用,且灰兜巴石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取部分的抑制活性较高,而醇提剩余部分和水提部分的

抑制活性较低。

4 结果与讨论

本研究首次通过高效液相色谱法研究灰兜巴石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、醇提萃取剩余物以及水提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性并比较在反应过程中振荡对抑制率的影响。4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 在 α -葡萄糖苷酶的催化作用下,可生成对硝基酚 (PNP) 和葡萄糖,在本次研究中,我们取 PNP 作为检测峰^[10],通过高效液相色谱法检测 PNP 峰面积的变化从而反映供试品对 α -葡萄糖苷酶抑制能力的强弱。结果发现,灰兜巴石油醚萃取部分、乙酸乙酯萃取部分和正丁醇萃取部分均有良好的抑制活性,而灰兜巴醇提剩余部分和水提部分的抑制活性较弱。同时通过比较在反应过程中对反应液进行振荡与不振荡,发现振荡以后其抑制率会增加,而且试验结果的重现性更好。这可能是因为每隔一段时间振荡后,药物与酶在溶液中的分布更加均匀,从而使酶与药物的反应过程更加稳定。因此,在后续的研究过程中应严格控制振荡频率及时间,以保证试验结果的重现性良好。

通过研究表明灰兜巴可通过抑制 α -葡萄糖苷酶的活性从而发挥其降糖作用,为一种良好的 α -葡萄糖苷酶抑制剂。项目组前期利用紫外-可见分光光度法对灰兜巴各提取部分的 α -葡萄糖苷酶抑制作用进行了初步研究^[11],在试验过程中发现,由于各提取部分本身在检测波长下均有吸收,会对试验结果产生较大干扰,导致试验结果重现性较差。因此,本次实验选用 HPLC 法测定 PNP 的峰面积,再计算酶抑制率。高效液相色谱法较于传统的紫外分光光度法检测 α -葡萄糖苷酶的抑制活性,误差小,重现性高,可有效将所需峰与其他干扰峰分离开,通过调整保留时间可消除药物本身对于 PNP 检测峰的影响,使结果更加准确可靠,是一种更为简单、有效且新颖的研究 α -葡萄糖苷酶抑制的方法。

参考文献

- Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb *Ramulus mori* in normal and diabetic rats and mice. *Phytomedicine*, 2002, 9: 161-166.
- Fan P, Lara T, Anne-Emmanuelle H, et al. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia*, 2010, 81: 124-131.

(下转第 1689 页)