

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.02.002

HPLC-DAD 法评价青钱茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性*

张 勇 高桂花[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 **目的** 建立高效液相色谱法-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法评价青钱茶对 α -葡萄糖苷酶抑制活性的方法。**方法** 依据 α -葡萄糖苷酶抑制剂可抑制 α -葡萄糖苷酶对 4-硝苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷酶解的原理,以乙腈-0.3%乙酸为流动相,梯度洗脱测定 4-硝苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷酶解产物对硝基酚,检测波长 315nm,流速 1.0ml·min⁻¹,柱温 35℃。**结果** 对硝基酚在 17.42~348.4 μ g·ml⁻¹ 范围内线性关系良好,回收率为 98.8%。**结论** 所建立的方法测定结果准确,重现性好,可用于评价青钱茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。

关键词 α -葡萄糖苷酶;高效液相色谱法;抑制活性;青钱茶

中图分类号:R587.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2021)04-080-04

Evaluation of the Inhibition of Qingqian Tea on α -glucosidase by HPLC-DAD

ZHANG Yong, GAO Guihua[△]

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC-DAD method for evaluation the activity of α -glucosinase inhibitors of Qingqian tea. **Methods** According to the principle that α -glucosidase inhibitors can inhibit the enzymatic hydrolysis of α -glucosidase to 4-nitrophenyl- α -D-pyranoglucoside, an HPLC method was developed to determine p-nitrophenol, the deglycoside product of 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, using gradient elution with acetonitrile-0.3% acetic acid as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the detection wavelength and column temperature were set as 315 nm and 35℃, respectively. **Results** P-nitrophenol was linear in the range of 17.42~348.4 μ g·ml⁻¹. The average recovery was 98.8%, with RSD of 1.5%. The method was accurate and reproducible. **Conclusion** The method is sensitive and accurate, and can be used to evaluate the inhibition activity of Qingqian tea on α -glucosinase.

Keywords: α -Glucosidase; HPLC; Inhibition activity; Qingqian tea

α -葡萄糖苷酶能催化 α -1,4-糖苷键水解,使小肠内麦芽糖、蔗糖等寡糖水解。通过抑制该酶活性,可减缓葡萄糖的生成及吸收,调整血糖水平。青钱茶是青钱柳叶、黄芪、山药及绿茶制成的泡茶饮,具有降糖作用。其降糖机制可能为竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶,故评价其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性具有十分重要的意义。

目前关于 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外评价方法主要采用紫外分光光度法^[1-2]。但当抑制剂本身在测定波长下具有紫外吸收时,会对测定产生干扰,

影响结果的准确度。本实验采用高效液相色谱法-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法,将干扰物质与产物分离后^[3-4],对产物进行准确测定,从而达到精准评价 α -葡萄糖苷酶抑制剂活性的目的。现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津);BP211D 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);酸度计(上海精密科学仪器有限公司);台式高速离心机(湘仪仪器厂)。

* [基金项目] 济宁医学院 2017 年青年教师扶持基金项目 (JY2017KJ051)

[△][通信作者] 高桂花, E-mail: guihua526@163.com

1.2 试剂

α -葡萄糖苷酶(北京百灵威科技有限公司);4-硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)(北京百灵威科技有限公司,纯度 98%);对硝基酚(PNP)(北京百灵威科技有限公司,纯度 99%);米格列醇(山东西亚化学工业有限公司,纯度 $\geq 98\%$);乙腈(色谱纯, Burdick & Jackson);青钱茶(江西省修水神茶实业有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试液的制备

1) $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)。精密称取 0.68g 磷酸二氢钾和 0.705g 磷酸氢二钠置 100ml 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。

2) $2.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNPG 溶液。精密称取 PNPG 18.81mg ,置 25ml 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。现用现配。

3) $1\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ α -葡萄糖苷酶溶液。精密称取 α -葡萄糖苷酶 100U ,置 100ml 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。于冰箱中冷藏保存。

4) $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 反应终止液。精密称取无水碳酸钠 0.216g ,置 100ml 容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。

5) $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNP 对照品溶液。精密称取 PNP 17.42mg ,置 25ml 容量瓶中,加磷酸盐缓冲液溶解至刻度,摇匀。

2.2 供试品溶液的制备

1) 青钱茶提取物。取青钱茶 3.0g ,加沸水 250ml ,室温浸泡 15min ,滤过,再同法浸泡两次,滤液浓缩,蒸干,即得。

2) 青钱茶供试品溶液。取青钱茶水提取物适量,溶于磷酸盐缓冲液中,得青钱茶供试品溶液。

3) 米格列醇供试品溶液。取米格列醇适量,溶于磷酸盐缓冲液中,得米格列醇供试品溶液。

2.3 α -葡萄糖苷酶活性抑制试验

α -葡萄糖苷酶抑制剂体外活性筛选是以 PNPG 作为底物,PNPG 在 α -葡萄糖苷酶的作用下可分解产生 PNP,以 PNP 作为检测物评价 α -葡萄糖苷酶抑制剂的活性^[5-8],按照表 1 取 PBS、 α -糖苷酶试液,米格列醇供试品溶液及青钱茶供试品溶液,混匀, 37°C 孵育 10min 。再分别加入 PNPG 溶液,混匀, 37°C 反应 90min 后,加反应终止液混匀,终止反应,制得空白对照溶液、阳性对照溶液及样品溶液。采用高效液相色谱法测定生成的 PNP,

按下式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{C_{\text{空白}} - C_{\text{样品}}}{C_{\text{空白}}} \times 100\%$$

表 1 反应液体积/ μl

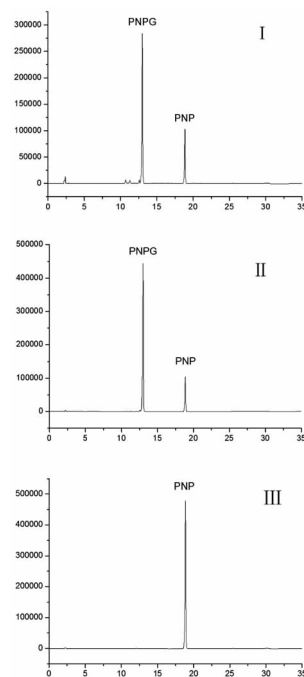
溶液	空白对照溶液	阳性对照溶液	样品溶液
PBS	50	—	—
α -糖苷酶	50	50	50
青钱茶供试品	—	—	50
米格列醇供试品	—	50	—
PNPG	50	50	50
反应终止液	100	100	100

2.4 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C18(2) 柱($200 \times 4.6\text{mm}$, $5.0\mu\text{m}$);流动相:0.3% 乙酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序为 $0 \sim 25\text{min}$, $10\% \sim 90\% \text{ B}$; $25 \sim 27\text{min}$, $90\% \sim 10\% \text{ B}$; $27 \sim 35\text{min}$, $10\% \text{ B}$;流速 $1\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35°C ;检测波长为 315nm ;进样量 $10\mu\text{l}$ 。

2.5 含量测定方法学验证

2.5.1 专属性试验 取样品溶液、阳性对照溶液及空白对照溶液各 $10\mu\text{l}$,按“2.4”项下色谱条件进样分析。结果显示,空白对照、PNPG 及杂质均不干扰 PNP 的测定。色谱图见图 1。



注: I-样品溶液; II-阳性对照溶液; III-空白对照溶液

图 1 高效液相色谱图

2.5.2 线性关系考察 取 PNP 溶液,逐级稀释制成 $17.42, 34.84, 69.68, 139.36, 348.4\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液。经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,进样 $10\mu\text{l}$ 。以浓度

为横坐标,峰面积为纵坐标,计算回归方程。结果 PNP 在 $17.42 \sim 348.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内线性良好,回归方程为 $Y = 5299920X + 593618 (r = 0.9997)$ 。

2.5.3 精密度试验 取 PNP 标准溶液,按“2.4”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积,结果,PNP 峰面积 RSD 为 0.52%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一份青钱茶样品溶液,按“2.4”项下色谱条件,分别在 0、2、4、6、8、10h 进样,记录峰面积,结果 PNP 峰面积 RSD 为 0.6%,表明对照品溶液在 10h 内稳定性良好。

2.5.5 检测限和定量限 取 PNP 对照品溶液,逐级稀释,制备对照品溶液进样 $10 \mu\text{l}$,以 $S/N = 3:1$ 时 PNP 的质量为检测限, $S/N = 10:1$ 时 PNP 的质量为定量限。结果 PNP 的检测限为 0.1ng,定量限为 0.2ng。

2.5.6 加样回收率及重复性试验 取青钱茶提取物 50.12mg,置 10ml 容量瓶中,加磷酸盐缓冲液溶解并稀释至刻度,得 $5.012 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的青钱茶提取物溶液。分别取青钱茶提取物溶液 25、25、25 μl ,PNP 溶液 11、14、17 μl ,PBS 溶液 14、11、8 μl 混匀作为供试品溶液,按照“2.3”方法制备抑制样品溶液,每个水平平行 3 份。按“2.4”项下色谱条件,测定 PNP 浓度,计算回收率,结果见表 2,平均回收率为 98.8%,RSD 为 1.5%。

取上述青钱茶提取物溶液 25 μl 、PBS 溶液 25 μl 混合作为重复性供试品溶液,平行 6 份,按“2.3”项下方法制备抑制样品溶液,按“2.4”项下色谱条件,测定 PNP 浓度,计算抑制率。青钱茶提取物的抑制率重复性试验的 RSD 为 1.9%,表明方法重复性良好。

表 2 回收率试验结果(n=9)

序号	测得量 / μg	加入量 / μg	样品中含 量/ μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	15.17	7.66	7.68	97.7		
2	15.30	7.66	7.68	99.4		
3	15.45	7.66	7.68	101.4		
4	17.35	9.76	7.68	99.1		
5	17.46	9.76	7.68	100.3	98.8	1.5
6	17.16	9.76	7.68	97.1		
7	19.44	11.85	7.68	99.2		
8	19.31	11.85	7.68	98.1		
9	19.17	11.85	7.68	97.0		

2.6 样品测定

精密称取米格列醇及青钱茶提取物,按“2.3”项下方法制备抑制样品溶液,按“2.4”项下色谱条

件进样测定,结果表明青钱茶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用,且具有浓度依赖性。见表 3。

表 3 样品测定结果(n=3)

序号	青钱茶提取物			米格列醇		
	浓度 / $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	抑制率 /%	RSD /%	浓度 / $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	抑制率 /%	RSD /%
1	0.5	10.4	1.6	0.313	42.2	2.4
2	1.0	30.7	2.7	0.625	61.4	1.8
3	2.5	68.3	1.8	1.25	83.4	3.1
4	5.0	81.4	1.2	2.5	93.7	2.9
5	10.0	93.1	2.8	5.0	99.8	3.3

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验采用液相色谱法测定 PNP 的优势在于经色谱柱分离后,中药提取物中组分不再干扰 PNP 的测定。鉴于青钱茶提取物中成分较多,采用梯度洗脱方式,以确保 PNP 测定不受干扰。分别考察了甲醇与乙腈作为有机相时的分离情况,在保留时间相近的情况下,使用乙腈时分离效果更好。添加乙酸能够改善峰形,减小拖尾。

3.2 酶促反应时间的优化

按照 2.3 确定的条件,以青钱茶提取物为抑制剂,分别在 30、50、70、90、110、130min 加入反应终止液终止反应,测定产物 PNP 的变化。结果在 90min 时 PNP 的产量已经足够,适宜高效液相色谱仪测定,确定反应时间为 90min。

3.3 青钱茶 α -糖苷酶抑制活性

米格列醇是一种高效的 α -葡萄糖苷酶抑制剂,对各种 α -葡萄糖苷酶均有较强的抑制作用,尤其是对蔗糖酶和葡萄糖淀粉酶有更强的抑制作用。青钱柳叶其主要功能性成分为黄酮、多糖及三萜等类物质^[9-12],由青钱茶 α -糖苷酶抑制活性实验结果可知,青钱茶提取物对 α -葡萄糖苷酶抑制作用具有浓度依赖性,等量 $10 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的青钱茶提取物与 $2.5 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的米格列醇的体外抑制作用相当,其 IC_{50} 为 $1.7 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

综上所述,本文采用 HPLC 法成功将干扰物质与 PNP 分离,并准确测定 PNP 的含量,所建立的方法定量准确,操作简便,能够用于精准评价青钱茶对 α -糖苷酶的抑制活性。同时,实验结果表明,青钱茶具有显著的抑制 α -糖苷酶活性的能力,其抑制作用具有浓度依赖性,这为青钱茶进一步开发和利用提供了一定的依据。

参考文献:

[1] 舒婷,肖畅,何慧,等. 青砖茶粗多糖抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(3): 194-199. DOI: 10. 13684/j. cnki. spkj. 2019. 03. 035.

[2] 赵胜男,郑晓凤,崔琳,等. 桔梗糖蛋白超临界辅助提取工艺及对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 187-190, 195. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2016. 03. 031.

[3] Li DQ, Zhao J, Xie J, et al. A novel sample preparation and on-line HPLC-DAD-MS/MS-BCD analysis for rapid screening and characterization of specific enzyme inhibitors in herbal extracts; Case study of α -glucosidase[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88, 130-135. DOI: 10. 1016/j. jpb. 2013. 08. 029.

[4] 陈海君,秦惠玉,龙飞,等. 超滤亲和结合液相色谱-质谱联用和分子对接技术筛选毛茛苳种子中高亲和性 α -葡萄糖苷酶抑制剂[J]. 分析化学, 2017, 45(6): 889-897. DOI: 10. 11895/j. issn. 0253-3820. 170050.

[5] Yang L, Yang YL, Dong WH, et al. Sesquiterpenoids and 2-(2-phenylethyl) chromones respectively acting as α -glucosidase and tyrosinase inhibitors from agarwood of an Aquilaria plant[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019, 34(1): 853-862. DOI: 10. 1080/14756366. 2019. 1576657.

[6] 文丽霞,吴正钧,郭本恒. 两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型的改良与比较[J]. 天然产物研究与开发,

2015, 27(4): 681-686. DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2015. 04. 024.

[7] 李美华,王渭清,曾阳,等. 金露梅提取物对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶和醛糖还原酶的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 470-475. DOI: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 20180413.

[8] 张兆远,阮洪生. 金荞麦根茎乙醇提取物抗氧化和对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的抑制作用[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 102-106. DOI: 10. 13412/j. cnki. zyy. 2017. 02. 028.

[9] 刘杰,向燕茹,丁嘉瑜,等. 青钱柳抑制 α -葡萄糖苷酶有效成分筛选及其对 II 型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 363-365, 369. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2015. 14. 066

[10] 扶丽君,胡明华,尹西拳,等. 青钱柳叶对糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中成药, 2017, 39(6): 1134-1138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2017. 06. 005.

[11] 吴少锦,邹荣灿,焦思棋,等. 青钱柳抑制 α -淀粉酶活性筛选研究[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 224-227. DOI: 10. 13684/j. cnki. spkj. 2018. 05. 040.

[12] 王建礼,杨作成,王聪,等. 槲皮素对糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(2): 135-138. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2018. 02. 013.

(收稿日期 2020-12-10)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 079 页)

参考文献:

[1] 龙朝明. 三七研究综述[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(6): 502-503. DOI: 10. 3969/j. issn. 1004-2814. 2013. 06. 064.

[2] 董晓强,董天文,洪霞,等. 三七、人参与西洋参化学成分与药效学之间的关系[J]. 承德医学院学报, 2011, 28(3): 307-309. DOI: 10. 15921/j. cnki. cyxb. 2011. 03. 027.

[3] 马珍珠,普俊学,屈云莲,等. 三七总皂苷提取、分离纯化技术的研究进展[J]. 中国当代医药, 2016, 21: 19-22.

[4] 黄梅,杨丽娟,谢丹. 三七总皂苷联合三苯氧胺对乳腺癌 T47D 细胞生长与凋亡影响[J]. 世界中医药, 2011, 6(4): 340-342. DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-7202. 2011. 04. 037.

[5] Dang KT, Nguyen TH, Nguyen TD, et al. Anticancer effects of saponin and saponin - phospholipid complex of Panax notoginseng grown in Vietnam[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2016, 6(9): 795-800. DOI: 10. 1016/j.

apjtb. 2016. 04. 013.

[6] 刘卫里,武军宏. 乳腺癌的研究进展[J]. 社区医学杂志, 2007, 5(18): 21-21. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-4208. 2007. 18. 011.

[7] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(8): 561-569. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-3969. 2013. 08. 001.

[8] 陈鹏,王志萍,李文,等. 三七总皂苷对肝癌高转移细胞 HCCLM3 的抑制作用研究[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 9: 50-51. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-2349. 2012. 09. 037.

[9] 李晓红,董作仁,郝洪岭,等. 三七皂苷对 NB4 细胞促凝活性及诱导分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1): 63. DOI: 10. 3321/j. issn: 1003-5370. 2004. 01. 018.

[10] 郑文球,朱敏. 三七皂苷 R1 对 HL-60 细胞凋亡及 survivin, p53 表达的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(3): 198-200. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-170X. 2007. 03. 010.

(收稿日期 2020-11-20)

(本文编辑:石俊强)