

知母中4种成分及对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

朱建新, 冯亭亭, 张景, 罗飞, 李旺*
(河北北方学院, 河北 张家口 075000)

摘要: 目的 比较了不同产地知母中黄酮类成分、皂苷类成分的含有量及其对 α -葡萄糖苷酶抑制作用, 并在此基础上提出知母质量标志物。方法 采用PNPG法测抑制率, UPLC法测定知母中新芒果苷、芒果苷的含有量, 相关性分析筛选其药效成分。结果 芒果苷、总皂苷与抑制率的相关性较大, 新芒果苷与抑制率无显著相关性。结论 知母药材中起 α -葡萄糖苷酶抑制作用的主要成分可能为芒果苷, 芒果苷可作为知母质量标志物。

关键词: 知母; 黄酮; 皂苷; 化学成分; α -葡萄糖苷酶; 质量标志物

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1120-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.024

Four chemical constituents from *Anemarrhenae rhizoma* and their α -glucosidase inhibitory effects

ZHU Jian-xin, FENG Ting-ting, ZHANG Jing, LUO Fei, LI Wang*
(Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

KEY WORDS: *Anemarrhenae rhizome*; flavone; saponins; chemical constituents; α -glucosidase; Q-Marker

糖尿病是一组由多病因引起的以慢性高血糖为特征的终身性代谢疾病。全球糖尿病患者已超过4亿人, 2014年流行病学调查结果表明中国糖尿病患者已达1.4亿人, 因此对糖尿病的预防和治疗已迫在眉睫。目前糖尿病的药物治疗有口服药物治疗和胰岛素治疗。 α -葡萄糖苷酶抑制剂为口服药物, 既可用于1型糖尿病又对2型糖尿病有很好的治疗作用, 因而被广泛应用于临床。食物中的淀粉经口腔唾液、胰淀粉酶消化成含少数葡萄糖分子的低聚糖(或称寡糖)以及双糖与三糖, 进入小肠在 α -葡萄糖苷酶作用下分解为单个葡萄糖被小肠吸收。在服用 α -葡萄糖苷酶抑制剂后葡萄糖在小肠吸收时间后延, 可降低餐后血糖, 长期使用亦可降低空腹血糖, 但也会出现一些不良反应, 如腹痛、肠胀气等。

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 具有清热泄火, 滋阴润燥的功效^[1]。已有文献报道知母所含成分对 α -葡萄

糖苷酶有抑制作用, 可作为 α -葡萄糖苷酶抑制剂用于糖尿病的治疗^[2-8]。本文采用PNPG法探讨知母提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用, 进一步明确其药用成分, 并提出知母质量标志物(Q-Marker), 以期为新的 α -葡萄糖苷酶抑制剂筛选及知母的资源开发和临床运用提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters Acquity UPLC™超高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司); SF-400型电子称(上海皖衡电子仪器有限公司); WND-200型高速中药粉碎机(浙江兰溪伟能达电器有限公司); DZF-6050型真空烘箱(宁波江南仪器厂); XB220 A型万分之一分析天平(瑞士PERCISA公司); WD-9415E型超声仪(北京六一仪器厂); TDL-50B低速离心机(上海安亭科学仪器厂); UV759紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); HH-S6数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂); MX-S可调式涡旋振荡混匀器(金坛市

收稿日期: 2017-11-24

基金项目: 河北省张家口市科学技术研究与发展计划(1411066C)

作者简介: 朱建新(1992—), 女, 硕士生, 主要从事生药鉴定及质量评价研究。Tel: 18831317858, E-mail: 1587882210@qq.com

*通信作者: 李旺(1966—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中医临床与中药研究。Tel: 18931316828, E-mail: zjklw66@sina.cn

科析仪器有限公司); MK-3 酶标仪 (赛默飞世尔科技公司)。

1.2 试药 芒果苷对照品 (批号 111607-200301)、知母皂苷 B-II (批号 111839-201505) 购自中国食品药品检定研究院; 新芒果苷对照品 (批号 BW5361) 购于北京坛墨科技有限公司 (纯度 >98%); α -葡萄糖苷酶 (批号 RM1768Y387)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) (批号 RM2017Y620) 均购于上海瑞永生物科技有限公司; 娃哈哈饮用纯净水; 乙腈、甲醇为色谱纯; 乙醇、丙酮为分析纯。25 批知母药材来源于河北张家口、安国、甘肃、山西、安徽、河南, 经河北北方学院中医学院赵恒成副教授鉴定为正品。药材粉碎, 过 2 号筛。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取新芒果苷和芒果苷对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶, 用流动相溶解并稀释制成质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备溶液; 精密称取知母皂苷 B-II 对照品适量, 30% 丙酮定容至 10 mL, 制成质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备溶液。

2.2 供试品溶液制备 知母药材干燥粉碎, 精密称取知母粉末 1.25 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 25 mL, 超声 (功率 300 W, 频率 40 kHz, 温度 35 $^{\circ}\text{C}$) 提取 2 次, 每次 20 min, 放冷, 离心 (5 000 r/min, 10 min) 取上清液, 合并后 70% 乙醇定容至 50 mL, 即得。

2.3 总黄酮含量测定 精密称取芒果苷对照品适量, 70% 乙醇定容至 10 mL, 制成质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 对照品贮备液。依次吸取 15、45、75、125、250、500 μL 对照品贮备液, 70% 乙醇定容至 5 mL, 在 258 nm 处测定吸光度, 以对照品浓度为横坐标 (X), 以吸光度为纵坐标 (A), 绘制标准曲线 $A = 0.107 2X + 0.000 3$ ($r = 0.999 8$), 线性范围 0.9 ~ 30 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 总皂苷含量测定 精密称取知母皂苷 B-II 对照品适量, 30% 丙酮定容至 10 mL, 制成质量浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备溶液。依次吸取 20、100、160、200、300、500 μL 对照品贮备液参照刘春林^[9]等方法加入 1.0% 对二甲氨基苯甲醛乙醇溶液 2.0 mL 和磷酸 6.0 mL, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 60 min 后冰水浴冷 5 min, 再加无水乙醇 4.0 mL, 摇匀, 在 520.0 nm 处测定吸光度值, 以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 以吸光度为纵坐标

(A), 绘制标准曲线 $A = 0.115 3X + 0.006 3$ ($r = 0.999 1$), 线性范围 0.5 ~ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 新芒果苷、芒果苷含量测定

2.5.1 色谱条件 Synchronis C_{18} 色谱柱 (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-水 (13 : 87); 体积流量 0.25 mL/min; 检测波长 258 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。色谱图见图 1。

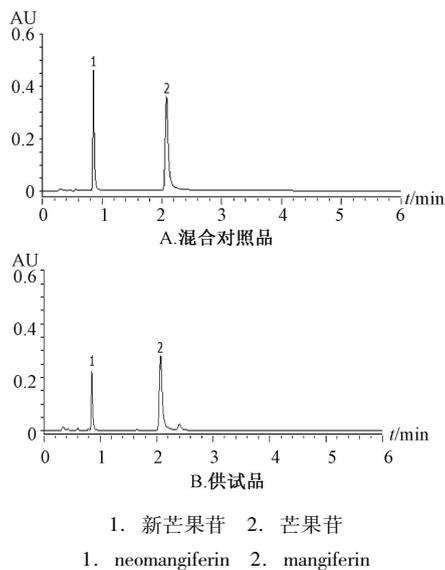


图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

2.5.2 方法学考察

2.5.2.1 线性关系考察 分别精密称取各对照品溶液 6.25、12.5、25、50、100、400 μL 稀释至 1 mL, 取 5 μL 在“2.5.1”色谱条件下测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行回归得新芒果苷、芒果苷的线性方程分别为 $Y_1 = 32 806 X_1 + 5 589.4$ ($r = 1, n = 6$), $Y_2 = 24 192 X_2 + 9 602.4$ ($r = 0.999 9, n = 6$), 表明两者分别在 1.25 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ 、1.875 ~ 120 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.5.2.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液, 在“2.5.1”项条件下重复进样 6 次, 得新芒果苷和芒果苷的峰面积 RSD 分别为 0.31%、0.27%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2.3 稳定性试验 取室温放置的同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定峰面积, 测得新芒果苷和芒果苷的峰面积 RSD 分别为 0.83%、1.06%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.2.4 重复性试验 精密称取同一供试品粉末, 按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 在

“2.5.1”项条件下进样，测得新芒果苷和芒果苷的峰面积 RSD 分别为 1.38%、1.49%，表明该方法重复性良好。

2.5.2.5 加样回收率试验 精密称定已知含有量的知母粉末 0.625 g 共 9 份，平均分为低、中、高 3 组 ($n=3$)，分别加入新芒果苷和芒果苷含有量的 80%、100%、120% 的各对照品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.5.1”项条件下进样测定，计算回收率。结果，新芒果苷、芒果苷平均加样回收率分别为 100.3%、99.55%、99.80%；99.42%、100.44%、100.73%，RSD 值分别为 0.91%、1.1%、1.12%；1.12%、1.7%、1.22%。

2.5.3 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 按“2.2”项下方法制备知母提取液，检测在 96 孔板上进行，反应体系参照何荣^[10] 的方法，磷酸盐缓冲液 20 μ L，加入 α -葡萄糖苷酶 (25 U/L) 20 μ L，样品溶液 20 μ L，37 $^{\circ}$ C 预热 10 min，后加入 PNPG (1.25 mmol/L) 20 μ L，37 $^{\circ}$ C 恒温反应 40 min，再加入 80 μ L 的 Na_2CO_3 (0.1 mol/L) 溶液终止反应，于 405 nm 波长下测 OD 值，计算抑制率。

$$\text{抑制率 } I = 1 - \frac{(c - d)(a - b)}{a - b} \times 100\%$$

a 为阴性对照组 (缓冲液 + 酶液 + 底物)， b 为空白对照组 (缓冲液)， c 为样品测定组 (样品 + 酶液 + 底物)， d 为样品对照组 (样品 + 缓冲液)。

2.6 样品总黄酮含有量测定 25 批样品按“2.2”项下条件制备样品，在“2.3”项条件下测定吸光度，按回归方程计算总黄酮百分含有量。结果见表 1。

表 1 各总黄酮含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 1 Results of content determination of various total flavones ($n=3$)

| 产地 | 知母肉 | 毛知母 |
|----------|------|------|
| 安家沟野生 | 4.97 | |
| 赐儿山野生 | 3.52 | |
| 鱼儿山野生 | 3.23 | |
| 崇礼野生 | 4.48 | |
| 宣化野生 | 4.19 | |
| 崇礼种植 | 2.01 | 3.06 |
| 蔚县西合营镇种植 | 2.24 | 2.73 |
| 蔚县南杨庄种植 | 2.35 | 4.92 |
| 蔚县代王镇种植 | 2.65 | 1.03 |
| 蔚县宋家庄镇种植 | 2.5 | 2.88 |
| 河北安国 | 1.8 | 3.24 |
| 河南 | 2.28 | 2.53 |
| 甘肃 | 3.35 | 3.24 |
| 山西 | 2.72 | 3.83 |
| 安徽 | 1.29 | 1.57 |

由表 1 可知，总黄酮含有量在 1.03% ~ 4.97%，平均值为 2.90%。建议知母总黄酮成分含有量限度不低于 0.82% (按干燥品计算)。

2.7 样品总皂苷含有量测定 25 批样品按“2.2”项下条件制备样品，在“2.4”项条件下测定吸光度，按回归方程计算总皂苷百分含有量。结果见表 2。

表 2 各总皂苷含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of various total saponins ($n=3$)

| 产地 | 知母肉 | 毛知母 |
|----------|------|------|
| 安家沟野生 | 8.47 | |
| 赐儿山野生 | 8.08 | |
| 鱼儿山野生 | 8.15 | |
| 崇礼野生 | 7.68 | |
| 宣化野生 | 7.82 | |
| 崇礼种植 | 7.41 | 8.24 |
| 蔚县西合营镇种植 | 7.58 | 8.2 |
| 蔚县南杨庄种植 | 7.27 | 8.07 |
| 蔚县代王镇种植 | 6.86 | 8.23 |
| 蔚县宋家庄镇种植 | 6.78 | 6.76 |
| 河北安国 | 6.65 | 8.32 |
| 河南 | 7.53 | 7.51 |
| 甘肃 | 7.57 | 7.05 |
| 山西 | 6.45 | 7.03 |
| 安徽 | 6.65 | 7.45 |

由表 2 可知，总皂苷含有量在 6.45% ~ 8.47%，平均值为 7.51%。建议知母总皂苷成分含有量限度不低于 5.16% (按干燥品计算)。

2.8 样品中新芒果苷、芒果苷含有量测定 25 批样品按“2.2”项下条件制备样品，在“2.5.1”项色谱条件下进样，测定峰面积，按回归方程分别计算新芒果苷、芒果苷百分含有量。结果见表 3。

表 3 各新芒果苷、芒果苷含有量测定结果 ($n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of various neo-mangiferins and mangiferins ($n=3$)

| 产地 | 知母肉 | | 毛知母 | |
|----------|------|------|------|------|
| | 新芒果苷 | 芒果苷 | 新芒果苷 | 芒果苷 |
| 安家沟野生 | 2.51 | 2.58 | | |
| 赐儿山野生 | 1.87 | 1.52 | | |
| 鱼儿山野生 | 1.44 | 1.52 | | |
| 崇礼野生 | 2.90 | 1.45 | | |
| 宣化野生 | 2.40 | 1.56 | | |
| 崇礼种植 | 1.07 | 1.20 | 1.44 | 1.42 |
| 蔚县西合营镇种植 | 0.94 | 1.04 | 0.98 | 1.59 |
| 蔚县南杨庄种植 | 1.33 | 0.87 | 2.61 | 2.09 |
| 蔚县代王镇种植 | 1.65 | 0.83 | 1.71 | 0.93 |
| 蔚县宋家庄镇种植 | 1.40 | 0.84 | 1.66 | 0.95 |
| 河北安国 | 1.15 | 0.52 | 1.81 | 1.25 |
| 河南 | 0.49 | 1.62 | 0.66 | 1.68 |
| 甘肃 | 1.45 | 1.71 | 1.41 | 1.71 |
| 山西 | 1.86 | 0.68 | 1.88 | 1.79 |
| 安徽 | 0.66 | 0.33 | 0.67 | 0.70 |

由表3可知,新芒果苷含有量在0.49%~2.9%,平均值为1.52%,建议知母中新芒果苷成分含有量限度不低于0.39%(按干燥品计算)。芒果苷含有量在0.33%~2.58%,平均值1.3%,建议知母中芒果苷成分含有量限度不低于0.6%(按干燥品计算)。

2.9 知母提取液对 α -葡萄糖苷酶抑制率测定 25批样品按“2.2”项下条件制备,在“2.5.3”项条件下测OD值,计算抑制率。结果见表4。

表4 各 α -葡萄糖苷酶抑制率测定结果(n=3)

Tab. 4 Results of determination of various α -glucosidase inhibition rates (n=3)

| 产地 | 知母肉 | 毛知母 |
|----------|-------|-------|
| 安家沟野生 | 95.44 | |
| 赐儿山野生 | 91.1 | |
| 鱼儿山野生 | 91.73 | |
| 崇礼野生 | 90.35 | |
| 宣化野生 | 90.37 | |
| 崇礼种植 | 86.54 | 90.06 |
| 蔚县西合营镇种植 | 80.12 | 90.11 |
| 蔚县南杨庄种植 | 78.52 | 93.76 |
| 蔚县代王镇种植 | 84.5 | 90.7 |
| 蔚县宋家庄镇种植 | 73.71 | 85.37 |
| 河北安国 | 76.61 | 84.46 |
| 河南 | 88.48 | 90.69 |
| 甘肃 | 89.86 | 89.16 |
| 山西 | 59.16 | 89.95 |
| 安徽 | 79.87 | 81.74 |

2.10 相关性分析 运用SPSS22软件将知母各组分对 α -葡萄糖苷酶抑制率进行相关性分析,结果见表5。

表5 相关性分析结果

Tab. 5 Results of correlation analysis

| | 新芒果苷 | 芒果苷 | 总黄酮 | 总皂苷 | 抑制率 |
|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 新芒果苷 | 1 | 0.433* | 0.796** | 0.291 | 0.252 |
| 芒果苷 | 0.433* | 1 | 0.785** | 0.628** | 0.743** |
| 总黄酮 | 0.796** | 0.785** | 1 | 0.392 | 0.462* |
| 总皂苷 | 0.291 | 0.628** | 0.392 | 1 | 0.703** |
| 抑制率 | 0.252 | 0.743** | 0.462* | 0.703** | 1 |

注:**在0.01水平(双侧)上显著相关;*在0.05水平(双侧)上显著相关

通过相关性分析可知,芒果苷、总皂苷这2种成分与抑制率的相关性较大,总黄酮与抑制率的相关性较小,新芒果苷与抑制率没有显著相关性,表明芒果苷、总皂苷对 α -葡萄糖苷酶具有良好的抑制作用,新芒果苷没有明显的抑制作用。

3 讨论

研究表明知母中黄酮类成分和皂苷类成分对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用。芒果苷作为知母双苯吡酮类的主要成分对 α -葡萄糖苷酶抑制作用较明显,而新芒果苷无此作用与之前的结论相一致,这可能是知母具有降血糖作用的机制之一。由此提出芒果苷可作为知母的Q-Marker,有利于建立知母药材全程质量控制及质量溯源体系。在之后的研究中将进一步密切中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分的关联度,加强中药知母标准化建设。再者毛知母中新芒果苷、芒果苷含有量均高于知母肉中的含有量,表明知母皮及其根须中均含新芒果苷和芒果苷这2种成分,为知母炮制工艺提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 212-213.
- [2] 吴莹, 宋泽璧, 高慧, 等. 知母盐制前后降血糖作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1977-1980.
- [3] 张爽, 曲琰, 吴莹, 等. 盐知母降血糖活性部位作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(10): 791-794.
- [4] 崔玲玲, 季德, 袁永亮, 等. 知母酒炙前后指纹图谱的比较及对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的比较研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(4): 43-48.
- [5] 陈丽华, 潘自红, 曹云丽, 等. 知母中活性成分对 α -葡萄糖苷酶的抑制研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 147-150, 157.
- [6] 黄芳, 徐丽华, 郭建明, 等. 知母提取物的降血糖作用[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(6): 332-335.
- [7] 李春梅, 高永林, 李敏, 等. 知母皂苷对小鼠血糖的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(4): 22-23.
- [8] 高雁, 张爽, 宋泽璧, 等. 盐知母化学成分 α -葡萄糖苷酶抑制作用研究[J]. 中国医药科学, 2016, 6(21): 60-62.
- [9] 刘春林, 张继全, 吴飞, 等. 基于新检测方法的知母总皂苷最佳提取工艺研究[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1994-1996.
- [10] 何荣, 冯国华, 张富东, 等. 芒果苷对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 54-57.
- [11] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [12] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.