

引用:陈丹,李薇,李小兰,李金科,李柯,颜学文.老鹤草提取工艺优选及其对 α -淀粉酶抑制作用的研究[J].湖南中医杂志,2023,39(7):159-162.

老鹤草提取工艺优选及其对 α -淀粉酶抑制作用的研究

陈丹¹,李薇^{2,3},李小兰^{2,3},李金科¹,李柯²,颜学文⁴

- (1. 湘潭医卫职业技术学院,湖南湘潭,411102;
2. 湖南省中医药研究院,湖南长沙,410013;
3. 湖南中医药大学,湖南长沙,410208;
4. 湖南润吉药业有限公司,湖南长沙,410153)

[摘要] 目的:优选老鹤草中柯里拉京的提取工艺条件,并通过对 α -淀粉酶活力的抑制作用初步判断柯里拉京的降糖作用。方法:以柯里拉京提取率为指标,采用单因素考察提取方法、提取溶剂和提取次数对老鹤草柯里拉京提取率的影响;在单因素试验的基础上,采用正交设计法优化老鹤草水提取工艺条件。结果:老鹤草水提取的最佳工艺条件为加水回流提取2次,用量8,6倍,提取时间1.5,1.5h,在此条件下,老鹤草柯里拉京的提取率1.2%,影响老鹤草柯里拉京提取率的因素从大到小依次为:加水倍数>提取时间>浸泡时间。结论:通过对 α -淀粉酶活力的抑制作用测定,表明老鹤草中柯里拉京有较好的降糖作用。

[关键词] 老鹤草;柯里拉京;提取工艺; α -淀粉酶;抑制作用

[中图分类号]R284 **[文献标识码]**A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.07.039

Optimization of the extraction process of *Geranium wilfordii* maxim. and its inhibitory effect on α -amylase

CHEN Dan¹, LI Wei^{2,3}, LI Xiaolan^{2,3}, LI Jinke¹, LI Ke², YAN Xuewen⁴

- (1. Xiangtan Medicine & Health Vocational College, Xiangtan 411102, Hunan, China;
2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China;
3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;
4. Hunan Runji Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410153, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To optimize the extraction process conditions of corilagin in *Geranium wilfordii* maxim., and to investigate the hypoglycemic effect of corilagin based on its inhibitory effect on the activity of α -amylase. Methods: With the extraction rate of corilagin as an index, the univariate analysis was used to investigate the influence of extraction method, extraction solvent, and times of extraction on the extraction rate of corilagin in *Geranium wilfordii* maxim., and then an orthogonal design was used to optimize the water extraction process conditions for *Geranium wilfordii* maxim. Results: The optimal water extraction process conditions for *Geranium wilfordii* maxim. were reflux extraction with water twice, an amount of 8,6 times, and an extraction time of 1.5, 1.5 hours for both times of extraction, and under such conditions, the extraction rate of corilagin *Geranium wilfordii* maxim. was 1.2%. The folds of water added was the greatest influencing factor for the extraction rate of corilagin, fol-

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(21C1472)

第一作者:陈丹,女,硕士,副教授,研究方向:中药制剂开发及中药质量标准研究

通信作者:颜学文,男,工程师,研究方向:中药质量控制研究,E-mail:19389438@qq.com

lowed by extraction time and soak time. Conclusion: The inhibitory effect of corilagin in *Geranium wilfordii* maxim. on the activity of α -amylase is measured to show that corilagin has a good hypoglycemic effect.

[**Keywords**] *Geranium wilfordii* maxim.; corilagin; extraction process; α -amylase; inhibitory effect

随着生活水平的提高,糖尿病、高脂血症的发病率呈逐年上升趋势,并严重危害人类健康。以阿卡波糖为代表的 α -葡萄糖苷酶抑制剂具有很好的控制餐后血糖水平的功效,是临床常用的治疗糖尿病药物。现代中医药试验研究表明,许多天然药物都具有降血糖的功效^[1]。文献报道,从余甘子降血糖活性部位分离鉴定出的7个酚类活性成分,均具有很好的抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用^[2],其中以没食子酸和柯里拉京活性为最强^[3-4]。

老鹤草为牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.、老鹤草 *Geranium wilfordii* Maxim. 或野老鹤草 *Geranium carolinianum* L 的干燥地上部分^[5]。现代研究证明,老鹤草有抗肿瘤、降血糖、升压等作用,主要化学成分为鞣质、黄酮、有机酸和挥发油等^[6-7]。课题组前期研究发现老鹤草(产地:湖南省邵阳县)中柯里拉京的含量为0.9%,没食子酸含量为0.5%。本实验主要研究老鹤草水提液的最佳提取工艺及对 α -淀粉酶活性的抑制作用,以期进一步探索老鹤草的降糖机制,为开发利用老鹤草提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料 老鹤草,购于长沙市老百姓大药房;柯里拉京(成都普思生物科技股份有限公司,批号:PSO11825);乙腈(色谱醇,美国天地有限公司);磷酸(色谱醇,天津科密欧试剂有限公司); α -淀粉酶(合肥博美生物科技有限责任公司);阿卡波糖片(湖南千金湘江药业股份有限公司,50 mg/片);可溶性淀粉、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、3,5-二硝基水杨酸(天津市科密欧化学试剂公司,均为国产分析纯);水为怡宝纯净水。

1.2 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪,包括 LC-20AT 型二元泵、SPD-20A 型紫外检测器、LabSolutions 系列工作站,日本岛津公司产品;2450 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司产品;XPE105 电子分析天平,1/100000, METTLER TOLEDO 公司产品;DK-600 型电热恒温水浴箱,上海精宏实验设备有限公司产品;HX-06 型超声波清洗器,武汉恒信世纪科技有限公司产品;高速中

药粉碎机(型号:ZN-200A)。

2 方法与结果

2.1 单因素实验

2.1.1 提取方法考察 称取老鹤草 2 g, 2 份, 分别加 10 倍量水, 采用加热回流提取和超声提取, 时间 1 h, 滤过, 滤液定容至 25 ml, 测定提取液中柯里拉京提取量。

2.1.2 提取溶剂考察 称取老鹤草 2 g, 3 份, 分别加 10 倍量水、50%乙醇、乙醇, 加热回流提取 1 h, 滤过, 滤液定容至 25 ml, 测定提取液中柯里拉京提取量。

2.1.3 提取次数考察 称取老鹤草 2 g, 加 10 倍量水加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液分别定容至 25 ml, 测定每次提取液中柯里拉京提取量。

2.1.4 柯里拉京含量测定 1) 对照品溶液的制备。取柯里拉京对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成每 1 ml 含 175 μ g 的对照品溶液。2) 色谱条件。色谱柱: 依利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈(A)-0.2%的磷酸溶液(B)为流动相, 流动相洗脱梯度见表 1; 检测波长 270 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 10 μ l。在上述色谱条件下, 理论板数以柯里拉京峰计, 均不得少于 2000(见图 1)。

表 1 流动相梯度洗脱表

t/min	A/%	B/%
0~3	0	100
3~5	0 \rightarrow 3	100 \rightarrow 97
5~12	3 \rightarrow 10	97 \rightarrow 90
12~20	10	90
20~25	10 \rightarrow 14	90 \rightarrow 86
25~35	14 \rightarrow 17	86 \rightarrow 83
35~40	17 \rightarrow 21	83 \rightarrow 79

2.1.5 实验结果 结果表明, 回流提取柯里拉京提取量明显高于超声提取, 因此采用加热回流提取(见表 2)。采用水作溶剂, 柯里拉京提取量最高(见表 3)。当提取第 3 次时, 柯里拉京提取量和提取 2 次基本保持不变, 所以最佳提取次数为 2 次(见表 4)。

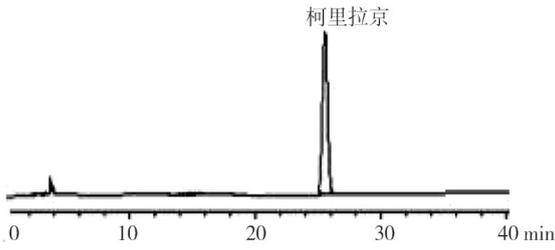


图 1-1 混合对照品溶液

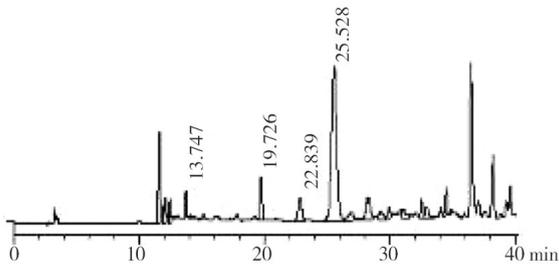


图 1-2 老鹤草供试品溶液

图 1 HPLC 色谱图

表 2 提取方法考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=2$)

提取方法	回流提取法	超声提取法
柯里拉京提取量/mg	20.49±0.14	17.28±0.11

表 3 提取溶剂考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=2$)

提取溶剂	水	50%乙醇	乙醇
柯里拉京提取量/mg	20.04±0.16	16.29±0.10	14.67±0.13

表 4 提取次数考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=2$)

提取次数	1	2	3
柯里拉京提取量/mg	21.04±0.17	25.51±0.15	25.87±0.12

2.2 正交试验设计 在单因素试验基础上,以柯里拉京提取量为指标,选取加水倍数、浸泡时间、提取时间为考察因素,采用正交试验优化老鹤草中柯里拉京的提取工艺条件。因素水平见表 5,柯里拉京含量的测定参照“2.1.2”项。由表 6~7 可知,影响老鹤草柯里拉京提取量的因素从大到小依次为:加水倍数>提取时间>浸泡时间,最优工艺条件为:A2B2C3,因为浸泡时间 $P>0.05$,故未浸泡,即老鹤草加水回流提取 2 次,用量 8,6 倍,提取 1.5,1.5 h。

表 5 因素与水平

水平	加水倍数/倍(A)	浸泡时间/h(B)	提取时间/h(C)
1	10,8	0	0.5,0.5
2	8,6	0.5	1.0,1.0
3	6,4	1.0	1.5,1.5

表 6 正交实验结果

试验号	因素				柯里拉京提取量/mg
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	22.12
2	1	2	2	2	22.85
3	1	3	3	3	22.70
4	2	1	2	3	24.12
5	2	2	3	1	25.70
6	2	3	1	2	23.60
7	3	1	3	2	24.11
8	3	2	1	3	22.95
9	3	3	2	1	22.68
K ₁	67.67	70.35	68.67	70.50	
K ₂	73.42	71.50	69.65	70.56	
K ₃	69.74	68.98	72.51	69.77	
R	5.75	2.52	3.84	0.79	
SSi	5.65	1.06	2.65	0.13	

表 7 柯里拉京提取量方差分析表

变异来源	SSi	r	MS	F	P
A	5.65	2	2.83	43.85	<0.05
B	1.06	2	0.53	8.23	>0.05
C	2.65	2	1.33	20.58	<0.05
误差	0.13	2	0.06		

注:F_{0.05}(2,2)=19.00;F_{0.01}(2,2)=99.00

2.3 最佳工艺验证实验 分别称取 2 g 老鹤草粉,3 份,按优选的工艺条件提取柯里拉京,参照“2.1.2”项下方法测定柯里拉京量,结果表明:优选的提取工艺具有良好的重复性。(见表 8)

表 8 工艺验证的考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=2$)

验证实验	1	2	3
柯里拉京提取量/mg	24.18±0.17	25.03±0.15	24.42±0.14

2.4 老鹤草提取液对 α -淀粉酶抑制活性的测定

2.4.1 试剂配制 α -淀粉酶试液:取 α -淀粉酶 50 mg,以 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH6.8) 溶解定容至 25 ml,过滤。现用现配。1%可溶性淀粉溶液:取可溶性淀粉 0.5 g,置 100 ml 烧杯中。取上述取磷酸盐缓冲液 50 ml,先用少量缓冲液润湿可溶性淀粉,余下缓冲液煮沸后加入可溶性淀粉中,将可溶性淀粉液置沸水浴中搅拌 10 min,使之充分糊化溶解。取出,冷却至室温后转移至 50 ml 容量瓶中。用水适量洗涤烧杯,将洗涤液并入量瓶中,并定容至刻度,摇匀,过滤,即得。使用前配制。3,5-二硝基水杨酸试液:取 3,5-二硝基水

杨酸 6.5 g,加 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 325 ml,丙三醇 45 ml,再加水至 1000 ml,充分溶解,室温存放备用。试验液:老鹳草水提取液(每 1 ml 含老鹳草 2 g)作为测试液。阿卡波糖对照品溶液:取阿卡波糖对照品适量,用纯水配制成 0.80 mg/ml 的溶液。

2.4.2 对 α -淀粉酶抑制率测试 在 20 ml 具塞试管中,按照下表依次加入缓冲液,试验液,可溶性淀粉液,淀粉酶试液,摇匀。置于 37℃ 恒温水浴中精确反应 30 min(见表 9)。反应完成后加入 3,5-二硝基水杨酸试液 3 ml,混匀,沸水浴加热 5 min。取出用流动水冷却至室温,各加水 5 ml,混匀,在波长 520 nm 处测定吸光值,分别记为 A1、A2、A3。

酶抑制率按下式计算:抑制率(%) =
$$\frac{(A1_{\text{平行}} - A1_{\text{空白}}) - (A2_{\text{平行}} - A2_{\text{空白}})}{(A1_{\text{平行}} - A1_{\text{空白}}) - (A3_{\text{平行}} - A3_{\text{空白}})} \times 100\%$$

表 9 不同试验组的设计及结果

	缓冲液	试验液/ml	可溶性淀粉溶液/ml	α -淀粉酶试液/ml	吸收值 A	抑制率/%	备注
	A1 空白	0.8	0	0	0.318		不加抑制剂时,淀粉本身+淀粉新生成
	A1 平行	0.4	0	0.4	0.723		
样品 A	A2 空白	0.6	0.2	0	0.227	45.05	加抑制剂后:淀粉本身+淀粉新生成
	A2 平行	0.2	0.2	0.4	0.550		
样品 B	A2 空白	0.6	0.2	0	0.221	46.70	
	A2 平行	0.2	0.2	0.4	0.541		
样品 C	A2 空白	0.6	0.2	0	0.223	43.96	
	A2 平行	0.2	0.2	0.4	0.548		
阳性对照	A2 空白	0.6	0.2	0	0.219	48.90	阳性对照药物为阿卡波糖
	A2 平行	0.2	0.2	0.4	0.535		
	A3 空白	1.0	0	0	0.091		淀粉本身所含还原糖
	A3 平行	0.6	0	0.4	0.314		

2.4.3 最优提取条件下不同浓度老鹳草水提液对 α -淀粉酶的抑制结果 根据正交设计所选定最优提取工艺制备老鹳草水提液,分别加入一定量的纯化水,配制成浓度 400、200、100、50 mg/ml 的溶液进行抑制率测试,结果表明老鹳草水提液对 α -淀粉酶的抑制作用随水提液浓度增大而升高,当浓度达到 400 mg/ml 时,抑制率约为 45%,相当于 160 μ g/ml 阿卡波糖溶液的抑制率。(见图 2)

3 讨论

中药材提取过程中有效成分的溶出常受提取方法、提取溶剂、提取次数、提取时间、固液比等因素的影响,因此本研究首先在预实验的基础上,以柯里拉京提取量为指标,采用正交设计法选定老鹳

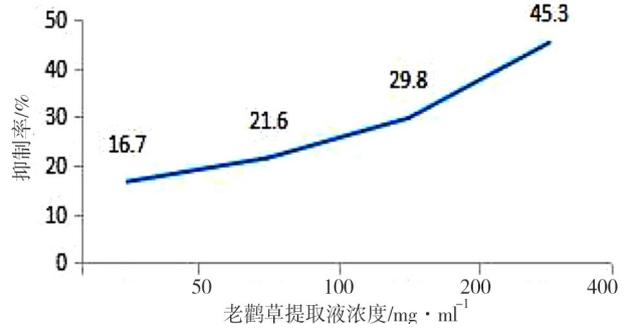


图 2 不同浓度老鹳草水提取液对 α -淀粉酶的抑制作用

草水提液的最佳提取工艺,然后研究最佳提取工艺制备的老鹳草提取液对 α -淀粉酶的抑制作用。结果表明,老鹳草提取液中可能含有 α -淀粉酶抑制剂,能够抑制 α -淀粉酶对淀粉的分解,并且抑制作用和提取液的浓度密切相关,等量的提取液浓度越高, α -淀粉酶抑制剂含量越高,则抑制作用越强。由于提取物含有色素,因此每个样品均以磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH6.8)配成溶液测定背景吸收,并对最终测定结果进行校正,同时每批样品、随行空白和阳性对照均在同一条件下反应。

老鹳草作为我国传统药物常出现在中医降血糖和减肥的组方中,但其降糖减肥机制并不十分明确。本实验为进一步研究老鹳草降糖减肥机制及其产品的开发利用提供了一定的科学依据。综上所述,本研究结果可为老鹳草提取工艺及生物活性的研究提供参考,同时也有助于资源的合理开发与利用。

参考文献

- [1] 高小平,张蔚瑜,邹文俊,等. 中药提取物中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(6):536.
- [2] 刘伟,李明玺,王俊龙,等. 余甘子酚类成分及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 现代食品科技,2017,33(12):45-50.
- [3] 瞿运秋,赵文佳,陈继光,等. 余甘子主要活性成分柯里拉京对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):206-209.
- [4] 陈一燕,陈崇宏. 柯里拉京药理活性研究进展[J]. 中国现代应用药学,2010,27(5):390-394.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典·一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:126.
- [6] 宋华. 老鹳草的药理作用研究进展[J]. 中草药,1997,28(A10):132-133.
- [7] 何文涛,金哲雄,王宝庆. 老鹳草的研究进展[J]. 航空航天医学杂志,2011,22(10):1200-1202.

(收稿日期:2023-02-27)

[编辑:韩晗]