

仙鹤草降糖活性成分提取工艺优化

陈优生^{1,2}, 张焜^{1*}, 赵肃清¹

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006;
2. 广东食品药品职业学院制药系, 广州 510520)

[摘要] 目的: 仙鹤草降糖活性成分提取工艺的优选。方法: 以提取物降糖活性为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计实验, 考察了乙醇浓度、提取时间、料液比、提取温度对提取率的影响, 优选出合理的提取工艺。结果: 优选出仙鹤草降糖活性成分的最佳提取工艺条件是: 回流提取 3 次, 1 h/次, 60% 乙醇溶液, 料液比 1:10, 提取温度为 80 ℃。结论: 优化后的工艺提取率高。

[关键词] 仙鹤草; 降糖活性成分; 回流

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0025-03

Optimality of Extraction Condition of Lowering Blood Sugar Substance from Agrimony

CEHN You-sheng^{1,2}, ZHANG Kun^{1*}, ZHAO Su-qing¹

(1. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Pharmacy, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction condition of lowering blood sugar substance from agrimony. **Method:** With effects of lowering blood sugar as criteria, concentration of alcohol, extraction time, and the ratio of gardenia to liquor and extraction temperature are evaluated by $L_9(3^4)$ orthogonal design method. **Result:** The optimum extraction condition was described as follow: hot reflux extraction 3 times (once 1 hour), 60% ethanol solution, and 10-fold solvent. **Conclusion:** The high extraction rate is got at the optimum technology.

[Key words] agrimony; lowering blood sugar substance; reflux

仙鹤草多在广东省内主要分布于北部、中部和东部。全草入药, 中医临床主要用于止血、降糖、抗肿瘤、泌尿、呼吸、消化道等疾病及妇科病的治疗^[1]。研究表明仙鹤草降血糖疗效确切, 机制清楚^[2]; 仙鹤草含多种活性成分而具备多种药理作用, 但用于治疗糖尿病时还存在失明、呼吸困难、皮疹、头昏、面

红、恶心呕吐、过敏性休克等不良反应, 过量服用仙鹤草还可致肾功能衰竭, 以致于限制了其临床应用^[3-4]。课题组拟在筛选仙鹤草降糖活性成分最佳提取方法和溶剂后进一步对该方法的工艺进行优选^[5], 以确保对仙鹤草的降糖活性成分最大提取率, 为确定仙鹤草活性部位(通过萃取把仙鹤草提取物按极性分为石油醚、乙酸乙酯、水 3 部分)、分离纯化仙鹤草降糖活性部位化学成分并确定降糖活性化学成分的结构及其降糖机制, 进而减少或避免仙鹤草临床用于糖尿病治疗时需全草入药时引起的不良反应及为新药研发奠定基础。

1 材料

仙鹤草(自备, 经广东中医研究所曾庆钱副教授鉴定, 系蔷薇科龙芽草属植物仙鹤草 (*Agrimonia pi-*

[收稿日期] 2010-04-06

[基金项目] 广东省中医药局项目(2009274)

[第一作者] 陈优生, 博士研究生/讲师, 新药开发的研究, Tel: 020-28854939, E-mail: yous11@163.com

[通讯作者] * 张焜, 博士生导师/教授, 研究方向, 新药开发, Tel: 020-28854939, E-mail: chenys@gdyzy.edu.cn

losa.), 批号 20081025); 昆明种小鼠(南方医科大学基础医学院实验教学中心提供); 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂); XS105 型 DualRange 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 仙鹤草提取物对正常小鼠的降糖活性测量^[6]

取小白鼠 20 只, 随机分成纯化水对照组、仙鹤草提取物剂量组(0.5 g·kg⁻¹) 2 组, 每组 10 只。每天分别灌胃纯化水、服用仙鹤草降糖活性成分剂量各 1 次, 给药体积均为 0.02 mL·g⁻¹, 连续 7 d。分别于首次给药, 末次给药后禁食 2 h, 眼眶取血, 每次取血 0.2 mL, 邻甲苯胺法^[5]测定血糖。结果见表 1。结果表明, 一次灌胃给药, 无显著改变; 连续给药 7 d, 则可显著降低正常小白鼠血糖, 与纯化水对照组比较, 血糖降低显著, 血糖降低值越大, 则说明降糖活性成分提取率越大。

表 1 仙鹤草提取物降糖效果观察 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血糖		血糖降低值
	mmol·L ⁻¹		
	第 1 天	第 7 天	
纯化水对照	$X_1(6.05 \pm 0.64)$	$X_2(5.98 \pm 0.78)$	$X_1 - X_2(0.07)$
仙鹤草提取物服用	Y_1	Y_2	0.87~1.52

2.2 仙鹤草降糖活性成分工艺优选

2.2.1 仙鹤草降糖活性成分提取 在 60 ℃ 条件下, 仙鹤草干燥(3 h)后粉碎, 过 60 目筛。称取粗粉 100 g 于 1 000 mL 的圆底烧瓶中, 按正交试验安排, 加入相应浓度和体积的乙醇溶液。先在常温下浸置 24 h, 再水浴回流浸提 3 次, 合并提取液, 回收溶剂, 得仙鹤草降糖活性成分提取物, 按 2.1 项测量其血糖降低值。

2.2.2 正交试验 采用正交实验设计对提取工艺进行筛选和优化, 考察乙醇体积分数、提取温度、提取时间以及料液比(仙鹤草粗粉质量与加入乙醇体积之比)4 个因素对工艺的影响, 以仙鹤草提取物降血糖量为指标, 建立 L₉(3⁴) 正交试验表, 见表 2。表 3 中实验号 1~9 仙鹤草提取物降糖活性测量, 取小白鼠 100 只, 分 10 组, 每组 10 只, 一组为对照, 其他九组分别服用实验号 1~9 所得仙鹤草提取物, 按 2.1 项所述进行测量, 对照组的降糖结果见表 1, 实验号 1~9 仙鹤草提取物降糖结果见表 3。

由表 3 可见, 以服用仙鹤草降糖活性成分提取

物后降糖量为考察指标, 影响因素由大到小依次为 A > B > C > D。最佳工艺条件为 A₃B₃C₁D₂, 即乙醇浓度为 60%, 浸提温度为 80 ℃, 浸提时间 1 h, 料液比 1:10。经实验验证, 在此最佳工艺条件下, 仙鹤草降糖活性成分提取物按 2.1 项测量其降糖值为 1.53 mmol·L⁻¹。

表 2 正交试验表

水平	A	B	C	D
	乙醇浓度/%	提取温度/℃	提取时间/h	料液比/g:mL
1	30	60	1	1:8
2	45	70	2	1:10
3	60	80	3	1:12

表 3 正交试验结果

No.					血糖降低值
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.26
2	1	2	2	2	1.38
3	1	3	3	3	1.33
4	2	1	2	3	0.97
5	2	2	3	1	0.87
6	2	3	1	2	1.23
7	3	1	3	2	1.3
8	3	2	1	3	1.48
9	3	3	2	1	1.52
K ₁	1.32	1.18	1.32	1.22	
K ₂	1.02	1.24	1.29	1.30	
K ₃	1.43	1.36	1.17	1.26	
R	0.41	0.18	0.16	0.09	

2.3 仙鹤草提取物对四氧嘧啶糖尿病小白鼠血糖的影响

优化工艺条件下仙鹤草提取物对四氧嘧啶糖尿病小白鼠血糖的影响: 取小白鼠 35 只分正常对照组 10 只和造模组 25 只, 禁食不禁水 24 h, 造模组腹腔注射四氧嘧啶水溶液 200 mg/kg, 正常对照组腹腔注射等体积生理盐水, 正常喂食, 给水 5 d 后, 禁食(不禁水) 2 h, 眼眶取血约 0.2 mL, 按邻甲苯胺法^[5]测定血糖。血糖值 > 10.0 mmol/L 的小白鼠可视为造模成功。取造模成功的四氧嘧啶糖尿小白鼠 20 只, 随机分成 2 组, 每组 10 只, 分为模型组、仙鹤草提取物服用组。正常对照组和模型组灌胃蒸馏水, 仙鹤草提取物组给予仙鹤草提取物 0.5 g·kg⁻¹, 每天 1 次, 给药剂量均为 0.02 mL·g⁻¹, 连续 7 d, 正常喂食、给水。末次给药后禁食(不禁水) 2 h, 眼眶取血约

0.2 mL,按邻甲苯胺法^[5]测定血糖。血糖降低见表 4,由表中数值可以看出,仙鹤草优选工艺提取物对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的影响显著($P < 0.05$),有较强的降糖活性。

表 4 仙鹤草对四氧嘧啶糖尿病小白鼠
血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	血糖值		血糖降低值
	第 1 天	第 7 天	
正常对照	$X_1 (5.68 \pm 0.52)$	$X_2 (5.72 \pm 0.69)$	0.04
模型	19.42 ± 0.36	20.36 ± 0.78	0.94
仙鹤草提取物服用	20.72 ± 0.47	12.53 ± 0.82	$8.19^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

单因素考察提取溶液乙醇浓度和提取温度发现:当乙醇浓度超过 60%,仙鹤草中降糖活性成分提取率没有明显提高;当提取温度超过 80 °C 时,仙鹤草中降糖活性成分的提取率也下降,可能是一些含甙键的降糖活性成分在温度较高时发生反应而失去或降低了降糖活性。又当提取溶液乙醇浓度较高,或提取温度较高时会导致杂质含量明显提高,不利于后续仙鹤草降糖活性成分的分离纯化,所以在正交实验设计中乙醇浓度上限选择了 60%,提取温

度选择 80 °C。仙鹤草降糖活性部位提取工艺优化地报道在国内属于首次报道,该工艺简单可行。

在此基础上确定了仙鹤草的降糖活性部位^[7]并分离纯化了仙鹤草降糖活性成分^[8]。

[参考文献]

- [1] 洪阁,戴永红,刘培勋,等. 仙鹤草化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学服务与研究,2008,8(5):362.
- [2] 范尚坦,李金兰,姚振华. 仙鹤草降血糖的实验研究[J]. 医药导报,2004,23(10):710.
- [3] 赖中福,卢壬丹. 过量服用木通、仙鹤草致肾功能衰竭各 1 例[J]. 中国药业,2003,12(7):59.
- [4] 范尚坦,李金兰,左晖. 仙鹤草的不良反应[J]. 福建中医药,2002,33(1):47.
- [5] 陈优生. 仙鹤草降糖活性成分提取方法筛选[J]. 海峡药学,2010,22(1):82.
- [6] 上海市医学检验所. 临床生化检验[M]. 上海,上海科技出版社,1979:14.
- [7] 陈优生,张焜. 仙鹤草降糖活性部位筛选研究[J]. 安徽医药,2010,14(7):57.
- [8] 王希,陈优生. 仙鹤草降糖活性成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):98.

[责任编辑 仝燕]