

# 多指标综合评分正交试验法优选虎杖中抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶成分的提取工艺<sup>△</sup>

曹 扬<sup>1\*</sup>, 焦连庆<sup>1,2</sup>, 杨 航<sup>1</sup>, 于 敏<sup>2</sup>, 田义新<sup>1#</sup>(1.吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2.吉林省中医药科学院植物化学研究所, 长春 130012)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1815-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.27

**摘 要** 目的: 优选虎杖中3种成分(虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚)的最优提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、提取次数、提取时间、溶剂用量为考察因素, 以虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力为指标进行正交试验, 确定虎杖中抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶成分的最优提取工艺并进行验证试验。结果: 最优提取工艺为8倍量70%乙醇提取2次, 每次2 h; 验证试验结果显示, 50 g药材中虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量平均值分别为137.47、42.5、9.68 mg,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力为8.22 ml/ $\mu$ g(RSD均小于3%); 3种活性成分的含量较高时,  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力也较强。结论: 优选的提取工艺稳定可靠, 虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚可能为虎杖中抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力的主要成分。

**关键词** 虎杖; 正交试验; 提取工艺; 综合评分; 虎杖苷; 大黄素; 大黄素甲醚;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力

## Optimal Extraction Process of $\alpha$ -glucosidase Inhibitors from *Polygonum cuspidatum* by Multi-index Integrating Score Orthogonal Test Method

CAO Yang<sup>1</sup>, JIAO Lian-qing<sup>1,2</sup>, YANG Hang<sup>1</sup>, YU Min<sup>2</sup>, TIAN Yi-xin<sup>1</sup>(1.College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2.Institute of Phytochemistry, Jilin Academy of Chinese Traditional Medicine, Changchun 130012, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the optimal extraction process of polydatin, emodin and physcione from *Polygonum cuspidatum*. METHODS: With the investigative factors of ethanol volume fraction, extraction times, extraction time, solvent dosages and the indexes of the contents of polydatin, emodin and physcione and the inhibition activity of  $\alpha$ -glucosidase, orthogonal test was used to determine the optimal extraction process of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *P. cuspidatum*. Verification test was conducted. RESULTS: The optimal extraction process was as follow as extracting 2 times with total 8 times of 70% ethanol, 2 h for each time. The verification tests showed that the average value of the contents of polydatin, emodin and physcione from 50 g medicinal materials were respectively 137.47, 42.5, 9.68 mg and the inhibition activity of  $\alpha$ -glucosidase was 8.22 ml/ $\mu$ g (RSD were less than 3%). When the content of 3 compositions was higher, the inhibition activity of  $\alpha$ -glucosidase was stronger. CONCLUSIONS: The optimized extraction process is stable and reliable. Polydatin, emodin and physcione may be the main compositions of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *P. cuspidatum*.

**KEYWORDS** *Polygonum cuspidatum*; Orthogonal test; Extraction process; Integrating score; Polydatin; Emodin; Physcione; Inhibition activity of  $\alpha$ -glucosidase

虎杖为蓼科植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的干燥根茎和根<sup>[1]</sup>, 主要含有蒽醌、二苯乙烯、黄酮等成分。目前虎杖提取工艺的研究大多以大黄素、白藜芦醇等单一化学成分<sup>[2-3]</sup>或总蒽醌、总黄酮等某一类成分<sup>[6-7]</sup>为指标进行评价<sup>[8]</sup>, 且均是只以化学成分为指标进行评价, 未见有以 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力为指标对其醇提取工艺进行评价的研究报道。虎杖提取物有显著的降糖功效<sup>[9]</sup>, 且已证明该提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶有抑制作用<sup>[10]</sup>。故本试验以可能具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚在药材中的含量及这3种成分对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制活力为指标进行综合评价, 确定虎杖

中具有 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的成分的最优提取工艺, 为研究虎杖中具有抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的药效物质奠定基础。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪, 包括LC-20AT型溶液传输单元、SPD-M20A型二极管阵列检测器、SIL-10AF型自动进样器、LC-Solution色谱工作站(日本岛津公司); MR-96A型酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); BT25S型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

#### 1.2 药材、对照品与试剂

虎杖于2014年3月14日购自吉林大药房, 产地为江苏, 经吉林省中医药科学院徐国经教授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根; 虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为: 111575-200502、110756-200110、110758-200611, 纯度: 均

△基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No.20130727026YY)

\* 硕士研究生。研究方向: 生药学。E-mail: caoyang2012112@163.com

# 通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药材栽培。E-mail: y.x.tian2003@163.com

大于98%); $\alpha$ -葡萄糖苷酶(批号:EC3.2.1.20,酶活力:81 U/mg)、4-硝基苯酚- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)均购自美国Sigma公司;其余试剂均为色谱纯或分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚含量测定<sup>[11]</sup>

2.1.1 色谱条件与专属性试验 色谱柱为Luna-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~40 min, 15% A→50% A; 40~65 min, 50% A→90% A),流速为1.0 ml/min;柱温为30  $^{\circ}$ C;检测波长为290 nm;进样量为10  $\mu$ l。

取样品(正交试验6号样品提取所得)及“2.1.3”项下混合对照品溶液进样分析,结果各峰之间分离度均大于2.0,以3个主峰计理论板数均大于4 000。色谱详见图1。

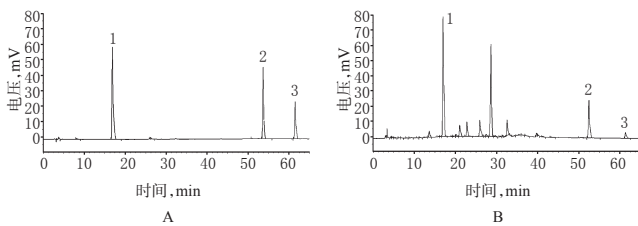


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.样品;1.虎杖苷;2.大黄素;3.大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference; B. sample; 1. polydatin; 2. emodin; 3. physcione

2.1.2 供试品溶液的制备 将虎杖药材粉碎成粗粉(过20目筛),称取9份,每份50 g,精密称定,按照4因素3水平正交试验表中的设计方案进行回流提取,提取液分别进行减压干燥。分别取干燥物约50 mg,精密称定,置于25 ml棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,备用。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚对照品3.98、2.49、1.50 mg,分别置于25、25、100 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为各自的对照品溶液;各精密量取1 ml,置于同一25 ml棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,制成质量浓度分别为6.37、3.98、0.60  $\mu$ g/ml的混合对照品溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚3种混合对照品溶液1、5、10、15、20、25  $\mu$ l,进样测定。以对照品质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,得虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚的回归方程分别为 $y=2\ 596.3x+135.71$  ( $r=1.000\ 0$ )、 $y=3\ 131.1x+1\ 714.7$  ( $r=0.999\ 7$ )、 $y=1\ 718.0x-5.146\ 8$  ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚检测质量浓度线性范围分别为6.37~159.25、3.92~99.5、0.60~15.00  $\mu$ g/ml。

2.1.5 精密度试验 吸取混合对照品溶液,连续进样6次。结果虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.08%、1.83%、1.97% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液,避光条件下分别于0、2、4、8、12、24 h测定,结果虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.03%、1.26%、1.96% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在避光条件下24 h内均稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取“2.1.2”项下的同一批样品6份

(正交试验6号)制备成供试品溶液,分别测定虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚含量,计算得其含量的RSD值分别为1.89%、2.17%、1.93% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(正交试验6号)6份,各约25.0 mg,置于25 ml量瓶中,分别精密加入虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚混合对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。计算得虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚平均回收率分别为100.03%、99.97%、98.8%,RSD分别为1.52%、1.36%、1.85% ( $n=6$ ),表明该方法准确度好。

### 2.2 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力测定<sup>[12]</sup>

2.2.1 样品的制备 取正交试验中9组提取物各12.5 mg,精密称定,用磷酸钾缓冲液(pH 6.8)分别溶解并定容至100 ml;分别精密量取0.5、1.0、2.0、4.0 ml置于10 ml量瓶中,用磷酸钾缓冲液溶解并定容至刻度,得质量浓度分别为6.25、12.5、25.0、50.0  $\mu$ g/ml的样品溶液。

2.2.2  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力测定 采用PNPG法测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活力。取磷酸钾缓冲液100  $\mu$ l、3 mmol/L谷胱甘肽20  $\mu$ l、虎杖提取物供试品溶液10  $\mu$ l,混匀,再加入0.3 U/ml  $\alpha$ -葡萄糖苷酶20  $\mu$ l,混合,37  $^{\circ}$ C保温10 min,再加入25 mmol/L PNPG 20  $\mu$ l启动反应,37  $^{\circ}$ C保温20 min,再加0.2 mol/L碳酸钠溶液终止反应。于405 nm波长处测定在酶作用下释放出的对硝基酚(PNP)的吸光度(A)。用水代替酶液和供试品溶液作空白,其他步骤及试剂同上。其中酶活力单位定义为:在30  $^{\circ}$ C、pH 6.8的条件下,每分钟酶液水解PNPG释放1  $\mu$ mol PNP所需的酶量。计算各样品系列质量浓度下的活力抑制率,绘制质量浓度-抑制率曲线,由此算出半数抑制浓度IC<sub>50</sub>值<sup>[13]</sup>。酶活力抑制率=( $A_{\text{空白}}+A_{\text{背景}}-A_{\text{供试品}}$ )/ $A_{\text{空白}}\times 100\%$ ,其中, $A_{\text{背景}}$ 指只加入供试品、不加入酶液的吸光度。IC<sub>50</sub>值越小表示抑制活力越强,因此用1/IC<sub>50</sub>表示酶抑制活力(ml/ $\mu$ g)。

### 2.3 正交试验设计及结果

预试验结果显示,乙醇体积分数、提取次数、提取时间及溶剂用量(药材量的倍数)为主要影响因素,故选用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验方案,以药材中虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量(提取物的质量与提取物中各成分的百分含量之积)及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力为指标进行考察,因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(乙醇体积分数,%)	B(提取次数)	C(提取时间,h)	D(溶剂用量,倍)
1	50	1	1	6
2	70	2	1.5	8
3	90	3	2	10

将3种化学成分的含量及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力这4个指标进行综合评分,由于主要目的是优选 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制成分的最优工艺,因此将权重系数分配为虎杖苷含量( $X_1$ )0.2、大黄素含量( $X_2$ )0.2、大黄素甲醚含量( $X_3$ )0.2、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力( $X_4$ )0.4。综合评分值( $Y$ )= $X_1/X_{1\text{max}}\times 0.2+X_2/X_{2\text{max}}\times 0.2+X_3/X_{3\text{max}}\times 0.2+X_4/X_{4\text{max}}\times 0.4$ 。以Y为总指标对试验结果进行分析。正交试验设计及结果见表2,方差分析见表3。

表2 正交试验设计及结果(n=2)

Tab 2 Design and results of orthogonal test(n=2)

试验号	A	B	C	D	指标				综合评分
					虎杖苷含量,mg	大黄素含量,mg	大黄素甲醚含量,mg	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力,ml/ $\mu$ g	
1	1	1	1	1	54.6	15.31	3.01	6.76	19.588
2	1	2	2	2	122.5	32.41	8.03	9.13	41.720
3	1	3	3	3	100.5	23.52	7.48	10.54	36.916
4	2	1	2	3	103.8	60.31	18.75	7.29	43.428
5	2	2	1	1	138.6	98.58	14.93	12.35	60.302
6	2	3	3	2	165.5	42.5	9.02	6.95	51.184
7	3	1	3	2	89.1	76.47	22.91	4.16	42.520
8	3	2	1	3	127.6	53.29	12.8	2.62	43.606
9	3	3	2	1	149.4	48.91	11.86	7.72	50.062
$K_1$	98.224	105.536	114.378	129.952					
$K_2$	154.914	145.628	135.210	135.424					
$K_3$	136.188	138.162	139.738	123.950					
R	56.69	40.092	25.36	11.474					

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	556.188 0	2	278.094 0	25.33	<0.05
B	303.062 8	2	151.531 4	13.80	
C	121.957 6	2	60.978 8	5.55	
D	21.957 2	2	10.978 6	1	

注: $F_{0.05}(2, 2)=19$ Note: $F_{0.05}(2, 2)=19$ 

由极差分析结果可知,各因素影响程度为A>B>C>D;由方差分析结果表明因素A有显著性差异。最优工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即用8倍量(ml/g)70%乙醇回流提取2次,每次2h。

#### 2.4 验证试验

称取3份虎杖药材粗粉,各50g,按A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>进行提取工艺试验,提取液分别减压干燥,得浸膏,测定虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量及 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力,结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of verification test

试验编号及均值	虎杖苷含量,mg	大黄素含量,mg	大黄素甲醚含量,mg	$\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力,ml/ $\mu$ g
1	137.4	41.9	9.49	8.24
2	139.2	43.0	9.89	8.31
3	135.8	42.6	9.65	8.12
平均值	137.47	42.5	9.68	8.22
RSD, %	1.24	1.31	2.08	1.17

由表4可知,根据最优工艺进行提取,3种化学成分含量平均值和 $\alpha$ -糖苷酶抑制活力均与正交试验中较高数据相近,且RSD值均小于3.0%,表明该提取工艺稳定可靠且效果最优。

### 3 讨论

(1)正交试验方差分析结果表明,因素A即乙醇体积分数对提取效果具有显著性影响,其他因素无显著性影响,故本试验中乙醇体积分数是最重要的影响因素。

(2)本试验未采用《中国药典》中3种成分的含量测定方法

分别进行测定,而是采用文献[11]中的新方法,用一种流动相即可同时测定出3种成分的含量,使试验操作更加方便快捷。

(3)从正交试验中9组提取物中3种化学成分的含量与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力的结果及验证试验结果可知,虎杖中的虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚这3种化学成分含量较高时, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力也较强,说明这3种成分可能是抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力的主要成分。

(4)以往文献报道了虎杖提取物具有抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的作用,但并未明确具体活性物及活性物成分含量与活力的关系。本试验同时采用化学成分的含量与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力相结合的方法优选药材中有效成分的提取工艺,并采用文献报道的经典方法即PNPG法测定 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活力,为研究虎杖中具有抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的药效物质提供了一种较全面且合理的方法。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:194-195.
- [2] 王健,李向阳,李振国.正交试验法优选虎杖的提取工艺[J].中医研究,2010,23(8):17.
- [3] 张春复,申野,段大航.虎杖中游离蒽醌类化合物提取工艺条件优化研究[J].中国现代药物应用,2010,4(13):144.
- [4] 刘超,杨青青.超声波-酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺研究[J].北方园艺,2014(7):127.
- [5] 张强华,熊清平,石莹莹.虎杖中白藜芦醇提取纯化工艺研究[J].中国药房,2009,20(12):909.
- [6] 王金辉,郭涛,赵庆春.正交试验法优选虎杖提取工艺的研究[J].中草药,2007,38(3):392.
- [7] 胡春霖,郑可利,罗利琴,等.超声波法虎杖中总黄酮提取工艺研究[J].宝鸡文理学院学报:自然科学版,2013,33(4):31-39.
- [8] 聂媛,李梦青,张洁,等.虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷、大黄素等有效成分的提取[J].河北工业大学学报,2008,37(2):60.
- [9] 周劲.虎杖对2型糖尿病治疗作用的临床观察及实验研究[D].武汉:湖北中医药大学,2011:3-22.
- [10] 杨冬,刘舒,宋凤瑞,等.虎杖和大黄中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的超滤质谱研究[J].分析化学,2014,42(4):552.
- [11] 张清峰,付莹娟,陈继光,等.高效液相色谱法同时测定虎杖中5种活性成分[J].现代食品科技,2014,3(3):216.
- [12] 郑晓媛,杜俊蓉,杨芳,等.虎杖提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].中草药,2007,38(5):735.
- [13] 杨秀芳,吴明鑫.虎杖中 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂的初步研究[J].陕西科技大学学报:自然科学版,2006,24(5):48.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-01-09)

(编辑:刘萍)