

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.23.011

虎杖中蒽醌类和二苯乙烯类成分闪式提取工艺优化

朱 芹¹, 黄湘杰^{2△}

(1. 湖南省湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411000; 2. 湖南省湘乡市人民医院药剂科, 湖南 湘潭 411400)

摘要:目的 优选虎杖中大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷 4 种指标性成分的闪式提取工艺。方法 采用 Plackett-Burman 试验筛选影响虎杖中大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷 4 种指标性成分含量的主要因素;以乙醇体积分数、液料比、提取时间为考察因素,以 4 种指标性成分提取率归一值(OD)为评价指标,进行二元多次回归拟合;采用 Box-Behnken Design 响应面法预测最佳提取工艺。结果 优选的最佳闪式提取工艺,乙醇体积分数为 68%,液料比为 35 mL/g,提取 10 min;验证试验结果表明,大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷提取率分别为 6.867, 5.127, 9.736, 13.850 mg/g,与模型预测值 6.902, 5.158, 9.799, 13.890 mg/g 相近。结论 优选的提取工艺参数可用于虎杖中蒽醌类和二苯乙烯类成分的闪式提取,方法简便,结果准确。

关键词:虎杖;闪式提取法;Plackett-Burman 试验;Box-Behnken Design 响应面法;蒽醌类;二苯乙烯类;工艺优选

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)23-0036-05

Optimization of Flash Extraction Process of Anthraquinones and Stilbenes from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*

ZHU Qin¹, HUANG Xiangjie²

(1. Xiangtan Food and Drug Inspection Institute, Xiangtan, Hunan, China 411000; 2. Department of Pharmacy, Xiangxiang People's Hospital, Xiangtan, Hunan, China 411400)

Abstract: Objective To optimize the flash extraction process of emodin, physcion, resveratrol, and polydatin from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*. Methods Plackett-Burman(PB) test was used to screen the significant factors affecting the contents of emodin, physcion, resveratrol and polydatin in *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*. The binary multiple regression was fitted with the ethanol volume fraction, liquid-material ratio and extraction time as the investigation factors and with the overall desirability(OD) of the extraction rate of the above four index components as the evaluation index. The Box-Behnken Design(BBD) response surface method was used to optimize the significant factors and predict the optimal extraction process. Results The optimal flash extraction process was as follows: the ethanol volume fraction was 68%, the liquid-material ratio was 35 mL/g, and the extraction time was 10 min. The verification test results showed that the extraction rates of emodin, physcion, resveratrol, and polydatin were 6.867, 5.127, 9.736 and 13.850 mg/g, respectively, which were consistent with 6.902, 5.158, 9.799 and 13.890 mg/g of the model's predicted values. Conclusion The optimal extraction parameters can be used for the flash extraction of anthraquinones and stilbenes from *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*. The method is simple and accurate.

Key words: *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*; flash extraction process; Plackett-Burman test; Box-Behnken Design response surface method; anthraquinones; stilbenes; process optimization

虎杖源于蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. 的干燥根茎和根,又名红三七,始载于《本草纲目》^[1],我国资源量大,具有利湿退黄、止咳化痰、散瘀止痛功效,临床常用于治疗湿热黄疸、风湿痹痛、水火烫伤、跌打损伤、肺热咳嗽等症^[2]。虎杖含有二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类等多种活性成分,前 2 种活性成分具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎、调节代谢等多种药理学作用。2020 年版《中国药典(一部)》中虎杖的含量测定指标性成分为大黄素和虎杖苷,大黄素和大黄素甲醚属蒽醌类,白藜芦醇和虎杖苷属二苯乙烯类^[3-5]。目前,虎杖有效成分的提取方式主要有煎煮法、酶解法、超声提取法^[6-7]等,均存在耗时长、操作烦琐等缺点,且二苯乙烯类成分遇热不稳定,易降解^[8]。闪式提取法在室温下利用超动分子

渗透技术和高速剪切力,快速、高效地将中药材粉碎,并使有效成分迅速溶解平衡,达到高效提取目的^[9-10]; Plackett-Burman(PB)试验可快速、有效地筛选出最明显的关键影响因素^[11], Box-Behnken Design(BBD)响应面法可解决非线性数据问题。本研究中采用闪式提取法提取虎杖的有效成分,通过 PB 试验筛选出显著影响因素,采用 BBD 响应面法优化虎杖中蒽醌类和二苯乙烯类成分的最佳提取工艺,为进一步开发虎杖的药用价值奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

E2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有四元超高压溶剂系统、2695 型自动进样器、2998 PDA 型

第一作者:朱芹,女,大学本科,副主任药师,研究方向为化学药品及中药的质量分析,(电子信箱)zhuqin1221@163.com。

△通信作者:黄湘杰,男,大学本科,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)494784257@qq.com。

二极管阵列检测器、Empower3 型色谱工作站;AUW-220D 型电子天平(日本岛津公司,精度为 0.01 mg);JHBE-50C 型闪式提取器(西安麒麟实验仪器有限公司,功率为 3 000 W,转速为 10 000 r/min);Milli-Q Academic 型超纯水系统(美国密理博公司)。

1.2 试药

大黄素对照品(批号为 110756-201912,含量为 98.9%),大黄素甲醚对照品(批号为 110758-201817,含量为 99.5%),虎杖苷对照品(批号为 11575-201803,含量为 89.5%),白藜芦醇对照品(批号为 111535-201903,含量为 99.3%),均购自中国食品药品检定研究院;虎杖药材购自河北省安国中药材专业市场,经湖北省食品药品研究院蔡波主任药师鉴定为正品;乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 提取工艺

取干燥的虎杖药材适量,粉碎,过 4 号筛,取粉末 50 g,精密称定,投入闪式提取器中,设置仪器参数,加入溶剂适量,充分提取,提取液减压浓缩至近干,真空干燥,得药材浸膏粉末。

2.2 虎杖 4 种指标性成分含量测定^[12-14]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Xterra C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.18% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~9 min 时 11% A,9~25 min 时 11% A→45% A,25~35 min 时 45% A→66% A,35~48 min 时 66% A→82% A,48~60 min 时 82% A→10% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm(大黄素和大黄素甲醚),303 nm(白藜芦醇和虎杖苷);柱温:28℃;进样量:10 μL。

2.2.2 溶液制备

取大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇和虎杖苷对照品各适量,精密称定,以甲醇为溶剂配制质量浓度分别为 0.102 3,0.241 5,0.337 8,0.516 9 mg/mL 的混合对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。取 2.1 项下制备的浸膏粉末 1.0 g,精密称定,置 100 mL 棕色容量瓶中,加 75% 乙醇溶解并定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察与定量限确定:分别精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 2,5,10,15,20,25 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。以混合对照品溶液进样量(X , μg)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线。结果大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇和虎杖苷的回归方程分别为 $Y_1 = 101.18 X_1 - 22.73$ ($r_1 =$

$0.999\ 6$), $Y_2 = 68.65 X_2 + 19.36$ ($r_2 = 0.999\ 5$), $Y_3 = 94.24 X_3 - 18.19$ ($r_3 = 0.999\ 7$), $Y_4 = 70.16 X_4 + 9.83$ ($r_4 = 0.999\ 8$),线性范围分别为 0.204 6~2.558 0 μg,0.483 0~6.037 0 μg,0.675 6~8.445 0 μg,1.034 0~12.920 0 μg。表明大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷在各自线性范围内与峰面积线性关系良好。精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液各适量,用甲醇倍比稀释,按 2.2.1 项下色谱条件进样分析,取峰面积信噪比(S/N)为 10:1 时混合对照品溶液的进样量为定量限,结果定量限分别为 1.76,3.28,6.44,9.20 ng。

稳定性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液,分别于 0,6,12,15,20,24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷峰面积的 RSD 分别为 0.88%,1.03%,0.91%,0.96% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

精密度试验:精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇和虎杖苷峰面积的 RSD 分别为 0.67%,0.54%,0.73%,0.49% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取 2.1 项下已知含量的虎杖浸膏粉适量,精密称定,共 6 份,分别精密加入 2.2.2 项下混合对照品溶液 2.0 mL,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的平均回收率分别为 99.89%,99.12%,99.65%,99.71%, RSD 分别为 0.71%,0.89%,1.01%,0.97% ($n=6$),表明方法准确可靠。

2.3 PB 试验筛选主要影响因素

PB 试验设计:按 PB 试验设计表设置仪器参数,采用 Design Expert 8.0.5 软件拟合影响大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷提取率的二次回归方程,作出相互作用影响 4 种有效成分提取率的 3D 响应面图和 2D 等高线图,并预测 4 种有效成分提取率的最大理论值。选定的 6 个影响因素为乙醇体积分数(因素 A,%),提取次数(因素 B,次),液料比(因素 C,mL/g),药材粒度(因素 D),提取时间(因素 E,min),提取温度(因素 F,℃),PB 试验设计因素水平见表 1。

结果与分析:取 12 份虎杖药材,各 100 g,置闪式提取器中,按表 1 的试验设计快速提取,并测定大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率。结果见表 2。由表 3 可知,模型显著;各因素对大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率影响的显著性顺序依次为提取时间(E)>料液比(C)>乙醇体积分数(A)>提取次数

表 1 PB 试验设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of the PB test

水平	因素 A(%)	因素 B(次)	因素 C(mL/g)	因素 D	因素 E(min)	因素 F(℃)
1	50	3	30	细粉	6	100
-1	30	2	15	粗粉	3	60

表 2 PB 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of the PB test

试验号	因素						提取率(mg/g)			
	A	B	C	D	E	F	大黄素	大黄素甲醚	白藜芦醇	虎杖苷
1	1	1	-1	1	1	1	4.98	3.90	6.64	11.54
2	-1	1	1	-1	1	1	5.30	4.86	7.91	13.44
3	1	-1	1	1	-1	1	5.20	4.26	5.63	10.75
4	-1	1	-1	1	1	-1	5.03	4.83	6.74	12.54
5	-1	-1	1	-1	1	1	4.84	4.75	7.66	13.65
6	-1	-1	-1	1	-1	1	5.02	3.34	5.06	9.15
7	1	-1	-1	-1	1	-1	4.53	5.64	6.99	11.66
8	1	1	-1	-1	-1	1	4.10	3.59	4.90	8.25
9	1	1	1	-1	-1	-1	5.21	4.90	5.84	10.08
10	-1	1	1	1	-1	-1	4.72	5.25	6.53	10.98
11	1	-1	1	1	1	-1	5.40	5.88	6.25	11.87
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4.00	3.98	4.97	9.55

表 3 PB 试验设计各因素水平显著性分析

Tab. 3 Significance analysis of each factor level according to the PB test

来源	P 值			
	大黄素	大黄素甲醚	白藜芦醇	虎杖苷
模型	0.001 7	0.032 4	0.006 1	0.028 0
A	0.064 7	0.081 2	0.056 4	0.188 0
B	0.153 9	0.199 3	0.926 3	0.300 3
C	0.020 2	0.030 9	0.011 7	0.048 0
D	0.286 1	0.310 4	0.928 5	0.451 8
E	0.001 4	0.004 8	0.000 6	0.003 1
F	0.527 7	0.601 3	0.972 0	0.795 5

(B) > 药材粒度(D) > 提取温度(F)。其中,对蒽醌类成分和二苯乙烯类成分提取率影响较显著的因素为因素 A,C,E,故上述 3 个关键因素进行响应面优化和设计。

2.4 最陡爬坡试验设计及结果

本研究中采用提取时间(步长设为 2 min)、液料比(步长设为 10 mL/g)、乙醇体积分数(步长设为 5%)3 个自变量设置正向爬坡模式,以大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率为观察值寻求最优参数值。结果见表 4。

由表 4 可知,第 4 次试验时,大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率最大,分别为 6.762,4.095,8.095,12.888 mg/g,即提取参数为液料比 40 mL/g,提取 12 min,乙醇体积分数 65%。

表 4 最陡爬坡试验设计与结果

Tab. 4 Design and results of the steepest ascent test

步长	因素			提取率(mg/g)			
	A(%)	C(mL/g)	E(min)	大黄素	大黄素甲醚	白藜芦醇	虎杖苷
0	50	10	6	5.524	4.002	7.854	12.413
0+1Δ	55	20	8	5.933	3.966	7.875	12.555
0+2Δ	60	30	10	5.687	3.859	7.764	12.532
0+3Δ	65	40	12	6.762	4.095	8.095	12.888
0+4Δ	70	50	14	6.531	4.027	8.062	12.812
0+5Δ	75	60	16	6.042	3.849	7.125	11.865

表 5 BBD 响应面法设计因素水平表

Tab. 5 Factors and levels of BBD response surface method

水平	因素 A(%)	因素 C(mL/g)	因素 E(min)
-1	60	30	8
0	65	40	10
1	70	50	12

2.5 BBD 响应面法优化试验

2.5.1 BBD 响应面法设计

BBD 响应面法采用多元二次回归方程模型预测各拟合响应值与最优因素间的试验条件及数理函数关系^[15]。根据最陡爬坡试验结果,并结合 BBD 响应面法原理,以乙醇体积分数(因素 A)、液料比(因素 C)、提取时间(因素 E)为考察因素,以虎杖提取物中大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷提取率的加权评分(OD)值为评价指标,运用 Design Expert 8.0.5 统计学软件,设计虎杖提取工艺三因素三水平响应面分析模型,对二次多项方程进行显著性分析。BBD 响应面法设计因素水平见表 5。

2.5.2 回归模型的建立及分析

采用 2.2.1 项下方法测定 17 组试验大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率,根据 Hassan 法计算各试验 4 个指标性成分的 OD 值,并对模型进行综合分析。结果见表 6 至表 7。

采用 Design Expert 8.0.5 统计学软件进行方差分析,得二次多项回归方程 $Y = 0.75 + 0.22A + 0.33C + 0.021E + 0.028AC + 0.076AE - 0.008255CE - 0.24A^2 - 0.052C^2 - 0.16E^2$ 。式中,因变量为大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇和虎杖苷提取率 OD 值,因素 A,C,E 分别为自变量乙醇体积分数、液料比及提取时间。综合评价 OD 值的相关系数 $R^2 = 0.9928$,数学模型拟合良好。由表 7 可知,所建立模型有意义($P < 0.01$),表明模型拟合度高,预测性较好。因素 A 和因素 C 对模型影响均显著。模型验证得大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率预测值分别为 6.902,5.158,9.799,13.890 mg/g。

2.5.3 BBD 响应面法分析与最佳工艺确定

采用 Design Expert 8.0.5 软件,绘制影响 OD 值的各因素相互作用的 3D 响应面图和 2D 等高线图。由图 1

表6 BBD 响应面法设计与结果

Tab.6 Design and results of the BBD response surface method								
试验号	因素			提取率(mg/g)				OD(分)
	A	C	E	大黄素	大黄素甲醚	白藜芦醇	虎杖苷	
1	-1	-1	0	6.409	4.163	5.245	9.452	0.000
2	1	-1	0	7.403	5.276	6.425	11.13	0.297
3	-1	1	0	8.003	6.007	7.076	13.52	0.575
4	1	1	0	8.924	5.684	9.778	14.31	0.988
5	-1	0	-1	7.201	5.918	6.546	10.15	0.201
6	1	0	-1	7.012	6.026	8.764	11.16	0.516
7	-1	0	1	5.891	5.125	6.353	9.546	0.068
8	1	0	1	8.072	6.103	9.067	12.21	0.684
9	0	-1	-1	5.839	5.907	6.532	10.26	0.215
10	0	1	-1	8.002	5.964	9.057	13.86	0.863
11	0	-1	1	5.896	6.021	6.845	10.75	0.303
12	0	1	1	8.805	5.019	9.286	14.16	0.918
13	0	0	0	7.319	5.915	8.867	13.11	0.766
14	0	0	0	6.891	5.779	8.867	13.26	0.782
15	0	0	0	7.593	4.943	8.865	12.91	0.745
16	0	0	0	7.244	4.869	8.894	13.15	0.774
17	0	0	0	7.356	4.597	8.885	13.23	0.808

表7 BBD 响应面法设计方差分析结果

Tab.7 Results of ANOVA of the BBD response surface method					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.583 0	9	0.176 0	127.338	<0.01
A	0.337 0	1	0.337 0	243.811	<0.01
C	0.799 0	1	0.799 0	578.651	<0.01
E	0.004 0	1	0.004 0	2.882	0.133 4
AC	0.003 0	1	0.003 0	2.478	0.159 5
AE	0.023 0	1	0.023 0	16.362	<0.01
CE	0.000 3	1	0.000 3	0.202	0.666 6
A ²	0.282 0	1	0.282 0	204.194	<0.01
C ²	0.011 0	1	0.011 0	8.001	0.025 5
E ²	0.093 0	1	0.093 0	67.572	<0.01
残差	0.010 0	7	0.001 0		
纯误差	0.002 0	4	0.001 0		
总误差	1.593 0	16			

可知,曲线面升降变化均较明显,因素 A,C,E 之间显著交互。最佳提取工艺条件为,乙醇体积分数 68%,液料比 35 mL/g,提取 10 min。取虎杖药材 3 份,按最佳提取工艺提取,实测大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率分别为 6.867,5.127,9.736,13.850 mg/g, RSD 分别为 0.41%,0.63%,0.71%,0.58% (n=3),预测值和实测值偏差分别为 0.25%,0.30%,0.32%,0.14%。

3 讨论

由图 1 可知,提取时间显著影响 OD 值,在各曲线

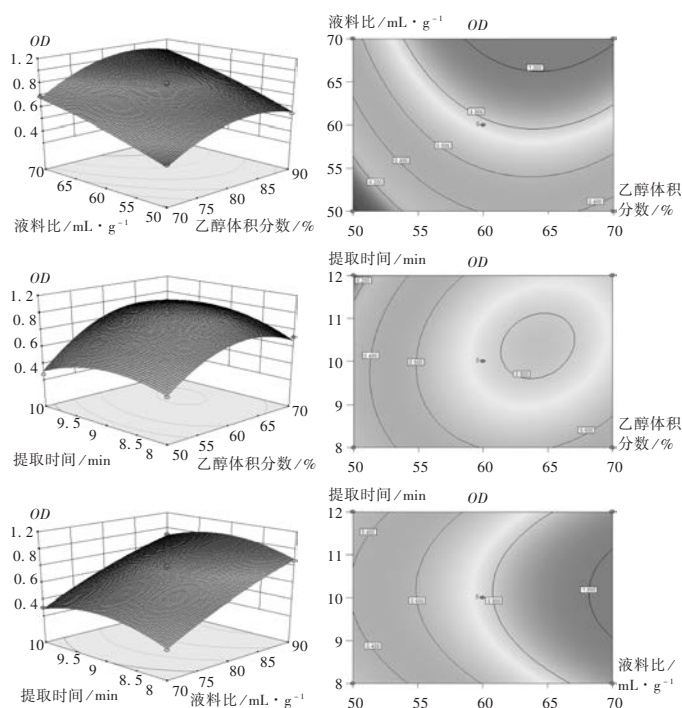


图1 各因素交互作用的 3D 响应面图和 2D 等高线图

Fig.1 3D response surface plot and 2D contour plot of the interaction of various factors

图中均是先低后高,而乙醇体积分数和液料比曲线面随自变量增加呈上升趋势。预测值与实测值偏差较小,表明理论模型预测较准确,优选提取工艺可行。

曾考察影响大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷提取率综合评价指标相互作用的三因素(乙醇体积分数、提取时间、液料比),通过 PB 试验联合 BBD 响应面法进行试验设计,采用 Design Expert 8.0.5 统计学软件拟合二次多项方程,采用方差分析拟合程度,推导最佳提取工艺条件,并预测大黄素、大黄素甲醚、白藜芦醇、虎杖苷的提取率。由含量测定方法学考察结果可知,方法准确可靠,精密度、稳定性均较好,可准确测定虎杖中蒽醌类和二苯乙烯类成分的含量;由提取工艺优化结果可知,液料比对提取率影响较大,乙醇体积分数为 68%,液料比为 35 mL/g,提取时间为 10 min,基本可将蒽醌类有效成分提取完全,可为虎杖中蒽醌类和二苯乙烯类成分的提取提供参考。

参考文献

- [1] 万芳,王娇,郑瑞新.《本草纲目》引用今佚古籍初步[J]. 中医杂志,2018,59(20):1722-1725.
- [2] 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,2015:353-354.
- [3] 时圣明. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2016,39(2):313-317.
- [4] 肖召文,姜昕,付璐,等. 虎杖苷对小鼠急性心肌梗死后心肌细胞损伤的保护作用[J]. 华中科技大学学报(医学版),2016,45(2):176-180.