

References:

[1] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
 [2] Liang L H, Wang T Q. The influence to *Gastrodia Rhizome's* appearance and quality by different processing methods [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med* (新疆中医药), 1999, 17 (4): 42.  
 [3] Shi Y H, Li X L, Li D B, et al. The research about soakage during the course of cutting *Gastrodia Rhizome* [J]. *Heilongjiang J Tradit Chin Med* (黑龙江中医药), 2003 (4): 54.

[4] Li D X, Xiao S J. The traditional processed techniques and quality investigation on *Gastrodia Rhizome* [J]. *Res Prac Chin Med* (现代中药研究与实践), 2004, 18 (4): 12-13.  
 [5] Tian S X. The empirical study on *Gastrodia Rhizome* by baking technique [J]. *Lishizhen Med Mater Res Med* (时珍国医国药), 2001, 12 (3): 224.  
 [6] Dong J B, Yang S X. The study on *gastrodine's* stability during the course of drying *Gastrodia Rhizome* [J]. *Zhejiang Prac Med* (浙江实用医学), 2003, 12 (8): 380-381.

## 正交试验法优选虎杖提取工艺的研究

文金辉<sup>1,2</sup>, 郭 涛<sup>1\*</sup>, 赵庆春<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110016; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116023)

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎, 味微苦, 性微寒, 具有瘀滞止痛、祛风利湿等功效<sup>[1]</sup>。虎杖的主要化学成分为蒽醌类、萜类、酚性成分和黄酮类化合物, 其中大黄素等蒽醌类衍生物是其抗炎、抑菌的主要成分<sup>[2]</sup>。有关虎杖提取工艺的报道多数单以总蒽醌<sup>[3]</sup>或大黄素<sup>[4,5]</sup>为指标进行优选, 指标具有片面性。本实验采用  $L_9(3^4)$  正交设计, 以虎杖出膏率、大黄素的量和总蒽醌的量 3 项指标的综合评分优选虎杖的提取工艺, 为虎杖的制剂工艺生产提供试验依据。

### 1 仪器与试药

PU-2087 高效液相色谱仪(日本 Jasco 公司), UV-2075 紫外-可见检测器(日本 Jasco 公司), N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所), AUW120D 十万分之一电子天平(日本 Shimadzu 公司), 668 真空干燥箱(大连第四仪表厂), UV-2501PC 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。大黄素对照品由中国药品生物制品检定所提供, 虎杖购自沈阳广生堂药业有限责任公司, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 大黄素的测定

2.1.1 高效液相色谱条件: 色谱柱 Spherisorb  $C_{18}$  柱 (150 mm × 4.6 mm, 10  $\mu$ m); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸溶液 (80:20); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20  $\mu$ L。  
 2.1.2 标准曲线绘制: 精密称取以五氧化二磷为干

燥剂减压干燥至恒重的大黄素对照品适量, 加甲醇配制成 24、48、96、144、192、240、480  $\mu$ g/mL 的溶液, 依次进样, 按上述色谱条件测定。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程:  $Y = 2330.1 X + 4.364.6, r = 0.9999$ 。表明大黄素在 24~480  $\mu$ g/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.3 供试品溶液制备及测定: 取虎杖浸膏约 30 mg, 精密称定, 精密加入氯仿 25 mL 和 2.5 mol/L 硫酸溶液 20 mL, 称定质量, 置水浴中加热回流 2 h, 冷却至室温, 再称定质量, 用氯仿补足减失的质量, 摇匀, 精密吸取氯仿层 10 mL, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 用微孔滤膜 (0.45  $\mu$ m) 滤过, 取续滤液, 进样, 按外标法测定。色谱图见图 1。

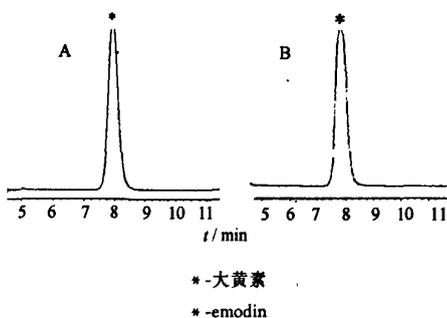


图 1 大黄素对照品(A)和虎杖提取物(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of emodin reference substance (A) and *P. cuspidatum* extract (B)

#### 2.2 总蒽醌的测定

2.2.1 标准曲线绘制<sup>[1]</sup>: 精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的大黄素对照品适量, 加甲醇

配制成 100、120、160、200、240、280、320  $\mu\text{g/mL}$  的溶液。精密吸取 1 mL，氮气吹干甲醇，残渣各精密加入 2% 氨溶液与 5% 氢氧化钠溶液的等量混合溶液 10 mL 使溶解。以试剂为空白，在 520 nm 波长处测定各溶液吸光度。以吸光度(Y)对质量浓度(X)进行线性回归，得回归方程： $Y=0.002 X+0.004$ ， $r=0.999 5$ 。表明大黄素在 100~320  $\mu\text{g/mL}$  与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.2 供试品溶液制备及测定：取 2.1.3 项下制备的供试品溶液 2 mL，依照 2.2.1 项下方法测定溶液在 520 nm 波长处的吸光度，代入方程计算总蒽醌的量。

2.3 正交试验

2.3.1 因素水平：乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取次数(C)和提取时间(D) 4 个因素对虎杖提取工艺的影响较大，选择的因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/%	B/倍	C/次	D/h
1	55	16	1	3
2	70	20	2	4
3	95	24	3	5

2.3.2 试验设计与结果：每次称取粉碎的虎杖药材 25 g，按正交试验表安排试验(每个试验重复 2 次)，回流提取，提取液滤过后减压浓缩，并将浓缩后的浸膏放入减压干燥器中干燥，得干浸膏，称重，得出膏率。以提取物中出膏率、大黄素和总蒽醌的量 3 项考察指标的综合评分优选提取工艺。结果见表 2。评分标准：设定虎杖出膏率 15% 时取满分 15 分，大于等于 40% 取 0 分；大黄素的量为 10.85% 时取满分 40 分，量为 0 时取 0 分；总蒽醌的量为 14.21% 时取满分 45 分，量为 0 时取 0 分。数据统计分析用 SPSS 11.5，方差分析结果见表 3。

表 2 正交设计结果

Table 2 Result of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	A	B	C	D	出膏率/%	大黄素/%	总蒽醌/%	综合评分
1	1	1	1	1	28.6	7.37	9.07	62.75
2	1	2	2	2	33.0	7.08	9.06	59.02
3	1	3	3	3	36.4	7.24	8.99	57.34
4	2	1	2	3	32.0	7.16	9.21	60.35
5	2	2	3	1	30.6	8.66	10.70	71.46
6	2	3	1	2	30.0	7.98	9.78	66.41
7	3	1	3	2	18.4	10.53	14.03	96.22
8	3	2	1	3	18.4	9.64	12.83	89.17
9	3	3	2	1	18.2	10.27	13.32	93.14
$K_1$	59.705	73.107	72.779	75.785				
$K_2$	66.076	73.220	70.839	73.886				
$K_3$	92.846	72.299	75.009	68.955				

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	3 711.104	2	1 855.552	179.345	$P<0.01$
B	3.028	2	1.514	0.146	
C	52.239	2	26.120	2.525	
D	149.166	2	74.583	7.209	$P<0.05$
误差	93.117	9	10.346		

$F_{0.05}(2,9)=4.26$   $F_{0.01}(2,9)=8.02$

最适宜的提取工艺  $A_3B_2C_3D_1$ ，即用 20 倍量 95% 乙醇提取 3 次，总提取时间为 3 h。4 个因素对提取工艺影响程度依次为  $A>D>C>B$ ，其中乙醇体积分数和提取时间对大黄素的影响具有显著性，乙醇用量和提取时间无显著性差异。

2.4 验证试验：为验证该工艺的优劣和稳定性，据所筛选的最佳提取条件验证 3 批，结果见表 4。验证试验结果说明，所筛选的提取工艺条件基本稳定。

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification

批号	出膏率/%	大黄素/%	总蒽醌/%
1	16.0	10.47	13.33
2	16.0	10.53	12.89
3	17.2	10.48	13.04

3 讨论

正交试验中大黄素和总蒽醌的量都以各自单次试验的最高值为满分，表 2 中的出膏率、大黄素、总蒽醌和综合评分取两次重复试验的平均值。正交试验得出的最佳提取工艺  $A_3B_2C_3D_1$ 。具体操作为第一次 8 倍量 95% 乙醇提取 1.5 h，第二次、第三次各为 6 倍量 95% 乙醇，分别提取 1 h 和 0.5 h。

大黄素和总蒽醌随着提取时间的延长而降低，这与先前报道<sup>[6]</sup>温度和提取时间对大黄素有影响相一致。所以实际操作中，提取的整个过程要注意控制温度，尽量减少蒽醌类衍生物分解、升华所带来的损失。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.  
 [2] Zhang X Y. The research on the chemical constituents, pharmaceutical effects, extraction and isolation of *Polygonum cuspidatum* Sieb. [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 1999, 11 (3): 13-14.  
 [3] Zeng L, Yuan P. The research of the optimization of the extractive method in anthraquinones of *Polygonum cuspidatum* Sieb. [J]. *China Pharm* (中国药业), 2003, 12 (9): 45-47.  
 [4] Yuan K, Yang X H, Yin P H. The process choice of *Rhizoma Poizoma Cuspidatum* extracted substance and quality analysis [J]. *China Mod Appl Pharm J* (中国现代应用药学杂志), 2000, 17 (6): 444-446.  
 [5] Zhang J. Study on the optimum extraction process for *Polygonum cuspidatum* Sieb. by orthogonal test design [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38 (2): 154.  
 [6] Su Z, Zeng H F, Si Q R. Preliminary study on the extractive technique to *Rhizoma Polygoni Cuspidati* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4 (1): 8-10.