

# 混合溶剂提取虎杖多极性成分的研究

陈 成<sup>1</sup>, 邱细敏<sup>2</sup>, 夏之宁<sup>1\*</sup><sup>1</sup>重庆大学化学化工学院, 重庆 400030; <sup>2</sup>湖南师范大学医学院, 长沙 410014

**摘要:** 为了研究混合溶剂对虎杖多成分提取的可行性与先进性, 本文采用多种混合溶剂对虎杖进行提取, 并与石油醚、乙酸乙酯、70% 乙醇提取进行比较研究, 在确定最佳提取溶剂的条件下, 考察溶剂配比、料液比、温度以及时间因素对虎杖苷和大黄素提取率的影响。结果表明 70% 乙醇-乙酸乙酯混合溶剂提取效率最高, 最佳条件为 70% 乙醇: 乙酸乙酯 = 3: 1, 料液比 1: 12.5, 温度 85 °C, 提取时间 2 h。多元混合溶剂可以增加虎杖广泛极性成分的提取效率, 为中药多成分提取给出了一种新方法。

**关键词:** 混合溶剂; 多极性成分; 提取; 虎杖

中图分类号: R932

文献标识码: A

## Study on Extraction of Multipolar Components from *Polygonum cuspidatum* by Mixed Solvents

CHEN Cheng<sup>1</sup>, QIU Xi-min<sup>2</sup>, XIA Zhi-ning<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;<sup>2</sup>Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410014, China

**Abstract:** To study the feasibility and advantage of extraction of multiple components from *Polygonum cuspidatum* with mixed solvent, chemical components of *Polygonum cuspidatum* were extracted by petroleum ether, ethyl acetate, 70% ethanol and different mixed solvent. The mixture of 70% ethanol and ethyl acetate was selected as extraction agents to investigate the effects of extraction time, temperature and ratio of volume to weight on extraction. According to the yield of polydatin and emodin, the optimal extraction conditions were determined to be: solid-liquid ratio of 1: 12.5, extraction time of 2 h and temperature of 85 °C. Using mixed solvent can enhance the extraction efficiency of constituents with different polarity. This method provided a new way for the extraction of multiple components from traditional Chinese Medicine.

**Key words:** mixed solvent; multipolar components; extraction; *Polygonum cuspidatum*

中药虎杖为蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc) 的干燥根和根茎, 其有效成分主要为蒽醌类和二苯乙烯类化合物, 其代表性成分分别为大黄素和虎杖苷<sup>[1]</sup>。虎杖有效成分的提取最常用的是溶剂提取法, 常用溶剂有水、乙醇、甲醇、乙酸乙酯、石油醚等。有文献报道, 二元或三元溶剂之间存在协同作用, 可以增加提取效率<sup>[2]</sup>。故本文使用多元混合溶剂提取, 既可以利用乙醇的高渗透能力, 也可以增加不同极性成分的提取效率, 从而可以尽量全面地对虎杖有效成分进行提取。本文用传统的单一溶剂提取法与混合溶剂法分别对虎杖提取,

用高效液相色谱进行定性定量分析, 比较研究了虎杖苷和大黄素的提取率, 并以这两种成分的提取率为考察指标, 对混合溶剂提取虎杖的工艺进行了优化, 获得了最佳提取条件。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1260 液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 恒温水浴锅(北京长风仪器仪表公司), 电子分析天平(SHIMADZU AY120), 旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

试剂: 甲醇为色谱纯, 乙醇、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯。

虎杖药材经重庆大学杨丰庆副教授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc, 标本

收稿日期: 2014-02-25 接受日期: 2014-07-09

基金项目: 科技部国际合作项目(2010DFA32680); 国家自然科学基金项目(21175159)

\* 通讯作者 Tel: 86-23-65106615; E-mail: tcm\_anal\_cqu@163.com

保存于重庆大学药学系天然药物研究室。大黄素分析标准品(纯度 $\geq 96.0\%$ )和虎杖苷分析标准品(纯度 $\geq 99\%$ )购于 aladdin 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 对照品制备

精密称取对照品虎杖苷和大黄素,甲醇溶解定容。用甲醇稀释调配成不同质量浓度的对照品溶液。虎杖苷对照品溶液的浓度分别为:0.0488、0.0732、0.0976、0.1220、0.1464、0.1708 mg/mL;大黄素对照品溶液的浓度分别为:0.0068、0.0136、0.0272、0.0408、0.0544、0.0680 mg/mL。

### 1.2.2 样品制备

称取虎杖 20.0 g,分别加入石油醚、乙酸乙酯、70%乙醇、混合溶剂 1(70%乙醇:石油醚=1:1)、混合溶剂 2(70%乙醇:乙酸乙酯=1:1)、混合溶剂 3(70%乙醇:二氯甲烷=1:1)、混合溶剂 4(70%乙醇:石油醚:二氯甲烷=1:1:1)、混合溶剂 5(70%乙醇:石油醚:乙酸乙酯=1:1:1)、混合溶剂 6(70%乙醇:石油醚:二氯甲烷:乙酸乙酯=1:1:1:1)、水浴加热回流 1 h,减压回收溶剂后用适当甲醇溶解,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,滤液用 HPLC 分析,测定峰面积,计算提取率,考察不同提取溶剂对虎杖苷和大黄素提取率的影响。

### 1.2.3 色谱条件

Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:水(A)和甲醇(C);梯度洗脱程序为:0~10 min,10%~22% C;10~15 min,22%~25% C;15~15.5 min,25%~30% C;15.5~20 min,30%~50% C;20~25 min,50% C;25~30 min,50%~100% C;30~40 min,100% C;流速 1.00 mL/min;进样量 1  $\mu\text{L}$ ;温度 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长 254 nm。

### 1.2.4 方法学考察

#### 1.2.4.1 标准曲线的绘制

将“1.2.1”制备的对照品按“1.2.3”的色谱条件进样,测定峰面积。分别以虎杖苷和大黄素对照品浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,得到虎杖苷的回归方程为  $Y = 4.984 + 3838.3197X$ ,  $R = 0.9993$ ;大黄素的回归方程为  $Y = 49.982 + 18088.6657X$ ,  $R = 0.9994$ 。

#### 1.2.4.2 精密度实验

以 70%乙醇:乙酸乙酯=3:1 为提取剂,料液比为 1:12.5,85  $^{\circ}\text{C}$  提取 2 h,将提取液重复进样 6 次,测定峰面积,计算虎杖苷和大黄素峰面积的 RSD 分

别为 1.72% 和 0.64%,说明实验精密度良好。

#### 1.2.4.3 稳定性实验

取大黄素和虎杖苷对照品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样,测定其峰面积,计算虎杖苷和大黄素的 RSD 分别为 1.86% 和 1.32%,表明在 12 h 内基本稳定。

#### 1.2.4.4 回收率实验

分别精密称取 1.0 g 已知含量的虎杖 5 份,分别加入 31.4 mg 虎杖苷对照品和 6.8 mg 大黄素对照品,以 70%乙醇:乙酸乙酯=3:1 为提取剂,料液比为 1:12.5,85  $^{\circ}\text{C}$  提取 2 h,测定提取液峰面积,计算虎杖苷和大黄素平均回收率分别为 97.78% 和 96.71%,表明本方法基本准确。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

9 种不同溶剂提取得到的虎杖苷和大黄素的提取率结果如图 1 所示。

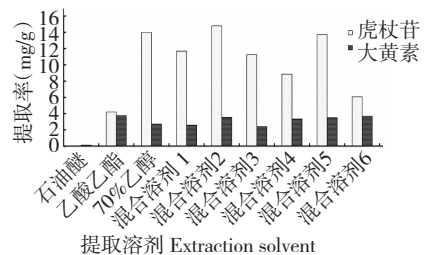


图 1 9 种不同溶剂对大黄素和虎杖苷的提取效果对比  
Fig. 1 Comparison of 9 solvents for the extraction efficiency of polydatin and emodin

由图 1 可知,对虎杖苷而言,混合溶剂 2(70%乙醇-乙酸乙酯)得到的提取率最高。对大黄素而言,乙酸乙酯以及混合溶剂 6(70%乙醇-石油醚-乙酸乙酯-二氯甲烷)得到的提取率比混合溶剂 2 高,但是这两种溶剂的虎杖苷提取率明显比混合溶剂 2 低。70%乙醇对虎杖苷的提取率较高,但是对大黄素的提取率却比混合溶剂要低。随着混合溶剂中石油醚乙酸乙酯等弱极性成分的增加,虎杖苷的提取率有所下降,但大黄素的提取率却是提高的。综合考虑采用 70%乙醇-乙酸乙酯混合溶剂。

### 2.2 单因素实验结果

#### 2.2.1 70%乙醇-乙酸乙酯最佳配比的确定

在提取温度为 80  $^{\circ}\text{C}$ ,提取时间为 1 h,料液比为 10:1 条件下,分别考察乙醇-乙酸乙酯分别以 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、5:1 混合时对虎杖苷和大黄素的

提取率的影响,结果如图2。

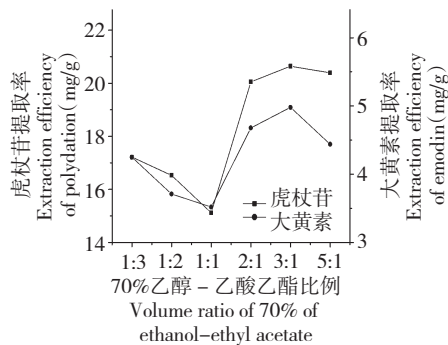


图2 70%乙醇-乙酸乙酯对比虎杖苷和大黄素提取率的影响

Fig. 2 The effect of volume ratio of 70% of ethanol-ethyl acetate on extraction efficiency of polydatin and emodin

由图2可知,当70%乙醇比例由1:3增加到1:1时,虎杖苷和大黄素的提取率是逐渐下降的,而之后随着乙醇比例的增加两者的提取率也增加,当70%乙醇比例增加到5:1时,两者的提取率下降,尤其是大黄素提取率下降更明显,所以确定70%乙醇-乙酸乙酯最佳混合比例为3:1。

### 2.2.2 料液比对虎杖苷和大黄素提取率的影响

在70%乙醇-乙酸乙酯为3:1,提取温度为80℃,提取时间为1h条件下,分别考察料液比为1:5、1:7.5、1:10、1:12.5、1:15对虎杖苷和大黄素的提取率的影响,结果如图4。

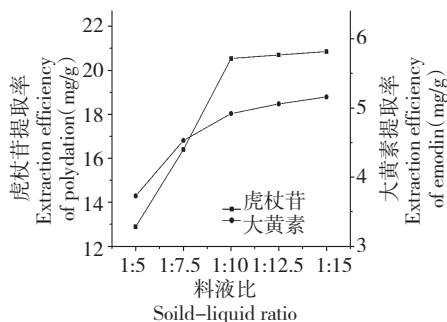


图3 料液比对虎杖苷和大黄素提取率的影响

Fig. 3 The effect of solid-liquid ratio on extraction efficiency of polydatin and emodin

由图3可知,当料液比由1:5增加到1:10时,大黄素和虎杖苷的提取率增加较快,但是10倍量到15倍量增加趋缓,考虑到溶剂的消耗和产物的浓缩,所以确定最佳料液比为1:12.5。

### 2.2.3 提取温度对虎杖苷和大黄素提取率的影响

在70%乙醇-乙酸乙酯为3:1,料液比为1:12.5,

提取时间为1h条件下,分别考察温度为70、75、80、85、90℃对虎杖苷和大黄素的提取率的影响,结果如图4。

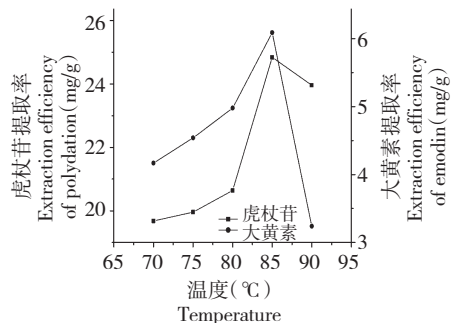


图4 提取温度对虎杖苷和大黄素提取率的影响

Fig. 4 The effect of extraction temperature on extraction efficiency of polydatin and emodin

由图4可知,虎杖苷和大黄素在70℃升到80℃时,提取率缓慢增加,到85℃有大幅度上升,而继续升到90℃两者的提取率反而下降,可能是温度过高造成产物的破坏。而且温度越高,热能消耗更高,所以确定最佳提取温度为85℃。

### 2.2.4 提取时间对虎杖苷和大黄素提取率的影响

在70%乙醇-乙酸乙酯为3:1,料液比为1:12.5,提取温度为85℃的条件下,分别考察提取时间为0.5、1、1.5、2、3h对虎杖苷和大黄素的提取率的影响,结果如图5。

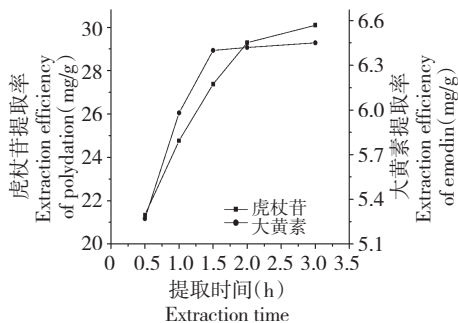


图5 提取时间对虎杖苷和大黄素提取率的影响

Fig. 5 The effect of extraction time on extraction efficiency of polydatin and emodin

由图5可知,随着提取时间的增加,虎杖苷和大黄素的提取率都有所增加,虎杖苷在时间达到2h时有一个大幅度增加,而大黄素提取率则增加缓慢,所以确定最佳提取时间为2h。

## 2.3 正交设计

根据单因素实验结果,采用混合溶剂回流法提

取虎杖中的有效成分。影响提取效率的因素主要有混合溶剂比例、料液比、提取温度和提取时间,故以此4因素为参考指标,采取 $L_{16}(4^4)$ 正交试验进行考

察,以大黄素和虎杖苷的提取率为评价指标,优选最佳提取水平。其因素水平见表1,结果见表2和表3。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 The orthogonal table of factors and levels tested

水平 Level	A 温度 Temperature(°C)	B 时间 Time(h)	C 溶剂配比 Volume ratio of solvents	D 料液比 Liquid-solid ratio
1	90	1	3:1	1:5
2	75	1.5	5:1	1:7.5
3	80	2	2:1	1:10
4	85	2.5	1:2	1:12.5

表2  $L_{16}(4^4)$ 正交试验方案及结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号 No.	A	B	C	D	$Y_1$	$Y_2$
1	1	1	1	1	21.38	4.544
2	1	2	2	2	20.45	4.345
3	1	3	3	3	19.54	4.151
4	1	4	4	4	18.53	3.937
5	2	1	2	3	22.39	4.758
6	2	2	1	4	26.23	5.574
7	2	3	4	1	16.66	3.539
8	2	4	3	2	20.52	4.361
9	3	1	3	4	22.44	4.769
10	3	2	4	3	19.58	4.162
11	3	3	1	2	26.35	5.600
12	3	4	2	1	23.45	4.983
13	4	1	4	2	19.68	4.182
14	4	2	3	1	21.58	4.585
15	4	3	2	4	27.31	5.804
16	4	4	1	3	29.18	6.202

注:表中 $Y_1$ 为虎杖苷提取率, $Y_2$ 为大黄素提取率。

Note: $Y_1$  indicates extraction efficiency of polydatin, $Y_2$  indicates extraction efficiency of emodin.

表3 正交实验结果分析

Table 3 Analysis of orthogonal testing results

		$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	R
$Y_1$	A	19.98	21.45	22.96	24.44	4.46
	B	21.48	21.96	22.46	22.92	1.44
	C	25.79	23.4	21.02	18.61	7.18
	D	20.77	21.75	22.68	23.63	2.86
$Y_2$	A	4.245	4.558	4.878	5.193	0.95
	B	4.563	4.667	4.774	4.871	0.31
	C	5.48	4.973	4.467	3.955	1.53
	D	4.413	4.622	4.818	5.021	0.61

由表3的极差分析可以得出,影响虎杖苷和大黄素提取效果各因素的主次顺序分别为:溶剂比例、温度、料液比、时间,理论上最佳组合为 $A_4B_4C_1D_4$ 。但是提取时间(B)影响较小,且3、4水平差距很小,故本着降低能耗的原则,确定最佳组合为 $A_4B_3C_1D_4$ 。即70%乙醇:乙酸乙酯=3:1,料液比为1:12.5,提取温度85℃,提取时间2h。

## 2.4 验证实验

精密称取虎杖药材10.0g,加入混合溶剂(70%乙醇-乙酸乙酯=3:1)125mL,85℃水浴加热回流2h,减压回收溶剂后用适当甲醇溶解,用0.45μm微孔滤膜滤过,按“1.2.3”色谱条件进行测定。虎杖苷提取率为31.89mg/g,大黄素提取率为6.28mg/g。验证结果较正交实验各结果都好,所以确定此条件为最佳提取条件。

## 3 结论

由图1可以看出,当采用石油醚作为提取溶剂时,由于溶剂本身的极性和渗透性的影响,对2种成分的提取效率都不高。单一溶剂乙酸乙酯和乙醇很难兼顾极性相差较大的成分的提取。而多元混合溶剂可以对不同极性成分进行提取,提取成分更全面。此外,用混合溶剂提取时会形成共沸,其沸点会降低,而较低的回流温度也可以节约能源。

综上所述,采用优化配比的混合溶剂有利于虎杖成分的尽可能全面地提取,同时可以降低成本,对

以后其他中药成分提取研究提出了一个新思路。

## 参考文献

- Xie Y(谢扬),Zhu QH(朱秋华),Yan YC(严轶琛). Progress of study on extraction and separation of the active ingredients in *Polygonum cuspidatum*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药),2004,15:615-616.
- Garcia LMZ,de Oliveira TF,Soares PK,*et al.* Statistical mixture design—Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemo-metric Intell Lab Syst*,2010,103:1-7.
- Zhao HB(赵鸿宾),Chen HG(陈华国),Zhou X(周欣),*et al.* Study on the extraction technology and determination of 3 components in *Polygonum cuspidatum* by RP-HPLC. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2010,32:1393-1396.
- Liu D(刘丹),Tang HF(汤海峰),Zhang SQ(张三奇),*et al.* The optimization of extraction process for effective ingredients in *Polygonum cuspidatum*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2007,29:516-521.
- Yang HM(杨红美),Chen B(陈波),Zeng JG(曾建国),*et al.* Simultaneous determination of resveratrol, emodin, chrysophanol, physcion, in root of *Polygonum cuspidatum* and its extract by HPLC. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2006,31:202-205.
- Zheng MQ(郑茂强),Wang L(王路),Wang M(王猛),*et al.* Study on extracting technics of grape seed oil and procyanidin by mixed solvent. *Food Sci Tech*(食品科技),2008,15(6):20-23.
- Tian AP(天爱平),Guo SS(郭赛珊),Shen ZF(申竹芳). Insulin resistant animal model established by high fat diet. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报),2006,22:267-269.
- Wang T(王彤),Zhou GY(周国用),Ma J(马静),*et al.* Study on non-insulin-dependent diabetes mellitus model in C57BL/6J mice induced by streptozotocin. *Acta Lab Ani Sci Sin*(中国实验动物学报),2000,8(2):92-97.
- Surwit RS,Kuhn CM,Cochrane C,*et al.* Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*,1988,37:1163-1167.
- Yang JL(杨架林),Li G(李果),Liu YP(刘优萍). Establishing a rat model similar to the adult patient of the general type 2 diabetes by long-term fat-enriched fed and lower dose of streptozotocin-treated rats. *Acta Lab Ani Sci Sin*(中国实验动物学报),2003,11:138-141.
- Liu CS(刘长锁),Shen ZF(申竹芳). Free fatty acids and insulin resistance. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2005,21:145-149.
- Jiao P,Ma J,Feng B,*et al.* FFA induced adipocyte inflammation and insulin resistance: Involvement of ER stress and IKKβ pathways. *Obesity*,2011,19:483-491.
- Savage DB,Petersen KF,Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*,2007,87:507-520.
- Lillioja S,Mott DM,Spraul M,*et al.* Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*,2010,23:11-16.

(上接第1388页)