

响应面法优化红花乙醇减压辅助提取工艺

王雅琪¹, 何小汝¹, 伍振峰¹, 张小飞², 兰继平¹, 郑琴¹, 杨明^{1,2*}
(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] **目的:**优化红花减压辅助提取的工艺参数,为该工艺的推广与应用提供参考。**方法:**以羟基红花黄色素 A 得率为指标,采用响应面分析法对乙醇体积分数、沸腾温度、提取次数、提取时间等参数进行考察,结合扫描电镜微观分析不同处理方式药材表面的微观形态。**结果:**最佳提取工艺为加 20 倍量 50% 乙醇于 65 ℃ 提取 2 次,每次 42 min。羟基红花黄色素 A 得率 1.51%。**结论:**优选的减压提取工艺稳定可靠,羟基红花黄色素 A 得率显著高于传统回流提取法,提示减压提取法适合中药材中热敏性成分的提取。

[关键词] 红花; 羟基红花黄色素 A; 减压提取; 扫描电镜; 响应面分析

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151215.0909.002.html>

[网络出版时间] 2015-12-15 9:09

Optimization of Vacuum-assisted Extraction Technology for Carthami Flos by Response Surface Methodology

WANG Ya-qi¹, HE Xiao-ru¹, WU Zhen-feng¹, ZHANG Xiao-fei²,
LAN Ji-ping¹, ZHENG Qin¹, YANG Ming^{1,2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate rationality of vacuum-assisted extraction (VAE) technology for Carthami Flos and optimize its extraction conditions. **Method:** Response surface methodology was used to optimize VAE technology of Carthami Flos with yield of hydroxy safflower yellow A as index, its major factors were boiling temperature, ethanol concentration, extraction time and cycles, which had influence on yield of hydroxy safflower yellow A were tested by an Box-Behnken design. Besides, micro-morphology of plant materials were observed by scanning electron microscope (SEM). **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extracted twice with 20 times the amount of 50% ethanol at 65 ℃, extraction time of 42 min for per time. Under these conditions, yield of hydroxy safflower yellow A reached 1.51%. **Conclusion:** Compared with conventional heat reflux extraction, VAE has higher extraction efficiency. VAE is an efficient and simple method for extracting hydroxy safflower yellow A from Carthami Flos, which shows great potential for becoming an alternative technique for extraction of heat sensitive compounds from traditional Chinese medicine.

[Key words] Carthami Flos; hydroxy safflower yellow A; vacuum-assist extraction; scanning electron microscope; response surface analysis

红花为菊科一年生草本植物红花的干燥筒状花冠,性温,味辛,具有活血通经、散瘀止痛之功效,常

[收稿日期] 20150624(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173565)

[第一作者] 王雅琪, 硕士, 讲师, 从事中药物质基础及工艺技术研究, Tel:0791-87118108, E-mail:wangyaqi_3@163.com

[通讯作者] * 杨明, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术/制药装备技术研究, Tel:0791-87118108, E-mail:temmingyang@163.com

与丹参、桃仁等配成药对,是传统的活血化瘀要药。红花中富含色素类成分,是一种纯天然染色剂。药理研究发现红花中主要有效成分羟基红花黄色素 A 具有抗脑缺血损伤^[1]、抗心肌损伤^[2]、抗氧化^[3]等作用,且因其可双向调节新生血管形成,有望成为一种新的肿瘤血管生成阻断剂而受到广泛重视^[4-5]。

羟基红花黄色素 A 具有热不稳定的特征,传统加工过程易降解损失,前期实验发现红花水提液中中间体相比较差,杂质较多,药材煎煮后黏稠易堵塞滤网,影响出汁效率。减压提取法是通过调节体系真空度,实现溶剂低温动态沸腾提取,可最大限度地保护热敏性成分,缩短提取时间,避免热解^[6]。在前期研究基础上,本实验以羟基红花黄色素 A 得率为指标,采用 Box-Behnken 效应面法研究各因素对其提取率的影响,并结合微观形态层面探寻其内在机制,为红花的开发利用提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),TG328A 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司),UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),V850 型压力控制器(瑞士 Buchi 公司),S-3500N 型扫描电子显微镜(日本日立公司)。

红花药材购于南昌市老百姓大药房,经江西中医药大学杨明教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* 的干燥花。羟基红花黄色素 A(中国食品药品检定研究院,批号 111637-201308),水为双蒸水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 羟基红花黄色素 A 的含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.5% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 10% ~ 30% A),检测波长 310 nm,柱温 25 °C,进样量 20 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取红花药材 10 g,置于减压提取装置中^[6],加入 50% 乙醇 200 mL,密塞,调节体系压力,60 °C 低温沸腾提取 2 次,每次 40 min,提取液双层纱布过滤后合并,提取溶剂冷却后定容于 1 000 mL 量瓶,摇匀,即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,加甲醇溶解定容于 50 mL 量瓶中,摇匀,得 334 mg·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取羟基红花黄色素 A 对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 3, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm

微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 2.983X + 1.574$ ($r = 0.9996$),线性范围 8.35 ~ 167 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液按 2.1.1 项下色谱条件连续测定 6 次,计算羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 2.0%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,加入已知含量的同一批红花药材 0.2 g 中(羟基红花黄色素 A 质量分数 1.6%),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,计算平均加样回收率 100.98%,RSD 2.8%。

2.2 Box-Behnken 效应面法优化提取工艺 选择乙醇体积分数、沸腾温度、提取次数、提取时间为自变量,每个自变量的试验水平分别以 -1, 0, 1 进行编码。固定料液比 1:20,以羟基红花黄色素 A 得率为因变量,采用 Box-Behnken 设计,共 29 个试验点,其中 24 个为析因点,5 个为零点(中心点重复试验),用于考察模型的误差。称取红花药材 10 g,按一定条件提取($n = 3$),试验安排及结果见表 1。

采用 Design Expert 7.1 软件分析试验数据,以编码值对 Box-Behnken 试验数据进行回归分析,得方程 $Y = 1.53 + 0.13A + 0.27B + 0.094C + 0.067D - 0.080AB - 0.18AC - 0.11AD - 0.15BC + 0.088BD - 0.082CD - 0.53A^2 - 0.46B^2 - 0.35C^2 - 0.37D^2$ 。为了更好地预测试验结果的可靠性,分别对回归模型的显著性、各变量的模型拟合参数及失拟项进行测试,方差分析结果见表 2。结果表明响应值的二次响应面模型达极显著水平,失拟项相对于纯误差并不显著,说明回归模型建立成功。

根据回归分析结果,固定 4 个因素中 2 个变量,绘制不同变量间相互作用对羟基红花黄色素 A 得率的影响,见图 1。结果显示 4 个因素间均存在明显的相互作用,表现为效应值的先增大后减小。当沸腾温度达到 60 ~ 75 °C 时,羟基红花黄色素 A 得率达最大范围,且随着沸腾温度的持续升高,羟基红

表 1 红花减压辅助提取工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 1 Box-Behnken test analysis for vacuum-assisted extraction technology of Carthami Flos

No.	A 乙醇 体积分数 /%	B 沸腾 温度 /℃	C 提取数 /次	D 提取 时间 /min	羟基红花 黄色素 A /%
1	50	60	2	40	1.670
2	50	40	2	60	0.428
3	20	80	2	40	1.066
4	50	60	2	40	1.505
5	80	60	1	40	0.872
6	50	80	2	20	0.874
7	50	60	3	20	0.957
8	80	60	3	40	0.842
9	20	40	2	40	0.105
10	50	80	1	40	0.757
11	50	40	1	40	0.189
12	80	40	2	40	0.402
13	50	60	3	60	0.963
14	20	60	1	40	0.171
15	50	80	3	40	0.628
16	50	60	2	40	1.503
17	80	60	2	60	0.579
18	20	60	2	20	0.129
19	50	60	1	20	0.728
20	50	60	1	60	1.063
21	50	60	2	40	1.619
22	80	80	2	40	1.042
23	50	40	3	40	0.651
24	50	40	2	20	0.523
25	20	60	3	40	0.861
26	50	80	2	60	1.129
27	50	60	2	40	1.315
28	20	60	2	60	0.509
29	80	60	2	20	0.657

花黄色素 A 得率下降。这可能与低温影响溶质在溶剂中的溶解度和扩散系数相关,当达到一定程度平衡后,长时间高温热处理过程可能会造成羟基红花黄色素 A 的降解。当乙醇体积分数达 45% ~ 60% 时,羟基红花黄色素 A 得率达最大范围,且随着乙醇体积分数的持续升高,羟基红花黄色素 A 得率下降。这可能与羟基红花黄色素 A 在溶剂中的溶解度相关,在溶剂中添加一定比例乙醇,能显著改善溶剂的黏度和扩散系数。当提取时间达 35 ~ 50 min,提取数达 2 次时,羟基红花黄色素 A 得率达最大范围,且随着提取时间的延长和提取次数的增加,羟基红花黄色素 A 得率下降,这可能与长时间高温热处理过程导致羟基红花黄色素 A 的降解有关。

2.3 验证试验 通过软件的处理预测这些因素的最佳水平为乙醇体积分数 52.46%,提取温度

表 2 响应面模型方差分析

Table 2 Analysis of variance for regression model

方差来源	SS	f	F	P
模型	4.76	14	7.83	0.000 2
A	0.20	1	4.63	0.049 3
B	0.85	1	19.64	0.000 6
C	0.10	1	2.42	0.142 3
D	0.054	1	1.24	0.284 5
AB	0.026	1	0.59	0.453 8
AC	0.13	1	2.99	0.105 9
AD	0.052	1	1.21	0.290 1
BC	0.087	1	2.01	0.177 9
BD	0.031	1	0.71	0.414 9
CD	0.027	1	0.62	0.442 8
A ²	1.83	1	42.11	0.000 1
B ²	1.38	1	31.75	0.000 1
C ²	0.79	1	18.30	0.000 8
D ²	0.88	1	20.21	0.000 5
残差	0.61	14		
失拟项	0.53	10	2.86	0.161 1

65.7 ℃,提取数 2 次,提取时间 42.17 min。此条件下,羟基红花黄色素 A 得率预测值 1.575%。称取红花药材 10 g,共 3 份,加 20 倍量 50% 乙醇于 65 ℃ 提取 2 次,每次 42 min,结果羟基红花黄色素 A 平均得率 1.51%,与预测值无显著性差异。

2.4 不同提取方式比较

2.4.1 常压乙醇提取法 准确称取红花药材 10 g,加 20 倍量 50% 乙醇常压热回流提取 2 次,每次 42 min,提取液合并,过滤,定容于 1 L 量瓶。计算羟基红花黄色素 A 得率 1.25%。与常压乙醇提取方法比较,减压提取工艺的羟基红花黄色素得率提高了 20.8%。说明减压提取工艺提高了提取效率。

2.4.2 常压水提取法 准确称取红花药材 10 g,加 20 倍量水常压热回流提取 2 次,每次 42 min,合并提取液,过滤,定容于 1 L 量瓶。计算羟基红花黄色素 A 得率 1.03%。与常压水提取方法比较,减压提取工艺的羟基红花黄色素得率提高了 46.6%。羟基红花黄色素 A 为水溶性成分,故红花常见提取方式多以水为溶剂,但水的极性较大,黏度较高,大分子杂质(蛋白质、多糖、鞣质等)易溶出,造成药材表面局部浓度过高,影响溶质的溶出和扩散,此结果与前期效应面分析结果相一致。

2.5 扫描电镜微观形态分析 分别取 2 种不同提取方式处理后的药材少许,铺于扫描电子显微镜样品台上,观察不同提取方式药材的表面微观形态,见图 2。结果发现经提取处理后,药材表面均出现一定程度的破坏,而经减压辅助提取方式处理后的药

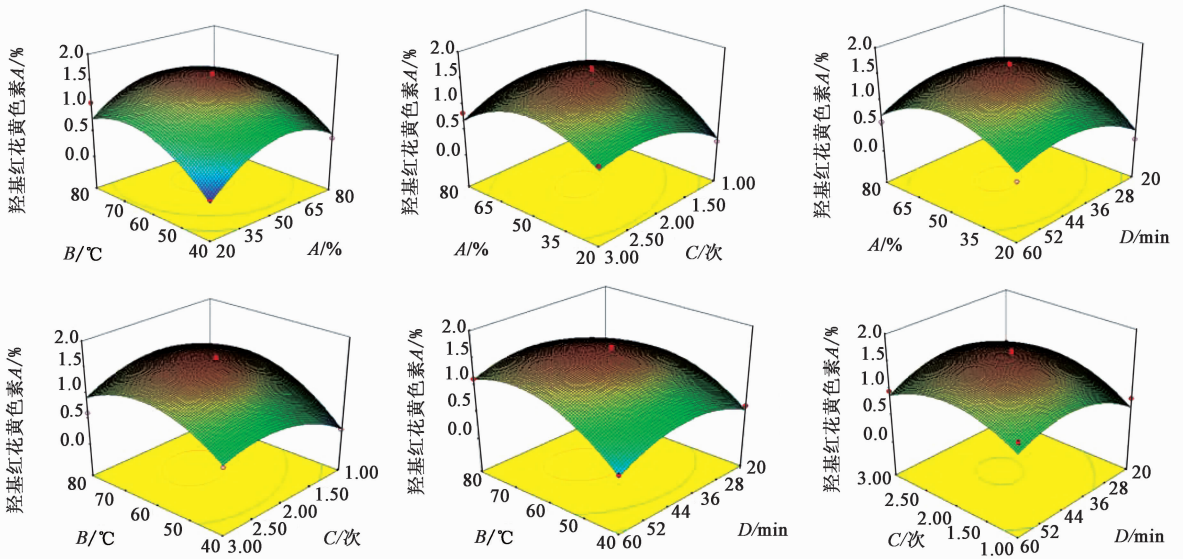


图 1 不同因素对效应值(羟基红花黄色素 A 得率)影响的 3D 曲面

Fig.1 3D surface and contour plot showing effects of variables on yield of hydroxy safflower yellow A

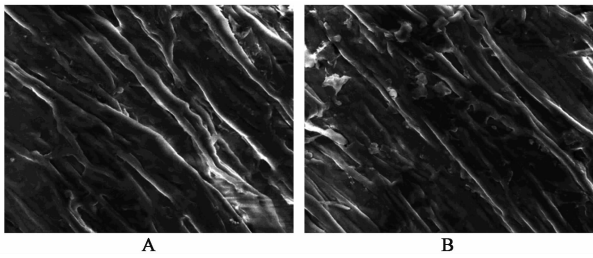


图 2 常规乙醇提取法(A)和减压乙醇提取法(B)处理后红花药材表面的 SEM(×3 000)

Fig.1 SEM of Carthami Flos after being treated with different method(×3 000)

材表面破坏程度强于常规提取法,直观证实减压辅助提取能有效破坏细胞微观形态,加速细胞内容物的溶出和释放,提高提取效率。

3 讨论

天然色素的种类和市场需求量大幅度增加,因为其具有天然和健康的属性^[7]。红花中富含色素类成分,以羟基红花黄色素 A 为典型代表。该成分为水溶性成分,热不稳定,传统加工过程以水为提取溶剂,沸腾温度高,易降解损失,且水提液中间体品相较差,大分子杂质较多,黏度大,影响溶质的溶出和扩散,从源头上会影响后续制剂质量。

本文以乙醇为提取溶剂,采用减压辅助提取法,在负压状态下进行回流提取,达到药效成分最适溶解度所对应的真空度时,溶液即可沸腾,一方面可降低沸腾的温度,避免药效成分降解损失;另一方面负压作用下可促进溶质的溶出,缩短提取时间,提高提取效率。采用 Box-Behnken 响应面法结合扫描电镜

微观分析证实,在溶剂中添加一定比例乙醇,能改善溶剂的溶解度和扩散系数,利于提取传质过程,对红花药材采用乙醇减压提取法较常压水提法提取羟基红花黄色素 A 具有一定优势。

[参考文献]

[1] 陈亭亭,杜玉娟,刘晓雷,等. 羟基红花黄色素 A 对脑缺血大鼠皮层炎症信号转导途径相关因子的抑制作用[J]. 药学学报,2008,43(6):570-575.

[2] 张媛,陈晨,刘倩,等. 红花黄色素对急性心肌缺血大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):282-284.

[3] 马勤,徐慧,阮影影,等. 红花黄色素对 Aβ1-42 诱导的痴呆大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中药药理与临床,2014,30(5):64-66.

[4] 张领,宋艳,李长龄,等. 羟基红花黄色素 A 对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中草药,2008,39(1):90-93.

[5] 奚胜艳,张前,刘朝阳,等. 红花组分 HSYA 对人胃腺癌 BGC-823 移植瘤裸鼠 VEGF 蛋白、KDR 与缺氧诱导因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(1):82-87.

[6] Wang Y Q, Wu Z F, Ke G, et al. An effective vacuum assisted extraction method for the optimization of labdane diterpenoids from *Andrographis paniculata* by response surface methodology [J]. *Molecules*, 2015, 20(1):430-435.

[7] 刘艳,张勤,吕志刚,等. 红花中非法添加色素得薄层色谱快速鉴别法[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):95-98.

[责任编辑 刘德文]