

闪式提取法提取大黄总蒽醌的工艺研究

罗黎霞¹, 易伟², 汤淮波², 王兴¹, 杨宁¹

(1. 湖南省湘潭市中医医院, 湖南 湘潭, 411100;

2. 湘潭大学, 湖南 湘潭, 411105)

[摘要] 目的: 优选大黄总蒽醌的提取工艺。方法: 以大黄游离总蒽醌为主要指标, 考察闪式法、超声法与回流法3种不同提取方法对其含量的影响, 并采用正交实验法优化闪式提取法的工艺。结果: 闪式法与回流法对大黄游离总蒽醌的提取率分别为87.1%、87.0%, 均高于超声提取法的84.3%; 闪式法每次提取时间为3min, 较回流法与超声法更为迅速高效。闪式提取法优选的工艺条件为: 料液比(g/mL)1:9, 提取时间80s, 转速4000r/min。结论: 闪式提取法能避免大黄蒽醌苷受热水解, 提取时间短、效率高、经济节能, 具有工业化生产应用的前景。

[关键词] 大黄总蒽醌; 闪式提取法; 正交实验

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.06.079

A process study on flash extraction for total anthraquinones in *Rheum officinale*

LUO Li-xia¹, YI Wei², TANG Huai-bo², WANG Xing¹, YANG Ning¹

(1. Xiangtan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangtan 411100, Hunan, China;

2. Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the optimal extraction process for total anthraquinones in *Rheum officinale*. Methods: The content of total dissociative anthraquinones in *Rheum officinale* was used as the main index to investigate the influence of flash extraction, ultrasonic extraction, and refluxing extraction on the content of total anthraquinones, and an orthogonal experiment was performed to optimize the process of flash extraction. Results: Flash extraction and refluxing extraction had a higher extraction rate of total dissociative anthraquinones than ultrasonic extraction (87.1%/87.0% vs 84.3%). The time of flash extraction was 3 minutes, which was significantly shorter than that of refluxing extraction and ultrasonic extraction. The optimal process of flash extraction was a solid-liquid ratio (g/ml) of 1:9, an extraction time of 80 seconds, and a rotating speed of 4000r/min. Conclusion: Flash extraction can avoid the hydrolysis of anthraquinone glycoside due to

本实验选择3种不同选育法得到的茯苓样品: 野生型, 湘靖28, 辐射一号, 其在加工性能、多糖含量方面都有一定的差异。(1)在加工性能方面。从折干率、出品率以及皮肉比3个方面比较, 折干率: 辐射一号 > 野生型 > 湘靖28; 出品率: 辐射一号 > 湘靖28 > 野生型; 皮肉比: 辐射一号 < 湘靖28 < 野生型; 可见辐射一号相比野生型、湘靖28具有明显优势。(2)从常见有效成分分析。多糖含量: 湘靖28 > 辐射一号 > 野生型, 辐射一号与其亲本的多糖含量相差不大, 而比野生型高出10%以上。但是由于辐射一号的折干率比湘靖28的高出很多, 所以鲜茯苓湘靖28多糖含量为29.200%, 辐射一号为33.137%, 辐射一号比母本高出3.937%。综合以上各方面考虑, 辐射一号是一个相对较优的品种, 主要的经济价值指标尤其明显, 可以作为新的品种进行推广。

参考文献

[1] 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, 2010: 224.

[2] Zhong ZJ, Liu J. Study progresses in triterpenes of *Poria cocos* and its pharmacology[J]. Chin Tradit Pat Med, 2001, 23(1): 58-62.

[3] 王坤凤. 茯苓化学成分及质量控制方法研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

[4] 熊杰, 林芳灿, 王克勤, 等. 茯苓基本生物学特性研究[J]. 菌类学报, 2006, 25(3): 446-453.

[5] 李利军, 孔红星, 陆丹梅. 蒽酮-硫酸法快速测定蔗糖的研究及应用[J]. 分析检测, 2003, 24(10): 145-149.

[6] 陈莉. 茯苓多糖提取工艺的优化及开发利用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007: 21-49.

[7] 黄才欢. 茯苓多糖的提取方法及其改性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2002: 10-19.

[8] 魏群. 基础生物化学实验(3版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 84-85.

[9] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 666-667. (收稿日期: 2017-09-11)

基金项目: 湖南省湘潭市科技计划项目(编号: SF-YB20161008)

第一作者: 罗黎霞, 女, 主任药师, 研究方向: 中药制剂研究

通讯作者: 汤淮波, 男, 药学博士, 讲师, 研究方向: 外用新剂型与新技术, E-mail: haibotang@126.com

heat in *Rheum officinale* and has a short extraction time, high efficiency, and low economic and energy costs. Therefore, it holds promise for application in industrial production.

Key words: Total anthraquinones in *Rheum officinale*; flash extraction; orthogonal experiment

大黄是蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.) 或药用大黄 (*Rheum officinale* Bail.) 的干燥根及根茎, 具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经之功效^[1]。现代药理学研究表明大黄主要的活性成分为蒽醌类物质, 大黄酸、大黄酚、大黄素、芦荟大黄素与芦荟大黄素甲醚等游离蒽醌具有抗炎、抗菌、降血脂与清除氧自由基等多种药理活性; 而这些游离蒽醌在大黄药材中以蒽醌苷形式存在, 大黄蒽醌苷为泻泄的主要活性成分^[2-3]。目前提取大黄总蒽醌类成分优选的方法为乙醇回流法^[4-5], 但蒽醌苷在煎煮过程中易受热转化为游离蒽醌而丧失泻下攻积的功效。闪式提取法是一种在室温条件下完成提取的技术, 具有避免活性成分受热破坏、提取时间短、效率高等诸多优点, 是一种日益应用广泛的新型中药提取技术^[6-9]。本文以大黄游离总蒽醌的含量为主要指标, 考察了超声提取法、回流提取法与闪式提取法等不同提取方法对大黄总蒽醌提取的影响, 并采用正交实验法优选了闪式提取法的工艺条件。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津高效液相色谱系统 (LC-20AT 高效液相色谱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, LCU Solution 工作站; 日本岛津公司); 色谱柱: InertSustain C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (GL Sciences Inc.); 高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AU220 型电子分析天平 (日本岛津); JHBE-50T 型闪式提取器 (河南智晶生物科技股份有限公司); PTHW 型电热套 (巩义市英峪予华仪器厂)。

1.2 试剂 芦荟大黄素 (批号: 984)、芦荟大黄素甲醚 (批号: 3987)、大黄素 (批号: 2669)、大黄酸 (批号: 938) 和大黄酚 (批号: 3612) 均购自上海诗丹德生物技术有限公司; 大黄购自湘潭市雨湖区谭邵路大药房, 经湘潭市中医院罗黎霞主任药师鉴定为蓼科植物药用大黄 (*Rheum officinale* Bail.) 的干燥根及根茎; 甲醇 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 磷酸 (分析纯, 湖南汇虹试剂有限公司); 哇哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法测定大黄游离蒽醌的含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱: InertSustain C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液 (85:15); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40℃; 进样量: 10 μL; 理论塔板数按大黄素计算不低于 3000。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品 9.8、10.1、17.0、15.5、12.1 mg, 分别置不同的 50 mL 量瓶中, 前 4 种用甲醇溶解并稀释至刻度, 后 1 种用乙酸乙酯溶解, 超声摇匀并定容; 再分

别精密量取上述对照品溶液 1 mL, 置于同一 25 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液。每 1 mL 含芦荟大黄素 7.84 μg、大黄酸 8.08 μg、大黄素 13.60 μg、大黄酚 6.20 μg、大黄素甲醚 9.68 μg。

2.1.3 供试品溶液的配制与测定 精密移取大黄提取液 5 mL, 置具塞圆底烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸 10 mL, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 用适量蒸馏水洗至中性, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 于“2.1.1”条件下测定大黄总蒽醌含量。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品溶液适量, 分别稀释成系列对照品溶液; 按“2.1.1”项下色谱条件进样 10 μL。以峰面积 (y) 与进样浓度 (x, μg/mL) 进行线性回归, 得各对照品线性回归方程。芦荟大黄素在 1.568 ~ 98 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 51980x + 4727.2$, $R^2 = 0.9996$; 大黄酸在 1.616 ~ 101 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 44627x + 13396$, $R^2 = 0.9997$; 大黄素在 2.72 ~ 170 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 32179x + 10216$, $R^2 = 0.9996$; 大黄酚在 1.24 ~ 77.5 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 52981x + 16232$, $R^2 = 0.9998$; 大黄素甲醚在 1.936 ~ 121 μg/mL 范围内有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 31843x + 1739.7$, $R^2 = 0.9996$ 。

2.2 提取方法考察

2.2.1 乙醇浓度对大黄提取的影响 称取 50.0 g 大黄粗粉 3 份, 分别加入 50%、75%、95% 乙醇 400 mL, 提取 2 次, 每次 1 h。随着乙醇浓度增大, 大黄总蒽醌提取量也随之增加, 乙醇浓度由低至高大黄总蒽醌提取量依次为 2.6936 mg/g、9.7907 mg/g、10.4476 mg/g。

2.2.2 不同提取方法研究 回流提取法: 称取大黄粗粉 50.0 g 加热回流提取 3 次, 第 1 次加入 95% 乙醇 400 mL, 第 2 次加入 95% 乙醇 300 mL, 第 3 次加入 95% 乙醇 200 mL, 每次回流提取 1 h, 提取液滤过, 合并 3 次滤液。闪式提取法: 称取大黄粗粉 50.0 g 提取 3 次, 第 1 次加入 95% 乙醇 400 mL, 第 2 次加入 95% 乙醇 300 mL, 第 3 次加入 95% 乙醇 200 mL, 每次提取 90 s, 提取液纱布滤过, 合并 3 次滤液。超声辅助提取法: 称取大黄粗粉药材 50.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加热超声提取 3 次, 第 1 次加入 95% 乙醇 400 mL, 第 2 次加入 95% 乙醇 300 mL, 第 3 次加入 95% 乙醇 200 mL, 每次超声提取 1 h。提取液纱布滤过, 分别合并各提取方法的 3 次滤液。

精密移取各方法提取液 5 mL, 按“2.1”项所述的方法制备供试品液, 并测定样品中各游离蒽醌的含量。各方法剩余的提取液浓缩, 置已恒重的蒸发皿中水浴蒸干, 烘箱烘干

至恒重:大黄浸膏率=大黄浸出物化合物质量/大黄质量×100% 闪提法与回流法提取的大黄游离蒽醌量接近,均高于超声法;浸膏率由高到低依次为回流法、闪提法与超声法(见表1)。回流法与超声法每次提取时间均为1h,而闪式提取法仅需3min,故闪式提取法更为迅速高效。

表1 不同方法提取大黄中游离蒽醌

提取方法	提取时间(min)	游离蒽醌提取量(mg/g)	提取率(%)	浸膏率(%)
回流法	60	9.450	87.0	37.7
超声法	60	9.169	84.3	25.5
闪提法	3	9.454	87.1	28.0

2.3 正交试验优化闪式提取的工艺 根据不同浓度乙醇对大黄提取影响的实验结果选择95%乙醇为提取溶剂,以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚与大黄素甲醚的总提取量为考察指标,选择转速(A)、料液比(B)、提取时间(C)3个因素,采用L₉(3⁴)正交设计表安排试验。因素水平见表2,正交试验结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素水平表

水平	A 转速(r/min)	B 料液比(mL/g)	C 提取时间(s)
1	3200	1:6	40
2	4000	1:9	80
3	4800	1:12	120

表3 闪式提取工艺正交试验安排及结果

实验号	因素				5种蒽醌提取量 (mg/g生药)
	A 转速(r/min)	B 料液比(mL/g)	C 提取时间(s)	D 空白列	
1	1	1	1	1	9.2367
2	1	2	2	2	11.4751
3	1	3	3	3	11.4495
4	2	1	3	2	8.6701
5	2	2	1	3	11.8827
6	2	3	2	1	13.7986
7	3	1	2	3	11.0727
8	3	2	3	1	13.8628
9	3	3	1	2	7.7458
K1	32.1613	28.9795	28.8652	36.8981	
K2	34.3514	37.2206	36.3464	27.891	
K3	32.6813	32.9939	33.9824	34.4049	
k1	10.7204	9.6598	9.6217	12.2993	
k2	11.4504	12.4068	12.1154	9.2970	
k3	10.8937	10.9979	11.3274	11.4683	
R	0.7301	2.747	2.4937	3.0023	

表4 大黄总蒽醌含量的方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
A	1.3173	2	0.6586	0.4712	
B	11.7662	2	5.8831	4.2088	
C	10.1936	2	5.0968	3.6463	
D	14.8638	2	7.4319		
误差	11.1836	8	1.3978		

正交试验方差分析F的检验结果表明,A、B、C3个因素

对提取率的影响都不显著。但是B、C2个因素对闪式提取大黄总蒽醌含量的影响具有统计学意义,因此,可从表3中的极差R中选择各因素对大黄总蒽醌提取率的影响大小。根据极差结果,各因素对大黄总蒽醌提取量的影响依次是B(料液比)>C(提取时间)>A(转速),并且B、C远>A。由k₁、k₂、k₃值的大小,各因素的最优水平为B₂C₂A₂,即闪式提取大黄总蒽醌的最优条件为:料液比(g/mL)为1:9,提取时间80s,转速4000r/min。

2.4 验证试验 按最佳工艺条件提取3份各100g大黄粗粉,测定总蒽醌含量,计算得率。3批供试品的得率分别为13.7523mg/g、13.0023mg/g、13.2305mg/g,平均得率为13.3283mg/g,显示此条件下大黄总蒽醌提取得率较高,方法重复性好。

3 讨论

大黄药材中蒽醌类成分以糖苷键结合成大黄蒽醌苷,这些蒽醌苷为泻热通便的主要活性成分,但大黄蒽醌苷易受热水解为游离蒽醌,煎药时需后下以减少蒽醌苷破坏。由于蒽醌苷稳定性差,2015版药典选择大黄酸、大黄素、大黄酚与芦荟大黄素与大黄素甲醚等游离蒽醌为大黄质量控制成分。本研究发现闪式提取法与回流提取法提取的5种游离蒽醌总量接近,但回流提取法加热时间长,大黄蒽醌苷易水解,且耗时、耗能、操作复杂。闪式提取技术是利用组织破碎提取法的基本原理,依靠高速电机带动内置刀片的高速转动,通过刀腔内负压将药材与溶剂吸入到刀腔内并在室温下将药材迅速粉碎为细微颗粒,药材所含的活性成分能迅速溶解与扩散到溶剂中。闪式提取法在室温条件完成,提取过程中能避免热敏的大黄蒽醌苷受热破坏,且提取时间短、效率高,经济节能;具有工业化提取大黄总蒽醌的前景。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:23-24.

[2] 王丽英,张丽珍,鲁刚英,等. 大黄药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2000,11(4):381-382.

[3] 李广峰. 大黄的药理作用及临床应用分析[J]. 中国医药指南,2013(16):317-318.

[4] 崔红花,赵英日,王淑美. 大黄蒽醌类成分的提取方法筛选及均匀设计优化工艺研究[J]. 中国药房,2010(7):612-614.

[5] 叶殷殷,曾元儿,曹骋,等. 大黄总蒽醌乙醇提取工艺优化实验[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):.

[6] 谢仲德,李文烈,方应权,等. 白芍中芍药苷的闪式提取工艺研究[J]. 中成药,2013,35(9):2037-2039.

[7] 冯素香,李晓玉,白燕,等. 回流提取法与闪式提取法提取姜黄中姜黄素的工艺对比研究[J]. 时珍国医国药,2015(2):348-350.

[8] 于敏,韩德强. 闪式提取法提取丹参中有效成分的研究[J]. 中成药,2010(9):1609-1612.

[9] 魏凤铃,齐敏超,钟加胜. 大黄蒽醌类成分提取工艺优选[J]. 中国中药杂志,1998,23(10):609.

(收稿日期:2017-10-18)