

大黄蒽醌提取工艺研究

程 磊¹ 杨 骏² 郭 静³

1. 上海中医药大学附属龙华医院(上海 200032); 2. 上海市黄浦区香山中医医院(上海 200020); 3. 苏州玉森新药开发有限公司(江苏 苏州 215125)

【摘要】 目的 研究并建立大黄蒽醌的提取方法。方法 采用 HPLC 法测定大黄中总蒽醌、游离蒽醌、结合蒽醌的含量,用正交试验方法确定大黄蒽醌提取工艺。结果 大黄蒽醌的最佳提取工艺为 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。结论 该优化工艺简便易行,重现性好,可用于大黄蒽醌的提取。

【关键词】 大黄蒽醌; 提取工艺; 正交试验

【中图分类号】 R284.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1007-1334(2012)02-0071-03

Study on extraction technology of anthraquinone in *Radix et Rhizoma Rhei*

CHENG Lei¹, YANG Jun², GUO Jing³

1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 2. Xiangshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huangpu Area, Shanghai; 3. Suzhou Youseen New Medicine Exploration Co. Ltd., Suzhou

Abstract: Objective To research and establish the extraction technology of anthraquinone in *Radix et Rhizoma Rhei*. **Methods** The content of total anthraquinone, free anthraquinone and conjugated anthraquinone were determined by HPLC method. The extraction process of anthraquinone in *Radix et Rhizoma Rhei* was determined by orthogonal test. **Results** The experiment suggested that extract anthraquinone with 8 times, 95% ethylalcohol for three times, once an hour is the best choice. **Conclusion** Extracting anthraquinone by this method is simple and convenient.

Keywords: anthraquinone; extraction process; orthogonal test

大黄来源于蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)或药用大黄(*Rheum officinale* Baill.)的干燥根及根茎,具有泻热通便、凉血解毒、逐瘀通经的作用,主要用于治疗实热便秘、咽肿、上消化道出血等疾病^[1]。大黄中主要含蒽醌类化合物,其中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及其苷类为其主要活性成分^[2]。大黄具有泻下、抗炎、降血压、抗菌、抗病毒、祛痰、抗肿瘤、降脂、减肥、改善胰岛素抵抗等功能^[3-5],而这些功能多与大黄的蒽醌类成分有关。本研究用正交试验法系统考察不同因素对大黄中总蒽醌、游离蒽醌、结合蒽醌提取率的影响,为确定大黄合理提取工艺提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 LC, DAD 检测器; sartorius BS110S 分析天平。

1.2 试剂 甲醇: HPLC, 美国 TEDIA, 批号: 210902。

其余试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 方法学研究

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Agilent XDB-C18; 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸(梯度洗脱); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μl。梯度洗脱条件详见表 1。

表 1 高效液相梯度洗脱条件

时间(min)	0.1% 磷酸	甲醇
0	25	75
13	25	75
14	10	90
20	10	90
21	0	100
25	0	100

2.1.2 样品制备 对照品溶液的制备: 精密称取芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇分别制成每毫升含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 20 μg 的混合对照品溶液。色谱图见图 1。

【基金项目】上海市自然科学基金项目(10ZR1426000); 上海市卢湾区卫生系统学科带头人培养项目(LWK0910)

【作者简介】程磊, 女, 药师, 主要从事中药制剂研究工作。

【通讯作者】杨骏, 副主任药师。E-mail: lgwshutcm@163.com

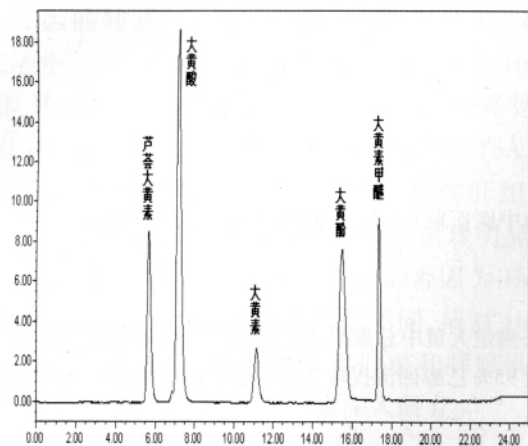


图1 混合标准品 HPLC 图谱

供试品溶液的制备: 游离性蒽醌: 精密称取大黄提取物 0.1 g, 至试管中, 三氯甲烷萃取 3 次, 每次 10 ml, 合并三氯甲烷层, 挥干, 加入甲醇定容至 10 ml 容量瓶。色谱图见图 2。

结合性蒽醌: 上述水层加入 0.6 ml 浓硫酸, 10 ml 三氯甲烷, 水浴回流 2 h, 冷却后取三氯甲烷层, 水层加入三氯甲烷萃取 3 次, 每次 10 ml, 合并三氯甲烷层, 挥干, 加入甲醇定容至 10 ml 容量瓶。

总蒽醌: 为游离性蒽醌与结合性蒽醌的总和。

分别以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚为指标, 加和结算得到游离性蒽醌、结合性蒽醌、总蒽醌含量。

2.1.3 线性关系试验 精密称取芦荟大黄素对照品 20.32 mg、大黄酸对照品 18.56 mg、大黄素对照品 17.25 mg、大黄酚对照品 20.13 mg、大黄素甲醚 19.11 mg 置同一 100 ml 量瓶中, 加 25% 甲醇定容摇匀, 分别精密量取上述溶液 2、4、6、8、10 ml 置 50 ml 量瓶中, 加 25% 甲醇定容摇匀即得。精密吸取 20 μ l 注入液相, 按上述色谱条件进行测定。以峰面积积分值为纵坐标, 对照品浓度为横坐标进行线性回归, 计算回归方程及相关系数表明芦荟大黄素在 8.13 ~ 40.64 μ g、大黄酸在 7.42 ~ 37.12 μ g、大黄素在 6.90 ~ 34.50 μ g、大黄酚在 8.05 ~ 40.26 μ g、大黄素甲醚在 7.64 ~ 38.22 μ g 范围内线性关系良好(表 2)。

表2 标准曲线结果

样品	回归方程	回归系数 R
芦荟大黄素	$y = 520.56x - 0.1102$	0.9999
大黄酸	$y = 105.24x + 0.6568$	0.9999
大黄素	$y = 230.72x + 4.1760$	0.9998
大黄酚	$y = 657.58x + 0.7215$	0.9999
大黄素甲醚	$y = 856.83x + 2.7636$	0.9998

2.1.4 精密度试验 精密称取游离型蒽醌样品 0.1123 g, 按供试品溶液制备方式处理, 连续进样 6 次,

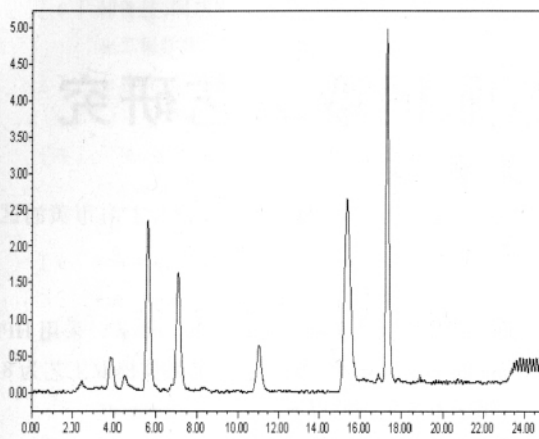


图2 供试品 HPLC 图谱

每次 20 μ l, RSD 分别为 0.11%、0.56%、0.28%、0.75%、1.03%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密称取游离型蒽醌样品 0.1205 g, 按供试品溶液制备方式处理, 分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 进样, 每次 20 μ l, RSD 分别为 0.36%、0.88%、0.42%、0.55%、1.22%, 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.2 大黄蒽醌提取工艺考察

2.2.1 乙醇浓度的考察 称取生大黄 400 g 粉碎, 分别加入 8 倍量 50%、75%、95% 乙醇, 加热回流 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 回收乙醇, 浓缩干燥, 称重, 按含量测定项下方法测定含量。随着乙醇浓度的增加而含量逐渐增加选择溶剂提取浓度为 95% 乙醇(表 3)。

表3 乙醇浓度考察结果

样品	含量(%)
乙醇浓度 50%	2.21
乙醇浓度 75%	2.46
乙醇浓度 95%	3.65

2.2.2 正交试验 为综合分析各因素的影响水平, 以大黄提取时间、乙醇溶剂倍量、提取次数为因素进行三因素三水平 $L_9(3^4)$ 考察, 以总蒽醌、游离型蒽醌、结合型蒽醌含量为考察指标, 优选提取工艺。因素水平见表 4。

表4 正交试验因素水平表

水平	A(提取时间)	B(乙醇用量)	C(提取次数)	D(空白)
1	0.5 h	3 倍	1 次	/
2	1 h	5 倍	2 次	/
3	2 h	8 倍	3 次	/

取大黄药材 9 份, 每份 40 g, 粉碎成粗粉, 加 95% 乙醇按表 4 正交试验设计提取, 合并滤液, 浓缩干燥, 并按 2.1 项下方法测定大黄中总蒽醌、游离蒽醌、结合蒽醌含量(表 5、表 6)。

表 5 正交实验结果

因素	A	B	C	D	总蒽醌 (mg/g)	游离蒽醌 (mg/g)	结合蒽醌 (mg/g)
实验 1	1	1	1	1	17.94	9.64	8.30
实验 2	1	2	2	3	28.87	19.01	9.86
实验 3	1	3	3	2	41.43	28.12	13.22
实验 4	2	1	2	2	29.86	19.85	10.01
实验 5	2	2	3	1	34.89	24.90	10.99
实验 6	2	3	1	3	30.67	18.52	12.15
实验 7	3	1	3	3	24.08	15.08	9.00
实验 8	3	2	1	2	29.77	20.07	9.70
试验 9	3	3	2	1	39.67	26.60	13.07

总蒽醌(mg/g)				结合蒽醌(mg/g)			
A	B	C	D	A	B	C	D
K1	88.24	71.88	78.38	92.5	31.38	27.31	30.15
K2	95.42	93.53	98.40	83.62	33.15	30.55	32.94
K3	93.52	111.77	100.40	101.06	31.77	38.44	33.21
R	7.18	39.89	22.02	17.44	1.77	11.13	3.06

表 6 方差分析结果

总蒽醌(mg/g)						结合蒽醌(mg/g)					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	9.23	2	4.61	0.18	0.85	A	0.58	2	0.29	0.89	0.53
B	265.85	2	132.92	5.24	0.16	B	21.85	2	10.92	33.71	0.03
C	98.85	2	49.93	1.95	0.34	C	1.91	2	0.96	2.95	0.25
D(误差)	50.70	2	25.35			D(误差)	0.65	2	0.32		

3 讨论

大黄中富含鞣质,如粉碎过细反而不易于对有效成分提取。本实验大黄药材均粉碎成粗粉后加 95% 乙醇提取。

目前大黄的提取方法很多,各种方法对大黄中蒽醌类成分的提取率都有不同的影响。煎煮法提取由于受热时间过长,大黄蒽醌成分,特别是大黄素存在湿热降解情况,因此水煎煮法会降低大黄蒽醌成分的提取率^[6]。因此,采用醇提法进行提取较为适宜。

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: 人民卫生出版社, 2010: 22.

根据方差分析结果,以因素 B 最为显著, A 没有显著性差异。根据直观分析结果三因素的影响为 $B > C > A$, 最终确定提取工艺为 $A_2B_3C_3$, 即: 取大黄药材粉碎成粗粉, 加 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h。
2.2.3 验证实验 取大黄药材 3 份, 每份 40 g 粉碎成粗粉, 用 8 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 减压干燥。测定大黄中总蒽醌、游离蒽醌、结合蒽醌含量。验证实验结果见表 7。

表 7 验证实验结果

	总蒽醌(mg/g)	游离蒽醌(mg/g)	结合蒽醌(mg/g)
样 1	33.58	18.54	15.04
样 2	34.12	19.02	15.10
样 3	32.05	17.66	14.39
平均	33.25	18.41	14.84
RSD(%)	3.23	3.75	2.65

由表 7 可知,应用优化后提取工艺进行三份验证试验,其含量与正交实验结果基本一致,说明该提取工艺稳定,重现性良好。

- [2] 徐翔, 郦柏平, 张慧芬. 大黄的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2003, 37(4): 56-59.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册) [M]. 上海: 上海科技出版社, 2005: 102-108.
- [4] 查兵兵, 张烁, 焦东海, 等. 大黄提取片对高脂饮食诱导肥胖大鼠能量代谢的影响[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(10): 57-59.
- [5] 张蓉, 朱榕峰, 徐俊, 等. 大黄素改善脂多糖引起的胰岛素抵抗机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(8): 71-73.
- [6] 苏子仁, 周华, 刘中秋. 大黄在提取精制工艺中的化学变化研究[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(2): 83-84.

编辑:季春来

收稿日期: 2011-09-10