

正交试验法优选大黄中蒽醌类成分提取工艺

窦志华¹, 曹 瑞^{2*}, 卞 理^{1*}, 许 波², 倪丽丽²

1. 南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 优化大黄中蒽醌类成分提取工艺。**方法** HPLC 法测定大黄药材中 8 个结合型蒽醌、5 个游离型蒽醌共计 13 个原型蒽醌及总蒽醌质量分数, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间和提取次数为考察因素, 分别以总蒽醌、5 个游离型蒽醌、8 个结合型蒽醌提取率为考察指标, 优化大黄总蒽醌、游离型蒽醌、结合型蒽醌提取工艺参数, 并对优化的工艺进行放大验证试验。**结果** 总蒽醌和游离型蒽醌最佳提取工艺为 5 倍量 75% 乙醇, 回流提取 5 次, 每次 30 min, 采用该工艺原型蒽醌类成分和总蒽醌提取率均在 90% 左右, 游离型蒽醌提取率超过 160%; 结合型蒽醌最佳提取工艺为 5 倍量 95% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 60 min, 采用该工艺原型蒽醌类成分提取率接近 90%, 结合型蒽醌提取率超过 80%。**结论** 优化的工艺简单、稳定、可行, 重复性好, 可分别用于大黄中总蒽醌和游离型蒽醌、结合型蒽醌的提取。

关键词: 大黄; 总蒽醌; 游离型蒽醌; 结合型蒽醌; 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: 0253-2670(2018)14-3279-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.013

Optimization of extract process of anthraquinones from *Rhei Radix et Rhizoma* by orthogonal test

DOU Zhi-hua¹, CAO Rui², BIAN Li¹, XU Bo², NI Li-li²

1. Nantong Third Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226006, China

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To optimize the extract process of anthraquinones from the *Rhei Radix et Rhizoma* (RRR). **Methods** The contents of eight bound anthraquinones (BAs) and five free anthraquinones (FAs), a total of 13 original anthraquinones, and total anthraquinones (TAs) in RRR were determined by HPLC. $L_9(3^4)$ orthogonal table was used, with ethanol concentration, solvent ratio, extract time, and number of extract as factors and extract quantity of TAs, five FAs, and eight BAs as the investigation index, respectively, the extract processes of TAs, FAs, and BAs from RRR were optimized. The optimized processes were verified by magnification test. **Results** The optimum extract process of TAs and FAs was as follows: five times of 75% ethanol, extracting five times by reflux, 30 min for each time. Using this process, the extraction rate for both original anthraquinones and TAs was about 90%, and FAs extraction rate was over 160%. The optimum extract process of BAs was as follows: five times of 95% ethanol, extracting three times by reflux, 60 min for each time. Using this process, original anthraquinones extraction rate was close to 90%, and the one of BAs was over 80%. **Conclusion** The optimized process is simple, stable, feasible, and repeatable, and can be used for the extraction of TAs, FAs, and BAs from RRR, respectively.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; total anthraquinones (TAs); free anthraquinones (FAs); bound anthraquinones (BAs); extraction process; orthogonal test

收稿日期: 2017-12-29

基金项目: 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2018674); 江苏省中医药科技计划项目(YB201836); 南通市应用基础研究计划项目(MS12016057); 南通市科技计划项目(YYZ16025); 南通市卫计委青年科研基金课题(WQ2016018)

作者简介: 窦志华, 博士, 主任中药师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。

Tel: (0513)85116018 E-mail: zhihuadou@163.com

*通信作者 卞 理, 女, 硕士, 药师, 主要从事中药质量评价研究。Tel: (0513)89093866 E-mail: 339466880@qq.com

曹 瑞, 女, 在读硕士, 主要从事中药检验与质量分析研究。Tel: 17766096300 E-mail: 1334951821@163.com

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Bail. 的干燥根和根茎，为常用中药^[1]，其有效成分主要为蒽醌类化合物^[2-4]，包括游离型蒽醌和结合型蒽醌，前者主要有大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚，后者主要为这些游离型蒽醌与葡萄糖结合成的苷^[5-6]。近年来研究表明，大黄所含的蒽醌类成分具有肝、肾保护和肝、肾毒性“双重作用”^[7-11]，但发挥肝、肾保护作用及产生肝、肾毒性的是游离型蒽醌还是结合型蒽醌目前并不清楚^[12-15]。尽管大黄中游离型蒽醌含量仅占总蒽醌类成分的10%~20%^[16]，但目前的研究几乎仅围绕游离型蒽醌，结合型蒽醌的报道较少^[17]，其原因是结合型蒽醌不稳定，提取纯化比较困难^[18]。

本课题组前期采用正交试验法，以提取液加酸水解后的大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚提取率为考察指标，以这5个成分占药材总蒽醌含量百分比设权重进行综合加权评分法，考察了大黄药材中蒽醌类成分提取工艺^[19]，过程比较繁琐，且仍未解决结合型蒽醌的提取问题。因此，本实验分别以总蒽醌、5个游离型蒽醌及8个结合型蒽醌提取率为指标，采用正交试验法，分别考察了总蒽醌、游离型蒽醌和结合型蒽醌的提取工艺，为下一步分别提取、分离游离型蒽醌和结合型蒽醌，并进行大黄肝、肾保护及毒性评价奠定基础。

1 仪器与试药

Waters Alliance 高效液相色谱系统，e2695 分离单元+2998 二极管阵列检测器+Empower 色谱工作站，美国 Waters 公司；SK5200H 超声波清洗器，上海科导超声仪器有限公司；Sartorius BT 25S 型电子天平，德国赛多利斯公司。

对照品大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷（批号 150122，质量分数≥98%）、芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷（批号 141225，质量分数≥98%）、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷（批号 141211，质量分数≥98%）、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷（批号 150325，质量分数≥98%）、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷（批号 150114，质量分数≥98%）、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷（批号 141209，质量分数≥98%）、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷（批号 141212，质量分数≥98%）、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷（批号 150120，质量分数≥98%）均购自成都克洛玛生物科技有限公司；对照品芦荟大黄素（批号 110795-

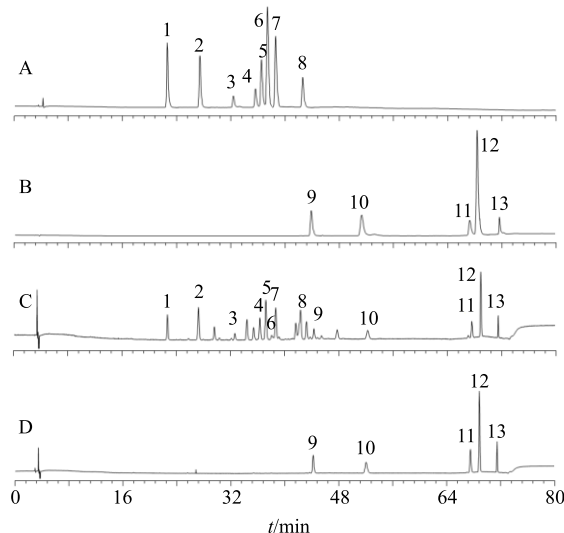
201007，质量分数 98%）、大黄素甲醚（批号 110758-201013，质量分数 99.8%）、大黄酸（批号 110757-200206，质量分数≥98%）、大黄素（批号 110756-200110，质量分数≥98%）、大黄酚（批号 110796-201118，质量分数 99.5%）购自中国食品药品检定研究院。甲醇，色谱纯，国药集团化学试剂有限公司；纯净水，杭州娃哈哈集团有限公司。

大黄药材（批号 130703，产地甘肃礼县）购自南通三越中药饮片公司，经南通市食品药品监督管理局中心龚旭东主任中药师鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 蒽醌类成分含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液，按文献梯度洗脱^[16]；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 430 nm。以上条件下的混合对照品及样品色谱图见图 1。



1-芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 2-大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷 3-大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 4-大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 5-大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 6-芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷 7-大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 8-大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 9-芦荟大黄素 10-大黄酸 11-大黄素 12-大黄酚 13-大黄素甲醚

1-aloe emodin-8-*O*-glucopyranoside 2-rhein-8-*O*-glucopyranoside 3-emodin-1-*O*-glucopyranoside 4-chrysophanol-1-*O*-glucopyranoside 5-chrysophanol-8-*O*-glucopyranoside 6-aloe emodin-3-CH₂-*O*-glucopyranoside 7-emodin-8-*O*-glucopyranoside 8-phycion-8-*O*-glucopyranoside 9-aloe emodin 10-rhein 11-emodin 12-chrysophanol 13-phycion

图1 结合型蒽醌 (A)、游离型蒽醌 (B) 混合对照品溶液和提取液 (C) 及总蒽醌 (D) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A, B), extract solution (C), and TAs (D)

2.1.2 对照品溶液的制备 取结合型蒽醌对照品适量,精密称定,加 70%甲醇溶解,配成芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷质量分数分别为 56.4、96.4、12.12、24.72、44.4、72.4、51.2、29.96 $\mu\text{g/mL}$ 的结合型蒽醌混合对照品溶液 A。精密量取 1 mL 结合型蒽醌混合对照品溶液 A,置 25 mL 量瓶中,加 70%甲醇至刻度,摇匀,配成结合型蒽醌混合对照品溶液 B。取游离型蒽醌对照品

适量,精密称定,配成芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚质量分数分别为 33.2、68.8、23.2、10.4、83.6 $\mu\text{g/mL}$ 的游离型蒽醌混合对照品溶液 A。精密量取 1 mL 游离型蒽醌混合对照品溶液 A,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,配成游离型蒽醌混合对照品溶液 B。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取结合型蒽醌和游离型蒽醌混合对照品溶液 B 12.5、25 μL ,混合对照品溶液 A 5、10、20、30、40 μL 进样,测定各成分峰面积值,以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归处理,得 13 个成分的回归方程及线性范围见表 1。

表 1 13 个成分回归方程及线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of 13 constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ng
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=9.14 \times 10^5 X-1.65 \times 10^4$	0.999 9	28.20~2 256.00
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=5.69 \times 10^5 X-1.00 \times 10^4$	0.999 9	48.20~3 856.00
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=9.23 \times 10^5 X-4.37 \times 10^3$	0.999 9	6.06~484.80
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=7.43 \times 10^5 X-6.25 \times 10^3$	0.999 9	13.36~988.80
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.04 \times 10^6 X-1.32 \times 10^4$	0.999 9	22.20~1 776.00
芦荟大黄素-3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.03 \times 10^6 X-1.61 \times 10^4$	0.999 9	36.20~289.60
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=8.88 \times 10^5 X-8.21 \times 10^3$	0.999 9	25.60~2 048.00
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.01 \times 10^6 X-1.15 \times 10^4$	0.999 9	14.98~1 198.40
芦荟大黄素	$Y=1.86 \times 10^6 X-8.79 \times 10^3$	0.999 9	16.60~132.80
大黄酸	$Y=1.02 \times 10^6 X-8.69 \times 10^3$	0.999 9	34.40~275.20
大黄素	$Y=1.90 \times 10^6 X-1.00 \times 10^4$	0.999 9	11.60~928.00
大黄酚	$Y=2.37 \times 10^6 X-5.07 \times 10^4$	0.999 9	5.20~416.00
大黄素甲醚	$Y=3.72 \times 10^5 X-9.43 \times 10^3$	0.999 9	41.80~3 344.00

2.1.4 精密度试验 分别精密吸取 5 个游离型蒽醌和 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液 A 10 μL ,连续进样 6 次,记录 8 个结合型蒽醌(芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷)和 5 个游离型蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚)的峰面积积分值,计算 RSD,结果分别为 2.51%、0.65%、2.24%、2.54%、2.50%、0.48%、3.35%、2.46%、0.68%、4.07%、2.38%、0.84%、1.74%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 分别精密吸取正交试验 5 提取液供试品溶液 20 μL 和总蒽醌供试品溶液 10 μL ,分别于制备后的 0、3、6、9、12、24 h 进样测定,

记录提取液供试品溶液中 8 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌、总蒽醌供试品溶液中 5 个游离型蒽醌的峰面积积分值,计算 RSD,结果前者 13 个成分分别为 2.52%、2.07%、4.29%、3.01%、2.58%、2.04%、1.93%、1.96%、2.03%、1.75%、3.24%、1.64%、3.15%,后者 5 个成分分别为 2.42%、1.29%、2.13%、1.62%、1.69%,表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.6 重复性试验 称取大黄粉末 6 份,每份各约 5 g,精密称定,按正交试验方案 5 提取,并制备提取液供试品溶液和总蒽醌供试品溶液,分别精密吸取提取液供试品溶液 20 μL 和总蒽醌供试品溶液 10 μL ,进样测定,计算 8 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌共计 13 个原型蒽醌类成分的质量分数及 RSD、总蒽醌(以酸解后 5 个游离型蒽醌计)的质量分数及 RSD,结果 13 个原型蒽醌类成分的平均质量分

数分别为 1.474、2.863、0.386、1.507、2.698、0.777、2.487、2.203、1.879、4.688、1.576、4.227、5.706 mg/g, RSD 分别为 3.48%、4.11%、3.04%、4.49%、3.46%、4.73%、4.17%、4.77%、4.33%、4.21%、4.16%、3.93%、3.15%; 总蒽醌的平均质量分数分别为 3.637、7.989、4.160、8.872、13.326 mg/g, RSD 分别为 4.16%、5.39%、4.48%、5.21%、5.23%, 表明正交试验的重复性良好。

2.2 药材中蒽醌类成分含量测定

2.2.1 原型蒽醌类成分供试品溶液制备 取大黄粗粉 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 95 mL 左右, 超声提取 30 min, 放冷后甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。剩余续滤液备用。

2.2.2 总蒽醌供试品溶液制备 取“2.2.1”项剩余续滤液 10 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 20 mL, 再加三氯甲烷 20 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 20 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 含量测定及结果 分别精密吸取原型蒽醌类成分供试品溶液 10 μ L 和总蒽醌供试品溶液 20 μ L,

进样测定, 计算 6 份样品中各成分的平均质量分数, 结果芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 8 个原型结合型蒽醌平均质量分数分别为 3.193、5.603、0.751、3.426、4.638、1.077、3.649、4.735 mg/g, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 5 个原型游离型蒽醌平均质量分数分别为 0.696、1.712、1.070、3.022、3.976 mg/g; 总蒽醌 (以 5 个游离型蒽醌计算) 平均质量分数分别为 3.877、8.909、4.64、10.71、16.39 mg/g。

2.3 正交试验设计及结果分析

2.3.1 正交试验设计 以乙醇体积分数 (A)、乙醇用量 (B)、回流次数 (C) 和回流时间 (D) 为考察因素, 每个因素设 3 个水平, 称取大黄粗粉约 5 g, 共 9 份, 精密称定, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。因素水平见表 2, 试验设计及结果见表 3、4。

表 2 正交试验因素水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平	A/%	B/倍	C/次	D/min
1	55	3	3	30
2	75	4	4	45
3	95	5	5	60

表 3 正交试验设计及结果

Table 3 Orthogonal test design and grading results

试验号	A	B	C	D	总蒽醌提取率/(mg·g ⁻¹)	5 个游离型蒽醌提取率/(mg·g ⁻¹)	8 个结合型蒽醌提取率/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	30.755	13.028	12.296
2	1	2	2	2	32.095	13.606	10.150
3	1	3	3	3	37.606	14.632	18.697
4	2	1	2	3	37.828	13.906	18.229
5	2	2	3	1	39.513	18.239	14.862
6	2	3	1	2	38.948	19.651	15.149
7	3	1	3	2	36.186	8.739	19.976
8	3	2	1	3	33.723	9.107	21.199
9	3	3	2	1	37.164	9.956	22.310

2.3.2 各成分提取率测定 合并各次试验提取液, 置 250 mL 量瓶中, 加相应体积分数乙醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 得续滤液 A, 精密吸取 1 mL 续滤液 A 置 10 mL 量瓶中, 加相应体积分数乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 续滤液即为提取液供试品溶液;

精密吸取 2 mL 续滤液 A, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 40 mL, 再加三氯甲烷 40 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷振摇提取 3 次, 每次 20 mL, 合并三氯甲烷液,

表 4 正交试验各样品含量测定结果
Table 4 Orthogonal test results of determination of each sample

成分	提取率/(mg·g ⁻¹)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
原型结合型蒽醌									
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.372	1.065	2.012	2.009	1.533	1.455	2.128	2.335	2.482
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.417	2.105	4.231	3.932	3.014	3.020	4.667	4.848	4.536
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.345	0.317	0.515	0.521	0.399	0.411	0.639	0.616	0.650
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.304	0.971	2.195	2.301	1.585	1.621	2.858	2.925	2.988
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.306	1.822	3.635	3.518	2.603	2.866	3.281	3.853	3.966
芦荟大黄素-3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.679	0.780	0.847	0.737	0.816	0.824	0.571	0.616	0.703
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.941	1.570	2.860	2.795	2.569	2.543	2.899	2.958	3.220
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.932	1.522	2.403	2.415	2.343	2.409	2.933	3.047	3.765
原型游离型蒽醌									
芦荟大黄素	1.149	1.523	1.507	1.223	1.921	1.888	0.680	0.681	0.777
大黄酸	3.155	4.346	4.410	2.919	4.646	4.636	1.441	1.482	1.638
大黄素	1.021	1.347	1.244	1.101	1.594	1.587	0.860	0.890	0.985
大黄酚	3.273	2.367	2.944	3.491	4.219	4.969	2.380	2.549	2.680
大黄素甲醚	4.430	4.023	4.527	5.172	5.858	6.571	3.377	3.505	3.877
总蒽醌									
芦荟大黄素	2.946	3.112	3.546	3.374	3.776	3.460	3.285	3.002	3.488
大黄酸	7.356	8.002	9.241	7.514	8.510	8.087	6.816	6.429	5.971
大黄素	3.282	3.653	4.140	4.105	4.243	4.117	3.858	3.508	4.138
大黄酚	6.903	6.698	8.291	9.242	9.246	9.327	8.900	8.448	9.466
大黄素甲醚	10.267	10.629	12.389	13.593	13.737	13.956	13.327	12.337	14.101

减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解并转移至 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,续滤液即为总蒽醌供试品溶液。分别精密吸取各次试验提取液供试品溶液 20 μL、总蒽醌供试品溶液 10 μL 进样测定,并计算各成分提取率。结果见表 4。

2.3.3 以总蒽醌提取率为指标的正交试验结果分析 以各次试验总蒽醌提取率(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚合计)为指标,对结果进行统计和方差分析。从表 5 中极差可以看出,各因素对大黄中总蒽醌类提取率影响的大小顺序为乙醇体积分数(A)>回流次数(C)>乙醇用量(B)>回流时间(D);由表 6 方差分析结果可知,乙醇体积分数、乙醇用量、回流次数对总蒽醌提取率有显著影响($P<0.05$),回流时间无明显影响($P>0.05$)。从生产实际考虑,如果以总蒽醌提取率为目标,可以将提取工艺确定为 A₂B₃C₃D₁,即 5 倍量 75%乙醇,回流提取 5 次,每次 30 min。

2.3.4 以游离型蒽醌提取率为指标的正交试验结果

分析 以各次试验 5 个原形游离型蒽醌提取率之和为指标,对结果进行统计和方差分析。从表 5 中极差可以看出各因素对大黄游离型蒽醌提取率影响的大小顺序为乙醇体积分数(A)>乙醇用量(B)>回流时间(D)>回流次数(C),由表 6 方差分析结果可知,乙醇体积分数对游离型蒽醌提取率有显著影响($P<0.05$),乙醇用量、回流时间和回流次数无明显影响($P>0.05$)。从生产实际和资源利用综合考虑,如果以游离型蒽醌提取率为目标,可以将提取工艺确定为与提取总蒽醌相同,为 A₂B₃C₃D₁,即 5 倍量 75%乙醇,回流提取 5 次,每次 30 min。

2.3.5 以结合型蒽醌提取率为指标的正交试验结果分析 以各次试验 8 个结合型蒽醌提取率之和为指标,对结果进行统计和方差分析。从表 5 中极差可以看出,各因素对大黄结合型蒽醌提取率影响的大小顺序为乙醇体积分数(A)>回流时间(D)>乙醇用量(B)>回流次数(C);由表 6 方差分析结果可知,乙醇体积分数对结合型蒽醌提取率有显著

表 5 直观分析结果

Table 5 Results of visual analysis

水平	总蒽醌提取率				5 个游离型蒽醌提取率				8 个结合型蒽醌提取率			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	100.456	104.769	103.426	107.432	41.266	35.673	41.786	41.223	41.143	50.501	48.644	49.468
K_2	116.289	105.331	107.087	107.229	51.796	40.952	37.468	41.996	48.240	46.211	50.689	45.275
K_3	107.073	113.718	113.305	109.157	27.802	44.239	41.610	37.645	63.485	56.156	53.535	58.125
R	15.833	8.949	9.879	1.928	23.994	8.566	4.318	4.351	22.342	9.945	4.891	12.850

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis

方差来源	自由度	总蒽醌提取率			5 个游离型蒽醌提取率			8 个结合型蒽醌提取率		
		偏差平方和	F 值	显著性	偏差平方和	F 值	显著性	偏差平方和	F 值	显著性
A	2	42.155 9	56.323 1	$P<0.05$	96.430 2	26.843 6	$P<0.05$	86.882 5	21.598 6	$P<0.05$
B	2	16.749 1	22.385 9	$P<0.05$	12.449 8	3.465 7		16.587 3	4.123 5	
C	2	16.629 0	22.225 3	$P<0.05$	3.981 4	1.108 3		4.022 6	1.000 0	
D	2	0.748 2	1.000 0		3.592 3	1.000 0		28.627 5	7.116 7	

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

影响 ($P<0.05$)，回流时间、乙醇用量和回流次数无明显影响 ($P>0.05$)。从生产实际和资源利用综合考虑，如果以结合型蒽醌提取率为目标，可以将提取工艺确定为 $A_3B_3C_1D_3$ ，即 5 倍量 95%乙醇，回流提取 3 次，每次 60 min。

2.4 验证试验

2.4.1 游离型蒽醌和总蒽醌提取工艺验证试验 称取大黄粗粉 3 份，每份 50 g，按 $A_2B_3C_3D_1$ 工艺（5 倍量 75%乙醇，回流 5 次，每次 30 min）提取，测定 13 个原型蒽醌类成分（8 个结合型、5 个游离型）和总蒽醌提取率，并根据样品中平均含量计算提取转移率，结果见表 7。

由表 7 可知，优选的工艺重复性良好，原型蒽醌类成分和总蒽醌平均提取转移率均在 90%左右，表明该工艺稳定可行。但是 8 个结合型蒽醌的平均提取转移率仅为 60.58%，5 个游离型蒽醌的平均提取转移率却达到 166.16%，提示部分结合型蒽醌水解成了游离型蒽醌。

2.4.2 结合型蒽醌提取验证试验 称取大黄粗粉 3 份，每份 50 g，按 $A_3B_3C_1D_3$ （5 倍量 95%乙醇，回流提取 3 次，每次 60 min）提取，测定 8 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌提取率，并根据样品中平均含量计算提取率，结果见表 8。可知优选的工艺重复性良好，原形蒽醌类成分提取率保持在接近 90%基础上 8 个结合型蒽醌类平均提取率提高到 84.76%，

5 个游离型蒽醌的平均提取率降低为 101.07%，表明该工艺稳定可行，结合型蒽醌水解明显减少。

3 讨论

结合蒽醌在提取过程中易水解成游离蒽醌^[18]，提取溶剂中含水量、提取温度和时间提高均会加速水解过程^[20]。试验药材中芦荟大黄素等 5 个游离型蒽醌质量分数之和为 10.476 mg/g，芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷等 8 个结合型蒽醌质量分数为 27.073 mg/g，结合表 4 数据可以计算得，正交试验 1~6（提取溶剂为 55%和 75%乙醇）5 个游离型蒽醌的提取率分别为 124.36%、129.88%、139.67%、132.74%、174.10%、187.58%，8 个结合型蒽醌的提取率分别为 45.42%、37.49%、69.06%、67.33%、54.9%、55.96%，正交试验 7~9（提取溶剂为 95%乙醇）5 个游离型蒽醌的总提取率分别为 83.42%、86.93%、95.04%，8 个结合型蒽醌的总提取率分别为 73.79%、78.3%、82.41%，表明采用正交试验 1~6 方案，提取过程中有大量结合型蒽醌水解为游离型蒽醌，而采用正交试验 7~9 方案则结合型蒽醌未见明显水解，提示水解与提取溶剂乙醇体积分数有关，乙醇中含水量高会发生水解。分别采用优选的游离型蒽醌和总蒽醌提取工艺、结合型蒽醌提取工艺进行放大验证试验的结果也表明，2 种工艺 13 个原型蒽醌类成分提取率均在 90%左右，但前者 8 个结合型蒽醌的平均提取率仅为 60.58%，5 个游离型蒽醌的平

表 7 验证试验结果 (游离型蒽醌和总蒽醌)

Table 7 Results of confirmatory test (FAs and TAs)

成分	1		2		3		平均值	
	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%
原型蒽醌类成分								
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.397	43.74	1.455	45.58	1.461	45.76	1.438	45.03
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.208	57.26	3.407	60.80	3.337	59.55	3.317	59.20
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.350	46.52	0.367	48.79	0.371	49.43	0.363	48.25
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	1.844	53.81	1.905	55.61	1.899	55.42	1.883	54.95
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.862	61.70	2.964	63.91	2.948	63.57	2.925	63.06
芦荟大黄素-3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.591	54.89	0.596	55.31	0.593	55.09	0.593	700.75
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.787	76.38	2.866	78.54	2.872	78.69	2.841	80.27
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.305	48.67	2.387	50.40	2.433	51.37	2.375	50.15
结合型蒽醌合计	15.343	59.07	15.946	61.40	15.914	61.27	15.734	60.58
芦荟大黄素	1.489	213.87	1.467	210.66	1.502	215.70	1.486	213.41
大黄酸	3.200	186.85	3.102	181.13	3.168	185.01	3.157	184.33
大黄素	1.540	143.95	1.526	142.63	1.576	147.38	1.547	144.65
大黄酚	4.219	139.62	4.183	138.44	4.311	142.66	4.238	140.24
大黄素甲醚	6.952	174.84	6.865	172.65	7.122	179.13	6.979	175.54
游离型蒽醌合计	17.399	166.08	17.142	163.63	17.680	168.76	17.407	166.16
原型蒽醌类成分合计	32.742	89.83	33.088	90.78	33.594	92.17	33.141	90.93
总蒽醌								
芦荟大黄素	2.622	67.63	2.654	68.47	2.746	70.82	2.674	68.98
大黄酸	5.367	60.25	5.166	57.99	5.613	63.01	5.382	60.42
大黄素	4.188	90.26	4.171	89.89	4.190	90.31	4.183	90.15
大黄酚	10.233	95.55	10.155	94.82	10.633	99.28	10.340	96.55
大黄素甲醚	16.172	98.68	15.197	92.72	17.051	104.03	16.140	98.48
总蒽醌合计	38.582	86.65	37.343	83.87	40.232	90.36	38.719	86.96

表 8 验证试验结果 (结合型蒽醌)

Table 8 Results of confirmatory test (BAs)

成分	1		2		3		平均值	
	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%	提取率/(mg·g ⁻¹)	转移率/%
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.789	87.35	2.717	85.09	2.727	85.39	2.744	85.94
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	4.902	87.48	5.040	89.95	4.961	88.54	4.968	88.66
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.779	103.66	0.742	98.80	0.795	105.74	0.772	102.73
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.282	95.81	3.250	94.86	3.254	94.98	3.262	95.22
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	4.454	96.04	4.377	94.38	4.540	97.89	4.457	96.11
芦荟大黄素-3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	0.872	80.98	0.925	85.89	0.886	72.82	0.894	83.05
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.763	103.13	3.719	101.91	3.763	98.47	3.748	102.73
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.113	44.62	1.984	41.90	2.206	46.58	2.101	44.37
结合型蒽醌合计	22.955	84.79	22.754	84.05	23.132	85.44	22.947	84.76
芦荟大黄素	0.723	103.84	0.733	105.28	0.708	101.65	0.721	103.59
大黄酸	1.788	104.39	1.741	101.67	1.732	101.15	1.754	102.40
大黄素	1.066	99.63	1.058	98.92	1.082	101.14	1.069	99.89
大黄酚	2.928	96.89	2.855	94.48	2.939	97.26	2.907	96.21
大黄素甲醚	4.126	103.76	4.190	105.38	4.096	103.02	4.137	104.05
游离型蒽醌合计	10.629	101.46	10.577	100.96	10.557	100.77	10.588	101.07
原形蒽醌类成分合计	33.585	89.44	33.332	88.77	33.689	89.72	33.535	89.31

均提取率却达到 166.16%，后者 8 个结合型蒽醌类平均提取率提高到了 84.76%，5 个游离型蒽醌的平均提取率降低为 101.07%，表明后者明显减少了结合型蒽醌水解，再次提示乙醇体积分数是影响结合型蒽醌提取率的主要因素，与文献报道一致^[20]。因此，要保持提取过程中大黄蒽醌类成分不发生转化，宜采用 95%乙醇作为提取溶剂。

包括《中药化学》教科书在内的大部分文献均记载大黄结合型蒽醌易溶于甲醇、乙醇中，所以本实验开始采用甲醇作为混合对照品溶液制备的溶剂，但在实际操作中发现，芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷等 8 个结合型蒽醌对照品在甲醇中的溶解度均较小，如 1 mg 大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、4 mg 大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、3 mg 大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷均不能在 10 mL 甲醇中完全溶解，属于《中国药典》定义的“几乎不溶或不溶”，1 mg 芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷不能在 2 mL 甲醇中完全溶解，属于药典定义的“极微溶解”，这些造成了实验所需的浓度无法溶解，改用 70%甲醇才解决了对照品的溶解问题。检索文献发现^[21-22]，也有“结合型蒽醌能溶于水、乙醇、碳酸氢钠溶液，但在有机溶剂中的溶解度很小”的记载。本实验总蒽醌提取工艺以酸解后的总蒽醌（芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚之和）为考察指标，结果与先期研究^[19]相同，但简化了计算过程。

参考文献

- [1] 刘杰, 刘培, 郭盛, 等. 掌叶大黄不同组织器官中主要资源性化学成分的分析评价 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 567-572.
- [2] 冯素香, 李蒙蒙, 李晨, 等. HPLC-MS 法测定大鼠体内大黄素血药浓度及药动学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1971-1976.
- [3] 于飞, 李苏宁. 大黄蒽醌在大鼠体内的药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(12): 2313-2320.
- [4] Zhan H, Fang J, Wu H W, *et al.* Rapid determination of total content of five major anthraquinones in *Rhei Radix et Rhizoma* by NIR spectroscopy [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 250-257.
- [5] 窦志华, 乔进, 卞理, 等. 指纹图谱与一测多评法相结合的大黄质量控制方法 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(5): 442-448.
- [6] 谭鹏, 张海珠, 李洋, 等. 基于活血生物效价检测大黄中 10 个蒽醌类成分抗血小板聚集作用初步研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 859-865.
- [7] Zeng L N, Ma Z J, Zhao Y L, *et al.* The protective and toxic effects of rhubarb tannins and anthraquinones in treating hexavalent chromium-injured rats: The Yin/Yang actions of rhubarb [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 246/247: 1-9.
- [8] 王璐璐, 刘媛琪, 陈立, 等. 大黄游离蒽醌对重症急性胰腺炎大鼠肾损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 31-83.
- [9] 李会芳, 马永刚, 肖小河, 等. 基于四膜虫生物热活性的大黄炮制减毒研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 103-105.
- [10] Zhang L, Chang J H, Zhang B Q, *et al.* The pharmacokinetic study on the mechanism of toxicity attenuation of rhubarb total free anthraquinone oral colon-specific drug delivery system [J]. *Fitoterapia*, 2015, 104: 86-96.
- [11] 任历, 曾滨阳, 张诗缙, 等. 大黄总蒽醌对人肾小管上皮细胞毒性作用及相关机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 79-83.
- [12] 许波. 大黄质量评价及蒽醌类成分提取纯化工艺研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [13] 王建平. 大黄有毒物质基础研究 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(24): 63-64.
- [14] 王伽伯, 马永刚, 张萍, 等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析 [J]. 药学学报, 2009, 44(8): 885-890.
- [15] Lv G P, Meng L Z, Han D Q, *et al.* Effect of sample preparation on components and liver toxicity of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 105-111.
- [16] 毛春芳, 施忠, 罗琳, 等. HPLC 法同时测定大黄中芦荟大黄素等 11 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2400-2403.
- [17] 冯素香, 王哲, 郝蕊, 等. HPLC 法同时测定不同产地掌叶大黄中 10 个蒽醌类化合物 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 783-788.
- [18] 刘喜纲, 刘沛, 陈大为, 等. 优选大黄总蒽醌结肠定位壳聚糖微球的制备工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 38-42.
- [19] 许波, 窦志华, 卞理, 等. 多指标综合加权评分法优选大黄药材中蒽醌类成分提取工艺 [J]. 中南药学, 2016, 14(4): 370-374.
- [20] Wianowska D. Hydrolytical instability of hydroxyanthraquinone glycosides in pressurized liquid extraction [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(13): 3219-3227.
- [21] 严春艳, 吴丽梅, 周晔, 等. 大黄中游离蒽醌类成分提取工艺的优化 [J]. 食品与药品, 2008, 10(9): 22-24.
- [22] 徐选明, 季瑛, 刘新, 等. 大黄中大黄素提取工艺的优化 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(5): 423-424.