

大黄中总鞣质的提取方法研究

刘 佳¹, 黄思洋², 陈钰沁¹, 朱艳玲¹, 赵明智¹, 付娟姬¹, 杨伶俐^{3*}

(1. 昆明医科大学 海源学院, 云南 昆明 650101; 2. 昆药集团血塞通药业股份有限公司, 云南 文山 663400;
3. 昆明医科大学第一附属医院 科教部, 云南 昆明 650000)

摘要: 为建立大黄中总鞣质的最佳提取方法. 采用超声波辅助提取法, 并选取溶剂体积分数、提取时间和固液比 3 个主要因素, 在单因素实验的基础上, 通过正交实验, 明确大黄中总鞣质的最佳提取方法. 结果表明, 当乙醇的体积分数为 60%、提取时间为 100 min、固液比为 15 倍时, 提取率最高. 说明利用超声波辅助法提取大黄中的总鞣质, 操作简单、可行性较高.

关键词: 大黄; 总鞣质; 提取方法; 单因素实验; 正交实验

中图分类号: O658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2021) 06 - 0109 - 05

DOI: 10. 14091/j. cnki. kmxyxb. 2021. 06. 018

Study on Extraction Process of Total Tannin in *Rhubarb*

LIU Jia¹, HUANG Siyang², CHEN Yuchin¹, ZHU Yanling¹, ZHAO Mingzhi¹, FU Juanji¹, YANG Lingli^{3*}

(1. Haiyuan College, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650101; 2. Kunming Pharmaceutical Group Xuesaitong Pharmaceutical Limited Liability Company, Wenshan, Yunnan, China 663400; 3. Department of Science and Education, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650000)

Abstract: To establish the best extraction method of tannin from rhubarb, Ultrasonic-assisted extraction method was used. The three main elements as solvent volume fraction, the extraction time, and solid-liquid ratio are selected. On the basis of single factor experiment, through orthogonal experiment the best extraction method of total tannin from *Rheum officinale* Baill. is determined. The results showed that when the volume fraction of ethanol was 60%, the extraction time was 100 min and the solid-liquid ratio was 15 times, the extraction yield was the highest, which states that ultrasonic assisted extraction of tannin from rhubarb is simple and feasible.

Key words: *Rheum officinale* Baill.; total tannin; extraction method; single factor experiment; orthogonal test

大黄 (*Rheum officinale* Baill.) 的茎、根除去杂质及外皮, 切碎, 进行干燥后即可药用. 大黄有较多的药理作用, 富含蒽醌类、蒽酮类、总鞣质等化学成分, 具有良好的致泻、止痛、抗肿瘤、抗衰老、解毒等功效, 常用于临床治疗^[1-2].

许多学者^[1-4]对大黄的研究主要集中于蒽醌类化合物, 因蒽醌类化合物具有一定的抗菌活性, 并有致泻作用. 而鞣质是大黄中重要的活性成分之一, 别名单宁, 相对分子质量为 500 ~ 3 000, 主要

分为水解型和缩合型, 其中没食子酸和 d-儿茶素是鞣质的主要单体成分, 具有一定的药理活性^[5-6]. 此外, 鞣质是一类结构较复杂的多元酚类化合物, 在植物界分布广泛, 约 70% 以上的生药中含有鞣质类化合物^[7]. 研究^[8]发现, 鞣质化合物数量多、类型广, 具有广泛的药理活性. 据报道^[7,9-13], 鞣质具有抗心脑血管疾病、抗高血压、降血脂、降血糖等作用.

鞣质的提取方法主要有超声波辅助提取、微波

收稿日期: 2021 - 05 - 06

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2021J0876).

作者简介: 刘佳 (1983—), 女, 云南昆明人, 副教授, 硕士, 主要从事药剂学研究.

* 通信作者: 杨伶俐 (1980—), 女, 云南昆明人, 主管药师, 硕士, 主要从事临床药学研究, E-mail: lingli_yang @ 126. com.

提取、浸渍法、水煎法、加压提取和超临界流体萃取等,其中:水煎法也称为煎煮法,是一种常见的浸提方法,该方法方便且经济,但对于煎煮时间、浸泡时间等没有一个最佳标准,导致提取的有效成分效果不明显,且杂质较多,水煎液易变质^[14].浸渍法是在容器中装入生药粗粉,再利用溶剂(如水和乙醇等)浸渍药材使其活性成分得到溶解.该方法特别适用于提取有效成分易破坏的药材、黏性药材、芳香性药材和非结构化医药产品.此外,浸渍法根据提取温度分为热、温、冷3种方法,按浸渍次数又分为轻和重2种方法.由于该方法操作时间长,且很难完全浸渍出活性成分,因此对于价值高的药材、毒性药材等都不宜采用此方法.而超声波辅助提取法是借助超声波从植物中提取活性成分,其原理是破坏细胞膜,用超声波来连续震荡提取物,使活性成分得到溶解并释放出来,同时产生热量以保持水温,使原料被水溶解.超声波辅助提取法可缩短提取时间,提高活性成分的提取率及原料的使用率.因此,本研究拟采用超声波辅助提取法提取大黄中的总鞣质,并通过单因素实验和正交实验,对提取方法进行探讨,以期筛选出提取大黄中总鞣质的最佳方法.

1 材料与方法

1.1 实验仪器

UV2550 紫外可见光光度计(上海美普达仪器有限公司);SI204 型电子天平(上海赞维衡器有限公司);AG133 型电子天平(深圳市盛美仪器有限公司);SHBIII 循环水式多用真空泵(郑州科泰实验设备有限公司);SK2200H 超声仪(苏州创惠电子有限公司);Direct-QTM5 超纯水仪(上海砾鼎水处理设备有限公司);电热恒温水浴锅(FA-NAI 仪器有限公司);101A3 型干燥箱(上海荣计达仪器科技有限公司);JZL 型中药粉碎机(广州市赛豪机械有限公司).

1.2 试药和样品

大黄药材(购自北京同仁堂西安市西大街店);没食子酸对照品(上海鼓臣生物技术有限公司);无水碳酸钠、干酪素、乙醇(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司).

1.3 实验方法

1.3.1 提取工艺

称取一定量的大黄药材,粉碎后过筛,再精密

称取 10.00 g 的大黄粉末,放入 10 mL 容量瓶中,并加入体积分数为 60% 的乙醇,超声提取 60 min,并用乙醇补足,静置过夜,取上清液,得到质量浓度为 1 g/mL 的生药.

1.3.2 供试品溶液制备

量取 1.3.1 项下的适量大黄提取液至 250 mL 的棕色容量瓶中,并加体积分数为 60% 的乙醇 150 mL,静置过夜,超声处理 10 min,冷却并加乙醇稀释至刻度,轻轻摇动容量瓶,使其混合均匀.充分静置后过滤,弃初滤液,精密量取 10 mL 置于 100 mL 的容量瓶中,再加入体积分数为 60% 的乙醇稀释至刻度,轻轻摇晃容量瓶,让其均匀混合,得供试品溶液.

1.3.3 对照品溶液制备

精密称取 50 mg 的没食子酸对照品,然后置于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度.精密量取该溶液 5 mL 置于 50 mL 的棕色容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得.

1.3.4 检测波长选择

取适量的没食子酸对照品置于 50 mL 的棕色瓶中,加入 1 mL 的磷钼钨酸试液及 20 mL 的水,最后用 29% 碳酸钠溶液定容至刻度,放置阴凉处静置 15 min,选择体积分数为 60% 的乙醇溶液作为参照物,扫描波长范围选定在 200 ~ 800 nm 处,得最大吸收波长为 760 nm.

1.3.5 标准曲线制作

分别精密量取 1.3.3 项下制备的对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置于 6 个 25 mL 的棕色容量瓶中,然后顺次加入 1 mL 的磷钼钨酸试液,并分别加入 11.5, 11.0, 10.0, 9.0, 8.0, 7.0 mL 的水,再用 29% 碳酸钠溶液定容至刻度,轻轻摇晃容量瓶,使其混合均匀,最后静置 15 min.用空白溶液作参比溶液,测定 760 nm 处的吸光度值.以吸光度值为纵坐标,溶液质量浓度为横坐标,绘制标准曲线.

1.3.6 总鞣质含量的测定

1) 总酚含量的测定.将 4.0 mL 供试品溶液倒进 50 mL 洁净的棕色量瓶中,采用与 1.3.2 项下相同方法则可得到各种供试品溶液,在 760 nm 处测定吸光度值,将吸光度值代入回归方程,通过计算即可得到溶液里的总酚含量.

2) 不被吸附多酚含量的测定.在 100 mL 锥形

瓶中加入 0.6 g 磨成细粉的干酪素和 25 mL 于 1.3.2 项下所制备的溶液放入 30 ℃ 恒温水浴锅中 1 h, 摇匀, 水浴保温后拿出, 放冷至室温, 混合均匀静置, 过滤弃初滤液, 精密量取 4 mL 续滤液, 倒入 50 mL 洁净的棕色量瓶中, 使用 1.3.4 项下方式处理, 于 760 nm 波长处测定吸光度值, 代入回归方程式, 通过计算即可得到不被吸附的多酚含量。

3) 总鞣质含量为: 总鞣质含量 = 总酚含量 - 不被吸附的多酚含量。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度考察

精密量取没食子酸对照品溶液, 于 760 nm 波长处, 连续 6 次测定吸光度值。通过计算得到 *RSD* 为 0.263%, 表明仪器的精密度良好。

2.1.2 稳定性考察

取 1.3.2 项下制备的供试品溶液 6 份, 在 760 nm 波长处, 于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 分别测定吸光度值。通过计算得到 *RSD* 为 0.216%, 表明在 24 h 内, 该样品稳定性良好。

2.1.3 重复性考察

取 6 个样品, 按 1.3.2 项下制备的供试品溶

液, 在波长 760 nm 处测定吸收度值。通过计算得到 *RSD* 为 0.132%, 表明重复性良好。

2.1.4 线性关系考察

根据数据绘制工作曲线, 横坐标和纵坐标分别为没食子酸质量浓度 (mg/mL) 和吸光度值 (*A*), 得到回归方程, $Y = 98.959x - 0.0113 (R^2 = 0.9996)$, 详见图 1。

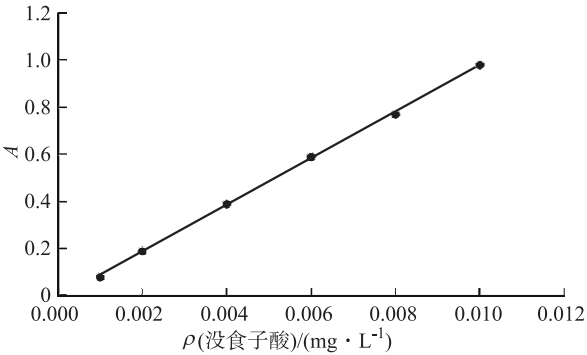


图1 没食子酸工作曲线

2.1.5 加样回收率

精密称取 9 份已知样品各 0.1 g, 并分别加入相同质量的没食子酸对照品。根据 1.3.2 项下制备的供试品溶液, 在 760 nm 波长处测定吸光度值, 并计算回收率, 得到平均回收率为 99.13%, *RSD* 为 0.398%, 回收率比较高, 详见表 1。

表1 加样回收率实验结果 (n=9)

称样量/g	样品量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
0.101	0.092	1.200	1.290	99.85	99.13	0.398
0.102	0.092	1.200	1.291	99.92		
0.103	0.093	1.200	1.287	99.53		
0.102	0.093	1.200	1.289	99.69		
0.102	0.092	1.200	1.279	98.99		
0.101	0.092	1.200	1.273	98.53		
0.101	0.092	1.200	1.269	98.22		
0.102	0.092	1.200	1.287	99.61		
0.102	0.093	1.200	1.265	97.83		

2.2 单因素实验考察

2.2.1 溶剂体积分数筛选

取 5 份各 8 g 的大黄粉末, 精密称定。然后分别加入 15 倍量体积分数为 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 的乙醇, 超声提取 60 min。显色后在波长 760 nm 处测定吸光度值, 结果见表 2。

2.2.2 提取时间筛选

分别取 5 份各 8 g 的大黄粉末, 精密称定。然后再加入 15 倍量体积分数为 60% 的乙醇溶液, 分别超声提取 20, 40, 60, 80, 100 min。显色后在波长 760 nm 处测定其吸光度值, 提取时间筛选结果见表 3。

表 2 溶剂体积分数对总鞣质提取率的影响

乙醇体积分数/%	20	40	60	80	100
总鞣质提取率/%	0.63	0.88	0.93	0.92	0.86

表 3 提取时间对总鞣质提取率的影响

提取时间/min	20	40	60	80	100
总鞣质提取率/%	0.71	0.82	0.98	0.83	0.81

2.2.3 固液比筛选

取 5 份各 8 g 的大黄粉末，精密称定。加入 5，10，15，20，25 倍体积分数为 60% 的乙醇溶液，超声提取 80 min。显色后在波长 760 nm 处测定吸光度值，结果见表 4。

2.2.4 正交实验

将单因素实验的测定结果进行比对，完成正交实验的设计，详见表 5。在实验过程中将其提取率

作为指标进行实验，共进行 3 次，然后对 3 次测定的数值进行计算，结果见表 6^[15]。

通过极差分析比较，在上述影响因素中，对提取率影响最大的为 A，其次为 C，影响率最小的是 B。因此，最优提取工艺为 A₂B₃C₁，换言之，当乙醇体积分数为 60%、提取时间为 100 min、溶剂用量为 15 倍时，大黄中总鞣质的提取率最高。

表 4 固液比对总鞣质提取率的影响

溶剂用量/倍	5	10	15	20	25
总鞣质提取率/%	0.73	0.93	0.95	0.86	0.83

表 5 因素水平表 (n=3)

水平	因素		
	A(乙醇体积分数/%)	B(提取时间/min)	C(溶剂用量/倍)
1	40	60	15
2	60	80	20
3	80	100	25

表 6 正交实验结果

实验号	A(乙醇体积分数/%)	B(提取时间/min)	C(溶剂用量/倍)	提取率/%
1	1	1	1	0.752
2	1	2	2	0.757
3	1	3	3	0.873
4	2	1	2	1.260
5	2	2	3	1.350
6	2	3	1	1.398
7	3	1	3	1.188
8	3	2	1	1.298
9	3	3	2	0.956
K1	2.382	3.200	3.448	
K2	4.008	3.405	2.973	
K3	3.442	3.227	3.411	
极差	1.626	0.205	0.475	

为了对提取工艺的可靠性进行验证, 使用相同的提取工艺, 按照样品制备方法平行制备3份样品, 则得到平均提取率为1.395%, 说明本提取工艺稳定、可靠, 可用于大黄中总鞣质的提取。

3 小结

本研究使用乙醇为溶剂, 并采用超声波辅助提取法提取大黄中的总鞣质, 该方法相较使用溶剂为水的煎煮法、浸渍法、渗漏法等提取方法而言, 不仅提取效率明显高于其他方法, 而且对有效成分的结构破坏较小, 可避免蒽醌类衍生物由于热不稳定性而增加溶出物被破坏的可能性^[16-18]。

本研究着重对大黄中总鞣质的提取方法进行了探讨, 并通过单因素实验探究了溶剂体积分数、提取时间和溶剂用量3个主要因素对于产物提取率的影响, 结果表明, 当乙醇体积分数为60%、提取时间为100 min、溶剂用量为15倍时, 大黄中总鞣质的提取率最高。

【参考文献】

- [1] 郭志伟, 刘琳娜. 大黄及其有效成分的药理研究概况[J]. 中国药房, 2006 (22): 1741-1743.
- [2] 南海江, 许旭东, 陈士林, 等. 大黄属植物研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21 (4): 690-701.
- [3] LEMLI J. The estimation of anthracene derivatives in senna and Rhubarb [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 17 (4): 227-232.
- [4] RISA KO K, NOBUTOMO I, CHIKA N, et al. Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of Rhubarb extract [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 152 (1): 190-200.
- [5] 大蒲谚吉, 贺玉琢. 大黄的药理药效 [J]. 国际中医中药杂志, 1992 (3): 17-20.
- [6] DE JESUS N Z, DE SOUZA FALCÃO H, GOMES I F, et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms [J]. International journal of Molecular Sciences, 2012, 13 (3): 3203-3228.
- [7] 刘畅, 金哲雄. 鞣质的药理活性研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2015, 28 (1): 14-17.
- [8] SMERIGLIO A, BARRECA D, BELLOCCO E, et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects [J]. British Journal of Pharmacology, 2017, 174 (11): 1244-1262.
- [9] BLADÈ C, ARAGONÈS G, AROLA-AMAL A, et al. Proanthocyanidins in health and disease [J]. Biofactors, 2016, 42 (1): 5-12.
- [10] 张杰, 詹炳炎. 鞣质的药理作用 (Ⅲ): 抗氧化、降脂、降压等多种作用 [J]. 国外医药 (植物药分册), 1995, 10 (3): 99-103.
- [11] QUIFER-RADA P, CHOY Y Y, CALVERT C C, et al. Use of metabolomics and lipidomics to evaluate the hypocholesterolemic effect of proanthocyanidins from grape seed in a pig model [J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60 (10): 2219-2227.
- [12] DRAIJER R, DE GRAAF Y, SLETTENAAR M, et al. Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects [J]. Nutrients, 2015 (7): 3138-3153.
- [13] PONS Z, GUERRERO L, MARGALEF M, et al. Effect of low molecular grape seed proanthocyanidins on blood pressure and lipid homeostasis in cafeteria diet-fed rats [J]. J Physiol Biochem, 2014, 70 (2): 629-637.
- [14] LIAO J, ZHENG N, QU B. An improved ultrasonic-assisted extraction method by optimizing the ultrasonic frequency for enhancing the extraction efficiency of lycopene from tomatoes [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9 (8): 2288-2298.
- [15] 李欢欢. 优化试验设计方法的比较研究 [J]. 内蒙古科技与经济, 2021 (4): 63-65.
- [16] 解亚华, 杨维霞, 贺少堂, 等. 不同煎煮方法与煎煮时间对大黄煎液中蒽醌与鞣质含量的影响 [J]. 河南中医药学刊, 2002, 17 (4): 15-16.
- [17] 魏凤玲, 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 (10): 34-36.
- [18] 赵盼盼, 佟继铭, 张树峰, 等. 大黄毒性及其合理应用研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36 (9): 93-96.