

超声辅助双水相提取大黄中蒽醌类成分

姚 琴,赵茂俊*,张 利,姜媛媛,吴一超,方 会,谢焱林,杨 雯

四川农业大学理学院,雅安 625014

摘要:建立了超声辅助结合水溶性小分子醇双水相提取大黄中蒽醌类成分的方法。采用高效液相色谱法测定总蒽醌含量,以蒽醌提取收率为指标,筛选出的最佳双水相体系为正丙醇/ Na_2SO_4 ,加酸于体系同时水解和提取大黄蒽醌,考察了影响提取收率的多种因素并通过响应面优化出最佳提取条件,在提取温度 $75\text{ }^\circ\text{C}$,提取时间 30 min,液固比 20 mL/g 条件下,5 种蒽醌成分最高收率达 19.59 mg/g。实验结果表明,该方法具有快速、高效及低成本等优点,为植物中有效成分的提取工业化生产提供了新思路。

关键词:超声辅助提取;双水相体系;大黄蒽醌;高效液相色谱

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.8.010

Ultrasonic-assisted Aqueous Two-phase Extraction for the Anthraquinones in *Rheum palmatum* L.

YAO Qin,ZHAO Mao-jun*,ZHANG Li,JIANG Yuan-yuan,WU Yi-chao,FANG Hui,XIE Yi-lin,YANG Wen

College of Science,Sichuan Agricultural University,Yaan 625014,China

Abstract: A method of extraction for the anthraquinones from *Rheum palmatum* L. was developed by ultrasonic-assisted small molecular water-miscible alcohol aqueous two-phase extraction. The content of total anthraquinones was determined by high-performance liquid chromatography, and the best aqueous two-phase system, 1-propanol/ Na_2SO_4 , was screened with yield of anthraquinones as an index. In order to integrate extraction and hydrolysis for anthraquinones from *Rheum palmatum* L., the acid was added to the systems. The factors influencing the extraction yield were investigated in detail and the experimental conditions were optimized using response surface methodology (RSM). The final optimized conditions were, temperature $75\text{ }^\circ\text{C}$, extraction time 30 min and liquid/solid ratio 20 mL/g. Under the optimized conditions, the highest yield of five anthraquinones was up to 19.59 mg/g. The experimental results showed that the method had the advantages of fast, efficient, low-cost, and so on. It provided some new ideas for industrialized production of extracting on the efficacious components from plants.

Key words: ultrasonic-assisted extraction; aqueous two-phase systems; anthraquinones of *Rheum palmatum* L.; high-performance liquid chromatography

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* Baill. 的干燥根和根茎^[1],主产于我国青海、甘肃、四川等地。临床研究证实,大黄具有抗衰老、降血脂、抗肿瘤、抗炎、抗菌、泻下及止血等多种生物学活性。迄今为止,已从大黄中分离得到蒽醌、二蒽酮、苯丁酮、芪、萘色酮、单宁等 80 多种化合物。其中蒽醌类衍生物是大黄的主要有效成分,含量约 3% ~ 5%,包括芦荟大黄素、大黄酸、

大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 5 种游离蒽醌及其与葡萄糖结合的结合蒽醌^[2-5]。

大黄因其所具有的极佳药理活性,从大黄中提取的蒽醌类成分在新药研发、保健药品、食品和化妆品工业中已得到广泛的应用^[6,7]。大黄中蒽醌类成分常用的提取方法有有机溶剂热回流提取法、索氏提取法、微波辅助提取法、超声辅助提取法和超临界流体提取法等^[3]。传统提取法均要用到毒性较大的氯仿等有机溶剂,对环境污染大;超临界流体提取法的设备较复杂,能耗大,成本高,限制了其在工业上的应用;微波辅助提取法效率较超声辅助提取法低,且微波对人体危害较大^[8]。因此,开发一种新型的、绿色的大黄蒽醌类化合物提取工艺对大黄的

收稿日期:2018-03-13 接受日期:2018-05-16

基金项目:四川省科技厅国际合作计划(2015HH0029)

* 通信作者 E-mail:zhaomaojun@163.com

开发利用有着至关重要的意义。

双水相体系(Aqueous two-phase system, ATPS)是将两种亲水性化合物的水溶液以适当浓度相互混合后自发形成的互不相溶的两水相体系^[9]。小分子醇/盐体系作为一种新型的 ATPS 具有低成本,溶剂粘度小,试剂易于回收和重复使用等优点,已经在天然产物有效成分分离^[10,11]、生物分子分离、金属离子萃取分离、染料萃取分离和有机化合物萃取分离^[12]等方面有所应用。利用超声波辅助双水相提取大黄中的蒽醌类成分,省去了传统 ATPS 中的反萃取步骤,操作费用低,可同时实现低溶剂用量、较好的提取效果、容易分离固液两相和分离水溶性成分的目的。

本研究选用几种常见的水溶性小分子醇和无机盐,制备双水相体系,并绘制相图,筛选最佳成相体系。并首次将双水相体系用于大黄中蒽醌类成分的提取,通过响应面法优化超声辅助双水相提取的最佳条件。该方法的优势在于一步完成提取、水解与分离的操作,能大大节省时间,提高效率,为亲水性小分子醇双水相体系在提取大黄中蒽醌类成分的应用提供了科学方法和依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料

本试验以产自四川省阿坝藏族羌族自治州马尔康县的掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)的根为研究材料。处理方法:将新鲜大黄切片,冷冻干燥,用中药粉碎机将干燥的大黄粉碎,过 50 目筛,存于干燥器中备用。

1.1.2 试剂

1,8-二羟基蒽醌(北京百灵威科技有限公司,96%);标准品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚(成都曼斯特生物科技有限公司,≥98.64%);甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);乙醇、正丙醇、异丙醇、NaOH 和 HCl 等均为分析纯(成都市科龙化工试剂厂);乙酸镁为分析纯(天津市大茂化学试剂厂);磷酸为色谱纯(成都市科龙化工试剂厂);实验室用水为超纯水。

1.1.3 仪器

Aglient 1260 型高效液相色谱仪(HPLC),配备 DAD 紫外检测器(美国安捷伦公司);SB-800DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司);

BSA124S 电子天平(Sartorius 公司);冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);A390 型紫外可见分光光度计(翱艺仪器有限公司);HC-2518 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 双水相体系相图的绘制

根据浊点滴定法^[11]测定双水相体系的双节线数据,并绘制相图。

1.2.2 从大黄中提取游离蒽醌

称取 0.25 g 大黄粉于 10 mL 离心管中,加入 2.5 mL 一定浓度的盐溶液和 2.5 mL 正丙醇,摇匀,室温下超声 30 min,在 10 000 rpm 转速下离心 3 min,上相溶液即为样品液 1。

1.2.3 从大黄中提取总蒽醌

称取 0.25 g 大黄粉于 10 mL 离心管中,加入 2.5 mL 一定浓度的盐溶液、2.5 mL 正丙醇和 0.2 mL 浓硫酸,摇匀,室温下超声 50 min,在 10 000 rpm 转速下离心 3 min,上相溶液即为样品液 2。

1.2.4 游离蒽醌含量的测定

以 1,8-二羟基蒽醌为标准品,用紫外可见分光光度计在 200 ~ 700 nm 波长范围内对蒽醌-醋酸钠甲醇溶液进行扫描,找出最大吸收波长 513 nm,在此条件下测得不同浓度蒽醌的吸光度:蒽醌浓度范围在 0.005 ~ 0.1 mg/mL 时线性关系良好,标准曲线方程为: $Y = 0.0048 + 9.159X$ ($R^2 = 0.9997$), Y 表示吸光度, X 表示蒽醌浓度。

取样品液 1,用 0.5% 的醋酸镁-甲醇溶液稀释,通过标准曲线计算出蒽醌类成分的浓度。

1.2.5 HPLC 测定总蒽醌含量

在高效液相色谱条件下测得 5 种主要蒽醌类成分的标准品(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚)在不同浓度时的峰面积,得到标准曲线方程见表 1, Y 表示峰面积, X 表示蒽醌浓度。

取样品液 2,加入一定量 NaOH 溶液调节 pH 至中性,然后用甲醇定容,微孔滤膜过滤后,进样 10 μ L 测定含量。总蒽醌含量以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总量计^[1]。每次实验均平行测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 双水相体系的选择

由于大黄蒽醌类成分多数含有羧基和酚羟基等酸性官能团,且在碱性条件下不稳定^[13-15],由此排

表1 大黄5种蒽醌的回归方程

Table 1 Regression equations of five anthraquinones

化合物 Analyte	回归方程 Linear regression	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数 R^2
芦荟大黄素 Aloe-emodin	$Y = -0.8017 + 3.6783X$	4.800 ~ 512.00	0.9999
大黄酸 Rhein	$Y = -3.2245 + 3.3524X$	4.800 ~ 512.00	0.9999
大黄素 Emodin	$Y = -1.1631 + 3.1072X$	4.800 ~ 512.00	0.9999
大黄酚 Chrysophanol	$Y = -1.0877 + 4.4753X$	4.800 ~ 512.00	0.9999
大黄素甲醚 Physcion	$Y = -0.4276 + 2.8729X$	4.000 ~ 256.00	0.9999

除了对碳酸盐等显碱性的无机盐的选用。本实验首先考察了3种醇(乙醇、异丙醇、丙醇)和8种无机盐(Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl 、 KCl 、 MgSO_4 、 CaCl_2 、 NH_4Cl 、 BaCl_2)的成相情况。结果表明,乙醇只能与 Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 MgSO_4 这3种盐形成双水相体系,异丙醇只能与 Na_2SO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 和 CaCl_2 这4种盐形成双水相体系,而丙醇与这8种无机盐都能形成双水相体系。3种醇和 Na_2SO_4 的相图如图1(A)所示,根据文献报道可知,双水相体系的双节线图越靠近坐标原点则体系的成相能力越

强^[12,13],因此3种醇的成相能力为丙醇 > 异丙醇 > 乙醇,结论与前人研究结果一致^[11];8种无机盐和丙醇的相图如图1(B)所示,成相能力最强的是 Na_2SO_4 ,其次是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NaCl 。由图2可知, Na_2SO_4 /丙醇体系对大黄蒽醌成分的提取效果较另外两种体系更好,随着丙醇浓度的升高,蒽醌收率也随之升高,当丙醇体积分数为50%时,丙醇/ Na_2SO_4 体系的蒽醌的收率达到最大。因此,本实验选取丙醇/ Na_2SO_4 体系且丙醇体积分数50%对大黄蒽醌成分的提取作进一步研究。

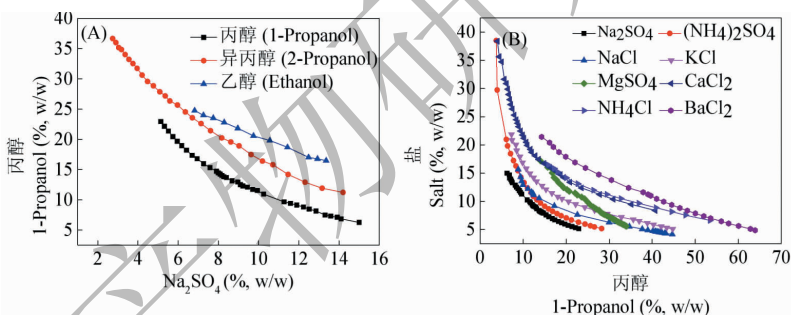


图1 醇/盐双水相体系的相图

Fig. 1 Binodal curves of the alcohol/salt ATPS

2.2 影响因素的考察

实验考察了 Na_2SO_4 盐溶液浓度、水解所用酸的

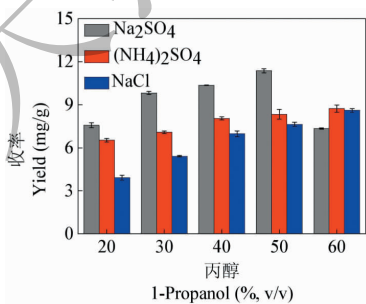


图2 不同正丙醇/盐双水相体系提取大黄蒽醌的收率

Fig. 2 The yield of anthraquinones in different 1-propanol/salt systems

种类及用量、超声提取温度、超声功率、提取时间和液固比等因素对蒽醌提取收率的影响。

2.2.1 Na_2SO_4 盐溶液浓度的影响

当盐浓度过低,双水相则不能形成,因此根据双水相上下相体积之比即相比和盐的溶解度选择研究了 Na_2SO_4 溶液浓度范围6%~16%。由图3(A)可知, Na_2SO_4 溶液的浓度超过8%之后,对大黄蒽醌成分的提取效果影响不显著,表明只需要少量的 Na_2SO_4 即可达到很好的提取效果。由于大黄中结合态蒽醌所占比例更大,需要进一步加酸水解,为了减少操作步骤,提高提取效率,本实验将水解需要的酸直接加入双水相体系中,随着加酸的量增多,体系

的相比也随之增大,直至变成单一相。而盐析能力可通过增加盐浓度来加强^[13],因此结合实验结果选择提取蒽醌收率最高的 Na_2SO_4 溶液浓度 12% 作为下一步加酸水解体系来考察提取单因素。

2.2.2 水解所用酸的种类及用量

已有文献中用来水解大黄结合态蒽醌的酸主要有盐酸和硫酸^[1,3,4,13],因此本实验研究了加入这两种酸之后对提取收率的影响。由图3(B)可知,在加入酸之后,大黄蒽醌的提取收率显著提高,在加入相同体积酸的条件下,硫酸水解效果明显比盐酸水解效果好,且加入酸的量越多,所提取的大黄蒽醌的量也越多,但是当加酸的量超过 0.6 mL 时,该体系变成均相,所以水解确定为加硫酸 0.6 mL,此时蒽醌的收率是未加酸水解蒽醌收率的 5 倍。

2.2.3 超声提取温度的影响

温度会影响大黄结合态蒽醌的水解,温度过高会使大黄蒽醌分解从而减少提取收率^[14,15],温度过低则水解不完全。实验考察了 30 ~ 80 °C 温度范围内对大黄提取收率的影响,结果见图3(C)。实验发现随着温度的升高,大黄蒽醌的收率也显著提高,在温度达到 70 °C 时,大黄蒽醌的收率达到最大,说明适当的温度可以促进溶剂对大黄材料的渗透作用,从而增加蒽醌的提取收率;当温度继续升高至 80

°C,大黄蒽醌的收率变化不显著。因此选择 70 °C 用于进一步参数优化。

2.2.4 超声功率的影响

超声功率对大黄蒽醌的影响如图3(D)所示,随着超声功率的升高,蒽醌提取收率也有所提高,在 560 W 时蒽醌收率已达到最大,超过此功率之后,蒽醌的收率变化已经不显著。总体来说,超声功率对大黄蒽醌收率的影响不显著,因此本实验选择功率 560 W 用于之后的研究。

2.2.5 超声提取时间的影响

超声时间能影响提取的目标化合物在细胞内外的动态平衡,时间过短会降低提取效率^[17]。实验考察了 50 min 内超声提取时间对大黄蒽醌提取收率的影响,结果如图3(E)所示。可见,在 40 min 内超声辅助可提高蒽醌的提取收率,之后变化不显著。这是由于在 40 min 内随着提取时间的延长,细胞内的蒽醌在超声作用下大量溶出和扩散,所以提取收率显著提高;当提取时间大于 40 min 时,由于细胞内外有效成分含量已达到动态平衡,浓度差推动力已减弱到最低,所以提取收率无明显提高。随着时间的延长,蒽醌类成分可能加速分解^[18],杂质也大量溶出,故选择 40 min 作为最佳超声提取时间。

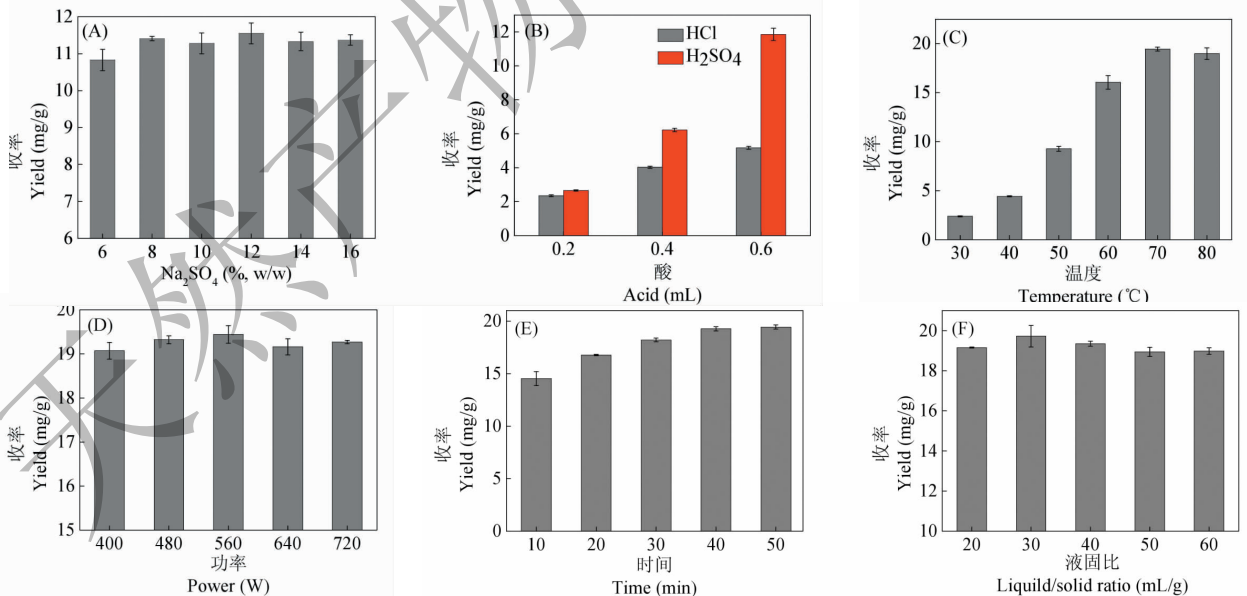


图3 不同因素对大黄蒽醌收率的影响

Fig. 3 The effects of different factors on the extraction yield of anthraquinones

2.2.6 液固比的影响

液固比是指双水相体系体积与大黄粉质量之

比。液固比的大小影响提取效率,液固比过大,过多的溶剂会溶解更多的杂质,从而导致提取收率的下

降,并且溶剂用量增加也会造成资源浪费;液固比过小,提取溶剂少,导致大黄粉与提取溶剂的接触不够充分造成目标化合物提取不完全。实验固定双水相体系的体积为 5 mL,考察了大黄粉质量在 0.1 ~ 0.25 g 范围内蒽醌的提取收率,结果见图 3(F)。当液固比超过 30 mL/g 时,大黄蒽醌提取收率趋于下降;当液固比为 30 mL/g 时收率最高,故选择 30 mL/g 作为最佳提取液固比。

2.3 响应面法的实验设计

为了得到最佳的提取条件,基于各个因素对大黄蒽醌提取收率的影响,选用 Box-Behnken Design

表 2 BBD 实验设计及结果

Table 2 The experimental design and the results of BBD

实验 Run	A 温度 Temperature (°C)	B 时间 Time (min)	C 液固比 Liquid-Solid Ratio (mg/L)	收率 Yield (mg/g)
1	80	40	40	19.38
2	70	40	30	19.17
3	60	50	30	15.90
4	80	40	20	19.13
5	60	40	20	15.55
6	80	50	30	18.91
7	60	40	40	14.60
8	70	40	30	19.43
9	70	40	30	19.37
10	80	30	30	19.63
11	70	50	20	19.66
12	70	40	30	19.52
13	70	40	30	19.30
14	60	30	30	14.20
15	70	30	40	18.97
16	70	30	20	19.51
17	70	50	40	19.30

表 3 大黄 5 种蒽醌收率的二次模型的方差分析统计

Table 3 ANOVA statistics of quadratic model for the yield of five anthraquinones

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	Prob. > F	显著性 Significant
模型 Model	58.13	9	6.46	421.25	< 0.000 1	显著 Significant
A-温度	35.28	1	35.28	2300.94	< 0.000 1	
B-时间	0.27	1	0.27	17.38	0.004 2	
C-液固比	0.32	1	0.32	20.87	0.002 6	
AB	1.46	1	1.46	95.49	< 0.000 1	
AC	0.36	1	0.36	23.48	0.001 9	

(BBD)将提取温度、提取时间和液固比设为自变量,大黄 5 种蒽醌的收率为响应值,采用三因素三水平的实验设计,进行 17 次实验包括 5 次重复的实验操作。

2.3.1 模型建立及方差分析

在响应面实验设计过程中,综合考虑单因素实验结果,实验设计及结果见表 2。利用软件 Design-Expert 8.0.6 对数据进行二次多元回归拟合,得到大黄 5 种蒽醌的收率与自变量之间的二次多项式回归方程:

$$Y = 19.36 + 2.10A + 0.18B - 0.20C - 0.61AB + 0.30AC + 0.045BC - 2.20A^2 - 0.0015B^2 + 0.0035C^2$$

式中 Y 为 大 黄 蒽 醌 的 收 率, A 为 提 取 温 度 ($^{\circ}\text{C}$), B 为 提 取 时 间 (min), C 为 液 固 比 (mL/g)。从拟合方程的相关系数 $R^2 = 0.9958$ 可知,拟合方程相关系数较高,拟合效果较好。当 P 值小于 0.05 时影响因素对响应值影响为差异显著,小于 0.01 时为差异高度显著,小于 0.001 时为差异极显著,大黄 5 种蒽醌的收率 ANOVA 见表 3,结果显示,收率建立的回归模型是极显著的 ($P < 0.0001$), $R^2 = 0.9958$ 表明模型的拟合度较好。失拟项 $P = 0.5980 > 0.05$ 表明方差失拟不显著,该模型可应用于大黄蒽醌收率的理论预测。同时 ANOVA 表明蒽醌收率的模型一次项提取温度 A 、交互项 AB 、二次项 A^2 影响极显著,一次项提取时间 B 、液固比 C 、交互项 AC 影响高度显著,交互项 BC 、二次项 B^2 、 C^2 影响不显著。对二次多项式方程中的各项系数进行简化,删除不显著因素 BC 、 B^2 和 C^2 ,方程简化为: $Y = 19.36 + 2.10A + 0.18B - 0.20C - 0.61AB + 0.30AC - 2.20A^2$, $R^2 = 0.9968$,几乎没有变化。

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	Prob. > F	显著性 Significant
BC	0.0081	1	0.0081	0.53	0.490 9	
A ²	20.31	1	20.31	1324.88	< 0.000 1	
B ²	9.474E-06	1	9.474E-06	6.179E-04	0.980 9	
C ²	5.158E-05	1	5.158E-05	3.364E-03	0.955 4	
Residual	0.11	7	0.015			
Lack of Fit	0.037	3	0.012	0.70	0.598 0	不显著 Not significant
Pure Error	0.070	4	0.018			
Cor Total	58.24	16				
$R^2 = 0.998 2$		$R^2_{Adj} = 0.995 8$	C. V. % = 0.68			

2.3.2 响应面曲面分析

根据二次多项式模型,把因变量与其中任两个因素拟合为三维曲面图,固定三个变量中的一个为中值,以拟合目标函数为数学模型,绘制自变量三维效应曲面图,结果见图 4,表明在实验的研究范围内,蒽醌的收率随着提取温度和时间的增大而增大。三个影响因素对蒽醌收率的影响依次为:提取温度 > 提取时间 > 液固比。

2.3.3 条件优化、预测和验证

为了达到最佳提取效果,应该使蒽醌的收率达到研究范围内的最大值。结果表明,运用软件优化

提取蒽醌的实验条件为提取温度 75.47 °C,提取时间 30.00 min,液固比 20.00 mL/g,蒽醌预测收率为 20.03 mg/g,愿望值为 100。结合实际实验操作,提取温度设为 75 °C,在此优化条件下进行实验验证,3 次平行实验的收率平均值 $Y = 19.59$ mg/g, $RSD = 0.59\%$,与模型的偏差率为 2.2%,偏差率 = (实际值 - 预测值) / 预测值 $\times 100\%$ ^[10]。预测值与实际值接近,说明二次多项式数学模型进行优化大黄蒽醌提取工艺符合设计目标,实验设计和数学模型具有可靠性和重现性。因此,运用 BBD 优化模型可用于预测最佳蒽醌收率的实验条件。

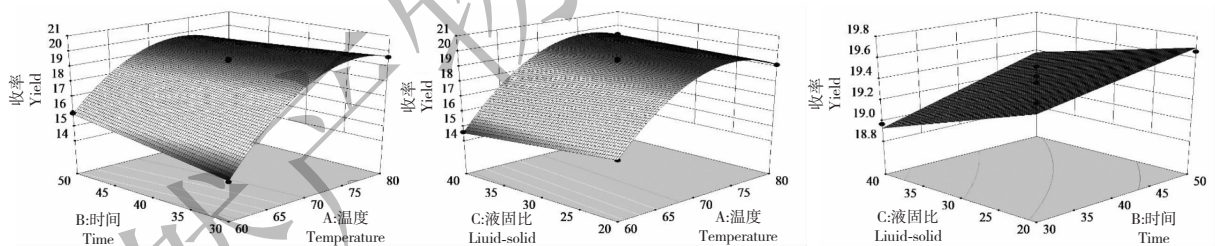


图 4 大黄 5 种蒽醌收率的模型效应曲面图

Fig. 4 Response surfaces plots of the model for the yield of five anthraquinones

2.4 双水相的提取及分离效果

根据文献报道^[19,20],本实验选择了提取大黄中蒽醌类成分常用的收率高的方法进行对比,实验结果表明,超声辅助双水相提取法的蒽醌收率比之提高了 61.8%,所需时间比之少了 3.5 h,并且不采用毒性较大的氯仿溶剂,更安全。同时,本实验选择了大黄蒽醌类成分常用提取溶剂甲醇和乙醇进行对比,发现在相同的超声辅助提取条件下,丙醇/ Na_2SO_4 双水相体系的蒽醌收率比它们分别高出了 27.8% 和 49.9%。此外,本实验将硫酸加入双水相

体系,提取和水解同步完成(一步法),蒽醌收率比同溶剂时提取和水解两步法多 7.09%。通过比较发现,超声辅助双水相法操作简单,提取效率高。

由于双水相上、下两相的差异,使其有一定分离效果,丙醇/ Na_2SO_4 体系的上相为富醇相,下相为富盐水相。如图 5 所示,甲醇提取收率比乙醇高,但杂质也比乙醇多;双水相体系两步法比一步法的蒽醌收率低且提取物中杂质多;双水相一步法的下相几乎没有 5 种蒽醌类成分的存在,表明目标成分主要富集在醇相。由于大黄的多糖可能在提取条件下水

解成单糖而无法检测到吸收峰,但用苯酚-硫酸法检测到了双水相体系的下相中糖的存在,说明丙醇/ Na_2SO_4 双水相体系能除去提取物中大部分糖类水溶性杂质,从而达到初步分离的目的,便于后续的纯化。此外,溶剂丙醇可以通过减压旋蒸回收重复

利用,而且产品省去了后续复杂的反萃取步骤; Na_2SO_4 也可以通过加醇析出回收循环使用。该方法可避免资源浪费,降低成本,有机溶剂的回收可以减少环境的污染,更环保。

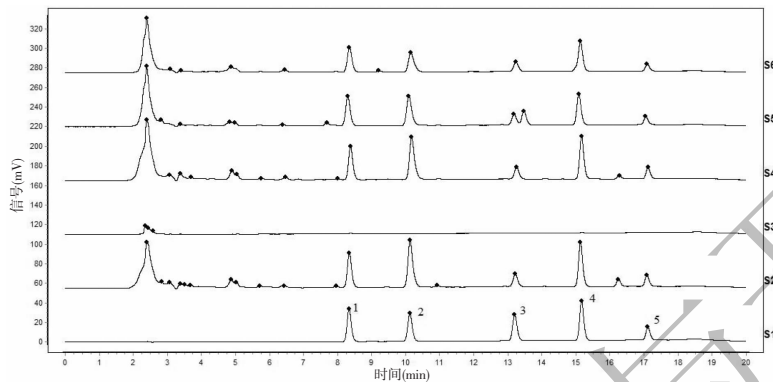


图5 大黄5种蒽醌的液相色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of five anthraquinones

注:(S1) 标准品;(S2) 双水相提取样品上相;(S3) 双水相提取样品下相;(S4) 两步法提取样品;(S5) 乙醇提取样品;(S6) 甲醇提取样品(1:芦荟大黄素;2:大黄酸;3:大黄素;4:大黄酚;5:大黄素甲醚)。

Note:standards (S1),top phase (S2) and bottom phase (S3) from the ATPS sample,sample extracted by two-step method (S4),sample extracted with ethanol (S5),methanol (S6) (1:aloe-emodin;2:rhein;3:emodin;4:chrysophanol;5:physcion.).

3 结论

采用超声辅助结合丙醇/ Na_2SO_4 双水相提取大黄中蒽醌类成分,以高效液相色谱法为手段测定其含量,该方法结合了水解、提取及分离于一体,具有快速、高效且溶剂可回收等优点,为大黄药材蒽醌类成分的提取提供了新方法,也为超声辅助结合水溶性小分子醇双水相应用于其它药材中化学成分的提取提供了新思路。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Committee (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015; 23-24.
- 2 Lan JB(兰景彬), Pan KJ(潘克俭), Wang H(汪宏), et al. The inhibition of emodin on metastasis of colon cancer induced by LPS[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 2044-2049.
- 3 Arvindekar A, Ferreira G, Laddha K. Assessment of conventional and novel extraction techniques on extraction efficiency of five anthraquinones from *Rheum emodi* [J]. *J Food Sci Technol*, 2015, 52: 6574-6582.

- 4 Tong SQ, Yan JZ. Large-scale separation of hydroxyanthraquinones from *Rheum palmatum* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1176: 163-168.
- 5 Zhao LC, Liang J, Li W, et al. The use of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted extraction of five anthraquinones from *Rheum palmatum* L. [J]. *Molecules*, 2011, 16: 5928-5937.
- 6 Xia SP(夏士朋). The extraction of rhein and its optimization [J]. *Chin JMAP* (中国现代应用药学杂志), 2006, 23: 289-291.
- 7 Qu DM(瞿冬梅). The research of extracting cosmetics preservative from rhubarb [D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2009.
- 8 Liu JH(刘建华), Han LQ(韩立强), Yuan Li(苑丽), et al. Effects of extraction methods on anthraquinone components and the antioxidant activity in rhubarb [J]. *Journal of Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 9484-9486.
- 9 Guo WL, Ma JJ, Wang Y, et al. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (ethanol/2-propanol/1-propanol) and $\text{MgSO}_4/\text{ZnSO}_4$ at (303.15 and 313.15) K and correlation [J]. *Thermochim Acta*, 2012, 546: 8-15.
- 10 Tan ZJ(谭志坚). Separation and purification of the active ingredients in *Aloe vera* L. using aqueous two-phase system

- [D]. Changsha: Central South University (中南大学), 2013.
- 11 Tan ZJ, Li FF, Xu XL. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system[J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2013, 36: 1105-1113.
 - 12 Ma JJ(马晶晶). Construction of small molecular water-miscible alcohol-salt aqueous two phase systems and application on the extraction of plant pigment[D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology(江苏科技大学), 2013.
 - 13 Deng WW, Zong Y, Xiao YX. Hexafluoroisopropanol-based deep eutectic solvent/salt aqueous two-phase systems for extraction of anthraquinones from *Rhei Radix et Rhizoma* samples[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2017, 5: 4267-4275.
 - 14 Shao J(邵晶), Guo M(郭玫), Yu XH(余晓晖), et al. Research progress on the extraction and purification process of anthraquinone in rheum[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 2010, 38: 5864-5866.
 - 15 Yang L(杨柳), Xu SJ(许舜军). Study on content changes of the anthraquinones of *Radix et Rhizoma Rhei* by different extract methods[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2007, 27: 908-910.
 - 16 Tong SQ, Yan JZ. Large-scale separation of hydroxyanthraquinones from *Rheum palmatum* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1176: 163-168.
 - 17 Li LJ(李兰杰), Li XW(李绪文), Ding J(丁健), et al. Ionic liquid surfactant-mediated ultrasonic-assisted extraction coupled with HPLC for the determination of five rare ginsenosides in *Panax notoginseng*(Burk.) F. H. Chen[J]. *Chem J Chinese Universities*(高等学校化学学报), 2016, 37: 454-459.
 - 18 Zhao LC, Liang J, Li W, et al. The use of response surface methodology to optimize the ultrasound-assisted extraction of five anthraquinones from *Rheum palmatum* L. [J]. *Molecules*, 2011, 16: 5928-5937.
 - 19 Jia Z(贾忠), Ma JJ(马建军), Ding YH(丁延虹), et al. Extraction of anthraquinone derivatives from rhubarb via continuously biphasic hydrolysis[J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2010, 19: 1365-1368.
 - 20 Wu JL(武静莲), Zhao HQ(赵红庆). Liquid-Liquid continuous biphasic extraction for anthraquinone from rhubarb[J]. *J Lanzhou Univ Med Sci*(兰州大学学报:医学版), 2008, 34(1): 44-46.
-
- (上接第 1311 页)
- 16 Lu H, Zhang L, Gu L, et al. Oxymatrine induces liver injury through JNK signalling pathway mediated by TNF- α in vivo [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 119: 405-411.
 - 17 Yuan D, Huang S, Berger E, et al. Kupffer cell-derived Tnf Triggers cholangiocellular tumorigenesis through JNK due to chronic mitochondrial dysfunction and ROS[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31: 771-789.
 - 18 M Zhu, X Zhou, J Zhao. Quercetin prevents alcohol-induced liver injury through targeting of PI3K/Akt/nuclear factor- κ B and STAT3 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14: 6169-6175.
 - 19 Huang QH, Xu LQ, Liu YH, et al. Polydatin protects rat liver against ethanol-onduced Injury: involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF- κ B p65 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, (1): 1-14.
 - 20 Kim SY, Jeong JM, Kim SJ, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1-15.