

掌叶大黄“柴禾”熏制加工过程中成分及体外抗氧化活性动态变化

冯银平¹, 帖晓燕¹, 张云鹤¹, 王 丹¹, 张文广¹, 苗小楼², 李秀娟³, 李 芸^{1*}
(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050;
3. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 探究掌叶大黄传统“柴禾”熏制加工过程中化学成分及体外抗氧化活性的动态变化。**方法** 采用 2015 年版《中国药典》方法和 DPPH 自由基清除法, 基于化学计量学对 12 批熏制不同天数掌叶大黄的水分、浸出物、蒽醌类成分及体外抗氧化活性进行差异性分析。**结果** 随着熏制天数的增加, 水分逐渐降至安全范围, 浸出物与抗氧化活性先增加后趋于稳定, 总蒽醌含量呈“单项递增”模式, 游离蒽醌呈近“M”型变化模式; 抗氧化活性与水分呈负相关, 与浸出物和总蒽醌含量呈正相关; 水分与浸出物、总蒽醌含量呈负相关。12 批样品被归为 4 类, 熏制 120~140 d 时质量“最优”, 40~100 d 时质量“较好”, 15~30 d 时质量“次之”, 0 d 时质量“较差”。游离蒽醌的变化是造成药材质量差异的最重要因素。**结论** 该方法可对熏制掌叶大黄质量进行较为全面地评价, 初步阐明传统产地熏制加工机理, 为规范其产地初加工方法提供科学支撑。
关键词: 掌叶大黄; 熏制加工; 蒽醌类; 抗氧化活性; 动态变化; 质量评价
中图分类号: R283 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2021)06-1526-05
doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2021. 06. 025

Dynamic changes of constituents and antioxidant activity *in vitro* of *Rheum palmatum* during the fumigation process of “Firewood”

FENG Yin-ping¹, TIE Xiao-yan¹, ZHANG Yun-he¹, WANG Dan¹, ZHANG Wen-guang¹,
MIAO Xiao-lou², LI Xiu-juan³, LI Yun^{1*}
(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

KEY WORDS: *Rheum palmatum* L.; fumigation processing; anthraquinones; antioxidant activity; dynamic changes; quality evaluation

掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 是《中国药典》收载的正品大黄之一^[1], 主要含有蒽醌类、蒽酮类、二苯乙烯类、苯丁酮类、色原酮类、黄酮类、鞣质类、多糖类等成分^[2], 其中蒽醌类是其重要的活性物质, 也是现行版《中国药典》规定控制大黄药材质量的指标, 具有抗炎、抗肿瘤、保护心血管、保肝、护肺、改善脑损伤、调节肠道菌群、治疗肾纤维化等生物活性^[3-5]。
甘肃礼县是掌叶大黄的传统道地产区, 种植历

史悠久, 但鲜品含水量较高, 根茎粗大, 质地坚实, 水分不易散失, 又因礼县气候潮湿阴冷, 采收期处于秋冬季, 易导致药材霉烂、糠心、变色、变质, 故采收后及时的干燥处理方式对保证药材质量和饮片临床疗效至关重要。大黄传统干燥方法主要有熏干法、烘干法、阴干法等^[6], 但烘干法对设备要求高导致生产成本高, 而阴干法历时较长, 易虫蛀霉变, 因而当地药农普遍采用符合农家生产加工模式的熏干法。历代本草对大黄药材干燥方法均

收稿日期: 2020-08-12
基金项目: 甘肃省高等学校产业支撑计划项目 (2020C-26); 甘肃省中医药管理局科研课题 (GZK-2018-6); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地开放基金项目 (ZYZL17-003)
作者简介: 冯银平 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药炮制与制药工艺研究。Tel: 18293113991, E-mail: xiaopzxf@163.com
* 通信作者: 李 芸 (1973—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药化学成分的分离分析与中药材的加工炮制工艺研究。Tel: (0931) 5161171, E-mail: liyunherb@163.com

有记载^[7-9]，宋平顺等^[10]发现，柴禾熏制可使掌叶大黄蒽醌类成分含量升高，但关于柴禾熏制加工过程中化学成分和药效的变化情况至今尚无报道。因此，本研究从以上 2 个方面出发，探讨柴禾熏制不同阶段掌叶大黄成分及体外抗氧化活性的动态变化规律，初步揭示药材产地熏制加工机理。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Agilent 1260 II 型高效液相色谱仪、Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）（美国 Agilent 公司）；BT125D 型电子天平、MA 37 型快速水分测定仪（德国赛多利斯公司）；Milli-Q 超纯水系统（德国默克生命科学公司）；FW-400A 型高建万能粉碎机（北京科伟永兴仪器有限公司）；DK-98-II 型电热恒温水浴锅（天津市泰斯特仪器有限公司）；R-200 旋转蒸发仪（瑞士 Buchi 公司）；SHB-III 循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）；DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科技有限公司）；KQ-300VDE 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Multiskan GO 多功能酶标仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；96 孔细胞培养板（北京鼎国生物技术有限公司）。

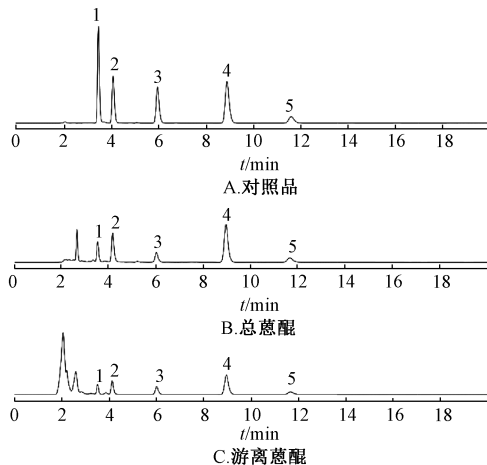
芦荟大黄素（批号 CHB160628）、大黄素甲醚（批号 CHB150817）、大黄酸（批号 CHB160628）、大黄素（批号 CHB150527）、大黄酚（批号 CHB160914）对照品均购自成都克洛玛生物科技有限公司，纯度≥98%。色谱纯甲醇、磷酸（天津市大茂化学试剂厂）；1，1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）（美国 Sigma-Aldrich 公司）；维生素 C（中国医药工业公司北京制药厂）；其他试剂均为分析纯；水为甘肃中医药大学科研实验中心分析测试一实验室自制超纯水。

1.2 样品 掌叶大黄药材采自甘肃礼县春天药业有限公司同一种植基地，委托当地药农产地柴禾熏制加工，经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的根及根茎。

2 方法与结果

2.1 熏制品制备 新鲜掌叶大黄采收后去掉支根，从中间切成两半，置于屋内棚上，使其切口向下，在棚下炉中点燃柴禾，不用明火，而用其烟熏制，直至完全熏干。根据熏制天数不同，分 2 年共 12 批样品，分别记为 S1.1~S1.7（熏制 0、10、15、30、40、60、120 d）及 S2.1~S2.5（熏制 0、60、

100、140、180 d），其中样品 S2.5 为熏制 140 d 后下架自然晾干而来。色谱图见图 1。



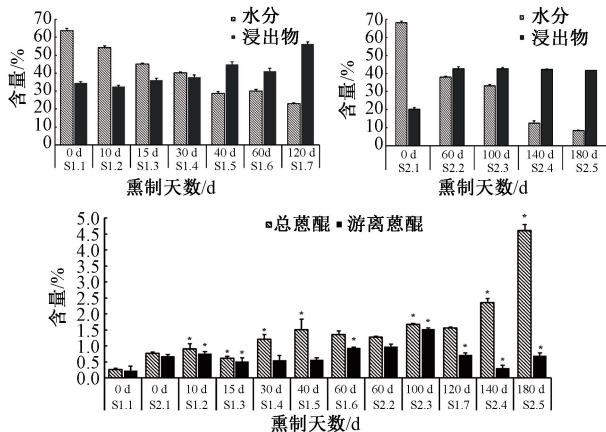
1. 芦荟大黄素 2. 大黄酸 3. 大黄素 4. 大黄酚 5. 大黄素甲醚
1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol 5. physcion

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2 水分、浸出物测定

2.2.1 水分 将样品粉碎，混合均匀，四分法取样，采用快速水分测定仪测定水分，平行 3 次，取平均值，结果见图 2。



注：与前一相邻采样点样品比较，总蒽醌和游离蒽醌含量分别有统计学差异（**P*<0.05）。

图 2 水分、浸出物、总蒽醌、游离蒽醌含量

Fig. 2 Content of moisture, extract, total anthraquinone and free anthraquinone

2.2.2 浸出物 取样品（按干燥品计）约 2 g，精密称定，按 2015 年版《中国药典》四部（通则 2201）水溶性浸出物测定项下热浸法进行浸出物测定，结果见图 2。

2.3 总蒽醌、游离蒽醌含量测定

2.3.1 色谱条件 参考文献 [1]，Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲

醇-0.1%磷酸（85：15）；体积流量 1 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 254 nm；进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量，加甲醇分别制备成质量浓度为 84、86、78、84、40 μg/mL 的溶液，各精密吸取 2 mL，混匀，即得。

2.3.3 总蒽醌供试品溶液制备 取本品粉末（过 4 号筛）约 0.15 g，精密称定，参考文献 [1] 报道的方法处理，即得。

2.3.4 游离蒽醌供试品溶液制备 取本品粉末（过 4 号筛）约 0.5 g，精密称定，参考文献 [1] 报道的方法处理，即得。

2.3.5 样品含量测定 取“2.3.2”下对照品溶液与“2.3.3”“2.3.4”下供试品溶液，在“2.3.1”项条件下测定，计算含量，色谱图见图 1，结果见图 2。

2.4 DPPH 自由基清除率测定

2.4.1 DPPH 贮备液制备 精密称取 DPPH 试剂 2.0 mg，甲醇溶解定容至 25 mL，即得（80 μg/mL），

避光置于 4 ℃ 冰箱中冷藏备用。

2.4.2 样品贮备液制备 取各样品粉末约 0.5 g，精密称定，精密加入 60% 乙醇 15 mL，超声（300 W）提取 30 min，抽滤，滤液旋干，残渣加甲醇溶解^[11]，定容至 100 mL，取 1 mL，甲醇定容至 10 mL，即得（500 μg/mL），放入 4 ℃ 冰箱中冷藏，以配制不同质量浓度的样品溶液。

2.4.3 维生素 C 对照液制备 取维生素 C 适量，加甲醇溶解，制备成质量浓度为 100 μg/mL 的溶液，即得。

2.4.4 自由基清除率测定 取上述溶液，分别稀释成 25、50、100、200、300、400、500 μg/mL 和 5、10、20、40、60、80、100 μg/mL，在 96 孔板上加入不同质量浓度的样品、DPPH 溶液各 100 μL，室温避光反应 30 min，于 517 nm 波长处测定吸光度 A_i 、100 μL 甲醇与 100 μL DPPH 溶液混合后吸光度 A_0 、100 μL 样品溶液与 100 μL 甲醇混合后吸光度 A_j ，平行 3 次，取平均值，按公式 $[1 - (A_i - A_j) / A_0]$ 计算清除率，同法处理维生素 C 对照液，结果见图 3。

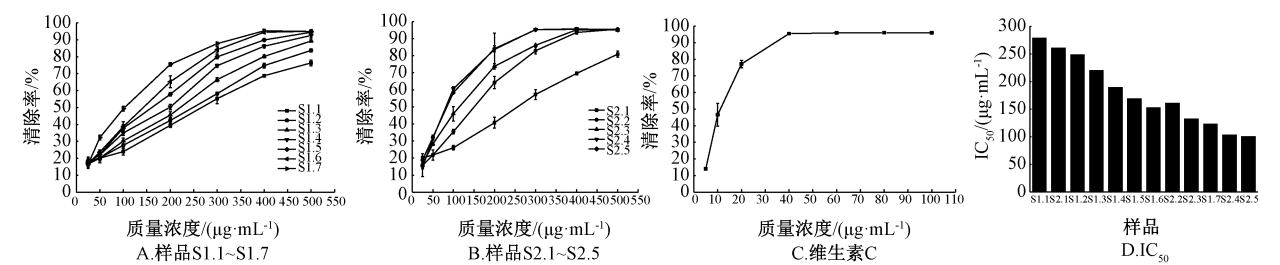


图 3 各样品 DPPH 自由基清除率与 IC₅₀ 值

Fig. 3 DPPH free radical scavenging rates and IC₅₀ values of various samples

2.4.5 IC₅₀ 值计算 运用 SPSS 19.0 软件中的 Probit 分析功能，以清除率为响应频率，观测值汇总 100%，质量浓度为协变量，模型为 Logit。

2.5 相关性分析

2.5.1 熏制天数与各指标 以熏制天数为自变量，水分、浸出物、总蒽醌含量及抗氧化活性（IC₅₀）为因变量进行 Pearson 相关性检验。结果显示，熏制天数与水分、总蒽醌、IC₅₀ 的相关系数分别为 -0.906（ $P=0.000$ ）、0.888（ $P=0.000$ ）、-0.920（ $P=0.000$ ），双侧 P 均 <0.01 ，提示熏制天数与水分呈负直线相关，与总蒽醌含量和抗氧化活性呈正直线相关；与浸出物的相关系数为 0.631（ $P=0.028$ ），双侧 $P<0.05$ ，结合图 2 可认为熏制天数与浸出物整体呈正相关，随着熏制天数的增加浸出

物先呈上升趋势，在 60 d 后逐渐趋于稳定。

2.5.2 抗氧化活性（IC₅₀）与各指标 以抗氧化活性（IC₅₀）为自变量，水分、浸出物、总蒽醌含量为因变量进行 Pearson 相关性检验。结果显示，IC₅₀ 与水分、浸出物、总蒽醌的相关系数分别为 0.961（ $P=0.000$ ）、-0.751（ $P=0.005$ ）、-0.766（ $P=0.004$ ），双侧 P 均 <0.01 ，提示抗氧化活性与水分呈负相关，与浸出物、总蒽醌含量呈正相关。

2.5.3 其他指标 水分与浸出物的相关系数为 -0.753（ $P=0.005$ ），与总蒽醌的相关系数为 -0.811（ $P=0.001$ ），双侧 P 均 <0.01 ，表明水分与浸出物、总蒽醌含量呈负相关。

游离蒽醌含量与各项指标之间均无相关性，结合 t 检验可知，随着熏制天数增加，两相邻采样点

游离蒽醌含量变化显著 ($P<0.05$)，整体呈近“M”型变化趋势，表明熏制过程中游离蒽醌变化复杂，但机制尚不明确。

2.6 化学模式识别

2.6.1 主成分分析 以 12 批熏制不同天数样品的水分、浸出物、总蒽醌、游离蒽醌、 IC_{50} 值作为特征变量值，将数据导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析，以主成分得分及各变量载荷为依据，结果见图 4。由此可知，第 1 主成分的方差百分比为 65.364%，第 2 主成分的方差百分比为 19.875%，累积方差百分比为 85.239%，可以表征原始数据特征；12 批样品聚为 4 大类，从左至右分别为熏制 120~140 d、熏制 40~100 d、熏制 15~30 d、熏制 0 d，对应药材质量为“最优”“较好”“次之”“较差”，表明熏制不同天数药材所含水分、浸出物、总蒽醌、游离蒽醌含量及抗氧化活性存在显著差异，所建立的模型良好，可以对不同质量药材进行有效区分。由图 5 可知，水分、浸出物、总蒽醌及 IC_{50} 在第 1 主成分中具有较大载荷，表明熏制天数影响水分、浸出物、总蒽醌含量及抗氧化活性，四者之间可能存在交互作用；第 2 主成分与游离蒽醌密切相关，表明掌叶大黄药材经熏制后游离蒽醌变化明显。

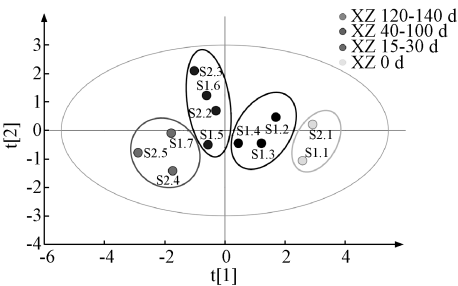


图 4 12 批样品主成分分析图

Fig. 4 Principal component analysis plot for twelve batches of samples

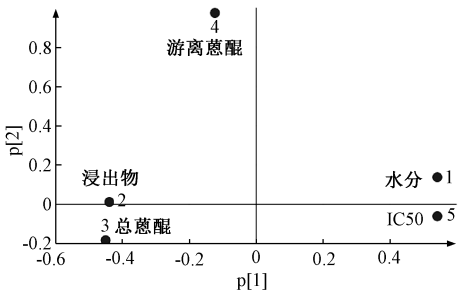


图 5 12 批样品各变量载荷图

Fig. 5 Variable load graph of twelve batches of samples

2.6.2 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 在主成分分析的基础上进行 PLS-DA^[12]，获得样品分布散点图，见图 6。由此可知，12 批样品根据熏制天数被分为 4 类，表明不同熏制天数下药材差异显著。

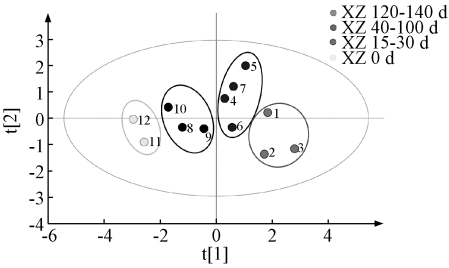


图 6 各样品 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 6 OPLS-DA score scatter plot for various samples

12 批样品 PLS-DA 模型中各变量的 VIP^[13] 见图 7，VIP 越大，表明该变量对于样品分类的贡献越大。由此可知，5 个变量对于差异性的影响程度依次为游离蒽醌> IC_{50} >水分>总蒽醌>浸出物，均为重要变量 (VIP>0.5)，其中游离蒽醌的 VIP>1.0，表明其变化是导致药材质量差异的重要因素。

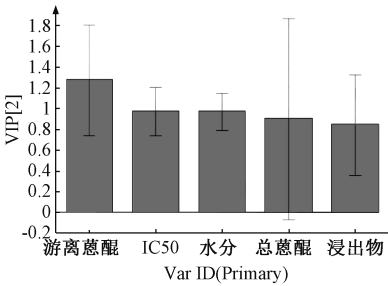


图 7 各样品 PLS-DA VIP 图

Fig. 7 PLS-DA VIP plot of various samples

3 讨论

自由基是单质或化合物均裂产生的带有未成对电子的原子或基团，研究发现其与心血管疾病 (CVD)、恶性肿瘤、2 型糖尿病、感染机制、纤维形成和神经紊乱等多种疾病的发生有密切的关系^[14-15]。研究发现，大黄提取物的抗氧化活性与蒽醌类成分有一定的相关性^[16]。课题组前期以大黄加工品的折干率、蒽醌衍生物含量及横切面质地和色泽变化为指标，比较了晒干法、阴干法、微波法、不同温度烘干和传统柴火熏制等不同干燥方式，结果显示不同干燥方式以熏干法的蒽醌类成分含量、横切面色泽质量最好^[17]。

熏干法的具体操作参考文献 [18]，本研究结果表明，掌叶大黄药材在熏制过程中化学成分和体外抗氧化活性发生显著变化。随着熏制天数增加，

水分降至安全范围，浸出物和抗氧化活性先增加后趋于稳定，总蒽醌含量呈“单项递增”模式，游离蒽醌“先增后减，再增再减”，即近“M”型变化模式。蒽醌类成分所呈现的变化模式在其饮片炮制过程中也有类似表现，杨丽等^[19]在研究大黄炭加热过程颜色特征与 14 种成分含量变化关系时发现随着加热温度升高，游离蒽醌呈“先增后减”变化趋势，并推测导致该变化的原因可能是温度升高导致结合蒽醌苷键断裂形成游离蒽醌，而加热时间过长后又使得游离蒽醌结构被破坏，游离蒽醌的羰基先降解由苯醌转化成萘醌，再进一步转化成醛或酮；另外有关大黄发酵使结合蒽醌转化为游离蒽醌的研究报道较为常见^[20]，而综合炒炭、发酵等炮制方法发现均与发热现象或微生物的参与有关，推测大黄药材采收之后，在一定含水量、适宜温度、相关微生物酶的参与下，其次生代谢产物蒽醌类成分的转化和积累仍十分活跃，故总蒽醌含量呈“单项递增”模式，而游离蒽醌的变化较为复杂。课题组将在后期进行相关微生物酶方面的研究，以期明确其变化机理，为进一步阐明熏制加工机制和规范产地加工技术提供参考。

致谢：衷心感谢甘肃礼县春天药业有限公司、兰州大学胡芳弟教授、甘肃省中医院闫治攀主管中药师以及课题组成员马冬妮、杨秀娟、石琪奇等对本研究提供的指导和帮助。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

[2] 王 玉，杨 雪，夏鹏飞，等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药，2019，50（19）：4821-4837.

[3] 万浩芳，万海同，周惠芬，等. 大黄总蒽醌提取物对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 中成药，2018，40（4）：771-776.

[4] 虞夏晖，朱雨晴，王于俊，等. 大黄蒽醌苷对大鼠脑缺血再

灌注损伤及肠道菌群的影响[J]. 中成药，2019，41（5）：1151-1155.

[5] 王亦君，冯舒涵，程锦堂，等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（13）：227-234.

[6] 杨秀娟，马冬妮，戴海蓉，等. 掌叶大黄产地加工与炮制一体化可行性的探讨[J]. 时珍国医国药，2019，30（2）：328-330.

[7] 陶弘景. 名医别录（辑校本）[M]. 北京：人民卫生出版社，1982：219.

[8] 余 靖. 本草古籍[M]. 北京：人民卫生出版社，2007：71.

[9] 苏 敬，尚志钧. 本草图经[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，1994：244.

[10] 宋平顺，晋小军，赵建邦，等. 不同加工方法对掌叶大黄中蒽醌类和酚酸类成分的影响[J]. 中国现代中药，2012，14（6）：46-49.

[11] 袁诗俊，龚梦瑀，李梦林，等. 大黄中抗氧化物质的提取工艺优化[J]. 食品工业科技，2018，39（19）：147-149；155.

[12] 拱健婷，赵丽莹，徐 东，等. 苦杏仁走油过程中外观性状、活性成分和酸败度的变化规律及其相关性分析[J]. 中国中药杂志，2020，45（13）：3155-3160.

[13] 施晓虹，杨日昭，赵立杰，等. 醇沉处理前后中药水提液理化性质的变化及其与喷雾干燥黏壁的关系[J]. 中国中药杂志，2020，45（4）：846-853.

[14] 徐 疆. 高脂血症治疗现状与展望[J]. 实用临床医学，2012，13（8）：137-139.

[15] Ginter E, Simko V, Panakova V. Antioxidants in health and disease. [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2014，115（10）：603-606.

[16] 吕慧英，赵晨曦，吴 海，等. 大黄提取物抗氧化活性与游离蒽醌相关性的研究[J]. 中草药，2010，41（3）：412-415.

[17] 李 芸，苗小楼，吴平安，等. 不同产地加工方法对掌叶大黄药材质量的影响[J]. 中药材，2011，34（8）：1196-1199.

[18] 甘肃省质量技术监督局. 无公害中药材大黄生产技术[S]. 2002.

[19] 杨 丽，温雅心，刘 洋，等. 大黄炭加热过程颜色特征与 14 种化学成分含量变化关系研究[J]. 中国中药杂志，2020，45（17）：4230-4237.

[20] Li X G, Du Y L, Wu G Z, *et al.* Solvent extraction for heavy crude oil removal from contaminated soils [J]. *Chemosphere*, 2012，88（2）：245-249.