

薯蓣总鞣质的提取工艺优选

王小平*, 王进, 陈建章, 尹建康

(江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] 目的: 优选薯蓣总鞣质的提取工艺。方法: 以总鞣质含量与转移率为评价指标, 通过单因素试验筛选提取方法、药材粉碎度、润湿时间等因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察乙醇体积分数、渗漉液收集量、渗漉流速对薯蓣总鞣质提取工艺的影响。结果: 选用乙醇渗漉法, 最佳工艺条件为渗漉前浸泡时间 24 h, 药材粉碎粒度为粗粉, 润湿时间 2 h, 乙醇体积分数 80%, 收集 8 倍量渗漉液, 渗漉流速 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论: 该工艺稳定可行, 适用于薯蓣片的工业化生产。

[关键词] 薯蓣; 提取工艺; 正交试验; 总鞣质; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0035-04

[doi] 10.11653/syjf2014030035

Optimization of Extracting Process of Total Tannins in *Dioscoreo cirrhosa*

WANG Xiao-ping*, WANG Jin, CHEN Jian-zhang, YIN Jian-kang

(Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total tannins in *Dioscoreo cirrhosa*. **Method:** With content and transfer rate of total tannin as indexes, which was determined by UV. Single factor tests were adopted to screen extracting method, grinding degree, wetting time and other factors, effects of ethanol concentration, percolation velocity, collected liquid of percolate on extracting technology was investigated by

[收稿日期] 20130627(023)

[基金项目] 江西省教育厅科学技术基金项目(GJJ13789); 江西省卫生厅中医药科研基金重点课题(2009Z11)

[通讯作者] * 王小平, 硕士, 副教授, 从事中药炮制与新药开发研究, Tel: 0794-8239328, E-mail: jxrcwpx@163.com

累计释放量逐渐增大, 可能是由于包裹于内水相的药物穿过油层释放出来。与未包裹的人参总皂苷溶液相比, 复乳延缓了药物的释放, 能维持长久的药物有效浓度, 减少给药次数。

[参考文献]

- [1] 陈新梅. 大鼠肠道酶和菌群对人参皂苷 R_{g_1} 的代谢转化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 210.
- [2] 王丽双, 祁小乐, 朱家璧. 复乳的基础研究进展[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(9): 664.
- [3] 陈新梅, 孔志勇, 丁嘉信. W/O/W 型薄荷油复乳的制备及其性质初步研究[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(3): 130.
- [4] 万东华, 林滔, 李丽. W/O/W 型复乳配方的优选及性质考察[J]. 海峡药学, 2012, 24(7): 29.
- [5] 徐成业, 陈亭亭, 陆伟根. 大分子乳化剂对复乳稳定

- 性的影响及应用[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(6): 460.
- [6] 倪永兴. 药学应用数理统计[M]. 北京: 军事谊文出版社, 1994: 137.
- [7] 陈新梅. 曙红指示液在乳剂类型判定中的作用[J]. 齐鲁药事, 2012, 31(11): 650.
- [8] 汪国华, 张文惠, 陈剑. 丹皮酚复乳的药剂学研究[J]. 药学实践杂志, 2003, 21(6): 373.
- [9] 蒋楠, 孙雯, 李晔, 等. 葛根素微乳凝胶的制备及体外释放考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 34.
- [10] 张立, 崔名全, 尹蓉莉, 等. 葛根素磷脂复合物的制备及表征[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(11): 28.
- [11] 陈丽华, 赵小婷, 吴德智, 等. 电导率法筛选微乳处方及其相行为的研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(1): 40.

[责任编辑 全燕]

$L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** Ethanol percolation method was adopted, its optimum extraction process was as follows: soaked 24 h before percolation, grinding degree of herbs with coarse powder, wetting time 2 h, ethanol concentration of 80%, percolation velocity of $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, collected 8 times the amount of percolation solution. **Conclusion:** Optimized extraction process was stable and practicable, which was suitable for industrial production of *D. cirrhosa* tablets.

[**Key words**] *Dioscorea cirrhosa*; extraction process; orthogonal design; total tannins; single factor test

出血证为妇科临床常见病^[1],鉴于妇科出血的特殊性,单纯应用西药止血药的疗效并不佳,故应考虑选用具有多靶点、多成分、多环节作用特点的中药制剂治疗该病症。薯蓣主要含有鞣质、酚类成分,具有抗菌、抗溃疡、抗病毒、抗菌、止血及降压等作用^[2-3],在民间被广泛用于治疗出血症^[4]。现代药理试验表明薯蓣可有效缩短出血时间和凝血时间^[5-7]。由薯蓣水提浸膏制备的薯蓣片收载于部颁标准,主要用于治疗月经过多、功能性子宫出血及产后出血^[8],但由于薯蓣主要含有缩合鞣质,在水提加热过程中易致其氧化、脱水缩合为不溶于水的鞣酐沉淀,且浸膏收率高,存在服药量大、药效不稳定等问题。本实验以总鞣质含量及转移率为评价指标,通过正交试验优选薯蓣总鞣质的提取工艺,为薯蓣片的二次开发提供参考。

1 材料

TU-1901型紫外-可见分光光度计(北京普析通用分析仪器有限公司),AB265-S型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器集团),FST-III-10型精密型超纯水机(上海富诗特仪器设备有限公司)。薯蓣购自抚州市临川区医药公司,经江西中医药大学高等专科学校李秀英副教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea cirrhosa* Lour. 的块茎,儿茶素对照品购自中国食品药品检定研究院,批号 110877-200001,所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总鞣质的含量测定^[9]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品 23.75 mg 置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取薯蓣粉末约 0.1 g,置 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,超声处理 30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密称取对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇

定容至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。精密量取各溶液 0.5 mL, 分别加至包有锡箔的试管中,各加入 3% 香草醛甲醇溶液 2.5 mL 和 30% 浓硫酸甲醇溶液 2.5 mL, 摇匀,避光显色 20 min, 以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法于 500 nm 处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,质量浓度为纵坐标,得回归方程 $C = 0.2005A - 0.0221$ ($r = 0.9998$),表明儿茶素在 4.75 ~ 47.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 取对照品溶液适量,按 2.1.3 项下方法连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.13%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取供试品溶液分别于制备后 1, 2, 3, 5, 7, 9 h 按 2.1.3 项下方法测定 A, 结果 RSD 1.77%,表明供试品溶液在 9 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同批薯蓣粉末 6 份,每份 0.1 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定 A,结果以儿茶素计算总鞣质平均质量分数 189.04 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.77%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 分别精密称取已知总鞣质含量的薯蓣粉末 6 份,每份 0.05 g,各加入儿茶素对照品 10 mg,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算总鞣质平均回收率 99.48%, RSD 2.81%,表明该方法的回收率良好。

2.1.8 样品测定 分别精密称取薯蓣粉末 3 份,每份 0.1 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算总鞣质平均质量分数 197.33 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.01%。

2.2 不同提取方法比较^[8,10]

2.2.1 煎煮法 取薯蓣粗粉 3 份,每份 25 g,分别加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,合并滤液,测定体积(另取样 10 mL 备用),于 80 °C 减压浓缩成稠膏状,80 °C 减压干燥成干浸膏,精密称重,计算平均浸膏收率。

2.2.2 乙醇回流法 取薯蓣粗粉 25 g,共 3 份,分别用 10 倍量 90% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,测定体积(另取样 10 mL 备用),于

80 ℃减压浓缩成稠膏状,80 ℃减压干燥成干浸膏,精密称重,计算平均浸膏收率。

2.2.3 乙醇渗漉法 取薯蓣粗粉 25 g,共 3 份,分别用 90% 乙醇润湿 2 h,装筒,浸泡 24 h,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度进行渗漉,收集渗漉液至无鞣质显色反应为止,测定体积(另取样 10 mL 备

用),于 80 ℃减压浓缩成稠膏状,80 ℃减压干燥成干浸膏,精密称重,计算平均浸膏收率。

分别称取 3 种方法制备的干浸膏,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法测定 3 种提取液和干浸膏中总鞣质含量,结果见表 1。

表 1 薯蓣总鞣质不同提取工艺的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

方法	提取液中总鞣质		平均浸膏收率/%	浸膏中总鞣质	
	质量/g	转移率/%		质量/g	转移率/%
煎煮	4.480 ± 0.412	90.10	28.60 ± 2.87	1.635 ± 0.245	33.05
乙醇渗漉	4.424 ± 0.343	89.41	24.46 ± 1.94	2.988 ± 0.217	60.39
乙醇回流	4.298 ± 0.366	86.86	22.74 ± 1.70	1.998 ± 0.228	40.19

注:浸膏收率% = 干浸膏质量/药材取样量 × 100%;提取液中总鞣质转移率% = 提取液中总鞣质质量/(药材取样量 × 药材中总鞣质质量分数) × 100%;浸膏中总鞣质转移率 = 干浸膏中鞣质质量/(药材取样量 × 药材中鞣质质量分数) × 100%。

由表 1 可知,采用乙醇渗漉法与煎煮法制备的提取液中总鞣质含量及转移率相近,均稍高于乙醇回流法,但煎煮法提取液的体积大,为后续处理增加了困难。当将煎煮法提取液制备成干浸膏时,虽然浸膏收率较高,但总鞣质含量及转移率均明显低于乙醇渗漉法,原因是煎煮法制备的水提液后续浓缩、干燥工序中加热时间长,而缩合鞣质受热后易形成鞣酐沉淀,导致总鞣质含量迅速下降,故选择乙醇渗漉法。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 药材粉碎粒度 取薯蓣药材适量,分别粉碎成最粗粉、粗粉、中粉、细粉。称取不同薯蓣药材粉末各 3 份,每份 50 g,分别置于 250 mL 烧杯中,加 90% 乙醇 100 mL 润湿 2 h,装入同一规格渗漉筒中,浸泡 24 h,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度进行渗漉,收集渗漉液 500 mL。试验过程中发现薯蓣细粉组的渗漉速度太慢而放弃收集。依法测定前 3 种粒度薯蓣渗漉液中总鞣质含量,计算平均转移率分别为 73.18% (RSD 4.27%), 85.74% (RSD 5.09%), 86.15% (RSD 4.11%), 结合渗漉速度,确定薯蓣药材粉碎粒度为粗粉。

2.3.2 润湿时间 取薯蓣粗粉适量至烧杯中,加 2 倍量 90% 乙醇拌匀,分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min 挑选较大的薯蓣颗粒,观察药材润湿情况,结果润湿 120 min 时颗粒方可充分润透。

2.3.3 乙醇体积分数 称取薯蓣粗粉 50 g,共 12 份,等分成 4 组,各组依次加入 2 倍量体积分数为 30%, 50%, 70%, 90% 的乙醇溶液拌匀,润湿 2 h,其余操作同 2.3.1 项,收集渗漉液 500 mL,计算平均转移率分别为 69.83%, 76.52%, 82.04%,

86.76%, RSD 分别为 7.22%, 5.73%, 4.80%, 4.97%, 故选择 70% ~ 90% 的乙醇溶液。

2.3.4 浸泡时间 称取薯蓣粗粉 50 g,共 12 份,等分成 4 组,各加入 2 倍量 90% 乙醇拌匀,润湿 2 h,装入同一规格渗漉筒中,分别浸泡 6, 12, 24, 48 h,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 渗漉速度进行渗漉,收集渗漉液 500 mL,依法测定渗漉液中总鞣质含量,计算平均转移率分别为 76.77%, 83.16%, 86.50%, 86.45%, RSD 分别为 2.54%, 1.07%, 4.65%, 3.88%, 故选择渗漉前浸泡时间 24 h。

2.3.5 渗漉流速 称取薯蓣粗粉 50 g,共 12 份,等分成 4 组,各加入 2 倍量 90% 乙醇拌匀,润湿 2 h,装入同一规格渗漉筒中,浸泡 24 h,分别以 2, 3, 4, 5 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度渗漉,收集渗漉液 500 mL,计算总鞣质平均转移率分别为 86.45%, 85.80%, 85.29%, 78.90%, RSD 分别为 5.34%, 3.89%, 2.04%, 6.15%。

2.3.6 渗漉液收集量 称取薯蓣粗粉 50 g,共 3 份,各加入 2 倍量 90% 乙醇,拌匀,润湿 2 h,装入同一规格渗漉筒中,浸泡 24 h,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度进行渗漉,分段收集渗漉液,每 20 mL 为 1 份,收集至第 26 份时渗漉液基本无鞣质显色反应,故选择渗漉液收集量宜 < 12 倍。

2.4 提取工艺优化 根据项目合作单位生产实际情况,确定渗漉筒中药材填充径高比 1:5。在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、渗漉液收集量、渗漉流速为考察因素,以总鞣质含量和转移率为考察指标,称取薯蓣粗粉 9 份,每份 50 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见

表 3, 方差分析见表 4, 5。

表 2 薯蓣总鞣质提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数 /%	B 收集量 /倍	C 渗漉流速 /mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹
1	70	8	2
2	80	10	3
3	90	12	4

表 3 薯蓣总鞣质提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总鞣质		
					质量浓度 /g·L ⁻¹	转移率 /%	
1	1	1	1	1	14.54	58.95	
2	1	2	2	2	13.73	69.58	
3	1	3	3	3	12.07	73.40	
4	2	1	2	3	18.41	74.64	
5	2	2	3	1	16.32	82.70	
6	2	3	1	2	13.83	84.10	
7	3	1	3	2	18.28	74.11	
8	3	2	1	3	16.85	85.39	
9	3	3	2	1	14.47	87.99	
质量浓度	K ₁	40.34	51.23	45.22	45.33		
	K ₂	48.56	46.90	46.61	45.84		
	K ₃	49.60	40.37	46.67	47.33		
	R	3.09	3.62	0.48	0.67		
转移率	K ₁	201.93	207.70	228.44	229.65		
	K ₂	241.44	237.67	232.21	227.79		
	K ₃	247.49	245.50	230.21	233.43		
	R	15.19	12.60	1.26	1.88		

表 4 总鞣质质量浓度方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	17.155	2	8.578	23.826	<0.05
B	19.925	2	9.963	27.673	<0.05
C	0.449	2	0.224	0.623	>0.05
D(误差)	0.720	2	0.360		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ (表 5 同)。

表 5 总鞣质转移率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	408.302	2	204.151	74.255	<0.05
B	265.470	2	132.735	48.279	<0.05
C	2.372	2	1.186	0.431	>0.05
D(误差)	5.499	2	2.749		

由直观分析可知, 各因素对总鞣质含量的影响

顺序为 $B > A > C$, 方差分析表明因素 A, B 具有显著性影响, C 因素则无显著性影响, 最佳工艺条件为 $A_3B_1C_3$ 。各因素对总鞣质转移率的影响顺序为 $A > B > C$, 因素 A, B 具有显著性影响, C 因素则无显著性影响, 最佳工艺条件为 $A_3B_3C_2$ 。综合生产实际考虑, 确定薯蓣总鞣质的最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3$, 即提取溶媒为 80% 乙醇, 收集 8 倍量渗漉液, 流速 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.5 验证试验 称取薯蓣粗粉 3 份, 每份 2.5 kg, 按优选的工艺条件进行重复性试验, 结果渗漉液中总鞣质平均质量浓度 $18.37 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RSD 5.26%), 转移率 86.53% (RSD 3.45%), 表明该工艺重复性好且稳定可行。

3 讨论

缩合鞣质是由黄烷-3-醇或黄烷-3,4-二醇类通过 4,8 或 4,6 位以 C-C 缩合而成的一类结构比较复杂多元酚类化合物, 易溶于水、乙醇、丙酮等溶剂, 该成分用酸、碱处理或久置均不能水解, 但在空气中久置或在加热过程中易致缩合成高分子不溶于水的产物“鞣红”, 故本实验选用不需加热的乙醇渗漉法与薯蓣片的煎煮法及常用的乙醇回流法进行比较。

[参考文献]

[1] 王新花. 固冲汤加减联合西药治疗围绝经期功能失调性子宫出血 56 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 241.

[2] 钟超, 严奉祥. 薯蓣的研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2007, 23(5): 675.

[3] 夏承来, 钟超. 薯蓣醇提成分对大鼠血压的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(1): 160.

[4] 刘晓鹏, 张永萍, 闫春霞, 等. 小剂量氟哌利多和安定在人工流产后出血量的观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 279.

[5] 南京中医药大学. 中药大辞典. 下册 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3722.

[6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 22 卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 228.

[7] 刘日才. 大剂量红孩儿治疗出血症 [J]. 浙江中医杂志, 1997, 42(5): 228.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 第 4 册 [S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药典委员会编, 1991: 219.

[9] 程悦, 陈嘉升, 陈建萍, 等. 地榆提取物中不同类型鞣质的测定 [J]. 中成药, 2011, 33(5): 852.

[10] 黄瑞松, 苏青, 黄永灵, 等. 均匀设计法优选薯蓣的提取工艺条件 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(3): 199.

[责任编辑 全燕]