

# 正交试验优选罗布麻叶中总鞣质提取工艺

樊珍珍, 热娜·卡斯木\*, 王晓梅, 胡君萍, 王新玲, 王小青  
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的: 优选罗布麻叶中总鞣质的提取工艺。方法: 以鞣质含量为指标, 采用单因素试验考察提取方式、提取溶剂、料液比等因素对提取工艺的影响; 以浸膏得量和总鞣质提取量为综合评价指标, 通过正交试验考察提取次数、提取时间及料液比对罗布麻叶中总鞣质提取工艺的影响, 确定最佳提取工艺。结果: 最佳提取工艺为  $A_2B_3C_3$ , 即加 20 倍量甲醇回流提取 3 次, 每次 3 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 可作为罗布麻叶的工业化生产工艺。

**[关键词]** 罗布麻叶; 总鞣质; 提取工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0013-04

**[doi]** 10.11653/zgsyxfjzxx2013070013

## Optimization of Extraction Technology for Total Tannin from Leaves *Apocynum venetum* by Orthogonal Test

FAN Zhen-zhen, RENA Ka-simu\*, WANG Xiao-mei, HU Jun-ping, WANG Xin-ling, WANG Xiao-qing  
(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**[收稿日期]** 20121021(001)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(201191259); 2012 年国家科技支撑计划课题(2012BAI30B02)

**[第一作者]** 樊珍珍, 在读硕士, 从事新疆特色中药资源的开发与利用, Tel: 0991-4363345, E-mail: van-zone26@163.com

**[通讯作者]** \* 热娜·卡斯木, 博士, 教授, 从事新疆特色中药资源的开发与利用, Tel: 0991-4362473, E-mail: renakasimu@vip.sina.com

用水, 15% 乙醇及 35% 乙醇梯度洗脱时, 35% 乙醇的洗脱液中总黄酮纯度达 54.24%。推测可能原因是南山茶花醇提物中水溶性及极性大的杂质较多, 降低了富集物中总黄酮的相对含量, 用 15% 乙醇可有效地将这些杂质与主要黄酮类物质分离。因此, 确定最佳纯化工艺为上样液体积 9 BV, 依次用 3 BV 去离子水, 15% 乙醇 3 BV, 35% 乙醇 10.5 BV 以  $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$  流速梯度洗脱, 结果 35% 乙醇洗脱液中总黄酮纯度由 37.4% 提高至 54.24%, 样品中总黄酮洗脱率也达 29.83%。

### [参考文献]

- [1] 王永奇, 吴小娟, 李红冰, 等. 药用山茶属植物的研究[J]. 大连大学学报, 2006, 27(4): 47.
- [2] Wu X J, Tang L, Lin H J, et al. Flavonoids from seeds of *Camellia semiserrata* Chi. and their estrogenic activity[J]. Biosci Biotechnol. Biochem, 2008, 72(9): 2428.
- [3] 林红景, 冯宝民, 史丽颖, 等. 南山茶叶化学成分的研究

究[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(24): 1852.

- [4] 张薇薇, 于大永, 史丽颖, 等. 南山茶果皮化学成分的研究[J]. 广西植物, 2012, 32(5): 698.
- [5] 唐玲, 冯宝民, 史丽颖, 等. 山茶属植物的抗骨质疏松作用[J]. 中药材, 2008, 31(10): 1540.
- [6] 王宝昌, 张薇薇, 史丽颖, 等. 南山茶花化学成分的含量分析[J]. 华西药学, 2012, 27(6): 100.
- [7] 黄志宏, 蒋东旭, 赖小平. 大孔吸附树脂法富集纯化荆芥穗总黄酮的工艺研究[J]. 中药材, 2010, 33(9): 1476.
- [8] 朱欣婷, 刘云. 大孔树脂纯化无花果叶总黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 13.
- [9] 林红景, 吴小娟, 唐前, 等. Diaion HP-20 富集纯化南山茶种子抗原原 I 型骨质疏松有效部位的研究[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 183.
- [10] 海平, 苏雅乐其其格. 蒙药小白蒿中总黄酮的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 59.

[责任编辑 仝燕]

**[ Abstract ] Objective:** To optimize extraction process of total tannins from leaves of *Apocynum venetum*. **Method:** With the content of total tannins as index, single factor test was used to investigate extraction methods, extraction solvent, solid-liquid ratio and other factors on extraction technology; With extract amount and yield of total tannins as comprehensive evaluation index, orthogonal test was used to optimize extraction technology of total tannins from leaves of *A. venetum* with liquid-solid ratio, extraction time and times as factors. **Result:** Optimum extraction process was  $A_2B_3C_3$ , that was as following: reflux extracted 3 times with 20 times the amount of methanol, 3 h each time. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable, reasonable and feasible, it could be as an industrial production technology for leaves of *A. venetum*.

**[ Key words ]** leaves of *Apocynum venetum*; total tannins; extraction technology; orthogonal test

罗布麻叶亦称罗布奴尔坎得利,分布于我国新疆、山东、陕西等省区。其性凉,具有清热凉血、利尿消肿、行气凉肝、镇静安神之功效,临床用于治疗头晕、神经衰弱、高血压及肝硬化引起的腹水等<sup>[1]</sup>,药理试验证实其主要活性成分为黄酮及萜类成分<sup>[2-3]</sup>。目前对罗布麻叶中黄酮类成分的提取工艺研究较多<sup>[4-6]</sup>,对萜类成分研究较少。萜类成分是组成缩合鞣质的物质之一,鞣质类物质具有抗菌、抗肿瘤、抗抑郁、抗氧化、止血、收敛等功效,对心脏和心血管也有一定效应<sup>[7-9]</sup>。本实验对罗布麻叶中总鞣质进行提取工艺的优化,以提高罗布麻叶中总鞣质的提取率,为更好地开发中药罗布麻叶资源提供实验依据。

## 1 材料

T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),AL104 型电子分析天平(梅特勒-托利多上海有限公司),1001 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)。

罗布麻叶(购于新疆头屯河区柯坪路民建药店,经新疆医科大学药学院胡君萍教授鉴定为夹竹桃科植物罗布麻 *Apocynum venetum* L. 的干燥叶),没食子酸对照品(天津市光复精细研究所,批号 2006-05-08),干酪素(北京海淀区微生物培养基制品厂),Folin 试剂按《中国药典》2010 年版配制,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 总鞣质的含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取没食子酸对照品 25 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加水溶解,定容至刻度,精密量取 5 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 罗布麻叶粉碎,过 60 目筛,称取一定量样品置于容器中,采用不同方法,按不同溶剂浓度、料液比、时间、温度进行提取,抽

滤,合并滤液,加水定容至 200 mL 量瓶中,即得。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密吸取没食子酸对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,分别加磷钼钒酸试液 1 mL,依次精密加 20% 碳酸钠溶液 12 mL,加水稀释至刻度,摇匀,放置 30 min,以水为空白,于 760 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $A = 0.1114C - 0.09764$  ( $r = 0.9999$ ),表明没食子酸在  $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与 A 呈良好线性关系。

**2.1.4 样品测定** 按《中国药典》2010 版一部附录 XB 鞣质含量测定方法测定<sup>[10]</sup>。

**2.1.4.1 总酚含量** 精密量取供试品溶液 0.2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,按 2.1.3 项下方法测定 A,利用标准曲线计算其质量浓度。

**2.1.4.2 不被吸附的多酚含量** 精密量取供试品溶液 25 mL,加入至已有干酪素 0.6 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中,密塞,置 30 °C 水浴中保温 1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,过滤弃初滤液,取续滤液 0.2 mL 置 25 mL 棕色量瓶中,按 2.1.3 项下方法测定 A,利用标准曲线计算其质量浓度。

鞣质含量 = 总酚量 - 不被吸附多酚含量

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 0.2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,按 2.1.3 项下方法测定 A,重复测定 5 次, RSD 0.08%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 加样回收率试验** 精密吸取供试品溶液 0.2 mL,分成 3 组,分别准确加入高、中、低 3 个剂量组的对照品,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算加样回收率为 95.45%, RSD 0.88%。

## 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 提取方法** 精密称取罗布麻叶粉末 3 份,每份 1 g,分别采用回流法、超声法及冷浸法进行提取,按 2.1.4 项下方法测定鞣质含量,结果回流法较冷浸和超声提取效果更好。

**2.2.2 提取溶剂** 精密称取罗布麻叶粉末 4 份,每份 1 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入甲醇、乙醇、丙酮、水各 20 mL 进行回流提取,抽滤,定容,测定鞣质含量,结果表明甲醇的提取效果要优于其他溶剂。

**2.2.3 提取溶剂体积分数** 精密称取罗布麻叶粉末 11 份,每份 1 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入水,体积分数为 20%,40%,60%,80% 的甲醇水溶液,甲醇,体积分数为 20%,40%,60%,80% 的丙酮水溶液,丙酮各 20 mL 进行回流提取,抽滤,定容,测定鞣质含量(鉴于文献中含水丙酮的提取效果较好,故将含水丙酮也作为提取溶剂进行考察),结果见图 1。表明甲醇的提取效果最好。

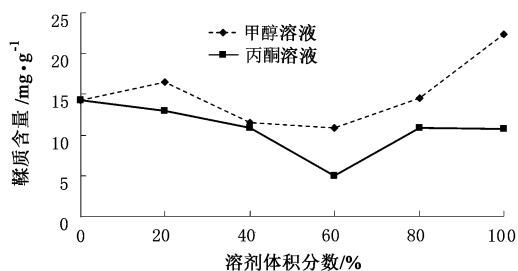


图 1 罗布麻叶中总鞣质提取溶剂的筛选

**2.2.4 料液比** 精密称取罗布麻叶粉末 10 份,每份 1 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,分别加入 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mL 甲醇回流提取,抽滤,定容,测定鞣质含量,结果表明料液比为 1:20 时提取效果最好。

**2.2.5 提取时间** 精密称取罗布麻叶粉末 5 份,每份 1 g,分别置于 100 mL 圆底烧瓶中,各加入甲醇 20 mL,分别回流提取 0.5, 1, 2, 3, 4 h,抽滤,定容,测定鞣质含量,结果表明提取 2 h 时鞣质含量最高。

**2.3 正交试验** 在单因素试验基础上,选取料液比、提取次数、提取时间为考察因素,每个因素设定 3 个水平,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,以浸膏得量和总鞣质提取量的综合评分为指标,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 罗布麻叶中总鞣质提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加醇量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次
1	15	1	1
2	20	2	2
3	25	3	3

由直观分析可知,各因素对鞣质提取率的影响顺序为 C > B > A。方差分析结果显示,因素 A 对提取工艺具有显著性影响,因素 B, C 均对提取工艺具

有极显著影响,确定最佳工艺条件为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即药材加 20 倍量甲醇回流提取 3 次,每次 3 h。

表 2 罗布麻叶中总鞣质提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	鞣质 提取量 /mg·g <sup>-1</sup>	浸膏 质量 /g	综合 评分
1	1	1	1	1	19.69	0.366 9	75.34
2	1	2	2	2	23.64	0.413 9	89.30
3	1	3	3	3	25.55	0.437 1	96.07
4	2	1	2	3	25.79	0.446 1	97.20
5	2	2	3	1	22.56	0.429 6	87.56
6	2	3	1	2	26.45	0.449 3	99.33
7	3	1	3	2	21.31	0.464 8	84.44
8	3	2	1	3	24.54	0.440 5	93.16
9	3	3	2	1	23.16	0.426 4	88.38
K <sub>1</sub>	260.7	257.0	251.3	267.8			
K <sub>2</sub>	284.1	270.0	273.1	274.9			
K <sub>3</sub>	266.0	283.8	286.4	268.1			
R	23.40	26.80	35.10	7.1			

注:综合评分 = 浸膏质量/浸膏质量最大值 × 20% + 鞣质提取量/鞣质提取量最大值 × 80%。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	261.368	2	130.684	5.741	<0.05
B	337.306	2	168.653	7.409	<0.01
C	622.320	2	311.160	13.670	<0.01
D(误差)	409.713	18	22.762		

注: F<sub>0.05</sub>(2, 18) = 3.55, F<sub>0.01</sub>(2, 18) = 6.01。

**2.4 验证试验** 精密称取罗布麻叶粉末 3 份,每份 1 g,分别置于 100 mL 圆底烧瓶中,按最佳提取条件进行 3 次验证试验,分别测定罗布麻叶中总鞣质含量。结果表明总鞣质的平均提取量 25.74 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 3.103%),表明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

关于鞣质含量测定方法及条件的文献较多<sup>[11-14]</sup>,本试验选择 2010 年版《中国药典》中干酪素法,同时对条件进行一定调整。试验发现,采用 29% 碳酸钠常会析出,无法完全溶解。李志猛等<sup>[13]</sup>改用 1.5% 碳酸钠,但选用的对照品是鞣酸,20% 碳酸钠能够完全溶解且与 29% 碳酸钠的测定效果无太大差距,故本实验选用 20% 碳酸钠;其用量经过筛选 16 mL 时效果较好,但加入 12 mL 与 16 mL 的 A 差距不大,故选择加入量 12 mL。谢坤、沈洁等<sup>[17-18]</sup>对干酪素用量进行了考察,确定干酪素用量

0.6 g;有文献报道干酪素空白对不被吸附的多酚 A 会有影响,需进行干酪素空白的 A 测定并扣除干酪素空白多酚含量的影响<sup>[15-16]</sup>,本实验对干酪素空白进行 A 测定,发现其 A 基本趋近于零,认为干酪素空白的的影响并不大,故并不将干酪素的影响算入。杨铮等<sup>[12]</sup>对显色时间进行考察,确定显色 15 min 后较为稳定,李志猛等<sup>[13]</sup>选择在 30 min 后测定,谢坤、沈洁等<sup>[17-18]</sup>则在 90 ~ 120 min 进行测定,本实验经过考察,确定显色后 30 min 时 A 较大且稳定。

因鞣质类物质不稳定,单因素试验考察了温度对鞣质含量的影响,结果发现温度对提取工艺影响并不大,故并未将温度作为一个因素列入正交试验,选择甲醇的沸点 65 °C 作为提取温度。预试验对不同体积分数的乙醇进行考察,发现相对于水、乙醇及丙酮,纯甲醇的提取效果最好,同时甲醇作为穿透细胞能力较强的溶剂,认为其提取出来的物质会更加全面;鞣质提取率于采用 20% 甲醇提取时达峰值,可能与罗布麻叶中鞣质的性质有一定关系,有待进一步探讨。

罗布麻叶在新疆有一定资源优势,具有较大的开发利用前景,本实验对罗布麻叶中鞣质的提取工艺进行研究,通过对提取方法比较发现,确定采用回流法提取,该法较明胶沉淀法<sup>[19-20]</sup>更简单易行、省时且提取效率高,对其他药材中鞣质类成分的提取有一定参考意义,同时为后续罗布麻叶鞣质中有效成分的研究奠定基础。

#### [参考文献]

[1] 刘勇民. 维吾尔药志[M]. 乌鲁木齐:新疆卫生科技出版社,2006:428.

[2] 侯晋军,韩利文,杨官娥,等. 罗布麻叶化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药,2006,37(10):附7.

[3] 揭金阶. 罗布麻叶总黄酮类化合物的提取及含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(12):1490.

[4] 叶菊. 罗布麻总黄酮提取、分离及抑菌活性的初步研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2000.

[5] 杨志芳,王维娜,杨坤,等. 正交设计优选罗布麻叶中总黄酮提取工艺[J]. 中草药,2006,37(8):1177.

[6] 吴桂梅. 罗布麻叶中黄酮类化合物的分离提取及抗氧化、抗抑郁活性研究[D]. 长春:长春师范学院,2011.

[7] 夏昆华,周鲁,左之利. 黄烷醇类化合物抗氧化性的构效关系[J]. 华西药学杂志,2003,18(5):321.

[8] 刘超,陈若芸. 儿茶素及其类似物的化学和生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2004,29(10):1017.

[9] 王瑞斌,薛成虎. 国内鞣质生理活性研究进展[J]. 榆林学院学报,2010,20(2):47.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录63.

[11] 戴万生,赵荣华,陈红波. 干酪素法测定大黄鞣质类成分的研究[J]. 时珍国医国药,2003,14(6):324.

[12] 杨铮,秦丽娟,高建萍,等. 干酪素法测定诃子中鞣质的含量[J]. 内蒙古中医药,2005,20(6):31.

[13] 李志猛,李向日. 干酪素法测定不同产地金樱子中鞣质类成分的研究[J]. 中华中医药杂志,2009,24(2):230.

[14] 刘莹,熊富良,张雪琼,等. 叶下珠中鞣质的含量测定[J]. 医药导报,2007,26(10):1222.

[15] 王添敏,孙晓丽,彭雪,等. 胡桃楸的根、茎枝、叶和果皮中总鞣质的含量测定[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):32.

[16] 谢道刚,宋光志,刘静,等. 鞣质含量测定法(中国药典2005年版一部附录xB)方法学验证[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(6):50.

[17] 谢坤,唐丽,张婉,等. 磷钼钨酸/干酪素法测定蒙药阿给炮制前后的鞣质含量[J]. 中药材,2009,32(10):517.

[18] 沈洁,徐金钟,胡济宏,等. 磷钼钨酸-干酪素法测定丹参药材中鞣质的含量[J]. 分析化学研究简报,2008,36(4):553.

[19] 邹艳,李洪嫚,郭建鹏. 老鹤草鞣质结肠定位制剂的体外释放度[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):5.

[20] 郑明显,郑玲玲,温丽颖,等. 老鹤草鞣质超声循环提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):7.

[责任编辑 仝燕]