

核桃青皮中总鞣质的提取工艺优化

姜金慧, 霍金海, 王伟明*

(黑龙江省中医研究院中药所, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 优化核桃青皮中总鞣质的提取工艺。方法: 采用磷钼钨酸紫外分光光度法测定总鞣质含量。以总鞣质含量为指标, 采用单因素试验考察提取方法及溶媒; 选取提取次数、提取时间和料液比为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验优选核桃青皮中总鞣质的提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h, 鞣质提取率达 $26.65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 建立的总鞣质含量测定方法稳定可行, 优选的提取工艺可用于核桃青皮中总鞣质的工业化生产。

[关键词] 核桃青皮; 鞣质; 含量测定; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0014-03

Optimization of Extraction Technology of Total Tannin from Walnut Green Husk

JIANG Jin-hui, HUO Jin-hai, WANG Wei-ming*

(Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy
of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total tannin from walnut green husk.

Method: The content of total tannin was determined by phosphomolybdotungstic acid UV spectrophotometry method. With the content of total tannin as index, single factor test was used to investigate extraction method and solvent; Extraction times, extraction time and solid-liquid ratio were chosen as factors, extracting technology of total tannin from walnut green husk was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design test. **Result:** Optimum extracting technology was as following: extracted 3 times with 10 the amount of water, 1 h each time, extracting rate of total tannin was up to $26.65 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** Established a method of determination of total tannin was stable and feasible, optimized process could be used for industrial production of total tannin from walnut green husk.

[Key words] walnut green husk; tannin; content determination; extraction technology

核桃青皮又名青龙衣, 民间多用于消化系统、恶性肿瘤等疾病的治疗, 现代药理学研究表明青龙衣具有抗癌、抗菌、镇痛等作用^[1-2]。目前, 对青龙衣的化学成分研究多为蒽醌类和黄酮类成分, 对鞣质类成分研究较少, 但鞣质在青龙衣中含量仅次于黄酮、蒽醌类, 故本试验对青龙衣中总鞣质进行研究。

鞣质类成分的结构复杂, 人工合成不易, 目前国内主要天然植物中提取。由于天然资源有限、价格较高, 从植物中提取鞣质具有一定的经济意义。本试验以总鞣质的含量为指标, 采用单因素和正交试验优选核桃青皮中总鞣质的提取工艺, 为其工业化生产提供试验依据。

1 材料

核桃青皮为 2008 年采于黑龙江省哈尔滨市宾县地区, 由黑龙江省中医研究院初东君主任药师鉴定为胡桃科植物核桃楸 *Jugland mandshurica* Maxim. 的未成熟外果皮。UV-16 型紫外分光光度计(日本岛津), MH-250 型可调式电热套(北京科伟永仪器有限公司), 没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110831-200302), 试剂均为分

[收稿日期] 20120824(001)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2009ZX09102-138); 黑龙江省科技攻关项目(GC12C110); 哈尔滨市科技创新人才专项(2012RFQY042)

[第一作者] 姜金慧, 硕士, 从事中药化学成分分析研究, Tel: 0451-55665478, E-mail: 254374034@qq.com

[通讯作者] * 王伟明, 博士, 研究员, 从事中药新药研发, Tel: 0451-55665478, E-mail: ZYYJY@163.com

析纯。

2 方法与结果

2.1 总鞣质的含量测定^[3-6]

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称量没食子酸对照品 2.54 mg,置于 50 mL 棕色量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取核桃青皮粉末(过 40 目筛) 0.5 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 丙酮 50 mL,密封称定质量;超声提取 40 min,取出称定质量,用 70% 丙酮补足减失的质量;摇匀,静置后滤过,精密吸取续滤液 20 mL,减压回收至无丙酮味,转至 50 mL 棕色量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,静置后滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 总多酚含量 精密吸取供试品溶液 2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,加入磷钼钨酸显色剂 1 mL,加 20% Na_2CO_3 10 mL,加水稀释至刻度,摇匀,静置 30 min,以显色剂为空白,在 760 nm 处测定吸光度(A),计算总多酚含量。

2.1.4 不被吸附多酚的含量 精密吸取供试品溶液 25 mL(加入总多酚质量 ≤ 1.3 mg),置已装有 0.6 g 干酪素的具塞锥形瓶中,密塞,放入 30 °C 水浴中,时时振摇,保持 1 h,取出,放冷,滤过,精密吸取续滤液 2.0 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,按总多酚含量测定方法,测定溶液中游离多酚的含量。由于干酪素的水浸出液经显色后在 760 nm 处有吸收值,对不被吸附多酚的含量测定有干扰,因此需随干酪素空白干扰试验。精密称定干酪素 0.6 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入水 25 mL,密塞,置于 30 °C 水浴中,按上述方法测定干酪素空白溶液中多酚的含量。

不被吸附多酚的含量 = 溶液中游离多酚的含量 - 干酪素空白溶液中多酚的含量;鞣质的含量 = 总多酚的含量 - 不被吸附多酚的含量。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取没食子酸对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL,分别置于 25 mL 棕色量瓶中,按 2.1.3 项下方法测定 A。以 A 为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 4.525X + 0.0603$ ($r = 0.995$),表明没食子酸在 1.00 ~ 8.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液 1.0 mL,按 2.1.3 项下方法测定样品 A,连续测定 6 次, RSD 0.12%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 1.0 mL,按 2.1.3 项下方法进行显色,分别于显色后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h 测定溶液于 760 nm 处 A。结

果表明显色后放置时间的延长,样品溶液 A 逐渐下降,但在 3 h 内溶液 A 的 RSD 2.31%,说明样品溶液显色后至少在 3 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 取 6 份同一胡桃楸样品粉末 0.5 g,精密称定,按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1.3 项下方法测定总鞣质的含量,结果总鞣质平均质量分数 $15.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.29%。

2.1.9 加样回收率试验 取已知总多酚含量的胡桃楸样品粉末 9 份,每份 0.5 g,精密称定,分别加入一定量没食子酸对照品 70% 丙酮溶液 ($2.412 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使没食子酸的加入量为胡桃楸样品中总多酚含量的 50%, 100%, 150%。按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定样品中总多酚的含量,计算加样回收率,见表 1。结果总多酚的平均加样回收率为 99.26% (RSD 3.73%),表明总多酚含量测定方法的回收率良好,准确度满足要求。

表 1 胡桃楸样品中没食子酸的加样回收率

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
3.86	11.27	94.3	99.26	3.73
3.86	11.31	95.4		
3.86	11.32	95.7		
7.72	15.16	97.6		
7.72	15.28	99.1		
7.72	15.44	101.2		
11.34	19.25	102.5		
11.34	19.34	103.3		
11.34	19.45	104.2		

注:样品中含量均为 7.63 mg。

2.2 提取方法及溶媒的选择^[7-10]

2.2.1 回流法 取核桃青皮药材粉末 3 份,每份 2 g,分别加入水、70% 乙醇、70% 丙酮各 50 mL,回流提取 2 次,每次 1.5 h,收集提取液,滤过,精密吸取续滤液 25 mL 加水定容至 50 mL,摇匀,精密吸取 20 mL 加水定容至 50 mL。测得总鞣质质量分数分别为 19.88, 13.78, 20.63 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2.2 超声提取法 取核桃青皮药材粉末 3 份,每份 2 g,分别加入水、70% 乙醇、70% 丙酮各 50 mL,超声提取 2 次,每次 1 h,滤过,精密吸取续滤液 25 mL 加水定容至 50 mL,摇匀,精密吸取 20 mL 加水定容至 50 mL 量瓶,过滤,取续滤液。测得总鞣质质量分数分别为 15.68, 13.01, 17.30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2.3 冷浸法 取核桃青皮药材粉末 3 份,每份 2 g,分别加入水、70% 乙醇、70% 丙酮各 100 mL,分别

浸泡过夜,滤过,精密吸取续滤液 25 mL 加水定容至 50 mL,摇匀,精密吸取 20 mL 加水定容至 50 mL。测得总鞣质质量分数分别为 7.24, 7.92, 10.72 mg·g⁻¹。

由以上结果确定采用回流法提取,水为提取溶剂。

2.3 正交设计优选 精密称取青龙衣粉末 9 份,每份 5.00 g,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,以总鞣质占药材的质量分数为指标,选择提取次数、料液比和提取时间为考察因素,考察青龙衣中总鞣质的提取工艺条件,每个因素设置 3 个水平,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 核桃青皮中总鞣质的提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取数/次	B 料液比	C 提取时间/min
1	1	8	60
2	2	10	90
3	3	12	120

表 3 核桃青皮中总鞣质的提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	总鞣质质量分数/%
1	1	1	1	1	11.07
2	1	2	2	2	12.05
3	1	3	3	3	14.22
4	2	1	2	3	17.43
5	2	2	3	1	21.62
6	2	3	1	2	23.83
7	3	1	3	2	23.44
8	3	2	1	3	26.65
9	3	3	2	1	25.55
K ₁	12.445	17.310	20.518	19.412	
K ₂	20.959	20.106	18.341	19.772	
K ₃	25.214	21.202	19.759	19.434	
R	12.769	3.892	2.177	0.360	

表 4 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	253.614	2	1 039.402	<0.05
B	24.172	2	99.066	<0.05
C	7.328	2	30.033	<0.05
D(误差)	0.24	2		

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.00。

由表 2 结果可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A > B > C,即提取次数影响最大,其次是料液比。方差分析表明因素 A, B, C 对提取工艺的影响均具有显著性。确定最优水平组合为 A₃B₂C₁。即加 10 倍量水回流提取 3 次,每次 1 h。按最佳工艺进行 3 次验证试验,结果总鞣质质量分数分别为 26.69, 26.67, 26.60 mg·g⁻¹。说明优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

2010 年版《中国药典》中采用 29% Na₂CO₃ 溶液对总鞣质进行显色,易析出结晶而影响测定结果。本试验对总鞣质的含量测定方法略加改善,采用 20% Na₂CO₃ 溶液 10 mL 代替 29% Na₂CO₃ 溶液,较好地解决了这一问题,且显色效果更佳。由于干酪素水溶液经滤过后,本身与显色剂在碱性条件就可显色(同为蓝色),所以不被吸附多酚的含量应为溶液中游离多酚含量与干酪素空白溶液中多酚含量之差。

以 70% 丙酮为提取溶剂,所得总鞣质质量分数最高为 20.63 mg·g⁻¹,而水为提取溶剂时(19.88 mg·g⁻¹)与之相差不大,且若以丙酮为提取溶剂,必须将其蒸干或减压回收形成水溶液,方可进行含量测定,增加了试验步骤,故综合考虑选择水为提取溶剂。

[参考文献]

- [1] 许巍. 青龙衣的药用研究概述[J]. 中医药信息, 2002, 19(6): 13.
- [2] 吕海宁, 张克诚, 崔增杰, 等. 核桃青皮体外抑菌活性的研究[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(2): 150.
- [3] 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 62, 附录 X B.
- [4] 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]. 中国医药杂志, 2011, 36(1): 32.
- [5] 程明, 杨连菊, 冯雪峰, 等. 养殖五灵脂和野生五灵脂等鞣质含量比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 90.
- [7] 郑明昱, 郑玲玲, 温丽颖, 等. 老鹳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.
- [6] 朱翔宇, 杨莲菊, 李春. HPLC 测定五灵脂中原儿茶酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 71.
- [8] 杜瑞莲, 杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(6): 839.
- [9] 陈大全, 王昌利, 王剑波, 等. 正交试验优选元宝枫果壳中鞣质的提取工艺研究[J]. 中草药, 2006, 37(12): 1816.
- [10] 魏永燕, 刘培阁, 洪阁, 等. 中药仙鹤复方总鞣质提取分离工艺研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 469.

[责任编辑 全燕]