

薯蓣中鞣质纯化工艺优选

王小平^{1*}, 王进¹, 汤灿辉¹, 王芳²

(1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 优选薯蓣中鞣质的纯化工艺条件。**方法:** 以鞣质含量和保留率为指标, 采用静态吸附法考察不同大孔树脂的吸附、洗脱性能, 通过单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验对薯蓣中鞣质的纯化工艺条件进行优化。**结果:** 选用 AB-8 型大孔吸附树脂, 其最佳纯化工艺条件为上样量以每克树脂儿茶素不超过 17.25 mg 为宜, 加 3 BV 水洗除杂, 用 1.5 BV 40% 乙醇以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液, 鞣质保留率 82.02%, 鞣质纯度 64.39%。**结论:** 优选的纯化工艺合理、稳定可行, 可为薯蓣中鞣质的工业化纯化提供实验依据。

[关键词] 薯蓣; AB-8 型大孔吸附树脂; 纯化工艺; 正交试验; 鞣质

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0024-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070024

Optimization of Purification Technology of Tannin in *Dioscorea cirrhosa*

WANG Xiao-ping^{1*}, WANG Jin¹, TANG Can-hui¹, WANG Fang²

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Fuzhou 344000, China;

2. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology conditions of tannin from *Dioscorea cirrhosa*. **Method:** With the content and retention rate of tannin as indexes, different macroporous resin properties of absorption and desorption were observed by static absorption method, purification technology conditions of tannin from *D. cirrhosa* was optimized by single factor test and $L_9(3^4)$ orthogonal design. **Result:** AB-8 type macroporous resin was chosen, its optimum purification technology conditions were as followings: sample amount no more than 17.25 mg per gram of resin, washed impurity with 3 BV water, and eluted by 1.5 BV 40% ethanol with flow rate of $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, collected the eluent. The content and retention rate of tannin were 82.02%, 64.39%, respectively. **Conclusion:** This optimized technology was stable, feasible and reasonable, it could provide experimental basis for industrial purification of tannin in *D. cirrhosa*.

[Key words] *Dioscorea cirrhosa*; AB-8 type macroporous resini; purification process; orthogonal design; tannin

妇科经、带、产等病引起的出血证为临床常见病, 约占妇科门诊、住院病例的 1/3, 是导致妇女慢性贫血和不孕不育症的重要原因^[1-2]。目前, 虽然临床可用的止血药品种较多, 但鉴于妇科出血与多

种因素有关, 单纯应用西药止血药的疗效并不尽如人意。因此, 选用具有多靶点、多成分、多环节作用特点的有效中药制剂治疗妇科出血证有较大的市场需求。薯蓣主要含鞣质、酚类成分, 在民间广泛用于治疗出血症^[2]。现代药理研究表明, 其可有效缩短出血时间和凝血时间^[3-5]。20 世纪 70 年代, 中国人民解放军第 175 医院曾在临床试用薯蓣治疗各种出血性疾病, 治疗率达 85%^[6]。由薯蓣水提浸膏制备的薯蓣片, 收载于《卫生部部颁标准》, 每天服用量 12 片, 主要用于治疗月经过多、功能性子宫出血及产后出血^[7]。本课题组前期研究表明, 薯蓣中所含

[收稿日期] 20121019(008)

[基金项目] 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, 从事教学与中药炮制研究与新药开发, Tel: 0794-8239328, E-mail: jxrcwpx@163.com

鞣质类型主要为缩合鞣质,采用水煎煮提取工艺,在加热过程中缩合鞣质易被氧化、脱水缩合为不溶于水的鞣酐沉淀,同时浸膏收率高而导致服用量大。在采用渗漉提取工艺基础上,本实验选用大孔吸附树脂对薯蓣中主要有效成分鞣质进行纯化,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-托利多仪器公司),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;AB-8,HPD-400A,HPD-826 型大孔吸附树脂均购自沧州宝恩化工有限公司;儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110877-200001),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鞣质的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品 15.09 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取儿茶素对照品溶液 0.5,1,2,3,4,5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容。精密量取各溶液 0.5 mL,分别加至包有锡箔的试管中,加 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。以相应的试剂为空白,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,对照品质量浓度为纵坐标,得回归方程 $A = 22.0266C - 0.2538$ ($r = 0.9998$),表明儿茶素在 2.74 ~ 27.44 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备 取薯蓣粉末约 0.1 g,精密称定,置 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,超声处理 30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 1 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容。

2.1.4 精密度试验 精密量取对照品溶液适量,依法连续测定 6 次 A,结果 RSD 0.27%,表明仪器精密度高。

2.1.5 稳定性试验 称取薯蓣粉末 0.1 g,精密称定,依 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 1,2,3,5,7,9 h 按 2.1.2 项下方法测定 A,结果 RSD 2.61%,表明供试品溶液在 9 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 分别称取同一批次薯蓣粉末

6 份,每份 0.1 g,精密称定,依法制备供试品溶液并测定 A。结果鞣质平均含量(以儿茶素计)411.45 mg·g⁻¹,RSD 2.80%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 分别称取已知鞣质含量的薯蓣粉末 6 份,每份 0.05 g,精密称定,各加入儿茶素对照品 20 mg,依法制备供试品溶液并测定含量。结果平均回收率 98.12%,RSD 2.09%,表明儿茶素含量测定方法的回收率良好。

2.2 上柱前样品溶液的制备 取薯蓣粗粉 2.5 kg,以流速 4 mL·kg⁻¹·min⁻¹,80% 乙醇为溶媒进行渗漉,收集 8 倍量渗漉液,回收乙醇,加水适量稀释,搅拌,滤过,精密测定体积。精密量取样品溶液 0.5 mL,按 2.1.2 项下方法测定 A,计算样品溶液中鞣质含量,备用。

2.3 不同型号大孔树脂的吸附、洗脱能力比较 称取预处理好的 AB-8,HPD-400A,HPD-826 型大孔吸附树脂各 10 g,分别置于 100 mL 锥形瓶中,各加入 30 mL 样品溶液,浸渍 24 h,不时振摇,滤取溶液,精密测定体积并依法测定含量。取吸附饱和的大孔吸附树脂,加入乙醇不断振摇,滤取乙醇液,精密测定体积并依法测定含量。根据下述公式计算吸附量依次为 20.56,16.41,19.09 mg·g⁻¹;洗脱量分别为 17.80,13.06,16.02 mg·g⁻¹;洗脱率分别为 86.57%,79.61%,83.92%。表明最佳大孔吸附树脂型号为 AB-8。

$$Q_a = (C_o - C_e) \times V/W; Q_d = C_d \times V/W; E_d = Q_d/Q_a \times 100\%$$

式中 Q_a 表示吸附量, C_o 为吸附液起始质量浓度, C_e 为吸附液平衡质量浓度, V 为溶液体积, W 为树脂质量, C_d 为洗脱液平衡质量浓度, Q_d 为洗脱量, E_d 为洗脱率。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 上样量 将已预处理的树脂 30 g,湿法装柱,取上样液 30 mL,分成 30 份,依次上样,用水以 0.5 BV·h⁻¹ 洗脱,分段收集(每份 1 mL),采用 5% FeCl₃ 溶液进行显色检识。结果表明,收集到第 24 份时,鞣质泄露明显。故上样量以每克树脂不超过儿茶素 17.25 mg 为宜。

2.4.2 水洗除杂用量 在上样液吸附平衡后,确定水洗流速 0.5 BV·h⁻¹。用 5 BV 水洗脱,每 1 BV 收集 1 份。结果表明水洗脱液中鞣质含量低。分别将 5 份水洗脱液干燥,得浸出物,称定质量,结果第 4 份水洗脱液中浸膏收率很低,表明 3 BV 水洗已基本除去杂质。因此,确定用 3 BV 水洗除杂。

2.4.3 洗脱溶剂 称取已预处理的树脂 5 份,每份 30 g,均湿法装柱,分别精密量取上样液 23 mL 上样,用 3 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,洗脱液弃去,分别用体积分数为 20%,40%,60%,80%,95% 的乙醇溶液以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液至不与 5% FeCl_3 溶液发生显色反应为止,依法测定洗脱液中鞣质含量,计算洗脱率分别为 63.57%,82.61%,85.79%,86.85%,87.21%。从经济性与安全性角度考虑,取前 3 个体积分数乙醇进行优化试验。

2.4.4 洗脱溶剂用量 称取已预处理的树脂 3 份,每份 30 g,湿法装柱,分别精密量取上样液 23 mL 上样,用 3 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,洗脱液弃去,再分别用体积分数为 20%,40%,60% 乙醇溶液以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,每 1 BV 洗脱液为 1 份,共收集 4 份,分别水浴蒸干,称定质量。结果发现,前 2 BV 洗脱液的干膏质量依次占其全部干膏质量的 89.08%,94.70%,95.36%。从经济性角度考虑,选取收集不超过 2 BV 洗脱液进行优化试验。

2.5 纯化工艺优化 在预试验及单因素试验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以鞣质保留率与鞣质纯度为指标,考察乙醇体积分数、乙醇用量、洗脱流速对纯化工艺的影响,因素水平见表 1。取已处理好的 AB-8 型大孔树脂,按相同径高比湿法装柱,分别取上样液 9 份,每份 50 mL,上样,用 3 BV 水以 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,洗脱液弃去,之后按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,收集乙醇洗脱液,摇匀,精确测定体积,测定鞣质含量并计算其保留率;将洗脱液减压浓缩,低温干燥,称定质量,依法测定鞣质含量。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3~4。

表 1 薯蓣中鞣质的纯化工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/BV	C 洗脱流速/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$
1	20	1	0.5
2	40	1.5	0.75
3	60	2	1.0

由表 3~5 结果可知,各因素对鞣质保留率的影响顺序为 $A > B > C$,其中因素 A 有极显著性影响,因素 B 有显著性影响,最佳工艺条件为 $A_3B_3C_1$;各因素对鞣质质量分数的影响依次为 $A > B > C$,其中因素 A 有显著性影响,其他因素均无显著影响,最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3$ 。综合考虑,确定最佳纯化工艺为 $A_2B_2C_1$,即以 40% 乙醇为洗脱溶媒,洗脱溶媒用量 1.5 BV,洗脱流速 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

表 2 薯蓣中鞣质的纯化工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	鞣质/%	
					保留率	质量分数
1	1	1	1	1	40.20	40.28
2	1	2	2	2	42.15	47.55
3	1	3	3	3	43.58	42.83
4	2	1	2	3	72.32	65.19
5	2	2	3	1	79.14	67.44
6	2	3	1	2	82.89	66.10
7	3	1	3	2	72.06	63.67
8	3	2	1	3	83.04	64.34
9	3	3	2	1	83.27	60.02
保留率	K_1	125.93	184.58	206.13	202.61	
	K_2	234.35	204.33	197.74	197.1	
	K_3	238.37	209.74	194.78	198.94	
	R	37.48	8.39	3.78	1.84	
鞣质质	K_1	130.66	169.14	170.72	167.74	
	K_2	198.73	179.33	172.76	177.32	
量分数	K_3	188.03	168.95	173.94	172.36	
	R	22.69	3.46	1.07	3.19	

表 3 鞣质保留率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	2 712.646	2	1 356.323	517.082	<0.01
B	116.928	2	58.464	22.289	<0.05
C	23.108	2	11.554	4.405	>0.05
D(误差)	5.246	2	2.623		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00, F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 4 同)。

表 4 鞣质质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	893.259	2	446.629	58.373	<0.05
B	23.513	2	11.756	1.536	>0.05
C	1.769	2	0.884	0.116	>0.05
D(误差)	15.302	2	7.651		

2.6 验证试验 为进一步考察上述优选工艺的稳定性和合理性,按该工艺条件进行重复性试验 3 次,依法测定鞣质含量并计算保留率。结果保留率分别为 80.73%,83.49%,81.85%;鞣质纯度依次为 66.27%,61.54%,65.36%;表明该工艺重复性好,且稳定可行。

3 讨论

据文献报道^[8],采用渗漉法提取薯蓣中鞣质,

星点设计-响应面法优化厚朴提取工艺

刘颖新*, 刘利利, 喻祖文, 李飞艳

(湖南中医药大学高等专科学校, 湖南 株洲 412012)

[摘要] 目的:通过星点设计-响应面法优化厚朴的提取工艺。方法:以乙醇体积分数、提取时间、溶媒比为自变量,以浸膏得率、厚朴酚及和厚朴酚含量的总评“归一值”为因变量,通过对自变量各水平进行多元线性回归及二项式拟合,采用响应面法优选提取工艺,并进行预测分析。结果:最佳提取工艺为佳 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 95 min。结论:星点设计-响应面法优选的厚朴提取工艺简便、合理可行,具有较高的精确度,可推广于大生产应用。

[关键词] 厚朴; 星点设计; 响应面法; 厚朴酚; 和厚朴酚; 浸膏

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0027-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070027

Optimization of Extraction Technology for *Magnolia officinalis* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

LIU Ying-xin*, LIU Li-li, YU Zu-wen, LI Fei-yan

(Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Magnolia officinalis* by central composite design/response surface methodology. **Method:** Taking ethanol concentration, extraction time and the amount of solvent

[收稿日期] 20121019(011)

[基金项目] 湖南省教育厅科研项目(12C1190)

[通讯作者] * 刘颖新, 讲师, 硕士, 从事中药物质基础研究, Tel:15886357041, E-mail:liuyx412@163.com

提取溶剂为 90% 乙醇, 渗漉速率 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在前期研究工作中, 本课题组采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对薯蓣的渗漉提取工艺进行优化, 结果确定为以 80% 乙醇为溶媒, 收集 8 倍量渗漉液, 流速 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

本试验曾对大孔吸附树脂纯化鞣质的耐用性进行考察, 结果表明经 6 次动态吸附洗脱过程后, 树脂色泽明显加深, 吸附率下降, 需进行酸碱处理后才能重复使用。曾与薯蓣水提取浸膏比较, 按本方法制备的浸膏收率 14.00% (按原药材折算), 仅为水提取浸膏收率的 1/2, 鞣质平均含量比水提取浸膏高 1 倍多。

[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] 刘晓鹏, 张永萍, 闫春霞. 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 全军中西医结合工作会议资料选编-止血药红孩儿临床应用与药理研究(附 585 例报告)[M]. 北京: 中国人民解放军战士出版社, 1974:341.
- [7] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 第 4 册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:219.
- [8] 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 仝燕]