

中药仙鹤复方总鞣质提取分离工艺研究

魏永燕,刘培勋,洪阁,赵峰(中国医学科学院放射医学研究所,天津 300192)

摘要:目的 探讨中药仙鹤复方中总鞣质的最佳提取条件,并对复方中的鞣质类别作初步研究。方法 采用回流法、渗漉法、冷浸法提取复方中总鞣质,以总鞣质含量和收率为指标,确定最佳提取工艺;通过化学定性鉴别和 IR 鉴别初步判定复方总鞣质种类。结果 在乙醇回流法、渗漉法、甲醇冷浸法中,以甲醇冷浸法提取复方总鞣质效果最佳;通过定性鉴别判定复方总鞣质主要为毒性较低的缩合鞣质。结论 本实验结果可靠,方法简便,最佳条件适合批量生产中该复方药材的提取,为中药仙鹤复方开发抗肿瘤药物提供了一定的理论依据。

关键词:中药仙鹤复方;总鞣质;提取分离;缩合鞣质

中图分类号:R931.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)06-0469-04

作者简介:魏永燕,女,硕士,实习研究员

Tel: (022) 85683042

E-mail: hongge6688@yahoo.com.cn

WEI Yong-yan, LIU Pei-xun, HONG Ge, ZHAO Feng (Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction condition of total tannin from compound TCM medicine—Xianhe, and identify the sorts of tannin in Xianhe. **METHODS** Tannin in Xianhe was extracted by alcohol extraction, Percolation and cold infusion, respectively. Identified the sorts of tannin in Xianhe by using qualitative reaction analysis and infrared spectrophotometry. **RESULTS** Methanol of cold soaking was the best solvent to extract tannin from Xianhe. The result of qualitative analysis shows that the extracted tannin is most condensed tannin, which used less dangerous. **CONCLUSION** The method is simple, convenient, and can be apply to extract tannin in large scale. And supplied the basis of theory for discovering antitumor components in compound TCM medicine—Xianhe.

KEY WORDS: compound TCM medicine—Xianhe; total tannin; extract separate; conjugated tannin

鞣质 (tannin) 又称植物单宁 (Vegetable Tannin) 或植物多酚 (plant polyphenol), 是一类广泛存在于植物体内的多元酚化合物, 具有抗肿瘤、抗过敏、抑制微生物、止血^[1]、抗乙肝病毒^[2]等多种生理活性, 因此, 鞣质在医药领域的应用有广阔的前景。

中药仙鹤复方是由仙鹤草、白花蛇舌草、白英、甘草四味中药组成的具有抗肿瘤作用的临床经验方, 经化裁而成。仙鹤草 (*Agrimonia pilosa* Ledeb.) 主要成分为三萜皂苷类、黄酮类、酚类、鞣质类、糖苷类、酯类、有机酸类等^[3]。白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd.) 主要含有萜醌类、萜类、黄酮类、甾醇类、烷烃类、有机酸类、多糖类等成分^[4]。白英 (*Solanum lymphatum* Thunb.) 中主要有甾体皂苷类化合物^[5], 还有咖啡酸、香草酸、*N*-(*p*-hydroxyphenethyl)-*p*-coumaramide、芦丁^[6]等。甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 中含有挥发性成分、黄酮类、三萜类、生物碱类、香豆素类、多糖类等成分^[7]。组成复方的四味药材中主要含有黄酮类、皂苷类、鞣质或多酚类等抗肿瘤有效成分^[8-9], 本实验对中药仙鹤复方中总鞣质的提取进行深入研究。

1 原料、试剂和仪器

1.1 原料

仙鹤草 (*Agrimonia pilosa* Ledeb., 产地河北)、白花蛇舌草 (*Hedyotis diffusa* Willd., 产地广西)、白英 (*Solanum lymphatum* Thunb., 产地安徽) 和甘草 (*Radix Glycyrrhizae*, 产地内蒙) 均购自天津安舜大药房。

1.2 试剂

没食子酸 (gallic acid) 对照品 (中国药品生物制品检定所); 溴素 (天津市大茂化学试剂厂); 钼酸钠 (姜堰市安达有色金属有限公司); 硫酸锂 (国药集团化学试剂有限公司); 钨酸钠 (天津市化学试剂四厂); 碳酸钠 (天津市塘沽新华化工厂); 干酪素 (天津市东方卫生材料厂); 明胶 (天津大学科威公司); 氯化钠 (天津市化学试剂三厂); 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

T6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); Shimadzu-IR435 红外光谱仪 (KBr)。

2 实验方法

2.1 试剂配制^[10]

2.1.1 磷钼钨酸试液 取钨酸钠 100 g、钼酸钠 25 g, 加水 700 mL 使溶解, 加盐酸 100 mL、磷酸 50 mL, 加热回流 10 h, 放冷, 再加硫酸锂 150 g、水 50 mL 和溴 0.2 mL, 煮沸除去残留的溴 (约 15 min), 冷却, 加水稀释至 1000 mL, 滤过, 即得。

2.1.2 29% 碳酸钠水溶液 称取无水碳酸钠 29 g, 溶于 100 mL 蒸馏水中, 即得。

2.1.3 氯化钠-明胶水溶液 称取明胶 0.5 g, 加蒸馏水 25 mL, 待充分溶胀后, 于 40℃ 水浴加热使之溶解, 加入 5 g 氯化钠, 溶解完全后再加蒸馏水至 50 mL。

2.2 中药仙鹤复方总鞣质提取分离方法

2.2.1 乙醇回流法提取分离总鞣质^[11] 按处方量称取中药仙鹤复方药材 100 g, 按 10:1 液料比, 以 95% 乙醇 1000 mL 为提取溶剂, 提取温度为 60℃, 提取时间为 1.5 h, 回流提取 3 次, 合并提取液, 过滤, 回收乙醇, 得复方醇提浸膏 (I) 为 14.8 g。称取 95% 乙醇提取物 (I) 10 g, 用 1000 mL 60~70℃ 热蒸馏水溶解, 过滤, 滤液分别用环己烷和乙醚各萃取 3 次, 每次用量 500 mL。水层减压蒸干, 得固形物 (I-1) 为 5.31 g。

2.2.2 乙醇渗漉法提取总鞣质 按处方量称取中药仙鹤复方药材 100 g, 依次用无水乙醚-95% 乙醇 (4:1)、95% 乙醇各 1000 mL 渗漉提取复方中总鞣质^[12-13]。无水乙醚-95% 乙醇 (4:1) 混合渗漉液按 1:1 体积比加水置分液漏斗, 萃取 3 次, 取水层, 按 7:1 体积比向水层中加入无水乙醚萃取 1 次, 分出水层, 减压蒸干, 得红褐色固形物 (II-1) 为 0.28 g。95% 乙醇渗漉液回收乙醇, 得固形物 (II-2) 为 1.85 g。

2.2.3 甲醇冷浸提取总鞣质^[14] 按处方量称取复方药材 100 g, 按 10:1 液料比用甲醇 1000 mL 冷浸提取 3 次, 提取时间依次为 48, 48, 24 h, 合并提取液, 过滤, 滤液减压浓缩回收甲醇, 得浸膏 (III) 为 10.20 g。称取 3 g 浸膏 (III), 用适量 60~70℃ 热蒸馏水溶解, 过滤, 滤液加环己烷萃取 3 次, 每次用

量 100 mL。水层再用无水乙醚萃取 3 次,每次用量 200 mL。水层液减压蒸干,得固形物(Ⅲ-1)为 1.75 g。

2.3 中药仙鹤复方中总鞣质的定性鉴别

利用文献^[15]方法,采用 5%三氯化铁、石灰水、乙酸铅、稀盐酸、明胶等试剂对本实验所得鞣质类型进行定性鉴别。

2.4 总鞣质的含量测定

2.4.1 供试品溶液的制备 将回流法分离得到的固形物(Ⅰ-1)、渗漉法得到的固形物(Ⅱ-1)和(Ⅱ-2)、冷浸法得到的固形物(Ⅲ-1),减压干燥后,研细,精密称取,分别用蒸馏水溶解稀释成 100 mL 含生药为 1 g 的溶液,过滤,弃初滤液,取续滤液为供试品溶液。

2.4.2 标准曲线的制备 精密称取没食子酸对照品 5 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.05 mg·mL⁻¹对照品储备液。

精密量取没食子酸对照品储备液 0.0,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,分别置 25 mL 棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液 1 mL,再分别加水 12,11.5,11,10,9,8,7 mL,用 29%碳酸钠水溶液稀释至刻度,摇匀,放置 30 min,置比色杯中,在 760 nm 波长处测定吸光度,以没食子酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线^[10]。计算标准曲线的回归方程和相关系数, Y=121.01 X + 0.064 8, r=0.999 4。标准曲线线性范围为:1~10 μg·mL⁻¹。

表 1 提取物中鞣质的鉴别反应

Tab 1 Qualitative identification of tannin in sample extracted

提取方法	提取部位	5%三氯化铁	石灰水	乙酸铅	稀盐酸	明胶溶液
回流法	Ⅰ-1	产生沉淀 (+)	溶液混浊 (+)	产生沉淀,加乙酸溶解 (+)	产生沉淀 (+)	无沉淀 (-)
渗漉法	Ⅱ-1	产生沉淀 (+)	溶液混浊 (+)	产生沉淀,加乙酸溶解 (+)	产生沉淀 (+)	无沉淀 (-)
	Ⅱ-2	产生沉淀 (+)	溶液混浊 (+)	产生沉淀,加乙酸溶解 (+)	产生沉淀 (+)	无沉淀 (-)
冷浸法	Ⅲ-1	产生沉淀 (+)	溶液混浊 (+)	产生沉淀,加乙酸溶解 (+)	产生沉淀 (+)	无沉淀 (-)

注:“+”为阳性反应;“-”为阴性反应

Note:“+” present positive reaction;“-” present negative reaction

由表 1 实验结果可知,三种提取方法所得固形物与 5%三氯化铁、石灰水、乙酸铅、稀盐酸试剂均呈阳性反应,说明固形物中鞣质的存在;而明胶实验为阴性,考虑中药仙鹤复方中提取的鞣质类型可能不是水解鞣质或水解鞣质含量较低。

3.2 提取方法

不同提取方法测定中药仙鹤复方总鞣质含量结果见表 2。

由表 2 中数据可知,渗漉法提取鞣质,在无水乙醚:95%乙醇(4:1)提取部位(Ⅱ-1)的总鞣质含量最高,为 4.859%,每 1 g 复方提取生药材含总鞣质以没食子酸计为 0.136 mg,含量相对较低。甲醇冷浸提取中,(Ⅲ-1)总鞣质含量及固形物收率都相对较高,分别为 3.599%和 5.95%;每 1 g 复方提取生药材含总鞣质以没食子酸计为 2.141 mg,含量最高。95%

2.4.3 供试品溶液总鞣质含量测定 精密量取供试品溶液 2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,照“2.4.2”项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起,加水 10 mL,依法测定吸光度,从标准曲线中读出供试品溶液中没食子酸的量(mg),计算,即得样品中总酚量。另取供试品溶液 10 mL,加至已盛有干酪素 0.24 g 的 100 mL 具塞锥形瓶中,密塞,置 30℃ 水浴中保温 1 h,时时振摇。取出,放冷,摇匀,滤过,弃初滤液,精密量取续滤液 2 mL,置 25 mL 棕色量瓶中,照“2.4.2”项下的方法,自“加入磷钼钨酸试液 1 mL”起,加水 10 mL,依法测定吸光度,从标准曲线中读出供试品溶液中没食子酸的量(mg),计算,即得不被吸附的多酚含量。

按下式计算鞣质含量:鞣质含量=总酚量-不被吸附的多酚量^[10]。

2.5 95%乙醇提取物萃取分离所得鞣质红外光谱分析

鞣质为多羟基化合物,具有较强极性,同时在 50℃ 以上易氧化^[16]。因此本实验对醇提法得到的总鞣质进行了考察。将 95%乙醇提取物萃取分离所得鞣质样品(Ⅰ-1),用无水溴化钾压片,置于 Shimadzu-IR435 型红外光谱仪中进行测试,得到样品的红外光谱分析图。

3 结果与分析

3.1 总鞣质的定性鉴别

中药仙鹤复方中总鞣质的定性鉴别实验结果见表 1。

表 2 不同提取方法所得中药仙鹤复方总鞣质含量及收率

Tab 2 Content and yield of tannin with sample extracted by different methods in Xianhe

提取方法	提取部位	固形物	鞣质	mg 鞣质 /
		收率 /%	含量 /%	1 g 生药
醇提法	Ⅰ-1	6.888	1.847	1.275
渗漉法	Ⅱ-1	0.280	4.859	0.136
	Ⅱ-2	1.850	1.661	0.307
冷浸法	Ⅲ-1	5.950	3.599	2.141

乙醇回流提取所得总鞣质含量与甲醇冷浸法相比,其固形物收率稍高,但总鞣质含量只有甲醇冷浸法的一半。结果表明,提取分离中药仙鹤复方总鞣质以甲醇冷浸法最佳。

3.3 95%乙醇提取物萃取分离所得鞣质红外光谱分析

95%乙醇提取物萃取分离所得鞣质样品(I-1)在 3 394.1 cm^{-1} , 1 617.98 cm^{-1} , 1 400.07 cm^{-1} , 1 068.37 cm^{-1} , 929.52 cm^{-1} 处出现吸收峰,与文献报道^[12]仙鹤草根芽中分离出来的(R)-(-)-仙鹤草酚B的IR光谱数据基本相符;在 3 355.53 cm^{-1} , 1 617.98 cm^{-1} , 1 400.07 cm^{-1} , 1 068.37 cm^{-1} 处出现吸收峰,与文献报道^[13]仙鹤草根芽中分离出来的新鞣花酸苷的IR光谱数据基本相符。

4 讨论

本实验采用回流法、渗漉法、冷浸法提取分离中药仙鹤复方总鞣质,从指标性成分总鞣质的含量和固形物收率等角度比较分析了不同方法对中药仙鹤复方总鞣质提取分离效果的影响,初步确定提取分离中药仙鹤复方总鞣质以甲醇冷浸法最佳。以冷浸法、渗漉法提取中药仙鹤复方总鞣质为对照,结合 95%乙醇提取物萃取分离所得鞣质样品(I-1)的红外光谱数据,提示本研究中中药仙鹤复方 95%乙醇回流提取鞣质方案基本可行,应注意提取总鞣质过程中尽量避免加热温度过高、时间过长。

鞣质结构较为复杂,按其水解情况可分为水解鞣质和缩合鞣质。明胶试验无沉淀生成,初步推断中药仙鹤复方提取物中的鞣质以缩合鞣质为主^[17]。

植物中可水解鞣质酯羰基出现在 1 740~1 710 cm^{-1} 范围内,若含有双键共轭的羟基,在更低波数处出现另外的吸收峰。羟基一般在 3 400 cm^{-1} 处呈现强峰,该芳香环一般在 1 620~1 420 cm^{-1} 范围内出现三个特征吸收峰。这三组峰对于鉴别可水解鞣质及推测新的结构类型很有用^[18]。样品(IV-2-3)红外光谱图中,这三组峰均未出现,初步推测样品中无水解鞣质或水解鞣质含量很低。本实验中提取鞣质与明胶反应为阴性(不产生沉淀),综合分析试验现象,初步认为中药仙鹤复方 95%乙醇提取物的鞣质主要是缩合鞣质。而文献曾报道^[14],中药仙鹤复方中的仙鹤草提取的鞣质主要是缩合鞣质。有资料表明^[15],可水解鞣质毒性较高,对肝脏有严重损害作用,而缩合鞣质毒性较低,对肝脏无损害或损害轻微,这为利用中药复方开发抗肿瘤药物提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] KENICHL M, NOBUHARU K, RYOZO K, *et al.* Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins[J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(2): 814-822.
- [2] LI R Z, LI X, HE W J. The study on the anti-hepatitis B of polyphenol constituent of Chinese traditional drug[J]. J Beijing Med Univ(北京医科大学学报), 1994, 26(2): 134-135.
- [3] ZHAO Y, LIU J P, LI P Y. Studies on chemical constituents and pharmacological effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res(特产研究), 2001, 23(1): 50.
- [4] HUANG J R, LIU Y H, YU Z B, *et al.* Studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Hedyotis diffusa* Wild[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2005, 27(11): 1329.
- [5] YUNG-YUNG LEE, FENG-LIN HSU, TOSH IHIRO NOHARA, *et al.* Two new soladulcidine glycosides from *Solanum lyratum*[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(8): 1381.
- [6] YANG J Z, GUO G M, ZHOU L X, *et al.* Studies on chemical constituent of *Olanum lyratum*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27(1): 42.
- [7] HU J F, SHEN F J. A survey of the studies on chemical constituents of *Glycyrrhiza*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1996, 8(3): 77.
- [8] MIYAMOTO KENICHI, KISHI NOBUHARU, KOSH IURE RYOZO. Antitumor effect of agrimoniin, a tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb on transplantable rodent tumors[J]. Pharmacol, 1987, 43(2): 187-195.
- [9] TIAN L, GAO X L. Antitumor effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2004, 19(3): 133-135.
- [10] Ch. P(2005) Vol I (中国药典 2005年版.一部)[S]. 2005: Appendix 57.
- [11] LIN Q S. Chemical Constituent of Traditional Chinese Medicine (中草药成分化学)[M]. Beijing: Science Press, 1977: 178.
- [12] PEI Y H, LI X, ZHU T R. Studies on the chemical constituents from the root-sprouts of *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1989, 24(8): 431-437.
- [13] PEI Y H, LI X, ZHU T R. Studies on the structure of a new ellagic acid glycoside from the root-sprouts of *Agrimonia pilosa* Ledeb[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 1990, 25(10): 798-800.
- [14] ZHAO L F, ZHANG X L. Extracting tannin from Herb *Agrimoniae*[J]. J Baoji Univ Arts Sci Nat Sci Ed(宝鸡文理学院学报:自然科学版), 2000, 20(3): 196-197, 235.
- [15] XIAO C H. Traditional Chinese Medicinal Chemistry(中药化学)[M]. Shanghai: Shanghai scientific and technical Publishers, 1987: 125.
- [16] SHI W G, LIU L, WANG X, *et al.* Optimum extraction process of total tannin of *Geranium sibiricum* L[J]. Heilongjiang Med Pharm(黑龙江医药科学), 2004, 27(3): 26-27.
- [17] KING-THOM CHUNG, TIT YEE WONG, CHENG-I WEI, *et al.* Tannins and Human Health: A Review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1998, 38(6): 421-464.
- [18] YAN B, ZHANG Q H, LIU X F. Studies on chemical constituents of tannins from plant[J]. Shandong Pharm Ind(山东医药工业), 2003, 22(1): 34-36.

收稿日期: 2006-07-27