

维吾尔药木吒栓中石榴皮和石榴花水提取工艺的优化[△]

田红林^{1*},陈良¹,孙芸^{2#},李建梅³(1.新疆医科大学附属中医医院药学部,乌鲁木齐 830012;2.新疆医科大学中医学院中药系,乌鲁木齐 830001;3.新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所维吾尔医方剂学重点实验室,乌鲁木齐 830049)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)22-3099-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.22.20

摘要 目的:优化维吾尔药木吒栓中石榴花与石榴皮的水提取工艺。方法:以总鞣质和鞣花酸含量为评价指标,以提取时间、提取次数和溶剂用量为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化石榴花、石榴皮的水提取工艺并进行验证试验。结果:石榴花与石榴皮中总鞣质和鞣花酸的最优提取工艺为将2味药材用10倍量水回流提取3次,每次0.5 h;验证试验中3批药材提取出的总鞣质与鞣花酸平均含量分别为151.69、24.59 mg/g(RSD分别为1.15%、1.41%, $n=3$)。结论:优化的提取工艺稳定、可行,可用于木吒栓中石榴花、石榴皮中总鞣质和鞣花酸的提取。

关键词 木吒栓;石榴花;石榴皮;提取工艺;正交试验;总鞣质;鞣花酸

Optimization of the Water Extraction Technology of *Punica granatum* Peel and Flowers in Muzha Uighur Medicine Suppository

TIAN Honglin¹, CHEN Liang¹, SUN Yun², LI Jianmei³(1.Dept. of Pharmacy, Affiliated TCM Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830012, China; 2.Dept. TCM, Xinjiang Medical University Institute of TCM, Urumqi 830001, China; 3.Key Laboratory of Uygur Medicine Formulation, Xinjiang Uygur Medicine Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830049, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the water extraction technology of *Punica granatum* peel and flowers in Muzha suppository. **METHODS:** Using total tannin, ellagic acid contents as evaluation indexes, extraction time, times, the amount of solvents as investigation factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted to optimize the water extraction technology of *P. granatum* flowers and peel. And verification test was conducted. **RESULTS:** The optimal extraction technology of total tannin and ellagic acid in *P. granatum* peel and flowers was as follow as 10-fold water reflux extraction for 3 times with 2 herbs, 0.5 h every time. The average content of total tannin and ellagic acid extracted from 3 batches of herbs was 151.69 mg/g (RSD=1.15%, $n=3$), 24.59 mg/g (RSD=1.41%, $n=3$) in the verification test, respectively. **CONCLUSIONS:** The optimized extraction technology is stable, feasible, and can be used for extracting the total tannin and ellagic acid in *P. granatum* peel and flowers.

KEYWORDS Muzha suppository; *Punica granatum* flowers; *Punica granatum* peel; Extraction technology; Orthogonal test; Total tannin; Ellagic acid

维吾尔药木吒栓来自新疆维吾尔自治区和田地区维吾尔医经验方,由石榴皮、石榴花等药材组方而成,具有收敛、消炎等功效,多用于治疗滴虫感染、阴道炎等病症。为提高其临床应用效果,本课题组对其制剂工艺进行优化研究。在本文中,主要对方中君药石榴皮和石榴花中的主要成分进行提取工艺研究。由于石榴皮和石榴花中有效成分相近^[1-3],故以2种药材中均富含的鞣花酸、没食子酸等鞣质类成分为主要活性成分指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化影响2种成分水提取效果的相关工

艺条件,为其工业化生产提供试验依据^[4-7]。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪,包括2489紫外检测器、Empower 3 色谱工作站(美国 Waters 公司);Cintra 20 紫外-可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器公司);SECURA124-1CN 电子天平(瑞士赛多利斯科学仪器有限公司);SGT7200HBT 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

石榴皮、石榴花药材均购自新疆参茸中维药饮片有限公司[批号:2016040906、2015031029,经新疆维吾尔自治区维吾尔医医院药剂科艾尼瓦尔主任药师鉴定为

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区中医民族医药科技人才培养项目(No.2016-03-05)

* 中药师。研究方向:中药药理。E-mail:85762226@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:中药药理。E-mail:hel-lo0125@sohu.com

石榴科植物石榴(*Punica granatum* L.)的干燥果皮和花];没食子酸对照品(批号:110831-200803,纯度:90.1%)、鞣花酸对照品(批号:111959-201501,纯度:92.6%)均来源于中国食品药品检定研究院;干酪素(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20141030);磷酸、甲酸均为分析纯;甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 总鞣质含量测定方法

参考文献[8-12]方法进行测定。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品适量,置于50 mL棕色量瓶中,加水溶解,稀释至刻度,制成每1 mL含0.048 9 mg没食子酸的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取石榴皮与石榴花药材粉末(过60目筛)各50.0 g,精密称定,加水1 000 mL,回流提取1 h,过滤,滤液定容至1 000 mL。精密量取提取液2 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀过滤,作为供试品溶液。

2.1.3 样品含量测定 (1)总酚:精密量取供试品溶液2 mL至25 mL棕色量瓶中,加入磷钼钨酸试液1 mL,摇匀,再加水10 mL,摇匀,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min;同时设置空白对照。依法测定吸光度(A),计算含量,即得。(2)不被吸附的多酚:精密量取供试品溶液25 mL,加至装有干酪素0.6 g的100 mL具塞锥形瓶中,密塞,置于30 ℃水浴中保温1 h,时时振摇,取出放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液;精密量取续滤液2 mL,置于25 mL棕色量瓶中,照总酚测定中自“加入磷钼钨酸试液1 mL”起制备样品,依法测定 A ,计算含量,即得。

根据公式“鞣质含量=总酚含量-不被吸附的多酚含量”^[8],计算鞣质含量。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于25 mL棕色量瓶中,各加入磷钼钨酸试液1 mL,再分别加水11.5、11.0、10.0、9.0、8.0、7.0 mL,用29%碳酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min。以相应的试剂制备空白对照,在760 nm波长处测定 A 。以 A 为纵坐标(y)、对照品质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得回归方程 $y=0.092 3x-0.008 1$ ($r=0.999 3, n=3$)。结果表明,没食子酸检测质量浓度线性范围为1.08~10.80 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液2.0 mL,按“2.1.3”项下方法测定样品 A ,连续测定6次,结果RSD为0.52% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 加样回收率试验 取已知总酚含量的提取液样品6份,每份2.0 mL,精密量取,分别加入一定量没食子酸对照品,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。结果总酚的平均加样回收率为97.27% (RSD=2.19%, $n=6$),表明总酚含量测定方法的回收率良好,准确度满足要求。

2.2 鞣花酸含量测定方法

参考文献[13-15]方法进行测定。

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱为菲罗门Fusion C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(23:77),流速为1 mL/min;检测波长为254 nm;进样量为10 μL 。取“2.2.2”项和“2.2.3”项溶液进样分析,结果各主峰与相邻峰的分离度均大于1.7,理论板数按鞣花酸计均大于5 600。

2.2.2 鞣花酸对照品溶液的制备 精密称取经40 ℃减压干燥4 h的鞣花酸对照品适量,加甲醇制成质量浓度0.176 mg/mL的鞣花酸对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.1.2”项下供试品溶液2 mL至10 mL棕色量瓶中,加甲醇5 mL,密塞,超声(功率:150 W,频率:40 kHz,下同)15 min,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2.4 标准曲线绘制 精密吸取鞣花酸对照品溶液(0.176 mg/mL)1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μL ,分别注入色谱仪,以进样量(μg)为横坐标(x)、对照品峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程: $y=2 028 601.46x+21 379.33$ ($r=0.999 7$)。结果表明,鞣花酸进样量在0.176~1.056 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下鞣花酸对照品溶液10 μL ,连续进样6次,记录峰面积。结果,鞣花酸峰面积的RSD为0.89% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h,进样测定,记录峰面积。结果,鞣花酸峰面积的RSD为1.92% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 平行制备6份供试品溶液,进样测定,记录峰面积,计算含量。结果,鞣花酸含量的RSD为1.57% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 采用标准添加法测定回收率。精密量取同一供试品溶液6份,每份1.0 mL,置于10 mL棕色量瓶中,分别加入质量浓度为0.176 mg/mL的鞣花酸对照品溶液1.0 mL;加甲醇5 mL,超声处理30 min,定容,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤,进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,鞣花酸的平均加样回收率为99.35% (RSD=1.72%, $n=6$),表明鞣花酸含量测定方法的回收率良好,准确度满足要求。

2.3 正交试验优化提供工艺

根据预试验,对影响石榴皮和石榴花药材中有效成分提取效果的主要因素提取次数(A)、提取时间(B)、加水量(C)进行研究,因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factor and levels

水平	因素		
	A(提取次数)	B(提取时间),h	C(加水量),倍
1	1	0.5	6
2	2	1.0	8
3	3	1.5	10

精密称取石榴皮和石榴花药材粉末9份,每份各100.0 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以总鞣质和鞣花酸含量的综合评分为考察指标(2种成分的权重系数各为0.5)。试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 试验设计与结果

Tab 2 Design and results of test

试验号	A(提取次数)	B(提取时间)	C(加水量)	D(空白)	总鞣质含量, mg/g	鞣花酸含量, mg/g	综合评分
1	1	1	1	1	47.96	7.25	29.96
2	1	2	2	2	72.95	13.29	50.47
3	1	3	3	3	105.98	17.09	68.52
4	2	1	2	3	112.06	16.28	68.57
5	2	2	3	1	168.25	19.89	93.09
6	2	3	1	2	115.05	16.86	70.72
7	3	1	3	2	149.36	18.16	83.73
8	3	2	1	3	100.21	19.39	71.79
9	3	3	2	1	135.18	23.08	94.66
K_1	49.65	60.75	57.49	72.57			
K_2	77.46	71.78	71.23	68.30			
K_3	83.39	77.96	81.78	69.62			
R	33.74	17.21	24.29	2.94			

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

误差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A(提取次数)	1946.960 8	2	973.480 4	68.123 5	0.014 5
B(提取时间)	456.061 3	2	228.030 7	15.957 4	0.059 0
C(加水量)	890.240 2	2	445.120 1	31.149 2	0.031 1
D(误差)	28.579 9	2	14.289 9		

由表2直观分析结果可知,各因素的影响大小分别为 $A>C>B$,最优水平为 $A_3B_1C_3$ 。方差分析结果表明,A、C因素有显著性影响($P<0.05$),故选择 A_3C_3 ;B因素无显著性影响($P>0.05$),故选择节能水平即 B_1 。综合以上结果,最优提取工艺为 $A_3B_1C_3$,即取石榴皮和石榴花药材粗粉混合,加10倍量水,回流提取3次,每次0.5 h,提取液过滤后混合,备用。

2.4 验证试验

分别称取石榴皮和石榴花药材粗粉各100.0 g,混合,按确定的最优提取工艺条件进行3批验证试验,计算含量。结果,总鞣质含量分别为153.65、151.09、150.32 mg/g,鞣花酸含量分别为24.17、24.63、24.96 mg/g,总鞣质与鞣花酸平均含量分别为151.69、24.59 mg/g,RSD分别为1.15%、1.41%($n=3$)。结果表明,优化工艺合理、稳定,具有良好的重现性和可操作性。

3 讨论

木吒栓中君药石榴皮与石榴花中均含有没食子酸与鞣花酸等主要成分,皆具有抗炎、抗氧化的功效,而鞣质类成分的结构复杂,针对没食子酸与鞣花酸含量测定的报道多采用高效液相色谱法^[13-15]。在2015年版《中国药典》(一部)中,在保留原有总鞣质的检测项时,与旧版药典相比新增了石榴皮中鞣花酸的含量测定项目。在本研究前期预试验中发现,石榴皮与石榴花中鞣花酸含量远高于没食子酸含量,故本研究针对2味药材

的共有成分,分别以紫外分光光度法和高效液相色谱法对总鞣质和鞣花酸含量分别进行检测,以通过多指标综合评定来优化石榴皮和石榴花药材的提取工艺,可以较全面地反映提取物有效成分的信息,符合维吾尔医学的整体观理论。

笔者在参照2015年版《中国药典》(一部)有关要求与规定^[4],在对供试品进行超声提取时,对提取时间(15、30、45 min)进行了考察。结果发现,以甲醇超声提取15 min即可将鞣花酸提取完全,与《中国药典》规定的40 min相比时间缩短。

本试验以总鞣质和鞣花酸含量为指标,通过正交试验优化了石榴皮与石榴花的水提取工艺,建立了操作简便且稳定、合理的提取工艺,为维药木吒栓后续制备工艺的研究提供了参考依据。

参考文献

- [1] 王超萍.石榴花活性物质提取分离技术研究[D].济南:山东轻工业学院,2011.
- [2] 畅静,田莉.石榴多酚的提取工艺和检测方法研究进展[J].中国中医药信息杂志,2014,21(12):133-136.
- [3] 周倩,孙立立,戴衍明,等.石榴皮、石榴瓢及石榴籽的化学成分比较研究[J].中国中药杂志,2013,38(13):2159-2162.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:93-94.
- [5] 张旭杰.天然药物化学[M].北京:人民卫生出版社,1988:3-16.
- [6] 于占洋,金哲雄.鞣质抗氧化作用研究进展[J].黑龙江医药,2014,27(1):43-46.
- [7] Huang TH, Peng G, Kota BP, et al. Pomegranate flower improves cardiac lipid metabolism in a diabetic rat model: role of lowering circulating lipids[J]. Br J Pharmacol, 2005,145(6):767-774.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:203.
- [9] 雷志丹,夏新华,杨建伟,等.地榆鞣质提取工艺及吸湿性的研究[J].中国药房,2015,26(1):93-95.
- [10] 王丽,曹跃,贾天柱,等.狗脊中鞣质类成分的纯化工艺研究[J].中国药房,2013,24(3):219-221.
- [11] 刘刚,孙磊,乔善义.鞣质的分离和分析方法研究进展[J].国际药学研究杂志,2013,40(2):172-176.
- [12] 王添敏,徐世钊,张慧,等.胡桃楸茎枝、叶和果实中总鞣质的动态变化[J].中成药,2012,34(8):1567-1569.
- [13] 黄彩虹,刘海涛,雷鹏,等.高效液相色谱法测定地锦草中鞣花酸的含量[J].中南药学,2013,11(2):136-138.
- [14] 贝玉祥,杨阳,郭英,等.高效液相色谱法测定诃子中鞣花酸的含量[J].时珍国医国药,2009,20(9):2178-2179.
- [15] 刘智,王爱民,许祖超,等.高效液相色谱法测定野鸦椿药材中鞣花酸含量[J].中国药业,2013,22(17):16-18.

(收稿日期:2016-11-07 修回日期:2017-02-16)

(编辑:刘萍)