

川桑葚中鞣酸的提取及纯化工艺研究

杨凤琼¹, 李梅丽²

(1. 广东岭南职业技术学院 广东广州 510663;

2. 厦门大学第一附属医院药学部 福建厦门 361000)

摘要: 对脱除多糖的桑葚干燥粉末先用 N,N-二甲基甲酰胺提取鞣酸, 再用石油醚和正丁酸甲酯萃取 3 次后获得鞣酸粗品。鞣酸粗品经酸沉、醇沉和重结晶 3 种方法纯化, 采用单因素试验与正交试验优选鞣酸提取工艺和纯化工艺。结果发现: 最佳提取工艺条件为 N,N-二甲基甲酰胺与川桑葚质量比 12 : 1、石油醚与正丁酸甲酯体积比 3 : 1、提取温度 40 ℃、提取时间 8 h; 最佳纯化工艺条件为酸沉时间 16 h、醇沉时间 4 h、重结晶温度 50 ℃。

关键词: 川桑葚; 鞣酸; 提取纯化工艺

Study on extraction and purification technology of tannic acid in Sichuan mulberry

YANG Feng-qiong¹, LI Mei-li²

(1. Lingnan Institute of Technology Guangzhou 510663, Guangdong, China;

2. The Pharmaceutical Department of The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian, China)

Abstract: After removing polysaccharide from mulberry, tannic acid was extracted in the mulberry powder through N,N-dimethyl-formamide(DMF). Then raw tannic acid was obtained after extracting in mineral ether(ME) and methyl butyrate(MB) 3 times. Tannic acid was purified by acid precipitation, alcohol precipitation and recrystallization, Single factor test and orthogonal experiment were used to find the best factor for extraction and purification, the results showed that the optimum extraction conditions were as follows: weight ratio of DMF to Sichuan mulberry was 12 : 1, volume ratio of ME to MB was 3 : 1, temperature was 40 ℃, and time was 8 h. The best purification conditions were as follows: time for acid precipitation was 16 h, time for alcohol precipitation was 4 h, the temperature for recrystallization was 50 ℃.

Key words: Sichuan mulberry; tannic acid; extraction and purification technology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1008-9578 (2018) 05-0092-05

桑葚, 又称乌椹、桑果、桑枣等, 是桑树的成熟果实, 属于桑科落叶乔木^[1]。川桑葚主要生长在温暖湿润的四川盆地、贵州等地, 不耐旱, 但对土壤的适应性很强。《本草纲目》等多本中医药典中对桑葚的药用功效均有记载, 桑葚的主要功效有滋阴养血、补气益肾、生津止渴等^[2], 可用于治疗缺血导致的头晕眼花、头发花白、消渴口干等, 还可以提升人体免疫力、防止血管硬化、降低血脂、改善皮肤光泽和心悸失眠等^[3-4]。迄今为止, 桑葚中已被分离出来确认的物质超过了 150 种, 其中被人们关注和应用的主要有白藜芦醇、花色苷类化合物、鞣酸、多糖、黄酮类化合物等^[5-6], 这些成分的药用和保健功能早已被市场所认可。

鞣酸又称单宁酸, 是由五倍子中提取出的一种鞣质, 属于多元酚类衍生物, 一般为淡黄色或无色

的粉末, 易溶于甘油, 可溶于水和乙醇, 不溶于乙醚和氯仿^[7]。在医学上, 鞣酸具有止血、抗过敏的功效, 可制成软膏局部使用来治疗烫伤、溃疡、湿疹、痔疮等, 还可以抑制蛇毒蛋白的活性, 中和蛇毒的毒性^[8]。在饮料方面, 鞣酸可用作食品抗氧化剂, 与维生素、氨基酸混合后使用, 主要特点是水溶性好, 易于与蛋白质共沉淀, 从而提升饮料的保质期^[9]。

本文先以 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 对处理过的川桑葚中的鞣酸进行粗提取, 用石油醚和正丁酸甲酯复配的提取剂萃取浓缩粗提取液, 经过酸沉、醇沉、重结晶法提纯鞣酸。对提取及纯化工艺中主要影响因素进行正交试验分析, 并对结果进行讨论和总结, 旨在优化出一套完整提取鞣酸的工艺流程。

收稿日期: 2017-08-28

作者简介: 杨凤琼 (1968—), 女, 教授, 研究方向为食品药品研发及教育管理。

通信作者: 李梅丽 (1968—) 女, 厦门大学第一附属医院药学部主任药师, 学士学位, 研究方向为食品药品研发。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

川桑葚：四川国友果业有限公司。

无水乙醇、高氯酸、DMF、正癸醇：分析纯；盐酸、石油醚：工业纯；正丁酸甲酯：优级纯。

1.2 仪器与设备

XS204 分析天平：梅特勒-托利多国际有限公司；JM-LMJ 连续灭酶机：温州市龙湾集美机械厂；XZ-6G 低速大容量离心机：长沙湘智离心机仪器有限公司；循环水真空泵：郑州英峪领科仪器设备有限公司；R1020 旋转蒸发仪：郑州长城科工贸有限公司；Astacus 超纯水仪：德国曼默博尔北京分公司；LC-10T 高效液相色谱仪：赛智科技（杭州）有限公司。

1.3 试验与方法

1.3.1 桑葚中多糖的脱除

称取去皮的桑葚粉末 2 g 于锥形瓶中，按料液比 1 : 5 (g/mL) 用乙醇脱色和去除小分子糖，60 °C 水浴回流过滤，烘干乙醇后备用。称量适量样品，迅速升温至 140 °C 灭酶 20 min，之后离心分离去除滤液，将处理好的样品放置于 5 °C 冰箱中静置过夜。抽滤样品后干燥至无水备用^[10-11]。

1.3.2 鞣酸的粗提取

称取 0.1g 去多糖的桑葚粉末于 200 mL 锥形瓶中，首先用 1% 的 HCl 去除所含金属离子，用蒸馏水冲洗 3 次后，用 DMF 在磁力搅拌条件下初次提取鞣酸 8 h，过滤得清液后用不同体积比的石油醚、正丁酸甲酯混合溶剂分 3 次萃取 DMF 清液，最后用旋转蒸发仪减压浓缩鞣酸，冷却至室温后得到浓缩的鞣酸粗提液。

1.3.3 鞣酸的提纯工艺

鞣酸的提纯工艺流程如下：

鞣酸粗品→醇沉→酸沉→重结晶→鞣酸纯品

醇沉工艺：取鞣酸粗品 2 mL 于 5 mL 离心管中，加入少量的正癸醇，边加入正癸醇边摇动离心管，当正癸醇溶液颜色不再加深时停止摇动离心管，并将其置于冰箱中进行充分醇沉。

酸沉工艺：将上述醇沉液置于 100 mL 塑料杯中，缓慢滴加高氯酸 (HClO₄)，边滴加边摇晃塑料杯，待溶液不再有气泡产生，黏稠度明显下降，颜色变为淡黄棕色时停止滴加。之后于通风处静置 6 h，放入冰箱中静置酸沉。

重结晶工艺：将上述酸沉液置于烧杯中，加入适量去离子水，在 80 °C 条件下进行重结晶。反复进行 3 次重结晶操作。最后将重结晶的晶粒溶解于一定量的超纯水中制得鞣酸纯品。

1.3.4 鞣酸含量的测定方法

1.3.4.1 高效液相色谱的测定条件

用 HPLC 测定鞣酸含量。固定相为 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、流动相为乙腈 : 3% 磷酸溶液 : 无水乙醇 = 70 : 10 : 20 (体积比)、检测波长为 280 nm、灵敏度 0.005 AUFS；柱温 30 °C、流速 1.0 mL/min、进样量 10 μL^[12]。

1.3.4.2 标准曲线的绘制

精密称取鞣酸对照品约 2 mg，置于 25 mL 量瓶中，加乙腈至刻度线，摇匀，即得对照品溶液 (80 mg/L)。分别取该对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL 并稀释至 25 mL，确定高效液相色谱进样量均为 10 μL 进行测定，以对照品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，拟合回归方程。

1.3.4.3 鞣酸含量的测定

用孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤提取的鞣酸纯品，精密吸取 10 μL 注入 HPLC，测得峰面积，代入回归方程计算其含量。

1.3.5 鞣酸提取及纯化工艺的影响因素试验

1.3.5.1 提取鞣酸的影响因素试验

在各单因素试验的基础上，以粗提取液中鞣酸含量为考察指标，设计 4 因素 3 水平 L₉(3⁴) 正交试验，各因素水平见表 1。

表 1 提取工艺因素水平表

因素水平	A DMF 与桑葚的质量比	B 石油醚与正丁酸甲酯体积比	C 提取温度 / °C	D 提取时间 / h
1	12 : 1	4 : 1	20	10
2	10 : 1	3 : 1	30	8
3	20 : 1	5 : 1	40	12

1.3.5.2 鞣酸纯化工艺的影响因素试验

在各单因素试验结果的基础上，以鞣酸纯品中的鞣酸含量为考察指标，对醇沉时间、酸沉时间、重结晶温度这 3 个因素设计 3 因素 3 水平 L₉(3³) 正交试验，各因素水平见表 2。

表2 影响因素试验水平表

因素水平	A 醇沉时间/h	B 酸沉时间/h	C 提取温度/°C
1	16	4	50
2	24	2	60
3	8	6	70

2 结果与讨论

2.1 提取鞣酸的工艺研究

2.1.1 单因素影响试验

2.1.1.1 DMF与桑葚质量比对鞣酸含量的影响

称取桑葚粉末0.1g,固定其他条件不变,分别以DMF与桑葚粉末质量比3:1、6:1、10:1、12:1、20:1进行试验,粗提取后溶液定容至50mL容量瓶,用HPLC测得的鞣酸含量如表3所示。

表3 DMF与桑葚质量比对鞣酸含量的影响

DMF与桑葚 末质量比	3:1	6:1	10:1	12:1	20:1
鞣酸含量/(g/L)	0.016	0.042	0.063	0.072	0.078

从表3可以看出,DMF的用量成倍增加时,提取液中的鞣酸含量迅速上升,12倍量与20倍量DMF对鞣酸的提取效果相近,且10倍量DMF之后的提取鞣酸含量上升速度明显趋于平缓。因此,选择DMF与桑葚质量比为12:1。

2.1.1.2 萃取剂对提取鞣酸含量的影响

石油醚与正丁酸甲酯的复配溶剂是为了从粗提取液中尽可能多地将鞣酸转移出来的同时,对粗提取液中存在的黄酮类化合物起到抑制和过滤的作用。固定其他条件不变,分别以石油醚与正丁酸甲酯体积比2:1、3:1、4:1、5:1、6:1进行试验,结果如表4所示。

表4 萃取剂对提取鞣酸含量的影响

石油醚与正丁 酸甲酯体积比	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1
鞣酸含量/(g/L)	0.57	0.87	0.94	0.96	1.02

从表4结果可知:当石油醚与正丁酸甲酯复配体积比为2:1~3:1时;鞣酸含量的增大速率较快,当复配体积比为3:1~6:1时,鞣酸含量继续增大。考虑到后续减压蒸除萃取剂的时间和效果,且适当延长萃取过程的相转移时间也可以将

鞣酸含量进一步提高,因此选择石油醚与正丁酸甲酯复配体积比为3:1。

2.1.1.3 提取温度和时间对鞣酸含量的影响

提取温度和时间是鞣酸提取工艺中较为重要的2个因素。固定上述其他提取工艺条件不变,分别对提取温度(20、30、40、50、60°C),提取时间(4、6、8、10、12h)对鞣酸含量的影响,结果如表5所示。

表5 提取温度和时间对鞣酸含量的影响

温度影响		时间影响	
提取温度 /°C	鞣酸含量 /(g/L)	提取时间 /h	鞣酸含量 /(g/L)
20	0.06	4	0.31
30	0.31	6	0.60
40	0.72	8	0.82
50	0.76	10	0.89
60	0.77	12	0.93

从表5可以得出,随着提取温度和提取时间的增加,鞣酸含量也随之上升。综合考虑温度升高会增大有机溶剂的挥发以及试验效率2个方面,选择提取温度40°C、提取时间8h作为提取的最佳工艺条件。

2.1.2 正交试验的方差分析

鞣酸提取工艺的正交试验结果见表6,方差分析结果见表7。

表6 影响因素试验及结果

试验号	因素				鞣酸含量/(g/L)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.73
2	1	2	2	2	0.81
3	1	3	3	3	0.83
4	2	1	2	3	0.64
5	2	2	3	1	0.78
6	2	3	1	2	0.56
7	3	1	3	2	0.87
8	3	2	1	3	0.72
9	3	3	2	1	0.63
K_1	2.37	2.24	2.01	2.14	
K_2	1.98	2.31	2.08	2.26	
K_3	2.22	2.02	2.48	2.19	
R	0.39	0.29	0.47	0.12	

表7 提取工艺正交试验的方差分析结果

项目	f	S	MS	F值	P值
A	2	0.0258	0.0129	43	<0.05
B	2	0.0163	0.00815	27.17	>0.05
C	2	0.0429	0.02145	71.5	<0.01
D	2	0.0317	0.01585	52.83	>0.05

由表6可以看出,影响因素顺序为 $C > A > B > D$,由表7可见,因素 C (提取温度)质量比各水平之间有显著差异($P < 0.01$),因素 A (DMF与桑葚的倍量关系)各水平之间有差异($P < 0.05$),因素 D (提取时间)各水平间无显著差异($P > 0.05$)。综合直观分析与方差分析相结合,确定鞣酸最佳提取工艺为 $A_1B_2C_3D_2$,即以12倍桑葚粉末的DMF粗提取鞣酸,提取温度 40°C ,提取时间8h,之后以石油醚与正丁酸甲酯体积比3:1的复配溶剂萃取粗提取液。

2.1.3 验证试验

为了验证上述鞣酸最佳提取工艺的稳定性 and 可靠性,在最佳提取工艺的条件下进行3次平行试验,结果表明该优化工艺稳定,试验效果理想,具体试验结果见表8。

表8 提取工艺验证试验结果

验证试验	1	2	3	\bar{x}	RSD/%
鞣酸含量/(g/L)	0.87	0.82	0.89	0.86	1.80

2.2 鞣酸的液相色谱分析

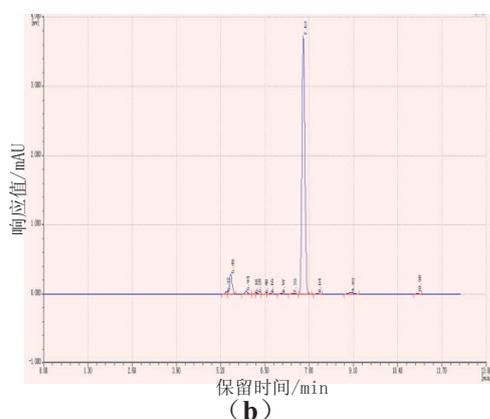
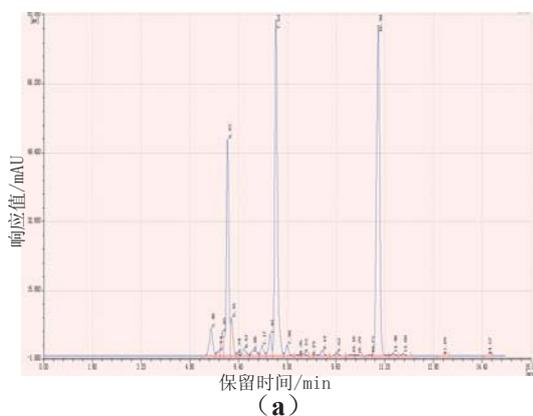


图10 鞣酸粗提取液和鞣酸纯品液相色谱图

图10(a)为粗提取液的鞣酸液相色谱图,图10(b)为鞣酸纯品的液相色谱图。在鞣酸的提取工艺中,即使经过了乙醇的脱色、去除小分子糖、灭酶、HCl去除金属离子和石油醚-丁酸甲酯复配溶剂的萃取等这些除杂和相转移过程,粗提取液中仍然存在除鞣酸以外的其他组分,推测为维生素、白藜芦醇、油酸等。经过三步纯化工艺(醇沉→酸沉→重结晶)处理,醇沉工艺和酸沉工艺以相似相溶的原理分别对白藜芦醇进行沉淀/油酸进行有机相分层过滤,重结晶则由于沸点的不同对维生素进行了脱去。液相色谱测定分析可以很明显地看出杂质变少了,鞣酸的纯度已经提升至85%以上,达到了鞣酸纯品的要求,证明提纯工艺过程是行之有效的。以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,拟合线性曲线,其回归方程为 $A=1.103 \times 10^4 \rho + 1.9236 \times 10^3$ ($r=0.995, n=6$),线性范围为10~100 mg/L。

2.3 鞣酸纯化工艺研究

2.3.1 醇沉、酸沉、重结晶的工艺

取鞣酸粗提取液2 mL,固定酸沉、重结晶条件不变,考察醇沉时间单因素对鞣酸纯品含量的影响。以此类推,考察酸沉时间和重结晶温度对鞣酸纯品含量的影响,具体纯化工艺影响鞣酸含量的试验结果见表9所示。

表9 纯化工艺影响的试验结果

醇沉		酸沉		重结晶	
时间/h	鞣酸含量/(g/L)	时间/h	鞣酸含量/(g/L)	温度/ $^\circ\text{C}$	鞣酸含量/(g/L)
8	1.47	2	1.16	50	0.35
16	1.96	4	1.41	60	0.36
24	2.03	6	1.45	70	0.32

从表9可以看出,醇沉时间的延长对纯化鞣酸十分有益,酸沉时间对于增大鞣酸含量的效果并不显著。考虑适当的缩短试验时间对纯化鞣酸的影响不大,选择醇沉时间为16h,酸沉时间为4h。

重结晶温度对于鞣酸含量的影响与前两者明显不同,重结晶温度升高,鞣酸含量先缓慢增大后减小。这是因为鞣酸的活性受温度影响很大,较高的温度会使鞣酸失活甚至结构上发生变化,所以升高温度到某一阶段时鞣酸含量就会呈现不升反降的现

象。因此,从单因素试验结果来看,选择重结晶温度为 50 ℃最佳。

2.3.2 鞣酸纯化工艺正交试验的方差分析

表 10 影响因素试验及结果

试验号	因素			鞣酸含量/(g/L)
	A	B	C	
1	1	1	1	0.37
2	1	2	2	0.33
3	1	3	3	0.30
4	2	1	2	0.41
5	2	2	3	0.31
6	2	3	1	0.37
7	3	1	3	0.28
8	3	2	1	0.27
9	3	3	2	0.25
K_1	1.00	1.06	1.01	
K_2	1.09	0.91	0.99	
K_3	0.80	0.92	0.89	
R	0.29	0.15	1.12	

表 11 方差分析结果

	f	S	MS	F	P
A	2	0.044 1	0.022 1	100.68	<0.01
B	2	0.014 1	0.007 1	32.19	>0.01
C	2	0.008 3	0.004 2	18.95	>0.05

从表 10 可以看出,影响纯化效果的因素顺序为: $C > A > B$ 。由表 11 可知,因素 A(醇沉时间)各水平之间有显著差异($P < 0.01$),因素 B(酸沉时间)各水平之间有差异($P > 0.01$),因素 C(重结晶温度)各水平之间无显著差异($P > 0.05$)。综合直观分析、方差分析、适当缩短试验时间三者考虑,确定最佳优化工艺 $A_1B_1C_1$,即醇沉时间为 16 h,酸沉时间为 4 h,重结晶温度为 50 ℃。

2.3.3 验证试验

为了验证上述鞣酸最佳纯化工艺的稳定性可靠性,在最佳纯化工艺条件下进行 3 次平行试验,结果显示该工艺试验效果良好,有一定的稳定性,具体试验结果见表 12。

表 12 纯化工艺验证试验结果

验证试验	1	2	3	\bar{x}	RSD/%
鞣酸含量/(g/L)	0.40	0.44	0.44	0.427	10.32

3 结论

本文以桑葚脱除多糖→HCl 去除金属离子→DMF 初提取→石油醚与正丁酸甲酯复配萃取→减压蒸馏为提取工艺,以醇沉→酸沉→重结晶为纯化工艺,对桑葚中的鞣酸进行提取纯化工艺的研究。探讨提取和纯化工艺过程中的单因素影响,并设计正交试验考察最佳的工艺条件。川桑葚中鞣酸的最佳提取工艺条件为 DMF 与川桑葚质量比 12 : 1、石油醚与正丁酸甲酯体积比 3 : 1、提取温度 40 ℃、提取时间 8 h;最佳纯化工艺条件为:醇沉时间 16 h、酸沉时间 4 h、重结晶温度 50 ℃。对鞣酸粗品和纯化样品采用高效液相色谱进行测定,发现粗品中鞣酸含量低于 30%,而纯化品中鞣酸含量超过了 85%,进一步证实了试验的提取纯化工艺流程对鞣酸的提取效果好。

【参考文献】

- [1] 吴祖芳,翁佩芳. 桑椹的营养组分与功能特性分析 [J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 102-107.
- [2] 张志强,杨清香,孙来华. 桑葚的开发及利用现状 [J]. 中国食品添加剂, 2009, 65(4): 65-68.
- [3] 陈诚,李洪波,杨欣,等. 中药桑葚活性物质的研究进展 [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1660-1662.
- [4] 李冬香,陈清西. 桑葚功能成份及其开发利用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 293-297.
- [5] 吴滨滨,甄丹丹,甄汉深,等. 桑葚研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 41-43.
- [6] 游元元,万德光,杨文宇,等. 桑椹药材 HPLC 图谱研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(2): 141-144.
- [7] 武斌,张薇. 高纯度食品级鞣酸的制备 [J]. 贵州化工, 2002, 27(2): 1-3.
- [8] 洪宗国,易筠,江丹,等. 不同产地艾叶中鞣酸含量比较 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2009, 28(3): 63-65.
- [9] 冯素玲,李俊,樊静. 荧光动力学分析法测定痕量鞣酸 [J]. 分析化学, 2003, 31(2): 198-200.
- [10] 李洪燕,罗浩,刘结荣,等. 酶解法提取罗汉果多糖的工艺研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 689-694.
- [11] 高文宏,右彦国,李国基,等. 超滤法提取大豆低聚糖的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(6): 6-10.
- [12] 仝燕,王锦玉,张锴镔,等. 苦参生物碱提取纯化工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 19-22.