

# The Study on the Chemistry Properties of Tannin in Chinese Medicine *Filipendula*\*

Shuxia Miao<sup>1</sup>, Yuguang Lv<sup>2#</sup>, Hongzhi Miao<sup>3</sup>, Yuanxu Wang<sup>3</sup>, Hong Cui<sup>1</sup>, Chunhui Shi<sup>1</sup>, Xin'an Wang<sup>1</sup>, Ye Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Medical College of Jiamusi University, Jiamusi

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi

<sup>3</sup>Jiamusi Infectious Diseases Hospital, Jiamusi

Email: #yuguanglv@163.com

Received: Sep. 28<sup>th</sup>, 2012; revised: Oct. 10<sup>th</sup>, 2012; accepted: Oct. 18<sup>th</sup>, 2012

**Abstract:** Study on the extraction of tannin and quantitative determination process, and understanding the activity of tannin in the *Filipendula*. Respectively, to extract the tannin from the *Filipendula* with 30% methanol, 50% acetone water and distilled water and to detect the content of tannin with complex quantity. Using different solvents extract the tannin from the same quantity of *Filipendula*, 30% methanol extraction is the best at last. Method of measurement with the complex ways in tannin, with 30% methanol is better. By the study of tannins in the *Filipendula*, the tannin compounds in pharmaceutical respect play a bigger role.

**Keywords:** *Filipendula*; Tannin; Quantitative Determination

## 中药蚊子草中鞣质化学性质的研究\*

缪淑霞<sup>1</sup>, 吕玉光<sup>2#</sup>, 苗洪志<sup>3</sup>, 王元旭<sup>3</sup>, 崔红<sup>1</sup>, 石春卉<sup>1</sup>, 王新安<sup>1</sup>, 李焯<sup>2</sup>

<sup>1</sup>佳木斯大学临床医学院, 佳木斯

<sup>2</sup>佳木斯大学药学院, 佳木斯

<sup>3</sup>佳木斯市传染病医学院, 佳木斯

Email: #yuguanglv@163.com

收稿日期: 2012年9月28日; 修回日期: 2012年10月10日; 录用日期: 2012年10月18日

**摘要:** 研究蚊子草中鞣质的提取以及定量工艺, 并了解蚊子草中的鞣质的活性。分别用 30% 的甲醇, 50% 丙酮水, 水分别提取 5 g 蚊子草中的鞣质, 用络合量法测定鞣质的含量。用不同的溶剂提取等质量蚊子草中鞣质, 用络合量法测定其中提取的大小, 最后甲醇的提取率最好。在用络合量法测量鞣质的方法中, 用 30% 的甲醇效果较好。通过对蚊子草中的鞣质的研究, 使鞣质类化合物在医药方面发挥更大的作用。

**关键词:** 蚊子草; 鞣质; 结构鉴定

### 1. 引言

蚊子草 [*Filipendula palmate* (Pall) Maxim] 系蔷薇科

\*资助信息: 黑龙江省科技厅科研项目(B201015), 黑龙江省中医药管理局科研项目(ZHY12-Z195), 黑龙江省教育厅科研项目(11551482), 2012 年佳木斯大学研究生创新科研项目专项资金(YJSCX2012-037JD), 佳木斯大学重大培育及面上科研项目(LZP2011-003, L2010-144), 佳木斯大学 2012 年“大学生创新创业训练计划”校级项目(A-37)和校级培育项目(A-25)。

#通讯作者。

蚊子草属植物, 又名合叶子、黑白蚊子草, 全草入药, 主要成分分布于我国北方省份<sup>[1]</sup>。近年来对于蚊子草属植物也做了一些药理方面的研究, 并取得了积极进展和多方面的研究成果, 证明其具有多种生理活性, 该植物具有退热和消炎的功效, 在防治心血管疾病以及抗肿瘤方面具有潜在的疗效。蚊子草也可用于发汗, 治疗痛风、风湿、烧伤等症, 在妇科止血方面也

有良好的疗效<sup>[2]</sup>。随着人们对蚊子草植物的研究不断深入,已经从该植物中发现了多种成分,主要包括黄酮化合物,鞣质类化合物,挥发油类成分,脂类化合物,蚊子草中还含有肝素,叶中含有维生素 C,果实中含有生物碱,此外,蚊子草中还发现了水晶蓝素等化学成分<sup>[3-10]</sup>。蚊子草属植物抗肿瘤作用研究表明:其花提取物中的类黄酮成分具有抑制肿瘤扩散的作用,该属植物中的水杨酸盐和鞣质,通过中断细胞分裂的方法抑制肿瘤细胞的增值。蚊子草属植物中挥发油类以及黄酮类化合物成分具有抗微生物活性的作用。对于蚊子草属植物抗氧化和清除自由基作用的研究发现,其主要的抗氧化成分为水杨酸类衍生物,鞣质,黄酮类化合物,其中槲皮素-4-葡萄糖苷在体外具有明显抑制黄嘌呤氧化酶的作用。蚊子草属中的黄酮类化合物和香豆素类物质具有较好的护肝作用。蚊子草属植物花粉中富含黄酮醇类化合物,具有抗动脉粥样硬化,降低胆固醇,降低血压,保护缺血心肌的作用。蚊子草属植物还具有抗炎,抗凝,抗栓和促纤溶的作用。药用植物中鞣质的研究在天然药物化学中已成为非常活跃的领域,其在医药行业的抗肿瘤治疗中也显示相当诱人的前景。在可水解的鞣质的研究方面取得了引人瞩目的成就,确定了很多课水解鞣质的结构,并发现了不少新的生物活性<sup>[11-13]</sup>。这些成就的取得为进一步深入广泛开展鞣质类研究工作展示了光明的前景,利用得天独厚的几千年的临床应用经验,充分利用现代科学技术结合传统的医疗实践经验,开辟这一古老而年轻的领域的而研究工作,就一定能使药用鞣质的研究工作重放光彩,使鞣质类化合物在医药方面发挥更大的作用。正确地利用这些有效成分及其特性是充分发挥蚊子草药用价值的重要因素之一。

有关蚊子草化学成分的报道较少,为了更好的开发和利用药用资源,我课题组对蚊子草提取物进行了系统的化学成分研究,研究结果发现蚊子草含有化学成分为黄酮化合物,鞣质,酚类,糖,苷和醌类化合物<sup>[14]</sup>,本文仅对蚊子草中的鞣质化合物的提取工艺和化学性质进行了研究。

## 2. 实验部分

### 2.1. 仪器与材料

#### 2.1.1. 仪器

RE52-5AA 旋转蒸发仪;上海亚荣生化仪器厂  
JT10001 电子天平;上海精科电子天平仪器有限公司

超声波清洗器;昆山超声仪器有限公司  
恒温数显水浴锅;常州国华电器有限公司

#### 2.1.2. 材料

甲醇(分析纯);天津市科密欧化学试剂有限公司  
丙酮(分析纯);沈阳市华东试剂厂  
铬黑-T;沈阳市试剂三厂  
氯化铵;齐齐哈尔市试剂三厂  
三氯化铁;天津市凯通化学试剂有限公司  
醋酸铅;天津市博士迪化工有限公司  
氧化钙;沈阳市华东试剂厂  
乙酸锌;天津市红岩化学试剂厂  
EDTA;哈尔滨新达化工厂  
蚊子草;黑龙江省佳木斯地区

### 2.2. 提取分离

鞣质的含量测定:精密称取样品粉末 50 g 三份,分别用 30%的甲醇,50%的丙酮,蒸馏水溶液 500 ml,在 85℃的水浴条件下回流提取三次,每次 30 min,(第一次回流提取之前先用 30%的甲醇等冷浸 30 分钟)。放冷,抽滤,合并滤液,于 35 左右水浴温热 15 min。精密吸取醋酸锌标准液(1 mol/L) 25 ml 于 500 ml 容量瓶中,振荡 1 分钟,置上述水浴温热 30 min,间歇振荡数次。冷却至室温,用 30%甲醇,50%丙酮,蒸馏水定容。摇匀后放置过夜。用双层干滤纸抽滤,弃去初滤液,抽滤 3 次,续滤液备用。精密吸取 25 ml 续滤液于 500 ml 锥形瓶中,加蒸馏水 300 ml, pH = 10 的氨-氯化铵缓冲溶液 25 ml, 铬黑-T 指示剂少许,用 0.05 mol/L EDTA-2Na 滴定至溶液由紫红色变纯蓝色,记录消耗 EDTA-2Na 的体积数,同时做空白对照试验,按下列计算公式计算:

$$\text{鞣质}\% = F \cdot 0.1565 (V_s - V_0) \times M \times 20 W \times 100\%$$

0.1565 为 1 摩尔每升醋酸锌标准溶液消耗量于鞣质含量的比例常数,  $V_0$  为空白试验消耗的 EDTA-2Na 的体积,  $M$  为 EDTA-2Na 的体积的浓度,  $W$  为样品重,  $F$  为校正因子。

### 2.3. 实验的成分的预实验

实验的成分的预实验见表 1, 通过预实验证明蚊子草中含有鞣质。

## 3. 实验定量

### 3.1. 样品溶液的制备

将 500 ml 容量瓶中的样品溶液分别移取 1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml 于 50 ml 的锥形瓶中, 分别向五个锥形瓶中加入 1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml 缓冲溶液, 然后分别加入 50/3 ml, 100/3 ml, 150/3 ml, 200/3 ml, 250/3 ml 的蒸馏水, 分别加入少量指示剂络黑-T。

### 3.2. 实验结果计算

计算公式: 鞣质% =  $0.1556 [V_{Zn} \times C_{Zn} - V_{EDTA-2Na} \times C_{EDTA-2Na}] \times 20/M \times 100\%$ , 实验数据见表 2。

平均值 =  $B1 + B2 + B3 + B4 + B5/5$

标准偏差:  $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^5 (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$  变异系数

$RSD = s/\bar{X}$ 。

## 4. 结果与讨论

### 4.1. 提取溶剂的选择

在提取物制备中, 文献报道也用 50% 的丙酮或蒸馏水提取, 预实验发现丙酮提取样品会同时提取出大量叶绿素, 影响终点颜色的变化, 且其空白试验也有沉淀生成, 而水提物不容易通过滤纸, 且测试结果偏低, 并且从变异系数的角度看, 30% 的甲醇提取鞣质, 误差较小, 所在提取鞣质时才用络合量测定鞣质的含量时 30% 的甲醇效果较好, 实验数据见表 3。

### 4.2. 络合沉淀金属离子的选择

在以金属的有机或无机的盐类鞣质做含量测定时, 文献上早已有不少叙述<sup>[15]</sup>, 但多采用铜盐、铅盐等, 在方法上无外乎重量法, 不仅操作复杂, 而且他们的专属性也不高, 与若干非鞣质化合物成分均生成沉淀, 误差较大, 结果很不准确, 在本方法的条件下锌盐有较高的选择性, 与文献记载相符, 锌在螯合物化学中属于第一类形成体, 能与元素周期表中第六族

Table 1. The tannin of Filipendula in the experiment  
表 1. 蚊子草中鞣质成分的预实验

| 类别   | 三氯化铁 | 醋酸铅 | 石灰水 | 火柴梗实验 |
|------|------|-----|-----|-------|
| 水解鞣质 | 蓝    | 沉淀  | 青灰色 | 无现象   |
| 缩合鞣质 | 绿    | 沉淀  | 无现象 | 紫红色   |

Table 2. Data of experiment  
表 2. 实验数据

|             | 1 ml    | 2 ml    | 3 ml    | 4 ml    | 5 ml    |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 消耗 EDTA-2Na | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       |
| 甲醇          | 0.27 ml | 0.68 ml | 0.92 ml | 1.31 ml | 1.63 ml |
| 丙酮          | 0.35 ml | 0.75 ml | 0.95 ml | 1.25 ml | 1.65 ml |
| 水           | 0.35 ml | 0.88 ml | 1.17 ml | 1.35 ml | 1.85 ml |

Table 3. Results of experiment  
表 3. 实验结果

|    | 含量平均值   | 标准偏差   | 变异系数   | 回收率     |
|----|---------|--------|--------|---------|
| 甲醇 | 51.7081 | 3.3634 | 2.1898 | 51.7081 |
| 丙酮 | 52.6262 | 2.0982 | 3.9562 | 52.6262 |
| 水  | 51.4786 | 1.9830 | 3.8521 | 51.4786 |

第一元素(氧)形成最稳定的络合物, 一般认为锌的离子半径较小, 电离势较大, 在锌形成的螯合物中共价键成分较多, 且具有环状结构到等因素, 故可知锌离子与鞣质所形成的多核络合物具有足够的稳定性, 可运用其进行定量。

### 4.3. 络合沉淀的选择

络合沉淀的条件沉淀温度在 30°C~65°C 之简均无明显变化; 当温度升高时, 水解性鞣质的  $Zn^{2+}$  络合量增加, 乃由于鞣质在碱性溶液中加热引起水解, 生成没食子酸并继而与锌离子发生沉淀所致。缩合鞣质无明显影响。此外, 亦有可能因加热后影响络合物的稳定常数( $K_f$ )之故。络合物沉淀的生成经 20 分钟即可达完全, 久置后亦使氧化分解, 但因没食子酸(或其它多元酚)在该温度下(35°C ± 2°C)未能与  $Zn^{2+}$  形成沉淀, 所以其值反趋下降。缩合鞣质不因酸碱分解, 故无变化。

pH 值对络合物的形成颇为重要, 金属离子与鞣质生成络合物是金属离子取代-OH 基中的氢离子, 通过带电荷的氧与金属离子键合(进而与另一-OH 基键合), 可见络合物的稳定常数  $K_f$  与  $[H^+]$  间的密切关系。实验表明, 在酸性条件下(pH 低于 5)无沉淀生成; 中性时络合物沉淀极不稳定; 弱碱性(pH 8~9)pH 因锌盐呈氢氧化物沉淀析出。本法选择在 pH 11 ± 0.2 的氢氧

化氨溶液中进行沉淀, 不仅使氢氧化锌沉淀溶解, 促进螯合反应的完成与稳定, 还可使鞣质与其它成分(如生物碱)的化合物分解, 进而与  $Zn^{2+}$  络合沉淀。研究过程中还发现, 沉淀剂的用量与试品溶液的稀释度对结果有显著的影响。沉淀剂必须有足够的过量方可得稳定的结果, 此与反应的平衡有关。试品溶液的加入须有相当的稀释度, 因为鞣质水溶液系一胶体溶液, 胶粒的大小及分散度与溶液的浓度有关, 而它们可直接影响反应的进行。

#### 4.4. 关于操作方法

络合沉淀直接在容量瓶中进行, 并以剩余滴定测定  $Zn^{2+}$  的络合量, 可免除沉淀转移、洗涤、烧灼、溶解等许多复杂的程序。经试验证实, 此与不直接在容量瓶中沉淀无显著差异。剩余滴定稍多加指示剂(1~2 ml)可使终点更为明显。关于空白对照检验(包括  $Zn^{++}$  的络合沉淀与剩余滴定二方面)我们以皮粉吸附除去鞣质后的样品溶液同法进行测定, 结果均不消耗  $Zn^{++}$ 。实验还表明, 试品溶液(未加  $Zn$  沉淀)也不消耗 EDTA, 因而省略了空白对照试验<sup>[16]</sup>。

#### 4.5. 温度的设定

相关文献报道, 基于鞣质遇热不稳定的化学性质, 鞣质加热提取 30 min 或者 1 h, 其含量将明显降低, 药典规定加热 30 min, 吕湘林等采用水蒸汽抽提 1~2 h, 都将造成结果偏低, 本法采用温热条件浸提, 可避免加热处理, 减少鞣质的分解。

### 5. 结论

通过对实验的各个方面的分析, 方法的验证, 试验条件的选择, 不同溶剂在提取鞣质的反方面表现其优缺点, 这一部分有实验方法限制, 得出的结论是在选用络合量测定鞣质的含量时, 比较回收率, 平均值以及变异系数等各个方面, 采用 30% 的甲醇效果尤其好, 补充了丙酮提取时带来的叶绿素问题, 同时也补充了蒸馏水不容易通过滤纸的缺点, 同时提取率也高, 综合分析用甲醇提取方法较好。并且通过对提取物进行化学试剂的鉴定, 为以后鞣质的鉴定工作提供了很好的理论和实践依据, 并判断了水解鞣质和缩合

鞣质的鉴别方法, 提供了很好的理论依据。

### 6. 致谢

在此感谢黑龙江省科技厅科研项目(B201015), 黑龙江省中医药管理局科研项目(ZHY12-Z195), 黑龙江省教育厅科研项目(11551482), 2012 年佳木斯大学研究生创新科研项目专项资金(YJSCX2012-037JD), 佳木斯大学重大培育及面上科研项目(LZP2011-003, L2010-144), 佳木斯大学 2012 年“大学生创新创业训练计划”校级项目(A-37)和校级培育项目(A-25)对本文研究工作的大力支持。

### 参考文献 (References)

- [1] 吉林省中医中药研究所. 长白山植物药志[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1982: 539.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1997: 1092.
- [3] 金哲雄, 杨戈, 朴英爱. 蚊子草鞣质类成分研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 32-33.
- [4] 孙允秀, 毛坤元, 姜文普. 蚊子草挥发油的结构鉴定和定量分析[J]. 吉林大学自然科学学报, 1992, 1: 119-121.
- [5] 王玲玲, 刘斌, 石任兵. 荷叶黄酮类化学成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(2): 116-118.
- [6] 周娟, 胡英杰, 肖敏勋. 贯叶金丝桃的黄酮类成分研究[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(5): 416-418.
- [7] 董建勇, 贾忠建. 赶山鞭中黄酮类化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(12): 897-899.
- [8] 殷志琦, 叶文才, 赵守训. 贯叶连翘的化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(6): 487-488.
- [9] 杨念云, 段金殿, 李萍. 金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(21): 1261-1261.
- [10] 杨锦竹, 曲晓宇, 李东飞, 刘银燕, 杨晓虹. 蚊子草化学成分的研究[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20: 307-309.
- [11] C. BenNasr, N. Ayed and M. Metche. Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 1996, 203(4): 186-190.
- [12] K. Maceda, M. Fukuda. Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996, 276 (2): 765 - 768.
- [13] R. M. Halder, G. M. Richards. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. Skin Therapy Letter, 2004, 9(6): 1-3.
- [14] 石春卉, 缪淑霞, 吕玉光, 苗洪志等. 中药蚊子草中鞣质类化学成分的研究[J]. 分析化学进展, 2012, 2: 21-24.
- [15] I. Paran, R. W. Michelmore. Development of reliable PCR-based marker linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85(8): 332-337.
- [16] M. Mars, M. Marrakchi. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. Genetic Resources and Crop Evolution, 1999, 46(5): 174-178.