

# 正交试验优选黔产铁苋菜中没食子酸的提取工艺

魏学军<sup>1\*</sup>, 陈明<sup>1</sup>, 余跃生<sup>1</sup>, 林先燕<sup>1</sup>, 冯光维<sup>1</sup>, 李江<sup>2</sup>

(1. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558003; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的: 优选黔产铁苋菜中没食子酸的提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定铁苋菜中没食子酸含量, Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05% 磷酸 (4:96), 检测波长 270 nm, 柱温室温, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。以没食子酸转移率为指标, 通过单因素试验筛选提取溶媒和提取方法, 采用正交试验考察液固比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间对提取工艺的影响。结果: 选择乙醇为提取溶媒, 采用回流法提取。最佳提取工艺条件为加 30 倍量 70% 乙醇于 90 °C 提取 2 次, 每次 4 h, 没食子酸平均转移率 7.888 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 1.60%)。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 为黔产铁苋菜的开发利用提供实验依据。

**[关键词]** 铁苋菜; 高效液相色谱法; 没食子酸; 正交试验; 提取工艺; 单因素试验

**[中图分类号]** R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0027-03

**[doi]** 10.11653/syjf2013210027

## Optimization of Extraction Process for Gallic Acid in *Acalypha australis* from Guizhou by Orthogonal Test

WEI Xue-jun<sup>1\*</sup>, CHEN Ming<sup>1</sup>, YU Yue-sheng<sup>1</sup>, LIN Xian-yan<sup>1</sup>, FENG Guang-wei<sup>1</sup>, LI Jiang<sup>2</sup>

(1. Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558003, China;

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of gallic acid in *Acalypha australis* from Guizhou. **Method:** The content of gallic acid from *A. australis* was determined by HPLC, Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (4:96), detection wavelength 270 nm, column temperature at room temperature, flow rate 1 mL·min<sup>-1</sup>, injection volume 10 μL. With transfer rate of gallic acid as index, single factor tests were adopted to screen extraction methods and solvents, effects of

**[收稿日期]** 20130403(003)

**[基金项目]** 贵州省教育厅自然科学研究项目(20090119号); 黔南民族医学高等专科学校项目(QNYZ200902)

**[通讯作者]** \* 魏学军, 副教授, 从事中药质量控制研究, Tel: 0854-8308038, E-mail: qndywxj@163.com

[7] 夏昌林. 中药浓缩方式的应用[J]. 机电信息, 2011, 18(14):4.

[8] 张华, 裴桂珍, 李桂华, 等. 鞣花酸片剂的制备及其含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):39.

[9] 高明燕, 余梦瑶, 郑林用, 等. 具有免疫调节功能的平菇咀嚼片的研制[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3):184.

[10] 李海刚, 袁中文, 关世侠, 等. 酮洛芬微丸缓释片的制备及体外释放度考察[J]. 中国医院药学杂志, 2011,

31(20):1710.

[11] 王若兰, 侣丽莎, 李成文, 等. 山药咀嚼片的研制[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5):101.

[12] 赖志勇, 夏有杰, 肖维强, 等. RP-HPLC 法测定青果鲜果肉中的没食子酸含量[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2009, 22(1):17.

[13] 谢晓艳, 刘洪涛, 张吉, 等. 没食子酸体外抗氧化作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3):319.

[责任编辑 全燕]

ratio of solid-liquid, ethanol concentration, extraction temperature and time on extraction technology were investigated by orthogonal test. **Result:** The best extraction process of gallic acid was as following: extracted 2 times with 30 times the amount of 70% ethanol at 90 °C, 4 hours per time. Average transfer rate of gallic acid was 7.888 mg·g<sup>-1</sup> (RSD 1.60%). **Conclusion:** This optimized extraction process was stable and feasible, it could provide experimental basis for development and utilization of *A. australis* from Guizhou.

[**Key words**] *Acalypha australis*; HPLC; gallic acid; orthogonal test; extraction process; single factor test

铁苋菜主要含黄酮、生物碱、鞣质等化学成分,具有清热利湿、收敛止血的功能<sup>[1]</sup>,在贵州黔南苗族聚集区被广泛应用,是药食同源品种,苗药称为“海蚌含珠”<sup>[2]</sup>。没食子酸作为可水解鞣质的结构单元,是铁苋菜中重要的活性成分之一,具有抗菌消炎、止泻、止血和平喘等药理作用<sup>[3-4]</sup>。本实验以黔产铁苋菜为原料药,没食子酸转移率为评价指标,通过单因素试验和正交试验优选铁苋菜中没食子酸的提取方法和工艺,为进一步开发利用黔产铁苋菜和完善铁苋菜的质量控制标准提供理论依据。

## 1 材料

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),G80F20CN-B8 型微波炉(格兰仕集团),SG-4050C 型数显恒温水浴锅(上海硕光),DHG-9240A 型真空干燥箱(上海金山),2.0R 型低速离心机(德国 Heraeus 公司),AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)。没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110831-200803),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。铁苋菜药材采于本校植物园,经贵阳中医学院李江教授鉴定为大戟科植物铁苋菜 *Acalypha australis* L. 的干燥全草,样本留存于本校中药标本室。

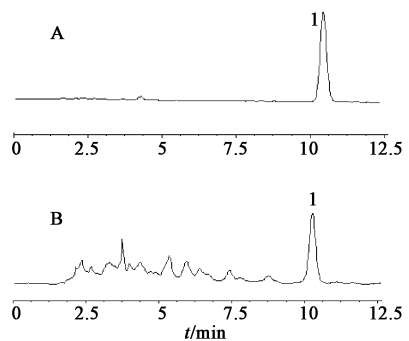
## 2 方法与结果

### 2.1 没食子酸的含量测定<sup>[5]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸(4:96),检测波长 270 nm,柱温室温,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。理论塔板数按没食子酸峰计算不低于 6 000,见图 1。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密称取过 3 号筛干燥至恒重的铁苋菜粉末 1.0 g,加对应溶剂按相关工艺进行提取,提取液过滤后定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,即得,冷藏备用。

**2.1.3 对照品储备液的制备** 精密称取没食子酸对照品 22.5 mg,用流动相定容至 100 mL 量瓶中,摇匀,即得。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 没食子酸

图 1 黔产铁苋菜 HPLC

**2.1.4 标准曲线的制备** 精密移取对照品储备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,得对照品溶液。精密移取不同体积对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 1.557 \times 10^6 X + 208.631$  ( $r = 0.9999$ ),表明没食子酸进样量在 0.0225 ~ 0.225 μg 与峰面积呈良好线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 取对照品溶液,连续进样 5 次,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果没食子酸峰面积的 RSD 1.43%,表明该仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 精密量取对照品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进样,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果没食子酸峰面积在 8 h 内的 RSD 0.76%,说明没食子酸对照品溶液在 8 h 内稳定。

**2.1.7 重复性试验** 精密移取同一供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果没食子酸峰面积的 RSD 2.13%,表明该方法重复性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 取已知没食子酸含量的铁苋菜粉末,加入适量没食子酸对照品,按 2.1.2 项下方法制备样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果平均回收率 98.83%,RSD 2.46%。

**2.2 没食子酸提取方法考察** 在预试验基础上,选取水、甲醇、70%乙醇为提取溶媒,溶剂用量 50 倍,分别采用回流、超声、微波法提取 30 min,按 2.1.2

项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,结果水按不同方法提取时没食子酸转移率( $n=3$ )分别为 2.315,1.451,1.143  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,甲醇提取时则分别为 1.544,1.287,0.916  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,70%乙醇提取时没食子酸转移率依次为 3.267,2.564,1.753  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,故采用回流法提取没食子酸,选择乙醇为提取溶媒。

**2.3 提取工艺优选** 在预试验基础上,固定提取数为 2 次,选取液固比、乙醇体积分数、提取温度、提取时间为考察因素,各因素取 3 个水平,称取 9 份黔产铁苋菜样品,按  $L_9(3^4)$  正交设计表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,采用 SPSS 13.0 统计软件对结果进行处理,方差分析见表 3,以直观分析和方差分析判断各因素对没食子酸提取的影响程度,筛选最佳提取工艺。

表 1 黔产铁苋菜中没食子酸提取工艺正交试验因素水平

水平	A 液固比	B 乙醇体积分数 /%	C 提取温度 /°C	D 提取时间 /h
1	30:1	60	80	2
2	40:1	70	90	3
3	50:1	80	100	4

表 2 黔产铁苋菜中没食子酸提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	没食子酸转移率 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	4.337 1
2	1	2	2	2	7.540 8
3	1	3	3	3	7.376 1
4	2	1	2	3	7.013 5
5	2	2	3	1	5.670 5
6	2	3	1	2	6.831 2
7	3	1	3	2	5.864 0
8	3	2	1	3	7.503 1
9	3	3	2	1	5.833 2
$K_1$	19.254 0	17.214 6	18.671 4	15.840 8	
$K_2$	19.515 2	20.714 4	20.387 5	20.236 0	
$K_3$	19.200 3	20.040 5	18.910 6	21.892 7	
R	0.315	3.450	1.716	6.052	

由直观分析可知,影响没食子酸提取工艺的因素顺序为  $D > B > C > A$ 。以极值最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果 D, B 因素对没食子酸提取工艺的影响极显著,确定最优提取工艺为  $A_1B_2C_2D_3$ ,即加 30 倍量 70% 乙醇于 90 °C 提取 2 次,每次 4 h。称取黔产铁苋菜样品 5 份,按优选的

表 3 没食子酸提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	0.018 9	2	0.009 5		
B	2.298 7	2	1.149 4	120.989 5	<0.01
C	0.575 9	2	0.288 0	30.315 8	<0.05
D	6.520 8	2	3.260 4	343.200 0	<0.01

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

提取工艺进行验证试验,结果没食子酸平均转移率 7.888  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (RSD 1.60%)。

### 3 讨论

没食子酸可溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂,故选择回流、超声、微波 3 种方法于不同溶媒条件下进行提取,比较没食子酸转移率,筛选最佳提取方法及其工艺,该设计方案较为全面地考察了影响没食子酸提取的各种因素,避免了采用单一溶媒考察不同提取方法研究的局限性。关于流动相的选择,预试验曾参考相关文献<sup>[5-8]</sup>,对各种溶剂系统进行比较,结果表明采用本文流动相时分离效果好、峰形漂亮、保留时间适宜,且较好地消除了各种干扰峰的影响。

### [参考文献]

- [1] 卫生部国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部颁布药品标准. 中药材. 第 1 册[S]. 北京: 卫生部药典委员会出版社, 1992: 71.
- [2] 邱德文, 杜江. 中华本草. 苗药卷[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005: 456.
- [3] Kimura Y, Okuda H, Okuda T, et al. Studies on the activities to tannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorph on nuclear leukocytes[J]. J Nat Prod, 1987, 50(3): 392.
- [4] 陈友香. 铁苋菜治疗小儿腹泻 85 例报告[J]. 中草药, 1998, 29(11): 761.
- [5] 何依玲, 李晓誉. 高效液相色谱法测定铁苋菜中没食子酸含量[J]. 中国药业, 2007, 16(11): 18.
- [6] 于波涛, 吴雪钗, 廖钦. 正交试验法研究赶黄草中没食子酸的提取工艺[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(6): 580.
- [7] 周涛, 艾强, 王彦君, 等. 基于不同地理种源花蓼中没食子酸的含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 49.
- [8] 秦冬梅, 胡利萍, 张跃新. HPLC 同时测定没食子酸中没食子酸与没食子酸甲酯的含量[J]. 中成药, 2011, 33(2): 353.

[责任编辑 全燕]