

内部沸腾法提取叶下珠没食子酸

蓝峻峰^{1*}, 刘琨²

(1. 柳州师范高等专科学校化学与生命科学系, 广西 柳州 545004;
2. 广西大学化学化工学院, 南宁 530004)

[摘要] 目的: 优选内部沸腾法提取叶下珠没食子酸工艺条件。方法: 用少量乙醇溶液为解吸剂润湿叶下珠粉末, 使没食子酸充分解吸, 加一定量热提取剂, 使渗透到叶下珠组织内部的乙醇沸腾, 强化提取过程。选取乙醇体积分数、解吸时间、乙醇用量、提取时间和提取温度等 5 个因素, 4 水平进行正交试验, 采用高效液相色谱法测定没食子酸含量。结果: 内部沸腾法提取叶下珠没食子酸的最佳工艺条件为 1.6 倍量 60% 乙醇解吸 30 min, 80 °C 提取 15 min。结论: 在最佳提取工艺条件下, 叶下珠没食子酸提取得率可达 0.970%, 该法有较好的应用前景。

[关键词] 叶下珠; 内部沸腾; 提取工艺; 没食子酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0063-03

Extraction of Gallic Acid from *Phyllanthus urinaria* by Inner Ebullition Method

LAN Jun-feng^{1*}, LIU Kun²

(1. Department of Chemistry and Life Science, Liuzhou Teachers College, Liuzhou 545004, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of gallic acid from *Phyllanthus urinaria* by inner ebullition method. **Method:** With a small amount of ethanol as wetting agent to soak power of *P. urinaria*, gallic acid was resolved fully, added a certain amount of heat extraction agent to make ethanol boiling which penetrated into internal organization of *P. Urinaria*, enhanced extraction technology. Orthogonal test was used with the concentration of ethanol, resolution time, the amount of ethanol, extraction time and extraction temperature as factors, the content of gallic acid was determined by HPLC. **Result:** Optimized extraction technology of gallic acid from *P. urinaria* by inner ebullition method was as follows: resolved 30 min with 1.6 times the amount of 60% ethanol, extracted 15 min at 80 °C. **Conclusion:** Under this optimized technology conditions, yield of gallic acid was 0.970%, and it had good application prospect.

[Key words] *Phyllanthus urinaria*; inner ebullition; extraction process; gallic acid

[收稿日期] 20111128(011)

[通讯作者] * 蓝峻峰, 硕士, 副教授, 从事天然产物化学及分析化学研究, Tel: 0772-2726500, E-mail: lzszyf@163.com

- emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment[J]. Int J Pharm, 2001, 212(2): 233.
- [2] 王云红, 杨荣平, 汪圣华. 姜黄素自乳化制剂的设计、优化及质量评价[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1933.
- [3] 张彝, 邹婷, 王剑文. 青蒿素检测方法的研究近况[J]. 抗感染药学, 2008, 5(4): 201.
- [4] 余正文, 王伯初, 杨占南, 等. 青蒿素及其类似物提取及分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 199.
- [5] 元四辉. 不同产地栽培中青蒿素的含量测定[J]. 中药材, 2007, 30(10): 1257.
- [6] Kang B K, Lee J S, Chon S K, et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs[J]. Int J Pharm, 2004(274): 65.
- [责任编辑 全燕]

叶下珠是大戟科叶下珠属植物,其别名有夜合草、珍珠草、珠子草、阴阳草等,具有平肝清热、利水解毒等功效,用于治疗痢疾、甲肝、水肿及小儿疳积、痈肿等症^[1],现代医学研究已证实其具有明显的抗乙肝病毒、治疗乙型肝炎、防治肝损伤和杀伤人肝癌细胞等作用^[2]。有研究显示叶下珠中含有没食子酸^[3-4]等多酚类物质具有抗乙肝病毒的活性^[5],是一种很有开发前景的天然药用植物。目前,叶下珠的研究主要集中在其成分分析和药理作用研究,对如何高效提取其有效成分充分利用植物资源,还缺乏系统的研究。传统的提取方法还存在提取速度慢、时间长、能耗高、效率低等弊端。

本研究采用的内部沸腾法^[6]是用少量乙醇溶液作为解吸剂,把有效成分从叶下珠植物组织的吸附及包埋中释放出来,然后加入热水,促使解吸剂在物料内部发生沸腾,产生对流,使过程传质方式从分子扩散转变为对流扩散,使提取过程在很短时间内就能完成。

1 材料

SPD-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), T500 型电子天平(常熟双杰测试仪器厂), Finnpiptette 型移液枪[热电(上海)仪器有限公司], GZX-DH-400S 型电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

叶下珠购于南宁市中草药市场,经柳州师范高等专科学校覃逸明博士鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 全草。没食子酸对照品(纯度 >98%,批号 A0110,成都曼思特生物科技有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 对照品溶液的制备 准确称取没食子酸对照品 5 mg,30% 甲醇溶解,定容 50 mL 量瓶中,制成

100 mg·L⁻¹ 没食子酸对照品储备液。

2.2 色谱条件^[7] WYG-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-磷酸(8:92:0.05),检测波长 271 nm,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温常温。

2.3 标准曲线的绘制 精密吸取适量 2.1 项下没食子酸对照品溶液于 25 mL 量瓶中,30% 甲醇稀释,得 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg·L⁻¹ 系列对照品溶液,分别取 10 μL 注入液相色谱仪,按 2.2 项中色谱条件测定其峰面积,以进样没食子酸质量浓度为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4\,421.1X + 3\,783.2$ ($r = 0.999\,3$),没食子酸线性范围 5 ~ 50 mg·L⁻¹。

2.4 样品的制备及处理 将叶下珠全草经粉碎,过 60 目筛,准确称取叶下珠粉末各 10.00 g 置于 250 mL 烧杯中,加入乙醇溶液,浸泡解吸一定时间后,迅速加入热水,水浴中保持温度提取一定时间,趁热过滤,收集滤液,所得滤渣重复提取 1 次,合并 2 次提取滤液,减压浓缩,得粗浸膏。浸膏经真空低温(60 ℃)烘干至恒重,得叶下珠总提取物,称重,密封低温保存,待测。

2.5 没食子酸含量测定 准确称取叶下珠总提取物约 10 mg,30% 甲醇溶解,定容至 50 mL,进样 10 μL,测定没食子酸质量浓度,计算提取物中没食子酸含量及提取得率。

2.6 正交试验 以乙醇溶液为解吸剂,热水为提取溶剂,没食子酸提取得率为指标,按正交表 L₁₆(4⁵) 设计安排试验,选择乙醇体积分数、解吸时间、提取时间、乙醇用量和提取温度等为考察因素,每个因素选择 4 个水平,综合考察各因素对没食子酸提取得率的影响。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 内部沸腾法提取叶下珠没食子酸正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 解吸时间/min	C 提取时间/min	D 乙醇用量/g·mL ⁻¹	E 提取温度/℃
1	60	10	10	1:1.6	70
2	70	20	15	1:1.8	75
3	80	30	20	1:2.0	80
4	90	40	25	1:2.2	85

从表 2 结果可知,5 个因素对提取得率的影响次序为 E > B > A > C > D; 通过比较 K 值可知最佳工艺条件为 A₁B₃C₂D₃E₃,即用 2 倍量 60% 乙醇解吸 30 min,80 ℃ 提取 15 min。方差分析表明 B, E 对没食子酸得率影响显著, C, D 因素影响不显著。综合

考虑 K 值和生产成本因素,内部沸腾法提取叶下珠没食子酸的优选工艺确定为 A₁B₃C₂D₁E₃,即用 1.6 倍量 60% 乙醇解吸 30 min,80 ℃ 提取 15 min。

2.7 验证试验 称取一定量叶下珠,用正交试验结果的所得的最佳工艺条件,重复提取 3 次,所得提

表2 内部沸腾法提取叶下珠没食子酸正交试验安排

No.	A	B	C	D	E	没食子酸得率/%
1	1	1	1	1	1	0.782
2	1	2	2	2	2	0.902
3	1	3	3	3	3	0.962
4	1	4	4	4	4	0.886
5	2	1	2	3	4	0.824
6	2	2	1	4	3	0.862
7	2	3	4	1	2	0.861
8	2	4	3	2	1	0.746
9	3	1	3	4	2	0.813
10	3	2	4	3	1	0.807
11	3	3	1	2	4	0.880
12	3	4	2	1	3	0.859
13	4	1	4	2	3	0.828
14	4	2	3	1	4	0.875
15	4	3	2	4	1	0.854
16	4	4	1	3	2	0.827
K_1	0.883	0.812	0.838	0.844	0.797	
K_2	0.823	0.862	0.860	0.839	0.851	
K_3	0.840	0.889	0.849	0.855	0.878	
K_4	0.846	0.830	0.845	0.854	0.866	
R	0.060	0.077	0.022	0.016	0.081	

表3 没食子酸得率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.008	2	8.000	
B	0.014	2	14.000	<0.05
C	0.001	2	1.000	
D(误差)	0.001	2	1.000	
E	0.015	2	15.000	<0.05

注: $F_{0.05}(2,15) = 9.280$ 。

取物按2.5项下方法测定总提取物中没食子酸的含量,计算其提取得率。结果没食子酸平均得率0.97%(RSD 0.31%),说明该工艺条件下,内部沸腾法提取叶下珠没食子酸方法可靠、稳定。

3 讨论

用内部沸腾法提取叶下珠有效成分,植物组织先被少量低沸点解吸剂浸润,把叶下珠植物中的没食子酸从组织吸附和包埋细胞中释放出来,再加入温度高于或达到解吸剂沸点的热水为提取溶剂,使渗透到组织内部的解吸剂被加热至沸腾汽化,导致组织细胞破裂而更快地释放出更多的植物有效成分。采用该法提取叶下珠有效成分,乙醇等有机溶剂用量少,设备要求低,操作时间短,提取得率高,可有效降低生产成本。

[参考文献]

- [1] 中药大辞典.下册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:1496.
- [2] 蔡瑾,梁敬钰.叶下珠化学成分及药理作用研究概况[J].海峡药学,2003,15(1):1.
- [3] 张兰珍,王晓强,贾辉,等.高效液相色谱法测定叶下珠中没食子酸的含量[J].北京中医药大学学报,2000,23(6):46.
- [4] 张兰珍,郭亚健,涂光忠,等.叶下珠化学成分研究[J].中国中药杂志,2000,25(10):615.
- [5] 冀德富,郭东艳,裴妙荣,等.叶下珠的薄层鉴别及其多酚类成分的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(11):14.
- [6] 韦藤幼,赵钟兴,童张法.解析-内部沸腾两步法提取黄连小檗碱的工艺及机理[J].过程工程学报,2006,6(3):380.
- [7] 杨艳,周健,陈晓,等.圆果化香树中没食子酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):107.
- [8] 胥道宝,张转平.叶下珠中鞣质及没食子酸的含量测定[J].西北药学杂志,2008,23(1):31.

[责任编辑 仝燕]