

白花檵木中没食子酸和总酚提取工艺

谢月¹, 邵海华¹, 宋永贵^{1,2}, 刘岩庭¹, 张武岗^{1,2}, 冯育林^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的:建立白花檵木中没食子酸和总酚的最佳提取工艺。方法:以没食子酸和总酚含量为考察指标,筛选回流、渗漉、索氏、超声 4 种不同提取方法,正交试验优选溶媒、料液比、提取时间及提取次数 4 个工艺参数。结果:最佳提取工艺为采用回流提取法,8 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 2 h。结论:采用该方法提取没食子酸和总酚,具有提取效率高、稳定性好等特点,适应于工业生产。

[关键词] 白花檵木; 没食子酸; 总酚; 正交试验

[中图分类号] R283. 6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0009-04

Extraction Technology of Gallic Acid and Total Polyphenols from *Loropetalum chinense*

XIE Yue¹, SHAO Hai-hua¹, SONG Yong-gui^{1,2}, LIU Yan-ting²,
ZHANG Wu-gang^{1,2}, FENG Yu-lin^{1,2*}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China)

[Abstract] Objective: To establish optimal extraction technology of gallic acid and total polyphenols from *loropetalum chinense*. Method: With the content of gallic acid and total polyphenols as indexes, four different methods (refluxing extraction, leakage extraction, soxhlet extraction and ultrasonic extraction) were investigated, and orthogonal test was adopted to optimize extraction process parameters, including solvent, ratio of solid-liquid, extraction time and extraction times. Result: Refluxing extraction method was optimal extraction technology, optimum condition was as follow: 8 times the amount of 60% ethanol, extracted three times with 2 hours each time. Conclusion: This extraction process showed higher yield and good stability of gallic acid and total polyphenols, it was available for industrial production.

[Key words] *Loropetalum chinense*; gallic acid; total polyphenols; orthogonal experiment

檵木收载于 1977 年版《中国药典》,以根、叶、花入药^[1],具有清热解毒、收敛止血的功效,用于治疗消化道出血、产后恶露不净、紫癜、腹泻、创伤出血

等症^[1-2]。檵木分布广泛,在我国华东、华南、西南、等各省区都有丰富的资源。药理研究表明其具有止血、抑菌等活性,其中多酚类化合物为主要生物活性成分^[3-4],但白花檵木中没食子酸和总酚的提取工艺研究尚未有报道。本试验以没食子酸和总酚含量为考察指标,采用正交试验优选最佳提取工艺,为白花檵木的开发利用提供理论依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent), Milli-Q 型纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司), Shimadzu UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津), AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士

[收稿日期] 20111026(012)
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(2009BADC3B03)
[第一作者] 谢月,在读研究生,从事天然药物化学研究, Tel: 0791-87119632, E-mail: xieyue-618@hotmail. com
[通讯作者] * 冯育林, Tel: 0791-87119632, E-mail: fengyulin2003@hotmail. com; * 张武岗, Tel: 0791-87119650, E-mail: zwgchf98@yahoo. com. cn

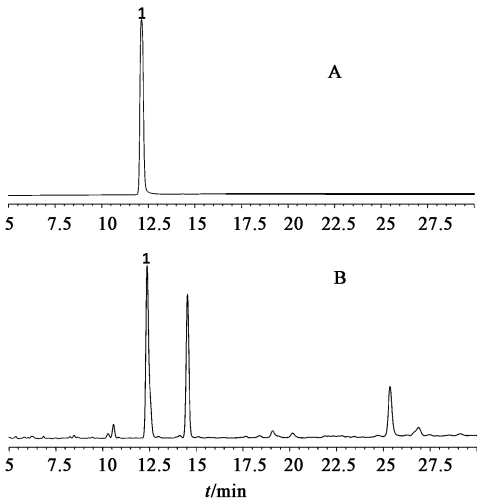
Mettler), 福林-酚试剂 (北京索莱科技有限公司), 无水碳酸钠 (上海实验试剂有限公司), 没食子酸对照品 (纯度为 98%, 批号 1222-080712, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室), 水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

白花檫木采自景德镇德宇集团, 经江西中医学院杨世林教授鉴定为金缕梅科白花檫木 *Loropetalum chinense* (R. Brown) Oliv. 的干燥茎枝叶。

2 方法与结果

2.1 没食子酸的含量测定^[5]

2.1.1 色谱条件 COSMOSIL C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 甲醇 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 线性梯度洗脱: 0 min ~ 10 min ~ 25 min ~ 40 min (2:98 ~ 10:90 ~ 20:80 ~ 25:75), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 272 nm, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 没食子酸

图 1 檫木 HPLC

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取没食子酸对照品 25.2 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 0.5 g·L⁻¹ 对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密量取白花檫木提取液 5 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 取 2.1.2 项下的没食子酸对照品溶液, 分别精密量取 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 进样, 依法测定, 记录峰面积, 以没食子酸的质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得没食子酸回归方程 $Y = 60.75X + 42.04$ ($r = 0.9994$), 没食子酸进样量在

5.04 ~ 100.8 μg 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液按 2.1.4 项下方法, 连续进样 5 次, RSD 1.05%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取白花檫木的供试品溶液, 按 2.1.4 项下方法, 于室温放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 后测定, RSD 1.27%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 加样回收试验 精密称定已知没食子酸含量的白花檫木药材粉末 6 份, 分别精密加入一定量的没食子酸对照品进行提取, 按 2.1.8 项下方法进行测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 没食子酸加样回收率试验

No.	样品质 量/g	样品含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.500 5	2.101	2.651	4.766	100.53	98.93	1.96
2	0.500 1	2.080	2.651	4.662	97.39		
3	0.501 2	2.205	2.200	4.428	101.04		
4	0.500 4	2.093	2.200	4.301	100.36		
5	0.500 9	2.150	1.762	3.849	96.42		
6	0.500 6	2.111	1.762	3.835	97.84		

2.1.8 样品测定 精密吸取上述对照品及供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以外标法计算没食子酸含量。

2.2 总酚的含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密量取 2.1.2 项下对照品溶液 5 mL 定容至 50 mL, 即得 0.1 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取白花檫木提取液 5 mL, 置 25 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 测定波长的选择 精密取白花檫木提取液和对照品溶液适量, 加入福林-酚试剂 2.5 mL, 静置 5 ~ 7 min, 分别加入 10% Na₂CO₃ 溶液 5 mL, 混匀后蒸馏水定容至 25 mL, 50 ℃ 水浴加热 5 min, 放置 2 h, 在 300 ~ 900 nm 对供试品溶液和对照品溶液扫描, 供试品和对照品均在 775 nm 处有最大吸收, 故确定 775 nm 为测定波长。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 2.2.1 项下没食子酸对照品溶液 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0 mL, 加入福林-酚试剂 2.5 mL, 静置 5 ~ 7 min, 分别加入 10% Na₂CO₃ 溶液 5 mL, 混匀后蒸馏水定容至 25 mL, 50 ℃ 水浴加热 5 min, 放置 2 h, 于 775

nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,对照品量(X)为横坐标,得回归方程 $A = 0.476\ 3X + 0.013\ 7$ ($r = 0.999\ 5$),没食子酸在 $0.5 \sim 2.0\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液,按 **2.2.4** 项下方法测定吸光度,重复测定 6 次。结果 RSD 0.12%。

2.2.6 重复性试验 取白花檵木的供试品溶液,按 **2.2.4** 项下方法,于室温放置 0,2,4,8,12,24 h 后测定,计算 RSD 2.01%,结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密称定已知总酚含量的白花檵木药材粉末 6 份,分别精密加入一定量的没食子酸对照品进行提取,按 **2.2.4** 项下方法显色进行测定,计算没食子酸的回收率。结果见表 2。

表 2 总酚含量测定加样回收率试验

No.	样品质 量/g	样品含 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.501 1	15.517	18.297	33.828	100.08	99.37	1.43
2	0.500 7	15.510	18.297	33.825	100.10		
3	0.500 6	15.511	15.523	30.555	96.91		
4	0.501 3	15.521	15.523	31.081	100.24		
5	0.500 0	15.505	12.213	27.521	98.38		
6	0.501 5	15.525	12.213	27.805	100.54		

2.2.8 样品测定 精密吸取供试品溶液 1 mL 置 25 mL 量瓶中,按 **2.2.4** 项下方法测定吸光度,计算总酚质量浓度,由此计算出总酚含量。

2.3 提取方法的考察

2.3.1 回流提取 取白花檵木药材,粉碎后过 3 号筛,称取粉末 20 g,加 10 倍量 60% 乙醇,回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,浓缩成稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

2.3.2 渗漉提取 取白花檵木药材,粉碎后过 3 号筛,称取粉末 20 g,10 倍量 60% 乙醇装筒浸渍 48 h,加 20 倍量 60% 乙醇,以 $2\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度渗漉 50 h,收集渗漉液,浓缩成浸膏稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

2.3.3 索氏提取 取白花檵木药材,粉碎后过 3 号筛,称取粉末 20 g,加 10 倍量 60% 乙醇,索氏提取 2 ~ 3 h,提取 2 次,合并提取液,浓缩成浸膏稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

2.3.4 超声提取 取白花檵木药材,粉碎后过 3 号筛,称取粉末 20 g,加 10 倍量 60% 乙醇,超声提取 3

次,每次 30 min,合并提取液,浓缩成浸膏稠膏,加适量甲醇溶解,摇匀,备用。

将上述 4 个样品采用 HPLC 测定没食子酸质量分数分别为 0.407% , 0.224% , 0.299% , 0.432% , 采用紫外分光光度法测定总酚质量分数分别为 4.119% , 3.275% , 3.590% , 4.457% 。由结果可知,以乙醇超声法所得指标成分含量最高,且耗时最短,其次是 60% 乙醇回流提取,乙醇渗漉法最低,但超声法因受设备和工艺条件限制,迄今在国内尚未得到工业化推广,只适合实验室研究。回流提取效果在上述比较中仅次于超声法,且所用设备也较简单,易推广于工业生产,因此,综合考虑成本、耗时、稳定性等各方面因素,选用乙醇回流法作为提取方法。

2.3.5 提取条件优化^[6] 通过预实验考察,确定对提取时间(A)、料液比(B)、乙醇体积分数(C)及提取次数(D)4 个因素进行考察,每个因素选择 3 个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。取白花檵木药材,粉碎过 3 号筛,称取粉末 20 g,共 9 份。以白花檵木中没食子酸和总酚提取率为考察指标,因素水平安排见表 3,4,方差分析见表 5。

表 3 白花檵木回流提取工艺因素水平

水平	A 提取时间 /h	B 料液比	C 乙醇体积 分数/%	D 提取次数 /次
1	1	1: 8	50	1
2	1.5	1: 10	60	2
3	2	1: 12	70	3

表 4 白花檵木回流提取工艺 $L_9(3^4)$ 试验安排

No.	A	B	C	D	没食子酸 /%	总酚 /%
1	1	1	1	1	0.195	3.198
2	1	2	2	2	0.329	3.593
3	1	3	3	3	0.346	4.173
4	2	1	2	3	0.430	4.659
5	2	2	3	1	0.209	2.301
6	2	3	1	2	0.355	3.711
7	3	1	3	2	0.387	3.747
8	3	2	1	3	0.436	6.056
9	3	3	2	1	0.333	3.939
没食子酸	K_1	0.290	0.337	0.329	0.246	
	K_2	0.331	0.324	0.364	0.357	
	K_3	0.385	0.345	0.314	0.404	
	R	0.095	0.021	0.050	0.158	
总酚	K_1	3.655	3.868	4.321	3.146	
	K_2	3.557	3.983	4.063	3.683	
	K_3	4.580	3.941	3.407	4.963	
	R	1.023	0.115	0.914	1.817	

表 5 白花檵木回流提取工艺方差分析

考察指标	方差来源	SS	f	MS	F	P
没食子酸	A	0. 014	2	0. 007	20. 983	<0. 05
	B(误差)	0. 001	2	0. 010		
	C	0. 004	2	0. 020	6. 119	>0. 05
	D	0. 040	2	0. 002	61. 329	<0. 05
总酚	A	5. 226	2	2. 613	255. 964	<0. 05
	B(误差)	0. 020	2	0. 010		
	C	1. 333	2	0. 667	65. 298	<0. 05
	D	1. 914	2	0. 957	93. 749	<0. 01

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

由表 4,5 可得出影响没食子酸和总酚含量的因素作用主次均为 $D>A>C>B$,即提取次数>提取时间>乙醇体积分数>料液比。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,A,D 对没食子酸含量有显著性影响;A,C,D 对总酚含量有显著性影响。结合生产实际,综合考虑生产成本、没食子酸和总酚提取效率,确定最佳提取工艺为 $A_3B_1C_2D_3$,即加 8 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 2 h。

2.3.6 工艺验证试验 取白花檵木药材,粉碎后过 3 号筛,称取粉末 20 g,按优选工艺重复实验 5 次,结果没食子酸和总酚平均质量分数分别为 0.553%,6.941%。试验结果表明本工艺重复性好,合理可行。

3 讨论

白花檵木中没食子酸含量的测定采用高效液相法,总酚含量的测定采紫外分光光度法,经方法学考察表明,2 种方法线性好,精密度高,重复性及回收率均较好,测得结果准确。

试验所用药材均为白花檵木带叶的茎枝,而在优选提取工艺验证试验中药材叶子稍多,所以测得没食子酸和总酚含量比正交试验中的结果要高。且经验证试验结果确认该提取工艺条件重复性较好,可作为白花檵木生产的参考工艺,为其进一步开发研究提供一定的试验资料。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].1977:528.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草.第3册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:750.
[3] 游璐茜.檵木叶中化学成分的提取分离及初步研究[D].厦门:厦门大学,2009.
[4] 卢成英,徐东翔,杜勇,等.檵木叶抑菌活性成分提取分离与检测[J].中成药,2006,28(1):132.
[5] 丁家欣,张秋海,李淑莉,等.HPLC 测定虎耳草中没食子酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):19.
[6] 贺石麟,牛景霞,倪艳.淫羊藿中淫羊藿苷和总黄酮的闪式提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):38.

[责任编辑 仝燕]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www. syfxzz. com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约。