

# 酶法提取叶下珠中多酚的研究

杨再雍<sup>1</sup>, 刘 琨<sup>2\*</sup>

(1 百色学院 化学与生命科学系, 广西 百色 533000; 2 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 533004)

**摘要:**目的 为充分利用大戟科叶下珠资源, 优选叶下珠有效成分总多酚的提取工艺。方法 以总多酚含量考察为指标, 使用酶法进行提取, 采用正交设计法对工艺条件进行优化, 普鲁士蓝法进行总多酚含量测定。结果 总多酚最佳提取工艺: 时间为 2 h、温度为 60 ℃、加酶量为 1.5%、pH 5.5、液料比为 50, 总多酚提取率 97.4%。结论 方法简单可行, 优于传统的溶剂提取法, 可作为叶下珠总多酚的提取工艺。

**关键词:** 叶下珠; 总多酚; 酶法提取

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2010)10-1651-03

叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 为大戟科柚柑属植物, 是我国广西、福建等地特有的野生植物资源。叶下珠中所含的没食子酸、短叶苏木酚酸和鞣云实精等多酚<sup>[1-3]</sup> 类化合物是其主要的药用成分, 具有较强的抗乙肝病毒和保肝作用<sup>[4-6]</sup>。2002年8月, 广西医科大学完成了“抗乙肝表面抗原中草药的筛选”工作, 对200种中药进行体外、体内实验研究证实只有叶下珠对乙肝表面抗原有效<sup>[7]</sup>。目前叶下珠有效成分提取多采用传统溶剂提取法<sup>[8]</sup>。本研究以纤维素酶辅助提取叶下珠的有效成分, 旨在探索一种更有效地从叶下珠中提取出其多酚类物质的方法。

## 1 仪器与材料

UV-1201 紫外分光光度计(北京瑞利仪器有限公司)。叶下珠由南宁元桂中药饮片有限责任公司提供, 经广西药用植物研究所吕慧珍副研究员鉴定为大戟科柚柑属植物叶下珠 *P. urinaria* L. 干品; 纤维素酶由上海源聚生物科技有限公司提供, 活力 750 U/mg; 其他试剂和药品均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 叶下珠总多酚的普鲁士蓝法测定<sup>[2]</sup>

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取没食子酸标准品 25 mg 于 50 mL 容量瓶中, 用 30% 甲醇水溶液溶解并加至刻度, 得到 0.5 mg/mL 对照品溶液。精密吸取该溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 再加入 30% 甲醇水至刻度, 配成 50 μg/mL 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备: 取叶下珠提取物 0.1 g, 精密称量, 加入 40 mL 30% 甲醇水溶液, 置水浴中煮沸浸提 15 min 后, 趁热抽滤, 冷却后定容至 100 mL。

2.1.3 标准曲线的制作: 分别精密吸取上述对照品

溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于 25 mL 容量瓶中, 依次加入 0.100 mol/L 三氯化铁溶液 0.5 mL、0.008 mol/L 铁氰化钾溶液 0.5 mL 和 0.10 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL, 定容, 得到不同浓度的对照品溶液。同时在 25 mL 量瓶中加入 0.100 mol/L 三氯化铁溶液 0.5 mL、0.008 mol/L 铁氰化钾溶液 0.5 mL 和 0.10 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL, 定容后得到空白溶液。随行空白, 在 700 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度为纵坐标, 吸光度为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程  $C = 2.1061A - 0.0612$ ,  $r = 0.9992$ , 结果没食子酸在 0.4~2.0 μg/mL 时, 质量浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.4 测定: 称取干燥(过 40 目)叶下珠 5.0 g, 按正交表所列条件, 进行酶法提取。减压抽滤并用正丁醇萃取、蒸干, 用 30% 甲醇定容于 25 mL 量瓶中, 量取 5 mL 样品, 测定吸光度, 计算提取率(提取率=溶出成分质量/干料质量×100%)。

### 2.2 单因素试验

2.2.1 时间对总多酚提取率的影响: 在液料比为 40:1 (叶下珠与水的质量比), 加酶量为叶下珠质量的 2%、pH 4.5、提取温度为 50 ℃条件下, 每隔半小时提取 1 次, 测定提取液中总多酚的量, 做出时间与提取率的关系曲线, 结果见图 1。可知随着提取时间的增加, 总多酚的量逐渐增加, 但在 2.5 h 后, 量基本不变。选择 30~60 min 为提取时间。

2.2.2 温度对总多酚提取率的影响: 在液料比为 40:1、加酶量为叶下珠质量的 2%、pH 4.5、提取时间为 2.5 h, 考察温度对提取率的影响, 测定提取液中总多酚的量, 结果见图 2。可知提取温度在 30~

①收稿日期: 2009-12-12

作者简介: 杨再雍(1980-), 男, 广西百色人, 讲师, 2007 年获得广西大学化学化工学院工学硕士学位, 从事药用植物的教学、科研工作。

Tel: (0776)2848132 E-mail: byroir2006@163.com

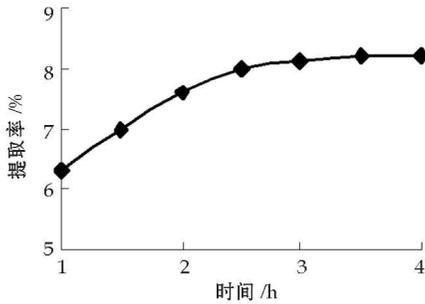


图 1 时间对多酚提取率的影响

Fig 1 Effect of time on total polyphenols yield

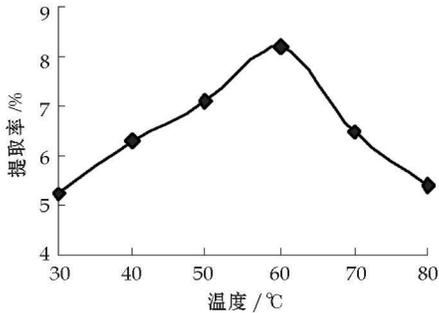


图 2 温度对多酚提取率的影响

Fig 2 Effect of temperature on total polyphenols yield

60 °C, 总多酚量逐渐增加并达到最大值, 但在 60 °C 以后总多酚含量急剧下降。选择 30~ 60 °C 为提取温度。

2.2.3 加酶量对总多酚提取率的影响: 在液料比为 40: 1, pH 为 4.5, 提取时间为 2.5 h, 温度为 60 °C 条件下, 考察加酶量对提取率的影响, 并做出加酶量与提取率的关系曲线, 结果见图 3。可知当加酶量在 0.5~ 2% 时, 总多酚含量逐渐增加, 而加酶量达 2% 以后, 总多酚量趋势平缓。选 0.5~ 2% 为加酶量。

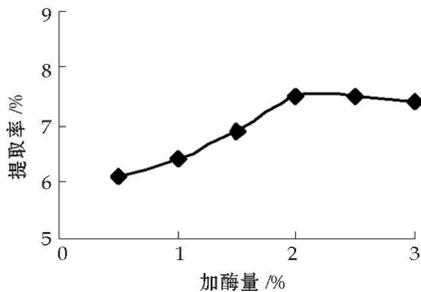


图 3 加酶量对多酚提取率的影响

Fig 3 Effect of cellulase amount on total polyphenols yield

2.2.4 pH 值对总多酚提取率的影响: 在液料比为 40: 1, 加酶量为 2%, 提取时间为 2.5 h, 温度为 60 °C 条件下, 考察溶液 pH 值的影响, 从图 4 可知 pH 值从 3.5 升至 5.5 时, 总多酚量增加并达最大, 然后下降。选择 pH 值 4.0~ 5.5 进行总多酚的提取。

2.2.5 料液比对总多酚提取率的影响: 在液料比为

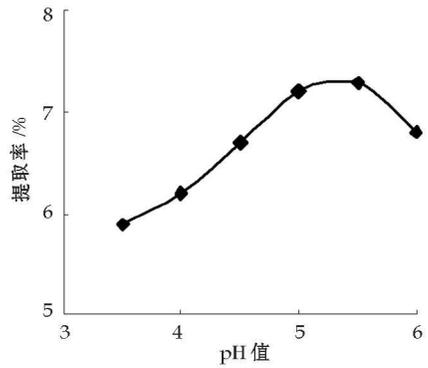


图 4 pH 值对多酚提取率的影响

Fig 4 Effect of pH value on total polyphenols yield

40: 1, 加酶量为 2%, 提取时间为 2.5 h, 温度为 60 °C, pH 值为 5.5 条件下, 探讨料液比对提取率的影响, 结果见图 5。可知料液比在 50: 1 时总多酚量达最大。故选择 20~ 50 倍料液比为适宜料液比。

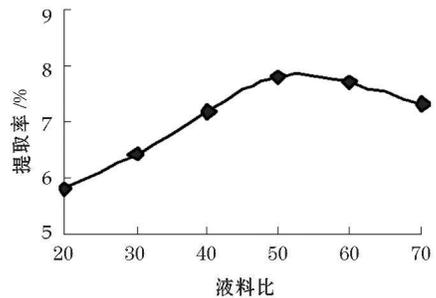


图 5 液料比对多酚提取率的影响

Fig 5 Effect of liquid/ solid on total polyphenols yield

2.3 正交试验: 在上述单因素试验的基础上, 再考察各因素之间的相互影响, 选用 5 个因素 4 个水平进行  $L_{16}(4^5)$  正交试验, 以进一步确定适宜的提取条件。选取因素水平见表 1, 实验结果及分析见表 2。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素				
	A 温度 / °C	B pH 值	C 料液比	D 加酶量 / %	E 时间 / h
1	30	4.0	1: 20	0.5	2.5
2	40	4.5	1: 30	1.0	1.0
3	50	5.0	1: 40	1.5	1.5
4	60	5.5	1: 50	2.0	2.0

根据极差分析结果, 确定影响因素的主次为:  $A > C > D > B > E$ 。最佳组合为  $A_4 B_3 C_4 D_{3E} 4$ , 即最佳提取工艺条件为: 提取温度为 60 °C、时间为 2 h、pH 值为 5.5、加酶量为 1.5%、料液比为 50, 结果与单因素的基本一致, 最佳提取率为 9.742%。

2.4 验证试验: 根据正交试验优选结果对酶解工艺进行 3 次重复试验, 同时在不加酶的条件下按优选的正交试验条件提取工艺进行 3 次试验, 结果见表 3。

表2 正交试验结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E	提取率/%
1	1	1	1	1	1	5.371
2	1	2	2	2	2	5.914
3	1	3	3	3	3	7.574
4	1	4	4	4	4	7.909
5	2	1	2	4	3	6.694
6	2	2	1	3	4	6.242
7	2	3	4	2	1	7.130
8	2	4	3	1	2	6.639
9	3	1	3	2	4	7.964
10	3	2	4	1	3	7.357
11	3	3	1	4	2	7.553
12	3	4	2	3	1	8.525
13	4	1	4	3	2	9.597
14	4	2	3	4	1	9.418
15	4	3	2	1	4	9.742
16	4	4	1	2	3	8.268
k <sub>1</sub>	26.768	29.626	27.434	29.372	30.444	
k <sub>2</sub>	26.705	28.931	31.138	29.276	29.703	
k <sub>3</sub>	31.399	32.262	31.595	31.938	29.893	
k <sub>4</sub>	37.288	31.341	31.993	31.574	31.854	
R	10.520	2.636	4.559	2.662	2.151	

可见,两种工艺重现性良好,但是加酶工艺比不加酶提取率高63.5%。

### 3 讨论

本实验探索利用紫外光谱分析叶下珠有效成分方法,实验结果表明,使用普鲁士蓝法测定叶下珠多酚数据溶液体系均一,工作曲线线性良好。用纤维

表3 验证试验

Table 3 Test of verification

加酶组	提取率/%	未加酶组	提取率/%
1	9.746	1	5.959
2	9.739	2	5.953
3	9.750	3	5.965

素酶解可以较温和地破坏植物β-D-葡萄糖键,将细胞壁破坏,使植物组织得以分解,加速有效成分的释放,从而提高得率。通过验证试验发现,酶法提取可以提高提取率63.5%。酶法提取,不使用有机溶剂,对环境友好,易于实现绿色工业化生产。

#### 参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005  
 [2] 王碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京:科学出版社, 2001  
 [3] Syamasundar K V, Singh B, Thakur R, et al. Antihepatotoxic principles of *Phyllanthus niruri* [J]. *J Ethno Pharmacol*, 1995, 14(1): 19  
 [4] 蔡瑾,梁敬珏. 叶下珠化学成分及药理作用研究概况. [J]. 海峡药学, 2003, 15(1): F3  
 [5] Shin M S, Kang E H, Lee Y I. Aflavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes [J]. *Antiviral Res*, 2005, 67(8): 163-168  
 [6] 谢志春,陈智平,苏洁寒,等. 抗乙肝表面抗原中草药的筛选体外及小鼠动物试验[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(4): 534  
 [7] 仲英,左春旭,李凤琴,等. 叶下珠化学成分及其抗乙肝病毒活性研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(6): 363  
 [8] 姜计划,孙琦,高秀英. 叶下珠提取工艺探讨[J]. 中成药, 1999, 21(增刊): 56

## HPLC法测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素

解军波<sup>1,2</sup>, 刘艳<sup>3</sup>, 张彦青<sup>1,2</sup>, 张明春<sup>1,2</sup>, 张美<sup>2</sup>, 郑菲<sup>2\*</sup>

(1 天津市食品生物技术重点实验室,天津 300134; 2 天津商业大学 制药工程系,天津 300134;

3 潍坊市人民医院,山东 潍坊 261216)

**摘要:**目的 建立酸枣仁黄酮剂中斯皮诺素的测定方法。方法 ODS C<sub>18</sub>柱(150 mm×3.9 μm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(0.1%醋酸), 梯度洗脱; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 25℃; 进样量: 20 μL, 检测波长: 335 nm。结果 斯皮诺素在4~20 μg/mL 呈良好的线性关系, 平均加样回收率为97.98%, RSD为2.58%。结论 该方法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于测定酸枣仁黄酮片中斯皮诺素。

**关键词:** 酸枣仁黄酮片; 斯皮诺素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1653-03

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥种子, 宁心安神、益阴敛汗, 为镇静安神的传统

药物之一<sup>[1]</sup>。黄酮类化合物是酸枣仁功效表现的主要部位之一, 历来受到较多重视。酸枣仁总黄酮提取物具有镇静安眠作用<sup>[2]</sup>。为进一步开发我国丰富

①收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 国家星火计划项目(2010GA610023); 天津市星火计划项目(09ZXHN05600)

作者简介: 解军波(1975-), 男, 山东省潍坊市人, 中药学博士, 从事中药资源开发与质量评价研究。E-mail: junboxie@yahoo.com.cn