

# 多指标正交试验法优选余甘子总酚提取工艺\*

亓 旗,崔雅萍,梁文仪,李 师,梁林金,叶 婷,吴玲芳,张兰珍\*\*

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

**摘 要:**目的:优选余甘子总酚提取工艺,为其工业化生产提供数据参考。方法:以总酚、诃黎勒酸、没食子酸和粘酸-2-O-没食子酸酯提取量为综合评价指标,采用正交试验设计优选提取溶剂、溶剂用量、提取次数、提取时间等并进行验证,确定最佳提取工艺。结果:余甘子总酚提取工艺为10倍量70%乙醇提取3次,每次90 min。结论:本文优化获得的余甘子总酚提取工艺稳定可靠,简便易行,为余甘子产业化研究提供依据。

**关键词:**余甘子 总酚 诃黎勒酸 没食子酸 粘酸-2-O-没食子酸酯 提取工艺

doi:10.11842/wst.2017.09.024 中图分类号:R284 文献标识码:A

余甘子为大戟科叶下珠属植物余甘子(*Phyllanthus emblica*. L)的干燥成熟果实,又名滇橄榄、油甘子、庵摩勒、喉甘子等<sup>[1]</sup>。主产于印度、中国、缅甸、马来西亚、巴基斯坦等地,我国广东、云南、江西、广西、福建、贵州、海南等省区都有野生余甘子林分布。余甘子主要含有鞣质、酚酸、粘酸、苯丙素、黄酮和三萜等化学成分<sup>[2-4]</sup>。药理作用显示余甘子具有抗氧化、抗病原微生物、抗肿瘤、保肝、抗炎等多种功效<sup>[5]</sup>。临床上常用于治疗血热血瘀、消化不良、腹胀、咳嗽、喉痛、口干等症<sup>[6]</sup>。

余甘子多酚是其抗氧化的主要成分<sup>[7]</sup>,目前报道的余甘子多酚提取工艺都以多酚含量为指标<sup>[8,9]</sup>。本研究以总酚中3个主要成分诃黎勒酸(可水解鞣质)、没食子酸(酚酸)、粘酸-2-O-没食子酸酯(粘酸)为指标,正交设计法优选余甘子总酚提取工艺,并建立HPLC法测定余甘子总酚提取物中3个成分含量,为余甘子总酚提取工艺和质量控制提供依据。

## 1 实验材料

### 1.1 仪器

紫外-可见分光光度计:UV 2000(尤尼科公司); Waters 2468型高效液相色谱仪;PAD检测器;Breeze软件;25 μL可调进样器;十万分之一电子分析天平;Sartorius BT 25S型(北京赛多利斯仪器有限公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司):KQ-500DE(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

余甘子药材购自西藏,产地尼泊尔,由北京中医药大学阎玉凝教授鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子*Phyllanthus emblica* L.的干燥果实。诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯对照品均为自制,经UV、MS、<sup>1</sup>HNMR、<sup>13</sup>CNMR鉴定结构,HPLC检测,峰面积归一化法测定纯度大于98.5%,符合定量要求。

甲醇(Sigma-aldrich公司,色谱纯);屈臣氏纯净水;其他试剂均为分析纯。

收稿日期:2017-06-11

修回日期:2017-09-20

\* 国家自然科学基金面上项目(81274187):基于藏药余甘子酚酸类成分体内动态变化的抗癌药效物质与质量控制研究,负责人:张兰珍。

\*\* 通讯作者:张兰珍,本刊编委,研究员,博士生导师,主要研究方向:中药药效物质基础与质量控制研究。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 含量测定方法

#### 2.1.1 对照品溶液制备

分别精密称取诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯对照品 1.82 mg、4.51 mg、2.42 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯对照品溶液。

#### 2.1.2 供试品溶液制备

精密称取余甘子总酚提取物约 5 mg 于锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称重, 100 MHz 超声 30 min, 冷却后, 补足原重量, 滤过。

#### 2.1.3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (5 μm 250×4.6 mm), 流动相: 甲醇(A)-0.2%冰醋酸/水(B), 梯度洗脱: 0-15 min, 12%-30% A, 15-21 min, 30%-70% A, 21-28 min, 70% A。检测波长: 275 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL。色谱图见图 1。

#### 2.1.4 线性关系考察

分别精密吸取诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯对照品溶液 0 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 50% 甲醇定容, 制成不同浓度对照品溶液。进样 20 μL, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别计算回归方程, 诃黎勒酸:  $Y=2E+06X-489.43$ ,  $r=0.9996$ ; 没食子酸:  $Y=2E+06X+51.095$ ,  $r=0.9996$ ; 粘酸-2-O-没食子酸酯:  $Y=569045X-88530$ ,  $r=0.9996$ 。分别在 0.0728-0.364 μg, 0.1804-0.902 μg 和 0.3872-1.1616 μg 范围内线性关系良好。

#### 2.1.5 精密度试验

精密吸取供试品溶液 20 μL, 连续进样 5 次, 记录诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯的峰面积, 计算 RSD 分别为 1.41%、0.77% 和 1.67%, 表明仪器精密度良好。

#### 2.1.6 重复性试验

取余甘子总酚提取物约 5 mg, 精密称重, 加 50% 甲醇 25 mL, 称重, 100 MHz 超声 30 min, 冷却后, 补足原重量, 滤过, 平行操作 6 份。分别测定诃黎勒酸、没食子酸和粘酸-2-O-没食子酸酯含量, RSD 分别为 1.15%、2.99%、2.91%。

#### 2.1.7 稳定性试验

余甘子总酚提取物于制备后 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、

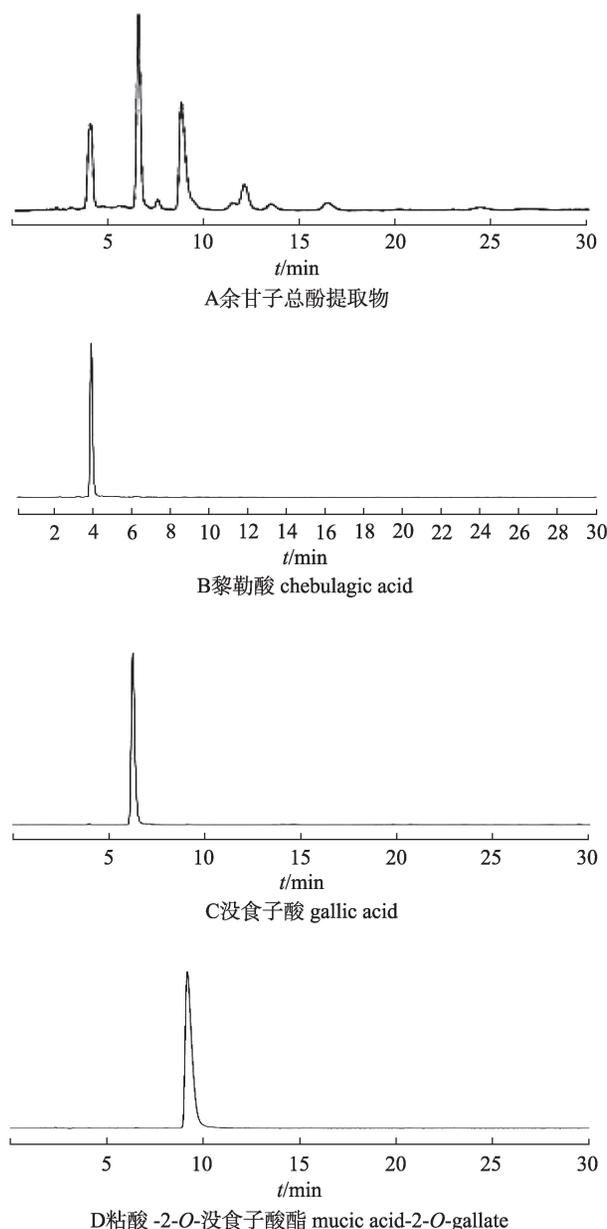


图1 余甘子总酚提取物 HPLC 色谱图

6 h、8 h、12 h 分别进样, 记录诃黎勒酸、没食子酸和粘酸-2-O-没食子酸酯的峰面积, 计算 RSD 分别为 2.31%、2.67%、2.33%, 样品溶液中 3 个成分在 12 h 内稳定性良好。

#### 2.1.8 加样回收率

取已知含量的余甘子总酚提取物约 2.5 mg, 精密称定, 平行 6 份, 分别加入对照品溶液 (诃黎勒酸 0.160 mg/mL、没食子酸 0.210 mg/mL、粘酸-2-O-没食子酸酯 0.170 mg/mL) 1.0 mL, 50% 甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 冷却后, 补足原重量, 滤过, 取 20 μL 进样, 测定峰面积, 计算平均回收率分别, 诃黎勒酸 99.92%,

表1 正交试验因素水平表

水平	溶剂浓度(A)	溶剂倍量(B)	提取次数(C)	提取时间(D)
1	0%	8	1	60 min
2	50%	10	2	90 min
3	70%	12	3	120 min

RSD为2.45%,没食子酸100.16%,RSD为2.35%,粘酸-2-O-没食子酸酯99.85%,RSD为2.21%。

## 2.2 分光光度测定法

### 2.2.1 测定方法

精密吸取没食子酸对照品溶液和样品溶液各0.5 ml,置25 mL容量瓶中,依次加入50% EtOH溶液5 mL、0.3%十二烷基磺酸钠溶液1 mL,混合显色剂(按体积比0.6%铁氰化钾溶液:0.9%三氯化铁溶液=10:9配制)1 mL,摇匀暗处静置5 min。加入0.1 mol/L的盐酸稀释至刻度,摇匀,暗处放置20 min,450-900 nm范围内扫描测定吸光度。选择744 nm为吸收波长。

### 2.2.2 线性关系考察

精密吸取没食子酸对照品溶液(浓度为0.051 mg/mL)0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL,置25 mL容量瓶中,依次“2.2.1”显色测定,以没食子酸对照品浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得到回归方程 $y=0.5338X+0.0047$ , $r=0.9992$ ,没食子酸在0.204~2.040  $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度有良好的线性关系。

### 2.2.3 精密度考察

精密吸取供试品溶液0.50 mL置25 mL容量瓶中,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,连续测定6次,RSD为1.02%,该方法精密度良好。

### 2.2.4 重复性试验

精密称取余甘子总酚提取物5份,每份约5 mg,置25 mL容量瓶中,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,RSD为1.54%,该方法重复性良好。

### 2.2.5 样品稳定性考察

供试品溶液配制后,分别于0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h精密吸取0.5 ml,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,RSD 2.23%,结果表明,样品溶液在12 h内稳定性良好。

### 2.2.6 提取物加样回收率

取余甘子提取物样品(总酚含量为31.30%)6份,每份约2.5 mg,置25 mL容量瓶中,分别精密加入浓度为1.55 mg/mL的没食子酸对照品溶液0.5 mL,按“2.2.1”项下方法测定吸光度,计算酚类成分的含量,平

均回收率为101.57%,RSD为2.65%。

## 2.3 总酚提取工艺

### 2.3.1 药材粒度考察

称取余甘子药材6份,每份约5 g,分别为a:未经处理原药材,b:5目药材粉末,c:10目药材粉末,以10倍量70%乙醇回流提取两次,每次1.5 h,合并滤液并浓缩,真空干燥,平行操作两份。按照“2.2.1”项下测定提取物总酚量,结果显示5-20目药材总酚提取率达90%以上,考虑工业生产粒度选取5-10目。

### 2.3.2 正交实验设计

精密称取余甘子药材18份,每份约5 g,按L9(3<sup>4</sup>)正交试验表设计制备相应提取物,按照“2.2.1”项下测定总酚含量,“2.1.2”项下测定总酚、诃黎勒酸、没食子酸和粘酸-2-O-没食子酸酯的含量,并计算得率。因素水平见表1。正交设计及试验结果、方差分析结果见表2和表3。

由表2、3可知,以余甘子中总酚、诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯的提取量为指标进行综合分析,再结合生产实际、经济及操作简便考虑,确定余甘子总酚提取物最佳提取工艺为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即以70%乙醇提取3次,每次90 min,溶剂用量为10倍。

### 2.3.3 验证试验

取余甘子药材(5目)5 g,以最佳提取工艺提取,即70%乙醇提取3次,每次90 min,溶剂用量为10倍,滤过,合并滤液,40℃减压浓缩,干燥,平行操作3份,测定。余甘子出膏率为55.06%(RSD=2.36%,n=3)、总酚含量为35.82%(RSD=0.82%,n=3),总酚提取率为89.59%(RSD=2.66%,n=3),诃黎勒酸含量为4.80%(RSD=0.60%,n=3),没食子酸含量为5.77(RSD=2.71%,n=3),粘酸-2-O-没食子酸酯含量为11.71%(RSD=1.96%,n=3)。

## 3 讨论

余甘子抗氧化、抗病毒、抗癌的主要活性成分是多酚类化合物,其中含量较高的有可水解鞣质、小分子酚酸、粘酸,本实验以3类代表成分诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯和总酚为指标,采用L9(3<sup>4</sup>)正交试验,对提取溶剂、提取时间、提取次数、溶剂用量等考察,优选出余甘子总酚最佳提取工艺。本提取工艺简便,稳定,为余甘子总酚工业生产提供参考。

表2 正交试验结果

序号	因素				提取量(mg)					含量(%)					得率(%)				
	A	B	C	D	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
1	1	1	1	1	305.01	15.11	77.93	104.32	197.35	22.85	1.13	5.84	7.81	14.78	6.10	0.30	1.56	2.09	3.95
2	1	1	1	1	324.95	13.32	86.13	128.59	228.04	24.34	1.12	7.27	10.85	19.24	6.49	0.27	1.72	2.57	4.56
3	1	2	2	2	788.53	22.23	239.00	213.54	474.77	22.89	0.65	6.94	6.20	13.78	15.77	0.44	4.78	4.27	9.50
4	1	2	2	2	820.61	18.58	239.95	261.46	519.99	23.82	0.64	8.31	9.06	18.02	16.41	0.37	4.80	5.23	10.40
5	1	3	3	3	899.29	13.77	243.68	232.82	490.27	26.89	0.41	7.29	6.96	14.66	17.98	0.28	4.87	4.66	9.81
6	1	3	3	3	899.29	13.11	231.56	220.91	465.58	26.89	0.41	7.28	6.95	14.64	17.98	0.26	4.63	4.42	9.31
7	2	1	2	3	743.53	77.87	111.10	187.82	376.78	31.53	3.30	4.71	7.97	15.98	14.87	1.56	2.22	3.76	7.54
8	2	1	2	3	743.53	85.72	125.07	291.22	502.01	31.53	3.44	5.01	11.67	20.12	14.87	1.71	2.50	5.82	10.04
9	2	2	3	1	1012.52	95.28	130.17	308.59	534.05	33.69	3.17	4.33	10.27	17.77	20.25	1.91	2.60	6.17	10.68
10	2	2	3	1	988.02	101.76	132.56	240.17	474.49	32.88	3.52	4.58	8.30	16.39	19.76	2.04	2.65	4.80	9.49
11	2	3	1	2	614.96	71.23	89.65	162.75	323.64	31.31	3.63	4.56	8.29	16.48	12.30	1.42	1.79	3.26	6.47
12	2	3	1	2	626.35	82.50	106.13	217.77	406.40	31.89	3.56	4.58	9.39	17.52	12.53	1.65	2.12	4.36	8.13
13	3	1	3	2	937.28	100.21	123.15	216.27	439.62	34.86	3.73	4.58	8.04	16.35	18.74	2.00	2.46	4.33	8.79
14	3	1	3	2	939.00	101.97	128.00	278.38	508.35	34.92	3.82	4.79	10.42	19.02	18.78	2.04	2.56	5.57	10.17
15	3	2	1	3	720.42	78.73	104.88	242.59	426.20	33.87	3.70	4.93	11.41	20.04	14.41	1.57	2.10	4.85	8.52
16	3	2	1	3	661.63	96.39	129.53	352.50	578.43	31.11	4.05	5.44	14.82	24.31	13.23	1.93	2.59	7.05	11.57
17	3	3	2	1	967.25	107.16	147.47	341.36	595.99	35.30	3.91	5.38	12.46	21.75	19.34	2.14	2.95	6.83	11.92
18	3	3	2	1	904.63	109.96	175.73	432.78	718.47	33.02	4.04	6.46	15.90	26.39	18.09	2.20	3.51	8.66	14.37

注:a.总酚,b.诃黎勒酸,c.没食子酸,d.粘酸-2-O-没食子酸酯,e.诃黎勒酸+没食子酸+粘酸-2-O-没食子酸酯。

表3 方差分析结果

	Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F	显著性
a	A	2	101 800.2366	50 900.1183	96.07	<.0001	****
	B	2	102 604.9895	51 302.4947	96.83	<.0001	****
	C	2	517 062.8162	25 8531.4081	487.94	<.0001	****
	D	2	4 507.5517	2253.7759	4.25	0.0501	**
b	A	2	23 868.73284	11 934.36642	376.61	<.0001	****
	B	2	33.16841	16.58421	0.52	0.6095	
	C	2	493.55258	246.77629	7.79	0.0109	**
	D	2	500.11854	250.05927	7.89	0.0105	**
c	A	2	16 011.65841	8 005.82921	68.06	<.0001	****
	B	2	12 405.80814	6 202.90407	52.73	<.0001	****
	C	2	19 752.28454	9 876.14227	83.96	<.0001	****
	D	2	3 871.34914	1 935.67457	16.46	0.0010	****
d	A	2	42 307.05298	21 153.526 49	8.33	0.0090	****
	B	2	18 416.37101	9 208.185 51	3.63	0.0700	
	C	2	22 595.97231	1 1297.986 16	4.45	0.0454	**
	D	2	4 146.81934	2 073.409 67	0.82	0.4723	
e	A	2	70 796.91648	35 398.458 24	8.78	0.0077	****
	B	2	62 836.89471	31 418.447 36	7.79	0.0109	**
	C	2	94 367.74528	47 183.872 64	11.70	0.0031	****
	D	2	2 316.65604	1 158.328 02	0.29	0.7569	

注:a.以总酚提取量为指标方差分析结果,b.以诃黎勒酸提取量为指标方差分析结果,c.以没食子酸提取量为指标方差分析结果,d.以粘酸-2-O-没食子酸酯提取量为指标方差分析结果,e.以诃黎勒酸+没食子酸+粘酸-2-O-没食子酸酯提取量为指标方差分析结果。

## 参考文献

- 1 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 456-457.
- 2 王辉. 余甘子的化学成分和药理作用研究进展. 中国现代中药, 2011, 13(11): 52-56.
- 3 李兵, 黄贵庆, 卢汝梅, 等. 余甘子化学成分研究. 中药材, 2015, 38(2): 290-293.
- 4 Yang B, Kortseniemi M, Liu P, *et al.* Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry. *J Agr Food Chem J*, 2012, 60(35): 8672-83.
- 5 元旗, 崔雅萍, 梁文仪, 等. 藏药余甘子与诃子化学和药理作用比较. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(7): 1171-1176.
- 6 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 179-187.
- 7 刘晓丽, 吴克刚, 柴向华, 等. 余甘子多酚作为食用油脂抗氧化剂的研究. 中国食品添加剂, 2010(3): 194-198.
- 8 郭炳春, 沈明娟, 叶征美, 等. 余甘子总多酚提取工艺优化研究. 热带作物学报, 2013, 34(12): 2479-2483.
- 9 曹维, 朱建梅, 文洁, 等. 余甘子有效成分提取工艺研究. 中药材, 2013, 36(5): 812-815.

### Optimum Extraction Technology of Total Polyphenol from *Phyllanthus emblica* via Multi-Target Orthogonal Design

Qi Qi, Cui Yaping, Liang Wenyi, Li Shi, Liang Linjin, Ye Ting, Wu Lingfang, Zhang Lanzhen  
(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**Abstract:** This study was aimed to optimize the extraction method for total polyphenol from *Phyllanthus emblica* through multi-target orthogonal experiment, in order to provide data reference for its industrial production. The comprehensive evaluation indexes included the extraction yield, extraction percentage of total polyphenol, chebulagic acid, gallic acid, mucic acid-2-O-gallate, were verified. The ethanol concentration, solid-liquid ratio and extraction time were crucial indexes for orthogonal design. The results showed that the best extraction process was using 10 times dosage 70% ethanol, to extract the medical material three time, 90 minutes for every time. It was concluded that the extraction technology was reliable. This method was stable, quick and simple. It laid a fundamental foundation for the extraction method exploration.

**Keywords:** *Phyllanthus emblica*. L, total polyphenol, chebulagic acid, gallic acid, mucic acid-2-O-gallate, extraction technology

(责任编辑:张 静, 责任译审:王 晶)