

响应面法优选双水相萃取分离珠子草中木脂素 hypophyllanthin 的方法

曹 洵, 刘 盛, 周 敏, 林小霞, 韦万兴*

广西大学化学化工学院, 南宁 530004

摘要:通过乙醇-硫酸铵双水相体系,以盐浓度(w/w)、醇浓度(w/w)、超声提取时间(min)为响应因素,根据中心组合(Box-Behnken)试验设计原理,采用三因素三水平响应面分析法确定木脂素 hypophyllanthin 的最佳分配体系,并在此基础上用环己烷对上相进行液液选择性萃取纯化 hypophyllanthin。结果表明,双水相体系提取木脂素 hypophyllanthin 的最佳条件为:盐浓度 26.54%、醇浓度 21%、超声提取时间为 20 min。在此条件下, hypophyllanthin 的分配系数可达 75.82,对上相再次萃取 hypophyllanthin 的产率达 3.18 mg/g,高于传统柱层析色谱法。此方法操作简单、绿色环保、成本低廉,为木脂素 hypophyllanthin 的分离提供了新的方法。

关键词:双水相;中心组合;木脂素;hypophyllanthin

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.04.032

Optimization of Aqueous Two-phase Extraction of Lignans Hypophyllanthin from *Phyllanthus niruri* Using Response Surface Methodology

CAO Xun, LIU Sheng, ZHOU Min, LIN Xiao-xia, WEI Wan-xing*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: In this study, an aqueous two-phase system (ATPS) based on ethanol/(NH₄)₂SO₄ was evaluated for the extraction of lignans from *Phyllanthus niruri*. Box-Behnken design (BBD) was used to study the effects of salt concentration, ethanol concentration and ultrasonic extraction time on the partition behavior of main bioactive components lignans hypophyllanthin. The results showed 26.54% (w/w) (NH₄)₂SO₄, 21% (w/w) ethanol, 20 min of ultrasonic extraction for hypophyllanthin were the optimal conditions with partition coefficient of 76.62. Furthermore, the cyclohexane was used for another step extraction on upper phase, under which 3.18 mg/g hypophyllanthin were obtained. The ATPS was firstly used to separate and purify hypophyllanthin from *P. niruri* and higher yields were obtained comparing with traditional column chromatography. The developed ATPS method was easier, greener and cheaper. It provided a new approach for the separation of hypophyllanthin.

Key words: aqueous two-phase extraction; Box-Behnken design; lignans; hypophyllanthin

珠子草,别名小返魂、叶下珠,为一年生大戟科叶下珠属草本植物,全株可用于治疗痢疾、肝炎、黄疸、肠炎、泌尿系统感染等疾病,具有通经镇痛、祛痰止咳、抗菌止血、清热解毒、通便利尿等药效^[1,2]。据报道,珠子草主要含有黄酮和黄酮甙、生物碱、木脂素等物质,而木脂素便是其主要活性成分之一^[3]。目前已分离得到的木脂素有 21 种^[4],其中 hypophyllanthin 在抗炎^[5,6]、抗乳腺癌^[7]、抗肝细胞

损伤^[8]上活性显著。传统分离纯化木脂素一般是用柱层析色谱、大孔树脂、高速逆流色谱制备等方法,但是大多操作复杂需要耗费大量有机溶剂。而双水相萃取技术是利用组分在两相间分配的差异而进行组分的分离与提纯^[9],具有操作简单、条件温和易于放大等优点。本研究利用响应面法优选双水相体系富集木脂素 hypophyllanthin 的最佳工艺条件,并在此条件下通过环己烷对上相进行再次萃取得到纯净木脂素 hypophyllanthin 化合物。此方法简单、环保、廉价,产率明显高于传统柱层析色谱法^[10],为木脂素 hypophyllanthin 的分离提供了新的方法。

收稿日期:2014-10-08 接受日期:2015-01-06

基金项目:国家自然科学基金(81060261);广西自然科学基金(2012GXNSFAA053021)

* 通讯作者 Tel:86-771-3272601; E-mail: wxwei@gxu.edu.cn

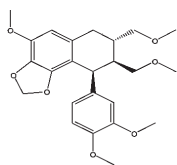


图1 木脂素 hypophyllanthin 的结构式

Fig. 1 Chemical structure of hypophyllanthin

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (Thermo Fisher UltiMate 3000), KQ5200B 超声清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司), BSA224S 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器), 微型漩涡混合仪 (上海沪西分析仪器有限公司), 乙腈为德国 Merck 色谱纯, 其余试剂均为广东西陇化工股份有限公司分析纯。

珠子草于 2012 年 11 月采自广西隆安县, 共 100 kg, 由西北大学生命科学学院倪士峰博士鉴定, 标本存放于本实验室, 编号 06121。珠子草晾干后粉碎至半厘米长, 在 85 °C 下用乙醇回流 3 h, 滤出浸提液, 残渣用乙醇继续回流提取两次。合并乙醇浸提液, 浓缩蒸干, 用滴水沉降法除叶绿素, 得珠子草浸膏 416 g。

1.2 实验方法

1.2.1 双水相体系的制备

根据不同盐类双水相体系相图, 利用无机盐在混合体系中的盐析作用, 分别改变盐和醇的浓度得到不同的双水相体系。准确称取一定量的浸膏加入其中, 使体系总质量为 10 g。

1.2.2 木脂素 hypophyllanthin 测定方法的建立

1.2.2.1 色谱条件

采用 Acclaim C₁₈ (2.1 × 150 mm, 3 μm, 120 Å) 色谱柱, 乙腈-水 (55:45) 为流动相, 流速: 0.4 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长: 230 nm, 进样量: 10 μL。

1.2.2.2 精密度试验

按 1.2.2.1 条件取同一标准样品, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果表明, RSD 为 0.3%。

1.2.2.3 稳定性试验

取一样品, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样分析, 计算木脂素 hypophyllanthin 标准品的 RSD 为 1.16%。

1.2.2.4 标准曲线的绘制

准确称取木脂素 hypophyllanthin 标准品 (实验

室自备, 经 NMR、MS、IR、UV 鉴定其结构, HPLC 测定其质量分数 >98%) 0.0045 g, 用甲醇溶解定容于 25 mL 容量瓶中, 按 5 倍浓度梯度稀释、进样, 测定峰面积值。以峰面积值为纵坐标、对照品浓度 (mg/mL) 为横坐标作图得木脂素 hypophyllanthin 线性回归方程: $Y = 780.2X - 0.7585$, $R^2 = 0.9998$ (0.1800 ~ 0.0008 mg/L), 并在此范围内线性关系良好。

1.2.2.5 样品分析

根据 1.2.2.1 条件, 对体系上下相分别用一定量的甲醇稀释至 50 mL 容量瓶中除去无机盐, 进样检测, 样品 HPLC 色谱图见图 2, 按以下公式计算分配系数 (K)、回收率 (R) 与萃取量 (Y)。

$$K = \frac{C_t}{C_b} \quad R(\%) = \frac{C_t V_t}{C_t V_t + C_b V_b} \quad Y(\text{mg/g}) = \frac{C_t V_t}{M_s}$$

式中, C_t 、 C_b 分别为上下相浓度, mg/mL; V_t 、 V_b 为上下相体积, mL; M_s 为加入珠子草浸膏质量, g。

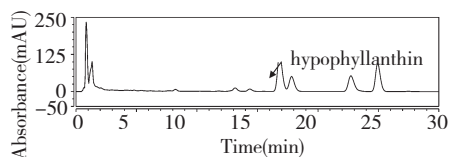


图2 样品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *P. niruri* sample

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 盐种类影响

分别称取一定量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2CO_3 、 NaH_2PO_4 分析纯, 按 1.2.1 方法制备盐浓度为 17%, 醇浓度为 25% 的双水相体系, 木脂素 hypophyllanthin 的分配系数见图 3。综合溶解与分相速率, 因此选定硫酸铵-乙醇双水相体系。

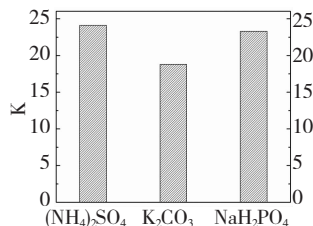


图3 不同双水相体系对木脂素分配系数的影响

Fig. 3 Effect of different aqueous two-phase systems on the partition coefficient (K) of lignans

1.2.3.2 醇浓度影响

准确称取 0.5 g 珠子草浸膏, 根据 1.2.1 方法, 保持盐浓度一定, 乙醇浓度在双水相的形成范围内递增, 结果见图 4。木脂素 hypophyllanthin 的分配系

数和回收率呈递增趋势后保持稳定。当体系中醇浓度增大,上相中乙醇浓度也相应增加,导致疏水性类木脂素 hypophyllanthin 也主要富集在上相。因此选定乙醇浓度为 22% ~ 28% 为最佳单因素试验范围。

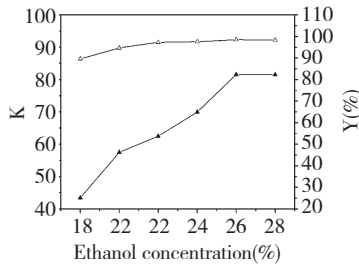


图 4 醇浓度对分配系数与回收率的影响

Fig. 4 Effect of ethanol concentration on the partition coefficients and recoveries

注: ▲表示分配系数, △表示回收率。下同。

Note: ▲: partition coefficients, △: recoveries. Same as below.

1.2.3.3 盐浓度影响

准确称取 0.5 g 珠子草浸膏按 1.2.1 方法,使乙醇浓度保持一定,盐浓度在双水相的形成范围内依次递增,结果见图 5。木脂素 hypophyllanthin 的分配系数和回收率呈递增趋势。这主要是由于盐浓度增大后导致的盐析效应使乙醇在上相中浓度也增大,所以 hypophyllanthin 也主要富集上相。因此选定盐浓度为 21% ~ 25% 为最佳单因素试验范围。

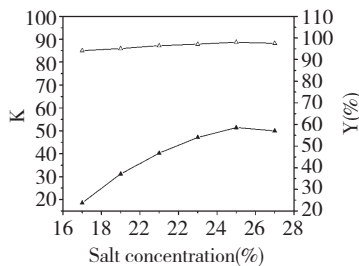


图 5 盐浓度对分配系数与回收率的影响

Fig. 5 Effect of salt concentration on the partition coefficients and recoveries

1.2.3.4 温度的影响

根据 1.2.1 方法,准确称取 0.5 g 珠子草浸膏,加入到盐浓度为 17%,醇浓度为 25% 的双水相体系中。在 25 ~ 50 °C 内,以温度影响对木脂素 hypophyllanthin 的分配系数与回收率做单因素试验,结果见图 6。结果表明,温度对木脂素 hypophyllanthin 的分配影响较小,因此选定室温(25 °C)为最佳单因素试验温度。

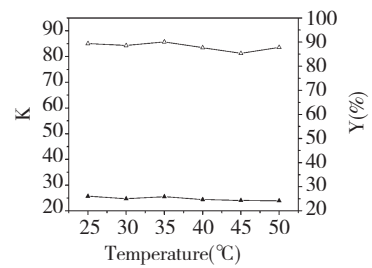


图 6 温度对分配系数与回收率的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the partition coefficients and recoveries

1.2.3.5 超声提取时间的影响

准确称取 0.5 g 珠子草浸膏,根据 1.2.1 方法,加入到盐浓度为 17%,醇浓度为 25% 的双水相体系中,在室温下(25 °C)超声提取时间逐渐增加,木脂素 hypophyllanthin 的分配系数递增后逐渐减小,结果见图 7。可能原因是由于超声耦合,体系浑浊,上相中亲水性物质成小颗粒状由上相分散到下相中。当时间超过 20 min,部分亲脂性物质也会同时进入,导致分配系数减小。因此,我们选定超声时间在 5 ~ 20 min 为最佳单因素试验范围。

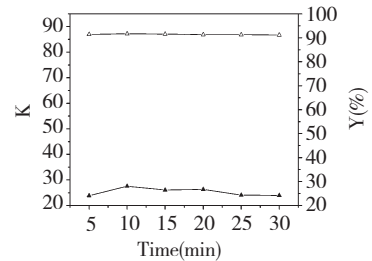


图 7 超声提取时间对分配系数与回收率的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic extraction time on the partition coefficients and recoveries

1.2.4 响应面法试验设计

根据响应面法中心组合(Box-Behnken)试验设计原理,选用 Design-Expert 8.0.5 软件为辅助手段设计响应面试验,以乙醇浓度(w/w)、盐浓度(w/w)、超声提取时间(min)为自变量,木脂素 hypophyllanthin 的分配系数为响应值,用三水平三因素响应面法确定最佳分配体系。响应面的因素水平见表 1。

1.2.5 响应面优化

根据中心组合(Box-Behnken)试验设计原理,综合单因素试验影响结果,以乙醇浓度(A)、盐浓度(B)、超声提取时间(C)为自变量,木脂素 hypophyl-

lanthin 的分配系数为响应值,通过三水平三因素响应面法确定最佳分配体系。试验设计见表 2。

表 1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	A 醇浓度 Ethanol concentration (w/w)	B 盐浓度 Salt concentration (w/w)	C 超声提取时间 Ultrasonic extraction time (min)
	+1	21%	22%
0	23%	25%	12.5
-1	25%	28%	20

表 2 响应面法试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of response surface experiment

试验号 No.	A (w/w)	B (w/w)	C (min)	分配系数 Partition coefficient (K)
1	25(0)	21(-1)	5(-1)	59.00
2	22(-1)	23(0)	20(1)	65.66
3	25(0)	23(0)	12.5(0)	62.82
4	28(1)	25(1)	12.5(0)	65.92
5	25(0)	23(0)	12.5(0)	65.19
6	25(0)	23(0)	12.5(0)	64.72
7	22(-1)	21(-1)	12.5(0)	61.09
8	28(1)	23(0)	20(1)	72.38
9	25(0)	21(-1)	20(1)	74.23
10	25(0)	25(1)	5(-1)	66.35
11	22(-1)	23(0)	5(-1)	53.15
12	28(1)	23(0)	5(-1)	57.16
13	25(0)	25(1)	20(1)	71.18
14	25(0)	23(0)	12.5(0)	63.62
15	25(0)	23(0)	12.5(0)	64.83
16	28(1)	21(-1)	12.5(0)	66.88
17	22(-1)	25(1)	12.5(0)	63.02

2 结果与讨论

2.1 响应面法试验结果与分析

选用 Design-Expert 8.0.5 软件对表 2 数据进行多元回归拟合,得到二次多项回归方程: $K_h = 64.24 + 2.43A + 0.66B + 5.97C - 0.72AB + 0.68AC - 2.60BC - 2.81A^2 + 2.82B^2 + 0.66C^2$ 。

方差分析与回归系数显著性检验结果见表 3,模型 P 值为 0.0002,说明所建模型模拟实际的三因素三水平分析合理可靠、效果显著,各因素间也并不是简单的线性关系。实验值与二次多项方程预测值

的相关系数 $R^2 = 0.9705$,表明 97.05% 的实验数据可以用此模型来进行解释。由 F 值的大小可以判断,在所选的试验范围内,三个因素对木脂素 hypophyllanthin 分配系数影响的排序为:超声提取时间(C) > 醇浓度(A) > 盐浓度(B)。对二次多项回归方程去一阶偏导数等于零,得到双水相体系上丰富集木脂素 hypophyllanthin 最佳提取条件:盐浓度为 26.54%,醇浓度为 21%,超声提取时间为 20 min。在此条件下,木脂素 hypophyllanthin 的分配系数为 76.62。经三次平行实验,分配系数为:75.16、74.37、75.82,实验值与预测值基本符合。

表3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 DF	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	431.66	9	25.55	0.0002 *
A	47.14	1	25.11	0.0015 *
B	3.47	1	1.85	0.2161
C	285.49	1	152.07	<0.0001 * *
AB	2.09	1	1.11	0.3266
AC	1.84	1	0.98	0.0048 *
BC	27.04	1	14.40	0.3556
A ²	33.14	1	17.65	0.0040 *
B ²	32.94	1	17.55	0.0041 *
C ²	1.82	1	0.97	0.3579
残差 Residual	13.14	7		
失拟项 Lack of Fit	9.26	3	3.18	0.1465
净误差 Pure error	3.88	4		
总离差 Cor Total	444.81	16		

注: * 差异显著, $P < 0.05$; * * 差异极显著, $P < 0.001$ 。

Note: * means significant difference, $P < 0.05$; * * means extremely significant difference, $P < 0.001$.

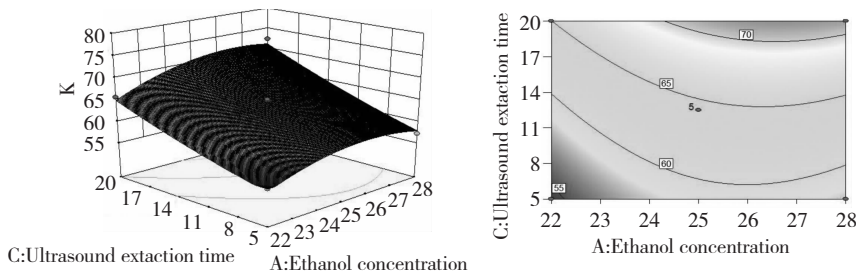


图8 $K = f(A, B)$ 的响应面与等高线图

Fig. 8 Response surface and contour plots of $K = f(A, B)$

2.2 因素间的交互影响

由图8两因素交互作用的等高线图可以直接得到响应面的最高点,而响应面三维图可以看出参数范围内的极值大小以及各因素之间交互作用对响应值的影响。根据方差分析表3可知,超声提取时间与乙醇浓度交互作用影响最显著。当体系中的醇在浓度范围内增大,疏水性类木脂素在超声耦合的作用下重新分配,大量富集在上相。但超声时间太长,体系浑浊,部分木脂素可能进入下相,而下相当中的一些杂质同时进入上相,导致木脂素 hypophyllanthin 的分配系数反而降低。从总体上看,超声提取时间对 hypophyllanthin 的分配影响最显著,醇浓度与盐浓度的影响次之。因此,在醇浓度较大、超声提取时间较长的范围内可以达到响应值的最高点。

2.3 纯化

根据2.1分析结果,按响应面优化的最佳提取工艺同时增大双水相体系与珠子草浸膏比例制备混合体系,取出上相用环己烷选择性萃取两次,浓缩、重结晶,得到木脂素 hypophyllanthin 白色晶体,产量为 3.18 mg/g,萃取液相图见图9。

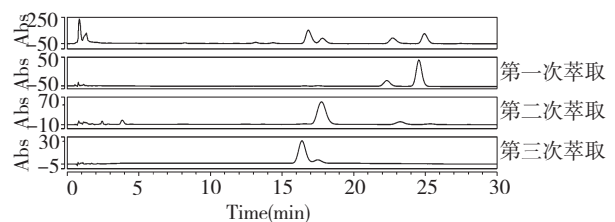


图9 萃取次数的色谱图

Fig. 9 HPLC chromatograms of different extraction processes

2.4 讨论

本文研究了以乙醇-硫酸铵构成的双水相体系用于珠子草中木脂素 hypophyllanthin 的提取分离,采用综合响应面法优化了双水相体系的提取工艺,探究了盐浓度、醇浓度、超声提取时间三个单因素变量对木脂素 hypophyllanthin 分配系数的影响。实验结果表明,盐浓度为 26.54% (w/w),醇浓度为 21% (w/w),超声提取 20min 时为最佳提取工艺。在此条件下,hypophyllanthin 的分配系数可达到 75.82,对上相再次萃取 hypophyllanthin 的产率达 3.18 mg/g,高于传统柱层析色谱法。本实验操作简单、绿色环保、成本低廉,所采用的响应面三维图使各影响因素的趋势更加直观明了,实验精确度明显提高。该方法简单高效,为木脂素 hypophyllanthin 的分离提供了新的方法。

致谢:感谢国家自然科学基金与广西自然科学基金对本课题的资助!

参考文献

- Chen DH (陈东辉), Chen L (陈亮), Hu JZ (胡家震), *et al.* Comparison study on the preparing way of chitosan. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2002, 14: 56-58.
- Wei WX (韦万兴), Pan YJ (潘远江), Zhang H (张虹), *et al.* The structures in crystal and in solution of friedelin isolated from *Phyllanthus niruri* Linn. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 201-203.
- Li XR (黎向荣), Zhou W (周昊), Wei WX (韦万兴). Chemical components and bioactivities of *Phyllanthus niruri* Linn. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 890-896.
- Shi JG (石建功), Gan ML (甘茂罗). Lignans chemical (木脂素化学). Beijing: Chemical industry press, 2009, 2-3.
- Manas M, Rashi S, Jaya S, *et al.* Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri* Linn. *Elixir Online J*, 2012, 5: 8487-8489.
- Chouhan HS, Singh SK. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 1337-1344.
- Parvathaneni M, Battu GR, Gray AI, *et al.* Investigation of anticancer potential of hypophyllanthin and phyllanthin against breast cancer by *in vitro* and *in vivo* methods. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 4: 71-76.
- Krithika R, Mohankumar R, Verma RJ, *et al.* Isolation, characterization and antioxidative effect of phyllanthin against CCl₄-induced toxicity in HepG2 cell line. *Chem Biol Interact*, 2009, 181: 351-358.
- Rosa PAJ, Azevedo AM, Ferreira IF, *et al.* Downstream processing of antibodies: single-stage versus multi-stage aqueous two-phase extraction. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 8741-8749.
- Wei WX (韦万兴) Studies on the chemical constituents of two *Phyllanthus* plants. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), PhD. 2003.
- Zang N (臧宁), Zeng YY (曾耀英), Huang XY (黄秀艳), *et al.* The effect of morin on the activation *in vitro*, proliferation and cell cycle. *Chin J Cell Molecul Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2007, 23: 197-200.
- Cho YM, Onodera H, Ueda M, *et al.* A 13-week subchronic toxicity study of dietary administered morin in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44: 891-897.
- Hou YC, Chao PD, Ho HJ, *et al.* Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. *Pharm Pharmacol*, 2003, 55: 199-203.
- Wang NS. Pharmacokinetic model and its introduction of analysis method. *J Guangzhou Coll TCM* (广州中医学院学报), 1985, 6(4): 30-34.
- Lipnick RL, Cotruvo JA, Hill RN, *et al.* Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33: 223-231.

(上接第 705 页)