

## 响应面法优化五倍子总鞣质的提取工艺

陈丹妮<sup>1,2,3</sup>, 秦昆明<sup>1,2,3</sup>, 陈林伟<sup>1,2</sup>, 王彬<sup>1,2</sup>, 张金龙<sup>3</sup>, 蔡宝昌<sup>1,2,3\*</sup>

- (1. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023;
2. 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究室, 南京 210046;
3. 南京海昌中药集团有限公司 江苏省企业研究生工作站, 南京 210061)

**[摘要]** 目的:优化五倍子总鞣质的提取工艺,为五倍子的深度开发和综合利用提供参考。方法:采用水浴加热浸提法,以没食子酸和浸出物得率为指标,在单因素试验基础上,选择提取次数、提取时间、液料比和提取温度为考察因素,采用 Box-Behnken 试验设计原理确定五倍子总鞣质的最佳提取工艺。结果:最佳提取工艺为加 10.4 倍量水于 62 ℃ 水浴提取 2 次,每次 125 min,没食子酸和浸出物得率分别为 55.67%、65.11%,与理论预测值的相对偏差分别为 3.30%、0.35%。结论:响应面法优选的五倍子总鞣质提取工艺方法简单、提取效率高、可预测性良好。

**[关键词]** 五倍子; 总鞣质; 没食子酸; 水浴浸提法

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0020-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140020

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1030.006.html>

**[网络出版时间]** 2015-05-27 10:30

### Optimization of Extraction Process of Total Tannin from *Galla Chinensis* by Response Surface Methodology

CHEN Dan-ni<sup>1,2,3</sup>, QIN Kun-ming<sup>1,2,3</sup>, CHEN Lin-wei<sup>1,2</sup>, WANG Bin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jin-long<sup>3</sup>, CAI Bao-chang<sup>1,2,3\*</sup> (1. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210046, China; 3. Graduate Workstation Enterprises in Jiangsu Province, Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of total tannin from *Galla Chinensis*. **Method:** On the basis of single factor tests, water heating extraction process of total tannin from *Galla Chinensis* was optimized by Box-Behnken design by taking yields of gallic acid and extract as indexes. **Result:** Optimum extraction technology of total tannin was extracted twice with 10.4 times the amount of water at 62 ℃, 125 minutes of each time, yields of gallic acid and extract were 55.67% and 65.11%, compared with theoretical prediction values, their relative deviations were 3.30% and 0.35%, respectively. **Conclusion:** This optimized extraction technology of total tannin from *Galla Chinensis* is simple with high extraction efficiency and good predictability.

**[Key words]** *Galla Chinensis*; total tannin; gallic acid; water heating extraction

五倍子又名文蛤、百虫仓、木附子等,具有敛肺降火、涩肠止泻、固精缩尿等功效,临床常用于抗脂质过氧化、抑菌、抗炎等方面<sup>[1]</sup>。其主要有效成分为鞣质类,又叫鞣酸、单宁酸<sup>[2]</sup>,由没食子酸与不同

样式葡萄糖结合而成,即一系列不同“多倍酰葡萄糖”的混合物,为可水解单宁,极性较强,易溶于水、甲醇、乙醇等有机试剂。五倍子总鞣质是一类较复杂的多酚类化合物,能与人体内有害自由基结合,具

**[收稿日期]** 20141021(010)

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金项目(BK20141093);国家中医药管理局公益性行业专项(201307008);江苏省科技支撑计划工业项目(BE2012011)

**[第一作者]** 陈丹妮,在读硕士,从事中药炮制机制及质量标准研究,Tel:18351895626,E-mail:18351895626@163.com

**[通讯作者]** \*蔡宝昌,教授,博士生导师,从事中药炮制机制及质量标准研究,Tel:025-68193567,E-mail:bccai@126.com

有强力去癌变功效,可抗衰老、增强机体免疫力<sup>[3]</sup>,对多种细菌、病毒有很好的抑制作用,还能缩短出血时间,是一种有效的凝血剂,临床上可用于分离血浆。总鞣质的提取方法包括水浸提、超声波辅助法<sup>[4]</sup>、微波法<sup>[5]</sup>、加压法<sup>[6]</sup>和超临界萃取法<sup>[7]</sup>等。因该成分性质较为活泼,在提取过程中,易发生氧化、离解或聚合等化学反应,给含量测定带来了一定困难。在酸性条件下,水解总鞣质可得到没食子酸,两者在量上成正比例关系,通过测定没食子酸含量,可反映出总鞣质的含量。关于总鞣质提取工艺的研究较多,但报道结果不尽相同,多采用正交设计考察温度、提取时间、溶媒用量这3个因素<sup>[8]</sup>,不够全面。本实验以总鞣质水解后的没食子酸为指标成分,采用响应面法考察提取次数、提取时间、液料比和提取温度对总鞣质提取工艺的影响<sup>[9-13]</sup>,为五倍子的深度开发和总鞣质的综合利用提供参考。

## 1 材料

LC-20AD型高效液相色谱系统(日本岛津),BS2242S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),TDZ5-WS型台式低速自动平衡离心机(湖南湘仪实验开发有限公司),FW135型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。五倍子(南京海源中药饮片有限公司,批号140110,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* 叶上的虫瘿),没食子酸对照品(成都瑞芬思科技有限公司,批号M-017-130711),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 没食子酸的含量测定

**2.1.1 色谱条件<sup>[17]</sup>** Kromasil 100-5C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(15:85),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长273 nm,进样量10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称定没食子酸对照品8.22 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密吸取0.822 g·L<sup>-1</sup>没食子酸对照品溶液0.5, 0.25, 0.5, 0.5, 0.2 mL,分别置于1, 1, 5, 10, 10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得系列对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 3 \times 10^7 X + 84\ 650$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围0.016 ~ 0.411 g·L<sup>-1</sup>。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 精密称定五倍子粉末

(过3号筛)2 g,按一定条件水浴浸提,过滤,合并滤液,加水定容至50 mL量瓶中,得提取液。精密吸取提取液5 mL置具塞锥形瓶中,水浴挥干,精密加入4 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液50 mL,水浴加热水解3.5 h,放冷,过滤,精密量取续滤液1 mL,置20 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 提取次数** 加8倍量水,于60℃水浴中分别提取1, 2, 3次,每次60 min,按2.1.4项下方法平行制备3份供试品溶液,按2.1.1项下条件测定,计算没食子酸得率分别为42.52%, 51.63%, 44.61%,故选择提取2次。

**2.2.2 提取时间** 固定提取数2次,加水量8倍,每次分别于60℃水浴浸提30, 60, 90, 120, 150 min,按2.1.4项下方法平行制备5份供试品溶液,按2.1.1项下条件测定,计算没食子酸得率分别为41.42%, 37.44%, 42.86%, 47.41%, 37.75%,说明提取120 min效果最佳。

**2.2.3 液料比** 确定提取数2次,每次120 min,分别加6, 8, 10, 12, 14倍量水于60℃水浴浸提,按2.1.4项下方法平行制备5份供试品溶液,按2.1.1项下条件测定,计算没食子酸得率分别为51.22%, 40.85%, 55.80%, 53.72%, 49.72%,故选择液料比10:1。

**2.2.4 提取温度** 确定提取数2次,时间120 min,液料比10:1,提取温度分别为30, 40, 50, 60, 70, 80℃。按2.1.4项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.1项下条件测定,计算没食子酸得率分别为37.15%, 50.35%, 53.03%, 54.44%, 49.02%, 42.98%,故选择提取温度60℃。

**2.3 响应面法优化提取条件** 在单因素试验基础上,选择料液比、提取次数、提取时间及温度为自变量,进行四因素三水平的Box-Behnken中心组合设计,试验安排及结果见表1,1~24号为析因试验,25~29号为中心试验。29个试验点分为析因点和零点,其中析因点为因素 $X_1, X_2, X_3$ 和 $X_4$ 所构成的多维空间顶点,零点为区域的中心点,中心点试验进行5次,用以估计试验误差。采用响应面法分析4个随机因子对响应值(没食子酸和浸出物得率)的影响,优化总鞣质的水浴加热浸提条件。

利用Design-Expert软件对表1中数据进行回归统计分析,得回归方程  $Y_1 = 51.17 + 6.09X_1 + 1.25X_2 + 1.92X_3 + 0.75X_4 + 0.75X_1X_2 + 1.15X_1X_3 + 0.33X_1X_4 + 0.61X_2X_3 + 1.45X_2X_4 + 0.13X_3X_4 -$

表1 五倍子总鞣质 Box-Behnken 中心组合试验分析  
Table 1 Box-Behnken test analysis of total tannin from *Galla Chinensis*

No.	$X_1$ 提取数 /次	$X_2$ 提取时间 /min	$X_3$ 液料比 /mL·g <sup>-1</sup>	$X_4$ 提取温度 /°C	没食子酸 得率 ( $Y_1$ )/%	浸出物 得率 ( $Y_2$ )/%
1	1	90	10	60	32.57	40.21
2	3	90	10	60	48.23	52.01
3	1	150	10	60	30.74	45.14
4	3	150	10	60	49.39	53.41
5	2	120	8	40	43.28	54.06
6	2	120	12	40	45.98	55.31
7	2	120	8	80	45.88	55.42
8	2	120	12	80	49.11	54.67
9	1	120	10	40	35.93	44.78
10	3	120	10	40	43.79	52.19
11	1	120	10	80	34.70	45.09
12	3	120	10	80	43.89	53.79
13	2	90	8	60	41.70	53.47
14	2	150	8	60	44.98	57.22
15	2	90	12	60	45.07	57.58
16	2	150	12	60	50.77	59.48
17	1	120	8	60	36.07	42.14
18	3	120	8	60	44.64	56.23
19	1	120	12	60	37.72	46.36
20	3	120	12	60	50.90	50.44
21	2	90	10	40	42.52	53.85
22	2	150	10	40	42.98	53.99
23	2	90	10	80	41.84	55.92
24	2	150	10	80	48.11	56.82
25	2	120	10	60	50.90	64.64
26	2	120	10	60	51.64	63.29
27	2	120	10	60	50.23	65.48
28	2	120	10	60	52.98	64.78
29	2	120	10	60	50.11	65.34

$7.46X_1^2 - 3.67X_2^2 - 1.52X_3^2 - 3.78X_4^2$  ( $r = 0.9342$ ),  
 $Y_2 = 64.71 + 4.53X_1 + 1.08X_2 + 0.44X_3 + 0.63X_4 -$   
 $0.88X_1X_2 - 2.50X_1X_3 + 0.32X_1X_4 - 0.46X_2X_3 -$   
 $0.79X_2X_4 - 0.50X_3X_4 - 11.70X_1^2 - 4.53X_2^2 -$   
 $4.12X_3^2 - 4.93X_4^2$  ( $r = 0.9760$ )。回归方程一次项中  
 各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对响应值  
 的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。由方  
 程可知,影响五倍子总鞣质提取率的因素顺序为  
 $X_1 > X_3 > X_2 > X_4$ ; 2个响应值的变化分别有93.42%  
 和97.60%来源于所选变量的变化,且呈现出显著

性。对方程进行回归方差分析,结果见表2。

方差分析表明,对于响应值  $Y_1$ ,一次项  $X_1, X_3$   
 和二次项  $X_1^2, X_2^2, X_4^2$  的  $P$  都  $< 0.01$ ,均具有极显著  
 影响,其他因素则均无显著性影响;对于响应值  $Y_2$ ,  
 一次项  $X_1$ ,交互项  $X_1X_3$  和二次项  $X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$  的  $P$   
 均  $< 0.01$ ,均具有极显著性差异,因素  $X_3$  则具有显  
 著性差异。失拟项的2个  $P$  均  $> 0.05$ ,无统计学意  
 义,说明拟合度良好,未知因素对试验结果干扰很  
 小,而且2个模型回归的  $P$  均  $< 0.0001$ ,说明模型  
 回归高度显著,可较好地预测五倍子总鞣质提取工  
 艺与各因素的变化规律。各自变量对  $Y_1$  和  $Y_2$  影响  
 的响应面分别见图1,2。

由图1可知,在  $X_1$  较小的情况下,随着  $X_2, X_3$   
 和  $X_4$  的增加,曲面的变化平缓,说明  $X_1$  较小时,即  
 使延长  $X_2$ ,加大  $X_3$ ,提高  $X_4$  也不会明显增加没食子  
 酸的得率;而在  $X_1$  较大的区域,得率随  $X_2, X_3$  和  $X_4$   
 增加而显著提高,这与回归方程中的正号相吻合,同  
 时出现了曲面最高点,反映了交互作用对响应值的  
 影响达到最大。在提取数  $> 1$  次时,  $X_2, X_3$  和  $X_4$  对  
 响应值的影响比  $X_1$  对其的影响更加显著;在  $X_4$  较  
 低时,  $X_3$  对响应值的影响较大,但二者的交互作用  
 不强。同理可分析其他因素。

由图2可知,在  $X_1$  和  $X_2$  均较小的交点区,曲面  
 明显向下弯曲,提示这时两因素的交互作用抑制了  
 浸出物的得率,等高线排列紧密说明在  $X_1$  较小的区  
 域,  $X_2$  对该响应值的影响很大,随着  $X_2$  的延长,得  
 率呈上升趋势,但延长到一定时间后开始下降。当  
 $X_2$  较短,等高线排列较密集,表明在  $X_2$  不是很充足  
 时,  $X_4$  对浸出物得率的影响显著,提高  $X_4$  能明显提  
 高浸出物得率;而在  $X_2$  较充分时,等高线排列相对  
 疏松,表明对浸出物的得率影响不是很明显;说明这  
 2个因素间互相抑制,与回归方程中的系数为负号  
 相符。

**2.4 验证试验** 经过 Design-Expert 软件优化的五  
 倍子总鞣质最佳提取工艺为提取数 2.26 次,时间  
 124.66 min,液料比 10.38:1,提取温度 62.05 °C,预  
 测没食子酸和浸出物得率分别为 53.89%,  
 64.88%。考虑实验条件的可操作性,工艺条件修正  
 为提取数 2 次,时间 125 min,液料比 10.4:1,提取  
 温度 62 °C。精密平行称定 3 份五倍子粉末,每份  
 2.0 g,按优选的工艺进行验证试验,结果没食子酸、  
 浸出物平均得率分别 55.67%,65.11%,与理论预  
 测值的相对偏差分别为 3.30%,0.35%。说明优选  
 的提取工艺参数准确可靠。

表 2 回归方程统计分析

Table 2 Statistical analysis of regression equation

方差来源	f	没食子酸得率			浸出物得率		
		SS	F	P	SS	F	P
$X_1$	1	445.42	92.30	<0.000 1	246.16	110.44	<0.000 1
$X_2$	1	18.85	3.91	0.068 2	14.13	6.34	0.024 6
$X_3$	1	44.08	9.14	0.009 1	2.34	1.05	0.322 8
$X_4$	1	6.83	1.41	0.254 1	4.73	2.12	0.167 5
$X_1X_2$	1	2.24	0.46	0.507 3	3.12	1.40	0.256 8
$X_1X_3$	1	5.31	1.10	0.311 8	25.05	11.24	0.004 7
$X_1X_4$	1	0.44	0.09	0.766 6	0.42	0.19	0.672 3
$X_2X_3$	1	1.46	0.30	0.590 4	0.86	0.38	0.545 5
$X_2X_4$	1	8.44	1.75	0.207 2	0.14	0.07	0.802 8
$X_3X_4$	1	0.07	0.02	0.905 7	1.00	0.45	0.513 9
$X_1^2$	1	361.40	74.89	<0.000 1	887.19	398.03	<0.000 1
$X_2^2$	1	87.51	18.13	0.000 8	133.19	59.75	<0.000 1
$X_3^2$	1	15.05	3.12	0.099 2	110.18	49.43	<0.000 1
$X_4^2$	1	92.89	19.25	0.000 6	157.82	70.80	<0.000 1
模型	14	958.83	14.19	<0.000 1	1269.87	40.69	<0.000 1
失拟项	10	61.98	6.20	0.072 1	28.19	3.74	0.107 7
残差	14	72.46			31.21		
纯误差	4	5.58			3.02		

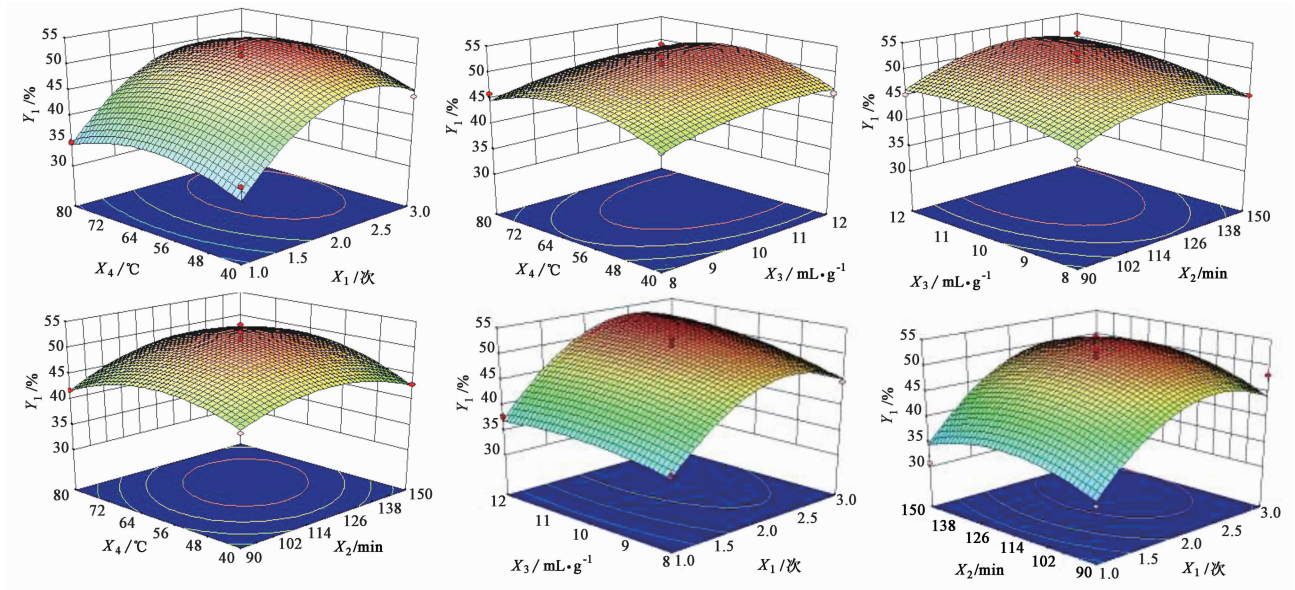


图 1 料液比、提取次数、提取时间及温度交互作用对没食子酸得率影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface and contour of effects of interaction between solid-liquid ratio, extraction times, extraction time and temperature on gallic acid yield

### 3 讨论

五倍子总鞣质属于可水解鞣质,是复杂多元酚类的混合物,相对分子质量较大、极性、易溶于水,

而且水是价廉易得、安全无毒的提取溶剂。此外,考虑到过长时间加热易使总鞣质分解,故选取水为提取溶剂,水浴浸提法为提取方法。测定五倍子中总

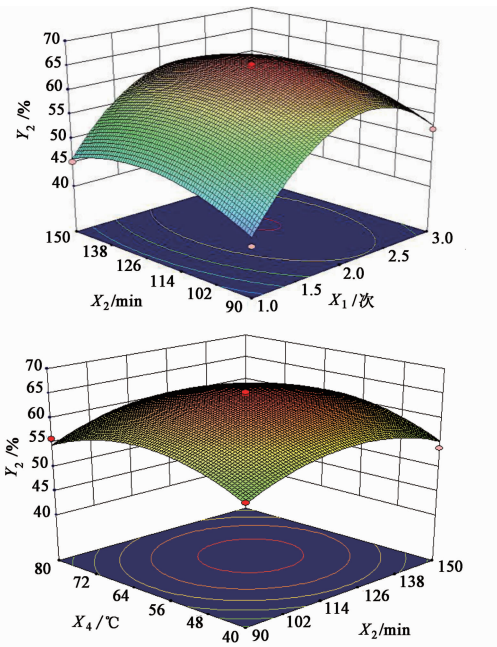


图 2 料液比、提取次数、提取时间及温度交互作用对浸出物得率影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface and contour of effects of interaction between solid-liquid ratio, extraction times, extraction time and temperature on extract yield

鞣质含量的方法很多<sup>[15-16]</sup>,包括滴定法<sup>[16]</sup>和紫外分光光度法<sup>[17]</sup>,但由于滴定法的误差较大,紫外分光光度法的操作较复杂、繁琐,故本文利用加酸加热水解总鞣质生成没食子酸,通过 HPLC 测定没食子酸含量来评价总鞣质的提取工艺,操作简单、结果重复性好。浸出物得率可反映五倍子中水溶性物质提取的情况,可为五倍子的后续制剂方面研究提供一定参考依据,故选择浸出物得率为指标之一。

回归方程及方程的检验结果显示,各因素影响五倍子总鞣质提取率的排序为提取次数 > 液料比 > 提取时间 > 提取温度,五倍子总鞣质是水溶性物质,提高温度可促进其溶出,但由于其属水解类鞣质,温度过高,又可能会使其分解,故将温度作为考察因素;从方程  $F$  检验可明显看出,虽然因素间的交互作用不完全显著,可能是因为水浴浸提法不像超声提取法那样可以作用于细胞膜,但每个因素的平方项却极其显著,说明各因素的影响不是简单的线性关系,而是高度卷曲的。

[参考文献]

[1] 栗世婷,张晓霞,吴蓉瑛. 鞣质药理活性的研究新进展[J]. 疾病监测与控制,2010,4(7):395-397.  
[2] 李秀萍,李春远,渠桂荣,等. 五倍子的研究概况[J].

中医药学报,2002,30(3):72-74.

[3] 吴玲芳,袁永兵,王坤凤,等. 可水解鞣质单体化学与药理作用研究进展[J]. 中草药,2014,45(2):290-299.  
[4] 雷志钧,夏新华,张婷,等. 虎杖总鞣质的提取工艺优选及吸湿性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):30-32.  
[5] 陈毅挺,戴婷婷,李艳霞,等. 翻白草中鞣质的微波提取工艺研究[J]. 分析测试技术与仪器,2014,20(2):73-78.  
[6] 申明乐. 五倍子加压提取单宁的工艺研究[J]. 山东化工,2007,36(12):11-13.  
[7] 谢松,童志平,谭睿,等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取川西老鹳草中鞣质工艺优选[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2912-2914.  
[8] 杜瑞莲,杨中林. 五倍子中鞣质提取工艺研究[J]. 中成药,2008,30(6):839-841.  
[9] 张生潭,王兆玉,兰新宇,等. 响应面法优化麻疯树叶总黄酮提取工艺及其抗菌活性研究[J]. 中药材,2013,36(2):308-311.  
[10] 刘艳清,汪洪武,蔡璇,等. 响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材,2014,37(2):333-337.  
[11] Sahin S, Aybastier Ö, Isik E. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology [J]. Food Chem, 2013, 141(2):1361-1368.  
[12] Hossain M B, Brunton N P, Patras A, et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology [J]. Ultrason Sonochem, 2012, 19(3):582-590.  
[13] Tabandeh F, Khodabandeh M, Yakhchali B, et al. Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture [J]. Chem Eng Sci, 2008, 63(9):2477-2483.  
[14] 常星洁,刘汉清,邹建荣,等. 响应面法优化女贞子有效成分的提取工艺[J]. 中成药,2012,34(5):839-842.  
[15] 闵凡芹,张宗和,秦清,等. 负压空化法提取五倍子单宁酸的响应面法优化[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(9):1240-1244.  
[16] 吕翔,杨子祥,李杨,等. 五倍子单宁含量测定方法的比较研究[J]. 西南农业学报,2012,25(3):1080-1084.  
[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:62.

[责任编辑 刘德文]