

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.003

响应面法优化盐肤木总鞣质回流提取工艺*

叶永华¹, 杨玲¹, 徐伟¹, 连红², 许文¹, 叶淼¹, 郑海音^{3△}

(1. 福建中医药大学药学院·生物医药研发中心, 福建 福州 350122; 2. 福州海王金象中药制药有限公司, 福建 福州 350014; 3. 福建中医药大学中西医结合学院, 福建 福州 350122)

摘要:目的 优选盐肤木中总鞣质的提取工艺。方法 以总鞣质提取率为考察指标,在单因素试验基础上,以提取时间、液料比和提取温度为考察因素,采用响应面设计原理优选提取工艺。结果 盐肤木中总鞣质最佳提取工艺为乙醇提取浓度70%,液料比20.71:1,提取温度60℃,提取时间72.57 min,提取2次。结论 响应面法优选的盐肤木总鞣质提取工艺简单,提取效率高,可预测性良好。

关键词:盐肤木;总鞣质;提取工艺;响应面分析法

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)09-0009-05

Optimization of Refluxing Extraction Process of Total Tannins from *Rhus chinensis* by Response Surface Methodology

YE Yonghua¹, YANG Ling¹, XU Wei¹, LIAN Hong², XU Wen¹, YE Miao¹, ZHENG Haiyin³

(1. Centre of Biomedical Research & Development, School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350122; 2. Fuzhou Neptunus Jinxiang Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou, Fujian, China 350014; 3. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350122)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of total tannin from *Rhus chinensis*. **Methods** The extraction rate of total tannin was taken as the index, on the basis of single factor test, the extraction time, liquid-to-solid ratio and extraction temperature were selected as the investigation factors, and the optimal extraction process of total tannins from *Rhus chinensis* was determined by response surface design principle. **Results** The optimal extraction conditions of total tannin from *Rhus chinensis* were as follows: extraction concentration of ethanol was 70%, liquid-to-solid ratio was 20.71:1, extraction temperature was 60℃ and extraction time was 72.57 min with extraction 2 times. **Conclusion** The extraction process of total tannin from *Rhus chinensis* by response surface methodology is simple, efficient and predictable.

Key words: *Rhus chinensis*; total tannins; extraction process; response surface methodology

盐肤木 *Rhus chinensis* Mills. 为漆树科 Anacardiaceae 盐肤木属 *Rhus* 落叶小乔木^[1],其叶上的虫瘿称为五倍子,主要由五倍子蚜 *Melaphis chinense* (Bell) Baker 寄生而形成^[2]。五倍子具有敛肺降火、涩肠止泻、固精缩尿等功效,临床用于治疗肺虚久咳、肺热痰嗽、久泻久痢、自汗盗汗、消渴、便血痔血、外伤出血、痈肿疮毒、皮肤湿烂等,其主要药效物质为鞣质类成分等。鞣质是一类具有沉淀蛋白质特性的多元酚类化合物^[3],存在于很多植物,具有显著清除自由基及抗肿瘤等药理作用^[4]。陈丹妮等^[5]利用响应面法优化了五倍子中鞣质的提取工艺,但盐肤木中产生虫瘿的量很少,即从盐肤木虫瘿即五倍子中获得活性鞣质,难以满足现代中药业的需求。本课题组前期开展了盐肤木药材的化学成分研究^[6],发现盐肤木根中也富含与五倍子一致的鞣质类成分,同时现代化学研究也表明盐肤木药材和其虫瘿一样,含有相同的鞣质类成分^[7-10],对于盐肤木的提取工艺研究仅有针对

黄酮类成分的方法^[11-12],对鞣质提取工艺的研究鲜有报道。因此,本研究在单因素考察基础上,采用响应面法设计优化盐肤木总鞣质的提取工艺,为盐肤木总鞣质的开发利用奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:UV-1800型可见分光光度计(日本岛津公司);CPA225D型天平(十万分之一,德国赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FY135型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

试剂:盐肤木(安徽协和成药业饮片有限公司,批号为15122201),经福建中医药大学范世明高级实验师鉴定为盐肤木 *Rhus chinensis* Mills. 的干燥根,标本(编号为YFM20151003)存放于福建中医药大学生物医学研发中心标本室;没食子酸(纯度≥90.8%,中国食品药品检定研究院,批号为110831-201605);碳酸钠、磷酸钨

*基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目[81803678];福建省高校产学研合作项目[2016Y4007];福建省科技厅引导性项目[2016Y0057]。

第一作者:叶永华,男,硕士研究生,研究方向为天然药物的开发,(电子信箱)2472696524@qq.com。

△通信作者:郑海音,女,博士研究生,副教授,研究方向为天然药物抗炎免疫基础,(电子信箱)zhyfjtem@sina.com。

酸、乙醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

取没食子酸对照品 12.5 mg,精密称定,置 25 mL 棕色容量瓶中,加水充分溶解,稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL 置 50 mL 容量瓶中,并加水定容,摇匀,即得质量浓度为 0.05 g/L 对照品溶液。

2.2 含量测定方法

鞣质含量 = 总酚酸含量 - 不被吸附的多酚含量^[13]。

总酚酸含量测定:精密量取供试品溶液 1.0 mL,置 25 mL 棕色容量瓶中,加入磷钼钨酸试液 1.0 mL、水 11.0 mL,用 29.0% Na_2CO_3 溶液稀释至刻度,摇匀,放置 35 min,以相应试剂为空白,按紫外-可见分光光度法在 760 nm 波长处测定吸光度,根据标准曲线计算含量。

不被吸附的多酚含量测定方法:精密量取供试品溶液 3.0 mL,置于已加入 0.6 g 干酪素的具塞锥形瓶中,加水,补足体积至 100.0 mL,密塞,于 30 ℃ 水浴中保温 1 h,实时振摇,于最后 10 min 静置,取出,放冷,取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,精密量取续滤液 3.0 mL,依法测定总酚酸的吸光度,根据标准曲线计算不被吸附的多酚含量。

取干酪素 0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 100.0 mL 水,同法制备空白溶液,进行干酪素空白干扰试验。

2.3 线性关系考察

精密量取没食子酸对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 25 mL 棕色容量瓶中, 分别加入磷

钼钨酸溶液 1.0 mL, 再分别加水 11.5, 11.0, 10.0, 9.0, 8.0, 7.0 mL, 最后分别用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 35 min, 以同样处理试剂为空白显色体系, 在 760 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y = 89.83X + 0.021$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明, 没食子酸质量浓度在 1.0 ~ 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

2.4 提取工艺单因素考察

评价指标:以总鞣质提取率为评价指标考察, 总鞣质提取率 = 总鞣质含量(mg)/药材质量(g) $\times 100\%$ 。

乙醇提取浓度:精密称取盐肤木粉末 5.0 g, 置锥形瓶中, 提取液料比 20:1, 乙醇提取溶剂比例分别设为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 浸渍 30 min, 回流提取 1 h, 按 2.2 项下方法测定总鞣质含量, 结果见图 1A。乙醇浓度在 40% ~ 60%, 总鞣质提取率与乙醇提取浓度呈正相关, 但超过 60% 乙醇浓度后, 总鞣质提取率反而下降。初步确定乙醇提取浓度为 50% ~ 70%。

提取温度:精密称取盐肤木粉末 5.0 g, 置锥形瓶中, 加入 20 倍量 60% 乙醇提取溶剂, 提取温度分别设置为 40, 50, 60, 70, 80 ℃, 浸渍 30 min, 分别提取 1 h, 按 2.2 项下方法测定总鞣质含量, 结果见图 1B。40 ~ 70 ℃ 时, 总鞣质提取率随温度的升高而升高, 但超过 70 ℃ 后, 提取率反而下降。初步确定提取温度为 60 ~ 80 ℃。

液料比:取盐肤木粉末 5.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 分别加入 5, 10, 15, 20, 25 倍量的 60% 乙醇浸渍 30 min, 回流提取 1 h, 按 2.2 项下方法测定盐肤木中总鞣质的

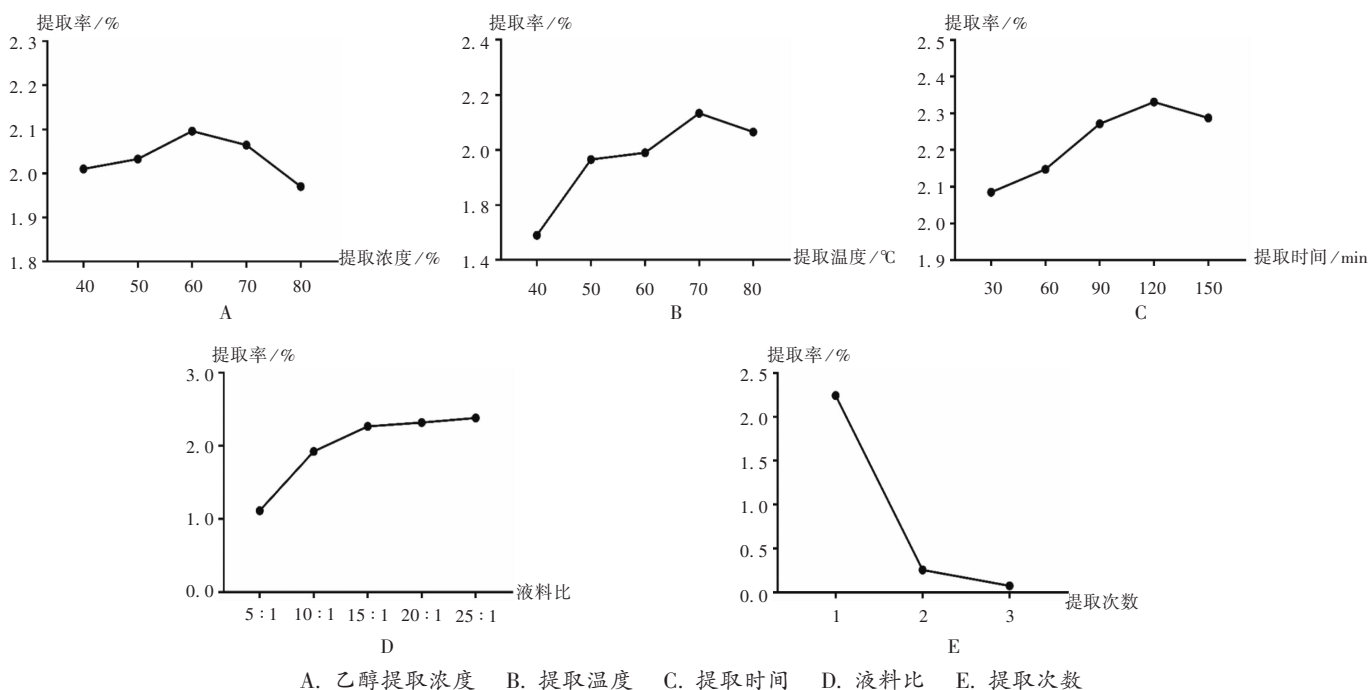


图1 提取影响因素考察结果

含量,结果见图1C。随着液料比的增大,总鞣质的提取率亦逐渐增大,液料比超过20:1后,总鞣质的提取率基本趋于稳定。因此选择液料比为15:1~25:1。

提取时间:取盐肤木粉末5.0g,精密称定,置锥形瓶中,加入20倍量的60%乙醇,浸渍30min后,回流提取时间分别设置为30,60,90,120,150min,按2.2项下测定总鞣质含量,结果见图1D。随着提取时间的延长,总鞣质提取率逐渐上升,提取时间超过120min后提取率略有下降。因此,选择提取时间为60~120min。

回流提取次数:取盐肤木粉末5.0g,精密称定,置锥形瓶中,加入20倍量的60%乙醇,浸渍30min,回流提取1h,提取1,2,3次,按2.2项下方法测定提取液中总酚酸含量,结果见图1E。随着提取次数的增加,总鞣质提取率逐渐降低,提取3次后已提取完全。为了节省试剂、时间等,确定提取次数为2次。

2.5 响应面法优化试验设计

2.5.1 因素水平确定

根据Box-Behnken的中心组合设计原理,在单因素考察基础上,以乙醇浓度(因素A)、料液比(因素B)、提取温度(因素C)、提取时间(因素D)为自变量,以盐肤木总鞣质提取率(Y)为响应值进行试验设计^[15]。确定各单因素对于盐肤木中总鞣质提取的显著性及各因素的最佳提取条件,其因素水平见表1。

表1 因素水平表

编码	因素A(%)	因素B(g/mL)	因素C(°C)	因素D(min)
-1	50	15	60	30
0	60	20	70	60
1	70	25	80	90

2.5.2 响应面分析与提取工艺优化

结合单因素试验结果,以总鞣质为指标,以乙醇提取浓度(因素A)、液料比(因素B)、提取温度(因素C)及提取时间(因素D)为考察因素,结果见表2。

采用Design-Expert8.0.6软件进行多项式回归拟合,建立多元二次响应面回归模型: $Y=2.08-1.000E-002A+0.034B-0.021C+0.018D-0.047AC+0.022BC-0.067CD-0.017A^2-0.041B^2-0.039C^2-0.10D^2$ 。因素的ANOVA分析见表3。可见, $F_{\text{模拟}}=21.89$,且 $P<0.0001$,表明该模型差异有统计学意义,方程与实际的拟合情况相符;失拟项 $P=0.0574$,提示失拟检测无显著性,表明未知因素对试验的干扰较小;模型拟合相关系数 $R^2=0.9341$,表明模型可信度较好,该模型可应用于分析和预测提取工艺参数。

拟合回归方程各项方差分析结果表明,对于响应值Y,因素一次项B,C,D,交互项AC,CD,二次项 B^2 , C^2 , D^2 都对总鞣质提取率的影响显著,其余均无显著性,提

表2 盐肤木总鞣质的提取工艺 Box-Behnken 中心组合试验结果

因素A	因素B	因素C	因素D	提取率(%)	因素A	因素B	因素C	因素D	提取率(%)
0	1	-1	0	2.02	0	-1	-1	0	2.03
-1	0	1	0	2.05	0	-1	1	0	1.94
-1	0	0	1	1.99	0	0	0	0	2.09
0	0	1	-1	2.00	0	1	1	0	2.02
0	-1	0	-1	1.87	0	0	-1	-1	1.88
1	-1	0	0	1.99	1	0	-1	0	2.08
0	1	0	1	2.01	0	0	0	0	2.07
1	0	0	1	1.99	-1	0	-1	0	2.02
1	1	0	0	2.05	-1	0	0	-1	1.96
0	1	0	-1	1.93	1	0	0	-1	1.91
0	0	1	1	1.86	-1	1	0	0	2.08
0	0	0	0	2.07	-1	-1	0	0	1.96
0	-1	0	1	1.91	0	0	0	0	2.07
0	0	-1	1	2.01	0	0	0	0	2.09
1	0	1	0	1.92					

表3 回归方程的显著性检验及方差分析

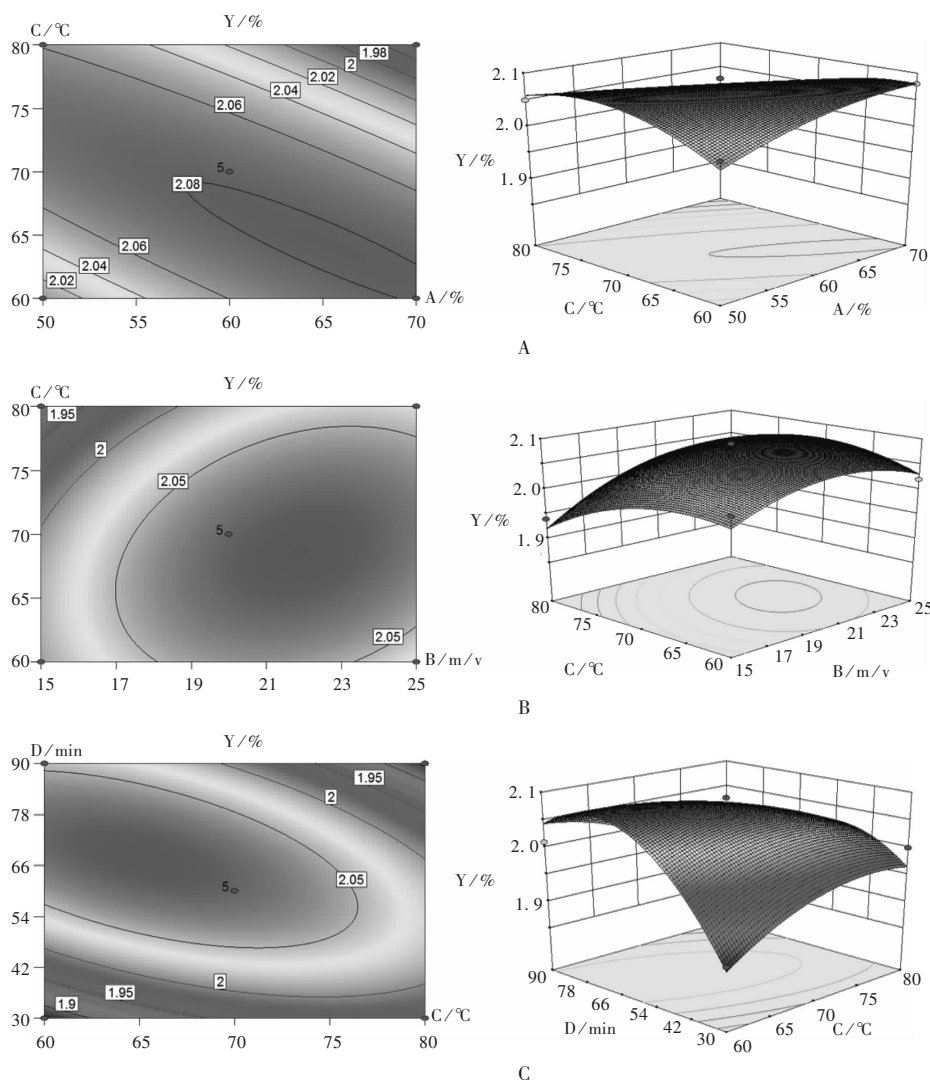
方差来源	方差和	自由度(df)	均方	F值	P值	显著性
模型	0.13	11	0.012	21.89	<0.0001	**
因素A	1.20×10^{-3}	1	1.20×10^{-3}	2.28	0.1498	
因素B	0.014	1	0.014	26.57	<0.0001	**
因素C	5.21×10^{-3}	1	5.21×10^{-3}	9.88	0.0059	*
因素D	4.03×10^{-3}	1	4.03×10^{-3}	7.65	0.0132	*
AC	9.03×10^{-3}	1	9.03×10^{-3}	17.12	0.0007	**
BC	2.03×10^{-3}	1	2.03×10^{-3}	3.84	0.0666	
CD	0.018	1	0.018	34.57	<0.0001	**
A^2	1.95×10^{-3}	1	1.95×10^{-3}	3.70	0.0715	
B^2	0.011	1	0.011	20.76	0.0003	**
C^2	9.66×10^{-3}	1	9.66×10^{-3}	18.31	0.0005	**
D^2	0.068	1	0.068	128.83	<0.0001	**
残差	8.96×10^{-3}	17	5.27×10^{-3}			
失拟性	8.48×10^{-3}	13	6.53×10^{-3}	5.44	0.0574	
纯误差	4.80×10^{-3}	4	1.20×10^{-3}			
总差	0.14	28				

注:** $P<0.001$,* $P<0.05$ 。

示各影响因素与提取率之间并非简单的线性关系。由表3可见,单因素A,B,C,D的F值大小分别为2.28,26.57,9.88,7.65,提示单因素对提取率的影响顺序为 $B>C>D>A$ 。

响应面分析的等高线图和响应面图见图2,根据拟合模型方程可知,只有AC和CD会有相互影响,各图为因素A~D中任意2个变量取零水平时,其余2个变量对盐肤木总鞣质提取率的影响,可更直观地体现2个因素对提取的影响。

由图2A可知,在因素C较小时,随着因素A的变大,曲面变化较快,表明在因素C较小时,随着因素A



A. 乙醇浓度和提取温度 B. 提取温度和液料比 C. 提取时间和提取温度

图2 等高线及响应面图

的增加,总鞣质的提取率增加。在因素 C 较大时,随着因素 A 的增大,总鞣质提取率增加,同时出现了最高点,之后总鞣质提取率降低;由图 2 B 可知,在因素 C 较小时,随着因素 B 的变大,曲面变化较平缓,表明在因素 C 较小时,随着因素 B 的增加,总鞣质的提取率增加较慢。而在因素 C 较大,随着因素 A 的增大,总鞣质提取率增大,同时出现了最高点,之后总鞣质提取率降低;由图 2 C 可知,在因素 C 较小时,随着因素 D 的变大,曲面变化较快,表明在因素 C 较小时,随着因素 D 的增加,总鞣质的提取率增加较快。在因素 C 较大时,随着因素 A 的增大,总鞣质提取率增大,同时出现了最高点。可见,不同因素之间的交互作用对盐肤木中总鞣质的提取有很大影响。

2.5.3 最佳试验条件的预测与验证

用 Design - Expert 软件对盐肤木总鞣质的提取工艺 Box - Benhnken 中心组合试验结果进行分析,得到的总鞣质最佳提取条件为:因素 A 70%,因素 B 20.71:1,

因素 C 60℃,因素 D 72.57 min,盐肤木中总鞣质提取率的预测值为 2.10%。根据优选的提取工艺结果进行验证性试验,平行验证 3 次,盐肤木中总鞣质提取率分别为 2.10%,2.09%,2.13%,平均值为 2.11%,RSD 为 1.01% (n=3),与预测值的相对偏差为 0.474%,表明该方法优选的提取工艺可靠。

3 讨论

本研究中以盐肤木作为原料,首先比较了提取方法,如回流法、超声法、温浸法,结果表明,回流提取法的盐肤木中总鞣质的提取率最高,因此本试验采用回流提取法进行试验;同时对于提取溶剂筛选,前期比较了丙酮、水、乙醇,发现丙酮和乙醇提取的效果接近,均高于水,鉴于丙酮属有毒、易制毒化学试剂,故本试验采用乙醇作为总鞣质的提取溶剂。

本研究中通过单因素考察提取时间、提取温度、液料比和乙醇浓度对盐肤木总鞣质提取优选的基础上,通过 Box - Benhnken 的中心组合设计原理,响应面法分析