

响应面优化倍花水解制备没食子酸的工艺条件

欧阳玉祝 李雪峰 符智荣 张小凤

(吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室,湖南 吉首 416000)

摘要:为了开发倍花深加工产品,本文以倍花为原料,用浓硫酸催化水解制备没食子酸。在单因素试验基础上,采用响应面优化试验考察了水解温度、水解时间和硫酸用量对没食子酸得率的影响。结果表明,在50mL倍花提取液中,用2.47mL 98%浓硫酸催化,97℃温度下水解315min,没食子酸得率为36.01%,试验结果与试验模型预测值相吻合。分离产物用高效液相色谱结合没食子酸标样进行定性分析,结果与标准品一致。本研究能为倍花的开发利用提供理论依据。

关键词:倍花;没食子酸;响应面优化法

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2015.02.0321

倍花(*Chinese gall Beihua*)是产于我国西南山区各省的特色资源之一,是五倍子的一种,单宁酸含量为20%左右^[1-2]。没食子酸是单宁酸的水解产物,具有独特的生理活性和优良的抗氧化活性与自由基清除能力^[3-6],广泛应用于食品、日化、医药和分析检测等领域^[7-12]。在天然资源加工利用中,没食子酸主要由倍子单宁、塔拉单宁和一些含单宁酸的果皮水解制备^[13-17]。响应面法是一种常用的工艺优化方法,在天然产物分离和食品工艺研究方面有广泛的应用^[18-21]。本试验以倍花为原料,用响应面法优化酸催化水解倍花制备没食子酸的工艺条件,并用高效液相色谱对分离产物进行定性鉴定。研究结果能为倍花的深加工提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

倍花由湘西自治州保靖县林力科技有限公司提供,材料购回后经选料、真空干燥后,用植物粉碎机打碎成30目粉末,备用;没食子酸标准品,含量 $\geq 99\%$,由上海江莱生物科技有限公司提供;硫酸、无水乙醇、铬皮粉等均为国产分析纯试剂。

UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津公

司);LC-2010型高效液相色谱仪(日本岛津公司);RE-85Z型旋转蒸发器;SHB-III循环水式多用真空泵;DF-101S集热式恒温磁力搅拌器;JA2003N型电子天平。

1.2 试验方法

1.2.1 倍花提取液的制备方法 取5g倍花粉末和500mL水于1000mL烧杯中,30℃浸泡12h。过滤,定容于1000mL容量瓶中。取该溶液25mL稀释并定容于1000mL容量瓶中,得倍花提取液,备用。

1.2.2 没食子酸的制备方法 取50mL倍花提取液于150mL圆底烧瓶中,缓慢加入试验量的浓硫酸,在一定温度下水解一定时间,水解液加一定量铬皮粉,振荡15min,抽滤,滤液用紫外可见分光光度计测吸光度,计算没食子酸含量。

1.3 分析方法

1.3.1 标准曲线的绘制 按参考文献[22]配置梯度浓度的没食子酸标准溶液,用紫外可见分光光度计测标准溶液在270nm处的吸光度,绘制标准曲线,并经线性回归得回归方程和相关系数为:

$$C = 0.0225A, \quad R = 0.9997$$

式中C为标准溶液浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);A为标准溶液的吸光度。

收稿日期:2013-11-29 接受日期:2014-11-10

基金项目:吉首大学植物资源保护与利用湖南省高校重点实验室开放基金项目(13jdz094)

作者简介:欧阳玉祝,男,教授,主要从事天然产物开发和食品添加剂研究;E-mail:ouyanghxhg@163.com

通讯作者:同第一作者。

1.3.2 没食子酸含量分析 取 10mL 水解液稀释成 200mL 溶液,加一定量的铬皮粉吸收单宁酸,取上层清液,以水为参比用紫外可见分光光度计测 270nm 处吸光度。将吸光度带入回归方程计算水解液中没食子酸质量,按下式计算得率:

$$\text{没食子酸得率} = \frac{\text{水解液中没食子酸的质量}}{\text{倍花粉质量}} \times 100\%$$

1.3.3 色谱分析 色谱条件: 色谱柱为 Wondasil C18-WR 柱 (250mm × 4.6mm, 5 μ m); 流动相为 100%。

甲醇 - 0.05% 磷酸水溶液 = 10 : 90, 流速为 1.0mL·min⁻¹; 检测波长为 273nm; 柱温为 30℃; 进样量为 20 μ L。

试验数据经色谱工作站处理,并与标准品对照,确定分离产品与标准品的一致性。

2 结果与分析

2.1 水解反应单因素试验

2.1.1 水解温度 温度不同水解程度不同,没食子酸的得率将不同。取 50mL 倍花提取液,按 1.2.2 方法缓慢加入 2mL 浓硫酸,在不同温度下加热水解 120min,考察水解温度对没食子酸得率的影响(表 1)。

由表 1 可知,随水解温度升高,没食子酸得率增大,在 100℃ 时没食子酸的得率最大为 34.26%。由于水解反应在水中,水的沸点为 100℃,最佳反应温度选择 100℃。

2.1.2 水解时间 倍花中没食子酸的羧基可通过与自身的酚羟基或与糖羟基通过酯键结合成单宁,酯键水解生成没食子酸;水解时间不同,酯键的水解程度不同。为了考察水解时间对没食子酸得率的影响,取 50mL 倍花提取液,按 1.2.2 方法缓慢加入 2mL 浓硫酸,在 90℃ 下加热水解不同时间,结果见表 1。由表 1 可知,没食子酸的得率随水解时间增加而增大,到 300min 时基本恒定,得率为 34.31%。由此说明反应 300min 后,倍花中的酯键已经完全水解,没食子酸得率基本恒定。因此最佳水解时间选择 300min。

2.1.3 硫酸用量 倍花中酯键在不同酸度下水解程度不同,因此,硫酸用量直接影响没食子酸得率。取 50mL 倍花提取液,按 1.2.2 方法缓慢加入不同体积的浓硫酸,在 90℃ 下加热水解 120min(表 1)。由表 1 可知,随着浓硫酸用量的增加,没食子酸得率先增加后减少,2.5mL 时达到最大值 33.35%。这是由于浓硫酸用量太少,反应速度慢,反应不完全;浓硫酸用量太大则会

表 1 试验条件对没食子酸得率的影响
Table 1 Influence of experiment condition on extraction ratio of the gallic acid

试验条件 Experiment condition	没食子酸得率 Extraction ratio of the gallic acid/%
水解温度 Hydrolysis temperature/℃	50 12.75 60 14.73 70 17.73 80 23.49 90 30.37 100 34.26
水解时间 Hydrolysis times/min	60 23.14 120 24.97 180 28.12 240 28.63 300 34.31 360 34.70 420 34.79
硫酸用量 Sulfuric acid dosage/mL	0.5 18.54 1.0 20.99 1.5 21.97 2.0 25.43 2.5 33.35 3.0 33.20 3.5 32.69

加速产物氧化。因此硫酸最佳用量 2.5mL。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 Box-behnken 试验设计与结果 在单因素试验结果基础上,采用 Box-behnken 中心组合设计原理^[21],选择水解温度(X_1)、水解时间(X_2)和浓硫酸用量(X_3)3 个因素为影响因素,以没食子酸得率为响应值设计三因素三水平试验,其中在水解温度的设计中,考虑单因素中 100℃ 得率最高,水浴的最高温度为 100℃,因此选择将温度设置为 80、90、100℃ 3 个水平;水解时间设置为 240、300、362min; H_2SO_4 用量设置为 2.0、2.5、3.0mL。根据 Box-Behnken 设计的因素和水平,按 1.2.2 方法进行试验,试验因素水平表和试验结果见表 2、表 3。

2.2.2 模型的显著性检验 以没食子酸得率为响应值,用 Design Expert 8.00 软件对实验结果进行拟合,得出二次多项式数学模型为: $Y = -552.17 + 7.55X_1 + 0.71X_2 + 64.75X_3 - 1.42 \times 10^{-3}X_1X_2 - 0.20X_1X_3 - 0.03X_2X_3 - 0.03X_1^2 - 7.83X_2^2 - 7.07X_3^2$ 。同时,对表 3 数据用 Design Expert 8.00 软件进行回归和方差分析,结果见表 4。

表 2 Box-behnken 因素水平表
Table 2 Factor level of Box-behnken experimental

编码值 Coded value	X ₁ 水解温度 Hydrolysis temperature/°C	X ₂ 水解时间 Hydrolysis times/min	X ₃ 硫酸用量 Sulfuric acid dosage/mL
-1	80	240	2.0
0	90	300	2.5
1	100	360	3.0

表 3 Box-behnken 试验结果
Table 3 Results of Box-behnken experimental

试验号 Number	X ₁ 水解温度 Hydrolysis temperature/°C	X ₂ 水解时间 Hydrolysis times/min	X ₃ 硫酸用量 Sulfuric acid dosage/mL	没食子酸得率 Extraction ratio of the gallic acid/%
1	-1	1	0	26.46
2	1	0	1	34.39
3	1	-1	0	32.35
4	-1	0	-1	22.78
5	0	0	0	34.75
6	0	0	0	34.40
7	-1	0	1	25.53
8	0	0	0	34.74
9	0	-1	-1	25.90
10	0	0	0	35.10
11	0	-1	1	30.13
12	0	1	1	32.55
13	0	0	0	34.82
14	0	1	-1	32.12
15	-1	-1	0	21.07
16	1	1	0	34.34
17	1	0	-1	35.72

由表 4 可知, 试验所选模型的相关系数 $R^2 = 0.9928$, $P < 0.0001$, 表明模型极显著; 模拟调整相关系数 $R_{Adj}^2 = 0.9835$, 表明响应值(得率)变化的 98.35% 来自于所选变量。表 4 中, X_1 、 X_2 和 X_1^2 、 X_2^2 表现为极显著 ($P < 0.0001$); X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 和 X_3^2 表现为显著 ($P < 0.05$)。结合表 4 中各系数项的估计值, 本试验各因素的影响大小顺序依次为: 水解温度 > 水解时间 > 硫酸用量。

2.2.3 响应面分析 根据回归模型作出相应的响应曲面图, 考察拟合响应曲面的形状, 分析各因素对没食子酸得率的影响(图 1)。

利用 Design expert 8.00 软件结合回归模型, 预测倍花水解制备没食子酸的最佳工艺条件为: 水解温度

97.33°C, 水解时间 315.38min, 浓硫酸用量 2.47mL, 模型对没食子酸得率的预测值为 36.87%。

2.2.4 模型验证 为了检验响应面法所得结果的可靠性, 同时考虑试验条件的可操作性, 将提取工艺参数调整为: 水解温度 97°C, 水解时间 315min, 98% 浓硫酸用量 2.47mL。在此条件下进行组合验证试验, 平行试验 5 次得率分别为 35.96%、36.07%、35.93%、36.03% 和 36.05%, 取平均值 36.01%, 比模型的预测值 36.87% 小 0.86%, 表明基于响应曲面法所得的优化水解条件准确可靠, 进一步验证了数学模型的可靠性。

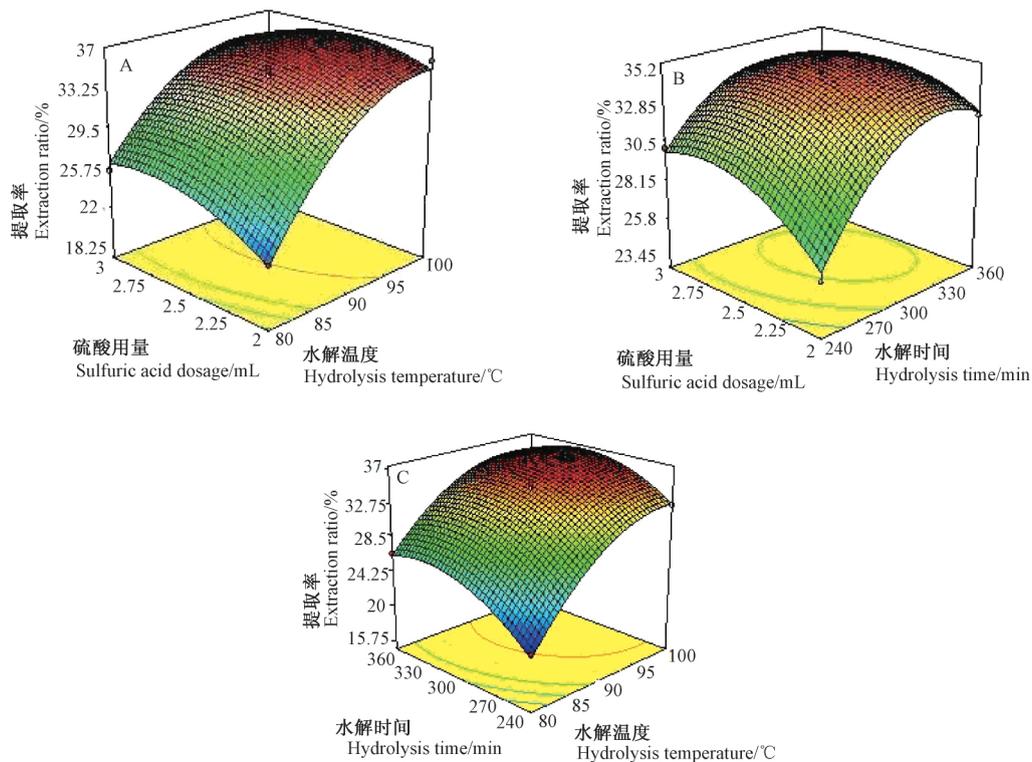
2.3 分离产物的表征

为了验证分离产物是目标产物, 将分离产物按

表 4 回归模型系数显著性检验及方差分析

Table 4 Significance testing and variance analysis of model regression coefficient

系数来源 Source of coefficient	平方和 SS	自由度 df	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型	362.26	9	40.250	107.09	< 0.0001	极显著
X_1	209.72	1	209.720	557.94	< 0.0001	极显著
X_2	32.08	1	32.080	85.35	< 0.0001	极显著
X_3	4.62	1	4.620	12.29	0.0099	显著
X_1X_2	2.89	1	2.890	7.69	0.0276	显著
X_1X_3	4.16	1	4.160	11.07	0.0126	显著
X_2X_3	3.61	1	3.610	9.60	0.0173	显著
X_1^2	48.34	1	48.340	128.62	< 0.0001	极显著
X_2^2	33.45	1	33.450	88.99	< 0.0001	极显著
X_3^2	13.17	1	13.170	35.04	0.0006	显著
失拟	2.38	3	0.790	12.74	0.0160	
净误差	0.25	4	0.062			
残差	2.63	7	0.380			
总离差	364.89	16				
相关系数 R^2	0.9928					
调整相关系数 R_{Adj}^2	0.9835					



注: A: 硫酸用量与水解温度的交互影响; B: 硫酸用量与水解时间的交互影响; C: 水解时间与水解温度的交互影响。

Note: A: Interaction influence of sulfuric acid dosage and hydrolysis temperature; B: Interaction influence of sulfuric acid dosage and hydrolysis time; C: Interaction influence of hydrolysis time and hydrolysis temperature.

图 1 响应曲面图

Fig. 1 Response surface graphs

1.3.3 方法做高效液相色谱分析,并与没食子酸标准品的高效液相色谱图对比,结果见图2。

图2结果表明,试验制得的没食子酸产品的HPLC图与没食子酸标准品的HPLC图吻合,说明本试验制得的产品是目标产物。

3 讨论

没食子酸的生产主要用五倍子单宁水解制得。随着没食子酸应用领域不断拓展,需求量不断增加,造成倍子原料短缺,价格上涨。倍花是一种价格低廉的没食子酸生产原料,具有很大的开发利用空间,但因没食子酸含量低,杂质多,深加工难度大,研究较少。熊国华等^[23]用硫酸水解倍花提取液一步制备没食子酸,收率为23%;陈方平等^[24]研究了倍花酸催化一步水解制工业没食子酸,并进行了工业化生产,产品得率为24.7%;陈茜文等^[25]用碱性水解倍花制备没食子酸,结果表明,在 $n_{\text{单宁酸}}:n_{\text{氢氧化钠}}$ 为1:38,水解时间为100 min,水解温度为106℃,没食子酸得率达48.3%。在上述生产方法中,酸催化时催化剂用量小,但没食子酸得率低;而碱催化时碱的用量大、时设备要求高、三废多。本试验在上述研究的基础上进行改进,在催化剂的选择上,由于碱催化水解工艺碱用量大,时设备要求高,产生的废水多,本法采用浓硫酸催化一步水解工艺,浓硫酸用量少,大大改善了水解条件,减少了废水量。在工艺优化方法上,采用先进的Design Expert设计法优化工艺条件。响应面法就是把多因素试验中因素与指标的相互关系用多元二次回归多项式方程进行拟合,在关注点附近拟合真实的功能函数,形成因素与

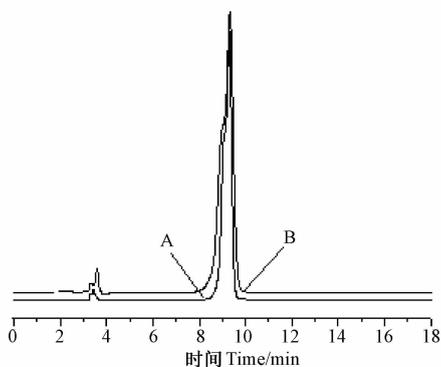
响应值之间的函数关系,建立数学模型和立体响应面,通过模型回归分析、方差分析和响应面分析得到最优工艺条件。本法在单因素基础上,以水解温度、水解时间和催化剂用量为因素,以没食子酸提取率为响应值进行优化试验。回归模型系数的显著性分析表明,数学模型表现为极显著, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 3个立体曲面的交互性影响也表现为显著,说明选择的3个试验因素相互之间对没食子酸提取率都有较大的影响。分析响应面图的坡度陡峭程度,相应面坡度越陡峭、等高线越密集,且呈椭圆形表示两因素相互影响较大^[26]。本试验得到的3个响应面图的坡度都较陡峭,等高线呈椭圆,说明选择的3个试验因素交互性影响较大,与试验模型分析吻合。试验结果表明,没食子酸提取率的模型优化值比验证组合试验值只高出0.86%,表明了优化条件和试验结果的合理性。

4 结论

本试验以倍花为原料,以没食子酸得率为响应值,以水解温度、水解时间和浓硫酸用量为影响因素,用响应面法优化了酸催化水解倍花制备没食子酸的工艺条件。结果表明,在50mL倍花提取液中,用2.47mL 98%的浓硫酸催化,97℃水解315min,没食子酸的得率为36.01%。组合后的试验结果与模型预测值吻合。分离产物用高效液相色谱结合标样进行定性分析,结果与标准品一致。

参考文献:

- [1] 周丽珠. 化学法倍花制取工业单宁酸的试验研究[J]. 林产化工通讯, 2002, 36(1): 19-21
- [2] 陈方平, 金淳. 倍花酸水解放制工业没食子酸[J]. 林产化学与工业, 1989, 9(1): 34-41
- [3] 陈杭君, 李兴飞, 邵海燕, 房祥军. 山核桃仁多酚组分分析及抗氧化研究[J]. 核农学报, 2013, 27(1): 61-67
- [4] 田伟, 毕玉婷, 周启龙, 薛艳红, 仇敏, 但飞君, 刘士平. 没食子酸酯对神经细胞的抗氧化保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(10): 1423-1427
- [5] 谢晓艳, 刘洪涛, 张吉, 李秀英, 李文明, 于超. 没食子酸体外抗氧化作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3): 319-323
- [6] 阮征, 邓泽元, 严奉伟, 高梦祥, 邹琛, 吴谋成. 莱籽多酚和Vc在化学模拟体系中清除超氧阴离子和羟自由基的能力[J]. 核农学报, 2007, 21(6): 602-605
- [7] 冯敏, 严建民, 李澧, 朱佳廷, 李俐俐, 杨萍, 王德宁, 顾贵强. 辐照对宠物干粮食品酸价的影响[J]. 核农学报, 2012, 26(9): 1260-1264
- [8] 王萍, 倪永. 抗氧化剂没食子酸丙酯合成纳米银及其应用[J].



注: A, 标准品, B, 产品。

Note: A: standard substance, B: product.

图2 没食子酸标准品和产品的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chart of standard substance and product

高等学校化学学报, 2013, 34(4): 837-840

- [9] 于艳华, 卜丽梅, 赵丽红, 石卓. 没食子酸对缺血再灌注损伤小鼠的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(20): 2335-2337
- [10] 伍翔群, 于兰, 于杰, 黄彩婷, 许维国, 牛凤兰. 紫外分光光度法在没食子酸体外还原 Fe^{3+} 能力检测中的应用及其意义[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2013, 39(2): 414-418
- [11] 何文飞, 何大维, 马超, 赵丹, 张永波, 卞则栋. 没食子酸抑制人神经母细胞瘤增殖作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 107-111
- [12] 李沐涵, 殷美琦, 冯靖涵, 王明艳. 没食子酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 109-112
- [13] 路祺, 张莹祖, 元刚, 项凤影, 赵春健, 孟庆焕, 张军, 高悦. 塔拉没食子酸的研究进展[J]. 植物研究, 2014, 34(4): 572-576
- [14] 周丽珠, 陆明召, 文超, 曾永明. 塔拉综合利用现状及开发前景[J]. 广西林业科学, 2011, 40(1): 70-71
- [15] 常连举, 张宗和, 黄嘉玲, 徐浩, 仲崇茂. 没食子酸的制备与应用综述[J]. 生物质化学工程, 2010, 44(4): 48-52
- [16] 陈笏鸿, 张宗和, 汪咏梅. 塔拉粉直接碱水解制备没食子酸的工艺研究及应用[J]. 林产化学与工业, 1995, 15(1): 1-8.
- [17] 杨顺楷, 杨亚力. 酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸[J]. 精细与专用化学品, 2005, 13(5): 12-15.
- [18] 张志清, 宋燕, 刘翔. 响应面法优化提取花椒籽蛋白质工艺研究[J]. 核农学报, 2013, 27(7): 988-995
- [19] 杨佳宇, 徐勇威, 孙亚丽, 张珍贞, 李雪峰, 欧阳玉祝. 响应面法优化田基黄总黄酮的吸附工艺[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2012, 33(6): 89-94
- [20] Hui T, Yong H C. Optimization of extraction of bioactive alkaloids and antioxidants from rhizome coptidis (*Coptis Chinensis* Franch) by using response surface methodology [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(3): 799-806
- [21] 张志清, 宋燕, 刘翔. 响应面法优化提取花椒籽蛋白质工艺研究[J]. 核农学报, 2013, 27(7): 988-995
- [22] 欧阳玉祝, 吕程丽, 匡友元. 紫外分光光度法测定路边青中多酚含量[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 1055-1059
- [23] 熊国华, 张强, 汤伟 马奔. 倍花水解制没食子酸[J]. 四川化工, 1994, (1): 14-17
- [24] 陈方平, 金浮, 魏加球. 倍花酸水解法制工业没食子酸[J]. 林产化学与工业, 1989, 9(1): 34-40
- [25] 陈茜文, 谷文众, 王贵武. 倍花浸提液水解制备没食子酸的工艺[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(5): 132-135
- [26] 刘奉强, 肖鉴谋, 刘太泽. 应用响应面法优化超声波提取荆芥中总黄酮的工艺[J]. 南昌大学学报, 2011, 33(2): 149-155

Optimization on Preparation Technological of Gallic Acid From Hydrolysis *Chinese Gall Beihua* With Response Surface Methodology

OU YANG Yuzhu LI Xuefeng FU Zhirong ZHANG Xiaofeng

(Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Utilization of Hunan Province, Jishou University, Jishou, Hunan 416000)

Abstract: In order to exploitation deep processing products of *Chinese gall beihua*, gallic acid was prepared with concentrated sulfuric acid catalytic hydrolysis of *Chinese gall beihua* in this paper. The influences of hydrolysis temperature, times and sulfuric acid dosage on the extraction ratio of gallic acid were studied by response surface methodology (RSM) based on single-factor experiment. The results showed that the extraction ratio of gallic acid from *Chinese gall beihua* is 36.01% with 50mL extraction solution under catalyzed with 2.47mL 98% concentrated sulfuric acid at 97°C for 315min. Experiment results were well matched with the model predicted value. Employed with high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, the results of the separation product are consistent in the standard substance. Theoretical basis was provided for the development and utilization of the *Chinese gall beihua* with the study.

Keywords: *Chinese gall beihua*, gallic acid, response surface methodology