

没食子提取工艺优化及其抑菌作用评价

刘丽鑫¹, 魏玉洁², 杨露萍¹, 米尔扎提·麦麦提², 李丽花³, 马璇^{2*}

[1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆奇沐医药研究院(有限公司), 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆特色药食资源利用创新中心, 新疆 乌鲁木齐 830011]

摘要: **目的** 优化没食子提取工艺, 并考察其抑菌作用。**方法** 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间为影响因素, 干膏得率及没食子酸、鞣花酸 1, 2, 3, 6-四没食子酰葡萄糖、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖含量的综合评分为评价指标, 正交试验优化提取工艺。采用倍比稀释法考察提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的抑制效果。**结果** 最佳条件为乙醇体积分数 65%, 料液比 1:12, 提取时间 45 min, 综合评分为 95.77 分。提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 15.625、31.250、125.000、62.500 mg/mL。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于提取具有较强抑菌作用的没食子。

关键词: 没食子; 提取工艺; 抑菌作用; 正交试验; 倍比稀释法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)06-1972-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.030

人体口腔是一个复杂而完整的微生态系统, 适宜的温度、pH 和相对湿度为口腔内各种微生物的生长、繁殖和定居提供了适宜的环境和条件, 大量研究表明龋齿、牙周病等常见口腔疾病的发生都与微生物关系密切^[1-2]。没食子为没食子蜂科(瘦蜂科)昆虫没食子蜂幼虫寄生于壳斗科植物没食子树 *Quercus infectoria* G. Olivier 幼枝上形成的干燥虫瘿, 是维吾尔族传统特色药材^[3-4], 主产于地中海沿岸、土耳其、伊朗、印度、巴基斯坦等地, 以小亚细亚产量最高, 巴基斯坦是我国主要进口商^[5]。没食子主要活性成分为鞣质、没食子酸、鞣花酸, 具有清洁口腔、固牙止痛、利咽除臭、固气、涩精、敛肺、凉血止血功效, 用于治疗牙龈肿痛出血、创伤出血、牙痛、疮疡久不收口、湿热病等^[6-8]。目前, 关于没食子提取工艺及其抗菌活性的研究较少, 故本实验优化该药材提取工艺, 同时探索其抑菌作用, 为该资源充分利用和深度开发提供理论参考, 并期冀扩展其在医药健康领域中的应用。

1 材料

1.1 试剂与药材 没食子酸、1, 2, 3, 6-四没食子酰葡萄糖、鞣花酸、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰葡萄糖对照品(分析纯, 中国食品药品检定研究院)。营养琼脂(北京奥博星生物技术有限公司)。金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、铜绿假单胞菌(ATCC 15442)、枯草芽孢杆菌(ATCC 9372)[新疆奇沐医药研究院(有限公司)]。没食子(药材市场)经新疆药品检验研究院苏来曼·哈力克主任鉴定为正品。

1.2 仪器 LC-20AT 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);

LDZH-100L 立式高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); WGZ-2XJ 细菌浊度计(上海昕瑞仪器仪表有限公司); SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司); Scan1200 抑菌环测量仪(上海丹必康实业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 干膏得率测定 称取药材适量, 加入 75% 乙醇回流提取, 过滤, 浓缩, 浓缩液置于真空干燥箱中烘干, 粉碎, 称定质量, 计算干膏得率, 公式为得率=(干膏质量/药材质量)×100%。

2.2 含量测定 采用 HPLC 法。

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B), 梯度洗脱, 程序见表 1; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 258 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 磷酸/%
0	5	95
8	10	90
10	15	85
20	15	85
40	20	80
45	15	85
55	5	95
56	95	5
65	95	5
66	5	95
75	5	95

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 消毒产品和消毒器械开发与产业化项目(2021A03002-3)

作者简介: 刘丽鑫(1999—), 女, 硕士, 研究方向为生物医药工程。E-mail: 1325461251@qq.com

* 通信作者: 马璇(1986—), 女, 博士, 硕士生导师, 副高级工程师, 从事新药开发研究。E-mail: mx646@163.com

10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容，即得。

2.2.3 供试品溶液制备 称取药材提取物 0.100 g，纯化水定容至 25 mL，超声处理 30 min，微孔滤膜过滤，即得。

2.2.4 线性关系考察 分别取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

成分	回归方程	R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
没食子酸	Y=9.137 5X-1.695 4	0.999 5	14.69~470.00
1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖	Y=5.729 9X-18.375	0.999 3	12.56~402.00
鞣花酸	Y=41.439X-28.642	0.999 6	5.72~183.00
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	Y=6.250 7X-82.013	0.999 1	15.50~496.00

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液适量，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得没食子酸、1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖、鞣花酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖峰面积 RSD 分别为 1.13%、0.63%、1.03%、1.61%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密吸取供试品溶液 6 份，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖、鞣花酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖峰面积 RSD 分别为 1.83%、1.27%、2.58%、2.13%，表明该方法重复性良好。

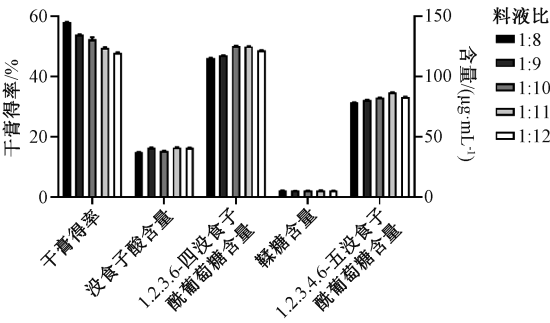
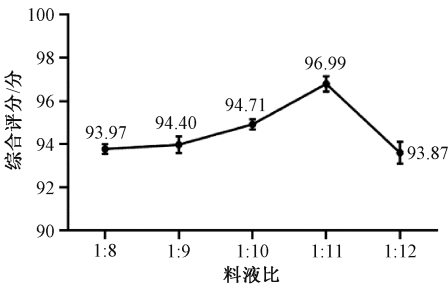


图 1 料液比对综合评分的影响



2.4.2 乙醇体积分数 称取药材粗粉 5 份，每份 50.0 g，以料液比 1：10 分别加入 55%、65%、75%、85%、95% 乙醇，加热煮沸，回流提取 60 min，过滤，重复 3 次，合并

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液，于 0、2、4、8、12 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖、鞣花酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖峰面积 RSD 分别为 1.82%、1.46%、1.59%、2.24%，表明溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取供试品溶液 6 份，加入各成分含量已知的对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，没食子酸、1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖、鞣花酸、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖平均加样回收率分别为 99.02%、101.13%、98.56%、98.99%，RSD 分别为 2.34%、2.78%、2.52%、2.41%。

2.3 综合评分计算 公式为综合评分=干膏得率/干膏得率_{max}×0.2+没食子酸含量/没食子酸含量_{max}×0.2+1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖含量/1,2,3,6-四没食子酰葡萄糖含量_{max}×0.2+鞣花酸含量/鞣花酸含量_{max}×0.2+1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖含量/1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖含量_{max}×0.2。

2.4 单因素试验

2.4.1 料液比 称取药材粗粉 5 份，每份 50.0 g，分别以料液比 1：8、1：9、1：10、1：11、1：12 加入 75% 乙醇，加热煮沸，回流提取 60 min，过滤，重复 3 次，合并滤液，浓缩，烘干，粉碎，计算综合评分，结果见图 1。由此可知，随着料液比减小，综合评分先升高后降低，为 1：11 时达到最大值。

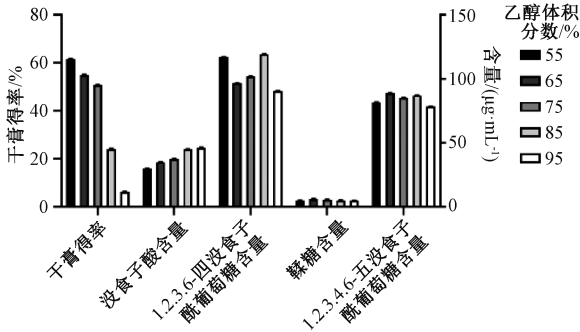
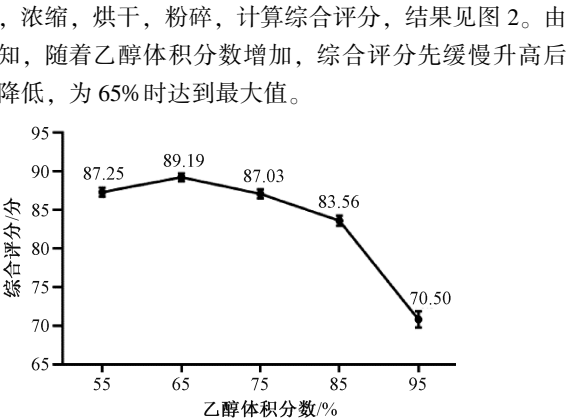


图 2 乙醇体积分数对综合评分的影响



2.4.3 提取时间 称取药材粗粉 5 份，每份 50.0 g，以料液比 1：10 加入 75% 乙醇，加热煮沸，分别回流提取 30、45、60、75、90 min，过滤，重复 3 次，合并滤液，浓缩、

烘干，粉碎，计算综合评分，结果见图 3。由此可知，随着提取时间延长，综合评分先升高后降低，为 50 min 时达到最大值。

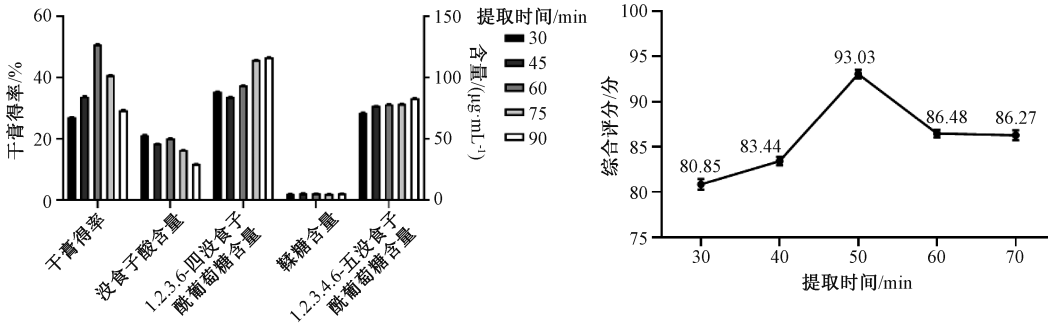


图 3 提取时间对综合评分的影响

2.5 正交试验 在单因素试验基础上，选择料液比 (A)、乙醇体积分数 (B)、提取时间 (C) 作为影响因素，干膏得率及没食子酸、鞣花酸 1，2，3，6-四没食子酰葡萄糖、1，2，3，4，6-五没食子酰葡萄糖含量的综合评分 (Y) 作为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行设计，因素水平见表 3，结果见表 4。由此可知，各因素影响程度依次为 $C>A>B$ ；最优工艺为 $A_2B_1C_2$ ，即料液比 1：11，乙醇体积分数 55%，提取时间 50 min，综合评分为 96.65 分。

表 3 正交试验因素水平 (n=4)

水平	因素			
	A 料液比	B 乙醇体积分数/%	C 提取时间/min	D(空白)
1	1：10	40	45	1
2	1：11	50	60	2
3	1：12	60	75	3

表 4 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	Y 综合评分/分
1	1	1	1	1	85.62
2	1	2	2	2	92.45
3	1	3	3	3	87.75
4	2	1	2	3	96.65
5	2	2	3	1	92.73
6	2	3	1	2	89.12
7	3	1	3	2	91.13
8	3	2	1	3	86.75
9	3	3	2	1	92.12
K_1	265.82	273.40	261.49	270.47	—
K_2	278.50	271.93	281.22	272.70	—
K_3	270.00	268.99	271.61	271.15	—
k_1	88.61	91.13	87.16	90.16	—
k_2	92.83	90.64	93.74	90.90	—
k_3	90.00	89.66	90.54	90.38	—
R	4.23	1.47	6.58	0.74	—

方差分析见表 5。由此可知，各因素影响程度依次为 $C>A>B$ ；最优工艺为 $A_2B_1C_2$ ，与表 4 一致；因素 A、C 有显著影响 ($P<0.05$)，B 无显著影响 ($P>0.05$)。

2.6 验证试验 按“2.5”项下优化工艺进行 3 批验证试验。结果，综合评分分别为 96.11、95.15、96.05 分，平均

值为 95.77 分，与预测值 96.65 分的相对偏差仅为 0.91%，表明该模型具有良好的预测性，提取工艺准确可行。

表 5 方差分析结果

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	96.089	6	16.015	36.779	0.027
截距	73 679.674	1	73 679.674	169 209.998	<0.001
A	27.834	2	13.917	31.961	0.030
B	3.361	2	1.681	3.860	0.206
C	64.893	2	32.447	74.516	0.013
误差	0.871	2	0.435	—	—
总计	73 776.633	9	—	—	—

2.7 抑菌作用评价

2.7.1 药液制备 药材按“2.5”项下优化工艺进行提取，烘干，研磨成粉末，采用倍比稀释法制成质量浓度分别为 250.000、125.000、62.500、31.250、15.625、7.812 5 mg/mL 的溶液，即得。

2.7.2 菌悬液制备 挑取已活化的单菌落，置于 10 mL 磷酸缓冲液中，混匀，细菌浊度计测定其含菌浓度，磷酸盐缓冲液稀释至 $5\times10^6\sim5\times10^7$ CFU/mL，即得。

2.7.3 最小抑菌浓度 (MIC) 测定 吸取“2.7.2”项下菌悬液 10 μ L，置于 20 mL 量瓶中，灭菌，冷却，转移到 50 $^{\circ}$ C 营养琼脂培养基中，摇匀，倒入平板中凝固。取无菌干燥的滤纸片，每片滴加 20 μ L “2.7.1”项下药液，室温自然干燥，每个平板贴放 3 片试验样片、1 片阴性对照样片，每片滴加 20 μ L 无菌蒸馏水，并且各样片中心之间相距 25 mm 以上，与平板边缘相距 15 mm 以上，在 37 $^{\circ}$ C 下培养 16~18 h，抑菌环分析仪测量抑菌圈直径^[9-10]，重复 3 次，结果见表 6 (抑菌圈直径大于 7 mm 时，有抑菌作用；小于等于 7 mm 时，无抑菌作用，初次出现抑菌圈的质量浓度即为 MIC^[11])。由此可知，药材提取物对 4 种菌种的 MIC 分别为 15.625、31.250、125.000、62.500 mg/mL。

3 讨论与结论

没食子成分复杂，其有效成分对于药效发挥起着至关重要的作用，由于它们在不同提取条件下可能表现出不同的活性和稳定性，故仅以单一指标进行优化往往不能保证

表 6 MIC 测定结果 (mm, $\bar{x}\pm s$)

菌种	提取物质量浓度/(mg·mL ⁻¹)						
	空白	250.000	125.000	62.500	31.250	15.625	7.812 5
金黄色葡萄球菌	—	20.11±0.17	18.24±0.24	15.10±0.14	11.40±0.34	8.33±0.11	—
大肠杆菌	—	22.04±0.11	18.80±0.10	16.60±0.42	13.20±0.20	—	—
铜绿假单胞菌	—	16.67±0.32	13.63±0.23	—	—	—	—
枯草芽孢杆菌	—	16.43±0.53	13.57±0.36	10.17±0.42	—	—	—

注：—表示无抑菌圈。

其整体质量^[12]。本实验采用多指标综合评分^[13]优化没食子提取工艺,发现其稳定可靠,重复性好,可为今后该药材有效成分的合理开发提供参考依据。

没食子具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等多种生物活性^[14-15],其所含的没食子酸、鞣花酸能通过使微生物体内原生质凝固,并抑制细菌代谢所需的多种酶类,从而发挥抑菌作用^[16-17]。本实验发现,没食子提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌均具有一定抑制作用,并与剂量呈正相关,效果依次为金黄色葡萄球菌>大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>铜绿假单胞菌,上述差异可能是由于大肠杆菌和铜绿假单胞菌为革兰氏阴性菌,其细胞壁被厚厚的脂多糖膜覆盖^[18-19];金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌为革兰氏阳性菌,仅有单个肽聚糖层^[20-22]。今后,还需进一步考察没食子对不同病原菌抑制作用存在差异的原因,探讨其抑制口腔有害微生物的作用机制,以期对相关新型抗菌活性成分的发现和天然抗生素的开发提供参考依据。

参考文献:

[1] Rosier B T, Marsh P D, Mira A. Resilience of the oral microbiota in health; Mechanisms that prevent dysbiosis[J]. *J Dent Res*, 2018, 97(4): 371-380.

[2] 陈敏珊,李 林,李 平.天然提取物的抑菌研究及其在口腔护理产品中的应用[J].口腔护理用品工业,2016,26(4): 16-20.

[3] 霍仕霞,陈两绵,祖力皮卡尔·吾斯曼,等.一测多评法同时测定没食子药材及制剂西帕依固龈液中 5 个没食子鞣质[J].药物分析杂志,2023,43(5): 780-792.

[4] 王教玉,张起辉,邓旭明,等.没食子的药理研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(10): 2570-2572.

[5] 塔布斯·马那尔,苏来曼·哈力克.没食子质量标准研究[J].中国现代中药,2022,24(7): 1246-1252.

[6] 丁 艳,白姣姣,萨巴海提·阿不力米提,等.基于化学成分、药理作用和网络药理学的没食子质量标志物预测分

析[J].中中药学,2024,22(3): 708-714.

[7] 张小莉.没食子中没食子酸提取及抑菌效力比较[J].海峡药

学,2021,33(2): 76-78.

[8] 龚 晶.没食子物质基础及其主要活性成分的药代动力学研究[D].广州:广州中医药大学,2017.

[9] 谭才邓,朱美娟,杜淑霞,等.抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J].食品工业,2016,37(11): 122-125.

[10] 中华人民共和国卫生部.消毒技术规范[S].2002.

[11] 谢小丽,王 凯,胡 璇,等.黎药复方牙膏的制备及其抑菌作用评价[J].香料香精化妆品,2023(6): 82-88.

[12] 张 霞,蓝苑元,任萃文.中药复方制剂制备工艺研究进展[J].中国现代中药,2007,9(4): 38-40.

[13] 陈登丰,何孝金,魏道智.多指标综合评分法优化绞股蓝乙醇提取工艺[J].海峡药

学,2017,29(10): 10-12.

[14] Yu W, Su X, Chen W, *et al.* Three types of gut bacteria collaborating to improve KuiJie' an enema treat DSS-induced colitis in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108751.

[15] 柯发敏,张开莲.没食子酸的研究进展[J].泸州医学院学报,2011,34(4): 440-442.

[16] 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.

[17] 张小莉,李 雪,高苏妮,等.没食子和五倍子体外抑菌作用比较研究[J].中国药业,2018,27(23): 29-31.

[18] 江福林,卢云浩,何 强.茶多酚对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的双向调节作用[J].食品工业科技,2023,44(22): 152-159.

[19] 殷泽禄,万 虎.大肠杆菌的研究综述[J].甘肃畜牧兽医,2019,49(5): 33-35.

[20] 孙建林,吕新翔.金黄色葡萄球菌的致病机制[J].医学综述,2022,28(12): 2363-2367.

[21] 卢 晓,周 磊,谢鲲鹏,等.没食子酸对金黄色葡萄球菌抑菌活性及机制研究[J].中国食用菌,2012,31(4): 54-56; 61.

[22] 冯 鹏,俞骏晨,王易鑫,等.竹燕窝提取物的抑菌活性研究[J].饲料研究,2024,47(1): 80-85.