

Box-Behnken 响应面法优化川佛手挥发油的超临界 CO₂ 萃取工艺^Δ

陈斯玮*, 王芳, 章卓, 张丹[#](西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3973-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.26

摘要 目的: 优化川佛手挥发油成分超临界 CO₂ 萃取的提取工艺。方法: 以挥发油得率为指标, 分别考察萃取温度、萃取压力、CO₂ 流量、萃取时间、分离压力和分离温度等单因素对川佛手挥发油得率的影响。在此基础上, 选取影响显著的萃取温度、萃取压力、CO₂ 流量和萃取时间 4 个因素, 采用 Box-Behnken 响应面法优化超临界 CO₂ 萃取工艺参数。结果: 在萃取温度 67 ℃、萃取压力 57 MPa、CO₂ 流量 22 L/h 和萃取时间 4 h 时, 川佛手挥发油超临界 CO₂ 萃取得率最高, 达到 1.892% ($n=3$), 与预测值(1.937%) 的相对误差为 2.32%。结论: 优选的川佛手挥发油的超临界 CO₂ 萃取工艺合理、可行。
关键词 Box-Behnken 响应面法; 川佛手; 挥发油; 超临界 CO₂ 萃取

Optimization of SFE-CO₂ Extraction Technology of Volatile Oil from *Citrisarcodactylis fructus* by Box-Behnken-response Surface Methodology
CHEN Siwei, WANG Fang, ZHANG Zhuo, ZHANG Dan (College of Pharmacy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize SFE-CO₂ extraction technology of volatile oil from *Citrisarcodactylis fructus*. METHODS: Using the yield of volatile oil as index, the influences of extraction temperature, extraction pressure, CO₂ flow, extraction time, acquisition pressure and acquisition temperature on the yield of volatile oil were investigated. Moreover, 4 significant factors, such as extraction temperature, extraction pressure, CO₂ flow and extraction time, were selected; the parameters of SFE-CO₂ extraction technology were optimized by Box-Behnken design-response surface methodology. RESULTS: The results showed that the highest extraction rate could be obtained with extraction temperature at 67 ℃, extraction pressure at 57 MPa, CO₂ flow at 22 L/h and extraction time for 4 h. The highest extraction rate was 1.892% ($n=3$), and the relative error between it and predicted value (1.937%) was 2.32%. CONCLUSIONS: Optimized SFE-CO₂ extraction technology for volatile oil from *C. fructus* is reasonable and feasible.
KEYWORDS Box-Behnken-response surface methodology; *Citrisarcodactylis fructus*; Volatile oil; SFE-CO₂ extraction

中药佛手 *Citrisarcodactylis fructus* 始载于《本草纲目》, 为芸香科植物佛手 *Citrus Medica* L. var *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实。佛手因产地不同有广佛手、川佛手、金佛手之分。川佛手为四川道地中药材, 具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰之功效^[1]。挥发油为川佛手主要的药效成分, 具有抗肿瘤、抑制黑色素、抗菌、抗氧化、提高免疫力、止咳平喘等作用^[2-4]。现代药理研究发现, 佛手挥发油对人肝癌 Hep3B、Huh7, 骨髓瘤 SP20, 肺癌 A549, 人胰腺癌 PANC-28, 黑色素瘤 B16, 人乳腺癌 MDA-MB-435 等瘤株均有不同程度的抗肿瘤活性^[5-6]。如何有效提高川佛手萃取过程中的挥发油含量, 一直是川佛手研究的热点。因此, 在本研究中笔者以川佛手挥发油的得率为考

察指标, 采用 Box-Behnken 响应面法对其超临界 CO₂ 萃取工艺参数进行优化^[7-8], 为改进川佛手挥发油生产工艺奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

HA221-50-01 超临界流体萃取设备(江苏南通华安超临界萃取有限公司); ZWH-2S 机械粉碎机(河南天鸿机械厂); DYYB-10 系列台式冷冻干燥机(上海德洋意邦仪器有限公司); 恒平 HT12 电子台秤(无锡市恒平工业设备有限公司)。

1.2 药材与试剂

川佛手(泸州天植中药饮片有限公司, 批号: 20150405-009)经西南医科大学药教研室庄元春副教授鉴定为芸香科

[9] Huang YX, Wu YB, Wu JG, et al. Chemical constituents from *Ligustrum lucidum* differentially promote bone formation and prevent oxidative damage in osteoblastic UMR-106 cells[J]. *Lat Am J Pharm*, 2014, 33(2): 258.
[10] Ma SC, He ZD, Deng XL, et al. In vitro evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum*

as antiviral agents[J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(11): 1471.
[11] He ZD, But PPH, Chan TWD, et al. Antioxidative glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum*[J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(6): 780.
[12] 陶益, 张畅, 李伟东, 等. 对照提取物法测定女贞子饮片中 4 种成分的含量[J]. *中国药房*, 2015, 26(33): 4685.
[13] 王丹, 吕亚丽, 刘春生, 等. 女贞子中裂环烯醚萜总苷的含量测定[J]. *药学服务与研究*, 2012, 12(1): 52.

Δ 基金项目: 四川省教育厅科研项目(No.16ZB0205)
* 讲师, 硕士。研究方向: 中药新制剂、新工艺。电话: 0830-3190325。E-mail: 6746763@qq.com
通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药制剂与炮制。E-mail: 393335427@qq.com

(收稿日期: 2016-03-23 修回日期: 2016-06-03)
(编辑: 刘 萍)

植物佛手 *Citrus Medica* L. var *sarcodactylis* Swingle 的干燥果实; CO₂(泸州客隆生物技术有限公司, 纯度: >99.9%)。

2 方法与结果

2.1 药材的处理与挥发油得率的计算

将新鲜川佛手果经冷冻干燥后粉碎, 过60目筛备用。每次精密称定100 g川佛手粉末装入超临界萃取装置, 收集分离产物并计算挥发油得率。挥发油得率(%) = 挥发油质量(g)/川佛手生药质量(g) × 100%。

2.2 单因素试验考察

根据相关文献及预试验结果^[9-12], 预先设定萃取温度为80℃、萃取压力为50 MPa、分离温度为50℃、分离压力为15 MPa、CO₂流量为20 L/h、萃取时间为3 h。之后保持其他因素不变, 依次改变萃取压力为10、30、50、70、90 MPa, 萃取温度为50、65、80、95、110℃, CO₂流量为10、20、30、40、50 L/h, 分离压力为10、15、20、25、30 MPa, 分离温度为25、35、45、55、65、75℃, 萃取时间为1、2、3、4、5 h, 考察上述因素对挥发油得率的影响。单因素试验考察结果见图1。

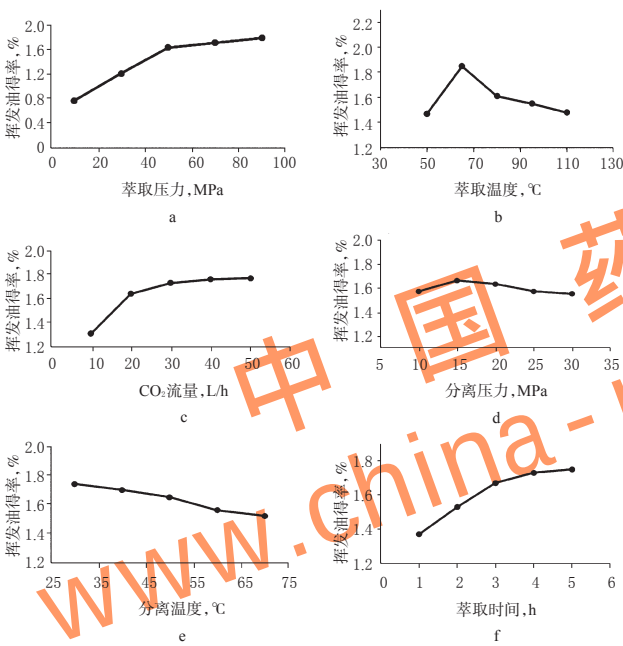


图1 各因素对挥发油得率的影响

a. 萃取压力; b. 萃取温度; c. CO₂流量; d. 分离压力; e. 分离温度; f. 萃取时间

Fig 1 Effects of factors on the yield of volatile oil

a. extraction pressure; b. extraction temperature; c. CO₂ flow; d. separation pressure; e. separation temperature; f. extraction time

由图1a可见, 挥发油得率随萃取压力的升高逐渐增加, 当萃取压力达到50 MPa后增加趋势逐渐变缓, 故选择萃取压力为50 MPa。由图1b可见, 挥发油得率随萃取温度的上升逐渐增加, 当萃取温度达到65℃时得率最大, 之后则逐渐降低, 出现这一现象的原因可能是温度过高, 挥发油损耗增加, 从而导致得率下降, 故选择萃取温度为65℃。由图1c可见, 挥发油得率随CO₂流量的增大逐渐增加, 当CO₂流量达到20 L/h后增加趋势逐渐变缓, 故选择CO₂流量为20 L/h。由图1d和图1e可见, 分离压力和分离温度对挥发油得率的影响较小。由图1f可见, 挥发油得率与萃取时间成正相关, 且1~3 h内增加明显, 3 h后增加趋势逐渐变缓, 故选择萃取时间为3 h。

2.3 Box-Behnken响应面法优化挥发油提取工艺

在单因素试验结果基础上, 采用Box-Behnken响应面法设

计试验, 以萃取压力(A, MPa)、萃取温度(B,℃)、CO₂流量(C, L/h)、萃取时间(D, h)4个因素为响应因子, 以川佛手挥发油得率(%)为响应值进行试验。因素与水平见表1, 正交试验设计与结果见表2, 方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A(萃取压力), MPa	30	50	70
B(萃取温度), °C	50	65	80
C(CO ₂ 流量), L/h	10	20	30
D(萃取时间), h	2	3	4

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of test

试验号	A, MPa	B, °C	C, L/h	D, h	挥发油得率, %
1	0	0	1	-1	1.80
2	0	0	0	0	1.83
3	0	0	-1	-1	1.24
4	1	-1	0	0	1.44
5	-1	0	0	1	1.31
6	0	-1	1	0	1.52
7	0	-1	0	-1	1.43
8	0	0	0	0	1.84
9	1	1	0	0	1.12
10	0	1	1	0	1.29
11	1	0	0	-1	1.74
12	0	1	0	-1	1.55
13	0	1	0	1	1.77
14	-1	0	-1	0	0.91
15	1	0	1	0	1.57
16	0	0	0	0	1.81
17	-1	0	1	0	0.88
18	0	0	0	0	1.83
19	0	-1	-1	0	1.21
20	1	0	-1	0	1.45
21	0	-1	0	1	1.71
22	-1	-1	0	0	1.15
23	0	0	-1	1	1.38
24	1	0	0	1	1.81
25	0	0	0	0	1.65
26	0	0	1	1	1.95
27	-1	0	0	-1	0.91
28	1	1	0	0	1.73
29	0	1	0	-1	1.61

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表2试验数据进行多元回归拟合, 设4个因素29个试验, 零点试验重复5次。由表3方差分析结果可得出, 影响挥发油得率的主次因素顺序为: A>D>C>B; A、C、D、BC、A²、C²、B²对挥发油得率的影响有统计学意义(P<0.05)。挥发油得率的回归方程 $Y=1.86+0.82A+0.025B+0.064C-0.071D+0.073AB+0.030AC-0.066AD+0.042BC+0.028BD-0.018CD+0.33A^2-0.17B^2+0.054C^2+0.037D^2$ (R²=0.896 8)。模型P=0.000 1<0.001, 说明各响应值对该模型的影响是显著的。失拟项P=0.099 7>0.05, 为不显著, 说明回归方程和试验拟合情况好, 试验误差小, 未知因素对试验结果影响较小, 可应用该回归方程对不同萃取条件下川佛手挥发油得率进行预测。通过回归方程预测的挥发油萃取的最优工艺条件为: 萃取压力56.68 MPa、萃取温度67.33℃、CO₂流量22.14 L/h、萃取时间4 h。在此条件下, 预测

川佛手挥发油得率为1.937%。

表3 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
模型	2.410	14	0.170	8.690	0.000 1
A	1.000	1	1.000	50.280	<0.000 1
B	0.031	1	0.031	1.560	0.231 8
C	0.120	1	0.120	6.150	0.026 5
D	0.130	1	0.130	6.670	0.021 7
AB	0.026	1	0.026	1.290	0.275 1
AC	5.625×10^{-3}	1	5.625×10^{-3}	0.280	0.602 8
AD	0.027	1	0.027	1.370	0.261 0
BC	0.099	1	0.099	5.000	0.042 1
BD	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.045	0.834 4
CD	2.500×10^{-5}	1	2.500×10^{-5}	1.260×10^{-3}	0.972 2
A ²	0.710	1	0.710	35.640	<0.000 1
B ²	0.130	1	0.130	6.540	0.022 8
C ²	0.350	1	0.350	17.510	0.000 9
D ²	3.813×10^{-4}	1	3.813×10^{-4}	0.019	0.891 7
残差	0.280	14	0.020		
失拟项	0.250	10	0.025	3.930	0.099 7
纯误差	0.026	4	6.420×10^{-3}		
总离差	2.690	28			

注： $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$
Note： $F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.00$

当萃取压力、萃取温度、CO₂流量和萃取时间中有2个因素为固定值时,绘制其他2个因素及其交互作用对挥发油得率影响的响应面及等高线图。其中,以CO₂流量与萃取温度的交互作用较显著,结果见图2,其余因素交互作用不显著(图略)。

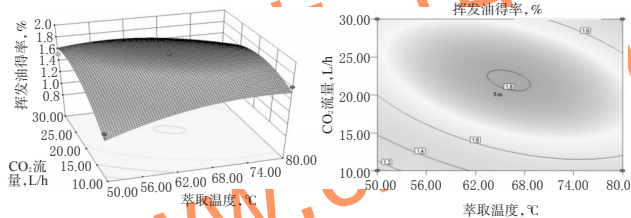


图2 CO₂流量与萃取温度对挥发油得率影响的三维响应面图和等高线图

Fig 2 Three-dimensional response surface and contour of the CO₂ flow and extraction temperature on the extraction rate of volatile oil

2.4 验证试验

结合生产实际,最终确定川佛手挥发油的超临界CO₂萃取工艺条件为:萃取压力57 MPa,萃取温度67℃,CO₂流量22 L/h,萃取时间4 h。按此条件分别进行了3次验证试验,结果川佛手挥发油得率的平均值为1.892% (RSD=0.68%, n=3),与预测值(1.937%)相比,相对误差为2.32%。实测值与预测值接近,说明模型可靠。

3 讨论

中药挥发油成分的萃取,目前主要有水蒸气蒸馏、微波提取法、压榨法、溶剂法以及超临界萃取法,尤其是近年来兴起的超临界CO₂萃取法,具有效率高、萃取速度快、工艺和操作简单等优点,适合于一些对热敏感、容易氧化分解破坏的成分的提取和分离。在最优工艺条件下,可以将所需成分几乎完全提出,从而提高产品的回收率和资源的利用率^[13-14]。同时,由于萃取工艺简单、无污染,分离后的超临界流体经精制可循环

使用,故其在工业化生产中应用越来越广泛。响应面法作为一种有效的试验设计方法,可进行多因素多水平试验研究,并可研究因素间的交互作用,根据综合指标得到最优工艺,避免了常规正交设计试验只能对单个因素水平进行分析以及无法给出直观图形的缺陷^[15]。在挥发油萃取领域,超临界CO₂萃取技术与响应面法的结合在中药生产研究中有广泛的应用。因此在本试验中,笔者利用响应面法中Box-Behnken模式设计,以川佛手挥发油得率为指标,运用响应面法考察萃取压力、萃取温度、CO₂流量和萃取时间4个主要因素对川佛手挥发油超临界CO₂萃取工艺的影响,并对提取工艺条件进行优化,取得了较好的结果。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:178.

[2] 吕学维,邵邻相,张均平,等.佛手挥发油对B16黑色素瘤细胞体外增殖的抑制作用[J].中国粮油学报,2011,26(8):50.

[3] 施长春,王建英,朱婉萍,等.佛手挥发油对哮喘的治疗作用[J].实用儿科临床杂志,2010,25(4):287.

[4] 郭卫东,郑建树,邓刚,等.佛手挥发油抑菌活性的研究[J].中国粮油学报,2009,24(8):103.

[5] 麻艳芳,邵邻相,张均平,等.佛手挥发油对MDA-MB-435人乳腺癌细胞体外增殖的影响[J].中国药理学杂志,2012,45(22):1737.

[6] 邵邻相,高海涛,成文召,等.佛手挥发油对小鼠体内B16黑色素瘤生长的影响[J].浙江师范大学学报,2012,35(2):184.

[7] 隋晓,丛培江.超临界CO₂萃取技术在中草药提取中的应用进展[J].青岛大学学报,2001,16(2):72.

[8] 谢予朋,李平华,闫芸,等.正交试验优选超临界CO₂流体萃取藿香正气方中挥发油的工艺[J].中国药房,2008,19(27):2111.

[9] 黎乃维,马丽杰,金海珠.超临界CO₂流体萃取法提取迷迭香中主要挥发性成分研究[J].食品研究与开发,2014,35(14):47.

[10] 纪莎,胡雯玲,何丹鸿,等.正交试验优化超临界CO₂萃取法提取黄芪中黄芪甲苷工艺[J].中国医院药学杂志,2015,35(1):65.

[11] 张丹,廖芳,周洁,等.Box-Behnken Design-响应面法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究[J].中草药,2015,46(3):359.

[12] 程晶,雷建都,刘静,等.响应面法优化人参叶总皂苷提取工艺的研究[J].北京林业大学学报,2015,37(2):142.

[13] 刘华钢,陆峥琳,赖茂祥,等.中药挥发油类成分提取分离研究概况[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(11):5.

[14] 杜志炉,王建英,吴绵斌.不同方法提取的佛手挥发油气相色谱-质谱分析结果比较[J].中国药业,2006,15(3):21.

[15] 赵立春,杨更亮.响应曲面法在中药有效成分提取中的应用研究[J].中药与临床,2013,4(6):62.

(收稿日期:2016-01-04 修回日期:2016-08-16)
(编辑:刘明伟)