

星点设计-响应面法优化山楂有机酸的提取工艺[△]

熊科元*, 万丹娜, 邵峰#, 赵海平, 刘荣华, 黄慧莲, 杨明(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2241-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.22

摘要 目的:优化山楂有机酸的提取工艺。方法:在单因素试验基础上,以液料比、提取时间及乙醇体积分数为自变量,以有机酸得率为因变量,采用星点设计-响应面法优化山楂有机酸提取工艺。结果:最优提取工艺条件为山楂按液料比18.5:1加入75%乙醇,回流提取2次,每次2.0 h;验证试验的有机酸得率平均值为5.22%(RSD=2.70%, $n=3$),与模型预测值(5.13%)的相对误差为1.75%。结论:优化建立的山楂有机酸提取工艺方法简单,重现性和可预测性较好。

关键词 山楂;有机酸;提取工艺;星点设计-响应面法

Extraction Technology Optimization for Organic Acids in *Crataegi Fructus* by Central Composite Design-response Surface Method

XIONG Keyuan, WAN Danna, SHAO Feng, ZHAO Haiping, LIU Ronghua, HUANG Huilian, YANG Ming(Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology for organic acids in *Crataegi fructus*. METHODS: Based on single factor test, using liquid-solid ratio, extraction time and ethanol volume fraction as independent variables, extraction yield of organic acids as dependent variable, central composite design-response surface method was used to optimize the extraction technology of organic acids in *Crataegi fructus*. RESULTS: The optimal extraction technology was as follow as liquid-solid ratio of 18.5:1, adding 75% ethanol, reflux extraction twice, 2.0 h each time. Average extraction yield of organic acids in verification test was 5.22% (RSD=2.70%, $n=3$), with 1.75% relative error of the predicted value (5.13%). CONCLUSIONS: Optimized extraction technology for organic acids in *Crataegi fructus* is simple, with good reproducibility and predictability.

KEYWORDS *Crataegi fructus*; Organic acids; Extraction technology; Central composite design-response surface method

山楂为蔷薇科山楂属(*Crataegus* L.)植物山里红(*Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N.E.Br.)或山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)的干燥成熟果实,味酸、甘,性微温,归脾、胃、肝经,具有消食健胃、行气散瘀之功效^[1],临床常用于治疗消化系统与心脑血管系统疾病^[2]。山楂主要含有机酸类、黄酮类、三萜类化合物及其他类成分。现代药理研究表明,山楂有机酸具有较好的消食导滞作用^[3]。为此,本课题组在参考文献[4]及2015年版《中国药典》“山楂”项下相关内容的基础上,采用单因素试验及星点设计-响应面法对山楂有机酸提取工艺进行优化,以期对山楂有机酸资源的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

PHS-25数显pH计、E-201-C pH复合电极(上海仪电科学仪器股份有限公司);EYELA N-1100旋转蒸发仪

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260638);江西省自然科学基金资助项目(No.20161BAB205220);江西省卫生计生委中医药科研计划课题(No.2016A053);江西省研究生创新专项资金项目(No.YC2016-B079);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(No.JZYC16B02)

*讲师。研究方向:中药质量评价。E-mail:258561309@qq.com

#通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:中药质量评价。E-mail:shaofeng0729@163.com

[日本东京理化(上海)仪器有限公司]。

1.2 药材、药品与试剂

山楂于2015年10月9日购自山东平邑,经江西中医药大学刘荣华教授鉴定为山里红的干燥成熟果实;枸橼酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100396-200301,供含量测定用);乙醇、氢氧化钠均为分析纯,水为自制双蒸水。

2 方法与结果

2.1 有机酸含量测定方法

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取枸橼酸对照品97.8 mg,用水溶解,定容于250 mL量瓶中,制备成0.391 mg/mL的对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液制备 取30 g山楂粉碎成粗粉,加一定量的乙醇回流提取2次,过滤,合并滤液。取50 mL提取液,减压回收溶剂至无醇味,加水定容于100 mL量瓶中,即得,备用。

2.1.3 标准溶液滴定曲线建立 参考文献[1,5],精密吸取20 mL枸橼酸对照品溶液置于烧杯中,浸入电极,搅拌,用0.05 mol/L的氢氧化钠溶液滴定。开始每滴加1 mL滴定液,搅拌并记录电位;至近终点时,每滴加0.1 mL滴定液,搅拌并记录电位;至突跃点已过,仍应继续滴加几次滴定液,并记录电位;同时进行空白校正。以电

位变化量与体积变化量之间的比值为纵坐标($\Delta E/\Delta V$)、电位变化前后所用滴定液体积平均值为横坐标(V)作滴定曲线,曲线的极大值对应的滴定液消耗体积为滴定终点消耗值。结果,消耗的滴定液体积为2.35 mL,与理论值(2.44 mL)基本吻合。每1 mL滴定液(0.1 mol/L)相当于6.404 mg的枸橼酸。

取“2.1.1”项对照品溶液与“2.1.2”项供试品溶液滴定,2种溶液的滴定曲线见图1。

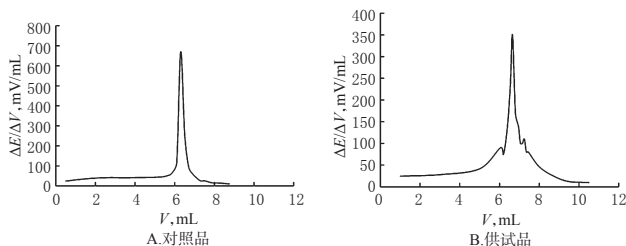


图1 滴定曲线

Fig 1 Titration curve

2.1.4 精密度、重复性、稳定性和加样回收率试验 按相关方法进行操作。结果精密度试验RSD为1.43% ($n=6$),表明该方法精密度良好;重复性试验RSD为2.40% ($n=6$),表明该方法重复性良好;稳定性试验RSD为0.97% ($n=5$),表明供试品溶液在24 h内稳定;加样回收率试验的平均回收率为96.5% (RSD=2.26%, $n=9$)。

2.1.5 含量测定 精密量取20 mL供试品溶液置于烧杯中,浸入电极,搅拌,按照“2.1.3”项下方法测定,计算有机酸含量 $[C \times K \times (V - V_0) \times (100/20) \times (V_1/50)]$,式中 V 为滴定样品消耗氢氧化钠溶液的体积; V_0 为空白消耗氢氧化钠溶液的体积; C 为氢氧化钠溶液浓度(即0.05 mol/L); K 为换算成枸橼酸的系数(即0.001 mol氢氧化钠相当于枸橼酸的系数, $K=0.064$); V_1 为供试品溶液体积。

2.2 单因素试验筛选有机酸提取工艺

分别对影响提取效果的液料比、提取时间、乙醇的体积分数进行单因素考察。

2.2.1 液料比 称取山楂粗粉3份,每份30 g,分别按液料比5:1、10:1、15:1、20:1、25:1加入60%乙醇溶液,回流提取1 h,提取2次,合并滤液,测定有机酸含量并计算有机酸得率(Y ,有机酸含量/药材质量 $\times 100\%$),结果见图2A。

由图2A可知,当液料比由5:1升高到10:1时, Y 大幅提高;而当液料比由10:1增加至25:1时, Y 变化并不明显;当液料比为20:1时, Y 最高。因此,确定液料比以20:1为中心点,在15:1~25:1范围内进行星点设计。

2.2.2 提取时间 称取山楂粗粉3份,每份30 g,加入液料比15:1的60%乙醇溶液,分别回流提取0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,提取2次,合并滤液,测定有机酸含量,计算 Y ,结果见图2B。

由图2B可知,当提取时间由0.5 h延长至1.0 h时, Y 增幅最为明显;当提取时间由1.0 h延长至2.5 h时, Y 仍继续提高,但增幅较前者小。因此,确定提取时间以2.0 h为中心点进行星点设计。

2.2.3 乙醇体积分数 称取山楂粗粉3份,每份30 g,按

液料比15:1分别加入体积分数为30%、45%、60%、75%、90%的乙醇溶液,回流提取1.0 h,提取2次,合并滤液,测定有机酸含量,计算 Y ,结果见图2C。

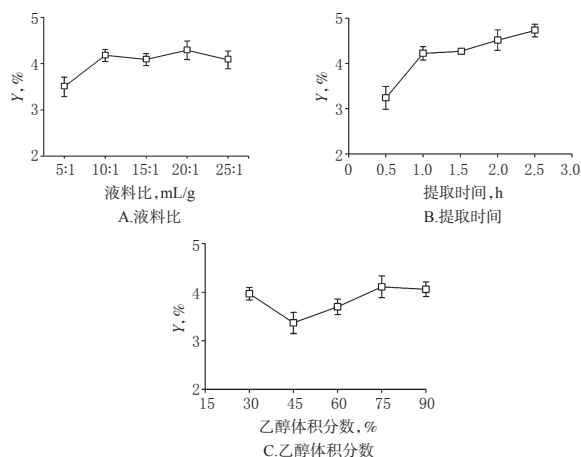


图2 各因素对有机酸得率的影响

Fig 2 Effects of each factor on extraction yield of organic acids

由图2C可知,乙醇体积分数从30%到45%时, Y 明显下降;之后,随着乙醇体积分数的增加, Y 逐步提高;当乙醇体积分数在75%时, Y 最高;乙醇体积分数高于75%之后, Y 略有降低。因此,确定乙醇体积分数以75%为中心点进行星点设计。

2.3 星点设计试验优化有机酸提取工艺

2.3.1 试验设计与结果 以液料比、提取时间、乙醇体积分数3个因素分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,以样品中 Y 为响应值,每个因素设5水平,并以-1.682、-1、0、1、1.682表示自变量的高低水平进行星点设计。因素与水平见表1,星点设计试验与结果见表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				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X_1 (液料比), mL/g	15:1	17:1	20:1	23:1	25:1
X_2 (提取时间), h	1.5	1.7	2.0	2.3	2.5
X_3 (乙醇体积分数), %	60.0	66.1	75.0	83.9	90.0

2.3.2 模型拟合 利用Design-Expert 8.0软件,对试验数据进行分析,以 Y 为响应值,分别对 X_1 、 X_2 、 X_3 进行二项式方程拟合,得回归模型方程为 $Y=5.10-5.825 \times 10^{-3} X_1+0.15 X_2+1.465 \times 10^{-3} X_3-0.091 X_1 X_2-0.099 X_1 X_3+0.034 X_2 X_3-0.053 X_1^2-0.24 X_2^2-0.17 X_3^2$ ($R^2=0.9206$)。

由表3可知,模型 $P<0.01$,表明上述回归模型显著。二项式回归方程失拟项检验不显著($P=0.5562$),提示未知因素对试验结果干扰较小。提取时间 X_2 的 $P<0.05$,表明提取时间对 Y 有显著影响。3个因素对 Y 影响顺序大小为: $X_2>X_1>X_3$ 。所有交互项系数未达到显著性($P>0.05$)。

2.3.3 响应面优化 利用软件Design-Expert 8.0绘制 Y 与3个变量的三维响应面图,见图3。

利用数学模型,预测最优提取工艺参数为乙醇体积

表2 星点设计试验与结果

Tab 2 Central composite design test and results

试验号	X_1 , mL/g	X_2 , h	X_3 , %	Y , %
1	17:1	1.7	66.1	4.46
2	17:1	1.7	83.9	4.51
3	23:1	1.7	66.1	4.89
4	23:1	1.7	83.9	4.51
5	17:1	2.3	66.1	4.80
6	17:1	2.3	83.9	4.95
7	23:1	2.3	66.1	4.83
8	23:1	2.3	83.9	4.62
9	20:1	2.0	60.0	4.42
10	20:1	2.0	90.0	4.64
11	15:1	2.0	75.0	4.88
12	25:1	2.0	75.0	4.85
13	20:1	1.5	75.0	3.97
14	20:1	2.5	75.0	4.73
15	20:1	2.0	75.0	5.32
16	20:1	2.0	75.0	5.28
17	20:1	2.0	75.0	5.06
18	20:1	2.0	75.0	5.19
19	20:1	2.0	75.0	4.84
20	20:1	2.0	75.0	4.93

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
模型	1.60	9	0.18	5.08	0.009 0
X_1	4.633×10^{-4}	1	4.633×10^{-4}	0.013	0.910 8
X_2	0.33	1	0.33	9.28	0.012 3
X_3	2.931×10^{-5}	1	2.931×10^{-5}	8.359×10^{-4}	0.977 5
X_1X_2	0.067	1	0.067	1.90	0.198 1
X_1X_3	0.078	1	0.078	2.23	0.166 6
X_2X_3	9.113×10^{-3}	1	9.113×10^{-3}	0.26	0.621 2
X_1^2	0.041	1	0.041	1.17	0.304 3
X_2^2	0.80	1	0.80	22.79	0.000 8
X_3^2	0.43	1	0.43	12.14	0.005 9
残差	0.35	10	0.035		
失拟项	0.16	5	0.033	0.88	0.556 2
纯误差	0.19	5	0.037		
总和	1.95	19			

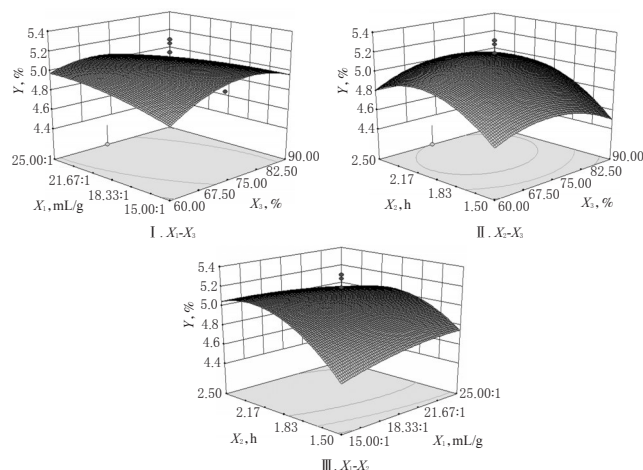


图3 各因素的三维响应面图

Fig 3 Three-dimensional response surface graph of each factor

分数76.56%、液料比18.56:1、提取时间2.13 h,回流提取2次。 Y 预测值为5.13%。

2.3.4 模型检验 从实际生产出发,最终确定工艺条件为乙醇体积分数75%、液料比18.5:1、提取时间2.0 h,回流提取2次。按此工艺试验3次,结果 Y 分别为5.07%、5.19%、5.41%,平均值为5.22%(RSD=2.70%, $n=3$)。实测值与预测值比较,相对误差为1.75%,表明所建立的数学模型预测性良好,优化后工艺重现性较好。

3 讨论

有机酸类成分是酸味药的药效物质基础^[6]。现代研究表明,山楂药材中含有苹果酸、枸橼酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、没食子酸、阿魏酸、山楂酸、齐墩果酸及熊果酸等25种有机酸类成分^[7],这些成分大多数具有良好的生物活性^[8]。然而,这些成分的水溶性强弱不同。为此,本课题组采用乙醇替代水作为提取溶剂,使得上述有机酸成分均能够被充分提取出来。

目前,山楂提取工艺优化研究常以总黄酮得率作为评价指标^[9],而将总有机酸得率作为评价指标的山楂提取工艺研究报道较少,且大部分采用正交设计方法对工艺条件进行优化^[10]。由于正交试验法在预测性与精确度方面均存在不足^[11],为此,本课题组选用预测性较好、精确度较高的星点设计-响应面法对山楂有机酸提取工艺进行优化,并通过验证试验,发现实测值与预测值的相对误差较小。本研究结果可为山楂资源的开发利用提供基础参考。

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, 2015:31.
- [2] 杨志明. 浅议山楂临床作用[J]. 中医杂志, 2010, 51(S2): 150-151.
- [3] 张文叶, 贾春晓, 毛多斌, 等. 山楂果中多元酸和高级脂肪酸的分析研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 117-119.
- [4] 鞠建峰, 朱宗敏, 杜忠科, 等. 星点设计-效应面法优化重楼皂苷类成分的提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(28): 3967-3969.
- [5] 尹文清, 张岩, 宋鑫明, 等. 石柑子总有机酸的提取工艺与含量测定[J]. 中药材, 2009, 32(1): 124-126.
- [6] 曹煌, 张静雅, 龚苏晓, 等. 中药酸味的药性表达及在临证配伍中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(24): 3617-3622.
- [7] 刘荣华, 邵峰, 邓雅琼, 等. 山楂化学成分研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(7): 1100-1103.
- [8] 汤喜兰, 刘建勋, 李磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 243-246.
- [9] 张明. 山楂黄酮提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(33): 11857-11858.
- [10] 廖广群. 正交试验法筛选山楂的提取工艺[J]. 中药材, 2002, 25(9): 661-662.
- [11] 邱颖, 朱玲, 孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 18-20.

(收稿日期:2016-09-23 修回日期:2016-10-18)

(编辑:刘萍)