

Box-Behnken 效应面法优化陈皮中橙皮苷及川陈皮素提取工艺

韦正, 杨丽, 李旻, 彭月, 银玲, 刘荣, 樊丹青, 刘友平*
(成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**通过 Box-Behnken 效应面法优化陈皮中橙皮苷及川陈皮素的提取工艺。**方法:**采用 HPLC 测定橙皮苷及川陈皮素含量,以橙皮苷及川陈皮素提取率的总评“归一值”为指标,通过 Box-Behnken 试验考察提取温度、液料比、提取时间对提取工艺的影响,对结果进行二项式方程拟合,利用效应面法优化提取工艺并进行预测分析。**结果:**最佳提取工艺为温度 77 ℃,液料比 19:1,提取 1.6 h,乙醇体积分数 70%;预测值与验证值偏差较小(<5%)。**结论:**优选的提取工艺稳定可行,实际值与预测值吻合度高,预测性良好。

[关键词] 陈皮; 橙皮苷; 川陈皮素; 星点设计-效应面法; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0017-04

[doi] 10.11653/syjf2013100017

Optimization of Extraction Technology of Hesperidin and Nobiletin from *Citrus reticulata* by Box-Behnken Design-Response Surface Methodology

WEI Zheng, YANG Li, LI Ming, PENG Yue, YIN Ling, LIU Rong, FAN Dan-qing, LIU You-ping*
(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructed by Ministry of Science and Technology and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of hesperidin and nobiletin from *Citrus reticulata* by Box-Behnken design-response surface method. **Method:** The content of hesperidin and nobiletin was determined by HPLC. Independent variables were extraction temperature, liquid-solid ratio and extraction time, dependent variable was the overall desirability of extraction rate of hesperidin and nobiletin. No-linear mathematic models was used to estimate relationship between independent and dependent variables, response surface methodology was used to optimize extraction process, prediction was carried out by comparing the observed and predicted values. **Result:** Optimum extraction technology was as following: reflux extracted 1.6 h with 19 times the amount of 70% ethanol at 77 ℃. Deviation between the observed and predicted values was small (<5%). **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and feasible with high predictability.

[Key words] *Citrus reticulata*; hesperidin; nobiletin; Box-Behnken design-response surface methodology; extraction process

陈皮药用历史悠久,具有理气健脾、燥湿化痰之功,临床用于治疗胸脘胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等

[收稿日期] 20121103(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072991);四川省教育厅自然科学重点项目(09ZA033)

[第一作者] 韦正,在读硕士,从事中药化学成分与质量标准化研究,Tel:15208278394,E-mail:weizheng2006@163.com

[通讯作者] *刘友平,研究员,博士生导师,从事中药质量标准化及药效物质基础研究,Tel:028-61800158,E-mail:lyp@edutem.edu.cn

症^[1]。其主要有效成分为黄酮类、挥发油和生物碱类化合物,黄酮类成分橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素和 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮等。黄烷酮化合物具有抗自由基、抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗菌、抗炎症和调节免疫等药理活性^[2]。陈皮黄酮类提取工艺研究多以单一成分为含量测定指标^[3-4],采用正交设计或均匀设计法优选提取工艺,虽具有操作简便、试验次数少等优点,但精密度不佳。本实验拟采用星点设计-响应面法^[5-6],以橙皮苷和川陈皮素提取率的总评归一值^[7-8]为指标,优选陈皮中黄酮类成分的提取条件,为陈皮的开发和利用提供实验依据。

1 材料

Shimadzu LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),BP211D(1/10 万),BP121S 型(1/万)电子分析天平(德国 Sartorius 股份有限公司),W201B 型恒温水浴锅(北京国华医疗器械厂),Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特分析仪器有限公司)。

橙皮苷、川陈皮素对照品(均购于成都曼斯特生物制品公司,纯度均 > 98%,批号分别为 A0032-20, A0395-20),乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。陈皮采购于成都市荷花池药材专业市场,经成都中医药大学严铸云教授鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的成熟果皮。

2 方法与结果

2.1 橙皮苷、川陈皮素含量测定

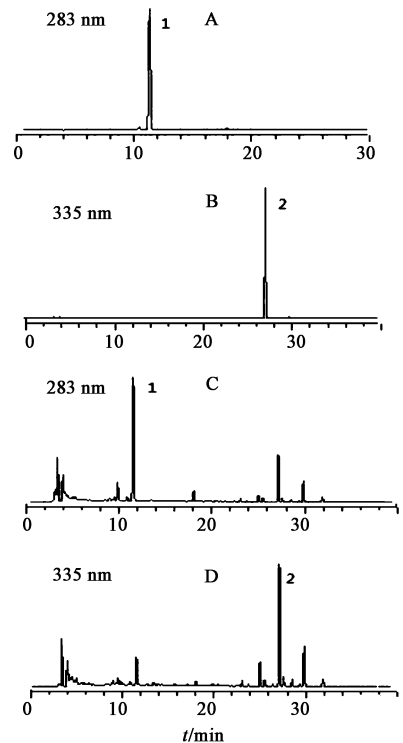
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥的对照品适量,加甲醇配制成橙皮苷、川陈皮素质量浓度分别为 0.370, 0.088 2 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛)约 0.4 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 20 mL,称定质量,水浴加热(75 °C)回流提取 1 h,冷却至室温,再称定质量,用 70% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 吸收波长的确定 精密吸取橙皮苷、川陈皮素对照品溶液各 5 μL,进行 HPLC 测定,采用 SPD-20A 检测器采集的三维谱图进行分析,其最大吸收波长分别为 283, 335 nm,故选 283, 335 nm 双波长作为检测波长。

2.1.4 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相 0.05% 磷酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 20% ~ 25% B; 5 ~ 10 min,

25% ~ 30% B; 10 ~ 20 min, 30% ~ 50% B; 20 ~ 30 min, 50% ~ 60% B; 30 ~ 35 min, 60% ~ 90% B; 35 ~ 40 min, 90% ~ 100% B),柱温 30 °C,流速 0.7 mL·min⁻¹,双波长检测 283, 335 nm,进样量 5 μL,见图 1。



A, B. 对照品; C, D. 供试品; 1. 橙皮苷; 2. 川陈皮素
图 1 陈皮 HPLC

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2, 5, 8, 10, 15, 20 μL, 按上述色谱条件测定,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y_{\text{橙皮苷}} = 2.94 \times 10^6 X + 3.47 \times 10^4$ ($r = 0.9998$), $Y_{\text{川陈皮素}} = 5.67 \times 10^6 X - 1.16 \times 10^5$ ($r = 0.9999$); 线性范围依次为 0.740 ~ 7.40, 0.174 ~ 1.740 μg。

2.1.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL,重复进样 5 次,记录峰面积,计算精密度。结果橙皮苷和川陈皮素峰面积 RSD 分别为 0.10%, 0.25%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液,于 0, 2, 4, 8, 12, 20, 24 h 分别进样测定,记录峰面积,结果 RSD 1.17%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一份药材粉末,按 2.1.2 项下方法制备 5 份供试品溶液,各进样 5 μL,记录峰面积,结果橙皮苷、川陈皮素含量的 RSD 分别为 1.1%, 2.5%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 回收率试验 称取已知含量的陈皮样品粉

末 6 份,每份约 0.2 g,精密称定,分别加入一定量的对照品储备液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定,进样量 10 μL,计算加样回收率。结果橙皮苷、川陈皮素平均加样回收率 ($n = 6$) 分别为 99.11% ,95.79% ,RSD 分别为 1.4% ,2.1% 。

2.2 星点试验设计 通过单因素试验考察提取温度、提取时间、液料比、乙醇体积分数和提取次数对提取工艺的影响,发现当乙醇体积分数 >70% 时,总黄酮含量略微增加,但考虑到工业提取成本,选用 70% 乙醇溶液为提取溶媒^[6]。因提取次数为非连续变量,回归处理较难,结合预试验结果及工业生产实际暂定提取数为 2 次。综上所述,本试验选取提取温度、液料比、提取时间为考察因素^[9]。取陈皮粉末 10 g,精密称定,按星点试验设计进行提取,冷却至室温,称定质量,用 70% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,按 2.1.4 项下方法测定,计算各成分提取率。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 陈皮中橙皮苷及川陈皮素的提取工艺星点试验因素水平

水平	X_1 提取温度/℃	X_2 液料比/倍	X_3 提取时间/h
-1	65	15	1.0
0	75	20	1.5
+1	85	25	2.0

表 2 陈皮中橙皮苷及川陈皮素的提取工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	橙皮苷 提取率/%	川陈皮素 提取率/%	OD
1	65	15	1.5	0.801	0.263	0
2	85	15	1.5	2.788	0.269	0.252
3	65	25	1.5	0.929	0.280	0.109
4	85	25	1.5	3.618	0.305	0.799
5	65	20	1	0.867	0.295	0.107
6	85	20	1	2.778	0.329	0.838
7	65	20	2	1.096	0.279	0.162
8	85	20	2	3.073	0.300	0.675
9	75	15	1	1.124	0.272	0.128
10	75	25	1	1.350	0.281	0.230
11	75	15	2	1.303	0.277	0.193
12	75	25	2	1.185	0.270	0.124
~17	75	20	1.5	2.600	0.270	0.259

注:13~17 号为重复试验,结果用平均值计算。

2.2.1 数据处理 多指标的数据处理采用总值归一法。分别测定橙皮苷、川陈皮素 2 个指标,根据 Hassan 法将每个指标进行“归一值”,求各指标“归

一值”的几何均数得总评“归一值”(OD)。 $d_{i\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$; $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, (k 为指标数)。

试验模型通过最小二乘法拟合,得二次多项式方程可以表达为 $Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$, 其中 Y 为效应值, A_0, A_i, A_{ii}, A_{ij} 为方程系数, X_i, X_j ($i = 1, 2, 3; i \neq j$) 为自变量真实值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 (R^2) 表达,采用 Design expert 7.0 软件分析拟合参数,并以 $P < 0.05$ 进行逐步递减回归,简化方程分别为 $Y_{\text{橙皮苷}} = -14.127 - 0.079X_1 + 0.838X_2 + 9.213X_3 + 3.512 \times 10^{-3}X_1X_2 + 3.295 \times 10^{-3}X_1X_3 - 0.034X_2X_3 + 7.36 \times 10^{-4}X_1^2 - 0.026X_2^2 - 2.879X_3^2$; $Y_{\text{川陈皮素}} = 1.187 - 0.026X_1 + 9.713 \times 10^{-3}X_2 - 0.0939X_3 + 9.60 \times 10^{-5}X_1X_2 - 6.75 \times 10^{-4}X_1X_3 - 1.49 \times 10^{-3}X_2X_3 + 1.77 \times 10^{-4}X_1^2 - 3.32 \times 10^{-4}X_2^2 + 0.054X_3^2$; $Y_{OD} = 6.433 - 0.231X_1 + 0.076X_2 + 0.737X_3 + 2.191 \times 10^{-3}X_1X_2 - 0.011X_1X_3 - 0.017X_2X_3 + 1.538 \times 10^{-3}X_1^2 - 4.926 \times 10^{-3}X_2^2 + 0.129X_3^2$ 。

对 OD 值模型进行方差分析,结果 OD 的 $R^2 = 0.9366$,表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确的预测实际情况。其校正决定系数为 0.8551,表明 85.51% 试验数据的变异性可用此回归模型来解释,约有 14% 不能由此模型进行解释;信噪比 11.239,表明有很强的信号。综上所述,表明该模型能较好地解释响应值的变化。

2.2.2 效应面法优选工艺条件 根据拟合方程,绘制 OD 值随因素变化的效应面图(图 2~4)。结果预测最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 70%,提取温度 76.85℃,料液比 18.35:1,提取时间 1.55 h。考虑到实际生产情况,将各因素条件进行微调,最终确定陈皮中橙皮苷及川陈皮素的提取工艺条件为乙醇体积分数 70%,提取温度 77℃,料液比 19:1,提取时间 1.6 h,提取 2 次,橙皮苷及川陈皮素提取率的预测值分别为 3.618% ,0.329% 。

2.3 验证试验 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果橙皮苷、川陈皮素提取率的预测值分别为 3.675% ,0.329% ;二者的偏差依次为 1.580% ,1.567% ;说明该模型预测较好,得到的拟合方程可较好地描述因素与指标的关系。

3 讨论

考虑到橙皮苷、川陈皮素均陈皮中功效性成分,本实验认为应综合考察较为合理。试验结果表明,

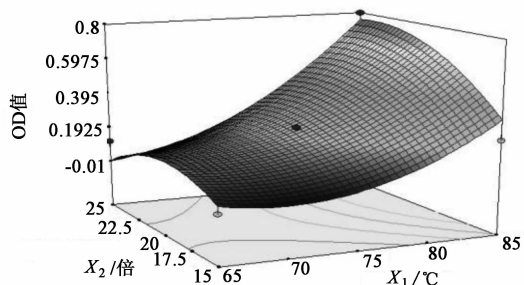


图2 提取温度和料液比对 OD 值影响的等高线和效应面

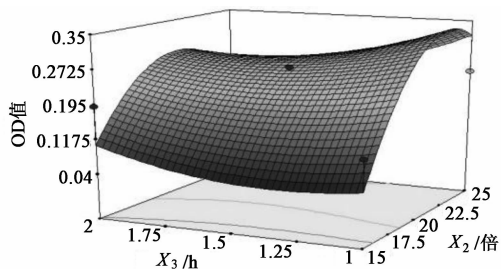


图3 料液比和提取时间对 OD 值影响的等高线和效应面

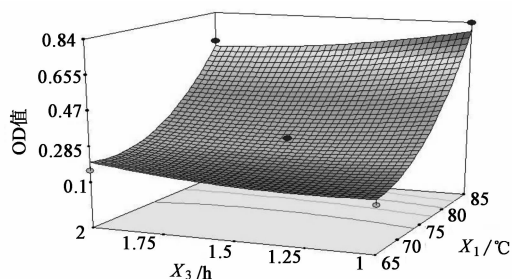


图4 提取温度和提取时间对 OD 值影响的等高线和效应面

各因素对效应面的影响并非呈线性关系,而目前国内一般采用正交设计和均匀设计优化工艺,即用线性数学模型进行拟合,使得试验结果的精度不够,造成预测值与真值偏差较大。而星点设计-效应面法可通过非线性模型拟合得出最佳条件,弥补了两者的不足,且最佳条件下的效应面预测值和实测值偏差较小,结果较理想。

在多指标工艺筛选的试验设计中,指标间往往

相互影响,对某一项指标有利的条件可能不利于另一指标,最终选择条件往往依据这些指标的综合效应。本实验采用总评“归一值”法考察陈皮醇提工艺优化中2个指标,并成功建立数学模型进行优化与预测分析,优选的制备工艺实测值与预测值吻合较好。提取温度、液料比、提取时间对橙皮苷、川陈皮素提取率均有显著性影响,各因素间存在不同程度的交互作用。由试验结果可知,星点设计的理论值与试验值相差不大,采用非线性拟合模型较接近客观事实,效应面三维图使因素对指标的影响更为直观、方便,且试验精度高。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 132.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第43卷[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 201.
- [3] 徐旭耀, 王汝娟, 谢伟飞. 柑橘皮中川陈皮素超声提取工艺及含量分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 283.
- [4] 常庆, 刘明, 杨鹏, 等. 正交优化提取陈皮中橙皮苷的工艺研究[J]. 化工技术与开发, 2011, 40(11): 33.
- [5] 王国华, 张保献, 聂其霞, 等. 星点设计-效应面法优选荷叶中荷叶碱与荷叶黄酮的取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2332.
- [6] Li C P, Wang L L, Jin Z S, et al. Study on the extraction technique of poly-methoxyflavonoids from Citrus peels by using response surface methodology [J]. Adv Mater, 2012, 24(8): 544.
- [7] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学. 药学分册, 2000, 27(5): 292.
- [8] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 350.
- [9] Li C P, Tian H M. Study on microwave-assisted extraction of nobletin and tangeretin from orange peel[J]. Food Sci Technol, 2011, 36(5): 224.

[责任编辑 仝燕]