

Optimization of Supercritical CO₂ Extraction Technology for Main Active Components in *Phellodendrom amurense* by Response Surface Methodology

Delong Zhang, Liying Zhou, Xiguo Zhang, Yuhong Zhang*

Key Laboratory of Forest Plant Ecology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang
Email: *pzhangyh@126.com

Received: Apr. 7th, 2018; accepted: Apr. 21st, 2018; published: Apr. 28th, 2018

Abstract

In order to study the technological conditions of extracting berberine from *Phellodendron amurense* by Supercritical CO₂ Fluid Extraction (SFE), the berberine extraction amount was used as the indicators, and the single factor and response surface methodology experimental design were used in SFE-CO₂, to analyze the effect of extraction pressure, extraction temperature, extraction time and entrainer ethanol concentration on extraction amount of berberine. At the same time, using response surface interaction and establishment of regression equation, analyzing by Response Surface Methodology, the optimum technological condition for extraction of berberine from *P. amurense* is obtained: extraction pressure is 31.00 Mpa; extraction temperature is 52.00°C; extraction time is 90.00 min; ethanol concentration is 94.00%. Under this condition, the extraction amount of berberine from *P. amurense* was 0.987 mg/g.

Keywords

Phellodendron amurense, Supercritical CO₂ Fluid Extraction, Berberine, Response Surface Methodology

响应面法优化黄檗中主要活性成分的超临界CO₂萃取工艺研究

张德龙, 周丽莹, 张锡国, 张玉红*

*通讯作者。

文章引用: 张德龙, 周丽莹, 张锡国, 张玉红. 响应面法优化黄檗中主要活性成分的超临界 CO₂ 萃取工艺研究[J]. 农业科学, 2018, 8(4): 369-378. DOI: 10.12677/hjas.2018.84058

东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨
Email: pzhangyh@126.com

收稿日期: 2018年4月7日; 录用日期: 2018年4月21日; 发布日期: 2018年4月28日

摘要

为研究黄檗中小檗碱的超临界CO₂流体萃取工艺条件, 以小檗碱提取量为指标, 通过单因素及响应面实验设计分析, 探讨萃取压力、萃取温度、萃取时间和夹带剂乙醇体积分数对小檗碱提取量的影响。同时应用响应面交互作用和建立回归方程, 分析优化得出该方法的最佳提取条件是: 提取压力为31.00 Mpa, 提取温度为52.00℃, 提取时间为90.00 min, 乙醇体积分数为94.00%。在此条件下黄檗中小檗碱提取量为0.987 mg/g。

关键词

黄檗, 超临界CO₂萃取, 小檗碱, 响应面分析

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

黄檗(*Phellodendron amurense*)又称黄波罗、黄柏, 芸香科(Rutaceae)黄檗属植物, 属第三纪孑遗植物, 主要分布于我国东北三省及华北地区, 中国特有种, 国家 II 级重点保护的野生濒危植物[1] [2]。同时, 黄檗材质优良, 是我国经济价值较高的珍贵用材树种。黄檗也是我国传统大宗名贵中药材及《药典》品一关黄柏的唯一药源植物[3], 其内皮(韧皮部)入药, 与杜仲、厚朴并称为我国 3 大木本药用植物。其根、皮、枝、叶等器官富含具有生物活性作用的生物碱, 其中小檗碱为主要的药用成分[4]。临床研究主要用于抗菌抗炎, 泻火除蒸, 清热燥湿, 解毒疗疮等作用[3]。现代研究表明, 黄檗及小檗碱在对癌症、糖尿病、降血压[4] [5]等方面有较好疗效。因此具有重要的经济和药用价值。

响应面分析(Response Surface Methodology, RSM)是利用合理的实验设计, 采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的关系, 通过分析回归方程来求得最佳工艺参数, 以解决多变量问题的一种统计方法。它与被广泛使用的正交、均匀试验设计法不同, 具有试验周期短, 回归方程精确度高, 能体现多因素间交互作用等优点[6]。

近二十多年来, 基于超临界流体的优良特性发展起来的超临界流体萃取技术(Supercritical Fluid Extraction, SFE)取得迅速的发展, 并已在医药、食品、化工、香料、分析化学等诸多领域得到应用。其近年来, 在我国实施中药现代化进程中, 超临界萃取技术被列为中药高效提取分离新技术, 也受到国人重视[7] [8] [9] [10]。本文通过利用超临界 CO₂ 流体萃取技术, 以黄檗中小檗碱含量为指标, 通过单因素及响应面实验设计, 分析探讨了萃取压力、萃取温度、萃取时间和夹带剂乙醇体积分数对小檗碱提取量的影响, 确定最佳提取工艺参数, 为黄檗中小檗碱进一步开发利用提供参考。

2. 材料和方法

2.1. 材料与仪器

实验所用黄檗采于东北林业大学城市林业试验基地。小檗碱、药根碱、掌叶防己碱标准品购于中国药品生物制品检定所。色谱纯乙腈(美国 TEDIA 公司), 水(超纯水), 无水乙醇(色谱纯), 磷酸二氢钾、十二烷基磺酸钠(分析纯, 北京化学试剂公司)。二氧化碳气体(99.9% 食品级, 哈尔滨黎明气体公司)。HA120-50-01 型超临界流体萃取仪(江苏南通华安公司), Waters 2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 高速冷冻离心机(德国 Heraeus sepatech 公司), BSA223S 型电子分析天平(德国赛多利斯)。

2.2. 单因素样品制备

称取黄檗皮过 20 目筛的干粉 100 g, 装入萃取釜中。根据 HA120-50-01 型超临界流体萃取装置的操作规程, 在工艺流程为压力 30 MPa, 温度 50℃, 时间 60 min, 夹带剂乙醇体积分数 95%基础上, 以其中某一因素为变量, 即分别选取提取压力为 15、20、25、30、35 MPa, 提取温度为 35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃和 65℃, 提取时间为 20、40、60、80、100 和 120 min, 乙醇体积分数为 85%, 90%, 95% 和 100%, 保持其余因素不变的情况下进行萃取, 收集萃取物。

2.3. 响应面优化及其样品制备

在单因素实验结果的基础上, 选取压力、温度、时间、乙醇体积分数 4 个因素作为试验因素。以提取物中小檗碱含量响应值, 运用 Design Expert.V8.0.6.1 软件设计试验, 试验因素及水平见表 1。

2.4. 高效液相色谱检测方法

采用秦彦杰[11]的方法测定黄檗样品中生物碱含量。流动相为乙腈:水溶液 = 1:1, 且 1000 mL 流动相溶液中含 3.4 g KH_2PO_4 及 SDS 1.7 g, 流速: 1.0 ml/min; 检测波长 345 nm; 每次进样量 10 μL 。根据结果计算小檗碱的含量。每个样品进样 3 次。

2.5. 数据分析

所有数据均为 3 次平行实验, 并采用 Excel 2007 软件对数据进行统计分析。

3. 结果与分析

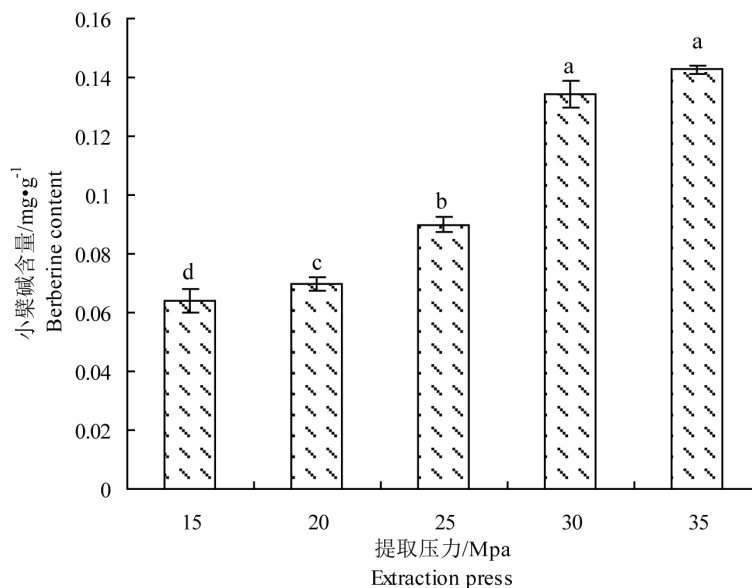
3.1. 单因素条件下黄檗中三种主要生物碱超临界 CO_2 萃取的影响

3.1.1. 萃取压力

萃取压力是超临界萃取过程中的一个重要影响因素, 显著地影响着萃取能力。以萃取温度为 50℃, 体积分数 95% 的乙醇为夹带剂, 二氧化碳流量为 25~35 kg/h 的条件下, 萃取时间为 90 min, 萃取压力分别为 15、20、25、30、35 MPa, 对黄檗进行超临界 CO_2 萃取。结果见图 1。随着压力的升高, 黄檗中小檗碱的含量也在升高, 在 35 MPa 时, 小檗碱的含量达到了实验条件下的最高值 0.143 mg/g。在压力为 35 MPa 时, 小檗碱含量相对于 30 MPa 时增幅较小, 仅为 6.3%, 差异不显著($p > 0.05$)。随着压力的增大, 超临界 CO_2 的密度增大, 溶质在流体中的溶解度增大, 减少了物质间的传质距离, 萃取效率提高, 从而使小檗碱的溶解度增大, 萃取率提高。但压力增加到一定时, 萃取率增幅减缓, 这是因为压力高, 流体密度虽大, 但其扩散系数小, 反而影响传质速率, 不利于萃取, 同时黄檗中的其它成分也被萃取出来, 会导致目的萃取物的含量下降。但是萃取压力较高, 会导致设备投资和不安全因素增加[7]。本实验中,

Table 1. Factors and levels in response surface design**表 1.** 黄檗中小檗碱萃取响应面试验设计

因素	水平(编码值)		
	-1	0	1
萃取压力/MPa	25	30	35
萃取温度/°C	45	50	55
萃取时间/min	30	60	90
夹带剂体积分数/%	90	95	100



注：相同小写字母表示差异不显著($p > 0.05$)，不同的小写字母表示差异显著($p < 0.05$)，下同。

Figure 1. Effect of extraction press on berberine content**图 1.** 提取压力对小檗碱含量的影响

萃取压力为 35 MPa 时小檗碱的含量虽然比 30 MPa 时高，但差异不显著($p < 0.05$)，目前工业上允许的最大压力一般不超过 35 MPa，因此本实验确定最优萃取压力为 30 MPa。

3.1.2. 萃取温度

由图 2 可知，在 35°C~50°C 时，随着温度的升高，小檗碱的含量呈缓慢上升趋势，在 50°C 时呈现最大值，为 0.493 mg/g，比 45°C 多出 45.9%，差异显著($p < 0.05$)但在提取温度为 50°C 以后，小檗碱的含量呈现下降趋势。尤其在 55°C 以后，迅速下降，在 65°C 时小檗碱含量只有 0.155 mg/g，比 50°C 少了 68.5%。一方面，在一定的压力下，温度的升高导致超临界 CO₂ 流体的密度降低，从而导致 CO₂ 溶解能力的降低，不利于萃取；但另一方面，升高温度有利于溶质挥发性的增加和扩散速度的加快，进而有利于目的物质的萃取。因此，在其它条件一定下，选择适合的萃取温度在超临界萃取中很重要。根据本实验结果确定超临界 CO₂ 流体最优萃取温度为 50°C。

3.1.3. 萃取时间

以萃取压力 30 MPa，萃取温度 50°C，以体积分数 95% 的乙醇为夹带剂，二氧化碳流量控制在 25~35 kg/h 条件下，萃取时间分别为 20、40、60、80、100 和 120 min，对黄檗进行超临界 CO₂ 流体萃取，结果见图 3。在萃取时间 60 min 之前，随着萃取时间的延长，小檗碱的含量随之而升高。当萃取时间在 60

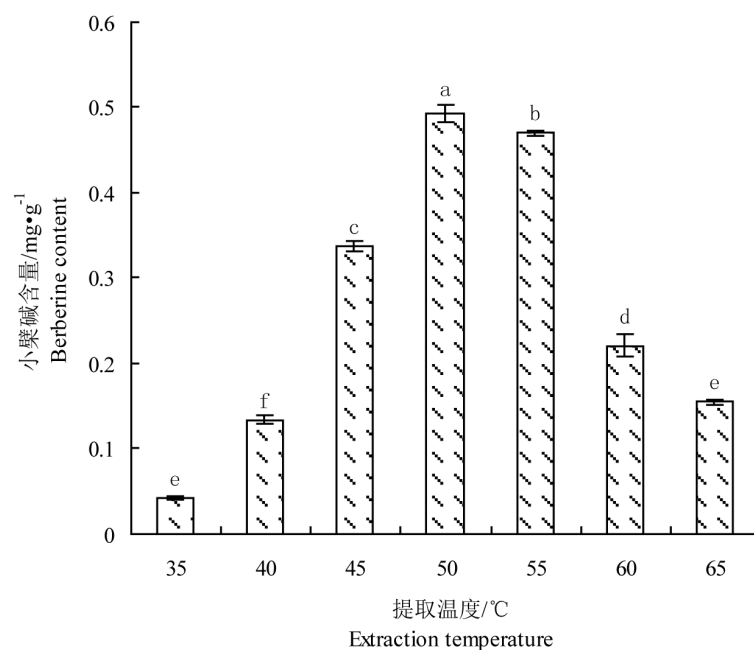


Figure 2. Effect of extraction temperature on berberine content

图 2. 提取温度对小檗碱含量的影响

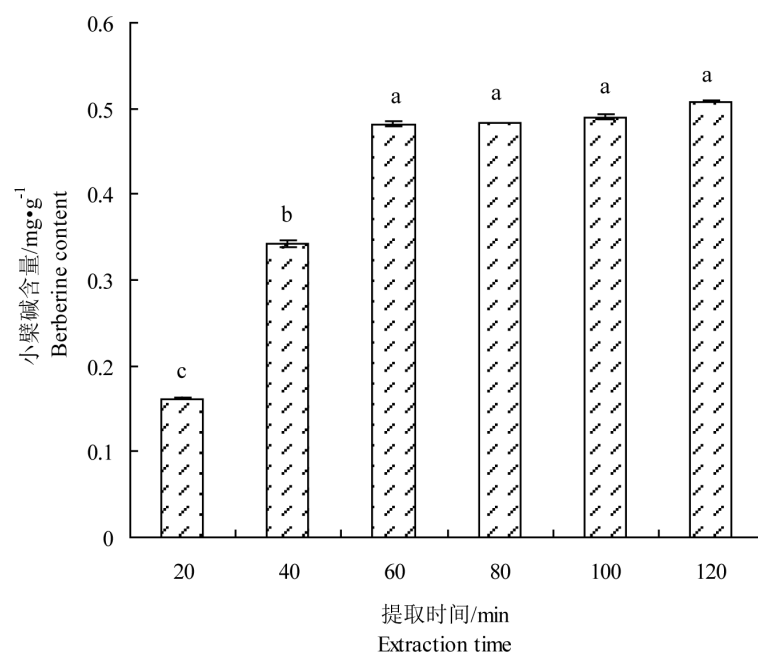


Figure 3. Effect of extraction time on berberine content

图 3. 提取时间对小檗碱含量的影响

min 以后, 随着萃取时间的延长, 萃取物的增加量非常有限, 并且差异不显著($p > 0.05$)。考虑到 CO_2 及原料投入产出的效率, 确定超临界 CO_2 流体萃取黄檗小檗碱的时间为 60 min。

3.1.4. 乙醇体积分数

超临界 CO_2 流体一般难于直接用于极性较大的生物碱类成分提取, 通常要加入少量极性溶剂, 以改

善萃取效果。生物碱的溶解度与分子中 N 原子的存在形式、极性基团的数目以及溶剂等相关,但大多能溶于乙醇,因而以乙醇常作为超临界 CO₂ 流体萃取生物碱的夹带剂[12]。本实验在萃取压力为 30 Mpa,萃取温度为 50℃,萃取时间为 60 min,二氧化碳流量为 25~35 kg/h 的条件下,以体积分数分别为 85%,90%,95%和 100%的乙醇作为夹带剂对样品进行超临界 CO₂ 流体萃取。从图 4 的结果可以看出,随着乙醇浓度的升高,小檗碱的含量也呈现上升趋势。乙醇体积分数为 95%时小檗碱含量(0.622 mg/g)相对于乙醇体积分数为 90%小檗碱含量时(0.254 mg/g)有大幅度提高,差异达到了极显著($p < 0.01$)。在乙醇体积分数为 95%和 100%时,小檗碱含量变化不明显,并且差异不显著($p > 0.05$)。考虑到夹带剂的节约使用,因而本实验确定 95%为超临界 CO₂ 流体萃取黄檗中生物碱的夹带剂。

3.2. 响应面法优化超临界 CO₂ 流体萃取黄檗中生物碱工艺

3.2.1. 响应面结果分析及模型建立

在单因素实验结果的基础上,考察压力、温度、时间、乙醇体积分数 4 个因素。采用 Box-Benken 响应面设计原理,以黄檗中主要小檗碱含量为响应值,运用 Design Expert.V8.0.6.1 软件,设计 4 因素 3 水平实验方案,共 29 个试验,试验设计方案及结果见表 2。

使用统计软件 Design Expert.V8.0.6.1 对结果中数据进行多元回归拟合,得到以小檗碱含量为响应值回归方程。小檗碱含量 = $0.518 + 0.0036A + 0.0785B + 0.0838C - 0.0881D - 0.1426AB + 0.0105AC - 0.1703AD - 0.113BC - 0.0803BD + 0.0235CD - 0.0174A^2 - 0.0131B^2 - 0.0244C^2 + 0.1269D^2$ 。

根据方差分析结果,小檗碱含量各因素中 B (提取温度)和 D (夹带剂乙醇体积分数)两因素影响显著($P < 0.05$),交互作用项 AB、AD 影响显著($p < 0.05$),表明提取压力和提取温度、与夹带剂乙醇体积分数之间交互作用明显,其余不明显,因此各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。而上述回归方程所描述与响应值之间的关系所建立的二次多项模型 F 值为 1.574, p 值 0.0493 ($p < 0.05$), R^2 为 0.9606,表明 96.06%的数据可用此方程解释。模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率[12],表 3 中的失拟项 $p = 0.7258$ (>0.05),模型失拟项不显著,所选模型适宜,说明该回归方程是黄檗小檗碱含量与提取

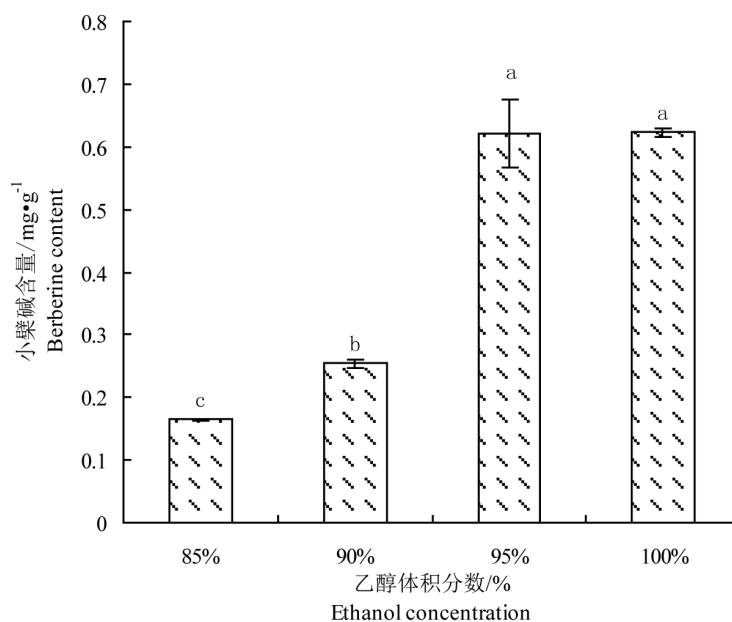


Figure 4. Effect of ethanol concentration on berberine content

图 4. 乙醇体积分数对小檗碱含量的影响

Table 2. Response surface design arrangement and experimental results
表 2. Box-Behnken 设计方案及数据结果

试验号	A: 提取压力 /MPa	B: 提取温度 /°C	C: 提取时间 /min	D: 乙醇体积分数 /%	小檗碱含量 (mg·g ⁻¹)
1	-1	1	0	0	0.3396
2	0	0	0	0	0.4928
3	1	1	0	0	0.7769
4	0	0	0	0	0.4597
5	0	1	0	-1	0.6256
6	-1	0	1	0	0.8628
7	0	0	1	-1	0.3472
8	0	0	0	0	0.6249
9	1	0	-1	0	0.6717
10	0	1	1	0	0.9236
11	0	0	1	1	0.7400
12	0	0	0	0	0.2428
13	0	0	-1	-1	0.1147
14	0	-1	0	-1	0.5546
15	1	-1	0	0	0.6335
16	-1	0	0	1	0.6202
17	1	0	1	0	0.4274
18	0	0	-1	1	0.6219
19	-1	0	0	-1	0.3011
20	1	0	0	-1	0.5640
21	0	1	-1	0	0.4698
22	-1	0	-1	0	0.7355
23	-1	-1	0	0	0.6300
24	0	0	0	0	0.6268
25	0	-1	1	0	0.4570
26	0	-1	-1	0	0.3493
27	1	0	0	1	0.6878
28	0	1	0	1	0.1986
29	0	-1	0	1	0.6222

工艺各参数的合适数学模型。本实验的变异系数(CV)值为 2.08%，而变异系数反映模型的可信度，CV 值越低，模型的可信度越高。本实验的 CV 值较低，说明模型可信度较高，回归模型方程能够较好地反映真实的试验值，可用此模型分析小檗碱响应值的变化。因此可以利用此模型确定黄檗小檗碱含量的最佳提取工艺条件。

Table 3. Analysis of variance of the constructed regression model
表 3. 响应面分析法对小檗碱提取含量的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.658762	14	0.047054	1.574339	0.0493	*
A	0.000156	1	0.000156	0.005226	0.9434	
B	0.073926	1	0.073924	2.473329	0.0381	*
C	0.082336	1	0.082336	2.754798	0.1192	
D	0.093138	1	0.093138	3.116181	0.0493	*
AB	0.081325	1	0.081325	2.720970	0.0413	*
AC	0.000439	1	0.000439	0.014674	0.9053	
AD	0.115957	1	0.115957	3.879660	0.0490	*
BC	0.051115	1	0.051115	1.710214	0.2120	
BD	0.025798	1	0.025798	0.863151	0.3686	
CD	0.002202	1	0.002202	0.073665	0.7900	
A ²	0.001962	1	0.001962	0.065655	0.8015	
B ²	0.001106	1	0.001106	0.036993	0.8502	
C ²	0.003868	1	0.003868	0.129427	0.7244	
D ²	0.104454	1	0.104454	3.494806	0.0826	
残差	0.418437	14	0.029888			
失拟项	0.261529	10	0.026153	0.666708	0.7258	
纯误差	0.156908	4	0.039227			
总离差	1.007159	28				

注: *代表 $p < 0.05$ 水平上显著。

3.2.2. 小檗碱响应面交互作用分析与优化

利用 Design Expert.V8.0.6.1 软件对各个因素之间的交互作用进行响应面分析, 绘制响应面曲面图, 进行可视化分析。利用统计软件进行响应面分析, 得到不同因子的响应面图。响应面图形是响应值对个试验因子所构成的 3D 图, 从响应图上可以看出最佳参数和各参数之间的相互作用。如图 5 所示, 图 5(a) 表明随着压力的增大和温度的升高, 黄檗中小檗碱含量不断上升; 图 5(b) 中小檗碱含量随着提取压力的增大和时间的延长而上升, 但趋势缓慢; 图 5(c) 中随着提取压力和乙醇体积分数的增大, 小檗碱含量上升明显; 图 1(d) 提取温度的升高和时间的延长, 小檗碱含量均有明显增高趋势, 变化趋势类似图 5(a)。图 5(e) 随着温度和乙醇体积分数的升高, 小檗碱含量上升; 图 5(f) 随着提取时间和乙醇体积分数的增大, 小檗碱含量变化趋势类似图 e。综合以上情况可以得出, 提取压力和提取温度之间以及提取压力和乙醇体积分数之间交互作用对小檗碱含量影响较大, 这与表 3 回归分析结果相吻合, 提取压力和提取温度之间交互作用以及提取压力和乙醇体积分数之间交互作用对应的 p 值小于 0.05, 均达到了显著水平。

通过软件分析计算得出黄檗小檗碱含量的理论最佳提取工艺: 提取压力 31.25 Mpa, 提取温度为 52.6℃, 提取时间为 89.96 min、乙醇体积分数 93.43%。由回归方程预测小檗碱含量理论值可达 1.01 mg/g。为了方便试验操作, 对优化的提取条件进行修正为: 提取压力为 31.00 Mpa, 提取温度为 52.00℃, 提取时间为 90.00 min, 乙醇体积分数为 94.00%。在最佳提取条件下, 进行 3 次重复试验, 得到黄檗小檗碱含

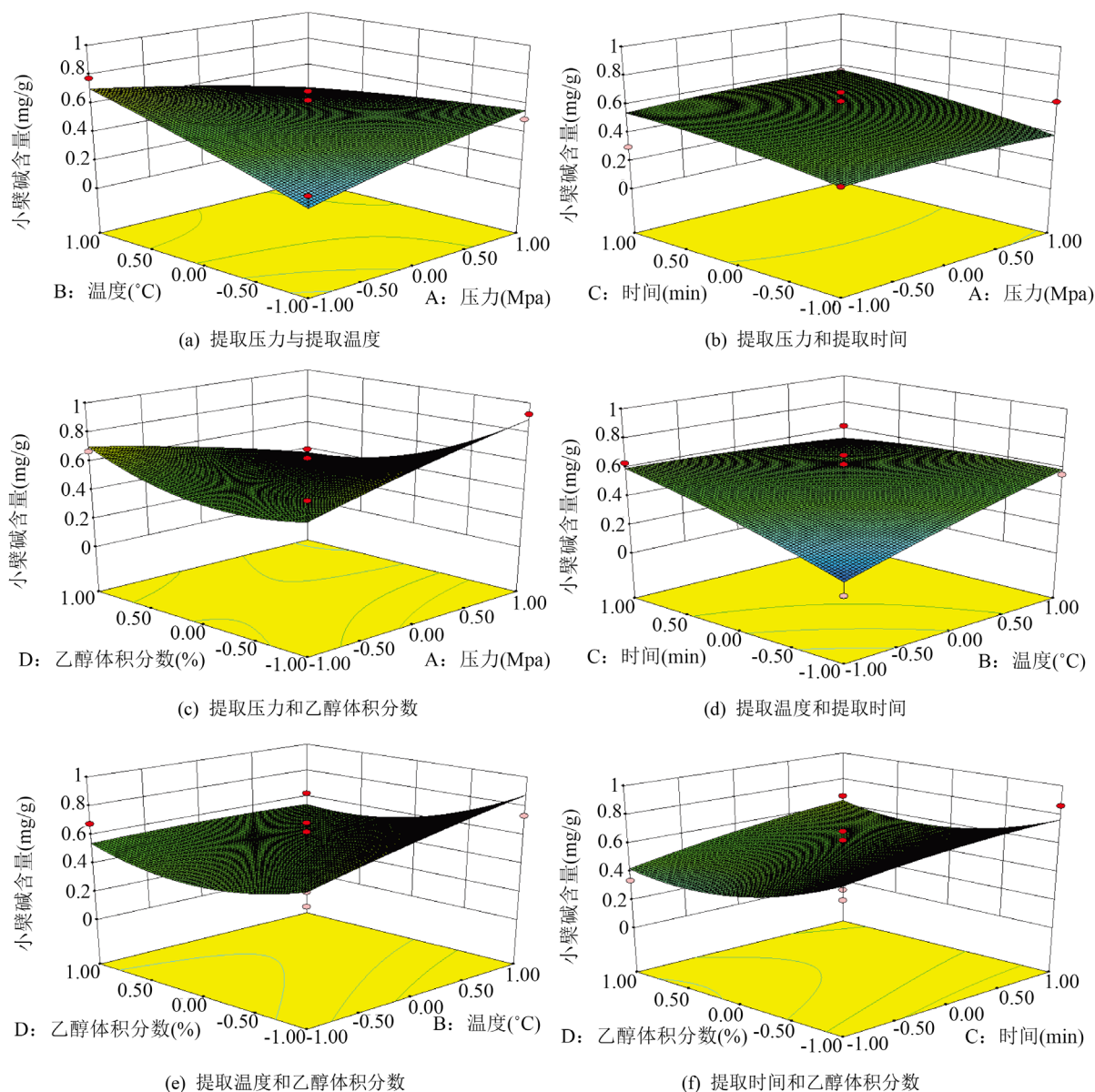


Figure 5. Response surface curve of two factors interaction on berberine content

图 5. 两因素交互作用对小檗碱含量的响应面图

量 0.987 ± 0.11 mg/g, 测定结果稳定, 与理论预测值 1.01 mg/g 相差 0.023 mg/g, 说明所建立的回归方程与实际情况拟合度较好, 结果合理可靠。

4. 结论

采用 Design-Expert 软件的中心组合设计方法设计响应面实验, 建立数学模型。方差分析结果表明黄檗叶中小檗碱提取量与提取温度和夹带剂乙醇体积分数呈正相关, 与提取压力和提取时间有一定影响。结合响应面交互作用的分析结果和理论预测与实际最佳条件验证, 后得出黄檗中小檗碱的提取最佳条件: 提取压力为 31.00 Mpa, 提取温度为 52.00℃, 提取时间为 90.00 min, 夹带剂乙醇体积分数为 94.00%, 在此条件下黄檗中小檗碱超临界 CO₂ 提取的量与理论预测值基本相符。

基金项目

国家林业公益性行业专项(201104066)资助。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物[M]. 第1册. 北京: 科学出版社, 1992: 572.
- [2] 张玲, 张东来, 邓晓华. 黄檗雌雄植株增殖培养性别差异研究[J]. 森林工程, 2017, 33(6): 11-14.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005年版一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 99-100.
- [4] Yin, J., Ye, J.P. and Jia, W.P. (2012) Effects and Mechanisms of Berberine in Diabetes Treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2**, 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.003>
- [5] 张冠英, 董瑞娟, 廉莲. 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(10): 812-821.
- [6] 林建原, 季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 83-90.
- [7] 元英进, 刘明言, 董岸杰. 中药现代化生产关键技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 9-38.
- [8] 谷满仓, 钱亚芳, 李大鹏. 超临界流体分离技术萃取中药活性成分的研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 21-22.
- [9] 李倩, 蒲彪. 超临界流体萃取技术在天然产物活性成分提取中的应用[J]. 食品发酵科技, 2011, 47(3): 12-14, 27.
- [10] 刘娜. 超临界流体萃取技术在中药提取中的应用[J]. 广州化工, 2017, 45(24): 31-33.
- [11] 秦彦杰, 张玉红, 王洋, 等. 黄檗中生物碱含量的高效液相色谱分析[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(8): 115-118.
- [12] 蔡兴东. 乙醇夹带剂在超临界萃取中草药活性成分中的应用[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(6): 1245-1248.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjas@hanspub.org