

· 中药工业 ·

基于 PB-CCD 设计的化香树果序碱提酸沉提取工艺[△]

汪芸兰, 张鹏, 胡坤霞, 韩立柱, 邱金清, 赵佩媛, 张新博, 宋道*, 唐志书*

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

[摘要] 目的: 基于二水平析因-星点设计法(PB-CCD)优化化香树果序碱提酸沉提取工艺。方法: 以鞣花酸含量为评价指标, 采用 PB 设计试验, 研究液料比、提取时间、提取温度、碱提液 pH 和酸沉液体积分数对化香树果序中鞣花酸提取率的影响; 采用 CCD 设计对筛选出的因素进一步优化, 确定化香树果序碱提酸沉提取的最佳工艺。结果: 化香树果序碱提酸沉提取的最优工艺条件为液料比 13:1、提取时间 80 min、提取温度 85 ℃、碱提液 pH 13、酸沉液体积分数 10%。结论: 基于 PB-CCD 设计确定的化香树果序碱提酸沉的最佳提取工艺模型预测性良好、提取工艺简便可行。

[关键词] 二水平析因-星点设计法; 化香树果序; 碱提酸沉; 鞣花酸; 提取工艺

[中图分类号] R284.2; R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)06-1051-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200721007

Alkali Extraction-acid Precipitation of Infructescence of *Platycarya strobilacea* Based on PB-CCD

WANG Yun-lan, ZHANG Peng, HU Kun-xia, HAN Li-zhu, QIU Jin-qing, ZHAO Pei-yuan,

ZHANG Xin-bo, SONG Xiao*, TANG Zhi-shu*

College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the alkali extraction-acid precipitation of *Platycarya strobilacea* infructescence based on Plackett-burman-central composite design(PB-CCD). **Methods:** With ellagic acid content as the evaluation index, PB design was used to study the effects of liquid-to-material ratio, extraction time, extraction temperature, pH of the alkali for extraction, and concentration of the acid for precipitation on the extraction rate of ellagic acid. CCD was employed to further optimize the screened factors and determine the optimal process for alkali extraction-acid precipitation of *P. strobilacea* infructescence. **Results:** The optimal parameters for alkali extraction-acid precipitation are as below: liquid-to-material ratio of 13:1, extraction for 80 min at 85 ℃, alkali pH of 13, and acid concentration of 10%. **Conclusion:** Based on PB-CCD, the optimal process for alkali extraction-acid precipitation of *P. strobilacea* infructescence was determined. The model has high predictability and the extracting process features ease of implementation.

[Keywords] PB-CCD; infructescence of *Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc.; alkali extraction-acid precipitation; ellagic acid; extracting process

化香树果序为胡桃科植物化香树的果序^[1], 别名化香树球、化香果等。根据《湖南药物志》记载, 其具有活血行气、杀虫止痒、消肿止痛的功效, 通常用于治疗鼻炎等相关病症^[2]、内伤所致胸腹胀

痛、跌打损伤、筋骨疼痛, 也可用于治疗痈肿、疥癣、湿疮等^[3]。现代药理研究表明, 化香树果序具有抗炎抑菌、抗病毒、抗肿瘤等药理作用^[4]。近些年来发现, 化香树果序中有效成分鞣花酸具有抗炎、

[△] [基金项目] 陕西省科学技术厅课题(2017SF-359); 陕西省教育厅课题(17JS031); 陕西省中药基础与新药研究重点实验室项目(1008); 陕西省中药制药重点学科专项(1008); 国家中医药管理局中药制剂三级实验室项目(1008)

* [通信作者] 宋道, 教授, 研究方向: 天然药物提取、分离和剂型制备工艺及体内评价; Tel: (029)38183726, E-mail: song-xiaoyao@163.com

唐志书, 教授, 研究方向: 中药高新技术制备、中药资源开发与综合应用; Tel: (029)38185060, E-mail: tzs6565@163.com

抗氧化^[5]、调节肠道菌群^[6]等生物活性,且具有明显抗癌、抗诱变活性,尤其是对肝癌^[7]、肺癌、鼻咽癌^[8]、子宫内膜癌^[9]等有很好的抑制作用,因此有非常好的市场应用前景。

本研究以碱提酸沉法提取,考察液料比、提取时间、提取温度、碱提液 pH、酸沉液体积分数对化香树果序内鞣花酸提取率的影响^[10],结合响应面法优化化香树果序碱提酸沉提取工艺,得到可靠的提取工艺条件,以期化为香树果序鞣花酸提取开发利用提供参考^[11]。

1 材料

1.1 仪器

Ulti Mate 3000 型高效液相色谱仪(Thermo Fisher 公司); Vortex-Genie2 型旋涡混合器(北京卓信宏业仪器设备有限公司); 800 型离心机(上海手术器械 10 厂); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); PHS-25 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); 800Y 型高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司); FA21040N 型电子天平(十万分之一,赛多利斯上海贸易有限公司)。

1.2 试药

对照品鞣花酸(中国食品药品检定研究院,批号:111959-201903,纯度:98.8%);氢氧化钠(分析纯,天津北联精细化学品开发有限公司);盐酸(分析纯,江苏彤晟化学试剂有限公司);色谱乙腈、色谱甲醇(Fisher 公司);无水乙醇(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司)。

化香树果序(香菊制药有限责任公司,批号:20190712)经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为胡桃科化香树属植物化香树 *Platycarya strobilacea* Sieb. et Zucc 的干燥果实。

2 方法

2.1 HPLC 条件

色谱柱:Acclaim™ 120A C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),等度洗脱(20:80);柱温:30 ℃;流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:254 nm^[12];进样量:10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取化香树果序粗粉约 5.0 g,置于 100 mL

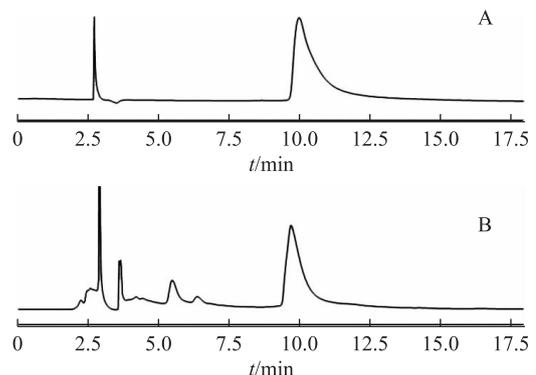
锥形瓶中,按 PB 试验设计的方案加入一定量的 pH 的氢氧化钠溶液,于一定温度,提取一定时间,滤过,提取一定次数后合并滤液,以一定体积分数的盐酸溶液滴定至 pH 为 1,静置 24 h,抽滤,弃滤液,滤饼层于室温条件下自然干燥,称质量,备用。精密称取滤饼层样品 0.1 g,置于 10 mL 的量瓶中,65%乙醇溶解并稀释至刻度,0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取鞣花酸对照品,精密称取 2.0 mg,配以色谱纯甲醇 70 mL 移至 100 mL 量瓶,超声 5 min,取出,待恢复至室温后,加甲醇稀释至 100 mL,摇匀后得质量浓度为 0.191 1 mg·mL⁻¹的鞣花酸对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 精密量取鞣花酸对照品溶液、65%乙醇、供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定。见图 1。



注:A.鞣花酸对照品;B.供试品溶液。

图1 鞣花酸及化香树果序供试品 HPLC 图

2.4.2 线性关系考察 精密称取鞣花酸对照品 2.10 mg,然后配以色谱甲醇 4 mL,超声 10 min,振摇 15 min,标记为 1,取 1 中鞣花酸对照品溶液 1 mL,精密移取至已经精密吸取色谱甲醇 1 mL 的 2 mL 离心管中,超声 10 min,振摇 15 min,标记为 2,重复操作 5 次。将 5 次所得溶液过微孔滤膜后进行进样分析,测定峰面积。以进样质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。

2.4.3 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次。

2.4.4 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时进样,记录色谱图。

2.4.5 重复性考察 精密称取同一样品,重复操作6次,依法加色谱甲醇制备供试品溶液,测定含量。

2.4.6 加样回收率试验 取鞣花酸质量浓度为 $1.29 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品,重复3次。每份为0.1 mL,每份分别精密加入质量浓度为 $0.198 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的鞣花酸对照品溶液0.31、0.62、0.93 mL,制得高、中、低质量浓度的溶液共9份,按2.1项下色谱条件进行测定。记录峰面积,计算加样回收率及RSD。

2.5 Plackett-Burman(PB)试验设计

根据提取过程中的影响因素,选择液料比(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、碱提液pH(D)、酸沉液体积分数(E),每个因素设定最低限度和最高限度^[13]。PB设计因素与水平见表1。按照PB设计,5个因素进行12次试验,进行化香树果序提取,采用高效液相色谱法(HPLC)检测化香树果序中鞣花酸含量,以鞣花酸峰面积作为响应因子,根据PB试验结果确定对提取过程影响较大的3个因素。

表1 化香树果序碱提酸沉提取PB设计因素与水平

水平	因素				
	A	B/min	C/°C	D	E/%
最低限(-1)	6	30	60	8	8
最高限(+1)	18	90	90	14	14

3 结果与分析

3.1 方法学考察结果

专属性考察结果展示的色谱峰分离度良好,峰形尖锐,符合含量测定要求(图1);线性关系考察得到鞣花酸的回归方程: $Y = 1146.5X - 11.57 (r = 0.9994)$,结果表明,鞣花酸在 $0.03216 \sim 0.51450 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与其峰面积线性关系良好;精密考察结果鞣花酸峰面积RSD为1.32%,说明此仪器精密度良好;稳定性考察结果显示,24 h内RSD为1.16%,表明此溶液在室温下放置24 h内稳定;重复性考察所得鞣花酸平均质量分数为 $0.79 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD为0.98%,表明此方法重复性良好;加样回收结果得鞣花酸平均回收率为99.79%,RSD为0.48%(表2)。

3.2 PB试验

根据PB试验方案进行试验,结果见表3。

表2 化香树果序碱提酸沉提取鞣花酸加样回收率考察结果

取样量/ mL	样品中含 量/mg	对照品加 入量/mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.1	0.122 97	0.061 38	0.182 06	98.76	99.79	0.48
0.1	0.122 97	0.061 38	0.185 82	100.80		
0.1	0.122 97	0.061 38	0.184 11	99.87		
0.1	0.122 97	0.122 97	0.245 57	99.70		
0.1	0.122 97	0.122 97	0.246 87	100.76		
0.1	0.122 97	0.122 97	0.244 49	98.88		
0.1	0.122 97	0.184 14	0.306 30	99.75		
0.1	0.122 97	0.184 14	0.306 20	99.74		
0.1	0.122 97	0.184 14	0.306 50	99.82		

表3 化香树果序碱提酸沉提取PB试验设计及结果

序号	A	B/min	C/°C	D	E/%	鞣花酸质量分数/%
1	6	90	60	8	14	0.188 328
2	6	30	90	14	14	0.246 617
3	18	30	60	8	14	0.285 203
4	6	30	60	8	8	0.195 727
5	6	90	60	14	8	0.360 574
6	18	90	90	8	14	0.222 397
7	18	30	90	14	14	0.355 356
8	6	30	60	8	8	0.383 627
9	18	90	90	8	14	0.152 801
10	6	90	90	14	8	0.335 731
11	18	90	60	14	14	0.710 380
12	18	30	60	14	8	0.927 310

采用Design-Expert Version 10.0.7统计软件进行ANOVA方差分析,由分析结果(表4)可知,液料比、提取温度、碱提液pH的P值分别为0.0227、0.0476、0.0150,均小于0.05,说明液料比、提取温度、碱提液pH是影响化香树果序碱提酸沉法提取鞣花酸的显著因素。根据各影响因素对鞣花酸峰面积的ANOVA分析,结合最大值运算结果,将影响不显著的因子进行最大值预测,结果提取时间为81.6312 min,酸沉液体积分数为9.61409%,结合实际情况选择提取时间为80 min,酸沉液体积分数为10%。

表4 化香树果序碱提酸沉提取PB试验设计数据ANOVA方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.480	5	0.097	5.950	0.025 4
A	0.150	1	0.150	9.270	0.022 7
B	4.154×10^{-4}	1	4.154×10^{-4}	0.025	0.878 4
C	0.100	1	0.100	6.170	0.047 6
D	0.190	1	0.190	11.360	0.015 0
E	0.036	1	0.036	2.180	0.190 3

3.3 星点设计(CCD)试验

在PB结果的基础上,以CCD对响应因子具有显著性影响的因素A、C、D进行优化,以确定最优的参数设置,通过HPLC测定鞣花酸含量。

采用Design-Expert Version 10.0.7软件设计优化试验,CCD影响因素水平设计见表5,CCD试验设计及结果见表6。根据结果,绘制此次实验数据的效应曲面图和等高线图(图2~4)。在3种因素交互作用的三维图中,碱提液pH与提取温度的响应面的曲张程度最大,而液料比与提取温度、液料比与碱提液pH的响应面的曲线较平滑,表明碱提液pH与提取温度间的交互作用强于其他因素间的交互作用^[14]。

表5 化香树果序碱提酸沉提取 CCD 试验影响因素与水平

水平	因素		
	A	C/°C	D
-2	8	65	9
-1	10	70	10
0	12	75	11
+1	14	80	12
+2	16	85	13

表6 化香树果序碱提酸沉提取 CCD 三因素五水平试验及结果

序号	A	C/°C	D	鞣花酸质量分数/%
1	12	75	10	0.253 678
2	12	75	12	0.822 380
3	12	80	11	0.543 420
4	12	75	11	0.351 794
5	12	75	11	0.643 748
6	14	75	11	0.540 162
7	12	75	11	0.566 363
8	8	85	9	0.514 329
9	16	65	9	0.263 042
10	10	75	11	0.280 282
11	8	65	9	0.135 476
12	12	75	11	0.641 327
13	8	85	13	1.079 450
14	16	85	9	0.575 094
15	12	70	11	0.476 349
16	16	65	13	0.964 054
17	12	75	11	0.567 316
18	12	75	11	0.617 055
19	8	65	13	1.206 120
20	16	85	13	1.443 800

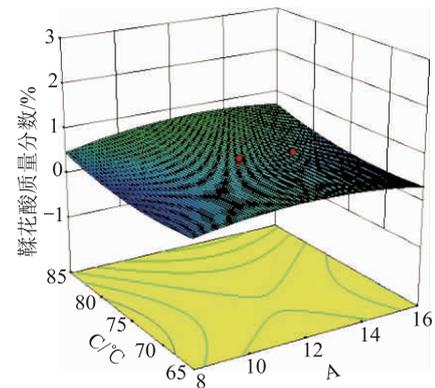


图2 提取温度与液料比对化香树果序中鞣花酸含量的交互影响

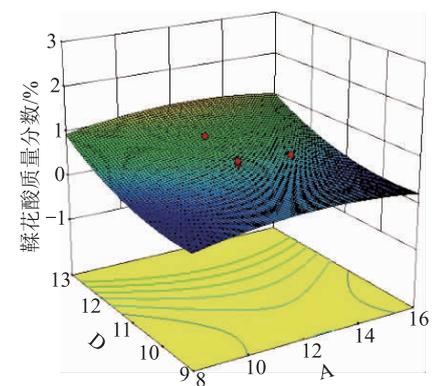


图3 碱提液pH与液料比对化香树果序中鞣花酸含量的交互影响

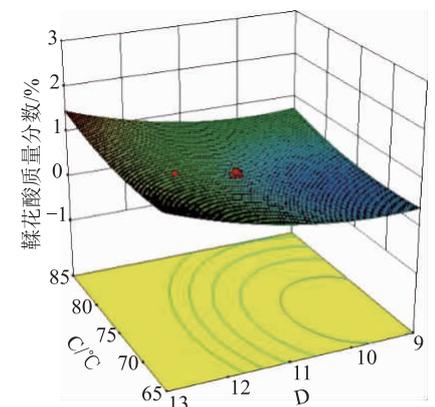


图4 提取温度与碱提液pH对化香树果序中鞣花酸含量的交互影响

3.4 回归模型建立与验证分析

使用Design-Expert Version 10.0.7统计软件对表6的试验结果进行拟合分析,得到自变量A、C、D与因变量鞣花酸含量的二次多项回归方程为 $Y = 0.52 + 0.052A + 0.13C + 0.41D + 0.067AC - 0.008AD - 0.042CD - 0.22A^2 + 0.18C^2 + 0.29D^2$ 。方差分析结果见表7。

表7 化香树果序碱提酸沉提取 CCD 三因素五水平试验设计结果数据 ANOVA 方差分析

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	统计学差异
模型	1.940	9	0.220	11.680	0.000 3	**
A	0.023	1	0.023	1.230	0.292 5	
C	0.140	1	0.140	7.390	0.021 6	*
D	1.430	1	1.430	77.480	<0.000 1	**
AC	0.036	1	0.036	1.970	0.190 9	
AD	5.454×10^{-4}	1	5.454×10^{-4}	0.029	0.867 1	
CD	0.014	1	0.014	0.770	0.400 4	
A ²	8.962×10^{-3}	1	8.962×10^{-3}	0.480	0.502 2	
C ²	6.014×10^{-3}	1	6.014×10^{-3}	0.330	0.581 1	
D ²	0.016	1	0.016	0.860	0.375 3	
残差	0.180	10	0.018			
失拟项	0.120	5	0.025	2.070	0.221 5	
纯误差	0.060	5	0.012			
总离差	2.130	19				

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

由表7可知,回归模型极为显著($P < 0.01$),模型的决定系数 $R^2 = 0.913 1$,说明回归模型中自变量与因变量的回归关系是显著的,具有统计学意义^[15]。失拟项 P 值为 $0.221 5 > 0.05$,失拟项不显著,表明此回归方程拟合程度良好。各因素对碱提酸沉法提取鞣花酸的影响顺序为 $D > C > A$ 。

3.5 最优工艺与验证实验

根据 PB-CCD 设计结果,液料比 13.016 7、提取温度 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 、碱提液 pH 13,结合实际生产情况,将最优工艺参数调整为提取时间 80 min、酸沉液体积分数 10%、液料比 13、提取温度 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 、碱提液 pH 13。在此条件下,重复进行 3 次提取试验,鞣花酸质量分数分别为 1.47、1.46、1.47 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,平均质量分数为 1.47 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与理论值 1.45 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 相近,说明本实验最终得到的碱提酸沉法提取化香树果序中鞣花酸的提取工艺稳定可靠。

4 讨论与结论

响应面分析法是一种比较有效的数学统计方法,采用多元二次回归方程来拟合各个影响因素与相应响应值之间的函数关系,寻找最优的工艺参数。相比于单因素试验和正交试验设计,试验次数少、周期短、模型预测性良好。本实验采用 PB-CCD 设计,以鞣花酸含量为考察指标,优化化香树果序碱提酸沉提取工艺。通过 PB 设计选定 5 个影响因素:液料比、提取时间、提取温度、碱提液 pH、酸沉液体积分数进行试验。预实验过程中发现,当碱提液 pH 为

8~14 时,体积分数为 8% 和 14% 的酸沉液均无法在滴定 $\text{pH} > 1$ 获得碱提酸沉提取物,因此,选择酸沉 pH 终点为 1。再筛选出的 3 个显著影响因素:液料比、提取温度、碱提液 pH 继续进行优化,确定鞣花酸提取的最佳工艺:液料比 13、提取时间 80 min、提取温度 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 、碱提液 pH 13、酸沉液体积分数 10%。实验结果为下一步开发利用化香树果序及其鞣花酸打下了良好基础,后期可对化香树果序碱提酸沉液中的有效成分进行研究。

参考文献

- [1] 朱俊谕.化香树果序醇提物诱导人鼻咽癌细胞发生 methuosis 死亡的机制研究[D].广州:南方医科大学,2017.
- [2] 赵鹏,汪瑾,孟庆华,等.响应面法优化化香树果序多糖提取工艺及抗氧化性能研究[J].计算机与应用化学,2015,32(5):601-604.
- [3] 胡坤霞,巨红叶,韩立柱,等.化香树果序没食子酸和鞣花酸含量测定及 HPLC 指纹图谱研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(2):56-59.
- [4] 刘本涛,袁彩英,黄嘉咏,等.化香树果序化学成分及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(21):227-234.
- [5] CHEN P, CHEN F C, ZHOU B H. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by *D*-galactose [J]. Sci Rep, 2018, 8:1465.
- [6] 沈起兵,李淑娟,刘同方,等.高通量测序分析鞣花酸对大鼠肠道菌群的影响[J].安徽农业科学,2019,47(18):171-173.

(下转第 1067 页)

- 甘肃中医,2008,21(12):22-23.
- [12] MATSUDA H, WU J X, TANAKA T, et al. Antinociceptive activities of 70% methanol extract of *evodiae fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its alkaloidal components[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(3):243-248.
- [13] JIN M, LEE H J, RYU J H, et al. Inhibition of LPS-induced NO production and NF- κ B activation by a sesquiterpene from *Saussurea lappa* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2000, 23(1):54-58.
- [14] LEE H J, KIM N Y, JANG M K, et al. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF- α in LPS-activated macrophages[J]. *Planta Med*, 1999, 65(2):104-108.
- [15] KANG J S, YOON Y D, LEE K H, et al. Costunolide inhibits interleukin-1 β expression by down-regulation of AP-1 and MAPK activity in LPS-stimulated RAW 264. 7 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(1):171-177.
- [16] 缪昌文. HPLC法测定吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量[J]. *中国处方药*, 2018, 16(7):40-41.
- [17] 彭飞城, 罗疆南, 丁野, 等. HPLC法测定调经活血胶囊中木香炔内酯与去氢木香内酯含量[J]. *中国药师*, 2019, 22(3):539-541.
- [18] 王森, 陈爱华, 刘红宁, 等. HPLC测定狗皮膏中桂皮醛和丁香酚的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(15):73-75.
- [19] 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.

(收稿日期: 2020-06-02 编辑: 王笑辉)

(上接第1055页)

- [7] TANAKA T, IWATA H, NIWA K J, et al. Inhibitory effect of ellagic acid on *N*-2-fluorenylacetylamine-induced liver carcinogenesis in male ACl/N rats[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1988, 79(12):1297-1303.
- [8] 邱华锋, 雷迅, 范才文, 等. 鞣花酸对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(1):78-80.
- [9] WANG Y Z, REN F, LI B, et al. Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(15):3303-3314.
- [10] 马慧, 李博涵, 朱美林, 等. 碱提酸沉法提取银杏外种皮中银杏酸的工艺研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2019, 44(9):1264-1267.
- [11] 黄文静, 孙晓春, 张严磊, 等. 基于 PB-CCD 设计的黄芪茎叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2018(5):105-110.
- [12] 王瑞生, 张振凌, 王胜超, 等. HPLC法同时测定五倍子发酵百药煎中没食子酸及鞣花酸含量[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(7):831-836.
- [13] 孙晓春, 刘妍如, 黄文静, 等. 基于 PB-CCD 设计的丹参提取工艺的研究及主要成分含量测定[J]. *中南药学*, 2015, 13(12):1237-1241.
- [14] 黄晓斌, 汪欢, 陈志鹏, 等. Box-Behnken 响应面法优化苦参黄酮超声提取工艺[J]. *中药材*, 2019, 42(10):2352-2356.
- [15] 李杰, 李钟杰, 雷高明, 等. 响应面法优化槐米中芦丁的溶剂热法提取工艺[J]. *中国食品添加剂*, 2019(9):47-54.

(收稿日期: 2020-07-21 编辑: 王笑辉)