

中图分类号: R932; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)05-36-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.05.010



Box - Behnken 响应面法优选贵州产青椒精油提取工艺*

罗忠圣^{1,2}, 黎浪³, 严艳芳^{1,2}, 郑前方⁴, 吴红³, 徐昌艳³, 覃容贵^{3△}

(1. 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州省德江县民族中医院, 贵州 铜仁 565200)

摘要:目的 优选贵州产青椒精油提取工艺。方法 采用水蒸气蒸馏法提取青椒精油, 单因素试验考察粉碎粒度、料液比、浸泡时间和蒸馏时间对精油得率的影响, 采用 Box - Behnken 响应面法优选提取工艺, 并对优选工艺进行验证试验。结果 最佳提取工艺为粉碎粒度 60 目、料液比 1:20(g:mL)、浸泡时间 36 min 和蒸馏时间 146 min, 在此工艺条件下的精油得率为 11.76%(n=3)。结论 该优选工艺稳定可靠, 可为青椒精油产品的研发提供理论依据。

关键词: 贵州产青椒; 青椒精油; 水蒸气蒸馏法; Box - Behnken 响应面法; 提取工艺

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from *Zanthoxylum schinifolium* Produced in Guizhou by the Box - Behnken Response Surface Methodology

LUO Zhongsheng^{1,2}, LI Lang³, YAN Yanfang^{1,2}, ZHENG Qianfang⁴, WU Hong³, XU Changyan³, QIN Ronggui³

(1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guiyang, Guizhou, China 550025; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou, China 550014; 3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, China 550025; 4. Dejiang National Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tongren, Guizhou, China 565200)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of volatile oil from *Zanthoxylum schinifolium* produced in Guizhou. **Methods** The volatile oil from *Zanthoxylum schinifolium* was extracted by the steam distillation method. The effects of grinding granule size, solid / liquid ratio, soaking time and distillation time on the yield of volatile oil were investigated by the single factor test. The extraction process of volatile oil was optimized by the Box - Behnken response surface methodology, and the validation test of the optimal process was carried out. **Results** The optimal extraction process was as follows: the grinding granule size was 60 mesh, the solid / liquid ratio was 1 : 20 (g : mL), the soaking time was 36 min, and the distillation time was 146 min. Under these conditions, the yield of volatile oil was 11.76% (n = 3). **Conclusion** The optimal process is stable and reliable, which can provide a theoretical basis for the research and development of related products of volatile oil from *Zanthoxylum schinifolium*.

Key words: *Zanthoxylum schinifolium* produced in Guizhou; volatile oil from *Zanthoxylum schinifolium*; steam distillation method; Box - Behnken response surface methodology; extraction process

花椒为芸香科植物青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 或花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果皮, 为常用食品调味料, 且药食两用, 收载于历版《中国药典》, 其性温, 归脾、胃、肾经, 具有温中散寒、除湿、杀虫、止痒等功效^[1]。药理学研究表明, 花椒具有镇痛、抗炎、局部麻醉、抗菌等作用^[2-3], 主要成分为挥发油、生物碱、酰胺、黄酮、香豆素、三萜等化合物^[4-6]。花椒精油的主要提取方法有有机溶剂萃取法、水蒸气蒸馏法、超临界萃取法等^[7-8], 其中水蒸气蒸馏法所得花椒提取物中挥发性物质种类最多^[9], 且操作简便, 故本研究中采用水蒸气蒸馏法。贵州省德江县万进花椒种植专业合作社创建于2015年, 地处德江县东北

部稳坪镇, 所产青椒粒大饱满、香味浓郁、口感良好, 于2020年被评为国家级花椒示范基地。本研究中采用水蒸气蒸馏法提取该基地所产青椒的精油, 采用 Box - Behnken 响应面法考察粉碎粒度、料液比、浸泡时间和蒸馏时间对精油得率的影响, 优选最佳提取工艺, 为贵州省花椒产业的可持续发展提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

QE - 500 克摇摆式高速万能粉碎机 (浙江屹立工贸有限公司); DP - 500 mL 磨口挥发油提取器 (南京康洛达实验科技有限公司); ZNCL - GS190 / 90 型智能磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司); AL204 型

* 基金项目: 贵州省科技计划项目 [黔科合支撑 [2021] 一般 129]; 贵州省教育厅高等学校特色重点实验室项目 [黔教合 KY 字 [2020] 018]。

第一作者: 罗忠圣, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为功能食品的开发与利用, (电子信箱) 1052318167@qq.com。

△通信作者: 覃容贵, 女, 博士, 教授, 研究方向为植物资源, (电子信箱) 1346812934@qq.com。

电子天平(梅特勒-托利多<上海>有限公司,精度为万分之一);Thermo Varioskan LUX型多功能酶标仪(赛默飞世尔科技<中国>有限公司);101-1AB型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

无水乙醇(分析纯,重庆万盛川东化工有限公司,批号为20201101);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号为20220211);甲醇(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号为20200611);青椒样品于2021年采自贵州省德江县万进花椒种植专业合作社,由贵州医科大学药学院覃容贵教授鉴定为青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果皮。

2 方法与结果

2.1 提取方法

取青椒样品30g,用水蒸气蒸馏法提取精油,并计算得率(%).精油得率(%) = 精油体积(mL) / 青椒样品质量(g) × 100%。

2.2 单因素试验^[10-13]

粉碎粒度:取青椒样品,粉碎粒度分别为原药材(未粉碎,0目)、20目、40目、60目、80目,分别称取30g青椒粉,加入料液比1:25的纯化水,在浸泡时间40min、提取温度140℃、蒸馏时间60min工艺条件下提取,每隔15min收集精油,记录精油体积。每个粉碎粒度平行试验3次,以确定最佳粉碎粒度。结果见图1A。可见,当粉碎粒度由原药材到40目时,精油得率明显升高;当由40目升至60目时,精油得率升高趋势逐渐平缓;当由60目升至80目时,精油得率只增加了0.06%,升高趋势接近平缓。综合实际,选择60目为最佳粉碎粒度。

料液比:称取粉碎粒度项下粉碎粒度为60目的青椒粉,按料液比分别为1:10,1:15,1:20,1:25,1:30(g:mL)加入纯化水,在提取温度140℃、浸泡时间40min、蒸馏时间60min工艺条件下提取,每隔15min收集精油,记录精油体积。每个料液比平行试验3次,以确定最佳料液比。结果见图1B。可见,料液比从1:10到1:20,随着料液比的增加,精油得率逐渐升高,随着料液比的继续

增加,精油得率逐渐降低,料液比为1:20时精油得率最高,故选择1:20为最佳料液比。

浸泡时间:称取粉碎粒度项下粉碎粒度为60目的青椒粉,加入料液比为1:20的纯化水,分别浸泡0,10,40,70,100min,140℃温度下蒸馏60min,每隔15min收集精油,记录精油体积。每个浸泡时间平行试验3次,以确定最佳浸泡时间。结果见图1C。可见,浸泡时间从0min到40min,精油得率逐渐升高,随着浸泡时间的继续增加,精油得率逐渐降低,浸泡40min时的精油得率最高,故选择40min为最佳浸泡时间。

蒸馏时间:称取粉碎粒度项下粉碎粒度为60目的青椒粉,在浸泡时间40min、料液比1:20和提取温度140℃条件下,蒸馏45,120,195,270,345min,每隔15min收集精油,记录精油体积。每个蒸馏时间平行试验3次,以确定最佳蒸馏时间。结果见图1D。可见,当蒸馏时间从45min增加到120min时,精油得率逐渐升高,随后,精油得率降低并趋于平稳,故选择120min为最佳蒸馏时间。

2.3 Box - Behnken 响应面试验^[14-16]

试验设计:在2.2项下筛选出的最佳单因素试验条件基础上,采用Box - Behnken响应面试验设计方案,以影响显著的粉碎粒度(因素A)、料液比(因素B)、浸泡时间(因素C)和蒸馏时间(因素D)4个因素为自变量,以精油得率为响应值(Y),设计四因素三水平进行Box - Behnken试验,确定最佳工艺条件。响应面试验因素与水平见表1。

表1 Box - Behnken 响应面试验因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels of Box - Behnken response surface test

| 水平 | 因素A(目) | 因素B(g:mL) | 因素C(min) | 因素D(min) |
|----|--------|-----------|----------|----------|
| -1 | 40 | 1:15 | 10 | 45 |
| 0 | 60 | 1:20 | 40 | 120 |
| 1 | 80 | 1:25 | 70 | 195 |

试验结果:结果见表2。采用Design Expert V8.0.6软件对试验结果进行回归分析,得青椒精油得率对上述4个影响因素的二次多项回归方程 $Y = 11.57 +$

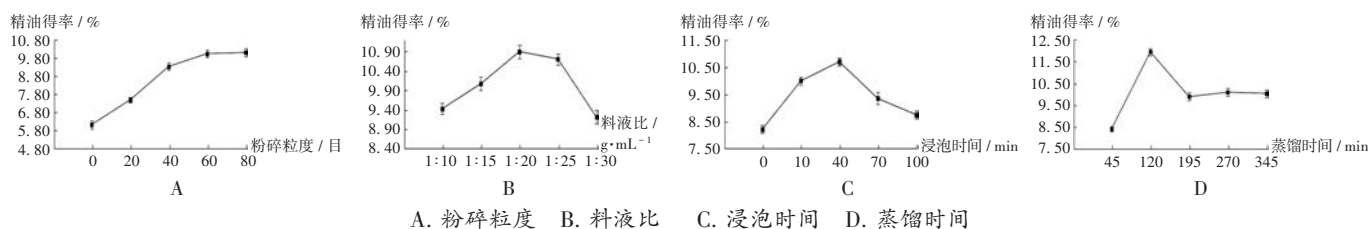


图1 单因素试验结果

A. Grinding granule size B. Solid/liquid ratio B. Soaking time D. Distillation time

Fig. 1 Results of the single factor test

$0.25A - 0.21B - 0.21C + 0.64D - 0.18AB + 0.25AC + 0.21AD - 0.055BC - 0.090BD - 0.14CD - 0.92A^2 - 1.01B^2 - 0.76C^2 - 1.02D^2$ 。为验证回归方程的有效性,对青椒精油提取的数学模型进行方差分析,结果见表3。该模型 $F = 18.89$, 显著性水平 $P < 0.0001 < 0.05$, 具有显著性。模型的失拟项 $F = 1.03$, 显著性水平 $P = 0.5337 > 0.05$, 不具有显著性, 说明该回归模型与试验数据拟合度良好, 未知因素对试验结果干扰小。粉碎粒度(A)、料液比(B)、浸泡时间(C)、蒸馏时间(D)4个因素对青椒精油得率的影响均显著($P < 0.05$), 各因素的交互项对青椒精油得率的影响均不显著($P > 0.05$), 各因素的二次项对青椒精油得率的影响均极显著($P < 0.01$)。对精油得率的影响程度为蒸馏时间(D) > 粉碎粒度(A) > 浸泡时间(C) > 料液比(B)。模型的相关系数 $R^2 = 0.9497$, 说明预测值与试验值有较好的相关性, 故该模型可用于对青椒精油提取条件的分析与预测。

表2 Box - Behnken 响应面试验结果

Tab. 2 Results of the Box - Behnken response surface test

| 试验号 | 因素 | | | | 精油得率(%) | 试验号 | 因素 | | | | 精油得率(%) |
|-----|----|----|----|----|---------|-----|----|----|----|----|---------|
| | A | B | C | D | | | A | B | C | D | |
| 1 | -1 | 1 | 0 | 0 | 9.28 | 16 | 1 | 1 | 0 | 0 | 9.64 |
| 2 | 0 | -1 | 0 | 1 | 10.50 | 17 | 0 | 0 | 1 | -1 | 9.14 |
| 3 | -1 | 0 | -1 | 0 | 10.00 | 18 | 1 | -1 | 0 | 0 | 10.50 |
| 4 | 0 | 1 | -1 | 0 | 9.80 | 19 | -1 | 0 | 1 | 0 | 9.57 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.29 | 20 | 0 | 1 | 1 | 0 | 8.93 |
| 6 | 0 | -1 | 1 | 0 | 9.64 | 21 | -1 | 0 | 0 | -1 | 8.86 |
| 7 | 0 | -1 | -1 | 0 | 10.29 | 22 | 1 | 0 | -1 | 0 | 9.86 |
| 8 | 0 | 1 | 0 | -1 | 8.93 | 23 | 0 | 0 | -1 | 1 | 10.86 |
| 9 | -1 | -1 | 0 | 0 | 9.43 | 24 | -1 | 0 | 0 | 1 | 9.71 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | 1 | 10.57 | 25 | 0 | 0 | -1 | -1 | 9.43 |
| 11 | 0 | 1 | 0 | 1 | 10.18 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.57 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.29 | 27 | 1 | 0 | 1 | 0 | 10.43 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.86 | 28 | 0 | 0 | 1 | 1 | 10.00 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11.86 | 29 | 1 | 0 | 0 | -1 | 8.86 |
| 15 | 0 | -1 | 0 | -1 | 8.89 | | | | | | |

结果分析:应用 Design - Expert V8.0.6 软件分析试验结果,得青椒精油得率与各因素交互作用的三维响应面图与二维等高线图(图2)。在响应面图中,曲面越陡峭则该因素对青椒精油得率的影响越大^[17]。由图2可知,曲面均较平缓,表明这些因素相互作用的影响不明显,与方差分析结果一致(AB, AC, AD, BC, BD, CD项的 $P > 0.05$)。

2.4 验证试验

通过建立的数学模型预测青椒精油的最佳提取工艺条件为粉碎粒度63.43目、料液比1:19.35、浸泡时间35.86 min、蒸馏时间146.23 min,在此条件下的精油得

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the ANOVA

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F值 | P值 |
|----------------|-------|-----|-------|-------|---------|
| 模型 | 21.98 | 14 | 1.57 | 18.89 | <0.0001 |
| A | 0.76 | 1 | 0.76 | 9.08 | 0.0093 |
| B | 0.52 | 1 | 0.52 | 6.21 | 0.0258 |
| C | 0.53 | 1 | 0.53 | 6.42 | 0.0239 |
| D | 4.95 | 1 | 4.95 | 59.58 | <0.0001 |
| AB | 0.13 | 1 | 0.13 | 1.52 | 0.2385 |
| AC | 0.25 | 1 | 0.25 | 3.01 | 0.1049 |
| AD | 0.18 | 1 | 0.18 | 2.22 | 0.1581 |
| BC | 0.01 | 1 | 0.01 | 0.15 | 0.7086 |
| BD | 0.03 | 1 | 0.03 | 0.39 | 0.5425 |
| CD | 0.08 | 1 | 0.08 | 0.98 | 0.3397 |
| A ² | 5.48 | 1 | 5.48 | 65.9 | <0.0001 |
| B ² | 6.57 | 1 | 6.57 | 79.05 | <0.0001 |
| C ² | 3.79 | 1 | 3.79 | 45.55 | <0.0001 |
| D ² | 6.70 | 1 | 6.7 | 80.63 | <0.0001 |
| 残差 | 1.16 | 14 | 0.08 | | |
| 失拟项 | 0.84 | 10 | 0.08 | 1.03 | 0.5337 |
| 净误差 | 0.32 | 4 | 0.081 | | |
| 总和 | 23.15 | 28 | | | |

率为11.74%。以节流为出发点,结合实际损耗,将预测提取工艺条件修正为粉碎粒度60目、料液比为1:20(g:mL)、浸泡时间36 min、蒸馏时间146 min。按修正后的条件进行3次验证试验,平均青椒精油得率为11.76%($n = 3$),与理论值相差0.02%,表明此条件预测性好且较稳定,可用于青椒精油的提取。

3 讨论

目前,青椒精油提取方法的研究热点主要集中在超临界CO₂萃取、超声波辅助蒸馏、有机溶剂浸渍提取、微波辅助提取等现代提取工艺方法^[18-20],提取设备要求高,工艺复杂,提取成本较高,不利于工业化大生产,而传统水蒸气蒸馏提取法的设备要求较低,经济适用,操作简单,精油提取率较高,较现代提取方法更适于工业化大生产。响应面法可通过较少的试验设计完成多因素、多水平考察,较正交试验法和均匀设计法更全面,可用于预测试验范围内任何试验点的理论值^[21]。本研究中采用 Box - Behnken 响应面法优选青椒精油的水蒸气蒸馏提取工艺,为青椒精油的产品研发奠定了试验基础。

采用水蒸气蒸馏法提取精油工艺主要影响因素多为粉碎粒度、料液比、浸泡时间、蒸馏时间,针对青椒精油的水蒸气蒸馏研究基本未考虑粉碎粒度,预试验发现,粉碎粒度对精油得率影响较大,故对粉碎粒度、料液比、浸泡时间、蒸馏时间4个因素进行单因素考察,确定最佳单因素,并以此为基础确定 Box - Behnken 响应

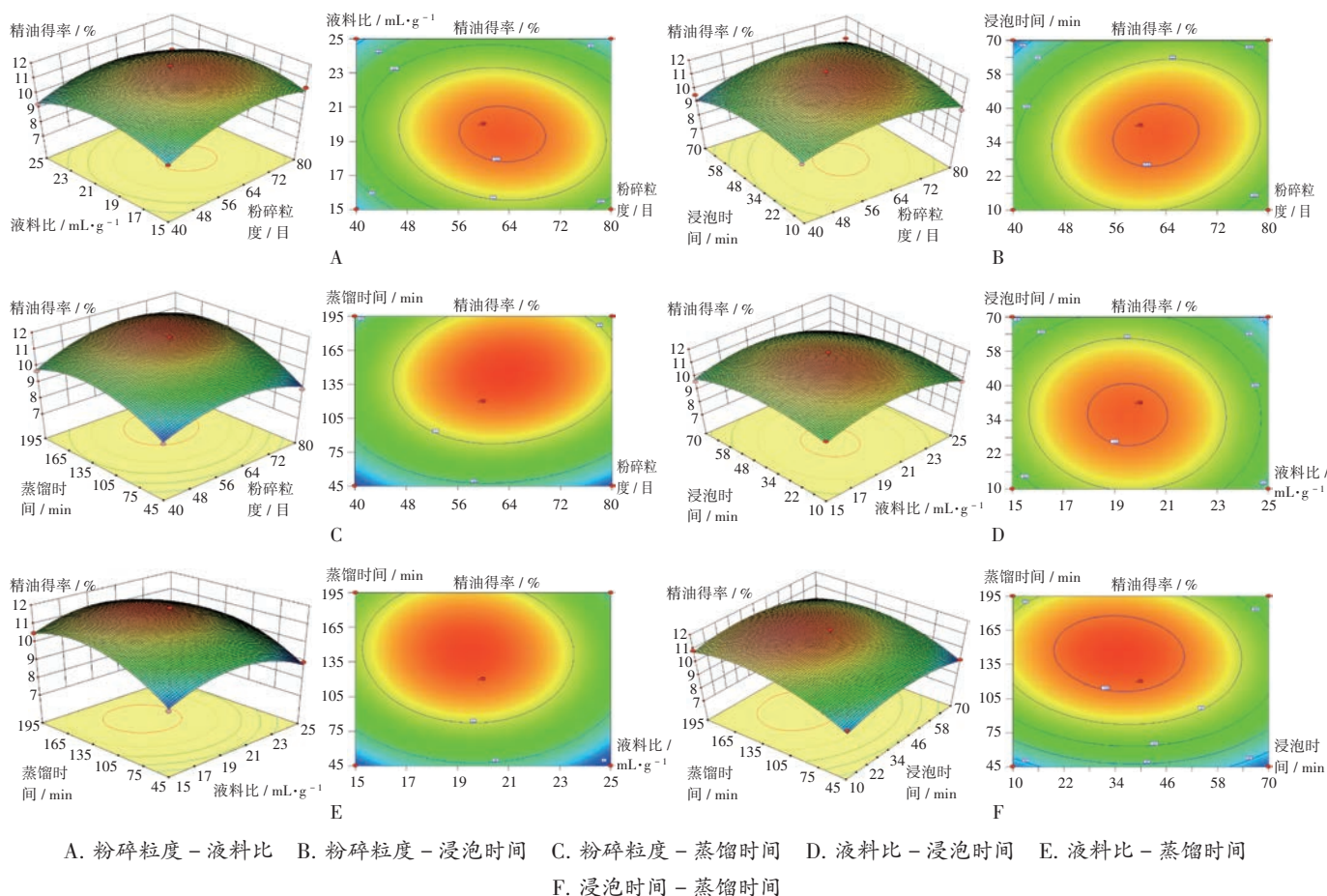


图2 青椒精油得率与各因素交互作用的三维响应面图与二维等高线图

A. Grinding granule size - liquid / solid ratio B. Grinding granule size - soaking time C. Grinding granule size - distillation time D. Liquid / solid ratio - soaking time E. Liquid / solid ratio - distillation time F. Soaking time - distillation time

Fig. 2 Three - dimensional response surface diagram and two - dimensional contour diagram of the interaction between the yield of volatile oil from *Zanthoxylum schinifolium* and various factors

面试验设计各因素与水平。

经 Box - Behnken 响应面试验优化,得贵州产青椒精油最佳提取工艺为粉碎粒度 60 目、料液比 1:20 (g:mL)、浸泡时间 36 min、蒸馏时间 146 min,精油得率为 11.76% ($n = 3$)。该优选工艺提取效率较高,且稳定可靠,初步说明贵州省德江县国家级花椒示范基地所产青椒品质较优良。本研究为高值化花椒精油产品的研发和贵州省花椒产业的可持续发展提供了良好的理论依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:166 - 167.
[2] 席少阳,郭延秀,马晓辉,等. 花椒化学成分及药理作用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2021,36(6):717 - 722.
[3] 纪爱玲. 竹叶椒的化学成分及现代药理研究进展[J]. 继续医学教育, 2020,34(6):155 - 157.
[4] 张红,杨庆,陈颖,等. 中药花椒化学成分及其防治神经精神疾病的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(11):1969 - 1981.

[5] 李春丽,孟宪华,尚贤毅,等. 花椒化学成分及其抗氧化活性[J]. 中草药, 2021,52(10):2869 - 2875.
[6] 吕双,陈佳欢,张涛,等. 花椒果皮化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020,26(1):133 - 138.
[7] 王雪迪,许朵霞,王蓓,等. 三种提取方法对红花椒挥发性成分的影响[J]. 食品工业科技, 2021,42(2):241 - 249.
[8] 郭娜,李箫乐,王香爱. 花椒精油的提取及应用研究[J]. 现代食品, 2020(2):146 - 149.
[9] 朱妞. 花椒活性成分研究现状及发展前景[J]. 粮食与油脂, 2020,33(4):4 - 6.
[10] 蹇顺华,陈胜,齐富友,等. 响应面优化紫油厚朴挥发油提取及抑菌性研究[J]. 粮食与油脂, 2021,34(5):68 - 71.
[11] 史芳芳,周孟焦,梁晓峰,等. 竹叶花椒叶挥发油提取及其化学成分的 GC - MS 分析[J]. 中药材, 2020,43(5):1191 - 1195.
[12] 黄培池. 响应面法优化白芷挥发油提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021(9):31 - 38.
[13] 齐巧明,龙旭,罗凤,等. 响应面法优化艾叶挥发油的提取工艺及其抗氧化性能研究[J]. 化学与生物工程, 2020,37(5):22 - 26.
[14] 郭宏焱,李冬,雷雄,等. 花椒多酚提取工艺响应面优化及动力学分析[J]. 食品科学, 2018,39(2):247 - 253.