

· 试验研究 ·

多指标综合评分法优化陕产花椒提取工艺研究

程应锋^{1,2}, 杜远东³, 赵重博^{1,2*}, 王 晶^{1,2}, 曹林旭^{1,2}, 刘 钉^{1,2}

(1 陕西中医药大学, 陕西 咸阳, 712046; 2 陕西省中药饮片工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046;

3 汉中市食品药品检验检测中心, 陕西 汉中 723000)

摘要:利用 Plackett-Burman 和 Central-Composite Design 效应面法优化花椒酰胺提取工艺。建立花椒提取物中总酰胺的紫外检测方法, 以此为评价指标进行单因素试验确定影响花椒提取的因素水平; 建立花椒提取物中羟基- α -山椒素的高效液相定量检测方法, 以提取物重量、提取物总酰胺和羟基- α -山椒素含量三者总评值为指标, 筛选对花椒提取影响有显著性的因素, 通过响应面法对筛选出的显著影响因素进一步优化花椒酰胺提取工艺。结果表明花椒粉碎粒径 65 目, 以 19 倍量的 80% 甲醇在 32℃ 下浸提 4h, 同时设置搅拌速度 50rpm, 在此条件下花椒提取物得率为 17.91%, 总酰胺提取率为 6.32%, 羟基- α -山椒素提取率为 4.99%。验证试验表明优选的花椒总酰胺提取工艺方法可行。

关键词:花椒; 酰胺; 羟基- α -山椒素; 响应面法

花椒为芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 和青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果皮, 有很好的止痛作用^[1], 在我国有广泛的栽植。长期的人工培育产生了一些列花椒优势品种, 尤其以甘肃、陕西、山东等省最为出名, 如陕西韩城的大红袍等品种^[2]。花椒有特殊的麻味和香味, 也是日常生活中必不可少的调味品, 与桂皮、丁香、八角等被称一起被称为“八大味”^[3]。花椒目前主要是作为农副产品, 经济价值不高, 深加工不够。近几年对花椒的麻味研究较多, 花椒所含异丁基酰胺类化合物, 尤其是羟基- α -山椒素作为麻味的主要物质, 被报道具有一定的神经保护和增强记忆的作用^[4~5]。

花椒酰胺在国内外已有较多报道, 但多针对其麻味刺激和药理作用, 提取方面报道不多, 多以机溶剂或超临界萃取^[6~8], 存在工艺复杂、设备昂贵等制约因素, 不利于工业化推广; 且研究指标单一, 多采用紫外检测麻味物质。PB-CCD 法是针对实验结果影响因素较多时常用的一种优化方法, 在天然产物提取工艺条件的优化上, 该方法以各因素的极端水平为试验所允许的极值, 仅通过一次设计和计算即可得到显著影响提取效率的因素, 是筛选试验因素的较好设计方法^[9]。因此本次实验选用更为简单的浸提工艺, 在单因素实验基础上, 以陕产花椒为研究对象, 以花椒提取物得

率、总酰胺的提取率和羟基- α -山椒素的含量为指标优化提取工艺, 以期陕产花椒的精深加工和综合开发提供借鉴。

1 材料与仪器

花椒购自陕西省韩城市芝阳花椒市场, 为芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. 的干燥成熟果皮。羟基- α -山椒素 (HPLC \geq 98.0%, 批号 M26M10D84025) 购自上海源叶生物科技有限公司。实验中所用甲醇、中性氧化铝及其它试剂均为分析纯; 色谱甲醇为色谱纯, 实验用水为纯化水。

YBS-1000 密封粉碎机 (上海绿翊机械制造有限公司), 524G 恒温加热磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司), XM-80 超声波清洗器 (小美超声仪器有限公司), RE-201D 型旋转蒸发仪 (上海岐耀仪器设备有限公司), TDL-5A 低速离心机 (金城海澜仪器制造厂), BT 25S 型 1/10 万分析天平 (赛多利斯上海贸易有限公司), UV1901 双光束紫外-可见分光光度计 (上海之信仪器有限公司), 沃特斯 2695 高效液相色谱仪, 配 2996DAD 检测器, Empower 工作站 (美国 Waters 公司)。

2 方法与结果

收稿日期: 2020-02-22 修回日期: 2020-04-10

基金项目: 陕西中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (201831057); 陕西省创新人才推进计划-科技创新团队 (2018TD-005); 陕西省中药炮制技术传承基地建设项目; 陕西中医药大学科学研究计划项目 (2017PY31)。

第一作者简介: 程应锋 (1999-), 男, 陕西汉中人, 从事中医药研究。

通信作者: 赵重博 (1987-), 男, 讲师, 博士, 专业方向: 中药炮制与饮片质量标准研究。

2.1 实验流程

花椒→粉碎→过筛→浸提→纯化→干燥→提取物。

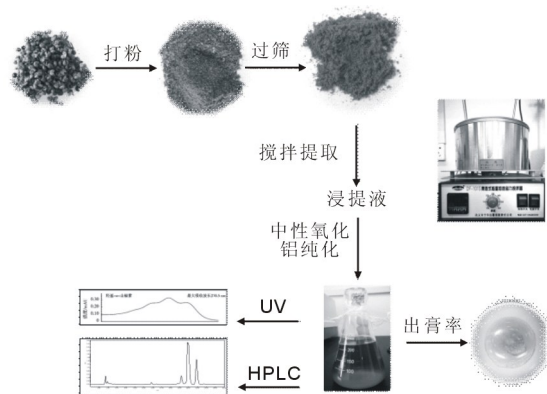


图 1 花椒酰胺浸提实验流程

2.2 花椒总酰胺含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取羟基- α -山椒素对照品 10 mg, 转移至 100 mL 棕色容量瓶中, 加少量甲醇超声待充分溶解后, 再加甲醇补足至刻度线, 即得浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液母液, 用锡箔纸包裹严密, 置于冰箱中, 避光保存备用。

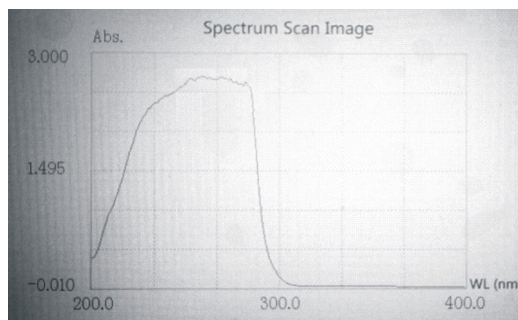
2.2.2 供试品溶液的制备 花椒提取物制备: 参考文献^[10]的方法制备花椒酰胺提取物, 称取花椒粉末 100 g (过三号筛), 加 10 倍量甲醇, 以 60 rpm 的转速在 50°C 浸提 4 h, 过滤。将滤液减压浓缩至一定体积, 过碱性氧化铝层析柱, 收集流出液混合至一处, 4 000 转离心 10 min, 取上清液回收甲醇, 低温干燥即得花椒提取物 13.3675 g, 室温条件下保存于干燥器内。

供试品制备: 精密称取花椒提取物 10 mg 置于棕色三角瓶中, 加 100 mL 甲醇, 称定重量, 超声 30 min, 室温放凉, 加甲醇补足重量, 过滤即得供试品溶液, 用锡箔纸包裹严密, 置于冰箱中, 避光保存。

2.2.3 最大吸收波长扫描 吸取羟基- α -山椒素对照品溶液置于石英皿中, 以甲醇的石英皿为空白对照, 通过紫外-可见分光光度计在 200~400 nm 波长范围内扫描, 结果在 270 nm 处波有最大吸收值, 故选用 270 nm 作为总酰胺含量测定的检测波长。

图 2 羟基- α -山椒素紫外最大吸收波长扫描

2.2.4 线性关系考察 将羟基- α -山椒素对照品溶液依次稀释为浓度为 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $16 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液, 在 270 nm 波长处测定各个溶液的吸光度值。以紫外吸光度为 Y 值, 以不同羟基- α -山椒素浓度为 X 值, 采用最小二



乘法拟合标准曲线, 方程为 $Y = 43.164X - 0.1084$, $r = 0.9995$, 表明羟基- α -山椒素浓度在 $8 \sim 20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 将同一浓度羟基- α -山椒素对照品溶液, 在 270 nm 处重复测定吸光度 6 次, 计算 RSD 值为 0.25%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取 6 份花椒提取物, 每份 10 mg, 按“2.2.2”项下“置于棕色三角瓶中”开始制备供试品溶液, 分别在 270 nm 处测定吸光度, 计算 RSD 值为 1.64%, 表明所建立的花椒总酰胺定量检测方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 将一份标记好的花椒提取物供试品溶液, 用锡箔纸包裹严密, 置于冰箱中, 避光保存, 分别在 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 的时候取出放至室温, 在 270 nm 处测定吸光度, 计算 RSD 值为 1.36%, 表明所建立的花椒总酰胺定量检测方法的稳定性良好。

2.2.8 加样回收试验 精密称取 9 份花椒酰胺提取物, 每份 5 mg, 分为三组。每组分别精密加相当于花椒酰胺提取物中羟基- α -山椒素成分量的 80%、100%、120%, 按“2.2.2”项下“称定重量”开始制备供试品溶液, 分别在 270 nm 处测定吸光度, 计算平均回收率为 100.25%, RSD 值为 2.16%, 表明所建立的花椒总酰胺定量检测方法的准确度良好。

2.2.9 花椒总酰胺提取率计算

$$\text{花椒总酰胺提取率} (\%) = \frac{\text{总酰胺含量} \times \text{花椒提取物质量}}{\text{花椒质量}} \times 100\%$$

2.3 花椒酰胺提取物中羟基- α -山椒素含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性^[11~12] 采用 Thermo C18 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇:水 (0.1% 磷酸) = 70:30, 检测波长 270 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。

2.3.2 对照品溶液的制备 同“2.2.1”对照品溶液的制备。

2.3.3 供试品溶液的制备 同“2.2.2”供试品溶液的制备。

2.3.4 线性关系考察 取“2.2.4”项下的对照品储备液。采用高效液相色谱仪自动进样,测定峰面积,以羟基- α -山椒素峰面积为 Y 值,以不同羟基- α -山椒素浓度为 X 值,采用最小二乘法拟合标准曲线,方程为 $Y = 420\ 319X - 752.81$ ($r = 0.9992$),表明羟基- α -山椒素浓度在 $8 \sim 20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度考察 将同一羟基- α -山椒素对照品溶液,重复进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 值 0.72%,表明仪器的精密度良好。

2.3.6 重复性考察 取“2.2.6”项下的 6 份重复性样品进样,测定峰面积,计算 RSD 值 1.35%,

表明所建立的花椒羟基- α -山椒素定量检测方法的重复性良好。

2.3.7 稳定性考察 将同一供试品,分别在 0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 时间点进样,测定羟基- α -山椒素峰面积,计算 RSD 值 1.57%,表明所建立的花椒羟基- α -山椒素定量检测方法的稳定性良好。

2.3.8 加样回收率实验 取“2.2.8”项下的 9 份加样回收率样品液进样,测定峰面积,计算平均回收率为 103.71%,RSD 值为 2.42%,表明所建立的花椒羟基- α -山椒素定量检测方法的准确度良好。

2.3.9 花椒羟基- α -山椒素提取率计算

$$\text{花椒羟基-}\alpha\text{-山椒素提取率}(\%) = \frac{\text{羟基-}\alpha\text{-山椒素含量} \times \text{花椒提取物质量}}{\text{花椒质量}} \times 100\%$$

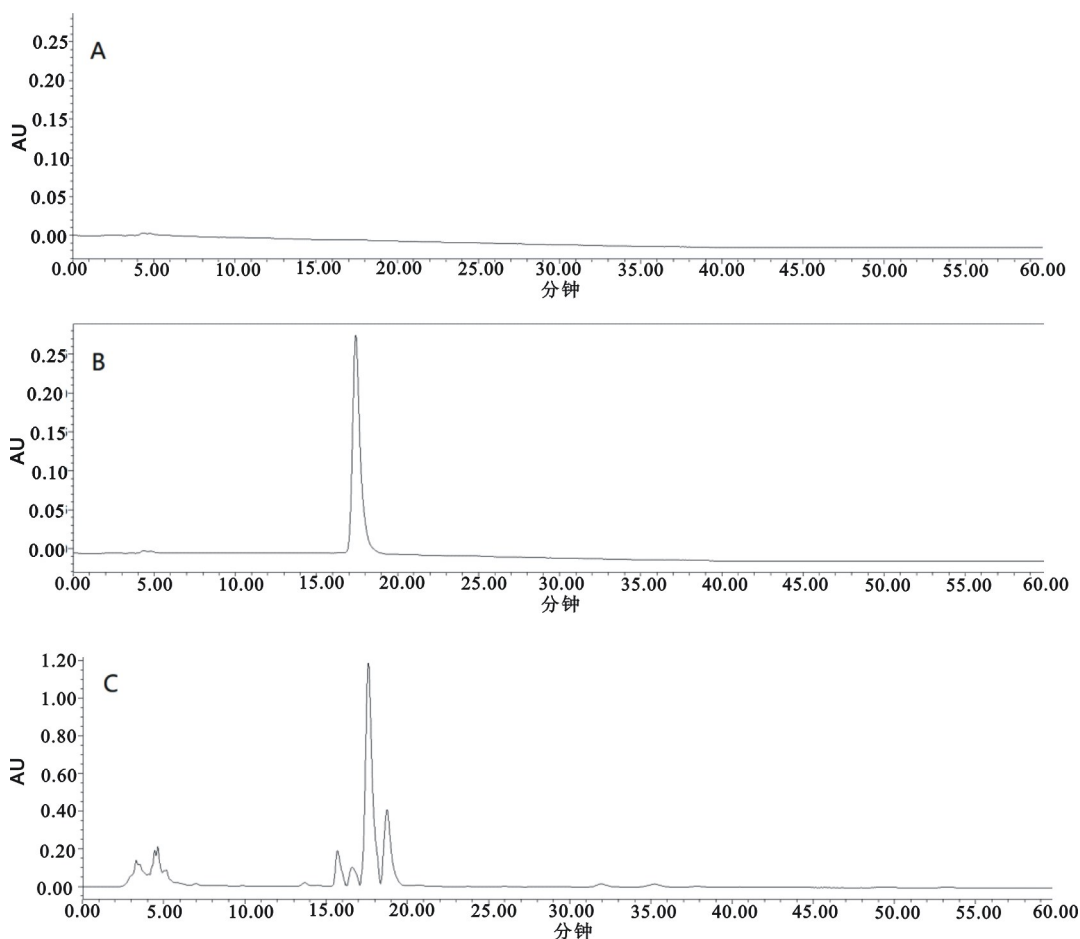


图3 羟基- α -山椒素色谱图(A 空白甲醇,B 标准品,C 花椒酰胺提取物)

2.4 单因素试验考察

花椒提取过程的影响因素包括粉碎粒径,提取溶剂浓度和用量,浸提温度和时间以及搅拌速度 6 个因素,每个因素取常用 5 个参数进行单因素实验。因单因素试验次数较多,且总酰胺是重

要的评价指标,故单因素以花椒总酰胺含量为指标进行考察。

2.4.1 粉碎粒径考察 根据药典筛得到花椒粉碎粒度分别为 24 目、50 目、65 目、80 目和 100 目,每种粒径花椒粉末称取 10g,置棕色具塞锥形

瓶中,加 10 倍量 100% 甲醇,以 60 rpm 的转速在 50℃ 浸提 4 h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-A,用二号筛(24 目)过筛时花椒粉和内部果壳纤维不能有效分离,花椒过筛的目数越大(粉碎粒径越小),总酰胺含量越高。但是粒径太小时,因为花椒富含油脂易粘连导致过筛较困难,当粒度为 65 目时,提取率最大。当粒度超过 80 目,提取率出现下降,可能因为粉末太细,煎煮过程中凝结成团,不利于团块内部的酰胺溶出,故选择 65 目粉碎粒径继续进行单因素实验,选择 50~80 目作为后续实验粉碎粒径范围。

2.4.2 提取溶剂考察 精密称取 10g 花椒粉末(65 目)5 份,分别置棕色具塞锥形瓶中,加 10 倍量 100% 甲醇、80% 甲醇、60% 甲醇、40% 甲醇、20% 甲醇,以 60 rpm 的转速在 50℃ 浸提 4 h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-B,80% 甲醇的提取率最高,故选 80% 甲醇作为最佳浓度进行单因素试验,选择 60%~100% 浓度甲醇作为后续实验提取溶剂浓度范围。

2.4.3 溶剂量考察 精密称取 10 g 花椒粉末(65 目)5 份,分别置棕色具塞锥形瓶中,分别加 5 倍、10 倍、15 倍、20 倍和 25 倍 80% 甲醇,以 60 rpm 的转速在 50℃ 浸提 4h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-C,料液比 1:15 即达到提取饱和,随着溶剂用量增多,提取率增加不明显反而有一定的减少,有可能是过多的溶剂回收会造成酰胺更多的损失,从节约能源和减少后期回收溶剂

等方面考虑,故选 15 作为最佳倍量继续进行单因素试验,选择 10~20 倍作为后续实验料液比范围。

2.4.4 浸泡温度 精密称取 10g 花椒粉末(65 目)5 份,分别置棕色具塞锥形瓶中,分别加 15 倍 80% 甲醇,分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃,以 60 rpm 的转速浸提 4h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-D,浸提温度在 40℃ 达到最大值,随着温度升高,提取率增加不明显反而有一定的减少,有可能是高温加剧酰胺的氧化损失,故选 40℃ 作为最佳浸泡温度继续进行单因素试验,选择 30~50℃ 作为后续实验浸泡温度范围。

2.4.5 浸泡时间 精密称取 10 g 花椒粉末(65 目)5 份,分别置棕色具塞锥形瓶中加 15 倍 80% 甲醇,在 40℃ 以 60 rpm 的转速浸提 2 h、3 h、4 h、5 h、6 h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-E,浸泡时间越长提取率越高,4 h 后基本饱和,故选 4 h 作为最佳浸泡时间继续进行单因素试验,选择 3~5 h 作为后续实验浸泡时间范围。

2.4.6 搅拌速度 精密称取 10 g 花椒粉末(65 目)5 份,分别置棕色具塞锥形瓶中加 15 倍 80% 甲醇,浸提温度 40℃,分别以 20 rpm、30 rpm、40 rpm、50 rpm、60 rpm、的转速浸提 4 h,按“2.2.2”项下“过滤”开始制备供试品溶液,计算花椒总酰胺提取率。结果见图 4-F,浸提转速越高提取率越高,50 rpm 达到最大提取率后趋于平和。所以选择 50 rpm 作为浸提转速继续进行单因素试验,选择 40~60 rpm 作为后续实验浸提转速范围。

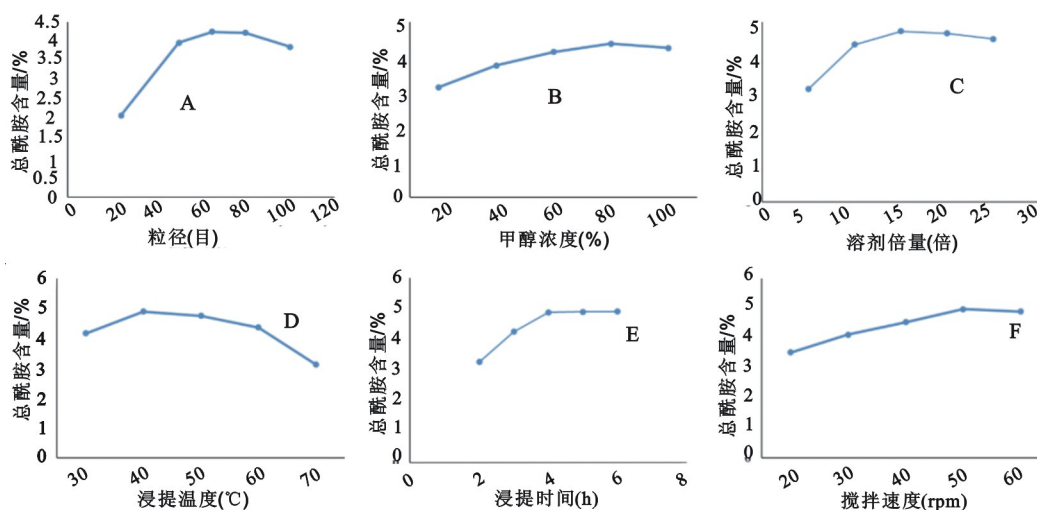


图 4 单因素结果(左右上下依次为 4-A,4-B,4-C,4-D,4-E,4-F)

2.5 Plackett-Burman 设计

在单因素试验基础上运用 Design-Expert 软件的 Plackett-Burman 模块,对每个因素选取 2 个水平(-1,1),考察各因素水平对花椒提取物得率、总酰胺提取率和羟基- α -山椒素提取率的影响。采用总评归一值法[overall desirability-value, OD 值,利用 Hassan 法对各效应值进行归

一化,本次实验的指标值高越好,因此,归一值 $d_i = (y_i - y_{min}) / (y_{max} - y_{min})$,再对归一值求几何平均值, $OD = (d_1, d_2, \dots, d_n)^{1/n}$]的影响^[13]。实验因素水平见表 1,结果见表 2。

利用 Design-Expert 软件对实验因素和结果进行方差分析,对模型采用 F 检验进行方差分析及模型系数显著性检查,结果见表 3。

表 1 PB 实验因素水平

| | 粉碎粒径/目 | 甲醇浓度/% | 溶剂量/倍 | 浸提温度/°C | 浸提时间/h | 搅拌速度/rpm |
|----|--------|--------|-------|---------|--------|----------|
| -1 | 50 | 60 | 10 | 30 | 3 | 40 |
| 1 | 80 | 100 | 20 | 50 | 5 | 60 |

表 2 PB 实验设计及结果

| | 粉碎粒径 /目 | 甲醇浓度 /% | 溶剂量 /倍 | 浸提温度 /°C | 浸提时间 /h | 搅拌速度 /rpm | 提取物得率 /% | 总酰胺 /% | 羟基- α - 山椒素/% | OD 值 |
|----|------------|------------|-----------|-------------|------------|--------------|-------------|-----------|-------------------------|--------|
| 1 | 50 | 60 | 20 | 30 | 5 | 60 | 15.42 | 6.14 | 4.92 | 0.8213 |
| 2 | 80 | 100 | 10 | 50 | 5 | 60 | 12.29 | 4.12 | 3.42 | 0.0741 |
| 3 | 50 | 60 | 10 | 30 | 3 | 40 | 12.24 | 5.75 | 4.78 | 0.3653 |
| 4 | 80 | 60 | 20 | 50 | 3 | 60 | 14.15 | 3.72 | 3.08 | 0 |
| 5 | 50 | 100 | 20 | 50 | 3 | 40 | 16.84 | 4.41 | 3.66 | 0.2842 |
| 6 | 50 | 100 | 20 | 30 | 5 | 60 | 17.48 | 5.83 | 4.84 | 0.9132 |
| 7 | 80 | 60 | 20 | 50 | 5 | 40 | 13.94 | 4.31 | 3.58 | 0.1708 |
| 8 | 50 | 100 | 10 | 50 | 5 | 40 | 13.16 | 3.85 | 3.11 | 0.0166 |
| 9 | 80 | 100 | 20 | 30 | 3 | 40 | 16.56 | 4.85 | 4.02 | 0.4515 |
| 10 | 80 | 60 | 10 | 30 | 5 | 40 | 12.56 | 5.19 | 4.31 | 0.3007 |
| 11 | 80 | 100 | 10 | 30 | 3 | 60 | 14.37 | 5.46 | 4.53 | 0.5368 |
| 12 | 50 | 60 | 10 | 50 | 3 | 60 | 11.15 | 4.38 | 3.62 | 0 |

表 3 PB 实验方差分析结果

| 项目 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|--------|-------|-----|---------|-------|----------|
| 模型 | 1.00 | 6 | 0.17 | 17.85 | 0.0031** |
| A-粒径 | 0.063 | 1 | 0.063 | 6.68 | 0.0491* |
| B-溶剂浓度 | 0.032 | 1 | 0.032 | 3.40 | 0.1244 |
| C-溶剂倍量 | 0.15 | 1 | 0.15 | 16.16 | 0.0101* |
| D-浸提温度 | 0.67 | 1 | 0.67 | 71.93 | 0.0004** |
| E-浸提时间 | 0.036 | 1 | 0.036 | 3.87 | 0.1065 |
| F-搅拌速度 | 0.048 | 1 | 0.048 | 5.09 | 0.0737 |
| 残差 | 0.047 | 5 | 0.00936 | | |
| 总离差 | 1.05 | 11 | | | |

注: ** 为极显著($P < 0.01$), * 为显著($P < 0.05$)

由表 3 可以看出,所建立的模型具有显著性($P < 0.01$),表明该模型可用于花椒酰胺提取因素的显著性分析。其中花椒粉碎粒径($P < 0.05$)、浸提时间($P < 0.01$)和溶剂用量($P < 0.05$)三个因素具有显著性,但是粉碎粒径由过筛目数决定,是一个非连续变量,故将此浸提时间和溶剂用量 2 个因素作为下一步响应面法优化的

因素。甲醇浓度、浸提温度和搅拌速度对实验结果影响不大,因此结合单因素实验结果固定花椒粉碎粒径 65 目(四号筛),80%甲醇浸提 4 h,搅拌速度 50 rpm 四个因素进行实验。

2.6 Central-Composite Design 效应面法优选

在单因素试验和 PB 实验的基础上,固定花椒粉碎粒径 65 目(四号筛),甲醇浓度 80%,浸提

时间 4h, 搅拌速度 50rpm, 以溶剂倍量和浸提温度为因变量, 以 OD 值为自变量, 根据 Design Expert 软件的 Central-Composite Design 中心组

合试验模块进行实验设计, 因素水平表见表 4, 实验结果见表 5。

表 4 因素水平

| 因素 | 水平 | | | | |
|--------|-------|----|----|----|-------|
| | -α | -1 | 0 | 1 | +α |
| 溶剂倍量/倍 | 7.92 | 10 | 15 | 20 | 22.07 |
| 浸提温度/℃ | 25.85 | 30 | 40 | 50 | 54.14 |

表 5 Central-Composite Design 实验设计表与效应值

| No | 溶剂倍量 / 倍 | 浸提温度 /℃ | 提取物得率 /% | 总酰胺 /% | 羟基-α-山椒素 /% | OD 值 |
|----|----------|---------|----------|--------|-------------|---------|
| 1 | 12 | 300 | 15.73 | 5.62 | 4.61 | 0.648 2 |
| 2 | 8 | 300 | 12.51 | 4.45 | 3.76 | 0.158 9 |
| 3 | 12 | 350 | 17.11 | 6.12 | 4.95 | 0.910 3 |
| 4 | 12 | 250 | 13.72 | 4.76 | 3.75 | 0.244 9 |
| 5 | 12 | 300 | 17.83 | 6.24 | 5.01 | 1 |
| 6 | 12 | 300 | 17.22 | 6.13 | 4.75 | 0.869 5 |
| 7 | 8 | 300 | 17.29 | 6.07 | 4.86 | 0.891 2 |
| 8 | 12 | 300 | 14.15 | 3.72 | 3.08 | 0 |
| 9 | 12 | 350 | 17.24 | 6.09 | 4.91 | 0.904 0 |
| 10 | 12 | 300 | 10.76 | 4.18 | 3.28 | 0 |
| 11 | 8 | 250 | 14.76 | 5.58 | 4.79 | 0.608 2 |
| 12 | 16 | 350 | 17.37 | 5.93 | 4.65 | 0.816 6 |
| 13 | 16 | 300 | 17.16 | 6.02 | 4.87 | 0.875 |

运用 Design-Expert 软件进行响应面分析, 以花椒提取总评值 OD 值为响应值, 对溶剂用量、浸提温度进行多元线性回归二项式方程拟合, 拟合的方程模型为 $OD = 0.88 + 0.19A - 0.24B - 0.11AB - 0.2A^2 - 0.23B^2$ ($R^2 = 0.8217$; $R_{Adj}^2 = 0.6943$), 对模型采用 F 检验进行方差分析及模型系数显著性检查, 结果见表 6。二项式模型

$P < 0.05$, 说明该方程与实际情况拟合良好。以 OD 值最大值为目标, 根据“Design Expert”软件预算得最佳花椒提取工艺参数为: 溶剂倍量 19 倍, 浸提温度 32℃, 此情况下 OD 值预测最大值 1.0089。OD 值提取率与溶剂倍量和浸提温度的三维效应面曲线见图 5。

表 6 Central-Composite Design 实验方差分析结果

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P(F>Fα) |
|----------------|-----------|-----|----------|-------|-----------|
| Model | 1.37 | 5 | 0.27 | 6.45 | 0.014 9* |
| A-溶剂倍量 | 0.29 | 1 | 0.29 | 6.81 | 0.035* |
| B-浸提温度 | 0.45 | 1 | 0.45 | 10.55 | 0.014 1* |
| AB | 0.045 | 1 | 0.045 | 1.07 | 0.336 2 |
| A ² | 0.29 | 1 | 0.29 | 6.86 | 0.034 5* |
| B ² | 0.37 | 1 | 0.37 | 8.77 | 0.021 1* |
| 残差 | 0.30 | 7 | 0.043 | | |
| 失拟性 | 0.29 | 3 | 0.097 | 67.95 | 0.000 7** |
| 纯误性 | 0.000 57 | 4 | 0.000 14 | | |
| 总差 | 1.454 985 | 16 | | | |

注: ** 为极显著 ($P < 0.01$), * 为显著 ($P < 0.05$)。

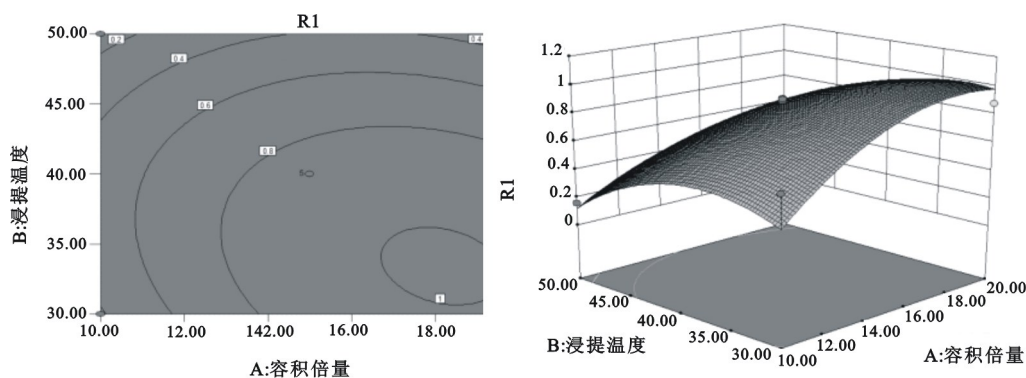


图5 溶剂倍量和提取温度对响应值的等高线和效应面

2.7 提取工艺参数验证

根据实际条件的可操作性,将工艺条件优化为:花椒粉碎粒径 65 目(四号筛),甲醇浓度 80%,溶剂倍量 19 倍,浸提温度 32℃,搅拌速度 50rpm,浸提时间 4h,结果见表 7。

花椒提取物得率为 17.91%,总酰胺提取率

为 6.32%,羟基- α -山椒素提取率为 4.99%,平均 OD 值为 1.0161 > 1.0089。由结果可知,通过 PB-CCD 实验优化所得花椒提取工艺模型预测值与实际提取值结果接近,表明建立的花椒提取工艺模型预测性良好。

表 7 验证试验结果

| | 提取物得率/% | 总酰胺含量/% | 羟基- α -山椒素含量/% | OD 值 |
|-----|---------|---------|-----------------------|---------|
| 1 | 17.85 | 6.37 | 4.93 | 1.005 4 |
| 2 | 17.67 | 6.35 | 5.03 | 1.015 1 |
| 3 | 18.21 | 6.24 | 5.01 | 1.026 5 |
| 平均值 | 17.91 | 6.32 | 4.99 | 1.016 1 |

3 讨论

花椒作为典型的药食同源物质,作为食物是因为其特有的麻味风味,作为中药温里药是因为其性辛温,都与其所含酰胺类成分有关。日本学者以人体的刺麻感受作为指标的研究结果表明花椒中以羟基- α -山椒素为主的酰胺类成分是其产生麻感的主要成分^[14~15]。但是由于花椒酰胺化学结构中含有大量的共轭三烯键,在室温的条件下就极易被氧化,其氧化物的麻度降低^[16]。本项目制备的花椒总酰胺提取物其稳定性要高于高纯度的花椒酰胺,且提取方式都有利于工业化生产。研究结果为花椒的进一步开发利用提供了一定的借鉴,也为花椒产业深加工所面临的问题进行了一定的探索。

参考文献:

[1] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[S]. 成都:四川科学技术出版社,2010: 596-599.
 [2] 银航,王秀玲,窦雪绒,等.花椒药用深加工研究综述及发展建议[J]. 陕西林业科技,2018,46(04): 102-105.
 [3] 赵晓娟,刘晓林,李彩玉,等.韩城花椒存在的问

题及对策[J]. 陕西林业科技,2019,47(05): 108-111.

[4] M Y, L X, H LX, et al. Extraction solvent affects the antioxidant, antimicrobial, cholinesterase and HepG2 human hepatocellular carcinoma cell inhibitory activities of Zanthoxylum bungeanum pericarps and the major chemical components[J]. Industrial Crops & Products, 2019, 142-153.
 [5] Z MM, X MG, W DN, et al. Hydroxy- α -sanshool isolated from Zanthoxylum bungeanum attenuates learning and memory impairments in scopolamine-treated mice. [J]. Food & function, 2019, 10(11): 1-10.
 [6] 刘雄, 阚建全, 陈宗道, 等. 花椒风味成分的提取[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 62-66.
 [7] 孙国峰, 李凤飞, 杨文江, 等. 花椒有效成分的 CO₂ 超临界萃取工艺[J]. 食品与生物技术报, 2011, 30(06): 899-904.
 [8] 朱羽尧, 张国琳, 钱骅, 等. 竹叶花椒中不饱和酰胺类成分的制备研究[J]. 食品工业, 2015, 36(06): 8-11.
 [9] 黄文静, 孙晓春, 姚绍嫦, 等. 基于 PB-CCD 设计的黄芪茎叶总皂苷提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(08): 3 690-3 697.

(下转第 38 页)