

УДК 615.322.57.087

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ β -КАРОТИНА МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

А.Г. Курегян^{1*}, Э.Ф. Степанова^{1*}

Резюме. В настоящей статье представлены результаты моделирования и оптимизации процесса получения каротиноидов на примере β -каротина. Проведена комплексная количественная оценка влияния пяти технологических параметров на выход индивидуального каротиноида методом математического планирования эксперимента. Цель достигнута путем построения математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка. Доказана адекватность работы полученной математической модели и проведена оптимизация процесса получения β -каротина методом крутого восхождения.

Ключевые слова: каротиноиды, β -каротин, экстракция, математическое планирование эксперимента, крутое восхождение.

TECHNOLOGY OPTIMIZATION OF β -CAROTENE PRODUCTION BY MEANS OF MATHEMATICAL DESIGN OF EXPERIMENTS

A.G. Kuregyan^{1*}, E.F. Stepanova^{1*}

Abstract. This article presents the results of modeling and optimization of the process of producing carotenoids by the example of β -carotene. The complex quantitative estimation of five technological parameters influence on the exit of individual carotenoid is conducted by the method of the mathematical planning of experiment. The complex quantitative estimation of influence of five technological parameters is conducted on the exit of individual carotenoids the method of the mathematical planning of experiment. The goal is achieved by constructing a mathematical model based on regression equations of the first order. We prove the adequacy of the work produced mathematical models and optimization carried out the process of obtaining β -carotene by a steep ascent.

Keywords: carotenoids, β -carotene, extraction, mathematical design experiment, steep ascent.

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

1 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of SEI HPE Volgograd state medical university MH RF, 11, Kalinina prospekt., Pyatigorsk? 357532, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Kooregyan@mail.ru, estepanova@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды – один из классов природных биологических активных веществ (БАВ), который может способствовать решению задач по профилактике и терапии достаточно широкого круга патологических состояний [1–3].

Получение любых индивидуальных БАВ из растительного сырья с достаточно высокой степенью чистоты является трудоемким процессом. Одним из наиболее эффективных способов получения фармацевтических субстанций природного происхождения является комбинация методов экстракции и хроматографии. Такой сочетанный подход требует целенаправленного выбора и оптимизации технологического процесса.

Наиболее эффективно для этих целей используются математико-статистические методы планирования. Именно эти методы прикладной

математики позволяют выявить влияние нескольких факторов на изучаемый технологический процесс [4–6].

Цель исследования – моделирование и оптимизация процесса получения каротиноидов на примере β -каротина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную экстракцию сырья (мякоть плодов тыквы, влажность не более 15%, гидромодуль 1:10) проводили смесью ацетона и метилового спирта; полученный экстракт сушили до полного удаления растворителя; сухой остаток растворяли в гексане; шрот повторно обрабатывали гексаном; экстракты объединяли; для омыления эфиров каротиноидов использовали раствор гидрокарбоната натрия с концентрацией от 5 до 10%; отделяли органический слой, промывая диэтиловым эфиром до полного удаления гидро-

карбоната натрия; разделение суммы каротиноидов на индивидуальные соединения осуществляли на колонке с алюминия оксидом (подвижная фаза – гексан, ацетон, диэтиловый эфир).

Количественное определение β-каротина проводили спектрофотометрически, расчет по стандартному образцу β-каротина (7235-40-7, Sigma-Aldrich).

Использованные в эксперименте реактивы: метанол (ч.д.а., ГОСТ 6995-77), ацетон (ч.д.а., ГОСТ 2603-79), *n*-гексан (ч.д.а., ТУ 2631-003-05807999-98), спирт этиловый (ФС 42-3071-00), натрия гидрокарбонат (ФС.2.2.0011.15), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15), диэтиловый эфир (ч.д.а., ТУ 2600-001-43852015-10 с изм. №1), алюминия оксид для хроматографии (ТУ 6-68-164-99) и оборудование: весы лабораторные ВЛ-210, класс точности 1 (специальный); блендер лабораторный Waring 8010S; лабораторные сита С30/50 (ГОСТ 3826-82); роторный испаритель (испаритель ротационный R-213b); эксикатор (ГОСТ 25336-82); спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», спектральный диапазон от 200 до 750 нм); воронки делительные вместимостью 25, 100 и 500 мл; колбы конические вместимостью 25, 50, 100, 250 мл; колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250 мл; цилиндры мерные градуированные объемом 10, 50 и 100 мл, пипетки градуированные объемом 1, 2, 5, 10 мл (класс точности 1, ГОСТ 29227-91).

Комплексную оценку влияния технологических параметров на выход индивидуального каротиноида осуществляли методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка. Расчеты проводили на базе программного пакета Microsoft Office, включающего лицензионную программу Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для построения математической модели в качестве переменных величин были выбраны следующие: количество алюминия оксида, помещаемого в хроматографическую колонку; время контакта фаз на одной ступени экстракции; концентрация раствора гидрокарбоната натрия; число ступеней экстракции; температурный режим экстрагирования.

Для проверки значимости влияния этих факторов на процесс экстракции был построен эксперимент по типу дробной реплики, условия которого представлены в таблице 1.

Далее в соответствии с дробной репликой 2³ был поставлен эксперимент в восьми повторностях в соответствии с матрицей планирования, представленной в таблице 2.

Критерием оптимизации было выбрано содержание каротиноида, которое определяли методом спектрофотометрии как количество экстрагированного β-каротина в процентах.

Таблица 1.

Условия планирования эксперимента

	Количество алюминия оксида X ₁ , г	Время экстракции X ₂ , мин	Концентрация раствора гидрокарбоната натрия X ₃ , %	Число ступеней экстракции X ₄ , раз	Температура X ₅ , °С
Основной уровень	5	20	10	3	20
Интервал варьирования	2	10	5	1	5
Верхний уровень (+1)	7	30	15	4	25
Нижний уровень (-1)	3	10	5	2	15

Таблица 2.

План и результат эксперимента получения β-каротина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение Y, %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	+	-	-	-	-	0,137
2	+	+	+	+	-	0,134
3	-	-	-	+	+	0,149
4	-	+	-	-	-	0,144
5	+	-	+	-	+	0,136
6	+	+	-	+	+	0,140
7	-	-	+	+	-	0,139
8	-	+	+	-	+	0,142
9	0	0	0	0	0	0,141
10	0	0	0	0	0	0,139
11	0	0	0	0	0	0,142
12	0	0	0	0	0	0,143
13	0	0	0	0	0	0,140
14	0	0	0	0	0	0,138

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии. Пример расчета и значения коэффициентов уравнения регрессии представлены в таблице 3.

Как показали расчеты, коэффициенты в уравнении регрессии для первого, второго и третьего фактора имели отрицательные значения, для четвертого и пятого – положительные.

На основании полученных результатов было составлено опорное уравнение регрессии, имеющее следующий вид:

$$y = 0,1401 - 0,0034x_1 - 0,00013x_2 - 0,00238x_3 + 0,000375x_4 + 0,00163x_5 \quad (1)$$

Таблица 3.

Расчет значений коэффициентов уравнения регрессии

Пример расчета	Коэффициент в уравнении регрессии	Значение коэффициента
$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{1,121}{8} = 0,1401$ $b_1 = \frac{\sum y \cdot x_1}{n} = \frac{-0,027}{8} = -0,0034$	b_0	0,140100
	b_1	-0,003400
	b_2	-0,000130
	b_3	-0,002380
	b_4	+0,000375
	b_5	+0,001630

Далее согласно матрице эксперимента по результатам опытов в нулевых условиях, отраженных в таблице 2, проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнения:

$$y_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{0,843}{6} = 0,141 \quad (2)$$

$$S_y = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1} = 8,4 \cdot 10^{-4} \quad (3)$$

$$S_y^2 = 7,1 \cdot 10^{-7} \quad (4)$$

$$S_{bi}^2 = \frac{S_y^2}{n} = \frac{7,1 \cdot 10^{-7}}{8} = 0,89 \cdot 10^{-7} \quad (5)$$

$$S_{bi} = 2,98 \cdot 10^{-4} \quad (6)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнения регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [7]:

$$t_0 = \frac{b_0}{S_{bi}} = \frac{0,1401}{2,98 \cdot 10^{-4}} = 470 \quad (7)$$

$$t_1=11,40; t_2=0,44; t_3=7,99; t_4=1,25; t_5=5,50.$$

Коэффициенты Стьюдента для второго (t_2) и четвертого (t_4) факторов меньше табличных, это свидетельствует о минимальном влиянии на процесс получения каротиноидов времени контакта фаз и числа ступеней экстракций больше минимальных значений – 10 мин и более 2 раз.

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывает температура (t_5). Максимальное отрицательное влияние оказывает количество алюминия оксида (t_1), если происходит увеличение его количества до значений больше 5 г.

После учета влияния факторов на процесс получения β -каротина уравнение регрессии приняло окончательный вид:

$$y = 0,1401 - 0,0034x_1 - 0,00238x_3 + 0,00163x_5 \quad (8)$$

Любая построенная математическая модель нуждается в проверке адекватности.

С этой целью, используя окончательное уравнение регрессии (8) и матрицу эксперимента, представленную в таблице 2, рассчитывали теоретические значения измеряемого показателя – содержание β -каротина в конечном экстракте. Пример расчета содержания каротиноида в конечном экстракте и результаты представлены в таблице 4.

По полученным данным рассчитывали сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности:

$$S_R = \sum (y_{\text{э}} - y_p)^2 = 0,000144^2 = 2,1 \cdot 10^{-8} \quad (9)$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N-f} = \frac{2,1 \cdot 10^{-8}}{14-6} = 4,15 \cdot 10^{-9} \quad (10)$$

Таблица 4.

Значения экспериментального и рассчитанного содержания β -каротина в конечном экстракте

№ опыта	Пример определения расчетного содержания ($U_{\text{расчетное}}$) каротиноида: $y_1 = 0,1401 - 0,0034(+1) - 0,00238(-1) + 0,00163(-1) = 0,138$		
	$U_{\text{экспериментальное}}$	$U_{\text{расчетное}}$	$U_{\text{э}} - U_p$
1.	0,137	0,138	-0,001
2.	0,134	0,133	0,001
3.	0,149	0,148	0,001
4.	0,144	0,144	0
5.	0,136	0,136	0
6.	0,140	0,141	-0,001
7.	0,139	0,139	0
8.	0,142	0,143	0,001
9.	0,141	0,136	0,005
10.	0,139	0,136	0,003
11.	0,142	0,136	0,006
12.	0,143	0,136	0,007
13.	0,140	0,136	0,004
14.	0,138	0,136	0,002

Таблица 5.

Крутое восхождение по содержанию β -каротина в конечном экстракте

Характеристика	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	y
Начальная точка движения	3 г	10 мин	5%	2 ступени	25,0 °С	0,149
Единица варьирования	0,25	–	0,5	–	2,5	–
Коэффициент в уравнении регрессии	–0,00340	–	–0,00238	–	+0,00163	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,155
Опыт 2	2,5	10	4	2	30,0	0,158
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,151

Далее было рассчитано значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{4,15 \cdot 10^{-9}}{3,50 \cdot 10^{-6}} = 0,0012. \quad (11)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 0,0012, что не превышает табличное значение этого показателя – $F_{0,95}(8,13)=2,77$ [7] и позволяет утверждать, что разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса экстракции, параметр оптимизации – содержание β -каротина, %. Для этого использовали метод крутого восхождения, который представлен в таблице 5. Начальной точкой движения был выбран эксперимент с наилучшими результатами по содержанию каротиноида, полученными в предыдущем исследовании.

Изменение факторов проводили в соответствии с их влиянием на процесс и значением коэффициентов в окончательном уравнении регрессии. Наибольшее значение коэффициента наблюдается у первого фактора – количества алюминия оксида, его шаг варьирования был максимальным.

Для факторов третьего и пятого – концентрации раствора натрия гидрокарбоната и температуры – шаг изменяли пропорционально значению их коэффициентов в уравнении регрессии, для незначимых факторов – времени контакта фаз и числа ступеней экстракций – значения принимали равными минимальным, то есть 10 мин и 2 ступени.

Таким образом, было установлено, что увеличение температуры выше 30 °С и уменьшение количества алюминия оксида до значений меньше 2,5 г и концентрации раствора гидрокарбоната натрия до значений меньше 4% не приводит к увеличению выхода β -каротина, а следовательно, в опыте 2 достигнуты оптимальные условия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что предлагаемый способ оптимизации позволил увеличить выход продукта на 6% от максимального и

на 12% от среднего до оптимизации. Кроме того, выявленное количественное влияние пяти факторов на процесс экстракции каротиноидов на примере получения β -каротина позволит в дальнейшем упростить масштабирование методики.

Наработка экспериментального и теоретического материала по экстракции соединений различной полярности позволит в дальнейшем при систематизации и математико-статистической обработке этих данных получить теоретические модели, позволяющие проводить оптимизацию экстракции соединений природного происхождения, учитывая количественное влияние каждого фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Pilbrow, D. Garama, A. Carne. Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function // Paper in Press. 2012. V. 59. № 190. P. 1–3.
2. J. Deng, L. Xiong, Z. Zuo. Trans-sodium crocetin provides neuroprotection against cerebral ischemia and reperfusion in obese mice // J. Neurosci. Res. 2015. V. 93. P. 615–622.
3. M.A. Gammon, N. D'Orazio. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 2196–2214.
4. В.Д. Пономарев. Экстрагирование лекарственного сырья. – М.: Медицина, 1976. С. 164–184.
5. В.Д. Пономарев, В.Г. Беликов, Н.И. Коковкин-Щербак. Математические методы в фармации. – М.: Медицина, 1983. С. 101–150.
6. Я.И. Абрамова, В.С. Чучалин, Е.М. Теплякова и др. Разработка технологии экстракта желчегонного сбора // Фармация. 2012. № 2. С. 38–41.
7. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея РФ, 13-е изд. – М.: НЦЭСМП, 2015. URL: <http://www.femb.ru> (дата обращения 03.02.2017).