

# 星点设计-效应面法优化首乌藤微波提取工艺

文怡静, 李小芳\*, 刘玲, 舒予, 吴珊

(成都中医药大学, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:** 优选首乌藤改善睡眠有效部位的微波辅助提取工艺。**方法:** 采用单因素试验考察微波功率、提取时间、乙醇体积分数、溶剂用量、提取温度等对首乌藤总黄酮和总蒽醌含量的影响。在单因素试验基础上, 选取微波功率、提取时间、乙醇体积分数为考察因素, 每个因素设置 5 个水平, 以总黄酮、总蒽醌含量的总评“归一值”为评价指标, 利用星点设计-效应面法优选微波提取工艺。**结果:** 首乌藤改善睡眠有效部位的最佳微波提取工艺为微波功率 585 W, 提取数 1 次, 加 10 倍量 82% 乙醇于 60 ℃ 提取 11 min。**结论:** 优选的微波辅助提取工艺简便易行, 预测性良好, 为首乌藤后续的剂型开发和工业化生产提供实验依据。

**[关键词]** 首乌藤; 改善睡眠有效部位; 总黄酮; 总蒽醌; 微波辅助提取工艺; 星点设计-效应面法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0024-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013230024

## Optimization of Microwave Extraction Technology for Caulis Polygoni Multiflori by Central Composite Design-Response Surface Methodology

WEN Yi-jing, LI Xiao-fang\*, LIU Ling, SHU Yu, WU Shan

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines, Ministry of Education, Breeding Base of Provincial Ministry of State Key Laboratory for Development and Utilization of Chinese Materia Medica Resources System, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize microwave extraction process of effective parts in Caulis Polygoni Multiflori for improving sleep. **Method:** Single-factor tests were adopted to investigate effects of extraction time, ethanol concentration, microwave power, solvent amount and extraction temperature on contents of total flavonoids and total anthraquinones in Caulis Polygoni Multiflori. Based on single factor tests, taking extraction time, ethanol concentration and microwave power as factors, each factors was set five levels, with the “Overall Desirability” of contents of total flavonoids and total anthraquinones as evaluation indicator, then extraction process of effective parts in Caulis Polygoni Multiflori for improving sleep was optimized by central composite design-response surface methodology. **Result:** Optimum microwave extraction conditions were as follows: microwave power 585 W, extracted 11 min with 10 times the amount of 82% ethanol at 60 ℃, extracted 1 time. **Conclusion:** Optimized extraction technology was simple and feasible with a good predictability, it could provide experimental evidence for formulations development and industrial production of Caulis Polygoni Multiflori.

**[Key words]** Caulis Polygoni Multiflori; effective part for improving sleep; total flavonoids; total anthraquinones; microwave-assisted extraction process; central composite design-response surface methodology

**[收稿日期]** 20130626(002)

**[基金项目]** 四川省教育厅重点项目(12ZA042)

**[第一作者]** 文怡静, 在读硕士, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究, Tel:13551832699, E-mail:selinawyj@msn.com

**[通讯作者]** \* 李小芳, 博士, 教授, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究, Tel:13808195110, E-mail:lixiaofang918@163.com

首乌藤具有养血安神、祛风通络的功效,临床用于治疗失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛、皮肤瘙痒<sup>[1]</sup>,已被列入卫生部公布的可用于保健食品的物品名单,其改善睡眠的主要有效成分为黄酮类、蒽醌类<sup>[2-3]</sup>。目前尚无采用微波法提取首乌藤的研究报道。在单因素试验基础上,本实验以总黄酮、总蒽醌含量的总评“归一值”为指标,利用星点设计-效应面法优选首乌藤中改善睡眠有效部位的微波提取工艺,为后续的剂型开发和工业化生产奠定基础。

## 1 材料

HWC-3型微波提取实验设备(天水华圆医疗设备有限公司),UV-6000型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),DZG-6020型真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),BP211D AG型电子天平(德国 Satorius),UPT-I-10T型超纯水器(成都超纯科技有限公司),DFY-300型摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司),SB-5200DT型超声仪(200 W,40 kHz,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

首乌藤饮片(四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学李敏教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥藤茎),芦丁、大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100080-200707,110756-200110),所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 首乌藤总黄酮的含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取芦丁对照品 10.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加 95% 乙醇使溶解并定容至刻度,即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 称取首乌藤提取物粉末约 0.15 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 60% 乙醇溶液 50 mL,称定质量,密塞后摇匀,超声处理 20 min,补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.3 线性关系考察** 利用紫外-可见分光光度计进行全波长扫描,发现在 500 nm 处有最大吸收。精密吸取对照品溶液 0,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,各加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,加入 4% NaOH 溶液 4 mL,加水定容至刻度,放置 15 min,于 500 nm 处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,质量浓度为纵坐标,得回归方程  $Y = -0.0001 + 0.0811X$  ( $r = 0.9995$ ),线性范围

0.012 ~ 0.06 g·L<sup>-1</sup>。

**2.1.4 精密度试验** 精密量取芦丁对照品溶液 0.6 mL,按 2.1.3 项下比色法连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.75%,表明仪器精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 精密量取同一供试品溶液 0.6 mL,分别于 0,5,10,15,20,30 min 按 2.1.3 项下方法测定,结果 A 的 RSD 1.88%,表明供试品溶液至少在 30 min 内基本保持稳定。

**2.1.6 重复性试验** 取同一份首乌藤提取物粉末,按 2.1.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定,结果总黄酮含量的 RSD 1.13%,表明该方法重复性良好。

**2.1.7 加样回收试验** 精密称取已知总黄酮含量的同一首乌藤提取物粉末 6 份,每份 0.15 g,各加入已精密量取的芦丁对照品溶液 0.9 mL,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.3 项下方法测定 A,计算平均加样回收率 99.37%,RSD 1.34%。

### 2.2 首乌藤总蒽醌的含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取用五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的大黄素对照品 10.0 mg,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取干燥至恒重的首乌藤提取物粉末 0.15 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇 50 mL,称定质量,水浴加热回流 1 h,取出放冷,称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,置于具塞锥形瓶中,水浴蒸干溶剂,精密加入 8% 盐酸溶液 20 mL,超声处理 5 min,加入三氯甲烷 20 mL,水浴加热回流 1 h,取出,放冷,置于分液漏斗中,静置分层,分取三氯甲烷层,酸水层加三氯甲烷振摇萃取 3 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷层,回收溶剂至干,加甲醇使残渣溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.2.3 线性关系考察** 分别精密吸取大黄素对照品溶液 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,水浴蒸干,残渣加含 0.5% 乙酸镁的甲醇溶液使溶解,定容至 5 mL 量瓶中,以相应试剂为空白,利用紫外-可见分光光度计于 510 nm 处测定 A,以大黄素质量浓度为纵坐标, A 为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0006 + 0.023X$  ( $r = 0.9974$ ),表明总蒽醌在 0.004 ~ 0.020 g·L<sup>-1</sup> 呈良好线性关系。

**2.2.4 精密度试验** 精密量取大黄素对照品溶液 0.6 mL,按 2.2.3 项下方法连续测定 6 次,结果 A 的

RSD 0.062%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.5 稳定性试验** 精密量取同一供试品溶液 0.6 mL, 按 2.2.3 项下方法分别于 0, 10, 20, 30, 40, 50 min 进行测定, 结果 A 的 RSD 1.47%, 表明供试品溶液至少在 50 min 内稳定。

**2.2.6 重复性试验** 取同一份首乌藤提取物粉末, 按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.2.3 项下方法测定 A, 结果总蒽醌含量的 RSD 1.8%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.7 加样回收试验** 精密称取已知总蒽醌含量的同一批首乌藤提取物粉末 0.15 g, 共 6 份, 精密加入大黄素对照品溶液 0.6 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下方法测定 A, 计算平均加样回收率 99.03%, RSD 2.46%。

**2.3 单因素试验考察** 选取微波功率、微波提取时间、乙醇体积分数、溶剂用量、提取温度等为考察因素, 每个因素各设 4~7 个不同水平, 分别称取首乌藤饮片 10 g 进行提取工艺考察。

**2.3.1 微波功率** 固定提取温度 50 °C, 提取时间 8 min, 乙醇体积分数 70%, 液料比 1:12, 选取微波功率为 500, 600, 700, 800, 900 W 的 5 个水平分别进行考察, 结果发现总蒽醌和总黄酮对应的 A 随微波功率的改变而呈现相似趋势变化, 2 种成分均在 600 W 时 A 最低, 800 W 时 A 最高。

**2.3.2 微波提取时间** 固定提取温度 50 °C, 微波功率 600 W, 乙醇体积分数 70%, 液料比 1:12, 选取提取时间为 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 min 的 7 个水平分别进行考察, 结果显示当提取 11 min 时总蒽醌有最大 A, 提取 8 min 时总黄酮有最大 A。

**2.3.3 乙醇体积分数** 固定提取温度 50 °C, 微波功率 600 W, 提取时间 8 min, 液料比 1:12, 选取乙醇体积分数为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 的 6 个水平分别进行考察, 结果可知当乙醇体积分数 80% 时总蒽醌有最大 A, 当乙醇体积分数分别为 60%, 90% 时总黄酮有最大 A。

**2.3.4 溶剂用量** 固定提取温度 50 °C, 微波功率 600 W, 提取时间 8 min, 乙醇体积分数 70%, 选取液料比 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:20 的 6 个水平分别进行考察, 结果显示当液料比为 1:10 时总蒽醌和总黄酮均有最大 A, 之后 A 趋于平衡, 故选择 10 倍量的溶剂用量。

**2.3.5 提取温度** 固定微波功率 600 W, 提取时间 8 min, 乙醇体积分数 70%, 料液比 1:12, 由于所用微波提取设备的温度限制, 只选取了 50, 60, 70,

80 °C 共 4 个水平进行考察, 结果显示各温度下测得的 A 变化不大, 但当提取温度为 60 °C 时, 总蒽醌和总黄酮均有最大 A。

**2.4 星点设计试验** 在单因素试验基础上, 选择微波提取时间、微波功率、溶剂浓度进行三因素五水平的星点设计, 以总黄酮和总蒽醌含量的总评“归一值”为评价指标, 利用效应面法优化首乌藤的提取工艺。因为提取次数为非连续变量, 结合预试验和参考文献, 将提取数先暂定为 1 次。总评 OD =  $(d_1 d_2 \cdots d_n)^{1/n}$  ( $n$  为指标数), 采用 Hassan 求得单一指标的“归一值”, 即  $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ , 其中  $Y_i$  为实测值,  $Y_{\max}$  和  $Y_{\min}$  分别为每一个指标在不同次试验中测得的最大值和最小值, 因素水平见表 1, 试验安排与结果见表 2。

表 1 首乌藤改善睡眠有效部位的微波提取工艺星点试验因素水平

水平	$X_1$ 微波提取时间 /min	$X_2$ 微波功率 /W	$X_3$ 乙醇体积分数 /%
-1.732	8	500	50
-1	10.54	584.53	58.45
0	14	700	70
1	17.46	815.47	81.55
1.732	20	900	90

表 2 首乌藤改善睡眠有效部位的微波提取工艺星点试验安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总黄酮 /g·L <sup>-1</sup>	总蒽醌 /g·L <sup>-1</sup>	OD 值
1	-1	-1	-1	0.038 1	0.008 6	0.360 6
2	1	-1	-1	0.036 0	0.009 3	0.352 8
3	-1	1	-1	0.039 9	0.009 8	0.471 2
4	1	1	-1	0.039 3	0.011 2	0.491 9
5	-1	-1	1	0.037 8	0.018 9	0.759 1
6	1	-1	1	0.036 8	0.017 8	0.683 5
7	-1	1	1	0.038 9	0.015 4	0.667 5
8	1	1	1	0.037 7	0.016 6	0.653 8
9	-1.732	0	0	0.039 4	0.015 9	0.614 7
10	1.732	0	0	0.037 2	0.014 8	0.591 8
11	0	-1.732	0	0.036 3	0.017 3	0.643 9
12	0	1.732	0	0.0394	0.015 5	0.641 2
13	0	0	-1.732	0.038 2	0.008 4	0.229 4
14	0	0	1.732	0.038 9	0.016 9	0.696 3
15~20	0	0	0	0.037 1	0.019 1	0.226 7

注: 15~20 号为重复试验, 数据以平均值表示。

**2.4.1 模型拟合** 以 OD 值为因变量 ( $Y$ ),  $X_1, X_2, X_3$  为自变量,通过比较多个拟合方程的相关系数以选取最佳拟合模型,采用 Design-Expert8 软件进行分析,得拟合度最佳的二项式拟合方程为  $Y = 7.4342 - 0.2862X_1 - 0.0121X_2 - 0.0392X_3 + 2.825 \times 10^{-5}X_1X_2 - 3.1938 \times 10^{-4}X_1X_3 - 3.4781 \times 10^{-3}X_2X_3 + 0.0102 \times X_1^2 + 1.0189 \times 10^{-5}X_2^2 + 5.6966 \times 10^{-4}X_3^2$  ( $P < 0.05, r = 0.9976$ ),方差分析见表 3,结果表明该模型具有高度的显著性,方程的拟合度和可信度均较好,可用此模型对提取工艺进行优化与预测。

表 3 首乌藤改善睡眠有效部位的微波提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.78	9	0.087	467.09	<0.0001
$X_1$	$9.62 \times 10^{-4}$	1	$9.62 \times 10^{-4}$	5.16	0.0465
$X_2$	$1.09 \times 10^{-3}$	1	$1.09 \times 10^{-3}$	5.86	0.0360
$X_3$	0.26	1	0.26	1376.59	<0.0001
$X_1X_2$	$1.02 \times 10^{-3}$	1	$1.02 \times 10^{-3}$	5.48	0.0413
$X_1X_3$	$1.31 \times 10^{-3}$	1	$1.31 \times 10^{-3}$	7	0.0245
$X_2X_3$	0.017	1	0.017	92.23	<0.0001
$X_1^2$	0.24	1	0.24	1272.24	<0.0001
$X_2^2$	0.29	1	0.29	1558.27	<0.0001
$X_3^2$	0.091	1	0.091	487.08	<0.0001
残差	$1.87 \times 10^{-3}$	10	$1.87 \times 10^{-4}$		
总差	0.79	19			

**2.4.2 提取工艺的优化与预测** 根据已确定的方程为模型,固定 3 个自变量之一为中值,以 OD 值为因变量,绘制效应面的三维图,见图 1~3,结果得最优工艺条件为提取时间 10.54 min,微波功率 584.53 W,乙醇体积分数 81.55%。为便于实际操作,最后将参数确定为微波功率 585 W,加 10 倍量 82% 乙醇于 60 °C 提取 11 min。总黄酮、总蒽醌质量浓度预测值分别为 0.038 3, 0.191 g·L<sup>-1</sup>,总评 OD 预测值 0.766 6。

**2.4.3 验证试验** 按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,结果 OD 值分别为 0.752 2, 0.749 8, 0.753 7,平均 OD 值 0.751 9,与预测值的偏差 1.92%,说明建立的数学模型可靠,预测性良好。

### 3 讨论

研究报道表明黄酮类化合物具有治疗肿瘤、心血管疾病、糖尿病及抗衰老、抗 HIV 病毒等药理活性<sup>[4]</sup>。首乌藤中黄酮类和多糖类成分具有改善睡眠及抗氧化作用<sup>[5-6]</sup>,首乌藤还有能抑制对肿瘤细胞行为有重要影响的基质金属蛋白酶的活性<sup>[7]</sup>、抗

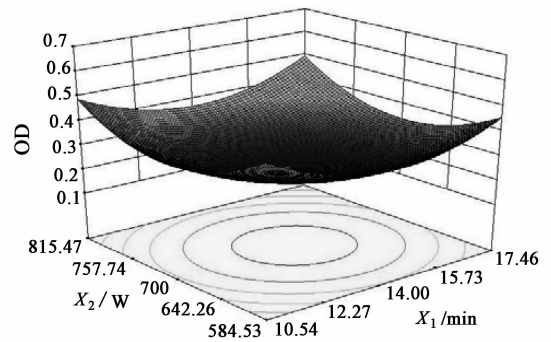


图 1 微波功率、提取时间及其相互作用对提取工艺的影响效应面

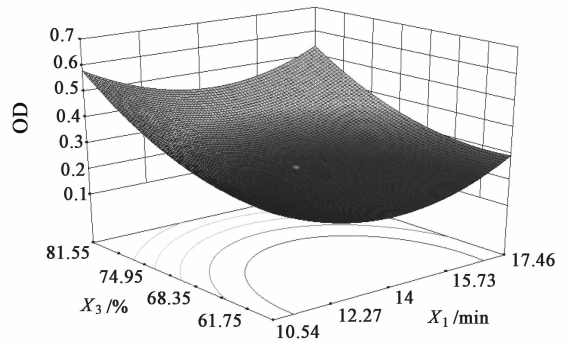


图 2 提取时间、乙醇体积分数及其相互作用对提取工艺的影响效应面

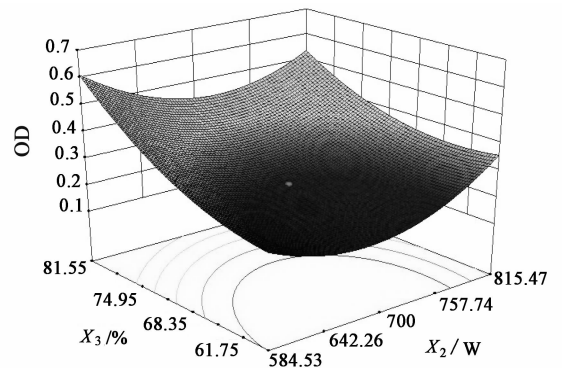


图 3 微波功率、乙醇体积分数及其相互作用对提取工艺的影响效应面

炎抑菌<sup>[8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>等作用。首乌藤中黄酮类和蒽醌类成分的提取多采用乙醇回流法或超声法<sup>[10]</sup>。首乌藤为藤茎类药材,从药材的形态结构和总黄酮、总蒽醌的性质的考虑,均适宜采用微波提取法<sup>[11]</sup>,利用微波法提取有效成分,方便可控且快速,适合工业生产。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:248.
- [2] 汲广全,杨娟,杨小生. 夜交藤改善睡眠活性成分研究[J]. 中成药,2011,33(3):514.

# 正交试验优选姜椒凝胶的处方工艺

蔡兴东<sup>1\*</sup>, 王金凤<sup>1</sup>, 刘新<sup>2</sup>

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的: 优选姜椒凝胶剂的处方工艺并探讨其体外经皮渗透性。方法: 以辣椒素 24 h 单位面积累积渗透量为评价指标, 通过  $L_9(3^4)$  正交试验考察甘油、丙二醇、氮酮用量对姜椒凝胶处方工艺的影响; 以大鼠离体皮肤为屏障, 运用 Franz 扩散池作为体外经皮释药模型, 考察姜椒凝胶的体外透皮特性。采用 HPLC 测定辣椒素含量, 色谱条件为 Diamonsil  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水 (65:35), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm, 柱温 40  $^{\circ}$ C, 进样量 20  $\mu$ L。结果: 姜椒凝胶处方的最佳组合为 2% 卡波姆, 10% 甘油, 20% 丙二醇和 1% 氮酮; 其体外经皮渗透符合零级动力学方程, 经皮渗透速率 0.353  $\mu$ g·h<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>。结论: 该处方设计合理, 适宜皮肤局部用药。

**[关键词]** 姜椒凝胶; 辣椒素; 经皮渗透; 正交试验; 处方工艺; 单位面积累积渗透量

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0028-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013230028

## Optimization of Formulation Process for Jiangjiao Gels by Orthogonal Test

CAI Xing-dong<sup>1\*</sup>, WANG Jin-feng<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>2</sup>

(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

2. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize formulation of Jiangjiao gels and investigate its *in vitro* percutaneous penetration. **Method:** Taking cumulative permeation amount per unit area in 24 h of capsaicin as index, effect of dosages of glycerol, propylene glycol and azone on formulation process of capsaicin was investigated by orthogonal test; With isolated rat skin as transdermal barrier, Franz diffusion cell was used as *in vitro* percutaneous release model, then *in vitro* transdermal permeability of capsaicin was investigated. The content of capsaicin was

**[收稿日期]** 20130506(001)

**[基金项目]** 重庆市教委自然科学基金项目(KJ121801)

**[通讯作者]** \* 蔡兴东, 硕士, 讲师, 从事中药制剂及中药资源开发研究, Tel:023-58556899, E-mail:2001cxd@163.com

[3] 李智欣, 杨中平, 石宝霞, 等. 夜交藤中改善睡眠成分的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 327.

[4] 张冬青, 汪德清. 黄芪总黄酮生物学活性作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 253.

[5] 戴成国, 王纪平, 肖扬, 等. 首乌藤黄酮的体内抗氧化作用研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(4): 75.

[6] 张寒娟, 李晓坤, 杨云, 等. 首乌藤多糖体内及体外抗氧化活性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 668.

[7] LIU J S, YANG J G, HONG Y, et al. Inhibitory effects of *Polygoni Multiflori Caulis* extracts on matrix metalloproteinase activities[J]. Chem Res Chinese U, 2009, 25(2): 211.

[8] 宋毅, 唐尧, 张志勇, 等. 夜交藤抗炎抑菌作用的实验研究[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(2): 112.

[9] 黄树莲, 陈学芬, 陈晓军. 首乌藤降血脂作用的实验研究[J]. 中草药, 1991, 22(3): 117.

[10] 杨金华, 王登斌, 陈小明. 首乌藤中大黄素的提取工艺研究[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2017.

[11] 李小芳, 蒋蔚, 黄毅, 等. 浅谈微波萃取技术与被提取中药的关系[J]. 中成药, 2007, 29(5): 757.

[责任编辑 全燕]