

响应曲面法优化微波辅助提取淫羊藿中淫羊藿苷工艺

梁新丽, 王春柳, 王光发, 赵国巍, 廖正根*, 杨明

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨微波辅助提取技术在叶类中药材中的适宜性。方法:以淫羊藿为例,采用 Box-Behnken 设计考察微波功率、料液比和提取时间 3 个因素对淫羊藿苷提取率及干浸膏得率的影响,采用响应曲面法优化微波辅助提取淫羊藿苷得提取工艺,并与传统提取工艺比较。结果:淫羊藿苷提取率和干浸膏得率与所考察 3 因素之间关系符合二次模型。确定最佳提取工艺为微波功率 800 W,料液比 1:16,提取时间 37 min。该条件下淫羊藿苷提取率 84.53%,干浸膏得率 22.47%。结论:微波辅助提取淫羊藿苷具有时间短、提取率高、化学特征峰无差异、能量消耗更低等特点,微波辅助技术适用于淫羊藿等叶类药材的提取。

[关键词] 微波辅助提取;淫羊藿苷;响应曲面法;Box-Behnken 设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0011-05

Optimization of Microwave-assisted Extraction Process for Icaritin from Epimedium by Response Surface Methodology

LIANG Xin-li, WANG Chun-liu, WANG Guang-fa, ZHAO Guo-wei, LIAO Zheng-gen*, YANG Ming

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate suitability of microwave-assisted extraction technology used in leaf

[收稿日期] 20110911(001)

[基金项目] 863 计划中药生产创新工艺及装备研发项目(2009AA043202)

[第一作者] 梁新丽,硕士研究生,从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0791-87119190, E-mail:paln7@163.com

[通讯作者] *廖正根,教授,博士,从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0791-87119011, E-mail:lyzlyg@163.com

深入研究。最终确定 $K_m = 1:2$ 时,微乳区面积最大,并且能够形成均一、透明、稳定的微乳。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2005:36.
- [2] 翟科峰,段红,邢建国,等. 天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(5):374.
- [3] 翟科峰,邢建国,杨伟俊,等. HPLC 法同时测定天山雪莲中紫丁香苷,绿原酸和芦丁的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(5):762.
- [4] 邢建国,翟科峰,王新春,等. 透皮促进剂对天山雪莲巴布剂中三种有效成分经皮渗透的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(11):45.
- [5] 黄贤惠,邢建国,王新春,等. 正交设计法优选天山雪莲凝胶剂基质处方[J]. 中国中药杂志,2010,35

(14):1803.

- [6] 张立超,胡晋红. 微乳透皮给药系统的研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2004,31(1):44.
- [7] 张旭,欧阳五庆,陈建民,等. 复方蜂胶纳米乳的制备及其品质评价[J]. 西北农业学报,2010,35(4):24.
- [8] 吴旭锦,欧阳五庆,朱小甫. 黄芩苷纳米乳的制备[J]. 精细化工,2007,24(5):470.
- [9] 曹发昊,欧阳五庆,王艳萍. 人参皂苷纳米乳的制备及其免疫佐剂效应研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(4):439.
- [10] 向大位,唐甜甜,彭金飞,等. 电导率-含水量曲线法与目测法确定 O/W 型微乳成型临界值的比较[J]. 药学学报,2010,45(8):1052.
- [11] Sun H, Lu F S, Zhao H. Phase behavior and structural transitions in fenvalerate microemulsion[J]. Chin J Appl Chem,2005,22:780.

[责任编辑 全燕]

Chinese medicine. **Method:** Epimedium was taken as example. Three factors were investigated influence of microwave power, solvent-solid ratio, extraction time on yield of extracted for icariin and yield of dry extract by Box-Behnken design. Microwave-assisted Extraction Process for icariin was optimized by response surface design, and compared with traditional extraction technique. **Result:** Relation fitted quadratic model between yield of extraction for icariin, yield of dry extract and 3 factors investigated. Optimum extraction technology of icariin was: microwave power 800 W, solvent-solid ratio 16, extraction time 37 min. Under these conditions, average yield of icariin was 84.53%, dry extracta sicca was 22.47%. **Conclusion:** Microwave-assisted extraction of icariin had characteristics of low in time, high extraction ratio, no difference of chemical characteristics peaks and lower energy consumption. Microwave-assisted technology applied to extraction of leafy medicinal materials such as Icariin.

[**Key words**] microwave-assisted extraction; icariin; response surface methodology; Box-Behnken design

叶类药材由于其特定的组织结构及形态,存在质地疏松、密度小、堆积起来较蓬松、含大量叶绿素成分、有效成分易挥发等特点,这导致其在提取过程中有别于根类及其他中药的提取过程。针对叶类中药,微波辅助提取具有一定的优势,首先其操作时间短,减少了有效成分的破坏;溶剂用量少;能使叶类药材表面均匀、充分的接触到溶剂,提高提取效率;提取液几乎不含叶绿素^[1-2]。本研究即以淫羊藿为代表,探讨微波辅助提取技术在叶类中药材中的适用性。

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿、心叶淫羊藿或箭叶淫羊藿的茎叶,有温肾壮阳、强筋骨、祛风湿的功效,用于肾阳虚阳痿、不孕、尿频、肝肾不足所致筋骨痹痛、风湿拘挛麻木等症。其主要有效成分是淫羊藿多糖(EPS)、淫羊藿苷(ICA)、淫羊藿总黄酮(TFE)^[3-5],其中 ICA 具有的补肝肾、强筋骨、祛风湿、抗衰老、提高免疫力、抑制肿瘤等药理作用^[6-7]。淫羊藿苷的提取普遍采用水煎煮法、乙醇加热回流提取法和超声提取法^[8-10]等,但都存在溶剂用量大、提取时间长、成本较高等^[11-13]缺陷。本研究采用 Box-Behnken 设计,考察微波功率、辐射时间、料液比 3 个因素对淫羊藿苷提取率和干浸膏得率的影响,最终优化出微波辅助提取淫羊藿苷的最佳提取工艺。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KDM 型调温电热套(山东城华鲁电热仪器厂),TG328A 型 1/10 万电子天平(德国 Startorius 公司),HWC-3LA 型微波提取设备(天水华圆制药设备科技有限责任公司),PD862-4 型单相电能表(精益集团百德电表有限公司)。

淫羊藿购自江西药都樟树制药有限公司(产地甘肃,批号 1006006)。

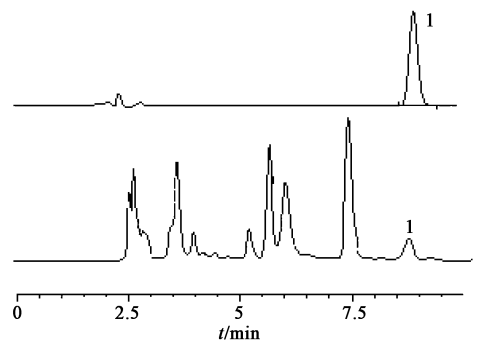
淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110737-200415),水为单蒸水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 微波辅助提取淫羊藿苷 准确称取淫羊藿 50 g,放入微波提取罐中,设置好微波功率,提取时间,加入定量水后提取。合并提取液,冷却至室温,定容。精密量取提取液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释定容至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,待测。

2.2 淫羊藿苷含量及干浸膏得率的测定 采用 HPLC 测定淫羊藿苷的含量。

色谱条件 Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水溶液(28:72),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。淫羊藿苷色谱峰与其他色谱峰基线分离,阴性试验结果表明阴性无干扰,HPLC 色谱图见图 1。方法学考察结果显示此条件适用于淫羊藿中淫羊藿苷的含量测定。活性成分的提取率按公式进行计算,淫羊藿原药材中淫羊藿苷的含量按《中国药典》2010 年版一部淫羊藿药材含量测定方法^[14]测得为 7.4 mg \cdot g⁻¹。



A. 对照品; B. 提取液; 1. 淫羊藿苷

图 1 淫羊藿提取液 HPLC

$$\text{提取率} = \frac{C_{\text{测}} \times n \times V_{\text{样}}}{M_{\text{药材}} \times C_{\text{药材}} \times 10^6} \times 100\% \quad (1)$$

公式(1)中 $C_{\text{测}}$ 为测定样品中某一成分的含量, n 为稀释倍数, $V_{\text{样}}$ 为提取液浓缩定容体积, $M_{\text{药材}}$ 为药材称取量, $C_{\text{药材}}$ 为某一成分在药材中的百分含量。

取合并所得提取液 50 mL,置于蒸发皿中,水浴挥发至干,称重,换算出提取物总质量,由公式(2)计算出干浸膏得率。

$$\text{干浸膏得率} = \frac{\text{提取物总重量}}{\text{原药材总重量}} \times 100\% \quad (2)$$

2.3 响应曲面法实验设计及分析 以淫羊藿苷提取率和干浸膏得率为评价指标,根据预试验,微波功率、料液比、辐射时间对淫羊藿苷提取率和干浸膏得率影响较大。固定提取次数、浸泡时间和搅拌速度,选取微波功率(A)、料液比(B)、辐射时间(C)3个条件为考察因素,各考察因素设置3水平,可用 $0, \pm 1, \pm \alpha$ 表示, $\alpha = 2$ 。试验设计及分析均采用 Design-Expert 7.1.3 软件,因素水平见表1,试验安排见表2。

表1 淫羊藿苷微波提取工艺 Box-Behnken 设计因素水平

变量	A 微波功率	B	C 辐射时间
	/W	料液比	/min
低水平(-1)	500	16	30
高水平(+1)	800	22	50

表2 淫羊藿苷微波提取工艺 Box-Behnken 设计

No.	试验号	试验安排			提取率 /%	干膏得率 /%
		A	B	C		
1	9	500	16	40	72.05	22.78
2	3	800	16	40	86.53	22.67
3	16	500	22	40	66.59	21.63
4	7	800	22	40	89.40	23.80
5	2	500	19	30	59.76	20.80
6	14	800	19	30	71.45	21.46
7	11	500	19	50	64.22	22.94
8	5	800	19	50	81.62	24.32
9	12	650	16	30	72.04	22.08
10	13	650	22	30	70.64	21.49
11	10	650	16	50	77.04	23.07
12	17	650	22	50	72.20	22.98
13	6	650	19	40	66.51	22.73
14	4	650	19	40	65.04	22.61
15	1	650	19	40	69.27	22.43
16	15	650	19	40	67.34	22.56
17	8	650	19	40	68.87	22.14

2.4 波辅助提取与传统提取工艺比较

2.4.1 时间、耗能和提取率的比较 微波辅助提取方法按 2.1 项下方法;传统提取方法:准确称取淫羊藿 50 g,放入圆底烧瓶中,搭建好回流装置。分别加

16 倍量水,提取 3 次,微波提取 37 min,传统方法提取 80 min。提取液与 2.1 项下同样方法处理。

2.4.2 化学特征峰的比较 取上述 2 种方法所得提取液采用 HPLC 进行指纹峰比较。色谱条件:Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(0~60 min 5:95;60 min 后 60:40),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 25 ℃,进样量 20 μL。

2.5 响应曲面法试验

2.5.1 二次响应面模型拟合 以淫羊藿苷提取率和干浸膏得率为响应值,考察微波功率(A)、料液比(B)、辐射时间(C)3个因素对其的影响,采用 Box-Behnken 设计,共 17 个试验点,其中 12 个为析因点,5 个为零点,结果如表 2 所示。回归模型见式(3),所得回归方程见式(4),(5)。

$$y = b_0 + \sum_i b_i x_i + \sum_{ij} b_{ij} x_i x_j + \sum_j b_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (3)$$

(式中 y 为响应值, b_i 为编码变量 x_i 的斜率或线性效应, b_{ij} 为 x_i 和 x_j 之间的交互效应, b_{ii} 为 x_i 二次效应, b_0 为常数项, ε 为误差。)

$$\text{淫羊藿苷} = 67.41 + 8.30A - 1.10B + 2.65C + 2.08AB + 1.43AC - 0.86BC + 3.76A_2 + 7.48 B_2 - 1.90 C_2 \quad (R^2 = 0.9694) \quad (4)$$

$$\text{干浸膏得率} = 22.49 + 0.51A - 0.089B + 0.94C + 0.57AB + 0.18AC + 0.12BC + 0.10A_2 + 0.12B_2 - 0.21C_2 \quad (R^2 = 0.9125) \quad (5)$$

表 2 结果表明,二次响应面模型 P 值分别为 0.000 2,0.005 8,达到极显著水平。失拟项分别为 0.252 9,0.065 3,表明其相对于纯误差而言为不显著,本回归模型建立成功。

2.5.2 响应面分析 响应曲面图见图 2。由图 2a 可知,淫羊藿苷提取率随液料比的增大而先减小再增大;由图 2b 可知,微波功率对淫羊藿苷提取率的影响比辐射时间大,随微波功率的增加而增加;在微波功率为 800 W、辐射时间为 50 min 时淫羊藿苷提取率达到最大。由图 2c 可知,随辐射时间的增大淫羊藿苷提取率先减小再增大,而整体上液料比对淫羊藿苷提取率影响不大;由图 2d 可知在低功率时,浸膏得率随液料比的增加而减少,而在高功率时,浸膏得率随液料比的增加而增加;由图 2e 可看出,干浸膏得率随辐射时间的增加而增大,辐射时间对干浸膏得率影响较微波功率大,干浸膏得率在波功率为 800 W 辐射时间为 50 min 时达到最大;由图 2f 可知,辐射时间对干浸膏得率的影响较溶剂倍量大,干浸膏得率随辐射时间的增加而增大在辐射时间为

表 3 淫羊藿苷微波提取工艺 Box-Behnken 试验方差分析

指标	方差来源	SS	f	MS	F	P
提取率/%	模型	960.111 8	9	106.679 1	24.680 8	0.000 2
	A	550.668 6	1	550.668 6	127.400 4	<0.000 1
	B	9.730 5	1	9.730 5	2.251 2	0.177 2
	C	56.101 8	1	56.101 8	12.979 5	0.008 7
	AB	17.374 2	1	17.374 2	4.019 6	0.085 0
	AC	8.170 7	1	8.170 7	1.890 3	0.211 6
	BC	2.965 9	1	2.965 9	0.686 2	0.434 8
	A ²	59.556 9	1	59.556 9	13.778 8	0.007 5
	B ²	235.303 1	1	235.303 1	54.438 8	0.000 2
	C ²	15.247 8	1	15.247 8	3.527 7	0.102 4
	残差	30.256 4	7	4.322 3		
	失拟项	18.244 2	3	6.081 4	2.025 1	0.252 9
	纯误差	12.012 3	4	3.003 1		
总离差	990.368 2	16				
干膏得率/%	模型	10.958 2	9	1.217 6	8.113 9	0.005 8
	A	2.104 5	1	2.104 5	14.024 5	0.007 2
	B	0.063 3	1	0.063 3	0.421 7	0.536 8
	C	7.008 6	1	7.008 6	46.705 3	0.000 2
	AB	1.304 9	1	1.304 9	8.696 0	0.021 4
	AC	0.130 7	1	0.130 7	0.871 2	0.381 7
	BC	0.061 2	1	0.061 2	0.407 8	0.543 4
	A ²	0.044 1	1	0.044 1	0.294 2	0.604 4
	B ²	0.063 6	1	0.063 6	0.423 8	0.535 8
	C ²	0.192 2	1	0.192 2	1.280 8	0.295 0
	残差	1.050 4	7	0.150 1		
	失拟项	0.847 5	3	0.282 5	5.568 1	0.065 3
	纯误差	0.202 9	4	0.050 7		
总离差	12.008 6	16				

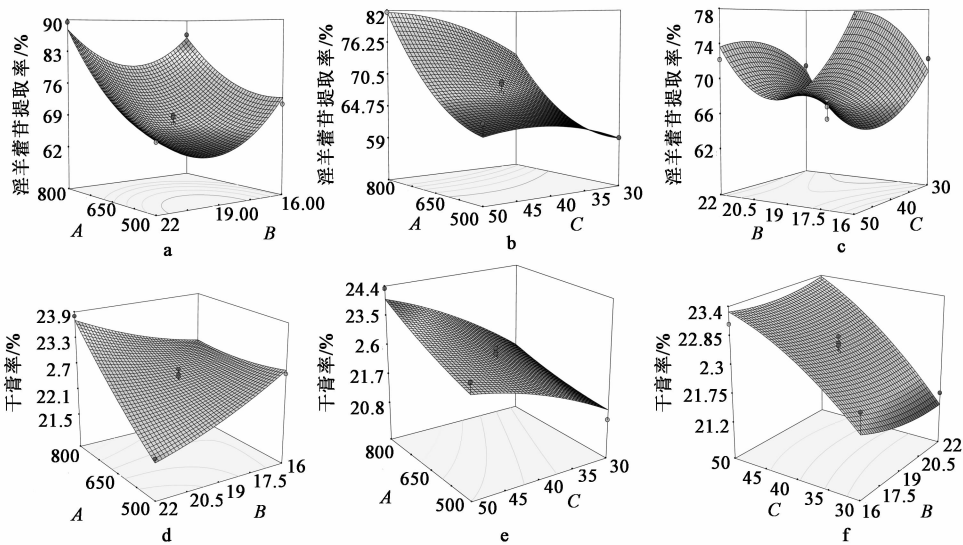


图 2 不同因素对淫羊藿苷得率和干浸膏得率影响的响应面

50 min, 溶剂倍量为 22 倍时干浸膏得率达到最大。

2.5.3 响应值优化及预测 选择综合效果最佳的各因子水平作为最优化条件, 渴求函数的主要优点在于有效地解决了相互矛盾的优选指标的优化问题^[15]。本试验应用了 Design-Expert 7.1.3 软件中的 Derringer 渴求函数。在这种方法中, 先将需优化的每一个响应值都赋予一定的权重系数(r_i), r_i 的值最小为 1(+), 最大为 5(++++)。当不同的响应值赋予不同的权重系数时, 渴求函数可表达

如下(式 6):

$$D = (d_1 r_1 \times d_2 r_2 \times \dots \times d_n r_n) / \sum r_i = \left(\prod_{i=1}^n d_i r_i \right) / \sum r_i \quad (6)$$

(式中, d_i 为从每个实验的响应值转化而得的各个响应值的部分渴求函数, n 是需要优化响应值的数目, r_i 代表每个响应值的权重系数。)

优化目的是使得淫羊藿苷提取率达到最大, 干浸膏得率在有效成分提取率高时应尽可能小。在软件中设定的优化条件可见表 4。通过软件的处理,

预测出这些因素的最佳水平为微波功率 800 W, 辐照时间 37 min, 液料比 16。即本文优化的微波辅助淫羊藿苷的提取工艺为 16 倍水, 采用 800 W 的微波功率提取 37 min。此条件下, 软件预测的淫羊藿苷提取率为 84.53%, 干浸膏得率为 22.47%。

表 4 优化时设定响应值及因素水平

指标	目标	下限	上限	权重系数
提取率/%	最大值	59.76	100	5
干膏得率/%	最小值	20	24.32	2

2.5.4 工艺验证 根据优化试验的结果, 按照软件预测的最佳提取工艺条件进行了 3 次平行实验, 结果淫羊藿苷平均提取率为 85.03%, 干膏得率为 22.48%, 与预测值无显著性差异。

2.5.5 微波辅助提取与常规提取工艺比较 冯怡等^[16]比较了微波辅助提取与传统提取法提取葛根总黄酮的化学特征峰, 结果两者没有差异。本文以时间、提取率、能耗、生产成本、特征峰为考察指标研究了仙灵骨葆方的微波辅助提取工艺, 并与常规提取法进行了系统比较。

2.5.5.1 时间、能耗和提取率的比较 采用以上所得的优化后的提取工艺进行微波辅助提取, 并且与传统提取方法进行了比较, 结果提取时间分别为 111, 240 min, 各耗能 1.48, 2.9 kW·h⁻¹, 淫羊藿提取率分别为 85.03%, 82.10%。微波辅助提取与传统提取方法比, 耗能显著减少, 且大大缩短了提取时间。

2.5.5.2 化学特征峰的比较 本实验中, 微波辅助提取和传统回流提取 2 种提取所得提取液的化学特征峰见图 3, 采用相似度软件按全图谱相关系数法计算两者的相似度为 0.912 892, 说明 2 种提取方法所得提取物的成分含量有差异, 但成分数量与比例基本一致。亦表明微波辅助提取淫羊藿苷对有效成分的破坏率与常规提取相当。

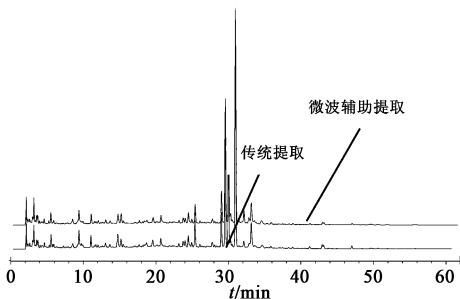


图 3 2 种提取方法提取淫羊藿所提取液的化学特征峰

3 讨论

采用 Box-Behnken 设计考察了微波功率、提取

时间、液料比 3 个主要影响因素对淫羊藿苷提取率和干浸膏得率的影响, 二次响应面模型拟合程度较高, 表明该法可以用于淫羊藿苷的提取工艺的优化。与传统回流方法比较, 有效成分基本无差异, 在提取时间、耗能方面具有明显优势。由此可知, 微波辅助提取法适用于以淫羊藿为代表的叶类药材的提取。

[参考文献]

- [1] 孙振国, 梁新武, 吴立明. 叶类中药的国内外研究状况与开发前景 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(9): 862.
- [2] Lopez Avila V, Benedicto J. Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Trends in Analytical Chem, 1996, 15(8): 334.
- [3] 张明月, 石进校. 淫羊藿属植物研究进展 [J]. 吉首大学学报, 2009, 30(1): 107.
- [4] 李晶, 宋敏, 罗晓, 等. 淫羊藿应用研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(8): 514.
- [5] 邹萍. 淫羊藿免疫药理学研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(3): 3279.
- [6] 贾亮亮, 袁丁, 王洪武, 等. 淫羊藿苷药理作用的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3976.
- [7] 李梨, 周崎新, 石京山. 淫羊藿苷药理作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2005, 16(12): 952.
- [8] 王欣, 王婷婷, 王海军, 等. 淫羊藿中淫羊藿苷提取工艺研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(9): 670.
- [9] 李玉山, 邬应龙. 川产淫羊藿属植物中淫羊藿苷的提取分离工艺研究 [J]. 食品科技, 2008, 33(11): 206.
- [10] 赵丽东, 张华峰, 董静洲, 等. 淫羊藿苷的超声波强化提取及其稳定性初探 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 285.
- [11] 马慧萍, 贾正平, 谢景文, 等. 淫羊藿总黄酮的提取分离工艺研究 [J]. 华西药学杂志, 2002, 17(1): 1.
- [12] 蔡德, 余白蓉, 杨绮华, 等. 淫羊藿总黄酮提取及其含量测定 [J]. 广东药学院学报, 2005, 21(1): 75.
- [13] 张琳, 张瑾. 淫羊藿总黄酮的提取方法研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(5): 63.
- [14] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 307.
- [15] 汪冬庚, 刘文英. 设计法优化虎杖中百黎芦醇的提取工艺 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(15): 138.
- [16] 冯怡, 傅荣杰. 黄酮类组分微波萃取与传统水煎提取的比较 [J]. 2005, 27(10): 1138.

[责任编辑 仝燕]