

## 星点设计-效应面法优化川芎提取工艺

吕 维, 吴 恋, 罗红丽, 叶 娜, 王春艳, 范成杰, 万 丽\*

成都中医药大学药学院, 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, 四川 成都 610075

**摘要:** **目的** 采用星点设计效应面法优化川芎中阿魏酸和藁本内酯的提取工艺。**方法** 以川芎药材中阿魏酸、藁本内酯的质量分数为考察指标, 考察乙醇体积分数、提取温度以及提取时间对提取工艺的影响, 对结果进行二项式拟合, 用效应面法选择较佳工艺条件, 并进行预测分析。**结果** 确定较优提取工艺为 83 ℃下, 14 倍量 73%乙醇提取 2 次, 每次 2 h, 含量实际值与预测值偏差为-1.37%。**结论** 星点设计效应面法优化川芎提取工艺, 方法简便, 结果可靠, 预测性良好。

**关键词:** 川芎; 阿魏酸; 藁本内酯; 效应面法; 提取工艺

**中图分类号:** R943.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)01-0053-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.01.012

## Optimization of extraction process of *Ligusticum chuanxiong* by central composite design-response surface method

LYU Wei, WU Lian, LUO Hong-li, YE Na, WANG Chun-yan, FAN Cheng-jie, WAN Li

Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Ministry of Education, Department of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction process of ferulaic acid and ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* by central composite design and response surface method. **Methods** The effects of ethanol concentration, extracting temperature, and extracting time on the contents of ferulaic acid and ligustilide were investigated by using central composite design and response surface method. The data were imitated using multi-linear equation and second-order polynomial equation. **Results** The optimal conditions of extraction process were 14 fold solvent, 2 h for decoction, and extracting twice; The ethanol concentration was 73%, the extracting temperature was 83 ℃. The variance between observed and predicted values was -1.37%. **Conclusion** The central composite design and response surface method is convenient, reliable, and highly predictive.

**Key words:** *Ligusticum chuanxiong* Hort.; ferulaic acid; ligustilide; response surface method; extraction technology

川芎为伞形科(Umbelliferae)藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 应用非常广泛<sup>[1]</sup>。其性温, 味辛、微苦, 具有活血行气、祛风止痛之功效。主治血瘀气滞致月经不调、痛经闭经, 肝郁气滞而致血行不畅的胸胁疼痛、头痛、风寒湿痹等病证<sup>[2]</sup>。川芎主要活性成分是藁本内酯、川芎嗪、阿魏酸等<sup>[3-5]</sup>, 具有保护内皮细胞、抑制脂质过氧化、抗血栓、抗心肌缺血、舒张血管、抑制神经元变性等药理作用<sup>[6-9]</sup>。

星点设计(central composite design, CCD)是

多因素 5 水平的实验设计, 是在二水平析因设计的基础上加上极值点和中心点构成的, 具有试验次数少、试验精密度高等特点, 在药学应用上成效显著<sup>[10]</sup>。效应面分析法(response surface method, RSM)是通过对响应面的分析得出最优工艺条件, 采用多元线性拟合或二项式回归分析来反映因素与效应值之间函数关系的一种数理统计方法, 使用起来较为直观、方便, 模型预测效果好<sup>[11]</sup>。本实验以川芎藁本内酯、阿魏酸含量为指标, 采用星点设计效应面法对川芎进行提取工艺优化, 得到川芎最优提取工艺。

收稿日期: 2013-09-30

作者简介: 吕 维(1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药有效成分及质量标准研究。Tel: 13618082932 E-mail: lvwei2007@126.com

\*通信作者 万 丽, 女, 教授。Tel: 15982418713 E-mail: wanli8801@163.com

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1200 series 高效液相色谱仪, 包括四元泵 (G1311A) 带真空脱气机 (G1322A), 柱温箱 (G1316A), DAD 紫外检测器 (G1315D), Agilent Technologies 色谱工作站 (美国 Agilent 公司); KQ3200E 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发器 (RE-5203, 上海亚荣生化仪器厂); 恒温水浴锅 (北京国华医疗器械厂); BS124S (万分之一)、BP211D (十万分之一) 型电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 试剂

藜本内酯 (批号 MUST-12082702, 质量分数  $\geq 98\%$ , 成都曼斯特生物科技有限公司); 阿魏酸 (批号 MUST-12112204, 质量分数  $\geq 99.32\%$ , 成都曼斯特生物科技有限公司); 川芎药材购自成都市国际商贸城药材市场, 经成都中医药大学标本馆卢先明教授鉴定为川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎。水为超纯水, 高效液相用甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 川芎阿魏酸和藜本内酯的含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Dikma Kromasil C<sub>18</sub> (250 nm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为甲醇-0.1%冰醋酸 (65:35), 检测波长 320 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10  $\mu$ L。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取川芎药材粉末 (过 3 号筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 50 mL。称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密称取阿魏酸对照品和藜本内酯对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含阿魏酸 15.984  $\mu$ g/mL、含藜本内酯 0.122 mg/mL 的混合对照品溶液。按“2.1.1”色谱条件, 分别进样 2、5、10、15、20  $\mu$ L, 测定, 记录各自峰面积, 以对照品质量为横坐标 ( $X$ ), 以峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 进行线性回归, 得阿魏酸回归方程为:  $Y=4\ 963.6 X+20.246$  ( $r=0.999\ 4$ ), 藜本内酯回归方程为:  $Y=2\ 047.8 X+41.195$  ( $r=0.999\ 4$ )。表明阿魏酸在 0.032 0~0.317 9  $\mu$ g, 藜本内酯在 0.244 0~2.440 0  $\mu$ g 呈良好线性关系。

### 2.2 单因素试验确定主要影响因素及范围

**2.2.1 提取温度的影响** 固定提取时间为 1.5 h, 料液比为 1:8, 乙醇体积分数为 95%, 提取 1 次, 改变提取温度, 观察其对阿魏酸、藜本内酯量的影响。结果显示, 在一定温度范围内, 随提取温度的升高, 阿魏酸和藜本内酯的量逐渐增加。当提取温度超过 80  $^{\circ}$ C (阿魏酸、藜本内酯质量分数分别为 1.46、11.16 mg/g) 时, 阿魏酸和藜本内酯的量变化不明显。因此, 将响应面试验中的提取温度设定在 70~90  $^{\circ}$ C。

**2.2.2 乙醇体积分数的影响** 固定提取时间 1.5 h, 提取温度 83  $^{\circ}$ C, 料液比 1:8, 改变乙醇体积分数, 观察其对阿魏酸、藜本内酯量的影响。结果显示, 在乙醇体积分数超过 75% (阿魏酸质量分数为 1.55 mg/g) 时, 阿魏酸量随乙醇体积分数增大而降低, 藜本内酯量随乙醇体积分数升高无明显差异, 因此, 将响应面试验中的乙醇体积分数设定在 59%~89%。

**2.2.3 提取时间的影响** 固定提取温度为 83  $^{\circ}$ C, 料液比为 1:8, 乙醇体积分数为 75%, 改变提取时间, 观察其对阿魏酸、藜本内酯量的影响。结果显示, 提取时间过短, 阿魏酸和藜本内酯提取不完全; 提取时间超过 2 h (阿魏酸、藜本内酯质量分数分别为 1.51、10.18 mg/g) 后, 阿魏酸、藜本内酯量的变化不明显。因此, 将响应面试验中的提取时间设定在 1.5~2.5 h。

**2.2.4 料液比的影响** 固定提取时间为 2 h, 提取温度为 83  $^{\circ}$ C, 乙醇体积分数为 75%, 改变料液比, 观察其对阿魏酸、藜本内酯量的影响。结果显示, 阿魏酸量随料液比增大而增加, 但增加不明显; 料液比为 1:14 (藜本内酯质量分数为 12.38 mg/g) 时, 藜本内酯量最高。料液比对阿魏酸和藜本内酯提取效果的影响程度比其他因素要小, 为了减少试验次数, 所以提取工艺中料液比固定为 1:14。

### 2.3 星点设计-响应面分析法优化川芎提取工艺条件

**2.3.1 试验设计及结果** 根据 Central Composite 中心组合设计的原理和单因素试验结果, 选取乙醇体积分数 ( $X_1$ )、提取温度 ( $X_2$ ) 和提取时间 ( $X_3$ ) 三个对阿魏酸、藜本内酯量影响较大的因素。因提取次数为非连续性数据, 一般在考察时单独研究, 在本实验中选取提取次数为 2 次, 进行 3 因素 5 水平的响应面试验, 用代码  $-\alpha$ 、 $-1$ 、 $0$ 、 $1$ 、 $\alpha$  ( $\alpha=1.732$ ) 表示, 代码值所代表的物理量见表 1, 星点实验设

计及结果见表 2。另外，将表 3 中阿魏酸 ( $Y_1$ ) 和藜本内酯 ( $Y_2$ ) 的含量数值标准化为 0~1 的归一值 (desirability)，并将归一值求算几何平均数，得总评归一值 (overall desirability, OD)。OD =  $(d_1 d_2 \cdots d_n)^{1/n}$ ， $n$  为指标数，对取值越小越好的效应和取值越大越好的效应采用 Hassan 方法分别进行数学转换求“归一值” $d_{\min}$  和  $d_{\max}$ ， $d_{\min} = (Y_{\max} - Y_1) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ ， $d_{\max} = (Y_1 - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$  [12]。本实验要求阿魏酸和藜本内酯的含量越大越好。

表 1 因素水平表  
Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	乙醇体积分数( $X_1$ )/%	温度( $X_2$ )/°C	时间( $X_3$ )/h
$-\alpha$	48.02	62.68	1.13
-1	59	70	1.5
0	74	80	2
+1	89	90	2.5
$+\alpha$	99.98	97.32	2.87

表 2 星点试验设计及结果 ( $n = 2$ )

Table 2 Design and results of central composite design ( $n = 2$ )

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	阿魏酸/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	藜本内酯/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	OD
1	0	$-\alpha$	0	1.33	9.10	0.27
2	-1	-1	1	1.33	9.57	0.40
3	-1	-1	-1	1.29	8.73	0
4	0	$\alpha$	0	1.40	9.74	0.48
5	-1	1	1	1.16	10.64	0.44
6	$\alpha$	0	0	0.97	10.67	0
7	0	0	$-\alpha$	1.34	10.19	0.54
8	1	-1	1	1.27	9.19	0.27
9	1	1	-1	1.33	9.52	0.39
10	$-\alpha$	0	0	1.30	8.85	0.15
11	1	-1	-1	1.04	12.04	0.45
12	1	1	1	1.10	9.99	0.30
13	-1	1	-1	1.43	9.64	0.48
14	0	0	$\alpha$	1.41	10.09	0.57
15	0	0	0	1.53	10.60	0.75
16	0	0	0	1.50	10.40	0.69
17	0	0	0	1.42	10.62	0.68
18	0	0	0	1.50	10.48	0.71
19	0	0	0	1.48	10.40	0.68
20	0	0	0	1.26	11.16	0.62

2.3.2 模型拟合与显著性检验 依据因素水平表，取川芎粉末 5 g 加适宜体积分数的乙醇，料液比 1 : 14，加热回流，提取 2 次，滤过，滤液用乙醇定容至 150 mL，精密量取提取液相当于生药材 0.1 g 的体积 (3 mL) 于 10 mL 量瓶中，用乙醇定容。再照“2.1.1”色谱条件，测定阿魏酸和藜本内酯的量，试验设计及结果见表 2。

将实验所得数据运用 Design-Expert.v 8.0.6 版软件进行响应面分析，以各总评归一值 ( $Y$ ) 对各单因素 ( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ ) 进行多元线性回归和二项式拟

合，拟合模型如下： $Y = 0.69 - 0.019X_1 + 0.068X_2 + 0.017X_3 - 0.056X_1X_2 - 0.066X_1X_3 - 0.056X_2X_3 - 0.21X_1^2 - 0.11X_2^2 - 0.46X_3^2$  ( $R^2 = 0.9590$ )。

对模型采用  $F$  检验进行方差分析，结果见表 3。从表 3 中可以看出各因素对川芎中阿魏酸和藜本内酯的提取影响的主次顺序为： $X_2 > X_1 > X_3$ ，二项式方程复相关系数  $R^2 = 0.9590$ ，二项式模型  $P < 0.0001$ ，达到极显著水平，说明该方程与实际情况拟合度良好，且相对于多元线性拟合的  $R^2$  值有提高，表明该方程有较大可信度，预测性较好，可以利用该模

表3 回归方程显著性检验

Table 3 Significance test of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P(F > F_{\alpha})$	显著性
Model	0.93	9	0.10	25.99	<0.000 1	***
$X_1$	0.005	1	0.005	1.31	0.279 5	
$X_2$	0.065	1	0.065	16.34	0.002 4	**
$X_3$	0.004	1	0.004	1.05	0.329 3	
$X_1X_2$	0.025	1	0.025	6.27	0.032 0	*
$X_1X_3$	0.035	1	0.035	8.83	0.014 0	*
$X_1X_2$	0.025	1	0.025	6.27	0.032 0	*
$X_1^2$	0.67	1	0.67	167.49	<0.000 1	***
$X_2^2$	0.18	1	0.18	44.20	<0.000 1	***
$X_3^2$	0.033	1	0.033	8.25	0.016 6	*
残差	0.040	10	0.004			
失拟差	0.031	5	0.006			
纯误差	0.009	5	0.002			
总差	0.97	19				

型分析预测最佳工艺条件。

**2.3.3 工艺优化与预测** 根据星点实验设计结果运用 Design-Expert.v 8.0.6 版软件绘制响应值  $Y$  与其中任意两个因素的三维效应面曲线图, 见图 1。结合图 1 直观分析, 运用 Design-Expert.v 8.0.6 版软件对二项式回归模型进行预测分析, 在结合实际操作的可性, 得出最优川芎提取工艺为: 以提取温度为

83 °C, 乙醇浓度为 73%, 料液比为 1 : 14, 提取时间为 2 h, 提取 2 次, 总评归一值的最大值为 0.73。根据最优工艺进行验证实验, 实际川芎提取的总评归一值为 0.72 ( $n=3$ ), 实际值比预测值的偏差为 -1.37%, 说明星点设计效应面法应用于川芎的提取工艺优选得到了较好的结果, 本实验所建模型得到的工艺参数准确可靠。

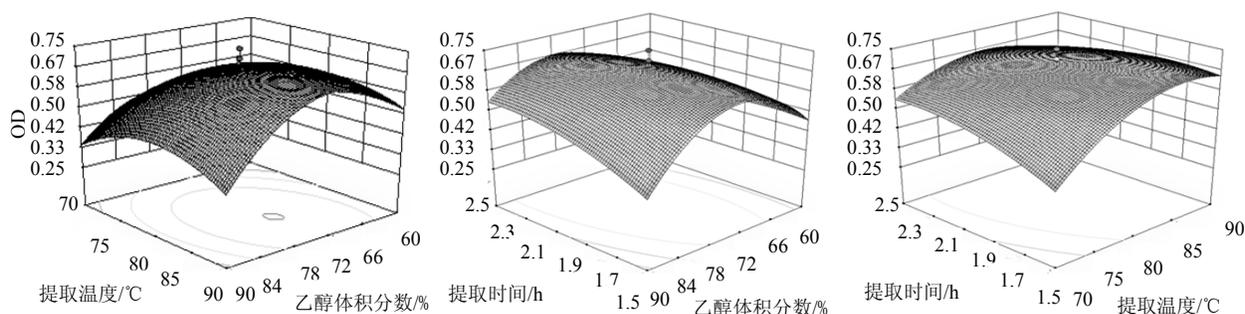


图1 各因素两两交互作用对川芎提取的总评归一值影响的响应面

Fig. 1 Effect of interaction on OD of reference extraction of Chuanxiong Rhizoma

### 3 讨论

传统的数理统计一般采用正交设计或均匀设计, 寻求最佳的因素水平, 即用线性数学模型进行拟合, 实验次数虽少, 但不能在设定的整个区域中找到因素和响应值之间的一个明确的函数表达式, 从而无法找到整个区域中的因素的最佳组合和相应

的最优值<sup>[13-14]</sup>。星点实验设计的前提为实验所选变量均为连续变量, 通过模型预测中心极值点, 在中心极值点附近进行重复性验证实验, 所得实验结果的真实值更加接近于模型预测值。本实验首先以单因素试验确定主要影响因素及范围, 在单因素实验的基础上, 应用响应面分析法考察药材的提取温度、

乙醇浓度、提取时间3个因素对川芎阿魏酸和藁本内酯提取效果的影响, 优选川芎的最佳提取工艺。结果表明, 用二次多项式对实验中各因素和指标进行拟合, 模型可信度较高。采用该方法确定的川芎提取工艺表现出较高的提取率, 验证试验表明所建立的模型具有较好的预测性。

阿魏酸和藁本内酯有极性差异, 因此, 本实验考察了三氯甲烷、甲醇、乙醇3种溶剂对其提取率的影响, 结果表明阿魏酸在甲醇、乙醇中提取率高; 藁本内酯提取率在几种溶剂中无明显差异, 与文献相符<sup>[15-16]</sup>, 再结合工艺和操作安全, 故选定乙醇作为提取溶剂, 星点设计中进一步考察乙醇浓度。

#### 参考文献

- [1] 王永忠, 童树洪. 川芎的传统用法与现代药理研究 [J]. 中国药业, 2012, 21(7): 95-96.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 郝淑娟, 张振学, 田 洋, 等. 川芎化学成分研究 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(3): 22-25.
- [4] Li S L, Yan R, Tam Y K, *et al.* Post-harvest alteration of the main chemical ingredients in *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55: 140-144.
- [5] 张 玲, 刘友平, 李 旻, 等. 川芎化学成分分离鉴定与藁本内酯的含量测定 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1381-1382.
- [6] Hou Y Z, Zhao G R, Yang J, *et al.* Proective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide [J]. *Life Sci*, 2004, 75(19): 1775-1786.
- [7] Adluri R S, Shanmugavel M, Nagarajan D, *et al.* Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to *N*-acetylcysteine [J]. *Toxicology*, 2008, 243(20): 317-329.
- [8] 尚立芝, 韦大文, 王 峰. 川芎嗪对心肌缺血再灌注损伤大鼠 HSP25 和 p38MAPK 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(10): 882-884.
- [9] Yan R, Ko N L, Li S L, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in *Rhizoma Chuanxiong* in the rat [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(2): 400-408.
- [10] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455.
- [11] 陈家仪, 贾 薇, 曹元儿, 等. 星点设计 - 响应面法优化枳实黄酮成分的提取工艺 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1267.
- [12] 甘良春, 侯世祥, 毕岳琦, 等. 星点设计-效应面法优化丹参酮 II<sub>A</sub> 纳米粒的制备工艺 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(10): 758-760.
- [13] 朱家校, 何 伟, 李 勇, 等. 响应面分析法优化川芎藁本内酯提取工艺的研究 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2172-2175.
- [14] 于 淼, 柏云娇, 代岐昌, 等. 响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1286-1289.
- [15] 晁真真, 晁若冰. HPLC 测定川芎药材中藁本内酯的含量 [J]. 华西药学杂志, 2004, 19(3): 197-198.
- [16] 刘 毅, 刘素香, 张铁军, 等. HPLC 法测定川芎中阿魏酸和藁本内酯 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 210-212.