doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.18.007

响应面法优选川芎醇提工艺*

刘雨晴[1,2],景炳年[1,2],谢晓阳[1,2],魏　磊[1,2],李　建[1,2],张华南[1,2],王　韬[1,2],朱　杰[1,2],刘冠华[1,2],陈　飞[1,2]

(1. 河南省科学院,河南 郑州 450002; 2. 河南省纳普生物技术有限公司,河南 郑州 450002)

摘要:目的 优选川芎醇提工艺。**方法** 在单因素试验基础上,以阿魏酸得率为考察指标,乙醇体积分数、料液比、超声温度和超声时间为考察因素,采用响应面法优选川芎的醇提工艺并验证。**结果** 川芎最佳醇提工艺条件为,以80%乙醇、料液比为1∶21(g / mL)、在63 ℃下超声提取60 min。实际测得的阿魏酸平均得率为(0.096 ± 0.02)%,与理论预测值(0.098%)相对误差较小。**结论** 优化后的川芎醇提工艺稳定可行,可为川芎的开发应用提供依据。

关键词:川芎;阿魏酸;醇提工艺;响应面法

中图分类号:R943;R283　　文献标志码:A　　文章编号:1006 - 4931(2022)18 - 0026 - 04

Optimization of Alcohol Extraction Process of *Ligusticum Chuanxiong* by Response Surface Methodology

LIU Yuqing[1,2], *JING Bingnian*[1,2], *XIE Xiaoyang*[1,2], *WEI Lei*[1,2], *LI Jian*[1,2], *ZHANG Huanan*[1,2], *WANG Tao*[1,2], *ZHU Jie*[1,2], *LIU Guanhua*[1,2], *CHEN Fei*[1,2]

(1. *Henan Academy of Sciences, Zhengzhou, Henan, China 450002; 2. Henan Natural Product Biotechnology Co., Ltd., Zhengzhou, Henan, China 450002*)

Abstract: Objective To optimize the alcohol extraction process of *Ligusticum chuanxiong*. **Methods** Based on the single factor experiment, the ethanol extraction process of *Ligusticum chuanxiong* was optimized and verified by response surface methodology (RSM) with the yield of ferulic acid as the index, and with the ethanol volume fraction, material liquid ratio, ultrasonic temperature and ultrasonic time as the factors. **Results** The optimal ethanol extraction process of *Ligusticum chuanxiong* was as follows: the volume fraction of ethanol was 80%, the solid - liquid ratio was 1∶21 (g / mL), the ultrasonic temperature was 63 ℃, and the extraction time was 60 min. The actual measured average yield of ferulic acid was (0.096 ± 0.02)%, which had a low relative error with the theoretical prediction value (0.098%). **Conclusion** The optimal alcohol extraction process of *Ligusticum chuanxiong* is stable and feasible, which can provide a basis for the development and application of *Ligusticum chuanxiong*.

Key words: *Ligusticum chuanxiong*; ferulic acid; alcohol extraction process; response surface methodology

川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 是多年生、伞形科藁本属植物,广泛分布于四川、广西、贵州、湖北及云南等地[1],药用部位为干燥的根茎。《外台秘要方》收录美容方剂363首,包括外用方和内服方,其中川芎是唯一入药频次均为前5的中药[2]。川芎粗提物可抑制酪氨酸酶活性,从而起到抑制黑色素生成的作用[3-7]。本研究

*基金项目:河南省科学院院级项目[220613084]。

第一作者:刘雨晴,女,博士,副研究员,研究方向为植物天然产物功效,中药资源开发与应用,(电话)0371 - 55935573(电子信箱)myjoe00@163.com。

[5] 卢　琳,马满玲. 我国重点监控药品现状分析与思考[J]. 临床药物治疗杂志,2019,17(10):76 - 81.

[6] 陆倩妮,裴　佩,卢梦情,等. 我国各地区药品使用监控政策的分析与思考[J]. 中国医院管理,2019,39(3):25 - 28.

[7] 袁　雍,邵燕飞,毛小红,等. PDCA循环在重点监控药品管理中的应用效果[J]. 中国现代应用药学,2019,36(12):1578 - 1582.

[8] 卫生部办公厅. 关于转发《北京市医疗机构处方专项点评指南(试行)》的通知[EB / OL]. (2012 - 12 - 28)[2021 - 09 - 14]. http: // www.nhc.gov.cn / yzygj / s3590 / 201212 / 93a34b9643bc47c5acf138228c69a60e.shtml.

[9] 金　锐,赵奎君,郭桂明,等. 中成药临床合理用药处方点评北京共识[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):1049 - 1053.

[10] 《中国脑卒中防治报告2019》编写组.《中国脑卒中防治报告2019》概要[J]. 中国脑血管病杂志,2020,17(5):272 - 280.

[11] 袁　雍,邵燕飞,毛小红,等. 浙江省人民医院PDCA循环在重点监控药品管理中的应用效果[J]. 中国现代应用药学,2019,36(12):1578 - 1582.

[12] 苏海燕,胡　俐. 信息技术在合理用药管理工作中的应用研究[J]. 重庆医学,2014,43(31):4148 - 4150.

[13] 王　丽,赵成龙,付中华,等. 某院重点监控药品基于处方前置审核系统的医保控费管理与实施效果评价[J]. 中国合理用药探索,2021,18(11):10 - 13.

[14] 吴美玲,叶　云,赵　昕,等. 医院重点监控药品管理的探索与实践[J]. 中国现代应用药学,2021,38(12):1509 - 1513.

[15] 王　英,鲁科峰,梁斌鑫. 多部门协作处方点评模式在重点监控药品监督中的应用[J]. 中医药管理杂志,2021,29(14):87 - 89.

(收稿日期:2021 - 09 - 15;修回日期:2022 - 02 - 07)

中以阿魏酸得率为考核指标，在单因素试验基础上，采用响应面法综合分析乙醇体积分数、料液比、超声温度、超声时间4个最佳工艺参数[8-12]，优选川芎醇提取工艺，以期为川芎植物资源在化妆品方面的充分、合理开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

KQ-500E型超声波清洗仪（昆山超声仪器有限公司）；UV-3802型紫外可见分光光度计（尤尼柯<上海>仪器有限公司）。

1.2 试药

阿魏酸对照品（中国食品药品检定研究院，批号为110773-201915，含量≥98%）；试验所用试剂均为分析纯。川芎药材购自河南郑州中药批发市场，经河南中医药大学董诚明教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸含量测定

2.1.1 溶液制备

取阿魏酸对照品2.33 mg，精密称定，置50 mL容量瓶中，加入甲醇超声（功率500 W，频率40 kHz，下同）处理20 min，滤过，取续滤液，即得对照品溶液。取药材样品粗粉适量，精密称定，置500 mL锥形瓶中，加入提取溶剂超声处理20 min，重复3次，合并3次滤液，抽真空旋转浓缩，以甲醇定容至50 mL，即得供试品溶液。

2.1.2 最大吸收波长确定

取阿魏酸对照品溶液，置1 mL比色管中，进行200~400 nm波长全扫描，获得吸收光谱图，确定其最大吸收波长为320 nm，故以此为检测波长。

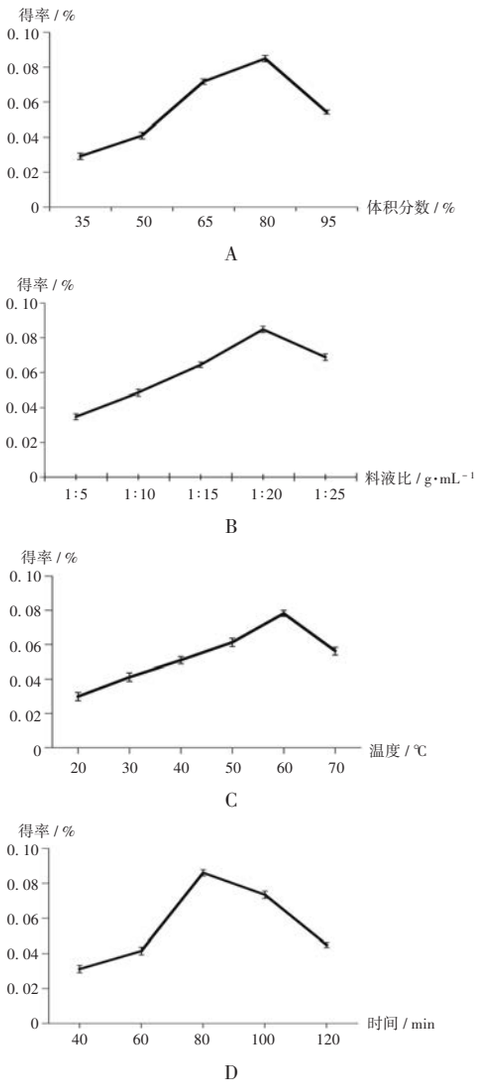
2.1.3 方法学考察

线性关系考察[13]：取阿魏酸对照品溶液0，1.5，2.0，2.5，3.0，3.5 mL，分别置25 mL容量瓶中，依次加入甲醇6 mL、0.3%十二烷基硫酸钠2 mL、0.9%铁氰化钾-0.6%三氯化铁（1∶1，V/V）混合液1 mL（现配现用），充分摇匀，暗处放置5 min，加入1 mol/L冰醋酸溶液定容至25 mL，摇匀，暗处放置30 min，测定320 nm波长处的吸光度。以阿魏酸质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、吸光度（Y）为纵坐标进行线性回归，得阿魏酸回归方程为$Y=199.27X+6.70$（$R^2=0.9946$，$n=6$）。结果表明，阿魏酸质量浓度在2.83~6.60 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好。

其他：按相关要求进行方法学考察，结果精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%，表明仪器精密度、溶液稳定性、方法重复性均良好。

2.2 单因素试验

乙醇体积分数：分别以体积分数为35%，50%，65%，80%，95%的乙醇，料液比为1∶20（g/mL），160 ℃下超声提取60 min。结果阿魏酸得率随乙醇体积分数的增大呈先升后降的趋势，乙醇体积分数为80%时得率最高，故选择80%乙醇进行后续试验。详见图1 A。



A. 乙醇体积分数 B. 料液比 C. 超声温度 D. 超声时间

图1 单因素试验考察结果

A. Volume fraction of ethanol B. Solid-liquid ratio
C. Ultrasonic temperature D. Ultrasonic time

Fig. 1 Results of the single factor test

料液比：分别以料液比为1∶5、1∶10、1∶15、1∶20、1∶25（g/mL），80%乙醇，160 ℃下超声提取60 min。结果阿魏酸得率随料液比的增大呈先升后降的趋势，当液料比为1∶20（g/mL）时得率最高，故选择料液比1∶20（g/mL）进行后续试验。详见图1 B。

超声温度：以80%乙醇，料液比1∶25（g/mL），分别在30，40，50，60，70 ℃下超声提取60 min。结果阿魏酸得率随超声温度的升高呈先升后降的趋势，当温度为60 ℃时得率最高，故选择超声温度60 ℃进行后续试验。详见图1 C。

超声时间：以80%乙醇，料液比1∶25（g/mL），在60 ℃下分别超声提取20，40，60，80，100 min。结果阿魏酸得率随超声时间的延长呈先升后降的趋势，当超声80 min时得率最高，故选择超声80 min进行后续试验。详见图1 D。

2.3 响应面法

试验设计与结果：根据单因素试验结果，以乙醇体积分数（A）、料液比（B）、超声温度（C）和超声时间（D）为自变量，阿魏酸得率为响应值，采用4因素3水平的Box－Behnken试验，因素与水平见表1，响应面试验设计和试验结果见表2。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels

水平	因素A（%）	因素B（g/mL）	因素C（℃）	因素D（min）
－1	50	1∶15	50	40
0	65	1∶20	60	60
1	80	1∶25	70	80

表2 Box－Behnken试验设计方案

Tab. 2 Design of the Box－Behnken test

序号	因素				得率（%）	序号	因素				得率（%）
	A	B	C	D			A	B	C	D	
1	0	1	0	1	0.093 5	16	1	0	0	－1	0.087 0
2	0	1	0	－1	0.072 7	17	0	0	－1	1	0.094 6
3	0	0	1	1	0.094 8	18	1	0	1	0	0.089 0
4	1	1	0	0	0.076 7	19	－1	0	1	0	0.073 9
5	0	－1	－1	0	0.072 4	20	1	0	－1	0	0.084 3
6	1	－1	0	0	0.055 9	21	－1	－1	0	0	0.055 9
7	0	0	0	0	0.094 1	22	0	0	0	0	0.100 0
8	0	－1	0	1	0.076 8	23	0	0	0	0	0.100 0
9	－1	0	0	1	0.072 0	24	0	0	0	0	0.095 8
10	0	－1	0	－1	0.069 1	25	0	0	0	0	0.101 3
11	0	0	1	－1	0.088 7	26	0	0	－1	－1	0.081 7
12	－1	1	0	0	0.059 4	27	－1	0	0	－1	0.067 2
13	0	1	－1	0	0.073 5	28	1	0	0	1	0.102 1
14	0	－1	1	0	0.077 7	29	－1	0	－1	0	0.069 3
15	0	1	1	0	0.087 4						

模型的建立及其显著性检验：采用Design－Expert 12数据统计分析软件对试验设计和试验结果进行多元回归、拟合，得二次多项回归模型为，$Y = 0.098\ 2 + 0.008\ 1A + 0.004\ 6B + 0.003\ 0C + 0.005\ 6D + 0.004\ 3AB + 0.000\ 0AC + 0.002\ 6AD + 0.002\ 2BC + 0.003\ 3BD - 0.001\ 7CD - 0.015\ 7A^2 - 0.018\ 4B^2 - 0.003\ 9C^2 - 0.002\ 2D^2$。

结果分析：由表3可见，对结果的影响，一次项A，B，D极显著（$P < 0.01$），C显著（$P < 0.05$）；二次项A^2，B^2极显著（$P < 0.01$），C^2，D^2不显著（$P > 0.05$）。试验因素系数$F = 16.80$（$P < 0.000\ 1$），说明该模型拟合程度良好，回归极显著，总决定系数$R^2 = 0.943\ 8$，校正决定系数$R^2_{Adj} = 0.887\ 6$。结果表明，回归模型可很好地描述川芎醇提工艺各因素与阿魏酸得率之间的关系。

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.005 0	14	0.000 4	16.80	＜0.000 1
A	0.000 8	1	0.000 8	37.26	＜0.000 1
B	0.000 3	1	0.000 3	12.08	0.003 7
C	0.000 1	1	0.000 1	5.02	0.041 9
D	0.000 4	1	0.000 4	17.88	0.000 8
AB	0.000 1	1	0.000 1	3.53	0.081 1
AC	2.500×10^{-9}	1	2.500×10^{-9}	0.000 1	0.991 5
AD	0.000 0	1	0.000 0	1.25	0.281 9
BC	0.000 0	1	0.000 0	0.873 2	0.365 9
BD	0.000 0	1	0.000 0	2.03	0.176 5
CD	0.000 0	1	0.000 0	0.545 9	0.472 2
A^2	0.001 6	1	0.001 6	75.34	＜0.000 1
B^2	0.002 2	1	0.002 2	103.66	＜0.000 1
C^2	0.000 1	1	0.000 1	4.56	0.050 9
D^2	0.000 0	1	0.000 0	1.54	0.234 4
残差	0.000 3	14	0.000 0		
失拟项	0.000 3	10	0.000 0	2.67	0.178 5
净误差	0.000 0	4	9.663×10^{-6}		
校正项	0.005 3	28			

注：$R^2 = 0.943\ 8$，$R^2_{Adj} = 0.887\ 6$，Pred$R^2 = 0.707\ 1$，Adeq Precision = 13.073 7。

Note: $R^2 = 0.943\ 8$, $R^2_{Adj} = 0.887\ 6$, Pred$R^2 = 0.707\ 1$, Adeq Precision = 13.073 7.

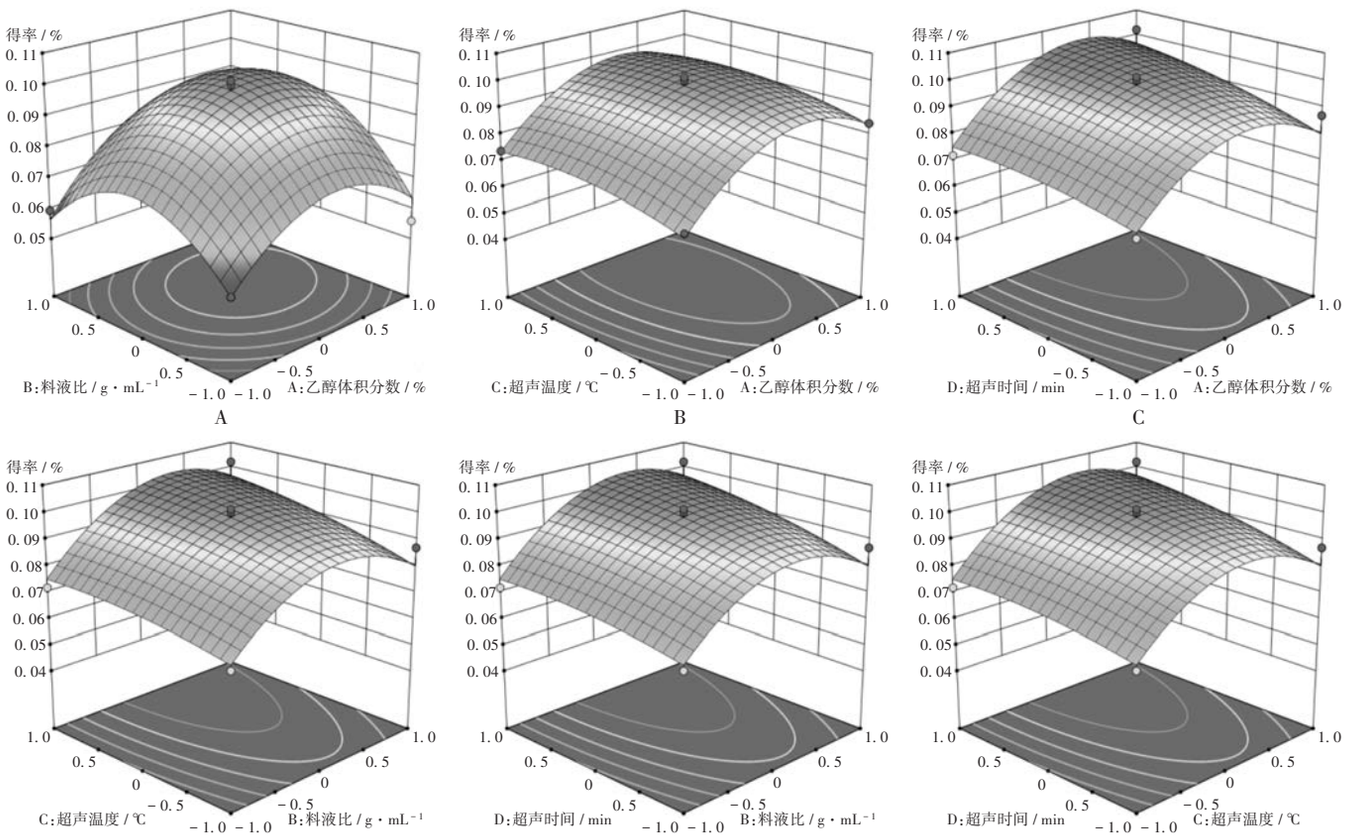
响应面交互作用：为确定上述4因素及其交互作用对川芎阿魏酸得率的影响，根据回归方程绘制响应面图。4个因素之间双因素交互作用的响应面均为开口向下的凸形曲线，表明试验范围内阿魏酸得率的响应值存在极高值，即醇提最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。详见图2。

2.4 验证试验

川芎最佳醇提工艺条件为乙醇体积分数为80.68%，料液比为1∶21.77（g/mL），超声温度62.68 ℃，超声时间60 min。在此条件下，川芎阿魏酸得率的理论预测值为0.098%。为进一步确认本研究响应面结果的可靠性，并充分考虑实际可操作性，将最佳提取工艺参数修正为，80%乙醇、料液比1∶21（g/mL），在63 ℃下超声提取60 min。川芎阿魏酸的实际平均得率为（0.096 ± 0.02）%（$n = 3$），与理论预测值0.098%相对误差较小。

3 讨论

阿魏酸是川芎药材的重要活性成分之一。本研究中最佳醇提工艺经3次平行试验验证，阿魏酸实际得率



A. 料液比与乙醇体积分数　B. 超声温度与乙醇体积分数　C. 超声时间与乙醇体积分数　D. 超声温度与料液比
E. 超声时间与料液比　F. 超声时间与超声温度

图 2　各因素对川芎阿魏酸得率影响的响应面图

A. Solid-liquid ratio and volume fraction of ethanol　B. Ultrasonic temperature and volume fraction of ethanol　C. Ultrasonic time and volume fraction of ethanol　D. Ultrasonic temperature and solid-liquid ratio　E. Ultrasonic time and solid-liquid ratio　F. Ultrasonic time and ultrasonic temperature

Fig. 2　RSM plots of the influence of various factors on the yield of ferulic acid from *Ligusticum chuanxiong*

与模型理论预测结果相对误差较小，优化工艺参数稳定可靠。阿魏酸可溶于乙醇及乙酸乙酯，脂溶性较小，本研究中 80% 乙醇为超声提取的最佳溶剂，与阿魏酸的上述特性相互印证。

川芎最佳醇提取工艺条件为，以 80% 乙醇、料液比为 1∶21(g / mL)，在 63 ℃下超声提取 60 min。实际测得的阿魏酸平均得率为(0. 096 ± 0. 02)%，与理论预测值(0. 098%)相对误差较小。

综上所述，优化后的川芎醇提工艺稳定可行，可为川芎开发应用提供依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：42－43.
[2] 中国药材公司. 中药资源概述[M]. 北京：科学出版社，1994：866.
[3] 张智萍. 川芎美白活性成分的提取分离及在化妆品中的应用研究[D]. 广州：广东药科大学，2014.
[4] 吴金勇，徐　峰，姜媛媛，等. 川芎精油和多糖的同步提取及其抗氧化活性分析[J]. 基因组学与应用生物学，2021，40(1)：334－341.
[5] 梁　盈，袭晓娟，刘巧丽，等. 阿魏酸及其衍生物的生理活性及应用研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(5)：449－454.
[6] 马梓育，陆　洋. 体内黑色素合成、调控及常用天然、中药来源的黑色素抑制剂[J]. 中国中药杂志，2020，45(24)：5898－5916.
[7] 袁　博，曹　健，秦　朗，等. 四种酚类化合物体外抗氧化活性的比较研究[J]. 食品工业，2018，39(9)：200－204.
[8] 金宏飞，刘雨彤，于佳池，等. 中药川芎乙醇提取工艺的正交试验研究[J]. 广州化工，2018，46(19)：63－65.
[9] 谢　丹，鲁延杰，李佳璇，等. 响应面法优化川芎蛋白提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技，2021，42(21)：213－220.
[10] 侯丽丽，陈洪海，张守勤. 川芎中阿魏酸超高压提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学，2014(9)：2133－2135.
[11] 王　玥，杜守颖，吴　清，等. 川芎中阿魏酸的闪式提取工艺研究[J]. 北京中医药大学学报，2012，35(8)：559－562.
[12] 韩建军，宁　娜，郁建生，等. 响应面优化微波协同酶法提取川芎阿魏酸的工艺[J]. 江苏农业科学，2016，44(3)：284－287.
[13] 王　琳，郜昭慧，程忠哲，等. 紫外可见分光光度法测定马齿苋中总酚酸的含量[J]. 辽宁中医药大学学报，2012，14(5)：223－225.

（收稿日期：2021－11－18；修回日期：2022－03－21）