

研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 11-14.

[5] 孙淑萍, 狄留庆, 黄耀洲, 等. 不同辅料对中药全浸膏制剂防潮效果的比较研究[J]. 中成药, 2006, 28(6): 897-899.

[6] 狄留庆, 孙淑萍, 黄耀洲. 粉体表面改性技术降低中药全浸膏制剂引湿性的应用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 2(4): 241-242.

[7] 杜若飞, 冯 怡, 刘 怡, 等. 中药提取物吸湿特性的数据分析与表征[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1768-1771.

[8] 孙淑萍, 狄留庆, 黄耀洲, 等. 中药全浸膏制剂防潮技术应用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 341-343.

[9] 范玉玲, 金毅群, 李 森, 等. 防止传统中药生脉饮浸膏粉吸潮的研究[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1159-1160.

[10] 伍振峰, 丘玲玲, 郑 琴, 等. 中药提取物及其制剂防潮策略研究[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(1): 66-69.

[11] 罗世江. 不同辅料对中药全浸膏制剂防潮效果探讨[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(5): 917-918.

[12] 李小芳, 何倩灵, 耿桂香, 等. 防潮辅料对黄芪多糖吸湿

性的影响[J]. 中成药, 2011, 33(5): 800-803.

[13] 肖 琼, 沈平嬢, 朱莲华. 中药固体制剂防潮技术与辅料应用的研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 209-211.

[14] 崔红华, 李习文, 王会弟, 等. 不同辅料对 SN-中药颗粒剂吸湿性的影响[J]. 中国药业, 2007, 16(4): 46-46.

[15] 刘成梅, 周国辉, 万 婕, 等. 大米淀粉解吸等温线与吸附等温线的拟合模型[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 198-201.

[16] Yang Z, Zhu E L, Zhu Z S. Moisture sorption isotherms and net isosteric heats of sorption of green soybean[J]. *Int J Food Eng*, 2012, 8(3): 1-16.

[17] Mcminn W A M, Magee T R A. Studies on the effect of temperature on the moisture sorption characteristics of potatoes[J]. *J Food Process Eng*, 1999, 22(2): 113-128.

[18] Sing K S W, Everett D H, Haul R A W, *et al.* Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity[J]. *Pure Appl Chem*, 1985, 57(4): 603-619.

星点设计-响应面法优化黄芪双水相萃取工艺

宋力飞, 刘常青, 李曼莎, 段海霞*, 马志鹏, 刘乡乡
(广州泽力医药科技有限公司, 广东 广州 510663)

摘要: **目的** 通过星点设计-响应面法优化黄芪双水相(乙醇-磷酸氢二钾)萃取工艺。**方法** 以乙醇质量分数、磷酸氢二钾溶液质量分数和黄芪投料比为影响因素, 总黄酮、总皂苷萃取率为评价指标, 星点设计-响应面法优化工艺。**结果** 最佳条件为乙醇质量分数 27.97%, 磷酸氢二钾溶液质量分数 22.03%, 黄芪投料比 1:58.85, 总黄酮萃取率达 74.13% (集中在上层), 总皂苷萃取率达 81.34% (集中在下层)。**结论** 该方法简单精确, 预测性良好, 可用于萃取黄芪中的总黄酮和总皂苷。

关键词: 黄芪; 总黄酮; 总皂苷; 双水相萃取; 星点设计-响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)01-0070-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.013

Optimization of two-phase aqueous extraction for *Astragali Radix* by central composite design-response surface method

SONG Li-fei, LIU Chang-qing, LI Man-sha, DUAN Hai-xia*, MA Zhi-peng, LIU Xiang-xiang
(Guangzhou Zeli Pharmatech Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the two-phase (ethanol-dipotassium phosphate) aqueous extraction for *Astragali Radix* by central composite design-response surface method. **METHODS** With ethanol concentration, dipotassium hydrogen phosphate solution concentration and *Astragali Radix* feed ratio as influencing factors, together with

收稿日期: 2016-03-24
基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2014AA022204)
作者简介: 宋力飞, 男, 高级工程师, 研究方向为中药制剂。E-mail: songlifei@21cn.com
* 通信作者: 段海霞, 女, 硕士, 研究方向为中药活性成分的分离纯化。E-mail: xdhaixia@163.com

extraction rates of total flavonoids and total saponins as evaluation indices, the technology optimization was accomplished by central composite design-response surface method. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 27.97% for ethanol concentration, 22.03% for dipotassium hydrogen phosphate solution concentration, and 1 : 58.85 for *Astragali Radix* feed ratio. The extraction rate of total flavonoids reached 74.13% (concentrated in the upper layer), while that of total saponins reached 81.34% (concentrated in the lower layer). **CONCLUSION** With good predictability, this simple and accurate method can be used for the extraction of total flavonoids and total saponins in *Astragali Radix*.

KEY WORDS: *Astragali Radix*; total flavonoids; total saponins; aqueous two-phase extraction; central composite design and response surface method

黄芪为多年生草本植物，其性微温，味甘，归脾、肺经，有补气升阳、益卫固表、托毒生肌、利水退肿之功效^[1]。《中国药典》规定^[2]，本品属豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根。研究表明，黄芪含有多种活性成分，包括黄芪多糖^[3]、黄芪皂苷^[4]、氨基酸^[5]、黄芪黄酮^[6]等，以黄酮和皂苷为主，具有抗氧化、抗肿瘤、抗辐射、抗心血管疾病、抗血栓、抗菌、抗病毒、保肝利尿等药理作用^[1]。

近年来，对黄芪生物活性成分提取的研究主要集中在黄酮和皂苷^[6-8]，其中前者大多采用热水提取、醇提取、碱性水或碱性稀醇提取以及其他有机溶剂萃取法，而后者大多采用索氏提取、超声提取以及回流蒸煮法，如董顺福等^[9]采用索氏提取法提取黄酮，谢华等^[10]以正交试验优化酶法提取总黄酮，张军武等^[11]以乙醇回流提取总黄酮，李莉等^[12]采用微波辅助提取法提取黄芪甲苷，王培培^[13]采用 70% 乙醇回流提取法提取皂苷，但以上方法都只针对黄芪中的一类成分进行提取，并且在后期分离过程中需耗费大量时间和资源。本研究采用乙醇/磷酸氢二钾溶液双水相萃取法，综合萃取其中的总黄酮和总皂苷，可使两者得到一定程度分离，为后期处理节省了时间和经济成本。目前，该方法在国内尚未见报道，本实验为进一步提高两者萃取率，还采用星点设计-响应面法优化了主要工艺参数，以确保该方法可行性，为其高效率纯化提供了一定理论依据。

1 药材、试剂与材料

黄芪购自赤峰荣兴堂药业有限责任公司中药饮片厂（批号 20140502），由广州中医药大学李常青研究员鉴定为正品。芦丁（批号 100080）、黄芪甲苷（批号 110781）对照品均购自广州药品检验所。

无水乙醇、磷酸氢二钾、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、氯化钠、硫酸铵、盐酸等试剂均购自广州化学试剂厂。XW-80A 涡轮混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）、TB-114 电子天平（美国丹佛公司）、TU-1900 双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）、DF-15 台式连续投料粉碎机（温岭市林大机械有限公司）、高压差连续式提取浓缩器（广州泽力医药科技有限公司）。

2 实验方法

2.1 黄芪粗提物制备 将黄芪原药材粉碎，过 80 目筛，精密称取适量，以乙醇为提取溶剂，按照实验室确定的提取工艺，应用广州泽力医药科技有限公司独立研制并具有自主知识产权的高压差连续式提取浓缩器提取、浓缩、喷雾干燥，即得，常温下阴凉保存，待用。

2.2 总黄酮测定 根据《中国药典》2010 版，以芦丁为对照品，在 510 nm 波长处吸光度为纵坐标（Y），芦丁质量浓度（mg/mL）为横坐标（X）绘制标准曲线，得方程 $Y = 0.785\ 17X + 0.007\ 1$ ($R^2 = 0.998\ 3$)，以其计算黄芪粗提物中总黄酮含量。

2.3 总皂苷测定 参考文献 [14]，并作少量修改。选择黄芪甲苷作为对照，在 544 nm 波长处以香草醛-硫酸法测定，得黄芪甲苷标准曲线为 $Y = 0.020\ 2X + 0.091\ 86$ ($R^2 = 0.995\ 7$)，以其计算黄芪粗提物中总皂苷含量。

2.4 双水相相图绘制 根据 Albertsson 浊点^[15]滴定法，绘制双水相体系相图。精密称取适量无机盐（ m_s ）置于锥形瓶中，加入适量去离子水（ m_w ），缓慢滴加无水乙醇，并不断振荡使其充分混合，观察溶液澄清度，直至锥形瓶内液体出现浑浊为止，记录滴加的乙醇质量（ m_{ei} ），此时体系总质量为 m_i 。再加入适量去离子水（ m_{wj} ），溶液澄清，此时体系总质量为 m_j 。继续向锥形瓶中滴加无水乙醇，并不断混匀，直至再次达到浑浊，如此反复操

作，记录每次达到浑浊时乙醇和盐在系统中所占的质量分数，计算公式如下。以乙醇质量分数为纵坐标，盐质量分数为横坐标作图，即得一条双节线的相图，见图 1。

乙醇质量分数 $W_{ei} = \frac{\sum m_{ei}}{m_i} (i = 1, 2, 3, \dots, n)$

盐的质量分数 $W_s = \frac{\sum m_s}{m_j} (j = 1, 2, 3, \dots, n)$

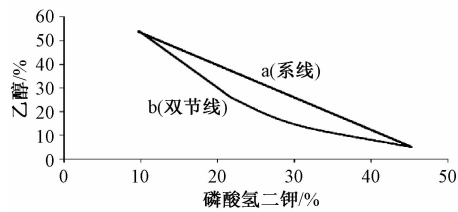


图 1 双水相相图

Fig. 1 Aqueous two-phase system diagram

2.5 黄芪投料比范围确定 由图 1 可知，乙醇、盐质量分数均在 20% ~ 30% 范围内比较合适，故再通过测定乙醇、磷酸氢二钾溶液质量分数均为 20% 或 30% 的两相体系中黄芪饱和溶解度，即可初步确定其投料比范围。

2.6 星点设计-响应面法优化 选择乙醇质量分数 (A)、磷酸氢二钾溶液质量分数 (B) 和黄芪投料比 (C) 作为影响因素，根据星点设计原理，各因素设置 5 个水平，见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 盐/%	C 黄芪投料比
-1.681 79	20	20	1 : 15
-1	22.03	22.03	1 : 26.15
0	25	25	1 : 42.50
1	27.97	27.97	1 : 58.85
1.681 79	30	30	1 : 70

3 实验结果与分析

3.1 黄芪投料比 见表 2，控制双水相体系总量为 10 g，确定 1 : 70 ~ 1 : 15 作为投料比范围。

表 2 投料比分析结果

Tab. 2 Analysis results of feed ratio

乙醇/%	盐/%	黄芪投料量/g	双水相体系总量/g	黄芪投料比
20	20	0.142 8	10	1 : 70.02
30	30	0.660 4	10	1 : 15.14

3.2 工艺优化

3.2.1 星点设计-响应面法 见表 3。

表 3 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of tests

试验号	A 乙醇/ %	B 盐/ %	C 黄芪 投料比	总黄酮萃 取率/%	总皂苷萃 取率/%
1	27.97	27.97	1 : 58.85	75.03	80.03
2	25	25	1 : 70	68.11	75.14
3	25	20	1 : 42.5	73.54	80.77
4	30	25	1 : 42.5	68.23	77.04
5	22.03	27.97	1 : 26.15	63.41	78.99
6	20	25	1 : 42.5	70.61	80.52
7	25	25	1 : 42.5	71.84	74.53
8	25	30	1 : 42.5	74.34	81.18
9	22.03	22.03	1 : 26.15	56.20	76.16
10	27.97	27.97	1 : 26.15	67.45	70.61
11	25	25	1 : 42.5	70.17	75.91
12	25	25	1 : 42.5	72.13	84.11
13	25	25	1 : 42.5	71.07	82.70
14	27.97	22.03	1 : 26.15	60.88	74.22
15	25	25	1 : 15	71.86	75.69
16	22.03	27.97	1 : 58.85	68.43	81.98
17	25	25	1 : 42.5	72.91	81.18
18	25	25	1 : 42.5	67.80	80.93
19	22.03	22.03	1 : 58.85	68.51	83.92
20	27.97	22.03	1 : 58.85	68.69	74.25

注：总黄酮/总皂苷萃取率 = [(双水相上层溶液中萃取得到的总黄酮/总皂苷量 + 双水相下层溶液中萃取得到的总黄酮/总皂苷量) / 黄芪投料量] × 100%

3.2.2 模型拟合 应用 Design Expert 8.0.6 软件处理实验数据，根据离均差平方和、拟合误差、统计总结对不同模型进行非线性拟合，发现二次模型最优，故以其进行数据回归。

3.2.2.1 总黄酮模型 以总黄酮萃取率 (Y₁) 为响应值，得到回归方程为 Y₁ = 3.25A + 2.52B + 0.95C - 0.11AB - 0.014AC - 0.021BC - 8.45。方差分析见表 4。

表 4 方差分析 (总黄酮)

Tab. 4 Analysis of variance (total flavonoids)

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	220.04	6	36.67	35.36	<0.000 1
A	9.58	1	9.58	9.24	0.009 5
B	5.75	1	5.75	5.55	0.034 9
C	13.74	1	13.74	13.24	0.003
AB	8.04	1	8.04	7.75	0.015 5
AC	3.89	1	3.89	3.75	0.074 8
BC	7.96	1	7.96	7.67	0.015 9
残差	13.48	13	1.04	—	—
失拟项	11.13	8	1.39	2.95	0.124 1
纯误差	2.36	5	0.47	—	—
总误差	233.53	19	—	—	—

由表 4 可知，该模型显著性良好 (P < 0.000 1)，相关系数 (R²) 为 0.951 2，表明相关性理想，乙醇质量分数、K₂HPO₄ 质量分数和黄芪投料比对总黄酮提取率均有显著影响 (P < 0.05)。图 2 ~ 4 显示，随着乙醇质量分数增加，总黄酮提取率先增后

降，在 27.97% 时达到最大值；K₂HPO₄ 质量分数对黄酮提取率的影响不大，在 22.03% 时黄酮提取率趋于稳定；黄芪投料量对黄酮提取率的影响最显著，在 58.85% 时总黄酮提取率最高。

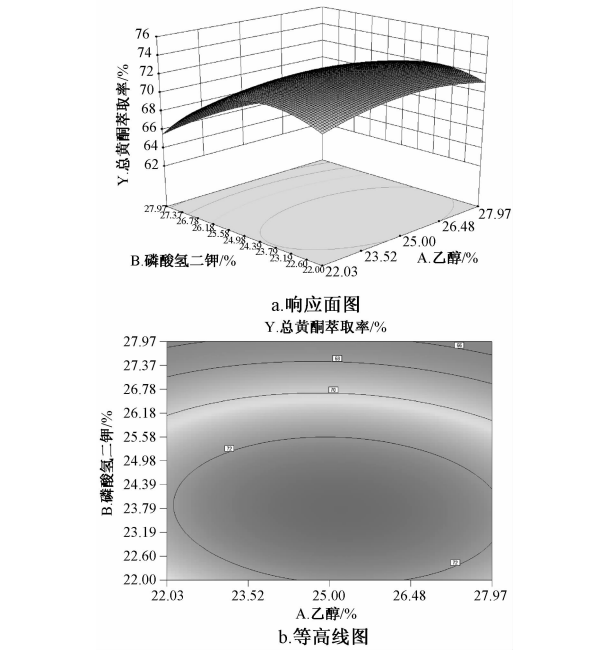


图 2 乙醇质量分数和磷酸氢二钾溶液质量分数对总黄酮萃取率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration and dipotassium hydrogen phosphate solution concentration on the extraction rate of total flavonoids

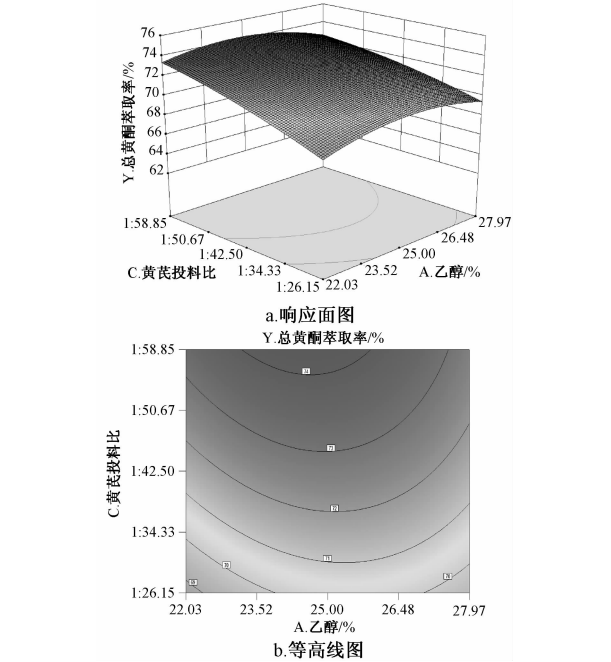


图 3 乙醇质量分数和黄芪投料比对总黄酮萃取率的影响

Fig. 3 Effects of ethanol concentration and *Astragali Radix* feed ratio on the extraction rate of total flavonoids

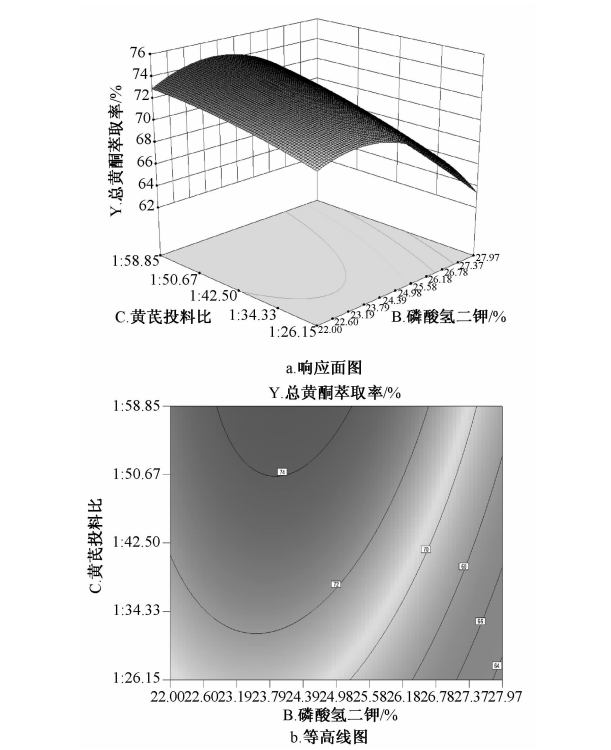


图 4 磷酸氢二钾溶液质量分数和黄芪投料比对总黄酮萃取率的影响

Fig. 4 Effects of dipotassium hydrogen phosphate solution concentration and *Astragali Radix* feed ratio on the extraction rate of total flavonoids

3.2.2.2 总皂苷模型 以总皂苷萃取率 (Y_2) 为响应值，得到回归方程为 $Y_2 = -139.053\ 02 + 6.159\ 71A + 8.969\ 74B - 0.033\ 834C - 0.150\ 61AB + 0.012\ 522AC - 9.513\ 80 \times 10^{-4}BC - 0.039\ 925A^2 - 0.070\ 125B^2 - 2.542\ 99 \times 10^{-3}C^2$ 。方差分析见表 5。

表 5 方差分析 (总皂苷)					
Tab. 5 Analysis of variance (total saponins)					
来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	471. 41	9	52. 38	76. 36	<0. 000 1
A	104. 47	1	104. 47	152. 3	< 0. 000 1
B	331. 7	1	331. 7	483. 57	<0. 000 1
C	5. 63	1	5. 63	8. 21	0. 016 8
AB	14. 18	1	14. 18	20. 67	0. 001 1
AC	2. 96	1	2. 96	4. 32	0. 064 3
BC	0. 017	1	0. 017	0. 025	0. 877 6
A ²	1. 93	1	1. 93	2. 81	0. 124 4
B ²	5. 77	1	5. 77	8. 42	0. 015 8
C ²	6. 92	1	6. 92	10. 09	0. 009 9
残差	6. 86	10	0. 69	—	—
失拟项	4. 61	5	0. 92	2. 05	0. 225 5
纯误差	2. 25	5	0. 45	—	—
总误差	478. 27	19	—	—	—

由表5可知,该模型显著性良好($P<0.0001$),相关系数(R^2)为0.9857,表明相关性理想,乙醇质量分数、 K_2HPO_4 质量分数和黄芪投料比对总皂苷提取率均有显著影响($P<0.05$)。图5~7显示,乙醇质量分数与黄芪投料比的相互作用不显著;当黄芪投料比一定时,总皂苷提取率先增后减;乙醇质量分数与磷酸氢二钾质量分数的相互作用很显著,两者在适中位置(均为25%)可使总皂苷萃取率达到最大值。

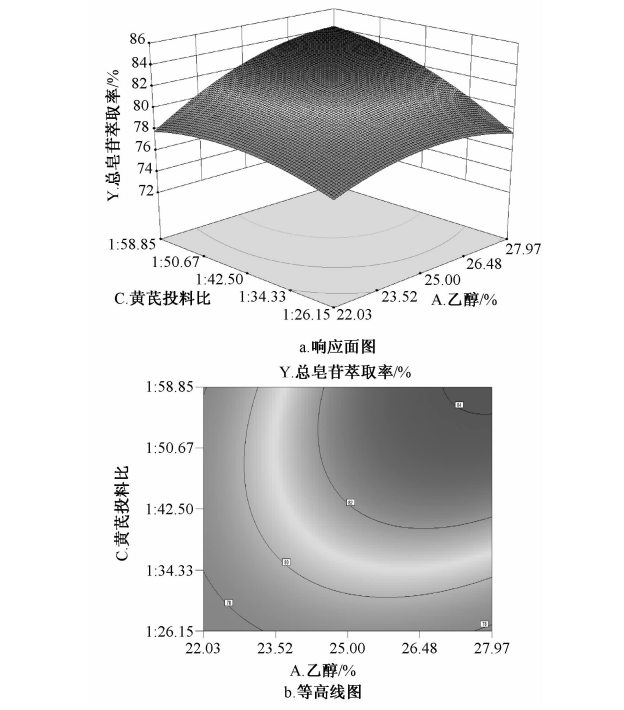


图5 乙醇质量分数和黄芪投料比对总皂苷萃取率的影响
Fig. 5 Effects of ethanol concentration and *Astragali Radix* feed ratio on the extraction rate of total saponins

综上所述,最佳萃取工艺为乙醇质量分数27.97%,磷酸氢二钾溶液质量分数22.03%,黄芪投料比1:58.85,此时总黄酮萃取率达74.13%,总皂苷萃取率达81.34%。

3.2.3 验证试验结果 根据上述优化工艺,进行3次双水相萃取,结果见表6。

由表可知,上层溶液中总黄酮平均转移率与预测值(74.13%)之间的RSD为1.99%,而下层溶液总皂苷平均转移率与预测值(81.34%)之间的RSD为7.33%,有一定差异,可能是由于总皂苷检测方法本身的不稳定性所造成的。

4 讨论和结论

本实验采用星点设计-响应面法进行优化,并通过二次模型对数据进行拟合,可使所得模型相关

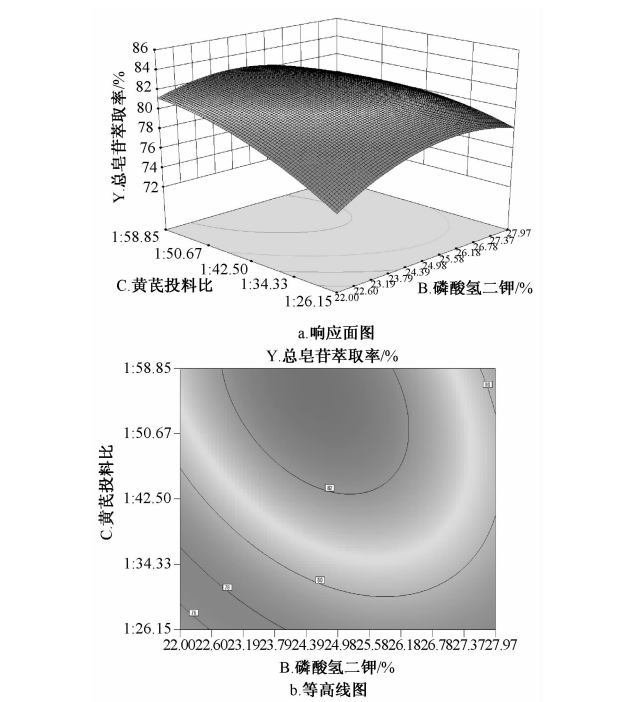


图6 磷酸氢二钾溶液质量分数和黄芪投料比对总皂苷萃取率的影响
Fig. 6 Effects of dipotassium hydrogen phosphate solution concentration and *Astragali Radix* feed ratio on the extraction rate of total saponins

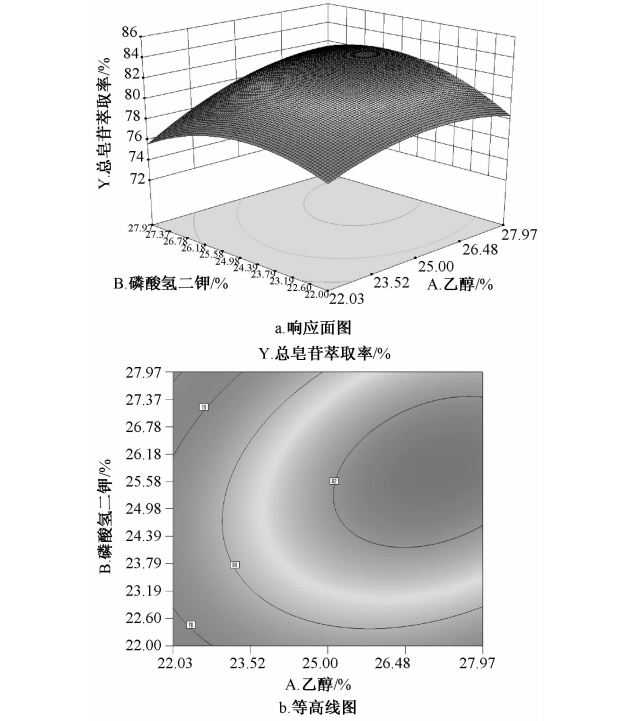


图7 乙醇质量分数和磷酸氢二钾溶液质量分数对总皂苷萃取率的影响
Fig. 7 Effects of ethanol concentration and dipotassium hydrogen phosphate solution concentration on the extraction rate of total saponins

表 6 验证试验结果 (n=3)

Tab. 6 Results of verification tests (n=3)

试验号	总黄酮/ μg	总黄酮萃 取率/%	平均值/ %	总皂苷/ mg	总皂苷萃 取率/%	平均值/ %
1(上层)	7 451. 933	76. 08	75. 62	29. 717	75. 92	75. 59
1(下层)	2 343. 070			93. 709		
2(上层)	7 321. 821	76. 12	75. 62	30. 417	73. 60	75. 59
2(下层)	2 297. 132			84. 777		
3(上层)	7 220. 522	74. 65		28. 177	77. 24	
3(下层)	2 452. 239			95. 620		

系数较高, 预测值更接近真实值, 而且充分考虑到各因素的交互作用。研究表明, 该方法设计简单, 试验次数少, 预测性良好。

综上所述, 黄芪双水相萃取工艺的最佳参数为乙醇质量分数 27. 97%, 磷酸氢二钾溶液质量分数 22. 03%, 黄芪投料比 1 : 58. 85, 总黄酮萃取率达 74. 13%, 总皂苷萃取率达 81. 34%。该方法成本低, 操作简单, 可为从黄芪中萃取出总黄酮和总皂苷提供了一种新方法, 对其他植物中相关成分的提取分离也有一定参考和借鉴价值。

参考文献:

[1] 陈国辉, 黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1482-1485.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部

[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 249.
[3] 何文涓, 袁志坚, 何晓升. 黄芪多糖的药理作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 692-694.
[4] 石海莲, 吴大正, 胡之璧. 黄芪皂苷甲的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(8): 565-567.
[5] 吴耕农, 胡还甫. 黄芪茎中氨基酸的研究 [J]. 光明中医, 2008, 23(10): 1448-1449.
[6] 陈瑞战, 孟繁磊, 张守勤. 超高压提取黄芪甲苷工艺研究 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(7): 519-523.
[7] 肖卫华, 韩鲁佳, 杨增玲, 等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 52-56.
[8] 姜波, 王宝秋, 谢家全, 等. 黄芪皂苷类有效成分提取分离技术 [J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 31-32.
[9] 董顺福, 李亚新, 韩丽琴. 丹参等三种中药总黄酮含量分析及其抗氧化机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1107-1109.
[10] 谢蓝华. 正交试验优化酶法提取黄芪总黄酮工艺 [J]. 包装与食品机械, 2013(3): 7-12.
[11] 张军武, 赵琦. 乙醇回流提取黄芪总黄酮最佳温度考察 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1133-1134.
[12] 李莉, 谭蔚, 马雪松. 微波辅助提取黄芪甲苷的研究 [J]. 中药材, 2007, 30(2): 234-236.
[13] 王培培, 许杜娟, 夏泉. 黄芪皂苷的提取及含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 27-29.
[14] 司丹丹. 黄芪有效成分提取以及纳滤在提取中的应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.
[15] Albertsson P A. Partition of cell particles and macromolecules [M]. New York: Wiley, 1971: 58-71.