

星点设计-效应面法优化甘草水提工艺

古川 武婧 梁艳妮 宋忠兴 刘红波 刘世军 唐志书 (陕西中医学院/陕西省中药资源产业化协同创新中心/陕西省中药基础与新药研究重点实验室 陕西咸阳 712046)

摘要 目的:运用星点设计-效应面法对甘草水提工艺进行优化。**方法:**用 HPLC 法测定甘草苷、甘草酸含量,以甘草苷、甘草酸含量和干膏收率为综合评价指标,以加水倍量、提取时间为自变量,综合评价指标为因变量,采用 Design-Expert 8.06 对试验数据进行多元线性回归及二项式拟合,用效应面法优选最佳水提工艺,并对结果进行预测分析。**结果:**最佳水提工艺为 12 倍量水,提取 2 次,每次 90 min,提取预测值与理论值偏差为 -1.72%,二项式拟合复相关系数 $r=0.979\ 7$ 。**结论:**星点设计-效应面法优化甘草水提工艺,简便可行,预测性较高;为后续应用膜分离纯化提供最佳提取工艺。

关键词 甘草;星点设计;效应面法;水提工艺

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2015)08-1253-03

Optimization of Water Extraction Process for Glycyrrhiza by Central Composite Design /Response Surface Methodology

Gu Chuan, Wu Jing, Liang Yanni, Song Zhongxing, Liu Hongbo, Liu Shijun, Tang Zhishu (Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi Xianyang 712046, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the water extraction process for glycyrrhiza. **Methods:** HPLC was used to determine the contents of glycyrrhizic acid and liquiritin. The comprehensive index included the contents of glycyrrhizic acid and liquiritin and the yield of dry extract. The water amount and the extraction time were selected as the independent variables, and the comprehensive index was set as the dependent variable. Design-expert 8.06 software was used to fit multivariate linear or quadratic multinomial models for the experimental values. Response surface methodology was used to optimize the water extraction process. The prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. **Results:** The regression coefficient of binomial fitting complex model was as high as 0.979 7. The optimum conditions of extraction process were as follows: 12-fold amount of water, extracting 3 times with 90 min for each time. The deviation between the observed and predicted values was -1.72%. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology is convenient and highly predictive in optimizing the water extraction process for glycyrrhiza, which can be applied in the further membrane separation and purification.

KEY WORDS Glycyrrhiza; Central composite design; Response surface methodology; Water extraction process

甘草为常用中药,来源于豆科多年生草本植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)、胀果甘草(*G. inflata* Bat.)和光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根及根茎,主产于内蒙古、甘肃、新疆等地。甘草主要含有三萜类化合物(甘草酸、甘草次酸)、黄酮类化合物(甘草苷、异甘草苷)及甘草多糖等。黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌抗病毒等作用;甘草酸具有保肝和治肝和治疗肾病和心脏疾病、抗病毒、抗菌等作用^[1]。甘草中有效成分的提取纯化方法很多^[2~4],但多采用有机溶剂作为溶媒。本试验考虑到苷类成分的提取及后续膜分离^[5,6]纯化的局限性,故采用最原始的水煎煮法。

均匀设计和正交试验设计法为目前国内常用的中药提取优选工艺方法。此两种方法虽然可以满足

一般试验的要求,但存在精度不够,选择的试验取值仅仅是接近最佳取值,无法精确找到最佳点等等。鉴于以上不足,常采用集数学与统计学方法于一体的星点设计(central composite design, CCD)-效应面法进行试验设计。CCD 具有试验次数少,精确度高,应用方便等特点^[7]。本试验选取星点设计-效应面法优选甘草最佳水提工艺,同时也为探讨星点设计-效应面法应用于中药提取工艺的可行性提供依据。

1 仪器与材料

Waters2695 高效液相色谱仪,Empower 色谱工作站,W2996 二极管阵列检测器;FA21040N 型电子天平(万分之一)。甘草饮片(购于西安盛兴中药饮片有限公司,批号:120701),甘草苷对照品(中国食

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81373978)

通讯作者:唐志书 Tel:18691970516 E-mail:tzs6565@163.com

品药品检定研究院,批号:111610-201106),甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110731-200615);乙腈、甲醇均为色谱纯;水为蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘草苷和甘草酸含量测定方法学建立

2.1.1 色谱条件与系统适用性^[8] 色谱柱:Accura-sil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:以乙腈为流动相 A,以0.05%磷酸水溶液为流动相 B,梯度洗脱(0 ~ 8 min,19 % A;8 ~ 35 min,19 % ~ 50 % A;35 ~ 36 min,50 % ~ 100 % A);检测波长:237 nm;流速:0.8 ml·min⁻¹;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷、甘草酸铵对照品适量,加70%乙醇分别制成每1 ml含甘草苷20 μg、甘草酸铵200 μg的溶液,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得(甘草酸重量=甘草酸铵重量/1.0207)。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取50 g甘草样品,按提取条件提取一定时间后,趁热过滤,将滤液定容到250 ml量瓶中,摇匀,精密吸取上述溶液1 ml,置100 ml量瓶中,加70 %乙醇定容至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。按“2.1.1”项下条件测定甘草苷和甘草酸的含量。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取甘草苷、甘草酸铵对照品溶液3,6,9,12,15,18 μl,按“2.1.1”项下的色谱条件注入色谱仪,测定峰面积,以峰面积为纵坐标、对照品质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得甘草苷回归方程: $Y=7.36 \times 10^6 X - 1.57 \times 10^3$ ($r=0.9992$),线性范围为0.030 ~ 0.180 μg;甘草酸回归方程: $Y=1.55 \times 10^6 X - 1.08 \times 10^3$ ($r=0.9994$),线性范围为0.059 ~ 0.365 μg。

2.1.5 精密度试验 取同一批(批号:120701)供试品溶液,连续进样5次,按“2.1.1”项下的色谱条件进行测定,记录峰面积,计算甘草苷和甘草酸RSD分别为1.37%和1.02% ($n=5$),表明仪器的精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取6份同一批(批号:120701)样品,按“2.1.3”项下进行制备供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件进行测定,记录峰面积,计算甘草苷和甘草酸RSD分别为1.04%和1.32% ($n=6$),本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一批(批号:120701)供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件,分别在0,1,2,4,8,12 h各测定一次,计算甘草苷和甘草酸RSD分别为1.16%和1.46% ($n=6$),表明供试品溶液在

12 h内稳定性良好。

2.1.8 回收率试验 取6份已知含有量的甘草样品,分别加入适量的甘草苷和甘草酸铵标准品,按“2.1.3”项下进行制备,按“2.1.1”项下的色谱条件进行测定,计算甘草苷和甘草酸平均回收率分别为97.12%和98.42%,RSD分别为2.05%和1.79% ($n=6$),表明本方法回收率良好。

2.2 星点设计法优化水提条件

2.2.1 试验设计^[9] 影响水煎煮提取的主要因素有加水倍量、提取时间和提取次数,因提取次数为非连续变量,不适宜于星点设计分析,因此对提取次数进行单独考察。称取甘草50 g,加10倍量水煎煮4次,每次90 min,按照“2.1.1”项下条件测定甘草苷、甘草酸的含量,将4次提取液所测得甘草苷、甘草酸含量总和视为100%,分别计算各次提取甘草苷、甘草酸的提取率,结果表明,提取2次的甘草苷、甘草酸提取率分别已达4次提取液中甘草苷、甘草酸总含量的86.57%、83.62%,从节省资源成本的因素考虑,将提取次数确定为2次。

根据星点设计的原理,对加水倍量和提取时间两个因素进行考察,各因素设五水平,用代码 $-\alpha$ 、 -1 、 0 、 1 、 α 来表示(两因素星点设计的 $\alpha=1.414$)。因素水平表见表1,试验安排结果见表2。

2.2.2 试验方法 称取甘草粗粉各50 g,按照表2设计的因素水平提取2次,合并提取液,浓缩至250 ml,备用。

2.2.3 综合评价指标OD 将不同的评价指标 Y_0 、 Y_1 和 Y_2 归一化为统一值进行综合评分。根据各指标在影响水提取工艺中的重要性,分别设定 Y_0 、 Y_1 和 Y_2 的权重为20%、40%和40%。计算公式: $OD=(Y_0/Y_{0max}) \times 20\% + (Y_1/Y_{1max}) \times 40\% + (Y_2/Y_{2max}) \times 40\%$ 。

表1 星点设计因素水平编码表

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1 加水倍量(倍)	6.00	7.46	11.00	14.54	16.00
X_2 提取时间(min)	10.00	26.10	65.00	103.90	120.00

2.2.4 模型拟合 采用Design-Expert 8.06软件,以综合评分为因变量对自变量(X_1 、 X_2)进行多元线性回归和二项式拟合,多元线性回归 $r=0.7632$, $P<0.0001$,模型虽然可以通过检验,但拟合度不佳,预测性较差,因此线性模型不合适。二项式模型方程为:综合评分(OD)= $-35.1405+10.7913X_1+1.2982X_2-0.0172X_1X_2-0.3299X_1^2-5.834 \times 10^{-3}X_2^2$ ($r=0.9797$, $P<0.0001$),方差分析结果见表3。

表 2 试验设计与结果

试验号	X_1	X_2	Y_0 干膏收率(%)	Y_1 甘草苷含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Y_2 甘草酸含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	OD 综合评分(%)
1	7.46	26.10	17.13	25.97	58.02	51.60
2	14.54	26.10	22.53	39.29	98.10	78.91
3	7.46	103.90	23.45	38.46	103.59	80.72
4	14.54	103.90	25.04	51.57	123.59	98.53
5	6.00	65.00	20.95	39.59	89.64	75.23
6	16.00	65.00	25.65	45.95	115.12	91.61
7	11.00	10.00	16.25	25.40	64.92	52.74
8	11.00	120.00	27.02	46.08	122.33	95.33
9	11.00	65.00	23.38	47.12	110.05	89.47
10	11.00	65.00	24.21	45.24	120.11	91.88
11	11.00	65.00	22.22	43.63	114.17	87.24
12	11.00	65.00	25.66	46.82	122.70	95.02
13	11.00	65.00	23.37	47.49	115.80	91.62

注:9~13 号为重复试验。

表 3 二项式拟合模型的方差分析表

方差来源 (variance)	SS	df	MS	F	P
模型	2694.82	5	538.96	33.13	<0.0001
X_1 -加水倍量	582.85	1	582.85	35.83	0.0005
X_2 -煎煮时间	1484.34	1	1484.34	91.25	<0.0001
X_1X_2	22.56	1	22.56	1.39	0.2774
X_1^2	118.94	1	118.89	7.31	0.0305
X_2^2	542.07	1	542.07	33.33	0.0007
残差	113.86	7	16.27		
失拟项	80.08	3	26.69	3.16	0.1477
误差	33.79	4	8.45		
总离差	2808.68	12			

由表 3 可知,整体模型达到显著水平,表明该二次方程模型比较显著,失拟项不显著($P=0.1477$)该方程对试验拟合较好,相对于线性拟合模型有大幅度提高,表明该方程有较大可信度,可以对不同条件下的综合评分进行预测。

2.2.5 工艺优化与预测 采用 Design Expert 8.06 软件,作出效应面的三维图,从而在效应面最佳区域上选取相应因素的较佳水平试验条件,三维图和等高线图见图 1,通过等高线在图上选取综合评分较佳工艺范围为 $X_1:11.96\sim14.54$ 倍; $X_2:81.26\sim100.85\text{ min}$,结合单因素试验结果及生产成本和操作的方便性,选取较佳水提工艺为:12 倍量水提取 2 次,每次 90 min。

根据最佳工艺条件提取甘草 3 份(每份 50 g),进行预测值与实测值的比较,结果偏差率为 -1.72% ,表明所建立的模型具有良好的预测性,所选工艺条件重复性好。

3 讨论

该甘草水提工艺优化以干膏收率、甘草苷和甘草酸含量作为综合评价指标,运用星点设计-效应面法,结合单因素试验结果,得出甘草最佳水提工艺为 12 倍量水,提取 2 次,每次 90 min。提取预测值与理论值偏差为 -1.72% ,二项式拟合复相关系数 $r=0.9797$,试验表明该工艺合理稳定,预测性较高,可为后续甘草的纯化研究提供最佳水提工艺。

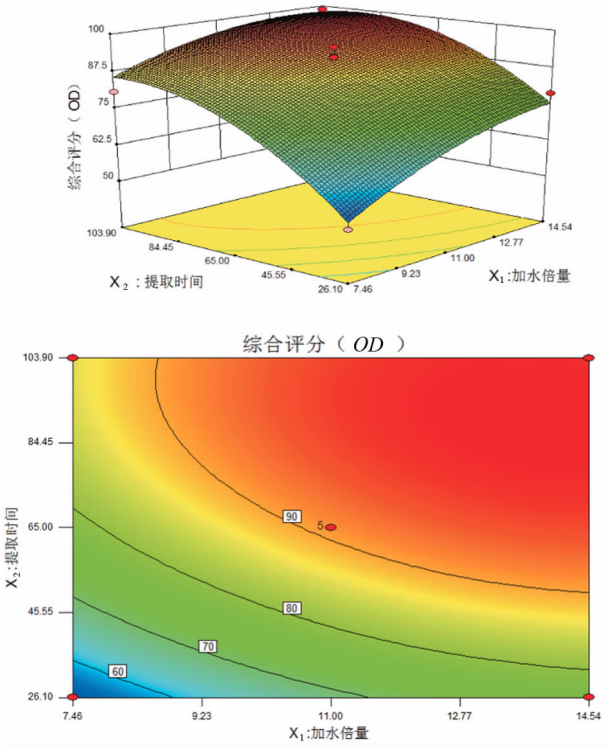


图 1 提取时间和加水倍量对综合评分(OD)的效应面和等高线图

参 考 文 献

1 田庆来,官月平,张波,等. 甘草有效成分的药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:343-347

2 赵祎镭,师清芝,唐星. 甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究[J]. 中国药房,2009,20(6):426-428

3 王海峰,邱芳萍. 甘草中甘草酸的提取工艺研究[J]. 长春工业大学学报(自然科学版),2010,31(1):66-69

4 马稳,宋力,李鸿雁. 微波辅助提取甘草中甘草苷的工艺研究[J]. 光谱实验室,2009,26(6):1409-1412

5 曹云台,郭立玮,施栋磊,等. 陶瓷膜应用于中药精制的研究进展[J]. 中草药,2010,41(2):314-317

6 程鹏,武超,华剑,等. 超滤膜分离的技术原理及其在中药领域中的应用[J]. 中国医药指南,2010,8(11):47-50

7 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):455-457

8 中国药典[S]. 2010 年版. 一部. 59-60

9 李永生,张春玲,杨华. 星点设计-效应面法优化健脾颗粒的提取工艺[J]. 中国药师,2012,15(12):1685-1688

(2015-03-18 收稿 2015-04-29 修回)