

采用响应曲面法优化甘草饮片中 甘草酸的超声提取工艺*

国蓉^{1, 2a}, 李剑君^{2b}, 国亮¹, 程光旭^{2a}

(1 西安工业大学 光电学院, 陕西 西安 710032;

2 西安交通大学 a 能源与动力工程学院; b 生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049)

[摘要] 根据Box-Behnken的中心组合实验设计原理,在单因素试验的基础上,采用三因素三水平的响应曲面分析法,建立了甘草饮片中甘草酸超声提取的二次多项数学模型,并以甘草酸提取率为响应值作响应面 and 等高线,考察了浸泡时间、超声时间和液固比对甘草酸超声提取的影响。结果表明,甘草酸超声提取的优化工艺条件为:浸泡时间151.3 min,超声时间48.8 min,液固比10.2 mL/g;在此工艺条件下,甘草酸提取率为21.06%。

[关键词] 甘草酸;超声提取;响应曲面法;优化工艺条件

[中图分类号] R284.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)09-0187-06

甘草始载于《神农本草经》,被中医界奉为“药中之王”,是中医处方和中成药中用得最多、耗量最大的品种之一。甘草酸是甘草中的主要生理活性成分,在保湿软化皮肤,防治色素沉积,止咳平喘,抗肿瘤、乙脑等方面有着显著作用。近年来,众多临床应用表明,甘草酸可以抑制乙型肝炎病毒(HBV)和感染细胞表面抗原(HBsAg)的分泌,还可以明显抑制(阻止)HIV增殖,增强机体的免疫力^[1-2]。目前,对于甘草酸提取工艺研究的报道,多限于单纯的分析提取效果的影响因素,或以正交试验方法确定最佳提取条件。但是,传统的正交试验方法虽然能够同时考虑几种影响因素,寻找最佳因素水平组合,却不能在给出的整个区域上找出因素和响应值间的明确的函数表达式,即回归模型,从而无法找到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值。

响应曲面方法(Response Surface Methodology, RSM)是Box等人于20世纪50年代提出的,其以回归模型作为函数估算的工具,在多因子试验中,将因子与试验结果(响应值)的相互关系用多项式拟合,把因子和试验结果的关系函数化。因而,可通过对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化,是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法^[3]。

基于此,本研究将响应曲面法应用于甘草饮片

中甘草酸的超声提取工艺优化中,通过试验建立了超声提取工艺参数与甘草酸提取率之间的数学模型,以期获得最优的工艺参数,从而提高甘草饮片中甘草酸的提取率。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

材料 甘草酸标准品购自陕西慧科植物开发有限公司,纯度98%;甘草饮片购自西安市宏济大药堂;其他试剂均为分析纯。

设备 高速冷冻离心机(J2MC)和紫外分光光度计(DU 640)均为BECKMAN公司产品;电子天平(AB104-S)为Mettler公司产品;超声波清洗器(KQ-250),由江苏昆山市超声仪器有限公司生产;旋转蒸发器(RE-52A),由上海亚荣生化仪器厂生产;循环水真空泵(SHB-3),由河南巩义市杜甫仪器厂生产;电热恒温水浴锅(DZKW-4),由黄骅市渤海电器厂生产;电热鼓风干燥箱(CS1012),由重庆试验设备厂生产;粉碎机(JZ7114),由上海微型电机厂生产。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线制备 取甘草酸纯品0.25 g,溶于50 mL体积分数50%的乙醇溶液中,分别取上述甘草酸标准液1, 2, 3, 4, 5 mL,用体积分数50%的乙醇溶液稀释至250 mL,在254 nm处测其吸光度,以体

* [收稿日期] 2005-09-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(20576108)

[作者简介] 国蓉(1972-),女,山东郓城人,副教授,在读博士,主要从事复杂过程系统控制与优化研究。

积分50%的乙醇溶液作参比,测得各自的吸光度,用最小二乘法经线性回归后可得 $C = 0.0106A - 0.0041$, 相关系数 $R = 0.9997$ 。式中, C 为浓度($\mu\text{g/mL}$), A 为吸光度。

1.2.2 样品处理 购得的甘草饮片经 60°C 干燥,粉碎,过 0.147 mm 筛备用。

1.2.3 甘草饮片中甘草酸的提取 用天平准确称取干燥后的甘草粉 20.0 g ,按适宜液固比分别制备提取液,再按照单因素试验方案(在 35°C 下分别选取不同的浸泡时间,在 40 kHz 下分别选取不同的超声时间)或三因素三水平试验方案,离心分离上清液。将上清液在旋转蒸发器中于 80°C 减压浓缩至原体积的 $1/5$,将浓缩液用 3.5 mol/L 的硫酸调 pH 至2,静置过夜,再离心,将固状物在烘箱中于 80°C 干燥至恒重,最后称取 0.25 g 溶于 50 mL 体积分数50%乙醇溶液中。取上述溶液 1 mL 用体积分数50%乙醇溶液稀释至 200 mL ,在 254 nm 处测其吸光度,按标准曲线计算其含量。

1.3 甘草酸提取率测定

甘草酸提取率的计算公式为^[4]:

$$R/\% = \frac{C \times V}{1000 \times W} \times 100\% \quad (1)$$

式中, R 为甘草酸提取率; C 为根据甘草酸标准曲线公式计算出的所测样品的甘草酸浓度($\mu\text{g/mL}$); V 为样品体积(mL); W 为甘草粉末质量(g)。

2 结果与讨论

2.1 浸泡时间、超声时间、液固比对甘草酸提取率的单因素影响试验

影响甘草酸提取率的因素很多,如浸泡时间、超

声时间、液固比等。在进行 RSM 分析前,应先通过单因素试验来选取试验因素与水平。

2.1.1 浸泡时间 固定液固比为 10 mL/g ,超声时间为 60 min ,研究不同浸泡时间对甘草酸提取率的影响,结果见图1。从图1可知,随着浸泡时间的延长,甘草酸提取率不断提高。甘草酸提取率在浸泡时间少于 120 min 前增加较为明显,以后趋于平缓。为缩短工时、减少能耗,选择浸泡时间为 $120\sim 180\text{ min}$ 为宜。

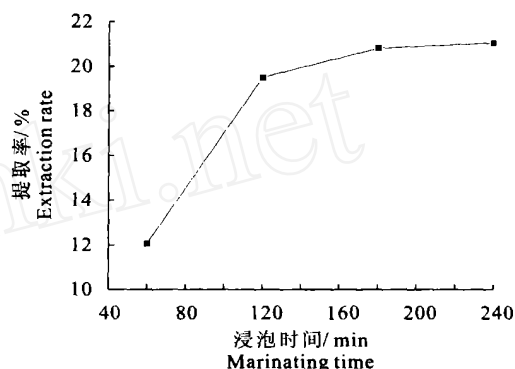


图1 浸泡时间对甘草酸提取率的影响

Fig 1 Effect of marinating time on extraction rate of glycyrrhizic acid

2.1.2 超声时间 固定液固比为 10 mL/g ,浸泡时间为 150 min ,研究不同超声时间对甘草酸提取率的影响,结果见图2。从图2可知,在液固比为 10 mL/g 、浸泡时间为 150 min 的条件下,当超声时间为 $30\sim 60\text{ min}$ 时,甘草酸提取率迅速增加;之后随超声时间延长,甘草酸提取率增加缓慢。综合考虑提取率、成本等因素,选择超声时间为 60 min 左右为宜。

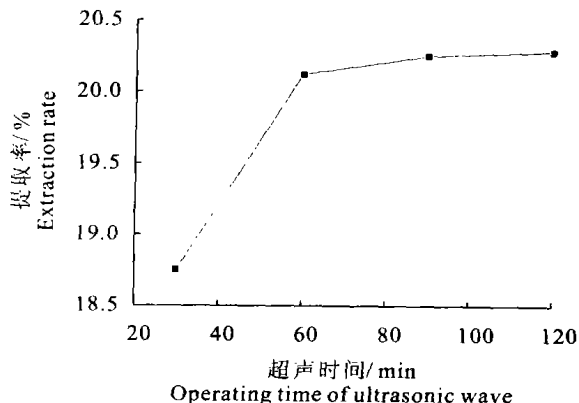


图2 超声时间对甘草酸提取率的影响

Fig 2 Effect of operating time of ultrasonic wave on extraction rate of glycyrrhizic acid

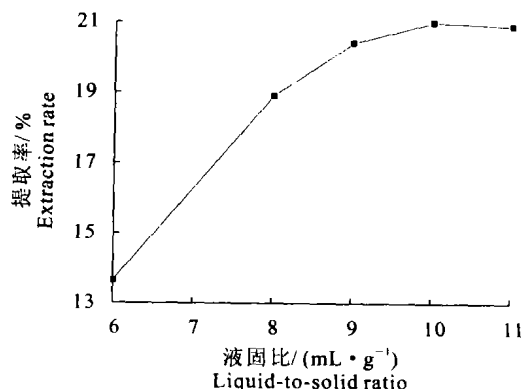


图3 液固比对甘草酸提取率的影响

Fig 3 Effect of liquid-to-solid ratio on extraction rate of glycyrrhizic acid

2.1.3 液固比 固定浸泡时间为150 min, 超声时间为60 min, 研究不同液固比对甘草酸提取率的影响, 结果见图3。从图3可以看出, 当液固比为0~10 mL/g 时, 随着液固比的增加, 甘草酸提取率也随之增加; 当液固比为10 mL/g 时, 甘草酸提取率最高; 之后随着液固比的增大, 甘草酸提取率有下降的趋势。因此, 提取甘草酸时, 选择液固比为10 mL/g 左右较为合适。

2.2 采用响应曲面法优化甘草酸超声提取工艺

2.2.1 响应曲面分析因素水平的选取 根据Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 结合上述单因素影响试验结果, 选取浸泡时间、超声时间和液固比3 个影响因素, 在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应曲面分析方法, 试验因素与水平设计见表1, 共17 个试验点, 其中12 个为析因点, 5 个为零点, 零点试验进行了5 次, 以估计误差^[5]。

表1 甘草酸超声提取试验的因素与水平

Table 1 Factors and levels in ultrasonic extraction experiments of glycyrrhizic acid

因素 Factors	水平 Levels		
	- 1	0	1
浸泡时间/min Marinating time (Z_1)	120	150	180
超声时间/min Operating time of ultrasonic wave (Z_2)	30	45	60
液固比/(mL · g ⁻¹) Liquid-to-solid ratio (Z_3)	8	9	10

2.2.2 响应曲面分析方案及结果 对浸泡时间(Z_1)、超声时间(Z_2)和液固比(Z_3)作如下变换^[6]:

$$x_i = (Z_i - Z_0)/Z \tag{2}$$

式中, x_i 为自变量的编码值, Z_i 为自变量的真实值, Z_0 为试验中心点处自变量的真实值, Z 为自变量的变化步长, 以甘草酸提取率为响应值(Y)。甘草酸超声提取响应曲面分析试验设计方案与试验结果见表2。

表3 甘草酸超声提取回归模型的方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for quadratic polynomial model of ultrasonic extraction of glycyrrhizic acid

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob> F	F _{0.01}	F _{0.05}
模型 Model	12.05	9	1.34	28.79**	0.000 1	14.66	
残差 Residual	0.33	7	0.046				
失拟项 Lack of fit	0.22	3	0.074	2.86	0.168 2		8.81
纯误差 Pure error	0.10	4	0.026				
总和 Total	12.37	16					

由表4 回归模型系数显著性检验结果可知, 模型(3)的一次项 x_1 , x_2 和 x_3 极显著; 二次项 x_1^2 和 x_2^2 极

表2 甘草酸超声提取试验设计与试验结果

Table 2 Experimental designs and extraction results of glycyrrhizic acid by ultrasonic

试验号 Trial No.	x_1	x_2	x_3	甘草酸提取率/% Extraction rate of glycyrrhizic acid
1	- 1	0	- 1	20.30
2	1	0	- 1	18.50
3	- 1	0	1	19.95
4	1	0	1	19.50
5	- 1	- 1	0	18.70
6	1	- 1	0	18.60
7	- 1	1	0	19.70
8	1	1	0	18.60
9	0	- 1	- 1	19.45
10	0	- 1	1	20.02
11	0	1	- 1	19.80
12	0	1	1	20.70
13	0	0	0	20.98
14	0	0	0	20.84
15	0	0	0	20.92
16	0	0	0	20.82
17	0	0	0	20.56

2.2.3 模型的建立及其显著性检验 利用Design-Expert (version 7.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) 软件对表2 试验数据进行多元回归拟合, 得到甘草酸提取率对浸泡时间(Z_1)、超声时间(Z_2)和液固比(Z_3)的二次多项回归模型为:

$$Y = 20.82 - 0.43x_1 + 0.25x_2 + 0.26x_3 - 0.25x_1x_2 + 0.34x_1x_3 + 0.082x_2x_3 - 1.18x_1^2 - 0.75x_2^2 - 0.084x_3^2 \tag{3}$$

对该模型进行显著性检验, 结果见表3, 回归模型系数显著性检验结果见表4。

由表3 可知, 模型的 $F = 28.79 > F_{0.01}(9, 4) = 14.66$, $P = 0.000 1 < 0.01$, 表明回归模型极显著; 失拟项 $F = 2.86 < F_{0.05}(9, 3) = 8.81$, $P = 0.168 2 > 0.05$, 不显著; 复相关系数 R 为0.973 7, 说明该模型拟合程度良好, 试验误差小, 可以此模型来分析和预测超声提取甘草酸的工艺结果^[7]。

显著, x_3^2 不显著; 交互项 x_1x_3 显著, 其他交互项不显著; 表明各影响因素对于甘草酸提取率的影响不是

简单的线性关系。

表4 甘草酸超声提取回归模型系数的显著性检验结果

Table 4 Test result of significance for regression coefficient of ultrasonic extraction of glycyrrhizic acid						
系数项 Model tem	回归系数 Coefficient estimate	自由度 df	标准差 Standard error	95% 置信下限 95% CI low	95% 置信上限 95% CI high	P 值 Prob> F
Intercept	20.82	1	0.096	20.60	21.05	
x ₁	-0.43	1	0.076	-0.61	-0.25	0.0008
x ₂	0.25	1	0.076	0.073	0.43	0.0126
x ₃	0.26	1	0.076	0.085	0.45	0.0103
x ₁ x ₂	-0.25	1	0.11	-0.50	0.005	0.0535
x ₁ x ₃	0.34	1	0.11	0.083	0.59	0.0166
x ₂ x ₃	0.082	1	0.11	-0.17	0.34	0.4692
x ₁ ²	-1.18	1	0.11	-1.43	-0.93	<0.0001
x ₂ ²	-0.75	1	0.11	-1.00	-0.50	0.0002
x ₃ ²	-0.084	1	0.11	-0.33	0.16	0.4478

2.2.4 甘草酸超声提取工艺的响应曲面分析与优化 模型(3)的响应曲面及其等高线见图4~6。3组图直观地反映了各因素对响应值的影响^[8-9]。

当液固比为9 mL/g时,浸泡时间和超声时间对甘草酸提取率的影响见图4。由图4可知,在浸泡时间为120~150 min和超声时间为30~50 min的范围内,甘草酸提取率不断增加,之后随着浸泡时间和超声时间延长,甘草酸提取率有下降的趋势。

当超声时间为45 min时,浸泡时间和液固比对甘草酸提取率的影响见图5。从图5可以看出,浸泡时间对甘草酸提取率的影响非常显著,表现为曲线较陡,当浸泡时间处于150 min左右时,甘草酸提取

率出现极值。
当浸泡时间为150 min时,超声时间和液固比对甘草酸提取率的影响结果见图6。从图6可以看出,超声时间处于45 min左右时,甘草酸提取率出现极值。

等高线的形状可反映出交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。由图5等高线可以看出,浸泡时间(Z_1)和液固比(Z_3)之间的交互作用显著,表现为等高线呈椭圆形。相比较而言,浸泡时间(Z_1)和超声时间(Z_2)之间,以及超声时间(Z_2)和液固比(Z_3)之间的交互作用较小。

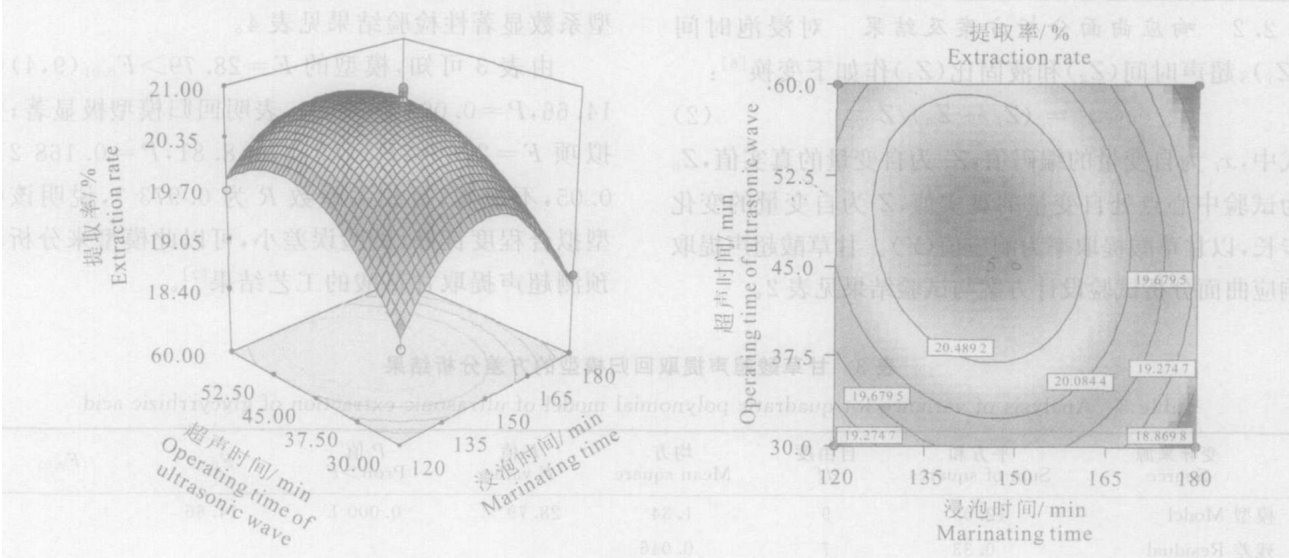


图4 甘草酸超声提取过程中浸泡时间、超声时间及其交互作用对提取率影响的响应曲面和等高线

Fig 4 Response surface plot and contour plot of the effect of marinating time and operating time of ultrasonic wave and their mutual interactions on the extraction rate in ultrasonic extraction process of glycyrrhizic acid

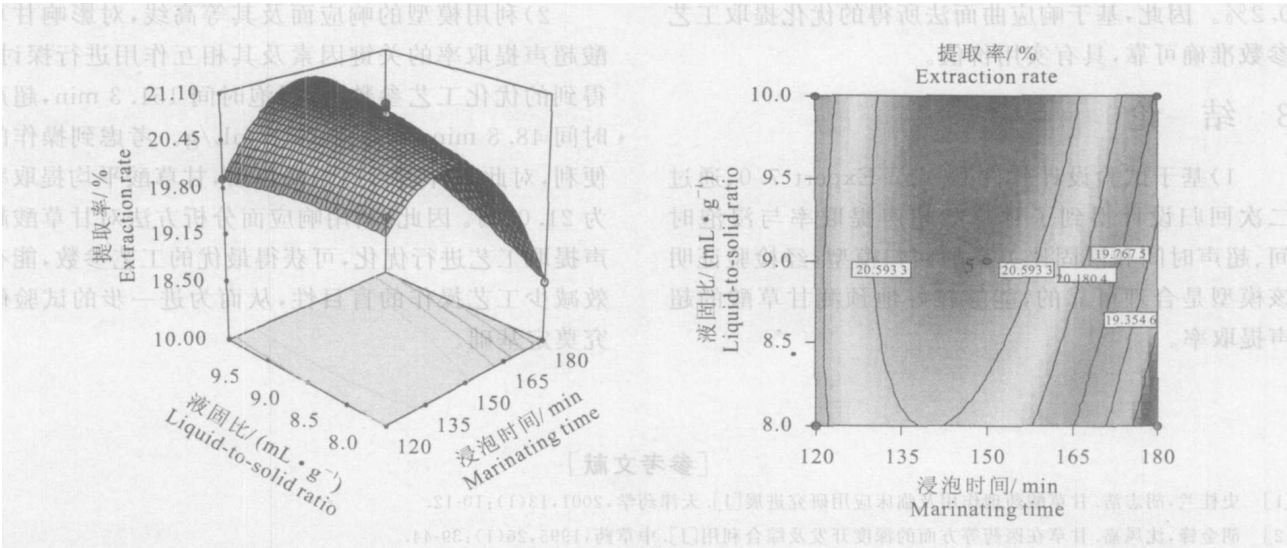


图5 甘草酸超声提取过程中浸泡时间、液固比及其交互作用对提取率影响的响应曲面和等高线

Fig 5 Response surface plot and contour plot of the effect of marinating time and liquid-to-solid ratio and their mutual interactions on the extraction rate in ultrasonic extraction process of glycyrrhizic acid

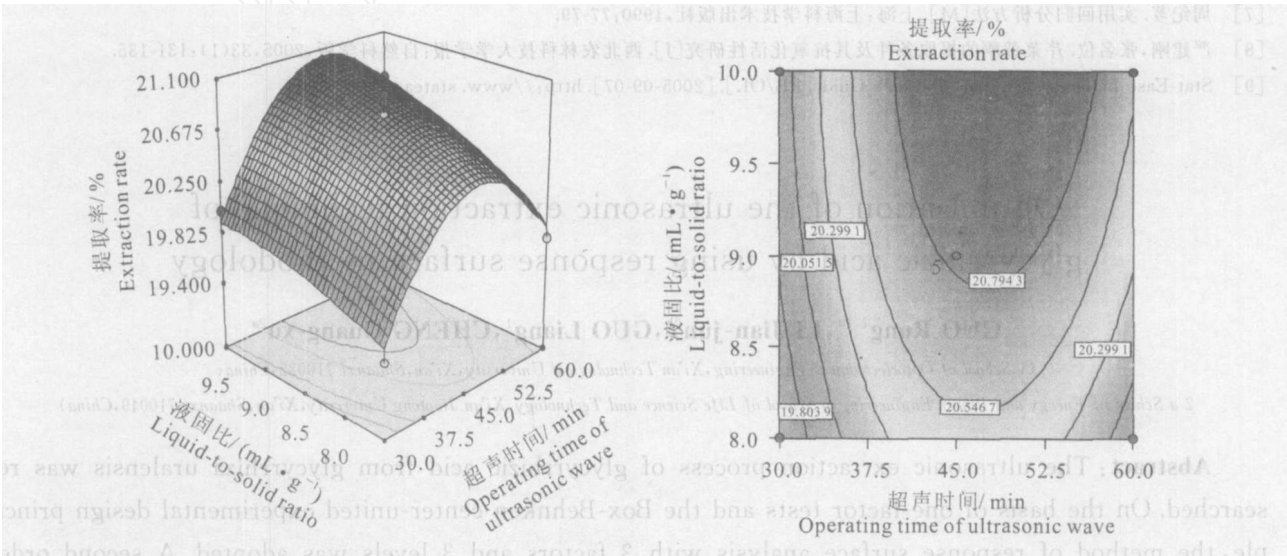


图6 甘草酸超声提取过程中超声时间、液固比及其交互作用对提取率影响的响应曲面和等高线

Fig 6 Response surface plot and contour plot of the effect of operating time of ultrasonic wave and liquid-to-solid ratio and their mutual interactions on the extraction rate in ultrasonic extraction process of glycyrrhizic acid

比较3组图可知, 浸泡时间对甘草酸提取率的影响最为显著, 表现为曲线较陡, 浸泡时间最佳值在150 min 附近; 而液固比和超声时间对甘草酸提取率的影响次之, 表现为曲线较平滑, 且随其数值的增加或减少, 响应值变化较小。

为进一步确定最佳点, 对模型(3)取一阶偏导等于零, 得到:

$$- 2.36x_1 - 0.25x_2 + 0.34x_3 = 0.43 \quad (4)$$

$$- 0.25x_1 - 1.5x_2 + 0.083x_3 = - 0.25 \quad (5)$$

$$0.34x_1 + 0.082x_2 - 0.168x_3 = - 0.26 \quad (6)$$

解方程得到: $x_1 = 0.0447$, $x_2 = 0.2556$, $x_3 = 1.2678$ 。变换为真实值可得: 浸泡时间为151.3 min, 超声时间为48.8 min, 液固比为10.2 mL/g, 在此条件下, 甘草酸提取率理论值可达到21.10%。

为检验响应曲面法所得结果的可靠性, 采用上述优化提取条件进行甘草酸的超声提取, 考虑到实际操作的便利, 将提取工艺参数修正为: 浸泡时间为150 min, 超声时间为50 min, 液固比为10 mL/g, 在此条件下提取5次, 实际测得的平均提取率为21.06%, 与理论预测值相比, 其相对误差约为

0.2%。因此,基于响应曲面法所得的优化提取工艺参数准确可靠,具有实用价值。

3 结 论

1) 基于试验设计软件Design-Expert 7.0,通过二次回归设计得到了甘草酸超声提取率与浸泡时间、超声时间和液固比关系的回归模型,经检验证明该模型是合理可靠的,能够较好地预测甘草酸的超声提取率。

2) 利用模型的响应面及其等高线,对影响甘草酸超声提取率的关键因素及其相互作用进行探讨,得到的优化工艺参数为:浸泡时间151.3 min,超声时间48.8 min,液固比10.2 mL/g。考虑到操作的便利,对此条件进行适当修正后,甘草酸平均提取率为21.06%。因此,利用响应面分析方法对甘草酸超声提取工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,能有效减少工艺操作的盲目性,从而为进一步的试验研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] 史桂兰,胡志浩.甘草酸药理作用及临床应用研究进展[J].天津药学,2001,13(1):10-12
- [2] 胡金锋,沈凤嘉.甘草在医药等方面的深度开发及综合利用[J].中草药,1995,26(1):39-44
- [3] 慕运动.响应面方法及其在食品工业中的应用[J].郑州工程学院学报,2001,22(3):91-94
- [4] 潘学军,刘会洲.从甘草中提取甘草酸不同提取方法的比较[J].过程工程学报,2001,1(1):102-106
- [5] 谢 果,霍丹群.超声波法从甘草中提取甘草酸的工艺研究[J].食品工业科技,2002,23(4):42-44
- [6] Douglas C Montgomery. 实验设计与分析[M].北京:中国统计出版社,1998:589-592
- [7] 周纪芑.实用回归分析方法[M].上海:上海科学技术出版社,1990:77-79
- [8] 严建刚,张名位.芹菜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(1):131-135
- [9] Stat-Ease Inc Design-Expert 7 User's Guide[EB/OL]. [2005-09-07]. <http://www.statease.com>.

Optimization of the ultrasonic extraction technique of glycyrrhizic acid by using response surface methodology

GUO Rong^{1,2a}, LI Jian-jun^{2b}, GUO Liang¹, CHENG Guang-xu^{2a}

(1 School of Optoelectronic Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an, Shaanxi 710032, China;

2 a School of Energy and Power Engineering; b School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

Abstract: The ultrasonic extraction process of glycyrrhizic acid from *glycyrrhiza uralensis* was researched. On the basis of one-factor tests and the Box-Behnken center-joined experimental design principle, the method of response surface analysis with 3 factors and 3 levels was adopted. A second order quadratic equation for ultrasonic extraction of glycyrrhizic acid was built. Response surface and contour were graphed with the extraction rate of glycyrrhizic acid as the response value. Based on the analysis of the response surface plots and their corresponding contour plots, effects of marinating time, operating time of ultrasonic wave, and liquid-to-solid ratio were explored. By using this new method, the optimum extraction condition was obtained as follows: marinating time 151.3 min, operating time of ultrasonic wave 48.8 min, and liquid-to-solid ratio 10.2 mL/g. Under the optimized condition, the average extraction rate of glycyrrhizic acid was 21.06%.

Key words: glycyrrhizic acid; ultrasonic extraction; response surface methodology (RSM); optimization of extraction condition