

## 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺

田彦芳, 万海同, 朱紫焯, 郑平平, 虞立, 何昱\*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

**摘要:** 目的 联用熵权法、Plackett-Burman 设计 (PBD) 与 Box-Behnken 设计 (BBD), 多目标筛选甘草黄酮类成分的纯化工艺。方法 在构建甘草 HPLC 指纹图谱的基础上, 以 6 种黄酮类成分甘草素葡萄糖芹糖苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草素葡萄糖芹糖苷、异甘草苷和新异甘草苷的回收率为检测指标, 筛选 12 种大孔树脂中最佳型号。熵权法赋予 6 种黄酮类成分的回收率客观权重, 计算综合指标作为评价标准, 运用 PBD 筛选显著性影响因素, 结合 BBD 优选大孔树脂富集甘草黄酮的最佳工艺参数。结果 ADS-7 型大孔树脂对甘草中 6 种黄酮类成分的富集选择性最高。最佳工艺参数为上样 pH 值 4.5, 上样质量浓度 0.20 g/mL, 上样量 1.0 g/g, 上样体积流量 0.6 mL/min, 6.7 BV 的 83%乙醇以 1.0 mL/min 体积流量洗脱。纯化后 6 种黄酮类成分的回收率为 86%~97%, 模型综合评价预测值为 93.32%, 实验所得综合评价为 93.05%, 相对偏差 1.17%。结论 联用熵权法、PBD 与 BBD 筛选甘草黄酮类成分纯化工艺是科学可行的, 可为实现中药有效成分分离纯化的多目标寻优提供借鉴。

**关键词:** 甘草黄酮类成分; 大孔树脂; 熵权法; 多目标优化; Plackett-Burman 设计; Box-behnken 设计; 纯化工艺

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)07-1118-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.010

## Multi-objective optimization of purification technology for licorice flavonoids based on entropy-weight method

TIAN Yan-fang, WAN Hai-tong, ZHU Zi-ye, ZHENG Ping-ping, YU Li, HE Yu

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

**Abstract: Objective** To multi-objectively optimize the purification process parameters of licorice flavonoids using entropy-weight method, Plackett-Burman design (PBD), and Box-Behnken design (BBD). **Methods** On the basis of HPLC fingerprints of licorice, the macroporous resin type was chosen using the recovery rates of six components (liquiritin apioside, liquiritigenin, isoliquiritin apioside, licuraside, isoliquiritin, and neoisoliquiritin) as detection indexes. Weights of the recovery rates of six components were determined by entropy-weight method, in order to obtain the comprehensive index. The significantly influencing factors were firstly evaluated by PBD, then purification conditions were optimized by BBD. **Results** ADS-7 type resin showed a high selectivity for six components. The optimized purification technology was as follows: pH value was 4.5, sample concentration was 0.20 g/mL, ratio of sample to resin was 1.0 g/g, flow rate was 0.6 mL/min, elution dosage was 6.7 BV, ethanol concentration was 83% of eluting agent, and elution rate was 1.0 mL/min. Under the conditions, the recovery rates of six components were 86%—97%, the theoretical and actual comprehensive indexes were 93.32% and 93.05%, respectively, with a relative error of 1.17%. **Conclusion** Entropy-weight method combined with PBD and BBD-RSM used to optimize the purification process for the licorice flavonoids in this study is scientific and feasible, providing a new reference to realize the multi-objective optimization of the purification technology for active constituents in Chinese materia medica.

**Key words:** licorice flavonoids; macroporous resin; entropy-weight method; multi-objective optimization; Plackett-Burman design; Box-Behnken design; purification process

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573868); 浙江省自然科学基金资助项目 (LR13H270001, LZ14H270001); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目

作者简介: 田彦芳 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 17826865216 E-mail: 1220068839@qq.com

\*通信作者 何昱, 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药活性成分分析、质量评价及新药开发研究。

Tel: (0571)86613657 E-mail: heyu0923@sina.com

甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药等功效<sup>[1]</sup>, 黄酮类化合物是甘草的主要有效部位之一, 具有明显的抗肿瘤、抗溃疡、解痉、抗菌、抗炎、调血脂、镇痛和雌激素样作用<sup>[2]</sup>, 随着药理活性研究的不断深入, 甘草黄酮类成分的市场需求日益增加。

目前已有文献报道以单一成分(甘草苷、异甘草素等)或总黄酮的量为指标筛选大孔树脂纯化甘草黄酮的工艺研究<sup>[3-6]</sup>, 以单一成分为指标无法体现中药多组分、多靶点的特点, 而以总黄酮为指标定量测定多采用紫外分光光度法, 因特异性差, 不同黄酮类化合物吸收系数不同, 容易导致实验结果偏差<sup>[7]</sup>。本实验以甘草指纹图谱中6种黄酮类成分回收率为检测指标, 从12种大孔树脂中, 筛选出对甘草黄酮类成分具有选择性富集型号。熵权法赋予6种黄酮成分的回收率客观权重, 根据权重得出综合指标。采用 Plackett-Burman 设计(PBD)、Box-Behnken 设计(BBD)效应面分析等数学模型, 筛选出显著影响因素并确定最佳水平组合, 多目标优化甘草黄酮类成分的纯化工艺, 为甘草药效物质基础研究及作用机制研究奠定基础。同时, 多种数学模型结合运用于有效成分的多目标富集也可为中药成分的提取分离提供借鉴与参考。

## 1 仪器与材料

Agilent1260 Infinity 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent Technologies; ABSCIEX 4500 QTRAP 质谱仪, 美国 ABSCIEX; SHA-A 型恒温数显水浴振荡器, 上海双舜实验发展有限公司; KQ-250E 型数控超声清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; RE-52A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生物仪器厂; Mettler AL104 型万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器公司; FE20 pH 计, 梅特勒-托利多仪器公司; 玻璃色谱柱, 内径 1.5 cm, 杭州汇普化工仪器有限公司。

甘草(批号 150319)购自浙江中医药大学名中医馆, 由浙江中医药大学资源与鉴定教研室陈锡林副教授鉴定为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎; 甘草苷对照品(批号 20120131, 质量分数 $\geq 98\%$ )、甘草酸对照品(批号 20120910, 质量分数 $\geq 98\%$ )购自上海源叶生物科技有限公司; 大孔树脂 D101、AB-8、NKA-9、HPD100、HPD300、HPD400、HPD500、HPD722、

ADS-7、ADS-17、X-5、D301 购自河北省沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 美国 Tedia 公司; 水为 Millipore 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 甘草提取液的制备

取甘草药材 200 g, 50 °C 干燥后粉碎过 40 目筛, 按固液比 1:10 加入 70%乙醇, 在 25 °C 下超声提取 3 次, 提取时间分别为 1.0、1.0、0.5 h, 合并提取液, 减压浓缩至无醇味后用水稀释至 0.10 g/mL, 离心取上清液, 即得<sup>[6,8]</sup>。

### 2.2 指纹图谱的建立

**2.2.1 色谱条件** Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 线性梯度洗脱: 0~10 min, 15%~25%乙腈; 10~17 min, 25%~30%乙腈; 17~25 min, 30%~35%乙腈; 25~45 min, 35%~60%乙腈; 45~55 min, 60%~90%乙腈; 切换波长检测: 276 nm(0~10 min)、360 nm(10~25 min)、252 nm(25~55 min); 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

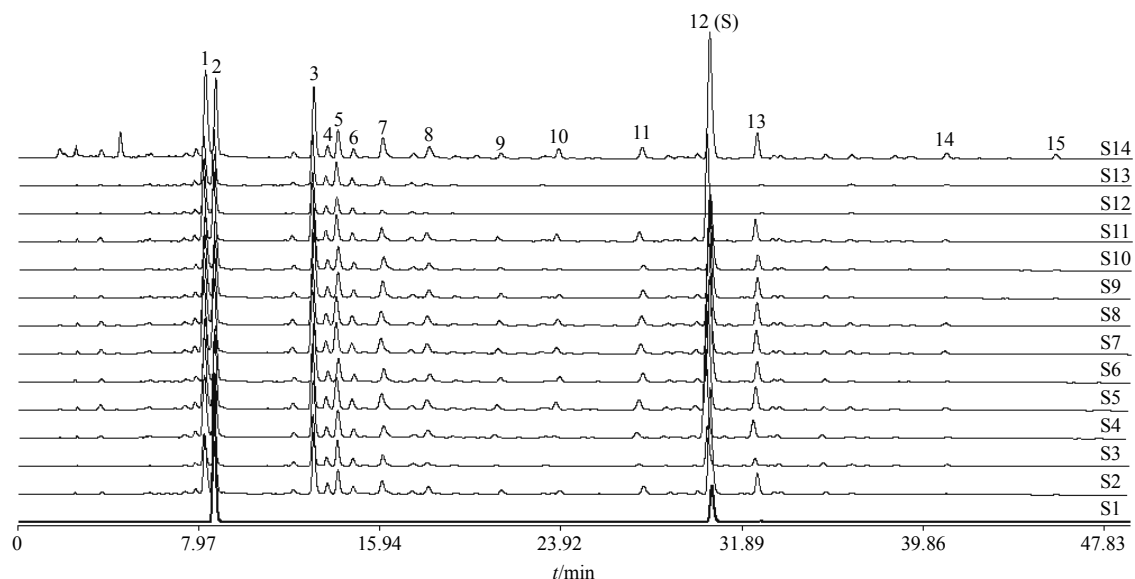
**2.2.2 质谱条件** 电离源: 电喷雾离子源(ESI); 检测方式: 负离子扫描模式; 扫描范围:  $m/z$  200~1 000; 离子源电压: -4 500 V; 温度 650 °C; 干燥气体为氮气; 气帘气 172.40 kPa(25 psi); 喷雾气 448.24 kPa(65 psi); 辅助加热气 448.24 kPa(65 psi)。

**2.2.3 药材指纹图谱的建立** 精密量取甘草提取液 1.0 mL, 加纯水定容 25 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.2.1”项色谱条件记录色谱图, 作为甘草的指纹图谱(图 1)。HPLC-ESI-MS 获取质谱信息, 通过与文献报道的甘草中化合物的相对分子质量比对、质谱规律<sup>[9-12]</sup>及结合部分对照品分析, 共推测出 10 个色谱峰的化合物归属, 其中 1~6 号色谱峰对应化合物为甘草黄酮类成分。

**2.2.4 对照峰的选择** 甘草酸在甘草中的量较高, 为甘草的主要活性成分之一, 是检验甘草品质的指标性成分。在色谱洗脱过程中, 甘草酸的色谱峰较为明显, 峰位较居中, 在图谱中分离良好, 故本实验选择甘草酸作为对照峰。

**2.2.5 精密度考察** 取同一批药材提取液, 连续进样 6 次, 以甘草酸的保留时间和峰面积为参照, 计算图谱中 15 个主要峰的相对保留时间 RSD<1.0%, 相对峰面积 RSD<3.0%, 说明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性考察** 取同一批次药材提取液, 分别



1-甘草素葡萄糖苷 2-甘草苷 3-芹糖异甘草苷 4-异甘草素葡萄糖苷 5-异甘草苷 6-新异甘草苷 8-刺芒柄花素  
11-甘草皂苷 G2 12-甘草酸 13-乌拉尔甘草皂苷乙  
1-liquiritin apioside 2-liquiritigenin 3-isoliquiritin apioside 4-licuraside 5-isoliquiritin 6-neoisoliquiritin 8-formononetin  
11-glycyrrhizin G2 12-glycyrrhizic acid 13-uralsaponin B

图 1 混合对照品 HPLC 图 (S1) 和甘草提取物 (S14) 以及经 D301 型 (S2)、ADS-7 型 (S3)、AB-8 型 (S4)、ADS-17 型 (S5)、HPD500 型 (S6)、HPD722 型 (S7)、HPD100 型 (S8)、HPD300 型 (S9)、HPD400 型 (S10)、NKA-9 型 (S11)、X-5 型 (S12)、D101 型 (S13) 大孔树脂纯化后样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (S1) and licorice extract fingerprints (S14) and D301 (S2), ADS-7 (S3), AB-8 (S4), ADS-17 (S5), HPD500 (S6), HPD722 (S7), HPD100 (S8), HPD300 (S9), HPD400 (S10), NKA-9 (S11), X-5 (S12), and D101 (S13) macroporous resin purified HPLC fingerprints

在 0、2、4、6、10、12 h 进样，以甘草酸的保留时间和峰面积为参照，计算图谱中 15 个主要峰的相对保留时间 RSD<1.0%，相对峰面积 RSD<3.0%，说明样品在 12 h 内稳定性良好。

**2.2.7 重复性考察** 取同一批次药材粉末 6 份，平行操作制备甘草提取液，以甘草酸的保留时间和峰面积为参照，计算图谱中 15 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD<1.0%，相对峰面积 RSD<3.0%，证明方法重复性良好。

### 2.3 树脂型号筛选

称取预处理<sup>[13]</sup>后的 12 种树脂 3.0 g，分别装入 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入质量浓度为 0.10 g/mL 的甘草提取液 30 mL，在 25 °C 恒温水浴摇床中，以 100 r/min 转速振摇 24 h 后真空抽滤，4 BV 纯水冲洗，吸干树脂表面的水分，倒回锥形瓶内，精密加入 70%乙醇 30 mL，振摇 24 h 后真空抽滤，洗脱液定容至 50 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，依照“2.2.1”项下色谱条件测定，依据色谱峰面积，计算 10 种主要成分的回收率，各成分均以加入甘草提取液的总量视为 100%，采用相应的峰面积之比计算

回收率。回收率按照公式  $Q=S/S_0$  ( $S$  为乙醇洗脱液吸收峰面积， $S_0$  为甘草提取液吸收峰面积， $Q$  为成分回收率) 计算<sup>[14]</sup>。

由表 1 可知，X-5 及 HPD100 型树脂对甘草提取液中 6 种黄酮类成分的回收率较大，但是目标产物的质量分数较低，故分别采用 10%、30%、50% 乙醇对吸附饱和后的 X-5 及 HPD-100 型树脂进行洗脱，考察对目标成分的纯化效果，结果见表 2。

如表 2 所示，X-5 及 HPD-100 型树脂吸附完全后，用不同体积分数的乙醇洗脱，随乙醇体积分数的降低目标成分回收率降低，且质量分数不及经 ADS-7 型树脂处理后的质量分数。ADS-7 型大孔树脂对甘草中甘草素葡萄糖苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草素葡萄糖苷、异甘草苷和新异甘草苷 6 个成分回收率较高，并且有较强的富集选择性，对其他成分几乎不吸附，以甘草苷计相当于每克树脂吸附甘草药材 0.8 g，确定以 ADS-7 大孔树脂为纯化甘草黄酮的材料。

### 2.4 单因素试验

**2.4.1 上样液 pH 值的考察** 称取 3.0 g 预处理好的

表 1 树脂型号对 10 种主要成分回收率的影响

Table 1 Effect of resin type on recovery rates of 10 main components

树脂型号	回收率/%									
	甘草素葡萄 糖芹糖苷	甘草苷	芹糖异 甘草苷	异甘草素葡萄 糖芹菜苷	异甘草苷	新异甘 草苷	刺芒柄 花素	甘草皂 苷 G2	甘草酸	乌拉尔甘 草皂苷乙
AB-8	73.97	71.78	89.09	90.98	86.50	81.65	60.43	78.67	84.15	84.36
D101	65.92	65.12	88.01	89.60	85.94	81.27	57.81	73.05	82.43	82.76
NKA-9	61.47	64.41	85.60	87.13	83.39	77.78	49.48	37.35	59.63	61.08
HPD400	71.12	70.46	88.48	89.68	86.56	76.84	51.62	68.62	79.84	80.38
X-5	94.48	93.32	94.56	94.40	93.44	96.45	91.06	89.73	94.02	95.06
D301	71.10	74.29	67.99	74.28	58.14	35.19	0	0	0	0
ADS-17	42.25	53.06	79.91	80.31	86.77	87.40	42.79	11.67	32.61	33.59
ADS-7	75.64	79.78	81.05	82.82	78.29	78.84	0	0	0	0
HPD500	74.15	78.12	89.13	89.82	88.61	91.04	74.63	51.52	70.05	68.88
HPD722	88.85	88.78	97.50	94.24	95.61	93.63	96.50	86.79	90.02	87.74
HPD300	86.14	87.20	92.21	96.52	93.49	64.08	90.85	88.89	88.88	90.60
HPD100	89.59	89.87	99.62	98.37	97.01	99.07	95.32	90.16	91.36	91.87

表 2 X-5 及 HPD-100 型树脂纯化时洗脱剂体积分数对主要成分回收率的影响

Table 2 Effect of eluent concentration on recovery rates of main components with X-5 and HPD-100 macroporous resins

乙醇/%	X-5 树脂回收率/%									
	甘草素葡萄 糖芹糖苷	甘草苷	芹糖异 甘草苷	异甘草素葡萄 糖芹菜苷	异甘草苷	新异甘 草苷	刺芒柄 花素	甘草皂 苷 G2	甘草酸	乌拉尔甘 草皂苷乙
10	16.74	17.10	2.87	0	0	0	0	19.36	9.73	10.85
30	55.87	52.85	31.51	27.13	26.14	23.06	14.78	27.92	19.51	20.60
50	81.22	79.93	89.54	91.66	86.68	89.90	61.43	53.42	54.45	55.10
乙醇/%	HPD-100 树脂回收率/%									
	甘草素葡萄 糖芹糖苷	甘草苷	芹糖异 甘草苷	异甘草素葡萄 糖芹菜苷	异甘草苷	新异甘 草苷	刺芒柄 花素	甘草皂 苷 G2	甘草酸	乌拉尔甘 草皂苷乙
10	9.02	3.66	0	0	0	0	0	19.82	9.97	10.73
30	54.32	51.12	29.54	25.06	23.91	21.53	10.97	27.18	18.63	19.42
50	73.91	72.73	68.81	68.52	61.54	61.57	47.68	48.23	44.62	43.60

ADS-7 型大孔树脂，湿法装柱。甘草提取液配制成 0.10 g/mL，用稀氨水或稀盐酸调节上样药液的 pH 值为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5，控制上样体积流量 1.0 mL/min，精密加入甘草提取液 30 mL，待吸附完全后，用 4 BV 水以 1.0 mL/min 的体积流量进行水洗除杂。接着用 8 BV 的 70%乙醇以 1.0 mL/min 的体积流量洗脱，收集洗脱液，70%乙醇定容至 50 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，依照“2.2.1”项下色谱条件测定，计算 6 种黄酮类成分的回收率。

在 MatlabR2009a 平台下，根据熵权法<sup>[15-16]</sup>计算权重的过程编写程序，为 6 种黄酮类成分的回收率赋予相应权重系数 (W)，在 j 个评价指标，i 个被评价方案的评估问题中，熵权法计算第 j 个指标的权重系数 (W<sub>j</sub>)。

(1) 计算第 j 个指标下第 i 个对象的指标值的

比重 (P<sub>ij</sub>):

$$P_{ij} = r_{ij} / \sum_{i=1}^m r_{ij}$$

(2) 计算第 j 个指标的 e<sub>j</sub> 熵值:

$$e_j = -k \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij}$$

其中, k=1/lnm

(3) 计算 W<sub>j</sub>:

$$W_j = (1 - e_j) / \sum_{j=1}^n (1 - e_j)$$

综合指标 (z) 根据公式计算:

$$z = \sum_{j=1}^n Q_j \times W_j, \quad i=5 \dots, j=1, 2, \dots, 6$$

Q<sub>j</sub> 为 6 种黄酮类成分的回收率, W<sub>j</sub> 为 6 种黄酮类成分的权重系数

pH 值为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 所对应的  $z$  值分别为 88.90%、93.46%、89.54%、87.95%、81.38%，当上样液 pH 值为 4.5 时， $z$  值最大，故选择上样液 pH 值 4.5。

**2.4.2 上样液质量浓度的考察** 将甘草提取液制备成质量浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 g/mL 的溶液，调节 pH 值至 4.5，按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样，其他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同上样质量浓度对应的  $z$  值， $z$  值分别为 86.43%、85.67%、88.46%、92.77%、80.61%。当上样液质量浓度为 0.20 g/mL 时， $z$  值最大，故确定上样液质量浓度 0.20 g/mL。

**2.4.3 上样量的考察** 准确称取预处理树脂 3.0 g，装入色谱柱中，分别按照药材-树脂比为 0.8:1、1.0:1、1.2:1、1.4:1、1.6:1 的比例精确加入调节 pH 值至 4.5 且质量浓度为 0.20 g/mL 的甘草提取液，其他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同上样量对应的  $z$  值， $z$  值分别为 96.36%、89.94%、87.49%、82.40%、80.48%，结果当上样量为 1.0:1 时，部分目标成分出现在过柱液中，且随着上样量的增加，泄露率增加。不同上样量处理分别接收完 8 BV 洗脱液后，续接液进行盐酸-镁粉反应，均为阴性，故在洗脱基本完全的情况下，随着上样量的增加， $z$  值下降，可能是由于树脂发生泄漏造成的，综合考虑各成分的回收率和较高的上样量，优选上样量为 1.0:1。

**2.4.4 上样体积分数的考察** 将甘草提取液制备成 0.20 g/mL 的溶液，调节 pH 值至 4.5，按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样，上样体积流量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min，其他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同上样体积流量对应的  $z$  值， $z$  值分别为 93.59%、81.94%、75.22%、63.28、57.13%， $z$  值随上样体积分数的增加而减小，选择上样体积流量 0.5 mL/min。

**2.4.5 洗脱液乙醇体积分数的考察** 将甘草提取液制备成 0.20 g/mL 的溶液，调节 pH 值至 4.5，按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样，上样体积流量为 0.50 mL/min，待吸附完全后，用 4 BV 水以 1.0 mL/min 的体积流量进行水洗除杂，分别用体积分数为 10%、30%、50%、70%、90%乙醇进行洗脱，其

他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同洗脱液对应的  $z$  值， $z$  值分别为 6.28%、26.51%、77.11%、93.45%、88.27%，当洗脱液体积分数为 70%时， $z$  值最大。

**2.4.6 洗脱剂用量的考察** 将甘草提取液制备成 0.20 g/mL 的溶液，调节 pH 值至 4.5，按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样，上样体积流量为 0.5 mL/min，待吸附完全后，用 4 BV 水以 1.0 mL/min 的体积流量进行水洗除杂。用 70%乙醇分别以 2、4、6、8、10 BV 洗脱用量进行洗脱，其他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同洗脱剂用量对应的  $z$  值， $z$  值分别为 60.03%、76.32%、88.41%、89.85%、90.43%，当洗脱剂用量为 6 BV 时， $z$  值的变化趋于平缓，为了节约能源并提高试验效率，故选用 6 BV 的洗脱剂用量。

**2.4.7 洗脱体积分数的考察** 将甘草提取液制备成 0.20 g/mL 的溶液，调节 pH 值至 4.5，按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样，上样体积流量分别为 0.5 mL/min，待吸附完全后，用 4 BV 水以 1.0 mL/min 的体积流量进行水洗除杂，以 6 BV 洗脱剂体积分数为 70%乙醇进行洗脱，洗脱体积流量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min，其他同“2.4.1”项下工艺参数操作，计算 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$ ，通过计算不同洗脱体积分数对应的  $z$  值， $z$  值分别为 83.69%、85.26%、79.84%、78.55%、75.94%，当洗脱体积分数为 1.0 mL/min 时， $z$  值最大。

## 2.5 PBD 试验筛选主要影响因素

**2.5.1 因素及水平范围** 选用 PBD 试验<sup>[17-18]</sup>，考察影响甘草黄酮类成分回收率的显著性因素。选取 7 个试验因素：上样液 pH 值 (A)、上样液质量浓度 (B)、上样量 (C)、上样体积流量 (D)、洗脱液乙醇体积分数 (E)、洗脱体积 (F)、洗脱液体积流量 (G) 以及 4 个空白因素 (H、J、K、L)，共计 12 组试验。根据单因素试验结果及各因素的实际情况，确定每个因素高、低 2 个水平，PBD 试验因素及水平见表 3。

**2.5.2 PBD 试验与结果** 7 个因素与 4 个空白因素，共 12 组试验，按表 3 进行试验，每组试验重复做 3 次。记录色谱图，计算 6 种黄酮类成分的回收率。在 MatlabR2009a 平台下，熵权法赋予 6 种黄酮类成分的回收率相应权重，甘草素葡萄糖芹糖苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草素葡萄糖芹糖苷、异甘

草昔和新异甘草昔的  $W$  分别为 0.052 3、0.044 7、0.154 0、0.188 1、0.274 1、0.286 7，将 6 种黄酮类成分的回收率及  $W$  代入  $z$  公式中，求  $z$  值。PBD 试验及结果见表 3。

运用 Design expert 8.0 软件对各因素进行显著性分析 ( $P < 0.05$  的因素为显著影响因素)，结果显示

(表 4) 所得的回归方程模型达到显著性水平 ( $P = 0.043 7$ )，决定系数  $R^2 = 0.920 3$ ，表明 92.03% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释。各因素对  $z$  值影响的显著性顺序为  $E > F > D > B > G > A > C$ ，其中 E、F、D 对综合指标的影响具有显著性差异，其他因素无显著性影响。

表 3 PBD 试验及结果 ( $n = 3$ )

Table 3 Test and results of PBD ( $n = 3$ )

试验号	A	B/(g·mL <sup>-1</sup> )	C/(g·g <sup>-1</sup> )	D/(mL·min <sup>-1</sup> )	E/%	F/BV	G/(mL·min <sup>-1</sup> )	H	J	K	L	z/%
1	1 (5.5)	-1 (0.15)	-1 (0.8 : 1)	-1 (0.5)	1 (90)	1 (8)	1 (1.5)	-	-	-	-	82.08
2	-1 (3.5)	1 (0.25)	1 (1.2 : 1)	1 (1.5)	-1 (50)	-1 (4)	-1 (0.5)	-	-	-	-	32.29
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-	-	-	-	98.52
4	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-	-	-	-	58.85
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-	-	-	-	67.17
6	1	1	-1	1	1	1	-1	-	-	-	-	67.18
7	1	1	1	-1	-1	-1	1	-	-	-	-	49.47
8	1	-1	1	1	-1	1	1	-	-	-	-	49.88
9	-1	1	1	-1	1	1	1	-	-	-	-	88.67
10	-1	1	-1	1	1	-1	1	-	-	-	-	63.64
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-	-	-	-	39.75
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-	-	-	-	70.45

表 4 PBD 试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance for PBD results

因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	因素	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.39	7	0.55	6.60	0.043 7	E	0.23	1	0.23	27.50	0.006 3
A	$1.695 \times 10^{-4}$	1	$1.695 \times 10^{-3}$	0.02	0.894 0	F	0.082	1	0.082	9.74	0.035 5
B	$5.023 \times 10^{-3}$	1	$5.023 \times 10^{-3}$	0.60	0.482 7	G	$2.474 \times 10^{-3}$	1	$2.474 \times 10^{-3}$	0.29	0.616 3
C	$1.367 \times 10^{-4}$	1	$1.367 \times 10^{-4}$	0.02	0.904 7	残差	0.034	4	$8.407 \times 10^{-3}$		
D	0.067	1	0.067	8.02	0.047 3	总和	0.42	11			

2.6 BBD 试验方案及结果

选择上样液体积流量 ( $X_1$ )、洗脱液乙醇体积分数 ( $X_2$ ) 及洗脱液体积 ( $X_3$ ) 为自变量， $z$  为因变量，在 MatlabR2009a 平台下熵权法赋予 6 种黄酮类成分 (甘草素葡萄糖芹糖昔、甘草昔、芹糖异甘草昔、异甘草素葡萄糖芹菜昔、异甘草昔和新异甘草昔) 回收率相应权重， $W$  值分别为 0.031 6、0.032 0、0.174 4、0.196 7、0.276 2、0.289 1。代入  $z$  公式计算  $z$  值。通过 BBD-效应面法优化甘草黄酮类成分纯化工艺，采用 Design expert 8.0 软件对试验数据进行拟合分析，每个因素的低、中、高试验水平分别以 -1、0、1 进行编码，共 17 组试验，每组试验重复 3 次，因素水平及试验安排 (表 5)。动态纯化过程中各因素经回归拟合所得的方程为  $z = 0.79 - 0.070 X_1 + 0.15 X_2 + 0.063 X_3 - 0.023 X_1 X_2 - 1.450 \times 10^{-3}$

$$X_1 X_3 - 0.044 X_2 X_3 + 0.035 X_1^2 - 0.14 X_2^2 - 0.032 X_3^2。$$

由表 6 可知，在动态纯化过程中，由 BBD 所得的非线性方程模型  $P < 0.000 1$ ，表明该模型极显著，其校正决定系数  $R^2$  为 0.980 6，表明 98.06% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释，可靠度较高。失拟性检验不显著 ( $P = 0.213 6 > 0.05$ )，说明回归模型的拟合情况良好，能准确地预测实际情况。各项因素对于  $z$  的影响为  $X_2 > X_1 > X_3$ ，交互项中  $X_2 X_3$  相互作用对  $z$  影响显著。

由表 6 及图 2 可知， $X_2$  和  $X_3$  对  $z$  影响显著。随着  $X_3$  增大， $z$  先上升后趋于平缓，说明解吸基本完全。当  $X_3$  一定时，随着  $X_2$  增加， $z$  呈现上升趋势，说明高体积分数的乙醇有利于解吸。

2.7 最佳纯化工艺和验证试验结果

采用 Design-Expert 8.0 软件对各因素水平进行

表 5 BBD 试验及结果 (n = 3)

Table 5 Test and results of BBD (n = 3)

组别	$X_1/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_2/\%$	$X_3/\text{BV}$	$z/\%$	组别	$X_1/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_2/\%$	$X_3/\text{BV}$	$z/\%$	组别	$X_1/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_2/\%$	$X_3/\text{BV}$	$z/\%$
1	1.0 (0)	50 (-1)	8 (1)	58.84	7	1.5 (1)	90 (1)	6 (0)	74.76	13	1.0 (0)	70 (0)	6 (0)	79.85
2	1.0 (0)	50 (-1)	4 (-1)	34.21	8	1.0 (0)	70 (0)	6 (0)	81.77	14	1.0 (0)	90 (1)	4 (-1)	73.86
3	1.0 (0)	70 (0)	6 (0)	79.13	9	0.5 (-1)	90 (1)	6 (0)	90.21	15	1.0 (0)	70 (0)	6 (0)	75.12
4	0.5 (-1)	50 (-1)	6 (0)	57.97	10	0.5 (-1)	70 (0)	8 (1)	92.57	16	1.0 (0)	90 (1)	8 (1)	80.75
5	1.5 (1)	70 (0)	8 (1)	75.10	11	1.0 (0)	70 (0)	6 (0)	77.94	17	1.5 (1)	70 (0)	4 (-1)	65.76
6	1.5 (1)	50 (-1)	6 (0)	51.31	12	0.5 (-1)	70 (0)	4 (-1)	82.65					

表 6 响应面二次回归方程方差分析

Table 6 ANOVA for quadratic regression equations of response surface

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.340	9	0.038	39.41	<0.000 1	$X_1^2$	$5.100 \times 10^{-3}$	1	$5.100 \times 10^{-3}$	5.31	0.054 6
$X_1$	0.040	1	0.040	41.22	0.000 4	$X_2^2$	0.078	1	0.078	81.46	<0.000 1
$X_2$	0.170	1	0.170	178.42	<0.000 1	$X_3^2$	$4.372 \times 10^{-3}$	1	$4.372 \times 10^{-3}$	4.56	0.070 2
$X_3$	0.032	1	0.032	33.59	0.000 7	残差	$6.717 \times 10^{-3}$	7	$9.596 \times 10^{-4}$		
$X_1X_2$	$2.030 \times 10^{-3}$	1	$2.030 \times 10^{-3}$	2.12	0.189 2	失拟项	$4.286 \times 10^{-3}$	3	$1.429 \times 10^{-3}$	2.35	0.213 6
$X_1X_3$	$8.410 \times 10^{-6}$	1	$8.410 \times 10^{-6}$	$8.764 \times 10^{-3}$	0.928 0	净误差	$2.431 \times 10^{-3}$	4	$6.077 \times 10^{-4}$		
$X_2X_3$	$7.868 \times 10^{-3}$	1	$7.868 \times 10^{-3}$	8.20	0.024 2	总离差	0.350	16			

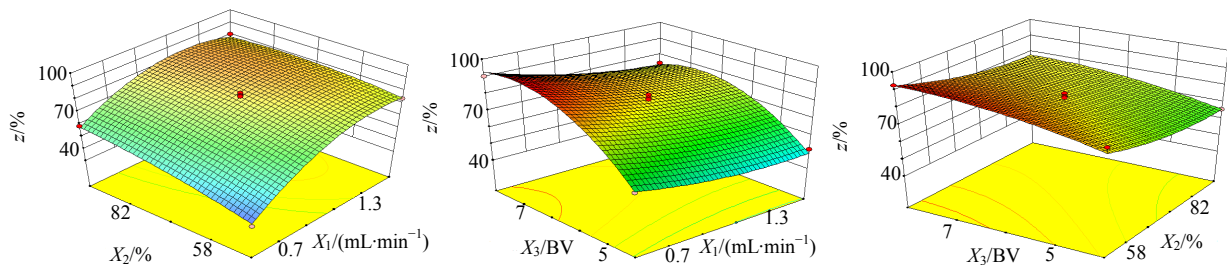


图 2  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  对  $z$  值的响应面图

Fig. 2 Response surface plot of  $X_1$ ,  $X_2$ , and  $X_3$  on  $z$  value

优化预测, 得最佳纯化工艺为上样液体积流量 0.57 mL/min, 洗脱剂乙醇体积分数 82.91%, 洗脱体积 6.65 BV, 最大预测  $z$  值为 93.32%。为验证该模型的稳定性, 需对预测的最佳工艺条件进行验证, 考虑到操作的可行性, 将最佳的工艺修正为上样液体积流量 0.6 mL/min, 洗脱剂乙醇体积分数 83.0%, 洗脱体积 6.70 BV。为验证该模型的稳定性, 按此工艺条件进行 3 次重复试验, 结果见表 7。由表 7 可知, 采用优选后的大孔树脂纯化条件, 甘草中 6

种黄酮类成分回收率为 86%~97%, 实际  $z$  平均值为 93.05%, 与预测  $z$  (93.32%) 相比, 实际  $z$  值与预测  $z$  值的偏差为 1.17%, 表明优选的工艺稳定可行。采用峰面积归一化法计算, 所得甘草中 6 种黄酮类成分总的质量分数为 81.59%。

本研究得到甘草黄酮类成分最佳纯化工艺参数为上样 pH 值 4.5, 上样液质量浓度 0.20 g/mL, 上样量 1.0 g/g, 上样液体积流量 0.6 mL/min, 6.7 BV 的 83%乙醇以 1.0 mL/min 体积流量洗脱。

表 7 3 批验证试验结果

Table 7 Results of three batches of verification

提取物	回收率/%						$z$ 值
	甘草素	葡萄糖芹糖苷	甘草苷	芹糖异甘草苷	异甘草素	葡萄糖芹糖苷	
1	92.39	97.14	94.39	92.04	93.98	93.05	93.45
2	89.73	94.77	95.27	91.86	94.34	94.36	93.89
3	91.07	94.07	94.29	86.46	92.47	93.19	91.82

### 3 讨论

针对甘草黄酮类成分,本研究选用非极性、弱极性、中极性和极性等性质的大孔树脂进行大孔树脂型号筛选,全面考察了不同类别大孔树脂对甘草黄酮类成分的适用性,实验结果稳定可靠。ADS-7型大孔树脂对甘草黄酮类物质组分有较强的选择性富集作用,相比其他型号树脂对甘草黄酮类成分的纯化性能具有明显优势。可能与ADS-7型树脂为强极性树脂,适合分离甘草中极性较大的黄酮类成分有关。通过筛选纯化工艺,可以得到质量分数为81.59%的甘草黄酮类成分,远远高于文献报道<sup>[19]</sup>的纯化结果,为甘草药效物质基础研究及作用机制研究奠定基础。

本实验以HPLC指纹图谱为评价手段精制甘草黄酮类物质组分,与以单一成分或总黄酮类成分为指标相比,能够更全面控制各成分在精制过程中的保留效果<sup>[15]</sup>。通过在MatlabRa2009平台下编程,引入熵权确定权重避免了主观确定权重的随意性,具有直观性好、灵活方便等特点<sup>[20]</sup>,提高实验数据的真实性和有效性,且数学模型计算相对简单,为实现中药有效成分多目标寻优提供了借鉴。

PBD试验可以通过较少的试验次数从众多影响因素中筛选出显著因素,避免在后期的优化试验中由于一些因素不显著而浪费资源<sup>[18]</sup>。根据单因素考察结果及各因素的实际情况,选取高、低2个水平,水平区间过小反映不出实际的因子影响能力,区间过大容易掩盖了其他因素的重要性。但PBD试验不能区分主效应与交互作用的影响,而BBD是基于3水平的2次式试验设计,充分考虑到研究因素与响应值之间、因素与因素之间的相互作用。该设计在中心点进行重复实验以提高实验精度,并且克服了传统正交试验只能给出最佳因素水平组合,无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷<sup>[21]</sup>。2种方法筛选出的影响因素的影响效果存在一定的差异,可能是因为洗脱液乙醇体积分数与洗脱体积的交互作用改变了洗脱体积对综合指标的影响效果。本实验联用熵权法、PBD与BBD多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺,由验证试验结果说明该方法是科学、合理、可行的,为组成成分复杂的中药材提取分离提供了参考。

#### 参考文献

[1] 中国药典[S].一部.2010.  
[2] 杨 绯,李淑红.大孔树脂柱分离甘草中总黄酮的研

究[J].食品与药品,2013,15(6):427-428.

- [3] 苏国林,刘 刚,刘育辰,等.甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J].中国现代中药,2011,13(10):48-51.
- [4] 赵文灏.异甘草素和甘草酸提取纯化工艺研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2005.
- [5] 付玉杰,刘晓娜,侯春莲,等.大孔吸附树脂分离纯化异甘草素的研究[J].离子交换与吸附,2006,22(4):315-322.
- [6] 康宜君,孙 萍,陈韩英,等.大孔树脂吸附解吸甘草黄酮效果研究[J].中国中医药信息杂志,2013,20(9):49-52.
- [7] 陈肖家,张庆文,季 晖,等.紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J].药物分析杂志,2007,27(5):625-630.
- [8] 李 红,李炳奇,刘 红,等.XDA-1型树脂对甘草黄酮吸附-解吸效果的研究[J].中成药,2007,29(6):830-833.
- [9] 陈佩东,周 习,丁安伟.炙甘草水煎液的HPLC-MS分析[J].中成药,2014,36(10):2115-2120.
- [10] 濮 润,王卫星,王京辉,等.甘草药材的快速HPLC指纹图谱分析[J].中国中药杂志,2008,33(22):2650-2652.
- [11] 孙 磊,靳 勇,刘晓晴,等.炙甘草药材指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2014,39(11):2056-2059.
- [12] 张 永,严安定,高 建.液质联用技术鉴定甘草提取物中的主要化学成分[J].中成药,2012,34(6):1111-1115.
- [13] 易海燕,何桂霞,欧阳文,等.大孔吸附树脂分离纯化藤茶总黄酮的研究[J].中草药,2011,42(1):74-77.
- [14] 李守信,展金祥,刘武占,等.基于指纹图谱的金银花物质组纯化工艺研究[J].中草药,2015,46(1):55-60.
- [15] 郑孟凯,何 昱,万海同,等.响应面法优化大孔树脂纯化麻黄总生物碱的工艺研究[J].中华中医药杂志,2015,30(6):141-147.
- [16] 盖玉权,何 昱,张宇燕,等.复方药物剂量配比多目标优化的方法学研究[J].微型机与应用,2012,31(7):92-95.
- [17] 伍振峰,陈伟良,王雅琪,等.丹参减压提取工艺优化及技术适宜性研究[J].中草药,2014,45(6):795-800.
- [18] 杨冀艳,胡 磊,许 杨.Plackett-Burman设计和响应面法优化荷叶总黄酮的提取工艺[J].食品科学,2009,30(6):29-33.
- [19] 吕子明,陈 凯,于向红,等.甘草总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):24-27.
- [20] 李四海,高建德,陈建国,等.熵权法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):56-58.
- [21] 王振忠,武文洁.野菊花总黄酮提取工艺的响应面设计优化[J].时珍国医国药,2007,18(3):648-650.