

基于裂区设计优化适用于多批次羊栖菜的提取工艺参数

陈 博^{1,4}, 王欣雨^{1,2#}, 艾玉廷⁵, 蒋剑平³, 龚行楚^{1,2*}

1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058
2. 浙江大学金华研究院, 浙江 金华 321016
3. 浙大城市学院附属医院, 浙江 杭州 310015
4. 浙江大学工程师学院, 浙江 杭州 310015
5. 浙江石原金牛生物科技有限公司, 浙江 温州 325799

摘 要: 目的 基于裂区实验设计优化羊栖菜 *Sargassum fusiforme* 的水提工艺参数, 得到适用于不同批次的稳健设计空间。方法 提出一种羊栖菜水提新工艺, 采用热水提取除去杂质, 煎煮提取获得较高质量分数的岩藻多糖和海藻酸。以热水提取温度、提取时间、液固比、热水提取次数、煎煮提取次数和药材批次为考察参数, 岩藻多糖产率、岩藻多糖质量分数、海藻酸产率和海藻酸质量分数为提取工艺评价指标, 利用 Design-Expert 13 软件, 裂区实验设计筛选关键工艺参数, 通过 Monte Carlo 算法计算出基于风险的设计空间, 优化工艺参数, 并进行验证。结果 优化所得条件为热水提取次数为 2, 煎煮提取次数为 3, 提取温度在 75~90 °C, 液固比在 15~21 mL/g, 提取时间在 22.43~30.00 min。结论 提出的水提新工艺避免使用了乙醇等有机溶剂, 绿色环保; 优化所得设计空间能够确保适用于研究范围内的多批次药材, 有利于获得更稳健的操作参数范围。

关键词: 羊栖菜; 岩藻多糖; 海藻酸; 裂区设计; 提取工艺; 稳健性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)17-5822-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.009

Optimizing extraction process parameters for multi-batch *Sargassum fusiforme* based on split-plot design

CHEN Bo^{1,4}, WANG Xinyu^{1,2}, AI Yuting⁵, JIANG Jianping³, GONG Xingchu^{1,2}

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
2. Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321016, China
3. Affiliated Hospital, Hangzhou City University, Hangzhou 310015, China
4. Polytechnic Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310015, China
5. Zhejiang Shiyuan Jinniu Biological Technology Co., Ltd., Wenzhou 325799, China

Abstract: Objective Based on split-plot experimental design, the process parameters of water extraction of Yangqicai (*Sargassum fusiforme*, SF) were optimized, and the robust design space for different batches was obtained. **Methods** This study proposed a novel water extraction process for SF where hot water was first used to eliminate impurities, followed by decoction to obtain higher purity fucoidin and alginic acid. The extraction parameters investigated included the extraction temperature of hot water, extraction time, liquid-to-solid ratio, time of hot water extraction, time of decoction extraction, and batch of SF. The evaluation indicators for the extraction process were the yield of polysaccharides, the mass fraction of polysaccharides, the yield of alginic acid, and the mass fraction of alginic acid. Using Design-Expert 13, a split-plot experimental design was employed to screen key process parameters. The risk-based design space was calculated through the Monte Carlo algorithm to optimize the process parameters and validate it subsequently. **Results** The optimized conditions were as follows: the extraction times of hot water were two, the extraction times of

收稿日期: 2024-02-22

基金项目: 国家中医药管理局创新团队与人才培养计划 (ZYYCXTD-D-202002); 浙江省高层次人才特殊支持计划 (ZJWR0108035); 技术开发委托合同 (XH-2022-KYC-210000-0001)

作者简介: 陈 博 (2002—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 22360539@zju.edu.cn

#共同第一作者: 王欣雨 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: 22219171@zju.edu.cn

*通信作者: 龚行楚 (1982—), 男, 副教授, 博士, 从事中药质量控制研究。E-mail: gongxingchu@zju.edu.cn

decocting were three, the extraction temperature was 75—90 °C, the liquid-solid ratio was 15—21 mL/g, and the extraction time was 22.43—30.00 min. **Conclusion** The proposed new water extraction process avoided the use of organic solvents such as ethanol, making it environmentally friendly. The optimized design space can ensure that it is suitable for multiple batches of medicinal materials within the research scope, and can obtain a more robust range of operating parameters.

Key words: *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch.; fucoidan; alginic acid; split-plot design; extraction process; robustness

羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch. 隶属于褐藻门马尾藻科马尾藻属, 被收录于《中国药典》2020 年版一部, 味苦、咸, 性寒, 无毒, 具有化痰软坚、利尿消肿的功效。其中岩藻多糖和海藻酸是羊栖菜中所含多糖的主要成分^[1]。岩藻多糖是一种硫酸化多糖, 具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]和抗肿瘤^[4]等多种药理活性, 被用作开发新型给药系统和功能食品的添加剂^[5]。海藻酸是一种天然多糖醛酸, 具有水溶性强、稳定性高以及生物相容性好等优点, 广泛应用于制药和食品行业。

目前, 文献报道中提取羊栖菜获得岩藻多糖的方法有热水提取法^[6]、微波辅助提取法^[7]、酶解法^[8]、超声辅助提取法^[9]等, 提取后往往需要采用醇沉等精制工艺获得高质量分数岩藻多糖^[10]。提取海藻酸的方法则包括酸化法^[11]、钙盐沉淀法^[12]、酶解法^[13]等。酶解法不使用有机溶剂, 且提取条件较为温和。缺点是酶价格较高, 且酶回收难度较大。醇沉法需要使用大量有机溶剂, 工业生产需要防爆车间, 由于环保等原因并不适合在羊栖菜产区(浙江和福建沿海)附近大规模实施。微波或超声等辅助提取法存在放大后的安全隐患或噪声污染等问题, 所以工业化案例较少。因此, 仍需要开发成本低、环境友好、且适合放大生产的提取方法来获得岩藻多糖和海藻酸。

本研究提出多次水提法提取羊栖菜中岩藻多糖和海藻酸的新工艺, 并基于质量源于设计(quality by design, QbD)理念进行优化^[14]。研究中采用“裂区设计”研究羊栖菜批次和提取工艺参数对目标产物的影响, 将药材批次设为裂区实验设计中的“难改变因素(hard-to-change factors)”；利用多元二次回归模型建立关键工艺参数与工艺评价指标之间的数学关系, 探究关键工艺参数对提取工艺评价指标的影响规律；最后, 采用 Monte Carlo 算法计算提取工艺风险大小, 并且获得了药材来源不同时, 工艺风险较低的设计空间范围并验证。

1 仪器与材料

1.1 仪器

THY-2015B 型数控恒温槽, 宁波天恒仪器厂；

GX-3015 型高温循环器, 宁波双嘉仪器有限公司；XS105DU 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司；Cary 60 UV-Vis 型紫外-可见分光光度计, 安捷伦科技有限公司；XMTD-8222 型烘箱, 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 材料

羊栖菜分别来自福建霞浦、浙江温州、山东威海 3 个产地, 由浙江石原金牛化工有限公司提供, 由浙江大学药学院龚行楚副教授鉴定, 为马尾藻科马尾藻属藻类植物羊栖菜 *S. fusiforme* (Harv.) Setch. 的干燥藻体。

浓硫酸(优级纯/分析纯)、苯酚(分析纯)、海藻酸钠对照品(化学纯, 批号 20220316)、氢氧化钠(分析纯), 国药集团化学试剂有限公司；L-岩藻糖对照品, 质量分数≥98%, 北京索莱宝科技有限公司；四硼酸钠十水合物(分析纯)、间羟基联苯(分析纯), 罗恩生物试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 提取工艺路线

由于羊栖菜提取的目标物质岩藻多糖和海藻酸均为大分子成分, 具有在冷水中溶解度较差, 热水中溶解度较好的性质, 本研究设计了如图 1 所示的多次水提工艺路线。提取工艺分为“热水提取”和“煎煮提取”2 个阶段, 2 个阶段提取温度不同。热水提取阶段的目标是除去杂质, 所得提取液直接弃去。煎煮提取的目标是得到质量分数较高的海藻酸和岩藻多糖, 所得提取液保留。

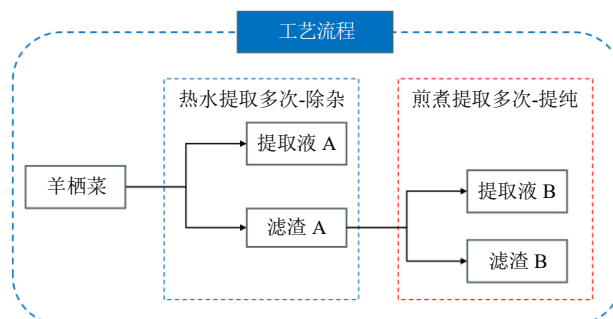


图 1 羊栖菜水提工艺流程图

Fig. 1 Flow diagram of water extraction process of *S. fusiforme*

2.2 实验流程

实验选取热水提取温度 (X_1)、提取时间 (X_2)、液固比 (X_3)、热水提取次数 (X_4)、煎煮提取次数 (X_5) 和药材批次 (X_6) 作为考察参数, 取值范围如表 1 所示。

称取药材批次为 X_6 的羊栖菜质量 (M_0) 50.00 g 置于提取罐中, 加入液固比 10:1 的去离子水使其吸水膨胀, 再次后加入液固比为 X_3 的去离子水,

开始提取, 加热, 当提取罐中温度达到 X_1 时开始计时, 提取时间为 X_2 , 相同条件重复提取, 总次数为 X_4 (热水提取)。热水提取完成后, 弃去水提液。接着, 开始煎煮提取, 同样加入液固比为 X_3 的去离子水, 开始提取, 加热, 当提取罐中温度达到 100 °C 时开始计时, 提取时间为 X_2 , 相同条件重复提取, 总次数为 X_5 (煎煮提取)。将煎煮提取所得水提液合并, 得羊栖菜提取液, 称定质量, 质量记为 m_0 。

表 1 工艺参数的各水平取值
Table 1 Value of each level of process parameters

变量类型	工艺参数	符号	取值范围		
			低水平	中水平	高水平
数值变量	热水提取温度/°C	X_1	75.0	82.5	90.0
	提取时间/min	X_2	15.0	22.5	30.0
	液固比/(mL·g ⁻¹)	X_3	15.0	18.0	21.0
分类变量	热水提取次数	X_4	1	2	
	煎煮提取次数	X_5	1	2	3
	药材批次	X_6	1 (福建霞浦)	2 (浙江温州)	3 (山东威海)

2.3 裂区实验设计优化提取工艺

2.3.1 裂区实验设计 本研究采用裂区设计同时考察药材批次与多个参数共同影响, 裂区实验设计表如表 2 所示。以岩藻多糖产率 (Y_1)、岩藻多糖质量分数 (Y_2)、海藻酸产率 (Y_3)、海藻酸质量分数 (Y_4) 作为提取工艺评价指标。

2.3.2 Y_1 和 Y_2 的测定 岩藻多糖的检测方法来源于中华人民共和国水产行业标准^[15]。称取岩藻糖标准品 0.02 g (精确至 0.1 mg), 用水溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 置 4 °C 冰箱中避光储存。将岩藻糖标准储备液逐级稀释, 配制成质量浓度为 0、10、20、50、100、200 μg/mL 的岩藻糖对照品溶液。分别移取上述溶液 1.0 mL 于 25 mL 比色管中, 加入 50 g/L 苯酚 1.0 mL, 然后立即加入浓硫酸 5.0 mL, 静置 10 min, 涡旋混匀, 室温下静置 20 min。在 490 nm 波长处测定各对照品吸光度 (A) 并记录, 以岩藻糖质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算得到岩藻多糖标准曲线的回归方程为 $Y=0.003\ 9\ X-0.007\ 3$, $R^2=0.999\ 6$, 线性范围为 10.04~200.80 μg/mL。

称取羊栖菜提取液约 300 mg, 用水稀释并定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀。吸取样品溶液 1.0 mL 按上述步骤操作, 测定 A 值。根据标准曲线求出相应的岩藻多糖质量浓度。精密称量干燥至恒定质量的称

量瓶空瓶质量, 加入适量的羊栖菜提取液后, 称量其质量。放入 105 °C 烘箱中干燥 3~4 h, 取出, 称其质量。分别利用公式 (1)~(3) 计算 Y_1 和 Y_2 。所得 Y_1 和 Y_2 结果见表 2, 分析可知 Y_1 在 1.42%~12.71%, Y_2 在 28.9%~80.5%。

$$W=(M_2-M_1)/M \tag{1}$$

$$Y_1=c_1m_0/M_0 \tag{2}$$

$$Y_2=c_1/W \tag{3}$$

W 为所测羊栖菜总固含量, M_1 为干燥至恒定质量的称量瓶空瓶质量, M_2 为加入样液后烘至恒定质量的称量瓶质量, M 为取样液的质量, c_1 为羊栖菜提取液中岩藻多糖质量分数, m_0 为第 2 段羊栖菜提取液的总质量, M_0 为称取的羊栖菜药材的质量

2.3.3 Y_3 和 Y_4 的测定 海藻酸的检测方法来源于中华人民共和国农业行业标准^[16]。分别吸取海藻酸钠对照品溶液 (0.100 g/L) 0、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 于 7 个具塞试管中, 再分别用水补充至总体积为 1.00 mL, 混匀。该标准系列溶液海藻酸钠的质量浓度分别为 0、10、20、40、60、80、100 μg/mL。将试管置于冰水浴中, 在各个试管中缓慢加入四硼酸钠硫酸溶液 6.0 mL, 混匀。将试管放入沸水浴中加热 5 min, 冷却至室温。在每个试管中加入 100 μL 间羟基联苯溶液作为显色剂, 混匀。室温放置 10 min 后, 在 520 nm 波长处用 1 cm 比色皿进行

表 2 裂区设计表及实验结果
Table 2 Split-plot experiment design table and experimental results

组别	运行	工艺参数					工艺评价指标					组别	运行	工艺参数					工艺评价指标				
		X_6	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2/min	$X_3/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	$X_4/\text{次}$	$X_5/\text{次}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$			X_6	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2/min	$X_3/(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$	$X_4/\text{次}$	$X_5/\text{次}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$
1	1	1	75.0	15.0	18.0	1	2	8.35	69.0	7.53	62.2	2	23	3	82.5	30.0	15.0	2	2	6.15	73.5	5.46	65.2
1	2	1	90.0	30.0	15.0	2	1	4.79	67.7	5.81	82.1	2	24	3	75.0	15.0	21.0	1	1	1.42	28.9	1.32	26.8
1	3	1	75.0	22.5	21.0	1	3	12.04	58.5	13.70	66.5	2	25	3	75.0	30.0	15.0	1	1	1.65	30.2	1.55	28.3
1	4	1	82.5	22.5	21.0	2	2	7.57	58.4	10.59	81.7	2	26	3	75.0	30.0	21.0	2	1	2.50	60.6	2.97	71.9
1	5	1	75.0	15.0	18.0	2	1	4.52	68.8	5.59	85.2	2	27	3	75.0	15.0	21.0	2	2	4.20	67.1	3.96	63.2
1	6	1	90.0	15.0	15.0	2	2	7.66	78.3	7.02	71.8	2	28	3	90.0	22.5	18.0	1	1	1.52	29.8	1.67	32.8
1	7	1	82.5	30.0	15.0	1	3	11.06	57.7	14.40	75.1	3	29	2	75.0	30.0	15.0	1	3	6.55	46.7	6.67	47.6
1	8	1	75.0	22.5	15.0	1	1	6.03	79.0	5.42	71.1	3	30	2	90.0	15.0	18.0	1	3	4.64	46.6	4.62	46.5
1	9	1	75.0	30.0	15.0	2	2	9.54	76.3	10.82	86.6	3	31	2	90.0	22.5	15.0	2	3	8.52	72.9	8.91	76.2
1	10	1	75.0	30.0	21.0	1	1	5.97	62.5	6.44	67.4	3	32	2	75.0	15.0	21.0	2	3	5.91	54.4	5.55	51.2
1	11	1	75.0	15.0	15.0	2	3	11.31	68.5	12.87	77.9	3	33	2	90.0	15.0	21.0	2	1	2.57	64.9	2.36	59.7
1	12	1	90.0	15.0	21.0	1	1	4.14	60.4	4.53	66.0	3	34	2	75.0	30.0	21.0	2	2	5.11	60.4	5.40	63.8
1	13	1	90.0	30.0	21.0	1	2	11.35	72.2	11.98	76.3	3	35	2	75.0	22.5	21.0	1	1	1.85	35.0	1.46	27.7
1	14	1	90.0	30.0	21.0	2	3	12.71	73.6	14.07	81.5	3	36	2	90.0	30.0	21.0	1	3	6.93	54.1	6.74	52.6
2	15	3	90.0	15.0	15.0	1	2	3.83	46.7	3.97	48.5	3	37	2	75.0	15.0	15.0	2	2	4.79	66.3	4.56	63.0
2	16	3	75.0	30.0	18.0	2	3	10.10	78.3	11.41	88.5	3	38	2	90.0	30.0	15.0	1	2	5.13	50.7	4.38	43.3
2	17	3	90.0	30.0	15.0	1	3	10.66	65.7	10.44	64.4	3	39	2	90.0	15.0	21.0	1	2	4.01	41.8	3.89	40.5
2	18	3	75.0	15.0	15.0	1	3	7.65	58.8	6.44	49.6	3	40	2	90.0	15.0	15.0	1	1	2.08	39.3	0.95	18.0
2	19	3	90.0	15.0	15.0	2	1	2.16	64.4	2.10	62.7	3	41	2	75.0	30.0	15.0	2	1	2.62	60.1	2.46	56.5
2	20	3	75.0	30.0	21.0	1	2	7.01	63.3	5.58	50.4	4	42	1	82.5	22.5	18.0	2	2	8.83	80.5	8.75	79.8
2	21	3	90.0	15.0	21.0	2	3	6.98	72.4	8.42	87.4	4	43	1	82.5	22.5	18.0	2	2	7.84	72.6	8.35	77.3
2	22	3	90.0	30.0	21.0	2	2	6.23	73.2	7.17	84.2	4	44	1	82.5	22.5	18.0	2	2	8.32	78.2	8.49	79.8

“组别”列在裂区设计中表示主区因子（文章中为药材批次）的不同组别。
“Groups” are listed in the split-zone design to represent different groups of main zone factors (in this article, medicinal materials batches).

比色，先用空白溶液调零，再测定各标准溶液的 A 值。以对照品系列溶液海藻酸钠的质量浓度为横坐标 (X)、 A 值为纵坐标 (Y)，绘制出标准曲线，计算得到海藻酸钠标准曲线的回归方程为 $Y=0.004\ 2X+0.003\ 7$ ， $R^2=0.999\ 9$ ，线性范围为 $10.27\sim102.70\ \mu\text{g/mL}$ 。

吸取“2.3.2 项中样品溶液 $1.0\ \text{mL}$ 置于具塞试管中，在与测定标准系列溶液相同的条件下显色、比色，以空白试验溶液调零，读取 A 值。在标准曲线上查出相应的质量浓度。

分别利用公式 (1)、(4) 和 (5) 计算 Y_3 和 Y_4 。所得 Y_3 和 Y_4 数据见表 2，分析可知 Y_3 在 $0.95\%\sim14.40\%$ ， Y_4 在 $18.0\%\sim88.5\%$ 。

$$Y_3=0.889\ 0\ c_2m_0/M_0 \tag{4}$$

$$Y_4=0.889\ 0\ c_2/W \tag{5}$$

c_2 为羊栖菜提取液中海藻酸钠质量分数， m_0 为第 2 段羊栖菜提取液的总质量， M_0 为称取的羊栖菜药材的质量， W 为所测羊栖菜总固含量， $0.889\ 0$ 为将海藻酸钠质量换算为海藻酸质量的系数

2.3.4 关键工艺参数筛选 由于在设计实验表存在 2 个 3 水平分类变量，分别为煎煮提取次数和药材批次（2 水平分类变量热水提取次数的高水平被编码为 1，低水平被编码为-1），软件使用了偏差效应编码（deviation effect coding，DEC）对 3 水平分类变量进行处理，从而将其建入模型中。具体编码方式见表 3。

使用 Design-Expert 13 软件(美国 Stat-Ease Inc.)，利用公式 (6) 对工艺参数进行筛选，采用向前回归法， P 值设为 0.05 ，筛选后保留下来的参数即为关键工艺参数。

表 3 3 水平分类变量的偏差效应编码
Table 3 Deviation effect coding for three-level categorical variables

煎煮提 取次数	变量 $X_5[1]$	变量 $X_5[2]$	药材批次	变量 $X_6[1]$	变量 $X_6[2]$
1	1	0	1 (福建霞浦)	1	0
2	0	1	2 (浙江温州)	0	1
3	-1	-1	3 (山东威海)	-1	-1

表 4 多元线性回归模型的偏回归系数及方差分析

Table 4 Partial regression coefficient and variance analysis of multiple linear regression model

参数	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4	
	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值
常量	6.083 0	—	59.971 7	—	6.325 8	—	61.186 6	—
X_2	0.702 9	0.000 2	—	—	0.890 6	<0.000 1	3.443 5	0.024 3
X_4	—	—	7.353 1	<0.000 1	—	—	10.540 5	<0.000 1
$X_5[1]$	-3.017 4	<0.000 1	-5.706 8	0.021 0	-3.221 1	<0.000 1	-6.208 3	0.001 8
$X_5[2]$	0.183 5	<0.000 1	2.453 8	0.021 0	-0.099 4	<0.000 1	-0.507 0	0.001 8
$X_6[1]$	2.363 4	<0.000 1	8.021 4	0.000 3	3.032 3	<0.000 1	13.011 1	<0.000 1
$X_6[2]$	-1.577 9	<0.000 1	-6.328 6	0.000 3	-2.055 3	<0.000 1	-10.887 5	<0.000 1
模型主区 P 值	<0.000 1		0.000 3		<0.000 1		<0.000 1	
模型副区 P 值	<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1	
R^2	0.912 3		0.642 8		0.914 0		0.810 8	

“—”代表在对应 Y 项下, X 值与该 Y 值无数量关系; 表 5 同。

“—” means in the corresponding Y , X value and the Y value has no quantitative relationship; same as table 5.

2.3.5 关键工艺参数的影响规律 采用公式 (7) 建立关键工艺参数与提取工艺评价指标之间的定量模型。精简模型同样采用向前回归法, P 值设为 0.05。

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=5}^6 \sum_{k=1}^2 b_{ik} X_i[k] + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=5}^6 \sum_{k=1}^2 b_{ijk} X_i X_j[k] + \sum_{i=5}^6 \sum_{j=i+1}^6 \sum_{k=1}^2 \sum_{l=1}^2 b_{ijkl} X_i[k] X_j[l] \quad (7)$$

a_0 为常数项, X_i 、 X_j 为各关键工艺参数, k 和 l 均表示偏差效应编码的编码数, 两者等价, b_i 、 b_{ik} 、 b_{ii} 、 b_{ij} 、 b_{ijk} 、 b_{ijkl} 为各项的偏回归系数

公式 (7) 的形式较为复杂, 是因为将热水提取次数、煎煮提取次数和药材批次作为分类变量, 进一步采用编码的方式代入模型进行计算。

根据公式 (7) 得到关键工艺参数与提取工艺评价指标之间的定量关系, 模型的偏回归系数及方差分析结果见表 5。结果显示各拟合模型的决定系数均大于 0.80, 说明这些模型可以解释大部分数据变异。从表 6 可知, 副区效应对应 P 值均小于 0.000 1,

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=5}^6 \sum_{k=1}^2 b_{ik} X_i[k] \quad (6)$$

Y 为评价指标, X_i ($i=1 \sim 6$) 为考察参数, a_0 为常数, k 表示偏差效应编码的编码数, b_i 、 b_{ik} 为相应参数的回归系数

所建多元线性回归模型的偏回归系数及方差分析如表 4 所示。从表中可知, 羊栖菜水提工艺的关键工艺参数为提取时间 (X_2)、热水提取次数 (X_4)、煎煮提取次数 (X_5) 和药材批次 (X_6)。

说明所研究工艺参数影响显著。主区效应中除 Y_3 外, 其余工艺评价指标也均为显著。说明本研究中的药材差异影响 Y_4 、 Y_1 和 Y_2 。各因素对海藻酸以及岩藻多糖的质量分数、产率影响见图 2~5。由图可知, 岩藻多糖的产率和海藻酸的产率均随提取时间的延长, 以及提取次数的增加而增加。

2.3.6 设计空间的建立 根据提取工艺评价指标要求设定指标, 通过 Monte Carlo 算法计算出基于风险的设计空间, 用 Matlab (美国 MathWorks 公司) 软件自编程序进行计算。详细计算方法已在课题组先前的工作中有所描述^[14,17-18]。

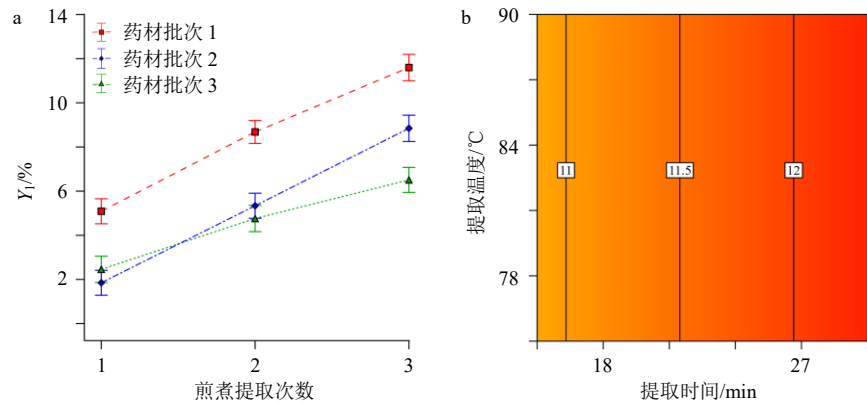
实施某工艺参数组合对应的风险大小以不达标的概率进行量化。将 Y_1 和 Y_3 下限均设为 7%, Y_2 和 Y_4 下限均设为 60%, 工艺最大可接受的风险值设为 10%。分别设置提取时间、热水提取次数、煎煮提取次数的步长为 0.01 min、1 次、1 次。设置实验模拟次数为 5 000 次, 逐步回归 P 值为 0.1。固定药材批次 1 的热水提取次数为 2, 煎煮提取次数为 2 或 3; 药材批次 2 与药材批次 3 的热水提取次数为 2,

表 5 多元二次回归模型的偏回归系数及方差分析

参数	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄	
	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值
常数项	6.125 2	—	60.262 5	—	6.358 2	—	61.812 2	—
X ₂	0.725 6	<0.000 1	—	—	0.900 0	<0.000 1	3.178 9	0.002 7
X ₄	—	—	7.512 7	<0.000 1	—	—	10.958 2	<0.000 1
X ₅ [1]	-2.993 3	<0.000 1	-5.973 1	0.001 6	-3.226 4	<0.000 1	-6.585 1	<0.000 1
X ₅ [2]	0.134 4	<0.000 1	2.838 6	0.001 6	-0.112 8	<0.000 1	0.454 3	<0.000 1
X ₆ [1]	2.330 7	<0.000 1	7.946 0	<0.000 1	2.972 0	0.537 0	13.422 5	<0.000 1
X ₆ [2]	-1.549 9	<0.000 1	-6.447 2	<0.000 1	-1.995 9	0.537 0	-11.516 0	<0.000 1
X ₄ X ₅ [1]	—	—	—	—	—	—	3.493 1	0.026 1
X ₄ X ₅ [2]	—	—	—	—	—	—	-2.221 7	0.026 1
X ₄ X ₆ [1]	—	—	-4.914 6	0.007 4	—	—	-4.841 9	0.001 0
X ₄ X ₆ [2]	—	—	1.842 0	0.007 4	—	—	1.012 1	0.001 0
X ₅ [1]X ₆ [1]	-0.374 4	0.012 0	5.940 3	0.003 6	-0.662 9	0.007 1	7.620 3	0.000 7
X ₅ [2]X ₆ [1]	0.090 6	0.012 0	0.847 7	0.003 6	-0.085 2	0.007 1	-0.700 0	0.000 7
X ₅ [1]X ₆ [2]	0.875 9	0.012 0	1.985 3	0.003 6	0.897 6	0.007 1	-2.433 8	0.000 7
X ₅ [2]X ₆ [2]	0.050 3	0.012 0	-1.866 4	0.003 6	0.306 5	0.007 1	1.917 1	0.000 7
R ²	0.939 3		0.826 8		0.942 6		0.937 7	

表 6 多元二次回归模型的主区与副区方差分析

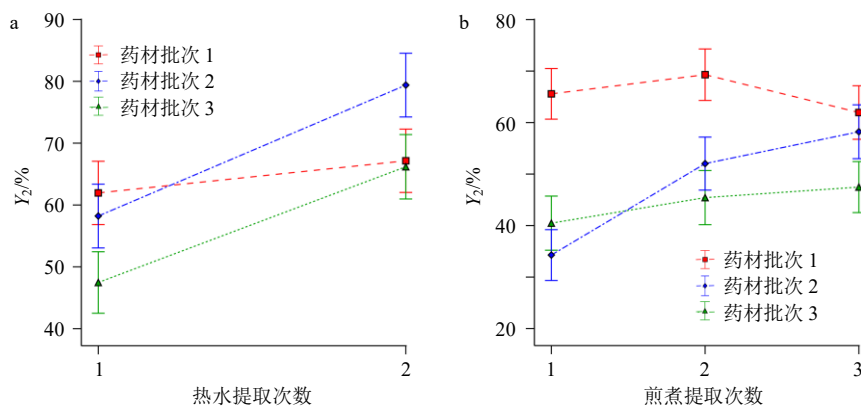
参数	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄	
	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值
主区	<0.000 1	82.34	<0.000 1	16.67	0.537 0	21.54	<0.000 1	71.07
副区	<0.000 1	51.33	<0.000 1	11.84	<0.000 1	50.34	<0.000 1	22.20



a-固定热水提取次数为 1 次，提取时间为 22.5 min；b-固定热水提取次数为 2 次，煎煮提取次数为 3 次，药材批次为批次 1。
 a-fix extraction time at 22.5 min, and the time of hot water extraction at 1; b-fix the time of hot water extraction at 2, boiling water extraction at 3 and the batch of medicinal materials at 1.

图 2 岩藻多糖产率
 Fig. 2 Yield of fucoidan

煎煮提取次数为 3。计算所得设计空间图如图 6 所示。结果显示，药材批次 1，热水提取次数为 2，煎煮提取次数为 2 或 3，提取时间在 15.00~30.00 min 内时；药材批次为 2，热水提取次数为 2，煎煮提取

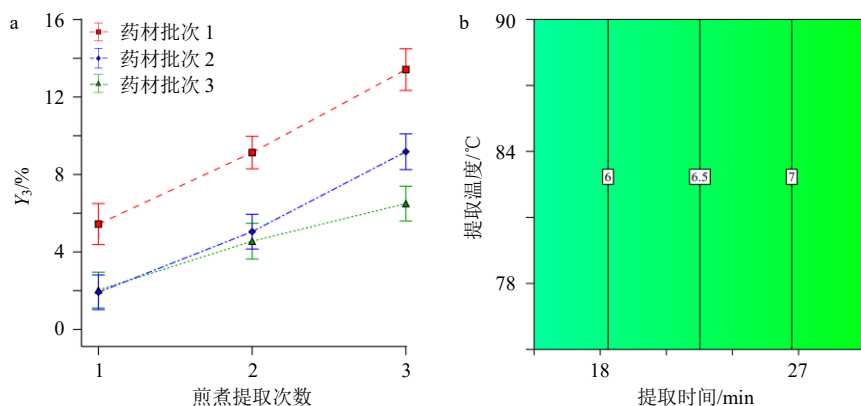


a-固定煎煮提取次数为 3 次; b-固定热水提取次数为 1 次。

a-fix the time of boiling water extraction at 3; b-fix the time of hot water extraction at 1.

图 3 岩藻多糖质量分数

Fig. 3 Purity of fucoidan

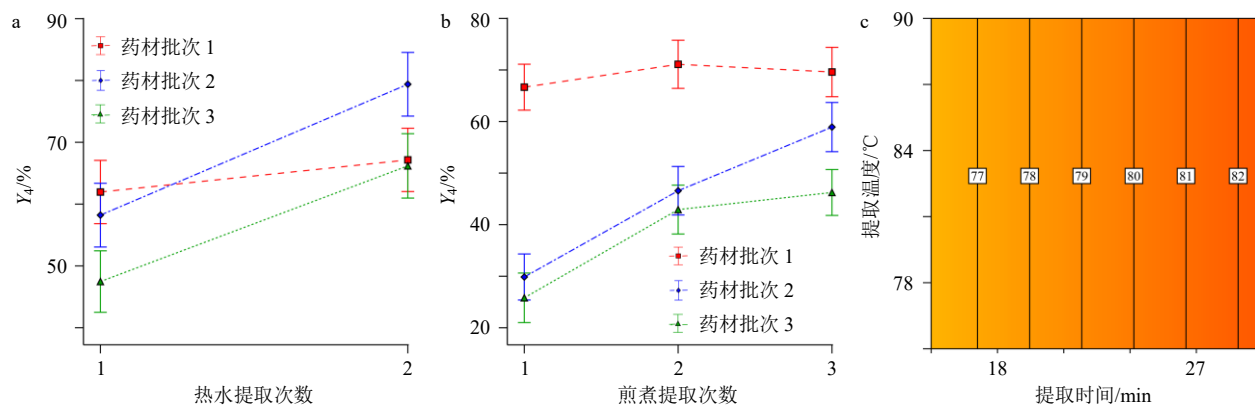


a-固定提取时间为 22.5 min, 热水提取次数为 1 次; b-固定热水提取次数为 2 次, 煎煮提取次数为 3 次, 药材批次为批次 2。

a-fix extraction time at 22.5 min, and the time of hot water extraction at 1; b-fix the time of hot water extraction at 2, the time of boiling water extraction at 3 and the batch of medicinal materials at 2.

图 4 海藻酸产率

Fig. 4 Yield of alginic acid



a-固定提取时间为 22.5 min, 煎煮提取次数为 3 次; b-固定提取时间为 22.5 min, 热水提取次数为 1 次; c-热水提取次数为 2 次, 煎煮提取次数为 3 次, 药材批次为 1。

a-fix extraction time at 22.5 min, and the time of boiling water extraction at 1; b-fix extraction time at 22.5 min, and the time of hot water extraction at 1; c-fix the time of hot water extraction at 2, the time of boiling water extraction at 3 and the batch of medicinal materials at 1.

图 5 海藻酸质量分数

Fig. 5 Purity of alginic acid

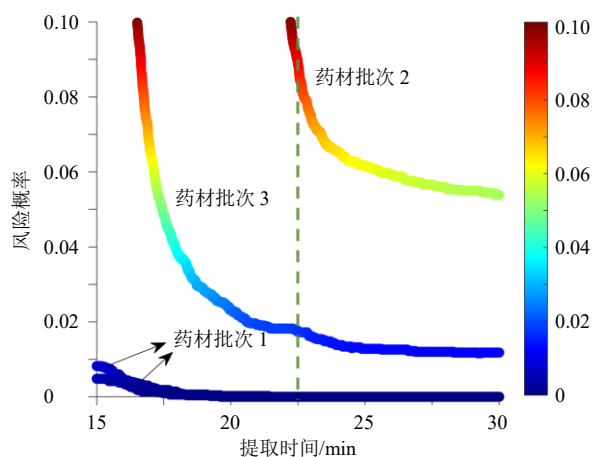


图 6 设计空间图

Fig. 6 Design Space

表 7 验证实验的实验条件及实验结果

Table 7 Experimental conditions and results of validation experiments

试验点	工艺参数				Y ₁ /%		Y ₂ /%		Y ₃ /%		Y ₄ /%	
	X ₂ /min	X ₄ /次	X ₅ /次	X ₆ (批次)	预测值	观测值	预测值	观测值	预测值	观测值	预测值	观测值
设计空间内 (V ₁)	27.5	2	2	1	9.16	9.79	74.5	86.2	9.13	8.64	78.9	76.1
设计空间外 (V ₂)	25.0	1	2	2	5.00	7.24	45.4	60.7	4.85	5.51	44.0	46.2

计空间内验证点的各个指标均达标。这证明了设计空间内工艺参数的稳健性，即在设计空间内操作能够保证所得岩藻多糖和海藻酸的产率和质量分数符合设定要求。

3 讨论

3.1 新工艺的特点

陈家兰等^[19]采用均匀设计优化了羊栖菜煎煮提取工艺，优化条件为液固比 50 : 1，提取时间 3 h，提取 3 次，此时多糖产率可达 5.30%。刘剑等^[20]通过正交试验确定了最佳工艺条件为提取温度 85 ℃，液固比 20 : 1，提取时间为 1 h，提取次数为 3 次，此时得到的多糖产率为 7.37%。相比上述研究，本实验总提取时间缩短，总提取次数增加，最终的多糖产率也有所提升（最高达 12.7%）。

Mohammed 等^[21]采用稀硫酸溶液从褐藻中提取海藻酸，并用碳酸钠溶液溶解得到质量分数为 92% 的海藻酸钠。王振伟等^[22]采用酶解法对羊栖菜进行提取，接着进行钙析-离子交换脱钙、酸化、干燥脱水等操作，最终得到质量分数为 91.5% 的海藻酸。相比之下，本实验方法虽然所得 Y₄ 并没有那么高，但是仅使用水提，无须外加酸碱或者酶，即可得到海藻酸与岩藻多糖 2 种产物，是一种绿色高效的方法。

次数为 3，提取时间在 22.43 ~ 30.00 min 内时；药材批次为 3，热水提取次数为 2，煎煮提取次数为 3，提取时间在 16.56 ~ 30.00 min 内时可以满足所设定指标要求。

对上述 4 个范围取交集，就可以得出在热水提取次数为 2，提取温度在 75 ~ 90 ℃，液固比在 15 ~ 21 mL/g，提取时间在 22.43 ~ 30.00 min，煎煮提取次数为 3 时，无论选择 3 种来源地药材中的哪一种都能满足设定的指标要求。

2.3.7 设计空间的验证 为验证设计空间的准确性，分别在设计空间内、外取一点进行验证，记为 V₁、V₂。验证点实验条件及结果见表 7。由表 7 可知，设计空间外验证点的各个指标均不达标，而设

从表 2 和图 3-a、5-a 可知，Y₂ 与 Y₄ 随着热水提取次数的增加而增加。这个现象符合本研究水提工艺的最初设计：通过第 1 段相对低温提取去除杂质，第 2 段煎煮提取获得含较高质量分数岩藻多糖及海藻酸的提取液。新工艺不使用任何有机溶剂，即可获得质量分数超过 80% 的岩藻多糖以及质量分数超过 85% 的海藻酸，为后续进一步纯化获得高质量分数产品提供了较好基础，也有利于在产地附近工厂中大规模实施。新工艺的不足之处在于耗水量较多，多次提取耗时长。

3.2 试验设计类型的选择

在中药质量控制研究中常用的优化设计包括正交设计、均匀设计、混料设计、中心复合设计、Box-Behnken 设计、确定筛选设计、裂区设计等。由于研究需要考察药材批次差异对于提取工艺评价指标的影响，而裂区设计则能够通过将其设为难改变的因素使实验次数相对更少，因此更适于本研究的情形。同时由于研究所考察的分类变量相对较多（3 个），使用裂区设计是能使实验次数相对更少且分析效果较好的一种方法^[23]。本研究结果证明采用裂区设计进行优化时可行的。

3.3 药材性质的影响

钟文等^[24]的研究证明药材批次间差异带来的

影响可能远大于工艺参数改变的影响。本研究中, 若将 Y_1 和 Y_3 下限从原来的 7% 提高为 8%, Y_2 和 Y_4 下限从原来的 60% 提高为 70%, 工艺最大可接受的风险值仍为 0.1。计算后发现只有“药材批次 1, 热水提取次数为 2 时, 煎煮提取次数为 2 或 3 时”, 才能满足所设定的限度。无法获得能同时满足 3 个批次药材加工的设计空间。这也证实了钟文等^[24]的结论。因此, 在研究建立中药工艺设计空间时, 有必要把药材批次间质量波动同时考虑在内。本实验所用方法将不同批次药材搭配不同工艺参数实施优化, 有利于获得更为稳健的设计空间。类似方法本课题组也成功用于优化盐酸青藤碱和三七总皂苷等的制备工艺等^[25-28]。

4 结论

本研究提出了一种羊栖菜水提绿色新工艺, 采用裂区实验设计对该水提新工艺参数进行优化并建立数学模型, 通过 Monte Carlo 算法计算不同工艺参数取值时的工艺风险大小, 根据风险值得到了稳健的设计空间。然而在工业生产中往往存在放大效应, 本研所得设计空间在用于工业生产时仍可能需要根据中试或者大规模生产数据进行更新。

药材的来源不同对评价指标的影响很大, 因此本研究的工艺转化后应重视药材质量控制。本研究的方法可以做到在药材批次改变时, 同时优化工艺参数。该方法会更有利于获得稳健的工艺参数取值, 有利于提升中成药批间一致性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 何维彬, 高亮, 艾玉廷, 等. 羊栖菜化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2327-2337.
- [2] 李玉芹, 陈赛兰, 贾淑婷, 等. 岩藻多糖氧化降解工艺优化及其对多糖结构和抗氧化活性的影响 [J]. 湘潭大学学报: 自然科学版, 2023, 45(1): 13-26.
- [3] Wang L, Oh J Y, Yang H W, *et al.* Fucoidan isolated from the popular edible brown seaweed *Sargassum fusiforme* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by blocking NF- κ B signal pathway [J]. *J Appl Phycol*, 2021, 33(3): 1845-1852.
- [4] 王祺瑶, 卢畅, 彭婵妮, 等. 海藻岩藻多糖抗肿瘤活性研究新进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2043-2050.
- [5] Tran P H L, Lee B J, Tran T T D. Current developments in the oral drug delivery of fucoidan [J]. *Int J Pharm*, 2021, 598: 120371.
- [6] 邱文辉. 裙带菜中岩藻多糖的制备工艺及其降血糖活性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2020.
- [7] Dai Y L, Row K H. Application of Schiff bases derived from carboxymethylcellulose sodium in the separation of polysaccharides from kelp [J]. *J Chem Tech & Biotech*, 2020, 95(6): 1808-1814.
- [8] Chaloshitori F N, Tabarsa M, Gavlighi H A, *et al.* Structure-activity relationship of fucoidans and alginates obtained from *Cystoseira indica* in a biorefinery concept [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 251: 126326.
- [9] Flórez-Fernández N, López-García M, González-Muñoz M J, *et al.* Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum* [J]. *J Appl Phycol*, 2017, 29(3): 1553-1561.
- [10] 李艳, 宁厚齐, 李迎秋. 海藻渣中岩藻聚糖硫酸酯提取工艺优化 [J]. 轻工学报, 2020, 35(6): 9-15.
- [11] Tiemi N M, Rustici C L, Camila Y, *et al.* Optimal conditions for alkaline treatment of alginate extraction from the brown seaweed *Sargassum cymosum* C. Agardh by response surface methodology [J]. *Appl Food Res*, 2022, doi: 10.1016/J.AFRES.2022.100141.
- [12] Latifi A, Nejad E S, Babavalian H. Comparison of extraction different methods of sodium alginate from brown *Alga sargassum* sp. localized in the southern of Iran [J]. *J Appl Biotechnol Rep*, 2015, 2: 251-255.
- [13] 李晓, 高超, 王颖, 等. 复合酶法提取海黍子中海藻酸钠的工艺研究 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 98-103.
- [14] Tai Y N, Qu H B, Gong X C. Design space calculation and continuous improvement considering a noise parameter: A case study of ethanol precipitation process optimization for *Carthami Flos* extract [J]. *Separations*, 2021, 8(6): 74.
- [15] SC/T 3404-2012, 岩藻多糖 [S]. 2012: 4.
- [16] NY/T 3174-2017 水溶肥料 海藻酸含量的测定 [S]. 2017: 1.
- [17] 邵静媛, 瞿海斌, 龚行楚. 2 种设计空间计算方法的比较研究: 达标概率法和多指标叠加法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2074-2080.
- [18] 沈金晶, 龚行楚, 潘坚扬, 等. 基于质量源于设计理念的金银花水提液石灰乳沉淀工艺优化研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1074-1082.
- [19] 陈家兰, 林芳花, 曹泽艮, 等. 羊栖菜多糖提取工艺的均匀设计法优选及含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 54-57.
- [20] 刘剑, 杨亚彪, 程阳, 等. 羊栖菜褐藻糖胶的提取工艺优化及理化性质分析 [J]. 温州大学学报: 自然科学版, 2018, 39(4): 26-33.
- [21] Mohammed A, Rivers A, Stuckey D C, *et al.* Alginate

- extraction from *Sargassum* seaweed in the Caribbean region: Optimization using response surface methodology [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 245: 116419.
- [22] 王振伟, 王维宇. 阔叶羊栖菜中褐藻胶的提取及应用 [J]. 食品工业, 2021, 42(7): 37-40.
- [23] Jones B, Nachtsheim C J. Split-plot designs: What, why, and how [J]. *J Qual Technol*, 2009, 41(4): 340-361.
- [24] 钟文, 陈莎, 章军, 等. 重点是原料, 还是工艺?: 以葛根芩连汤为例探讨中成药质量一致性控制方法 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1027-1032.
- [25] Ren D D, Xiang S S, Yan Y W, *et al.* Design and optimization of purification process of sinomenine hydrochloride [J]. *Chin J Chem Eng*, 2023, 55: 63-72.
- [26] Pan J J, He S Y, Zheng J Y, *et al.* The development of an herbal material quality control strategy considering the effects of manufacturing processes [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 38.
- [27] Pan J J, Tai Y N, Qu H B, *et al.* Optimization of membrane dispersion ethanol precipitation process with a set of temperature control improved equipment [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19010.
- [28] Gong X, Guo J, Pan J, *et al.* The development of *Fructus corni* quality standard considering the effects of processing [J]. *Chin J Chem Eng*, 2021, 29: 77-84.

[责任编辑 郑礼胜]