

· 中药工业 ·

基于层次分析和正交设计法优选甘草提取工艺[△]王文端¹, 崔洁², 施露³, 尚迪³, 侯俊玲^{1,4*}, 王文全^{1,2,4*}, 杨晶¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 北京中医药大学 东方学院, 河北 廊坊 065001;

4. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 以层次分析法和正交设计法优选甘草总多糖、总黄酮和总皂苷的提取工艺, 为其工业化生产提供参考。**方法:** 以总多糖、总黄酮和总皂苷含量作为评价指标, 采用层次分析法(AHP)确定各指标权重系数, 通过单因素和正交试验相结合的方法, 以料液比、提取温度、提取次数、提取时间为考察因素, 优选出最佳提取工艺。**结果:** 最佳提取工艺条件为甘草粉末以20倍水量, 90℃, 提取2次, 每次提取1.5 h。**结论:** 基于AHP法的多指标综合评价提取方法具有科学性和准确性, 该提取工艺简便、快捷, 可用于甘草总多糖、总黄酮和总皂苷的同时提取, 为甘草资源综合研究与利用奠定基础。

[关键词] 甘草; 层次分析法; 正交设计; 提取工艺; 总多糖; 总黄酮; 总皂苷

Optimization of Extraction Technology of *Glycyrrhiza uralensis* Based on Analytical Hierarchy Process with Orthogonal Design

WANG Wenduan¹, CUI Jie², SHI Lu³, SHANG Di³, HOU Junling^{1,4*}, WANG Wenquan^{1,2,4*}, YANG Jing¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

3. Dong Fang College of Beijing University of Chinese Medicine, Hebei Langfang 065001, China;

4. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drug, Ministry of Education, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction of total polysaccharides, total flavonoids and saponins from *Glycyrrhiza uralensis* by the method of analytical hierarchy process and orthogonal design. **Methods:** Based on the method of analytical hierarchy process, the single factor and orthogonal experimental design, the best extraction technology was optimized by taking solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction times and extraction times as the factors, the contents of total polysaccharides, total flavonoids and total saponins as evaluation indexes for comprehensive assessment. **Results:** The optimal extraction parameters were: solid-liquid ratio: 1:20, extraction temperature: 90℃, extraction times: 2 times, extraction time: 1.5 hours. **Conclusion:** The extraction method based on multi-index comprehensive evaluation of the AHP method is scientific and accurate. The extraction technology with the advantages of simple, convenient and rapid, could be used for simultaneous extraction of total polysaccharides, total flavonoids and total saponins from *G. uralensis*, which could provide a theoretical basis for further study and comprehensive utilization of *G. uralensis*.

[Keywords] *Glycyrrhiza uralensis*; analytical hierarchy process; orthogonal test; extraction technology; total polysaccharides; total flavones; total saponins

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.026

[△] [基金项目] 常用道地药材及其产区的特征、标准及数字化(2015FY111500)

* [通信作者] 侯俊玲, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中药资源开发与利用, Tel: (010)84738334, E-mail: mshjl@126.com; 王文全, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中药材规范化生产及其调控机制研究, Tel: (010)84738623, E-mail: wwq57@126.com

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功能, 常用于脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短、咳嗽痰多等症状^[1], 为我国常用大宗药材, 具有广泛的医用和药用价值。甘草具有抗菌、抗炎、镇咳、保肝、抗病毒、抗氧化、免疫调解、降糖和抗血小板凝集等多种药理作用^[2-3]。现代医学研究表明, 甘草主要成分为多糖类、黄酮类、三萜类等^[2]。在工业生产中, 大部分是对甘草中的甘草酸和甘草黄酮进行提取, 而忽略了对甘草多糖的利用, 造成资源的极大浪费。因此, 本实验采用层次分析法及单因素和正交试验相结合的方法, 以甘草中总多糖、总黄酮和总皂苷的含量为评价指标, 考察料液比、提取时间、提取次数和提取温度对其提取率的影响, 优选最佳提取工艺, 使甘草资源得到综合利用。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UV-2600 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]; KH-500DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); CPA225D 型电子分析天平(Germany Sartorius Weighing Technology GmbH); HH-S6 型水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司); TDZ6B-WS 低速自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 材料

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 来自内蒙古杭锦旗, 经中国医学科学院药用植物研究所王文全教授鉴定为甘草的干燥根和根茎; 甘草酸(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-14081812, 纯度 98.23%); 甘草苷(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-14100910, 纯度 98.68%); D-无水葡萄糖(上海融禾医药科技有限公司, 批号: 150124, 纯度大于 99%); 甲醇、氢氧化钠、香草醛、冰乙酸、高氯酸、浓硫酸、5% 苯酚溶液等均为分析纯。

2 方法

2.1 甘草总多糖的含量测定

参考文献的方法^[4]以葡萄糖质量 m (mg) 为横坐

标, 吸光度 A 为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = 84.082X - 0.0483$, $r = 0.9991$, 线性范围为 19.6 ~ 117.6 mg。

2.2 甘草总黄酮的含量测定

参考文献的方法^[5]以甘草苷浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = 65.707X - 0.0636$, $r = 0.9997$, 线性范围为 19.2 ~ 115.5 μg 。

2.3 甘草总皂苷的含量测定

参考文献的方法^[6-7]以甘草酸的质量 (mg) 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = 2.4436X - 0.0642$, $r = 0.9998$, 线性范围为 0.08 ~ 0.48 mg。

2.4 层次分析法(AHP)确定各指标权重标准

通过参考文献[8-11]发现, AHP 是美国科学家 Saaty 教授于 20 世纪 70 年代初提出的一种权重决策分析方法。本研究将评价体系设为二层, 见图 1。参照评分标准对 3 项指标进行两两比较, 评判重要性, 评分标准见表 1。

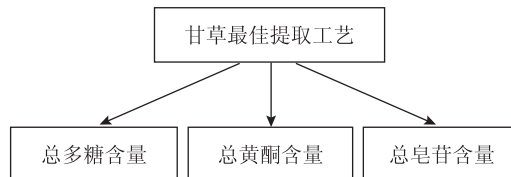


图 1 甘草最佳提取工艺层次结构模型

表 1 目标树各层次评分标准

对比打分	相对重要程度
1	同等重要
3	略为重要
5	基本重要
7	确实重要
9	绝对重要
$\begin{pmatrix} 2, 4 \\ 6, 8 \end{pmatrix}$	两相邻程度的中间值

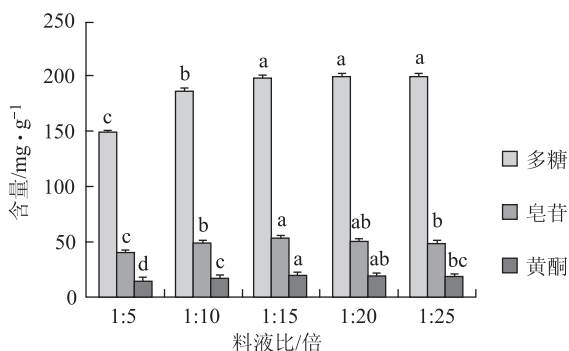
2.5 统计分析

应用 SAS 9.0、GraphPad Prism、Excel 2010 等软件对实验数据进行统计, 并进行正态分布检验、方差分析、正交分析等数据分析, 完成相关数据处理和作图。

3 结果与分析

3.1 甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的单因素分析

3.1.1 料液比对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响 取甘草粉(过60目筛)5份,每份10g,分别以1:5、1:10、1:15、1:20、1:25的料液比,水煮沸,回流提取,提取时间为1.5h,提取次数为2次,按上述方法测定总多糖、总黄酮和总皂苷的含量。重复3次,结果见图2。随着料液比的增大,总多糖的提取率呈现先上升后稳定的趋势,在料液比为1:25时,总多糖的提取率最大。差异显著性分析表明,料液比为1:15、1:20、1:25之间无显著性差异,其余各水平之间差异显著;随着料液比的增大,总黄酮的提取率呈现先上升后下降的趋势,在料液比为1:15时,总黄酮的提取率最大,差异显著性分析表明,1:15、1:20之间,1:20、1:25之间,1:10、1:25之间差异不显著性,其余各水平之间差异显著;随着料液比的增大,总皂苷的提取率先上升后下降,在料液比为1:15时,总皂苷的提取率最大,差异显著性分析表明,1:15、1:20之间,1:10、1:20、1:25之间无显著性差异,其余各水平之间差异显著。综合分析,将正交设计试验中料液比因素考察水平定为1:15、1:20、1:25。



注:不同水平进行多重比较,不同字母即差异显著($p > 0.05$),含相同字母即差异不显著($p > 0.05$);a表示含量高;ab表示含量低于a高于b,且与a、b差异不显著;b表示含量显著低于a;bc表示含量低于b高于c,且与b、c差异不显著;c表示含量显著低于b;d表示含量显著低于c。下同。

图2 料液比对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响

3.1.2 提取时间对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响 取甘草粉(过60目筛)5份,每份10g,分别以1、1.5、2、2.5、3h的提取时间,

1:15料液比,其他试验条件同上,测定总多糖、总黄酮和总皂苷的含量。重复3次,结果见图3。随着提取时间的增加,总多糖的提取率呈现先上升后稍下降的趋势,在2h时,总多糖的提取率最大,方差分析表明,2、2.5、3h之间,1.5、2、2.5h之间没有显著性差异,其余各水平之间有显著性差异;随着提取时间的增加,总黄酮的提取率呈现下降的趋势,在1h时,总黄酮的提取率最大,方差分析表明,1、1.5h之间,2、2.5、3h之间没有显著性差异,其余各水平之间有显著性差异;随着提取时间的增加,总皂苷的提取率呈现先上升后稳定稍下降的趋势,在1.5h时,总皂苷的提取率最大,方差分析表明,1.5、2、2.5h之间,2、2.5、3h之间,1、3h之间没有显著性差异,其余各水平之间有显著性差异。综合分析,故将正交设计试验中提取时间因素考察水平定为1.5、2、2.5h。

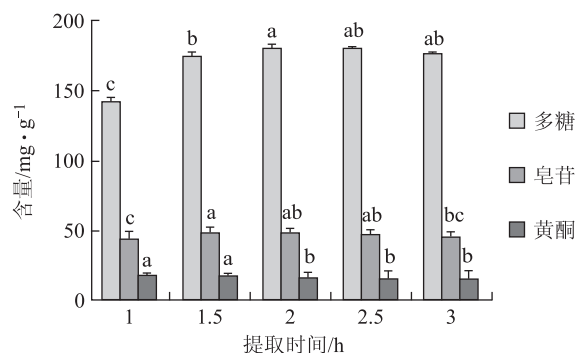


图3 提取时间对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响

3.1.3 提取温度对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响 取甘草粉(过60目筛)5份,每份10g,分别选择60、70、80、90、100℃的提取温度,提取时间为1.5h,其他实验条件同上,测定总多糖、总黄酮和总皂苷的含量。重复3次,结果见图4。随着提取温度的升高,总多糖的提取率呈现先上升后稍下降的趋势,在80℃时,总多糖的提取率最大,方差分析表明,80、90、100℃之间没有显著性差异,其余各水平之间有显著性差异;随着提取温度的升高,总黄酮的提取率呈现下降的趋势,在60℃时,总黄酮的提取率最大,方差分析表明,60、70、80、90℃之间,80、90、100℃之间没有显著性差异,其余各水平之间有显著性差异;随着提取温度的升高,总皂苷的提取率呈现先上升后稳定稍下降的趋势,在80℃时,总皂苷的提取率最大,方差分析表明,各水平之间没有显著性差异。

综合分析,故将正交设计试验中提取温度因素考察水平定为 70、80、90 ℃。

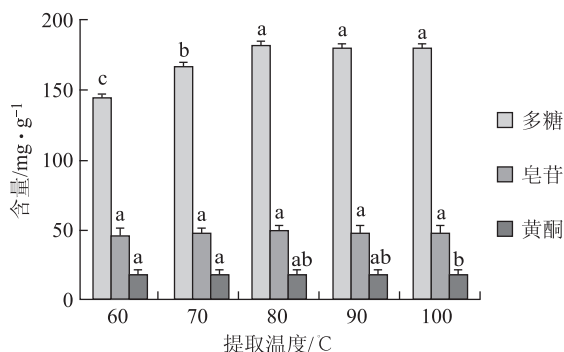


图 4 提取温度对甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取效果的影响

3.2 层次分析法(AHP)确定各指标权重及评分公式

通过参考文献[8-11],本研究根据评价体系(见图1),参照对3项指标进行两两比较,评判重要性,见表1。将结果形成判断优先矩阵,见表2。根据公式计算各指标的权重系数。

表 2 指标成对比较的判断优选矩阵

评价指标	总多糖	总黄酮	总皂苷
总多糖	1	3	5
总黄酮	1/3	1	3
总皂苷	1/5	1/3	1

注:初始权重系数 $W'_i = (a_{i1} a_{i2} a_{i3} \cdots a_{im})^{1/m}$ 。

$$\text{归一化权重系数 } W_i = W'_i \sum_{i=1}^m W'_i$$

$$\text{最大特征根 } \lambda_{\max} = \sum_{i=1}^m \lambda_i / m$$

$$CI = (\lambda_{\max} - m) / (m - 1) \quad CR = CI / RI$$

经过计算,求得总多糖、总黄酮和总皂苷各指标权重系数分别为:0.637 0、0.258 3 和 0.104 7,随机一致性比率 $CR = CI / RI$,当 $CR < 0.1$ 时,判断矩阵具有满意的一致性及权重计算正确性。本次试验的一致性比率为 $CR = 0.033 3 < 0.1$,表明权重计算正确。

综合评分 = 甘草总黄酮含量评分 + 甘草总皂苷含量评分 + 甘草总多糖含量评分。甘草总多糖含量评分 = (甘草总多糖含量/甘草总多糖含量最大值) $\times 100\% \times 0.637 0$; 甘草总黄酮含量评分 = (甘草总黄酮含量/甘草总黄酮含量最大值) $\times 100\% \times 0.258 3$; 甘草总皂苷含量评分 = (甘草总皂苷含量/甘草总皂苷含量最大值) $\times 100\% \times 0.104 7$ 。

3.3 正交试验与结果

3.3.1 提取因素和水平的选择 根据统计分析的结果,选择影响甘草总多糖、总黄酮和总皂苷提取率的4个主要因素:料液比、提取时间、提取温度、提取次数作为正交试验的因素。取甘草粉(过60目筛)9份,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方案,按表3进行正交试验,测定总多糖、总黄酮和总皂苷的含量,重复3次,结果见表4。

表 3 因素水平

水平	A 料液比/ g·mL ⁻¹	B 提取次数/ 次	C 提取时间/ h	D 提取温度/ ℃
1	1:25	1	1.5	70
2	1:15	2	2	80
3	1:20	3	2.5	90

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计结果

试验号	因素				甘草总多糖 含量/mg·g ⁻¹	甘草总黄酮 含量/mg·g ⁻¹	甘草总皂苷 含量/mg·g ⁻¹	综合评分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	206.50	20.11	37.95	83.85
2	1	2	2	2	236.65	21.05	41.32	93.42
3	1	3	3	3	233.93	22.76	50.14	96.36
4	2	1	2	3	197.87	17.89	39.41	79.37
5	2	2	3	1	222.21	18.84	49.85	88.80
6	2	3	1	2	214.04	19.16	43.94	85.90
7	3	1	3	2	201.18	17.43	37.68	79.38
8	3	2	1	3	245.07	21.44	52.07	98.13
9	3	3	2	1	235.75	22.16	53.99	96.90
总多糖	K ₁	677.08	605.55	665.61	664.46			
	K ₂	634.12	703.93	670.27	651.88			
	K ₃	681.99	683.71	657.32	676.86			
	R	15.96	32.79	4.32	8.33			

表 4(续)

试验号		因素				甘草总多糖 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	甘草总黄酮 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	甘草总皂苷 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	综合评分
		A	B	C	D				
总黄酮	K ₁	63.92	55.43	60.71	61.11				
	K ₂	55.89	61.33	61.1	57.64				
	K ₃	61.03	59.03	59.03	62.09				
	R	2.68	1.97	0.69	1.48				
总皂苷	K ₁	129.41	115.04	133.96	141.79				
	K ₂	133.2	143.24	134.72	122.94				
	K ₃	143.74	148.07	137.67	141.62				
	R	4.78	11.01	1.24	6.28				

注：K₁、K₂、K₃表示每个因素各水平下的指标总和，R表示极差(R=平均得率的最大值-平均得率的最小值)，反映各因素的水平变动对实验结果的影响大小。

3.3.2 方差分析 通过综合评分，将正交试验的结果进行 SAS 方差分析，结果见表 5。以综合评分为考察指标，各影响因素主次为 B>D>A>C，即提取次数>提取温度>料液比>提取时间，因素料液比、提取次数、提取温度对实验结果影响差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 5 方差分析结果

方差来源	自由度	离均差平方和	均方差	F 值	显著值
A	2	257.17	51.81	51.81	<.0001
B	2	924.27	186.21	186.21	<.0001
C	2	13.15	2.65	2.65	0.089
D	2	119.40	24.06	24.06	<.0001
误差	18	44.67	2.61		

注： $F_{0.05}(2, 18)=3.55$ ； $F_{0.01}(2, 18)=6.01$ 。

按显著性影响分析依次为：因素 B₂均数最大(92.32)，因此选择 B₂，即 2 次。因素 D₃均数最大(90.57)，因此选择 D₃，即提取温度 90℃。因素 A₃均数最大(90.75)，因此选择 A₃，即 1:20 的料液比。因素 C₂均数最大(89.16)，但因素 C 对实验结果影响不显著，故从节省时间的角度考虑选择 C₁，即提取时间为 1.5 h。

因此，甘草回流提取最佳的工艺条件为 A₃B₂C₁D₃，即甘草以 20 倍量的水回流提取，温度 90℃，提取 2 次，每次 1.5 h。

3.4 验证试验

精密称取甘草粉 3 份，每份 10 g，按最佳工艺 A₃B₂C₁D₃条件进行提取，测定甘草多糖、总黄酮和总皂苷的含量，结果见表 6。

表 6 验证试验结果

批次	甘草总多糖 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	甘草总黄酮 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	甘草总皂苷 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	综合评分
1	245.43	21.50	52.11	98.16
2	241.82	21.98	53.52	98.07
3	249.36	20.88	51.75	98.37
RSD(%)	1.54	2.56	1.78	0.15

由表 6 可知，3 批验证试验综合评分均达 98.20 以上，RSD 为 0.15%，组间无显著性差异，表明该工艺稳定可行，重复性良好。

4 小结与讨论

中药的成分复杂，每种成分都有其不同的作用，在工业生产中只提取一类或两类成分，资源利用率不高，造成浪费。

AHP 是一种将定性与定量相结合的系统分析方法，将其应用于提取工艺的优选，能够更加全面、科学、客观地反映指标层对实验结果的影响。AHP 在进行赋权时，通过数理运算将各指标的重要性转变为可量化的权重系数，这一过程虽然也存在一定的主观性，但比起单纯凭借经验赋值少了盲目性和随意性，因此，AHP 应用于同一种药材中多种活性成分同时提取工艺进行综合评价，其方法更为科学合理，具有明显优势。

甘草含有的多糖类、黄酮类和皂苷类成分均具有很强的药理活性，只提取任何一类成分不能充分利用资源，且分别提取则程序繁琐，成本高昂。甘草多糖具有调节机体免疫、抗肿瘤、抗病毒、抑菌、抗氧化等多种药理作用^[12]；甘草总黄酮具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗糖尿病、心脏保护、神

经保护、增强记忆力等方面的药理作用^[13]；甘草总皂苷具有抗炎的作用。因本研究以水为溶剂，水提液中主要成分为甘草总多糖，考虑到总黄酮、总皂苷在水中的溶出度不理想，且目前甘草总皂苷的药理作用较少，故在进行两两比较时，三者的重要程度依次为甘草总多糖、甘草总黄酮、甘草总皂苷。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 王兵,王亚新,赵红燕,等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2013,34(3):215-218.
- [3] 张利. 甘草的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究,2014,6(10):147-148.
- [4] 闫永红. 不同来源甘草的质量特征及评价研究[D]. 北京:北京中医药大学,2006.
- [5] 冯薇,王文全,赵平然. 甘草总黄酮含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2608-2610.
- [6] 兰霞,王洪新. 比色法测定甘草中总皂苷的含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(4):886-887.
- [7] 黄明进,王文全,沈寿茂. 甘草总黄酮和总皂苷成分的提取工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药,2010,12(4):24-27.
- [8] 查日维,谢晓梅,杨沫,等. 基于层次分析法的多指标综合评价优选宣木瓜提取方法[J]. 中成药,2014,36(3):643-646.
- [9] 牛广俊,陈清英,朱思,等. 用层次分析法多指标评价优选金花茶超声提取工艺[J]. 经济林研究,2015,33(1):119-122.
- [10] 贾成友,李微,张传辉,等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J]. 中草药,2016,47(6):917-922.
- [11] 李慧,刘其南,张丽,等. 基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺[J]. 中草药,2016,47(16):2832-2837.
- [12] 林雨鑫,王靖. 甘草多糖的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 中国饲料,2015(1):27-28.
- [13] 贾世亮,武雪玲,李筱筱,等. 甘草中黄酮类物质的功能研究进展[J]. 北京联合大学学报,2016,30(4):67-73.

(收稿日期 2016-09-08)

(上接第1175页)

参考文献

- [1] 魏长玲,郭宝林. 紫苏叶挥发油的不同化学型及研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(15):32-39.
- [2] 魏长玲,张琛武,郭宝林,等. 紫苏叶挥发油化学型和组分影响因素探究 I——不同生长发育期[J]. 中国中药杂志,2017,42(4):712-718.
- [3] 魏长玲,张琛武,张芬,等. 中国紫苏资源调查和紫苏叶挥发油化学型研究[J]. 中国中药杂志,2016,43(10):1824-1834.
- [4] Werker E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae—a review[J]. Flavour and Fragrance Journal,1993,8(5):249-255.
- [5] 韦保耀,黄丽,滕建文,等. 紫苏芳香油含量的研究[J]. 食品科技,2004(8):41-43.
- [6] Markus Lange B,Turner G W. Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities[J]. Plant biotechnology journal,2013,11(1):2-22.
- [7] Duriyapuran S,Britten E J,Basford K E. The effect of temperature on growth,oil yield and oil quality of Japanese mint[J]. Annals of Botany,1986,58(5):729-736.
- [8] Sergeeva S,Solzneva V A. Essential oil accumulation and changes in its qualitative composition during peppermint ontogeny[J]. FiziolBiokhimKultRast,1979,11:268-270.
- [9] Sangwan N S,Farooqi A H A,Shabih F,et al. Regulation of essential oil production in plants[J]. Plant growth regulation,2001,34(1):3-21.
- [10] Maffei M,Codignola A. Photosynthesis,photorespiration and herbicide effect on terpene production in peppermint (Menthapiperita L.) [J]. Journal of Essential Oil Research,1990,2(6):275-286.

(收稿日期 2016-12-05)