

星点设计-效应面法优选人参叶酶法提取工艺

吴清*, 倪宁, 王玉蓉, 吴华

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 通过星点设计-效应面法优选人参叶酶法提取工艺。方法: 用纤维素酶法从人参叶中提取人参总皂苷, 并用星点设计-效应曲面分析方法进行多元线性回归和二项式拟合以分析酶反应参数(包括 pH 值, 加水量, 酶底比)对人参总皂苷得率的影响, 从中选择最佳工艺, 进行预测分析, 得出预测值并与实际值比较。结果: 二项式拟合复合相关系数较高, r 为 0.940, 最佳提取工艺: pH 为 4.8, 加水量为 24 倍, 酶底比为 40U/g, 人参皂苷提取率实际值为 6.29%, 预测值为 6.37%。结论: 实际值和预测值吻合度高, 星点设计-效应面法优选人参总皂苷酶法提取工艺是成功的。

[关键词] 人参总皂苷; 星点设计-效应面法; 提取工艺; 人参叶; 纤维素酶;

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)04-0005-04

Optimization of Cellulase Hydrolysis Extraction Process of Folium Ginseng by Central Composite Design/Response Surface Methodology

WU Qing*, NI Ning, WANG Yu-rong, WU Hua

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the optimal cellulase hydrolysis extraction process of Folium ginseng by Central Composite Design/Response Surface Methodology. **Methods:** To extract ginsenosides from folium ginseng by adding cellulase digestion process. The parameters of enzyme hydrolysis action is divided into independent variables including pH value, water volume, the ratio of enzyme/the amount of herbal, and dependent variables—the extraction rates of ginsenosides. Linear or nonlinear mathematic models were used to estimate the relationship between independent and dependent variables. The response surface methodology was used to optimize the conditions of extraction. Prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. **Results:** It was showed that the coefficient of correlation of second-order quadratic model was high. The correlation coefficient reached 0.940. The optimum conditions of extraction were obtained. The optimum condition was pH 4.8, 24 times amount of water more than material medica, and enzyme/substrate was 40U/g. The observed values and the predicted one of extraction ratio was 6.29% and 6.37%. **Conclusion:** The observed values and predicted one are close to each other, which prove that the optimization of cellulase digestion extraction process of ginsenosides from folium ginseng by Central Composite Design/Response Surface Methodology is reasonable and successful.

[Key words] ginsenosides; Central Composite Design/Response Surface Methodology; extraction process; folium ginseng; cellulase

[收稿日期] 2005-09-22

[基金项目] 国家中医药管理局科研基金资助 (No: 02-032ZP02)

[通讯作者] 吴清, Tel: (010) 64711199-6034; E-mail: qwu@vip.sina.com.

酶法提取是近年来用于中药有效成分提取的新方法, 相比于传统提取方法它具有的反应条件温和、效率高、专一性强等特点使其备受关注, 已有多个中药品种应用酶法提取取得较好效果, 说明该方法值得研究和推广。本文将该方法应用于从人参叶中提

取人参总皂苷, 探讨其可行性及最佳工艺条件。

根据人参叶药材中含有大量纤维素的特点, 选用纤维素酶酶解细胞壁, 使有效成分充分暴露出来, 以提高提取率。另一方面, 由于人参叶药材不同于根, 其中含有大量的叶绿素, 用有机溶剂会把这部分杂质也提取出来, 因此我们采用水为提取溶媒, 叶绿素因为不溶于水而被除掉, 同时水溶媒更加符合环保和节约成本的要求。

1 仪器与试剂

仪器: U-2000 型紫外分光光度计(HITACHI)、恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂)、METTLER-AE240 型电子分析天平、pHS-25 精密数显酸度计(上海伟业仪器厂)、旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、循环水真空泵(SHZ-D III)。试剂: 甲醇、正丁醇、冰醋酸、高氯酸、香草醛(以上试剂均为分析纯, 由北京化工厂生产)、蒸馏水; 人参叶(购自北京市药材公司, 经本院生药系陈玉婷教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥叶)、纤维素酶 R-10 (10000U/g 购自北京经科宏达生物技术有限公司)、人参皂苷 Rg1(0703-9610, 购自中国药品生物制品检定所)。

2 实验方法与结果

2.1 人参总皂苷标准曲线的绘制 精密称取 0.0023g 人参皂苷 Rg1 对照品, 用甲醇定容, 配成 0.46mg/mL 对照品溶液。依次取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mL 对照品溶液, 挥干, 加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2mL, 高氯酸 0.8mL, 于 60℃水浴加热 15min, 冰水浴冷却 2~3min, 加冰醋酸 5mL 摇匀, 随行试剂做空白, 于 540nm 波长处测定紫外吸光度, 绘制标准曲线见图 1, 线性范围为 0.092mg~0.23mg。

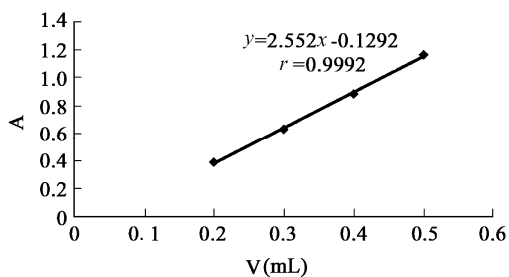


图 1 人参皂苷 Rg1 标准曲线图

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度实验 取新配样品, 按 2.1 项下测定方法, 在 540nm 处测量吸光度 5 次, 得 RSD = 0.13%。

2.2.2 稳定性实验 取新配样品, 分别在第 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48hr 测量吸光度。结果样品在 24hr 内基本稳定, RSD = 1.89%。

2.2.3 重现性实验 取同一批次样品进行 5 次测定, 结果 RSD = 0.69%。

2.2.4 加样回收率实验 采用加样回收法, 取已知含量的样品, 分别加入一定量的人参皂苷 Rg1 对照品, 测量吸光度, 平均加样回收率为 98.3%, RSD = 1.55%。

2.3 单因素法筛选酶解条件 由于中药酶解反应底物较复杂, 影响酶反应速度和程度的因素较多, 文献曾报道酶解 pH 值, 酶解温度, 酶底比, 酶解时间, 加水量, 缓冲溶液种类, 缓冲溶液离子强度等都对酶活性有较明显影响, 因此为以上每个影响因素设置若干水平, 单因素法考察酶解 pH 值, 酶解温度, 酶底比, 酶解时间, 加水量, 缓冲溶液种类, 缓冲溶液离子强度对人参总皂苷提取率的影响。选取人参总皂苷提取率最高的水平为最优, 以评价各因素对酶反应的影响。结果得出的最优条件为纤维素酶酶解 pH 值为 5.5, 酶解温度为 30℃, 酶底比为纤维素酶 30U/g, 酶解时间为 3h, 加水量为 20 倍水量, 缓冲溶液为醋酸钠-醋酸, 缓冲溶液离子强度为 0.4mol/L。其中酶解 pH 值, 酶底比, 加水量对酶解反应的影响较大。

2.4 星点设计法优化酶解条件 由于单因素考察只是考察了多个因素的单独作用效果且试验精度不高, 没有体现出因素间的相互作用, 因此选取单因素考察中对酶解反应影响较大, 且作用效果不易预测的三个因素——酶解 pH 值, 酶底比, 加水量。以这三个因素为自变量, 人参总皂苷提取率为因变量, 采用星点设计的方法进行多元线性回归和二项式拟合, 用效应面法优化工艺条件, 并进行预测分析。实验设计见表 1, 2。

2.4.1 试验设计与结果

表 1 星点设计因素水平表

因素	水平				
	- 1.732	- 1	0	1	1.732
(X1) pH 值	5.00	5.32	5.75	6.18	6.50
(X2) 加水量(倍)	10.00	14.23	20.00	25.77	30.00
(X3) 酶底比(U/g)	20.00	24.23	30.00	25.77	40.00

表2 试验结果与预测值表

实验号	X1	X2	X3	人参总皂苷提取率(%)	预测值(%)
1	-1	-1	-1	5.59	5.53
2	1	-1	-1	5.62	5.73
3	-1	1	-1	5.55	5.42
4	1	1	-1	5.09	5.02
5	-1	-1	1	5.50	5.48
6	1	-1	1	5.67	5.71
7	-1	1	1	6.21	6.00
8	1	1	1	5.67	5.63
9	-1.732	0	0	5.87	6.06
10	1.732	0	0	5.98	5.91
11	0	-1.732	0	5.30	5.21
12	0	1.732	0	4.83	5.05
13	0	0	-1.732	5.30	5.34
14	0	0	1.732	5.74	5.83
15	0	0	0	5.60	5.65
16	0	0	0	5.67	5.65
17	0	0	0	5.67	5.65
18	0	0	0	5.62	5.65
19	0	0	0	5.64	5.65
20	0	0	0	5.69	5.65

注:15~20号为重复实验。

2.4.2 模型拟合 以人参总皂苷提取率为因变量,对各因素进行多元线性回归和二项式拟合。多元线性回归: $r = 0.44513$, 模型为 $Y = 5.605165 - 0.100415X_1 - 0.008288X_2 + 0.024283X_3$ 。二项式拟合: $r = 0.93950$, 模型为 $Y = 19.46167 - 5.93717X_1 + 0.401562X_2 - 0.050143X_3 + 0.604257X_1^2 - 0.00519X_2^2 - 0.000643X_3^2 - 0.06014X_1X_2 + 0.003023X_1X_3 + 0.004781X_2X_3$ 。二项式拟合 r 值远高于多元线性回归,可见多元线性回归拟合度不佳,预测性较差,因此该数学模型不合适。最后选择二项式拟合模型为成功模型,实测值和预测值基本吻合,有较好的预测作用,见表2。

根据响应曲面分析绘出二项式模型的响应曲面分析图,见图2~4。

由图2可以看出曲面呈山峰形,最大值在峰顶,酶底比和加水量的交互作用成正性相关,随着酶底比的增加,加水量倍数也增大,人参皂苷提取率就会相应地增加,说明实验中若加大酶底比的量,相应

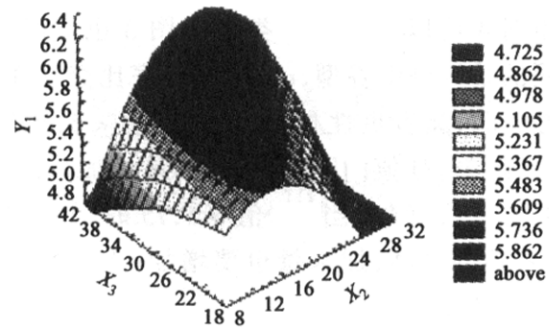


图2 酶底比和加水量对人参皂苷提取率的响应曲面分析

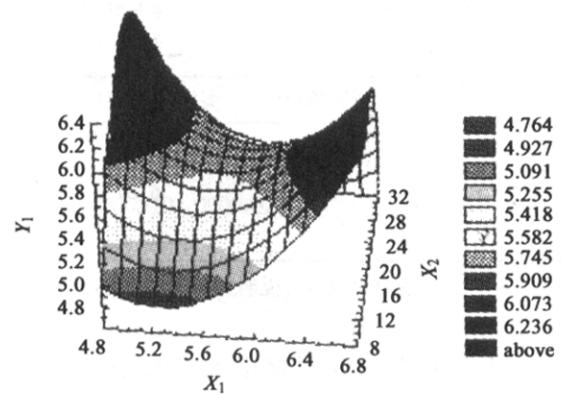


图3 pH值和加水量对人参皂苷提取率的响应曲面分析

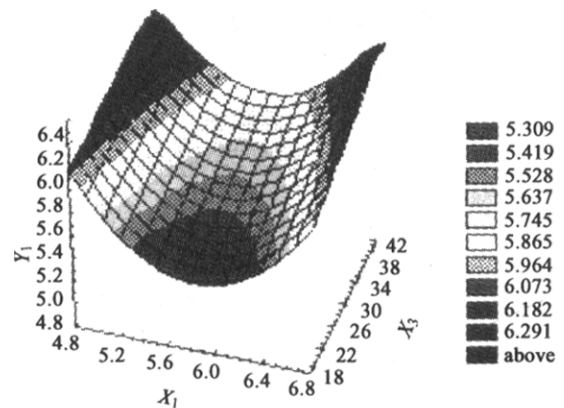


图4 pH值和酶底比对人参皂苷提取率的响应曲面分析地也要增加加水量的倍数。

由图3可以看出,曲面成两侧山谷形,中间是谷底,提取率低,峰尖在两侧,提取率高,pH值和加水量的交互作用成负相关。以谷底pH值为界,当pH值 < 5.75 时,随着pH值的降低,若加水量增加,人参皂苷的提取率才会增加;当pH值 > 5.75 时,随着

pH 值的升高,加水量要减少,人参皂苷的提取率才会增加。

由图 4 可以看出曲面类似于图 3 也呈峰谷形,所不同的是一侧山谷型,pH 值和酶底比交互作用既有正性相关,又有负性相关。当 pH 值 < 5.75 时,为负相关,随着 pH 值的降低,若加水量增加,人参皂苷的提取率才会增加;当 pH 值 > 5.75 时,为正相关,随着 pH 值的升高,加水量也要增加,人参皂苷的提取率才会增加。

考虑到成本问题,和实验误差控制问题,加酶量控制在范围的中下阶段,最后预测出的最佳工艺条件为酶底比为 40U/g, pH 值为 4.8,加水量为 24 倍。

2.4.3 验证试验 将上面预测出的最佳工艺做 5 次平行验证试验,结果取平均值,见表 3。

表 3 星点设计-效应面法优选人参茎叶中
人参总皂苷酶法提取工艺验证试验

条件	预测值(%)	实测平均值(%)	P
pH= 4.8			
加水量= 24 倍	6.37	6.29	0.2
酶底比= 40U/g			

$P = 0.2 > 0.05$, 无显著性差异,说明验证试验预测值和实测值相吻合。

非酶法提取人参叶药材中人参总皂苷的提取率为 4.02%,加酶后提取率提高了 1.5 倍,为 6.29%。

3 讨论

3.1 人参叶因含大量纤维素,普通法提取中由于纤维素的干扰有效成分很难提尽,加纤维素酶水解纤维素后明显提高了有效成分的提取率。实验中曾比较了单加纤维素酶及加纤维素酶和果胶酶的复合酶进行提取,二者无显著差异。表明茎叶类药材若用酶法提取,单加纤维素酶就可达到提高提取率的要求。

3.2 本实验先用单因素法宽范围考察影响酶反应的因素,确定出每种因素的最佳范围。选取对酶反应影响最大的三种因素,为 pH 值,加水量,酶底比,去掉单因素中对人参皂苷提取率影响较小的水平,缩小考察范围,提高实验精度,再用星点设计法进一步考察三个因素间的相互作用对人参皂苷提取率的影响。通过响应面的曲线幅度看出 pH 值,加水量和

酶底比这三个因素之间交互作用强,对酶反应影响较大,不能只考虑单个因素对酶活性的影响,应综合考虑三因素间的交互作用。因此通过效应面法进行交互作用的最佳条件的预测,验证试验中实测值和预测值吻合度高。

3.3 目前试验优选设计国内大多采用正交设计和均匀设计,这两种方法虽试验次数较少,但精度不如星点设计法,且多用线性数学模型,预测性较差。星点设计法简便,试验次数较少,且在中心点进行重现性试验以提高试验精度。在模型建立上采用非线性数学模型拟合,复合相关系数较高,预测值更接近真实值。综上,星点设计法比较常用的正交设计方法和均匀设计方法而言,有以下优点: 1, 实验所得的信息量更大,更直观,更适合于探索性的试验研究; 2, 在试验次数和费用并无显著增加的基础上,不仅提高了试验精度,还由正交设计和均匀设计的筛选作用提高到了预测指导作用,在实验设计中更具优势。

[参考文献]

- [1] 孙平,孟勤,徐景达. 国产西洋参与人参的茎叶皂甙含量比较[J]. 中医药学报, 1997, 23(6): 37-38.
- [2] 王兴才,孙宝森,陈占峰. 从人参茎叶中提取高纯度皂苷工艺[J]. 中医药学报, 1996, 26(2): 46.
- [3] 张晶,陈全成,弓晓杰,等. 不同提取方法对人参皂苷提取率的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 71-73.
- [4] 张崇禧,郑友兰,张春红,等. 不同方法提取人参总皂苷工艺的优化研究[J]. 人参研究, 2003, 21(4): 5-8.
- [5] 李泰平. 人参皂苷药理活性的研究进展[J]. 生物学教学, 2003, 28(4): 1.
- [6] 何克江,韩蔚,栾宏伟,等. 纯化和分光光度法检测联用的人参总皂甙简易测定方法[J]. 药物分析杂志, 2003, 4(23): 284-288.
- [7] 王志华,王东洁,赵晋府. 葵花籽绿原酸酶法提取工艺研究[J]. 食品科学, 2004, 25(1): 97-100.
- [8] 王晖,刘佳佳. 银杏黄酮的酶法提取工艺研究[J]. 中药材, 2003, 26(12): 887-888.
- [9] 刘志强,贺建华,曾云龙,等. 酶及处理参数对水酶法提取菜籽油和蛋白质的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 592-596.