

响应面法优化人参不定根中总皂苷的提取工艺

张 儒¹, 张变玲^{1*}, 谢 涛¹, 李谷才¹, 罗志勇²

¹湖南工程学院化学化工学院, 湘潭 411104; ²中南大学生命科学学院分子生物学研究中心, 长沙 410078

摘要:以人参不定根为原材料, 利用乙醇提取人参总皂苷, 选择提取温度、乙醇浓度和料液比为主要影响因素, 以人参总皂苷得率作为响应值, 利用响应面法优化人参不定根总皂苷的提取工艺。根据 Box-Behnken 实验设计原理, 采用三因素三水平的响应面分析法, 建立了人参不定根总皂苷得率与三个因素变化的二次回归方程。依据回归模型进行计算机模拟及绘制曲面图, 了解人参不定根总皂苷得率随主要因素水平的变化趋势及优化点。通过对各因素显著性和交互作用的分析, 得到最佳工艺条件为: 提取温度 70.00 °C、乙醇浓度 73.50%、料液比 1:34.50 (g/mL), 此时人参皂苷的得率为 1.86 ± 0.01%。

关键词: 人参; 人参皂苷; 提取工艺; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.033

Optimization of Extraction Process of Total Ginsenoside from Adventitious Roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer by Response Surface Methodology

ZHANG Ru¹, ZHANG Bian-ling^{1*}, XIE Tao¹, LI Gu-cai¹, LUO Zhi-yong²

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China;

²Molecular Biology Research Center, School of Life Sciences, Changsha 410078, China

Abstract: In this study, total ginsenoside was extracted from the adventitious roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer by ethanol extraction method. The extraction process was optimized by response surface methodology (RSM). Using the total yields of Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re and Rg₁ as responses, main factors, including extraction temperature, ethanol concentration and liquid-to-solid ratio, were investigated. Based on the results of single factor test, response surface methodology with 3 factors and 3 levels was applied according to Box-Behnken experimental design principle. The relationships between the yield of total ginsenoside and factors were investigated by response surface experiments, and then the regression equations were established. The optimal results were simulated using the regression models based on the value of response surface. The optimized extraction process of total ginsenoside were determined as follows: extraction temperature of 70 °C, ethanol concentration of 73.50% and solid-liquid ratio of 1:34.50 (g/mL), under which the yield of total ginsenoside was up to 1.86 ± 0.01%.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; ginsenoside; extraction technology; response surface methodology

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)为名贵的药食两用植物, 自古以来拥有“百草之王”的美誉, 更被东方医学界誉为“滋阴补气, 扶正固本”之极品, 也是护肤美容和食补佳品。人参的主要活性成分为人参皂苷, 具有抗肿瘤、抗衰老、抑制细胞凋亡和增强免疫力等活性, 已广泛应用于医药和食品工业^[1,2]。但是大部分人参皂苷特别是其中一些具有抗肿瘤、

抗衰老、抑制细胞凋亡和增强免疫力等活性强的皂苷在人参中含量极低^[3], 远远不能满足市场需求。

人参中的人参皂苷因人参的部位、加工方法、栽培年限和产地等的不同而不同。人参的不同部位含有人参皂苷的种类、含量都不相同。人参皂苷含量最高部位为人参花蕾和不定根, 其次为主根和叶。目前人参皂苷的生产主要是从人工栽培的人参主根中提取。虽然人参已有悠久的栽培历史, 但是人参生长周期较长, 且病害严重, 产量较低^[4-6], 因而限制人参皂苷的生产。近年来, 有研究采用人参愈伤组织^[7]或发根培养^[8]生产人参皂苷, 也有用不定根进行培养^[9]生产人参皂苷。其中不定根中总皂苷和

收稿日期: 2014-11-21 接受日期: 2015-02-15

基金项目: 湖南省自然科学基金(11JJ6009); 湖南省教育厅(11CC0329); 国家级大学生创新创业训练计划(201411342004); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划(2014-248)

* 通讯作者 Tel: 86-731-58680393; E-mail: blzhang369@163.com

稀有人参皂苷的含量远高于培养的人参、愈伤组织和发根,因而不定根培养的方式已被广泛应用于工业生产^[10,11]。但是不定根中富含人参多糖、果胶等杂质,对人参皂苷的提取工艺提出挑战。

响应面法已被广泛应用于多因素影响的实验优化上^[12],但用于优化人参不定根中皂苷提取工艺方面的研究鲜有报道。人参不定根中人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁ 的含量最多,占总皂苷的 90% 以上^[4]。本研究以这六种皂苷的总含量作为考察指标,应用响应面法考察人参不定根总皂苷提取工艺中各因素对提取的影响,对提取工艺进行了优化,为充分利用人参资源提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人参样品采集自吉林抚松县,经湖南省食品药品监督管理局检验研究院赵勇主管药师鉴定为人参(*P. ginseng* C. A. Meyer);人参皂苷对照品,中国食品药品检定研究院;石油醚、无水乙醇、甲醇为分析纯,水为双蒸水;乙腈、去离子水为色谱纯。

1.2 主要仪器与设备

LC-6A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-6A 输液泵、SCL-6A 系统控制器、SL-6A 自动进样器、SPD-6AV 紫外可见光检测器、CTO-6A 柱温箱;Hw-2000 数据站(南京千谱软件有限公司);WND-200 型高速中药粉碎机,浙江兰溪市伟能达电器有限公司;BS323S 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;SCIENTZ-III 型超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;NH-4 数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;RE-52A 旋转蒸发器,巩义市英峪予华仪器厂;TDZ5-WS 低速多管架自动平衡离心机,湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 人参不定根总皂苷提取

参考文献方法^[9]诱导和培养人参不定根。取培养的人参不定根于 60 °C 干燥至恒重后称量干重。将其研磨成细粉,取一定量并按不同的提取温度、不同乙醇浓度和不同料液比超声波处理 3 次,每次 15 min,4000 rpm 离心 15 min,收集并合并上清液。上清液再以 60 °C 水浴蒸干乙醇,然后用 5~10 mL 水洗溶解(或采用超声波促其溶解),乙醚萃取两次,取水相,然后用水饱和正丁醇萃取,收集正丁醇层。60 °C 蒸干正丁醇,即得到人参总皂苷,用适量的甲醇超声波溶解,定容至刻度,过 0.45 μm 的微孔滤

膜,得到样品溶液。

1.3.2 人参总皂苷含量测定

HPLC 测定条件为:流动相为乙腈-50 mM 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾 10:90 (V/V) (磷酸调 pH 至 4.0),用前经 0.45 μm 的过滤膜,超声脱气,流速为 1.0 mL/min,柱温为 35 °C, AUFS 20 mV,进样量为 20 μL,检测波长为 202 nm。

对照品的配制:精密称取纯度为 99% 的人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁ 对照品各 1.0 mg,用甲醇溶解,定容至 10 mL 容量瓶中,制成对照品溶液,备用。

HPLC 分析:分别精密吸取对照品溶液 1、3、5、7、10、15、20 μL 定容至 20 μL 后注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定各人参皂苷的峰面积,以总峰面积积分为纵坐标(y),对照品进样量(μg)为横坐标(x),绘制标准曲线,得线性回归方程: $Y = 3.885X + 0.127 (r = 0.9990)$ 。对照品进样量在 0.6~12.0 μg 之间具有良好的线性关系。以制作标准曲线的方法测定各样品中总皂苷的含量,对照品和人参不定根中总皂苷 HPLC 图如图 1。

精密度考察:供试品溶液经微孔滤膜过滤后,精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪测定,重复 6 次,得人参总皂苷峰面积 RSD 为 0.32% (n=6)。

重复性试验:按上述测定方法,对同一批样品进行 6 次平行试验,测得人参总皂苷含量为 1.78%,RSD 为 0.45% (n=6),结果表明此法重复性良好。

加样回收率试验:取已知含量为 1.78% 的人参不定根粗粉 0.1 g,平行 6 份,按供试品溶液制备方法处理后进样,依法测定,结果人参总皂苷平均回收率为 99.23%,RSD 为 0.59% (n=6)。

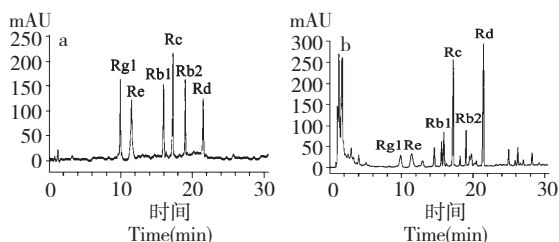


图 1 对照品(a)及人参不定根样品(b)的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of standard (a) and adventitious roots of *P. ginseng* (b)

1.3.3 影响提取工艺效果的因素试验设计

1.3.3.1 单因素试验

试验分别以提取温度、乙醇浓度和料液比为影响因素,研究不同水平下各因素对人参总皂苷

(Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Re 和 Rg₁) 得率的影响。

$$\text{人参总皂苷得率}/\% = \text{CV}/\text{M} \times 100\%$$

式中, C 为提取液浓度, mg/mL; V 为提取液原始体积, mL; M 为所取人参不定根粉末质量, mg。

1.3.3.2 Box-Behnken 中心组合试验设计

对人参皂苷得率的影响因素很多, 根据文献及单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 采用三因素三水平的响应面分析法, 依据回归分析确定各工艺条件的影响因素, 以人参总皂苷得率为响应值作响应面与等高线图, 分析优化的最佳提取条件。

1.3.4 数据分析

所有试验均重复三次, 实验结果为平均值 \pm 标准偏差, 采用 Excel 作图分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取条件下单因素试验

称取人参不定根干粉 0.5 g, 以不同的料液比、乙醇浓度和温度下, 按照 1.3.1 方法制备样品溶液, 并测定六种人参皂苷的峰面积, 计算得率, 重复三次, 取平均值。图 2a 为 1:40 (g/mL) 的料液比加入 80% 乙醇, 分别于不同的温度 (40、50、60、70、80 °C) 条件下测定结果。由图 2a 可以看出, 随温度逐渐增

加, 人参总皂苷的得率逐渐升高, 当提取温度为 60 °C 左右时达到最大值, 之后再继续升高提取温度, 总皂苷得率呈下降趋势。因此, 选择提取温度为 60 °C 最为适宜, 中心组合试验选择提取温度为 50 ~ 70 °C。图 2b 为以 1:40 (g/mL) 的料液比加入不同浓度的乙醇 (60%、70%、80%、90%、100%), 60 °C 条件下测定结果。从图 2b 可看出, 当乙醇浓度较低时, 得率较低, 可能原因是乙醇浓度低时, 一些亲水性物质如多糖、蛋白质和色素等水溶性杂质会溶于溶剂中, 对得率造成影响。随着乙醇的浓度增大, 人参总皂苷的得率含量逐渐升高, 当乙醇浓度达 70% 左右时达到最高, 之后再增大乙醇浓度, 皂苷含量反而下降, 可能原因是高浓度乙醇抑制了溶剂向物料的渗透, 影响了皂苷的浸出, 导致人参总皂苷不能很好的渗出。因此, 选择乙醇浓度为 70% 最为适宜, 中心组合试验选择乙醇浓度范围为 60 ~ 80%。图 2c 为不同的料液比 (1:25、1:30、1:35、1:40、1:45) (g/mL) 加入 70% 乙醇, 60 °C 条件下测定结果。由图 2c 可看出, 随着料液比的增加, 人参总皂苷的得率逐渐升高, 当料液比为 1:35 时达到最大值, 之后再继续增大料液比, 总皂苷得率基本保持不变。因此, 选择料液比为 1:35 最为适宜, 中心组合试验选择料液比为 1:30 ~ 1:40。

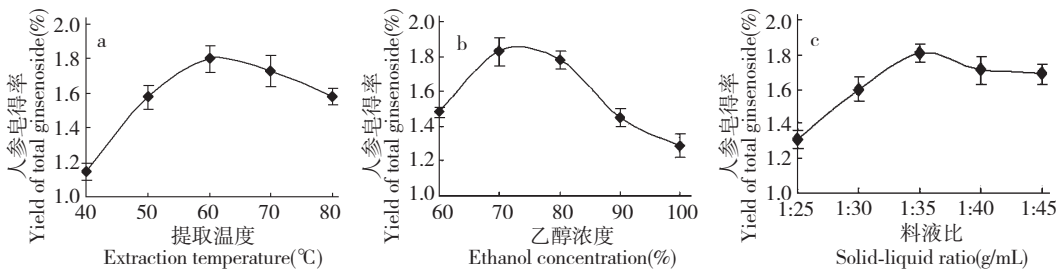


图 2 提取温度 (a)、乙醇浓度 (b) 和料液比 (c) 对人参总皂苷得率的影响

Fig. 2 Effects of extraction temperature (a), ethanol concentration (b) and solid-liquid ratio (c) on the yield of total ginsenoside

2.2 响应面分析优化工艺

2.2.1 皂苷提取试验方案和因素水平

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,

综合单因素试验结果, 选取提取温度、乙醇浓度和料液比三个因素, 采用三因素三水平响应面分析法进行实验设计, 见表 1。

表 1 响应面分析试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of RSM test

水平 Level	因素 Factor		
	X ₁ 提取温度 Extraction temperature (°C)	X ₂ 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	X ₃ 料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)
-1	50	60	1:35
0	60	70	1:40
1	70	80	1:45

2.2.2 响应面分析方案及结果

对人参总皂苷提取工艺进行响应面分析,具体试验方案和结果见下表2。将所得的试验数据采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行多元回归拟合,得到以人参总皂苷得率为目标函数的二次回归方程:

$$Y = -13.55 - 0.10X_1 + 0.31X_2 + 0.43X_3 + 2.25 \times 10^{-3} X_1 X_2 - 5.50 \times 10^{-4} X_1 X_3 + 6.50 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 2.70 \times 10^{-4} X_1^2 - 3.32 \times 10^{-3} X_2^2 - 6.38 \times 10^{-3} X_3^2$$

对该回归模型进行方差分析,结果见表3。

表2 响应面分析试验设计方案及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号 No.	X_1	X_2	X_3	得率 Y Yield (%)
1	0	0	0	1.81
2	-1	-1	0	1.61
3	0	0	0	1.82
4	0	0	0	1.83
5	1	0	-1	1.69
6	-1	0	-1	1.58
7	0	0	0	1.78
8	1	1	0	1.75
9	-1	0	1	1.62
10	-1	1	0	1.21
11	0	-1	-1	1.38
12	1	-1	0	1.25
13	0	-1	1	1.26
14	0	0	0	1.83
15	0	1	1	1.33
16	0	1	-1	1.32
17	1	0	1	1.62

从表3可以看出,模型总决定系数 $R^2 = 0.9950$,调整决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9987$,方程 $P < 0.0001$,说明二次回归模型高度显著;失拟项 $P = 0.2740$,失拟项不显著,说明该模型与实际试验的拟合度好, $R_{Pred}^2 = 0.9504$,说明该模型预测性良好,此实验方法可靠。CV 值越低,显示实验稳定性越好,本实验中 CV 值为 1.55 说明实验操作可信。在选

择范围内,方程中一次项 X_1 对皂苷得率的影响非常显著,二次项 X_2^2 和 X_3^2 对皂苷得率影响极其显著。交互项 $X_2 X_3$ 对皂苷得率的影响是显著的, $X_1 X_2$ 对皂苷得率的影响是极其显著。说明各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;三个因素对人参总皂苷得率的影响顺序为提取温度 (X_1) > 料液比 (X_3) > 乙醇浓度 (X_2)。

表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	0.83	0.09	156.32	<0.0001	***
X_1	0.01	0.01	17.75	0.0040	**
X_2	1.51×10^{-3}	1.51×10^{-3}	2.55	0.1540	
X_3	2.45×10^{-3}	2.45×10^{-3}	4.14	0.0814	
$X_1 X_2$	0.20	0.20	341.98	<0.0001	***
$X_1 X_3$	3.03×10^{-3}	3.03×10^{-3}	5.11	0.0583	

$X_2 X_3$	4.23×10^{-3}	4.23×10^{-3}	7.14	0.0319	*
X_1^2	3.07×10^{-3}	3.07×10^{-3}	5.18	0.0569	
X_2^2	0.46	0.46	783.77	<0.0001	***
X_3^2	0.11	0.11	180.90	<0.0001	***
残差 Residual error	4.15×10^{-3}	5.92×10^{-4}			
失拟项 Lack of Fit	2.43×10^{-3}	8.08×10^{-4}	1.88	0.2740	
净误差 Pure error	1.72×10^{-3}	4.30×10^{-4}			
总误差 Total error	0.84				
$R^2 = 0.9950 \quad R_{Adj}^2 = 0.9887 \quad R_{Pred}^2 = 0.9504 \quad CV\% = 1.55$					

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。
 Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

2.3 因素间的交互影响

根据响应面分析方案及结果,利用响应面分析

软件 Design-Expert 作不同因素的响应面分析图(图3)。从图3可直观地看出交互作用对人参总皂苷

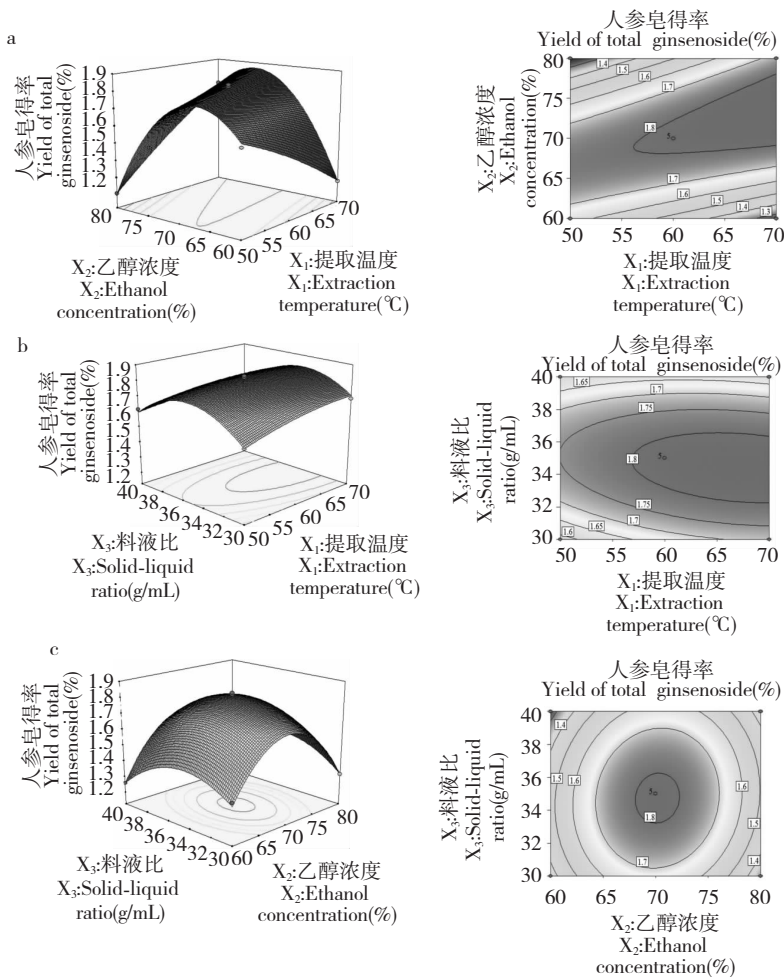


图3 交互因素对人参总皂苷提取效果的影响响应面曲线图

Fig. 3 Response surface plots illustrating the mutual effects of factors on the yield of total ginsenoside

提取的影响。分别对回归方程中各变量(X_1 、 X_2 和 X_3)求极值,得到极值点为 $X_1 = 1.00$ 、 $X_2 = 0.35$ 和 $X_3 = -0.11$,即在提取温度为70.00℃、乙醇浓度为

73.54%、料液比为1:34.47(g/mL)时,人参总皂苷最大得率的预测值为1.87%。为了方便操作,将最优组合方案定为:提取温度为70.00℃、乙醇体积分

数为 73.50%、料液比为 1:34.50(g/mL)。按最优组合方案中的提取条件进行验证实验,平行试验 3 次,结果测定人参总皂苷得率分别为 1.86%、1.87% 和 1.85%,取平均值后得皂苷实际得率为 1.86 ± 0.01%,RSD 为 0.53%。验证试验结果与模型预测的结果非常接近,偏差较小,表明试验拟合较好,实验误差较小,进一步验证了回归模型的正确性。

3 结论

本研究在单因素实验基础上,根据 Box-Behnken 试验设计原理,通过响应面分析法对人参不定根总皂苷提取工艺进行优化,并得到回归方程。回归分析结果表明,提取温度(X_1)对响应值有极显著的影响,提取温度(X_1)与乙醇浓度(X_2)交互效应极其显著,且与响应值之间不是简单的线性关系。经回归分析并结合实际操作便利性,确定人参不定根总皂苷提取的最佳工艺条件为提取温度 70.00℃、乙醇浓度 73.50%、料液比 1:34.50,此条件下提取得率可达 1.86 ± 0.01%,与理论值 1.87% 接近,说明该模型可靠性较高,能很好地预测各因素与得率之间的关系。

参考文献

- Baek SH, Bae ON, Park JH. Recent methodology in ginseng analysis. *J Ginseng Res*, 2013, 36:119-134.
- Lee DC, Lau AS. Effects of *Panax ginseng* on tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation: a mini-review. *Molecules*, 2011, 16:2802-2816.
- Oh JY, Kim YJ, Jang MG, et al. Investigation of ginsenosides in different tissues after elicitor treatment in *Panax ginseng*. *J Ginseng Res*, 2014, 38:270-277.
- Sunwoo HH, Kim CT, Kim DY, et al. Extraction of ginsenosides from fresh ginseng roots (*Panax ginseng* C. A. Meyer) using commercial enzymes and high hydrostatic pressure. *Biotechnol Lett*, 2013, 35:1017-1022.
- Kiselev KV, Shumakova OA, Tchernoded GK. Mutation of *Panax ginseng* genes during long-term cultivation of ginseng cell cultures. *J Plant Physiol*, 2011, 168:1280-1285.
- Beon MS, Park JH, Kang HM, et al. Geographic information system-based identification of suitable cultivation sites for wood-cultivated ginseng. *J Ginseng Res*, 2013, 37:491-495.
- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 2007, 12:607-621.
- Kochan E, Wasiela M, Sienkiewicz M. The production of ginsenosides in hairy root cultures of American Ginseng, *Panax quinquefolium* L. and their antimicrobial activity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2013, 49:24-29.
- Paek KY, Murthy HN, Hahn EJ, et al. Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009, 113:151-176.
- Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, et al. Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol Lett*, 2004, 26:1619-1622.
- Bae KH, Choi YE, Shin CG, et al. Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and methyl jasmonate in ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) adventitious root cultures. *Biotechnol Lett*, 2006, 28:1163-1166.
- Liu YL(刘永玲), Wang P(王萍), Chen T(陈涛), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of an imidazole alkaloid from *Aconitum pendulum* Busch by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:1311-1315.
- Zhang W(张雯), Zhao JJ(赵旌旌), Wang JS(王捷思), et al. Hypoglycemic activity of polysaccharides extracted from *Tremella aurantialba* mycelia in experimental type 2 diabetic rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 1:49-53.
- Genet S, Kate RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues Effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mole Cell Biochem*, 2002, 236:7-12.

(上接第 709 页)