

二次通用旋转试验设计优化栀子苷的酶解工艺

郑礼胜^{1,4}, 倪娜², 刘向前^{3,4*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 扬子江药业集团有限公司, 江苏 泰州 225321

3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

4. 中南大学化学化工学院, 湖南 长沙 410083

摘要: 目的 研究苦杏仁酶水解栀子苷制备栀子苷元的工艺条件。方法 以产物得率为指标, 通过二次通用旋转试验设计考察缓冲液 pH 值、反应温度、反应时间和酶加入量 4 个主要因素对工艺的影响, 得出苦杏仁酶水解栀子苷的最合适工艺条件; 采用理化性质及 NMR 谱鉴定产物结构, HPLC 峰面积归一化法检测产物纯度。结果 酶加入量、缓冲液 pH 值和反应时间对产物得率有显著影响, 所确定的最合适工艺条件为缓冲液 pH 值 5.25, 反应温度 50.5 °C, 反应时间 90 min, 酶加入量 1:10; 产物栀子苷元得率 > 34.5%, 质量分数为 99.6%。结论 用苦杏仁酶水解栀子苷制备栀子苷元的方法是可行的。

关键词: 栀子苷; 栀子苷元; 苦杏仁酶; 二次通用旋转试验设计; 水解

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1340-04

Optimization of enzymatic technology for geniposide by quadratic general rotation design

ZHENG Li-sheng^{1,4}, NI Na², LIU Xiang-qian^{3,4}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Yangtze River Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taizhou 225321, China

3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China

Key words: geniposide; genipin; emulsin; quadratic general rotation design; hydrolysis

栀子苷元是由栀子苷水解得到的环烯醚萜类物质, 易溶于乙醇、丙酮、醋酸乙酯、氯仿等有机溶剂, 在水中溶解度较小。近年来栀子苷元在抗肿瘤、治疗肝硬化等方面疗效显著, 以及其作为一种新兴药物中间体的诸多药用价值, 具有很好的应用前景。同时栀子苷元还作为一种新型的生物交联剂被广泛应用于生物材料中, 它不仅能形成稳定的交联制品, 而且具有细胞毒性小、生物相容性好、抗降解能力强和应用领域广泛等优点, 是非常有前途的交联材料^[1]。酸碱水解打断糖苷键生成苷元的方法不适用于制备栀子苷元, 环烯醚萜结构在酸碱作用下会遭到破坏, 影响其生物活性; 所以用微生物转化、酶解等温和方法制备栀子苷元成为必然趋势, 可利用

β -葡萄糖苷酶水解栀子苷生成苷元^[2]。由于 β -葡萄糖苷酶价格昂贵, 未能广泛应用于实际生产。本实验利用从苦杏仁中提取的苦杏仁酶水解栀子苷制备栀子苷元, 并对其工艺进行优化。

1 仪器与材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津), Inova 400NB NMR 核磁共振波谱仪 (美国瓦里安技术有限公司)。

栀子苷由长沙市高新技术开发区博海生物科技有限公司代购 (批号 2008030501, 质量分数 $\geq 95\%$); 苦杏仁酶 (自制, 水杨苷法测得活力约为 60 U/mg)。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为三蒸水, 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (11JJ2042); 湖南中医药大学十二五校极重点学科“药物分析学”建设项目资助

*通讯作者 刘向前 E-mail: lxq0001cn@163.com

网络出版时间: 2012-06-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120619.1727.001.html>

2 方法与结果

2.1 栀子苷水解工艺优化

分别称取栀子苷 1.5 g、苦杏仁酶适量,精密称定,置 500 mL 烧瓶中,加入 200 mL 不同 pH 值的缓冲液,超声溶解;加入 150 mL 氯仿,置于不同温度的水浴锅中反应不同时间,快速低温冷却结束反应;分液后,用预冷氯仿萃取 2 次(150 mL+100 mL),合并萃取液,回收氯仿;氯仿转移剩余物。

通风厨中挥干溶剂,氯仿重结晶,60 ℃以下真空干燥,称量并计算产物得率。

产物得率=产物质量 / 栀子苷质量

以产物得率为指标,对影响酶解工艺的主要参数:缓冲液 pH 值(X_1)、反应温度(X_2)、反应时间(X_3)、酶加入量(X_4 ,以苦杏仁酶/栀子苷比值表示),采用 4 因子 5 水平二次通用旋转试验设计^[3-4]安排试验,试验设计及结果见表 1。

表 1 二次通用旋转试验设计方案及结果

Table 1 Design and results of quadratic general rotation design

试验号	X_1	$X_2 / ^\circ\text{C}$	X_3 / min	X_4	得率 / %	试验号	X_1	$X_2 / ^\circ\text{C}$	X_3 / min	X_4	得率 / %
1	5.5 (1)	50 (1)	90 (1)	1 : 20 (1)	30.62	17	4.0 (-2)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	13.53
2	5.5 (1)	50 (1)	90 (1)	1 : 10 (-1)	38.50	18	6.0 (2)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	26.73
3	5.5 (1)	50 (1)	50 (-1)	1 : 20 (1)	24.07	19	5.0 (0)	35 (-2)	70 (0)	1 : 15 (0)	28.71
4	5.5 (1)	50 (1)	50 (-1)	1 : 10 (-1)	35.46	20	5.0 (0)	55 (2)	70 (0)	1 : 15 (0)	30.59
5	5.5 (1)	40 (-1)	90 (1)	1 : 20 (1)	26.90	21	5.0 (0)	45 (0)	30 (-2)	1 : 15 (0)	27.52
6	5.5 (1)	40 (-1)	90 (1)	1 : 10 (-1)	33.67	22	5.0 (0)	45 (0)	110 (2)	1 : 15 (0)	35.61
7	5.5 (1)	40 (-1)	50 (-1)	1 : 20 (1)	18.52	23	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 5 (-2)	38.18
8	5.5 (1)	40 (-1)	50 (-1)	1 : 10 (-1)	30.15	24	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 25 (2)	17.92
9	4.5 (-1)	50 (1)	90 (1)	1 : 20 (1)	22.37	25	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	30.83
10	4.5 (-1)	50 (1)	90 (1)	1 : 10 (-1)	32.10	26	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	33.58
11	4.5 (-1)	50 (1)	50 (-1)	1 : 20 (1)	19.91	27	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	28.38
12	4.5 (-1)	50 (1)	50 (-1)	1 : 10 (-1)	30.20	28	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	32.32
13	4.5 (-1)	40 (-1)	90 (1)	1 : 20 (1)	21.38	29	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	31.86
14	4.5 (-1)	40 (-1)	90 (1)	1 : 10 (-1)	31.43	30	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	34.04
15	4.5 (-1)	40 (-1)	50 (-1)	1 : 20 (1)	16.12	31	5.0 (0)	45 (0)	70 (0)	1 : 15 (0)	28.76
16	4.5 (-1)	40 (-1)	50 (-1)	1 : 10 (-1)	25.05						

2.2 回归模型的建立及显著性检验

以产物得率(Y)为因变量,4 因素编码值(X_i , $i=1, 2, 3, 4$)为自变量,对试验所得数据进行多元分析,得回归方程。

$$Y=31.323\ 04+2.738\ 97\ X_1+1.407\ 20\ X_2+2.236\ 43\ X_3-4.883\ 31\ X_4+0.055\ 06\ X_1X_2+0.034\ 31\ X_1X_3+0.008\ 31\ X_1X_4-0.059\ 94\ X_2X_3+0.059\ 25\ X_2X_4+0.048\ 81\ X_3X_4-2.852\ 49\ X_1^2-0.472\ 49\ X_2^2+0.006\ 26\ X_3^2-0.872\ 49\ X_4^2$$

对回归方程及各因素的方差分析见表 2。可知,失拟检验 $F_1=3.370\ 8 < F_{0.05}(10, 6)=4.06$, 差异不显著,表明未控制因素对实验结果干扰很小,拟合不足被否定;拟合检验 $F_2=6.133\ 8 > F_{0.01}(14, 16)=3.41$, 达到极显著水平。

复相关系数(R)=0.918 1,校正复相关系数(R_{adj})=0.904 9。对于给定的显著性水平 $\alpha=0.01$,

自变量个数 $m=4$, 实验次数 $n=31$ 时,对应的临界值 $R_{\min}=0.624 < R_{\text{adj}}=0.904\ 9$, 表明该方程与实际情况拟合良好,正确反映了产物得率与缓冲液 pH 值、反应温度、反应时间和酶加入量的关系,这与 F 检验的结论是一致的。

偏回归系数的检验结果表明, X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_4^2 的偏回归系数均达到极显著水平,这些因素对产物得率的影响极显著,且不是简单的线性关系; X_2 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 、 X_3^2 项均未达到显著水平,但由于各系数间具有相关性,微弱的交互项原则上不能删除,因此方程不能简化^[5]。

2.3 主因子效应

由于回归模型本身已经过无量纲编码代换,其偏回归系数已经标准化,故可直接从其绝对值大小来判断各因子对目标函数的相对重要性,即一次项

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

变异来源	偏回归平方和	自由度	F 值	显著性	变异来源	偏回归平方和	自由度	F 值	显著性
X_1	180.032 4	1	14.908 7	极显著	X_1^2	1 704.333 5	1	141.137 5	极显著
X_2	47.521 0	1	3.935 3	不显著	X_2^2	318.293 6	1	26.358 2	极显著
X_3	120.029 1	1	9.939 7	极显著	X_3^2	4.311 9	1	0.357 1	不显著
X_4	572.274 8	1	47.390 6	极显著	X_4^2	576.585 5	1	47.747 6	极显著
X_1X_2	0.485 1	1	0.040 2	不显著	回归平方和	1 036.985 8	14	$F_2=6.133 8$	极显著
X_1X_3	0.188 4	1	0.015 6	不显著	剩余平方和	193.211 2	16		
X_1X_4	0.011 1	1	0.000 9	不显著	失拟平方和	164.016 4	10	$F_1=3.370 8$	不显著
X_2X_3	0.574 8	1	0.047 6	不显著	误差平方和	29.194 8	6		
X_2X_4	0.561 7	1	0.046 5	不显著	总偏差平方和	1 230.196 9	30		
X_3X_4	0.381 2	1	0.031 6	不显著					

$$F_{0.05}(1, 16)=4.49 \quad F_{0.01}(1, 16)=8.53 \quad F_{0.05}(14, 16)=2.35 \quad F_{0.01}(14, 16)=3.41 \quad F_{0.05}(10, 6)=4.06 \quad F_{0.01}(10, 6)=7.87$$

系数绝对值大小可反映各因素对产物得率的影响程度。由回归方程可知, 4 因素的影响程度依次为酶加入量>缓冲液 pH 值>反应时间>反应温度。

2.4 单因子效应及边际效应

分别将回归方程中的 3 个变量固定在零水平, 进行降维分析, 即可得到 4 个以其中 1 个因素为决策变量的偏回归方程:

$$Y_1=31.323\ 04+2.738\ 97\ X_1-2.852\ 49\ X_1^2$$

$$Y_2=31.323\ 04+1.407\ 20\ X_2-0.472\ 49\ X_2^2$$

$$Y_3=31.323\ 04+2.236\ 43\ X_3+0.006\ 26\ X_3^2$$

$$Y_4=31.323\ 04-4.883\ 31\ X_4-0.872\ 49\ X_4^2$$

根据偏回归方程作图, 得到单因子效应曲线(图 1-A)。经计算, 当 $X_1=0.480\ 10$, $X_2=1.489\ 12$, $X_3=2.000\ 0$, $X_4=-2.000\ 0$, 即缓冲液 pH 值 5.24, 反应温度 52.44 °C, 反应时间 2.0 h, 酶加入量为 1:5 时, 各偏回归方程分别取得最大值: $Y_{1\max}=31.981$, $Y_{2\max}=32.371$, $Y_{3\max}=35.821$, $Y_{4\max}=37.600$ 。

对各偏回归方程求一阶导数, 得单因子边际效应方程。

$$dY_1/X_1=2.738\ 97-5.704\ 98\ X_1$$

$$dY_2/X_2=1.407\ 20-0.944\ 98\ X_2$$

$$dY_3/X_3=2.236\ 43+0.012\ 52\ X_3$$

$$dY_4/X_4=-4.883\ 31-1.744\ 98\ X_4$$

单因子边际效应方程反映了产物得率随不同因子编码值的变化速率。根据单因子边际效应方程可以作出单因子边际效应曲线(图 1-B)。可知, 4 条曲线斜率的绝对值大小依次为 $X_1>X_4>X_2>X_3$, 说明缓冲液 pH 值的变化对产物得率影响最大, 酶加入量次之, 反应温度再次之, 反应时间的变化对产

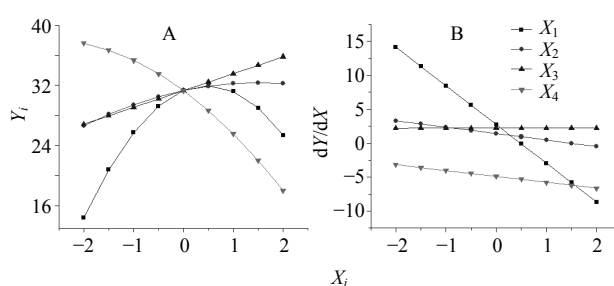


图 1 单因子效应 (A) 及其边际效应 (B) 曲线

Fig. 1 Curves of single factor effect (A) and its marginal effect (B)

物得率的影响很小。因此, 试验时应特别注意对缓冲液 pH 值和酶加入量的控制, 以防引起较大误差。

2.5 数学模型寻优

利用回归方程, 在试验约束区域内 ($-2.000 \leq X_i \leq 2.000$, $i=1, 2, 3, 4$), 取步长值为 0.200, 通过 MATLAB 编程, 进行计算机模拟仿真选优 ($N=21$), 得到 194 481 套方案的模拟结果, 从中筛选出产物得率 ≥ 42.000 的组合方案 358 套, 对 X_i 取值的频率分布进行统计解析。结果可以看出, 当 X_1 在 0.473 1~0.529 1, X_2 在 1.060 6~1.179 6, X_3 在 1.856 9~1.889 5, X_4 在 -1.853 6~-1.815 7 时, 产物得率有 95% 的可能性高于 42.000; 此时, 相应的解码值: 缓冲液 pH 值在 5.24~5.26, 反应温度在 50.30~50.90 °C, 反应时间在 107.14~107.79 min, 酶加入量在 1:5.73~5.92。

2.6 最佳工艺参数确定及回归模型验证

考虑到可操作性及实际生产需要, 将最优水解条件确定为缓冲液 pH 值 5.25 ($X_1=0.5$), 反应温度 50.5 °C ($X_2=1.1$), 反应时间 107.5 min ($X_3=1.875$),

酶加入量 1 : 5.8 ($X_4 = -1.84$)。

为验证上述优选出的工艺,按数据分析得出的最优提取条件进行 3 批验证试验,结果产物得率分别为 36.93%、35.77%、36.49%。由结果可知,在试验所得最佳工艺条件下的产物得率仅为 36.40%,远小于回归模型计算出的数值 $Y_{\text{最佳}} = 42.845\%$,甚至低于试验方案中某些值。

2.7 工艺参数修正试验

回归模型验证试验中,3 个样品均出现大量蓝色絮状物;且第 3 次萃取时,乳化现象特别严重。笔者认为,以回归模型计算得出的最佳条件不可取。依据对前述各次试验的分析及经验,对上述优化条件进行调整为缓冲液 pH 值 5.25、反应温度 50.5 °C、反应时间 90 min、酶加入量 1 : 10,并以此安排 3 批试验,结果产物得率分别为 34.51%、34.84%、35.43%。调整工艺参数后,产物得率下降了约 1.5%,但试验时间和酶加入量分别由 107.5 min、1 : 5.8 变为 90 min、1 : 10,较多地减少了试验时间和酶加入量;且显著减少了副产物蓝色絮状物的生成,避免了萃取时出现的严重乳化现象,故调整后的工艺更可取。

2.8 水解产物的理化性质及结构鉴定

水解产物为白色针状结晶(CHCl_3),mp 120.0~121.3 °C。与氨基酸类物质一起加热,即显深红色至蓝色,最后生成蓝色絮状物并沉淀;能使皮肤染成蓝色。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (s, H-3), 5.88 (s, H-7), 4.81 (d, $J = 8.5$ Hz, H-1), 4.32 (d, $J = 13.2$ Hz, H-10), 4.29 (d, $J = 13.2$ Hz, H-10), 3.74 (s, $-\text{OCH}_3$), 3.22 (ddd, $J = 9.5, 8.5, 8.5$ Hz, H-5), 2.89 (ddt, $J = 16.8, 8.5, 1.4$ Hz, H-6), 2.53 (ddd, $J = 8.5, 8.5, 1.5$ Hz, H-9), 2.07 (ddt, $J = 16.8, 9.5, 1.8$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 168.0 ($-\text{COO}-$), 152.6 (C-3), 141.9 (C-8), 131.0 (C-7), 110.6 (C-4), 96.3 (C-1), 61.2 (C-10), 51.3 ($-\text{OCH}_3$), 48.0 (C-9), 39.0 (C-6), 36.7 (C-5)。由上可知,水解产物的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与文献报道基本一致^[6],证明该产物为栀子苷元。

2.9 水解产物的纯度检验

参照卢毅等^[7]测定栀子苷元的条件:色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水 (15 : 85),体积流量为 1.0 mL/min,检

测波长为 238 nm,柱温为 30 °C,进样量为 10 μL 。

精密称取水解产物适量,置 25 mL 量瓶中,加色谱甲醇适量,超声溶解,冷却后色谱甲醇定容,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按上述色谱条件进样分析,结果供试品为单峰,保留时间为 23.975 min,分离度为 48.389,理论塔板数按栀子苷元计为 17 689.898;面积归一化得质量分数为 99.6%。

3 讨论

本实验通过二次通用旋转试验设计优化了苦杏仁酶水解栀子苷的工艺参数,并根据实验数据建立了回归模型;失拟检验、拟合检验以及复相关系数计算结果均表明,该回归方程与实际情况拟合良好,正确反映了产物得率与缓冲液 pH 值、反应温度、反应时间和酶加入量的关系。依据试验模型,通过 MATLAB 编程,进行计算机模拟仿真选优;再对 X_i ($i=1, 2, 3, 4$) 取值的频率分布进行解析,从而得出了最佳水解工艺参数。

但验证试验结果表明,最佳工艺条件下的产物得率仅为 36.40%,远小于以回归模型计算出最佳值 $Y_{\text{最佳}} = 42.845\%$,且实验过程中出现大量副产物。因此,对最佳工艺参数进行调整,并对调整后的新工艺进行验证。结果表明,调整工艺后的产物得率虽然略低于前述最佳工艺,但可以明显减少试验时间和酶加入量,显著减少试验副产物蓝色絮状物的生成,避免了萃取时出现的严重乳化现象。

参考文献

- [1] 霍蕾,苏建,沈竞,等. 京尼平苷的微生物转化研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 70-73.
- [2] 郑礼胜,刘向前. 京尼平苷的酶解工艺及其产物的降糖活性研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [3] 潘丽军,陈锦权. 试验设计与数据处理 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2008.
- [4] Montgomery D C. 实验设计与分析 [M]. 傅珏生,张健,王振羽,译. 北京: 人民邮电出版社, 2009.
- [5] 卢恩双,宋世德,郭满才. 回归通用旋转设计的几个问题 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(5): 110-113.
- [6] Djerassi C, James A N, Zalkow L H, et al. The structure of genipin [J]. *Org Chem*, 1961, 26: 1192-1206.
- [7] 卢毅,张彤,陶建生. β -葡萄糖苷酶水解栀子苷的工艺研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(3): 76-78.