

二次通用旋转组合法优化黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的酶解提取工艺

包旭宏^{1,2}, 王继龙¹, 魏舒畅^{1*}, 高建德¹, 范凌云¹

1. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃奇正藏药有限公司, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 采用二次通用旋转组合法设计优化黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素的酶解提取工艺。**方法** 在确定酶比例的基础上, 选定复合酶用量、酶解时间、加水量和提取时间为考察因素, 以毛蕊异黄酮苷、芒柄花素提取量为指标, 采用二次通用旋转组合法设计优化黄芪酶解提取工艺。**结果** 优化所得黄芪酶解提取的最佳工艺条件: 复合酶用量 340 mg, 酶解时间 110 min, 加水量 19 倍, 提取时间 150 min, 在此条件下, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花素提取量分别为 0.25 mg/g、67.95 μg/g。**结论** 优化所得黄芪酶解提取工艺稳定可行。

关键词: 黄芪; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花素; 酶解; 提取; 二次通用旋转组合法设计

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)18 - 2641 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.013

Enzymatic extraction process of calycosin glucoside and pormononetin in *Astragali Radix* with quadratic general rotary unitized design

BAO Xu-hong^{1,2}, WANG Ji-long¹, WEI Shu-chang¹, GAO Jian-de¹, FAN Ling-yun¹

1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Cheezheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective The technological conditions for enzymatic extraction of calycosin glucoside and formononetin in *Astragali Radix* were optimized by using quadratic general rotary unitized design. **Methods** On the base of single factors experiments, main factors that affecting the extraction efficiency, such as enzyme dosage, enzymatic hydrolysis time, adding water volume, and extraction time were selected. With the content of calycosin glucoside and formononetin as evaluation index, the process of enzymatic extraction of *Astragali Radix* was optimized by using quadratic general rotary unitized design. **Results** The optimum enzymatic extraction process was as follows: enzyme dosage 340 mg, enzymatic hydrolysis time 110 min, adding water volume 19 times, and extraction time 150 min. Under these optimum conditions, the content of calycosin glucoside was 0.25 mg/g, and formononetin was 67.95 μg/g. **Conclusion** The optimum enzymatic extraction process of *Astragali Radix* is stable and feasible.

Key words: *Astragali Radix*; calycosin glucoside; formononetin; enzymatic hydrolysis; extraction; quadratic general rotary unitized design

黄芪药材来源于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1]。具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效。作为甘肃省大宗道地药材, 其医疗、保健功用而深得各界信任。

用酶解法提取中药材可减小传质阻力, 有效提高成分提取率、缩短提取时间, 而且由于酶解条件

温和, 可保持天然产物的构象^[2-3]。黄芪为纤维性根茎类药材, 造成传质阻力的物质除纤维素外尚有半纤维素、果胶等物质。本实验用复合酶酶解黄芪药材, 更有利于有效成分提取。

二次通用旋转组合法设计因具有旋转性, 可克服正交、均匀等实验设计方法的不足, 因此, 广泛应用于科学研究^[4]。本实验以黄芪中异黄酮类物质毛蕊异黄酮苷及芒柄花素提取量为指标, 采用二次通

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81060345)

作者简介: 包旭宏 (1976—), 男, 高级工程师, 硕士生导师, 主要从事中药新药研究。Tel: (0931)8558428 E-mail: bxh@qzh.cn

*通信作者 魏舒畅, 男, 教授, 硕士生导师。Tel: (0931)8765391 E-mail: zhiyao@gszy.edu.cn

用旋转组合设计对复合酶提取其中毛蕊异黄酮苷及芒柄花素的工艺条件进行优化, 研究结果对纤维性根茎类药材中的黄酮类物质酶解提取工艺具有参考意义。

1 仪器与材料

Agilent1260 型高效液相色谱仪, 配 G1312C 泵、G1315D 型 DAD 检测器、G1329B 型自动进样器、G1316A 型柱温箱和 1260 色谱工作站(美国 Agilent 公司); ABT100—5M 分析天平(德国 KERN 公司); AKRY—UP—1816 超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

药材黄芪(来源于甘肃武都), 经甘肃中医药大学药学系魏舒畅教授鉴定, 为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; 毛蕊异黄酮苷对照品(批号 111920-201203)、芒柄花素对照品(批号 111703-200602), 中国食品药品检定研究院; 纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶, 甘肃华羚生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定方法的建立

2.1.1 色谱条件^[5] 色谱柱为 Theromo BDS Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 260 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈-0.3% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序为 0~12 min, 20%~37% 乙腈; 12~16 min, 37%~40% 乙腈; 16~22 min, 40%~50% 乙腈; 22~30 min, 50%~80% 乙腈; 30~35 min, 80%~20% 乙腈。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定毛蕊异黄酮苷 2.39 mg 置于 5 mL 量瓶中, 芒柄花素 1.52 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解稀释至刻度, 制得各单一对照品溶液, 分别量取不同体积单一对照品溶液, 混合稀释制成系列浓度混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 按不同工艺条件, 分别向 100 g 黄芪中加入 4 倍量水, 再加入一定量的酶搅匀, 于 50 °C 酶解一定时间后加热灭活 10 min, 补水并回流, 抽滤, 滤液浓缩至每 1 mL 浓缩液相当于 0.25 g 原药材, 精密吸取浓缩液 10 mL, 用醋酸乙酯萃取(20 mL×3), 合并醋酸乙酯萃取液, 水浴挥干溶剂, 剩余物用甲醇溶解定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系的考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 分别精密进样 10 μL, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积对进样量进行线性回归, 得回归方程: 毛蕊异黄酮苷 $y=1\ 585.8x+11.002$, 线性范围 23.9~4 780.0 ng, $r=0.999\ 9$; 芒柄花素 $y=3\ 271.4x+8.778\ 2$, 线性范围 7.6~1 520.0 ng, $r=0.999\ 9$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液连续进样 6 次, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 0.86%、1.04%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 精密进样 10 μL, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花素峰面积的 RSD 分别为 0.47%、0.31%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.3”项下依法平行制备 6 份供试品, 分别进样 10 μL, 毛蕊异黄酮苷、芒柄花素质量分数的 RSD 分别为 0.96%、0.77%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已测定的黄芪药材(1.25 g) 6 份, 同法制成供试品溶液, 分别精密加入一定量的对照品(毛蕊异黄酮苷、芒柄花素)。按“2.1.3”项下方法处理, 并按上述色谱条件测定, 计算回收率。毛蕊异黄酮苷、芒柄花素的平均回收率分别为 99.27%、99.63%, RSD 分别为 1.88%、1.41%。

2.2 酶使用比例的确定

固定水提取工艺条件(总加水量 18 倍, 提取时间 120 min, 提取 3 次), 分别考察纤维素酶、果胶酶和木聚糖酶用量(0、50、100、200、400 mg, 酶解 2 h)对黄芪中毛蕊异黄酮苷和芒柄花素提取量的影响。结果显示, 随着酶用量的增加, 毛蕊异黄酮苷和芒柄花素提取量均不断增大, 当纤维素酶用量为 100 mg、果胶酶与木聚糖酶用量分别为 200 mg 时, 二者提取量均达到最高, 继续增加酶用量, 提取量均反而下降。因此确定纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶的质量比为 1:2:2。

2.3 二次通用旋转组合设计优化试验^[6-8]

2.3.1 数学模型的建立与显著性检验 根据单因素试验结果, 确定 3 种酶组成的复合酶用量的零水平, 选定复合酶用量(x_1)、酶解时间(x_2)、加水量(x_3)和提取时间(x_4) 4 个因素, 以毛蕊异黄酮苷提取量(y_1)和芒柄花素提取量(y_2)为指标, 采用 4 元(1/2 实施)2 次通用旋转组合设计优化

黄芩酶解提取工艺, 试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

根据试验结果计算出拟合方程的各项系数, 从而得到 y_1 及 y_2 的回归方程 $y_1=0.231\ 3+0.032\ 8\ x_1+0.014\ 5\ x_2+0.013\ 2\ x_3-0.001\ 4\ x_4-0.012\ 3\ x_1^2-$

$0.018\ 1\ x_2^2+0.003\ 0\ x_3^2-0.001\ 3\ x_4^2+0.005\ 8\ x_1x_3-0.005\ 3\ x_1x_4$; $y_2=63.298\ 7+5.598\ 5\ x_1+3.720\ 9\ x_2+5.427\ 2\ x_3-0.094\ 2\ x_4-3.960\ 2\ x_1^2-2.439\ 9\ x_2^2-5.176\ 4\ x_3^2-2.148\ 2\ x_4^2+2.233\ 8\ x_1x_2-2.203\ 8\ x_1x_3-1.286\ 3\ x_1x_4$ 。

表 1 二次通用旋转组合设计试验与结果

Table 1 Design and results of quadratic general rotary unitized method

试验号	x_1 / mg	x_2 / min	x_3 / 倍	x_4 / min	y_1 / (mg·g ⁻¹)	y_2 / (μg·g ⁻¹)
1	150 (-1)	60 (-1)	15 (-1)	90 (-1)	0.14	34.43
2	150 (-1)	60 (-1)	21 (1)	210 (1)	0.17	50.86
3	150 (-1)	120 (1)	15 (-1)	210 (1)	0.17	37.53
4	150 (-1)	120 (1)	21 (1)	90 (-1)	0.19	51.14
5	350 (1)	60 (-1)	15 (-1)	210 (1)	0.19	44.22
6	350 (1)	60 (-1)	21 (1)	90 (-1)	0.26	54.16
7	350 (1)	120 (1)	15 (-1)	90 (-1)	0.24	58.58
8	350 (1)	120 (1)	21 (1)	210 (1)	0.26	61.05
9	82 (-1.682)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.15	43.28
10	418 (1.682)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.25	62.55
11	250 (0)	40 (-1.682)	18 (0)	150 (0)	0.15	49.43
12	250 (0)	140 (1.682)	18 (0)	150 (0)	0.21	65.00
13	250 (0)	90 (0)	13 (-1.682)	150 (0)	0.23	40.06
14	250 (0)	90 (0)	23 (1.682)	150 (0)	0.25	58.89
15	250 (0)	90 (0)	18 (0)	50 (-1.682)	0.22	57.04
16	250 (0)	90 (0)	18 (0)	250 (1.682)	0.23	59.04
17	250 (0)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.23	62.06
18	250 (0)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.24	63.47
19	250 (0)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.22	62.37
20	250 (0)	90 (0)	18 (0)	150 (0)	0.24	63.38

由表 2 结果可知, y_1 回归方程的失拟性检验 $F_1=1.354\ 7 < F_{0.05}(5, 3)=9.01$ 不显著, 说明未知因素对实验结果干扰很小; 显著性检验 $F_2=24.630\ 1 > F_{0.01}(11, 8)=5.74$ 极显著, 说明模型的预测值与实测值拟合很好。单因素中, 仅 x_4 不显著, 其他几个因素的分析均达到了显著水平; 剔除 $\alpha=0.10$ 的不显著项后得回归方程 $y_1=0.231\ 3+0.032\ 8\ x_1+0.014\ 5\ x_2+0.013\ 2\ x_3-0.012\ 3\ x_1^2-0.018\ 1\ x_2^2$ 。

由表 2 结果可知, y_2 回归方程的失拟性检验 $F_1=8.675\ 9 < F_{0.05}(5, 3)=9.01$ 不显著, 说明未知因素对实验结果干扰很小; 显著性检验 $F_2=53.073\ 2 > F_{0.01}(11, 8)=5.74$ 极显著, 说明模型的预测值与实测值拟合很好。单因素中, 仅 x_4 不显著, 其他几个因素的分析均达到了显著水平; 剔除 $\alpha=0.10$ 的不

显著项后得回归方程 $y_2=63.298\ 7+5.598\ 5\ x_1+3.720\ 9\ x_2+5.427\ 2\ x_3-3.960\ 2\ x_4-2.439\ 9\ x_1^2-2.439\ 9\ x_2^2-5.176\ 4\ x_3^2-2.148\ 2\ x_4^2+2.233\ 8\ x_1x_2-2.203\ 8\ x_1x_3$ 。

2.3.2 单因素效应分析 根据试验结果对单因素进行效应分析, 结果见图 1。

由图 1-A 可知, x_1 对 y_1 影响最大, 其次是 x_2 , x_4 对 y_2 影响最小。 y_1 随着各因素 (提取时间除外) 取值的增加而增加, 当酶解时间编码值达到 0.500 时, y_1 随酶解时间编码值的增大反而下降。

由图 1-B 可知, x_3 对 y_2 影响最大, 其次是 x_1 , x_4 对 y_2 影响最小。随着各因素取值的增加, y_2 也随之增加, 当 y_2 达到最高时, 继续增加对应各因素的取值, y_2 反而下降。

2.3.3 y_2 的交互作用效应分析 由表 2 方差分析结

表 2 y_1 和 y_2 方差分析
Table 2 Analysis of variance for y_1 and y_2

变异来源	y_1					y_2						
	平方和	自由度	均方	偏相关	F 值	P 值	平方和	自由度	均方	偏相关	F 值	P 值
x_1	0.009 0	1	0.009 0	0.960 7	89.748 5	0.000 1	263.935 4	1	264.830 9	0.959 8	89.976 4	0.000 1
x_2	0.001 8	1	0.001 8	0.892 0	18.028 7	0.002 9	117.996 5	1	118.514 2	0.936 8	40.095 7	0.000 2
x_3	0.001 5	1	0.001 5	0.854 4	14.668 2	0.004 8	252.699 5	1	251.116 9	0.977 2	85.879 0	0.000 1
x_4	0.000 0	1	0.000 0	-0.171 9	0.153 7	0.692 3	0.076 7	1	0.077 1	-0.072 8	0.026 2	0.883 3
x_1^2	0.001 3	1	0.001 3	-0.842 3	13.225 8	0.006 4	135.266 6	1	135.283 0	-0.923 6	46.091 2	0.000 1
x_2^2	0.002 9	1	0.002 9	-0.918 1	29.096 5	0.000 7	52.013 0	1	52.002 2	-0.868 9	17.733 9	0.002 7
x_3^2	0.000 1	1	0.000 1	0.363 7	0.773 8	0.406 3	233.388 5	1	232.843 0	-0.946 1	79.223 1	0.000 1
x_4^2	0.000 0	1	0.000 0	-0.168 4	0.148 6	0.702 5	40.760 6	1	40.687 4	-0.848 9	13.915 3	0.005 6
x_1x_2	0.000 0	1	0.000 0	-0.074 4	0.028 1	0.875 1	24.892 7	1	24.828 4	0.791 6	8.489 5	0.019 2
x_1x_3	0.000 2	1	0.000 2	0.500 8	1.654 3	0.236 3	24.429 7	1	24.501 1	-0.793 7	8.337 7	0.020 7
x_1x_4	0.000 1	1	0.000 1	-0.474 8	1.407 1	0.279 5	8.097 6	1	8.139 4	-0.589 8	2.772 2	0.128 5
回归	0.026 9	11	0.002 5	$F_2=24.630 1$		0.000 1	1 717.697 0	11	156.291 0	$F_2=53.073 2$		0.000 1
剩余	0.000 8	8	0.000 1			0.331 7	23.861 2	8	2.977 2			
失拟	0.000 6	5	0.000 1	$F_1=1.354 7$			21.265 1	5	4.264 9	$F_1=8.675 9$		0.004 2
误差	0.000 2	3	0.000 1				1.475 2	3	0.495 1			
总和	0.028 0	19					1 685.893 1	19				

x_2x_3 与前面因子 x_1x_4 线性相关, x_2x_4 与前面因子 x_1x_3 线性相关, x_3x_4 与前面因子 x_1x_2 线性相关

There is a linear correlation between x_2x_3 and x_1x_4 , x_2x_4 and x_1x_3 , x_3x_4 and x_1x_2 , respectively

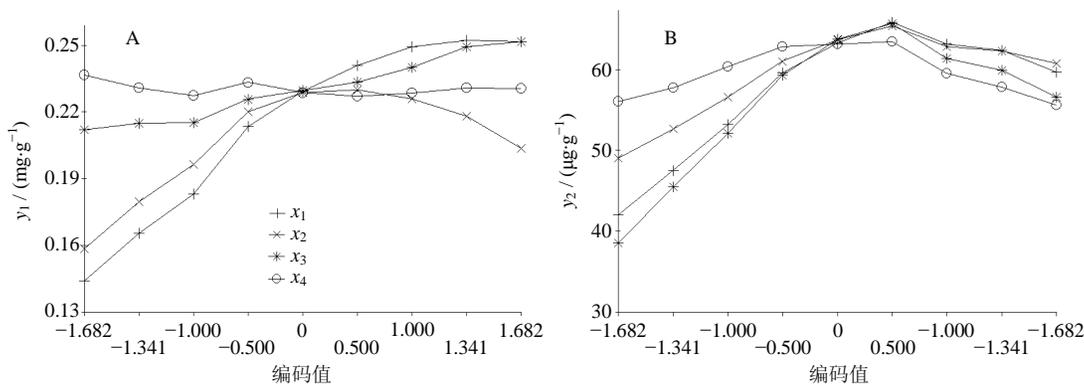


图 1 各单因素与毛蕊异黄酮苷 (A) 和芒柄花素 (B) 提取量的关系

Fig. 1 Relationship of each single factor to extraction amounts of calycosin glucoside (A) and formononetin (B)

果可知, 存在交互作用且达到显著水平的有 x_1x_2 和 x_1x_3 , 因此仅对此二组交互作用的因素作效应分析。选取 2 个因素的零水平, 考察另 2 个因素的交互作用, 分别作图可以直观地分析各因子间的互作效应, 结果见图 2。

由图 2-A 可以看出, 在 x_2 一定时, 增加 x_1 即可提高芒柄花素的提取量, 但在不同酶解时间时, 其变化趋势是不同的, 当酶解时间较短时, y_2 随着酶用量的增加呈先增大后减小趋势; 而当酶解时间延

长时, y_2 随着酶用量的增加而迅速增大, 当达到最大值后进一步增加酶用量对 y_2 的影响较小。两者的相互影响表明, 选取适宜的酶用量和酶解时间可使芒柄花素的量有较大提高。

由图 2-B 可以看出, y_2 随着 x_1 和 x_3 的增加而增加, 当达到最大值后, 进一步增加酶用量和加水量, y_2 反而逐渐降低。

2.3.4 提取工艺的优化与验证 由试验结果分析可知, 在试验中不但存在着单因素效应, 而且还有因

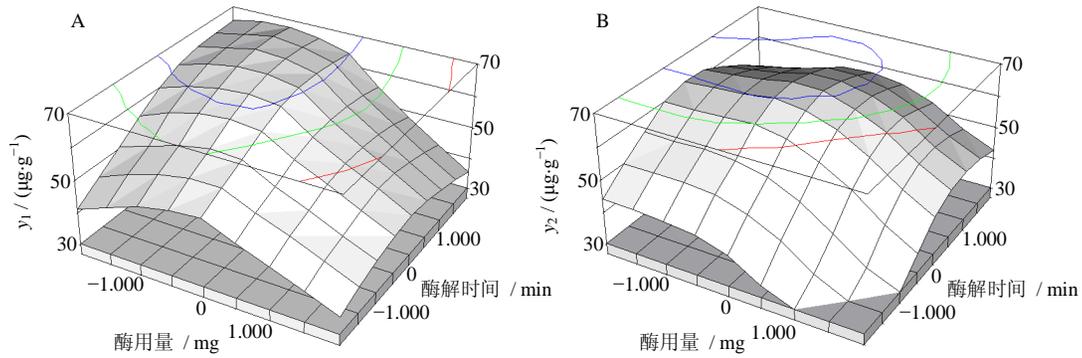


图 2 酶用量与酶解时间 (A) 和加水量 (B) 交互作用效应

Fig. 2 Interaction effect of enzyme dosage with enzymatic hydrolysis time (A) and additive quantity of water (B)

素间的交互作用，因此很难从单因素效应和交互作用的结果分析中找到最佳提取条件，且 4 元 2 次回归的数学模型不存在提取量函数的极大值。本实验采用频率分析法分别分析各回归模型以找到最佳提取条件，结果见表 3。

由表 3 可知在 95% 的置信区间 y_1 大于 0.21 mg/g、 y_2 大于 53.93 $\mu\text{g/g}$ ，鉴于二者提取量并考虑到实际操作性，将最优提取条件定为复合酶用量 340 mg、酶解时间 110 min、加水量 19 倍、提取时间 150 min。

表 3 毛蕊异黄酮苷和芒柄花素提取相关各变量取值的频率分布

Table 3 Probability distribution of each relative variable of calycosin glucoside and formononetin

水平	毛蕊异黄酮苷								芒柄花素							
	x_1		x_2		x_3		x_4		x_1		x_2		x_3		x_4	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-1.682	0	0.000 0	0	0.000 0	20	0.086 6	46	0.198 8	0	0.000 0	0	0.000 0	0	0.000 0	19	0.133 6
-1.000	0	0.000 0	40	0.173 9	40	0.174 6	46	0.200 8	4	0.028 2	10	0.070 5	21	0.148 4	32	0.225 3
0.000	60	0.261 5	70	0.305 3	50	0.218 7	46	0.200 9	46	0.327 6	39	0.277 4	51	0.364 9	39	0.278 8
1.000	87	0.378 4	71	0.310 6	61	0.267 0	47	0.202 8	51	0.359 8	46	0.328 0	50	0.355 7	31	0.221 4
1.682	85	0.371 3	50	0.217 9	60	0.262 1	46	0.200 6	38	0.269 1	44	0.309 2	17	0.124 3	18	0.131 6
加权均数	0.9751		0.4878		0.3787		0.0000		0.8183		0.7707		0.4161		0.0000	
标准误	0.0421		0.0605		0.0741		0.0823		0.0615		0.0668		0.0687		0.0904	
95%置信区间	0.906~1.076		0.377~0.615		0.234~0.525		-0.160~0.160		0.685~0.926		0.664~0.934		0.290~0.564		-0.182~0.182	
提取条件	340.6~357.6		101.3~108.5		18.7~19.6		140.4~159.6		318.5~342.6		109.9~118.0		18.9~19.7		139.1~160.9	

按照上述提取工艺共 5 批，依法对优化所得工艺进行验证，按“2.1.3”项下方法进行验证，结果毛蕊异黄酮苷、芒柄花素的平均提取量分别为 0.25 mg/g、67.95 $\mu\text{g/g}$ ，RSD 分别为 1.58%、1.29%。结果与预测值（0.26 mg/g、68.44 $\mu\text{g/g}$ ）接近。

3 讨论

黄酮是黄芪所含的一类小分子活性物质，鉴于游离黄酮与黄酮苷在水中的溶解度相差较大，本实验同时选芒柄花素和毛蕊异黄酮苷为指标成分，考察酶解提取工艺各因素对 2 种物质提取量的影响。由于所选 2 种黄酮类物质的溶解性相差较大，因

此，所得工艺条件对黄酮类物质的提取有较高的参考价值。

二次通用旋转组合设计具有旋转性，因其一致精度和需要较少的试验次数等优点而有利于提取工艺条件的优化，但考虑到其能容纳的因素数有限，本实验首先采用单因素法对纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶的比例进行了确定，在此基础上进行的工艺优化则更简便有效。此外，由于 3 种酶的最适酶解温度均为 50 $^{\circ}\text{C}$ ，最适 pH 均与黄芪水提液的 pH 较接近，因此本实验不再对其进行考察。

单因素试验中，2 种物质的提取量均随着酶用

