

响应曲面法(RSM)优化人参皂苷Rh₄和Rk₃的制备工艺

王梓¹, 赵立春², 李伟^{1*}, 刘双利¹, 杨舸¹, 刘志¹, 张连学^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530001

摘要: 目的 以人参皂苷Rh₄(GRh₄)和Rk₃(GRk₃)的生成量作为考察指标, 利用响应曲面法(RSM)优化GRh₄和GRk₃的制备工艺。方法 利用HPLC测定GRh₄和GRk₃的量, 以人参皂苷Rg₁(GRg₁)为底物, 采用高温热裂解, 对影响热裂解的酸浓度、反应温度及时间进行考察, 运用RSM选择最优GRh₄和GRk₃的热裂解工艺条件。结果 经HPLC测定, 根据Design Expert 7.1.6软件预测经高温热裂解GRg₁制备GRk₃和GRh₄的最佳工艺参数: 甲酸浓度为0.02%, 反应温度为116.4℃, 反应时间为2.22 h; 在此条件下GRk₃和GRh₄之和最大为123.56 mg, 得率为61.78%。结论 RSM优化后的高温热裂解条件, 适合大规模制备GRk₃和GRh₄。

关键词: 人参皂苷Rg₁; 响应曲面法; 人参皂苷Rh₄; 人参皂苷Rk₃; 制备工艺; 生成量; 高温热裂解

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)11-2207-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.009

Optimization of preparation process of ginsenosides Rh₄ and Rk₃ by response surface methodology

WANG Zi¹, ZHAO Li-chun², LI Wei¹, LIU Shuang-li¹, YANG Ge¹, LIU Zhi¹, ZHANG Lian-xue¹

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicines, Nanning 530001, China

Abstract: **Objective** To employ the response surface methodology (RSM) to optimize the preparation conditions for ginsenoside Rh₄ (GRh₄) and Rk₃ (GRk₃) using the yields as index. **Methods** High temperature hydrolysis combined with RSM was used to prepare GRk₃ and GRh₄ from ginsenoside Rg₁ (GRg₁), and the reaction conditions were optimized at the same time. **Results** The optimal preparation conditions of GRk₃ and GRh₄ were confirmed using Design Expert 7.1.6 software as follows: acid concentration of 0.02%, reaction temperature of 116.4℃, and reaction time of 2.22 h, respectively. Under the above conditions, the yields of GRk₃ and GRh₄ were 123.56 mg with conversion rate of 61.78%. **Conclusion** The preparation conditions obtained from RSM optimization are suitable for large scale preparation of GRk₃ and GRh₄.

Key words: ginsenoside Rg₁; response surface methodology; ginsenoside Rh₄; ginsenoside Rk₃; preparation artwork; yield; high temperature hydrolysis

人参次级皂苷是人参原有皂苷经过处理后而产生的一类稀有皂苷, 这些处理包括常温酸碱水解、生物酶和土壤微生物降解以及肠内菌代谢等^[1-3]。人参皂苷经高温水解可以产生次级皂苷, 该类皂苷主要是原有皂苷发生脱糖和脱水, 此类次级皂苷又叫“人参热裂解皂苷”^[4-5]。与其他次级皂苷不同, 该

类皂苷均伴随着C-20位的脱水及异构化^[6]。按人参皂苷的2种主要构型而进行分类, 人参二醇型热裂解皂苷包括人参皂苷Rk₁(GRk₁)、Rg₅(GRg₅)和Rz₁(GRz₁)等, 人参三醇型热裂解皂苷包括人参皂苷Rg₆(GRg₆)、F₄(GF₄)、Rk₃(GRk₃)和Rh₄(GRh₄)等^[7-8]。

收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 国家公益性行业科研专项(201303111); 国家自然科学基金资助项目(31201331); 吉林农业大学科研启动基金项目(2016052); 吉林省科技发展计划项目(20160209008YY)

作者简介: 王梓, 女, 博士, 讲师, 主要从事天然产物化学方面研究工作。E-mail: wangzi8020@126.com

*通信作者 李伟, 医学博士, 教授, 硕士生导师。E-mail: liwei7727@126.com

张连学, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: zlxbooksea@163.com

目前关于二醇型人参热裂解皂苷 GRk₁ 和 GRg₅ 药理作用研究较多, 主要包括抗炎、改善记忆、改善胰岛素抵抗及肾保护作用等^[9-11]。此外, 三醇型热裂解皂苷 GRk₃ 能够显著抗 H9C2 大鼠心肌细胞的凋亡和抑制移植瘤生长^[12], 同时, GRh₄ 能够抑制 H22 荷瘤小鼠和 S180 荷瘤小鼠的瘤生长^[13], 是一种有开发潜力的免疫佐剂^[14]。

为了深入开展三醇型人参皂苷热裂解的化学成分及药理活性研究工作, 本实验主要对 GRg₁ 制备热裂解皂苷 GRh₄ 和 GRk₃ 的高温热裂解工艺进行研究, 以期对其他皂苷类成分制备提供理论参考。

1 仪器与材料

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Hypersil ODS2 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 大连依利特有限公司; EYELA-DPE 2110 系列旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; Sartorius BP211D 型电子分析天平, 德国赛多利斯公司; KQ-250DB 型数控超声波清洗器, 昆山超声波仪器有限公司; BXM-30R 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

GRg₁, 由本实验分离制备, HPLC 测定其质量分数>95%, 可用于本实验的高温热裂解研究; GRh₄ 和 GRk₃ 对照品由本实验室自制, HPLC 测定其质量分数均>98.5%。娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团; 色谱乙腈, 美国 Fisher 公司; 其他化学试剂均为分析纯, 北京化工厂。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

准确称取 200 mg GRg₁ 置于三角瓶中, 准确加入一定量含酸水溶液做溶剂, 摇匀后置于高压灭菌锅中, 设定一定的温度, 按一定时间反应。反应结束后, 自然降至室温后, 取出三角瓶, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得供试品溶液, 待进行 HPLC 分析。

2.2 响应曲面法 (RSM) 实验设计

以 GRg₁ 为样本, 进一步利用 RSM 优化人参皂苷热裂解的最佳反应条件。

2.2.1 实验设计 首先, 以 GRk₃ 和 GRh₄ 的生成量为指标, 考察料液比、酸浓度、裂解温度、反应时间、静置时间等的影响, 为响应曲面法试验因素水平的选择提供依据。根据单因素实验设计最终确定了人参热裂解皂苷制备的 3 个主要变量, 即酸浓度 (X₁)、裂解温度 (X₂) 和反应时间 (X₃)。以 GRh₄

和 GRk₃ 的生成量之和作为考察指标, 根据软件并利用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken Design (BBD) 设计评价最优的人参热裂解皂苷制备变量组合, 根据 3 因素 3 水平的变量组合, 软件拟合二元多次回归方程, 确定回归系数, 非线性的数学模型用如下公式表示:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

其中 Y 为响应值, 即人参热裂解皂苷 GRh₄ 和 GRk₃ 生成量之和, β_0 、 β_j 、 β_{jj} 和 β_{ij} 分别为 3 个变量的交互、线性、平方及交互回归系数。 X_i 、 X_j 为编码值, 根据 Design Expert (Trial Version 7.1.6) 软件来评估每一个变量点的响应值及最优的变量组合, 即最优的人参热裂解皂苷制备条件组合。

二元多次回归方程模型的拟合度以 R^2 表示。 F 检验和 P 值用来检查回归系数的显著性, 每次实验重复 3 次, 测定的值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.2.2 人参热裂解皂苷 GRh₄ 和 GRk₃ 的测定 GRg₁ 高温处理后产生的 GRh₄ 和 GRk₃ 采用 HPLC-UV 法测定^[2]。色谱条件: Hypersil ODS2 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水为流动相, 采用梯度洗脱, 即 0~30 min, 30%~40% 水; 30~37 min, 40%~50% 水; 37~45 min, 50%~51% 水; 45~60 min, 51%~55% 水; 60~75 min, 55%~59% 水; 75~80 min, 90%~30% 水; 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温为 30 ℃。用外标法计算人参热裂解皂苷 GRh₄ 和 GRk₃ 的量, 重复 3 次测定, 取平均值。

上述测定方法经方法学考察, 线性关系良好, $r=0.999\ 9$, 重复性, 精密度及稳定性试验 RSD 在 0.35%~0.50%; GRk₃ 和 GRh₄ 的加样回收率在 98.2%~102.3%, RSD<2.0%, 该方法可以用于热裂解产物 GRk₃ 和 GRh₄ 的定量测定。

2.2.3 数据处理 RSM 所获得的数据均通过 ANOVA 分析。模型拟合度的相关系数用 F 检验和 P 值来检验, 其中 $P<0.000\ 1$ 被认为拟合度好, 所有实验重复 3 次, 取平均值, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.3 RSM 优化 GRg₁ 制备 GRk₃ 和 GRh₄

2.3.1 BBD 根据单因素实验结果, 确定影响 GRk₃ 和 GRh₄ 热裂解主要包括酸浓度 (X₁)、裂解温度 (X₂) 和反应时间 (X₃) 3 个变量因素。RSM 分析采用 3 因素 3 水平共 15 个试验点的响应面分析试验。高温热裂解制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的响应面分析试验因素编

码与水平表见表 1。其中 1~12 组为析因实验, 考查各因素对高温热裂解制备 GRk₃ 和 GRh₄ 影响; 13~15 组为中心实验, 用来分析试验操作过程中引起的纯误差。BBD 实验设计与结果见表 1。利用软件 Design-Expert 7.1.6 对表 1 中实验数据进行回归拟合, 可以得到 1 个回归方程。

表 1 BBD 实验设计与结果

Table 1 BBD experimental design and results

试验号	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/h	GRk ₃ +GRh ₄ 生成量/mg	
				实测值	预测值
1	0.01 (-1)	100 (-1)	2 (0)	21.62	29.08
2	0.05 (+1)	100 (-1)	2 (0)	24.51	26.65
3	0.01 (-1)	120 (+1)	2 (0)	99.34	97.15
4	0.05 (+1)	120 (+1)	2 (0)	65.35	57.83
5	0.01 (-1)	110 (0)	1 (-1)	22.61	21.96
6	0.05 (+1)	110 (0)	1 (-1)	25.96	30.59
7	0.01 (-1)	110 (0)	3 (+1)	98.22	93.51
8	0.05 (+1)	110 (0)	3 (+1)	42.58	43.14
9	0.03 (0)	100 (-1)	1 (-1)	20.62	13.76
10	0.03 (0)	120 (+1)	1 (-1)	43.68	46.39
11	0.03 (0)	100 (-1)	3 (+1)	41.69	38.81
12	0.03 (0)	120 (+1)	3 (+1)	98.61	105.44
13	0.03 (0)	110 (0)	2 (0)	101.04	108.02
14	0.03 (0)	110 (0)	2 (0)	110.23	108.02
15	0.03 (0)	110 (0)	2 (0)	110.32	108.02

2.3.2 RSM 设计与结果分析 方差分析的结果见表 2, 由表 2 可知, 模型 $P<0.000\ 1$, 表示模型高度显著, 足以代表响应值 (Y) 与 3 个变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的关系。ANOVA 分析表明决定系数 (R^2) = 0.985 3, 表明计算模型可以解释 98.53% 的实验结果。失拟项 $P=0.060\ 7$, 表明差异不显著 ($P>0.05$), 说明残差均由随机误差引起。模型 $F=52.13$ 说明模型非常显著。调整决定系数 (R^2_{adj}) = 0.966 4, 表明模型仅仅不能对 3.36% 的变异进行解释。此外变异系数 (CV) = 10.32 显示所进行的实验具有准确性和可信性。如表 3 所示, 制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的制备量主要受 X_2 及 X_3 影响 ($P<0.000\ 1$), 其次是 X_1 的影响 ($P=0.003\ 8$)。此外, 可以看出除了 X_2^2 , 其余的二次方参数 X_1^2 和 X_3^2 均显极显著性 ($P<0.000\ 1$)。对于交互项, 对于 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量的影响依次为 X_1X_3 、 X_1X_2 、 X_2X_3 交互作用。

预测的响应值 Y 可以得到如下二元回归方程:

表 2 制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的实验方差分析结果Table 2 Analysis of variance for fitted quadratic polynomial model of preparation of GRk₃ and GRh₄

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	22 628.78	9.00	2 514.31	52.13	<0.000 1	极显著
残差	337.63	7.00	48.23			
失拟项	274.80	3.00	91.60	5.83	0.060 7	不显著
纯误差	62.83	4.00	15.71			

表 3 变量与响应值方差分析

Table 3 Analysis of variance of response variables (Y) and independent variables (X_1 , X_2 , X_3)

变量	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X_1	1	871.53	871.53	18.07	0.003 8
X_2	1	4 925.28	4 925.28	102.12	<0.000 1
X_3	1	3 536.41	3 536.41	73.32	<0.000 1
X_1X_2	1	340.40	340.40	7.06	0.032 6
X_1X_3	1	870.25	870.25	18.04	0.003 8
X_2X_3	1	289.00	289.00	5.99	0.044 2
X_1^2	1	3 682.24	3 682.24	76.34	<0.000 1
X_2^2	1	2 796.72	2 796.72	57.98	0.000 1
X_3^2	1	871.53	871.53	84.69	<0.000 1

$$Y = -3\ 510.37 + 10\ 462.75 X_1 + 58.86 X_2 + 74.24 X_3 - 46.13 X_1X_2 - 737.50 X_1X_3 + 0.85 X_2X_3 - 73\ 931.25 X_1^2 - 0.26 X_2^2 - 31.15 X_3^2.$$

Y 响应值, 即为 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量之和, X_1 、 X_2 和 X_3 分别为影响高温热裂解制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的 3 个变量。

2.3.3 响应曲面分析与优化 将实验获得 15 组实验数据代入软件, 软件自动分析并作 3D 和 2D 响应曲面图, 考察所拟合的响应曲面的形状, 分析 X_1 、 X_2 和 X_3 对高温热裂解制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的影响。一般来讲, 等高线的形状可反映出影响实验的各因素的交互效应的强弱: 等高线呈现椭圆形, 则表示 2 个因素 (变量) 交互作用显著, 而圆形则表示 2 个因素 (变量) 交互作用不显著, 具体分析如下:

从软件分析给出的结果不难看出: X_1 和 X_2 对 GRg₁ 转化制备 GRk₃ 和 GRh₄ 影响最大, 二者差异极显著 ($P<0.000\ 1$); 而 X_1 对二者的生成影响较少, 差异不显著 ($P=0.003\ 8$)。

由图 1-A 可以看出, X_3 不变, X_1 和 X_2 的相互作用。 X_2 对 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量影响极其显著, 与模型方差分析的结果相一致 ($P<0.000\ 1$), 即高温

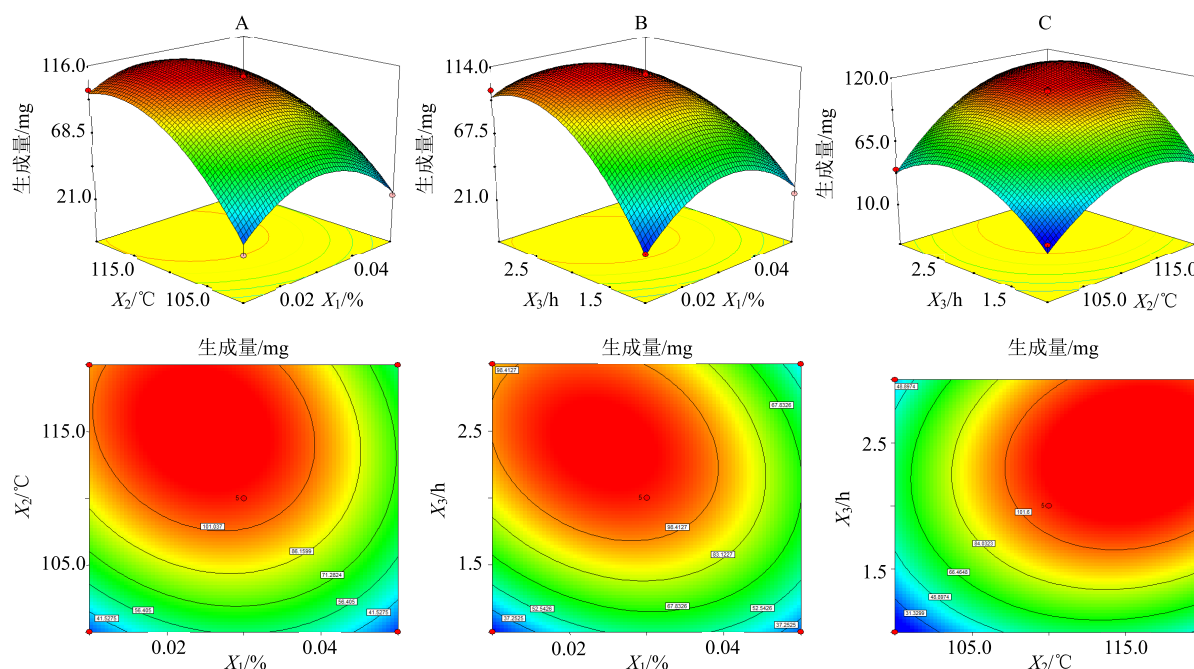


图 1 X_1 、 X_2 和 X_3 对 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量的响应曲面图和等高线图

Fig. 1 Response surface plots and contour plots of three factors affecting yields of GRk₃ and GRh₄

热裂解过程中反应温度影响至关重要。从 3D 响应曲面图可以看出随着 X_2 的升高, GRk₃ 和 GRh₄ 的生成量逐渐增加; 与 X_2 比较, X_1 对 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量影响较小 ($P=0.003\ 8$)。

图 1-B 可以反映了 X_1 与 X_3 的相互作用, 通过模型方差分析和等高线性状可以看出, 二者相互作用差异显著 ($P=0.003\ 8$), 当 X_3 将达到 2.5 h 时, GRk₃ 和 GRh₄ 生成量不再增加, 可能由于二者的转化已经达到最大值, 而随着 X_1 达到 0.03% 时, GRk₃ 和 GRh₄ 生成量达到最大值, 此后, 随着 X_1 的增加, 二者生成量反而下降。

图 1-C 表示反应时间与反应温度之间的相互作用, 二者交互不显著 ($P=0.044\ 2$), 2D 等高线呈圆形, 在 X_3 达到 110 °C 左右的时候, 随着 X_3 的增加, GRk₃ 和 GRh₄ 生成量逐渐增加, 当 X_3 为 2 h 左右时候, GRk₃ 和 GRh₄ 生成量达到最大值, 而后逐渐下降。

2.3.4 验证性实验 根据 Design Expert 软件预测经高温热裂解 GRg₁ 制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的最佳工艺参数为酸浓度为 0.02%, 反应温度为 116.4 °C, 反应时间为 2.22 h, 在此条件下 GRk₃ 和 GRh₄ 之和最大为 123.56 mg, 得率为 61.78%, 结果见表 4。

考虑到实际操作的可性, 将 RSM 优化后的制备工艺条件修正为酸浓度为 0.02%, 反应温度为

表 4 验证性实验结果最优条件下 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量的预测值与实测值

Table 4 Optimum conditions and predicted and experimental values of GRk₃ and GRh₄ quantity at optimum conditions

制备条件	$X_1/\%$	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/h	GRk ₃ 和 GRh ₄ 生成量/mg
优化条件	0.02	116.4	2.22	123.56 (预测值)
实际条件	0.02	120.0	2.20	117.60 (实测值)

120 °C, 反应时间为 2.2 h。为验证结果的可靠性, 采用上述优化出的 GRk₃ 和 GRh₄ 生成量的最佳工艺参数进行 3 次平行实验, 根据结果计算 GRk₃ 和 GRh₄ 的生成量为 (117.60 ± 10.50) mg, 该数值与模型预测值比较接近。结果表明, 利用 RSM 响应面分析法和 BBD 实验设计优化得到的高温热裂解 GRg₁ 制备 GRk₃ 和 GRh₄ 的工艺参数真实可靠, 具有实用价值。

3 讨论

GRg₁ 是三醇型皂苷的典型代表, 具有广泛的药理作用, 如抗老年痴呆及益智、神经保护、抗肿瘤, 通过激活 AMPK 信号通路而增加葡萄糖的利用等^[6,15]。GRg₁ 在高温热处理作用下, 先生成 GRh₁, 随着反应而进一步进行, 发生 C-20 脱水反应而生成 GRk₃ 和 GRh₄^[16]。本实验以 GRg₁ 为反应物, 采用高温高压处理, 对其主要热裂解皂苷 GRk₃ 和 GRh₄

进行分析, 阐释三醇型皂苷高温热裂解规律。

RSM 是近年来发展起来的一种新的多变量统计分析技术^[17]。RSM 可以用于多变量的统计学分析当中, 可以对几个因素的相互影响做出完美的统计学分析。RSM 的分析目标主要是同时优化多变量而去获得最优的系统表现力^[18]。在进行 RSM 分析之前, 应该明确实验设计所需要的相关变量, 并最大程度地找到每个变量的中心点, 从而开展实验设计。RSM 主要应用在工业设计领域。近年来, 由于其出色的表现, 已广泛应用于食品、药品、环境等多领域^[19]。中药提取和分离制备是一个多变量影响的过程, 应用 RSM 分析已经成功解决了多种中药成分的分离、提取及制备工艺^[20-21]。本实验针对人参皂苷热裂解过程中存在多变量共同作用, 对其开展 RSM 的工艺优化, 以期达到最佳的参数组合。

已经明确三醇型人参皂苷 GRg₁ 主要热裂解产物包括 GRk₃ 及 GRh₄ 等成分。本实验以人参单体皂苷 GRg₁ 为其反应物, 进一步明确其产物的类型, 并对其制备工艺涉及到的 3 个变量进行 RSM 拟合分析, 最终确定了最佳的工艺组合。本研究能够为后续人参皂苷热裂解研究提供理论参考。

参考文献

- [1] 于兆慧, 刘其媛, 崔 莉, 等. 微球固定化蜗牛酶转化人参皂苷 Rb₁ 制备人参稀有皂苷 Compound K 研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3092-3097.
- [2] 陈 贺, 宋晓琳, 崔勇虎, 等. 微生物固体发酵提高人参药材中稀有人参皂苷的研究 [J]. 食品科技, 2015, 12(40): 31-34.
- [3] 彭 婕, 刘春莹, 陈 双, 等. 原人参二醇类皂苷 (PPD) 在酶反应中转化动态及其产物稀有皂苷的制备 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 85-94.
- [4] 关大朋, 王 欢, 李 伟, 等. 高温热裂解人参皂苷 Rk₁ 和 Rg₅ 的制备工艺优化 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(1): 91-95.
- [5] 王 梓. 热裂解人参皂苷的分析、制备工艺及抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [6] 金银萍, 郑培和, 郑斯文, 等. 人参皂苷 20(S)-Rg₃, 20(R)-Rg₃, Rg₅, Rk₁ 对照品的制备 [J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(5): 591-594.
- [7] Hwang C R, Lee S H, Jang G Y, *et al.* Changes in ginsenoside compositions and antioxidant activities of hydroponic-cultured ginseng roots and leaves with heating temperature [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(3): 180-186.
- [8] 刘春莹. 酶转化法制备高活性人参稀有皂苷及低聚丹酚酸的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [9] Lee S M. Anti-inflammatory effects of ginsenosides Rg₅, Rz₁, and Rk₁: inhibition of TNF- α -induced NF- κ B, COX-2, and iNOS transcriptional expression [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(12): 1893-1896.
- [10] Hong Y J, Kim N, Lee K, *et al.* Korean red ginseng (*Panax ginseng*) ameliorates type 1 diabetes and restores immune cell compartments [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 225-233.
- [11] Li W, Yan M H, Liu Y, *et al.* Ginsenoside Rg₅ ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Nutrients*, 2016, 8(9), 566; doi:10.3390/nu8090566.
- [12] Sun J, Sun G, Meng X, *et al.* Ginsenoside RK₃ prevents hypoxia-reoxygenation induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via AKT and MAPK pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/690190>.
- [13] 曲 媛, 王承潇, 崔秀明. 人参皂苷 Rh₄ 对小鼠移植性肿瘤的抑制作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 2(5): 782-786.
- [14] Yang Z G, Ye Y P, Sun H X. Immunological adjuvant effect of ginsenoside Rh₄ from the roots of *Panax notoginseng* on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(2): 232-240.
- [15] Bae H J, Chung S I, Lee S C, *et al.* Influence of aging process on the bioactive components and antioxidant activity of ginseng (*Panax ginseng* L.) [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(10): H2127-H2131.
- [16] 夏 娟, 张金秋, 阮长春, 等. 天冬氨酸催化人参皂苷 Re 转化制备稀有人参皂苷的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3389-3394.
- [17] 经 纬, 王广基, 孙建国. 人参皂苷 Rg₁ 的药效学和药代动力学研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 3(38): 283-288.
- [18] 赵 亚, 赖小平, 姚海燕, 等. 响应曲面优化超微粉碎参须中人参总皂苷的溶出工艺 [J]. 中药材, 2014, 3(37): 494-498.
- [19] 李娅丽, 张越非, 刘 哲, 等. 响应曲面法优化人参皂苷及多糖微波辅助提取工艺 [J]. 中国医药导报, 2015, 16(12): 42-47.
- [20] 崔文燕, 刘素香, 赵艳敏, 等. 响应曲面法优化黄花败酱总皂苷提取工艺及体外促进肠平滑肌收缩活性 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2078-2083.
- [21] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿 (金青) 的醇沉工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.