

宁娜,韩建军,胡宇莉,等. 响应面法优化蛇床子中蛇床子素的酶法提取工艺[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):169-173.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.046

响应面法优化蛇床子中蛇床子素的酶法提取工艺

宁娜^{1,2}, 韩建军¹, 胡宇莉^{3,4}, 邹宗尧⁴, 郝建生^{1,2}

(1. 铜仁职业技术学院药学院, 贵州铜仁 554300; 2. 贵州省中兽药工程研究中心, 贵州铜仁 554300;
3. 重庆市动物疫病预防控制中心, 重庆 401120; 4. 西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要:采用蛇床子素作为原料,通过酶法从蛇床子中提取蛇床子素,并以蛇床子素提取率为指标,研究料液比、酶种类、酶用量等因素的影响。在单因素试验基础上,选取酶用量、酶解温度、酶解时间以及酶解 pH 值进行了 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计。结果表明,最优提取条件为料液比 1 g:30 mL、酶用量(纤维素酶:果胶酶=1:1) 10.4 mg/g、酶解温度 46 ℃、酶解时间 125 min、酶解 pH 值 4.6,在此条件下蛇床子素的提取率可达 95.13 %。

关键词:蛇床子;蛇床子素;复合酶;提取;响应曲面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0169-05

蛇床子为伞形科植物蛇床 [*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.] 的干燥成熟果实,具有燥湿祛风、杀虫止痒、温肾壮阳之功效,临床上用于阴痒带下、宫冷不孕等症^[1]。蛇床子中含有香豆素类^[2]、酚苷类^[3]、挥发油^[4]等多种化学成分,其中蛇床子素是蛇床子药材的质控成分^[1]。体内药理研究表明蛇床子素具有抗炎^[5]、神经保护^[6]、降血糖^[7]等活性。

目前已报道的从蛇床子中提取蛇床子素的方法主要有乙醇回流法^[8-9]、超声法^[10]、微波法^[11]等。生物酶解技术是通过生物酶破坏植物细胞壁从而促进有效成分提取,该方法具有提取效率高、反应条件温和、专一性强且易于控制等优点^[12-14]。现在越来越多的研究将生物酶解技术应用于中药有效成分的提取中,以达到提高有效成分的提取率、缩短提取时间、减少提取溶剂用量等目的^[15-17]。采用生物酶解技术提取蛇床子中蛇床子素的研究尚未见报道。本研究采用生物酶提取蛇床子中蛇床子素成分,并通过响应面法优化该提取工艺,为蛇床子中蛇床子素的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

蛇床子药材购于河北安国中药材市场,经鉴定为伞形科植物蛇床子 [*Cnidium monnieri* (L.) Cuss.] 的干燥成熟果实;蛇床子素标准品购自中国食品药品检定研究院;纤维素酶(酶活性为 22 000 U/g)购自宁夏和氏璧生物技术有限公司;水为重蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(手动进样器、在线脱气机、四元泵、DAD 检测器和 Agilent ChemStation 色谱工作站),美

国 Agilent 公司生产;SK8200H 超声清洗器,上海科导超声仪器有限公司生产;pHS-3C 精密 pH 计,上海光学仪器厂生产;METTLER AE240 型十万分之一电子天平,德国梅特勒公司生产;RE-2000A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;DK-S26 电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司生产;FZ102 微型植物粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 HPLC 法测定蛇床子素的含量

1.2.1.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C18 柱(5 μm, 4.6 × 250.0 mm²);流动相:乙腈/水(65/35, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:322 nm;进样量:10 μL。该色谱条件下理论塔板数以蛇床子素峰计算不低于 3 000。该色谱条件下测定蛇床子素标准品及蛇床子药材得到的色谱图见图 1。

1.2.1.2 标准曲线的绘制 精密称定蛇床子素对照品 12.5 mg 置于 25 mL 容量瓶中,并用无水乙醇定容至刻度,摇匀,分别精确量取此溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 至 10 mL 容量瓶中,并用无水乙醇定容至刻度,摇匀。分别精密吸取上述所配制的对照品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,按照上述色谱条件测定。以测得的峰面积 y 为纵坐标,以标准品的进样浓度 x (μg/mL) 为横坐标绘制标准曲线。蛇床子素质量浓度在 5 ~ 50 μg/mL 范围时,线性方程为 $y = 18\,467.46x - 3\,362.07$,相关系数 $r = 0.999\,7$,线性良好。

1.2.1.3 蛇床子药材中蛇床子素的含量测定 本研究所用的蛇床子药材按照《中国药典》2010 版一部蛇床子项下方法进行含量测定,表明本试验中所用蛇床子药材中蛇床子素的含量为 1.65%。

1.2.2 蛇床子素的提取及提取率的计算 取干燥的蛇床子药材用中药材粉碎机粉碎,过 40 目筛,取 10 g 蛇床子粉末加入一定量的生物酶后,再按照一定的料液比加入蒸馏水,在一定温度、pH 值条件下酶解一定时间后,过滤,收集提取液,并将所得提取液浓缩后,用无水乙醇定容至 100 mL,备用。用移液管精密吸取上述定容后的蛇床子提取液 0.7 mL 转移至 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,所得溶液经

收稿日期:2015-07-24

基金项目:国家科研平台建设项目(编号:发改高技[2013]2064号);贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(编号:黔人领发[2012]3号);贵州省民族中兽药与生态畜牧业人才基地项目(编号:黔人领发[2013]15号);贵州省铜仁市科技局科研计划(编号:铜仁市研[2012]62号)。

作者简介:宁娜(1984—),女,广西南丹人,博士,副教授,主要从事药用资源利用开发的工作。E-mail:ningnaok@163.com。

0.45 μm 微孔滤膜过滤后,取续滤液 10 μL 按照上述色谱条件进行测定,并根据峰面积计算蛇床子素的提取率。蛇床子素提取率的计算公式:蛇床子素提取率 = 提取出的蛇床子素质量/蛇床子药材中蛇床子素质量 $\times 100\%$ 。

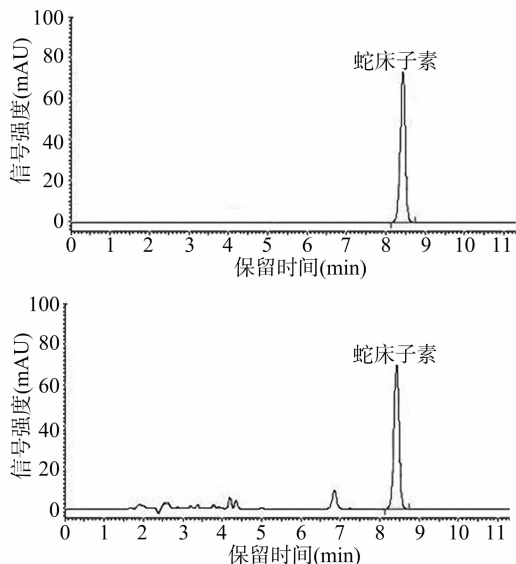


图1 蛇床子中蛇床子素的高效液相色谱

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶种类对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,加 300 mL 蒸馏水,分别加入酶用量为 10 mg/g 的纤维素酶、果胶酶、复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 2:1、1:1、1:2),在酶解 pH 值为 5.0、酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下酶解时间 120 min 后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子素提取率,结果见图 2。

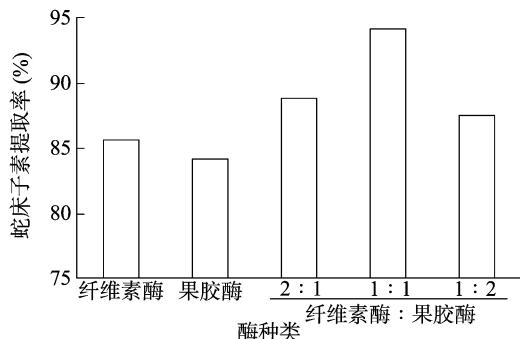


图2 酶种类对蛇床子素提取率的影响

由图 2 可知,与单一酶相比,由不同比例的纤维素酶和果胶酶组合成的复合酶对蛇床子中蛇床子素均有较好的提取效果。当纤维素酶和果胶酶按 1:1 组合用于酶解提取时,蛇床子素的提取率最高,因此选用复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)提取蛇床子素。

2.1.2 料液比对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,按照不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50, g:mL)加入蒸馏水,在复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)用量为 10 mg/g、酶解 pH 值为 5.0、酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下酶解时间 120 min 后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子

素提取率,结果见图 3。

由图 3 可知,料液比小于 1 g:30 mL 时,蛇床子素提取率随着溶剂用量的增加而增大。当料液比为 1 g:30 mL 时蛇床子素提取率达到最大,此后随着溶剂用量的进一步增加,蛇床子素提取率呈下降趋势。这是由于过多的溶剂会使提取溶液中生物酶的有效浓度降低,同时,提取溶剂用量过大也会增加后续浓缩过程的工作量。因此提取溶剂的料液比选定为 1 g:30 mL。

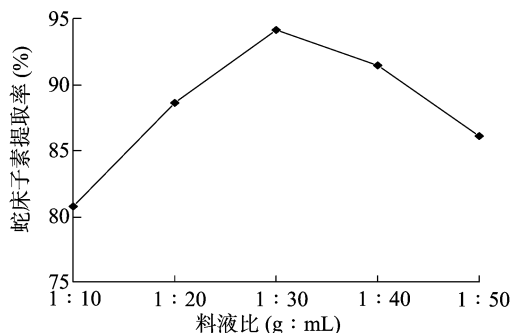


图3 料液比对蛇床子素提取率的影响

2.1.3 酶用量对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,加 300 mL 蒸馏水,加入一定量的由纤维素与果胶酶按 1:1 组合成的复合酶(6、8、10、12、14 mg/g),在酶解 pH 值为 5.0、酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下酶解时间 120 min 后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子素提取率,结果见图 4。

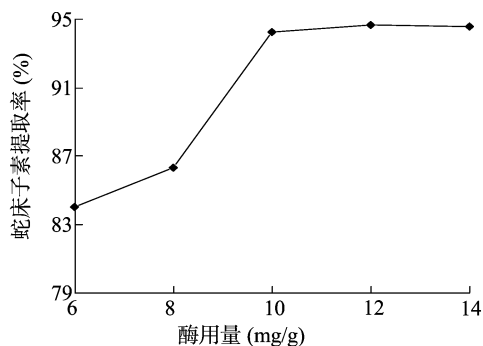


图4 酶用量对蛇床子素提取率的影响

由图 4 可知,酶用量在 6~10 mg/g 时,蛇床子素提取率随酶用量的增加而明显升高,当酶用量超过 10 mg/g 时,蛇床子素提取率增加的趋势有所平缓。因此酶用量宜选择在 10 mg/g 左右。

2.1.4 酶解温度对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,加 300 mL 蒸馏水,复合酶(纤维素酶:果胶酶 = 1:1)用量为 10 mg/g、酶解 pH 值为 5.0,在一定酶解温度(30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$)下酶解 120 min 后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子素提取率,结果见图 5。

由图 5 可知,当酶解温度低于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,蛇床子素提取率随着酶解温度的升高而增加,当酶解温度达到 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,蛇床子素提取率达到最大。随着酶解温度的进一步升高,蛇床子素提取率有所下降。这是因为低于生物酶的最适温度时,温度升高可促进生物酶活性的增强,而高于生物酶的最适温度时可引起酶蛋白的变性,从而降低生物酶的催化活力。因此酶解温度宜选择在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

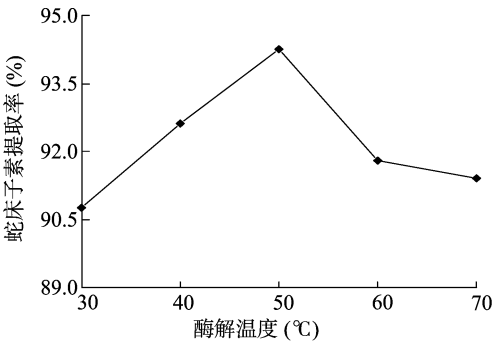


图5 酶解温度对蛇床子素提取率的影响

2.1.5 酶解时间对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,加 300 mL 蒸馏水,在复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1)用量为 10 mg/g、酶解 pH 值为 5.0、酶解温度为 50 ℃ 的条件下酶解一定时间(60、120、180、240、300 min)后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子素提取率,结果见图 6。

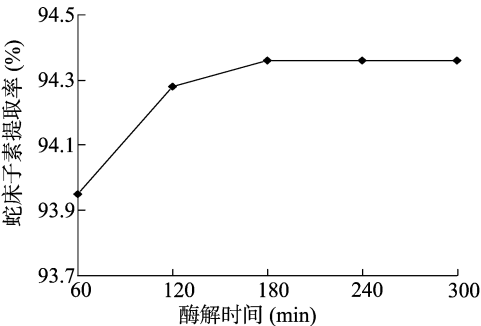


图6 酶解时间对蛇床子素提取率的影响

由图 6 可知,酶解时间在 60~120 min 时,蛇床子素提取率随着酶解时间延长而明显升高。当酶解时间超过 120 min 时,蛇床子素提取率增加的趋势有所平缓。因此酶解时间宜选在 120 min 左右。

2.1.6 酶解 pH 值对蛇床子素提取率的影响 准确称取 10 g 蛇床子粉末,加 300 mL 蒸馏水,复合酶(纤维素酶:果胶酶=1:1)用量为 10 mg/g、酶解 pH 值为 5.0、酶解温度为 50 ℃,在一定 pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0)的条件下酶解 120 min 后,过滤,收集滤液,并计算蛇床子素提取率,结果见图 7。

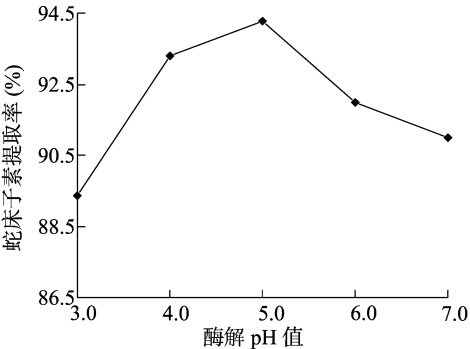


图7 酶解 pH 值对蛇床子素提取率的影响

由图 7 可知,酶解 pH 值在 3.0~5.0 时,蛇床子素提取率随着酶解 pH 值的增大而升高。当酶解 pH 值为 5.0 时,蛇床子素提取率达到最大。此后,随着酶解 pH 值得进一步增大,

蛇床子素提取率呈下降趋势。这是由于酶解 pH 值高于或低于生物酶的最适 pH 值均会影响生物酶的催化活力,从而影响蛇床子素的提取效率。因此最佳酶解 pH 值选在 5.0 左右。

2.2 响应曲面法优化提取工艺

2.2.1 响应曲面优化试验设计 根据上述单因素试验结果,以酶用量(x_1)、酶解温度(x_2)、酶解时间(x_3)和酶解 pH 值(x_4)4 个因素为变量,以蛇床子素提取率(y)为响应值,采用 Box-Behnken 试验设计法对蛇床子中蛇床子素提取工艺进一步进行优化。分析因素及水平编码见表 1,试验方案及结果见表 2。

表 1 不同因素对蛇床子素提取率影响的 Box-Behnken 中心组合设计编码水平

编码水平	x_1 :酶用量 (mg/g)	x_2 :酶解温度 (℃)	x_3 :酶解时间 (min)	x_4 :酶解 pH 值
-1	8	40	60	4.0
0	10	50	120	5.0
1	12	60	180	6.0

表 2 不同因素对蛇床子素提取率影响的 Box-Behnken 试验方案及结果

试验编号	x_1 :酶用量(%)	x_2 :酶解温度(℃)	x_3 :酶解时间(min)	x_4 :酶解 pH 值	蛇床子素提取率(%)
1	10	50	60	4.0	93.49
2	12	60	120	5.0	88.98
3	8	50	60	5.0	85.28
4	10	50	180	4.0	93.65
5	12	50	120	6.0	90.78
6	10	60	120	4.0	92.01
7	12	50	120	4.0	89.63
8	12	40	120	5.0	91.60
9	10	40	120	6.0	91.03
10	10	50	60	6.0	92.09
11	10	40	120	4.0	94.56
12	10	40	180	5.0	94.15
13	10	40	60	5.0	92.83
14	12	50	60	5.0	90.86
15	8	50	120	6.0	85.77
16	10	50	120	5.0	94.97
17	8	50	180	5.0	84.38
18	10	60	180	5.0	93.08
19	10	60	120	6.0	92.75
20	12	50	180	5.0	90.45
21	10	50	120	5.0	95.35
22	10	50	120	5.0	94.63
23	10	50	180	6.0	92.01
24	8	40	120	5.0	84.05
25	8	60	120	5.0	85.94
26	8	50	120	4.0	87.33
27	10	60	60	5.0	91.77

根据表 2 试验结果,通过 Design-Expert 8.0.6 软件拟合得到影响蛇床子素提取率的回归方程: $y = 94.980 + 2.460x_1 - 0.310x_2 + 0.120x_3 - 0.520x_4 - 1.130x_1x_2 + 0.120x_1x_3 + 0.680x_1x_4 - 0.003x_2x_3 + 1.070x_2x_4 - 0.060x_3x_4 - 5.960x_1^2 - 1.250x_2^2 - 1.090x_3^2 - 0.960x_4^2$ 。蛇床子素提取率二次多项

回归模型方差分析结果见表 3。由表 3 数据可知,该数学模型极显著($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P>0.05$),回归方程的复相关系数 R^2 为 0.975 1,校正后的复相关系数 R^2_{Adj} 为 0.946 0,说明模型的回归方程拟合良好,试验结果可靠。模型一次项中 x_4 对蛇床子素提取率影响显著($P<0.05$), x_1 对

蛇床子素提取率影响极显著($P<0.01$);二次项中 x_4^2 对蛇床子素提取率影响显著($P<0.05$), x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2 对蛇床子素提取率影响极显著($P<0.01$);交互项中 x_1x_2 、 x_2x_4 对蛇床子素提取率影响显著($P<0.05$)。

表 3 不同因素对蛇床子素提取率影响的方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	288.35	14	20.6	33.50 **	< 0.000 1
x_1	72.77	1	72.77	118.37 **	< 0.000 1
x_2	1.13	1	1.13	1.85	0.199 3
x_3	0.16	1	0.16	0.27	0.615 6
x_4	3.24	1	3.24	5.28 *	0.040 4
x_1x_2	5.09	1	5.09	8.27 *	0.013 9
x_1x_3	0.06	1	0.06	0.98×10^{-1}	0.760 0
x_1x_4	1.84	1	1.84	2.99	0.109 6
x_2x_3	2.50×10^{-5}	1	2.50×10^{-5}	4.07×10^{-5}	0.995 0
x_2x_4	4.56	1	4.56	7.41 *	0.018 5
x_3x_4	0.14×10^{-1}	1	0.14×10^{-1}	0.23×10^{-1}	0.880 9
x_1^2	189.66	1	189.66	308.52 **	< 0.000 1
x_2^2	8.34	1	8.34	13.57 **	0.003 1
x_3^2	6.33	1	6.33	10.30 **	0.007 5
x_4^2	4.89	1	4.89	7.95 *	0.015 5
残差	7.38	12	0.61		
失拟项	7.12	10	0.71	5.49	0.163 9
纯误差	0.26	2	0.13		
总和	295.72	26			

注:“**”表示极显著水平($P<0.01$),“*”表示显著水平($P<0.05$)。

2.2.2 响应面分析 响应曲面陡峭程度可反映各个因素及因素交互作用对蛇床子素提取率影响的强弱。由图 8 可知,在各个因素中,酶用量对蛇床子素提取率的影响最大,酶解 pH 值的影响次之,酶解温度和酶解时间的影响均较小;交互作用中,酶用量与酶解温度、酶解温度和酶解 pH 值的交互作用对蛇床子素提取率影响较强,而酶用量与酶解时间、酶用量与酶解 pH 值、酶解温度与酶解时间、酶解时间与酶解 pH 值交互作用的影响较弱,与上述方差分析结果一致。

2.2.3 最佳工艺条件及模型验证 经过 Design - Expert 8.0.6 软件分析,结合单因素试验结果,得到酶法提取蛇床子中蛇床子素的最佳工艺条件为料液比 1 g : 30 mL、酶用量(纤维素酶 : 果胶酶 = 1 : 1)10.44 mg/g、酶解温度 45.99 ℃、酶解时间 124.64 min、酶解 pH 值 4.58,蛇床子中蛇床子素的理论提取率为 95.43%。为验证方法的可行性,采用上述条件对蛇床子中蛇床子素进行提取,考虑到试验操作的可控性,将得到的优化条件修正为料液比 1 g : 30 mL、酶用量(纤维素酶 : 果胶酶 = 1 : 1)10.4 mg/g、酶解温度 46 ℃、酶解时间 125 min、酶解 pH 值 4.6,进行 3 组平行试验,测定蛇床子素的实际平均提取率为 95.13 %,试验结果与模型预测相对误差仅为 0.3 %,较为接近,验证了响应曲面法回归模型的合理性。通过本试验结果与已经报道的文献结果^[8-11]对比,可知生物酶解技术可有效提高蛇床子中蛇床子素的提取率,不仅可减少有机溶剂的使用,同时极大地缩短了提取时间,可为工业生产提供参考。

3 结论

通过单因素试验、Box - Behnken 试验设计及响应面分析,得到优化的酶法提取蛇床子中蛇床子素的工艺提取条件为料液比 1 g : 30 mL、酶用量(纤维素酶 : 果胶酶 = 1 : 1)10.4 mg/g、酶解温度 46 ℃、酶解时间 125 min、酶解 pH 值 4.6,在此条件下蛇床子素的提取率可达 95.13 %,

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:295 - 296.

[2] Lee T H, Chen Y C, Hwang T L, et al. New coumarins and anti - inflammatory constituents from the fruits of *Cnidium monnieri*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(6): 9566 - 9578.

[3] Kim S B, Chang B Y, Han S B, et al. A new phenolic glycoside from *Cnidium monnieri* fruits [J]. Natural Product Research, 2013, 27(21): 1945 - 1948.

[4] Chen Q H, Li P, Yuan F J, et al. Identification and quantification of the volatile constituents in *Cnidium monnieri* using supercritical fluid extraction followed by GC - MS[J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(2): 252 - 257.

[5] Wang X L, Shang X, Cui Y, et al. Osthole inhibits inflammatory cytokine release through PPAR α/γ - mediated mechanisms in LPS - stimulated 3T3 - L1 adipocytes[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2015, 37(2): 185 - 192.

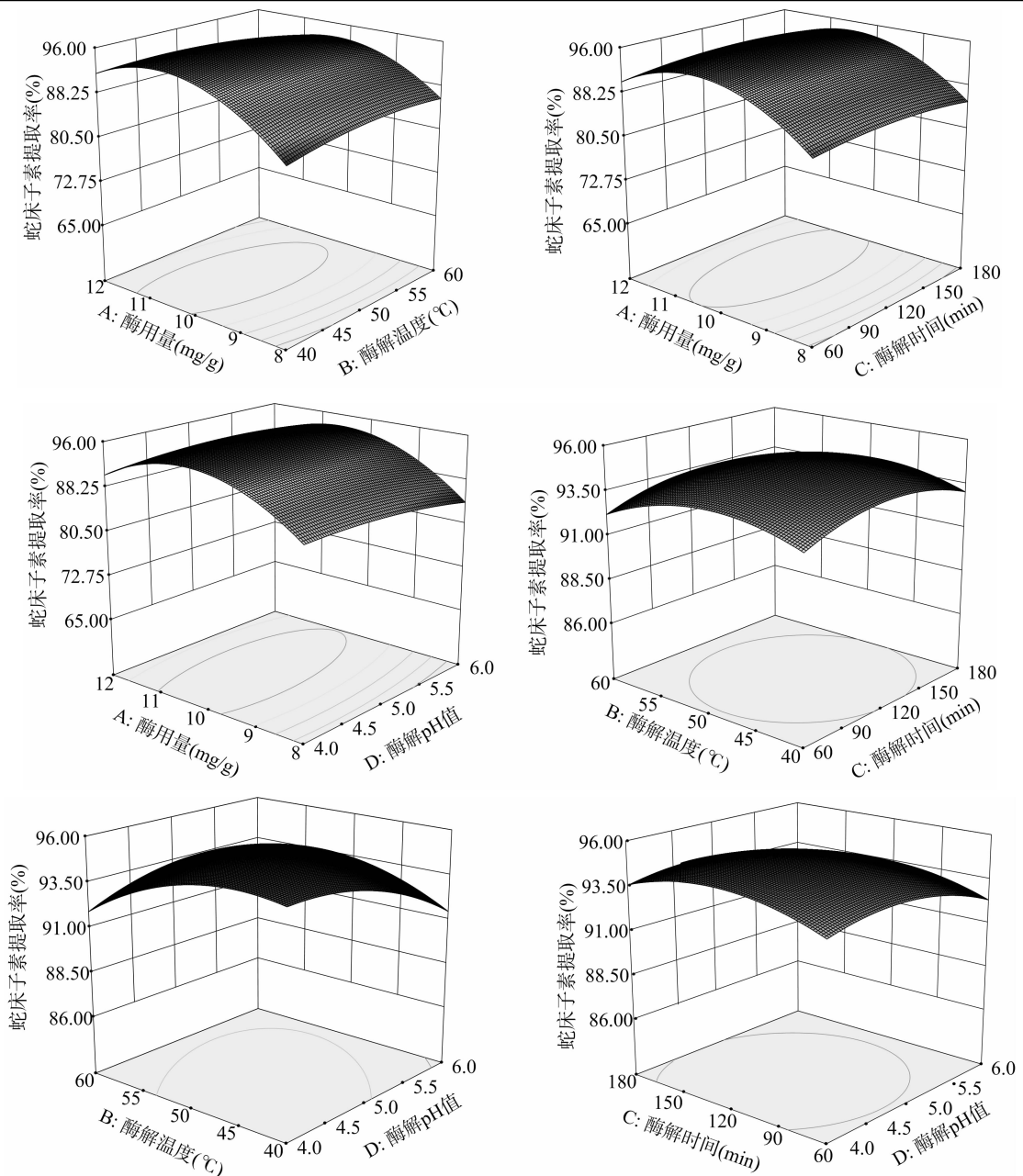


图8 基于响应面曲面法不同因素及相互作用对蛇床子素提取率的影响

- [6] Chen Z W, Mao X X, Liu A M, et al. Osthole, a natural coumarin improves cognitive impairments and BBB dysfunction after transient global brain ischemia in C57 BL/6J mice: involvement of Nrf2 pathway[J]. *Neurochemical Research*, 2015, 40(1): 186–194.
- [7] Lee W H, Wu H H, Huang W J, et al. N-hydroxycinnamide derivatives of osthole ameliorate hyperglycemia through activation of AMPK and p38 MAPK[J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4516–4529.
- [8] 邓洪, 谷丹丹, 阳勇, 等. 蛇床子中蛇床子素提取工艺的优化[J]. *华西药科学*, 2013, 28(1): 106–107.
- [9] 张力, 黄静, 张琦. 响应曲面法优化蛇床子中蛇床子素的提取工艺[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(9): 45–49.
- [10] 王锐, 杨婧, 谢国梁, 等. 超声法联合表面活性剂提取蛇床子中蛇床子素的研究[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(3): 603–604.
- [11] 路强, 王雅梅, 王喜明. 蛇床子素提取方法的研究[J]. *内蒙古农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 31(2): 298–300.
- [12] 高懿萌, 徐愿坚, 杜洪飞, 等. 中药提取新技术的研究进展[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2014(4): 890–894.
- [13] 蔡延渠, 朱盛山, 李润萍, 等. 新型提取联用技术在中药提取中的应用进展[J]. *中成药*, 2011, 33(5): 863–866.
- [14] 刘明言, 王帮臣. 用于中药提取的新技术进展[J]. *中草药*, 2010, 41(2): 169–175.
- [15] 程轩轩, 郭楚楚, 周凤燕, 等. 响应面法优化广金钱草中总黄酮的酶法提取工艺[J]. *华西药科学*, 2015, 30(1): 70–73.
- [16] 何艾, 李维国, 窦志浩, 等. 纤维素酶辅助提取沉香叶黄酮及其抗氧化活性测定[J]. *食品科技*, 2015, 40(5): 233–237.
- [17] 王晓林, 钟方丽, 薛健飞, 等. 酶法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J]. *北方园艺*, 2015, 39(4): 136–139.