

# 响应面法优化加拿大原产地西洋参皂苷的提取工艺研究

许云章, 任焱, 王静霞, 孙美, 赵小燕, 刘圆

(西南民族大学民族医药研究院, 四川成都 610041)

**摘要:** 优化加拿大原产地西洋参皂苷的最佳提取工艺。采用 HPLC-ELSD 法, 在单因素试验基础上, 利用响应面法, 以人参皂苷 Rb1 为响应值, 建立数学模型, 对提取温度、时间、乙醇浓度和料液比进行优化, 确定最佳提取工艺。结果表明: 提取温度为 90 ℃、乙醇浓度 77.4%、提取时间 1.88 h、料液比 1:25、提取 2 次的人参皂苷 Rb1 提取率可达到 1.40%, 与预测值 1.41% 相差不大。

**关键词:** 加拿大; 西洋参; 人参皂苷 Rb1; 响应面法; 提取工艺优化

文章编号: 1673-9078(2013)5-1040-1044

## Optimization of Extraction Process of Ginsenoside from *Panax quinquefolius* L. Collected from Canada by Response Surface Methodology

XU Yun-zhang, REN Ye, WANG Jing-xia, SUN Mei, ZHAO Xiao-yan, LIU Yuan

(Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the extraction process of ginsenoside from *P. quinquefolius* L. collected from Canada. Based on one-factor-at-a-time experiments, extract yield of the ginsenoside-Rb1 was used as response for establishing a quadratic regression model. Temperature and time of extraction, ethanol concentration and liquid-to-solid ratio were selected as the factors for RSM design. The results showed that the best extraction conditions were as follows: extraction temperature 90 ℃, extraction time 1.88 h, ethanol concentration 77.4%, solid-liquid ratio 1:25, and extracted times twice, under which the predicted yield of ginsenoside-Rb1 with the optimized procedure was up to 1.40% and practical yield was 1.41%.

**Key words:** Canada; panax quinquefolium L.; ginsenoside-Rb1; the response surface methodology; optimization of extraction

西洋参 (*Radix panacis quinquefolius*) 为五加科人参属 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根, 又名花旗参, 主产于美国、加拿大<sup>[1-2]</sup>。原野生于北美洲的加拿大南部和美国北部、东部等地区, 分布于北纬 30~47°, 西经 67~125° 的山地森林中, 生长在海拔 2000 m 左右的海洋性气候丘陵地带; 该地区气候偏冷, 原始森林区的土壤肥沃, 富含各种矿物质, 适宜种植西洋参, 被公认为含有很高的人参皂苷和是世界上品质最纯净的西洋参。作者在加拿大西洋参农场实地考察了解到, 与中国国内的人参野生资源“野山参”一样, 加拿大

收稿日期: 2013-01-01

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”(2011ZX09307-002-01); 国家科技支撑计划(2012BA127B07); 国家自然科学基金(81173653); 四川省杰出青年学术技术带头人后续计划(2011JQ0051)

作者简介: 许云章(1988-), 男, 硕士, 研究方向: 民族药物

通讯作者: 刘圆(1968-), 女, 博士, 教授, 从事民族药教学和科研工作

和美国的山地森林中也很难找到野生西洋参, 同样处于濒临灭绝的状态。因此, 目前在国际市场上的西洋参和中国国内的进口西洋参基本上都是加拿大西安大略省和美国威斯康辛州的西洋参农场人工种植的产品; 在中国多省栽培成功, 其中东北三省普遍栽培, 但是公众普遍认为加拿大西安大略省和美国威斯康辛州的西洋参品质优于中国国内引种栽培西洋参, 因此, 在中国国内的西洋参市场上, 进口西洋参的价格远高于中国国产西洋参; 同时国际市场大量需求和高昂的价格, 现在西洋参在北美草药销量排名前十。人参皂苷为西洋参的主要活性成分之一, 目前已分离鉴定的人参单体皂苷有 40 余种, 每种单体皂苷都具有其独特的疗效<sup>[3]</sup>, 中国药典将活性成分人参皂苷 Rg1、Re 和 Rb1 作为西洋参的质量控制指标<sup>[1]</sup>。西洋参皂苷类化学成分的药理活性在国内外研究报道较多<sup>[4-10]</sup>, 表明具有镇静、镇痛、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抗病毒、

保护心脑血管、降低肝损伤、调节免疫功能等。响应面法已被广泛应用于同时存在多因素影响的实验优化上<sup>[11-13]</sup>，但是加拿大原产地西洋参皂苷提取工艺方面鲜有报道，本试验拟对加拿大原产地西洋参皂苷提取工艺进行优化，确定最佳提取工艺，以期为加拿大西洋参开发与利用提供具有指导价值的实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

西洋参根样品自采于加拿大西洋参原产地西安大略省 The Great Mountain Farm, Western Ontario, Canada; 经西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为五加科人参属植物西洋参的干燥根。人参皂苷 Rb1 对照品购于四川省成都市药品检验所; 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。Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 科技有限公司; Alltech 2000 ES 蒸发光散射检测器; N2000 色谱工作站; Diamonsil C18(250×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱(迪马科技有限公司); METTLER AE240S 型电子天平, 梅特勒-托利上海有限公司; 艾柯 AKRY-UP-1824 型超纯水机, 成都康宁实验专用纯水设备厂; HH-2 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; SHZ-D (III) 型循环水真空泵, 天津华鑫仪器厂; DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 检测方法

##### 1.2.1.1 色谱条件

色谱柱: Dimaonsil C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 乙腈-水系统为流动相, 梯度洗脱; 体积流量为 1 mg/mL; ELSD 载气为氮气; 气体流量为 2.8 L/min; 漂移管温度为 100 °C; 进样量为 10 μL。

##### 1.2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取纯度为 99% 的人参皂苷 Rb1 对照品 2.12 mg, 用甲醇溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 制成对照品溶液, 备用。

##### 1.2.1.3 供试品溶液的制备

将西洋参样品粉碎、过 4 号药典筛。精密称取粉末 1.0 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶, 加入石油醚(60~90 °C) 10 mL, 脱脂 30 min, 过滤, 通风橱中挥去溶剂。按料液比 1:30 (m/V) 加入 80% 的乙醇 30 mL, 80 °C 水浴回流 1 h, 过滤, 收集滤液, 滤渣再用 30 mL 80% 乙醇重复提取 1 次, 滤渣用 80% 乙醇 2 mL 洗涤 2 次, 合并滤液。将滤液置于蒸发皿中于 45 °C 挥去溶剂,

吸取适量甲醇溶解残渣, 置于 50 mL 容量瓶中, 再用适量甲醇冲洗蒸发皿 3 次, 合并溶液, 用甲醇定容至刻度, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 得供试品溶液。

##### 1.2.1.4 标准曲线的绘制

分别精密吸取备用的人参皂苷 Rb1 对照品溶液 1、2、4、6、8、10、12 μL, 于 HPLC-ELSD 上测定, 记录峰面积值。以进样量(μg)的自然对数(X)为横坐标, 峰面积值的自然对数(Y)为纵坐标绘制工作曲线。回归方程为:  $Y=1.8613X+6.2387$ ,  $R^2=0.9996(n=7)$ 。线性范围 0.212~2.544 μg, 线性关系良好。

##### 1.2.1.5 方法学考察

###### a. 精密度试验

精密吸取备用的对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 测定人参皂苷 Rb1 的峰面积, RSD 为 0.644% (n=5), 表明精密度良好。

###### b. 稳定性试验

精密吸取备用的对照品溶液 10 μL, 分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 时进样, 测定人参皂苷 Rb1 的峰面积, RSD 为 0.964% (n=7), 表明稳定性良好。

###### c. 重复性试验

取同一批西洋参样品 5 份, 每份 1.0 g, 按供试品制备方法制备供试品溶液, 进样量 10 μL, 测定峰面积, RSD 为 1.190% (n=5)。表明样品重复性良好。

###### d. 加样回收率试验

精密称取西洋参粉末 1.0 g, 制备西洋参供试品溶液, 进样量为 10 μL, 测定峰面积值, 按照已知标准曲线计算该粉末中人参皂苷 Rb1 含量。精密称取已知含量的西洋参粉末 6 份, 每份 1.0 g, 按照供试品制备方法制备, 其中 3 份样品分别加入 0.212 μg 对照品溶液, 另外 3 份分别加入 0.424 μg, 定容为供试品溶液。测定, 结果平均回收率为 100.025%, RSD 为 0.668% (n=6), 加样回收率良好。

### 1.2.2 人参皂苷 Rb1 含量的测定

按照“1.2.1.3 项”下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按照“1.2.1.1 项”下色谱条件, 测定其中人参皂苷 Rb1 的峰面积值, 按照已知标准曲线计算供试品中人参皂苷 Rb1 的含量, 并根据下式计算出西洋参中人参皂苷 Rb1 含量。

人参皂苷 Rb1 含量=(提取人参皂苷 Rb1 质量/西洋参干粉质量)×100%

### 1.2.3 影响提取工艺效果的因素试验设计

#### 1.2.3.1 单因素试验

分别以提取温度、乙醇浓度、提取时间、料液比为影响因素, 研究不同水平下各因素对人参皂苷 Rb1

提取率的影响。

### 1.2.3.2 Box-Behnken 中心组合试验设计

根据单因素实验结果, 采用 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 采用四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子, 以人参皂苷 Rb1 提取率为响应值做响应面与等值线图, 分析优化最佳提取条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 不同提取时间对人参皂苷得率的影响

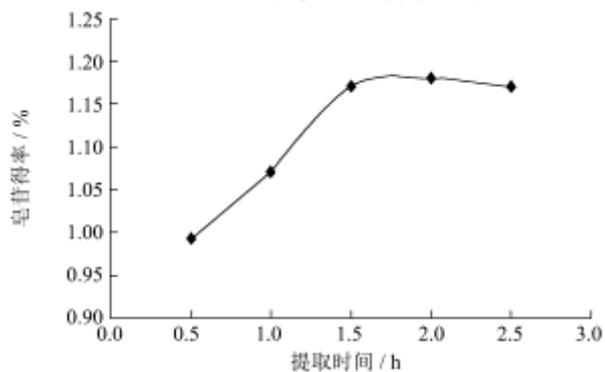


图1 提取时间对皂苷提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on the yield of ginsenoside-Rb1

按照“1.2.1.3 项”下方法, 按照不同提取时间(0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h) 回流提取, 分别制备供试品溶液, 并测定峰面积。人参皂苷 Rb1 含量与提取时间的关系见图 1, 由图 1 可看出, 随着提取时间的增加, 人参皂苷 Rb1 的得率逐渐升高, 当提取时间达到 1.5 h 时达到最大值, 之后再继续增加提取时间, 皂苷得率没有显著变化。因此, 选择提取时间为 1.5 h 最为适宜。综合考虑提取条件对皂苷得率的影响, 中心组合试验选择提取时间范围为 1.0~2.0h。

#### 2.1.2 不同提取温度对人参皂苷得率的影响

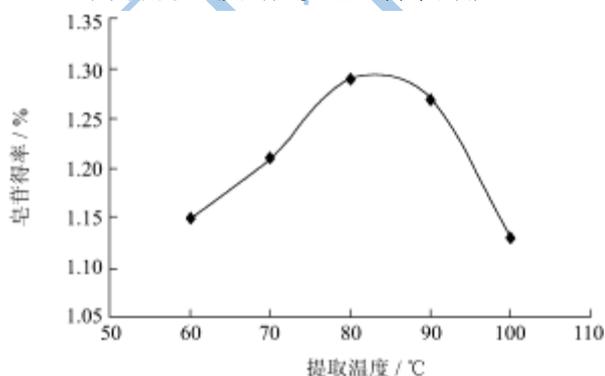


图2 提取温度对皂苷提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on the yield of ginsenoside-Rb1

按照不同提取温度(60 °C、70 °C、80 °C、90 °C、

100 °C) 回流提取 1.5 h, 分别制备供试品溶液, 并测定其测定峰面积。人参皂苷 Rb1 得率与提取温度的关系见图 2。由图 2 看出, 随着提取温度的增加, 人参皂苷 Rb1 的得率逐渐升高, 当提取温度为 80 °C 左右时达到最大值, 之后再继续升高提取温度, 皂苷得率呈下降趋势。因此, 选择提取温度为 80 °C 最为适宜, 中心组合试验选择提取温度为 70~90 °C。

#### 2.1.3 不同乙醇浓度对人参皂苷得率的影响

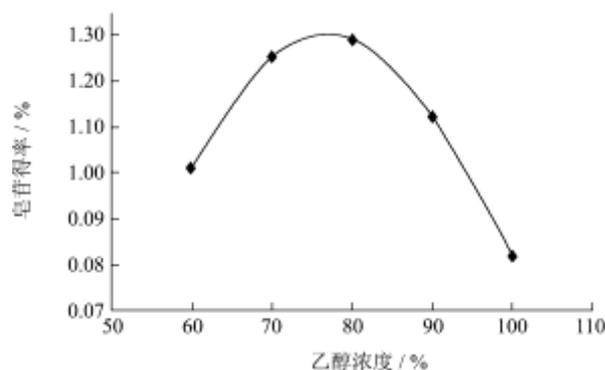


图3 乙醇浓度对皂苷提取率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the yield of ginsenoside-Rb1

按料液比 1:30 加入不同浓度的乙醇(60%、70%、80%、90%、100%) 80 °C 回流提取 1.5 h, 分别制备供试品溶液并测定峰面积。人参皂苷 Rb1 含量与乙醇浓度的关系见图 3。由图 3 可看出, 随着溶液中乙醇浓度的增加, 人参皂苷 Rb1 的得率逐渐升高, 当提取温度为 80 °C 时达到最大值, 之后再继续增加乙醇浓度, 皂苷得率逐渐下降。因此, 选取乙醇浓度为 80% 最为适宜, 中心组合试验选择乙醇浓度范围为 70~90%。

#### 2.1.4 不同料液比对人参皂苷得率的影响

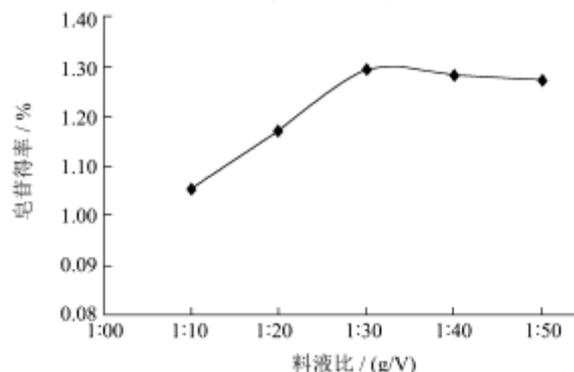


图4 料液比对皂苷提取率的影响

Fig.4 Effect of the solid-liquid ratio on the yield of ginsenoside-Rb1

按不同的料液比(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50) (g:v) 加入浓度为 80% 的乙醇 80 °C 回流 1.5 h, 分别制备供试品溶液并测定峰面积, 人参皂苷 Rb1 得率与

料液比的关系见图 4, 由图可看出, 随着料液比的增加, 人参皂苷 Rb1 的得率逐渐升高, 当料液比为 1:30 时达到最大值, 之后再继续增大料液比, 皂苷得率基本保持不变。因此, 选择料液比为 1:30 最为适宜, 中心组合试验选择料液比为 1:20~1:40。

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、提取时间、料液比四个因素, 采用四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	因素			
	X <sub>1</sub> (提取温度/°C)	X <sub>2</sub> (乙醇浓度/%)	X <sub>3</sub> (提取时间/h)	X <sub>4</sub> [料液比/(m/V)]
-1	70	70	1	1:25
0	80	80	1.5	1:30
1	90	90	2	1:35

2.2.2 响应面分析方案及结果

对人参皂苷 Rb1 提取工艺进行响应面分析, 具体试验方案和结果见下表 2。

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	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	皂苷得率/%
1	-1	-1	0	0	1.14
2	-1	1	0	0	1.12
3	1	-1	0	0	1.24
4	1	1	0	0	1.19
5	0	0	-1	-1	1.25
6	0	0	-1	1	1.21
7	0	0	1	-1	1.26
8	0	0	1	1	1.22
9	-1	0	0	-1	1.18
10	-1	0	0	1	1.17
11	1	0	0	-1	1.30
12	1	0	0	1	1.21
13	0	-1	-1	0	1.20
14	0	-1	1	0	1.22
15	0	1	-1	0	1.17
16	0	1	1	0	1.18
17	-1	0	-1	0	1.16
18	-1	0	1	0	1.17
19	1	0	-1	0	1.24

20	1	0	1	0	1.26
21	0	-1	0	-1	1.24
22	0	-1	0	1	1.19
23	0	1	0	-1	1.21
24	0	1	0	1	1.14
25	0	0	0	0	1.24
26	0	0	0	0	1.24
27	0	0	0	0	1.24
28	0	0	0	0	1.24
29	0	0	0	0	1.25

表中 1~24 为析因试验, 24~29 为中心试验。用 Design Expert 7.1.6 软件对试验结果进行二次回归响应面的分析, 得到二元回归方程为:  $Y=1.24+0.042X_1-0.018X_2+6.667\times 10^{-3}X_3-0.025X_4-7.500\times 10^{-3}X_1X_2+2.500\times 10^{-3}X_1X_3-0.020X_1X_4-2.500\times 10^{-3}X_2X_3-5.000\times 10^{-3}X_2X_4-0.026X_1^2-0.044X_2^2-6.417\times 10^{-3}X_3^2-1.417\times 10^{-3}X_4^2$ 。对该回归模型进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 回归模型方差分析及其系数的显著性检验

**Table 3 Variance analysis for the established regression model and significance test**

来源	自由度	平方和	方差	F 值	P 值	显著性
Model	14	0.050	$3.595\times 10^{-3}$	138.53	$< 0.0001$	**
X <sub>1</sub>	1	0.021	0.021	802.75	$< 0.0001$	**
X <sub>2</sub>	1	$4.033\times 10^{-3}$	$4.033\times 10^{-3}$	155.41	$< 0.0001$	**
X <sub>3</sub>	1	$5.333\times 10^{-4}$	$5.333\times 10^{-4}$	20.55	0.0005	*
X <sub>4</sub>	1	$7.500\times 10^{-3}$	$7.500\times 10^{-3}$	288.99	$< 0.0001$	**
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	$2.250\times 10^{-4}$	$2.250\times 10^{-4}$	8.67	0.0107	*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	$2.500\times 10^{-5}$	$2.500\times 10^{-5}$	0.96	0.3430	
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	1	$1.600\times 10^{-3}$	$1.600\times 10^{-3}$	61.65	$< 0.0001$	**
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	$2.500\times 10^{-5}$	$2.500\times 10^{-5}$	0.96	0.3430	
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	1	$1.000\times 10^{-4}$	$1.000\times 10^{-4}$	3.85	$< 0.0001$	**
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	1	0.000	0.000	0.000	1.0000	
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	$4.527\times 10^{-3}$	$4.527\times 10^{-3}$	174.42	$< 0.0001$	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	0.013	0.013	482.05	$< 0.0001$	**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	$2.671\times 10^{-4}$	$2.671\times 10^{-4}$	10.29	0.0063	*
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1	$1.302\times 10^{-5}$	$1.302\times 10^{-5}$	0.50	0.4904	
残差	14	$3.633\times 10^{-4}$	$2.595\times 10^{-5}$			
失拟项	10	$2.833\times 10^{-4}$	$2.833\times 10^{-5}$	1.42	0.3941	
纯误差	4	$8.000\times 10^{-5}$	$2.000\times 10^{-5}$			
总和	28	0.051				
$R^2=0.9928, R^2_{Adj}=0.9857, R^2_{Pred}=0.9653$						

注: \*P<0.05 为显著; \*\*P<0.0001 为高度显著

结合表 3 可以看出, 模型的 F 值为 138.53, P 值小于 0.0001, 经显著性检验说明二次回归模型高度显著; 模型总决定系数  $R^2=0.9928$ , 调整决定系数

$R^2_{Adj}=0.9857$ , 失拟项不显著, 说明该模型与实际试验的拟合度好,  $R^2_{Pred}=0.9653$ , 说明该模型预测性良好; 一次项  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_4$  对皂苷提取率是极显著的, 二次项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$  对皂苷提取率影响也是极显著地。  $X_3$ 、 $X_3^2$  以及交互项  $X_1X_2$  对皂苷提取率的影响是显著的, 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; 由 F 判断, 在选择范围内, 四个因素对皂苷提取率的影响影响顺序为温度 ( $X_1$ ) > 料液比 ( $X_4$ ) > 乙醇浓度 ( $X_2$ ) > 提取时间 ( $X_3$ )。

### 2.3 因素间的交互影响

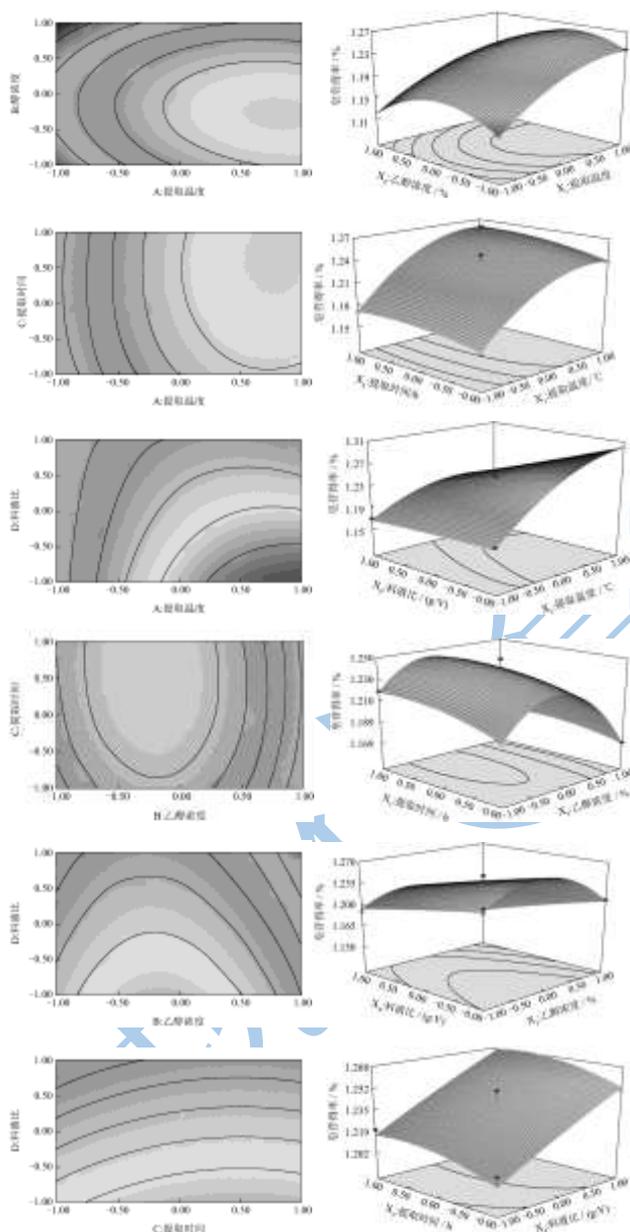


图5 交互因素对人参皂苷 Rb1 提取效果的影响响应面曲线图

Fig.5 Response surface plots showing the effects of interactions of factors on the yield of ginsenoside-Rb1

根据响应面分析方案及结果, 利用 Design-Expert 软件作不同因素的响应面分析图, 见图 5。

分别对回归方程中各变量 ( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ ) 求极值, 得到极值点为  $X_1=1$ 、 $X_2=-0.26$ 、 $X_3=0.76$ 、 $X_4=-1$ , 即在提取温度为  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , 乙醇体积分数为 77.4%, 提取时间 1.88 h, 料液比为 1:25 时, 人参皂苷 Rb1 最大得率的预测值为 1.41%。使用该条件进行验证试验, 平行试验 3 次, 取平均值后得皂苷实际得率为 1.40%, 比预测值稍低 0.01%, 因此该试验模型能较好地预测醇溶法提取加拿大原产地西洋参中人参皂苷 Rb1 的得率。

### 3 结论

3.1 运用响应面法得到最佳的操作工艺为: 提取温度为  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度为 77.4%, 提取时间为 1.88 h, 料液比为 1:25, 在此条件下, 提取 2 次, 人参皂苷 Rb1 的提取率为 1.40%, 为最佳提取条件; 影响人参皂苷 Rb1 提取率大小的因素主次顺序为: 提取温度 > 料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间 (固定提取次数为 2 次)。

3.2 本次研究得到一个能较好预测试验结果的二次模型方程, 为加拿大西洋参开发与利用提供具有指导价值的实验数据。

### 参考文献

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2010 年版, 一部 (上), 北京, 中国医药科技出版社, 2010
- [2] 赵海龙. 西洋参及其混淆品鉴别[J]. 山西中医, 2010, 26(S1): 53-54
- [3] 黄亚伟, 王加华, Jacqueline J, 等. 近红外光谱测定人参与西洋参的主要皂甙总量[J]. 分析化学(FENXI HUAXUE)研究简报, 2011, 39(3): 377-381
- [4] 张翼轸, 张文驹, 穆青, 等. 人参化学成分的药理活性及其含量积累的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 12158-12160, 12163
- [5] 邵南奇, 朱萱萱. 西洋参对心肌缺氧缺血的药理学研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(3): 3-4
- [6] 王海南. 人参皂苷药理研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(11): 1201-1206
- [7] 安宁, 朱文. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 抗肿瘤机制的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(4): 648-652
- [8] Li J, Shao Z H, Xie J T, et al. The effects of ginsenoside Rb1 on JNK in oxidative injury in cardiomyocytes [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(7): 1259-1267
- [9] GUO Na, FU Rui, DOU De-qiang. Chemical constituents from Panax quinquefolium [J]. Chinese Journal of Medicinal

- Chemistry, 2006, 16(3): 172-174
- [10] Chike Godwin Azike, Paul Abrahams Charpentier, Edmund Man King Lui, et al. Yin and Yang actions of worth American ginseng root in modulating the immune function of macrophages [J]. Chin Med, 2011, 6: 21-27
- [11] 黄艳菲,彭镰心,丁玲,等.荞麦中芦丁的提取工艺优化[J].现代食品科技,2012,28(10):1345-1349
- [12] 万俊,蒋爱民,曲直,等.响应面法优化双蛋白干酪加工工艺[J].现代食品科技,2012,28(8):1013-1017
- [13] 陈耀华,陈健.响应面法优化鸡枞菌多糖的提取工艺[J].现代食品科技,2012,28(5):541-544,563

现代食品科技