

doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2021.02.001

酶法结合超声辅助提取桃儿七鬼臼毒素工艺研究

许显莉^{1,2,3}, 刘盈盈^{1,2,3}, 冯海生^{1,2}, 马世震^{1,2*}, 李彩霞^{1,2**}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 目的: 研究酶法结合超声辅助提取桃儿七鬼臼毒素工艺条件, 并比较不同提取方法下鬼臼毒素提取得率。方法: 采用单因素试验研究提取工艺中加酶量、酶解 pH、酶解温度、超声时间、甲醇体积分数和料液比对鬼臼毒素提取得率的影响, 并通过 Plackett-Burman 设计筛选出三个影响显著的因素; 其次, 采用响应面法对提取工艺参数进行进一步优化; 最后, 比较酶法结合超声辅助提取法和其他提取方法(加热回流提取、索式提取、超声提取、酶法提取)下鬼臼毒素提取得率。结果: 酶法结合超声辅助提取鬼臼毒素的最佳工艺条件为: 复合加酶量 0.004 g, 酶解 pH 为 3, 酶解温度 30℃, 料液比 1:30 (g/mL)、甲醇体积分数为 50%、超声时间 10 min。在此条件下, 鬼臼毒素提取得率为 5.20%。结论: 与其他提取方法相比, 酶法结合超声辅助提取工艺耗时短, 耗能低, 且具有较好的提取效果。
关键词 响应面法; 酶法结合超声; 提取; 桃儿七; 鬼臼毒素

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1006-9690(2021)02-0001-09

Process of Enzyme Combined with Ultrasonic Assisted Extraction of Podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum*

Xu Xianli^{1,2,3}, Liu Yingying^{1,2,3}, Feng Haisheng^{1,2}, Ma Shizhen^{1,2*}, Li Caixia^{1,2**}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;
2. Qinghai Key Lab. of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Xining 810008, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective: To study the ultrasonic assisted extraction method combined with the use of enzyme extract podophyllotoxin (PPT) from *Sinopodophyllum hexandrum*, and the extraction yield of PPT under different methods was compared. Methods: A single factor experiment was used to investigate the effects of the amount of added enzyme, pH of enzymatic hydrolysis, temperature of enzymatic hydrolysis, ultrasonic time, methanol volume fraction, and material-liquid ratio on the extraction yield of PPT in the extraction process, and Plackett-Burman design was used to select the significant affected factors. Secondly, the extraction process parameters were further optimized by response surface method. Finally, the PPT yield obtained by ultrasonic-assisted extraction combined with the use of enzyme was compared with other extraction methods (heating reflux extraction, Soxhlet extraction, ultrasonic extraction, and enzymatic extraction). Results: The optimized conditions: the amount of added enzyme was 0.004 g, the enzymatic hydrolysis pH was 3, the enzymatic hydrolysis temperature was 30℃, the material-liquid ratio was 1:30 (g/mL), the methanol volume fraction was 50%, and the ultrasonic time was 10 min. Under these conditions, the maximum yield of extraction was 5.20%. Conclusion: Compared with other extraction methods, the ultrasonic-assisted extraction combined with the use of enzyme has a better extraction

收稿日期: 2020-09-14, 录用日期: 2021-01-23

基金项目: 青海省应用基础研究(2019-ZJ-7061)。

作者简介: 许显莉(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药材质量标准研究。E-mail: ucasxianlixu@163.com

* 通讯作者: 马世震(1963-), 男, 学士, 研究员, 研究方向为青藏高原特色生物资源的利用与保护。E-mail: szma@nwipb.cas.cn

** 共同通讯作者: 李彩霞(1989-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为青藏高原特色生物资源的利用与保护。E-mail: lex@nwipb.cas.cn

effect.

Key words Response surface method; Enzyme method combined with ultrasonic; Extraction; *Sinopodophyllum hexandrum*; Podophyllotoxin

桃儿七 [*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying] 为小檗科桃儿七属 (*Sinopodophyllum* Ying) 植物的根及根茎^[1], 主要分布在我国青海、西藏、四川、甘肃等地区^[2], 具有祛风除湿、活血止痛、镇咳止喘、祛痰等功效^[3]。桃儿七中含有大量木脂素类化合物, 主要为鬼臼毒素。研究发现, 鬼臼毒素抗肿瘤作用显著, 还具有抗艾滋病、利气活血、止痛、解毒等活性^[4]。此外, 鬼臼毒素还可用于依托泊苷、替尼泊苷等抗癌药物的合成^[5-6]。因此, 高效低耗提取鬼臼毒素已成为关注热点, 对抗肿瘤药物的生产和研发具有重要意义。

目前, 桃儿七鬼臼毒素的提取方法有加热回流提取法^[7]、甲醇冷浸法^[8]、超声波辅助提取法、亚临界水萃取法^[9-11]等, 其中超声辅助提取法应用最为广泛^[12]。随着现代生物技术的不断发展, 酶法提取因提取条件温和简单, 提取快速高效, 减少环境污染等优点^[13], 在天然产物活性成分提取中得到了广泛应用。而复合酶可以集合纤维素酶、果胶酶、蛋白酶等多种酶的共同作用, 有效降解细胞壁及细胞间质中的蛋白质、果胶、纤维素等, 更利于活性成分溶出^[14]。目前, 有关酶法提取与超声提取相结合进行桃儿七鬼臼毒素提取的研究报道较少。

鉴于此, 本研究使用复合酶, 采用酶法结合超声辅助进行桃儿七鬼臼毒素的提取, 以鬼臼毒素提取得率为评价指标, 通过单因素试验、Plackett-Burman 因素筛选试验和响应面分析法优化桃儿七鬼臼毒素的提取工艺条件, 并与其他提取工艺(加热回流提取、索式提取、超声提取、酶法提取)比较, 验证本工艺的高效性, 以期对鬼臼毒素的开发利用提供一定的技术基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

ML2047 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SL-500A 型高速万能粉碎机(浙江省永康市松青五金厂); BPG-9140A 型电热鼓风干燥箱(一恒科学仪器有限公司); SK3310LHC 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); Agilent Infinity 1260 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(4.6 mm × 250

mm, 5 μm)。

1.2 药材与试剂

2019 年 9 月购买于西安药材市场的桃儿七; 鬼臼毒素标准品(纯度 ≥ 98%, 批号: 17112303, 成都普菲德生物技术有限公司); 甲酸(色谱纯, 天津市凯信化学工业有限公司); 乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司); 中性蛋白酶(50 u · mg⁻¹)、果胶酶(3 × 10⁵ u · g⁻¹)、纤维素酶(1 × 10⁴ u · g⁻¹)、漆酶(2 × 10⁴ u · g⁻¹) (均为上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

2 试验方法

2.1 鬼臼毒素标准品溶液的制备

称取鬼臼毒素标准品 0.001 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶液溶解并定容至刻度, 得浓度为 0.1 μg/μL 的标准品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

称取 3 份过 40 目筛的桃儿七干燥粉末 0.1 g 于具塞试管中, 分别加入各单因素试验中设定量的复合酶(纤维素酶:果胶酶:中性蛋白酶:漆酶 = 1:1:1:1) 盐酸水溶液和甲醇水溶液^[15], 在选定的料液比、超声时间、超声温度下提取三次, 合并三次提取液并定容至 25 mL 容量瓶中, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 得供试品溶液。采用高效液相色谱法测定鬼臼毒素含量, 用公式 1 计算粗提物中鬼臼毒素提取得率。

$$Pt(\%) = \frac{m}{M} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

m : 鬼臼毒素质量(g); M : 桃儿七根质量(g)

2.3 色谱条件

采用非极性 C18(4.6 mm × 250 mm × 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A) - 0.04% 甲酸水溶液(B) 为流动相, 梯度洗脱(表 1), 流速 0.5 mL/min, 柱温 30°C, 检测波长 290 nm, 进样量 10 μL。对照品和样品色谱图见图 1。

2.4 线性关系

吸取 2.1 项下配置的标准品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 依次设定进样量 2、4、6、8、10、12、14、16 μL, 按 2.3 下的色谱条件进行测定分析。以对照品质量(X) 为横坐标, 峰面积(Y) 为纵坐标, 进行线性回归分析。

表 1 梯度洗脱的流动相比比例
Table 1 The mobile phase ratio of gradient elution

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	15	85
4	15	85
10	24	76
15	24.5	75.5
20	32	68
25	32	68
35	55	45
40	55	45

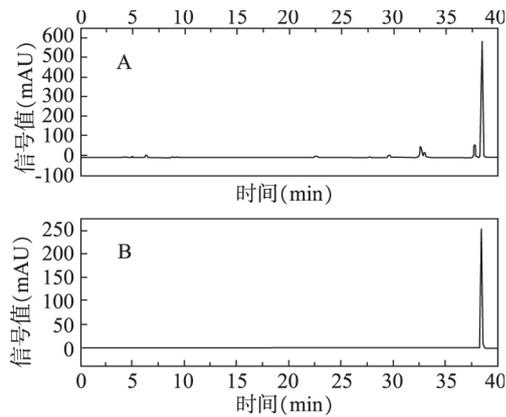


图 1 鬼臼毒素样品(A) 和对照品(B) 色谱图
Fig. 1 Chromatogram of sample(A) and control substance(B) of podophyllotoxin

2. 5 单因素试验

2. 5. 1 加酶量对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 加入 1 mL pH 为 4 的盐酸水溶液, 分别加入 0. 002 g、0. 004 g、0. 006 g、0. 008 g、0. 01 g 复合酶 A mL 82% 甲醇溶液, 设定超声时间 20 min, 超声温度 50℃, 研究加酶量对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 5. 2 pH 对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 在液料比 1: 40(g/mL), 复合酶加酶量 0. 004 g, 甲醇体积分数 82%, 超声时间 20 min, 超声温度 50℃ 的条件下, 研究不同 pH(2、3、4、5、6) 的酸水通过影响酶活性对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 5. 3 温度对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 加入 1 mL pH 为 3 的酸水和 0. 004 g 复合酶, 在液料比 1: 40(g/mL), 甲醇体积分数 82%, 超声时间 20 min 的

条件下, 研究不同超声温度(20℃、30℃、40℃、50℃、60℃) 对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 5. 4 甲醇体积分数对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 加入 1 mL pH 为 3 的酸水和 0. 004 g 复合酶, 在液料比 1: 40(g/mL), 超声温度 30℃, 超声时间 20 min 的条件下, 研究不同甲醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%) 对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 5. 5 料液比对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 加入 1 mL pH 为 3 的酸水和 0. 004 g 复合酶, 在甲醇体积分数 50%, 超声温度 30℃, 超声时间 20 min 的条件下, 研究不同料液比 1: 10、1: 20、1: 30、1: 40、1: 50(g/mL) 对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 5. 6 超声时间对桃儿七鬼臼毒素提取得率的影响

参考刘盈盈^[16]等单因素试验方法并稍作调整, 称取 0. 1 g 桃儿七样品于 25 mL 具塞试管, 加入 1 mL pH 为 3 的酸水和 0. 004 g 复合酶, 在液料比 1: 40(g/mL), 甲醇体积分数 50%, 超声温度 30℃ 的条件下, 研究不同超声时间(5 min、10 min、15 min、20 min、25 min) 对桃儿七中鬼臼毒素提取得率的影响。

2. 6 Plackett-Burman 试验设计

由于本研究探究的因素较多, 在单因素试验基础上, 采用 Plackett-Burman 设计筛选出影响较大的几个因素作为响应面试验的影响因子, 通过 Plackett-Burman 对单因素试验的六个因素进行考察, 依次标为 A~F, 每个因素取低水平“-1”和高水平“1”, 响应值为鬼臼毒素提取得率, 因素水平表见表 2。

表 2 Plackett-Burman 试验因素水平表
Table 2 Factors and levels of Plackett-Burman

因素	水平	
	-1	1
A 加酶量(g)	0. 002	0. 006
B pH	2	4
C 超声温度(℃)	20	40
D 甲醇体积分数(%)	40	60
E 料液比(g/mL)	1: 20	1: 40
F 超声时间(min)	5	15

2. 7 酶法辅助超声提取工艺的响应面优化试验

根据单因素试验结果, 将 Plackett-Burman 试验筛选出的对桃儿七鬼臼毒素提取得率影响较大的三个因素料液比(X_1) g/mL, 甲醇体积分数(X_2) % 和超

声时间 (X_3) min 作为响应面 Box - Behnken 设计 (BBD) 的变量,以鬼臼毒素提取得率为衡量指标进行考察。BBD 设计以随机顺序进行 17 组试验,其中包括 12 个因析试验组,5 个重复的中心点试验组。三个变量分别指定为 X_1 、 X_2 、 X_3 进行组合,自变量的水平编码为 -1、0 和 1,即分别表示低、中和高值,响应面试验因素及水平编码见表 3。

表 3 桃儿七鬼臼毒素提取工艺响应面优化试验因素及水平编码

Table 3 Independent variables and their coded and actual values used in the response surface

独立变量	水平		
	-1	0	1
甲醇体积分数 (%)	40%	50%	60%
液料比 (g/mL)	1:20	1:30	1:40
超声时间 (min)	5	10	15

为了预测最佳的优化条件,采用 Design-Expert 8.0.6 软件就试验结果做回归分析,得到拟合二阶多项式模型(公式 2),该回归系数拟合相关联的变量和响应值。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{j=1}^K \beta_{ij} X_i^2 + \sum_{i>j}^K \beta_{ij} X_i X_j \quad (k=3) \quad (\text{公式 2})$$

Y 为预测响应值 k 为变量的个数 ($k=3$); X_i 和 X_j 为自变量编码水平 ($i \neq j$); β_0 为常数项; β_i 为线性回归系数; β_{ij} 为二次项回归系数; β_{ij} 为交互项回归系数。

2.8 验证试验

经单因素试验、Plackett - Burman 因素筛选试验和响应面优化后,在最佳提取工艺条件下,进行三次平行提取试验,验证试验结果的准确性和可靠性。

2.9 其他提取方法

2.9.1 加热回流提取

参考王萍等^[17]研究,热回流提取工艺为:称取 1 g 干燥的桃儿七原料,置于 50 mL 圆底烧瓶中。在选定乙醇浓度 53%、液料比 16:1 (mL/g)、提取时间 40 min、提取温度 42℃ 条件下热回流提取,共提取三次,提取液过滤并定容至 50 mL 容量瓶,过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

2.9.2 索式提取

参考张成等^[18]研究并加以调整,索式提取工艺为:称取桃儿七样品 1 g 用滤纸包好,置索氏提取器中,加 100 mL 75% 乙醇,设定提取温度 85℃,提取时间 8 h,抽滤得提取液,经旋蒸浓缩后定容至 50 mL

容量瓶,过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

2.9.3 超声辅助提取

参考刘盈盈等^[16]研究进行超声辅助提取,得供试品溶液。

2.9.4 酶法提取

参考余美琼等^[19]研究并加以调整,酶法提取工艺流程为:准确称取过 40 目筛的桃儿七粉末于 25 mL 具塞试管中,分别加入 4% 的复合酶、pH 3 的酸水和 3 mL 50% 的甲醇溶液,将试管置于 30℃ 水浴锅中提取 20 min,共提取三次,合并提取液,抽滤并定容至 10 mL 的容量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。

3 试验结果

3.1 线性关系考察

按照“2.4”项色谱条件依次进样,测定峰面积。以峰面积积分值 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归,得鬼臼毒素回归方程为 $Y = 1\,678.7 X + 14.079$, $r = 0.9999$,表明鬼臼毒素在 0.2~1.6 μg 具有良好线性关系,线性关系见图 2。

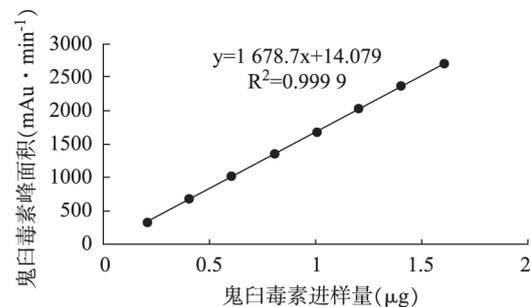


图 2 线性关系

Fig. 2 Linear relationship

3.2 单因素试验结果

3.2.1 加酶量对鬼臼毒素提取得率的影响

由图 3(A) 可知,加酶量为 0.002 g 时,鬼臼毒素提取得率较低;当加酶量增至 0.004 g 时,得率明显上升;当加酶量由 0.004 g 增至 0.008 g 时,得率无明显变化;当加酶量变为 0.01 g 时,得率明显下降。由于酶的添加量可以决定酶活力,大量的复合酶可以促进提取效果,但同时会增加提取成本^[20],因此,复合酶的最适用量为 0.004 g。

3.2.2 pH 对鬼臼毒素提取得率的影响

从图 3(B) 可得,pH 为 3 时,鬼臼毒素提取得率最高,说明此时复合酶活力最高对底物的综合作用效果达到最大。因此,最适酶解 pH 为 3,与文献中

复合酶的最适 pH 范围 2~6 吻合^[21]。

3.2.3 温度对鬼臼毒素提取得率的影响

从图 3(C) 可得, 当提取温度从 20℃ 上升到 30℃ 时, 鬼臼毒素提取得率随之增加; 当提取温度增至 30℃ 以上时, 提取得率随之降低。温度通过控制酶活性来影响提取得率, 温度升高会提高酶的活性和分子运动, 加速细胞内活性成分释放和溶剂进入, 但过高的温度会使酶变性, 降低酶活性^[22], 因此最适提取温度为 30℃。

3.2.4 超声时间对鬼臼毒素提取得率的影响

由图 3(D) 可知, 在超声时间为 10 min 时, 鬼臼毒素提取得率最高。溶剂的渗入以及活性成分的溶出都需要一定的时间。当超声时间小于 10 min 时, 提取不充分, 鬼臼毒素溶出较少, 导致得率较低; 当超声时间大于 10 min 后, 鬼臼毒素的稳定性变差, 同时引起其他物质溶出, 使目标化合物含量相对下

降^[23]。因此, 最适超声时间为 10 min。

3.2.5 甲醇体积分数对鬼臼毒素提取得率的影响

由图 3(E) 可得, 在甲醇体积分数为 50% 时, 鬼臼毒素提取率最高。这说明提取溶剂的浓度对鬼臼毒素的溶出有一定的影响, 浓度太低, 提取不完全; 浓度太高, 可能会因为其他活性成分的溶出影响目标化合物的得率, 且造成有机溶剂的浪费^[24]。因此, 桃儿七鬼臼毒素提取的最适甲醇体积分数为 50%。

3.2.6 料液比对鬼臼毒素提取得率的影响

由图 3(F) 可知, 当料液比由 1:10(g/mL) 变为 1:30(g/mL), 鬼臼毒素提取得率随之增加; 当料液比由 1:30(g/mL) 变为 1:50(g/mL), 提取得率缓慢降低。因此, 桃儿七鬼臼毒素提取的最适料液比为 1:30(g/mL)。

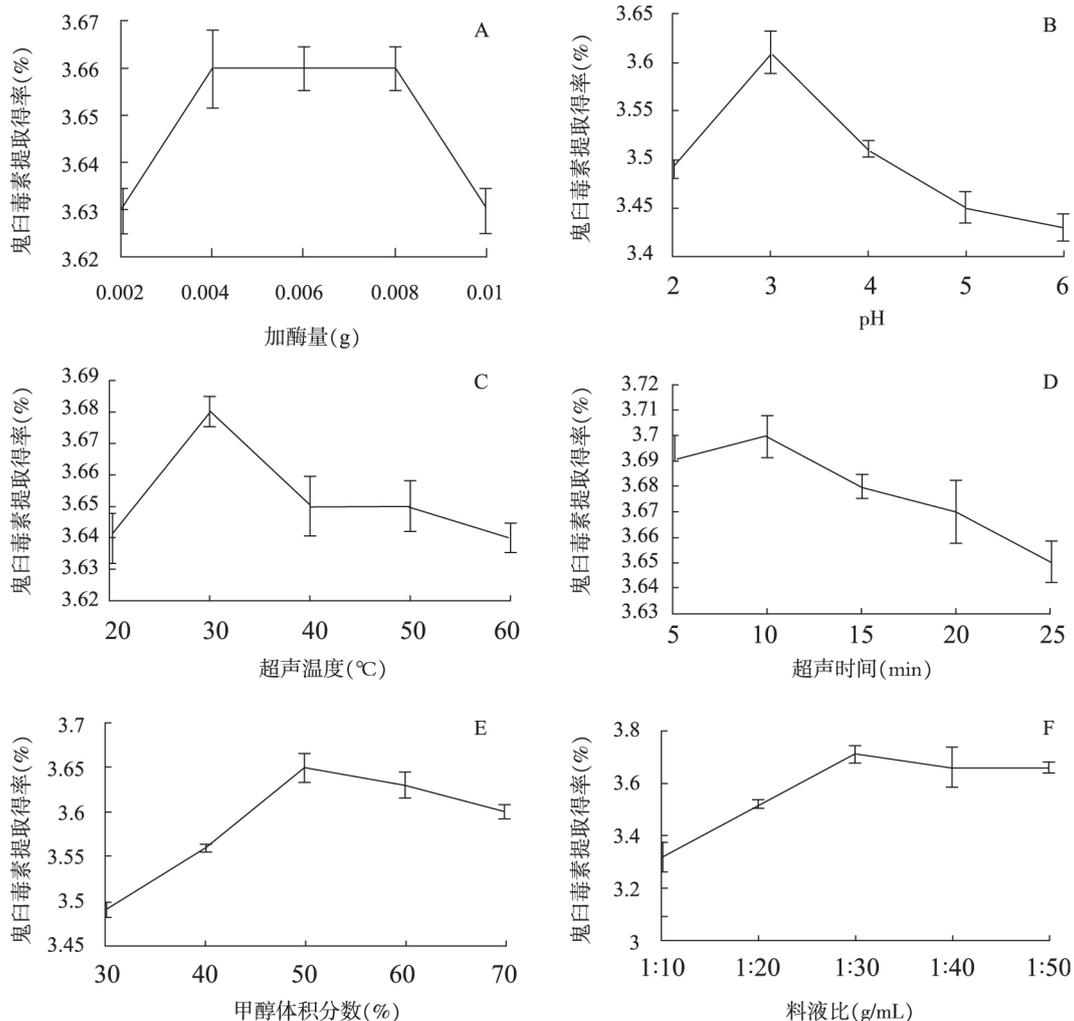


图 3 不同因素对鬼臼毒素提取得率的影响

Fig. 3 The effect of different factors to the yield of podophyllotoxin

3.3 Plackett-Burman 试验结果及分析

根据 2.6 进行 Plackett-Burman 试验,试验结果见表 4,用 Minitab 17 软件对试验结果进行逐步回归分析,各因素的显著性检验见表 5。

表 4 Plackett-Burman 试验结果 (N=12)

Table 4 The results of Plackett-Burman

实验号	A	B	C	D	E	F	提取得率(%)
1	1	-1	1	1	-1	1	3.55
2	1	-1	-1	-1	1	1	3.54
3	1	1	-1	1	1	-1	3.55
4	-1	1	1	1	-1	1	3.53
5	-1	-1	1	1	1	-1	3.54
6	-1	1	1	-1	1	-1	3.49
7	1	-1	1	-1	-1	-1	3.46
8	1	1	1	-1	1	1	3.61
9	-1	1	-1	-1	-1	1	3.47
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3.44
11	1	1	-1	1	-1	-1	3.49
12	-1	-1	-1	1	1	1	3.63

表 5 各因素的显著性检验

Table 5 Significance test of each factor

模型	回归系数	标准偏差	T 值	P 值	显著性	影响顺序
A	0.008 33	0.007 85	1.06	0.337		4
B	-0.001 67	0.007 85	-0.21	0.840		6
C	0.005 00	0.007 85	0.64	0.552		5
D	0.023 33	0.007 85	2.97	0.031	*	3
E	0.035 00	0.007 85	4.46	0.007	**	1
F	0.030 00	0.007 85	3.82	0.012	*	2

注: $P < 0.05$ 为显著(*), $P < 0.01$ 为极显著(**)。

Plackett-Burman 回归模型的 $P = 0.022 < 0.05$, 模型显著,具有一定的统计学意义^[25]。由表 5 中的回归系数及 P 值得: 六个因素中, 甲醇体积分数、料液比、超声时间对桃儿七鬼臼毒素提取得率影响显著, 因此, 选用这三个因素设计响应面优化试验进行提取工艺优化, 设定其他因素在单因素试验下的最佳水平进行试验。

3.4 响应面优化试验结果

3.4.1 响应面设计与回归模型的建立

本研究以料液比 (X_1) mL、甲醇体积分数 (X_2) %、超声时间 (X_3) min 3 个因素为自变量, 以鬼臼毒素提取得率为响应值进行响应面 Box-Behnken 设计(BBD), RSM 试验组合及桃儿七鬼臼毒素得率见表 6。

为了更好地预测酶法结合超声辅助提取的效率、变量及因变量之间的关系, 对桃儿七鬼臼毒素提取率(%) 进行回归拟合, 结果如公式 3 所示, 其中 Y 表示鬼臼毒素得率, 变量 X_1 表示料液比(g/mL), X_2 表示甲醇体积分数(%), X_3 表示超声时间(min)。

表 6 RSM 试验组合及桃儿七鬼臼毒素得率

Table 6 Box-Behnken experimental design and results for total PPT extraction yields

组数	料液比 (X_1) (g/ml)	甲醇体积分 数 (X_2) (%)	超声时间 (X_3) (min)	鬼臼毒素提取率(%)	
				真实值	预测值
1	1	0	-1	5.11±0.021	4.99
2	1	-1	0	5.06±0.01	4.88
3	0	0	0	5.19±0.01	5.17
4	0	1	-1	5.06±0.07	5.09
5	0	0	0	5.15±0.001	5.17
6	-1	-1	0	4.88±0.04	4.94
7	1	1	0	5.16±0.03	5.12
8	-1	0	1	4.93±0.04	5.06
9	1	0	1	5.13±0.02	5.05
10	0	-1	1	4.97±0.02	4.93
11	0	0	0	5.19±0.08	5.20
12	0	1	1	5.11±0.04	5.09
13	0	0	0	5.16±0.06	5.19
14	0	-1	-1	4.92±0.01	4.95
15	-1	0	-1	4.88±0.01	4.93
16	0	0	0	5.19±0.02	5.18
17	-1	1	0	5.00±0.01	5.02

$$Y = 5.18 + 0.096X_1 + 0.063X_2 + 0.021X_3 - 5 \times 10^{-3} X_1X_2 - 7.5 \times 10^{-3} X_1X_3 + 0.0000X_2X_3 - 0.077X_1^2 - 0.074X_2^2 - 0.087X_3^2 \quad (\text{公式 3})$$

为了检验试验数据均数差别的显著性, 用方差分析(ANOVA) 分析二阶多项式模型的准确性和适合度。由表 7 可知, 模型 P 值 < 0.0001 , 说明鬼臼毒素提取率的回归模型极显著。同时对线性系数 (X_1 , X_2 和 X_3)、二次项系数 (X_1^2 , X_2^2 和 X_3^2) 和交互作用系数 (X_1X_2 , X_1X_3 和 X_2X_3) 的显著性进行 P 值检验, 料液比 (X_1) 和甲醇体积分数 (X_2) 线性系数均为极显著, 提取时间 (X_3) 的线性系数为显著, X_1X_2 , X_1X_3 和 X_2X_3 的交互作用为不显著。二次项系数 (X_1^2 , X_2^2 和 X_3^2) 均为极显著。以上数据表明, 三因素中部分因素与响应值之间线性关系显著, 即在本研究中分析的部分变量是影响鬼臼毒素提取率的重要因素。

系数也称 R^2 , 通常用于衡量模型的准确性, 本试验中所得的 R^2 为 0.984 6, 充分表明该模型是一个合理的拟合试验。此外, 调整确定系数值 (adj- R^2) 为 0.964 9, 预测系数值 (pre- R^2) 为 0.8631, 该数据表明得到的试验结果与预测值有显著性差异。变异系数 (C. V.) 为 0.42, 表明获得的试验值具可靠性^[26]。因此, 该 BBD 模型中多项式的回归模型与实际试验结果相匹配。

表 7 回归模型中回归系数方差分析

Table 7 ANOVA for response surface quadratic model

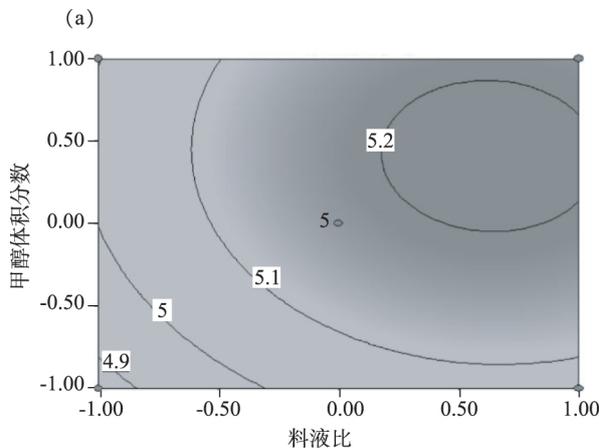
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.20	9	0.022	49.84	<0.000 1
料液比 (X_1)	0.074	1	0.074	167.62	<0.000 1
甲醇体积分数 (X_2)	0.031	1	0.031	70.68	<0.000 1
超声时间 (X_3)	3.612×10^{-3}	1	3.612×10^{-3}	8.17	0.024 4
$X_1 X_2$	1×10^{-4}	1	1×10^{-4}	0.23	0.648 9
$X_1 X_3$	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	0.51	0.498 7
$X_2 X_3$	-1.388×10^{-6}	1	-1.388×10^{-6}	-3.193×10^{-13}	1.000 0
$X_1 X_1$	0.025	1	0.025	56.1	0.000 1
$X_2 X_2$	0.023	1	0.023	52.5	0.000 2
$X_3 X_3$	0.032	1	0.032	71.67	<0.000 1
残差	3.095×10^{-3}	7	4.42×10^{-4}		
失拟项	1.575×10^{-3}	3	5.25×10^{-4}	1.38	0.369 6
纯误差	1.520×10^{-3}	4	3.8×10^{-4}		
总离差	0.20	16			
标准差	0.021		调整 R^2		0.964 9
R^2	0.9846		预测 R^2		0.863 1
准确度	0.028		变异系数 (%)		0.42

注: $P < 0.05$ 为显著 $P < 0.01$ 为极显著。

3.4.2 两因素交互影响的响应面分析

采用 Design-Expert 8.0.6 软件拟合的料液比 (X_1)、甲醇体积分数 (X_2)、超声时间 (X_3) 三个因素的交互作用对响应值鬼臼毒素提取率 (Y) 的影响如图 4、5、6 所示,可以直观得到提取工艺变量对桃儿七鬼臼毒素提取率的影响。

由图 4 可知,等高线图 (a) 呈椭圆,说明料液比和甲醇体积分数两因素间的交互作用明显^[27];从三维响应面图 (b) 得,鬼臼毒素提取率随料液比和甲醇体积分数的增加有显著的上升趋势,响应面图坡度较陡,且料液比的变化坡度及等高线数量高于甲



醇体积分数,表明料液比对鬼臼毒素提取率的影响高于甲醇体积分数^[28]。

由图 5 可知,等高线图 (c) 呈圆形,说明料液比和超声时间两因素间的交互作用不显著;从三维响应面图 (d) 得,鬼臼毒素提取率随料液比和超声时间的增加有显著的上升趋势,响应面图坡度较陡,且料液比的变化坡度高于超声时间,表明料液比对鬼臼毒素提取率的影响高于超声时间,说明足够的提取溶剂才能使目标化合物提取充分,目标化合物的得率受提取溶剂剂量的影响较大。

由图 6 可知,等高线图 (e) 呈椭圆,说明甲醇体积分数和超声时间两因素间的交互作用显著;从三维响应面图 (f) 得,鬼臼毒素提取率随甲醇体积分数和超声时间的增加呈先上升后略微下降的趋势,响应面图坡度较陡,且甲醇体积分数的变化坡度高于超声时间,表明甲醇体积分数对鬼臼毒素提取率的影响高于超声时间,且较长时间和较高浓度的甲醇都不利于鬼臼毒素的溶出。

3.4.3 验证试验

通过 Design Expert 软件分析,酶法结合超声辅助提取桃儿七鬼臼毒素的最优参数为:料液比为 1:30 (g/mL),甲醇体积分数为 50%,超声时间为 10 min。在此条件下,桃儿七鬼臼毒素提取率的预测值为 5.19%,实际值为 5.2% (n=3),实际值与预测值接近,说明所确定的最优工艺条件稳定可靠。

3.5 不同提取工艺的比较

为比较采用不同提取工艺的鬼臼毒素提取率,本研究参考前人研究的工艺方法分别进行提取,不同提取方法下的鬼臼毒素提取率见图 7。

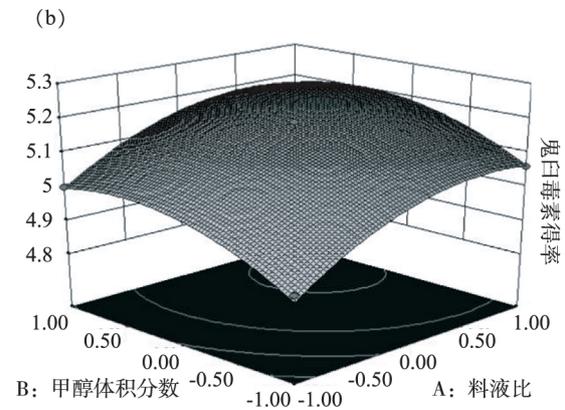


图 4 不同料液比 (X_1) 和甲醇体积分数 (X_2) 对鬼臼毒素得率影响的等高线图和响应面图

Fig. 4 The contour figure and response surface figure of variable parameters including ratio of material to liquid (X_1) and methanol volume fraction (X_2) on the yield of the extracted podophyllotoxin

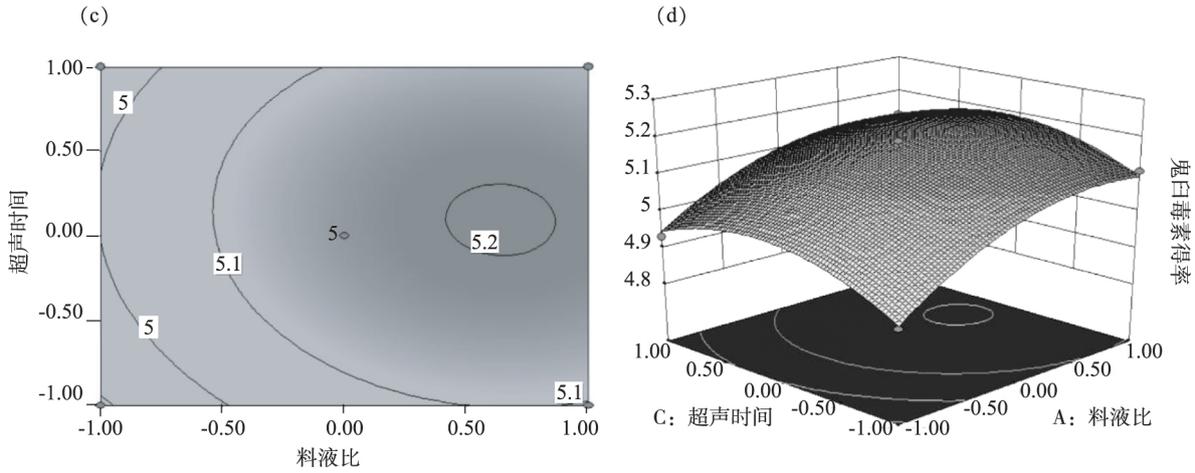


图 5 同料液比(X_1)和超声时间(X_3)对鬼臼毒素得率影响的等高线图和响应面图

Fig. 5 The contour figure and response surface figure of variable parameters including ratio of material to liquid(X_1) and ultrasonic time (X_3) on the yield of the extracted podophyllotoxin

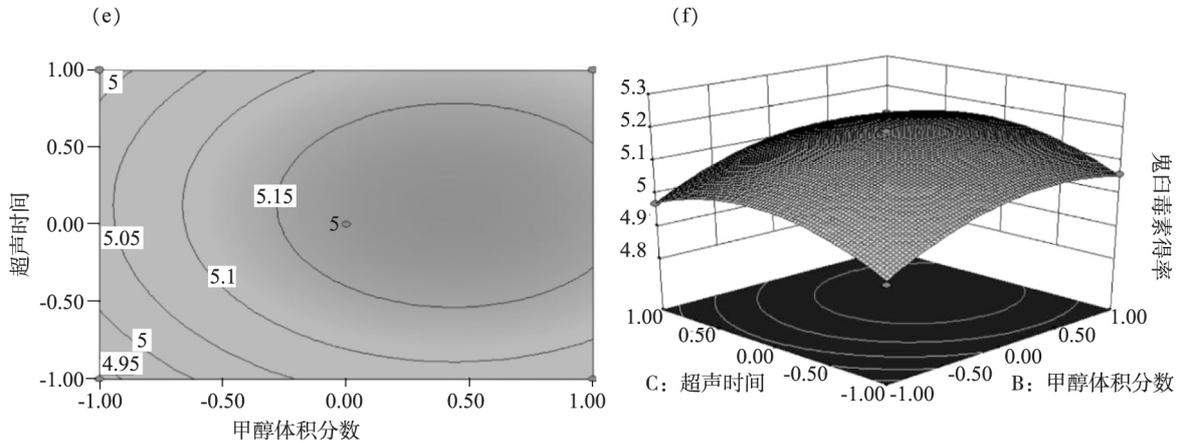


图 6 不同甲醇体积分数(X_2)和超声时间(X_3)对鬼臼毒素得率影响的等高线图和响应面图

Fig. 6 The contour figure and response surface figure of variable parameters including methanol volume fraction (X_2) and extraction time (X_3) on the yield of the extracted podophyllotoxin

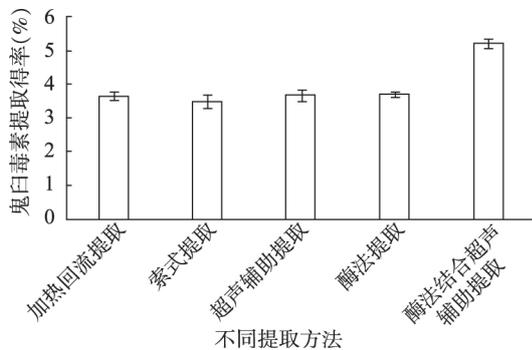


图 7 不同提取方法下桃儿七中鬼臼毒素提取得率
Fig. 7 The yield of podophyllotoxin in different extraction methods

4 结论与讨论

本研究利用酶法结合超声辅助提取桃儿七中鬼臼毒素,经单因素试验、Plackett-Burman 因素筛选试验、响应面优化得出桃儿七鬼臼毒素的最佳提取工艺条件为:复合加酶量 0.004 g、酶解 pH 3、酶解温度 30℃、料液比 1:30(g/mL)、甲醇体积分数 50%、超声时间 10 min。此条件下鬼臼毒素提取率为 5.20%,提取得率较加热回流提取、索式提取、酶法提取、超声提取分别增加了 1.55%、1.7%、1.51%、1.54%。综上,相比于单一的提取方法,酶法结合超声辅助提取在桃儿七鬼臼毒素提取中更具有优势。

一般大量的提取溶剂可以提高溶剂在细胞中的

扩散速率, 并从样品中溶解更多的活性成分^[29]。但本研究发现, 当料液比大于 1:30 (g/mL) 时, 随着溶剂比例的增加, 鬼臼毒素得率反而下降。一方面, 这可能是因为液料比增大, 酶与底物接触机会反而降低, 导致细胞壁降解减慢, 鬼臼毒素溶出减少。另一方面, 这可能由于当加入溶剂过多时, 非目标化合物的溶出影响了鬼臼毒素的溶出^[30]。

对比本研究中不同提取工艺, 提取时长的排序顺序为: 索式提取>加热回流提取>酶法提取>超声提取>酶法结合超声提取; 鬼臼毒素得率的排序顺序为: 酶法结合超声提取>酶法提取>超声提取>加热回流提取>索式提取; 液料比的排序顺序为: 索式提取>加热回流提取>超声提取>酶法提取>酶法结合超声提取。刘盈盈^[16]等采用超声法提取桃儿七鬼臼毒素时, 最高得率为 4.18%。本研究将酶法与超声辅助提取结合后, 所需提取时间较短, 提取温度较低, 溶剂消耗减少, 鬼臼毒素提取得率较高。

采用酶法结合超声辅助提取桃儿七鬼臼毒素达到高效低耗的原因主要有以下两方面。首先, 鬼臼毒素的提取主要受到植物细胞壁及细胞质中的大分子蛋白质、纤维素、淀粉、果胶、木质素等物质影响。本研究中纤维素酶能够催化水解纤维素, 中性蛋白酶能够高效水解蛋白质, 漆酶能够催化木质素类成分的降解, 而果胶酶具有对果胶的解酯、水解和破裂作用。酶的专一性和反应条件温和的特点使鬼臼毒素的构象和生物活性不被遭到破坏^[31], 四种酶相互作用, 使提取得率高于单一酶作用效果, 更优于无酶工艺^[32]。其次, 超声提取利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速胞内鬼臼毒素的释放、扩散和溶解。这也说明, 两种或多种简便提取方法的耦合集成, 结合不同优势, 是未来天然产物有效成分提取制备的发展趋势。

参考文献:

- [1] 徐文华, 徐文军, 李艳玲. 藏药桃儿七种子离体培养条件优化研究[J/OL]. 中药材, 2019(4): 725-729.
- [2] 泽仁旺姆, 于顺利, 尼珍, 等. 13 个藏药植物种在西藏的分布和资源量调查[J]. 北京农业, 2010(12): 56-59.
- [3] Li M F, Ge L, Kang T L, et al. High-elevation cultivation increases anti-cancer podophyllotoxin accumulation in *Podophyllum hexandrum* [J]. Ind Crop Prod, 2018(121): 338-344.
- [4] Zhang G Y, Wang Y W, Chi X F, et al. Green and efficient extraction of podophyllotoxin from *Sinopodophyllum hexandrum* by optimized subcritical water extraction combined with macroporous resin enrichment [J]. Ind Crop Prod, 2018(121): 267-276.
- [5] 张仲恒. 鬼臼毒素类衍生物的设计、合成以及抗肿瘤活性评

- 价[D]. 天津: 天津医科大学, 2014.
- [6] Guerram M, 江振洲, 张陆勇. 天然来源的鬼臼毒素研究进展[J]. 中国天然药物, 2012, 10(3): 161-169.
- [7] 马莹慧, 冯波, 朱鹤云, 等. 北五味子中总木脂素类成分的抗氧化及抗炎活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 25-30.
- [8] 荆文光, 张权, 杜杰, 等. 不同产地厚朴药材中 3 种木脂素类成分含量测定及聚类分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(10): 1822-1827.
- [9] 杨雁芸, 张艳丽, 何玉环, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定辛夷中 12 种木脂素[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1069-1073.
- [10] 王书云, 梁宏刚, 黄健, 等. HPLC 同时测定五味子中 7 个木脂素类化合物的含量[J]. 中国现代中药, 2019, 21(4): 473-477.
- [11] 王金叶, 刘恒, 黄德福, 等. LC-MS/MS 法测定不同产地南五味子 3 种木脂素含量[J]. 海峡药学, 2018, 30(8): 38-41.
- [12] 张丽, 王薇, 李玉泽, 等. HPLC 法同时测定桃儿七中 8 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1461-1468.
- [13] 王银霞, 王宏社. 酶在天然产物活性成分提取中的应用[J]. 广东化工, 2020, 47(11): 141, 169.
- [14] 余美琼, 朱金环, 杨金杯, 等. 复合酶法辅助提取无患子总皂苷的工艺[J]. 福建师大福清分校学报, 2020(2): 44-49.
- [15] 程振玉. 北五味子木脂素和多糖提取工艺研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2014.
- [16] 刘盈盈, 李彩霞, 冯海生, 等. 响应面法优化桃儿七鬼臼毒素的超声提取工艺[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(4): 11-16, 31.
- [17] 王萍, 陈涛, 刘永玲, 等. 响应面法优化桃儿七中鬼臼毒素的热回流提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(11): 1864-1867.
- [18] 张成, 胡紫薇, 罗映, 等. 紫茉莉籽黄酮响应面法优化提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国农学通报, 2019, 35(34): 127-133.
- [19] 余美琼, 朱金环, 杨金杯, 等. 复合酶法辅助提取无患子总皂苷的工艺[J]. 福建师大福清分校学报, 2020(2): 44-49.
- [20] Wang K L, Li M, Wen X, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) polysaccharides based on response surface methodology and antioxidant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2018(114): 1056-1063.
- [21] 李映, 陈佳芸, 吴亚楠, 等. 酶法自茶叶中提取茶多酚工艺和口味研究[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 77-82.
- [22] Yin X L, You Q H, Jiang Z H. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* by response surface methodology [J]. Carbohydr Polym, 2011, 86(3): 1358-1364.
- [23] 王心怡, 方璐玲, 陈琪, 等. 响应面法优化紫马铃薯皮花青素的提取工艺 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(2): 37-41.

(下转第 14 页)

参考文献:

- [1] Mashali A, Suarez D L, Nabhan H, et al. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils [M]. Rome: FAO Land and Plant Nutrition Management Service, 2005.
- [2] 王遵亲. 中国盐渍土[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [3] 李金彪, 陈金林, 刘广明, 等. 滨海盐碱地绿化理论技术研究进展[J]. 土壤通报, 2014, 45(1): 246-251.
- [4] 赵可夫, 张万钧, 范海, 等. 改良和开发利用盐渍化土壤的生物学措施[J]. 土壤通报, 2001, 32(S0): 115-119.
- [5] 赵可夫, 冯立田. 中国盐生植物资源[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] 唐美霞, 王福宁, 王涛. 蒲公英利用现状及开发前景的探讨[J]. 青海草业, 2015, 24(1): 39-44.
- [7] 马丽贤, 董宽虎. 盐碱胁迫对华蒲公英质膜 ATP 酶和 5'-核苷酸酶的影响[J]. 草地学报, 2010, 18(4): 556-559.
- [8] 刘雅辉, 王秀萍, 左永梅, 等. 蒲公英苗期盐胁迫反应及耐盐阈值的确定[J]. 西北农业学报, 2017, 26(8): 1223-122.
- [9] 阎旭东. 植物耐盐性鉴定及评价技术规程[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012.
- [10] 石秋梅, 邓翻云, 吴敏言, 等. 罗布麻和大叶白麻种子萌发及幼苗生长耐盐性研究[J]. 北方园艺, 2014, 38(12): 128-133.
- [11] 李惠英, 陈良. 盐胁迫对草坪草萌发生长及代谢的影响[J]. 草业科学, 2018, 35(11): 584-2592.
- [12] 袁飞敏, 权有娟, 陈志国. 不同钠盐胁迫对藜麦种子萌发的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2018, 32(11): 182-187.
- [13] 渠晓霞, 黄振英. 盐生植物种子萌发对环境的适应对策[J]. 生态学报, 2005, 25(9): 2389-2398.
- [14] Katembe W J, Ungar I A, John P M. Effect of salinity on germination and seedling growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae) [J]. Ann Bot-london, 1998, 82(2): 167-175.
- [15] 朱毅, 范希峰, 刘吉利, 等. 盐胁迫对柳枝稷种子萌发的影响[J]. 中国草地学报, 2014, 36(4): 38-43.
- [16] 刘彦清, 董宽虎, 王奇丽, 等. 不同盐分胁迫对高冰草种子发芽的影响[J]. 草原与草坪, 2007, 27(2): 18-21.
- [17] 陆嘉惠, 吕新, 吴玲, 等. 三种药用甘草种子对盐渍环境的萌发响应及其适宜生态种植区[J]. 草业学报, 2013, 22(2): 195-202.
- [18] 杨琦琦, 蒋志荣, 黄海霞, 等. NaCl 和 Na₂SO₄ 胁迫对裸果木种子萌发的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2019, 33(3): 171-176.
- [19] 纪荣花, 于磊, 鲁为华, 等. 盐碱胁迫对芨芨草种子萌发的影响[J]. 草业科学, 2011, 28(2): 245-250.

(上接第 9 页)

- [24] 田淑雨. 灵芝活性成分的提取分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 聊城市: 聊城大学, 2019.
- [25] 刘智峰. 酶法-超声波辅助提取香椿叶中总黄酮及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 314-319, 353.
- [26] Prakash J, Maran S, Manikandan K, et al. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide[J]. Carbohydr Polym, 2013(92): 604-611.
- [27] 金丽梅, 白静, 隋世有, 等. 响应面法优化微波辅助提取红小豆种皮花色苷及其稳定性研究[J/OL]. 食品工业科技, 2020, 9(11): 1-16.
- [28] 李琳, 张国强, 石晓峰. Box-Behnken 响应面法优化复方红黄口含片的醇提工艺[J]. 华西药学杂志, 2020, 35(4): 416-423.
- [29] Vahid S, Amir M. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2013(60): 427-436.
- [30] 皮诗宇, 王常高, 杜馨, 等. 芝麻粕蛋白酶法提取工艺优化及组分分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 202-207.
- [31] 杨吉霞, 蔡俊鹏, 祝玲. 纤维素酶在中药成分提取中的应用[J]. 中药材, 2005, 28(1): 64.
- [32] 张悦怡. 五味子主要有效成分的生物酶辅助提取及其生物活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.