

基于正交试验和Box-Behnken响应面法优化人参皂苷Rg₅的制备工艺



冯惠柳[#], 杜跃中[#], 李健豪, 谢丽娟, 宋莹莹, 郭畅冰, 徐芳菲

吉林人参研究院植物化学研究室(长春 130031)

【摘要】目的 探究以人参茎叶总皂苷为原料, 通过柠檬酸水解制备人参皂苷 Rg₅ 的最佳工艺。**方法** 采取正交试验和 Box-Behnken 响应面法对料液比、柠檬酸浓度、反应时间和反应温度 4 个因素进行工艺优化, 同时建立柠檬酸水解人参皂苷 Rg₅ 制备工艺的二次项数学模型, 并验证其可靠性。**结果** 经正交试验和 Box-Behnken 响应面法优化后, 最佳工艺为料液比 1:21、柠檬酸浓度 30%、反应时间 3 h、反应温度 95 °C, 此条件下人参皂苷 Rg₅ 平均得率为 9.64%。**结论** 经正交试验和 Box-Behnken 响应面法优化的工艺条件应用于人参皂苷 Rg₅ 的制备工艺转化效率较高, 为人参稀有皂苷成分的开发利用提供了数据支撑。

【关键词】 人参; 人参皂苷 Rg₅; 正交试验; Box-Behnken 响应面法; 制备工艺

【中图分类号】 R 284 **【文献标识码】** A

Optimization of the preparation process of ginsenoside Rg₅ based on orthogonal test and Box-Behnken response surface method

FENG Huiliu[#], DU Yuezhong[#], LI Jianhao, XIE Lijuan, SONG Yingying, GUO Changbing, XU Fangfei

Plant Chemistry Laboratory, Jilin Ginseng Research Institute, Changchun 130031, China

[#]Co-first authors: FENG Huiliu and DU Yuezhong

Corresponding author: XU Fangfei, Email: xufangfei905@sina.com

【Abstract】Objective To explore the best technology for preparing ginsenoside Rg₅ by citric acid hydrolysis from total ginsenoside of ginseng stem and leaf. **Methods** The orthogonal test and Box-Behnken response surface method were used to optimize the solid-liquid ratio, citric acid concentration, reaction time and reaction temperature. The quadratic mathematical model of ginsenoside Rg₅ preparation process by citric acid hydrolysis was established and its reliability was verified. **Results** After the optimization of orthogonal test and Box-Behnken response surface, the optimal process was as follows: the solid-liquid ratio was 1:21, the citric acid concentration was 30%, the reaction time was 3 h, the reaction temperature was 95 °C. Under these conditions, the average yield of ginsenoside Rg₅ was 9.64%. **Conclusion** The process conditions optimized by orthogonal test and Box-Behnken response surface method being applied to ginsenoside Rg₅ preparation process had higher conversion efficiency, which provided data support for the development and utilization of rare ginsenoside components.

DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202411146

[#] 共同第一作者

基金项目: 吉林省部门预算科学研究项目(CZ2303001、CZ2403001); 2024年度吉林省中医药科技项目(2024132)

通信作者: 徐芳菲, 正高级工程师, Email: xufangfei905@sina.com

【Keywords】 Ginseng; Ginsenoside Rg₅; Orthogonal test; Box-Behnken response surface method; Preparation process

人参作为传统的名贵中药材,在临床上已有近千年的应用历史^[1]。科研工作者对其活性成分的研究逐渐明确,其主要化学成分广泛应用于医药、食品等领域,人参产业链不断延伸。在药食同源观念的推动下,随着产品市场供给侧比例的逐渐调整,消费者对于产品种类多元化的需求愈加凸显,以人参为原料的新型产品的市场份额也将随之增加^[2]。人参皂苷作为人参中最重要的活性成分,一直被专家学者们所关注,由于植物体多年生的生长特性,其富集在人参的主要药用部位根茎中。近年来研究证实,人参茎叶中总皂苷的含量比根茎中更高,约为人参根茎中含量的 2.16 倍^[3]。人参皂苷主要分为原生皂苷和次生皂苷,由于次生皂苷在植物体中含量极其稀少,且无法通过干预其生长过程获取,致使其价格居高不下,但由于其生物利用度和良好的药理活性,一直受到市场的青睐^[4]。次级人参皂苷主要由原生皂苷通过催化剂进行结构修饰所得,转化过程涉及去除骨架结构达玛烷型四环三萜支链上所连糖基。人参皂苷 Rg₅是具有较高活性的次级皂苷,可通过人参皂苷 Rb1 的去糖基化和人参皂苷 Rg₃ 的 20 位碳脱水形成^[5-6]。人参皂苷 Rg₅ 在抗肿瘤、抗血栓、抗炎症、抗糖尿病、抗骨关节炎、提高免疫力、改善神经和心肌损伤等方面有显著的药理作用^[7-14]。目前,人参皂苷 Rg₅ 的制备主要以加工人参、人参须根粉和原人参二醇组皂苷为原料,通过对其进行长时间高温高压或酸化处理进行制备,但制备时间长、耗能高、得率低、溶剂消耗大^[15-18]。本研究以人参茎叶总皂苷酸水解制备人参皂苷 Rg₅, 以期为人参皂苷广泛应用于市场及工业化生产提供前期试验和理论基础。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

人参茎叶总皂苷(吉林省宏久生物科技股份有限公司;纯度>90.53%);人参皂苷 Rg₅(成都曼思特生物科技有限公司,纯度>98.13%,批号: MUST-23020803);乙腈(Fisher, 色谱纯,批号: F22MB9201);甲醇(Fisher, 色谱纯,批号: 221079);硫酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号: 20230901);香草醛(天津市光

复科技发展有限公司,分析纯,纯度>99%);柠檬酸(北京化学试剂有限公司,分析纯,批号: 20231011);水为娃哈哈纯净水。

1.2 仪器设备

高效液相色谱仪(配有紫外检测器, OpenLAB CDS 色谱工作站, 美国安捷伦科技有限公司 Agilent-1260);电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司 SQP);电子恒温水浴锅(金坛市白塔金昌实验仪器厂 HH-6);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司 KQ-300DE);数显水浴恒温振荡器(常州市万丰仪器制造有限公司 WHY-2);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 TDZ5-WS);真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司 DZF-6050);紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司 SP-1920)。

1.3 试验方法

1.3.1 对照品溶液的制备

精密称定人参皂苷 Rg₅ 标准品 2.05 mg 于 1 mL 容量瓶中,加色谱甲醇溶解并定容,制成 2.05 mg/mL 的人参皂苷 Rg₅ 标准品溶液。取人参皂苷 Rg₅ 标准品溶液 100 μL,加色谱甲醇定容于 1 mL 容量瓶中,制成浓度为 0.205 mg/mL 的人参皂苷 Rg₅ 对照品溶液。

1.3.2 供试品溶液的制备

精密称取人参茎叶总皂苷 5.0 g,置于 150 mL 具塞三角瓶中,加入一定浓度的柠檬酸溶液,根据反应温度和反应时间设置水浴振荡器,将试验样品进行振荡后,超声处理附着在瓶壁的残留物,之后全部转移至离心瓶中,设置转速为 4 000 r/min,离心 3 min,弃去上清液,加入超纯水 100 mL,超声处理 10 min,再重复上述离心等过程,共重复三次,用 pH 试纸检测上清液至中性后,弃去上清液,加入色谱甲醇 15 mL,超声溶解后蒸至九成干,转移至真空干燥箱烘干,磨粉称重即得提取物质量 M(g)。

精密称定供试品 20 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即为供试品待测溶液。

1.3.3 色谱条件及方法学考察

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长为 203 nm; 柱温为 30 ℃; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相乙腈 (A): 水 (B) 等度洗脱 (0~60 min, 46%A)。

采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定人参皂苷 R_{g5} 含量, 并通过线性关系考察、精密度考察、重复性试验、稳定性试验、加样回收试验进行方法学考察。①线性关系: 配制浓度分别为 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL 的标准系列溶液。按照 1.3.3 中的色谱条件检测方法, 精密吸取上述不同浓度的混合标准溶液 10 μL 进行测定。以对照品浓度 (mg/mL) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归计算, 并绘制标准曲线。②精密度: 精密吸取同一对照品溶液 6 份, 重复进样六次, 记录人参皂苷 R_{g5} 标样的峰面积, 并计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。③重复性: 精密称取同一批次的供试品 6 份, 按照 1.3.2 中方法配制供试品溶液, 按 1.3.3 中的测定方法分别进样检测, 测定定量试样中人参皂苷 R_{g5} 的峰面积, 并计算 RSD 值。④稳定性: 取同一供试品溶液, 分别在放置 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h 后按 1.3.3 中方法进样测定, 记录峰面积, 计算 RSD 值。⑤准确度: 取 6 份已知含量 (见重复性实验) 的供试品, 每份约 20 mg, 每份加入人参皂苷 R_{g5} 对照品 1.0 mg。配制供试品溶液, 测定样品中人参皂苷 R_{g5} 的含量, 并分别计算加样回收率。

1.3.4 人参皂苷 R_{g5} 得率计算方法

以人参皂苷 R_{g5} 得率为试验指标, 计算公式如下:

$$Y = \frac{X \times M}{m \times 1000} \times 100\%$$

其中 Y 为人参皂苷 R_{g5} 得率 (%), X 为提取物中人参皂苷 R_{g5} 的含量 (mg/g); M 为提取物质量 (g); m 为样品中总皂苷质量 (g)。

1.4 试验设计

1.4.1 正交优化试验

根据人参茎叶总皂苷中皂苷的理化性质, 选取水解制备过程中的料液比 (A)、柠檬酸浓度 (B)、反应时间 (C)、反应温度 (D) 4 个因素作为考察条件, 每个因素设置 3 个水平, 按 L₉ (3⁴) 正交表设计试验方案, 以人参皂苷 R_{g5}

得率为试验指标, 优化柠檬酸水解制备人参皂苷 R_{g5} 的条件。

1.4.2 响应面优化试验

在正交试验的基础上, 采用中心组合试验 Box-Behnken 设计模型试验 (表 1)。采用 Design Expert 13 软件按响应面法共设计 29 组试验, 对料液比、柠檬酸浓度、反应时间、反应温度 4 个因素进行条件优化, 以人参皂苷 R_{g5} 得率为响应面, 确定因素之间的交互作用对人参皂苷 R_{g5} 得率的影响, 确定最优提取条件。

表 1 响应面试验因素水平设计表

Table 1. Design table of factor levels for response surface experiments

因素	料液比 (g : mL)	柠檬酸 浓度	反应时间 (h)	反应温度 (℃)
	A	B	C	D
-1	1 : 15	25%	2.0	85
0	1 : 20	30%	2.5	90
1	1 : 25	35%	3.0	95

1.5 数据处理

通过数据处理系统 (data processing system, DPS) 设计正交试验, 得出处理结果, 采用 Design Expert 13 软件进行响应面设计及分析。

2 结果

2.1 高效液相色谱法分析

采用 HPLC 分析, 结果见图 1, 人参茎叶总皂苷经柠檬酸水解后, 其中的部分原生苷逐步转化为次级皂苷 R_{g5}。

2.2 方法学考察结果

标准曲线评价: 通过线性回归计算, 对照品人参皂苷 R_{g5} 的线性回归方程为 $Y=4197.7x-11.416$, 相关系数 $R^2=0.9997$ 。结果可见, 对照品人参皂苷 R_{g5} 在 0.05~0.5 mg/mL 范围内, 浓度与峰面积线性关系良好。

精密度评价: 本试验对人参皂苷 R_{g5} 对照品标准溶液连续进样 6 次, 峰面积的 RSD 值为 0.27%, 小于 3%, 表明本测定方法仪器精密度良好。

重复性评价: 试验结果可知定量样品中人参皂苷 R_{g5} 峰面积的 RSD 值为 0.72%, 结果稳定, 说明本测定方法重复性良好。

稳定性评价: 试验结果表明供试样品中人参皂苷 R_{g5} 的峰面积 RSD 值为 0.18%, 说明供试品溶液在至少 24 h 内稳定。

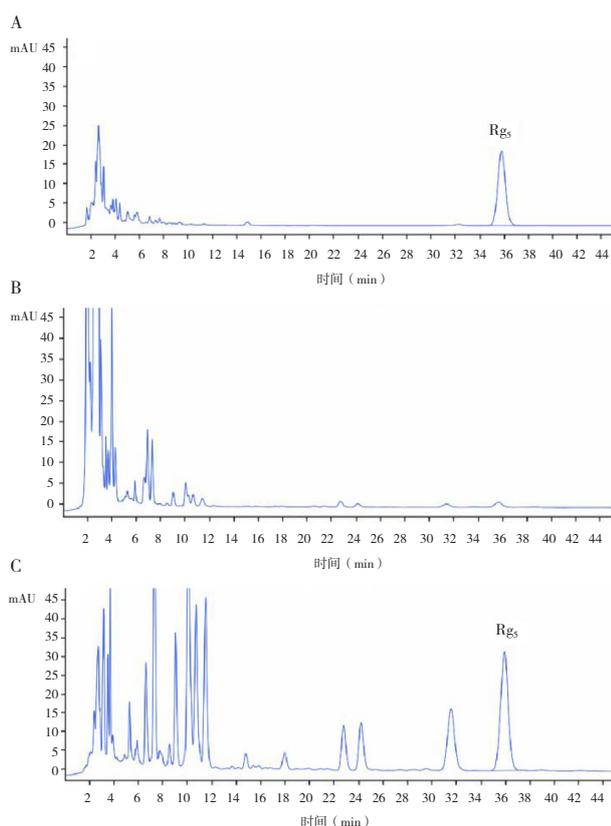


图1 高效液相色谱法图谱

Figure 1. Chromatogram of high performance liquid chromatography

注：A. 人参皂苷 R_{g_5} 标准品色谱图；B. 人参茎叶总皂苷色谱图；C. 提取试样色谱图。

准确度评价：根据方法条件，本试验测定的人参皂苷 R_{g_5} 加样回收率平均值为 101.65%，其 RSD% 值为 1.56%，表明此方法加样回收率较好。各项考察结果表明本方法操作简单、灵敏度高、重复性好、准确度高。

2.3 正交试验结果

2.3.1 正交优化试验结果

如表 2 所示，所选取的 4 个因素对人参皂苷 R_{g_5} 得率均有一定影响，人参皂苷 R_{g_5} 得率影响因素的主次顺序如下：反应温度 ($^{\circ}\text{C}$) > 反应时间 (h) > 柠檬酸浓度 (%) > 料液比 (g : mL)，即 $D > C > B > A$ ；最优方案为 A3B2C3D3，即料液比 (1 g : 25 mL)、柠檬酸浓度 30%、反应时间 3 h、反应温度 95°C 。

2.3.2 正交试验方差分析结果

正交试验方差分析结果见表 3，其中 F 值代表组间均方与组内均方的比值，它通过比较不同来源的变异来评估多组数据的均值情况， F 值越大，说明处理之间的效果（差异）越明显，误差项越小，说明试验精度较高。由表 3 可知，4 个因素处理间效果差异最大的是反应温度，说明反应温度对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响最大。本试验结果表明，柠檬酸浓度、反应时间、反应温度对

表2 L9 (3^4) 正交试验设计及结果Table 2. Design and results of the L9 (3^4) orthogonal test

编号	料液比 (g : mL)	柠檬酸浓度 (%)	反应时间 (h)	反应温度 ($^{\circ}\text{C}$)	人参皂苷 R_{g_5} 得率 (%)		
	A	B	C	D	重复①	重复②	重复③
1	1	1	1	1	7.28	7.52	7.58
2	1	2	2	2	8.95	8.69	8.70
3	1	3	3	3	9.22	8.89	9.13
4	2	1	2	3	8.97	9.52	9.38
5	2	2	3	1	8.49	8.92	8.63
6	2	3	1	2	7.82	7.48	7.52
7	3	1	3	2	8.62	8.59	8.89
8	3	2	1	3	8.74	8.82	9.08
9	3	3	2	1	8.18	7.89	8.05
K1	75.96	76.35	71.84	72.54			
K2	76.73	79.02	78.33	75.26			
K3	76.86	74.18	79.38	81.75			
k1	8.44	8.48	7.98	8.06			
k2	8.53	8.78	8.70	8.36			
k3	8.54	8.24	8.82	9.08			
极差R	0.10	0.54	0.84	1.02			

注：K值用于判断试验因素对试验指标的影响，K1为各因素1水平所对应的试验指标之和，k1为K1的平均值，若因素A对试验指标无影响，KA1、KA2、KA3应相等；同理，K2、K3分别对应各试验因素2、3水平的指标之和，k2、k3分别为K2、K3的平均值。

提取率影响较大,料液比对得率的影响较小。

2.3.3 验证试验

为了验证正交试验法优选条件的可行性,在优选条件下(为便于实际生产操作试验设置温度高点为 95 ℃),将验证试验按料液比(1 g : 25 mL)、柠檬酸浓度 30%、反应时间 3 h、反应温度 95 ℃设置。在此优化条件下进行 3 次重复试验,结果得到人参皂苷 R_{g5} 平均得率为 9.42%, RSD 为 1.25%。验证试验表明优选条件提取工艺重复性和精密度较好,应用正交试验

对柠檬酸水解制备人参皂苷 R_{g5} 的工艺进行筛选,得到提取人参皂苷 R_{g5} 含量较高的制备工艺,且该工艺稳定性高。

2.4 响应面法试验结果

2.4.1 响应面法试验设计及结果

将料液比、柠檬酸浓度、反应时间、反应温度 4 个因素按照表 2 的编码依据 Box-Behnken 设计模型进行 29 组试验,对 4 个因素进行条件优化,以人参皂苷 R_{g5} 得率为响应面,确定最优提取条件,响应面法的试验结果见表 4。

表3 正交试验方差分析结果

Table 3. Results of ANOVA of the orthogonal test

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
区组	10.040 7	8	1.255 1	35.262 7	<0.001
料液比	0.052 6	2	0.026 3	0.738 7	0.492
柠檬酸浓度	1.306 1	2	0.653 0	18.347 2	<0.001
反应时间	3.706 5	2	1.853 2	52.067 7	<0.001
反应温度	4.975 7	2	2.487 8	69.897 3	<0.001
误差	0.640 7	18	0.035 6	-	-

表4 响应面法试验设计及结果

Table 4. Design and results of the response surface experiments

试验号	料液比 (g : mL)	柠檬酸浓度 (%)	反应时间 (h)	反应温度 (℃)	人参皂苷R _{g5} 得率 (%)
1	15	25	2.5	90	8.33
2	25	25	2.5	90	8.18
3	15	35	2.5	90	8.05
4	25	35	2.5	90	8.01
5	20	30	2.0	85	7.50
6	20	30	3.0	85	8.68
7	20	30	2.0	95	9.04
8	20	30	3.0	95	9.47
9	15	30	2.5	85	8.06
10	25	30	2.5	85	8.19
11	15	30	2.5	95	9.15
12	25	30	2.5	95	9.52
13	20	25	2.0	90	7.92
14	20	35	2.0	90	7.62
15	20	25	3.0	90	9.34
16	20	35	3.0	90	8.98
17	15	30	2.0	90	7.87
18	25	30	2.0	90	7.64
19	15	30	3.0	90	8.72
20	25	30	3.0	90	8.65
21	20	25	2.5	85	7.85
22	20	35	2.5	85	7.42
23	20	25	2.5	95	9.34
24	20	35	2.5	95	9.04

续表4

试验号	料液比 (g : mL)	柠檬酸浓度 (%)	反应时间 (h)	反应温度 (°C)	人参皂苷R _{g5} 得率 (%)
25	20	30	2.5	90	8.98
26	20	30	2.5	90	9.04
27	20	30	2.5	90	8.85
28	20	30	2.5	90	8.88
29	20	30	2.5	90	8.72

2.4.2 模型的建立

对响应面法试验结果数据进行处理, 得到回归方程 $Y=8.89-0.0042A-0.1467B+0.5100C+0.6542D+0.0275AB+0.04AC+0.075AD-0.0125BC+0.015BD-0.1875CD-0.3437A^2-0.3799B^2-0.2199C^2+0.0263D^2$ 。由表5可知, 该次模拟出的回归方程模型中 F 值为16.67, $R^2=0.9434$, $P<0.01$, 说明响应值94.34%的变化均能被该模型预测, 变异系数(CV)为2.48%, 表明用响应面法分析柠檬酸水解制备人参皂苷R_{g5}工艺条件并建立模型与预测具有可行性。

模拟出的二次回归方程中料液比(A)、柠檬酸浓度(B)、反应时间(C)的二次项系数值均小于零, 说明该模型中这三个因素存在稳定的顶点, 即在此条件下存在人参皂苷R_{g5}得率的最

大值; 而二次回归方程中反应温度(D)的二次项系数值大于零, 说明其无最大值, 但是为了便于实际生产, 反应温度最高值设为95°C, 即95°C为该因素响应值的顶点。

同时该模型中失拟项 F 值为3.67, $P=0.111$, 表明失拟误差不显著, 说明试验误差相对较小。该响应面法试验的处理数据表明响应面法分析得到回归方程的拟合程度好, 回归效果显著, 试验结果具有很高的可信性和准确性, 因此响应值与自变量间的多元回归关系适用于本模型。

由表5中 F 值和 P 值可知, 一次项中仅因素料液比(A)的差异不显著, 柠檬酸浓度(B)的差异性显著($P<0.05$), 反应时间(C)和反应温度(D)的差异性均较显著($P<0.01$)。通过4个交互项的偏回归系数可以看出, 4个交

表5 响应面法试验方差分析结果

Table 5. Results of ANOVA of the response surface experiments

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	10.3700	14	0.7406	16.6700	< 0.001
A	0.0002	1	0.0002	0.0047	0.946
B	0.2581	1	0.2581	5.8100	0.030
C	3.1200	1	3.1200	70.2400	< 0.001
D	5.1400	1	5.1400	115.5700	< 0.001
AB	0.0030	1	0.0030	0.0681	0.798
AC	0.0064	1	0.0064	0.1440	0.710
AD	0.0225	1	0.0225	0.5064	0.488
BC	0.0006	1	0.0006	0.0141	0.907
BD	0.0009	1	0.0009	0.0203	0.889
CD	0.1406	1	0.1406	3.1600	0.097
A ²	0.7661	1	0.7661	17.2400	< 0.001
B ²	0.9362	1	0.9362	21.0700	< 0.001
C ²	0.3137	1	0.3137	7.0600	0.019
D ²	0.0045	1	0.0045	0.1012	0.755
残差	0.6221	14	0.0444		
失拟误差	0.5610	10	0.0561	3.6700	0.111
纯误差	0.0611	4	0.0153		
总误差	10.9900	28			

注: 决定系数 $R^2=0.9434$; 调整系数 $R^2_{adj}=0.8868$ 。

互项均不显著 ($P > 0.05$), 表明料液比 (A)、柠檬酸浓度 (B)、反应时间 (C)、反应温度 (D) 4 个影响因素的交互项对人参皂苷 R_{g_5} 得率影响均不显著 ($P > 0.05$), 4 种影响因素的相互作用无意义。由 F 值可知, 反应温度 (D) $>$ 反应时间 (C) $>$ 柠檬酸浓度 (B) $>$ 料液比 (A) 为各个自变量对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响顺序。

2.4.3 响应面法对制备工艺的分析与优化

根据柠檬酸水解人参茎叶总皂苷制备人参皂苷 R_{g_5} 的工艺优化, 在 4 个影响因素中, 取其中 2 个因素作 X 轴和 Y 轴, 以得率作 Z 轴, 采用 Design Expert 13 软件创建两因素交互作用人参皂苷 R_{g_5} 得率影响的二维等高线图与三维曲面图。等高线图与三维曲面图可以直观地反映交互作用对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响程度。等高线的形状表明变量之间的交互影响显著性, 圆形等高线表示两变量之间的交互影响不显著; 椭圆形等高线

表明两变量之间的交互影响显著。响应面曲面的坡度可反映该因素对人参皂苷 R_{g_5} 得率影响的强弱程度^[19-20]。具体来说, 曲面越陡, 等高线越密集, 则影响越显著。

如图 2 所示, 在同一料液比条件下, 当柠檬酸浓度为 25%~30%, 随着反应浓度的增加, 人参皂苷 R_{g_5} 得率明显升高; 之后随着柠檬酸浓度增加, 人参皂苷 R_{g_5} 得率下降。顺着柠檬酸浓度的方向等高线密度变化相较料液比方向变化更大, 说明柠檬酸浓度对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响大于料液比。

如图 3 所示, 在同一料液比条件下, 在反应时间 2.0~3.0 h 内, 随着反应时间的增加, 人参皂苷 R_{g_5} 得率逐渐升高, 并且在反应时间方向人参皂苷 R_{g_5} 得率变化幅度较大, 说明反应时间对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响大于料液比。

如图 4 所示, 在同一料液比条件下, 在反应温

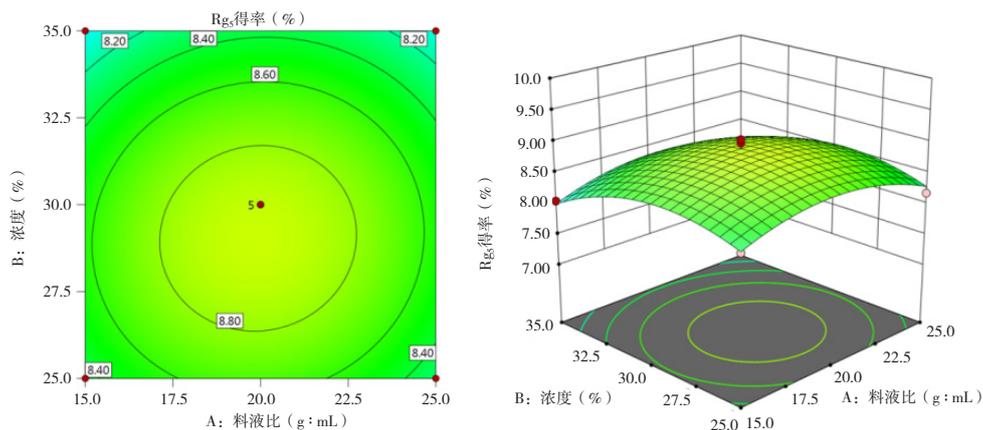


图2 料液比和柠檬酸浓度及其相互作用对人参皂苷 R_{g_5} 得率的响应面分析及等高线图

Figure 2. Response surface analysis and contour map of solid-liquid ratio, citric acid concentration and their interaction on the yield of ginsenoside R_{g_5}

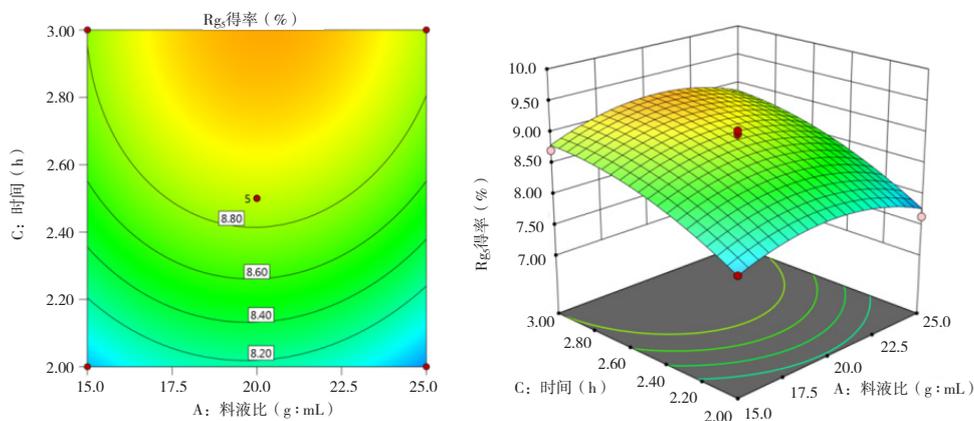


图3 料液比和反应时间及其相互作用对人参皂苷 R_{g_5} 得率的响应面分析及等高线图

Figure 3. Response surface analysis and contour map of solid-liquid ratio, reaction time and their interaction on the yield of ginsenoside R_{g_5}

度 85~95 ℃ 范围内, 随着反应温度的增加, 人参皂苷 R_{g_5} 得率逐渐升高, 且在反应温度方向人参皂苷 R_{g_5} 得率变化幅度较大, 对比两因素对得率的影响, 反应温度大于料液比, 根据颜色变化也可以看出, 反应温度对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响较大。

综上所述, 利用响应面图形分析、回归模型

等分析料液比、柠檬酸浓度、反应时间、反应温度 4 个因素对人参皂苷 R_{g_5} 得率的影响。4 个因素对得率的影响顺序为反应温度>反应时间>柠檬酸浓度>料液比。经响应面设计分析, 最佳提取条件为料液比 1:20.70、柠檬酸浓度 29.10%、反应时间 2.88 h、反应温度 95 ℃, 得率最高可达 9.71%。

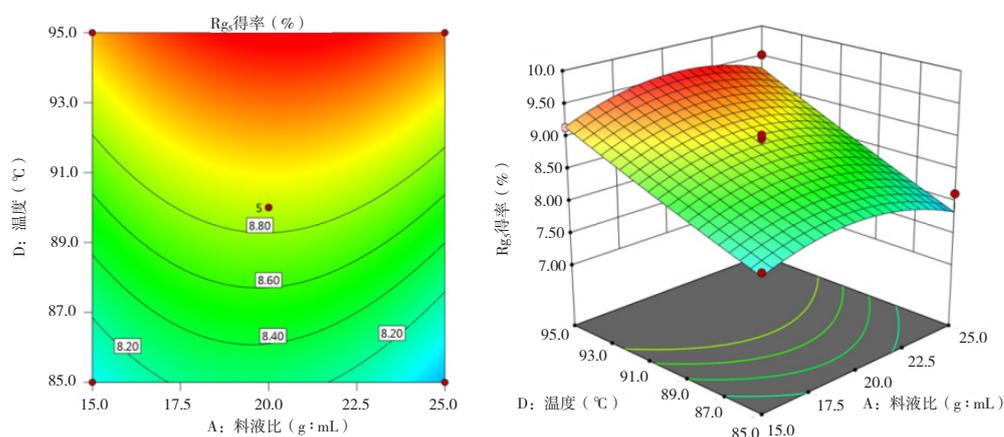


图4 料液比和反应温度及其相互作用对人参皂苷 R_{g_5} 得率的响应面分析及等高线图

Figure 4. Response surface analysis and contour map of solid-liquid ratio, reaction temperature and their interaction on the yield of ginsenoside R_{g_5}

2.4.4 验证试验

通过 Design Expert 13 软件求解回归方程, 得到人参皂苷 R_{g_5} 得率优化制备条件, 同时考虑到实际生产过程中条件控制精度问题, 将优化条件修正参数为料液比 1:21、柠檬酸浓度 30%、反应时间 3 h、反应温度 95 ℃。在此条件下进行 3 次重复试验, 平均得率为 9.64%, RSD 为 1.42%, 表明提取试验的重复性和精密性较好, 模型预测的最大得率为 9.71%, 比验证试验的平均得率 (9.64%) 高 0.07%, 表明建立的模型和实际情况基本吻合, 说明模型拟合性和有效性较好。

3 讨论

本研究通过正交试验和 Box-Behnken 响应面法对柠檬酸水解制备人参皂苷 R_{g_5} 的工艺进行优化。通过 Design-Expert 13 软件同时结合实际生产验证试验, 表明建立的模型和实际情况基本吻合, 模型拟合性和有效性较好。研究结果表明, 反应温度和反应时间对人参皂苷 R_{g_5} 提取效果影响较大, 需要在今后的实际应用中有效控制反应温度和时间。本研究仅进行了人参皂苷 R_{g_5} 的转化提取, 但并未进行纯化制备的中试, 经正交试验和 Box-Behnken 响应面法

优化工艺的稳定性较高, 适用于柠檬酸水解制备人参皂苷 R_{g_5} 提取工艺的优化, 人参皂苷 R_{g_5} 得率较高。

本研究通过酸性环境对人参皂苷进行结构修饰, 制备稀有人参皂苷 R_{g_5} , 相较于催化人参须根粉转化制备稀有人参皂苷, 利用人参茎叶皂苷可以大大降低生产成本^[21], 制备效果更佳, 更适用于工业化生产制备。稀有人参皂苷天然含量稀少、生物利用度较高, 其获得途径通常为从人参属植物中直接提取的原型皂苷经生物学或化学方法转化。近年来, 出现了利用乳酸菌等发酵转化的途径, 与本研究所采用的柠檬酸转化法相比, 其所需的转化温度低, 对环境要求更低, 发酵所需时间较长, 一般在 24~72 h 以上^[22-23]。未来的研究有待进一步结合各转化方式的优势, 综合提高转化效率, 以达到生产试验等制备工艺适应所需的要求, 同时为稀有人参皂苷的制备及大规模生产提供研究基础。

综上所述, 研究表明, 正交试验和 Box-Behnken 响应面法适用于柠檬酸水解制备人参皂苷 R_{g_5} 提取工艺的优化, 该方法操作简单, 绿色环保, 人参皂苷 R_{g_5} 得率较高, 为未来开发人参皂苷结构修饰的研究和应用提供了重要参考。

参考文献

- 1 杨怀雷, 查琳, 王影, 等. HPLC 法测定不同年生野山参中 9 种人参皂苷含量 [J]. 人参研究, 2020, 32(4): 7-10. [Yang HL, Zha L, Wang Y, et al. Determination of nine ginsenosides in wild ginseng of different ages by HPLC[J]. Ginseng Research, 2020, 32(4): 7-10.] DOI: 10.19403/j.cnki.1671-1521.2020.04.002.
- 2 刘一桐. 柠檬酸处理对红参化学成分及生物活性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017. [Liu YT. Effects of citric acid treatment on chemical composition and biological activity of red ginseng[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2017.] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=RNIbheLHWEj4PeYhtfequdV4FvSEYb4ApcEOXwnokwHbGHwupG-mHd4tCKy0q8_45T3FRFAqRrBaX1wdpqiqlDNbmCikfiPeRZGR9KWKbpq_Wz1P4ltXotjX018q_yt_VIK-65xLlSrLUvrENJe9D5e06JC0Y12xSUBgAhcKGMc6skNjmls3G_PFIayP3&uniplatform=NZKPT&language=CHS
- 3 王筱艳. 人参茎叶总皂苷动态微波辅助酶解提取纯化及微胶囊化研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018. [Wang XY. Research on dynamic-microwave assisted enzymatic hydrolysis extraction, purification and microencapsulation of total ginsenosides from stems and leaves of panax ginseng[D]. Changchun: Jilin University, 2018.] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=RNIbheLHWEjJ_At6NXUm6xi4hbE6upGoIUJrg6unUyWZNEsqOANK1aqyY-MarItdSWy76STV11nQcSsqjO2o00Q1PWCoHLFzg4UTkMalSik0DE737b_dJ81SDCQ7i3hOUgqITCg8q-Z6z82KlzfVzO_IAM2w38ZvTpe_13GeFGbI1ZDU_H0GufCGSFuXW1W4&uniplatform=NZKPT&language=CHS
- 4 Guo YH, Kuruganti R, Gao Y. Recent advances in ginsenosides as potential therapeutics against breast cancer[J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(25): 2334-2347. DOI: 10.2174/1568026619666191018100848.
- 5 孙成鹏, 高维平, 赵宝中, 等. 柠檬催化转化原人参二醇组皂苷制备人参皂苷 Rg5 的初步研究 [J]. 中成药, 2013, 35(12): 2694-2698. [Sun CP, Gao WP, Zhao BZ, et al. On conversion of protopanaxadiol type saponins to ginsenoside Rg5 by lemon[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2013, 35(12): 2694-2698.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2013.12.030.
- 6 叶安琪. 基于分子筛辅助的人参皂苷 Rg5 的高效制备及相关皂苷的稳定性研究 [D]. 吉林: 吉林化工学院, 2021. [Ye AQ. The study on the efficient preparation of ginsenoside Rg5 assisted by molecular sieve and the stability of related saponins[D]. Jilin: Jilin Institute of Chemical Technology, 2021.] DOI: 10.27911/d.cnki.gjgxc.2021.000012.
- 7 Almhanna K, Cubitt CL, Zhang S, et al. MK-2206, an Akt inhibitor, enhances carboplatinum/paclitaxel efficacy in gastric cancer cell lines[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(10): 932-936. DOI: 10.4161/cbt.25939.
- 8 Zhao XY, He ZY, Zai SF. Effects of ginsenoside Rg5 on cell cycle and invasion of gastric cancer[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2020, 36(1): 51-54. DOI: 10.12047/j.cjap.5891.2020.011.
- 9 Liu Y, Fan D. The preparation of ginsenoside Rg5, its antitumor activity against breastcancer cells and its targeting of PI3K[J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 246. DOI: 10.3390/nu12010246.
- 10 李莱. 基于 ROS 介导 JNK/p38 MAPK 的激活对人参皂苷 Rg5 促进人肺腺癌凋亡及细胞周期阻滞的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023. [Li M. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis and G2/M phase arrest in lung adenocarcinoma via ROS-mediated JNK/p38 MAPK activation[D]. Changchun: Jilin University, 2023.] DOI: 10.27162/d.cnki.gjlin.2023.007714.
- 11 Irfan M, Kim M, Rhee MH. Anti-platelet role of Korean ginseng and ginsenosides in cardiovascular diseases[J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1): 24-32. DOI: 10.1016/j.jgr.2019.05.005.
- 12 孙美阳, 窦德强. 基于网络药理学的人参、红参及黑参抗癌的作用机制及活性成分研究 [J]. 人参研究, 2021, 33(2): 2-16. [Sun MY, Dou DQ. Study on anti-cancer mechanism and active components of ginseng, red ginseng and black ginseng based on network pharmacology[J]. *Ginseng Research*, 2021, 33(2): 2-16.] DOI: 10.19403/j.cnki.1671-1521.2021.02.001.
- 13 Wei Y, Yang HX, Zhu CH, et al. Ginsenoside Rg5 relieves type 2 diabetes by improving hepatic insulin resistance in db/db mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 71: 104014. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104014.
- 14 Piao XM, Huo Y, Kang JP, et al. Diversity of ginsenoside profiles produced by various processing technologies[J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4390. DOI: 10.3390/molecules25194390.
- 15 杨烁, 刘一桐, 余欣鑫, 等. 柠檬酸水解法获得稀有人参皂苷工艺的优化 [J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(5): 577-582. [Yang S, Liu YT, She XX, et al. Optimization of rare ginsenoside obtaining technology by citric acid hydrolysis method[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2018, 40(5): 577-582.] DOI: 10.13327/j.jjlau.2018.3218.
- 16 郭丹丹, 成乐琴, 于金龙, 等. 人参皂苷 Rg5 的提取制备工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38(20): 42-46, 64. [Guo DD, Cheng YQ, Yu JL, et al. Study on the preparation process of ginsenoside Rg5[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(20): 42-46, 64.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-6521.2017.20.008.
- 17 孙成鹏. 柠檬催化转化原人参二醇组皂苷制备稀有人参皂苷 Rg3 [D]. 长春: 东北师范大学, 2013. [Sun CP. Conversion of protopanaxadiol type saponins into minor ginsenoside Rg3 catalyzed by lemon[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2013.] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=RNIbheLHW EjiX9ezf2bAReKjoXDMH_yjp-yvZSmCEjemEDz6Grqg8010pIb1g8MVLUH4qJJeGgIFFj0_YoM9hrLivePB7tvwu6A-iwEfBASwkvH9vFAvvGkrkZEAroJIEN4OmBoYN9DB3KHmUnrRdmQUSm63vVsR1IprJ45SI83au-JSiy4_gD6MYN5DIHYT&uniplatform=NZKPT&language=CHS
- 18 张浩然, 朱小涵, 张跃伟, 等. 原人参二醇组皂苷选择性制备人参皂苷 20(S)-Rg3 和 Rg5 及其生成机理研究 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(2): 129-137. [Zhang HR, Zhu XH, Zhang YW, et al. The selective preparation of ginsenoside 20(S)-Rg3 and Rg5 from protopanaxadiol group saponins and its formation mechanism[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(2): 129-137.] DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030121.

- 19 李华妮, 郑连营, 葛文静, 等. 正交试验、响应面法优化加味三根汤的提取工艺比较 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1089–1093. [Li HN, Zheng LY, Ge WJ, et al. Comparison of extraction process of jiawei sangen decoction optimized by orthogonal experiment and response surface methodology[J]. Modern Chinese Medicine, 2019, 21(8): 1089–1093.] DOI: [10.13313/j.issn.1673-4890.20190107004](https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20190107004).
- 20 许晓莉, 李彩霞, 吴瑞枫. 多指标综合评分结合响应面法优选脂康颗粒提取工艺 [J]. 中国药业, 2021, 30(19): 43–47. [Xu XL, Li CX, Wu RF, et al. Optimization of extraction process of Zhikang granules by synthesizing multiple guidelines grading method combined with response surface method[J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(19): 43–47.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4931.2021.19.012).
- 21 叶安琪, 赵迅, 张跃伟, 等. 天然柠檬汁催化人参须根粉制备 20(S,R)-Rg3 和 Rg5 工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(17): 68–74. [Ye AQ, Zhao X, Zhang YW, et al. Preparation of ginsenosides 20(S,R)-Rg3 and Rg5 from ginseng root powder catalyzed by natural lemon juice[J]. Food Research and Development, 2021, 42(17): 68–74.] DOI: [10.12161/j.issn.1005-6521.2021.17.012](https://doi.org/10.12161/j.issn.1005-6521.2021.17.012).
- 22 台雪月, 卢忠魁, 刘超, 等. 保加利亚乳杆菌发酵转化人参皂苷工艺研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(6): 1–9. [Tai XY, Lu ZK, Liu C, et al. Study on the process of fermentation and transformation of ginsenosides by Lactobacillus bulgaricus[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(6): 1–9.] DOI: [10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231226005](https://doi.org/10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231226005).
- 23 严建刚, 陆路, 付少委, 等. 乳酸菌发酵转化人参皂苷 Rg3 工艺研究 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(16): 222–230. [Yan JG, Lu L, Fu SW, et al. Processing technology of fermentation transformation of Ginsenoside Rg3 by lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(16): 222–230.] DOI: [10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033919](https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033919).

收稿日期: 2024 年 11 月 27 日 修回日期: 2025 年 03 月 07 日

本文编辑: 张苗 黄笛

引用本文: 冯惠柳, 杜跃中, 李健豪, 等. 基于正交试验和Box-Behnken响应面法优化人参皂苷Rg₅的制备工艺[J]. 数理医药学杂志, 2025, 38(4): 248–257. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202411146](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202411146).

Feng HL, Du YZ, Li JH, et al. Optimization of the preparation process of ginsenoside Rg₅ based on orthogonal test and Box-Behnken response surface method[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2025, 38(4): 248–257. DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202411146](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202411146).