

# 复合酶提取石榴皮中原花青素工艺优化及其动力学模型建立

王占一<sup>1</sup>, 张立华<sup>1</sup>, 王玉海<sup>1</sup>, 戴博<sup>2</sup>, 李卓瓦<sup>1</sup>, 毕海丹<sup>1</sup>

(1. 枣庄学院生命科学学院, 山东枣庄 277160; 2. 中国人民解放军空军总医院药学部, 北京 100142)

**摘要:** 目的 优化复合酶(纤维素酶-果胶酶)提取石榴皮中原花青素的工艺, 并建立其动力学模型。方法 以原花青素得率为评价指标, Plackett-Burman设计筛选影响因素, Box-Behnken设计对加酶量、酶解温度和酶解时间进行优化。建立4种提取工艺的动力学模型(Allometric1、Expdec1、Logistic、Sweibull1), 通过精准因子( $A_f$ )、偏差因子( $B_f$ )、根平均方差(RMSE)、决定系数( $R^2$ )分析模型的适用性。**结果** 最佳条件为加酶量1.5%、酶解温度48℃、酶解时间270 min, 原花青素得率为1.88%。Logistic模型和Sweibull1模型拟合精度均较高, 并且后者在最佳酶解温度(48℃)下预测效果更好。**结论** 所建立的优化条件和动力学模型均可用于石榴皮中原花青素提取工艺的工程放大和优化控制。

**关键词:** 石榴皮; 原花青素; 复合酶提取; 动力学模型; Plackett-Burman设计; Box-Behnken设计

中图分类号: R284.2; R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)12-2575-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.12.010

## Optimization of complex enzymatic extraction for proanthocyanidins from *Granati Pericarpium* and establishment of its kinetic models

WANG Zhan-yi<sup>1</sup>, ZHANG Li-hua<sup>1</sup>, WANG Yu-hai<sup>1</sup>, DAI Bo<sup>2</sup>, LI Zhuo-wa<sup>1</sup>, BI Hai-dan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China; 2. Department of Pharmacy, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

**ABSTRACT: AIM** To optimize the complex enzymatic (cellulase-pectinase) extraction of proanthocyanidins from *Granati Pericarpium* and to establish its kinetic models. **METHODS** With the yield of proanthocyanidins as an evaluation index, Plackett-Burman design was applied to screening the influencing factors, after which Box-Behnken design was adopted in the optimization of enzyme dosage, enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis time. Four kinetic models (Allometric1, Expdec1, Logistic and Sweibull1) for the extraction were established, whose applicabilities were analyzed by precise factor ( $A_f$ ), deviation factor ( $B_f$ ), root mean square error (RMSE) and coefficient of determination ( $R^2$ ). **RESULTS** To obtain a 1.88% of good proanthocyanidins yield, the optimal conditions were determined to be 1.5% for enzyme dosage, 48℃ for enzymatic hydrolysis temperature, and 270 min for enzymatic hydrolysis time. The fitting precisions of both Logistic model and Sweibull1 model were relatively high, and the latter showed a better prediction effect at 48℃ optimal enzymatic hydrolysis temperature. **CONCLUSION** The established optimal conditions and kinetic models can be used for engineering scale-up and optimal control in extraction of proanthocyanidins from *Granati Pericarpium*.

**KEY WORDS:** *Granati Pericarpium*; proanthocyanidins; complex enzymatic extraction; kinetic models; Plackett-Burman design; Box-Behnken design

收稿日期: 2016-01-11

基金项目: 国家星火计划项目(2012GA740049); 山东省自然科学基金(ZR2013BL018)

作者简介: 王占一(1980—), 男, 硕士, 讲师, 执业药师, 从事天然药物活性成分提取分离工作。Tel:(0632) 3785886, E-mail: zhiwang@126.com

石榴 *Punica granatum* L. 又名安石榴、天浆，在我国已有 2 000 多年栽培历史，栽培面积高达 58 万亩<sup>[1]</sup>，其干燥果皮入药，称为石榴皮，是一种常用中药材，早在《雷公炮炙论》中就有记载，也是《中国药典》2010 版收载品种<sup>[2]</sup>，含有多酚、黄酮、多糖等多种化学成分，其中多酚类成分含有量高达 10.4% ~ 21.3%。原花青素是该类成分的主要组成部分<sup>[3-4]</sup>，大多为儿茶素类化合物通过吡喃环上的 3-羟基或 3,4-二羟基配位缩合或聚合而成的二聚体、寡聚体或多聚体<sup>[4]</sup>，具有抗氧化、抗衰老、抗恶性肿瘤、防治心脑血管疾病等多种生物活性<sup>[5-7]</sup>。

在国内，生物酶提取已成为现代中药有效成分提取的新方法，加入纤维素酶、果胶酶等生物酶可以降解细胞壁纤维素骨架，破坏细胞壁致密构造，减小细胞壁、细胞间质等传质屏障对有效成分从胞内向提取介质扩散的传质阻力，从而有利其溶出<sup>[8]</sup>，与传统工艺相比，具有操作简单、易于推广，条件温和、环境友好等优点<sup>[9-10]</sup>。因此，本实验以石榴皮为材料，将纤维素酶与果胶酶组成复合酶，通过 Plackett-Burman、Box-Behnken 设计优化工艺条件，同时建立数学模型对提取过程进行动力学分析，为工业化大生产提供理论依据。

## 1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂 石榴皮采自山东枣庄万亩石榴园核心区，经枣庄学院同志佩教授鉴定为正品，低温干燥后粉碎到要求粒度。儿茶素对照品（含有量 >99.5%，批号 877-201401，中国食品药品检定研究院）；纤维素酶（酶活力 ≥ 15 000 U/g）、果胶酶（酶活力 ≥ 1 100 U/g）（国药集团化学试剂有限公司）。甲醇、香草醛、硫酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠（天津市大茂化学试剂厂）；水为蒸馏水（枣庄学院生物学省级教学示范中心）。

1.2 仪器 FA1104B 型电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司）；WFJ7200 型可见分光光度计（尤尼柯上海仪器有限公司）；FW135 型多功能粉碎机（天津泰斯特仪器有限公司）；HH-4 型电热恒温水浴锅（上海跃进医疗器械厂）；SH2-Ⅲ型循环水真空泵（上海亚荣生化仪器厂）；RE-2000B 型旋转蒸发器（巩义市予华仪器有限责任公司）；标准检验筛（浙江上虞华美仪器纱筛厂）；PHS-3E 型酸度计（上海仪电科学仪器有限公司）；RW16 型电子搅拌器（上海捷沪仪器仪表有限公司）。

## 2 实验方法

2.1 标准曲线的制定 采用香草醛-浓硫酸法<sup>[11-12]</sup>。精密称取干燥至恒重的儿茶素对照品 5.0 mg，置于 50 mL 小烧杯中，甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中，即得 0.2 mg/mL 对照品溶液。精密吸取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，即得 0.00、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06 mg/mL 儿茶素-甲醇溶液，分别量取 0.5 mL，置于 10 mL 具塞比色管中，依次加入 2.5 mL 3% 香草醛-甲醇溶液和 2.5 mL 30% 浓硫酸-甲醇溶液，甲醇稀释至刻度，于 30 °C 恒温水浴锅中保温 15 min，充分振摇后，于 500 nm 波长处测定吸光度 A，并以其为纵坐标，儿茶素质量浓度为横坐标（C）进行回归，得到标准曲线为  $A = 0.0026C - 0.051$  ( $R^2 = 0.9991$ )，在 0 ~ 0.003 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2 样品处理方法 精密称取粉碎至规定粒度的石榴皮粉末 5.0 mg，置于三颈圆底烧瓶中，加入不同比例复合酶（纤维素酶-果胶酶）至设定加酶量，再加入一定 pH 值磷酸盐缓冲液至设定料液比例，调节电子搅拌器至设定转速，于设定温度水浴锅中酶解反应至设定时间<sup>[13-14]</sup>。反应结束后，立即在沸水中灭酶 10 min，抽滤，滤液定容至 250 mL，作为供试品溶液。精密量取 0.5 mL，置于 10 mL 具塞比色管中，按“2.1”项下方法测定吸光度 A，计算原花青素含有量及得率，公式如下。

$$\text{得率}(Y) = \frac{\text{样品中原花青素含量}}{\text{样品重量}} \times 100\% \quad (1)$$

## 2.3 提取工艺试验

2.3.1 筛选（Plackett-Burman 设计） 在原花青素提取工艺中，影响因素共有 8 个，分别为原药粒度、料液比、搅拌速度、复合酶（纤维素酶-果胶酶）比例、加酶量、介质 pH、酶解温度和酶解时间，依次编码为  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_7$  和  $X_8$ ，每个因素均设定高、低两个水平。以原花青素得率（Y）为响应值，8 个影响因素为自变量，共进行 12 次试验<sup>[15]</sup>。因素水平见表 1。

2.3.2 优化（Box-Behnken 设计） 在 Plackett-Burman 设计基础上，选择加酶量（ $X_5$ ）、酶解温度（ $X_7$ ）和酶解时间（ $X_8$ ）作为 3 个自变量，应用 Box-Behnken 设计建立响应值与自变量之间的函数关系，优化提取工艺<sup>[15-16]</sup>。因素水平见表 2。

2.4 动力学模型 采用准确因子  $A_f$ 、偏差因子  $B_f$ 、根平均方差 RMSE 和相关因子  $R^2$  来评价模型

表1 Plackett-Burman设计因素水平

Tab. 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

编码	因素	低水平	高水平
X <sub>1</sub>	原药粒度/目	20	100
X <sub>2</sub>	料液比	1:15	1:25
X <sub>3</sub>	搅拌速度/(r·min <sup>-1</sup> )	60	180
X <sub>4</sub>	复合酶比例	1:1	2:1
X <sub>5</sub>	加酶量/%	0.5	2.5
X <sub>6</sub>	介质pH	3.8	5.2
X <sub>7</sub>	酶解温度/℃	36	50
X <sub>8</sub>	酶解时间/min	180	300

表2 Box-Behnken设计因素水平

Tab. 2 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
X <sub>5</sub> 加酶量/%	0.5	1.5	2.5
X <sub>7</sub> 酶解温度/℃	36	43	50
X <sub>8</sub> 酶解时间/min	180	240	300

的拟合程度<sup>[17-18]</sup>。其中,  $A_f$  表示预测值与实测值的偏离度,  $A_f$  值越小, 模型拟合度越好;  $B_f < 1$  表示实测值比预测值低,  $B_f > 1$  表示实测值比预测值高, 即其越接近1, 模型拟合度越好; RMSE 和  $R^2$  表示模型的精确度, 前者越小, 后者越接近1, 模型精确度越高。计算公式如下 ( $n$  表示计算中实测值的个数, pred 表示预测值, obs 表示实测值)。

$$A_f = 10 \left[ \frac{\sum |\lg(\text{pred}/\text{obs})|}{n} \right] \quad (2)$$

$$B_f = 10 \left[ \frac{\sum \lg(\text{pred}/\text{obs})}{n} \right] \quad (3)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\text{obs} - \text{pred})^2}{n-1}} \quad (4)$$

2.5 统计分析 试验设计采用 Design-Expert 8.0.5 软件, 图形制作和动力学模型拟合采用 Origin Pro 8.0 软件。

### 3 结果与分析

#### 3.1 提取工艺参数优化

3.1.1 Plackett-Burman 设计 选用  $n=12$  试验设计模块, 以原花青素得率 ( $Y$ ) 为预测响应值, 平行3次, 取平均值, 对  $X_1 \sim X_8$  进行评价, 设计安排及结果见表3, 方差分析见表4。

由表4可知, 模型达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 复相关系数  $R^2 = 0.9602$ , 决定系数  $R_{\text{adj}}^2 = 0.8541$ , 表明能解释 85.41% 的变异性, 即该模型可以用来评价各因素对结果的影响程度<sup>[15]</sup>。加酶量 ( $X_5$ )、酶解温度 ( $X_7$ )、酶解时间 ( $X_8$ ) 均达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 即为主要影响因素, 将通过 Box-Behnken 设计进行优化; 其他5个因素的影响均不显

著 ( $P > 0.05$ ), 考虑到效率提高及成本节约, 选择原药粒度 60 目, 料液比 1:20, 搅拌速度 90 r/min, 复合酶比例 3:2, 介质 pH 4.5。

表3 Plackett-Burman设计安排及结果

Tab. 3 Arrangement and results of Plackett-Burman design

试验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	Y/%
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.16
2	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.36
3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.30
4	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.39
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.34
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1.06
7	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	1.25
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.35
9	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.56
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.01
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1.33
12	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.99

表4 Plackett-Burman设计方差分析

Tab. 4 Analysis of variance of Plackett-Burman design

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.31	8	0.039	9.05	0.0485
X <sub>1</sub>	0.036	1	0.036	8.46	0.0620
X <sub>2</sub>	0.004	1	0.004	0.94	0.4037
X <sub>3</sub>	0.0008	1	0.0008	0.19	0.6892
X <sub>4</sub>	0.024	1	0.024	5.67	0.0976
X <sub>5</sub>	0.087	1	0.087	20.22	0.0205
X <sub>6</sub>	0.011	1	0.011	2.52	0.2107
X <sub>7</sub>	0.080	1	0.080	18.66	0.0229
X <sub>8</sub>	0.067	1	0.067	15.74	0.0286
残差	0.013	3	0.004	—	—
总离差	0.32	11	—	—	—

3.1.2 Box-Behnken设计 选用  $n=17$  试验设计模块, 以原花青素得率 ( $Y$ ) 为预测响应值, 平行3次, 取平均值, 对  $X_5$ 、 $X_7$  和  $X_8$  进行显著性分析, 设计安排及结果见表5, 方差分析见表6。

表5 Box-Behnken设计安排与结果

Tab. 5 Arrangement and results of Box-Behnken design

试验号	X <sub>5</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	Y/%
1	1	0	-1	1.53
2	-1	-1	0	1.50
3	1	0	1	1.72
4	0	0	0	1.78
5	1	1	0	1.73
6	1	0	-1	1.40
7	1	-1	0	1.31
8	-1	1	0	1.79
9	0	0	0	1.83
10	0	-1	1	1.66
11	0	1	-1	1.75
12	0	1	1	1.86
13	0	0	0	1.76
14	0	0	0	1.78
15	0	-1	-1	1.28
16	-1	0	1	1.75
17	0	0	0	1.82

表6 Box-Behnken设计方差分析

Tab. 6 Analysis of variance of Box-Behnken design

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.55	9	0.061	84.30	<0.000 1
$X_5$	0.021	1	0.021	29.16	0.001 0
$X_7$	0.24	1	0.24	330.30	<0.000 1
$X_8$	0.13	1	0.13	184.00	<0.000 1
$X_5X_7$	0.004 2	1	0.004 2	5.86	0.046 0
$X_5X_8$	0.002 5	1	0.002 5	3.47	0.104 8
$X_7X_8$	0.018	1	0.018	25.29	0.001 5
$X_5^2$	0.065	1	0.065	90.55	<0.000 1
$X_7^2$	0.032	1	0.032	44.22	0.000 3
$X_8^2$	0.020	1	0.020	28.22	0.001 1
残差	0.005	7	0.000 7	—	—
失拟项	0.001 5	3	0.000 5	0.58	0.659 9
误差项	0.003 5	4	0.000 9	—	—
总离差	0.55	16	—	—	—

对表5数据进行拟合, 得到回归方程为  $Y = 1.79 - 0.051X_5 + 0.17X_7 + 0.13X_8 + 0.032X_5X_7 + 0.025X_5X_8 - 0.067X_7X_8 - 0.12X_5^2 - 0.087X_7^2 - 0.070X_8^2$ 。

由表6可知, 模型达到极显著水平 ( $P < 0.000 1$ ), 复相关系数  $R^2 = 0.990 9$ , 决定系数  $R_{adj}^2 = 0.979 1$ , 表明能解释97.91%的变异性, 模型失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ), 表明该模型拟合度良好, 可以用来描述各响应变量与响应值之间的关系, 评价其显著性<sup>[14,16]</sup>。一次项  $X_5$ 、 $X_7$ 、 $X_8$ , 交互项  $X_5X_7$ 、 $X_7X_8$  以及二次项  $X_5^2$ 、 $X_7^2$ 、 $X_8^2$  均达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 表明试验因素对于响应值的影响并不是简单的线性关系, 3个主要因素对原花青素得率的影响依次为酶解温度 ( $X_7$ ) > 酶解时间 ( $X_8$ ) > 加酶量 ( $X_5$ )。

图1~3为响应面图和等高线图, 其均为开口向下的平滑曲面, 表明曲面上存在原花青素得率的最大响应值, 最佳工艺参数存在于所设计的因素水平范围内<sup>[16]</sup>。其中,  $X_5X_8$  交互作用不显著 ( $P > 0.05$ ),  $X_5X_7$  显著 ( $P < 0.05$ ), 表现为响应面曲线陡峭; 在等高线中, 与  $X_5$  轴相比, 沿  $X_7$  轴向等高线的变化相对密集, 即酶解温度对响应值的影响比加酶量大。 $X_7X_8$  交互作用极显著 ( $P < 0.01$ ), 表现为响应面曲线陡峭程度更显著; 在等高线中, 与  $X_8$  轴相比, 沿  $X_7$  轴向等高线的变化相对密集, 即酶解温度对响应值的影响比酶解时间大。在两种显著性交互效应中, 均体现出沿  $X_7$  轴曲线的变化密集, 即  $X_7$  对响应值的影响比  $X_5$  和  $X_8$  大。

3.1.3 验证试验 通过Design-Expert 8.0.5软件, 预测出复合酶提取石榴皮中原花青素的最佳工艺条件为加酶量1.495%、酶解温度48.39 °C、酶解时间272.4 min, 在此条件下, 原花青素得率的预测值为1.90%。考虑到实际操作, 将其修订为加酶量1.5%、酶解温度48 °C、酶解时间270 min。然后, 进行3次平行验证试验, 测得原花青素平均得率为1.88%, 与预测值比较接近, 表明Box-Behnken设计所得结果真实可靠。

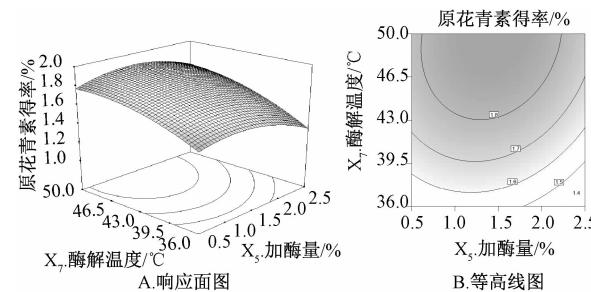


图1 加酶量与酶解温度的响应面与等高线图

Fig. 1 Response surface and contour plots for enzyme dosage and enzymatic hydrolysis temperature

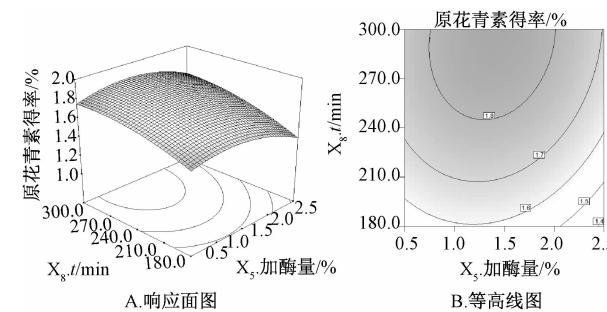


图2 加酶量与酶解时间的响应面与等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots for enzyme dosage and enzymatic hydrolysis time

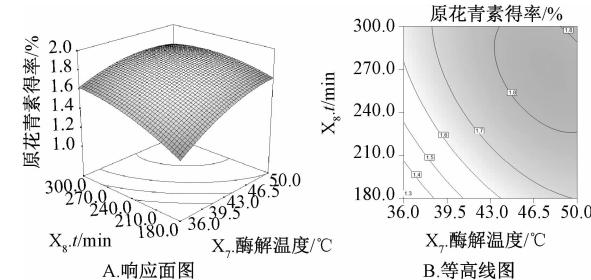


图3 酶解温度与酶解时间的响应面与等高线图

Fig. 3 Response surface and contour plots for enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis time

件为加酶量1.495%、酶解温度48.39 °C、酶解时间272.4 min, 在此条件下, 原花青素得率的预测值为1.90%。考虑到实际操作, 将其修订为加酶量1.5%、酶解温度48 °C、酶解时间270 min。然后, 进行3次平行验证试验, 测得原花青素平均得率为1.88%, 与预测值比较接近, 表明Box-Behnken设计所得结果真实可靠。

### 3.2 动力学分析

#### 3.2.1 动力学模型建立 精密称取干燥至达到要

求的石榴皮粉末5 g, 共25份, 固定原药粒度60目、料液比1:20、搅拌速度90 r/min、复合酶比例3:2、介质pH4.5、加酶量1.5%, 在不同酶解温度(38、43、48、53、58 °C)下以复合酶法提取原花青素, 酶解反应30 min后, 每隔15 min取样0.1 mL, 一直到300 min结束, 测定提取过程中原花青素含有量并计算得率( $n=5$ )。但每次均要取出0.1 mL进行测定, 若重复10次, 必然对试验结果产生一定影响, 故通过下式进行修正<sup>[19-20]</sup>。

$$C_n = \frac{1}{V_r} \left\{ [V_r - 0.1(n-1)] C_t + 0.1 \sum_{i=1}^{n-1} C_i \right\} \quad (6)$$

其中,  $C_n$ 为第 $n$ 次取样时原花青素含有量的修正值(mg/mL),  $C_i$ 为第 $i$ 次取样时原花青素含有量测定值(mg/mL),  $V_r$ 为提取液体积(mL),  $n$ 为取样次数(1~10次)。

在不同酶解温度下, 原花青素得率曲线见图4, 可知原花青素得率随超声时间延长而逐渐上升。

表7 不同酶解温度下动力学模型

Tab. 7 Kinetic models under different enzymatic hydrolysis temperatures

模型及方程	温度/°C	方程拟合参数			模型评价参数		
		a	b	$A_f$	$B_f$	RMSE	$R^2$
$y = ax^b$	38	0.029 9	0.656 5	1.099 1	1.038 0	$2.2447 \times 10^{-3}$	0.957 3
	43	0.089 9	0.513 8	1.107 1	1.028 8	$5.5972 \times 10^{-3}$	0.926 2
	48	0.131 1	0.478 7	1.059 8	1.003 8	$3.9563 \times 10^{-3}$	0.962 3
	53	0.101 2	0.506 8	1.074 9	1.019 6	$3.7627 \times 10^{-3}$	0.954 9
	58	0.077 9	0.520 1	1.124 6	1.037 3	$5.8644 \times 10^{-3}$	0.908 5
$y = y_0 + Ae^{-x/t}$	38	方程拟合参数			模型评价参数		
		$y_0$	$A_1$	$t_1$	$A_f$	$B_f$	RMSE
	43	1.379 6	-1.489 6	143.867 7	1.054 6	0.994 3	$5.0690 \times 10^{-4}$
	48	1.658 1	-1.789 0	97.790 8	1.050 3	0.998 6	$1.2226 \times 10^{-3}$
	53	2.057 3	-1.971 8	115.288 8	1.019 2	0.998 6	$3.9393 \times 10^{-4}$
	58	1.849 7	-1.860 7	112.122 0	1.026 5	0.999 1	$5.5302 \times 10^{-4}$
$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$	38	方程拟合参数			模型评价参数		
		$A_1$	$A_2$	$x_0$	$p$	$A_f$	$B_f$
	43	0.146 8	1.304 4	118.221 8	2.203 5	1.030 2	0.999 4
	48	0.294 2	1.617 0	92.954 6	2.466 5	1.033 1	1.000 2
	53	0.436 1	2.084 7	105.161 3	1.964 7	1.013 8	0.990 2
	58	0.306 6	1.892 6	102.344 5	1.902 2	1.018 6	1.000 2
	58	0.230 5	1.426 5	88.763 9	2.605 7	1.030 7	0.999 8
$y = A \{ 1 - e^{-[k(x-x_c)]^d} \}$	38	方程拟合参数			模型评价参数		
		$A$	$x_c$	$d$	$k$	$A_f$	$B_f$
	43	1.200 5	-21.316 6	1.654 9	0.006 8	1.037 5	0.998 5
	48	1.566 3	-14.964 3	1.464 8	0.008 9	1.042 2	0.999 5
	53	1.915 9	-48.746 9	1.659 4	0.006 7	1.011 3	0.999 6
	58	1.746 6	-22.297 8	1.393 3	0.007 9	1.019 6	1.000 1
	58	1.386 8	-8.808 1	1.485 9	0.009 6	1.040 8	0.998 7
	58	1.386 8	-8.808 1	1.485 9	0.009 6	1.040 8	0.998 7

$A_f$ 、RMSE越小,  $B_f$ 、 $R^2$ 值越接近1, 模型拟合度越好。OriginPro 8.0软件系统中固有的基础函数模型(Allometric1模型)、指数增长函数模型

当酶解温度为48 °C时, 酶活力最佳, 提取达到平衡状态所需的时间缩短, 原花青素得率最高; 低于48 °C时, 酶活力未充分体现; 高于48 °C时, 酶活力受到限制, 导致原花青素提取效率和得率偏低。

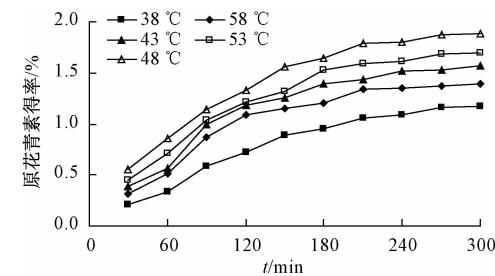


图4 原花青素得率曲线

Fig. 4 Curves of yield of proanthocyanidins

以图4中数据为基础, 采用OriginPro 8.0软件对数据进行模型拟合<sup>[21]</sup>, 并以 $A_f$ 、 $B_f$ 、RMSE和 $R^2$ 评价模型拟合度。结果见表7。

(Expdec1模型)和两种S形状函数模型(Logistic模型、Sweibull1模型)的适应性排在前4位<sup>[17-18]</sup>。但由表可知, 在最适酶解温度(48 °C)下,

Sweibull1 模型的  $A_f$ 、RMSE 最小 (1.011 3、 $1.9319 \times 10^{-4}$ )， $B_f$ 、 $R^2$  最接近 1 (0.999 6、0.997 1)，故当酶解温度为 48 ℃ 时，Sweibull1 模型最佳。同理，在其他酶解温度 (38、43、53、58 ℃) 下，选用 Logistic 模型可达到最优拟合。

**3.2.2 验证试验** 为了更好地比较不同酶解温度下最优模型预测值与实测值之间的相关性，以实测值为横坐标 ( $X$ )，模型预测值为纵坐标 ( $Y$ ) 进行拟合<sup>[17-18]</sup>，结果见表 8。由表可知，不同酶解温度下，最优模型预测值与真实值之间均呈现良好的线性关系 ( $R^2 > 0.9913$ )，故两种 S 形状函数模型 (Logistic、Sweibull1 模型) 的拟合精度均较高，其中 Sweibull1 模型在最适酶解温度 (48 ℃) 预测效果更好。

表 8 不同酶解温度下的拟合方程

**Tab. 8 Fitting equations under different enzymatic hydrolysis temperatures**

温度/℃	模型	拟合方程	$R^2$
38	Logistic	$Y = 0.9928X + 0.0059$	0.9961
43	Logistic	$Y = 0.9907X + 0.0110$	0.9917
48	Sweibull1	$Y = 1.0176X - 0.0154$	0.9977
53	Logistic	$Y = 1.0139X - 0.0089$	0.9913
58	Logistic	$Y = 0.9872X + 0.0126$	0.9924

## 4 讨论

国内已有应用复合酶法提取黄秋葵<sup>[10]</sup>、天冬<sup>[22]</sup>、丹参<sup>[23]</sup>等药材中原花青素类成分的文献报道，均显示其具有产物得率高、操作简单等优点。本实验研究了复合酶法提取石榴皮中原花青素的工艺条件，测得其得率为 1.88%，高于国内同类研究所采用的传统提取工艺<sup>[4]</sup>。另外，在天然产物提取动力学模型的研究领域中，Logistic 模型已有相关报道<sup>[21]</sup>，而 Sweibull1 模型鲜有关注。

本试验中选择加酶量、酶解温度和酶解时间作为提取工艺影响因素。如果将酶解时间定为 0 水平，则酶解温度对响应值的影响比加酶量大，其原因是在复合酶提取过程中，酶活性受温度的影响较大，在加酶量达到临界值附近，温度变化是促进原花青素得率提高的主要效应；如果将加酶量定为 0 水平，则酶解温度对响应值的影响比酶解时间大，其原因是在复合酶提取达到一定时间后，单纯延长酶解时间对原花青素得率的影响不大，而调节温度可使酶活性达到最佳，能够促进果胶酶和纤维素酶发挥协同作用，水解结构致密的植物细胞壁纤维素骨架，使细胞更易于溶出内容物，加速有效成分从固相向液相的转移。石榴外果皮有一层高分子网状聚

合物所形成的角质层，结构坚韧，若处理药材时未去除这部分，在提取过程中其颗粒将阻碍酶与底物的接触，从而影响复合酶解效应，而本实验未将其考虑在内。此外，复合酶法提取工艺是在偏酸性介质中进行的，是否会促进石榴皮中生物碱类成分成盐溶出，导致带入更多的杂质，本实验也未作验证，今后将加以深入研究。

复合酶法提取天然有效成分是一个复杂的固-液相转移过程，由于中药材存在原料组织结构的不确定性、所含化学成分的多样性等各种因素，故很难建立稳定可靠的提取过程动力学模型。因此，建议应将相关研究重点放在如何根据药材的不同，建立拟合度较高的提取动力学模型，以及如何建立其评价体系，以保证该类模型在实际生产工艺中具有广泛应用性。

## 参考文献：

- [1] 汪小飞, 周耘峰, 黄 埔, 等. 石榴品种数量分类研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 52(5): 1093-1098.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 87.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 精华本 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [4] 柯春林, 王永斌, 王 婦, 等. 石榴皮原花青素醇提条件的响应面优化及其抗氧化活性 [J]. 应用化工, 2013, 42(3): 443-449.
- [5] 陈超群, 吴春艳, 刘 霞, 等. 莲房中原花青素的药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2014, 36(8): 1734-1738.
- [6] 李 涠, 王建农, 卢树杰, 等. 山楂叶原花青素对乳鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 96-99.
- [7] 李 超, 王卫东, 虞海燕, 等. 超声强化亚临界水提取脱脂葡萄籽中原花青素的工艺及其抗氧化研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 967-972.
- [8] 余洪波, 张晓昱. 酶法在中药提取中的研究进展 [J]. 中成药, 2005, 27(5): 591-593.
- [9] 舒红英, 罗旭彪, 王永珍. 绿茶中茶多酚的复合酶-微波法提取工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1309-1312.
- [10] 汪殿蓓, 李建华. 复合酶法提取黄秋葵果多酚的工艺优化 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(6): 909-914.
- [11] 李 超, 郑 义, 王卫东, 等. 响应曲面法优化亚临界水提取葡萄籽原花青素的工艺研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(12): 6-10.
- [12] 周 玮, 孙智达, 谢笔钧, 等. 荔枝皮原花青素提取工艺优化 [J]. 农业工程学报, 2009, 25(S1): 175-179.
- [13] 周 琳, 李元波, 曾 英. 超声酶法提取三七总皂苷的研究 [J]. 中成药, 2006, 28(5): 642-645.
- [14] 胡建楣, 李静玲, 冯 鹏, 等. Box-Behnken 设计优化铁皮石斛中多糖复合酶法提取工艺 [J]. 中药材, 2014, 37

- (1): 130-133.
- [15] 郭梦鸿, 孙雨琦, 刘影, 等. Plackett-Burman 联合星点设计优化甜瓜蒂中葫芦素的提取工艺[J]. 中药材, 2015, 37(9): 1937-1941.
- [16] 常星洁, 刘汉清, 邹建荣, 等. 响应面法优化女贞子有效成分的提取工艺[J]. 中成药, 2012, 34(5): 839-842.
- [17] 钟葵, 吴继红, 廖小军, 等. 高压脉冲电场对植物乳杆菌的杀菌效果及三种模型的比较分析[J]. 农业工程学报, 2006, 22(11): 238-243.
- [18] 董庆利, 郭黎洋, 屠康, 等. 不同试验条件下生孢梭菌孢子生长预测方程的建立[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(2): 162-168.
- [19] 王占一, 戴博, 王玉海, 等. 石榴皮多糖提取过程的动力学分析[J]. 中成药, 2015, 37(5): 971-977.
- [20] 赵鹏, 张丽华. 款冬花多糖提取过程的动力学模型[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(18): 1434-1437.
- [21] 郭庆启, 张娜, 孙瑶, 等. 超声波辅助提取落叶松树皮多酚的动力学和热力学研究[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(3): 115-120.
- [22] 曹渊, 徐彦芹, 夏之宁, 等. 超声复合酶法提取天冬多糖[J]. 中药材, 2009, 31(4): 622-625.
- [23] 杨皓明, 齐葳, 何志敏, 等. 复合酶法提取丹参中丹参素[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1161-1164.

## 维生素E增加仁术脐贴3种成分的热稳定性

王超<sup>1</sup>, 侯伟元<sup>2</sup>, 叶炳皇<sup>2</sup>, 梁土亮<sup>1</sup>, 刘宇<sup>1</sup>, 张军<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510006; 2. 中山市黄圃人民医院, 广东 中山 528306)

**摘要:** 目的 考察仁术脐贴3种成分的热稳定化方法。方法 提取砂仁、苍术、肉桂、丁香挥发油, 加入羊毛脂中制备贴膏剂。HPLC法测定苍术素、桂皮醛、丁香酚含有量, 以其保留率为指标, 恒温加速试验比较抗氧化剂维生素E(VE)、叔丁基对羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)对这3种成分受热稳定性的保护作用。结果 维生素E对仁术脐贴中苍术素、桂皮醛、丁香酚的保护作用均优于其他两种抗氧化剂, 其适宜用量为0.15%~0.30%。结论 维生素E可增加仁术脐贴的热稳定性。

**关键词:** 仁术脐贴; 苍术素; 桂皮醛; 丁香酚; 热稳定性; 抗氧化剂; HPLC; 恒温加速试验

**中图分类号:** R927.11      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-1528(2016)12-2581-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.12.011

## Vitamine E increases the thermal stability of three constituents in Renzhu Umbilical Paste

WANG Chao<sup>1</sup>, HOU Wei-yuan<sup>2</sup>, YE Bing-huang<sup>2</sup>, LIANG Tu-liang<sup>1</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1\*</sup>

(1. Research and Development Center for New Chinese Drugs, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Huangpu People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528306, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the thermal stabilizing approaches for three constituents in Renzhu Umbilical Paste. **METHODS** The volatile oils extracted from *Amomi Fructus*, *Atractylodis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex* and *Caryophylli Flos*, were added into lanolin for preparing the paste. The contents of atracylodin, cinnamaldehyde and eugenol were determined by HPLC, whose retention rates were taken as indices in the investigation of the protective effects of antioxidants, including vitamine E (VE), butylated hydroxyanisole (BHA) and 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), on their thermal stability with reference to the constant temperature accelerated test.

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 广东省省部产学研结合项目(2013B090500119); 2015年高水平大学建设专项资金(2050205)

作者简介: 王超(1991—), 男, 硕士生, 从事中药新药研究与开发。Tel: (020) 39358519, E-mail: wangchao102408@163.com

\*通信作者: 张军(1971—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药新药研究与开发。Tel: (020) 39358519, E-mail: zhjxsh@aliyun.com