

响应曲面法优化精氨酸单糖苷合成工艺

宋明铭¹,王佳奇¹,李莹¹,刘一桐¹,赵婷²,刘文丛^{1*}

(1 吉林农业大学中药材学院,长春 130118;2 吉林省凯洛士科技有限公司,长春 130000)

[收稿日期] 2016-03-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 05-0045-07 [中图分类号] R931.6

[摘要] 利用响应曲面法对苹果酸催化合成精氨酸单糖苷(AF)条件进行优化。本文在单因素的基础上,以精氨酸单糖苷的合成率为考察指标,建立以反应时间、反应温度、料液比和苹果酸加入量的4因素3水平的实验模型,采用 Design Expert 8.0.6 分析软件对精氨酸单糖苷的合成条件进行优化研究。结果表明,合成 AF 的最佳工艺条件,反应温度为 85℃,反应时间 150 min,料液比 1:20 g/mL,苹果酸加入量为 0.75 g。优化出来的最佳合成条件稳定可行、合成率高。

[关键词] 精氨酸单糖苷;苹果酸;响应面分析法

Optimization of Arginyl – Fructose Synthesis Process by Response Surface Methodology

SONG Ming – ming¹, WANG Jia – qi¹, LI Ying¹, LIU Yi – tong¹, ZHAO Ting², LIU Wen – cong^{1*}

(1 Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;2 Jin Lin Kai Luo – shi Bio – tech, Changchun 130000, China)

Abstract: The synthesis conditions of Arginyl – Fructose(AF) were optimized by response surface methodology, and malic acid as catalyst. On the basis of single factor, the experimental models of 4 factors and 3 levels was used in this test with AF synthetic ratio as selection standard. Optimizing the synthesis condition of AF was simulated by Design Expert 8.0.6. The best synthesis condition of AF was received with 0.75 g malic acid, 85℃, 150 min and 1:20 g/mL solvent ratio. This preparation process of AF has the advantages of high synthesis rate and established.

Key words: Arginyl – Fructose; malic acid; response surface methodology

精氨酸单糖苷英文名为 Arginyl – Fructose,简称 AF,又称为精氨酸果糖苷,存在于自然界的许多动植物中,郑毅男^[1-2]在鲜参加工成生晒参、红参的过程中,发现 AF 的存在。为美拉德反应的非褐变部分,是精氨酸与葡萄糖羟醛脱水缩合的产物^[3-5]。分子量为 337.3,化学名称为 1-(精氨酸-N^α基)-1-去氧-D果糖,其结构如图 1 所示。

纯化后的 AF 单体为白色粉末,AF 极易溶于水,几乎不溶于有机溶剂,如甲醇等,具有吸湿性,对热不稳定。研究表明,AF 具有抗氧化^[6-8]、抗肿瘤^[9]、促进微循环^[10]等功能,而且具有抑制葡萄糖苷酶、抗糖尿病^[11-12]等作用。

AF 单体在自然界中含量较低,不易分离纯化且成本较高,因此人工合成的方法成为获取大量

基金项目:延边州科技发展计划项目(2015JH01)

作者简介:宋明铭,硕士研究生,从事中药新药研究与开发。

通讯作者:刘文丛。E-mail:jw1w6803@126.com

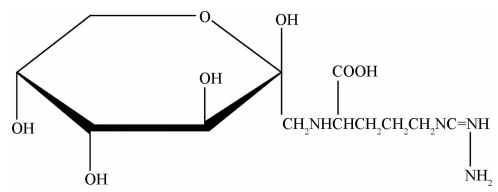


图1 AF 化学结构

AF的主要途径。目前,合成AF的主要方法是以精氨酸和葡萄糖为底物,冰醋酸为催化剂,但此方法合成率低,且冰醋酸强烈的刺激气味限制了生产应用。本研究以可食用的苹果酸为催化剂,丙三醇为溶酶体,优化AF合成条件,以促进其开发应用。

响应曲面法(Response surface methodology, RSM)是一种优化生物过程的统计学试验,采用多元二次回归方程来拟合响应值与因素之间函数关系的一种优化统计方法^[13-21]。本文在单因素的基础上,以反应时间、反应温度、料液比和苹果酸加入量为关键因子,利用相应曲面法对AF合成条件进行优化,确定其最佳合成工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 L-精氨酸(奥博星生物技术有限公司);葡萄糖、丙三醇、冰乙酸、磷酸(北京化工厂);苹果酸(广州利源食品添加剂有限公司);乙酸钠(西陇化工股份有限公司);乙腈(美国,OMNI CHEM,色谱级);水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器与设备 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);水浴恒温振荡器(上海龙跃仪器设备有限公司);冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);LC-2010A 高效液相色谱仪(LC solution 工作站,SPD-20A 紫外检测器,LC-20AT 泵,CTO-10AS VP 柱温箱,日本岛津公司)

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制 精密称取AF对照品5 mg,用水定容于10 mL容量瓶中,分别移取2、4、6、8 mL对照品溶液于10 mL容量瓶中,用水定容至刻度,得质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL的对照品溶液。

HPLC 条件:Venusil-AA 氨基酸分析专用柱(5 μm,4.6 mm×250 mm);流动相:A相-乙酸钠

缓冲溶液(925 mL 纯净水,7.6 g 乙酸钠,2 mL 磷酸,2~3 d 冰乙酸,75 mL 乙腈),B相-有机相(乙腈:水=4:1)。流速1.0 mL/min;检测波长254 nm;柱温40℃;进样量20 μL。

1.3.2 单因素试验

1.3.2.1 筛选最佳反应时间 固定反应温度85℃,料液比1:20,苹果酸加入量0.75 g,考察反应时间为60、90、120、150、180 min对AF合成率的影响。

1.3.2.2 筛选最佳反应温度 固定反应时间150 min,料液比1:20,苹果酸加入量0.75 g,考察反应温度为70、75、80、85、90℃对AF合成率的影响。

1.3.2.3 筛选最佳料液比 固定反应时间150 min,反应温度85℃,苹果酸加入量0.75 g,考察料液比1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL对AF合成率的影响。

1.3.2.4 筛选最佳苹果酸加入量 固定反应时间150 min,反应温度85℃,料液比1:20,考察苹果酸加入量0.5、0.75、1.0、1.25 g对AF合成率的影响。

1.3.3 响应面法试验 在单因素的基础上,采用统计分析软件DesignExpert 8.0.6,根据Box-Behnken的中心组合实验设计原理,以反应时间(X_1)、反应温度(X_2)、料液比(X_3)、苹果酸加入量(X_4)为自变量,AF合成率(Y)为响应值,进行优化,试验因素与水平编码如表1所示。

表1 响应面优化试验因素水平

因素	编码水平		
	-1	0	+1
X_1 反应时间/min	120	150	180
X_2 反应温度/℃	80	85	90
X_3 料液比/(g·mL ⁻¹)	15	20	25
X_4 苹果酸加入量/g	0.5	0.75	1.0

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制 测定不同浓度的AF对照品溶液在254 nm下的峰面积,以质量浓度 X (mg/mL)对峰面积 Y 绘制标准曲线,得到回归方程为: $Y=301959X+1052.8$, $R^2=0.9993$,在质量浓

度 0.1 ~ 0.5 mg/mL 内呈良好线性关系。

2.2 单因素试验

2.2.1 反应时间对 AF 合成率的影响 在其它试验条件不变的情况下,随着时间的延长,苹果酸催化的 AF 合成率逐渐升高,当时间达到 150 min 时,合成率达到最高点,随着反应继续,反应向 AF 减少方向进行(图 2)。因此,Box - Behnken 试验选取的反应时间的范围为 120 ~ 180 min。

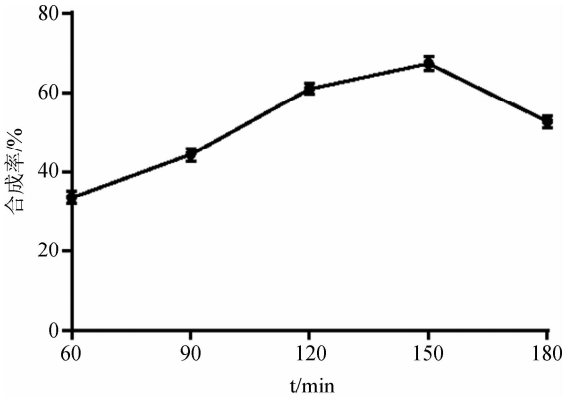


图 2 反应时间对 AF 合成率的影响

2.2.2 反应温度对 AF 合成率的影响 多次试验发现,温度 70 ~ 90℃ 之间时,AF 的合成反应迅速发生,符合 AF 在红参中形成的温度条件,当温度达到 85℃ 时,AF 合成率达到最高点,随着温度继续升高,合成率降低(图 3)。因此,Box - Behnken 试验选取的反应温度的范围为 80 ~ 90℃。

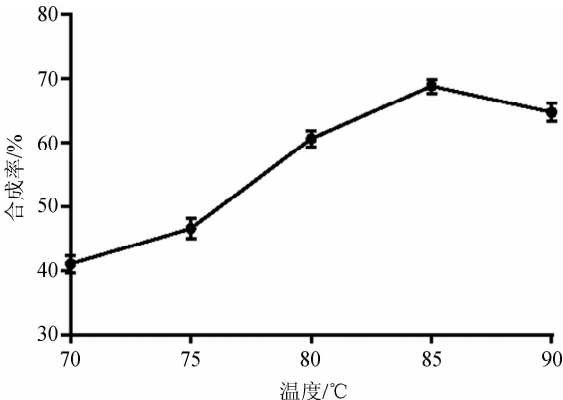


图 3 反应温度对 AF 合成率的影响

2.2.3 料液比对 AF 合成率的影响 在其它试验条件不变的情况下,以料液比为变量时,丙三醇加量过低时,反应不易混匀,且反应不彻底,合成率偏低,随着溶媒体积的增大,达到 1: 20 g/mL 时,AF 合成率最高,随着丙三醇体积继续增加,合成率下

降(图 4)。因此,Box - Behnken 试验选取的料液比的范围为 1: 15 ~ 1: 25 g/mL。

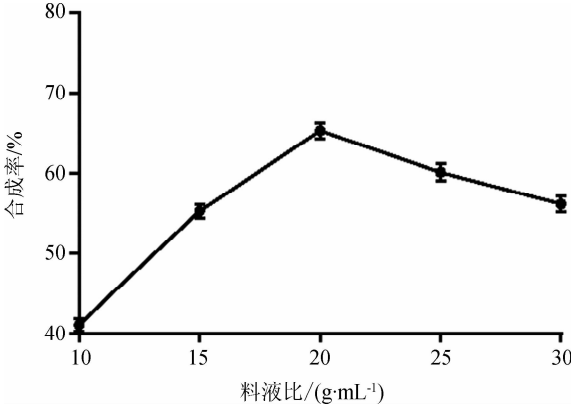


图 4 料液比对 AF 合成率的影响

2.2.4 苹果酸加入量对 AF 合成率的影响 在其它试验条件不变的情况下,随着苹果酸加入量的增加,AF 的合成率逐渐升高,苹果酸加入量达到 0.75 g 时,合成率达到最大值,随后随着苹果酸含量的增加而有所降低(图 5)。因此,Box - Behnken 试验选取的苹果酸加入量的范围为 0.5 ~ 1.0 g。

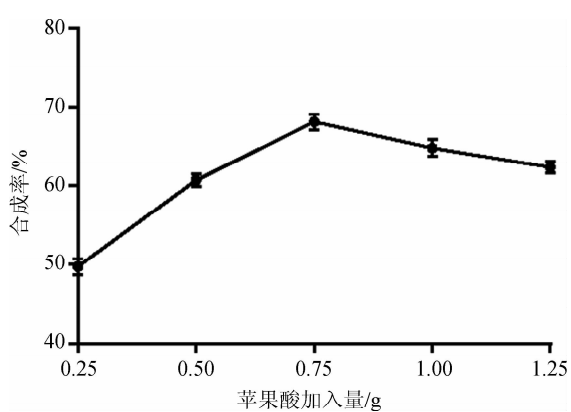


图 5 苹果酸加入量对 AF 合成率的影响

2.3 响应面法优化合成试验结果与分析

2.3.1 结果分析 运用 Design Expert 8.0.6 分析软件进行 Box - Behnken 设计,设计方案及其试验结果见表 2,试验号 1 ~ 24 位析因实验,试验号 25 ~ 29 位中心试验。

对表 2 的试验结果进行分析,得到 AF 合成率 (Y) 对反应温度 (X_1)、反应时间 (X_2)、料液比 (X_3)、加酸量 (X_4) 的二次多项回归方程为:
$$Y = 67.79 + 2.96X_1 + 1.74X_2 - 1.77X_3 + 1.05X_4 + 1.24X_1X_2 + 1.53X_1X_3 + 1.72X_2X_3 - 1.55X_2X_4 -$$

$2.01X_3X_4 - 5.15X_1^2 - 6.09X_2^2 - 5.49X_3^2 - 6.62X_4^2$ 。

表3为回归模型的方差分析结果,该模型F值为53.18、 $R^2=0.9815$ 、 $P<0.0001$,说明回归方程的拟合程度较好,试验具有很高的可信性和准确性。模型的修正相关系数 $R^2Adj=0.9631$,表明该方程较好地反映了合成时间、合成温度、料液比和苹果酸加入量与AF合成率的关系,说明该模型能够解释96.31%的响应值变化,因此可用此模型对AF的合成进行分析和预测。从F值的分析结果($A=95.2$ 、 $B=32.83$ 、 $C=34.03$ 、 $D=11.89$)可以看出,在所选的各因素水平范围内,对AF合成率的影响大小的顺序为:反应温度>料液比>反应时间>苹果酸加入量。

表2 Box-Behnken 试验设计方案与结果						
试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	实际值	理论值
1	-1	-1	0	0	51.53	53.09
2	1	-1	0	0	56.73	56.53
3	-1	1	0	0	53.71	54.08
4	1	1	0	0	63.88	62.48
5	0	0	-1	-1	54.73	54.39
6	0	0	1	-1	53.96	54.87
7	0	0	-1	1	61.25	60.50
8	0	0	1	1	52.45	52.94
9	-1	0	0	-1	53.61	52.85
10	1	0	0	-1	57.02	57.08
11	-1	0	0	1	53.47	53.25
12	1	0	0	1	60.27	60.87
13	0	-1	-1	0	58.61	57.96
14	0	1	-1	0	57.49	57.99
15	0	-1	1	0	51.63	50.97
16	0	1	1	0	57.41	57.90
17	-1	0	-1	0	57.35	57.48
18	1	0	-1	0	59.27	60.35
19	-1	0	1	0	51.98	50.88
20	1	0	1	0	60.02	59.86
21	0	-1	0	-1	50.71	50.74
22	0	1	0	-1	57.24	57.31
23	0	-1	0	1	56.02	55.93
24	0	1	0	1	56.37	56.31
25	0	0	0	0	66.31	67.79
26	0	0	0	0	68.68	67.79
27	0	0	0	0	68.92	67.79
28	0	0	0	0	67.69	67.79
29	0	0	0	0	67.37	67.79

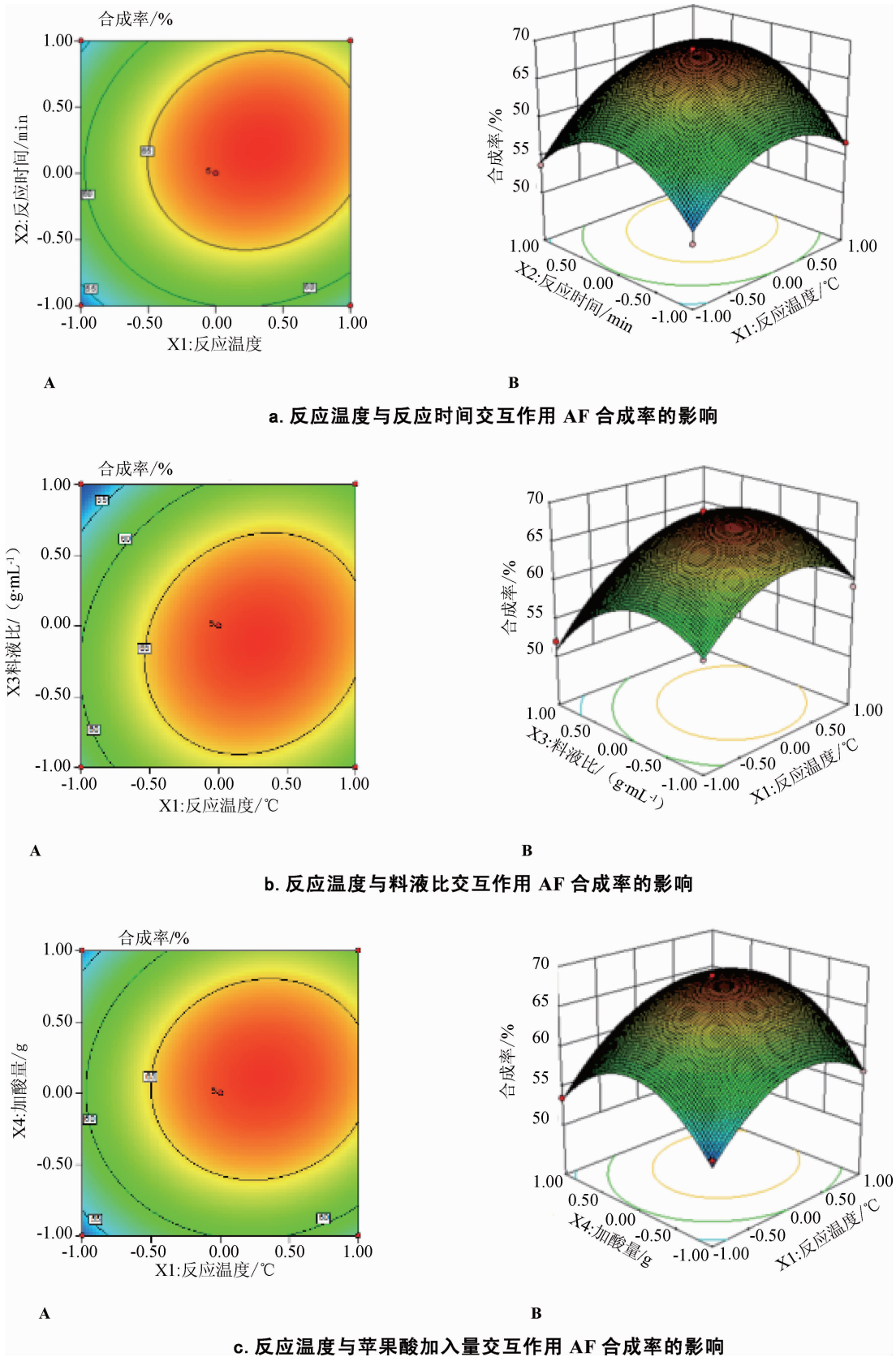
表3 回归模型方差分析结果						
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
Model	823.06	14	58.79	53.18	<0.0001	**
A-A	105.25	1	105.25	95.21	<0.0001	**
B-B	36.29	1	36.29	32.83	<0.0001	**
C-C	37.63	1	37.63	34.03	<0.0001	**
D-D	13.14	1	13.14	11.89	0.0039	**
AB	6.17	1	6.17	5.58	0.0331	*
AC	9.36	1	9.3636	8.47	0.0114	*
AD	2.87	1	2.87	2.59	0.1292	
BC	11.90	1	11.9025	10.76	0.0055	**
BD	9.54	1	9.54	8.63	0.0108	*
CD	16.12	1	16.12	14.58	0.0019	**
A ²	172.36	1	172.36	155.91	<0.0001	**
B ²	240.86	1	240.86	217.87	<0.0001	**
C ²	195.58	1	195.58	176.92	<0.0001	**
D ²	284.47	1	284.47	257.32	<0.0001	**
Residual	15.47	14	1.10			
Lack of Fit	11.03	10	1.10	0.9925	0.5519	
Pure Error	4.44	4	1.11			
Cor Total	838.54	28				

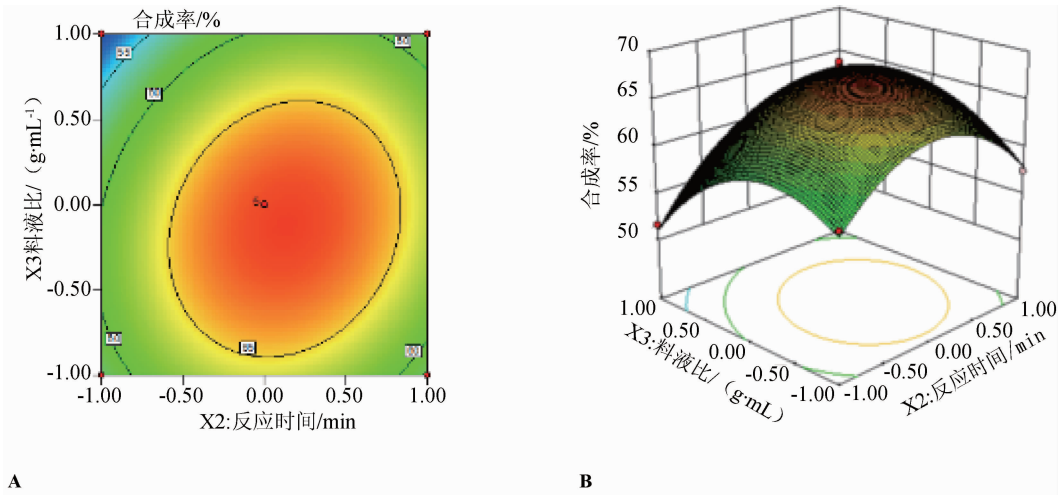
$R^2=0.9815$, $R^2Adj=0.9631$, $R^2Pred=0.9159$, $CV=1.81$

2.3.2 AF合成工艺的响应面分析与优化 图6为各因素交互作用对AF合成率影响的响应曲面图。A图为等高线, B图为相对应的响应曲面图。

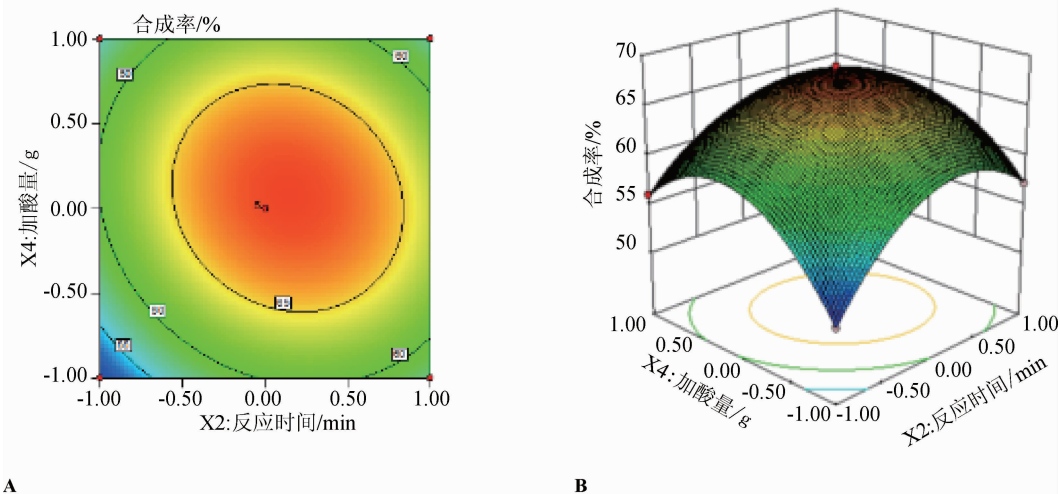
图6d、6f 曲面陡峭,等高线呈椭圆形,说明反应温度与料液比、料液比与苹果酸加入量有很强的交互作用,呈极显著性;图6a、6e 曲面相对平缓,说明反应温度与反应时间、反应温度与料液比、反应时间与料液比有一定的交互作用,但等高线几乎为圆形,交互作用不是很强;图6c 曲面平缓,等高线为圆形,说明反应温度与苹果酸加入量交互作用不显著。图6中均存在极值,说明试验所选范围比较合理。

2.3.3 AF合成工艺条件的确定 结合回归模型分析结果可知,AF合成的最佳工艺条件为反应温度85℃、反应时间150 min、液料比1:20(g/mL)、苹果酸加入量0.75 g。在此条件下AF的理论合成为67.79%,实际合成为68.92%,理论值与实际值基本吻合。由此可见,响应面分析法所优化的最佳合成工艺数据真实可靠。

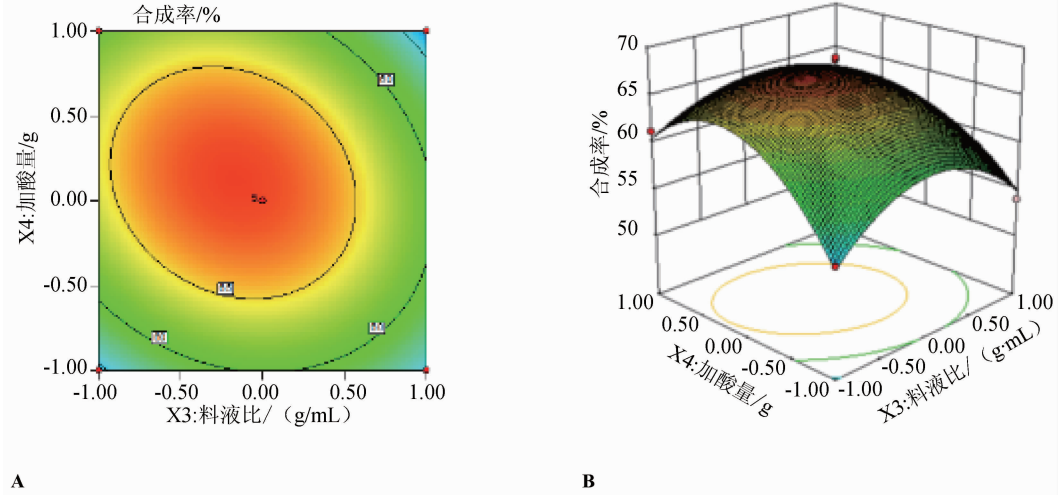




d. 反应时间与料液比交互作用 AF 合成率的影响



e. 反应时间与苹果酸加入量交互作用 AF 合成率的影响



f. 料液比与苹果酸加入量交互作用 AF 合成率的影响

图 6 各因素交互作用对 AF 合成率影响的等高线图和响应曲面图

3 讨论与小结

采用响应曲面法优化 AF 合成工艺,通过合理的实验设计,从而得出各因素对 AF 合成率影响大小依次为:反应温度 > 料液比 > 反应时间 > 苹果酸加入量。料液比和苹果酸加入量对 AF 合成的交互影响最为显著。其最佳合成条件为反应温度 85℃、反应时间 150 min、料液比 1:20 (g/mL)、苹果酸加入量 0.75 g,AF 的实际合成率为 68.92%。实验采用的响应曲面模型显著性较好,结果准确可靠,该研究结果是对人工合成 AF 方法的进一步完善,具有一定的理论参考价值和实际应用前景。

AF 单体在自然界中含量低,分离纯化难,因此采用人工合成的方法,以降低 AF 合成成本,提高利用价值。赵婷^[11]、郑毅男等^[5]以冰醋酸为催化剂合成 AF,合成率为 20~30% 左右。冰醋酸是一种有机一元酸,具有腐蚀性,且有强烈的刺激性气味,其蒸汽对眼和鼻有刺激性作用,且合成率低。所以需要选取一种在自然状态或加热后呈酸性、无腐蚀性、无副作用的催化剂。鉴于以上特点,本文选取苹果酸^[22]为催化剂,它是常用的食品酸味剂,几乎存在于一切果实中,且味道柔和,从未发现不良反应,是合成食药通用的 AF 较好的选择之一。AF 的生成是在加热和无水条件下,所以反应媒介必须满足熔点低、沸点高的条件,无刺激性气味、无毒副作用、与反应底物不发生反应,且可作为食品等材料使用。综合考虑及试验筛选,选取丙三醇没反应媒介。

本文利用响应面法优化 AF 合成工艺,克服了传统数理统计数据量大的缺点,且弥补了正交试验无法找到因素的最佳组合以及响应值的最优值的弊端,响应面法更好地处理离散水平值,实验周期短、精密度高,能对因素间交互作用进行研究,筛选出最佳合成条件,显著提高了 AF 合成率,为下一步研究奠定基础,也使得 AF 大量生产使用成为可能。

参考文献:

- [1] 郑毅男,松浦幸永,韩立坤,等.红参中新化合物-精氨酸衍生物分离与结构鉴定[J].药学学报,1996,31(3):191-195.
- [2] Zheng Y N, Okuda H, Han L K, *et al.* A new amino acid derivative from red ginseng [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica (B)*, 1998, 7:7-10.
- [3] Takaku T, Han, L K, Kameda K, *et al.* Production of arginyl-fructosyl glucose during processing of red ginseng[J]. *J. Tradit. Med*, 1996, 13, 118-123.

- [4] Gao F F, Zhang W Y, Liu L M, *et al.* Detection and distribution of arginine derivatives in *Panax quin-quefolius* L. and investigations of their antioxidant properties[J]. *Lebenson Wiss Technol*, 2012, 49:34-41.
- [5] 郑毅男,杨世杰.精氨酸糖苷的制备方法[P].CN,ZL201110038843.7.2012-07-04.
- [6] Suzuki Y, Choi, K J, Uchida K, *et al.* Arginyl-fructosyl-glucose and arginyl-fructose, compounds related to browning reaction in the model system of steaming and heat-drying processes for the preparation of red ginseng[J]. *Ginseng Res*, 2004, 28, 143-148.
- [7] Cho E, Piao X L, Jang M H, *et al.* The effect of steaming on the free amino acid contents and antioxidant activity of *Panax ginseng*. *J. Food Chem.* 2008, 107: 876-882.
- [8] Lee J S, Kim G N, Lee S H, *et al.* *In vitro* and cellular antioxidant activity of arginyl-fructose and arginyl-fructosyl-glucose [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2009, 18(6), 1505-1510.
- [9] Keum Y S, Park K K, Lee J M, *et al.* Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng [J]. *Cancer Lett*, 2000,150,41-48.
- [10] 郑毅男,张晶,奥田拓道,等.精氨酸衍生物对微循环的作用[J].吉林农业大学学报,1998,20(4):45-47.
- [11] 赵婷.人工合成L-精氨酸单糖苷(AF)及其抗糖尿病药理学研究[D].长春:吉林农业大学,2013,16-22.
- [12] Lee K H, Ha K S, Jo S H, *et al.* Effect of Long-Term Dietary Arginyl-Fructose (AF) on Hyperglycemia and HbA1c in Diabetic db/db Mice[J]. *Mol. Sci.* 2014, 15, 8352-8359.
- [13] 赵立春,杨更亮.响应曲面法在中药有效成分提取中的应用研究[J].中药与临床,2013,4(6):62-64.
- [14] 于淼,柏云娇,代岐昌,等.响应曲面法优化文殊兰中生物碱的提取工艺[J].中草药,2013,44(10):1286-1289.
- [15] 王金玺,包振伟,刘笑,等.响应曲面法优化平菇多糖提取工艺[J].中国酿造,2013,23(40):108-112.
- [16] 柴婧,付辉辉,张卫鹏,等.响应曲面法优化酶辅助闪式提取二氢槲皮素工艺[J].食品科学,2014,35(10):93-97.
- [17] 吴燕,盛尊来,高凌飞,等.响应面法优化丁香叶总酚酸提取工艺[J].食品工业科技,2015,36(2):286-290.
- [18] 钱丹丹,李新华,杨强,等.响应面分析法优化水飞蓟多糖提取工艺[J].食品工业,2015,36(6):117-120.
- [19] 朱盛林,郑玲利,袁明勇,等.响应面法优化附子多糖的微博提取工艺[J].中国医药导报,2015,12(16):48-51.
- [20] 王健,曾吉祥,龚远林.响应曲面法优化姜黄素包合物的制备[J].川北医学院学报,2015,30(2):166-169.
- [21] 吴军林,吴清平,张菊梅,等.L-苹果酸生物合成研究进展[J].食品科学,2014,35(2):238-242.

(编辑:陈希)