

文章编号: 1673-1689(2006)05-0081-07

# 响应面法优化白首乌中抗氧化成分的提取

张冬冬, 陶文沂\*, 崔凤杰, 敖宗华

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 在比较不同的提取方法后, 选用乙醇为提取溶剂。通过单因素实验结合响应面法对白首乌中抗氧化成分的提取工艺进行优化研究, 确定了提取工艺的最佳条件为温度: 70.1 °C, 乙醇体积分数: 75%, 提取时间: 1.78 h, 提取次数为两次。在此条件下白首乌醇提取液的总抗氧化能力理论值为 158.68 U/g, 实测值为 164.07 U/g ± 3.73。

**关键词:** 白首乌; 总抗氧化能力; 响应面法; Box-Behnken 设计

中图分类号: R 284.2

文献标识码: A

## Optimization of the Processing Parameters for the Extraction of Antioxidants from *Cynanchum Auriculatum* Royle ex Wight Using Response Surface Methodology

ZHANG Dong-dong, TAO Wen-yi\*, Cui Feng-jie, AO Zong-hua

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Based on the results of single-factor-at-a-time-technique, a three-level Box-Behnken factorial design combining with response surface methodology (RSM) was employed to optimize the extraction condition of *Cynanchum auriculatum* Royle. Canonical analysis was applied to estimate that a maximal yield of total antioxidant capacity (TAC) (158.68 U/g) could be obtained. When with two-time extraction, the extraction conditions, such as temperature, extraction time and the concentration of ethanol was 70.1 °C, 75% and 1.78h, respectively. These predicted values were also verified by validation experiments.

**Key words:** *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight; Total antioxidant capacity; Response surface methodology; Box-Behnken design

萝藦科 (*Asclepiadaceae*) 为鹅绒属植物耳叶牛皮消 (*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight) 的块根, 俗称白首乌, 作为一种传统的补益与抗衰老中药在江苏民间应用已有较长历史。白首乌营养成分丰富, 多羟基甾萜酯苷为白首乌中的主要活性成

分<sup>[1]</sup>。此外白首乌中还含有一定量的粗蛋白、粗脂肪、多糖、氨基酸、磷脂、无机盐及人体必须的微量元素。实验表明白首乌有很强的清除自由基抗氧化的功能。宋俊梅等人用化学发光法研究了白首乌中 C<sub>21</sub> 甾萜苷及各种甾萜苷元清除羟自由基的功能, 结

收稿日期: 2005-11-03; 修回日期: 2006-02-07.

作者简介: 张冬冬 (1978-), 男, 江苏南通人, 微生物生化药学硕士研究生; \* 通讯作者。  
万方数据

果表明  $C_{21}$  甾萜及甾萜元具有较强的清除自由基的能力<sup>[2]</sup>。她还用剧烈运动小鼠模型研究了白首乌中  $C_{21}$  甾体总萜抵抗内源性自由基氧化损伤的功能,认为总萜通过自身对氧自由基的直接清除作用和激活机体的抗氧化防御系统两个方面来提高机体的抗氧化水平,减少自由基对机体的危害,来起到延缓衰老和滋补保健的作用<sup>[3]</sup>。

传统的单因素实验优化是通过其它因子水平不变而研究其中一个因子的变化规律,当考察因子较多时需要大量的实验次数,不但延长了实验周期,而且对有交互作用的多因子实验还可能造成不可靠的结论。响应面法(RSM)是统计设计实验技术的合成,能用少量的实验次数和时间对实验进行全面的研究,取得明显有效的结论<sup>[4]</sup>。Box及其合作者与20世纪50年代完善了响应面方法学<sup>[5]</sup>,已经在诸多工艺过程优化控制中得到应用<sup>[6-7]</sup>。响应面法作为一种优化方法,考虑了试验随机误差。而传统优化是不考虑试验随机误差的。同时,响应面法将复杂的未知的函数关系在小区域内用简单的一次或二次多项式模型来拟合,计算比较简便<sup>[8]</sup>。响应面法虽然在很多领域都有应用,但应用于中草药有效成分提取的工艺条件优化报道较少。本文对白首乌中抗氧化活性成分的提取进行了单因素分析并进一步对提取条件进行了响应面优化,为系统地进行白首乌功能评价和功效物质分离,确认打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白首乌 江苏滨海首乌制品厂提供的耳叶牛皮消块根的干燥切片磨碎过10目筛;总抗氧化能力测试试剂盒 购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 测定方法

**1.2.1 原理** 提取液中许多抗氧化物质,能使  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$ ,后者可与邻二氮菲结合成稳固的  $Fe^{2+}$ -邻二氮菲络合物,通过比色测定  $Fe^{2+}$ -邻二氮菲含量变化,可了解溶液氧化还原状态,从而推知体系的 TAC<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 方法** 按南京建成生物工程研究所总抗氧化能力测定试剂盒说明书。定义在 37℃ 时,每分钟 0.1 g/mL 白首乌提取物使反应体系的吸光值(OD)每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位(U)。

总抗氧化能力计算公式为:

$$\text{总抗氧化有力} = \frac{OD_{\text{测定管}} - OD_{\text{对照管}}}{0.01 \times 30} \times \frac{V_a}{V_b} \times n \times \frac{100 \text{ mL}}{m_c}$$

上式中,  $V_a$  为反应液总体积(mL);  $V_b$  为样品体积(mL);  $m_c$  为白首乌质量(g);  $n$  为样品测试前稀释倍数。

### 1.3 提取方法

**1.3.1 室温冷浸法** 称取 10 g 左右白首乌粉 2 份,分别加入 100 mL 甲醇和体积分数为 95% 乙醇,室温提取 2 h,减压抽滤后残渣用相同的方法再提取一次,合并抽滤液与洗涤液,真空浓缩,定容到 100 mL,取 0.1 mL 测总抗氧化能力。

**1.3.2 加热回流法** 称取 10 g 左右白首乌粉 2 份,分别加入 100 mL 甲醇和体积分数 95% 乙醇,沸水浴中回流提取 1 h,其余步骤同 1.3.1。

**1.3.3 水浸提法** 称取 10 g 左右白首乌粉 1 份,加入 100 mL 蒸馏水,60℃ 搅拌提取 1 h,其余步骤同 1.3.1。

**1.3.4 超声提取法** 称取 10 g 左右白首乌粉 1 份,加入体积分数 95% 乙醇 100 mL,超声提取 30 min,其余步骤同 1.3.1。

### 1.4 提取条件单因素实验研究

**1.4.1 料液比对总抗氧化能力的影响** 准确称取 10 g 白首乌粉 5 份,固定提取条件为 60℃,乙醇体积分数为 70%,研究料液比对总抗氧化能力的影响。按物料 溶剂体积比为 1: 5、1: 10、1: 15、1: 20、1: 25 加入乙醇,搅拌提取 1.5 h,减压抽滤后残渣用相同的方法再提取一次,合并抽滤液与洗涤液,真空浓缩,定容到 100 mL,分别取 0.1 mL 测总抗氧化能力。

**1.4.2 温度对总抗氧化能力的影响** 准确称取 10 g 白首乌粉 5 份,分别加入体积分数 70% 乙醇 100 mL,于 30、40、50、60、70℃ 恒温搅拌提取 2 h,其余步骤同 1.4.1。

**1.4.3 乙醇体积分数对总抗氧化能力的影响** 准确称取 10 g 白首乌粉 6 份,分别加入 100 mL 乙醇,体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%、95% 60℃ 搅拌提取 1 h,其余步骤同 1.4.1。

**1.4.4 提取时间对总抗氧化能力的影响** 准确称取 10 g 白首乌粉 5 份,固定提取条件为 60℃,乙醇体积分数为 95%,研究提取时间对总抗氧化能力的影响。提取时间依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,其余步骤同 1.4.1。

**1.4.5 提取次数对总抗氧化能力的影响** 准确称取 10 g 白首乌粉 1 份,加体积分数 80% 乙醇 100

mL, 70 °C 提取 1.5 h, 减压抽滤后抽滤液减压蒸馏, 残渣在相同的提取条件下重复提取两次。分别取 0.1 mL 测总抗氧化能力。

1.5 响应面法优化提取工艺的实验设计

选择单因素实验中对响应值(总抗氧化能力)有显著影响的因素。采用 SAS (SAS Package Version 8.01) 对实验数据进行回归分析。每一自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 该模型通过最小二乘法拟合二次多项方程可以表达为:

$$Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_i X_j$$

上式中,  $Y$  为响应值(总抗氧化能力),  $A_0, A_i, A_{ii}, A_{ij}$  为方程系数,  $X_i, X_j (i \neq j)$  为自变量编码值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数  $R^2$  表达, 其统计学上的显著性由  $F$  值检验, 采用 SAS 典型分析预测白首乌抗氧化物质提取的最佳条件及总抗氧化能力的最大值。

1.6 结果验证

在最佳条件下, 实验重复二次, 取均值, 计算实验值与预测值之间的相对偏差。

2 结果与讨论

2.1 不同提取方法的提取结果比较

按材料与方法中 1.2.2 实验的结果如表 1 所示, 可以看出, 超声波提取的提取液总抗氧化能力值最大, 其次是加热回流提取, 在加热回流提取时甲醇与乙醇两种提取溶剂的提取结果相差不大。综合考虑设备成本及提取液的安全性, 选用乙醇为提取溶剂, 加热搅拌提取。

表 1 不同提取方法的实验结果

Tab. 1 TAC Results of different extraction methods

提取方法	提取溶剂/体积分数	总抗氧化能力/(U/g)
室温冷浸	95% 乙醇	43.08
	甲醇	66.47
加热回流	95% 乙醇	115.11
	甲醇	121.7
水浸提	水	39.43
超声波提取	95% 乙醇	144.91

2.2 以乙醇为提取溶剂的单因素实验结果

2.2.1 料液比对总抗氧化能力的影响 由图 1 看出, 当料液比达到 1: 15 时, 白首乌中的抗氧化物质已基本溶出, 再增大料液比会造成溶剂与能源的浪费。当料液比达到 1: 25 时, 总抗氧化能力反而有

所下降, 推测可能是白首乌中的杂质成分竞争性溶出, 不利于白首乌中的抗氧化物质提取。因此选取料液比为 1: 15。

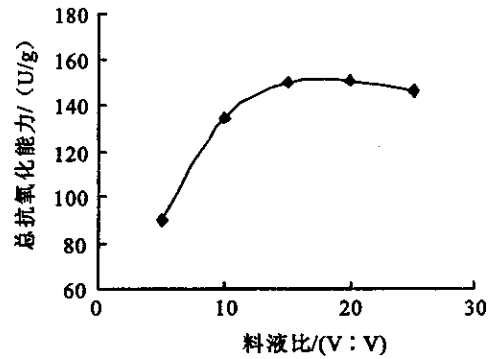


图 1 料液比对抗氧化能的影响

Fig. 1 Effect of ethanol amount on the TAC

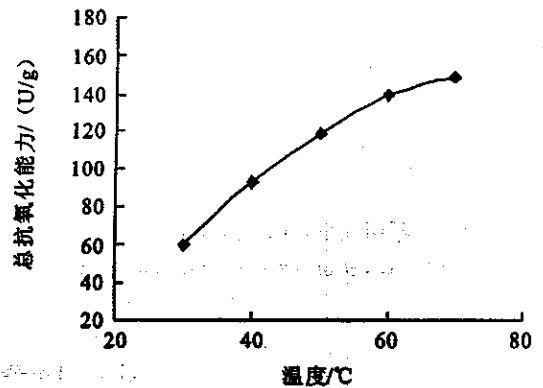


图 2 温度对提取物抗氧化能力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the TAC

2.2.2 温度对对白首乌提取物的总抗氧化能力的影响 由图 2 可见, 温度对白首乌中的抗氧化物质提取有较明显的影响。在常温下, 白首乌中的抗氧化成分溶出较慢, 当温度渐渐增大时, 抗氧化成分溶出加快, 在温度增大到 60 °C 后, 白首乌提取液的总抗氧化能力变化较小。

2.2.3 乙醇体积分数对白首乌提取物的总抗氧化能力的影响 因为乙醇溶解性能好, 对细胞穿透能力强常作为中草药有效成分提取的溶剂。从图 3 可看出, 随着乙醇的浓度增大, 总抗氧化能力也增大, 当乙醇体积分数达到 80% 左右时抗氧化能力最高, 再增大乙醇浓度, 总抗氧化能力下降。

2.2.4 不同提取时间对白首乌提取物的总抗氧化能力的影响 由图 4 可知总抗氧化能力随时间变化而不同。当提取达到一定时间(2 h)后, 抗氧化成分在提取液中达到平衡, 此时提取效率最高。如再延长提取时间(2.5 h), 干扰成分溶出量增加, 提取效率降低。

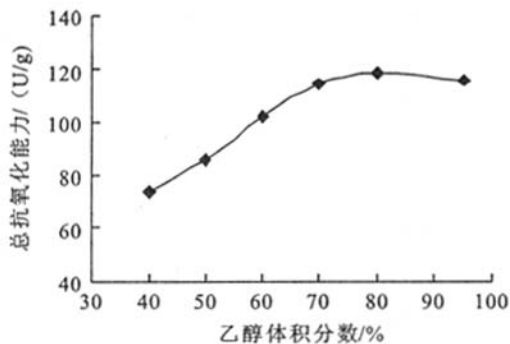


图3 乙醇体积分数提取物的抗氧化能力值测定结果

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the TAC

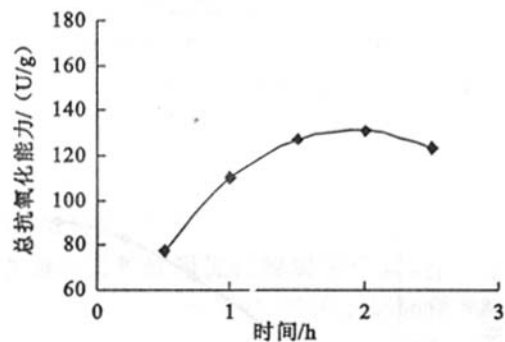


图4 不同提取时间对抗氧化能力的影响

Fig.4 Effect of extratuib time on the TAC

2.2.5 提取次数对对白首乌提取物的总抗氧化能力的影响 如图5所示,在提取次数为第三次时,提取液的总抗氧化能力与前两次比较已很低,考虑到经济成分,以提取两次为宜。

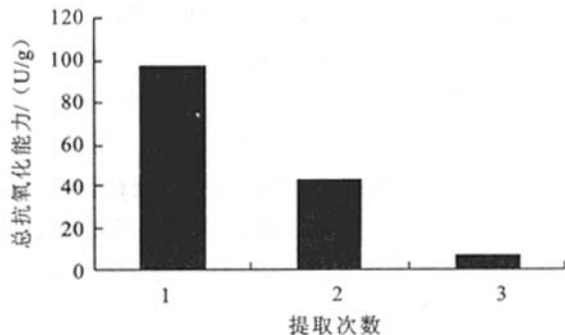


图5 提取次数对抗氧化能力的影响

Fig.5 Effect of extraction times on the TAC

### 2.3 响应面法优化白首乌抗氧化物质提取工艺

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,固定料液比为 1:15。选取提取温度、乙醇体积分数与提取时间三个因素,分别以  $X_1$ 、 $X_2$  与  $X_3$  表示。每个自变量的低中高水平分别以 -1、0、1 进行编码,以总抗氧化能力为响应值 ( $Y$ ),方案及试验结果见表 2。

表2 Box-Behnken 设计方案与实验结果

Tab.2 Box-Behnken design matrix and the responses of the dependent variables TAC

实验 编号	编码值			真实值			Y 提取液 总抗氧化能力/(U/g)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	温度/°C	乙醇体积分数/%	提取时间/h	
1	-1	-1	0	50	40	1.5	94.71
2	-1	1	0	50	80	1.5	105.12
3	1	-1	0	70	40	1.5	123.65
4	1	1	0	70	80	1.5	150.91
5	0	-1	-1	60	40	1	80.47
6	0	-1	1	60	40	2	119.37
7	0	1	-1	60	80	1	107.84
8	0	1	1	60	80	2	143.68
9	-1	0	-1	50	60	1	78.06
10	1	0	-1	70	60	1	142.74
11	-1	0	1	50	60	2	104.25
12	1	0	1	70	60	2	148.58
13	0	0	0	60	60	1.5	137.74
14	0	0	0	60	60	1.5	140.82
15	0	0	0	60	60	1.5	141.57

表 3 回归方程各项的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance( ANOVA ) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of TAC

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
一次项	6 438. 18	3	-	99. 61	<0. 000 1 **
二次项	1 913. 02	3	-	29. 60	0. 001 3 **
交互项	96. 25	3	-	1. 49	0. 324 6
回归	8 447. 45	9	-	43. 57	0. 000 3 **
总残差	107. 72	5	21. 54	-	-

$R^2 = 0. 987 4$

注 : \* \* Significant at 1% level.

表 4 回归系数取值及分析结果

Tab. 4 Results regression analysis of a full second-order polynomial model for optimization of TAC

模型项	系数估计	P-值	t-值
Intercept	140. 04	<. 000 1 **	52. 26
A <sub>1</sub>	19. 41	<. 000 1 **	11. 83
A <sub>2</sub>	9. 92	0. 001 8 **	6. 04
A <sub>3</sub>	18. 16	0. 000 1 **	11. 07
A <sub>11</sub>	-11. 50	0. 005 1 **	-4. 76
A <sub>12</sub>	1. 71	0. 493 7	0. 74
A <sub>13</sub>	4. 53	0. 296 8	1. 95
A <sub>22</sub>	-7. 44	0. 027 4 *	-3. 08
A <sub>23</sub>	-0. 77	0. 755 0	-0. 33
A <sub>33</sub>	-19. 76	0. 000 4 **	-8. 18 **

注 : \* \* Significant at 1% level ; \* Significant at 5% level.

### 3 结果与分析

表 3 为不同条件下所测的白首乌提取液的总抗氧化能力值,利用 SAS( SAS package version 8. 01 )软件对表 3 中所测得的数据进行多元回归拟合,由表 4 回归分析结果表明该模型回归显著。

各因素经回归拟合后,得到总抗氧化能力对温度、时间、乙醇浓度的二次多项回归方程为:

$$Y = 140. 04 + 19. 41X_1 + 9. 92X_2 + 18. 16X_3 - 11. 50X_{12} + 1. 71X_1X_2 - 4. 53X_1X_3 - 7. 44X_{22} - 0. 77X_2X_3 - 19. 76X_{32}$$

根据回归分析结果(表 5),作出相应的曲面图和等高线图,如图 6 ~ 11 所示。从图 6 可看出,在乙醇体积分数较低时,随着温度的升高总抗氧化能

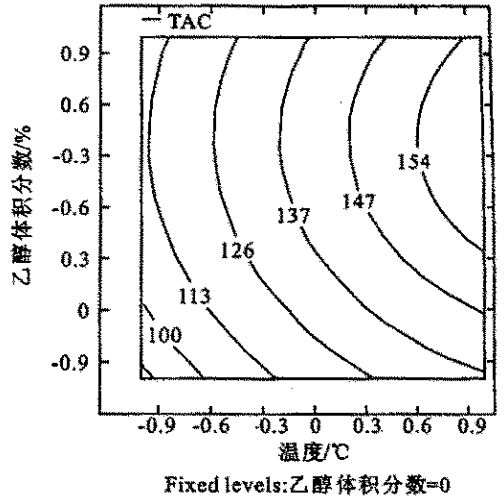


图 6 温度与乙醇体积分数对白首乌提取液总抗氧化能力影响等高线图

Fig. 6 Contour plot of the combined effects of ethanol concentration and temperature on the TAC of Cynanchum auriculatum Royle ex Wight

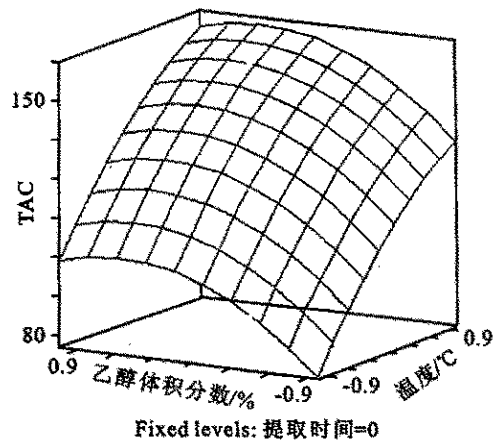


图 7 温度与乙醇体积分数对白首乌提取液总抗氧化能力影响响应图

Fig. 7 Surface plot of the combined effects of ethanol concentration and temperature on the TAC of Cynanchum auriculatum Royle ex Wight

力增大,当温度较低时乙醇体积分数对总抗氧化能力影响不大,当温度增高后,随着乙醇体积分数增大到 70% ~ 75% 时,总抗氧化能力达到最大值,再增大乙醇体积分数总抗氧化能力反而降低,可能在高温高浓度乙醇的条件下,白首乌中一些醇溶性杂质,亲脂性强成分溶解量增大,这些物质和白首乌中的抗氧化成分竞争同乙醇-水分子结合,从而导致抗氧化物质的溶出量降低,总抗氧化能力下降。由图 8 看出,在提取时间为实验设计取值下限时(1 h),总抗氧化能力随温度升高而变大。但当温度达到 76 ~ 79 °C 时,较长的提取时间会使提取液的总

抗氧化能力有所降低,在提取时间为 1.6 ~ 1.7 h 左右时,提取液总抗氧化能力最大,此时提取效率最高. 随着提取时间的延长到实验设计的上限( 2 h )时,总抗氧化能力下降. 这可能是杂质成分竞争性溶出的结果,但较短的提取时间白首乌中抗氧化成分溶出量小,影响提取效率. 因此有效提取时间在 1.7 h 左右较好. 由图 10 可直观看出在一定范围内总抗氧化能力与提取时间,乙醇体积分数呈正相关. 当乙醇体积分数在 70% ~ 75% 之间,提取时间在 1.6 h 左右时总抗氧化能力最大.

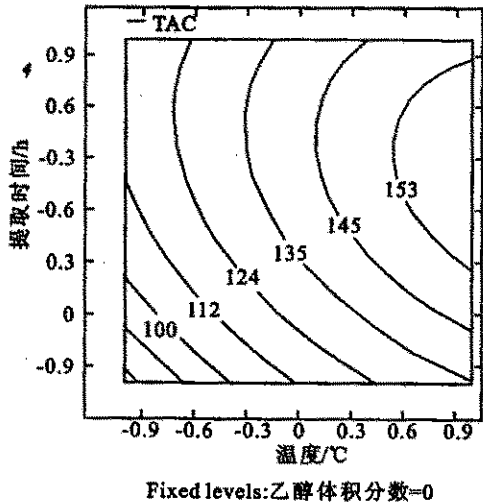


图 8 温度与提取时间对白首乌提取液总抗氧化能力影响等高线图

Fig. 8 Contour plot of the combined effects of time and temperature on the TAC of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

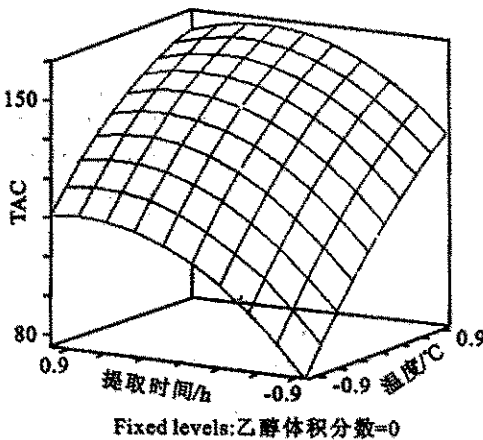


图 9 温度与提取时间对白首乌提取液总抗氧化能力影响响应面图

Fig. 9 Surface plot of the combined effects of time and temperature on the TAC of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

万方数据

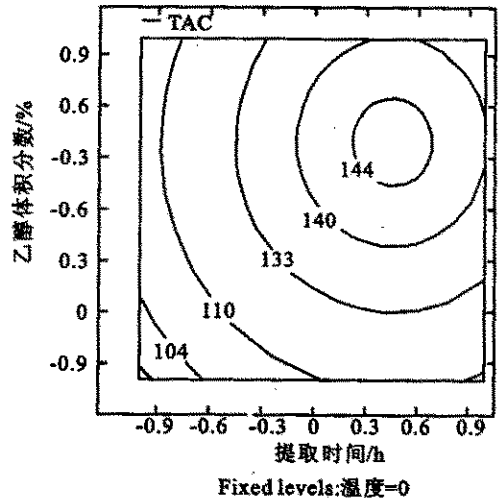


图 10 提取时间与乙醇体积分数对白首乌提取液总抗氧化能力影响等高线图

Fig. 10 Contour plot of the combined effects of time and temperature on the TAC of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

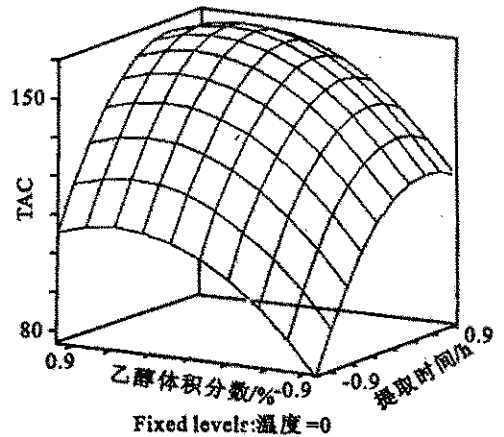


图 11 提取时间与乙醇浓度对白首乌提取液总抗氧化能力影响响应面图

Fig. 11 Surface plot of the combined effects of ethanol concentration and time on the TAC of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight

进一步用 SAS 软件的 Rsreg 命令对实验模型进行典型性分析,以获得最大总抗氧化能力时的各提取条件. 经分析得,在  $X_1 = 1.01$ ,  $X_2 = 0.75$ ,  $X_3 = 0.56$  即在温度为 :70.1℃,乙醇体积分数为 :75%,提取时间为 :1.78 h,提取次数为两次时取得 TAC 理论最大值 158.68 U/g.

以提取次数为两次,料液比 1: 15,最佳提取条件进行验证. 最终白首乌乙醇提取液的总抗氧化能力值为  $164.07\text{U/g} \pm 3.73$ ,试验值与理论值相差 3.40%,可见用响应面法在白首乌抗氧化物质的提取条件参数研究中有一定的可行性.

## 4 结 论

本研究以白首乌提取液的总抗氧化能力为量化指标,在单因素实验的基础上探索了用响应面法确定白首乌中抗氧化物质提取的最优工艺参数的可行性。取得了比较满意的结果,并最终确定白首

乌中抗氧化物质提取的最佳工艺条件为:提取温度 $70.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,乙醇体积分数 $75\%$ ,提取时间 $1.78\text{ h}$ ,提取次数为两次。在此条件下白首乌提取液的总抗氧化能力值为 $158.68\text{ U/g}$ 。取此最佳条件进行验证实验,最终试验值与理论值相差 $3.40\%$ 。

## 参考文献:

- [1] 徐凌川,公华,许昌盛.白首乌化学成分与药理现代研究述评[J].中医药学刊,2003,21(11):1993.
- [2] 宋俊梅,丁霄霖.响应面白首乌中 $C_{21}$ 甾苷及甾苷元清除羟自由基的功能[J].无锡轻工大学学报,1998,17(2):43-46.
- [3] 宋俊梅,王元秀,丁霄霖.白首乌 $C_{21}$ 甾苷抗氧化作用的研究[J].食品科学,2001,22(12):22-26.
- [4] 吴有炜.试验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002,135-142.
- [5] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. *Technometrics*, 1960, 2: 456-475.
- [6] Fabio M, Antonio M M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1996, 31: 419-426.
- [7] Chandrika L P, Fereidoon S. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology [J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(1): 47-56.
- [8] 王永菲,王成国.响应面法的理论与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版),2005,14(3):236-239.
- [9] 庞战军,周玫,陈瑗.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000,23-115.

(责任编辑 杨萌)

(上接第80页)

## 参考文献:

- [1] 王普,陈希杨,虞炳钧,等.新技术在甾体药物微生物转化中的应用[J].化工进展,2002,21(11):805-808.
- [2] 叶丽,史济平.甾体微生物转化在制药工业中的应用[J].工业微生物,2002,31(4):40-48.
- [3] Fernandes P, Cruz A, Angelova B et al. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003(32): 688-705.
- [4] Yang Kui, Li Xiao jing, Wang Ji-fen et al. Relationship between growth and morphology of *Metarhizium anisopliae* in biotransformation of steroid[J]. *Transactions of Tianjin University* 2001, 7(1): 1-6.
- [5] Revital Rapoport, David Sklan, Israel Hanukoglu. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450<sub>sec</sub> and P450<sub>c11</sub> systems: NADPH and steroid dependence[J]. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 17(2): 412-416.
- [6] 茅燕勇,沈珈琦,范伟平.葡枝根霉 NG0305 酶催化甾体 C11- $\alpha$  羟基化的研究[J].生物加工过程,2004,2(2):46-51.
- [7] 吴有炜.实验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002.
- [8] 史济平,叶丽,深国祥,等.金龟子绿僵菌对甾族化合物的 11- $\alpha$  羟化[J].上海医科大学学报,1997,24(4):265-268.
- [9] Blaga Angelova, Hans-Peter Schmauder. Lipophilic compounds in biotechnology—interactions with cells and technological problems[J]. *Journal of Biotechnology*, 1999(67): 13-32.
- [10] 郭一平,郑璞.甾体微生物 C11- $\alpha$  羟化反应的研究进展[J].浙江工业大学学报,2004,32(4):437-441.
- [11] 王敏,王春霞,路福平,等.甾体 11- $\beta$  羟基转化新工艺的研究[J].天津轻工业学院学报,2000(2):1-5.

(责任编辑 李春丽)