

响应曲面法优化大蒜中总酚提取工艺及其抗氧化活性测定

杜俊娜, 陈书霞*, 程智慧, 常燕霞, 周 静

(西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 采用响应曲面法对料液比、提取时间、不同体积分数酸化甲醇提取剂 3 个因素进行优化, 以料液比、提取时间、不同体积分数酸化甲醇提取剂为自变量, 总酚提取量为响应值, 利用 Box-Behnken 设计原理和响应曲面法, 研究各自变量及其交互作用对总酚提取的影响, 模拟求得二次多项回归方程的预测模型, 并确定料液比 1:14 (g/mL)、提取时间 31min、80% 酸化甲醇为提取剂是最佳的提取条件。在此条件下, 总酚提取量为 0.67mg GAE/g, 模型预测值偏差为 6.9%, 证明所选工艺条件为最佳工艺条件。同时, 用 5 种方法对其抗氧化活性进行测定, 结果表明大蒜具有良好的抗氧化活性。

关键词: 大蒜; 总酚提取量; 抗氧化活性; 响应曲面法

Response Surface Methodology for Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Garlic and Determination of Antioxidant Activity

DU Jun-na, CHEN Shu-xia*, CHENG Zhi-hui, CHANG Yan-xia, ZHOU Jing

(Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources Utilization in Northwest China, Ministry of Agriculture, College of Horticultural Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize extraction parameters (including material/liquid ratio, extraction time and concentration of extracting agents) so as to achieve the maximum extraction yield of total phenolic compounds. Studies were carried out on the respective independent variables (material/liquid ratio, extraction time and concentration of extracting agents) and the interactive effects of these three factors on the total phenolic compounds according to Box-Behnken design. A mathematical quadratic polynomial regression equation reflecting the relationship between the total phenolic compounds and the above extraction parameters was established. The optimal extraction parameters were obtained as: material/liquid ratio 1:14 (g/mL), extraction time 31 min, and 80% acidification methanol as extracting agent. Under the optimal condition, the total phenolic content was 0.67 mg GAE/g, and the model prediction deviation was 6.9%. Meanwhile, the antioxidant activity was determined with five different methods, and the results showed that garlic had good antioxidant activity.

Key words: garlic; total phenolic compounds; antioxidant activity; response surface methodology

中图分类号: S663.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)10-0072-06

大蒜(*Allium sativum* L.)为百合科葱属植物,在我国南北均有种植,是人们日常生活中传统的调味料和传统的药食同源植物。因其含有维生素、硒和含硫化合物等多种生理活性成分,因此在抗动脉粥样硬化^[1]、抗癌^[2]、保健和预防^[3]、治疗多种慢性疾病^[4]等领域有着广

泛的应用,而这些应用与它们的抗氧化活性密不可分。据研究,成熟大蒜及其成分在内皮细胞中皆表现出抗氧化性损伤的功能^[5],并可在一定程度上抑制癌细胞的增长^[6],因此,大蒜常常被当做是功能性的食品原料被加以利用^[7]。

收稿日期: 2011-05-21

基金项目: 西北农林科技大学唐仲英育种基金项目(A212020911);

西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目(01140303); 国家公益性行业(农业)科研专项(200903018-7)

作者简介: 杜俊娜(1985—),女,硕士研究生,研究方向为蔬菜生理与分子育种。E-mail: dujunna2005@126.com

*通信作者: 陈书霞(1971—),女,副教授,博士,研究方向为蔬菜生理与分子育种。E-mail: shuxiachen@nwsuaf.edu.cn

大蒜总酚不仅是一种天然无毒的抗氧化剂,也是理想的天然药物,具有清除自由基、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等作用。同时在医药、化妆品、农用化学品等领域也具有重要的应用。在目前大蒜多酚提取的工艺方法中,超声波提取法具有提取效率高、不需高温、能耗低、提取时间短等特点。但对于大蒜料液比、提取时间、不同体积分数提取剂等工艺参数尚有较少的研究对其进行优化。

响应曲面法(response surface methodology, RSM)是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法,可用于来进行建模、检验模型合适性、因子效应的评估、考察以及寻求因子的最佳操作条件等^[8]。近年来响应曲面法已成功应用于天然化合物提取优化实验^[9],与正交试验设计相比,具有试验周期短,回归方程的精度高,能同时研究几种因素间的交互作用等优点^[10]。

本研究在单因素试验基础上,利用响应曲面法对大蒜中总酚的提取工艺进行优化,分析料液比、提取时间、不同体积分数提取剂对总酚提取率的影响,建立总酚提取的数学模型。并采用5种方法分析大蒜的抗氧化活性,为大蒜医学功能的评价和相关产品的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大蒜(*Allium sativum* L.)鳞茎于2010年8月取自西北农林科技大学园艺场大蒜资源圃。采新鲜鳞茎-20℃保存备用。

福林肖卡试剂、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH)、新亚铜、啡咯嗪、rolox 标样 美国Sigma公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

SHIMADZU UV-1700型紫外分光光度计 日本岛津公司; ZMQS 5001型超纯水制备仪 法国Milipore公司; SORVAIL RC-SC-PLUS型高速冷冻台式离心机 美国Kendro公司; KQ-300DE型数控超声波机 昆山仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺

准确称取一定量的大蒜鳞茎于研钵中,加入液氮研磨至粉末,转移至50mL离心管中,再加入相应量的不同提取液,在20℃条件下进行超声波提取,10000r/min离心10min,转移上清至丝口瓶中,-20℃贮存备用。

1.3.2 提取条件优化方案

根据单因素试验,选取对试验结果影响较大的因素,采用Box-Behnken模型进行试验设计,用Design Expert 7.0软件进行响应面优化分析。

1.3.3 总酚提取量的测定

采用Folin-Ciocalteu(FC)法^[11]。移取待测溶液300μL提取液,加入700μL蒸馏水,混合均匀后,加入200μL福林肖卡(FC)试剂,混合萃取1min后,加入2mL Na₂CO₃(10%)溶液,室温避光静置2h后,于波长765nm处测吸光度。以没食子酸为标准品,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 17.179x + 0.0147$, $r^2 = 0.9991$,根据标准曲线方程求出提取液中总酚质量浓度/(mg GAE/g, GAE(gallic acid equivalent)表示没食子酸等效物)。

1.3.4 抗氧化活性的测定

1.3.4.1 DPPH清除力

通过检测试验样品对有机自由基DPPH的清除能力可以评价其抗氧化性的强弱。试验测定参照Mimica等^[12]的方法。DPPH清除率按下式计算。

$$\text{DPPH 清除率} \% = \frac{A_i}{A_c} \times 100$$

式中: A_i 为试验样品吸光度; A_c 为空白对照吸光度。

1.3.4.2 羟自由基清除力

对·OH的清除能力测定参照Sakanaka等^[13]的方法。清除率按下式进行计算。

$$\text{羟自由基清除率} \% = \left(1 - \frac{A_i}{A_c}\right) \times 100$$

式中: A_i 为试验样品吸光度; A_c 为空白对照吸光度。

1.3.4.3 铁氰化钾还原力

样品的还原能力与抗氧化能力呈正相关,参照Oyaizu^[14]的方法进行测定,还原能力的强弱以波长700nm处的吸光度表示。

1.3.4.4 铜离子还原力

取1mL提取液,分别加入1mL CuSO₄·5H₂O(5mmol/L), 1mL新亚铜(3.75mmol/L),于37℃反应30min,450nm波长处测吸光度。Trolox作标品,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 0.0016x - 0.0175$, $r^2 = 0.998$,根据标准曲线方程求出提取液中铜离子还原能力相当于trolox的含量的质量浓度。结果用mg(trolox等同量)/g表示。

1.3.4.5 金属螯合力

对亚铁的螯合能力测定参照Ak等^[15]的方法。螯合率按下式进行计算。

$$\text{整合率} / \% = \left(1 - \frac{A_i}{A_c}\right) \times 100$$

式中: A_i 为试验样品吸光度; A_c 为空白对照吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对大蒜中总酚提取量的影响

以 80% 酸化甲醇为提取剂, 提取时间为 30min 的条件下, 以料液比 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 (g/mL) 进行试验, 不同料液比对大蒜总酚提取量的影响见图 1。

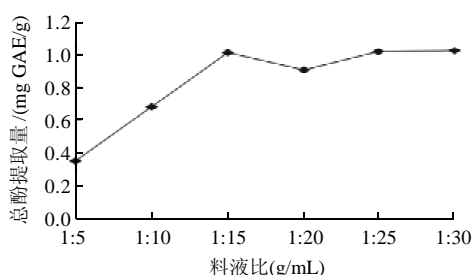


图 1 料液比对总酚提取量的影响

Fig.1 Effect of material / liquid ratio on yield of total phenolic compounds

由图 1 可知, 随着液体比例的逐渐增加, 总酚提取量呈增大趋势。但当料液比达到一定量时, 提取剂对有效成分的提取达到饱和。再增加提取剂的量, 杂质成分会竞争溶出而不利于有效成分的提取。而且会造成的浪费, 成本增加。因此, 在保证提取效果的同时, 可减少提取剂的用量。综合考虑, 料液比以控制在 1:15 (g/mL) 为宜。

2.1.2 提取时间对大蒜中总酚提取量的影响

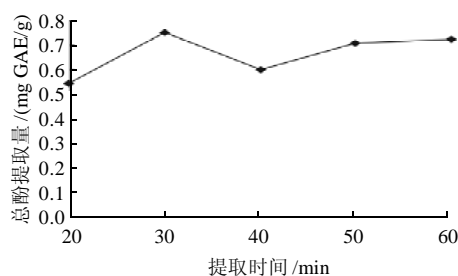


图 2 提取时间对总酚提取量的影响

Fig.2 Effect of extraction time on yield of total phenolic compounds

以 80% 酸化甲醇为提取剂, 料液比 1:10 (g/mL) 的条件下, 以提取时间 20、30、40、50、60 min 进行试验, 不同提取时间对总酚提取量的影响见图 2。

由图 2 可知, 随着时间延长, 总酚提取量逐渐增加, 在 30 min 前增加较明显, 说明时间越短提取越不充分, 在 30 min 后总酚提取量开始下降, 之后回升, 趋势平缓, 说明大蒜中抗氧化物质已基本提取完, 为缩短工时、节省能源, 选取最佳提取时间为 30 min。

2.1.3 提取剂体积分数对大蒜中总酚提取量的影响

在料液比为 1:10 (g/mL), 提取时间 30 min 条件下, 分别用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的酸化甲醇进行提取。不同体积分数提取剂对总酚提取量的影响见图 3。由图 3 可知, 80% 酸化甲醇提取率最高, 所以选择 80% 酸化甲醇为最佳提取剂。

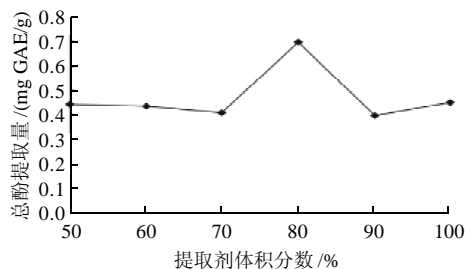


图 3 提取剂体积分数对总酚提取量的影响

Fig.3 Effect of concentration of extracting agents on yield of total phenolic compounds

2.2 响应面法提取条件的优化

2.2.1 响应面试验设计及结果

在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 以料液比、提取时间和不同体积分数提取剂 3 个外界因素为自变量, 以总酚提取量为响应值即因变量, 因素编码及水平见表 1, 试验设计及结果见表 2。

表 1 响应面试验因素水平编码表

Table 1 Variables and levels in three-variable-three-level Box-Behnken experimental design

因素	水平		
	-1	0	1
A 料液比 (g/mL)	1:10	1:15	1:20
B 提取时间 / min	20	30	40
C 提取剂体积分数	70% 酸化 甲醇	80% 酸化 甲醇	90% 酸化 甲醇

表2 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 2 Trials and results of the three-variable-three-level Box-Behnken experimental design

试验号	因素			总酚提取量/(mg GAE/g)
	A	B	C	
1	20	30	90% 酸化甲醇	0.52
2	15	40	90% 酸化甲醇	0.42
3	15	20	90% 酸化甲醇	0.39
4	10	30	70% 酸化甲醇	0.51
5	15	30	80% 酸化甲醇	0.78
6	10	30	90% 酸化甲醇	0.45
7	20	30	70% 酸化甲醇	0.37
8	10	40	80% 酸化甲醇	0.62
9	20	40	80% 酸化甲醇	0.44
10	10	20	80% 酸化甲醇	0.47
11	15	30	80% 酸化甲醇	0.69
12	15	30	80% 酸化甲醇	0.64
13	15	30	80% 酸化甲醇	0.64
14	20	20	80% 酸化甲醇	0.37
15	15	40	70% 酸化甲醇	0.38
16	15	20	70% 酸化甲醇	0.44
17	15	30	80% 酸化甲醇	0.84

利用 Design Expert 7.0 软件, 对表 2 的试验数据进行处理, 得到回归方程方差分析表, 见表 3。同时利用该软件进行非线性回归分析, 得到预测模型如下:

$$Y = 0.72 - 0.044A + 0.022B + 9.278 \times 10^{-3}C - 0.019AB + 0.056AC + 0.020BC - 0.094A^2 - 0.15B^2 - 0.16C^2 \quad (1)$$

表3 回归方程方差分析表

Table 3 Analysis of variances for the developed regression equation

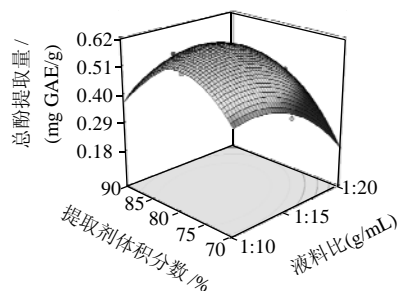
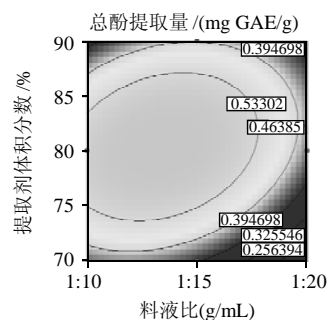
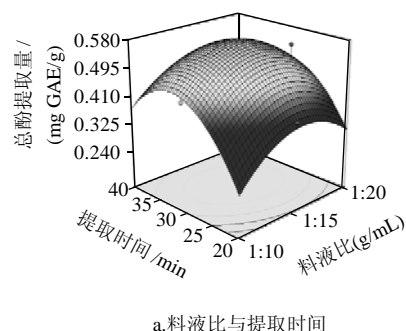
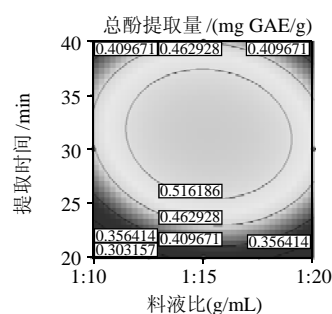
项	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.30	9	0.034	5.33	0.0191
A	0.016	1	0.016	2.51	0.1573
B	3.991×10^{-3}	1	3.991×10^{-3}	0.64	0.4517
C	6.88610^{-4}	1	6.88610^{-4}	0.11	0.7503
AB	1.456×10^{-3}	1	1.456×10^{-3}	0.23	0.6449
AC	0.012	1	0.012	1.98	0.2021
BC	1.680×10^{-3}	1	1.680×10^{-3}	0.27	0.6210
A ²	0.037	1	0.037	5.96	0.0446
B ²	0.093	1	0.093	14.80	0.0063
C ²	0.11	1	0.11	17.31	0.0042
残差	0.044	7	6.284×10^{-3}		
失拟项	0.014	3	4.775×10^{-3}	0.64	0.6262
净误差	0.030	4	7.416×10^{-3}		
总离差	0.35	16			
$R^2 = 0.8727$		$R^2_{Adj} = 0.7091$			

注: $P < 0.05$, 差异显著。

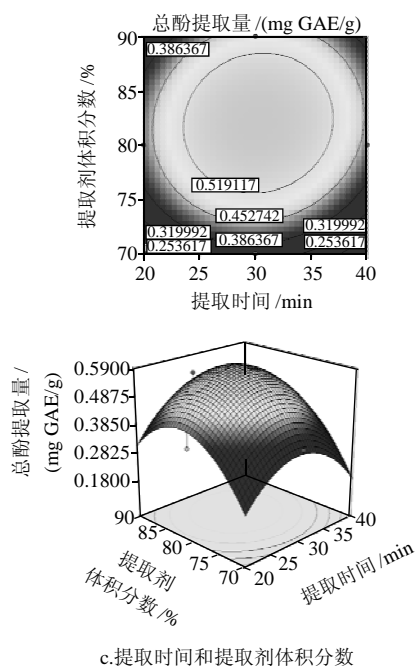
由表 3 可以看出, $F_{\text{回归}} = 5.33$, $P = 0.0191 < 0.05$, 表明模型效应显著, 不同处理间的差异显著; 各因素中 A^2 、 B^2 、 C^2 效应均显著; A 、 B 、 C 、 AB 、 AC 、 BC 效应不显著, 由此可见, 各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。 $F_{\text{失拟}} = 0.64$, 说明失拟项

与净误差没有显著的关联, 失拟项 $P = 0.6262 > 0.05$, 不显著, 说明回归方程拟合程度良好。 $R^2 = 0.8727$, 说明该回归方程回归效果较好; 模型的调整决定系数 $R^2_{Adj} = 0.7091$, 说明该模型能解释 70.91% 响应值的变化, 因而该模型拟合程度良好, 实验误差小, 可信度高, 该模型是合适的, 可以用此模型对总酚提取量提取工艺进行分析和预测。

2.2.2 各因素及交互作用对总酚提取量的影响



b. 料液比与提取剂体积分数



c. 提取时间和提取剂体积分数

固定水平: 料液比 1:15(g/mL); 提取时间 30min; 80% 酸化甲醇为提取剂。

图4 各两因素交互作用对总酚提取量影响的等高线及响应面图

Fig.4 Response surface plots of the interactive effects of extraction time and concentration of extracting agents on yield of total phenolic compounds

由图4a可知,以80%酸化甲醇为提取剂,料液比和提取时间对大蒜中总酚提取量的交互影响。在提取时间不变的条件下,随着提取剂用量的逐渐增加,总酚提取量出现先上升后下降的趋势,变化较不显著。这可能是当料液比变大时,大蒜中的总酚类物质与提取剂在单位时间内存在较大的质量浓度梯度,扩散系数大,扩散速率大。随着时间的延长,有效组分在提取剂中的溶解基本趋于饱和,再加大料液比也不会促进提取。在料液比不变的条件下,随着时间的逐渐延长,总酚提取量也出现了先上升后下降的趋势,变化较为显著,这说明总酚提取量随着时间的延长而增加,当达到饱和时,再延长提取时间,反而会抑制总酚类物质的提取。

由图4b可知,在30min提取时间下,料液比和提取剂体积分数对大蒜中总酚提取量的交互影响。在料液比不变的条件下,总酚提取量随提取剂体积分数的升高先增加后降低,提取剂体积分数大致在80%时,总酚提取量最高,70%和90%时,总酚提取量较低。在提取剂浓度不变的条件下,随着提取剂用量的逐渐增加,总酚提取量出现先上升后下降的趋势。这可能是由于料液比的增大会使大蒜中的总酚类物质得到更充分地释放,总酚提取量上升,当大蒜中的总酚提取接近完全时,再继续增大提取剂用量,总酚提取量则出现下降。

由图4c可知,在1:15(g/mL)料液比条件下,提取时间和提取剂体积分数对大蒜中总酚提取量的交互影

响。在提取时间不变的条件下,同料液比和不同体积分数提取剂的交互作用,以80%酸化甲醇为提取剂的总酚提取量最高。在提取剂体积分数不变的条件下,随着提取时间的增加,总酚提取量出现先上升后下降的趋势。其原因可能是在刚开始提取的时候,大蒜中的总酚类物质与提取剂在单位时间内存在较大的质量浓度差,扩散速度快,总酚提取量较高,随着时间的延伸,部分组织的有效组分的结构破坏,导致总酚提取量下降。

综合图4,在模型浓度范围内选择出发点,按照模型(1)使用快速上升法进行提取工艺的优化,提取的最佳条件为料液比1:13.76(g/mL)、提取时间30.91min、提取剂体积分数79.92%,在此条件下总酚提取量的理论值0.72mg GAE/g,可信度为0.7091。

2.2.3 最佳工艺参数的验证

在最佳条工艺件下进行验证实验,修正工艺参数为料液比1:14(g/mL)、提取时间31min、用80%酸化甲醇为提取剂,实际测得的总酚提取量0.67mg GAE/g,模型预测值偏差6.9%,与理论值较为一致。因此,认为利用响应面分析法得到的优化提取工艺参数准确可靠,得到的提取条件具有一定的实际应用价值。

2.3 最佳工艺提取液的抗氧化活性的测定

对采用最佳工艺所得提取液进行抗氧化活性测定。如图5所示,DPPH清除率76.2%、羟自由基清除率52.96%、铁氰化钾还原力(实际吸光度)为0.289、铜离子还原力相当于1.888mg(trolox 等同量)/g、而金属螯合率为21.43%,说明大蒜鳞茎提取液具有很好的抗氧化活性。

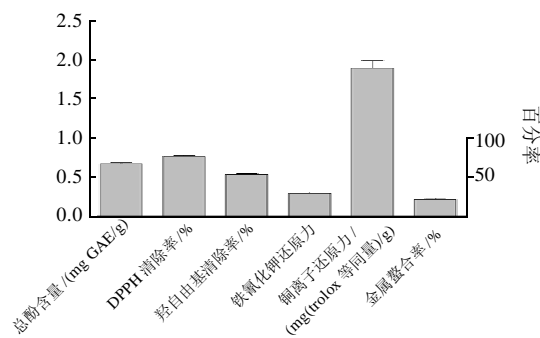


图5 总酚提取量及抗氧化活性指标

Fig.5 Total phenolic content extracted under optimized extraction conditions and antioxidant activity

3 结 论

通过单因素试验和Box-Behnken中心组合设计原理以及响应面分析法对大蒜中总酚类物质的提取工艺进行

优化, 得到料液比、提取时间、不同体积分数提取剂 3 个因素与总酚提取量的回归模型, 经检验证明该模型合理可靠, 能较好地预测大蒜中总酚提取量。由该模型确定的最优工艺条件为料液比 1:14(g/mL)、提取时间 31 min、提取剂为 80% 酸化甲醇, 在此条件下, 得到总酚提取量为 0.67mg GAE/g, 与理论值 0.72mg GAE/g 较为一致。同时, 抗氧化活性试验结果表明大蒜具有很好的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] NENCINI C, CAVALLO F, CAPASSO A, et al. Evaluation of antioxidative properties of *Allium* species growing wild in Italy[J]. Phytother Res, 2007, 21(9): 874-878.
- [2] LEELARUNGRAYUB N, RATTANAPANONE V, CHANARAT N, et al. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations[J]. Nutrition, 2006, 22(3): 266-274.
- [3] TAPIERO H, TEW K D, BA G N, et al. Polyphenol: do they play a role in the prevention of human pathologies[J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(4): 200-207.
- [4] DIPLOCK A T, CHARLERX J L, CROZIER W G, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species[J]. British Journal of Nutrition, 1998, 80(Suppl 1): 77-112.
- [5] IDE N, LAU B H. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury[J]. J Pharm Pharmacol, 1997, 49(9): 908-911.
- [6] HU X, CAO BN, HU G, et al. Attenuation of cell migration and induction of cell death by aged garlic extract in rat sarcoma cells[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(6): 641-643.
- [7] JAE-HEE P, YOO K P, EUNJU P. Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic(*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods[J]. Plant Foods Hum Nutr, 2009, 64(4): 244-249.
- [8] ANNADURAI G, SHEEJA R Y. Use of Box-Behken design of experiments for the adsorption of verofix-red using biopolymer[J]. Bioprocess Eng, 1998, 18(6): 463-466.
- [9] 张因, 康廷国, 尹海波. 星点设计 - 响应面法优化穿龙薯蓣多糖提取工艺[J]. 中药材, 2011, 34(1): 123-126.
- [10] 刘洋, 赵谋明, 杨宁. 响应面分析法优化仙人掌多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 42-45.
- [11] BILJANA B, NEDA M D, ISIDORA S, et al. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae)[J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 925-929.
- [12] MIMICA D, BOZIN B, SOKOVIC M, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(9): 2485-2489.
- [13] SAKANAKA S, ISHIHARA Y. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 739-744.
- [14] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction[J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44(6): 307-315.
- [15] AK T, GLIN I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin [J]. Chemico Biological Interactions, 2008, 174(1): 27-37.