

Box-Behnken 响应面法优化大蒜油提取工艺[△]

康冰亚^{1*}, 刘瑞新^{1#}, 桂新景², 段晓颖¹, 李学林¹, 徐立然³(1.河南中医学院第一附属医院国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 郑州 450000; 2.河南中医学院药学院, 郑州 450046; 3.河南中医学院第一附属医院艾滋病研究中心, 郑州 450000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0103-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.27

摘要 目的:优化大蒜油的提取工艺。方法:以大蒜油提取率为指标,在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 响应面法对水蒸气蒸馏法提取大蒜中大蒜油的发酵时间、料液比、发酵温度等条件进行优化研究,对优化工艺进行验证试验。结果:最优提取工艺为发酵时间 4.5 h、料液比 1:7、发酵温度 55 ℃。验证试验中大蒜油平均提取率为 0.32% (RSD=1.43%, n=3),实测值与预测值之间的相对误差为 0.06%。结论:采用 Box-Behnken 响应面法优化所得大蒜油提取工艺简便、合理、可行,可为大蒜油工业化大生产提供参考。

关键词 大蒜油;水蒸气蒸馏法;Box-Behnken 响应面法;提取工艺;优化

Optimization of the Extraction Technology of Garlic Oil by Box-Behnken Response Surface Method

KANG Bingya¹, LIU Ruixin¹, GUI Xinjing², DUAN Xiaoying¹, LI Xuelin¹, XU Liran³(1.Third Grade Laboratory, State Administration for TCM, the First Affiliated Hospital of Henan Traditional Chinese Medicine University, Zhengzhou 450000, China; 2.College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 3. AIDS Research Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of garlic oil. METHODS: Using extraction rate of garlic oil as index, based on single factor test, Box-Behnken response surface method was used to optimize conditions of steam distillation method for the extraction of garlic as fermentation time, solid to liquid ratio, fermentation temperature and the verification test were made for the optimized technology. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as fermentation time of 4.5 h, solid to liquid ratio of 1:7, fermentation temperature of 55 ℃. The average extraction rate of garlic oil in verification test was 0.32% (RSD=1.43%, n=3); the relative error between the measured value and predicted value was 0.06%. CONCLUSIONS: Box-Behnken response surface method is simple, reasonable and feasible to optimize the extraction technology of garlic oil, which can provide a scientific basis for industrial production.

KEYWORDS Garlic oil; Steam distillation; Box-Behnken response surface method; Extraction technology; Optimization

大蒜(*Allium sativum* L.)是百合科多年生草本植物大蒜的干燥鳞茎,主要活性成分为大蒜油,是蒜中所有含硫化合物的总称^[1]。大蒜油被称之为天然抗生素,国内外已有诸多相关产品问世,现被广泛应用于医药、保健品及食品等领域。

目前,大蒜油的提取工艺主要有水蒸气蒸馏法、溶剂浸出法和超临界二氧化碳萃取法。溶剂浸出法是一种相对比较温和的方法,但是其不足之处是提取物中其

他的可溶性杂质含量偏高,将大蒜油进一步提纯的操作较复杂且难度大^[2]。超临界二氧化碳萃取法可直接获得纯净、高品质、高得率的大蒜油,具有生产周期短、安全可靠等优点,但其对设备的要求也较高,相应地提高了提取成本,产业化生产相对比较困难,目前主要处于实验室研究阶段,不便于大规模生产^[3]。水蒸气蒸馏法具有设备简单、成本低、稳定性好等特点^[4],是最常用的工业生产化方法之一。本试验采用水蒸气蒸馏法提取大蒜油,以大蒜油提取率为指标,在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 响应面法分析并优化水蒸气蒸馏法提取大蒜油的工艺条件,并在工艺参数与大蒜油提取率之间建立数学模型关系,为将来的规模化生产提供理论依据。

1 材料

△ 基金项目:国家中医药管理局国家中医药临床研究基地业务建设科研专项课题(No.JDZX2015162);郑州市科技局项目(No.CZSYJJ-14012)

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药制剂。电话:0371-66233639。E-mail:kangby2008@163.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:中药制剂及分析。电话:0371-66233639。E-mail:liuruixin7@163.com

1.1 仪器

DS-1型高速组织捣碎机(上海标本模型厂);挥发油提取器(北京新科实验室玻璃仪器有限公司);ABZD-HW-2000型电热套(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 药材

大蒜(于2016年3月27日购自郑州市丹尼斯超市,产地:河南)。

2 方法与结果

2.1 提取方法

称取一定量的去皮大蒜,放入组织捣碎机中,加入适量蒸馏水,捣碎成细颗粒状,置于圆底烧瓶中,常压加一定量蒸馏水,在特定温度下浸泡发酵一定时间。连接挥发油提取器,提取一定时间,收集提取物,并加适量石油醚(60~90℃)萃取。精密读取大蒜油体积,计算其提取率[提取量(mL)/大蒜质量(g)×100%]。

2.2 单因素试验初步筛选影响因素与水平

查阅文献[5-6],分别设置发酵时间(h)、料液比(大蒜质量-加水量, $m:V$)、发酵温度(℃)和蒸馏时间(h)4个因素,每个因素设置5个水平,以大蒜油提取率为指标对影响因素进行初步筛选。

2.2.1 发酵时间 设置发酵温度为25℃、蒸馏时间为2h、料液比为1:4,考察发酵时间为1、2、3、4、5h时大蒜油提取率的影响,结果见图1A。

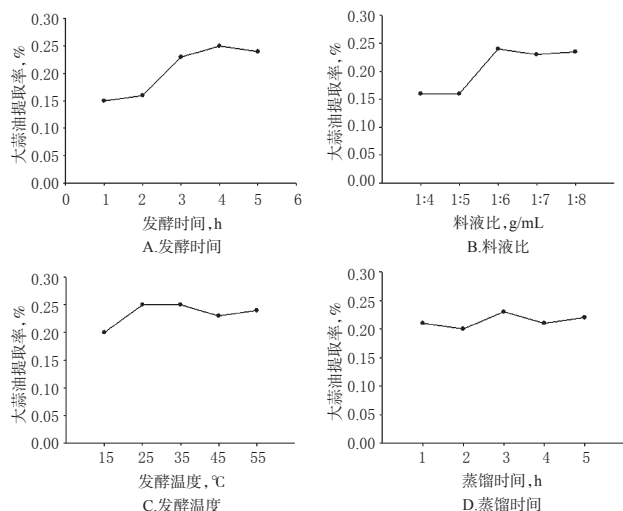


图1 各因素对大蒜油提取率的影响

Fig 1 Effects of various factors on extraction rate of garlic oil

由图1A可知,随着发酵时间的延长,大蒜油提取率呈现上升的趋势;当发酵时间为4h时,大蒜油提取率达到峰值,之后呈现下降趋势。故以发酵时间4h为宜。

2.2.2 料液比 设置蒸馏时间为2h、发酵温度为25℃、发酵时间为1h,考察料液比分别为1:4、1:5、1:6、1:7、1:8时大蒜油提取率的影响,结果见图1B。

从图1B可知,当料液比为1:4、1:5时,大蒜油提取率未发生明显变化;当料液比设为1:6时,大蒜油提取率呈现明显的上升趋势;当料液比设为1:7、1:8时,大蒜油提取率又略呈现先下降、后又微升的趋势。故选择料液比1:6为宜。

2.2.3 发酵温度 设置蒸馏时间为2h、料液比为1:4、发酵时间为1h,考察发酵温度为15、25、35、45、55℃时大蒜油提取率的影响,结果见图1C。

从图1C可知,随着发酵温度的升高,大蒜油的提取率呈现先升后降的趋势;当温度达到35℃时,大蒜油提取率最高,之后略呈现下降的趋势。故选择发酵温度35℃为宜。

2.2.4 蒸馏时间 设置发酵温度为25℃、料液比为1:4、发酵时间为1h,考察蒸馏时间为1、2、3、4、5h对大蒜油提取率的影响,结果见图1D。

由图1D可知,各蒸馏时间不同引起的大蒜油提取率的变化不太明显,蒸馏前3h呈现略微上升的趋势,之后呈现略微下降的趋势。从试验结果来看,虽然蒸馏3h比蒸馏2h大蒜油提取率略高,但随着蒸馏时间的延长能耗增大。因此,从节约成本及降低能耗的角度考虑,确定蒸馏时间为2h,并不再进行优化。

上述单因素结果表明,初步筛选的较优提取条件为发酵时间4h、料液比1:6、发酵温度35℃、蒸馏时间2h。最终选取发酵时间3~5h、料液比1:5~1:7、发酵温度15~55℃进行后续响应面法设计,优化大蒜油提取工艺参数。

2.3 Box-Behnken 响应面法优化大蒜油提取工艺

选取发酵时间(X_1)、料液比(X_2)、发酵温度(X_3)为考察变量,大蒜油提取率(Y)为响应值,采用Box-Behnken design(BBD)试验设计方案,进行3因素3水平的响应面分析对工艺参数进行优化,总共设计17组试验点。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 (发酵时间),h	X_2 (料液比),g/mL	X_3 (发酵温度),℃
-1	3	1:5	15
0	4	1:6	35
1	5	1:7	55

应用 Design Expert 6.0.5 软件对表2中的数据进行二次多元回归拟合,得到 Y 对 X_1 、 X_2 、 X_3 之间的二次多项回归方程为: $Y=0.31+0.036X_1-0.030X_2+0.054X_3-0.092X_1^2-0.060X_2^2-0.047X_3^2+7.500\times 10^{-3}X_1X_2+0.055X_1X_3+0.083X_2X_3$,剔除不显著项后 $Y=0.31+0.036X_1-0.030X_2+0.054X_3-0.092X_1^2-0.060X_2^2-0.047X_3^2+0.055X_1X_3+0.083X_2X_3$ 。由方程可知,各因素对

大蒜油提取率的影响大小排序为 $X_3 > X_1 > X_2$, 即发酵温度 > 发酵时间 > 料液比。对上述回归模型进行方差分析, 结果见表3。

表2 试验设计与结果

Tab 2 Design and results of test

试验号	X_1	X_2	X_3	Y, %
1	-1	-1	0	0.22
2	-1	0	-1	0.12
3	0	0	0	0.31
4	0	-1	1	0.17
5	0	1	-1	0.08
6	-1	1	0	0.07
7	0	0	0	0.26
8	0	-1	-1	0.23
9	1	-1	0	0.24
10	1	1	0	0.12
11	1	0	-1	0.12
12	-1	0	1	0.12
13	0	0	0	0.35
14	0	0	0	0.40
15	1	0	1	0.34
16	0	0	0	0.25
17	0	1	1	0.35

表3 回归模型的方差分析结果

Tab 3 Variance analysis result of regression model

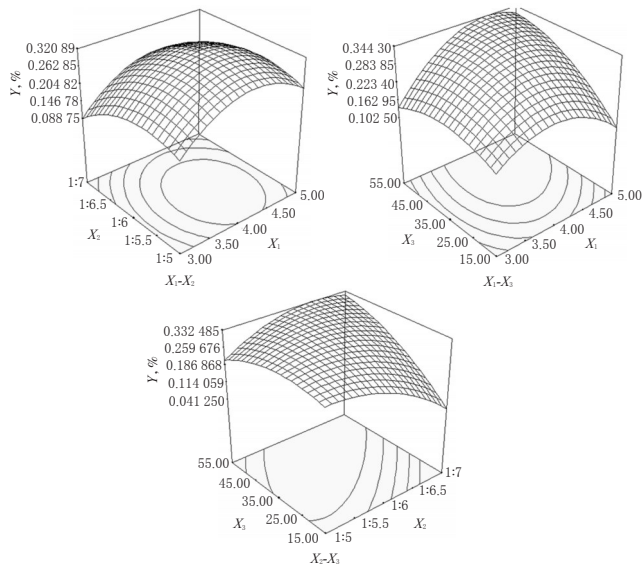
方差来源	平方和	自由度	F	P
模型	0.150	8	4.87	0.019 0 (显著)
X_1	0.011	1	2.80	0.132 7
X_2	0.007 2	1	1.92	0.203 4
X_3	0.023	1	6.16	0.038 0 (显著)
X_1^2	0.036	1	9.50	0.015 1 (显著)
X_2^2	0.015	1	3.97	0.081 4
X_3^2	0.009 301	1	2.48	0.154 1
X_1X_3	0.012	1	3.22	0.110 3
X_2X_3	0.027	1	7.26	0.027 3 (显著)
残差	0.030	8		
失拟项	0.014	4	0.91	0.535 4 (不显著)
净误差	0.016	4		
总离差	0.180	16		

从表3可以看出, 回归方程显著性检验 $P < 0.05$, 表明响应面回归模型达到显著水平。模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率^[7], 表4中失拟项的 P 为 $0.535 4 > 0.100$, 说明该方程对试验结果拟合良好。模型中 X_3 、 X_1^2 、 X_2X_3 项具有显著性, 表明各个自变量与因变量之间不是简单的线性关系, 而具有一定的交互作用。对各因素绘制曲面图和等高线图, 以直观地反映各因素的交互作用对响应值的影响以及最优条件下各因素的取值结果, 详见图2。

由图2可见, X_2 与 X_3 的曲线较陡, 且等高线为椭圆形, 表明二者之间具有显著性交互作用; X_1 与 X_3 、 X_1 与 X_2 的曲线比较平缓, 等高线基本为圆形, 表明两两之间交互作用不显著, 与方差分析结果一致。

根据 Box-Behnken 响应面法试验所得结果和二次

曲面图:



等高线图:

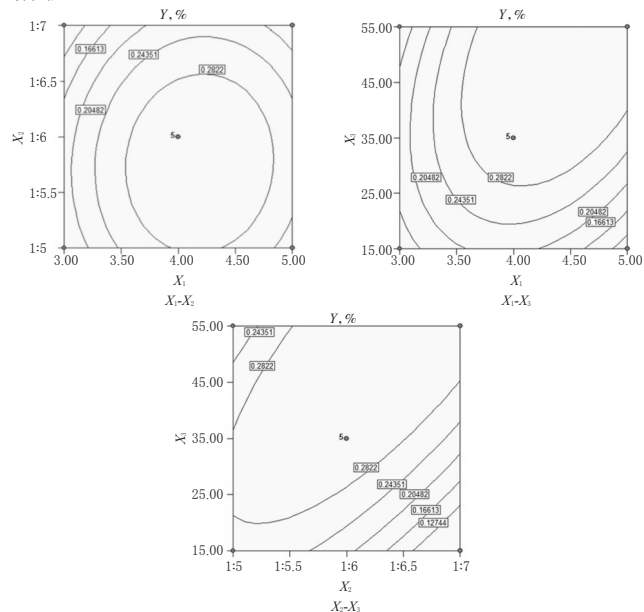


图2 各因素对大蒜油提取率的曲面图和等高线图

Fig 2 Surface plot and contour map for various factors to extraction rate of garlic oil

多项回归方程, 采用 Design Expert 6.0.5 软件拟合可得最优工艺条件为发酵时间 4.5 h、料液比 1:7、发酵温度 55 °C。此条件下大蒜油提取率预测值为 0.34%。

平行、精密称定 3 份大蒜, 每份 500 g, 根据优化工艺对 3 批样品进行提取工艺验证试验。结果大蒜油平均提取率为 0.32% (RSD=1.43%, $n=3$), 与预测值基本接近(相对误差为 0.06%), 表明预测值与真实值之间有较好的一致性, 进一步验证了模型的可靠性。

3 讨论

3.1 提取方法

大蒜油中主要药效成分是大蒜素, 经现代医学研究证明, 大蒜具有的广谱杀菌作用主要是由大蒜素引起

的^[8],而如何将大蒜油从大蒜中有效提取出来尚有一定的难度,这主要是由于大蒜素是在蒜酶作用下转化产生的,而在提取操作中蒜酶极易失活。本试验采用水蒸气蒸馏法,虽与其他方法相比有一定优势,但亦有不足之处,如蒸馏的高温可能会导致一部分有效成分挥发或分解。如果在制备大蒜油的过程中采用保持低温或隔绝空气等特殊的生产技术,如低温萃取或冷冻干燥技术,可能会提高制备的大蒜油的质量,这将是本课题组下一步的研究方向。

3.2 各因素对提取率变化的影响原因分析

3.2.1 发酵时间 在单因素试验中,随着发酵时间的延长,大蒜油提取率呈现先上升后下降。原因可能是大蒜中的蒜氨酸与蒜氨酸酶在细胞破碎后发生了酶解反应所致。随着发酵时间的延长,蒜氨酸酶与蒜氨酸充分反应接触,直至反应完全,生成一种名为硫代亚磺酸酯的化合物,该化合物不稳定,很快变成一系列的分子^[9],同时大蒜素的生成则减少。

3.2.2 料液比 在单因素试验中,随着料液比的增大,大蒜油提取率呈现先平衡、再上升后又略下降、再微上升的趋势。原因可能是当料液比为1:4~1:5时,由于水量不够,不能够充分浸润大蒜,产生的蒸气量不够,从而导致大蒜油提取不完全;而当继续增大液体的比例时(1:7~1:8),可能又对大蒜产生了稀释作用,从而导致其提取率略微下降。

3.2.3 发酵温度 在单因素试验中,随着发酵温度的增加,大蒜油的提取率呈现先升后降的趋势。原因可能是大蒜油的产生是一个酶促反应,而蒜氨酸酶的活性受温度的影响,当蒜浆的发酵处于一定温度时,蒜氨酸酶的活力最高,大蒜挥发油的转化速度最快,产量也就较高^[10];而温度低时,酶的活性小,产品转化时间长;温度太高,偏离酶活性最适期,产品产量又降低。

3.3 试验设计方法的选取

由于本试验中的3个自变量因素皆为连续性变量,对于连续性变量的多因素试验,Box-Behnken 响应面法是一种较适合的分析方法。Box-Behnken 响应面法通过非线性模型拟合得出的最优提取条件更接近客观实际,

避免了传统正交设计和均匀设计法的不足,具有试验精度高、模型预测性好的优点,并已用于优化各种中药的提取以及制剂处方工艺的试验中^[11-13]。而本试验的验证试验结果也表明,采用 Box-Behnken 响应面法优化大蒜油提取工艺简单、准确、可行。

参考文献

- [1] 鄢文佳,许志威.大蒜油的药理作用研究[J].中国现代中药,2015,17(10):1109-1112.
- [2] 梁丽军,熊涛,曾哲灵.大蒜油的提取和测定方法研究进展[J].四川食品与发酵,2007,43(5):15-19.
- [3] 仇小艳,黄小清,蔡艳军.水蒸气蒸馏法提取大蒜挥发油的工艺研究[J].氨基酸和生物资源,2013,35(1):11-14.
- [4] 张郁松,韩建军.水蒸气蒸馏法提取大蒜油的工艺研究[J].中国调味品,2011,36(3):27-29.
- [5] 宋磊,西洛,何黎黎,等.“红七星”大蒜油提取工艺研究[J].广州化学,2015,40(3):41-44.
- [6] 刘金丽,佟雷,张璐,等.大蒜油的提取工艺研究[J].微量元素与健康研究,2015,32(4):36-37.
- [7] 林媛媛,刘静,王冬梅. Box-Behnken 试验设计法优化宝泻灵凝胶膏剂处方及其体外透皮特性研究[J].中草药,2014,45(9):1238-1244.
- [8] 康冰亚,李学林,高晓洁,等.泻痢康胶囊防治艾滋病腹泻研究思路[J].中医学报,2015,30(6):1-3.
- [9] Dethier B, Nott K, Fauconnier ML. (Bio)synthesis, extraction and purification of garlic derivatives showing therapeutic properties.[J]. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2013,78(1):149-155.
- [10] 孔祥智,黄雪松.硫酸铵盐析法分布分离大蒜SOD和蒜氨酸酶的研究[J].食品工业科技,2008,29(1):165-166.
- [11] 白才堂,吕竹芬,谢清春,等.正交试验优选竭红跌打巴布剂基质处方[J].中国药房,2011,22(31):2911-2913.
- [12] 鹿静,魏希颖,张琼,等.灯盏花素巴布剂的处方优选[J].中成药,2013,35(3):504-507.
- [13] 宋信莉,刘文.正交试验法优选老鹳草巴布剂基质配方[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):52-54.

(收稿日期:2016-06-12 修回日期:2016-08-12)

(编辑:刘 萍)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅