

响应面法优化超临界 CO₂ 萃取当归挥发油工艺及抑菌活性研究

金元宝^{1,2}, 杜志琳¹, 刘明石¹, 王莘^{1*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林大学珠海学院, 广东珠海 519041)

摘要 [目的] 采用响应面法对超临界 CO₂ 萃取当归油的工艺进行优化, 同时对当归挥发油的抑制活性进行研究。[方法] 在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 试验设计, 考察萃取压力、萃取温度和萃取时间对挥发油提取率的影响, 并采用纸片扩散法对提取的挥发油对的抑菌效果进行考察。[结果] 当归挥发油的最优提取工艺为: 萃取温度 44.4 °C、萃取压力 32.37 MPa、萃取时间 1.48 h; 在此条件下, 萃取率可达 2.0833%。当归挥发油对部分常见的细菌和真菌具有较好的抑菌活性, MIC 值在 1.25~5.00 mg/ml 范围内。[结论] 超临界 CO₂ 萃取当归油工艺稳定, 提取率较高; 当归油具有明显的抑菌活性, 将为当归挥发油在抑菌制剂中的应用提供一定的理论依据。

关键词 超临界 CO₂ 萃取; 当归油; 响应面分析; 抑菌活性

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)11-04773-04

Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction Conditions of *Angelica sinensis* Volatile Oil Using Response Surface Method and the Detection Research of Antimicrobial Activity

JIN Yuan-bao et al (College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract [Objective] Response surface analysis method was applied to optimize the supercritical carbon dioxide extraction conditions of *Angelica sinensis*, the antimicrobial activity of *Angelica sinensis* volatile oil was studied. [Method] Based on the single factor experiment, a three-factor-three-level experiment design was developed by Box-Behnken central composite design method. The influences of extraction temperature extraction time extraction pressure on the yield of extraction were studied. The response surface method was employed to analyze the results of experiments. The disk diffusion method was used to detect the antimicrobial activity of *Angelica sinensis* volatile oil. [Result] The results indicated that the optimum extraction conditions were as follows: extraction temperature 44.4 °C, extraction time 1.48h, extraction pressure 32.37 Mpa, the extraction yield reached 2.0833%. The volatile oil of *Angelica sinensis* had antimicrobial activity of the tested strains, the MIC of the volatile oil was ranged 1.25 mg/ml from 5 mg/ml. [Conclusion] The supercritical carbon dioxide extraction condition is a stability process to obtain a higher extraction yield. The *Angelica sinensis* volatile oil has antimicrobial activity which could provide certain theoretical basis for the application of volatile oil.

Key words Supercritical carbon dioxide; *Angelica* oil; Response surface method; Antibacterial activity

当归 (*Angelica sinensis*) 为多年生伞形科草本植物, 以根部入药, 性甘、辛、温, 具有补血、活血和调经止痛等作用^[1-2]。当归含有挥发油, 具有治疗痛经、平喘、中枢抑制、镇痛以及提高免疫力等多方面的药理作用^[3-4]。

超临界 CO₂ 萃取技术应用范围较广, 与传统水蒸气蒸馏提取法相比, 具有提取率较高, 能够保护有效成分等明显优势。响应面分析法 (response surface analysis methodology, RSM) 是目前广泛应用的一种综合试验设计和数学建模的优化方法^[5], 通过多元二次回归方程拟合多因子与响应值间的关系, 进行模型预测, 并得到最优条件^[6-8]。

笔者采用超临界 CO₂ 萃取法提取当归中的挥发性成分, 并在单因素试验的基础上, 应用响应面法优化挥发油的萃取工艺, 通过对试验数据进行拟合, 研究萃取温度、萃取时间和萃取压力对挥发油得率的影响以及各考察因素之间的交互作用, 最终确定当归中挥发油的最佳萃取工艺。同时选择几种常见的细菌和真菌, 在最优条件下对提取所得挥发油进行抑菌活性的检测, 旨在为从当归中提取挥发油提供一种简便、高效的提取方法, 同时为当归挥发油在抑菌制剂中的应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。 当归, 购自广东省开平市健鸿药材市场, 产地云南, 经鉴定为 *Angelica sinensis*。

1.1.2 主要仪器。 HD-221-50-06 型超临界 CO₂ 萃取装置, 购自江苏南通超临界设备有限公司; WN-100 型万能粉碎机, 购自天津泰斯特设备有限公司; AR4202CN 型电子天平, 购自上海奥豪斯仪器有限公司; GZX-9240MBE 型电热鼓风干燥箱, 购自上海博讯实业有限公司。

1.1.3 主要试剂。 牛肉膏、蛋白胨等为生物试剂, 购自广东奥凯微生物有限公司; 氯化钠、氢氧化钠等试剂均为分析纯, 市售。

1.1.4 供试细菌。 铜绿色假单胞菌 (ATCC27853)、大肠杆菌 (ATCC25922)、金黄色葡萄球菌 (ATCC25923) 和枯草芽孢杆菌 (CMCC63501), 均由吉林大学国家级生物实验教学示范中心提供; 产黄青霉 (3.54688.5)、青色链霉 GIM4.15 (AS4.645) 和总状毛霉 (AS3.205), 均由吉林大学珠海学院化学与药学实验教学示范中心提供。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验优化当归挥发油的提取条件。 (1) 萃取温度的考察。称取 200.00 g 当归饮片, 共 5 份, 萃取温度分别为 35、40、45、50 和 55 °C, 萃取压力为 30 MPa, 萃取 1 h, 萃取所得挥发油称重, 计算提取率。 (2) 萃取时间的考察。称取 200.00 g 当归饮片, 共 5 份, 萃取时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 h, 萃取压力为 30 MPa, 萃取温度为 45

作者简介 金元宝 (1982-), 男, 吉林扶余人, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程及发酵产品的研究与利用, E-mail: 52699501@qq.com。* 通讯作者, 教授, 从事酶工程及发酵产品的研究与利用, E-mail: wangxin5853@126.com。

收稿日期 2013-03-24

℃, 萃取所得挥发油称重, 计算提取率。(3) 萃取压力的考察。称取 200.00 g 当归饮片, 共 5 份, 萃取压力分别为 20、25、30、35 和 40 MPa, 萃取时间为 1.5 h, 萃取温度为 45 ℃, 萃取所得挥发油称重, 计算提取率。

1.2.2 响应面法优化挥发油的提取工艺。在单因素试验的基础上, 采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合设计进行试验, 采用 F 检验方法评价各提取条件对当归挥发油提取率影响的显著性和各萃取条件之间交互作用, P 值越小, 则此提取条件的影响越显著。当 P 值小于 0.1 时, 系数显著; 当 P 值小于 0.05 时, 该系数十分显著; 当 P 小于 0.01 时, 该系数影响极为显著。选择以萃取温度 (X_1), 萃取时间 (X_2), 萃取压力 (X_3) 为自变量, 以挥发油得率 Y 为响应值, 进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 中心组合试验设计, 分别对萃取压力 (X_1), 萃取时间 (X_2), 萃取温度 (X_3) 进行编码, $X_1 = (Z_1 - 45)/5$, $X_2 = (Z_2 - 1.5)/0.5$, $X_3 = (Z_3 - 30)/5$, 各因素和水平的设计如表 1 所示。称取当归饮片 200.00 g 共 15 份, 粉碎过筛 (80 目), 置于 CO_2 超临界萃取罐中, 按照试验方案进行萃取, 萃取所得挥发油称重后计算挥发油得率 ($w/w, \%$), 采用多元二次回归模型对试验结果进行响应分

析, 并采用偏导运算方法求得多元二次回归方程的极值, 得到当归挥发油的最佳萃取工艺。

表 1 中心组合设计的因素与水平

水平	因素		
	萃取温度 X_1 / ℃	萃取时间 X_2 / h	萃取压力 X_3 / MPa
-1	40	1.0	25
0	45	1.5	30
1	50	2.0	35

1.2.3 当归挥发油抑菌活性的检测。

1.2.3.1 培养基的制备。(1) LB 液态培养基。称取 10.0 g 蛋白胨、5.0 g 酵母提取物、10.0 g NaCl, 加入到 950 ml 去离子水中, 加热直至溶质溶解, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 去离子水定容至 1 L, 分装, 于 121 ℃ 下高压灭菌 20 min。(2) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)。取 300.00 g 马铃薯, 去皮后切块, 加入到 1 000 ml 去离子水中, 煮沸 10 ~ 20 min; 趁热用纱布过滤后, 补加去离子水至 1 000 ml, 再加入 20.0 g 葡萄糖和 20.0 g 琼脂粉, 加热直至溶化, 分装后, 在 121 ℃ 高压灭菌 20 min。

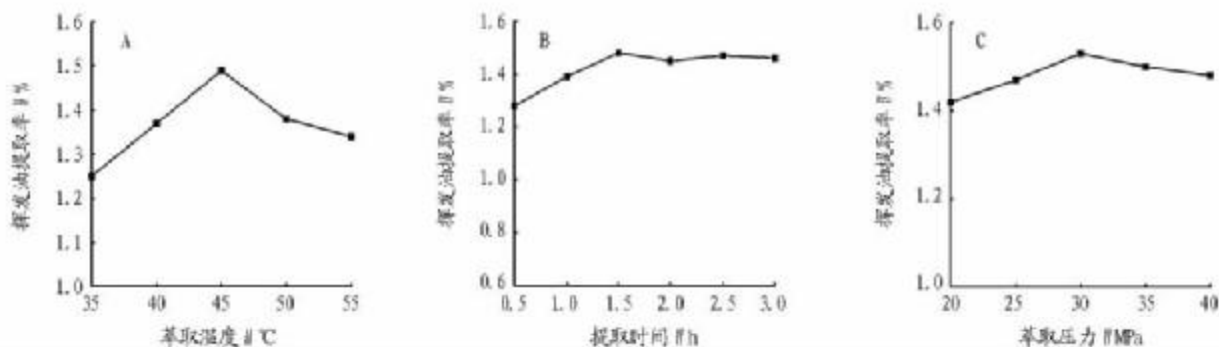


图 1 提取温度 (A)、提取时间 (B) 和提取压力 (C) 对提取率的影响

1.2.3.2 菌种的活化。在无茵条件下, 取甘油冻存的菌株适量, 接种于 LB 液体培养基中, 在 37 ℃ 条件下 200 r/min 转速摇床恒温培养 16 ~ 18 h, 待菌株生长至菌液浓度为 $A_{600} = 0.6$ 左右时, 取适量菌液, 接种在 LB 固体斜面培养基中, 在 37 ℃ 条件下恒温培养。

1.2.3.3 挥发油溶液的制备。用正己烷作为溶剂, 分别将几种挥发油配制成浓度为 20.00 mg/ml 的溶液。

1.2.3.4 抑菌活性的测定。在无茵条件下, 挑取母代菌株, 用 LB 液体培养基于 37 ℃ 恒温培养摇床中进行传代培养, 将对数期的菌液稀释至 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cfu/ml, 制成供试菌液; 通过纸片扩散法对当归挥发油的抑菌活性进行测定, 测量抑菌圈直径, 并初步判断其抑菌能力的强弱^[9-10]。(1) 纸片的制备。将滤纸用打孔机打成直径为 6 mm 的圆片, 在 120 ℃ 条件下干热灭菌 2 h, 即得。(2) 抑菌操作 (琼脂平板)。在琼脂平板上均匀一层涂布受试菌液, 然后将琼脂平板置于 37 ℃ 恒温培养几分钟, 当平板表面干燥后用无茵镊子将滤纸片均匀贴在培养基表面, 标号; 轻轻按压纸片使接触良好, 将平板置于 37 ℃ 倒置培养 24 h 后, 取出观察抑菌圈大小, 测量直

径, 各受试菌种均按此方法操作。抑菌圈 = 试验组抑菌圈直径 - 阴性对照组 (正己烷) 抑菌圈直径。采用革兰氏阴性菌铜绿色假单胞菌 ATCC27853、大肠杆菌 ATCC25922 以及革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌 CMCC63501、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为试验菌株, 分别定义当归挥发油对其产生的抑菌圈直径为 $d_{\text{ATCC25922}}$ 、 $d_{\text{ATCC27853}}$ 、 $d_{\text{ATCC25923}}$ 、 $d_{\text{CMCC63501}}$; 定义当归挥发油的综合抑菌圈直径为: $D = 1/4d_{\text{ATCC25922}} + 1/4d_{\text{ATCC27853}} + 1/4d_{\text{ATCC25923}} + 1/4d_{\text{CMCC63501}}$ 。同时考察了当归药挥发油对产黄青霉 (3.546 88.5)、青色链霉 GIM4.15 (AS4.645)、总状毛霉 (AS3.205) 3 种真菌的抑制作用, 综合抑菌圈直径为 $D = 1/3d_{3.546\ 88.5} + 1/3d_{\text{AS4.645}} + 1/3d_{\text{AS3.205}}$ 。

1.2.3.5 菌株 MIC 测定^[11]。在无茵条件下, 取 6 支试管, 分别加入已灭菌的营养肉汤液体培养基 1 ml, 在第 1 管中加入 1 ml 挥发油, 轻轻振荡混匀, 在第 1 管中吸取 1 ml 加入第 2 管中, 如此稀释至第 5 管, 弃去 1 ml, 第 6 管只加挥发油不加菌液作为空白对照; 在各试管中加入 0.1 ml 稀释后的菌液 (浓度约为 1×10^7 cfu/ml), 摇匀, 使试验菌与抑菌液充分接触。将加入菌液的试管置于 37 ℃ 条件下恒温培养 24 h。观

察试管中菌株生长情况,若试管中液体摇匀后仍澄清,则确认该管无菌株生长。从无菌生长的试管中吸取 0.1 ml 液体,均匀涂布于琼脂平板上,37 °C 下培养 24 h 后观察结果。若琼脂平板上无菌落生长,则认为此时最小稀释度的挥发油浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验优化挥发油提取条件

2.1.1 萃取温度的考察。图 1A 表明,最佳萃取温度为 45 °C,在此条件下,提取率可达 1.49%。

2.1.2 萃取时间的考察。图 1B 表明,最佳萃取时间为 1.5 h,在此条件下,提取率可达 1.48%。

2.1.3 萃取压力的考察。图 1C 表明,最佳萃取压力为 30 MPa,在此条件下,提取率可达 1.53%。

2.2 响应面法优化当归挥发油提取工艺 通过 3 因素 3 水平中心组合设计(BBD)对各提取条件进行优化。以挥发油提取率(Y)为响应值,对多元二次回归方程模型进行分析。中心组合试验设计结果如表 2 所示,采用 SAS Version 9.0 TS 对模型进行分析,得到回归方程为:

$$Y = 2.0233 - 0.0575X_1 - 0.0075X_2 + 0.1575X_3 - 0.0667X_1^2 - 0.055X_1X_2 + 0.08X_1X_3 - 0.1017X_2^2 - 0.02X_2X_3 - 0.1567X_3^2$$

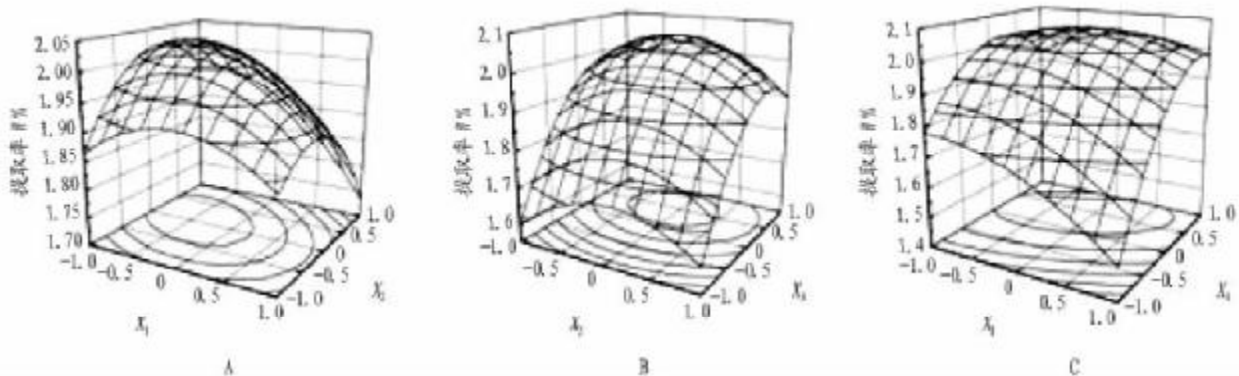
方程中 Y 为响应值,即为挥发油提取率(%), X_1 、 X_2 、 X_3 分别为萃取温度,萃取时间和萃取压力 3 个因素。该模型的 R^2 值为 94.39%, P 值为 0.01206,表明该模型对试验结果有较好的拟合度,各影响因素对响应值的显著作用采用 F 检测方法确定, P 值越小则该因素对响应值的影响越显著。从回归分析结果中可以看出,萃取压力(X_3)对提取率的影响极其显著($P = 0.00128$),萃取温度(X_1)对响应值的影响显著($P = 0.06344$),二次项中, X_3^2 影响极其显著($P = 0.00703$)。交互项中萃取温度(X_1)和萃取压力(X_3)之间

(X_1X_3) 的交互作用,同样对提取率有重要影响($P = 0.06655$),而其他各因素均为次要影响因素,说明各因素与响应值之间存在复杂的相互作用。因此,利用该模型可以确定当归油的最佳提取工艺。

表 2 Box-Behnken 中心组合设计方案及试验结果

试验号	X_1	X_2	X_3	多糖得率 Y //%
1	-1	-1	0	1.88
2	-1	1	0	1.89
3	1	-1	0	1.93
4	1	1	0	1.72
5	0	-1	-1	1.57
6	0	-1	1	1.89
7	0	1	-1	1.68
8	0	1	1	1.92
9	-1	0	-1	1.79
10	1	0	-1	1.46
11	-1	0	1	1.98
12	1	0	1	1.97
13	0	0	0	2.02
14	0	0	0	2.01
15	0	0	0	2.04

图 2 表明,3 个响应曲面均为开口向下的凸形曲面,说明响应值(提取率)存在极高值,3 个图中的等高线中心均位于 $-1 \sim 1$ 之间,说明提取的最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。图 2-C 中等高线呈椭圆形,且坐标轴与椭圆形的轴线之间存在着显著的夹角,表明这两个因素(X_1X_3)之间存在显著的交互作用。计算得到最优提取条件的编码值为: $X_1 = -0.1270$, $X_2 = -0.0491$, $X_3 = 0.4734$,代入变换公式得到 $Z_1 = 44.4$ °C, $Z_2 = 1.48$ h, $Z_3 = 32.37$ MPa,即当归中挥发油的最佳超临界萃取工艺为萃取温度 44.4 °C、萃取时间 1.48 h、萃取压力 32.37 MPa,同时由回归方程得到提取率的预测值为 2.0644%。



A: $Y = f(X_1, X_2)$; B: $Y = f(X_2, X_3)$; C: $Y = f(X_1, X_3)$

图 2 响应面和等高线

2.3 验证试验 为检验模型预测的准确性与可行性,采用最佳提取工艺提取挥发油,进行 3 次平行的验证试验,挥发油的提取率分别为 2.02%、2.08% 和 2.15%,平均提取率为 2.083%,与预测值的相对误差为 0.92%。

2.4 当归挥发油的抑菌效果 由表 4 可知,在供试菌中,当

归挥发油对真菌的抑制效果强于细菌,对 G^+ 菌的抑制效果强于 G^- 菌;尤其对产黄菌及青色链霉菌抑制效果较好,对金黄色葡萄球菌抑制最弱。由表 5 可知,当归挥发油对产黄菌及青色链霉菌的 MIC 最低,为 1.25 mg/ml;其次是铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌, MIC 为 2.50 mg/ml;其余均为 5.00

mg/ml。

表 3 当归挥发油抑菌结果

菌株	抑菌圈直径	
	平均值//mm	综合抑菌圈 D//mm
大肠杆菌	21.6	24.1
铜绿假单胞菌	25.7	
金黄色葡萄球菌	20.5	25.3
枯草芽孢杆菌	28.7	
产黄霉	27.9	
青色链霉	29.2	
总状毛霉	18.8	

表 4 当归挥发油的 MIC

菌株	挥发油浓度//mg/ml					
	20.000	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625
大肠杆菌	-	-	-	+	+	+
铜绿假单胞菌	-	-	-	-	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	+	+	+
枯草芽孢杆菌	-	-	-	-	+	+
产黄霉	-	-	-	-	-	+
青色链霉	-	-	-	-	-	+
总状毛霉	-	-	-	+	+	+

注：“-”表示无菌生长，“+”表示细菌生长。

3 结论与讨论

试验结果表明,当归中挥发油的最佳超临界萃取工艺为:萃取温度 44.4 ℃、萃取时间 1.48 h、萃取压力 32.37 MPa,多元二次回归模型得到提取率的预测值为 2.064 4%,实际测得平均提取率为 2.083 3%,与预测值的相对误差仅为 0.92%。

萃取所得当归挥发油具有广谱、良好的抑菌活性,对供试细菌及真菌均表现出较好的抑制效果,对部分细菌及真菌具有非常强的抑制效果, MIC 值在 1.25 ~ 5.00 mg/ml 范围内。

近些年来,随着抗生素长期使用的现象愈加严重,临床上耐药菌株的数量不断增加^[13],降低了现有抗生素的治疗

效率,致使临床感染死亡率不断提高^[14]。面对这一严峻现状,有着几千年发展历程的中药受到国内外学者的广泛关注,发挥中药的治疗优势将成为重要研究方向。课题组今后将进一步开展中药挥发油抑菌活性成分研究以及抑菌机制研究,以期对进一步将中药挥发油开发成产品应用贡献一份力量。

参考文献

[1] 李菁.超临界萃取当归挥发油的研究[J].中药材,1996,19(4):187-190.
 [2] 赵煜,朱刚,于长青,等.超临界 CO₂ 萃取当归油的工艺及当归多糖的提取[J].中国中医药信息杂志,2004,11(6):512-513.
 [3] 胡长鹰,丁霄霖.当归油在超临界 CO₂ 流体中的溶解度测定及研究[J].中国粮油学报,2004,19(6):83-84.
 [4] 项好,张贵君,甘德全. HPLC 测定 CO₂超临界萃取的当归油药效组分[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(8):64-65.
 [5] MYERS R H. Response Surface Methodology Current Status and Future Directions [J]. Journal of Quality Technology,1999,31(1):30.
 [6] 余小翠,刘高峰.响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用[J].中药材,2010,33(10):1651-1655.
 [7] BEZERRA M A, SANTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry [J]. Talanta, 2008,76:965-976.
 [8] MENG F X, LI Y X, GUO W L, et al. Optimization of Fermentation Medium for Epithilonones Production with Sequential Statistical Approach [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2010,26(1):86-91.
 [9] 胡林峰,许明录,朱红霞.植物精油抑菌活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):384-391.
 [10] 顾仁勇,傅伟昌,李佑等.肉桂精油抑菌及抗氧化作用的研究[J].食品研究与开发,2008,29(10):29-32.
 [11] 郭卫东,郑建树,邓刚,等.佛手挥发油抑菌活性的研究[J].中国粮油学报,2009,24(8):103-106.
 [12] LU S H, LI Y H, CHEN Y, et al. Study on the Chemical Constituents of Volatile Oil from Different Parts of *Embelia parviflora* Wall. ex A. DC by GC-MS [J]. Medicinal Plant, 2012,3(1):58-61.
 [13] 马刚,田雪梅,张振宇,等.樟芝挥发油的提取及其 GC-MS 分析与抑菌作用的研究[J].西南农业学报,2011(3):970-973.
 [14] 郑春生,姚宝书,李梅.当归挥发油提取工艺的研究[J].天津轻工业学院学报,2001(1):32-34.

(上接第 4772 页)

计算出关联度,就可以确定比较数列与参考数列的相似程度,从而判断比较数列(品种)的优劣,事实上,反映品种优劣的各性状指标的重要性是不同的,在评价各品种优劣时还应赋予关联系数不同的权重,权重系数 W_k 。

2.5.5 关联度计算。由表 10 可知,98D51 × 佳禾 9 号加权

表 10 供试品种的关联度及排序

品种	加权关联度	排序
98D51 × 佳禾 9 号	0.782 6	1
20040812	0.776 1	2
JW9 ♀ × 59 ♀	0.775 5	3
20040813	0.762 9	4
20040809	0.745 0	5
FM007 × JW16 ♀	0.741 8	6
里格尔 87-5	0.732 2	7
87-5 × JW14 ♂	0.720 4	8
CTJ-1	0.688 4	9
FM001 × FM007	0.683 5	10
N-9	0.628 2	11

关联度排名第 1,说明该品种最接近理想品种,N-9 加权关联度排名最后,该品种离理想品种的要求较远,对照品种里格尔 87-5 排名第 7。

3 结论

试验结果表明,98D51 × 佳禾 9 号株高适中,加工性状中等,产量较低,综合性状最接近理想品种;20040812 果实性状好,加工性状中等,番茄红素较高,产量高,综合性状好。其他品种产量均低于对照里格尔 87-5,加工品质一般。

对照里格尔 87-5,植株较矮,加工品质较好,产量高,在生产中已大面积推广应用,说明该结果与生产实际相吻合。N-9 植株高,生长势强,产量较高,果实品质及加工性状中等,综合性状最差。

参考文献

[1] 马克.新疆番茄产业发展浅析[J].新疆农垦经济,2005(8):25-28.
 [2] 鄂利锋,王勤礼,王红,等.河西荒漠区加工型番茄品种比较试验[J].西北农业学报,2005(14):169-173.
 [3] 陈友根,王冬良,戴志新.灰色关联分析在加工番茄品种比较试验中的应用[J].安徽农业大学学报,2004(1):107-110.