



食品工业科技

Science and Technology of Food Industry

ISSN 1002-0306, CN 11-1759/TS



《食品工业科技》网络首发论文

题目： 响应面法优化肉苁蓉水提物的制备工艺及其活性研究
作者： 冯朵，常想，蒋勇军，郭豫，赵建，赵江燕，孙巧弟，松伟，崔倩倩，闫文杰
DOI： 10.13386/j.issn1002-0306.2022050033
收稿日期： 2022-05-05
网络首发日期： 2022-10-12
引用格式： 冯朵，常想，蒋勇军，郭豫，赵建，赵江燕，孙巧弟，松伟，崔倩倩，闫文杰. 响应面法优化肉苁蓉水提物的制备工艺及其活性研究[J/OL]. 食品工业科技. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050033>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

响应面法优化肉苁蓉水提物的制备工艺及其活性研究

冯朵¹, 常想¹, 蒋勇军², 郭豫¹, 赵建¹, 赵江燕¹, 孙巧弟¹, 松伟¹,
崔倩倩¹, 闫文杰^{1,*}

1. 北京联合大学生物化学工程学院, 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100023;
2. 内蒙古三口生物科技有限公司, 内蒙古鄂尔多斯 017000

摘要: 为了研究肉苁蓉水提物制备工艺及其营养价值和活性功能研究, 本实验采用水提取法, 考察不同提取条件对肉苁蓉浸膏得率的影响, 并进一步采用响应面法优化工艺, 再测定提取物营养成分及功效成分含量, 讨论其抗氧化功能及对秀丽隐杆线虫寿命和生殖力的影响。结果显示, 当料液比为 1:12, 煎煮时间为 140 min, 煎煮次数为 4 次, 肉苁蓉水提物(Aqueous extract of *Cistanche*, AEC)浸膏得率为(65.83±0.87)%。此外, 检测 AEC 的营养成分和活性成分, 发现其含有大量的营养成分, 例如蛋白质(5.22±0.44) g/100g、脂肪(0.150±0.06) g/100g、氨基酸(0.640±0.05) g/100g 等, 以及松果菊苷(557±4.24) mg/100g、毛蕊花糖苷(169±7.07) mg/100g、总糖(22.1±0.64) g/100g、总黄酮(4.13±0.08) g/100g 等多种功效成分。AEC 还具有良好的 DPPH 清除能力、抑制 OH 自由基能力、总抗氧化能力和还原能力, 且均呈浓度依赖性。最后, AEC 还可以延长秀丽隐杆线虫的寿命, 其中 8 mg/mL AEC 效果最好, 平均寿命可达(10.946±2.40) 天。由此可见, 水提取后的 AEC 具有良好的抗氧化能力, 富含多种营养成分和功效成分, 这提示肉苁蓉具备开发食品抗氧化剂或功能食品的潜力, 为日后肉苁蓉的临床应用研究提供一定的理论依据。

关键词: 荒漠肉苁蓉; 水提法; 响应面分析; 抗氧化活性

Optimization of Aqueous Extraction Preparation Technology of *Cistanche deserticola* by Response Surface Methodology and its Activity Research

FENG Duo¹, CHANG Xiang¹, JIANG Yong-jun², GUO Yu¹, ZHAO Jian¹, ZHAO Jiang-yan¹, SUN Qiao-di¹,
SONG Wei¹, CUI Qian-qian¹, YAN Wen-jie^{1,*}

1. Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Function Food, College of Biochemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China;
2. Inner Mongolia Sankou Biotechnology Co., Ltd., Ordos, Inner Mongolia 017000, China

Abstract: To study the nutritional value and antioxidant activities of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma extract. The

收稿日期: 2022-5-5

基金项目: 北京市属高校分类发展项目; 北京联合大学科研项目(JB202101)

第一作者简介: 冯朵(1997-) (ORCID: 0000-0002-1907-8524), 女, 硕士, 研究方向为食物营养与功能食品。

E-mail: 15525926785@163.com

*通信作者简介: 闫文杰(1979-) (ORCID:0000-0003-3060-9995), 男, 博士, 教授, 研究方向为食物营养与功能食品。E-mail: meyanwenjie@126.com

water extraction method was used in this experiment to research the effects of different extraction conditions on the dry extract rate of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. Then the response surface analysis method was further used to optimize the process. Moreover, the nutritional components and functional components of the extract were determined, and the antioxidant function and effects on the life span and fecundity of *C. elegans* were discussed. The results showed that when the material liquid ratio was 1:12, the decocting time was 140 min, and the decocting times were 4 times, the dry extract yield of the Aqueous Extract of *Cistanche* (AEC) was (65.83±0.87)%. In addition, the nutritional composition and functional components of AEC was detected and found to contain a large amount of nutritional components such as protein (5.22±0.44) g/100g, fat(0.150±0.06) g/100g, amino acids (0.640±0.05) g/100g, etc, and echinacoside (557±4.24) mg/100g, acteoside (169±7.07) mg/100g, total sugar (22.1±0.64) g/100g, total flavonoids (4.13±0.08) g/100g and others. Furthermore, the AEC also showed good DPPH scavenging activity, OH⁻ free radical inhibiting activity, total antioxidant activity, and reducing activity, all of which were concentration dependent. Finally, AEC could prolong the life span of *Caenorhabditis elegans*. Among them, 8 mg/mL AEC had the best effect, and its average life span reaches (10.946±2.40) days. Therefore, AEC has good antioxidant capacity, and was rich in various nutrients and functional components, which indicates that *Cistanche deserticola* Y. C. Ma has the potential to develop functional food antioxidants and provides a theoretical basis for the clinical application of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma in the future.

Key words: *Cistanche deserticola* Y. C. Ma; Water extraction; Response surface analysis; Antioxidant activity

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050033

肉苁蓉 (*Cistanche deserticola* Y. C. Ma), 是一种寄生在沙漠树木梭梭根部的寄生植物, 因其功效和适度的滋补性而被广泛接受, 素有“沙漠人参”之美誉, 具有极高的药用价值, 含有多糖、苯乙醇苷类物质、环烯醚萜类及其苷类以及木质素类及其苷类等多种活性成分, 是中国传统的名贵中药材^[1]。肉苁蓉种类多样, 国内主要分为荒漠肉苁蓉、盐生肉苁蓉、管花肉苁蓉及沙苁蓉四大类^[2]。传统医学认为肉苁蓉具有补肾阳、益精血、润肠通便的作用^[1-3], 现代药理研究证明肉苁蓉及其有效成分具有抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤、抗菌、抗炎、保肝、抗骨质疏松和促进骨形成及增强机体免疫力^[3-7]; 肉苁蓉可以调节中枢神经系统和内分泌功能、改善性功能、提高记忆能力、抗动脉粥样硬化及预防老年痴呆^[8-10]等, 此外, 还具有降压作用及呼吸麻醉作用等药理作用^[2,3,5]。因而肉苁蓉备受人们的关注, 成为医药领域研究的热点之一。

荒漠肉苁蓉 (*Cistanche deserticola* Ma) 是一种分布于沙漠地区的滋补草药, 常用作中药, 自 2020 年 1 月, 国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局正式公布肉苁蓉按照传统既是食品又是中药材的物质(简称食药同源物质)进行生产经营试点工作后, 肉苁蓉作为药食同源物质得到了广泛关注及深入的研究^[11]。这时, 对于肉苁蓉的提取开发便显得尤为重要, 提取方法的多样性会导致肉苁蓉活性成分含量的不同, 例如, 以乙醇提取肉苁蓉时松果菊苷和毛蕊花糖苷得率较高, 而以水为溶剂时得率稍低^[12]。王英姿等^[13]发现超声提取法、絮凝水提法、醇提法三种提取方法会使得松果菊苷、总糖、 β -谷甾醇含量会有所改变。此外, 肖道安^[14]研究证明采用吐温 60 协同超声提取肉苁蓉多糖效果较好。同时, 切片厚度、烘干温度、烘干时间及抑制酶的方式等因素都会导致肉苁蓉有效成分含量的改变^[15]。然而, 肉苁蓉作为药食同源类物质, 急需进一步推广应用开发, 结合现代人的饮食生活习惯, 开拓肉苁蓉食品市场。考虑到水提法作为传统的提取方法之一, 具有节约成本、操作简便、周期短、条件控制方便及引入杂质少等优点, 是大多数人们普遍满足的提取方法之一, 因此本研究选择此法进行肉苁蓉的提取。

本试验利用荒漠肉苁蓉为原料，考察水提取法多种因素对 AEC 的影响，通过响应面分析优化提取工艺，初步确定提取物的主要功效成分含量，检测 AEC 的抗氧化活性，并将 AEC 应用于模式生物秀丽隐杆线虫，探讨其对线虫寿命和生殖力的影响，以期为肉苁蓉开发为抗氧化产品或功能食品提供一定的理论依据，为日后进一步研究肉苁蓉奠定基础。

1 材料及方法

1.1 试验材料、主要试剂及仪器

荒漠肉苁蓉（拉丁学名：*Cistanche deserticola* Y. C. Ma），采集于内蒙古鄂尔多斯，由内蒙古三口科技有限公司提供。

DPPH 试剂盒、总抗氧化能力试剂盒、羟基自由基试剂盒、超氧阴离子试剂盒购自南京建成科技有限公司；氯化铁（III）购自默克 Sigma 生命科学；铁氰化钾（ $K_3Fe(CN)_6$ ）、三氯乙酸购自北京化工厂；氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司；Tris-HCl、Tris-base 购自 Genview；煎煮锅、水浴锅（DFD-700、W201B，北京中兴伟业有限公司）；多功能酶标仪（INFINITE M NANO，TECAN 公司）；紫外分光光度计（UV-1600，上海美普达仪器有限公司）。

1.2 试验方法

1.2.1 AEC 试验工艺流程



图 1 水提物试验工艺流程

Figure 1 Technological process of Aqueous extract text

1.2.1.1 具体工艺说明

取原料新鲜肉苁蓉净制，除去杂质；放入蒸锅中进行增效处理，再放入鼓风干燥箱中进行烘干（烘干温度 $60\sim 70^{\circ}C$ ，烘干至水分含量 $30\%\sim 40\%$ ）；取出肉苁蓉，切厚片，将切片平铺到托盘上放入鼓风干燥箱进行二次烘干（烘干温度 $60\sim 70^{\circ}C$ ，烘干至水分含量 10% 以下）；将烘干好的肉苁蓉片切成小块备用；称量，加入纯化水进行提取；将提取液进行减压浓缩（真空度 -0.08 MPa 以上，温度 $60\sim 70^{\circ}C$ ），浓缩至浸膏状；将浸膏转入真空干燥箱中，进行干燥（真空度 -0.08 MPa 以上，温度 $60\sim 80^{\circ}C$ ）；至水分含量 5% 以下。

1.2.2 单因素试验设计

准确称取切片原料 100 g ，以浸泡 30 min 、水浴温度 $100^{\circ}C$ 、料液比 $1:10$ 、煎煮时间 1 h 、煎煮次数 2 次为基础固定值，研究不同料液比（ $1:8$ 、 $1:10$ 、 $1:12$ 、 $1:14$ 、 $1:16$ ）、不同煎煮时间（ 0.5 、 1 、 1.5 、 2 、 2.5 h ）和不同煎煮次数（ 1 、 2 、 3 、 4 、 5 次）对肉苁蓉干浸膏得率的影响。

1.2.3 响应面优化

1.2.3.1 响应面试验 Box-Behnken 设计

本试验根据单因素试验设计，得出较优因素范围，并通过响应面试验分析进一步优化，得到各因素最佳参数^[16]，如下表：

表 1 响应面试验因素水平编码表

Table 1. Coding table of response surface test factor level

序号	单因素/单位	-1	0	1
A	料液比 (g : mL)	1:10	1:12	1:14
B	煎煮时间/h	1.5	2	2.5
C	煎煮次数/次	3	4	5

1.2.3.2 评价指标

以干浸膏得率为考察指标，按下列公式 (1) 计算干浸膏得率，得出结果。

$$\text{干浸膏得率 (\%)} = \frac{m_1}{v_1} \times \frac{V_0}{M_0} \quad (1)$$

式中 m_1 为样品溶液测得固形物质量 (g)， v_1 为样品溶液称取体积 (mL)， V_0 为提取液总体积 (mL)， M_0 为实验中原料总质量 (g)。

1.2.4 AEC 成分指标含量测定

1.2.4.1 基本营养成分含量检测

蛋白质、氨基酸、脂肪、水分、灰分、钠等含量测定参照《食品安全国家标准》(GB/T 5009-2016) 中“食品中蛋白质的测定”、“食品中氨基酸的测定”、“食品中脂肪的测定”、“食品中水分的测定”、“食品中灰分的测定”、“食品中钾、钠的测定”。碳水化合物、能量参照《食品安全国家标准》(GB28050-2011) 问答(修订版) 进行计算。

1.2.4.2 活性成分含量检测

松果菊苷、毛蕊花糖苷根据《中华人民共和国药典》规定方法检测。总糖参照《食品安全国家标准》(GB/T 10782-2006)。总黄酮参照食品理化 2020 版 (第二法)。根据杨国宁等^[17]方法检测京尼平苷酸、8-表番木鳖酸、肉苁蓉苷 A、管花苷 A、异类叶升麻苷、2-乙酰基洋丁香酚苷、管花苷 B。粗多糖的测定“粗多糖的苯酚-硫酸分光光度测定法”进行检测^[18]。尿囊素含量检测根据陈天朝等^[19]方法进行检测。

1.2.5 AEC 体外抗氧化性的测定

1.2.5.1 总抗氧化能力测定

使用蒸馏水将 AEC 和 V_C 配制成终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL，参照试剂盒说明书进行操作，按照以下公式 (2) 进行计算：

$$\text{总抗氧化能力 (U/mL)} = \frac{OD_2 - OD_1}{0.01} \div 30 \times \frac{V_0}{V_1} \quad (2)$$

式中 OD_1 为对照值， OD_2 为测定值， V_0 为反应液总量 (mL)， V_1 为取样量 (mL)。

1.2.5.2 DPPH 自由基的清除能力测定

使用蒸馏水将 AEC 和 V_C 配制成终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL，参照试剂盒说明书进行操作，按照以下公式 (3) 进行计算：

$$\text{清除率 (\%)} = \left(1 - \frac{OD_2 - OD_1}{OD_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中 OD_0 为空白值， OD_1 为对照值， OD_2 为测定值。

1.2.5.3 羟自由基清除能力的测定

使用蒸馏水将 AEC 和 V_c 配制成终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL，参照试剂盒说明书进行操作，按下列公式（4）计算待测样本抑制羟自由基的能力：

$$\text{抑制羟自由基能力 (U/mL)} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD - OD_0} \times 8.824 \times \frac{1}{V_1} \quad (4)$$

式中 OD_0 为空白值， OD_1 为对照值， OD_2 为测定值， OD 为标准值， V_1 为取样量 (mL)，标准品浓度为 8.824mmol/L。

1.2.5.4 还原力测定

制备以下溶液：1% $K_3Fe(CN)_6$ 、0.1% $FeCl_3$ (新鲜)、10%三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA) 和磷酸盐缓冲液 (pH 6.6)。

使用蒸馏水溶解配制 AEC 和 V_c 终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL，参照^[20]方法检测，在 700 nm 处测量吸光度 (A)。较高的吸光度值表明较高的三价铁还原能力，按下列公式（5）计算液体还原能力：

$$\text{还原力} = A_1 - A_0 \quad (5)$$

式中 A_0 为蒸馏水所测吸光度值， A_1 为待测样本所测吸光度值。

1.2.6 AEC 对秀丽隐杆线虫寿命和生殖能力的影响

1.2.6.1 线虫培养

在 6cm 培养皿的线虫生长培养基 (Nematode Growth Medium, NGM) 上均匀分布涂抹大肠杆菌 OP50 (*E.coli* OP50) 200 μ L，20 $^{\circ}$ C 培养秀丽隐杆线虫，根据线虫生长状况定期转移至新的 NGM 培养基中。于 65 $^{\circ}$ C 水浴灭菌，并将 AEC 溶于大肠杆菌 OP50 中至终浓度为 0、4、8、16 mg/mL，冷藏备用。

1.2.6.2 寿命试验

根据 Chen 等^[21]实验方法稍作修改，将同期化至 L4 期的野生型 N2 线虫，随机挑取 30 条至 0、4、8、16 mg/mL AEC 加药组与空白对照组，每组 3 个平行，记为第 0 天，20 $^{\circ}$ C 下培养，每天同一时间将线虫转移至新的同浓度培养皿内，并记录线虫的生存情况。以铂金丝碰触线虫 10s 内不动判定为死亡，并依据线虫生存条数绘制生存曲线。

1.2.6.3 生殖力测定

将同期化的 L4 期野生型 N2 线虫，随机挑取 10 条至加药组与空白对照组，每组 3 个培养皿，此时记为第 0 天，每隔 24 h 将线虫转移至新的同浓度培养皿中，记录当天虫卵数目 (产卵量)，培养到第 8 天，将线虫每天所产虫卵数目相加，即为总产卵量。卵较小不易辨别，可以将板上的卵孵化至 L4 期放于 65 $^{\circ}$ C 烘箱中烘 30 min，使板上线虫死亡后在显微镜下统计幼虫数量，未孵化出幼虫的卵不计入内。

1.2.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据 ANOVA 单因素显著性分析，以 $\bar{X} \pm SD$ 表示；Graphpad prism 8.0.2 进行绘图； $P < 0.05$ 表示组间存在显著性差异， $P < 0.01$ 表示存在极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对 AEC 浸膏得率的影响

在不改变水提物加工流程及常量的前提下,料液比 1:8、1:10、1:12、1:14、1:16 对 AEC 提取率的影响如下图:

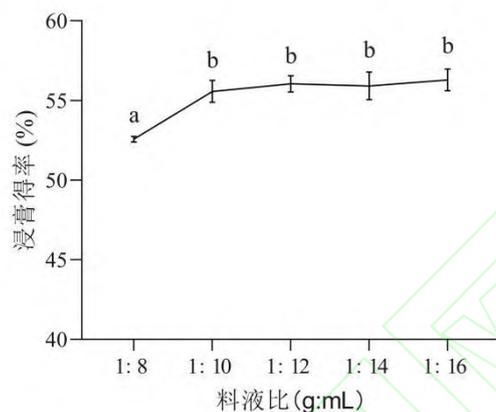


图 2 不同料液比对 AEC 浸膏得率的影响

Figure 2 Effect of different material to liquid ratios on the yield of AEC

注:不同字母代表差异显著($P<0.05$)

由图 2 观察发现,控制其他因素一致,只改变料液比,比较得出,1:8 时浸膏得率最低,为(52.58±0.17)%,与其他处理组存在极显著差异($P<0.01$);1:10、1:12、1:14、1:16 分别为(55.58±0.69)%、(56.05±0.51)%、(55.92±0.87)%、(56.3±0.68)%,变化范围在 0~0.72 之间,且不存在显著性差异($P>0.05$),因此本着节约成本的原则,试验采用 1:10、1:12、1:14 进行响应拟合探究最佳取值。

2.1.2 煎煮时间对 AEC 浸膏得率的影响

在不改变水提物加工流程及常量的前提下,改变煎煮时间 0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h,对于浸膏得率的影响如下图:

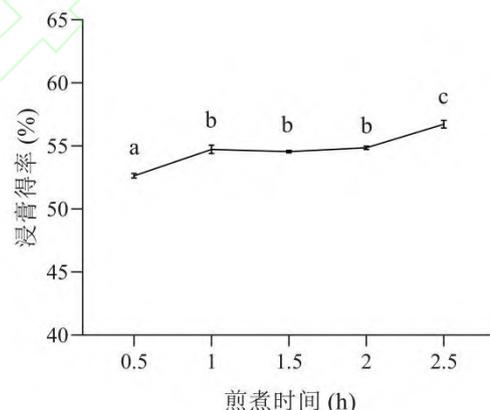


图 3 不同煎煮时间对 AEC 浸膏得率的影响

Figure 3 Effect of different decocting time on the yield of AEC

注:不同字母代表差异显著($P<0.05$)

由图 3 观察得出,煎煮时间越长,浸膏得率越高,0.5h、1h、1.5h、2h、2.5h 的浸膏得

率分别为(52.64±0.18)%、(54.73±0.33)%、(54.56±0.09)%、(54.85±0.13)%、(56.73±0.30)%，在 1~2h 之间，浸膏得率变化幅度不大，2.5h 浸膏得率再次升高的原因可能是由于煎煮时间过长，不溶性物质过滤至溶液中使得固形物质量上升，同时液体过量挥发，造成得率升高，而煎煮时间的升高又会造成水提取物一些化合物含量挥发转化，使其含量降低^[12,15]，因此选择 1.5、2、2.5 h 三个水平进行响应拟合探究最佳取值。

2.1.3 煎煮次数对 AEC 浸膏得率的影响

在不改变水提取物加工流程及常量的前提下，检测煎煮次数为 1、2、3、4、5 次，对于浸膏得率的影响如下图：

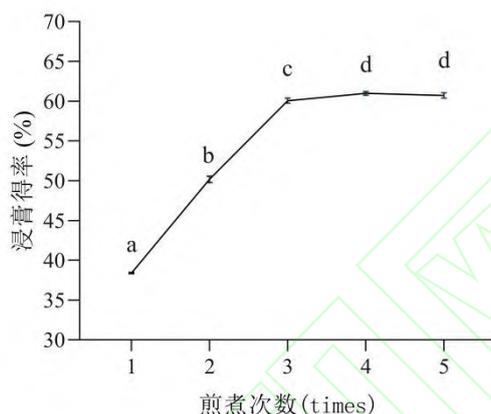


图 4 不同煎煮次数对 AEC 浸膏得率的影响

Figure 4 Effect of different times of decocting on the yield of AEC

注：不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

由图 4 中观察发现，煎煮次数为 1~3 次时，浸膏得率呈线性增长关系，分别为(38.39±0.065)%、(50.17±0.398)%、(60.07±0.31)%，增长速率快速，且两者之间均存在显著性差异($P < 0.05$)；当煎煮次数为 4 次和 5 次时，其得率分别为(60.98±0.22)%、(60.72±0.33)%，增长速度平缓，由图 4 可知，当煎煮次数为 4 次时，浸膏得率最高。因此，选择煎煮次数为 3、4、5 三个水平进行响应拟合探究最佳取值。

2.2 响应面设计

本试验采用 Box-Behnken 设计，进行分析探讨，研究料液比、煎煮时间和煎煮次数及两两因素之间的交互作用对于浸膏得率的影响，通过单因素试验设计得出各因素对于因变量较优的范围，再利用响应面设计得出最佳因素水平，最终得到浸膏得率试验设计的最优参数水平。所以设计响应面设计如下表：

表 2 响应面设计与浸膏得率结果

Table 2. Response surface test design and results

试验号	料液比 (g : mL)	煎煮时间 (h)	煎煮次数 (次)	浸膏得率 (%)
1	-1	0	1	63.1
2	0	0	0	60.09
3	0	-1	1	64.96
4	1	-1	0	58.66
5	0	0	0	61.3
6	0	0	0	58.9
7	0	1	-1	52.02
8	0	-1	-1	39.66

性，浸膏得率的预测值与实际值之间拟合相关性较高。综上所述，以干浸膏得率为响应值所建立的肉苁蓉水提取工艺优化模型是合理的，可利用该模型预测分析不同变量水平对 AEC 干浸膏得率的影响^[23-24]。

2.2.2 响应面优化曲面分析

通过响应面软件，计算得出三个自变量（料液比、煎煮时间、煎煮次数）与因变量（浸膏得率）之间的关系，并绘制等高线图和响应面图（等高线图可反映任意两因素之间的相互作用是否显著，显著为椭圆，反之是圆形），直观地反映各因素之间的交互作用及对因变量的影响^[25-26]。

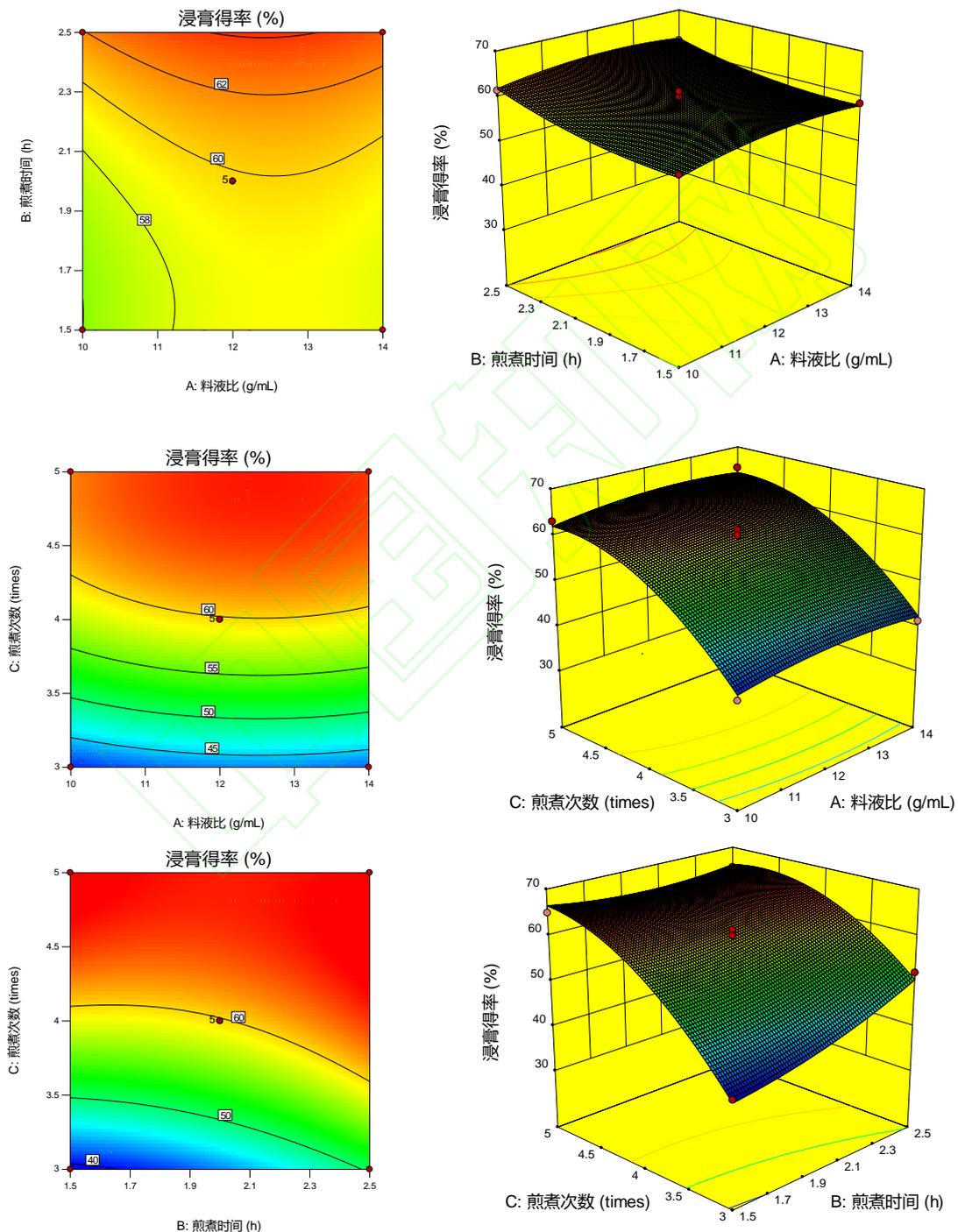


图 5 料液比、煎煮时间和煎煮次数对 AEC 浸膏得率的等高线图和响应面图

Figure 5 Contour map and response surface map

将建立的回归模型中任一因素固定在 0 水平，得到另外两个因素之间交互作用结果，二次多项回归方程的等高线图和响应面中见图 5，由图 5 可知，在一定范围内，煎煮次数对浸膏得率的影响最大，其次是煎煮时间，最后是料液比。当料液比为 1:12 时，煎煮时间在 1.9~2.1h 范围内，浸膏得率达到最大值，而从等高线图中发现两因素交互作用不显著；当料液比在 1:12~1:14 范围，煎煮次数达 5 次时，浸膏得率取得最大值，同时料液比与煎煮次数等高线图呈圆形，说明两因素交互作用不显著；当煎煮时间在 1.9~2.1 h 内，煎煮次数为 4 次时，浸膏得率最高，结合表 3 可知，两因素之间存在显著性交互作用。

2.2.3 验证试验

通过响应面设计得出各因素最优参数为：A（料液比）为 1:12.4，B（煎煮时间）为 2.39h，C（煎煮次数）为 4.46 次，在此条件下，浸膏预测得率为 65.9253%。为了方便操作，简化估值料液比参数为 1:12，煎煮时间 140 min，煎煮次数 4 次，进行 3 次验证试验，测定浸膏得率为(65.83±0.87)%，与预测值相差不多，这就表明该试验可以采用响应面法优化肉苁蓉水提法，以此提高 AEC 的提取率。

2.3 AEC 成分指标含量测定

2.3.1 营养成分检测

表 4 AEC 主要营养成分检测结果

Table 4. Detection of main nutrients in AEC

检测内容	含量
蛋白质(g/100g)	5.22±0.44
氨基酸(g/100g)	0.64±0.05
脂肪(g/100g)	0.15±0.06
灰分(g/100g)	2.70±0.00
钠(mg/100g)	225±3.54
碳水化合物(g/100g)	33.60±1.63
能量(kJ/100g)	665.50±18.17

本次试验测定了 AEC 基本营养成分，由此可知，肉苁蓉富含丰富的营养成分，包括蛋白质(5.22±0.44) g/100g、碳水化合物(33.6±1.63) g/100g、钠(225±3.54) mg/100g，少量的氨基酸(0.64±0.05) g/100g 和脂肪(0.15±0.06) g/100g，可提供大量能量，具有很高的营养价值。

2.3.2 活性成分检测

表 5 AEC 主要活性成分检测

Table 5. Detection of main active components in AEC

检测内容	含量
松果菊苷(mg/100g)	557±4.24
毛蕊花糖苷(mg/100g)	169±7.07
粗多糖(g/100g)	1.86±0.03
京尼平苷酸 (mg/100g)	13.40±0.64
8-表番木鳖酸(mg/100g)	131±3.54
肉苁蓉苷 A(mg/100g)	126±0.00
管花苷 A(mg/100g)	20.40±0.21
异类叶升麻苷(mg/100g)	194±0.71
2-乙酰基洋丁香氛苷(mg/100g)	234±11.31

管花苷 B(mg/100g)	487±9.90
总糖(g/100g)	22.10±0.64
总黄酮(g/100g)	4.13±0.08
尿囊素(mg/100g)	293±4.95

本次实验测定了 AEC 主要成分的含量, 由表 5 可知, AEC 含有丰富的活性成分, 主要包括松果菊苷、毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 A、管花苷 A 等多种苯乙醇苷类物质, 以及总黄酮、粗多糖、总糖等活性成分, 而不同的活性成分具有不同的功效, 例如, 肉苁蓉多糖具有抗氧化的作用, 苯乙醇苷类物质具有缓解阿尔兹海默症的功效, 以及抗癌作用^[27]等。由此可知, 丰富的功效成分使得肉苁蓉具有极高的药用价值和经济价值。目前我国已开发出抗疲劳、抗氧化、辅助改善记忆力和调节免疫力等功能声称的肉苁蓉保健产品, 产品的开发与产业需求形成良好的正向循环, 提高了肉苁蓉的应用价值^[28]。

2.4 AEC 体外抗氧化性的测定

2.4.1 不同浓度 AEC 总抗氧化能力测定

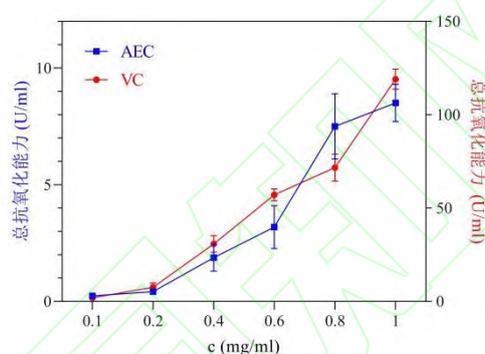


图 6 不同浓度 AEC 总抗氧化能力

Figure 6 Total antioxidant capacity of AEC at different concentrations

总抗氧化能力是待测样本中所有抗氧化剂的抗氧化总和, 可以直观的反映待测样本整体抗氧化能力。通过图 6, 我们发现 AEC 浓度与总抗氧化能力呈正向增长, 与 VC 对照组增长趋势一致。不同浓度 AEC 的总抗氧化能力分别为(0.23±0.04)、(0.42±0.03)、(1.87±0.58)、(3.18±0.92)、(7.50±1.40)、(8.51±0.80) U/mL, 其中, 在 0.6~0.8 mg/mL 范围内呈现快速增长状态, 其中, AEC 的 IC₅₀ 值为 0.6823 mg/mL。

2.4.2 不同浓度 AEC 清除 DPPH 自由基的能力

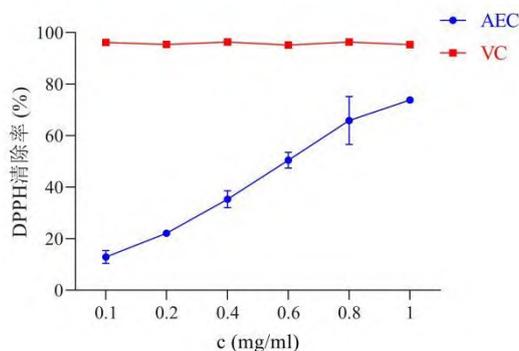


图 7 不同浓度 AEC 清除 DPPH 自由基的能力

Figure 7 The ability of different concentrations of AEC to scavenge DPPH radicals

该试验测定了不同浓度 AEC 清除 DPPH 自由基的能力, 以 V_C 做对照, 由图 7 可知, 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL AEC 的 DPPH 自由基清除能力分别为(12.9±2.56)%、(22.13±1.16)%、(35.38±3.3)%、(50.51±3.04)%、(65.87±9.32)%、(73.87±0.84)%, 随 AEC 浓度的升高呈线性增长关系, 且 DPPH 自由基清除能力 IC₅₀ 值为 0.5371 mg/mL, 说明 AEC 具有良好的 DPPH 自由基清除效果。

2.4.3 不同浓度 AEC 中羟自由基的测定

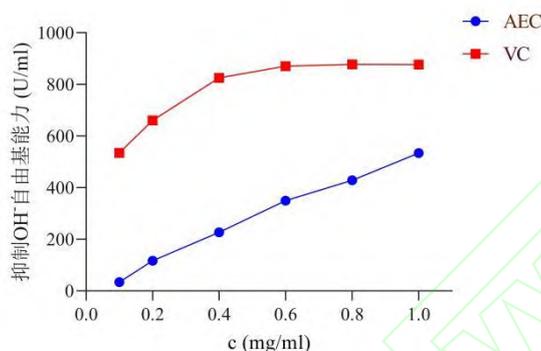


图 8 不同浓度 AEC 抑制羟基自由基能力

Figure 8 Inhibition of hydroxyl radical ability by AEC at different concentrations

羟基自由基是一种重要的活性氧, 容易得到电子, 具有极强的氧化能力。所以抑制羟基自由基成为物质体外抗氧化能力中的重点之一, 由图 8 观察得到, AEC 和 V_C 都具有抑制羟基自由基的能力, 当 V_C 高于 0.4 mg/mL 后, 抑制能力趋于稳定; 而随着 AEC 浓度的逐渐升高, 抑制能力呈线性增长, 分别为 (34.06±5.26)、(116.70±9.28)、(226.66±24.37)、(349.76±42.44)、(428.28±61.35)、(534.01±39.37) U/mL。

2.4.4 不同浓度 AEC 还原力测定

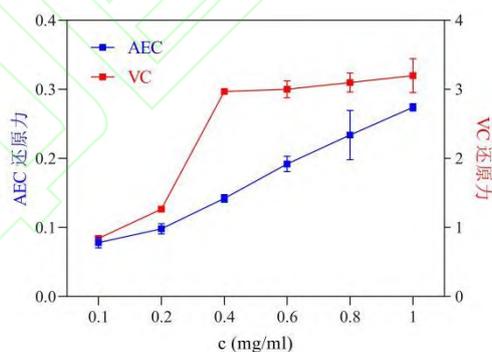


图 9 不同浓度 AEC 的还原能力

Figure 9 Reduction capacity of AEC with different concentrations

还原能力指在化学反应中原子、分子或离子失去电子的能力。物质还原能力越强, 抗氧化性就越强。由图 9 可知, 吸光度值越大, 样本的还原能力就越强, AEC 与 V_C 的还原力均具有浓度依赖性, 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mg/mL 的 AEC 还原力分别为 0.078±0.0078、0.098±0.0075、0.142±0.0057、0.192±0.0112、0.234±0.0357、0.274±0.0052; 还原能力检测显示 AEC 的 EC₅₀ 值为 1.295 mg/mL。

综上, AEC 具有一定的总抗氧化能力和还原力, 但远低于 V_C; AEC 对 DPPH 自由基和羟基自由基具有良好的清除能力, 清除能力略低于 V_C, 这可能是因为肉苁蓉中的苯乙醇苷

类化合物中的酚羟基，可提供 H⁺ 发生氧化还原反应，从而达到清除自由基的目的^[29-32]。

2.5 AEC 对线虫寿命和生殖能力的影响

2.5.1 AEC 对线虫寿命的影响

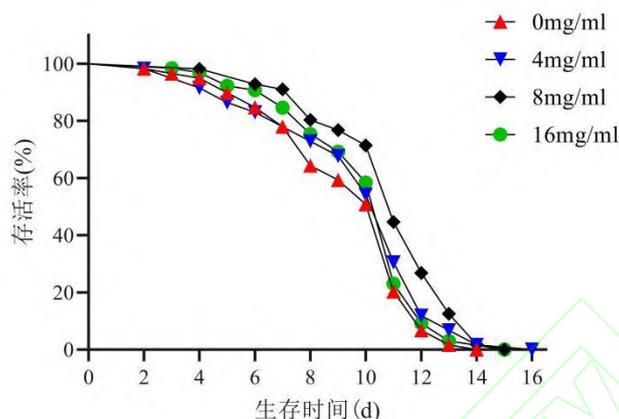


图 10 不同浓度 AEC 对线虫寿命的影响

Figure 10 Effects of different concentrations of AEC on *C. elegans* lifespan

表 6 不同浓度 AEC 对线虫平均寿命的影响

Table 6 Effects of different concentrations of AEC on *C. elegans* average lifespan

组别	平均寿命 (d)
对照组	9.46±2.69
4 mg/mL	9.88±2.97
8 mg/mL	10.95±2.40**
16 mg/mL	10.05±2.45

注：**表示与对照组存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

秀丽隐杆线虫寿命长短是衰老过程研究中的一个主要的评价指标。因此，也是抗衰老药物研究中必不可少的一环。经 Kaplan-Meier 生存分析得出 (图 10 和表 6)，对照组 (AEC 为 0 mg/mL) 线虫的平均寿命为 9.458，AEC 为 4、8、16 mg/mL 时，线虫平均寿命分别为 9.881、10.946、10.046 d，通过测定线虫寿命试验发现不同浓度的 AEC 均可延长线虫的寿命。另外，与对照组相比，当 AEC 浓度为 8 mg/mL 时，秀丽隐杆线虫平均寿命具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.5.2 AEC 对线虫生殖力的影响

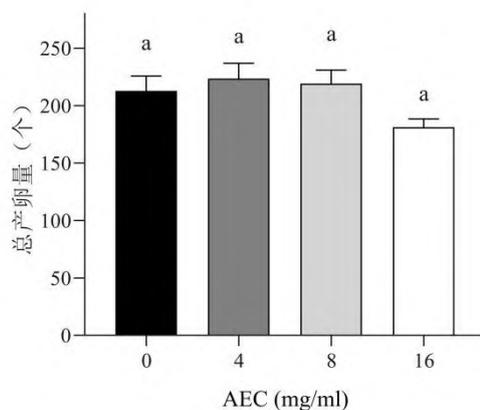


图 11 不同浓度 AEC 对线虫生殖力的影响

Figure 11 Effects of different concentrations of AEC on *C. elegans* reproductive capacity

注：不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。

线虫的生殖能力(产卵量)等指标也常作为药物抗氧化、抗衰老效果评价的参照。本次试验采用 0、4、8、16 mg/mL AEC 喂养线虫, 饲养期间总产卵量分别为(212.85±13.06)、(223.61±13.30)、(219.24±11.81)、(181.17±7.37)个, 结果显示 4、8 mg/mL 较对照组略有提高, 但是 16 mg/mL 的 AEC 反而降低了产卵量, 推测可能是药物浓度过高, 使 OP50 吸光度过高, 大肠杆菌浓度过低, 线虫食用不良, 从而影响线虫的生长状态^[33]。然而, 在实践过程中, 经常通过多个指标对药物的效果进行综合评价^[34]。所以后续还需通过多种指标检测进一步研究 AEC 延缓线虫衰老效应和作用机制, 以期为肉苁蓉的深度开发提供理论依据。

3 结论

本研究以肉苁蓉为原料, 开发制备肉苁蓉提取物, 采用响应面法优化提取工艺, 并对提取物进行抗氧化活性研究, 同时应用于简单模式生物线虫。结果显示, 通过单因素和响应面试验发现, 料液比为 1:12, 煎煮时间 140 min, 煎煮次数 4 次, 由此制得的肉苁蓉干浸膏得率可达(65.83±0.87)%。提取物具有一定的清除 DPPH 自由基和羟基自由基的能力, 和抗氧化活性, 且呈浓度梯度性, 同时发现提取物可以延长线虫寿命, 研究发现当 AEC 为 8 mg/mL 时, 线虫平均寿命较对照组延长 15.75%。由此推测, 肉苁蓉可以调节机体抗氧化功能的平衡, 拮抗自由基损伤起到抗氧化的作用, 从而起到延缓衰老的目的, 而抗氧化功能作为保健品企业的主要研发方向之一, 提示肉苁蓉可以作为原料开发研制抗氧化、延缓衰老产品, 进一步发展其药用价值和经济价值, 为“健康中国”行动添砖加瓦, 贡献一份力量。

参考文献

- [1] 毕萃萃,刘银路,魏芬芬,等.肉苁蓉的主要化学成分及生物活性研究进展[J].药物评价研究,2019,42(9):1896-1900.
BI C C, LIU Y L, WEI F F, et al. Research progress on main chemical constituents and biological activities of *Cistanche deserticola* [J]. Drug Evaluation Res, 2019, 42(9): 1896-1900.
- [2] 刘雄,李成明,高建德,等.肉苁蓉的研究进展[J].中国中医药科技,2013,20(5):575-577.
LIU X, LI C M, GAO J D, et al. Research progress of *Cistanche herba*[J]Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology,2013,20(5):575-577.
- [3] 方鉴.肉苁蓉的药理研究进展[J].光明中医,2017,32(14):2140-2142.
FANG J. Pharmacological research progress of *Cistanches herba* [J]. Guangming J Chin Med, 2017, 32(14): 2140-2142.
- [4] SHEN C Y, JIANG J G, YANG L, et al. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery[J]. British journal of pharmacology, 2017,174(11): 1395-1425.
- [5] 陈诗雅,覃威,杨莎莎,等.肉苁蓉的临床应用及其疗效机制研究进展[J].海峡药学, 2017, 29(5): 1-4.
CHEN S Y, QIN W, YANG S S, et al. Research progress of clinical application and therapeutic mechanism of *herba Cistanche* [J]. Strait Pharm J, 2017, 29(5): 1-4.
- [6] 高宇宏,柯尊记.肉苁蓉治疗阿尔茨海默病药理作用研究进展[J].上海中医药杂志, 2018, 52(1): 109-112.
GAO Y H, KE Z J. Research progress on pharmacological effects of Roucongrong (*Cistanches Herba*) in the treatment of Alzheimer's Disease[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 52(1): 109-112.
- [7] LIN Z J, WEN J N, ZHU T J, et al. *Chrysogenamide A* from an Endophytic Fungus associated with *Cistanche deserticola* and its neuroprotective effect on SH-SY5Y Cells[J]. Journal of antibiotics, 2008, 61(2): 81-85
- [8] 邢海燕,赵璐璐,王胜男,等.肉苁蓉多糖对衰老过程中学习记忆影响的体内外作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(6):453.
XING H Y, ZHAO L L, WANG S N, et al., Effects of *Cistanche deserticola* polysaccharide on learning and memory during aging in

- vitro and in vivo [J]. *Chin J Pharm Toxicol*, 2019, 33(6):453.
- [9] 张青,李亚珍,孙志惠,等.肉苁蓉中活性物质体外抗氧化活性研究进展[J].农产品加工, 2018 (21): 60-62.
ZHANG Q, LI Y Z, SUN Z H, et al. Research progress of antioxidant function evaluation in vitro of bioactive substances in *Cistanche* [J]. *Farm Prod Process*, 2018, (21): 60–62.
- [10] CAI R L, YANG M H, SHI Y, et al. Antifatigue activity of phenylethanoid-rich extract from *Cistanche deserticola*[J]. *Phytotherapy research*, 2010, 24(2):313-315.
- [11] 冯朵,何悦,蒋勇军,等.肉苁蓉抗衰老功能的研究进展[J].食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4429-4437.
FENG D, HE Y, JIANG Y J, et al. Research progress on anti-aging function of *Cistanches* [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(22): 4429-4437.
- [12] 庞金虎. 采后处理及提取方法对肉苁蓉主要有效成分的影响[D].内蒙古农业大学,2013.
PANG J H. The effect of postharvest treatment and extraction on main effective components of *Cistanche deserticola* Y.C.Ma[D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2013.
- [13] 王英姿,张超,贺葵邦.肉苁蓉提取工艺的优选方法研究[J].中医学报,2012,27(2):191-193.
WANG Y Z, ZHANG C, HE K B. Methods research optimization of the extraction technology of *Cistanche Deserticola*[J]. *Acta Chinese Medicine*,2012,27(2):191-193.
- [14] 肖道安.肉苁蓉多糖的提取工艺优化[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(4):926-929.
XIAO D A. Optimization on extraction technology of desertliving *Cistanche* Polysaccharides[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2014,16(4):926-929.
- [15] 李彪. 肉苁蓉有效成分含量的研究[D].内蒙古农业大学,2012.
LI B. The study on effective component content in *Cistanche*[D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2012.
- [16] 张轩,沈雪梅,刘琨毅,等.基于响应面法优化水提紫娟茶花青素工艺[J].甘肃农业大学学报, 2021, 56(1): 175-181.
DOI:10.13432/j.cnki.jgsau.2021.01.023.
ZHANG Q, SHEN X M, LIU K Y, et al. Response surface method based optimization of anthocyanins extraction process from Zijuan tea[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2021, 56(1): 175-181. DOI:10.13432/j.cnki.jgsau.2021.01.023.
- [17] 杨国宁,毕天琛,全桂平,等. HPLC 法同时测定肉苁蓉饮片中 8 种成分的含量[J].中国药师, 2020, 23(7): 1442-1445.
YANG G N, BI T C, TONG G P, et al. Simultaneous determination of 8 components in *Cistanches Herba* decoction pieces by HPLC[J].*China Pharmacist*, 2020, 23(7): 1442-1445.
- [18] 白鸿, 保健食品功效成分的检测方法[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011.
BAI H, Method for detecting functional components of health food[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [19] 陈天朝,李沁,姚超,等. 山药不同炮制品丸剂物性参数及成分含量间相关性研究[J].中医研究,2020,33(7):57-60.
CHEN T C, LI Q, YAO C, et al. Correlative study of physical properties and compositions of different processed *Chinese Yam Pills*[J].*Traditional Chinese Medicinal Research*,2020,33(7):57-60.
- [20] Omega S O, Orhue N E J, Omega K. Evaluation of the phytochemical content, in vitro antioxidant capacity, biochemical and histological effects of *Dennettia tripetala* fruits in healthy rats[J]. *Food science & nutrition*, 2019, 7(1): 65-75.
- [21] 刘磊,关枫,张晓燕,等. Box-Behnken 响应面法优化五味子花色苷提取工艺研究[J].辽宁中医药大学学报, 2019, 21(1): 66-69.
DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.01.017.
LIU L, GUAN F, ZHANG X Y, et al. Optimization of extraction technique of anthocyanins from *Schisandra Chinensis* Baill. by Box-behnken Design[J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 21(1): 66-69. DOI:10.13194/j.issn.1673-842x.2019.01.017.
- [22] 李林,范文翔,王利,等.基于 Box-Behnken 响应面法优化半夏蒸制工艺[J].中药材, 2018, 41(10): 2329-2334.
DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2018.10.015.
LI L, FAN W X, WANG L, et al. Optimization of steaming process for *Pinellia ternata* by Box-Behnken response surface methodology[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 2018, 41(10): 2329-2334. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2018.10.015.
- [23] 程海涛,申献双.响应面法优化机械砂磨辅助提取婆枣中原花青素工艺[J].食品工业科技, 2019, 40(11): 218-222+228.

- DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.036.
- CHENG H T, SHEN X S. Optimization of mechanical grinding assisted extraction of proanthocyanidins from Shenzhou Jujube by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(11): 218-222+228. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.036.
- [24] CHEN W, LIN H R, WEI C M, et al. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A beta-induced toxicity[J]. Biogerontology, 2018, 19(1): 47-65.
- [25] Mason R L, Gunst R F, Hess J L. Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science[M]. John Wiley & Sons, 2003.
- [26] 郭莹,周颖,毕海丹,等.响应面优化超声波-微波协同提取凤眼莲黄酮工艺及其不同部位黄酮抗氧化活性分析[J].食品工业科技, 2019, 40(1): 168-174+180. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.031.
- GUO Y, ZHOU Y, BI H D, et al. Optimization of Ultrasonic-microwave synergistic extraction of flavonoids from *Eichhorniacrassipes* by response surface methodology and analysis of antioxidant activity of flavonoids from Its different parts[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 168-174+180. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.01.031.
- [27] YE Y, SONG Y, ZHUANG J, et al. Anticancer effects of *echinacoside* in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG2 cells[J]. J Cell Physiol. 2019, 234(2): 1880-1888. doi:10.1002/jcp.27063.
- [28] 冯朵,段昊,吕燕妮,等.肉苁蓉在我国保健食品中的应用[J].食品科技, 2021, 46(12): 76-81. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.12.012.
- FENG D, DUAN H, LYU Y N, et al. Application of *Cistanche Deserticola Ma* in functional food in China[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(12): 76-81. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.12.012.
- [29] 何梦梦,游林,包晓玮,等.肉苁蓉水提物体外抗氧化及对小鼠肠道菌群紊乱的作用[J].食品研究与开发,2020,41(23):44-50.
- HE M M, YOU L, BAO X W, et al. Antioxidation of *Cistanche deserticola* water extract in vitro and its effect on intestinal flora disorder in mice [J]. Food Research and Development, 2020, 41(23): 44-50.
- [30] 肖星辉,张向前,李桂芳,等.双水相萃取荒漠肉苁蓉总黄酮及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2017,38(16):5-9.
- XIAO X H, ZHANG X Q, LI G F, et al. Aqueous Two-phase extraction of total flavonoids from *Cistanche deserticola Y.C.Ma* and the antioxidant activity of the extracts[J]. Food Research and Development, 2017, 38(16): 5-9.
- [31] 王国卫,赵芳.新疆肉苁蓉多糖清除活性氧自由基[J].光谱实验室, 2011, 28(3): 1545-1548.
- WANG G W, ZHAO F. Elimination active oxygen radicals of *Cistanche Deserticola(Y.C.Ma)* polysaccharid in Xinjiang[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2011, 28(3): 1545-1548.
- [32] 刘伯言. 肉苁蓉苯乙醇苷的提取、纯化和抗氧化活性研究[D].北京林业大学,2014.
- LIU B Y. Extraction, purification and antioxidant activities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola*[D]. Beijing Forestry University, 2014.
- [33] CHEN W, LIN H R, WEI C M, et al. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from Ab-induced toxicity [J]. Biogerontology, 2018, 19(1): 47-65.
- [34] 史秋佳,杨剑萍,陈缙光.秀丽隐杆线虫作为抗感染药物筛选模型的研究进展[J].中国药理学通报,2013,29(10):1333-1337.
- SHI Q J, YANG J P, CHEN Z G. Recent progress of *Caenorhabditis elegans*: as host model and tool for antimicrobial drug screening[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(10): 1333-1337.