

响应面法优化丹参中抗无乳链球菌 活性成分的提取工艺*

邓恒为 郭伟良 孙晓飞 谢珍玉 王世锋 胡文婷 周永灿

(海南大学海洋学院 热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海口 570228)

摘要 在单因素提取工艺优化的基础上,选取液料比、浸润时间、提取时间和提取温度进行四因素三水平的 Box-behnken 实验设计,并结合响应面分析法进一步优化丹参中抗无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*, SA)活性成分提取工艺。优化所得最佳提取工艺为液料比 37.8:1.0(ml:g)、浸润时间 104 min、提取温度 86.7℃、提取时间 182 min。响应面模型预测在该提取工艺下抗 SA 活性成分提取得率极值为 25.95%,经 4 次平行验证实验的实际提取得率为(25.87±0.03)%,为优化前的 2.59 倍,表明优化方法高效可靠。

关键词 无乳链球菌;丹参;提取工艺;响应面法

中图分类号 S948 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)04-0132-09

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, SA)是人畜共患的条件致病菌,能引起女性生殖系统感染(Usein *et al*, 2009)、婴儿败血症和脑膜炎(Lindhahl *et al*, 2005; Verani *et al*, 2010)、牛羊等畜禽乳腺炎(Naccari *et al*, 2009; Elizondo-Salazar *et al*, 2010)以及多种海水和淡水养殖鱼类链球菌病等(张新艳等, 2008; 柯剑等, 2010)。尤其是 2007 年以来,我国南方各地养殖罗非鱼链球菌病暴发和蔓延,对我国罗非鱼养殖造成了毁灭性打击,成为当前制约我国罗非鱼养殖可持续发展的最主要因素之一(柯剑等, 2010)。

为了控制养殖罗非鱼链球菌病的危害,近年来主要使用磺胺类、青霉素类等抗菌药物,该类药物在使用初期虽具有较好的效果,但由于 SA 能利用宿主巨噬细胞逃避抗生素类的杀伤作用,存在较严重的停药反弹现象,影响疾病控制效果(Zimmerman *et al*, 1975),并且,使用这类抗菌药物还存在耐药性和药物残留等严重缺陷,迫切需要寻找其他安全高效的罗非鱼链球菌病防治药物与方法。中草药具有天然、多

功能性、无耐药性和毒副作用小等特点,被认为是替代抗生素类药物用于水产疾病控制的良好选择(Jian *et al*, 2003; 梁利国等, 2010)。不过,由于中草药成分复杂,因不同来源不同种中草药的有效成分含量波动较大,导致使用时难以量化,为此,本研究在采用琼脂扩散法筛选出具有良好抗 SA 活性的中草药丹参的基础上,对丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)中抗 SA 活性的提取工艺进行优化,为鉴定丹参有效成分、研究其作用机制以及建立罗非鱼链球菌病的安全高效控制方法等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

丹参:2012 年 5 月购于海南海口市源安隆大药房,于 60℃烘箱烘烤 48 h,用小型高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,制成粉末样品备用。

无乳链球菌:分离自海南患病罗非鱼,经鉴定并保存于热带生物资源可持续利用省部共建国家重点

* 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120005)、海口市重点科技项目、海南大学地方服务项目和海南大学青年基金(qnj1206)共同资助。邓恒为, E-mail: hengweideng@163.com; 郭伟良, E-mail: guow107@mails.jlu.edu.cn。共同第一作者

通讯作者: 周永灿, 教授, E-mail: zychnu@163.com

收稿日期: 2013-09-02, 收修改稿日期: 2013-11-23

实验室的致病菌强毒株。

1.2 实验方法

1.2.1 SA 菌悬液的制备 将保存的 SA 菌种液平板划线, 32℃培养 24 h, 挑取一单菌落于装有 2 ml 灭菌脑心浸液(BHI)液体培养基的 5 ml 无菌 EP 管中, 32℃、180 r/min 培养 16 h, 将培养的菌悬液按照 1%的接种量接入 100 ml 的无菌脑心浸液(BHI)液体培养基中, 32℃、180 r/min 培养 16 h 制成最终的 SA 菌悬液。

1.2.2 抗 SA 活性成分含量的测定 琼脂扩散法测定丹参抗 SA 活性成分含量: 以用无菌生理盐水将 SA 菌悬液稀释至 A_{630nm} 为 0.8 的菌悬液, 按 2%接种量接入低于 50℃而未凝固的 BHI 半固体培养基, 快速倒入已冷凝的 BHI 固体培养基表面, 摇匀后平放, 制成 BHI 双层培养基; 凝固后用直径 5 mm 的打孔器在双层培养基上均匀打 3 个孔, 在每个孔中加入 57 μ l 待测样品液, 32℃培养 18 h 后以游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.2.3 标准曲线的绘制 采用热水提取法提取丹参中抗 SA 活性成分, 将丹参粉末按照液料比 30.0 : 1.0 (ml:g)混合于 EP 管中, 静置浸润 30 min, 然后于 50℃水浴中静置提取 60 min, 提取 1 次, 然后用旋转蒸发器将提取液浓缩 12 倍作为标准曲线的母液。因抗 SA 活性成分未经分离纯化鉴定, 其含量尚未得知。本研究假定标准曲线母液中抗 SA 活性成分浓度为 0.04 g/ml, 则其提取得率初始为 10.00%, 抗 SA 活性成分提取得率计算公式为:

$$\begin{aligned} & \text{抗无乳链球菌活性成分提取得率} / \% \\ &= \frac{\text{抗无乳链球菌活性成分质量}}{\text{丹参质量}} \times 100\% \end{aligned}$$

将丹参提取液母液分别与去离子水按 6 : 0、5 : 1、4 : 2、3 : 3、2 : 4 和 1 : 5 (ml : ml)混匀, 即药液中抗 SA 活性成分浓度分别为 0.0400、0.0333、0.0267、0.0200、0.0133、0.0067 g/ml, 以琼脂扩散方法测定各标准液的抑菌圈直径, 以抗 SA 活性成分浓度的对数为横坐标, 抑菌圈直径为纵坐标, 绘制标准曲线。

将样品液稀释或浓缩至生药量为 0.0400 g/ml, 以琼脂扩散法测定其抑菌圈直径, 根据标准曲线计算抗 SA 活性成分浓度和抗 SA 活性成分得率。

1.2.4 单因素法优化丹参抗 SA 活性成分的提取工艺

提取溶剂的选择: 按照标准曲线母液制备方法提取丹参抗 SA 活性成分, 提取溶剂分别用 0%、20%、40%、60%、80%和 100%的乙醇水溶液, 提取完成后,

用 40℃烘箱烘干, 加等量的去离子水将析出物完全溶解, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 制成无菌样品液, 测定其抗 SA 活性成分含量并计算其得率, 确定提取溶剂中乙醇的合适浓度。

提取次数的选择: 采用上述选择合适的溶剂, 以提取液料比 30.0 : 1.0 (ml : g)、温度 50℃、浸润时间 30 min 和提取时间 60 min 处理后, 过滤得第 1 次提取液, 向滤渣中加等量的溶剂, 用相同的提取方法再提取 2 次, 依此分别获得 3 次提取的提取液, 提取液以 1.2.2 方法测定其抗 SA 活性成分含量与得率, 以确定选择合适提取次数。

其他提取条件的优化: 采用单因素法分别研究提取液料比、浸润时间、提取温度和时间等因素对抗 SA 活性成分得率的影响, 其中, 研究某个影响因子时, 已研究的因子采用其已优化的结果, 未研究的因子采用其在制作标准曲线时设定的数值, 以此逐一优化丹参抗 SA 活性成分的合适提取条件。

1.2.5 Box-Behnken 试验设计及响应面的分析 在单因素优化的基础上进行四因素三水平的 Box-Behnken 设计试验, 因素水平如表 1 所示, 实验设计方案和结果如表 2 所示, 采用响应面对结果进行分析, 获得最优提取条件, 在最优条件下进行 4 次平行验证试验, 以验证模型的可靠性。

2 结果与分析

2.1 丹参抗 SA 活性成分测定标准曲线

图 1 为测定丹参抗 SA 活性成分含量的标准曲线, 其曲线方程为 $Y = 4.842X + 16.707$, 相关系数 R^2 为 0.9873, 表明丹参抗 SA 活性成分含量对数值与其抑菌圈直径间有较好的相关性, 该曲线适用于测定丹参提取液中抗 SA 活性成分的含量。

2.2 丹参抗 SA 活性成分提取条件的单因素优化

2.2.1 溶剂中乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响 提取溶剂中所含不同乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 2), 提取溶剂中乙醇体积分数为 20%时, 得率最高, 乙醇体积分数超过 20%后, 得率随乙醇体积分数的升高而下降, 乙醇体积分数为 100%时提取液没有表现出抗 SA 活性, 因此, 根据相似相溶原理推断, 丹参中抗 SA 活性成分的极性与 20%乙醇溶液的极性相当。

表 1 丹参抗 SA 活性成分提取工艺优化的 Box-Behnken 试验设计因素水平

Tab.1 The factors and levels of Box-Behnken experiment for optimizing the process of the active components against SA extraction from *S. miltiorrhiza*

因素 Factor	液料比 Ratio of liquid to solid (X_1) (ml:g)	浸润时间 Infiltration time(X_2) (min)	提取温度 Extraction temperature(X_3) ($^{\circ}$ C)	提取时间 Extraction time(X_4) (min)
-1	20.0 : 1.0	60	80	60
0	30.0 : 1.0	90	90	120
1	40.0 : 1.0	120	100	180

“0”表示该单因素优化获得的最优条件，“1”表示按照单因素步长和实验结果设计的高水平，“-1”表示按照单因素步长和实验结果设计的低水平

“0” is the best condition of the single factor optimization, “1” is high levels of design according to step length of the single factor and the experiment results, “-1” is low levels of design according to step length of the single factor and the experiment results

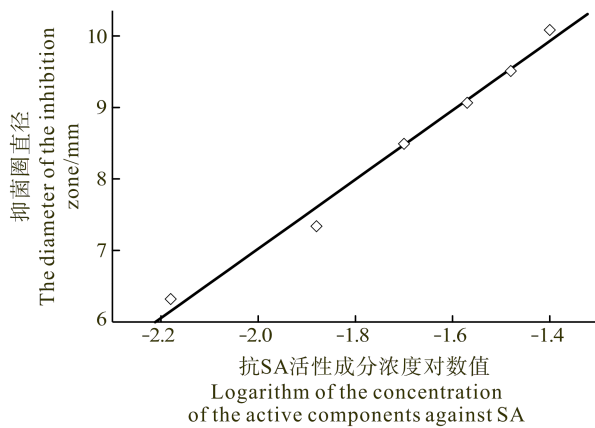


图 1 丹参抗 SA 活性成分含量对数值与抑菌圈直径的标准曲线

Fig.1 The standard curve of relationship between the concentration of the active components against SA and the diameter of the inhibition zone

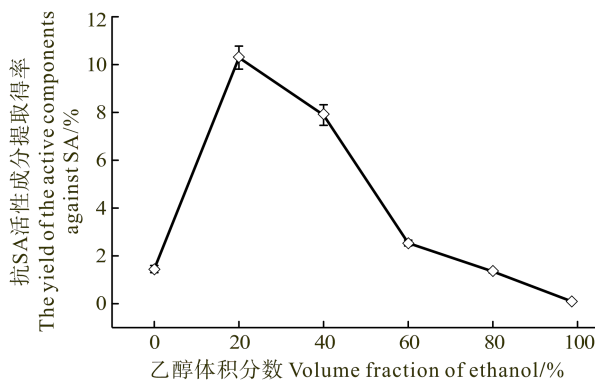


图 2 溶剂中乙醇体积分数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

Fig.2 The effect of volume fraction of ethanol in the solvent on the yield of the active components against SA

2.2.2 提取次数对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响 如 1.2.4 方法考察不同提取次数提取丹参中抗

SA 活性成分提取得率结果表明, 仅第 1 次提取的提取液中表现出较强的抗 SA 活性, 而第 2 次和第 3 次提取的丹参提取液均未出现明显抑菌活性, 说明仅经过 1 次提取就可较好地析出丹参中的抗 SA 活性成分。

2.2.3 液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

提取液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响研究表明(图 3), 随着液料比增加, 提取得率随液料比增加而增加, 而液料比达到 25.0 ml/g 后其增幅明显变缓, 综合考虑提取效果和节省溶剂原则, 选择丹参提取的合适液料比为 30.0 : 1.0(ml : g)。

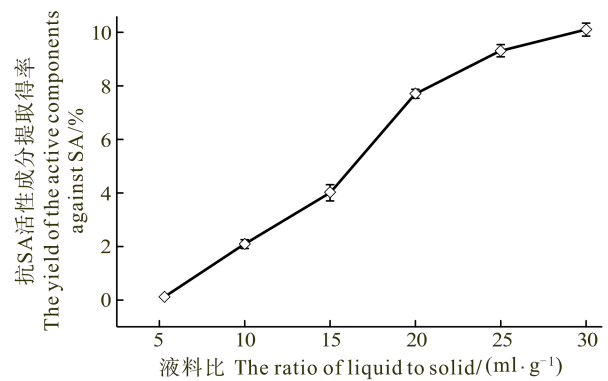


图 3 液料比对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响
Fig.3 The effect of the ratio of liquid to solid on the yield of the active components against SA

2.2.4 温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响

提取温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响研究表明(图 4), 提取温度低于 90 $^{\circ}$ C 时, 得率与温度呈正相关; 而温度高于 90 $^{\circ}$ C 时, 得率与温度呈负相关, 因此, 丹参中抗 SA 活性成分的最适提取温度为 90 $^{\circ}$ C。

2.2.5 浸润时间对丹参抗 SA 活性成分得率的影响

浸润时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 5), 浸润时间为 90 min 时, 得率最

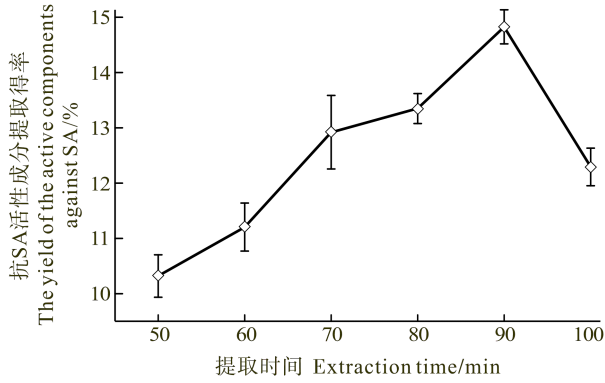


图 4 提取温度对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响
Fig.4 The effect of extraction temperature on the yield of the active components against SA

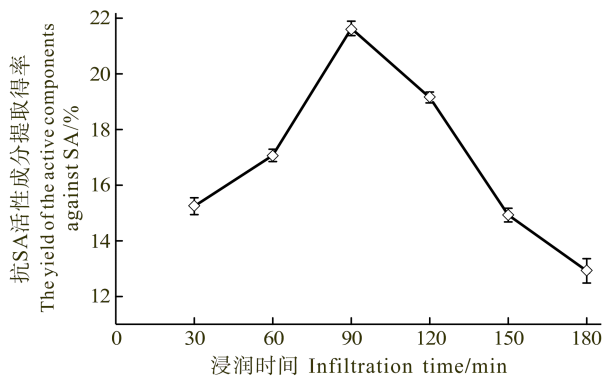


图 5 浸润时间对丹参抗 SA 活性成分得率的影响
Fig.5 The effect of infiltration time on the yield of the active components against SA

高, 据此确定提取丹参中抗 SA 活性成分的最佳浸润时间为 90 min。

2.2.6 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率影响的研究结果表明(图 6), 提取时间为 120 min 时得率最高, 因此选择其最适的提取时间为 120 min。

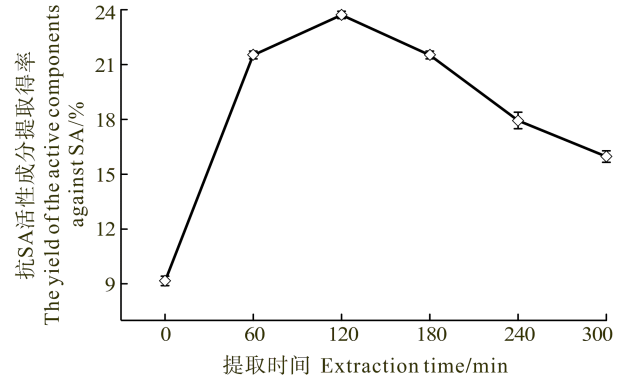


图 6 提取时间对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响
Fig.6 The effect of extraction time on the yield of the active components against SA

2.3 Box-Behnken 设计试验结果及响应面的分析

采用多元二次回归方程对表 2 中的试验结果进行拟合, 得到回归方程如下: $Y=16.145+0.345X_1+0.972X_2+0.486X_3+1.633X_4-2.354X_1^2-0.074X_1X_2+0.037X_1X_3-1.114X_1X_4-0.839X_2^2+0.452X_2X_3+0.694X_2X_4-3.501X_3^2-0.070X_3X_4-2.003X_4^2$ 。该回归方程的相关系数(R^2)为 0.870, 预测均方根误差(RMSE)为 2.458, 表明有 87.0%信息来自所选自变量, 多元二次回归模型有较好的拟合度和预测性能。以 F 检验对模型进行显著性检验, 其 F 值为 5.765, P 值为 0.002, 表明该模型显著可靠。

表 2 Box-Behnken 试验设计方案和结果
Tab.2 The design scheme and results of Box-Behnken experiments

试验号 Experiment numbers	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y \pm SE^*$	试验号 Experiment numbers	X_1	X_2	X_3	X_4	$Y \pm SE$
1	-1	-1	0	0	16.705±0.000	15	0	1	-1	0	17.521±0.363
2	-1	1	0	0	19.489±0.175	16	0	1	1	0	10.949±0.305
3	1	-1	0	0	17.938±0.252	17	-1	0	-1	0	16.724±0.250
4	1	1	0	0	22.674±0.492	18	-1	0	1	0	10.644±0.225
5	0	0	-1	-1	20.035±0.145	19	1	0	-1	0	22.306±0.257
6	0	0	-1	1	20.139±0.679	20	1	0	1	0	15.053±0.395
7	0	0	1	-1	11.064±0.268	21	0	-1	0	-1	11.736±0.389
8	0	0	1	1	11.125±0.305	22	0	-1	0	1	14.632±0.224
9	-1	0	0	-1	18.963±0.151	23	0	1	0	-1	21.904±0.659
10	-1	0	0	1	15.424±0.536	24	0	1	0	1	22.757±0.704
11	1	0	0	-1	22.528±0.181	25	0	0	0	0	24.060±0.422
12	1	0	0	1	21.878±0.298	26	0	0	0	0	24.219±0.276
13	0	-1	-1	0	11.737±0.218	27	0	0	0	0	24.140±0.338
14	0	-1	1	0	14.164±0.600	—	—	—	—	—	—

$Y \pm SE^*$ 为丹参中抗 SA 活性成分提取得率±平行试验间的标准差

$Y \pm SE^*$ is the yield of the active components against SA ± the standard deviation between the parallel test

表3 回归分析结果
Tab.3 The results of the regression analysis

项目 Items	DF ¹⁾	SS ²⁾	F	P _r >F	项目 Items	DF	SS	F	P _r >F
X ₁	1.	49.713	8.227	0.014	X ₁ X ₄	1.	2.085	0.345	0.568
X ₂	1	67.133	11.111	0.006	X ₂ ²	1	76.929	12.732	0.004
X ₃	1	104.811	17.346	0.001	X ₂ X ₃	1	20.246	3.351	0.092
X ₄	1	0.006	0.001	0.975	X ₂ X ₄	1	1.043	0.173	0.685
X ₁ ²	1	12.527	2.073	0.175	X ₃ ²	1	217.810	36.048	0.000
X ₁ X ₂	1	0.952	0.158	0.698	X ₃ X ₄	1	0.000	0.000	0.993
X ₁ X ₃	1	0.342	0.057	0.816	X ₄ ²	1	34.693	5.741	0.034
回归 Model	14	487.701	5.765	0.002	一次项 Linear	4	221.663	9.171	0.001
二次项 Quadratic	4	241.369	9.987	0.001	交互项 Cross product	6	24.670	0.680	0.669
残差 Error	12	72.507	—	—	失拟项 Lack of fit	10	72.4945	1147.1	0.001

1) DF 为自由度; 2) SS 为方差总和

1) DF is the degree of freedom; 2) SS is the sum of variance

采用 F 检验对回归模型中各项目进行显著性检验的结果表明(表 3), 浸润时间(X_2)和提取温度(X_3)项的 $P < 0.01$, 表明其对丹参抗 SA 活性成分提取得率的影响极其显著; 液料比(X_1)项的 $P < 0.05$, 表明其对得率有影响显著; 这 3 个因素在拟合方程中系数符号为正号, 表明它们对得率的影响是正效应; 而浸润时间(X_2)、提取温度(X_3)和提取时间(X_4)的平方项的 $P < 0.05$, 系数符号为负号, 表明这 3 个因素对得率的影响是呈开口向下的抛物线状, 它们的抛物线开口口径较小, 曲面弯度较为明显。模型中的交互项的 $P > 0.1$, 表明各提取条件之间的交互作用不显著。

为了直观提取条件与丹参抗 SA 活性成分提取得率之间以及不同提取条件之间的交互作用, 绘制两两提取条件之间的响应曲面图(图 7a-图 7f)。结果表明, 6 个响应曲面均为开口向下的凸面, 极值区域(曲面的顶端)在实验设计考察的范围内, 表明得率极值在考察范围内。此外, 图 7c、图 7e 和图 7f 的形成较为趋于正球面形, 表明液料比(X_1)与提取温度(X_3)、浸润时间(X_2)与提取温度(X_3)、浸润时间(X_2)与提取时间(X_4)之间交互影响不显著; 在考察的范围内, 抛物曲线的口径小, 弯曲度大, 与平方项统计分析结果显著相吻合。

通过对模型的多元二次回归方程偏导, 解方程组, 求极值, 获得丹参中抗 SA 活性成分提取的最佳条件为: 料液比 37.8 : 1.0 (ml : g), 浸润时间 104 min、提取温度 86.7°C 和提取时间 182 min, 该模型预测最优条件下得率最高值为 25.95%。在最佳条件下进行 4 次平行验证, 结果得率为(25.87±0.03)%, 与预测值间

相对误差为 0.31%, 表明模型预测准确可靠。提取方法优化后, 得率显著提高, 为优化前的 2.59 倍, 表明该优化方法有效可行。

3 讨论

药用丹参是双子叶唇形科植物丹参的根和茎, 其有效成分主要为脂溶性的二萜化合物和水溶性的酚酸类化合物, 以及黄酮类、三萜类、甾醇类等成分, 如丹参酮、二氢丹参酮 A、丹参酮 B、丹参素、丹酚酸等(李家实等, 1998)。已有研究表明, 丹参具有祛瘀止血、降血脂、抗血栓、改善微循环以及抗肿瘤、抗氧化和抗菌消炎等药理活性(浦锡娟等, 2009)。特别在抗菌消炎方面, 国内已有较多的报道, 周静等(2008)研究认为, 丹参水溶性成分和脂溶性成分对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)均有抑制作用, 且其水溶性成分的抑菌效果强于脂溶性成分; 王庆银等(2010)研究表明, 丹参醇提液对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和铜绿假单胞杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等均有明显抑制作用; 邓婧等(2006)研究了丹参水煎液对口腔常驻菌抑菌效果, 结果显示, 其对金黄色葡萄球菌和变形链球菌(*Streptococcus mutans*)等有较强抑制作用; 王政军等(2011)研究丹参根甲醇提取物体外抑菌试验表明, 其对枯草芽孢杆菌和表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)等 10 种常见细菌均有较强抑菌活性, 且对表皮葡萄球菌的抑菌活性最强, 其 MIC 和 MBC 均为 1.52 mg/ml。不过, 已有的研究主要集中于丹参对人类病原菌的作

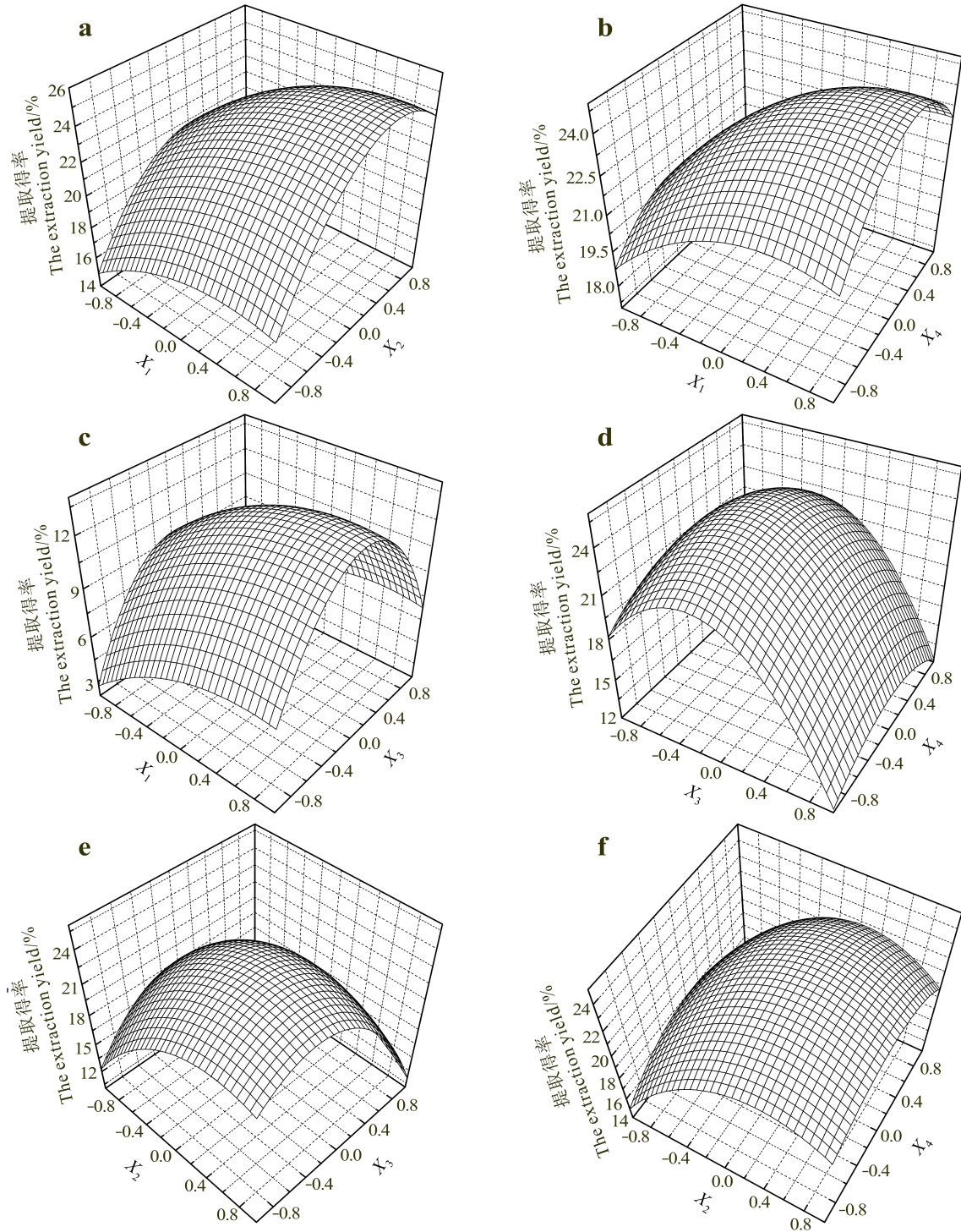


图 7 响应曲面

Fig.7 The figures of response surface

a : $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面图 ; b : $Y=f(X_1, X_4)$ 的响应面图 ; c : $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面图 ;

d : $Y=f(X_3, X_4)$ 的响应面图 ; e : $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面图 ; f : $Y=f(X_2, X_4)$ 的响应面图

a: Response surface figure of $Y=f(X_1, X_2)$; b: Response surface figure of $Y=f(X_1, X_4)$; c: Response surface figure of $Y=f(X_1, X_3)$; d: Response surface figure of $Y=f(X_3, X_4)$; e: Response surface figure of $Y=f(X_2, X_3)$; f: Response surface figure of $Y=f(X_2, X_4)$.

用效果，有关丹参对水产病原的抑制作用鲜有报道。
本研究采用单因素法对丹参抗 SA 活性成分提取

的乙醇体积分数、浸润时间、液料比、提取温度和提取时间等因子进行初步优化的基础上，再利用

Box-Behnken 试验设计和响应面分析法对其提取工艺进一步优化。其中,响应面法是集试验设计、数学统计和计算机科学为一身的优化方法,它不仅可以搜寻出各因素的最优水平区域,还可考察各因素对响应值及各因素之间的交互作用,具有试验点数少、实验信息量大、全局性高等优点,已广泛应用于化工、医药、生物和农业等研究领域的工艺优化(逯家辉等, 2008a、b; Avishek *et al.*, 2009; 孙元芹等, 2013)。本研究结果表明,采用 Box-Behnken 试验设计结合响应面分析法,以较少的试验次数获得了提取条件与抗 SA 活性成分之间的相关信息,较好地描述提取条件与抗 SA 活性成分得率之间的相关性以及提取条件之间的交互作用,通过该方法优化提取工艺显著提高了丹参中抗 SA 活性成分提取得率,在渔用中草药活性成分的分析以及推动丹参等中草药在水产病害防控中的研究与应用等方面具有良好前景。

本文对丹参抗 SA 活性成分的提取工艺进行了研究,但其中活性成分的具体种类尚未确定,不过,本研究结果表明,丹参以 20%乙醇作为其提取溶剂时其提取物的抗 SA 活性最强,根据相似相溶原理(Du *et al.*, 2004; 赵磊等, 2006),可以推测丹参中抗 SA 的活性成分应为极性较强物质,如丹参酮、丹参酮-A、隐丹参酮二氢丹参酮等。有研究认为(储茂泉等, 2002),中草药的浸提过程由 3 步组成:1)溶剂向药材内部渗透;2)依靠溶质的溶剂化将溶质溶解到固液界面上;3)溶质从固液界面向溶剂主体扩散。因此,中草药提取前的浸润时间和提取时间都是影响提取得率的重要因素。同时从单因素试验和响应面分析二次项统计的显著结果显示,浸润时间和提取时间对丹参中抗 SA 活性成分提取得率的影响呈显著的抛物线状,即提取得率随着浸润的时间和提取时间的延长,得率先是上升而后下降,提取温度也有相似地变化规律。由于丹参中抗 SA 活性成分并未明确,其得率是根据双层平板的抑菌圈直径计算而得,仅是表明随着浸润时间和提取时间的延长,提取液的抗 SA 活性先是上升而下降,按溶出理论,随着浸润和提取时间的延长,会促进活性物质快速溶出,抗 SA 活性也会随着增强,但过长的浸润和高温下过长的提取时间会促进并加剧一些化学反应的发生,造成待提取组分发生裂解、水解、氧化等反应,而造成待测组分的损失(陈益乐, 2011)¹⁾。李有润等(1997)研究了中草药成分的浸提过程也认为,中草药中有效成分在高温下长时间提

取会造成有效成分的分解与挥发。对于丹参中活性成分因高温和长时间提取而下降的文献也有报道过,如对丹参药材进行试用流通蒸汽灭菌 30 min,丹参酮 A 含量下降 15.19%(黄泰康 1994);曾元儿等(1997)的研究表明,丹参乙醇浸膏中丹参酮 A 损失的程度随温度的升高和时间的延长而增加,100℃烘干 5 h,丹参酮 A 损失均达 50%以上。当然丹参为复杂体系,其中含有多种活性成分,而且相似性活性成分含量之间存在显著相关性(曾令杰等, 2008),其中有抗 SA 活性成分,可能也存在抑制抗 SA 活性的成分或溶出物通过改变体系中的 pH 而加速了抗 SA 活性成分发生化学变化,随着浸润和提取时间的延长,这些成分溶出增多,而降低提取液的活性成分。分析结果为丹参抗 SA 活性成分的进一步纯化和应用奠定了基础。

参 考 文 献

- 王庆银,姚庆强. 丹参提取液体外抑菌活性研究. 食品与药品, 2010, (05): 184-187
- 王政军, 库里满·恰里甫, 苗德艳, 等. 丹参提取物抑菌活性的初步评价. 食品工业科技, 2011, (07): 65-66, 70
- 邓婧, 许晓燕, 袁昌青, 等. 丹参水煎液对几种口腔常驻菌的体外抑菌实验. 实用口腔医学杂志, 2006, (4): 553-555
- 孙元芹, 李翹楚, 卢璐, 等. 响应面法优化浒苔鱼松的加工工艺. 渔业科学进展, 2013, 34(1): 166-171
- 李有润, 郑青. 中草药提取过程的数学模拟与优化. 中草药, 1997, (7): 399-401
- 李家实. 中药鉴定学. 上海: 上海科学技术出版社, 1998, 172
- 张新艳, 樊海平, 钟全福, 等. 罗非鱼无乳链球菌的分离-鉴定及致病性研究. 水产学报, 2008, 32(5): 772-779
- 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离-鉴定与致病性. 广东海洋大学学报, 2010, 3(30): 22-27
- 周静, 李惠芬, 王洪志, 等. 丹参水溶性成分与脂溶性成分抑菌作用的考察. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2130-2131
- 赵磊, 蒲小平. 丹参粉针剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用. 中国新药杂志, 2006, 15(14): 39-41
- 浦锡娟, 徐凯琳. 丹参的药理作用研究进展. 临床医学工程, 2009, (08): 154-155
- 梁利国, 阎斌伦, 张晓君, 等. 常用中草药对 4 种病原弧菌体外抗菌效果的研究. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 114-119
- 黄泰康. 常用中药成分与药理手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1994, 254
- 逯家辉, 王迪, 郭伟良, 等. 响应面法优化八角茴香中莽草酸的超声波提取工艺. 林产化学与工业, 2008a, 28(1): 87-91
- 逯家辉, 李国庆, 张华飞, 等. 八角茴香油提取工艺优化. 农业工程学报, 2008b, 24(6): 254-256

1) 陈益乐. 红外辅助提取技术在丹参等中药有效成分提取分析中的应用研究. 见: 复旦大学硕士研究生学位论文, 2011, 17

- 曾元儿, 徐晖. 烘干温度和时间对丹参乙醇浸膏中丹参酮 A 含量的影响. 中药新药与临床药理, 1997, 8(1): 38–39
- 曾令杰, 林文雄, 梁晖, 等. 丹参中活性成分的同时定量分析及其相关性研究. 中成药, 2008, (6): 892–896
- 储茂泉, 刘国杰. 中药提取过程的动力学. 药学学报, 2002, (7): 559–562
- Avishek M, Angad S, Arun G, *et al.* Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(1): 150–156
- Du GH, Zhang JT. The general situation and progress of the modern research of red sage root (*Radix Salviae miltiorrhizae*). Herald of Medicine, 2004, 23(7): 435–440
- Elizondo-Salazar JA, Jayarao BM, Heinrichs AJ. Effect of heat treatment of bovine colostrum on bacterial counts, viscosity, and Immunoglobulin G concentration. J Dairy Sci, 2010, 93(3): 961–967
- Jian J, Wu Z. Effects of traditional Chinese medicine on non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson). Aquaculture, 2003, 218(1–4): 1–9
- Lindahl G. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(1): 102–127
- Naccari C, Niutta PP, Trombetta D, *et al.* Pharmacokinetics and efficacy of teicoplanin against intramammary infections in sheep. Vet Rec, 2009, 165(1): 19–22
- Usein CR, Petrini A, Georgescu R, *et al.* Group B *Streptococcus* colonization of Romanian women: phenotypic traits of isolates from vaginal swabs. Roum Arch Microbiol Immunol, 2009, 68(4): 235–239
- Verani JR, MPH, Schrag SJ. Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges. Clin Perinatol, 2010, 37(2): 375–392
- Zimmerman, RA, Klesius PH, Krushak DH, *et al.* Effect of penicillin on the humoral and cellular immune response following group A streptococcal pharyngitis. Can J Comp Med, 1975, 39(2): 227–230

(编辑 陈严)

Optimization of the Extraction Conditions of Active Components for Inhibition of *Streptococcus agalactiae* from *Salvia miltiorrhiza* Bge. Using Response Surface Methodology

DENG Hengwei, GUO Weiliang, SUN Xiaofei, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, ZHOU Yongcan

(College of Marine Science, Hainan University, State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Biotic Resources; Haikou 570228)

Abstract In recent years *Streptococcus agalactiae* (SA) has become the most harmful pathogen to cultured tilapia in Hainan and many southern provinces of China. *Salvia miltiorrhiza* Bge is highly resistant to SA, but it contains complex components and which component is responsible for the resistance to SA has not been reported. Here we investigated the effects of extraction conditions on the yield of anti-SA components in *S. miltiorrhiza* Bge and optimized the extraction method. We first developed the agar diffusion method for the quantitative analysis of extracted anti-SA components; then we used the yields of anti-SA components from *Salvia miltiorrhiza* Bge as the responsive values to study the effects of extraction conditions on the yield of the anti-SA components, including the extraction solvent, extraction times, the ratio of liquid to solid, infiltration time, temperature and extraction time in single-factor experiments; finally we further optimized the ratio of liquid to solid, infiltration time, temperature and extraction time using the four-factor-three-level Box-Behnken experimental design with

response surface method. The results of the agar diffusion showed that the standard equation for the determination of anti-SA components from *S. miltiorrhiza* Bge was $Y = 4.842X + 16.707$ ($R^2 = 0.9873$). The results of the single-factor experiments showed that the most suitable extraction solvent and times was 20% ethanol aqueous solution for 1 time. The results of the Box-Behnken experimental design with response surface method showed that the infiltration time, the extraction temperature, and the ratio of liquid to solid had extremely vital effects on the responsive values. The optimum extraction conditions were as follows: the ratio of liquid to solid was 37.8:1.0 (ml:g), the infiltration time was 104 min, the extraction temperature was 86.7°C and the extraction time was 182 min. The predicted maximum yield of anti-SA components was 25.95%, under the RSM model-generated optimal extraction conditions. The results of four parallel validation experiments showed that the actual yield of anti-SA components was (25.87 ± 0.03)%, and the relative error between predicted and actual values was 0.31%. The yield of anti-SA components was 2.59 times higher than before. These demonstrated that our optimization method was efficient and reliable. Furthermore, our study provided important clues to future research on the anti-SA components of *S. miltiorrhiza* Bge, and significantly contributed to the safe and efficient control of diseases caused by *S. agalactiae*.

Key words *Streptococcus agalactiae*; *Salvia miltiorrhiza* Bge; Extraction conditions; Response surface methodology

《渔业科学进展》期刊订阅启事

《渔业科学进展》是由中华人民共和国农业部主管、中国水产科学研究院黄海水产研究所和中国水产学会共同主办的国家级学术期刊，科学出版社出版发行。该刊创刊于1980年，原刊名为《海洋水产研究》，2009年更名为《渔业科学进展》，中国工程院院士、中国科协副主席唐启升担任主编。

主要报道内容为渔业生物学、渔业海洋学、水产增养殖学、水产种质资源与遗传育种、水生野生生物保护、渔业生物病害及其防治、渔业生态环境保护、渔业设施与捕捞技术、渔业装备制造技术，水产品综合利用与质量安全等领域的新发现、新技术和新成果。

《渔业科学进展》现为中文核心期刊、中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。目前已被英国《动物学记录》(ZR)、《水科学与渔业文摘(ASFA)》收录。在国内被中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国生物学文献数据库、中国海洋文献数据库、中国学术期刊(光盘版)收录。

《渔业科学进展》为双月刊，国内邮发代号：24-153；国外发行代号：4578Q。每册定价30元，全年180元(含邮费)。

敬请读者订阅

《渔业科学进展》编辑部