

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.06

星点设计法优化超声酶法提取蓝莓粉中花青素的工艺

孙倩怡¹, 李慧萍¹, 张晶^{1*}, 鲁宝君², 夏玉婷²

(1. 吉林农业大学 中药材学院, 长春 130118; 2. 杭州睦山农实业投资有限公司, 杭州 311604)

[收稿日期] 2016-12-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 06-0041-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 通过单因素实验和星点设计-效应面法优化超声酶法提取蓝莓中花青素的工艺, 以酶种类、酶用量、提取时间、提取温度、料液比、醇浓度和 pH 值为因素, 以花青素提取率为指标, 进行提取工艺的单因素优化; 在单因素实验基础上, 通过星点设计-效应面法, 考察联合提取时体系中醇浓度, 提取时间, 料液比对提取结果的影响, 从而确定了酶-辅助超声法提取蓝莓中花青素的最佳工艺为: β -葡聚糖酶, 提取时间为 20 min, 料液比为 1:20, 往体系中补充无水乙醇, 使得体系中的醇浓度为 55%, 再继续超声提取 10 min。花青素提取率可达到 19.156%, 提取条件温和, 酶用量小, 提取率高, 可为蓝莓中花青素的深度开发提供科学依据。

[关键词] 蓝莓; 花青素; 酶法-超声辅助提取; 星点设计

Study on the Extraction of Anthocyanins from Blueberry with Ultrasonic Enzymatic Optimized by Central Composite Design-response Surface Method

SUN Qian-yi¹, LI Hui-ping¹, ZHANG Jing^{1*}, LU Bao-jun², XIA Yu-ting²

(1. College of Chinese medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Hangzhou Mo Mountain Industrial Investment, Hangzhou 311604, China)

Corresponding author: ZHANG Jing, E-mail: zhjing0701@163.com

Abstract: In this experiment, to optimize ultrasonic extraction technology process conditions of anthocyanin from blueberry by the single factor experiment and the central composite design-response surface method. Use the enzymatic types, enzyme addition, extraction time, extraction temperature, ratio of material to liquid and ethanol concentration as the optimum factor. Use the anthocyanin extraction rate as the optimum index to optimize extraction process of single factor, on the basis of single factor experiment, by the means of the central composite design, investigate the alcohol concentration, extraction time, ratio of material to liquid, get the best extraction procedure thought enzymatic-ultrasonic-assisted were as follows: β -glucanase, extraction time 20 min, solid to liquid ratio 1:10. Afterwards, ethanol (final concentration 40%) was added to the mixture for ultrasonic-assisted extracting 10 min. The results show enzymatic-ultrasonic-assisted extraction rate can reach 19.156%,

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20140204063YY); 杭州市钱江学者计划(2015年)

作者简介: 孙倩怡, 硕士研究生, 从事天然产物化学方面研究。

通讯作者: 张晶。E-mail: zhjing0701@163.com

this method extraction condition mild, with less enzyme, provides a reasonable reference of the future for the development of anthocyanin from blueberry.

Key words: blueberry; anthocyanin; enzymatic-ultrasonic-assisted; central composite design

蓝莓为杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium Spp*)植物的浆果,原产于北美洲^[1],其果皮中含有大量的花青素成分^[2],具有很强的抗氧化、保护视力、抗癌和增强心血管功能等生物活性^[3]。在食品色素、化妆品、医疗等方面具有巨大的应用价值。近些年来,王静等^[4]研究发现蓝莓花青素可明显提高小鼠的痛阈,抑制耳廓肿胀,从而起到消炎的效果;王关林等^[5]研究发现,花青素可抑制小鼠肉瘤 S180 的生长;康雪燕^[6]通过猪体外试验研究发现,花青素对猪传染性胃肠炎病毒有一定的治疗效用;不仅如此,研究发现花青素还可以增强鸡的免疫力,同时促其生长^[7];由此可知花青素对动物疾病也有着良好的预防和治疗作用,在兽药方面有着较强的应用价值。但由于花青素的稳定性差,对 pH、光、温度等极为敏感^[8],在提取过程中损失较大,使其应用受到了很大的限制,故提高蓝莓中花青素的提取率成为蓝莓扩大应用的瓶颈问题,优化蓝莓花青素提取工艺也成为蓝莓生产行业中的研究热点。本文以酶辅助超声提取的方法提取蓝莓冻干粉中的花青素,旨在为蓝莓资源的广泛应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 蓝莓:由杭州睦山农实业投资有限公司提供,由本项目组鉴定为杜鹃花科越橘属浆果类植物果实。蓝莓鲜果避光匀浆后,冻干成粉状,-20℃避光保存,待用。

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(纯度>98%,四川省维克奇生物科技有限公司,批号:150823); β -葡聚糖酶(源叶生物,批号:G6831);木瓜蛋白酶(Sigma,批号:P3250);木聚糖酶(Sigma,批号:X3254);其他试剂均为分析级。

1.2 主要仪器 HR2839 匀浆机,珠海经济特区飞利浦家用电器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;PL303

电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Telstar LyoQuest 冷冻干燥机,THermo Fisher ST 16R 高速冷冻离心机,昊诺斯科技(北京)有限公司;KQ5200DB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;PB-10 酸度计,德国赛多利斯公司。

1.3 酶辅助超声提取工艺单因素优化实验 精确称取蓝莓粉 1.000 g 于锥形瓶中,采用超声法(200 W, 40 KHz),以酸水溶液为溶剂,分别考察加入酶的种类(木瓜蛋白酶、 β -葡聚糖酶、木聚糖酶及 3 种酶按不同比例组合的复合酶)、提取温度(10、20、30、40、50 及 60℃)、加酶量(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 及 10.0 mg/g)、提取时间(10、15、20、25 及 30 min)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25 及 1:30)、pH 值(1、2、3、4、5 及 6)酶解一定时间,然后往体系中加入乙醇,使体系醇浓度为(30、40、55、70 及 80%),继续超声 10 min,蓝莓中花青素提取率的变化,提取液离心,过滤后定容,测定其花青素含量(方法见 1.5)。

1.4 酶辅助超声提取星点设计-效应面法优化实验 根据单因素实验结果,通过星点设计-效应面法,以蓝莓中花青素的提取率为优化指标,采用 β -葡聚糖酶,加酶量为 6.0 mg/g,温度 40℃,考察联合提取时体系中醇浓度,提取时间,料液比对提取结果的影响,从而确定最佳提取工艺。星点水平设计如表 1。

1.5 花青素含量的测定

1.5.1 制备标准曲线 精密称取矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品 1.0 mg,用甲醇定容至 5 mL。从中分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于试管中,取 2 组,均用甲醇定容至 1 mL,然后其中的一组以 pH 1.0 的缓冲液定容至 5 mL;另外一组以 pH 4.5 的缓冲液定容至 5 mL,将两组梯度标品溶液分别于 530 和 700 nm 测定其吸光度,按公式 1 计算 A 实际,以吸光度 A 实际为纵坐标,浓度(C)为横坐标,绘制标

准曲线,得回归方程为: $y=4.7571x-0.00971, R^2=0.9993$,线性范围 $0.02\sim 0.12\text{ mg/mL}$ 。
 公式 1: $A_{\text{实际}}=(A_{530}-A_{700})_{\text{pH}1.0}-(A_{530}-A_{700})_{\text{pH}4.5}$

表 1 星点设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of central composite design

水平 Level	A(体系醇浓度)/% A(alcohol concentration)	B(提取时间)/min B(extraction time)	C(料液比) C(liquid ratio)
-1.682	30	10	1:10
-1	40	15	1:15
0	55	20	1:20
1	70	25	1:25
1.682	80	30	1:30

1.5.2 提取物中花青素含量的测定 取 1.3 项和 1.4 项的提取液 1 mL,分别加入 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲溶液,按 1.5.1 项测定吸光度值,按标准曲线计算总花青素浓度 C,按公式 2 计算花青素含量:

$$\text{花青素含量(mg)} = C \times V_1 \times V_2 / V_3 \text{ (公式 2)}$$

C-花青素浓度(mg/mL); V_1 -供试液体积(mL);
 V_2 -提取液总体积(mL); V_3 -待测液体积(mL)

$$\text{花青素提取率(\%)} = m_1 / m_2 \text{ (公式 3)}$$

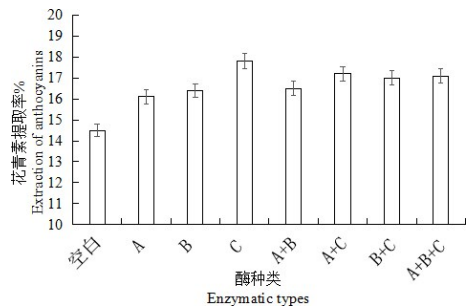
m_1 -花青素含量(mg); m_2 -蓝莓干粉含量(mg)

2 结果与分析

2.1 单因素实验 以 pH=3 的酸性水溶液为溶剂、料液比为 1:20(g:mL)、40℃条件下,按照总加酶量为 $6.0\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,超声提取 30 min 后,加入乙醇使浓度达 55%,继续超声提取 10 min 为基本工艺,进行单因素考察实验。

2.1.1 酶种类对花青素提取率的影响 在提取体系中加入不同种类的酶,考察酶种类对蓝莓中花青素提取率的影响。由图1可知,加酶后,花青素的提取率显著提高;3种酶中,以β-葡聚糖酶对花青素的提取率影响最大,使提取率达17.58%,较空白组提高21.2%,然后依次是木聚糖酶、木瓜蛋白酶;3种酶的不同组合均未达到β-葡聚糖酶的提取效果。

2.1.2 不同温度对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察β-葡聚糖酶在不同提取温度条件



(空白-不加酶;A—木瓜蛋白酶;B—木聚糖酶;C—β-葡聚糖酶;
 A+B—1:1;A+C—1:1;B+C—1:1;A+B+C—1:1:1)
 Blank;without enzyme A:papain;B:xylanase;C:β-glucanase;
 A+B;1:1;A+C;1:1;B+C;1:1;A+B+C;1:1:1

图 1 不同种类的酶对花青素提取率的影响

Fig 1 Effect of enzymatic types on the extraction of anthocyanins

下对花青素提取率的影响,结果如图2所示。随温度的提高,提取率呈现先升后降的趋势,当温度为 30℃,提取率出现最大值。原因在于温度太低酶的活性不能被激活,温度太高不仅酶活性被抑制,且花青素容易降解。故提取温度以30℃为宜。

2.1.3 酶用量对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察β-葡聚糖酶不同用量对花青素提取率的影响,结果如图3所示。随着加酶量的增大,花色素的提取率呈现先升后降的趋势,当β-葡聚糖酶用量达到 $5.0\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,花色素的提取率达

最大值。原因是 β -葡聚糖酶因为当酶与溶液充分作用后,继续增加酶的用量并不能使花青素释放,故呈现平缓趋势,考虑到提取率和工业化生产,故选用酶量为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.1.4 提取时间对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察加入 β -葡聚糖酶后,提取时间对花青素提取率的影响,结果如图4所示。随提取时间的延长,花青素提取率呈先升后平缓的趋势,20 min时出现最大值。因为酶解反应需要一定时间,但是当其充分反应后,花青素的提取率便不会再增加了,故提取时间 20 min 为宜。

2.1.5 料液比对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察不同的料液比对花青素提取率的影响。结果如图5所示,随料液比的升高而增大,花青素提取率呈现先升后降的趋势,当料液比为1:20时提取率出现最大值。因为随着溶剂量的增加,一是会降低酶的浓度,导致其作用效果不明显;二是会加大其他杂质的提取量,导致花青素的提取量降低,故选择料液比为 1:20。

2.1.6 醇浓度对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察醇浓度对花青素提取率的影响。结果如图 6 所示,随体系中的醇浓度的增大,花青素的提取率呈现先升后降的趋势,在醇浓度达 55%时,花青素提取率最高。因为花青素属于黄酮类化合物,可溶于水和乙醇等极性溶剂,当花青素的极性和溶剂的极性越接近时,其提取率就越好,但是随着乙醇浓度的增大,溶剂的极性相对变小,与花青素的极性差距变大,导致其提取率降低,故选用 55%的醇浓度最佳。

2.1.7 pH 值对花青素提取率的影响 在基本工艺基础上,考察醇浓度对花青素提取率的影响。结果如图 7 所示,随溶剂中 pH 值的增大,花青素的提取率呈现先上升后降的趋势,在 pH 值为 3 的时候有最大值。因为当 pH 为 3 的时候达到峰值,故选用 pH 值为 3 最佳。

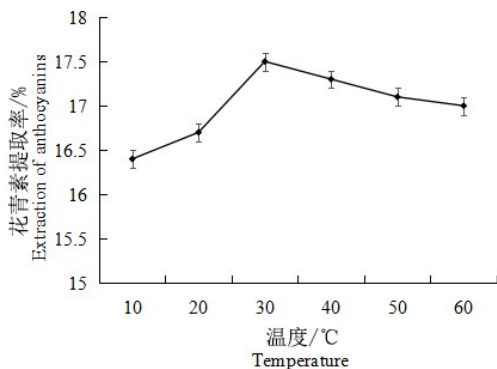


图 2 温度对花青素提取率的影响

Fig 2 Effect of temperature on anthocyanins extraction rate

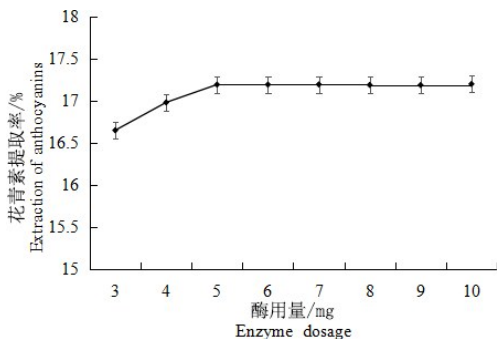


图 3 酶用量对花青素提取率的影响

Fig 3 Effect of enzyme addition on anthocyanins extraction rate

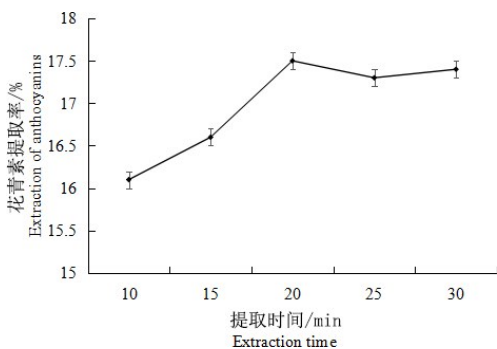


图 4 提取时间对花青素提取的影响

Fig 4 Effect of extraction time on anthocyanins extraction rate

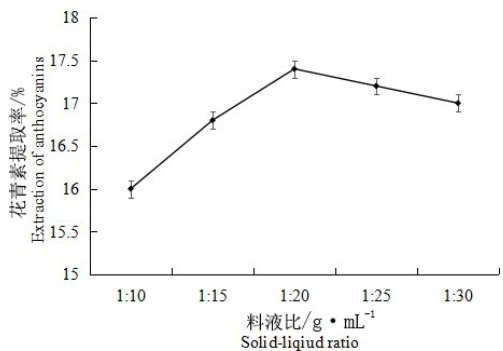


图 5 料液比对花青素提取的影响

Fig 5 Effect of solid to liquid ratio on anthocyanins

extraction rate

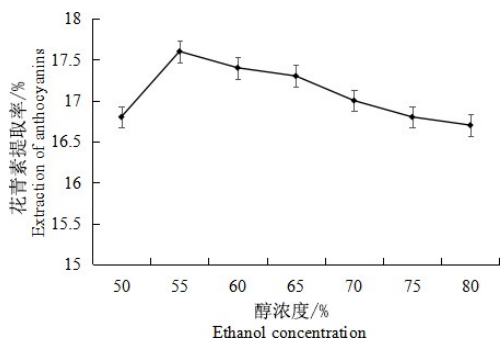


图 6 乙醇浓度对花青素提取的影响

Fig 6 Effect of ethanol concentration on anthocyanins

extraction rate

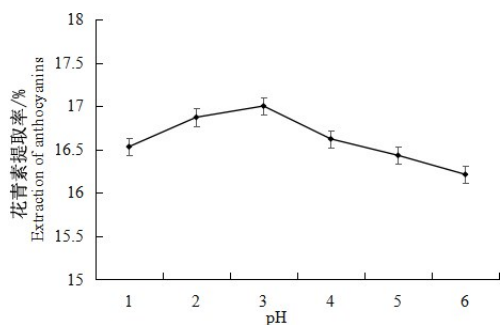


图 7 pH 值对花青素提取的影响

Fig 7 Effect of pH on anthocyanins extraction rate

2.2 星点设计分析 以体系的醇浓度、超声时间、料液比为自变量,以花青素提取率为评价指标,星点设计结果如表 2。

2.2.1 模型拟合及方差分析 17 个统计设计试验

表 2 星点试验设计与结果

Tab 2 Arrangement and results of central composite design

No.	A	B	C	Extraction rate/%
1	70	25	1 : 25	18.692
2	40	15	1 : 25	17.499
3	80	20	1 : 20	17.492
4	40	15	1 : 15	17.462
5	40	25	1 : 15	17.520
6	30	20	1 : 20	16.562
7	70	15	1 : 15	17.890
8	55	10	1 : 20	18.531
9	70	25	1 : 15	18.578
10	55	20	1 : 20	19.156
11	55	20	1 : 20	19.156
12	40	25	1 : 25	17.557
13	55	30	1 : 20	18.875
14	55	20	1 : 20	19.156
15	55	20	1 : 30	18.672
16	55	20	1 : 10	17.739
17	70	15	1 : 25	18.320

通过不同物理参数来优化自变量(体系醇浓度,提取时间和料液比)对蓝莓粉中花青素提取率的综合影响。花青素提取率在不同实验条件下的结果如表 2 所示,数据用 Design Expert 8.0.6 软件分析,得到二项式方程如下:

$$Y = 19.15 + 0.37X_1 + 0.13X_2 + 0.16X_3 + 0.12X_1X_2 + 0.059X_1X_3 - 0.04X_2X_3 - 0.75X_1^2 - 0.15X_2^2 - 0.33X_3^2$$

Y 是花青素提取率, X_1 , X_2 , X_3 是体系醇浓度,提取时间,料液比。

为检验该模型的显著性及准确性,进行了方差分析(ANOVA),如表 3 所示。模型的 F 值为 30.24 意味着模型的显著性。模型的 F 值只有 0.01% 与噪音等因素有关。在此实验中,一次项 A、C,二次项 A^2 、 C^2 在模型中有极显著性,一次项 B,二次项 B^2 有显著性。失拟项的 F 值为 26.13,意味着相对于纯粹的错误来说,失拟项显著,具有一定的意义。Adj $R^2 = 0.9427$ 与 Pred $R^2 = 0.8073$ 不接近,表明了实验模型有较好的解释性。通常是 Adeq Precision 大于 4 认为是具有可信度的,该比例是 19.450,说明此模型对蓝莓中花青素的提取是可行的。

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis variance

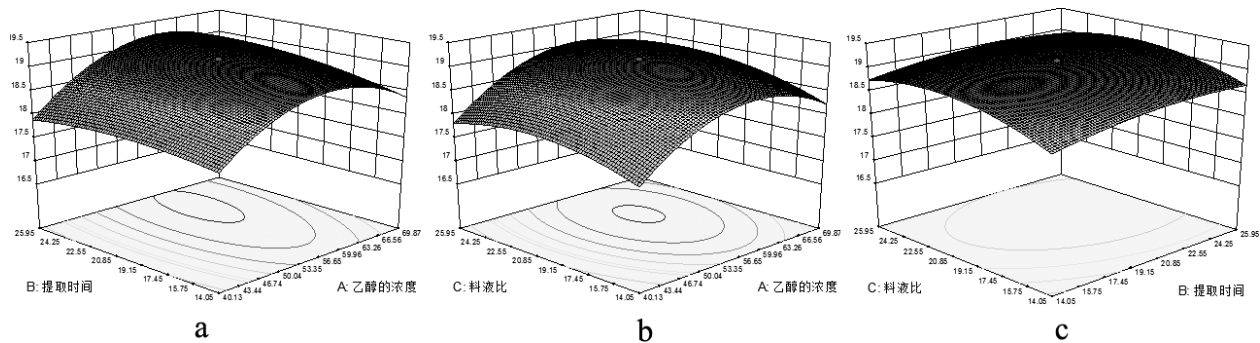
Sum of Source	Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	9.08	9	1.01	30.24	<0.0001 * *
A-ethanol concentration	1.84	1	1.84	54.99	0.0001 * *
B-extraction time	0.32	1	0.23	6.76	0.0355 *
C-stock ratio	0.35	1	0.35	10.50	0.0143 *
AB	0.11	1	0.11	3.34	0.1104
AC	0.028	1	0.028	0.83	0.3932
BC	0.012	1	0.012	0.37	0.5601
A ²	6.26	1	6.26	187.74	<0.0001 * *
B ²	0.26	1	0.26	7.90	0.0261 *
C ²	1.22	1	1.22	36.52	0.0005 * *
Residual	0.23	7	0.033		
Lack of Fit	0.23	5	0.047	26.13	0.01 *
Pure Error	0.000	2	0.000		
Cor Total	9.32	16			

$R^2 = 0.9749$, $Adj R^2 = 0.9427$, $Pred R^2 = 0.8073$, $Adeq Precision = 19.450$, $C.V.\% = 1.01$

注: ** 表示 $P < 0.01$, 表示有极显著差异; * 表示 $P < 0.05$, 表示有显著差异。

2.2.2 工艺参数优化和预测 通过二项式拟合模型, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件做相应响应曲面图, 结果见图 8a、8b、8c, 根据拟合的响应曲面形状, 研究体系醇浓度、提取时间和料液比对蓝莓干粉中

花青素提取率的影响, 从图中可以看出, 最佳的提取工艺是醇浓度 55%, 提取时间 20 min, 料液比为 1 : 20。



a. 醇浓度与提取时间; b. 醇浓度与料液比; c. 提取时间与料液比

(A) Alcohol concentration and extraction time; (B) Alcohol concentration and liquid ratio; (C) Extraction time and liquid ratio

图 8 醇浓度、提取时间和料液比相互拟合对花青素提取率影响的三维效应面图

Fig 8 Alcohol concentration, extraction time and liquid ratio to fit each other of the three-dimensional view of the effect of the anthocyanins extraction rate

2.2.3 验证试验 根据最佳工艺条件进行 3 次验证试验, 体系醇浓度 55%, 提取时间 20 min, 料液比 1 : 20。模型预计的响应值是 19.156%, 实际花青

素平均提取率是 19.018%。将预测值与实测值进行比较, 计算偏差 RSD 值为 0.7%, 说明此数学模型可靠, 具有良好的预测性。

3 讨论与小结

蓝莓花青素是一种水溶性色素,具有广泛的生物活性及应用范围,但其稳定性差且提取率低^[9],故增大其提取率是现在蓝莓应用市场的研究重点。针对于本实验中选用的酶^[10,17]而言, β -葡聚糖酶能水解植物细胞壁纤维素,使细胞内的物质更容易析出;木瓜蛋白酶是一种蛋白水解酶,能水解植物中细胞中的蛋白质;木聚糖酶能水解植物细胞壁中的异质多糖,而促使细胞壁破裂;但是由于植物细胞壁主要由纤维素和果胶构成,故作用于细胞壁纤维素的 β -葡聚糖酶提取效果更好。

对于提取方法而言,酶-辅助超声提取技术与酶法^[10-11]相比,能明显缩短提取时间,酶法提取需要 1~2 h,而酶-辅助超声提取仅需要 15~30 min;与超声提取法^[12-14]相比,能减少提取溶剂的使用量,超声提取法需醇浓度为 70~80%,酶-辅助超声提取技术则需醇浓度为 55%左右;对于内在因素提取率而言,不论是酶法或是超声提取法,蓝莓果提取率在 4%~7%之间,换算成干粉其提取率在 13%~14%左右,而酶-辅助超声得到的花青素的提取率为 19.156%,比常规的酶法或超声法提高了约 20%~30%。本文通过酶-辅助超声提取技术^[13-14]对体系醇浓度、提取时间、料液比 3 个重要因素进行了研究,以花青素的提取率为优化指标,采用星点设计-效应面法进行工艺优化^[15-17]。建立酶-超声辅助提取蓝莓中花青素的最佳工艺为:添加 β -葡聚糖酶,提取体系的醇浓度为 55%,提取时间 20 min,料液比 1:20 g·mL⁻¹,提取率可达 19.156%。酶-辅助超声提取法提高了蓝莓中花青素的提取率,且提取时间短,可操作性强,利于蓝莓花青素在治疗人和动物疾病等方面的开发利用。

参考文献:

- [1] 《中国植物志》编委会,中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 1991, 57(3): 147-156.
《Chinese Flora》Editorial Board, Chinese Flora[M]. Beijing: Science Press, 1991, 57(3): 147-156.
- [2] Fernandes I, Marques F, Freitas V D, *et al.* Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2923-2933.
- [3] Kong J M. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 923-933.
- [4] Wang L S. Anthocyanins and their role in cancer prevention [J]. Cancer Letters, 2008, 269(2): 281-290.
- [5] Li R, Wang P, Guo Q Q, *et al.* Anthocyanin composition and content of the vaccinium uliginosum berry [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 116-120.
- [6] 康雪燕. 猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白在毕赤酵母中的分泌表达及免疫原性分析[D]. 山东农业大学, 2010.
Kang X Y. Secretary expression and immunogenicity analysis of swine infectious gastroenteritis virus s protein in pichia pastoris [D]. Shandong Agricultural University, 2010.
- [7] 杨豆, 张卫波, 赵倩芸, 等. 花青素的生物活性及其在饲料上的应用[J]. 湖南饲料, 2016, 03: 25-27.
Yang D, Zhang W B, Zhao Q Y, *et al.* The biological activity of anthocyanin and its application in feed [J]. Feed of Human province, 2016, 03: 25-27.
- [8] Carrera C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, *et al.* Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 732: 100-104.
- [9] Wang L J, Su S, Wu J, *et al.* Variation of anthocyanins and flavonols in vaccinium uliginosum berry in lesser khingan mountains and its antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2014, 160: 357-364.
- [10] 向道丽. 酶法提取越桔果渣花色苷酶解条件的研究[J]. 中国林副特产, 2005(6): 1-3.
Xiang D L. Study of enzymatic hydrolysis conditions in enzymatic extraction of vaccinium vitis-idaea fruit residue anthocyanins [J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2005(6): 1-3.
- [11] Cai Z, Qu Z Q, Lan Y, *et al.* Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 266-272.
- [12] Virachnee L, Mary M, George S, *et al.* Determination of anthocyanins

- anins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries [J]. *Food Chemistry*, 2008, 111: 249-254.
- [13] Wu Y, Wang Y, Zhang W, *et al.* Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system [J]. *Separation & Purification Technology*, 2014, 124 (6): 170-178.
- [14] 赵尔丰, 高畅, 高欣, 等. 酶-超声波辅助提取蓝莓果渣中花青素的工艺研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41 (4): 98-102.
- Zhang E F, Gao C, Gao X, *et al.* Study on extraction procedure of anthocyanins from blueberry pomace by enzymatic-ultrasonic-assisted extraction [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41 (4): 98-102.
- [15] 黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (17): 28-31.
- Huang Y H, Wei T X, Zhang F S, *et al.* Optimal extraction of effective constituents from radix salvia based on central composite design/response surface methodology [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2010, 16 (17): 28-31.
- [16] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. *国外医学药学分册*, 2007, 27 (5): 292-297.
- Wu W G, Cui G H. Its Application in pharmacy based on central composite design [J]. *Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy*, 2007, 27 (5): 292-297.
- [17] Chen F L, Du X Q, Zu Y G, *et al.* A new approach for preparation of essential oil, followed by chlorogenic acid and hyperoside with microwave-assisted simultaneous distillation and dual extraction (MSDDE) from *Vaccinium uliginosum* leaves [J]. *Industrial Crops and Products*, 2015 (77): 809-826.

(编辑:陈希)