

石榴皮超微粉制备工艺优化及体内抗氧化研究

祖元刚, 钟 晨, 赵修华*, 吴微微, 李媛媛, 冯子奇

东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要:目的 考察石榴皮 *Granati Pericarpium* 超微粉的制备工艺以及石榴皮超微粉体内抗氧化能力。方法 通过单因素试验与响应面分析法对石榴皮超微粉的制备工艺进行优化, 选取最优条件下制备的石榴皮超微粉、石榴皮粗粉、水溶性维生素 E (VE) 和生理盐水 (空白对照) 进行大鼠体内抗氧化研究。结果 石榴皮超微粉制备工艺的最佳条件为粉碎时间 25 min、粉碎温度 -17 ℃、进料量 198 g, 在该条件下验证石榴皮超微粉粒径可达到 7.68 μm, 接近于预测值 7.96 μm。优化得到的回归模型具有良好的预测能力。石榴皮超微粉组和 VE 组相对于石榴皮粗粉组和空白对照组可以显著提高大鼠的血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活力, 并有效减少血清中丙二醛 (MDA) 的量。结论 石榴皮超微粉具有较强的抵御膜脂质过氧化和清除血清中自由基的能力, 这表明石榴皮超微粉中的活性成分较粗粉可以更快、更好地得到释放, 从而表现出更强的体内抗氧化活性。

关键词: 石榴皮; 超微粉; 加工工艺; 粒径; 抗氧化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)10-1454-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.009

Optimization of processing technology and study on antioxidant activity *in vivo* of superfine powder of *Granati Pericarpium*

ZU Yuan-gang, ZHONG Chen, ZHAO Xiu-hua, WU Wei-wei, LI Yuan-yuan, FENG Zi-qi

Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective Processing technology and antioxidant activity *in vivo* of pomegranate superfine powder were investigated. **Methods** Processing technology of superfine powder of *Granati Pericarpium* was optimized using single-factor tests and response surface methodology (RSM). The antioxidant effect *in vivo* of superfine powder of *Granati Pericarpium* with different particle, vitamin E, and normal saline were studied. **Results** The optimally grinding conditions for *Granati Pericarpium* were grinding time of 25 min, grinding temperature of -17 ℃, and input quantity of 198 g. Under the optimally grinding conditions, the minimum particle size of superfine powder of *Granati Pericarpium* was 7.68 μm which was close to the predicted value of 7.96 μm. Therefore, the established regression model has good prediction capability. Experimental results show that the superfine powder and vitamin E groups compared with the coarse powder and blank groups could significantly improve the activity of SOD, CAT, and GSH-Px, and reduce the content of MDA in serum of mice. **Conclusion** The ability of superfine powder group on the protection of membrane lipid peroxidation and scavenge free radical is quite superior. It indicates that the active ingredients in the superfine powder of *Granati Pericarpium* could be dissolved better and more quickly in solvent than those in coarse powder. Therefore, the superfine powder of *Granati Pericarpium* has the better anti-oxidant effect *in vivo*.

Key words: *Granati Pericarpium*; superfine powder; processing technology; particle size; anti-oxidation

石榴 *Punica granatum* L. 为石榴科 (Punicaceae) 石榴属 *Punica* L. 植物, 是一种集食用、药用、观赏于一身的植物。大量的研究已经证明石榴具有抗氧化^[1]、降血压^[2]和抗癌^[3]的作用。目前, 石榴最主

要的消费途径是鲜食, 或者被加工成果汁、果酱和果酒。石榴皮作为一种重要的中药材, 具有涩肠止泻、止血、驱虫之功效, 常用于久泻、久痢、便血、脱肛、崩漏、带下、虫积腹痛。石榴皮中富含多酚、

收稿日期: 2015-01-28

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD21B05)

作者简介: 祖元刚 (1954—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事植物药物开发研究。

*通信作者 赵修华, 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: xiuhua Zhao@nefu.edu.cn

多糖、生物碱及苹果酸等多种成分。这些成分具有消炎、抗菌、抗氧化、调节免疫等功效^[4]。尽管石榴皮具有非常良好的药用价值,但目前对石榴皮超微粉制备和不同粒度粉体体内抗氧化活性还没有系统的研究。超微粉碎技术作为一种新兴工艺技术,物料经过超微粉碎后,使得形成的粉体具有了良好的表面性能,如优越的分散性和溶解性。由于新生成粒子具有良好的表面效应、量子尺寸效应、小尺寸效应及量子隧道效应等显著特性,超微粉碎技术已经广泛应用于电工、医药、化工、陶瓷、造纸等领域。为提高粉碎效率和效果,本实验采用LWF6-BI型振动低温粉碎机,其运用高速撞击力和剪切力,使物料在磨筒内受到介质的挤压、剪切和撕裂作用,极大地缩短粉碎时间,提高了粉碎效率;同时因具备零下低温粉碎能力,增强了含糖物料的粉碎效果,从而可更广泛的应用于生产中。本实验通过响应面分析法(response surface methodology, RSM)结合Box-Behnken设计方法,以多元二次回归方程将各因素与响应值之间的函数关系用多项式进行拟合,可以通过对回归方程以及响应面的分析寻求最佳超微粉碎工艺条件^[5-9]来制备粒径最优的石榴皮超微粉,并通过大鼠体内抗氧化实验来验证不同粒度的石榴皮粉体具有不同的抗氧化活性。

1 仪器与材料

摇摆式高速中药粉碎机,浙江顶帅五金制品有限公司;LWF6-BI低温超微粉碎机,济南龙微制药设备有限公司;BT-9300 激光粒度仪,丹东百特仪器有限公司;Quanta-200 型扫描电镜(SEM),美国FEI公司;UV2550 紫外分光光度计,日本Shimadzu公司;3K-30 超速离心机,美国Sigma公司;电热恒温水浴锅HHS-11-1,天津泰斯特仪器有限公司;BS-124S 电子天平,北京赛多利斯仪器有限公司;DHG-9203A 电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司。

石榴皮购于河北省石药大药房,经东北林业大学毛子军教授鉴定为石榴科石榴属植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮。VE 醋酸酯微囊粉(*dl*- α -醋酸生育酚质量分数 $\geq 50\%$,批号2013041702)购于广东天和诚科技有限公司。昆明种大鼠16只,体质量(200 ± 10)g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供的清洁级实验动物,许可证号SCXK(沪)2007-0005;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧

化氢酶(CAT)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 单因素试验

将石榴皮放入鼓风干燥箱中低温烘干至含水量约为7%,使用普通中药粉碎机进行粗粉碎,把粗粉加入超微粉碎机中进行粉碎加工。结合石榴皮的特性与超微粉碎机的容量和功能,按照粉碎时间5~25 min、粉碎温度 $-20 \sim 0$ °C、进料量100~500 g。分别考察粉碎时间、粉碎温度、进料量对石榴皮超微粉粒径的影响。取适量石榴皮超微粉分散在适量去离子水中,用激光粒度检测仪检测 D_{10} 、 D_{50} 、 D_{90} 值,并根据3项数据得出SPAN值(SPAN为分布跨度,表示较大颗粒与较小颗粒直径差与平均直径的相对变化率)。

2.1.1 粉碎时间对石榴皮超微粉粒径的影响 取200 g石榴皮粗粉,在 -20 °C下进行超微粉碎,分别在5、10、15、20、25 min取少量样品检测,结果超微粉中位粒径 D_{50} 值分别为37.51、30.21、16.66、7.57、7.92 μm 。在粉碎初期,随着粉碎时间的增加,粒径快速减小,超过20 min后,物料粒径逐渐趋于平稳后略有增加。其原因是由于当粉碎机中的物料粒径下降到一定程度后,相对比表面积增加,颗粒之间彼此发生团聚现象;部分糖类成分释放使得超微粉有一定的黏性,但粉碎过程中是在低温状态下进行的,从而使得物料的粒径大小不会有过大的反弹。因此,粉碎时间应控制在20~25 min。

2.1.2 粉碎温度对石榴皮超微粉粒径的影响 取200 g石榴皮粗粉,分别在 -20 、 -15 、 -10 、 -5 、 0 °C温度下粉碎20 min,取少量样品检测,结果超微粉中位粒径 D_{50} 值分别为7.98、10.02、15.75、25.45、31.67 μm 。随着温度的降低,平均粒径也逐渐减小,当温度下降到 -15 °C时,平均粒径逐渐趋于平稳。其原因是由于粉碎过程中物料粒径减小到一定程度时,石榴皮中部分糖分被释放出来,在一定温度下会导致颗粒彼此团聚,从而粒径无法达到理想状态,但当温度下降到一定范围时糖分被暂时冷冻,从而阻止颗粒之间彼此发生团聚,但在实际操作过程中温度很难控制在 -20 °C以下。因此,粉碎温度应控制在 $-20 \sim -15$ °C。

2.1.3 进料量对石榴皮超微粉粒径的影响 分别取100、200、300、400、500 g石榴皮粗粉在 -20 °C条件下,粉碎20 min,取少量样品检测,结果超微

粉中位粒径 D_{50} 值分别为 13.33、8.06、15.46、26.19、35.34 μm 。过高或过低的进料量均不利于超微粉碎，其原因是由于超微粉碎设备是利用振动过程中钢棒之间的挤压力和摩擦力使物料粉碎，当进料量较少时，粉碎设备中钢棒之间空隙相对增大，物料所受挤压力与摩擦力随之变弱；当进样量增加时，挤压力逐渐增大，有利于粉碎的进行；当进料量高于一定限度时，超微粉碎设备内部空间减小，不利于物料流动，制约了粉碎的进行。因此，进料量控制在 100~300 g 效果较好。

2.2 RSM 优化石榴皮超微粉碎条件

依据 Box-Behnken 实验设计原理^[10]，基于单因素试验的结果，以粉碎时间 (X_1)、粉碎温度 (X_2)、进料量 (X_3) 作为自变量，分 3 个水平，采用 RSM 对超微粉碎条件进行优化。 D_{50} 作为一个样品的累计粒度分布百分数，常用来表示平均粒径， D_{50} 相对于 D_{10} 和 D_{90} 为一个相对优越的数值依据，因此本实验采用 D_{50} 值作为响应值。设计试验方案及结果见表 1。

采用 Design Expert 7 程序对不同水平下石榴皮超微粉的 D_{50} 进行 ANOVA 分析，并对 RSM 作 3D 图，结果见表 2 和图 1。经拟合分析得到响应值 D_{50}

表 1 RSM 实验方案及结果

Table 1 Program and experimental results of RSM

序号	X_1/min	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/g	$D_{50}/\mu\text{m}$
1	15 (-1)	-10 (1)	200 (0)	17.52
2	25 (1)	-20 (-1)	200 (0)	7.88
3	20 (0)	-20 (-1)	300 (1)	16.40
4	20 (0)	-10 (1)	300 (1)	18.19
5	20 (0)	-15 (0)	200 (0)	10.74
6	15 (-1)	-20 (-1)	200 (0)	15.52
7	25 (1)	-15 (0)	300 (1)	14.81
8	20 (0)	-15 (0)	200 (0)	11.04
9	20 (0)	-15 (0)	200 (0)	10.21
10	15 (-1)	-15 (0)	100 (-1)	19.25
11	20 (0)	-20 (-1)	100 (-1)	17.12
12	25 (1)	-15 (0)	100 (-1)	13.52
13	20 (0)	-10 (1)	100 (-1)	19.04
14	25 (1)	-10 (1)	200 (0)	11.61
15	20 (0)	-15 (0)	200 (0)	10.09
16	15 (-1)	-15 (0)	300 (1)	20.19
17	20 (0)	-15 (0)	200 (0)	10.31

表 2 RSM 分析结果

Table 2 Results of RSM analysis

方差来源	平方和	自由度	F 值	显著性
模型	240.31	9	50.59	<0.000 1
X_1	18.73	1	35.48	0.000 6
X_2	19.51	1	36.96	0.000 5
X_3	6.667×10^{-3}	1	0.013	0.913 7
X_1X_2	0.75	1	1.42	0.272 6
X_1X_3	0.031	1	0.058	0.816 5
X_2X_3	4.225×10^{-3}	1	8.006×10^{-3}	0.931 2
X_1^2	3.84	1	7.27	0.030 8
X_2^2	12.16	1	23.05	0.002 0
X_3^2	127.82	1	242.19	<0.000 1
残差	3.69	7		
失拟项	3.06	3	6.42	0.052 1
纯误差	0.64	4		
总和	244	16		

的回归方程为 $Y = 13.36 - 2.65 X_1 + 9.16 X_2 + 0.05 X_3 + 0.87 X_1X_2 + 0.088 X_1X_3 - 0.065 X_2X_3 + 0.95 X_1^2 + 6.80 X_2^2 + 5.51 X_3^2$ 。

从响应面优化对 D_{50} 的分析结果可以看出本试验中方法精密度高 (变异系数 $CV = 5.07\%$)、方法可靠性强 (模型 $P < 0.001$)、模型与试验数据相符 ($P = 0.052 1 > 0.05$)，方程拟合度好 ($R^2 = 0.984 9$ ， $R_{\text{adj}}^2 = 0.965 4$)。通过对 X_1 、 X_2 、 X_3 3 个因素水平的最优化组合方案分析，当 $X_1 = 25.00 \text{ min}$ 、 $X_2 = -17.37 ^\circ\text{C}$ 、 $X_3 = 198.27 \text{ g}$ ，即粉碎时间为 25 min，粉碎温度为 $-17.37 ^\circ\text{C}$ ，进料量为 198.27 g 时能达到最佳的粉碎效果，石榴皮超微粉的 D_{50} 可达 7.96 μm 。为提高实际生产操作的可行性，粉碎时间取 25 min、粉碎温度设定为 $-17 ^\circ\text{C}$ 、进料量调整为 198 g。验证试验中，3 次平行试验石榴皮超微粉 D_{10} 值分别为 4.36、3.68、3.83 μm ，平均值为 3.95 μm ； D_{50} 值分别为 7.03、7.57、8.43 μm ，平均值为 7.68 μm ； D_{90} 值分别为 12.31、11.29、10.72 μm ，平均值为 11.44 μm ；SPAN 值为 0.97。其中 D_{50} 平均值接近预测值 7.96 μm ，说明优化得到的回归模型具有良好的预测能力。

2.3 石榴皮粉体形态观察与粒径考察

使用 SEM 检测石榴皮粗粉与超微粉的形貌。将样品放在铝盘表面的碳条上，检测之前用溅射镀膜机喷金 5 min，制备好的样品用 SEM (Quanta 200，

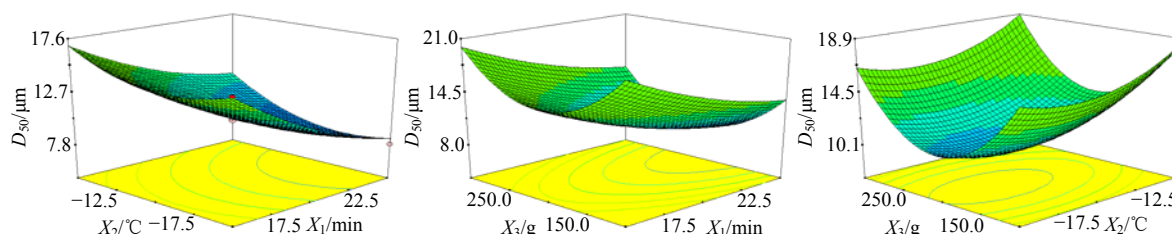


图 1 粉碎时间 (X_1)、粉碎温度 (X_2)、进料量 (X_3) 对 D_{50} 的 RSM
Fig. 1 RSM of grinding time (X_1), grinding temperature (X_2), and input quantity (X_3) on D_{50}

FEI) 进行检测。由图 2 可知, 石榴皮粗粉与超微粉均呈现不规则形状, 粗粉彼此间分散较好, 超微粉小颗粒吸附在大颗粒周围, 出现了轻微的团聚, 从而也验证了超微粉颗粒之间的团聚现象。

使用 BT-9300 激光粒度仪检测样品的粒径大小, 从而验证预测值的准确度。样品的粒径分布如图 3 所示。

2.4 石榴皮中水溶性活性成分对大鼠体内抗氧化能力的影响

2.4.1 抗氧化实验体系的建立 将雌性大鼠按体重随机分成 4 组: 石榴皮超微粉组 (200 mg/kg, $D_{50}=7.68\ \mu\text{m}$)、石榴皮粗粉组 (200 mg/kg, 粒径 300~500 μm)、VE 组 (25 mg/kg)、生理盐水空白对照组, 每组 4 只雌性大鼠, 根据体重将按设定的剂量每天定时 ig 1 次, 空白对照组用等量的生理盐水; 每项实验连续进行 4 周, 自由饮食饮水。

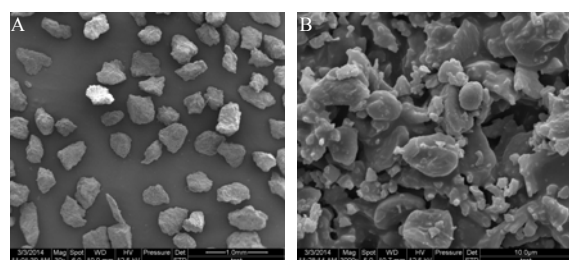


图 2 石榴皮粗粉 (A) 与超微粉 (B) 的 SEM 图
Fig. 2 SEM images of coarse powder (A) and superfine powder (B)

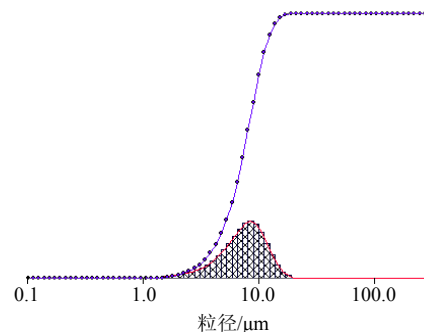


图 3 石榴皮超微粉的粒径分布曲线
Fig. 3 Particle size distribution of superfine powder of *Granati Pericarpium*

2.4.2 大鼠血清的处理与指标检测 大鼠连续 ig 4 周后, 最后 1 次 ig 后禁食 12 h, 自由饮水, 分别称取各组大鼠体质量, 眼眶取血, 置于含有 1% 肝素的离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集血清, -20 °C 保存待测。严格按照试剂盒的要求操作, 测定 SOD、MDA、GSH-Px 和 CAT 4 个指标, 并与 VE 组和空白对照组进行比较。

2.4.3 统计分析 用 SPSS 软件对所检测数据进行统计分析, t 检验, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4.4 实验结果与分析 本实验检测了石榴皮超微粉组、石榴皮粗粉组、VE 组和空白对照组的大鼠血清中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活力与 MDA 的量, 结果见表 3。从表 3 中可以看出, 石榴皮超微粉组与 VE 组血清中的 SOD 活力显著高于空白对照组

表 3 大鼠血清中 SOD 活性、MDA 的量、CAT 活性和 GSH-Px 活性测定结果
Table 3 SOD activity, MDA content, CAT activity, and GSH-Px activity in serum of rats

组别	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
石榴皮超微粉	117.69 ± 1.63**	5.39 ± 0.029**	6.59 ± 0.069**	614.61 ± 9.18**
石榴皮粗粉	97.07 ± 1.97	7.14 ± 0.057**	2.91 ± 0.037*	563.82 ± 6.11*
VE	105.15 ± 1.31**	5.96 ± 0.076**	5.82 ± 0.073**	600.34 ± 6.87**
空白对照	96.43 ± 1.57	11.93 ± 0.096	2.64 ± 0.024	550.96 ± 7.18

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group

($P<0.01$), 石榴皮粗粉组中血清的 SOD 活力与空白对照组相比无显著差异, 石榴皮超微粉组血清中的 SOD 活力略优于 VE 组。说明石榴皮中水溶性有效成分可以提高大鼠体内的 SOD 活力。大鼠体内抗氧化酶的活力高低反映了机体清除自由基能力的强弱。这进一步表明石榴皮中的水溶性活性成分可以清除大鼠体内过量的超氧阴离子自由基, 提高大鼠体内血清的抗氧化能力。

石榴皮超微粉组、石榴皮粗粉组和 VE 组中血清的 MDA 的量均低于空白对照组, VE 组中血清中 MDA 的量低于石榴皮粗粉组, 石榴皮超微粉组血清中 MDA 的量与 VE 组的差异不显著, 说明石榴皮中的水溶性活性成分可以降低大鼠体内血清中的 MDA 的量, 从而减轻小鼠体内膜脂质过氧化过程。

血清中各组 CAT 活性高低为石榴皮超微粉组>VE 组>石榴皮粗粉组>空白对照组。石榴皮超微粉组与 VE 组、石榴皮粗粉组血清中的 CAT 活性均显著高于空白对照组 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明一定量的石榴皮中水溶性活性成分可提高大鼠血清中的 CAT 活性, 从而增加其抗氧化能力。

血清中 GSH-Px 活力最高的是石榴皮超微粉组, 其次是 VE 组, 两者均极显著高于空白对照组 ($P<0.01$)。这表明石榴皮超微粉组的大鼠的 GSH-Px 的量较高, 该酶可清除大鼠体内过多的自由基和衍生物, 并且还可以与过氧化氢酶构成不同的基质特异性的多水平的还原有机氧过氧化物系统, 减少脂质过氧化物的形成, 增强大鼠的抗氧化能力, 从而保护细胞的结构和功能不受氧化损伤。

3 讨论

利用响应面分析法对石榴皮超微粉的制备工艺进行优化。通过单因素试验分别考察粉碎时间、粉碎温度、进料量对石榴皮超微粉粒径的影响, 选取适当的试验因素水平, 利用 Design Expert 软件和 Box-Behnken 设计法设计响应面试验, 对各个因素的显著性和交互作用进行分析。选取最优条件下制备的石榴皮超微粉、石榴皮粗粉、水溶性 VE 和生理盐水进行大鼠体内抗氧化研究。结果表明, 石榴皮超微粉制备工艺的最佳条件为粉碎时间 25 min、粉碎温度 -17°C 、进料量 198 g, 在该条件下验证石榴皮超微粉粒径可达到 $7.68\text{ }\mu\text{m}$, 接近于预测值 $7.96\text{ }\mu\text{m}$ 。优化得到的回归模型具有良好的预测能力。

SOD 是生物体内一种重要的酶类自由基清除剂, 具有维持活性氧代谢平衡, 保护膜结构的功能。SOD 能够清除体内的氧自由基, 从而对机体的氧化与抗氧化的平衡起重要作用。SOD 活力的高低可间接反映机体清除自由基能力的强弱。MDA 是动物体内多元不饱和和脂质氧化的终产物之一, 其浓度的高低可以反映体内不饱和脂质的过氧化程度, 间接地反映出细胞膜的损伤程度^[1]。羟自由基是化学性质最活泼的活性氧, 它对机体的破坏性极强, 但它可以被 CAT 分解, 保护机体细胞稳定的内环境及细胞的正常生活。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。它能催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 变为氧化型谷胱甘肽 (GSSG), 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进过氧化氢的分解, 从而保护细胞膜的结构以及功能免受过氧化物的损害。生物体内自由基处于生物生成体系与生物防护体系的平衡之中, 该 2 大体系均可由酶调控^[12]。血清中活性氧自由基导致脂质过氧化而产生大量的 MDA, SOD、GSH-Px、CAT 是体内生物防护体系中最重要抗氧化酶, 是体内自由基清除剂, 在机体抗自由基损伤中起着重要作用^[13]。通过对大鼠血清中 SOD 活性、MDA 的量、CAT 活性和 GSH-Px 活性测定得知, 石榴皮中水溶性活性成分可以有效制约体内氧化现象的发生, 其体内抗氧化能力略优于水溶性 VE。相对于石榴皮粗粉, 超微粉较大的比表面积使得石榴皮中各种水溶性有效成分能够更快地释放, 极大地提高了生物利用度。从而导致了二者在大鼠体内抗氧化能力的差异。

参考文献

- [1] Çam M, Hışıl Y, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods [J]. *Food Chem*, 2009, 112(3): 721-726.
- [2] Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 158(1): 195-198.
- [3] Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, et al. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102(41): 14813-14818.
- [4] Murthy K N, Reddy V K, Veigas J M, et al. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 256-259.
- [5] Baş D, Boyacı İ H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology [J]. *J Food*

- Eng, 2007, 78(3): 836-845.
- [6] 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(5): 965-977.
- [7] Hanrahan G, Lu K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2006, 36(3/4): 141-151.
- [8] Steinberg D M, Bursztyn D. Response surface methodology in biotechnology [J]. *Qual Eng*, 2010, 22(2): 78-87.
- [9] Tarley C R T, Silveira G, Santos W, *et al.* Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology [J]. *Microchem J*, 2009, 92(1): 58-67.
- [10] 费荣昌. 试验设计与数据处理 [M]. 无锡: 江南大学出版社, 2001.
- [11] 赵春艳. 沙葱中黄酮类化合物的分离纯化、结构鉴定及其对小鼠免疫抗氧化机能影响的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [12] Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts [J]. *Food Chem*, 2007, 104(1): 21-29.
- [13] Binsan W, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Food Chem*, 2008, 106(1): 185-193.