Box-Behnken响应面实验优化鳖血冻干粉的制备工艺Δ

娄　悦[1*]，苏雪蓉[1]，毛春芹[1]，赵晓莉[1]，陆兔林[1,2]，皮文霞[1#]（1.南京中医药大学药学院，南京　210023；2.国家中医药管理局中药炮制传承基地，南京　210023）

中图分类号　R283　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）13-1573-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.13.06

摘　要　目的　优化鳖血冻干粉的制备工艺，为提高鳖血的服用便捷性和质量稳定性提供参考。**方法**　采用真空冷冻干燥技术制备鳖血冻干粉。以溶解度为考察指标，通过单因素实验和Box-Behnken响应面实验优化鳖血冻干粉的冷冻干燥工艺参数，并验证。**结果**　鳖血冻干粉最优冷冻干燥工艺为预冻时间4 h、干燥时间13 h（0 ℃前）、解析干燥温度25 ℃。3批按最优工艺制备的鳖血冻干粉的平均溶解度为95.72%（RSD=0.68%，n=3），与理论溶解度（96.66%）的相对误差为-0.97%。**结论**　本研究优化的冷冻干燥工艺稳定可行，所制样品的溶解度较高。

关键词　鳖血；真空冷冻干燥；溶解度；工艺优化

Optimization of the preparation process of Soft-shelled turtle blood lyophilized powder using Box-Behnken response surface methodology

LOU Yue[1], SU Xuerong[1], MAO Chunqin[1], ZHAO Xiaoli[1], LU Tulin[1,2], PI Wenxia[1] (1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Traditional Chinese Medicine Processing and Inheritance Base, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To optimize the preparation process of Soft-shelled turtle blood lyophilized powder (STBLP), and to provide a reference for improving the availability and quality stability of soft-shelled turtle blood (STB). **METHODS** STBLP was prepared with vacuum freeze-drying. Taking the solubility as the index, the preparation process parameters of STBLP were optimized by single factor experiment and Box-Behnken response surface method. **RESULTS** The optimal freeze-drying process for STBLP was obtained: pre-freezing time of 4 h, total drying time of 13 h (before at 0 ℃), and resolution drying temperature of 25 ℃. The average solubility of 3 batches of STBLP prepared according to the optimal process was 95.72% (RSD=0.68%, n=3), the relative error of which was -0.97% to the theoretical solubility (96.66%). **CONCLUSIONS** Optimized lyophilization process in this study are stable and feasible, the solubility of the prepared sample is high.

KEYWORDS　soft-shelled turtle blood; vacuum freeze-drying; solubility; process optimization

中华鳖又名甲鱼，因长寿而为人熟知。其肉质细嫩、味鲜美、营养丰富，含有较多人体生命活动所必需的多肽、多糖、氨基酸、维生素及微量元素等营养成分[1]，具有极高的食用营养和药用价值。然而在现代仅有鳖甲作为中药材被《中国药典》收录。随着我国养鳖业的快速发展和养殖规模的不断扩大，中华鳖附加产品的发展迎来了机遇和挑战，其全身其他部分所含的营养、药用价值亟待进一步开发利用[2]。

鳖血泛指鳖科动物中华鳖的新鲜血液，始载于《本草纲目》，药用历史可追溯至晋代。其味甘、咸，性平，归肝经，具有滋阴清热、活血通络的功效，主治虚劳潮热、阴虚低热、胁痛、口眼㖞斜、脱肛[3]。鳖血中含有蛋白质、氨基酸、矿物元素、酶类等多种活性物质[4]，有抗癌和免疫调节作用，且临床报道其可治疗骨关节结核[5]。鳖血沿用至今，药效显著，具有广阔的开发应用价值。然而鳖血的保存方法、加工工艺和质量控制标准的缺失，极大地限制了鳖血及其相关产品的开发和应用。现代鳖血应用多以生鳖血、鳖血酒、干燥鳖血块/粉为主。鳖血生饮或兑酒饮用虽然可以保留鳖血中多种活性成分，但保存期短、口感差，大众接受度低，并存在安全卫生隐患。而经过加热凝固、晒干、烘干等干燥工艺制备而成的鳖血干血，活性成分损失，可用性差，无法使鳖血得到真正的高效利用[6]。

真空冷冻干燥技术是近年迅速兴起的一项多学科综合应用技术，是一种对被干燥物性质影响最小、最安全的干燥方法，该技术已广泛应用于食品深加工领域[7-8]。对鳖血进行冷冻干燥处理，所得鳖血冻干粉不仅便于复水，提高鳖血利用率，而且更便于运输和贮藏。因此，本研究采用Box-Behnken响应面实验优化鳖血真空冷冻干燥加工过程中各阶段的工艺参数，制备一种新

Δ**基金项目**　国家重点研发计划项目（No.2018YFC1707006）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药新药开发利用与中药质量评价。E-mail：louyueuuii@126.com

＃**通信作者**　副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药活性成分研究与新药开发。E-mail：300017@njucm.edu.cn

型鳖血冻干粉，以增加鳖血服用的便捷性和质量的稳定性，提高鳖血临床应用的便捷性。

1 材料

1.1 主要仪器

SCIENTZ-20F/A型冷冻干燥机购自宁波新芝冻干设备有限公司；DHG-9140A型电热鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司；TGL-16G型高速台式离心机购自上海安亭科学仪器厂。

1.2 中华鳖

中华鳖由江苏省扬州市宝应县山阳镇众盛生态龟鳖产销专业合作社提供，经南京中医药大学药学院吴启南教授鉴定为鳖科动物中华鳖，并经检疫合格。

2 方法与结果

2.1 鳖血冻干粉的制备

2.1.1 鳖血的前处理

挑选质量为1 kg左右的健康活体中华鳖，清洗表面后，倒挂30 min，采用断颈法切断其脖颈并将其新鲜血液收集至无菌离心管中，每收集5 mL鳖血便立即加入0.7 mL CPDA-1血液保存液轻摇使混匀，防止鳖血凝固变质。1只中华鳖可获得35～50 mL抗凝鳖血，密封后冷藏保存，备用。

2.1.2 鳖血的真空冷冻干燥

鳖血的冻干流程为预冻→抽真空→加热。具体工艺如下：提前开启真空冷冻干燥机制冷系统，使冷阱温度降至预冻温度后，将处理好的鳖血置于平底金属盘中（物料厚度5～10 mm）送进冷阱，密闭后设置预冻时间开始预冻；预冻完成后开启真空泵，使冷冻干燥机内的真空度达到设定值；启动隔板加热进入干燥过程，通过前期实验摸索，加热隔板采用斜率升温方式，升温至设定温度后干燥结束，解除真空状态，取出鳖血冻干样品。每5 mL鳖血可得到0.7～0.8 g鳖血冻干样品。

2.1.3 鳖血的粉碎均质与包装

将获得的鳖血冻干样品粉碎、均质为细粉末，装入无菌西林瓶，密封保存。

2.2 鳖血冻干粉制备工艺的单因素实验

本课题组前期研究发现，鳖血在真空冷冻干燥过程中，预冻时间、干燥时间、解析干燥温度和真空度的变化均会对鳖血冻干粉的溶解度产生影响。因此，本研究以鳖血冻干粉的溶解度为指标，对上述4个因素进行单因素考察。溶解度的测定参照文献[9]方法。

2.2.1 预冻时间

设置真空度为20 Pa；以5 ℃为一个升温阶梯，0 ℃前干燥时间为16 h，0 ℃后干燥时间为7 h；解析干燥温度为10 ℃。考察预冻温度为－50 ℃时，预冻2、3、4、6、12 h对鳖血冻干粉溶解度的影响。结果显示，在上述预冻时间下鳖血冻干粉的溶解度分别为86.93%、93.51%、95.10%、95.57%、97.16%，即预冻时间越长，溶解度越高。综合机器能耗选择预冻时间4 h为中值进行进一步筛选。

2.2.2 干燥时间

设置预冻温度为－50 ℃，预冻时间为4 h，真空度为20 Pa，0 ℃后干燥时间为7 h，解析干燥温度为30 ℃。以5 ℃为一个升温阶梯，考察0 ℃前干燥时间为4.5、9、13.5、18、27 h（对应升温速率分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.6 h/℃）对鳖血冻干粉溶解度的影响。结果显示，在上述干燥时间下鳖血冻干粉的溶解度分别为75.43%、91.92%、92.64%、91.98%、92.09%。可见干燥时间在9～27 h时溶解度较高。综合考虑效率等因素后选择干燥时间13 h为中值进行进一步筛选。

2.2.3 解析干燥温度

设置干燥时间为13.5 h，其他条件同“2.2.2”项，考察解析干燥温度为5、10、15、20、30 ℃时对鳖血冻干粉溶解度的影响。结果显示，在上述解析干燥温度下鳖血冻干粉的溶解度分别为90.92%、89.53%、91.22%、93.75%、92.64%，本研究选择解析干燥温度20 ℃为中值进行进一步筛选。

2.2.4 真空度

设置干燥时间为13.5 h，解析干燥温度为20 ℃，其他条件同“2.2.2”项。考察真空度为20、35、50、65、80 Pa时对鳖血冻干粉溶解度的影响。结果显示，在上述真空度下鳖血冻干粉的溶解度分别为92.64%、97.77%、95.41%、92.55%、90.17%。可见当真空度为35 Pa时鳖血冻干粉的溶解度最高。由于冷冻干燥机运行时的真空度大部分时间会自动维持在20～40 Pa，再结合本实验结果，最终将真空度定为35 Pa。

2.3 鳖血冻干粉的制备工艺优化

2.3.1 Box-Behnken实验设计与结果

为确定鳖血真空冷冻干燥最优工艺条件，笔者在单因素实验基础上，结合冻干效果及机器能耗等多方面考虑，根据Box-Behnken实验设计原理，以溶解度（Y）为响应值，选取预冻时间（A）、干燥时间（0 ℃前的干燥时间，B）、解析干燥温度（C）为因素设计3因素3水平实验。Box-Behnken实验的因素与水平见表1，实验设计及结果见表2。

表1 Box-Behnken实验的因素与水平

水平	A（预冻时间）/h	B（干燥时间）/h	C（解析干燥温度）/℃
－1	3	11	15
0	4	13	20
1	5	15	25

2.3.2 模型拟合与方差分析

利用Design-Expert 12软件对表2中数据结果进行二次多元回归拟合，得到各因素对鳖血冻干品溶解度的二次回归方程：Y＝－379.869 81+74.979 75A+49.858 62B－0.349 55C+0.332 5AB+0.147 5AC+0.140 5BC－10.095 75A^2－2.085 81B^2－0.042 63C^2。回归方程的方差分析结果见表3。

表 2　Box-Behnken 实验设计及结果

编号	*A*(预冻时间)/h	*B*(干燥时间)/h	*C*(解析干燥温度)/℃	*Y*(溶解度)/%
1	3	13	15	82.27
2	5	13	15	84.80
3	5	11	20	78.17
4	4	13	20	97.12
5	4	13	20	95.12
6	4	15	25	89.93
7	4	11	25	87.88
8	3	13	25	82.91
9	3	11	20	77.56
10	4	13	20	94.89
11	4	13	20	95.58
12	4	13	20	96.06
13	3	15	20	75.13
14	5	15	20	78.40
15	4	11	15	85.57
16	4	15	15	82.00
17	5	13	25	88.39

表 3　回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*	显著性
模型	837.61	9	93.07	66.18	<0.000 1	极显著
A	17.67	1	17.67	12.57	0.009 4	显著
B	1.73	1	1.73	1.23	0.304 0	不显著
C	26.17	1	26.17	18.61	0.003 5	显著
AB	1.77	1	1.77	1.26	0.299 0	不显著
AC	2.18	1	2.18	1.55	0.253 6	不显著
BC	7.90	1	7.90	5.62	0.049 6	显著
A^2	429.15	1	429.15	305.19	<0.000 1	极显著
B^2	293.09	1	293.09	208.43	<0.000 1	极显著
C^2	4.78	1	4.78	3.40	0.107 7	
残差	9.84	7	1.41			
失拟项	6.70	3	2.23	2.85	0.168 9	不显著
纯误差	3.14	4	0.78			
总和	847.45	16				

由表 3 可得，模型的 F 值为 66.18（P<0.000 1），表明模型极显著；失拟项的 P 值为 0.168 9（>0.05），说明模型拟合较好。软件分析得出的复相关系数 R^2 为 0.988 4，校正后 R^2_{Adj} 为 0.973 5，表明该模型成立且拟合度较好、误差小，可以预测鳖血冻干粉溶解度随各因素变化的规律。根据表 3 中 F 值的大小，可知各因素对溶解度影响大小为 $C>A>B$；从 P 值可知，A^2、B^2 对溶解度影响极显著（P<0.000 1），A、C 对溶解度影响显著（P<0.01），BC 对溶解度影响显著（P<0.05），其余因子对溶解度影响均不显著（P>0.05）。

2.3.3　不同因素交互作用结果分析

通过 Design-Expert 12 软件绘制溶解度随不同因素交互作用变化的三维响应面图，见图 1。根据图 1 可知，响应曲面的等高线图呈近圆形与椭圆形，曲面坡度陡峭，表明各因素之间的交互作用复杂。根据图 1e 可以看出，随解析干燥温度增加，溶解度呈缓慢上升趋势，这与图 1f 趋势一致。当干燥时间与解析干燥温度均处于中间水平时，溶解度最高，提示鳖血冷冻干燥工艺中干燥时间不宜过长，解析干燥温度也不宜过高，这与单因素实验结果一致。

2.3.4　鳖血真空冷冻干燥最优工艺的确定及验证

Design-Expert 12 软件预测的真空冷冻干燥最优工艺条件为：预冻时间 4.109 h，干燥时间 13.108 h（0 ℃前），解析干燥温度 24.603 ℃。在此条件下，鳖血冻干粉溶解度的理论值可达 96.66%。考虑到工厂化生产实际可操作性，将最优工艺条件调整为：预冻时间 4 h，干燥时间 13 h（0 ℃前），解析干燥温度 25 ℃。按优化后工艺条件进行 3 次重复实验。结果显示，3 批鳖血冻干粉的

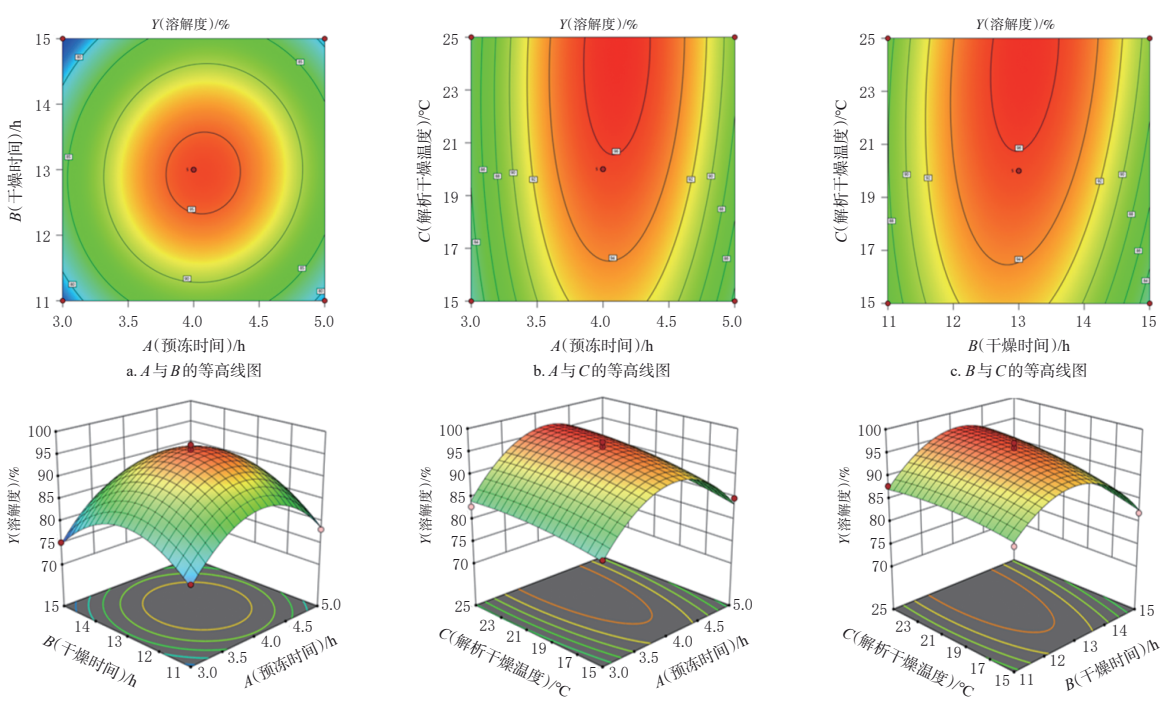


图 1　各因素交互作用的等高线图和响应曲面图

溶解度分别为95.13%、96.42%、95.60%，平均溶解度为95.72%（RSD=0.68%，n=3），与理论溶解度（96.66%）的相对误差为-0.97%，说明回归模型的拟合度较高，优选的冷冻干燥工艺准确、稳定、可靠。

3 讨论

3.1 鳖血抗凝剂的选择

前期研究发现，不同于牛血、猪血、鹿血等哺乳动物血液在添加抗凝剂后冷藏即可长久保存，鳖血极易变质凝固（新鲜鳖血3 min内便会凝固）。血液凝固后再冻干，其冻干品溶解度会大大降低，严重影响其利用度。由于不同抗凝剂对血液的抗凝原理不同，因此使用不同的抗凝剂进行抗凝处理对血液生理指标影响显著，抗凝效果也存在显著差异[10]。本研究前期比较了肝素钠、乙二胺四乙酸（EDTA）、CPDA-1血液保存液和草酸钾等抗凝剂后，最终选用了CPDA-1血液保存液。CPDA-1血液保存液属于人血采血袋中的一种抗凝剂，使用该抗凝剂后，鳖血可冷藏保存至少21 d，保存过程中无凝固现象也无腐败变质气味，血液pH及含氮量均稳定。

3.2 鳖血冷冻干燥工艺的选择

现代技术对于鳖血干血的制备方式有加热凝固后晒干、烘干、阴干、喷雾干燥等，这些方法会使血液中的生物活性成分失活，易导致血液变质甚至滋生细菌病毒，且所得样品的复水性差、溶解性差，不易被人体吸收。本研究运用真空冷冻干燥技术，通过低温预冻结晶在真空环境下直接升华成气体除去水分，能够很好地保持鳖血中活性蛋白质大分子以及一些肽类的空间结构及稳定性，并且该技术可在鳖血抗凝处理的基础上进一步延长其保存期、提高其稳定性，也更便于包装运输，是提高鳖血安全、高效利用的重要手段。

真空冷冻干燥分为预冻阶段和干燥阶段，本研究在预冻阶段考察了预冻温度（通过鳖血共晶点确定）和预冻时间。本研究前期在实验过程中通过冷冻干燥机的共晶点探头测定了鳖血共晶点温度为（-16.5±1.7）℃，由于预冻温度以低于共晶点温度5～10 ℃为最佳[11]，即预冻阶段将样品温度降至-26.5～-21.5 ℃进行预冻即可。为方便实际操作，本研究将预冻温度确定为-25 ℃。干燥阶段考察了干燥时间和干燥温度：（1）干燥时间主要考察升华干燥时间。在升华干燥阶段，鳖血样品中90%以上的水分（自由水）均在此阶段以升华的方式被除去。为确保鳖血样品升华干燥阶段的完整性，不影响到升华干燥过程的整体升温速率，在未知鳖血样品的升华干燥终点时，设置以0 ℃为界（确保样品的升华干燥阶段可保持同一升温速率），考察0 ℃前的干燥时间及升温速率对鳖血冻干的影响。（2）干燥温度主要考察了样品的最终解析干燥温度。鳖血样品中剩余的少部分水分以化学结合水形式存在于鳖血组织中，其可在解析干燥阶段随温度的增加以蒸发的形式被除去。最终解析干燥温度代表整个真空冷冻干燥过程中样品吸收的总热能以及最终成品的温度。基于此，本研究针对0 ℃以后的解析干燥阶段，仅考察最终解析干燥温度对鳖血冻干的影响。根据响应面实验结果，上述冷冻干燥参数之间存在交互作用，其中因素B（干燥时间）出现了一次项不显著，但其二次项却显著的情况，后续研究中应予以验证和规避。

综上所述，本研究优化的鳖血冻干粉制备工艺稳定可行；所得样品溶解度较高。但鳖血作为一种动物药，容易出现“微生物污染”问题，所以在开发利用时，如何对动物药的病毒和病原微生物等项目进行有效监测，对保证动物药的药用安全具有重要意义[12]。当前鳖血的质量标准缺乏生物安全风险控制，本课题组后续将运用现代科学技术开展基原动物（中华鳖）病毒检测、灭活方法研究及鳖血冻干粉的病原微生物（细菌、真菌和酵母菌）检测，并对鳖血冻干粉进行微生物限度、重金属含量、菌落种类及总数等检测，在质量控制过程中重点考虑其安全性。

参考文献

[1] WANG S S，CHEN G J，CHEN K W，et al. Bioavailability and prebiotic potential of Carapax Trionycis，a waste from soft-shelled turtle processing[J]. J Sci Food Agric，2020，100(6)：2554-2567.

[2] 王扬，张海琪，周凡，等. 中华鳖产品种类及主要加工技术研究现状[J]. 食品安全质量检测学报，2014，5(12)：4068-4072.

[3] 南京中医药大学. 中药大辞典：下册[M]. 2版. 上海：上海科学技术出版社，2006：3847.

[4] 陈瑞，黄如彬，杨争光，等. 鳖血生化指标、氨基酸和矿物元素含量的测定[J]. 动物学杂志，1999，34(4)：29-32.

[5] 江苏新医学院. 中药大辞典：下册[M]. 上海：上海科学技术出版社，1977：2726.

[6] 李滢，张远红，董浩，等. 动物血液蛋白质及活性肽开发研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2023，14(7)：39-47.

[7] 牛淑萍，艾麦提·巴热提. 食品中的真空冷冻干燥技术研究[J]. 中国食品，2022(1)：118-120.

[8] 邹晓霜，李佳妮，姜楠，等. 响应面法优化豆腐真空冷冻干燥工艺[J]. 食品科学，2017，38(18)：200-207.

[9] 兰颖. 鹿血主要功能成分提取及其微胶囊化研究[D]. 长春：吉林大学，2015.

[10] 何永果，李果，李德生，等. 两种抗凝剂对大熊猫血液生理指标的影响[J]. 畜牧兽医科技信息，2015(10)：15-17.

[11] 陈树俊，张君梅，石玥，等. 响应面法优化杂粮醋粉真空冻干工艺[J]. 食品工业科技，2018，39(15)：130-135.

[12] 马双成，王莹，魏锋. 中药质量控制未来发展方向的思考[J]. 中国药学杂志，2021，56(16)：1273-1281.

（收稿日期：2022-11-30　修回日期：2023-05-09）

（编辑：林　静）