

# 响应面法优化青海产树莓中总多酚的超声提取工艺研究

王煜伟<sup>1,2</sup>, 杨永晶<sup>1,2</sup>, 胡娜<sup>1,2</sup>, 索有瑞<sup>1\*</sup>

1. 中国科学院西北高原生物研究所(西宁 810001); 2. 中国科学院大学(北京 100049)

**摘要** 对超声辅助提取青海产树莓中总多酚的工艺进行了研究。在单因素试验的基础上选择提取次数、超声时间、乙醇体积分数、料液比4个因素为自变量,以树莓中总多酚的提取率为响应值,进行Box-Behnken中心组合试验设计,采用响应面法(RSM)优化了树莓总多酚的提取工艺。结果表明,超声辅助提取树莓中总多酚的最佳工艺条件为:超声提取2次,乙醇体积分数51%,料液比1:22(g/mL),超声时间30 min,在此条件下预测总多酚的得率为1.023%。

**关键词** 树莓;总多酚;超声提取;响应面法

## Study on Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Polyphenols from *Rubus corchorifolius* L. f by Response Surface Analysis

Wang Yu-wei<sup>1,2</sup>, Yang Yong-jing<sup>1,2</sup>, Hu Na<sup>1,2</sup>, Suo You-rui<sup>1\*</sup>

1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences (Xining 810001);

2. University of the Chinese Academy of Sciences (Beijing 100049)

**Abstract** Response surface methodology (RSM) was applied to optimize ultrasonic-assisted extraction process of total polyphenols from *Rubus corchorifolius* L. f. based on single experiments, extraction times, ethanol concentration, ratio of solid and liquid and extraction time were selected for Box-Behnken central composite design. Using the response surface method (RSM) to optimize the raspberry the extraction process of total polyphenols. The results indicated that the optimal process conditions were as followings: extracted 2 times, the ratio of liquid and solid was 1 : 22 (g/mL), aqueous ethanol concentration 51%, extraction time 30 min. Under these optimized conditions, the extraction yield of total polyphenols was up to 1.023%.

**Keywords** *Rubus corchorifolius* L. f; total polyphenols; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

树莓 (*Rubus corchorifolius* L. f) 即山莓,又名三月泡、山抛子、刺葫芦和悬钩子,是一种直立灌木。广泛分布在我国除内蒙古、新疆以外的其他各省、市、自治区,在海拔200~2200 m的向阳山坡、溪边、山谷、荒地和灌木丛中生长。树莓果实可供生食、制果酱以及酿酒。树莓根、茎、叶、果实均可入药,有活血、解毒、止血之效;根皮、茎皮、叶可提取栲胶<sup>[1]</sup>。树莓由于抗氧化成分含量高,在浆果中一直处于重要地位。现代医学研究发现,它具有抗

氧化、抗菌、抑癌、降糖和心血管保护等多种功效。树莓果实为聚合浆果,柔嫩多汁,营养丰富,风味独特,被誉为“黄金水果”<sup>[2]</sup>。目前对它的研究主要在起抗氧化作用的鞣酐和花青素方面,而对总多酚含量研究较少。超声提取对有效成分的萃取具有助溶作用,可以提高植物有效成分的提取率<sup>[3-4]</sup>。因此,试验采用超声提取优化树莓总多酚,在单因素试验的基础上通过响应面分析确定最佳提取工艺,以期为树莓多酚工业化生产工艺的建立提供科学依据和理论参考。

[10] 岳喜庆,徐明,王澜儒. 响应曲面法优化鹿茸蛋白提取条件[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(9): 59-62.

[11] 徐忠,薄凯,张珍珠. 麦麸蛋白的碱法提取工艺及乳化性质研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(9): 66-68.

[12] 吴冬青,刘赞,余丹丹,等. 碱法提取玉米胚蛋白工艺的研究[J]. 粮油食品科技, 2006, 14(1): 36-37.

[13] 郭兴凤,闫秋丽,陈定刚. 酶法提取小麦麸皮蛋白水解物的研究[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(2): 50-52.

[14] 皮钰珍,刘彦妮,岳喜庆,等. 酶法提取玉米胚芽蛋白的工艺优化[J]. 食品科技, 2011, 36(7): 157-160.

[15] 赵华,王虹,任晶,等. 响应面法提取玉米醇溶蛋白的工

艺优化[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 38-40.

[16] ABAS WANI A, SOGI D S, GROVER L, et al. Effect of temperature, alkali concentration, mixing time and meal/solvent ratio on the extraction of watermelon seed proteins - a response surface approach[J]. Biosystems Engineering, 2006, 94(1): 67-73.

[17] YU J, AHMEDNA M, GOKTEPE I. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing[J]. Food Chemistry, 2007, 103(1): 121-129.

[18] 乔宁,张坤生,任云霞. 绿豆分离蛋白提取工艺的研究[J]. 农产品加工: 学刊(中), 2013(9): 32-35.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

树莓：购于青海瑶池生物科技有限公司，商品名为秋英又名嘉林一号；没食子酸标准品，购于成都曼斯特生物科技有限公司（批号：MUST-13040103）；福林酚、无水乙醇、无水碳酸钠均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

T6新世纪紫外-可见分光光度计：北京谱析通用仪器有限责任公司生产；KQ-500E 型超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司；AL204 电子天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；SHZ-3 型循环水多用真空泵：上海亚荣生化仪器；101-1ES 型电热鼓风干燥箱：北京市永光明医疗仪器厂；FW100 型高速万能粉碎机：天津市泰斯特仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品处理

将树莓果浆于烘箱中烘至恒重，将干燥后的树莓在粉碎机中粉碎成粉末，过40目筛，得到树莓粉备用。

#### 1.3.2 树莓中多酚的提取

树莓果浆 烘干至恒重 粉碎 过40目筛 超声辅助提取法 抽滤 多酚提取液

#### 1.3.3 没食子酸标准液的配置

精密称取干燥至恒重的没食子酸0.050 g，用超纯水溶解并定容至100 mL，摇匀，即得标准储备液。精密量取10 mL标准储备液于50 mL容量瓶中加超纯水定容，摇匀，即得质量浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸标准液，置于冰箱中保存备用。

#### 1.3.4 标准曲线的绘制及回归方程的建立

用移液管分别量取0.0，1.0，2.0，3.0，4.0和5.0 mL的没食子酸标准储备液于25 mL容量瓶中，加入福林酚试剂2.0 mL摇匀，静置5 min，加入质量分数为10%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液2.0 mL，摇匀，静置6 min，用蒸馏水定容，置于25 的恒温水浴锅中加热显色60 min，以试剂空白作参比，于760 nm处测定吸光度，以没食子酸质量浓度（ $X$ ， $\mu\text{g/mL}$ ）为横坐标，吸光度（ $Y$ ）为纵坐标，制作标准曲线，得到标准曲线方程为： $Y=0.1207X+0.0096$ ， $R=0.9991$ 。

#### 1.3.5 样品多酚含量的测定

精密量取1.0 mL多酚提取液于25 mL容量瓶中，加入福林酚试剂2.0 mL摇匀，静置5 min，加入质量分数为10%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液2.0 mL，摇匀，静置6 min，用蒸馏水定容，置于25 的恒温水浴锅中加热显色60 min，以试剂空白作参比，于760 nm处测定吸光度。

#### 1.3.6 多酚得率的计算

$$\text{多酚得率} = C \times V / (G \times 10\,000) \times 100\% \quad (1)$$

式中： $C$ -多酚质量浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）； $V$ -提取液体积（mL）； $G$ -样品质量（g）。

### 1.4 超声辅助法提取树莓果实多酚的单因素试验

#### 1.4.1 提取次数对树莓果实多酚提取量的影响

称取树莓粉1.00 g分别加入5支试管，在每支试管中按1：20（g/mL）的料液比加入40%的乙醇溶液，用保鲜膜封口，放置湿润，使溶液充分渗入到细胞组织中，超声处理30 min，分别重复1，2，3，4和5次，每组做3次平行试验。

#### 1.4.2 超声时间对树莓果实多酚提取量的影响

称取树莓粉1.00 g分别加入5支试管，在每支试管中按1：20（g/mL）的料液比加入40%的乙醇溶液，用保鲜膜封口，放置湿润，使溶液充分渗入到细胞组织中，分别超声处理10，20，30，40和50 min，重复2次，每组做3次平行试验。

#### 1.4.3 料液比对树莓果实多酚提取量的影响

称取树莓粉1.00 g分别加入5支试管，在每支试管中分别按1：10，1：15，1：20，1：25和1：30（g/mL）的料液比加入40%的乙醇溶液，用保鲜膜封口，放置湿润，使溶液充分渗入到细胞组织中，超声处理30 min，重复2次，每组做3次平行试验。

#### 1.4.4 乙醇体积分数对树莓果实多酚提取量的影响

称取树莓粉1.00 g分别加入5支试管，在每支试管中按1：20（g/mL）的料液比分别加入体积分数30%，40%，50%，60%和70%的乙醇溶液，用保鲜膜封口，放置湿润，使溶液充分渗入到细胞组织中，超声处理30 min，重复2次，每组做3次平行试验。

### 1.5 树莓中总多酚提取条件的优化设计

根据Box-Behnken 中心组合试验设计原理，综合单因素试验结果，以乙醇溶液为提取剂，选取对总多酚影响较大的因素提取次数（A）、乙醇体积分数（B）和料液比（C），进行中心组合试验，并结合单因素试验条件选取合理水平。以总多酚的得率为响应值，通过响应面分析得出超声波提取树莓中总多酚的最佳提取工艺条件和方法。试验设计因素编码及水平见表1。

表1 中心组合设计因素与水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 提取次数	1	2	3
B 乙醇体积分数 / %	40	50	60
C 料液比 / (g · mL <sup>-1</sup> )	1 : 15	1 : 20	1 : 25

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素对树莓中总多酚得率的影响

#### 2.1.1 提取次数对树莓中总多酚提取率的影响

按照1.4.1进行试验，结果见图1。

由图1可知，超声提取两次时多酚得率最高，随

着提取次数的增大,多酚得率变化不大,所以超声次数在2次为宜。

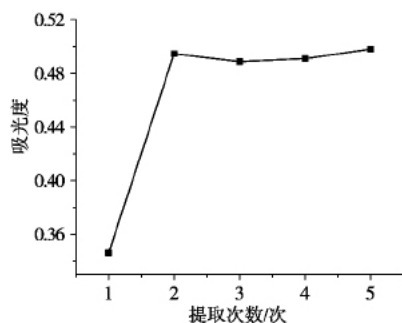


图1 超声提取次数对总多酚得率的影响

### 2.1.2 提取时间对树莓中总多酚提取率的影响

按照1.4.2进行试验,结果见图2。

由图2可知,在10~30 min内,总多酚的提取率随着时间的延长略有提高,但在30~50 min内,随着时间的延长多酚提取率反而有下降的趋势,可能因为时间过长,部分多酚分解,导致提取率下降。综合上述因素超声处理时间在30 min左右为宜。

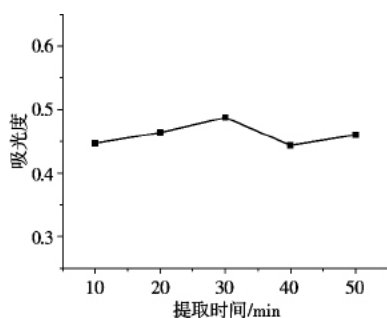


图2 超声提取时间对总多酚得率的影响

### 2.1.3 料液比对树莓中总多酚提取率的影响

按照1.4.3进行试验,结果见图3。

由图3可知,当料液比达到1:20 (g/mL)左右时,总多酚基本溶出,再增加提取剂用量,提取率反而减小。因而,料液比1:20 (g/mL)左右为宜。

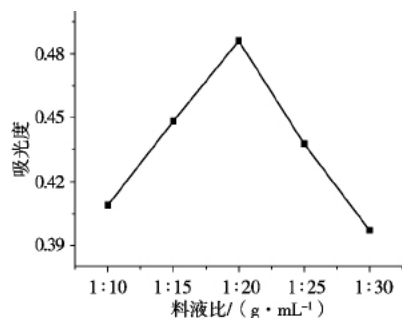


图3 料液比对总多酚得率的影响

### 2.1.4 乙醇体积分数对树莓中总多酚提取率的影响

按照1.4.4进行试验,结果见图4。

由图4可知,在乙醇体积分数50%左右提取率最大,因此选择乙醇体积分数在50%左右为宜。

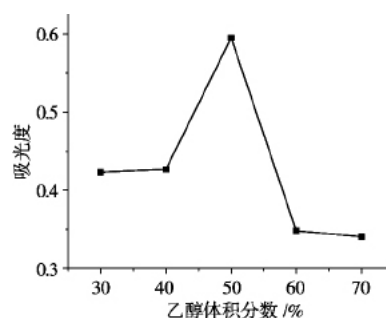


图4 乙醇体积分数对总多酚得率的影响

## 2.2 响应面分析试验结果与数据分析

表2 Box-Behnken 中心组合设计方案及试验结果

试验号	A	B	C	总多酚得率 /%
1	0	1	1	0.687
2	1	1	0	0.648
3	1	0	-1	0.702
4	0	1	-1	0.605
5	0	0	0	1.013
6	0	0	0	1.000
7	1	-1	0	0.689
8	0	-1	-1	0.436
9	0	0	0	0.950
10	0	0	0	1.011
11	-1	1	0	0.782
12	0	-1	0	0.536
13	-1	-1	0	0.572
14	-1	0	1	0.681
15	-1	0	-1	0.497
16	0	0	0	1.010
17	1	0	1	0.798

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
Model	60.61	9	6.73	19.42	0.000 4	**
A	1.16	1	1.16	3.36	0.109 6	不显著
B	2.98	1	2.98	8.58	0.022 0	*
C	2.67	1	2.67	7.71	0.027 5	*
AB	1.58	1	1.58	4.57	0.069 9	不显著
AC	0.19	1	0.19	0.55	0.482 2	不显著
BC	8.299E-003	1	8.299E-003	0.024	0.881 4	不显著
A <sup>2</sup>	5.72	1	5.72	16.51	0.004 8	**
B <sup>2</sup>	20.32	1	20.32	58.61	0.000 1	**
C <sup>2</sup>	20.96	1	20.96	60.46	0.000 1	**
残差	2.43	7	0.35			
失拟性	1.84	3	0.61	4.23	0.098 8	不显著
纯误差	0.58	4	0.15			
总差	63.04	16				

注：“\*\*”为  $p < 0.01$ , 差异极显著; “\*”为  $p < 0.05$ , 差异显著。  
 $R^2 = 0.961 5$ 。

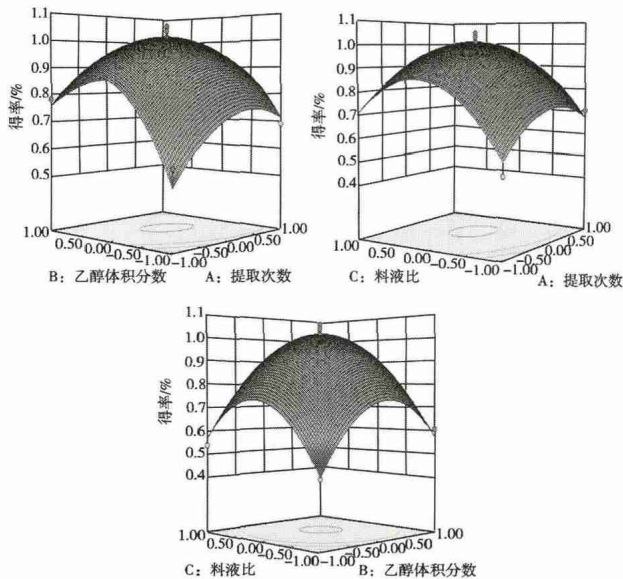


图5 各两因素交互作用对总多酚得率影响的响应面图  
利用 Design Expert 8.0.7.1 软件, 通过表2中总多酚率试验数据进行多元回归拟合, 对试验结果进行响应面分析, 得出回归模型方差分析表和响应曲面图, 分别见表3和图5。

由方差分析结果可知: 模型的  $F=19.42$ ,  $p=0.0004 < 0.01$ , 说明试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。  $F_{失拟}=4.23$ , 失拟项  $p=0.0988 > 0.05$ , 失拟不显著。模型的决定系数  $R^2_{Adj}=0.9120$ , 说明该模型能够解释91.20%的响应值变化。因此, 该模型拟合程度较好, 可以用此模型来分析和预测超声波提取树莓中总多酚的工艺条件。在总的因素中, 回归方程一次项具有较高的显著性, 表明提取次数、乙醇体积分数以及料液比对树莓中总多酚得率有较显著影响。

通过拟合可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程, 多元回归拟合分析得到树莓中总多酚提取率 ( $Y$ ) 与各因素变量的二次方程模型为:  $Y=10.09+0.384A+0.61B+0.58C-0.63AB-0.22AC-0.046BC-1.17A^2-2.20B^2-2.23C^2$ 。

从表3中方差分析结果可知方程一次项、二次项的影响均极显著, 说明分析结果可靠; 从试验所得的响应面分析结果可以找到它们在提取过程中的交互作用, 如表3和图5可知, 三项间的交互作用不明显。根据 Design Expert 8.0.7.1 软件对试验结果进行最优化分析, 确定最佳的提取条件为: 提取2次, 乙醇体积分数51.21%, 料液比1: 21.61 (g/mL), 在此条件下预测总多酚的得率为1.018%。

### 2.3 验证试验

根据模型预测结果进行近似验证试验, 但考虑到实际操作的便利, 将最佳工艺条件修正为提取2次,

乙醇体积分数51%, 料液比1: 22 (g/mL), 在此条件下测得总多酚的得率为1.023% ( $n=3$ )。

### 3 结论

用超声法提取树莓中总多酚, 根据单因素试验结果, 采用 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析对提取工艺进行优化, 得出最优工艺条件为: 提取2次, 乙醇体积分数51%, 料液比1: 22 (g/mL)。在此工艺条件下, 总多酚提取率为1.023% ( $n=3$ )。试验结果为树莓多酚工业化生产工艺的建立提供科学依据和理论参考。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1997(1): 393.
- [2] 韩加, 新华·纳比, 阿里木·帕塔尔, 等. 新疆树莓果实营养成分及其提取物抗氧化性研究[J]. 营养学报, 2008, 30(4): 410-413.
- [3] 刁小琴, 关海宁. 超声辅助提取黑木耳多酚及其抑菌活性研究[J]. 食品工业, 2013, 34(3): 69-71.
- [4] 王凤舞, 郭丽萍, 张晶, 等. 超声辅助法提取猕猴桃多酚的工艺研究[J]. 食品科技, 2013, 38(01): 73-77.
- [5] 庄英斌, 刘军海, 郭景学. 天然活性多酚提取、纯化及功能性研究进展[J]. 粮食与油脂, 2012(8): 44-48.
- [6] 赵玉红, 翟亚楠, 王振宇. 樟子松树皮中松多酚的提取工艺研究及提取方法比较[J]. 食品工业科技, 2013(4): 304-309.
- [7] 张秋龙, 梁永欣, 李文聪, 等. 响应面法优化细果角茴香中总黄酮的超声提取条件[J]. 天然产物研究与开发, 2013(25): 841-825.
- [8] 相炎红, 王浩云, 杨明俊, 等. 响应面法优化超声波辅助提取苦豆子生物碱的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(07): 255-258.
- [9] 郭辉, 罗宇倩, 章伟华, 等. 响应面法优化超声波辅助提取荷叶黄酮工艺研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 119-124.
- [10] 董发明, 白喜婷. 响应面法优化超声提取杜仲雄花中黄酮类化合物的工艺参数[J]. 食品科学, 2008, 29(08): 227-231.
- [11] 崔福顺, 王玉珍. 响应面法优化元蘑总黄酮提取工艺研究[J]. 食品工业, 2014, 35(2): 36-38.