

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0128-05

# 响应面法优化树莓中总黄酮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><sup>1</sup>中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810001; <sup>2</sup>中国科学院大学,北京 100049

**摘要:**本文对超声波辅助提取青海树莓中总黄酮的工艺进行了研究。在单因素试验的基础上选择提取次数、乙醇浓度、料液比、超声温度4个因素为自变量,以树莓中总黄酮的提取率为响应值,进行Box-Behnken中心组合试验设计,采用响应面法(RSM)评估了这些因素对总黄酮提取率的影响。结果表明,超声辅助提取树莓中总黄酮的最佳工艺条件为:超声提取2次,乙醇浓度76%,超声温度44℃,在此条件下预测总黄酮的得率为12.39 mg/g。

**关键词:**树莓;总黄酮;超声提取;响应面法

中图分类号:R932

文献标识码:A

## Study on Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids 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><sup>1</sup>Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;<sup>2</sup>University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Response surface methodology (RSM) was applied to optimize ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Rubus corchorifolius* L. f. Based on single experiments, extraction times, the concentration of ethanol and ultrasonic temperature were selected for Box-Behnken central composite design. RSM was employed to study the effect of these factors on the yield of total flavonoids. The results indicated that the optimal process conditions were to extract 2 times, 76% of aqueous ethanol, with 44℃ of ultrasonic temperature. Under these optimized conditions, the extraction yield of total flavonoids was up to 12.39 mg/g.

**Key words:** *Rubus corchorifolius* L. f; total flavonoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

树莓即山莓。树莓(*Rubus corchorifolius* L. f.),又名三月泡、山抛子、刺葫芦、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、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>。

黄酮类化合物是一类在植物界中分布广泛、具

有多种生物活性的多酚类化合物,广泛存在于药用植物、水果和蔬菜中,特别是在高等植物的花、叶、根中较多<sup>[3]</sup>。其生理作用广泛,不仅对心血管系统、消化系统有作用,且具有抗炎、抗菌及抗病毒、解痉等作用,还是重要的功能食品添加剂、天然的抗氧化剂、天然色素、天然甜味剂等<sup>[4,5]</sup>。因此,对黄酮类化合物的研究与利用颇受人们重视,其在食品、医药、保健领域的应用具有广阔的前景<sup>[6]</sup>。本研究采用超声提取优化树莓总黄酮,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,以期为树莓黄酮工业化生产工艺的建立提供科学依据和理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

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;取一定量的树莓果实于60℃

烘箱中烘干至恒重,粉碎;芦丁标准品,购于成都曼斯特生物科技有限公司(批号:MUST-13082002);硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠、碳酸钠、无水乙醇、无水碳酸钠均为分析纯。

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。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 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。

### 1.2.2 树莓中黄酮的提取

树莓果浆→烘干至恒重→粉碎→过 40 目筛→超声辅助提取法→抽滤→黄酮提取液

### 1.2.3 标准曲线的绘制及回归方程的建立

准确称取干燥恒重的芦丁标准品 0.005 g,用 30% 乙醇(体积分数,下同)溶解并定容 50 mL,摇匀得浓度为 10 μg/mL 标准应用液。取上述芦丁标准溶液 0.0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL,于 5 只 25 mL 容量瓶中,加入 1.0 mL 15% 亚硝酸钠摇匀,放置 5 min 后加入 1.0 mL 10% 硝酸铝,6 min 后加入 2 mL 1 mol/L 氢氧化钠,混匀,用 30% 乙醇定容至刻度,10 min 后于 510 nm 处比色测定。以芦丁质量浓度 X(μg/mL)为横坐标,吸光值 Y 为纵坐轴,制作标准曲线,得到标准曲线方程为: $Y = 0.030X - 0.007$ , $R^2 = 0.9992$ 。

### 1.2.4 样品黄酮含量的测定

精密量取 1.0 mL 黄酮提取液于 25 mL 容量瓶中,加入 1.0 mL 15% 亚硝酸钠摇匀,放置 5 min 后加入 1.0 mL 10% 硝酸铝,6 min 后加入 2 mL 1 mol/L 氢氧化钠,混匀,用 30% 乙醇定容至刻度,10 min 后于 510 nm 处比色测定。

### 1.2.5 黄酮得率的计算

$$\text{黄酮得率} (\text{mg/g}) = (C * V) / (G * 1000)$$

C 为黄酮浓度(μg/mL)

V 为提取液体积(mL)

G 为样品重量(g)

## 1.3 超声辅助法提取树莓果实黄酮的单因素试验

### 1.3.1 超声次数对树莓果实黄酮提取量的影响

称取树莓粉 1.00 g 分别加入 5 支试管,在每支试管中按 1:25 g/mL 的料液比加入 75% 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,于 40 °C 超声处理,分别重复 1,2,3,4 和 5 次,定容到 100 mL,待测。每组做 3 次平行试验。

### 1.3.2 乙醇浓度对树莓果实黄酮提取量的影响

称取树莓粉 1.00 g 分别加入 5 支试管,在每支试管中按 1:25 g/mL 的料液比分别加入 55%, 65%, 75%, 85%, 95% 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,于 40 °C 超声处理,重复 3 次,定容到 100 mL,待测。每组做 3 次平行试验。

### 1.3.3 料液比对树莓果实黄酮提取量的影响

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 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 g/mL 的料液比加入 75% 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,于 40 °C 超声处理,重复 3 次,定容到 100 mL,待测。每组做 3 次平行试验。

### 1.3.4 超声温度对树莓果实黄酮提取量的影响

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 1:25 g/mL 的料液比加入 75% 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,分别于 30, 40, 50, 60, 70 °C 超声处理,重复 3 次,定容到 100 mL,待测。每组做 3 次平行试验。

## 1.4 树莓中总黄酮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,选取对总黄酮影响较大的因素提取次数(A)、乙醇浓度(B)和超声温度(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。以总黄酮的得率为响应值,通过响应面分析得出超声波提取树莓中总黄酮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

Table 1 Factors and levels in the central composite design

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
提取次数(A)	1	2	3
乙醇浓度(B)/%	65	75	85
超声温度(C)/°C	30	40	50

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素对树莓中总黄酮得率的影响

固定料液比 1:25 g/mL, 选择乙醇浓度为 75%, 超声温度 40 °C, 超声次数分别按 1, 2, 3, 4 和 5 次, 按照 1.3.1 进行试验。结果见图 1。

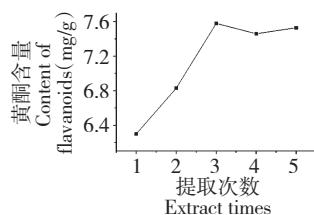


图 1 超声次数对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of extraction times on extraction yield of total flavonoids

由图 1 可知, 超声提取 3 次时黄酮得率最高, 随着提取次数的增大, 黄酮得率变化不大, 所以超声次数在 3 次为宜。

### 2.1.2 乙醇浓度对树莓中总黄酮提取率的影响

超声提取 3 次, 超声温度 40 °C, 料液比为 1:25 g/mL, 乙醇浓度分别按 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 按照 1.3.2 进行试验。结果见图 2。

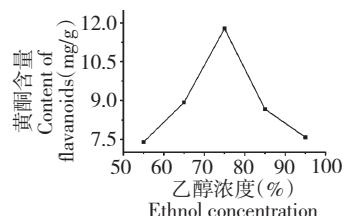


图 2 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

由图 2 可知, 在乙醇浓度 75% 左右提取率最大, 因此选择乙醇浓度在 75% 左右为宜。

### 2.1.3 料液比对树莓中总黄酮提取率的影响

选择乙醇浓度为 75%, 超声提取 3 次, 超声温

度 40 °C, 料液比分别按 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 g/mL, 按照 1.3.3 进行试验。结果见图 3

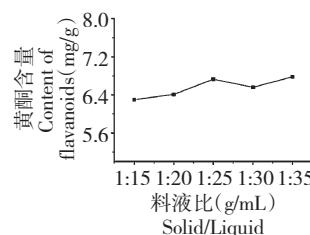


图 3 料液比对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of solid to liquid on extraction yield of total flavonoids

由图 3 可知, 当料液比达到 1:25 mL/g 左右时, 总黄酮基本溶出, 再增加提取剂用量, 提取率变化不大。因而, 料液比 1:25 mL/g 左右为宜。

### 2.1.4 超声温度对树莓中总黄酮提取率的影响

固定液料比 1:25 g/mL, 选择乙醇浓度为 75%, 超声提取 3 次, 超声温度分别按 30, 40, 50, 60, 70 °C, 按照 1.3.2 进行试验。结果见图 4。

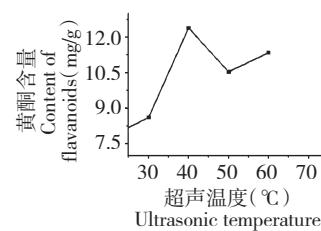


图 4 温度对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on extraction yield of total flavonoids

由图 4 可知, 在 20 ~ 40 °C 时, 温度的升高会加强溶液中各分子的运动, 促进扩散作用, 有利于提高提取率, 因此总黄酮的提取率随着温度的提高而提高。在 450 °C 以上, 温度过高黄酮得率反而下降, 故选择提取温度应为 40 °C。

## 2.2 响应面分析试验结果与数据分析

利用 Design Expert 8.0.7.1 软件, 通过表 2 中总黄酮得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。

表 2 Box-Behnken 中心组合设计方案及试验结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and the results of these experiments

试验号 No.	提取次数 Extract times (A)	乙醇浓度 Alcohol concentration (B)	超声温度 Ultrasonic temperature (C)	总黄酮得率 Yield of total flavonoids (mg/g)
1	1	1	0	8.13
2	1	-1	0	7.10

3	1	0	1	9.76
4	0	1	1	9.76
5	0	-1	1	8.88
6	-1	1	0	7.01
7	0	0	0	11.78
8	-1	0	1	8.86
9	-1	0	-1	6.93
10	0	-1	-1	7.76
11	-1	-1	0	7.12
12	0	0	0	11.98
13	0	0	0	12.03
14	0	1	-1	7.06
15	0	0	0	11.93
16	0	0	0	12.12
17	1	0	-1	8.15

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance(ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	69.31	9	7.7	125.29	< 0.0001	significant
A	1.29	1	1.29	21.04	0.0025	-
B	0.16	1	0.16	2.54	0.1553	-
C	6.78	1	6.78	110.35	< 0.0001	-
AB	0.32	1	0.32	5.22	0.0562	-
AC	0.025	1	0.025	0.41	0.5434	-
BC	0.63	1	0.63	10.2	0.0152	-
A <sup>2</sup>	22.96	1	22.96	373.46	< 0.0001	-
B <sup>2</sup>	24.12	1	24.12	392.35	< 0.0001	-
C <sup>2</sup>	7.18	1	7.18	116.8	< 0.0001	-
残差	0.43	7	0.061	-	-	-
失拟性	0.21	3	0.069	1.25	0.4022	insignificant
纯误差	0.22	4	0.055	-	-	-
总差	69.75	16	-	-	-	-

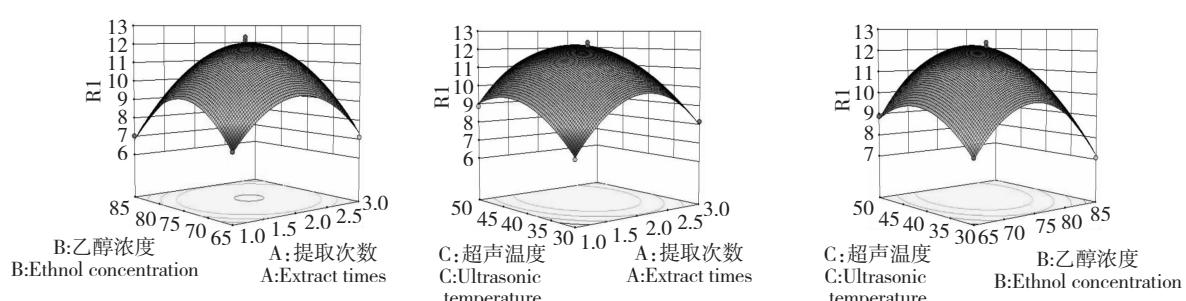
注: \* \*  $P < 0.01$ , 差异极显著;\*  $P < 0.05$ , 差异显著。  $R^2 = 0.9938$ 

图5 各两因素交互作用对总黄酮提取率影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plots of mutual influences of extraction conditions on the extraction yields of total flavonoids

由方差分析结果可知:模型的  $F = 125.29, P = 0.0001 < 0.01$ ,说明本试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。 $F_{失拟} = 1.25$ ,失拟项  $P = 0.4022 > 0.05$ ,失拟不显著。模型的决定系数  $R^2_{Adj} = 0.9938$ ,说明该模型能够解释 99.38% 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黄酮的工艺条件。在总的作用因素中,回归方程一次项具有较高的显著性,表明提取次数、乙醇浓度以及超声温度对树莓中总黄酮得率有较显著影响。

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黄酮提取率  $R_1$  与各因素变量(A 提取次数,B 乙醇浓度,C 超声温度)的二次方程模型为:  

$$R_1 = +12.02 + 0.04 * A + 0.14 * B + 0.92 * C + 0.28 * A * B - 0.079 * A * C + 0.04 * B * C - 2.23 * A^2 - 2.39 * B^2 - 1.31 * C^2$$

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 可知乙醇浓度和超声温度之间的交互作用显著,其余项间的交互作用不明显。根据 DesignExpert 8.0.7.1 软件对实验结果进行最优化分析,确定最佳的提取条件为:超声提取 2 次,乙醇浓度 76%,超声温度 44 °C,在此条件下预测总黄酮的得率为 12.26 mg/g。

### 2.3 验证实验

根据模型预测结果进行近似验证实验,但考虑到实际操作的便利,将最佳工艺条件修正为超声提取 2 次,乙醇浓度 76%,超声温度 44 °C,在此条件下总黄酮提取率为 12.39 mg/g( $n=3$ )。

## 3 结论

用超声法提取树莓中总黄酮,根据单因素实验结果,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:超声提取 2 次,乙醇浓度 76%,超声温度 44 °C。在此工艺条件下,总黄酮提取率为 12.39 mg/g( $n=3$ )。该研究结果对树莓中总黄酮的提取研究提供一定的参考价值,以期为树莓黄酮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

- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences(中国科学院西北高原生物研究所). *Flora Qinghaiica*(青海植物志) Vol 1. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997. 393.
- Han J(韩加), Xinhua N(新华·纳比), Alimu p(阿里木·帕塔尔). Study on the nutritional components of raspberry fruits and their effects on antioxidant activity. *Acta Nutimenta Sinica*(营养学报), 2008, 30:410-413
- Wu LY(吴莉宇). The structure of the physical and chemical properties and distribution of the flavonoids. *Chin J Trop Agric*(热带农业科学), 1998(5):12-17.
- Pei LP(裴凌鹏), Hui BL(惠伯棣). Review on health function processing technology and market prospects of flavonoids. *Food Sci*(食品科学), 2004, 25:203-207.
- Li MF(李明芳), Luo YJ(罗亚君). Studies on chemical constituents of *Stenoloma Chusana* (L.) Ching flavonoids. *J Sichuan Norm Univ, Nat Sci*(四川师范学院大学学报), 2009, 31:358-360.
- Cai DJ(蔡定建), Xie ZP(谢志鹏)等. Separation and Abstraction of Flavonoid and Pectin from Orange Peel. *Anal Testing Tech Instrum*(分析测试技术与仪器), 2006, 12:239-242.
- Zhang QL(张秋龙), Liang YX(梁永欣), et al. Study on optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms by response surface analysis. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:841-825.
- Guo H(郭辉), Luo YQ(罗宇倩). Optimization of technology for ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from lotusleaves by response surface methodology. *J Chin Ins Food Sci Tech*(中国食品学报), 2011, 11:119-124.
- Dong FM(董发明), Bai XT(白喜婷). Optimization of ultrasound-assisted extraction process parameters of flavonoids from *eucommia ulmoides* stamine flower by response surface methodology. *Food Science*(食品科学), 2008, 29:227-231.
- Cui FS(崔福顺), Wang YZ(王玉珍). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Hohenbuehelia serotina* by response surface methodology. *Food Industry*(食品工业) 2014, 35(2):36-38.