

响应面法优化高剪切分散乳化提取悬钩子多酚

樊梓鸾¹, 林秀芳¹, 王丽², 王振宇^{1,2}

(1. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要: 为探究提取小浆果悬钩子中活性成分多酚的最佳工艺参数, 采用高剪切分散乳化提取技术, 探讨了提取溶液浓度, 高剪机转速, 剪切时间 3 个因素对悬钩子多酚提取含量的影响。在单因素水平分析基础上, 运用响应面优化设计试验对提取工艺进一步优化, 由 Design-Expert 7.0.0 软件分析确定了悬钩子多酚的最佳提取条件, 考虑到实际操作的便利, 将最佳工艺参数修正为: 提取溶液体积分数: 85%, 高剪机转速: 18 000 r/min, 剪切时间: 220 s。经验证试验证实, 优化后悬钩子提取物中多酚质量分数为 (713.89 ± 0.66) mg/hg 鲜果。总黄酮和花色苷的质量分数分别为 (229.97 ± 1.37) mg/hg 鲜果和 (28.75 ± 0.43) mg/hg 鲜果。与传统的超声波、微波等辅助提取法相比, 高剪切分散乳化技术提取法大大缩短了提取时间, 避免了有效成分的损失与变性, 是一种极具应用前景的方法。

关键词: 悬钩子; 多酚; 高剪切分散乳化技术; 响应面法; 提取优化

中图分类号: S 38 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)04—0355—06

High-Speed Shear Treatment for Extraction of Polyphenol from Raspberries Via Response Surface Optimization

FAN Ziluan¹, LIN Xiufang¹, WANG Li², WANG Zhenyu^{1,2}

(1. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: In this paper, the best technology of extraction polyphenols from raspberry was discussed. A high-speed shear dispersing emulsifier (HSDE) was used to treat raspberry. The effects of the acetone concentration, HSDE rotary speed, treatment time were investigated. A predictive polynomial quadratic model was set up by means of central composite design and used to optimize these treatment conditions by response surface methodology. The optimal HSDE treatment conditions were determined as 85% of the acetone concentration, 18 000 r/min of HSDE rotary speed, 186s of treatment time. After optimization polyphenol content of raspberries were 710.69 mg/hg fresh weights. The contents of flavonols and anthocyanin were 219.997 mg/hg and 26.751 mg/hg fresh weights. Compared to conventional ultrasonic wave assisted extraction for polyphenol from raspberries greatly saved extraction time and avoided the loss and degeneration of the active

收稿日期: 2013-12-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170510); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(DL12BA35)。

作者简介: 樊梓鸾(1981—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工学博士, 讲师, 主要从事天然产物提取与功能活性研究。

E-mail: fzl_1122@163.com

principle. In conclusion, HSDE treatment is a good pretreatment strategy that can provide a high disruption rate in a short time.

Keywords: *Rubus kamanowii*, polyphenol, high-speed shear dispersing emulsifier, extraction, response surface optimization

悬钩子(*Rubus kamanowii*), 俗称树莓, 是蔷薇科(*Rosacea*)悬钩子属(*Rubus*)的一种落叶浆果类灌木, 也是一种新兴经济林木品种。树莓果实为聚合浆果, 柔嫩多汁, 色泽宜人, 风味独特。除鲜食外, 还可生产果酱、果汁、果酒、果冻、软糖等, 为天然保健食品^[1]。树莓果营养丰富, 含有比现有栽培水果及其它任何野果都高的维生素 E、SOD、氨基丁酸等抗衰老物质^[2]。特别是鞣化酸、花青素含量丰富, 对结肠、宫颈、乳腺、肝和胰腺癌有一定的预防作用和疗效。在医药、化妆、保健食品等方面有着广泛的用途^[3-4]。

高速剪切技术(High-speed Shear Dispersing Emulsifier, HSDE)是近几年新兴的提取技术, 是样品在高剪切分散乳化机上, 接受转子高速旋转产生的高剪切线速度和高频机械效应带来的强劲动能, 使物料在定、转子狭窄的间隙中受到强烈的机械效应、剪切效应和气蚀作用的协同作用。Hua^[5]等运用高速剪切技术提取黄芪中类黄酮, 探讨了提取动力学模型, 结果显示此方法明显优于超声波提取技术。孙术国^[6]等运用高速剪切与微波辅助偶联技术提取鲜葛中葛根素, 与传统方法相比具有提取率高、时间短、能耗小等优点。

由于多酚类活性物质不稳定, 用传统方法提取一般提取时间较长, 温度较高, 特别是超声波辅助提取在提取过程中会产生大量自由基, 这些自由基会与活性成分中用于清除自由基的基团结合, 从而降低了提取物的抗氧化活性。为了解决以上问题, 选取高剪切分散乳化技术提取悬钩子多酚, 考察提取溶剂浓度、高剪机转速、剪切时间 3 个工艺参数, 采用响应面法进行工艺优化, 应用 Design-Expert 软件进行数据拟合^[7-8], 探索高剪切分散乳化提取悬钩子多酚的优化工艺条件, 以期最大限度的保持悬钩子有效成分被提取出来, 同时不破坏其活性, 为悬钩子多酚产业化提取提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 原料

悬钩子(*Rubus kamanowii* Nakai.) 2012 年 8 月

采摘于伊春, 速冻冷藏保存。

1.2 仪器与设备

SHB 循环水多用真空泵: 郑州长城科工贸有限公司产品; JJ-2 型组织粉碎机: 常州仪器设备有限公司产品; FA25 高剪切分散乳化机: 上海弗鲁克流体机械制造有限公司产品; 722 可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司产品; 721 紫外可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司产品; DF204 电热鼓风干燥箱: 北京西城区医疗器械二厂产品。

1.3 试验方法

1.3.1 多酚活性成分的提取 取 100 g 速冻冷藏的悬钩子浆果, 加入 200 mL 预冷冻丙酮溶液, 先用组织粉碎机匀浆 3 min, 然后转入高剪切分散乳化机均质, 最后抽滤, 收集滤液, 适当稀释后进行吸光度测定。

1.3.2 多酚多酚质量分数测定 采用福林-酚法^[9], 分别取 125 μ L 标准溶液或稀释样品, 加入 125 μ L FCR 混合静置 6 min, 加入质量分数 7% Na_2CO_3 (1.25 mL), 用水调至 3 mL (加水 1.5 mL), 放置 90 min, 760 nm 测定吸光度。以标准曲线回归方程计算总多酚质量分数。

1.3.3 高剪切分散乳化技术提取悬钩子多酚的单因素实验 分别以不同提取溶剂的浓度、高剪切转速、剪切时间为单因素进行单因素实验, 考察各单因素对提取得到多酚含量的影响, 每个单因素水平重复 3 次测其吸光值。

1.3.4 响应面分析法优化冷冻均质辅助提取多酚的工艺参数 经单因素实验确定了不同提取溶剂的浓度、高剪切转速、剪切时间为主要影响因素, 运用 Design-Expert 7.0 软件程序根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 采用响应面分析法, 以多酚质量分数为响应值作响应面, 对提取条件进行优化。

2 结果与讨论

2.1 高剪切分散乳化技术提取悬钩子多酚的单因素实验结果

2.1.1 溶剂浓度对总多酚质量分数的影响 如图 1 可以看出,丙酮体积分数在 50%~80% 时,增加趋势较明显,在体积分数为 80% 时,总多酚质量分数达到 696.4 mg/hg 鲜果,比体积分数 50% 时增加了 96.1 mg/hg 鲜果,当体积分数 80% 以后,随溶液体积分数增加,总多酚质量分数降低,这是因为多酚类物质的复杂性,有些物质易溶于水(如黄酮苷类等),而有些物质易溶于有机溶剂(如黄酮苷元等),当丙酮体积分数为 80% 时,可最大量的溶出有机溶剂溶出物以及水溶物。

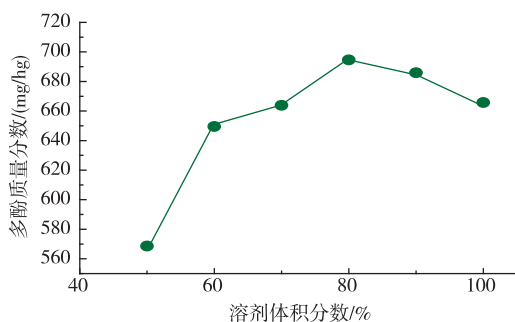


图 1 溶剂体积分数对总多酚质量分数的影响

Fig. 1 Effect of extraction solvent concentration on polyphenol content

2.1.2 高剪切转速对总多酚质量分数的影响 如图 2 所示,高剪切转速在 10 000~16 000 r/min 时,总多酚质量分数明显增加,高剪切转速为 16 000 r/min 时,总多酚质量分数最高,为 693.4 mg/hg 鲜果,比 10 000 r/min 的增加了 83.9 mg/hg 鲜果,随着功率增大,总多酚质量分数降低,这是因为功率越大,剪切力越大,破坏了多酚类物质(如黄酮母核)的结构,使其质量分数降低。

2.1.3 高剪切时间对总多酚质量分数的影响 如图 3 所示,剪切时间在 0~1 min 时,增加趋势较明显,增加了 111.2 mg/hg 鲜果,在 2~5 min 时,变化趋势平缓,在 3 min 时,总多酚质量分数最高,达到 695.9 mg/hg 鲜果。这是因为高转速剪切可以有有效的破坏植物细胞壁,使活性物质充分溶于溶液中,但随剪切时间越长,与氧气接触时间越多,酚酸可能被氧化成醌,从而多酚质量分数降低。

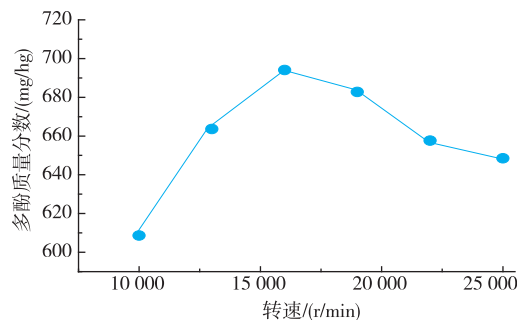


图 2 剪切转速对总多酚质量分数的影响

Fig. 2 Effect of HSDE rotary speed on polyphenol content

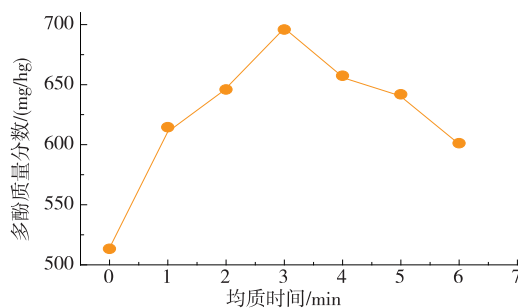


图 3 剪切时间对总多酚质量分数的影响

Fig. 3 Effect of treatment time on polyphenol content

2.2 响应面分析法优化悬钩子多酚的提取工艺

2.2.1 响应面分析法因素水平的选择 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,选取提取溶液浓度、高剪切转速、和剪切时间 3 个因素,进行三因素三水平实验设计(取中心点为 3),利用 Design-Expert 7.0.0 软件进行数据拟合,实验因素与水平见表 1。

表 1 相应面分析因素与水平设计表

Table 1 Factors and levels in the response surface design

因素	编码	水平		
		-1	0	1
提取溶液体积分数/%	A	70	80	90
均质转速/(r/min)	B	10 000	16 000	22 000
均质时间/min	C	1	3	5

2.2.2 响应面分析方案及结果 以提取溶液浓度(X_1)、高剪切转速(X_2)、剪切时间(X_3)为自变量,总多酚含量(Y)为响应值,进行响应面分析实验,实验方案及实验结果见表 2。

表 2 响应面分析方案及实验结果

Table 2 Program and experimental results of RSA

实验号	X_1 体积分数/%	X_2 转速/(r/min)	X_3 时间/s	Y 总多酚质量分数(mg/hg)
1	70	10 000	180	515.092
2	90	10 000	180	654.222
3	70	22 000	180	616.857
4	90	22 000	180	683.029
5	70	16 000	60	538.953
6	90	16 000	60	579.067
7	70	16 000	300	574.651
8	90	16 000	300	673.534
9	80	10 000	60	497.652
10	80	22 000	60	587.718
11	80	10 000	300	577.072
12	80	22 000	300	671.836
13	80	16 000	60	696.417
14	80	16 000	180	698.438
15	80	16 000	180	685.911
16	80	16 000	180	692.374
17	80	16 000	180	696.417

2.2.3 方差分析结果 通过 Design-Expert 7.0.0 软件进行二次响应面回归分析,对实验结果回归拟合后所得的模拟方程为: $Y=687.51+44.29X_1+39.43X_2+$

$37.96X_3-18.24X_1X_2+12.19X_1X_3+1.17X_2X_3-32.36X_1^2-37.84X_2^2-66.09X_3^2$ 。其决定系数 $R^2=0.9788$,表明该回归模型的拟合情况较好,实验值与预测值比较接近,模型的可靠性可通过方差分析及相关系数来考察(见表 3)。

从方差分析结果可知,模型在 $P\leq 0.01$ 水平时差异显著,因变量与所有自变量之间的线性关系显著($R^2=0.9788$),说明该模型能够较好地描述实验结果,信噪比为 $=15.576>4$ 说明用此模型可以得到足够强的相应信号。因此可以用模型来分析和预测悬钩子多酚提取工艺结果。从表 3 中可以看出, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 6 项为极显著影响因素, X_1X_2 项为显著影响因素。通过对 Y 的回归系数的检验可知,各因素对多酚含量提取影响的大小顺序为:提取溶液浓度(X_1)> 均质转速(X_2)> 均质时间(X_3)。

2.2.4 响应面与等高线 响应面的图形是响应值对各实验因子所构成的三维空间的曲面图,根据拟合函数,每 2 个因素对提取率画出响应面和等高线图,此时考虑到定性分析各因素对多酚提取量的关系,固定另外 2 个因素时,均作“0”水平处理。图 4~6 为各因素交互作用的响应面和等高线图。从图中可以直观地反映各因素对响应值的影响,找出最佳工艺参数以及各参数之间的相互作用,从响应面的最高点和等高线可以看出在所选的范围内存在

表 3 响应面回归模型方差分析表

Table 3 ANOVA for response quadratic model

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	$P>F$	显著性
模型	9	73 348.63	8 149.85	35.84	< 0.000 1	**
X_1	1	15 690.97	15 690.97	69.00	< 0.000 1	**
X_2	1	12 434.80	12 434.80	54.68	0.000 2	**
X_3	1	11 529.44	11 529.44	50.70	0.000 2	**
X_1X_2	1	1 330.72	1 330.72	5.85	0.046 2	*
X_1X_3	1	594.60	594.60	2.61	0.149 9	
X_2X_3	1	5.52	5.52	0.024	0.880 6	
X_1^2	1	4 409.85	4 409.85	19.39	0.003 1	**
X_2^2	1	6 030.30	6 030.30	26.52	0.001 3	**
X_3^2	1	18 392.85	18 392.85	80.88	< 0.000 1	**
残差	7	1591.83	227.40			
失拟项	3	832.56	277.52	1.46	0.351 1	
绝对误差	4	759.27	189.82			
总离差	16	74 940.47				

注: $P<0.01$ 为极显著 **; $P<0.05$ 为显著 *。

极值,响应面的最高点同时也是等高线中的最小椭圆的中心点。

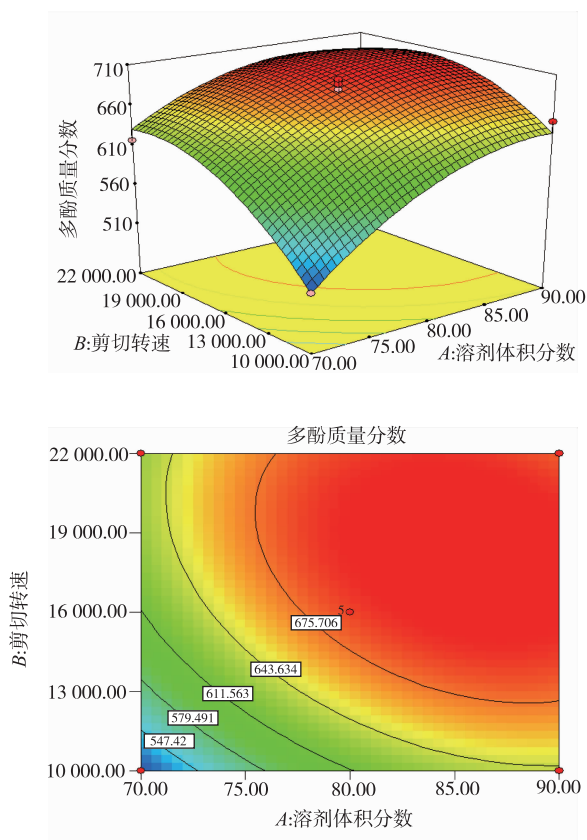


图4 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面与等高线

Fig. 4 Responsive surfaces and contours of $Y=f(X_1, X_2)$

将建立的回归模型中的任一因素固定在零水平,得到另外两个因素的交互影响结果,二次回归方程的响应面及其等高线如图4~6所示。随着每个因素的增大,响应值增大;当响应值增大到极值后,随着因素的增大,响应值逐渐减小;比较3组图可知,对多酚质量分数影响显著的因素,表现为曲线较陡;对多酚质量分数影响次显著或不显著的因素,表现为曲线较为平滑,随其数值的增加或减少,响应值变化较小。在交互项对多酚质量分数的影响中,提取溶液的浓度与高剪机转速(X_1X_2)对多酚质量分数的影响较显著。图4在 X_1 与 X_2 交互作用等高线中,沿A轴向等高线变化密集,而B轴向等高线变化相对稀疏,说明A(X_1)对响应值峰值的影响比B(X_2)大;图6,在 X_2 与 X_3 交互作用等高线中,等高线密度沿B(X_2)轴方向略大于C(X_3)轴方向,说明B(X_2)和C(X_3)的交互作用中,高剪机转速对响应值峰值的影响大于剪切时间。

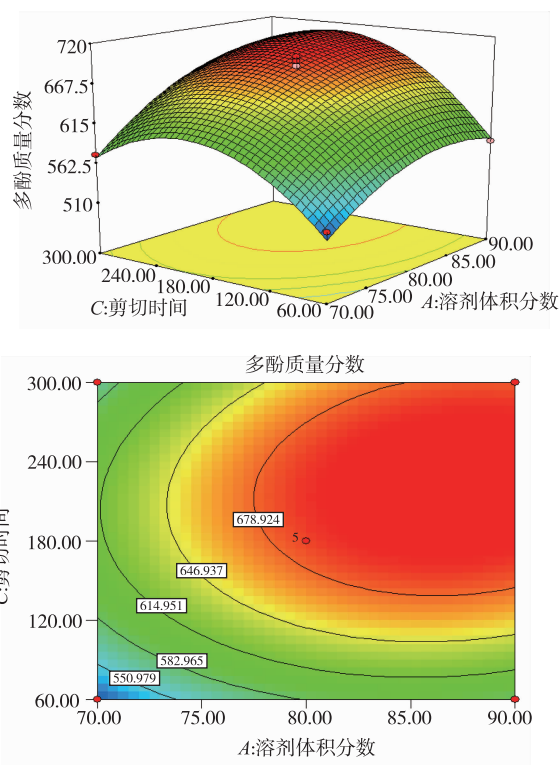


图5 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面与等高线

Fig. 5 Responsive surfaces and contours of $Y=f(X_1, X_3)$

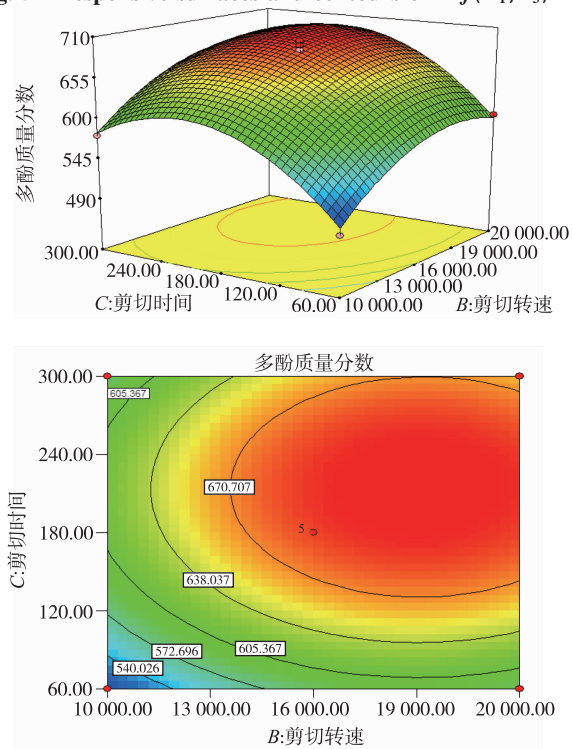


图6 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面与等高线

Fig. 6 Responsive surfaces and contours of $Y=f(X_2, X_3)$

2.2.5 提取工艺条件的确定 为进一步确定最佳点,利用 design-expert 7.0.0 软件对工艺条件进行

优化,可得悬钩子多酚提取的最佳条件为:提取溶剂的体积分数:86.45%,高剪机转速:18 218 r/min,剪切时间:221.98 s,预测多酚质量分数能达到715.76 mg/hg。为检验该法的可靠性,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺参数修正为:丙酮体积分数:85%,均质机功率:18 000 r/min,均质时间:220 s。进行悬钩子活性物质提取的验证实验,经3次平行实验,实际含量分别为712.54、719.64、709.49 mg/hg,实际得率平均值为(713.89±0.66) mg/hg,可见,实验结果与模型符合良好,说明该模型能较好地模拟和预测悬钩子提取物中总多酚的含量。根据此优化条件,测定悬钩子的总黄酮和花色苷的含量^[9]分别为(229.97±1.37) mg/hg 鲜果和(28.75±0.43) mg/hg 鲜果。

3 结 语

在单因素试验的基础上,通过响应面法优化了

冷冻均质提取悬钩子活性物质的工艺,建立了多元回归模型,模型拟合度良好。由 Design-Expert 7.0.0 软件分析确定了悬钩子多酚的最佳提取条件,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺参数修正为:丙酮体积分数:85%,均质机功率:18 000 r/min,均质时间:220 s。经验证试验测得悬钩子多酚质量分数可达713.89 mg/hg,表明实验结果与模型符合良好,说明该模型能较好地模拟和预测悬钩子提取物中总多酚的质量分数。在最优条件下提取的悬钩子提取物中总黄酮的质量分数为229.997 mg/hg,花色苷的质量分数为28.751 mg/hg 鲜果。为下一步功能性试验奠定良好的基础。此方法工艺简单,提取出的有效成分含量较高,采用冷冻均质提取可有效缩短提取时间,防止有效成分损失,可用于各种浆果类提取有效成分的研究。

参考文献:

- [1] 韩加,刘继文. 悬钩子属植物生物学作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2009,28(2):1-8.
HAN Jia, LIU Jiwen. Advances in the biological effects of plant Rubus [J]. **Chinese Wild Plant Resources**, 2009, 28 (2): 1-8. (in Chinese)
- [2] Wang S Y, Chen C T, Wang C Y. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries[J]. **Food Chemistry**, 2009, 112(3): 676-684.
- [3] Fan Z L, Wang Z Y, Zuo L L. Protective effect of anthocyanins from lingonberry on radiation-induced damages [J]. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2012, 9(12): 4732-4743.
- [4] Szajdek A, Borowska E J. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review [J]. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2008, 63(4): 147-156
- [5] Hua J N, Feng Z F, Liu Y F, et al. Extraction kinetics research of flavonoids from *Radix astragali* based on high shear dispersing emulsifier[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2012, 40(5): 752-756.
- [6] 许继华. 基于高剪切分散乳化技术的黄芪中黄酮类化合物提取方法及动力学研究[J]. 河北医药, 2013, 35(7): 1090-1092.
XU Jihua. Extraction kinetics research of flavonoids from radix astragali based on high shear dispersing emulsifier [J]. **Hebei Medical Journal**, 2013, 35(7): 1090-1092. (in Chinese)
- [7] 崔春兰,郑虎哲,顾立众,等. 响应曲面分析法优化苹果渣中多酚类物质的果胶酶辅助提取工艺[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2235-2240.
CUI Chunlan, ZHENG Huzhe, GU Lizhong, et al. Optimization of pectinase aided polyphenol extraction from apple pomace by response surface methodology[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2013, 29(9): 2235-2240. (in Chinese)
- [8] Tian S Q, Wang Z Y, Fan Z L, Zuo L L. Optimization of CO₂ laser-based pretreatment of corn stover using response surface methodology[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(22): 104930-104937.
- [9] Fan Z L, Wang Z Y, Liu J R. Cold-field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities in vitro [J]. **Food Chem**, 2011, 129(2): 402-407.
- [10] Zuo L L, Wang Z Y, Fan Z L, et al. Evaluation of antioxidant and antiproliferative properties of three actinidia (*Actinidia kolomikta*, *Actinidia arguta*, *Actinidia chinensis*) extracts in Vitro [J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2012, 13(5): 5506-5518.