

响应曲面法优化新疆药桑桑皮总多酚提取工艺

伍 春¹, 徐 立^{1,*}, 刘峻池¹, 黄先智¹, 买买提依明²

(1.西南大学生物技术学院, 重庆 400716; 2.新疆和田蚕桑科学研究所, 新疆 和田 848000)

摘 要: 采用响应曲面法对新疆药桑桑皮中多酚类化合物的提取工艺进行优化。在单因素试验的基础上, 选择乙醇体积分数、提取温度、提取时间, 进行三因素三水平的 Box-Behnken 中心组合试验设计, 采用响应曲面法(RSM)分析 3 个因素对响应值的影响。结果表明: 最佳提取工艺条件为溶剂中乙醇体积分数 78%、提取温度 70℃、提取时间 240min、液料比 30:1(mL/g), 在此条件下, 总多酚的得率达到 0.793%。该工艺稳定可靠, 可在生产中应用。

关键词: 新疆药桑; 桑皮; 总多酚; 响应曲面

Process Optimization for Total Polyphenol Extraction from the Tree Branch Bark of Xinjiang Black Mulberry (*Morus nigra* L.) by Response Surface Methodology

WU Chun¹, XU Li^{1,*}, LIU Jun-chi¹, HUANG Xian-zhi¹, MAIMAITI Yi-ming²

(1. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Sericulture Research Institute of Hetian Xinjiang, Hetian 848000, China)

Abstract: The objective of this study was the optimization of the extraction process for total polyphenols from the tree branch bark of Xinjiang black mulberry (*Morus nigra* L.) by response surface methodology. Based on single factor experiments, a three-factor, three-level Box-Behnken central composite design (CCD) coupled with response surface analysis (RSM) was employed to probe the effects of ethanol concentration, extraction temperature and length of extraction time on the yield of total polyphenols. It was found that the best extraction conditions were as follows: ethanol concentration, 78%; and liquid/material ratio, 30:1 (mL/g) for an extraction duration of 240 min at 70 °C, and that a maximum total polyphenol yield of 0.793% under such conditions. The extraction process proves stable and reliable and is applicable for the production of polyphenols.

Key words: *Morus nigra* L.; bark mulberry tree bark; total polyphenols; response surface methodology

中图分类号: S888.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0104-04

新疆药桑属半栽培半野生资源, 在植物分类学上属桑科桑属黑桑种(*Morus nigra* Linn.), 原产于伊朗, 16 世纪在我国新疆等地开始栽培, 是我国唯一的黑桑品种, 也是自然界极为罕见的珍稀药用果桑资源。在我国, 它一直被作为维吾尔族的民间药材, 用以治疗急性扁桃体炎、风湿关节痛、咽喉肿痛等疾病^[1]。现代药理学研究结果证实新疆药桑还具有包括防癌抗诱变、增强免疫力、保肾护肝、抗衰老、促进造血细胞生长、降糖降脂、预防血栓形成等多种防病、治病及保健功能^[2]。植物化学研究表明, 其含有多酚^[3-4]、多糖^[5-6]、生物碱^[7]等多种生物活性成分。现代科学研究表明^[8], 天然多酚类化合物具有优异的抗氧化性能和显著

清除自由基能力, 主要药理效应表现在延缓机体衰老, 预防心血管病、抗癌、抗辐射、抗艾滋病等方面。本实验通过响应曲面法优化桑皮总多酚的提取工艺, 为新疆药桑中总多酚的进一步研究提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

桑皮采自新疆蚕研所桑树种质资源圃, 选取无病虫害的桑枝, 剥取其皮、风干、粉碎待用。

乙醇、磷酸、过氧化氢、硫酸锂、浓盐酸、无水碳酸钠、钼酸钠、没食子酸、钨酸钠皆为分析纯。

FA2004A 型电子天平 上海精天电子仪器有限公司

收稿日期: 2010-03-13

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20090182120018);

国家现代农业(蚕桑)产业技术体系项目(nycytx-27-gw504)

作者简介: 伍春(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物功能性成分。E-mail: wuchun19860621@163.com

* 通信作者: 徐立(1976—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为植物功能性成分。E-mail: mulberry@swu.edu.cn

司; 紫外分光光度计 北京普析通用有限责任公司;
FFC-45D 型粉碎机 临沂大华机械厂; DHG-9123A 型电
热恒温鼓风干燥箱 上海齐欣科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原料的预处理

将桑皮放在 50℃ 的烘箱中烘干^[9], 粉碎后使用。原料直径应在 0.1~1mm 之间, 颗粒过大不利于提取, 过小不利于过滤分离。

1.2.2 桑皮中总多酚的提取与测定

准确称取桑皮样品 1.0g, 采用乙醇溶液提取法, 用一定体积分数的乙醇溶液提取桑皮总多酚, 过滤后滤液定容。采用福林试剂法^[3,10-13]分析检测。以没食子酸建立标准曲线作参照, 计算总多酚得率。分别考察提取时间[固定条件: 液料比 20:1 (mL/g)、提取温度 50℃、乙醇体积分数 80%; 提取时间 60、120、180、240、300min]、乙醇体积分数(固定条件: 液料比 20:1、提取温度 50℃、提取时间 120min; 乙醇体积分数 25%、45%、65%、80%、95%)、提取温度(固定条件: 液料比 20:1、提取时间 120min、乙醇体积分数 80%; 提取温度 15、30、50、70℃)、液料比[固定条件: 时间 120min、温度 50℃、乙醇体积分数 80%; 液料比 10:1、20:1、30:1、40:1(mL/g)]对提取效率的影响, 每组设定 4 个重复实验, 并在单因素试验的基础上, 选取乙醇体积分数、提取温度、提取时间 3 个对桑皮有效活性成分提取得率影响较大的因素, 利用响应曲面法(RSM)^[14-16], 采用中心组合试验 Box-Behnken 设计方案(表 1)对提取条件进行优化。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平及编码
Table 1 Variables and levels in the response surface design

因素	编码	水平			
		-1	0	1	
乙醇体积分数/%	X_1	45	62.5	80	
提取温度/℃	X_2	30	50	70	
提取时间/min	X_3	120	180	240	

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对桑皮总多酚得率的影响

由图 1 可知, 随着乙醇体积分数的增加, 总多酚的得率也随之增大, 当乙醇体积分数达到 80% 时总多酚得率最大, 之后随着乙醇体积分数的增加得率反而降低。主要原因可能是乙醇体积分数不同, 极性也不同, 当乙醇体积分数为 80% 时与多酚类化合物的极性相似, 溶解度最大; 乙醇体积分数小于 80% 时多酚类化合物并未完全浸出, 而大于 80% 时, 一些脂溶性物质的溶解

度增加, 影响了多酚类化合物的溶解。故将乙醇体积分数选定在 80% 左右。

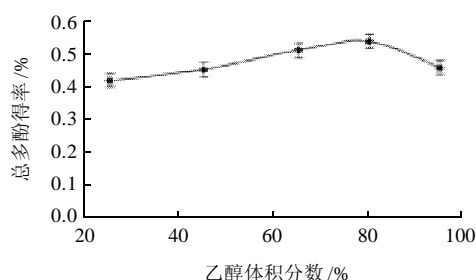


图 1 乙醇体积分数对多酚类化合物提取的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on the yield of total polyphenols

2.1.2 提取时间对桑皮总多酚得率的影响

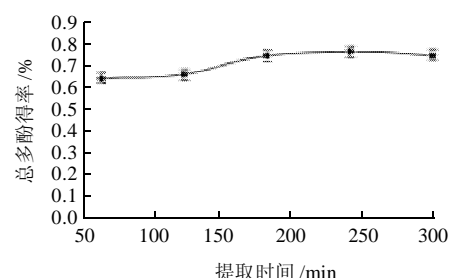


图 2 提取时间对多酚类化合物提取的影响

Fig.2 Effects of extraction time on the yield of total polyphenols

由图 2 可知, 提取时间为 240min 时, 总多酚得率最高。随着提取时间的再延长, 得率降低。可能是由于长时间的提取, 破坏了多酚类化合物的酚羟基结构, 导致其得率降低。因此提取时间 240min 左右为宜。

2.1.3 提取温度对桑皮总多酚得率的影响

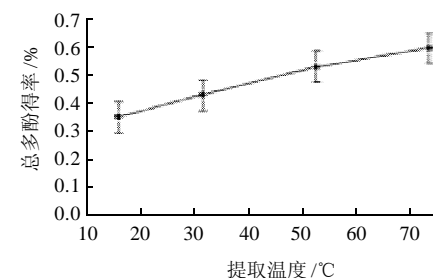


图 3 提取温度对多酚类化合物提取的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on the yield of total polyphenols

由图 3 可知, 在所考察温度范围内, 总多酚得率随温度的升高呈增大趋势。在 15~50℃ 之间, 总多酚得率的增大与温度的升高近似的成直线关系, 而在 50~70℃ 之间, 得率的增量明显的下降。分析其原因, 可

能是由于随着温度升高,一方面有利于还未游离出来的多酚类化合物的提取,另一方面也促进已经提取出来的物质的分解。这种综合效应使总多酚得率变化呈现如上趋势。

2.1.4 液料比对桑皮总多酚得率的影响

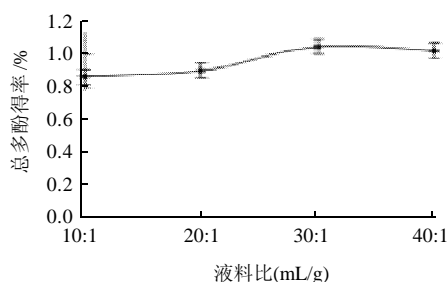


图4 液料比对多酚类化合物提取的影响

Fig.4 Effects of liquid/material ratio on the yield of total polyphenols

从图4可以看出,在开始阶段总多酚得率随着液料比的增大而增大,当液料比大于30:1(mL/g)时,总多酚得率略有降低。主要原因是:溶剂用量越多,传质动力越大,扩散到溶剂里的多酚类化合物就越多。但是在固液两相间,除了扩散溶解平衡外,还存在吸附平衡,低温有利于吸附。由于液料比的增大,在产生相同热量的条件下,提取液温度下降,吸附作用增强导致得率下降^[16]。考虑到液料比太高对后续的浓缩以及纯化工作带来不便。因此,30:1为较合适的液料比。

2.2 桑皮总多酚提取响应曲面法试验

2.2.1 桑皮总多酚得率拟合回归模型的建立

表2 响应面法试验设计与结果

Table 2 Arrangement and results of the four-variable/ three-level response surface central composite design

试验号	因素			得率/%
	X_1	X_2	X_3	
1	1	1	0	0.580
2	1	0	-1	0.591
3	0	1	-1	0.608
4	0	0	0	0.613
5	1	-1	0	0.647
6	0	0	0	0.660
7	0	0	0	0.673
8	-1	0	-1	0.700
9	-1	-1	0	0.701
10	0	1	1	0.701
11	0	0	0	0.704
12	-1	0	1	0.706
13	0	-1	1	0.745
14	-1	1	0	0.754
15	0	0	0	0.756
16	0	-1	-1	0.777
17	1	0	1	0.787

按照中心组合设计试验方案进行三因素三水平试验,试验结果见表2。将所得的试验数据采用 Design-Expert 软件进行多元回归拟合,得到以多酚得率为目标函数的二次回归方程:

$$Y=0.12103+0.0080347X_1+0.0039446X_2+0.0005640X_3+0.0000143X_1X_2+0.0000081X_1X_3-0.0000015X_2X_3-0.0000704X_1^2-0.0000058X_2^2-0.0000016X_3^2$$

由回归方程可知,乙醇体积分数、提取温度和提取时间3个线性项对多酚得率影响最大,而3个因素的交互项和二次项对多酚的得率影响较小。

2.2.2 试验结果的方差显著性分析

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.06300	9	0.00705	14.600	0.00090**
X_1	0.00480	1	0.00480	9.950	0.01600*
X_2	0.05100	1	0.05100	105.780	< 0.0001**
X_3	0.00495	1	0.00495	10.260	0.01500*
X_1X_2	0.00010	1	0.00010	0.210	0.66270
X_1X_3	0.00029	1	0.00029	0.600	0.46430
X_2X_3	0.00001	1	0.00001	0.025	0.87790
X_1^2	0.00196	1	0.00196	4.060	0.08370
X_2^2	0.00002	1	0.00002	0.047	0.83430
X_3^2	0.00014	1	0.00014	0.300	0.60320
残差	0.00338	7	0.00048		
失拟项	0.00335	3	0.00112	177.370	0.00010**
纯误差	0.00003	4	0.00001		
总和	0.06700	16			
决定系数	0.9494		变异系数	3.19%	

注: **.差异极显著($P < 0.01$); *.差异显著($P < 0.05$)。

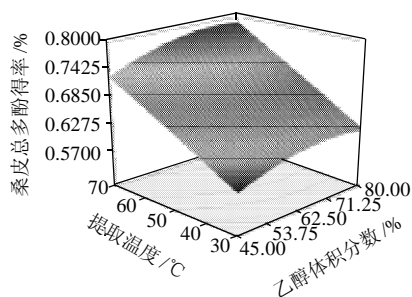
为了检验方程的有效性,对桑皮中总多酚得率的数学模型进行方差分析,并对各因素的偏回归系数进行检验,分析结果见表3。由表3可知,一次项中 X_2 的 P 值差异极显著,说明提取温度对桑皮总多酚的得率有极显著影响; X_1 和 X_3 的 P 值差异都显著,说明乙醇体积分数和提取时间对桑皮总多酚的得率有显著影响。二次项和交互项均未达到显著水平。回归方程的 P 值差异极显著,模型的决定系数 $R^2=0.9494$,说明该模型能解释94.94%响应值的变化,变异系数3.19%,说明实验有较好的精确度和可靠性,因而该模型拟合程度比较好,试验误差小,可以用此模型对乙醇溶液提取桑皮多酚类化合物进行分析和预测。

2.2.3 响应曲面分析

由图5可知,乙醇体积分数、提取温度、提取时间对总多酚得率的影响都很显著,且提取温度的影响最为显著,但是3个因素的交互项影响不大。

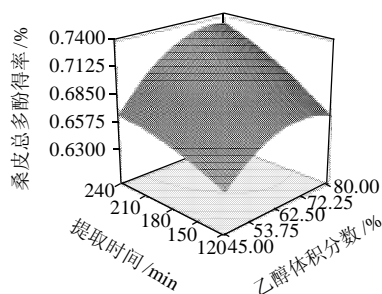
通过软件分析,乙醇溶液提取桑皮总多酚的最佳条

件为乙醇体积分数 77.95%、提取温度 70℃、提取时间 240min。在此条件下总多酚得率可达 0.814%。



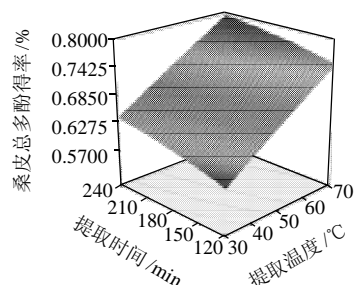
固定水平: 提取时间 180min。

A. 乙醇体积分数和提取温度



固定水平: 提取温度 50℃。

B. 乙醇体积分数和提取时间



固定水平: 乙醇体积分数 62.5%。

C. 提取温度和提取时间

图5 各两因素对桑皮总多酚得率影响的响应曲面和等高线
Fig.5 Three-dimensional response surface diagrams showing the pairwise interactive effects of three factors on the yield of total polyphenol

为检验 RSM 方法的可靠性, 采用上述最优提取条件进行总多酚的提取实验, 同时考虑到实际操作的情况, 将总多酚最佳提取条件修正为乙醇体积分数 78%、提取温度 70℃、提取时间 240min, 实际测得的总多酚得率为 0.793%, 与理论预测值比较误差为 2.56%。因此

采用响应曲面法优化得到的提取条件参数基本准确可靠, 具有一定的实用价值。

3 结 论

近年来, 多酚类化合物以其优越的药理活性越来越受广大消费者的青睐, 因此如何高效提取多酚类化合物, 尤显重要。本实验通过单因素试验和响应曲面分析, 得到用乙醇溶液提取新疆药桑桑皮总多酚的最佳工艺条件为乙醇体积分数 78%、提取温度 70℃、提取时间 240min, 实际测得的总多酚得率为 0.793%, 与理论预测值比较误差仅为 2.56%, 该方法稳定可靠。

参考文献:

- [1] 新疆蚕学会. 新疆桑树品种志[M]. 乌鲁木齐: 新疆维吾尔自治区农业厅, 1980: 3-7.
- [2] 宋大可, 买买提依明, 乃比江. 新疆药桑果汁化学成分及药物价值的探讨[J]. 蚕桑通报, 1994, 25(4): 23; 34.
- [3] BAE S H, SUH H J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(6): 955-962.
- [4] 买买提依明, 徐立, 武春, 等. 新疆药桑黄酮和多酚的提取与分析研究初报[J]. 北方蚕业, 2008, 29(4): 12-14.
- [5] ASANO N, YAMASHITA T, YASUDA K, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.)[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(9): 4208-4213.
- [6] 张帆, 刘宏炳, 田树革, 等. 药桑中黄酮和多糖的超声提取与含量测定[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(5): 282-283.
- [7] DAIMON T, TAGUCHI T, MENG Y, et al. β -fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex[J]. J Biol Chem, 2008, 283(22): 15271-15279.
- [8] 孙宏, 张泽. 分光光度法测定天然多酚类化合物含量的研究进展[J]. 生物质化学工程, 2008, 42(3): 55-58.
- [9] JARA P J, SARA A, MARIA T, et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results[J]. Food Research International, 2008, 41(3): 274-285.
- [10] 曹艳萍, 代宏哲, 曹炜, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定红枣总酚[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1299-1302.
- [11] SEGEV A, BADANI H, KAPULNIK Y, et al. Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in colored chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(2): 115-119.
- [12] 刘丽香, LAURA T, 梁兴飞. Folin-Ciocalteu 比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 101-106.
- [13] MOYER R A, HUMMER K E, FINN C E, et al. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(3): 519-525.
- [14] 杨佳, 张国文, 汪佳蓉, 等. 响应面分析法优化超声提取赣南脐橙皮中黄酮类化合物的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 94-97.
- [15] 查阳春, 杨义昕, 胡晓茵, 等. 响应面法优化荞麦壳中原花青素的提取工艺[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 189-192.
- [16] 董艳红, 李姝婧, 郑惠华, 等. 响应曲面优化超声波提取灵芝多糖工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 98-101.