

响应面法优化超声波辅助提取黑加仑多酚工艺及其抗氧化活性分析

宁志雪, 朱立斌, 朱 丹, 牛广财, 魏文毅, 徐瑞航

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Blackcurrant Polyphenols by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

NING Zhixue, ZHU Libin, ZHU Dan, NIU Guangcai, WEI Wenyi, and XU Ruihang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022010220>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化超声辅助提取芥菜多酚工艺及其抗氧化活性研究

Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction Technology of Polyphenol by Response Surface Methodology from *Capsella bursa-pastoris* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(2): 223-228,232

响应面优化蒲公英多酚超声波辅助乙醇提取工艺及其抗氧化性

Optimization of ultrasonic-assisted alcohol extraction of polyphenols from dandelion and their antioxidant activity

食品工业科技. 2017(02): 287-292

响应面优化紫果西番莲叶多酚超声辅助提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Polyphenols in the Purple Passionfruit Leaves by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2021, 42(1): 211-216,226

响应面法优化超声辅助提取代代花总黄酮的工艺及其抗氧化活性研究

Optimization of the Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Citrus aurantium* L. var daidai by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(24): 159-164,171

香蓼总多酚超声波辅助提取工艺优化及其体外抗氧化活性评价

Optimization of ultrasonic assisted extraction technology of total polyphenol from *Polygonum viscosum* and its antioxidant activity evaluation in vitro

食品工业科技. 2017(10): 281-285

特纳草黄酮超声强化提取工艺的响应面法优化及其抗氧化性

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Process of Flavonoids from *Damiana* by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2021, 42(16): 191-198



宁志雪, 朱立斌, 朱丹, 等. 响应面法优化超声波辅助提取黑加仑多酚工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 221–228. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010220

NING Zhixue, ZHU Libin, ZHU Dan, et al. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Blackcurrant Polyphenols by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 221–228. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010220

· 工艺技术 ·

响应面法优化超声波辅助提取黑加仑多酚工艺及其抗氧化活性分析

宁志雪^{1,2}, 朱立斌^{1,2}, 朱 丹^{3,*}, 牛广财^{1,2,*}, 魏文毅^{1,2}, 徐瑞航^{1,2}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;

2. 黑龙江省农产品加工工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319;

3. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 为提高黑加仑多酚的提取效率, 采用乙醇溶液作为提取溶剂, 超声波辅助对黑加仑果中多酚进行提取。通过单因素实验考察了乙醇体积分数、超声波功率、提取时间、料液比对黑加仑果多酚提取量的影响。在单因素实验的基础上, 结合响应面法优化提取工艺, 并对黑加仑果多酚的抗氧化活性进行分析。结果表明: 响应面法得到的黑加仑果多酚最佳提取工艺为: 乙醇体积分数 50%, 超声波功率 300 W, 提取时间 20 min, 料液比 1:10 g/mL。在上述提取条件下, 黑加仑果多酚提取量为 538.00 mg/100 g。抗氧化活性表明, 黑加仑果多酚对 DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基清除率的 IC₅₀ 值分别为 7.97、7.92 和 5.26 mg/mL, 表明黑加仑果多酚具有较好的抗氧化活性。该结果可为黑加仑果多酚的工业化生产提供参考。

关键词: 黑加仑, 多酚, 响应面法, 超声波辅助提取, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)22-0221-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010220

本文网刊:



Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Blackcurrant Polyphenols by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

NING Zhixue^{1,2}, ZHU Libin^{1,2}, ZHU Dan^{3,*}, NIU Guangcai^{1,2,*}, WEI Wenyi^{1,2}, XU Ruihang^{1,2}

(1. Food College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

2. Agri-Food Processing and Engineering Technology Research Center of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China;

3. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to improve the extraction efficiency of blackcurrant polyphenols, ethanol solution was used as extraction solvent, and the polyphenols in blackcurrant fruit were extracted by ultrasonic-assisted method. The effects of ethanol concentration, ultrasonic power, extraction time and solid-liquid ratio on polyphenol extraction from blackcurrant fruit were investigated by single factor experiments. On the basis of single factor experiment, the extraction process was optimized by response surface methodology, and the antioxidant activity of blackcurrant polyphenols was analyzed. The results showed that the optimum extraction conditions of polyphenols from blackcurrant fruit by response surface methodology were as follows: Ethanol concentration was 50%, ultrasonic power was 300 W, extraction time was 20 min, and solid-liquid ratio was 1:10 g/mL. Under the above extraction conditions, the extraction amount of blackcurrant polyphenols was

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 黑龙江省高校首批“新工科”研究与实践项目(黑教高函[2018]681号); 黑龙江八一农垦大学“三横三纵”平台支持计划项目(PTJH202103); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX-Y56)。

作者简介: 宁志雪(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏与精深加工, E-mail: 3172620736@qq.com。

*** 通信作者:** 朱丹(1972-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 植物资源开发利用, E-mail: 623016878@qq.com。

牛广财(1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: gcnui@126.com。

538.00 mg/100 g. The antioxidant activity showed that the IC_{50} values of blackcurrant polyphenols on DPPH, hydroxyl and ABTS⁺ radical scavenging rates were 7.97, 7.92 and 5.26 mg/mL, respectively, it indicated that blackcurrant polyphenols had good antioxidant activity. The results could provide reference for industrial production of blackcurrant polyphenols.

Key words: blackcurrant; polyphenol; response surface methodology; ultrasonic-assisted extraction; antioxidant activity

黑加仑(*Ribes nigrum* L.)学名为黑穗醋栗,俗称黑豆果,是虎耳草科茶藨子属的一种多年生小灌木浆果植物,成熟果实为紫黑色、酸甜可口,具有耐寒、抗风沙等特点^[1-2]。黑加仑果实中的酚类化合物种类繁多,包括酚酸、类黄酮、花青素和原花青素等^[3],具有优良的抗菌、抗氧化、抗高血压和抗肿瘤特性^[4-5],逐渐成为了近年来营养学研究的热点。从黑加仑果实中提取的酚类化合物,在食品、保健品和医药工业中具有广阔的应用前景。

从植物中提取多酚的传统方法主要包括溶剂萃取、加压液体萃取、酶提取等^[1]。近年来,超声波辅助提取技术因其高效、相对环保的特点而日益受到关注^[6],在多酚提取中取得良好效果。例如,王文良^[7]采用超声波辅助乙醇溶剂法对海棠果进行处理并测定其抗氧化性,在乙醇体积分数 44%,超声时间 41 min,液料比 26:1、超声温度 51 ℃ 的条件下处理海棠果,此时,多酚提取量可达 28.26 mg/g,经 LSA-900C 型大孔树脂纯化后,12 μg/mL 的海棠果多酚就可使 DPPH 自由基清除率达到 88.37%。刘皓涵等^[8]采用超声波辅助酶法对欧李果中多酚进行提取,在料液比 1:30 g/mL、超声波功率 105 W、酶解温度 50 ℃、酶解时间 80 min 的条件下处理欧李果实,多酚提取量为 42.63 mg/g,其对 DPPH、ABTS⁺和羟自由基清除率的 IC_{50} 值分别为 98.42、49.87 和 66.92 μg/mL。由此可见,采用超声波辅助对多酚进行提取,具有时间短、萃取量多、操作简单的优点^[9]。目前,尚未见采用超声辅助乙醇溶剂法对黑加仑中多酚进行提取的研究。本研究以黑加仑果为原料,采用超声波辅助乙醇溶剂法提取多酚,通过单因素实验和响应面法优化提取工艺,并对其抗氧化活性进行测定,以期在黑加仑多酚的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黑加仑果 购于黑龙江省尚志市亚布力北方小浆果种植专业合作社,挑选成熟度一致、新鲜饱满、无机械损伤及病虫害的果实作为实验原料;没食子酸 美国 Sigma 公司;1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)、水溶性维生素 E(Trolox) Aldrich 化学试剂公司;维生素 C 标准品(HPLC ≥ 99%) 上海源叶生物科技有限公司;福林酚试剂、无水碳酸钠、无水乙醇、甲醇、过硫酸钾、硝酸铈、浓硫酸、硫酸亚铁、过氧化氢 均为国产分析纯。

HG7701 型手持式多功能食物搅拌机 宁波禾高电子科技有限公司;YM-T1000CT 多用途恒温超

声波提取器 上海豫明仪器有限公司;EX324 型电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司;DK-98-II A 型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;L420 型台式低速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;756 型紫外可见分光光度计 上海光学仪器一厂。

1.2 实验方法

1.2.1 黑加仑果多酚超声波辅助提取工艺流程与操作要点 黑加仑果→挑选→清洗→打浆→加乙醇溶剂→超声波辅助提取→提取液离心→定容→测定→计算黑加仑多酚提取量

操作要点:准确称取 10 g 黑加仑果浆于烧杯中,按照设定的料液比加入一定体积的乙醇溶液,覆膜后置于恒温超声波提取器中,按照设定的参数进行提取,然后以 4000 r/min 的速度对提取液离心 15 min,取上清液定容后,进行测定,并计算黑加仑多酚提取量。

1.2.2 单因素实验 参考代沛珊等^[10]的方法并根据预实验的结果,设定乙醇体积分数 70%,超声波功率 300 W,提取时间 15 min,料液比 1:10 g/mL,提取温度 60 ℃ 为黑加仑果多酚单因素实验过程中的固定条件,在此基础上,研究乙醇体积分数、超声波功率、提取时间、料液比对黑加仑多酚提取量的影响。

1.2.2.1 乙醇体积分数对黑加仑多酚提取量的影响

以料液比为 1:10 g/mL,超声波功率为 300 W,提取温度为 60 ℃,乙醇体积分数分别为 30%、40%、50%、60%、70% 的条件下提取 15 min,考察乙醇体积分数对黑加仑多酚提取量的影响。

1.2.2.2 超声波功率对黑加仑多酚提取量的影响

以料液比为 1:10 g/mL,乙醇体积分数为 70%,提取温度为 60 ℃,超声波功率分别为 200、250、300、350、400 W 的条件下提取 15 min,考察超声波功率对黑加仑多酚提取量的影响。

1.2.2.3 提取时间对提取率的影响 以料液比为 1:10 g/mL,乙醇体积分数为 70%,超声波功率为 300 W,提取温度为 60 ℃,提取时间分别为 5、10、15、20、25 min 的条件下提取,考察提取时间对黑加仑多酚提取量的影响。

1.2.2.4 料液比对提取率的影响 以超声波功率为 300 W,提取温度为 60 ℃,乙醇体积分数为 70%,料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 g/mL 的条件下提取 15 min,考察料液比对黑加仑多酚提取量的影响。

1.2.3 响应面优化黑加仑多酚提取工艺 以乙醇体

积分数(A)、超声波功率(B)、提取时间(C)、料液比(D)为因素,多酚提取量为响应值,进行响应面分析,因素与水平编码表见表1。

表1 试验因素与水平设计编码

Table 1 Codes of experimental factors and levels in Box-Behnken design

水平	A乙醇体积分数 (%)	B超声波功率 (W)	C提取时间 (min)	D料液比 (g/mL)
-1	40	250	15	1:5
0	50	300	20	1:10
1	60	350	25	1:15

1.2.4 多酚标准曲线绘制 采用福林酚法测定多酚含量,以没食子酸为标准物质,参考洪玲等^[11]修改如下:配制浓度为0.20 mg/mL的没食子酸标准溶液,分别量取0、1、2、3、4、5 mL没食子酸标准溶液于100 mL容量瓶中,然后添加0.5 mL福林酚试剂,反应5 min,再添加3 mL的7.5%的Na₂CO₃溶液,用蒸馏水定容至刻度,摇匀;于20℃水浴1 h。用分光光度计在765 nm波长处测吸光度。以没食子酸浓度(mg/mL)为横坐标(x),吸光度为纵坐标(y),得标准曲线方程为: $y=0.7651x-0.0012$, $R^2=0.9960$ 。

1.2.5 黑加仑多酚提取量的测定 按照1.2.1的提取工艺流程,取1 mL定容后的黑加仑上清液、10 mL蒸馏水、0.5 mL福林酚试剂于100 mL容量瓶中反应5 min,再加3 mL 7.5%的Na₂CO₃溶液,用蒸馏水定容至刻度,摇匀。于20℃水浴1 h后,在765 nm波长处测吸光度,并按照公式(1)计算多酚含量。

$$m = \frac{C \times V \times N}{W \times 100} \quad \text{式(1)}$$

式中: m表示黑加仑多酚提取量, mg/100 g; C表示样品液总酚浓度, mg/mL; V表示提取液体积, mL; N表示稀释倍数; W表示黑加仑果质量, g。

1.2.6 黑加仑多酚抗氧化活性测定

1.2.6.1 DPPH自由基清除率测定 参照Brand-Williams等^[12]的方法并做了适当修改,具体操作步骤如下:在甲醇中配制1 mmol/L的DPPH溶液,稀释至0.1 mmol/L,现配现用。将溶液的吸光度在517 nm处调整为0.650±0.020。然后,将200 μL样品或Trolox标准品与2800 μL DPPH溶液混合,静置6 min后,在517 nm处测定吸光度。空白溶液中加入等量的DPPH试剂和200 μL甲醇。DPPH自由基清除率计算如下:

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A₀为对照的吸光度; A₁为样品的吸光度。

1.2.6.2 羟自由基清除率测定 参照范金波等^[13]的方法并做了适当修改,具体操作步骤如下:在去离子水中配制0.16 mmol/L的Ce(NO₃)₃溶液、10 mmol/L的H₂SO₄溶液、1 mmol/L的FeSO₄溶液和0.3 mmol/L

的H₂O₂溶液,分别取3、3、2、6 mL上述溶液与2 mL样品或Trolox标准品定容至25 mL,混均,静置60 min后,在360 nm处测定吸光度。羟基自由基清除率计算如下:

$$\text{羟自由基清除率} = \frac{F_1 - F_0}{F - F_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: F₁为样品组吸光值; F₀为对照组吸光值; F为空白组吸光值。

1.2.6.3 ABTS⁺自由基清除率测定 参照Re等^[14]的方法并做了适当修改,具体操作步骤如下:将7 mmol/L ABTS溶液与2.45 mmol/L K₂S₂O₈混合,并在室温避光放置12~16 h后使用。用甲醇稀释ABTS⁺溶液,使其在734 nm处吸光度为0.70±0.02。将10~100 μL的样品或Trolox标准品加入到2.5 mL稀释后的ABTS⁺溶液中,静置6 min后,测定其在734 nm处的吸光度。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中: A₀为空白组吸光度; A₁为样品组吸光度。

1.3 数据处理

本实验中单因素实验均重复三次,结果取平均值±标准差,使用Origin 8.6软件作图, Design-Expert V8.0.6软件对响应面试验进行分析, SPSS 26.0软件计算清除率为50%时的半数清除浓度(IC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 乙醇体积分数对黑加仑多酚提取量的影响 由图1可知,黑加仑多酚提取量在乙醇体积分数30%~50%时呈显著(P<0.05)上升趋势,在50%时达到最大值530.23 mg/100 g,推测黑加仑多酚在50%乙醇的作用下溶解速率最佳,扩散能力最强^[15]。多酚提取量在乙醇体积分数超过50%时呈下降趋势,这可能是过高的乙醇浓度导致非酚类化合物溶出^[16]。另外,乙醇浓度过高会导致极性下降和蛋白质变性^[8,17],而使多酚提取量下降,影响黑加仑多酚的提取。代沛珊等^[10]在提取黑果枸杞多酚的实验也表明,在乙醇体积分数为50%时,有利于水溶性与非水

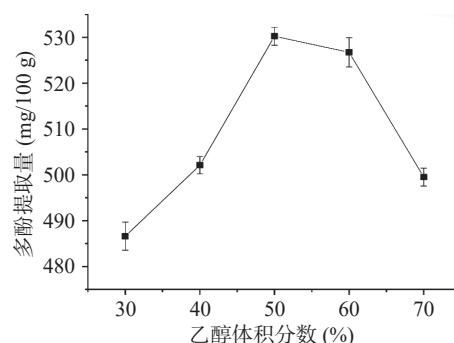


图1 乙醇体积分数对黑加仑多酚提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol volume fraction on polyphenol extraction from blackcurrant

溶性多酚的溶出。因此,在本实验中最佳乙醇体积分数为 50%。

2.1.2 超声波功率对黑加仑多酚提取量的影响 超声波功率对黑加仑果多酚提取量的影响如图 2 所示。结果表明,当超声波功率为 300 W 时,多酚提取量最高,达到 498.86 mg/100 g,当超声波功率低于 300 W 时,随着超声波功率的增加,多酚提取量也不断增加。这是因为超声波产生的空化和振动效应会破坏植物细胞并释放多酚化合物,还会促进溶剂渗透到植物组织中,从而增加传质和提取介质的快速饱和^[18-19];而当超声波功率高于 300 W 时,多酚提取量随着超声波功率的增加而减少,这是因为过高的超声振幅可能会降解酚类成分,从而对提取多酚产生不利影响^[20,21]。Wang 等^[22]采用超声波辅助技术对百香果中多酚进行提取时,最佳超声波功率也为 300 W,与本实验结果相一致。因此,在本实验中最佳超声波功率为 300 W。

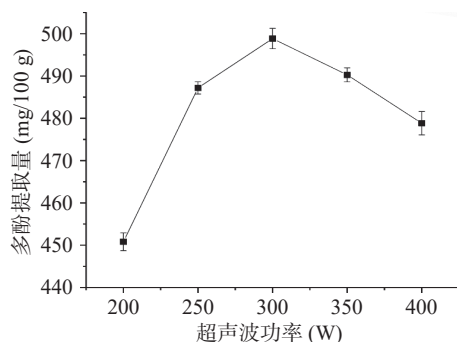


图 2 超声波功率对黑加仑多酚提取量的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic power on polyphenol extraction from blackcurrant

2.1.3 提取时间对黑加仑多酚提取量的影响 由图 3 可知,在 5~20 min 范围内,多酚化合物提取量随着提取时间的延长不断增加,20 min 时达到最大值 528.34 mg/100 g。这可能是因为是在超声波处理的早期阶段,提取物和溶剂之间的浓度差异很大^[23],细胞组织被破坏的程度越来越重,多酚类物质的释放和扩散会逐渐增强。当提取时间大于 20 min 时,多酚提取量开始下降,这可能是因为提取时间过长时,会

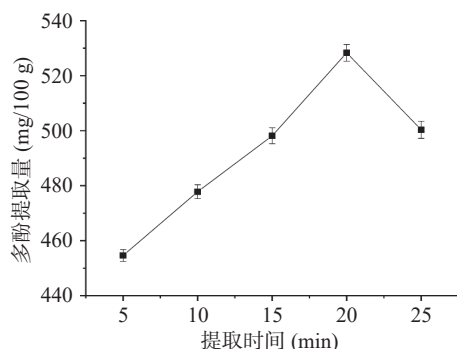


图 3 提取时间对黑加仑多酚提取量的影响

Fig.3 Effect of extraction time on polyphenol extraction from blackcurrant

产生一些来自细胞的不溶性物质,降低植物细胞内外的传质速率,阻碍了多酚提取量的增加^[24]。另外,长时间提取还会导致多酚化合物分解或氧化,降低提取效率^[25]。金莹等^[26]在采用超声波辅助技术提取苹果中多酚的最佳提取时间也为 20 min,这与本实验结果一致。因此,在超声波辅助提取黑加仑多酚时,最佳提取时间为 20 min。

2.1.4 料液比对黑加仑多酚提取量的影响 由图 4 可知,当料液比从 1:5 增加到 1:10 g/mL 时,多酚提取量呈上升趋势,当料液比为 1:10 g/mL 时,多酚提取量最高,达到 499.70 mg/100 g,这可能是因为料液比的增加提高了溶剂渗透率^[27],同时还可防止介质饱和和^[28],增强了多酚的溶出。当料液比大于 1:10 g/mL 时,多酚提取量呈逐渐下降趋势,这可能是因为过量的料液比会导致细胞膜的阻滞作用增大、超声波衰减和溶剂粘度上升以及饱和度下降^[29-32],这都会影响多酚的提取。张家豪等^[33]采用超声波辅助技术对黑果腺肋花楸中多酚进行提取时,其最佳料液比为 1:10 g/mL,说明这个料液比对于黑果腺肋花楸和黑加仑等浆果多酚的提取是合适的。因此,在本实验中最佳料液比为 1:10 g/mL。

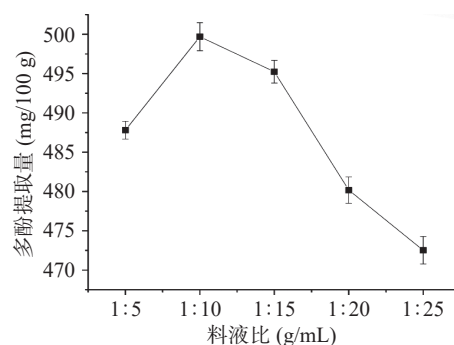


图 4 料液比对黑加仑多酚提取量的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on extraction amount of polyphenols from blackcurrant

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 模型的建立与分析 以乙醇体积分数(A)、超声波功率(B)、提取时间(C)和料液比(D)为试验因素,多酚提取量 Y(mg/100 g)为评价指标,运用 Design-Expert V8.0.6 Box-Behnken 进行响应面设计,其试验设计及结果见表 2。

对表 2 中数据进行回归分析,得到二次回归模型如下:

$$Y = 536.95 + 2.56A - 4.67B - 5.34C + 3.16D - 11.77AB - 9.05AC + 4.19AD - 7.51BC + 0.11BD + 0.34CD - 14.83A^2 - 15.96B^2 - 12.39C^2 - 10.47D^2$$

回归系数显著性检验结果如表 3 所示。从表 3 可知模型 $P < 0.0001$, 极显著,回归模型的失拟项 $P = 0.3103 > 0.05$,说明该模型不存在显著误差,实验可靠;模型决定系数 R^2 值为 0.8933,拟合度较高,表明该模型与实验拟合程度较好,可用于黑加仑果多酚提

表 2 黑加仑多酚提取工艺的响应面实验设计与结果

Table 2 Response surface experiment design and results of polyphenols extraction from blackcurrant					
实验号	A	B	C	D	Y: 多酚提取量(mg/100 g)
1	-1	-1	0	0	504.75
2	1	-1	0	0	525.54
3	-1	1	0	0	515.29
4	1	1	0	0	489.01
5	0	0	-1	-1	521.50
6	0	0	1	-1	512.09
7	0	0	-1	1	520.39
8	0	0	1	1	512.32
9	-1	0	0	-1	502.09
10	1	0	0	-1	504.76
11	-1	0	0	1	506.94
12	1	0	0	1	526.36
13	0	-1	-1	0	503.54
14	0	1	-1	0	520.99
15	0	-1	1	0	508.02
16	0	1	1	0	495.41
17	-1	0	-1	0	502.65
18	1	0	-1	0	527.81
19	-1	0	1	0	507.98
20	1	0	1	0	496.96
21	0	-1	0	-1	515.41
22	0	1	0	-1	497.74
23	0	-1	0	1	521.35
24	0	1	0	1	504.11
25	0	0	0	0	541.63
26	0	0	0	0	528.12
27	0	0	0	0	537.45
28	0	0	0	0	536.98
29	0	0	0	0	540.59

取过程的分析 and 优化。由 F 值可知, 各因素对多酚提取量的影响大小顺序为: 提取时间>超声波功率>料液比>乙醇体积分数。

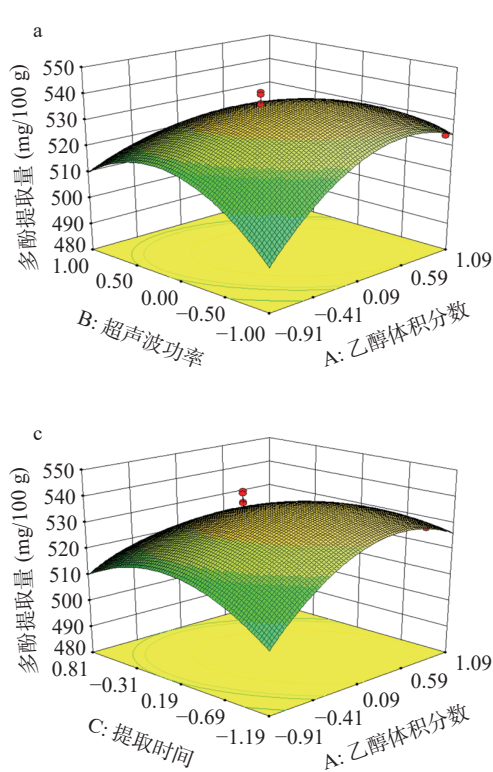


表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Variance analysis results of regression model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	5104.22	14	364.59	8.37	0.0002	**
A	78.75	1	78.75	1.81	0.2	
B	261.89	1	261.89	6.02	0.0279	*
C	342.4	1	342.4	7.87	0.0141	*
D	119.57	1	119.57	2.75	0.1197	
AB	553.9	1	553.9	12.72	0.0031	**
AC	327.25	1	327.25	7.52	0.0159	*
AD	70.14	1	70.14	1.61	0.225	
BC	225.9	1	225.9	5.19	0.0389	*
BD	0.046	1	0.046	1.06E-03	0.9745	
CD	0.45	1	0.45	0.01	0.9206	
A ²	1427.51	1	1427.51	32.79	<0.0001	**
B ²	1651.71	1	1651.71	37.94	<0.0001	**
C ²	996.54	1	996.54	22.89	0.0003	**
D ²	711.04	1	711.04	16.33	0.0012	**
残差	609.49	14	43.53			
失拟项	496.11	10	49.61	1.75	0.3103	
纯误差	113.37	4	28.34			
总和	5713.71	28				

注: **: 差异极显著, $P<0.01$; *: 差异显著, $P<0.05$ 。

2.2.2 数学模型及响应面分析 三维曲面图反映了乙醇体积分数、超声波功率、提取时间和料液比这四个因素中两个独立变量在其中心点保持不变时, 其他两个因素的相互作用对黑加仑多酚提取量的影响。其曲面坡度越陡峭、等高线形状越扁平说明各因素之间交互作用越显著^[34]。

由图 5 和表 3 可知, 交互项 AC、BC 对 Y 影响显著($P<0.05$), 交互项 AB 对 Y 影响极显著($P<0.01$), 其余交互项均不显著。其中, AB 表明乙醇体积分数

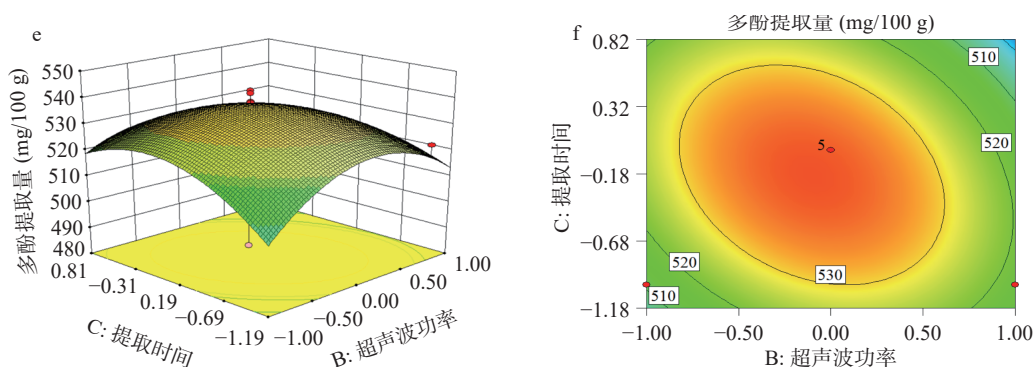


图5 各因素交互作用的响应面图

Fig.5 Response surface diagram of interaction of factors

和超声波功率对黑加仑果多酚提取量最为显著,由图 5a、图 5b 可知,随着乙醇体积分数和超声波功率的增加,黑加仑多酚提取量先增加后减少,且乙醇体积分数曲面的坡度较平滑,说明超声波功率的影响大于乙醇体积分数。当乙醇体积分数为 50%,超声波功率为 300 W 时,为临界最佳参数。图 5c、图 5e 分别呈现出提取时间和超声波功率、乙醇体积分数之间显著的交互作用,图中提取时间曲面较陡,说明提取时间的影响程度大于超声波功率和乙醇体积分数。

2.2.3 响应面优化结果及验证 以黑加仑多酚提取量的最大化为目标,预测得到的最佳提取条件为:乙醇体积分数 52.65%,超声波功率 290.83 W,提取时间 18.73 min,料液比 1:11 g/mL,在此提取条件下,回归方程模型对黑加仑多酚提取量的预测值为 538.71 mg/100 g。考虑实际操作可行性,将提取参数调整为:乙醇体积分数 50%,超声波功率 300 W,提取时间 20 min,料液比 1:10 g/mL,在 60 ℃ 下进行 3 次平行试验,得到黑加仑多酚的实际提取量 538.00 ± 5.45 mg/100 g,与预测理论值相差小于 5%,表明该回归模型适用于黑加仑多酚提取工艺参数的优化和分析。

2.3 黑加仑果多酚体外抗氧化活性

由图 6 可知,在 2~10 mg/mL 浓度范围内,黑加仑多酚对 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS⁺自由基都具有一定的清除能力。随着浓度的升高,黑加仑多酚的清除能力随之增强,当浓度为 12 mg/mL 时,黑加仑多酚对 DPPH 自由基、羟自由基、ABTS⁺自由基的清除率达到最大值,分别为 60.87%、62.79%、77.70%,但均低于同质量浓度下 V_C 的清除率。

由图 6 和表 4 可知,黑加仑多酚对不同自由基的清除能力存在一定差异,清除 ABTS⁺自由基的活性最强,其 IC₅₀ 值为 5.26 mg/mL,清除 DPPH 自由基和羟自由基的活性相对较弱,其 IC₅₀ 值分别为 7.97、7.92 mg/mL,这一规律与扶庆权等^[35]对黑加仑多酚抗氧化的研究结果相一致。另外,Łaczkó 等^[36]研究发现,使用超声波辅助 50% 甲醇提取并且经尼龙膜纯化后的黑加仑多酚对 DPPH 自由基清除率的 IC₅₀ 值为 1.90 mg/mL,而对 ABTS⁺自由基清除率的

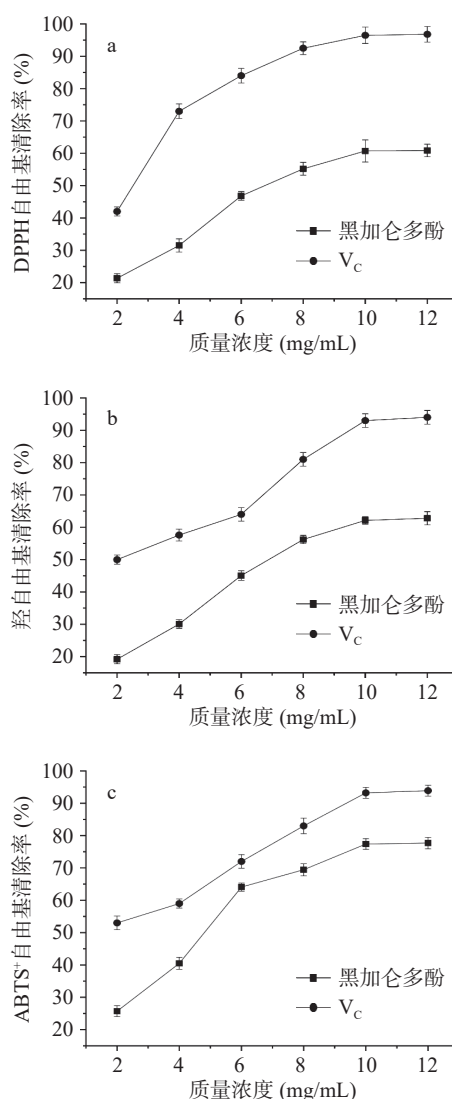


图6 黑加仑多酚的体外抗氧化活性

Fig.6 Antioxidant activity of blackcurrant polyphenols *in vitro*

IC₅₀ 值为 0.49 mg/mL,这也说明黑加仑多酚对 ABTS⁺自由基的清除能力最强,对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能力次之。这可能是黑加仑多酚通过酚羟基与 DPPH 自由基的脱氢反应产生半醌自由基的能力相对较弱^[37],以及黑加仑多酚中清除羟自由基的关键结构邻苯二酚基团,尤其是 4-羟基的数量不多有关^[38]。虽然上述黑加仑多酚清除 DPPH 自由基、羟

表 4 黑加仑多酚清除 DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值

Table 4 IC₅₀ values of scavenging DPPH free radical, hydroxyl free radical and ABTS⁺ free radical by polyphenols from blackcurrant

IC ₅₀ 值	黑加仑多酚(mg/mL)	维生素C(mg/mL)
DPPH自由基清除率	7.97	2.08
羟自由基清除能力	7.92	2.69
ABTS ⁺ 自由基清除能力	5.26	2.06

自由基和 ABTS⁺自由基的基本规律是一致的,但是,它们的 IC₅₀ 值差别很大,这可能是与其多酚的提取参数以及其纯度有关系。由图 6 和表 4 还可以看出,黑加仑果多酚对 DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除能力要低于 V_C, 其对应的 IC₅₀ 值为 V_C 的 3.83、2.94 和 2.55 倍。这说明黑加仑多酚虽然具有较好的体外清除自由基能力,但是其抗氧化活性要弱于 V_C。

3 结论

本实验通过响应面试验设计优化黑加仑果中多酚的提取工艺参数为:乙醇体积分数 50%,超声波功率 300 W,料液比 1:10 g/mL,提取时间 20 min,该条件下黑加仑果多酚提取量为 538.00 mg/100 g。黑加仑多酚具有较好的抗氧化活性,当其浓度在 2~10 mg/mL 时,随着浓度的增加,它对自由基的清除能力逐渐增强。黑加仑多酚对 DPPH 自由基、羟自由基和 ABTS⁺自由基的 IC₅₀ 值分别为 7.97、7.92 和 5.26 mg/mL,表明黑加仑果多酚具有较强的抗氧化活性。该研究结果为黑加仑果多酚的提取及其开发利用提供了理论基础。

参考文献

[1] BU X, XU Y, ZHAO M, et al. Simultaneous extraction of polysaccharides and polyphenols from blackcurrant fruits: Comparison between response surface methodology and artificial neural networks[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170: 1–16.

[2] KOWALSKI R, MEJIA E G. Phenolic composition, antioxidant capacity and physical characterization of ten blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars, their juices, and the inhibition of type 2 diabetes and inflammation biochemical markers[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359: 1–10.

[3] ZHAO M, BAI J, BU X, et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens[J]. *Food Control*, 2021, 119: 1–45.

[4] YANG Y, LEI Z, ZHAO M, et al. Microwave-assisted extraction of an acidic polysaccharide from *Ribes nigrum* L.: Structural characteristics and biological activities[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 147: 1–13.

[5] TAKATA R, YAMAMOTO R, YANAI T, et al. Immunostimulatory effects of a polysaccharide-rich substance with antitumor activity isolated from black currant (*Ribes nigrum* L.)[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(11): 2042–2050.

[6] 李培睿,王丽娜.超声波辅助提取绿茶中茶多酚的工艺研究[J]. *许昌学院学报*, 2021, 40(5): 71–74. [LI P R, WANG L N. Extraction process of TP from green tea assisted by ultrasonic wave[J]. *Journal of Xuchang University*, 2021, 40(5): 71–74.]

[7] 王文良.海棠果多酚的提取及在鲜湿面条中的应用[D].泰安:山东农业大学, 2021. [WANG W L. Extraction of polyphenols from *Malus crabapple* and their application in fresh noodles[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021.]

[8] 刘皓涵,钟迪颖,张润光,等.欧李多酚提取纯化及抗氧化性研究[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(22): 324–332. [LIU H H, ZHONG D Y, ZHANG R G, et al. Study on extraction, purification and antioxidant activity of *Cerasus humilis* (Beg.)Sok[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2020, 36(22): 324–332.]

[9] BACHTLER S, BART H J. Polyphenols from red vine leaves using alternative processing techniques[J]. *Processes*, 2018, 6(12): 1–15.

[10] 代沛珊,李淑玲,杨生辉,等.响应面法优化黑果枸杞多酚超声波辅助提取工艺[J]. *中国果菜*, 2021, 41(9): 45–52. [DAI P S, LI S L, YANG S H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted technology for polyphenols extraction from *Lycium ruthenicum* Murr. using response surface methodology[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2021, 41(9): 45–52.]

[11] 洪玲,张远芳,许明媚,等.广藿香多酚类成分的提取工艺及其黄嘌呤酶抑制活性研究[J]. *广州化工*, 2021, 49(21): 60–63,71. [HONG L, ZHANG Y F, XU M M, et al. Extraction on polyphenols from *Pogostemon cablin* and its xanthinase inhibitory activity[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2021, 49(21): 60–63,71.]

[12] BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER M E, BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25–30.

[13] 范金波,蔡茜彤,冯叙桥,等.桑葚、蓝莓、黑加仑中多酚类物质的抗氧化活性[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(2): 157–162. [FAN J B, CAI X T, FENG X Q, et al. Phenolic content and antioxidant capacity of blueberry, mulberry and blackcurrant[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(2): 157–162.]

[14] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9–10): 1231–1237.

[15] RIVERA-TOVAR P R, TORRES M D, CAMILO C, et al. Multi-response optimal hot pressurized liquid recovery of extractable polyphenols from leaves of maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz)[J]. *Food Chemistry*, 2021, 357: 1–11.

[16] ZUNIGA G E, TAPIA A, ARENAS A, et al. Phytochemistry and biological properties of *Aristotelia chilensis* a Chilean blackberry: A review[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2017, 16(5): 1081–1094.

[17] ZHU S. Optimization of extraction of polyphenol from *Panax quinquefolius* L. using central composite design/response surface methodology[J]. *Starch - Stärke*, 2021: 1–5.

[18] KIVILOMPOLO M, HYOTYLAINEN T. On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in *Lamiaceae* herbs[J]. *Journal*

of Chromatography A, 2009, 1216(6): 892–896.

[19] QIN L, YU J, ZHU J, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polyphenol from the seeds of *Allium senescens* L. and its antioxidative role in Harbin dry sausage[J]. Meat Science, 2021, 172: 1–9.

[20] ISMAIL B B, GUO M, PU Y, et al. Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 52: 257–267.

[21] ZHOU Y, ZHENG J, GAN R Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidants from the mung bean coat[J]. Molecules, 2017, 22(4): 1–13.

[22] WANG W, GAO Y T, W J W, et al. Optimization of ultrasonic cellulase-assisted extraction and antioxidant activity of natural polyphenols from passion fruit[J]. Molecules, 2021, 26(9): 1–14.

[23] YING Z, HAN X, LI J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1273–1279.

[24] VILKHU K, MAWSON R, SIMONS L, et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(2): 161–169.

[25] CHAVAN Y, SINGHAL R S. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 17: 106–113.

[26] 金莹, 孙爱东, 胡晓丹, 等. 苹果多酚的超声波提取及抗氧化作用研究[J]. 北京林业大学学报, 2007, 19(5): 137–141. [JIN Y, SUN A D, HU X D, et al. Biological functions and extraction methods of apple polyphenol[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007, 19(5): 137–141.]

[27] XU Y, CAI F, YU Z, et al. Optimisation of pressurised water extraction of polysaccharides from blackcurrant and its antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2016, 194: 650–658.

[28] JOVANOVIĆ A A, DJORDJEVIĆ V B, PETROVIĆ P M, et al. The Influence of different extraction conditions on polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of wild thyme[J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2021, 25: 1–7.

[29] 吴志强. 灰兜巴多糖的提取纯化及其抑制 α -糖苷酶活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014. [WU Z Q. Extraction, purification and inhibition of α -glucosidase activity of polysaccharide from Huidouba[D]. Guangzhou: South China University of Technol-

ogy, 2014.]

[30] JOVANOVIĆ A A, ĐORĐEVIĆ V B, ZDUNIĆ G M, et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 179: 369–380.

[31] PRASAD K N, KONG K W, RAMANAN R N, et al. Selection of experimental domain using two-level factorial design to determine extract yield, antioxidant capacity, phenolics, and flavonoids from *Mangifera pajang* Kosterm[J]. Separation Science and Technology, 2012, 47(16): 2417–2423.

[32] SAMAVATI V. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 95(1): 588–597.

[33] 张家豪, 马芹. 黑果腺肋花楸有效物质的提取及抗氧化和降糖活性研究[J]. 化学与生物工程, 2021, 38(5): 46–52. [ZHANG J H, MA Q. Extraction of effective substances from *Aronia melanocarpa* and their antioxidant and hypoglycemic activities[J]. Chemistry & Bioengineering, 2021, 38(5): 46–52.]

[34] GARCIA-VAQUERO M, RAJAURIA G, TIWARI B, et al. Extraction and yield optimisation of fucose, glucans and associated antioxidant activities from *Laminaria digitata* by applying response surface methodology to high intensity ultrasound-assisted extraction[J]. Marine Drugs, 2018, 16(8): 1–15.

[35] 扶庆权, 王海鸥, 陈守江, 等. 响应面法优化微波辅助提取黑加仑多酚工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(11): 78–86. [FU Q Q, WANG H O, CHEN S J, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from blackcurrant by response surface method and analysis of antioxidant activity of the extract[J]. Food Additives, 2017(11): 78–86.]

[36] LACZKO-ZOLD E, KOMLOSI A, ÜLKEI T, et al. Extractability of polyphenols from black currant, red currant and gooseberry and their antioxidant activity[J]. Acta Biologica Hungarica, 2018, 69(2): 156–169.

[37] HUSAIN S R, CILLARD J, CILLARD P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochemistry, 1987, 26(9): 2489–2491.

[38] 刘成伦, 唐德容. 黄酮类化合物抗氧化性质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006(5): 158–160, 168. [LIU C L, TANG D R. The research development on the anti-oxidation of flavonoids[J]. Food Research and Development, 2006(5): 158–160, 168.]