

# 火棘不可萃取多酚的提取工艺优化及抗氧化研究

许盈芄<sup>1</sup>, 刘 顺<sup>1</sup>, 李楚楚<sup>1</sup>, 方天润<sup>1</sup>, 邱 凡<sup>1</sup>, 陈西喆<sup>2</sup>, 鄢又玉<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023; <sup>2</sup>湖北神农蜂语生物产业有限公司, 十堰 442000

**摘要:**采用响应面法优化了火棘不可萃取多酚(non-extractable polyphenol, NEPP)的提取工艺, 分析了火棘中可萃取多酚(extractable polyphenol, EPP)和不可萃取多酚分别占总酚(total polyphenol, TEPP)的比例, 同时监测了NEPP萃取液的抗氧化能力。以NEPP得率为评价指标, 采用Folin-Ciocalteu法测定NEPP含量。考察了乙醇浓度(% , v/v)、乙醇占乙醇-硫酸提取液的比率(% , v/v)、料液比(g/mL)、提取时间(h)及提取温度(°C)对火棘NEPP得率的影响。进一步通过Box-Behnken设计优化提取工艺, 同时以ABTS及FRAP法对NEPP提取液的抗氧化能力进行测定。最佳提取工艺为: 提取时间2.68 h, 乙醇浓度94.44%(V/V), 温度83.47 °C, NEPP萃取量可达167.328 mg/g, EPP 40.4 mg/g。响应面模型优化火棘NEPP提取工艺结果可靠, NEPP占火棘TEPP比重较高, 为80.55%, ABTS及FRAP抗氧化能力均与NEPP含量呈良好正相关性。

**关键词:**火棘; 不可萃取多酚; 响应面法; 抗氧化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.021

## Extraction and Antioxidant Activity of Non-extractable Polyphenols from *Pyracantha fortuneana*

XU Ying-peng<sup>1</sup>, LIU Shun<sup>1</sup>, LI Chu-chu<sup>1</sup>, FANG Tian-run<sup>1</sup>, QIU Fan<sup>1</sup>, CHEN Xi-zhe<sup>2</sup>, YAN You-yu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Wuhan 430023, China;

<sup>2</sup>Hubei Shennong Honey Bio-Tech. Co., Ltd., Hubei Shiyan 442000, China

**Abstract:** The extraction process of non-extractable polyphenols (NEPPs) from *Pyracantha fortuneana* was optimized by response surface methodology (RSM). The content and antioxidant capacity of NEPP was determined. Taking extraction yield of NEPP as evaluation index and Folin-Ciocalteu colorimetry as assay method, on the basis of single factor experiments, the effects of ethanol concentration (% , v/v), the proportion of ethanol in sulfuric acid-ethanol (% , v/v), solid to liquid ratio (g/mL), extraction time (h) and temperature (°C) on the NEPP yield was investigated. In addition, Box-Behnken design was further adopted to optimize extraction process of NEPP from *P. fortuneana*. Moreover, the antioxidant capacity of the extracted NEPP was determined by ABTS and FRAP assays. The optimal extraction conditions was as follows: extraction time of 2.68 h; the volume fraction of ethanol, 94.44% (v/v); extraction temperature of 83.47 °C. Under these conditions, the extraction yield of NEPP and EPP reached 167.328 mg/g and 40.4 mg/g, respectively. RSM was feasible to optimize extraction process of NEPP from *P. fortuneana*. NEPP accounted for a high proportion of 80.55% in TEPP and the NEPP content had positive correlation with its antioxidant capacity.

**Key words:** *Pyracantha fortuneana*; non-extractable polyphenols; response surface methodology; antioxidant

火棘(*Pyracantha fortuneana*)是蔷薇科火棘属植物,其果又名将军粮、救军粮、赤阳子、红果等,广泛分布于我国湖南、湖北、陕西及西南诸省。在传统中医中,火棘果常被用于治疗消化不良<sup>[1]</sup>,现代研究发现火棘果提取物可抑制酪氨酸酶活性,减少黑色素的生成,在日本已作为增白剂用于化妆品中<sup>[2]</sup>,然而目前我国对火棘资源的开发不够深入,

每年大量的野生火棘资源被白白浪费。

多酚类化合物是指分子结构中有若干酚性羟基的植物成分的总称,包括黄酮类、单宁类、酚酸类以及花色苷类等<sup>[3]</sup>。植物来源的多酚类化合物具有抗氧化<sup>[4]</sup>、抗菌抗病毒<sup>[5]</sup>、抗肿瘤癌变<sup>[6]</sup>、抗肥胖<sup>[7]</sup>、降血糖<sup>[8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>、抗心血管疾病<sup>[10]</sup>等广泛的生理活性和药理活性。总酚(total polyphenol, TEPP)分为可萃取多酚(EPP)和不可萃取多酚(NEPP)两部分<sup>[11]</sup>。可萃取多酚主要是指通过简单

的有机-水相溶剂萃取就可以获得的处于游离状态的多酚,而不可萃取多酚主要是指结合于细胞壁上的一些水合单宁酸和原花青素类,需通过化学或与细胞壁相关的酶处理,破坏多酚物质与细胞壁结合的化学键,才能将其分离<sup>[12]</sup>。有研究表明,不可萃取原花青素可用硫酸从残渣中水解而得<sup>[13]</sup>,不可萃取多酚的含量在多种植物资源中远高于可萃取多酚,在抗氧化方面的作用远大于可萃取多酚<sup>[14,15]</sup>,它们在食品、保健尤其是胃肠健康方面具有广阔的应用前景<sup>[16]</sup>。但目前国内研究主要集中在几种特色资源的可萃取多酚提取及功效研究方面,而不可萃取多酚的研究文献甚少。

本实验重点旨在优化火棘不可萃取多酚的提取工艺,以提取可萃取多酚的火棘果残渣为原料,采用 Folin-ciocalteu 法测定多酚含量<sup>[17]</sup>,辅助 ABTS 法<sup>[18]</sup>和 FRAP 法<sup>[19]</sup>对不可萃取多酚进行快速抗氧化能力测定。在单因素试验基础上进一步通过 Box-Behnken 响应面设计,优化得到 NEPP 提取的最优工艺。以期为未来火棘产业化深加工提供理论依据及开发方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料试剂与仪器

火棘果,2014年11月中旬采自湖北恩施来凤地区,经华中科技大学植物学博士杨悦鉴定为全缘火棘 *Pyracantha atalantioides* 的果实;无水乙醇、浓  $H_2SO_4$ 、无水  $Na_2CO_3$  均为分析纯,上海国药集团化学试剂公司;Folin-ciocalteu 试剂, Sigma 分装,上海北诺生物科技有限公司;没食子酸标准品(中国药品生物制品检定所,批号:110831-201403);总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP法)、总抗氧化能力试剂盒(ABTS法),江苏省碧云天生物技术研究;Lambda 25 紫外-可见光分光光度计,美国 PE 公司;DF-101B 集热式磁力加热搅拌器,金坛市医疗仪器厂;Centrifuge 5424R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;Molelement1018a 型摩尔超纯水机,上海摩勒科学仪器有限公司;Anke LXJ-II B 型低速大容量离心机,上海安亭科学仪器厂;BS 系列电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;SB5200DTS 双频超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 没食子酸标准曲线的建立

准确称取 0.05 g 没食子酸标准品,加蒸馏水溶解后转移到 100 mL 容量瓶中定容,分别取 0.5 g/L 没食子酸标准溶液 2、4、6、8、10、12、14 mL 加入到 7 个 100 mL 容量瓶中,加水定容。各吸取 1 mL 置于 10 mL 试管中,分别加入 Folin-ciocalteu 试剂 5 mL,漩涡混匀后静置 3 min,再分别加入 170 g/L  $Na_2CO_3$  溶液 1.0 mL,混匀后置于 34 °C 恒温水浴中反应 40 min;同时做空白对照,于 765 nm 波长处测定吸光度。

#### 1.2.2 火棘 EPP 的去除及 NEPP 的提取

称取一定量干燥粉碎过 20 目筛的火棘果粉,按料液比 1:10 g/mL 加入 90% (V/V) 乙醇,90 °C 下回流提取 1 h,过滤,滤渣重复提取 2 次,合并 3 次滤液,4 °C 条件下 10000 rpm 离心 20 min 以待后续 EPP 含量测定(因 3 次提取后滤液中 EPP 含量甚微,可忽略,故前 3 次提取合并滤液中 EPP 可近似看做原料中总的 EPP)。提取后的滤渣置 80 °C 烘箱干燥,粉碎,过 20 目筛。

去除 EPP 的火棘果粉→加入乙醇-硫酸提取溶剂→水浴回流提取→冷水冷却→10000 rpm 离心 15 min→上清液中 NEPP 含量的测定。

#### 1.2.3 不可萃取多酚得率的测定

采用 Folin-Ciocalteu 法测定 NEPP 含量:将 5 g 去 EPP 火棘干粉处理得到的各 NEPP 提取液统一稀释至 180 mL,然后取 1 mL 再次稀释 80 倍备用,参照 1.2.1 同法操作测定 NEPP 溶液吸光度,并带入 2.1 没食子酸标准曲线关系式中进行相关换算,火棘提取物中 NEPP 含量(%)表示为去 EPP 火棘干粉中以没食子酸当量的 NEPP 的质量百分数。

$$M(\%) = \frac{(y - 0.048) \times 80 \times 180}{0.01 \times 5 \times 1000 \times 10} \%$$

其中 y 为 NEPP 样品溶液的吸光度。

#### 1.2.4 单因素试验设计

取 5.0 g 原料,以乙醇-硫酸为提取溶剂。考察不同乙醇浓度(100%、95%、90%、85%、80%),乙醇-硫酸中乙醇所占比例(100%、95%、90%、85%、80%),料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL),提取时间(1、3、5、7、9 h),水浴温度(30、45、60、75、90 °C)对 NEPP 提取率的影响,结果参见图 1。

#### 1.2.5 响应面实验设计

在单因素试验的基础上,固定乙醇-硫酸中乙醇

所占比例为 95% 及料液比 1:20 g/mL, 运用 Design-Expert 8.0.6 软件, 根据 Box-Behnken 设计, 以乙醇浓度( $X_1$ )、提取时间( $X_2$ )、提取温度( $X_3$ )为主要考察因素, 以 NEPP 得率为响应值, 设计实验如下表 1。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平及编码值

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

| 因素<br>Factors                            | 水平 Levels |    |    |
|--|-----------|----|----|
|  | -1        | 0  | +1 |
| $X_1$ 提取时间<br>extraction time(h)         | 1         | 3  | 5  |
| $X_2$ 乙醇浓度<br>Ethanol concentration(%)   | 86        | 92 | 98 |
| $X_3$ 提取温度<br>extraction temperature(°C) | 75        | 85 | 95 |

### 1.2.6 抗氧化 (ABTS 法及 FRAP 法) 检测方法的建立

以实验制备的不同浓度的 NEPP 溶液为待检样品, 分别以 Trolox 和  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为标准物, 绘制标准曲线。具体操作参见碧云天生物技术研究所提供的总抗氧化能力测定试剂盒 (ABTS 快速法及 FRAP 法) 说明书。取 10 mmol/L Trolox 标准溶液用蒸馏水稀释成 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L。在 96 孔板每个检测孔中加入 20  $\mu\text{L}$  过氧化物酶工作液。以蒸馏水为空白对照, 标准曲线检测孔内加入 10  $\mu\text{L}$  各浓度 Trolox 标准溶液, 样品检测孔内

加入 10  $\mu\text{L}$  各种样品, 分别混匀。每个孔内加入 170  $\mu\text{L}$  ABTS 工作液, 混匀, 室温孵育 6 min 后在 415 nm 进行测定。另外称取 27.8 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 溶解并用蒸馏水稀释至 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L。96 孔板的每个检测孔中加入 180  $\mu\text{L}$  FRAP 工作液。蒸馏水为空白对照, 标准曲线检测孔内加入 5  $\mu\text{L}$  各种浓度的  $\text{FeSO}_4$  标准溶液, 样品检测孔内加入 5  $\mu\text{L}$  各种样品, 混匀, 37 °C 孵育 3~5 min 后在 595 nm 进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 没食子酸标准曲线的建立

参照 1.2.1 设计测定结果, 以没食子酸浓度 ( $X$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对吸光度 ( $Y$ ) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=0.010X+0.048$  ( $R^2=0.9996$ ), 吸光度在质量浓度为 10~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  间线性关系良好。

### 2.2 火棘不可萃取多酚提取单因素试验

由图 1(A) 可知, 提高乙醇浓度有利于 NEPP 的提取, 当乙醇浓度  $\geq 95\%$  后, 提取量上升趋势渐缓, 另外, 出于成本经济考虑, 故选择乙醇浓度 95%。由图 1(B) 可知, 乙醇-硫酸中乙醇所占比例  $\geq 95\%$  之后, NEPP 提取率开始下降, 乙醇浓度低于 90% 后 NEPP 得率急剧下降, 故乙醇-硫酸中乙醇所占比例选为 95% 比较合适。由图 1(C) 可知, 料液比在 1:20 g/mL 时 NEPP 的提取率达到极值, 继续增大料

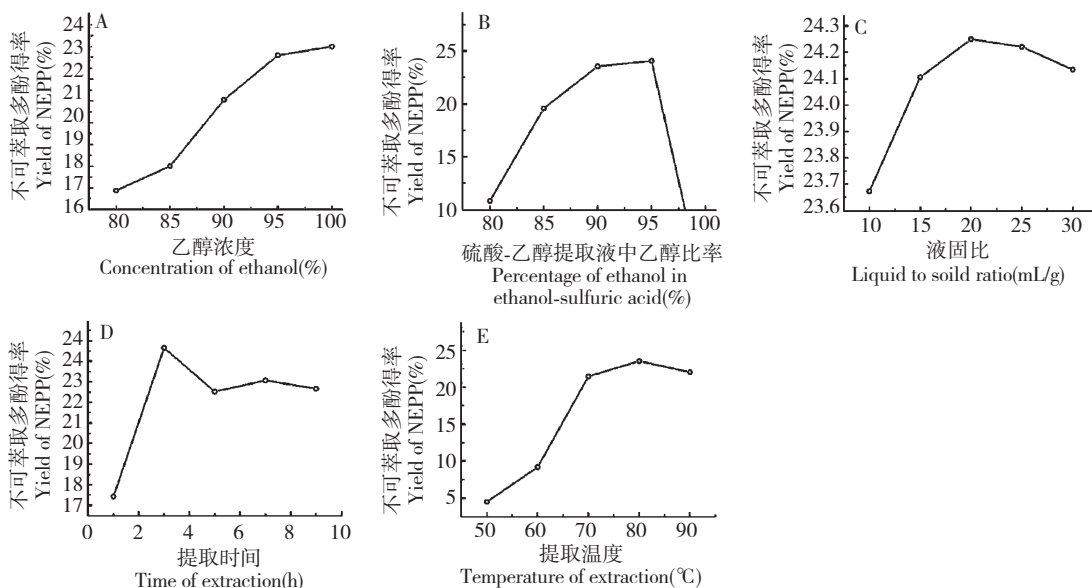


图 1 乙醇浓度 (A)、乙醇-硫酸中乙醇所占比率 (B)、液料比 (C)、提取时间 (D) 及提取温度 (E) 对火棘不可萃取多酚得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration (A), proportion of ethanol in ethanol- sulfuric acid (B), liquid to solid ratio (C), extraction time (D) and temperature (E) on NEPP yield of *P. fortuneana*

液比, NEPP 得率略有下降, 考虑到不增加后续浓缩工序负担, 料液比选为 1:20 g/mL 比较合适。由图 1(D) 可知, 随着提取时间的增加, NEPP 提取率先升后降, 提取时间为 3 h 时, 提取率达到极值, 进一步增加提取时间, NEPP 提取率反而下降, 这可能与高温强酸条件下, 提取出的 NEPP 被降解破坏有关, 故选择提取时间为 3 h。由图 1(E) 可知, 总体上随着

温度的升高 NEPP 提取率增大, 提取温度 90 °C 时, 提取率最高, 温度高于 90 °C 之后, 提取率反而略有下降, 这可能与 NEPP 的高温降解有关。故选择提取温度 90 °C 左右比较合适。

## 2.3 火棘不可萃取多酚提取响应面优化实验

### 2.3.1 响应面实验结果

参照 1.2.5 设计, 得到实验结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and the results

| 序号<br>No. | 因素与水平 Factors and levels                   |  |  | 不可萃取多酚得率<br>Yield of NEPP (%) |
|-----------|--|--|--|-------------------------------|
|           | X <sub>1</sub> 提取时间<br>Extraction time (h) | X <sub>2</sub> 乙醇浓度<br>Ethanol concentration (%) | X <sub>3</sub> 提取温度<br>Extraction temperature (°C) |                               |
| 1         | 1  | 86   | 85   | 17.2224                       |
| 2         | 5  | 86   | 85   | 12.9600                       |
| 3         | 1  | 98   | 85   | 18.9792                       |
| 4         | 5  | 98   | 85   | 18.5472                       |
| 5         | 1  | 92   | 75   | 18.2880                       |
| 6         | 5  | 92   | 75   | 16.8768                       |
| 7         | 1  | 92   | 95   | 16.7040                       |
| 8         | 5  | 92   | 95   | 12.9888                       |
| 9         | 3  | 86   | 75   | 14.6592                       |
| 10        | 3  | 98   | 75   | 19.2672                       |
| 11        | 3  | 86   | 95   | 13.9680                       |
| 12        | 3  | 98   | 95   | 16.9344                       |
| 13        | 3  | 92   | 85   | 22.4928                       |
| 14        | 3  | 92   | 85   | 22.0896                       |
| 15        | 3  | 92   | 85   | 21.5712                       |
| 16        | 3  | 92   | 85   | 21.5424                       |
| 17        | 3  | 92   | 85   | 22.2912                       |

以 NEPP 得率为主要响应值, 将表 2 中实验数据经过 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元回归拟合, 得到回归方程:  $Y = 4.40 - 0.25X_1 + 0.37X_2 -$

$0.21X_3 + 0.19X_1X_2 - 0.12X_1X_3 - 0.082X_2X_3 - 0.51X_1^2 - 0.51X_2^2 - 0.65X_3^2$ , 并对模型进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Variance analysis for each item of regression equation

| 方差来源<br>Source                | 平方和<br>Sum of squares | 自由度<br>Degree of freedom | 均方<br>Mean square | F 值<br>F value | P 值<br>P value |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|----------------|----------------|
| 模型 Model                      | 6.598                 | 9                        | 0.733             | 83.348         | < 0.0001 * * * |
| X <sub>1</sub>                | 0.482                 | 1                        | 0.482             | 54.824         | 0.0001 * * *   |
| X <sub>2</sub>                | 1.113                 | 1                        | 1.113             | 126.508        | < 0.0001 * * * |
| X <sub>3</sub>                | 0.361                 | 1                        | 0.361             | 41.030         | 0.0004 * * *   |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> | 0.147                 | 1                        | 0.147             | 16.6780        | 0.0047 * *     |

|                 |                      |                       |                        |            |                |
|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------|----------------|
| $X_1X_3$        | 0.0537               | 1                     | 0.053                  | 6.0349     | 0.0437 *       |
| $X_2X_3$        | 0.027                | 1                     | 0.027                  | 3.064      | 0.1235         |
| $X_1^2$         | 1.084                | 1                     | 1.084                  | 123.190    | < 0.0001 * * * |
| $X_2^2$         | 1.090                | 1                     | 1.090                  | 123.891    | < 0.0001 * * * |
| $X_3^2$         | 1.7860               | 1                     | 1.786                  | 203.052    | < 0.0001 * * * |
| 残差 Residual     | 0.062                | 7                     | 0.009                  |            |                |
| 失拟项 Lack of Fit | 0.0312               | 3                     | 0.010387354            | 1.36623955 | 0.3732         |
| 纯误差 Pure Error  | 0.03042              | 4                     | 0.007602879            |            |                |
| 总和 Cor Total    | 6.659901042          | 16                    |                        |            |                |
| $R^2 = 0.9908$  | $R_{Adj}^2 = 0.9789$ | $R_{Pred}^2 = 0.9180$ | Adeq Precisor = 25.386 |            |                |

注: \*  $P < 0.05$  显著作用; \*\*  $P < 0.01$  高度显著作用; \*\*\*  $P < 0.001$  极显著作用。

Note: \*  $P < 0.05$  significant effect; \*\*  $P < 0.01$  very significant effect; \*\*\*  $P < 0.001$  extremely significant effect.

由表3可知,除了 $X_2X_3$ 项表明乙醇浓度和温度的交互作用不显著、 $X_1X_3$ 项表明时间和温度的交互作用显著外,其他项均为极显著。实验选用的模型( $P < 0.001$ )极显著,失拟项( $P > 0.05$ )不显著,表明该响应面模型用于优化NEPP工艺是可行的。信噪比Adeq Precisor = 25.386比较高,说明该模型可以用于预测,而模型校正判定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9789$ ,说明该模型能解释97.89%的响应值变化。判定系数 $R^2 = 0.9908$ ,说明模型拟合程度良好,可以使用该模型分析和预测火棘NEPP的提取率, $R_{Pred}^2 = 0.9180$ 与 $R^2 = 0.9908$ 的值相差不大说明该响应面方程无需做进一步优化。

### 2.3.2 NEPP提取工艺响应面图分析与对比

根据2.3.1所得回归方程,考察拟合响应面的形状,绘制响应面立体分析图及相应的等高线图,结果见图2。各影响因素及交互作用对响应值的影响可通过图2中响应面图曲面陡峭程度和等高线图中等高线密集程度直观地反映出来。由图2(A)可知,乙醇浓度效应面相对更陡,等高线相对更密集。因此乙醇浓度的影响更为显著,随着乙醇浓度增加,NEPP得率先增后减;提取时间的影响次之;由图2(B)可知,提取时间效应面相对更陡,等高线相对更密集。因此提取时间的影响更为显著,随着提取时间增加,NEPP得率先增后减;提取温度的影响次之;由图2(C)可知,乙醇浓度效应面相对更陡,等高线相对更密集。因此乙醇浓度的影响更为显著,随着乙醇浓度增加,NEPP提取率先增后减;提取时间的影响次之;NEPP提取率随乙醇浓度的增大而增大;提取温度的影响对比前2个因素相对较弱但仍十分显著,NEPP提取率随提取温度的升高先升后

降。从图6(a-c)可以看出,响应面的最高点和等高线在所选的范围内存在极值,响应面的最高点同时也是等高线中的最小椭圆的中心点<sup>[20]</sup>。等高线均成椭圆形说明各因素的交互作用强,也即3个因素取不同的编码值对Y的影响表现出不同的规律,对火棘NEPP提取率的影响显著<sup>[21]</sup>,这一结论也与表3方差分析结果一致。

### 2.3.3 最优提取工艺验证

在节约成本同时使NEPP提取率尽可能高的前提下,通过响应面模型及其软件优化得到的最佳工艺条件为:提取时间2.68 h,乙醇浓度94.44%,水浴温度83.47 °C,此时NEPP提取率最大理论值为4.49989%。为检验该模型的可靠性,按照上述最优方案进行3组平行实验。实际提取条件:提取时间2.7 h,乙醇浓度95%,水浴温度83 °C,对3组结果取平均值,所得NEPP提取率为4.4294%,实际值与预测值接近。可见此模型可靠,可用于优化火棘不可萃取多酚提取工艺。

## 2.4 NEPP抗氧化量效关系分析

参照1.2.6实验设计测定相关结果后,以Trolox标准溶液浓度(X, mmol/L)对吸光度(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = -0.0004X + 0.5871$ ( $R^2 = 0.9998$ ),吸光度在质量浓度为100 ~ 1300  $\mu\text{g/mL}$ 间线性关系良好。以 $\text{FeSO}_4$ 标准溶液浓度(X, mmol/L)对吸光度(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.1006X + 0.0024$ ( $R^2 = 0.9994$ )。吸光度在质量浓度为150 ~ 1500  $\mu\text{g/mL}$ 间线性关系良好。

本实验主要研究任务是对火棘中不可萃取多酚的提取工艺进行优化,在优化的同时兼测提取液总抗氧化能力的变化。由表2中17组实验设计,我们

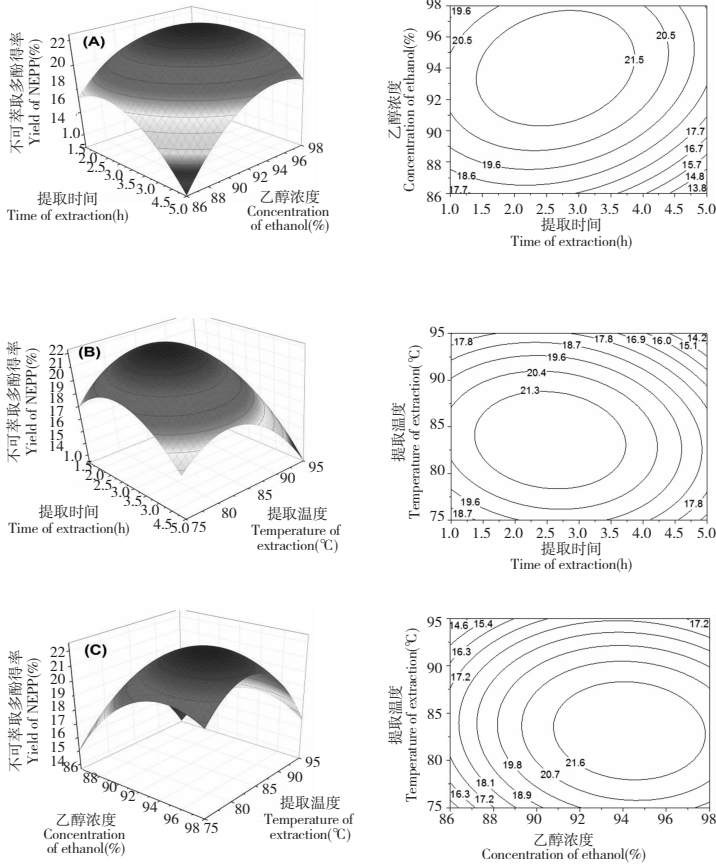


图2 乙醇浓度和提取时间(A)、提取温度和提取时间(B)及提取温度和乙醇浓度(C)对火棘不可萃取多酚得率影响的响应面及等高线图

Fig. 2 Response surface plots and contour plots showing the mutual effects of ethanol concentration and extraction time (A), extraction temperature and extraction time (B) as well as extraction temperature and ethanol concentration (C) on the extraction yield of NEPP from *P. fortuneana*

分别测得 NEPP 溶液吸光度并推算出其相应质量浓度, ABTS 及 FARP 总抗氧化吸光度响应值, 以 NEPP 浓度( $x$ , mg/mL) 分别对 ABTS 及 FARP 响应值( $y$ ) 进行线性拟合, 结果参见图 3, 分别得回归方程  $y_1 = 5.10196x + 0.44512 (R^2 = 0.8907)$ ,  $y_2 = 2.31721x + 0.24157 (R^2 = 0.8505)$ 。分析可知 NEPP 浓度与 ABTS 及 FRAP 总抗氧化能力呈现正相关, 相关性良好。

### 2.5 火棘 EPP 及 NEPP 含量的测定

按 1.2.2 设计提取火棘 EPP, 重复 3 组, 每组重复提取 3 次合并, 按 Folin-Ciocalteu 法测定吸光度, 并带入 2.1 没食子酸标准曲线计算出提取液中 EPP 质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ ), 根据提取液体积及提取物料质量, 3 次结果取平均值, 可得火棘中 EPP 含量为 40.4 mg/g; 按 2.3.3 响应面最优提取方案提取 3 组, 同

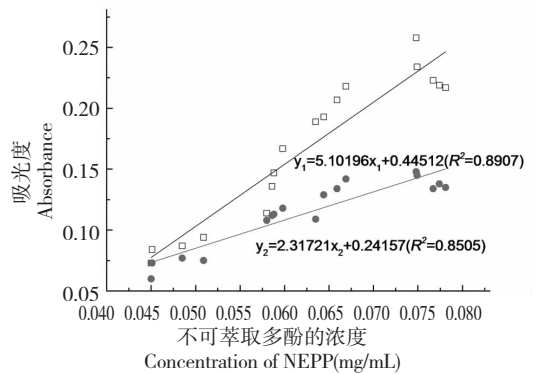


图3 不可萃取多酚浓度与抗氧化能力相关性分析  
Fig. 3 Correlation analysis of NEPP and its antioxidant capacity

法算出火棘中 NEPP 含量 167.328 mg/g, 因为 NEPP 提取时溶剂中加入强酸, 一次提取时强酸对植物细

胞壁的破坏就相当彻底,因此一次提取的 NEPP 量可近似看做火棘果皮肉粉中 NEPP 总量。显然,通过计算可知,NEPP 占 TPP 总量的 80.55%,占火棘总酚的绝大部分,从而进一步证明优化 NEPP 的提取工艺相当重要。

### 3 结论

通过单因素试验确定提取工艺中最适乙醇浓度为 95%,提取时间 3 h,乙醇-硫酸中乙醇所占比例为 95%,料液比为 1:20(质量浓度, g/mL),提取温度 95 °C。进一步应用响应面软件建立优化方案,模型显著,最佳提取工艺条件为:提取时间 2.68 h,乙醇浓度 94.44%,温度 83.47 °C。此时,NEPP 提取量可达 167.328 mg/g,EPP 提取量仅为 40.4 mg/g,NEPP 占 TEPP 含量的 80.55%,约为 EPP 含量的四倍。

同时对 NEPP 与抗氧化能力进行了相关性分析,结果表明 NEPP 浓度与 ABTS 及 FRAP 抗氧化能力之间均存在良好的正相关关系,但相关性并非特别显著,这可能是由于火棘中还含有其它具有抗氧化能力的成分,或是不同种类的不可萃取多酚的抗氧化能力不一而造成的,而且同一种多酚类物质对超氧自由基和羟自由基的清除率也是不同的,这可能与它们的结构有关<sup>[22]</sup>。因此未来我们应该进一步深入研究火棘总酚的分类、结构及其与抗氧化功效或其他功效之间的关系,以期推动火棘资源产业化。

#### 参考文献

- Deng RF (邓如福), Wang SG (王三根), Li GR (李关荣). Studies on the nutritional components of the fruit of the wild plant-firethorn. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 1990, 1: 79-84.
- Van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 1997, 45: 1309-1323.
- Yong JW, Zhong C, Jian WM, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process of *Poria cocos* polysaccharides by response surface methodology. *Carbohydr Polym*, 2009, 77: 713-717.
- Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2: 270-278.
- Jia Q, Liu X, Wu X, et al. Hypoglycemic activity of a polyphenolic oligomer-rich extract of *Cinnamomum parthenoxylon* bark in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 2009, 16: 744-750.

- Cai Y, Luo Q, Sun M, et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 2004, 74: 2157-2184.
- Jadeja RN, Thounaojam MC, Ramani UV, et al. Anti-obesity potential of *Clerodendron glandulosum*. Coleb leaf aqueous extract. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135: 338-343.
- Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 65-70.
- Saliu JA, Ademiluyi AO, Akinyemi AJ, et al. In vitro antidiabetic and antihypertension properties of phenolic extracts from bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.). *J Food Biochem*, 2012, 36: 569-576.
- Furuuchi R, Sakai H, Hirokawa N, et al. Antihypertensive effect of boysenberry seed polyphenols on spontaneously hypertensive rats and identification of orally absorbable proanthocyanidins with vasorelaxant activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76: 1694-1701.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem*, 2007, 101: 492-501.
- Arranz S, Saura-Calixto F, Shaha S, et al. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 7298-7303.
- Matthews S, Mila I, Scalbert A, et al. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry*, 1997, 45: 405-410.
- Madhujith T, Shahidi F. Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics. *Food Chem*, 2009, 117: 615-620.
- Chandrasekara A, Shahidi F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 6706-6714.
- Pérez-Jiménez J, Díaz-Rubio ME, Saura-Calixto F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr Res*, 2013, 26: 118-129.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult*, 1977, 28: 49-55.
- Lu G (卢弓), Li GY (李光勇), Wei JF (魏金凤), et al. Establishment of micro-model for scavenging ABTS Free Radical. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1533-1535.