

五种松针多酚的提取优化及抗氧化活性研究

樊梓鸾¹, 陈凯莉¹, 高芯², 包怡红¹

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本实验以高剪切分散乳化技术提取松针多酚, 以剪切机转速、剪切时间、乙醇浓度、料液比和剪切温度为考量条件, 根据单因素实验的结果以乙醇浓度、剪切时间、提取温度为最陡爬坡实验及响应面实验的考量条件。最后得到红松松针多酚的最佳提取条件为: 剪切转速 18000 r/min、料液比 1:10、乙醇浓度 64%、剪切时间 140 s、剪切温度 44 °C。以此条件提取, 红松、臭松、樟子松、黑皮油松和红皮云杉的松针多酚得率分别为 19.7623、24.6992、14.0626、9.4983 和 29.7984 mg/g。同时以 DPPH·清除能力、ABTS⁺·、总还原力清除能力为指标, 比较五种松针多酚的抗氧化能力。以 DPPH·自由基清除能力、总还原力为指标的结果为: 红松松针多酚>黑皮油松松针多酚>红皮云杉松针多酚>樟子松松针多酚>臭松松针多酚, 以 ABTS⁺·自由基清除能力为指标的结果为: 樟子松松针多酚>红松松针多酚>黑皮油松松针多酚>红皮云杉松针多酚>臭松松针多酚。

关键词: 松针; 多酚; 抗氧化; 高剪切分散乳化技术

文章编号: 1673-9078(2017)8-211-220

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.031

Extraction Optimization and Antioxidant Activity of Polyphenols from the Needles of Five Pine Species

FAN Zi-luan¹, CHEN Kai-li¹, GAO Xin², BAO Yi-hong¹

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China) (2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Polyphenols were extracted from the needles of different pine species by high-shear mixing emulsification. Shear speed, shear time, ethanol concentration, sample to solvent ratio, and shear temperature were used as the indices. From the results of single factor testing, ethanol concentration, shear time, and extraction temperature were selected as the factors to be considered for the steepest ascent and response surface methodology using a central composite design. The optimum extraction conditions were as follows: shear speed: 18000 r/min, sample to solvent ratio: 1:10, ethanol concentration: 64%, shear time: 140 s, and shear temperature: 44 °C. The yields of polyphenols from the needles of *Pinus koraiensis*, *Abies nephrolepis*, *Pinus sylvestris*, *Pinus tabulaeformis*, and *Picea koraiensis* were 19.7623, 24.6992, 14.0626, 9.4983, and 29.7984 mg/g, respectively. Meanwhile, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) scavenging ability and total reducing power were used as indicators to compare the antioxidant capacities of the extracted polyphenols from the five pine species; these were in the order of *Pinus koraiensis* > *Pinus tabulaeformis* > *Picea koraiensis* > *Pinus sylvestris* > *Abies nephrolepis*. When 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS⁺· was used as the indicator, the antioxidant capacities were in the order of *Pinus sylvestris* > *Pinus koraiensis* > *Pinus tabulaeformis* > *Picea koraiensis* > *Abies nephrolepis*.

Key words: pine needles; pine polyphenols; antioxidation; high-speed shear mixing emulsification technique

松针为松针系松科松属植物的叶, 又名猪鬃松叶、松毛, 主要包括红松、油松、臭松、落叶松、樟子松、黑松、红皮云杉、马尾松和黄山松等。松针是松树类

收稿日期: 2017-01-06

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 (2572014EA02-4); 黑龙江省科学自然基金项目 (QC2016021)

作者简介: 樊梓鸾 (1981-), 女, 博士, 主要研究方向: 天然产物分离纯化及功能活性评价

通讯作者: 包怡红 (1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物、林副产品及畜产品加工

植物的主要副产物之一, 是一种再生速度比较快、分布范围广、蓄积量大、可持续利用的天然再生资源。我国具有丰富的松针资源, 而且品种非常多, 分布广又相对集中, 主要分布于吉林省和黑龙江省。中医认为, 松针味苦, 无毒, 性温, 有祛风、活血、解毒、止痒和去疲劳等功效。近年来许多的研究发现松科植物体内含有大量的多酚类化合物, 而且它们具有一系列独特的化学性质和生物活性, 将其统称为松多酚^[1-3]。松多酚含有类黄酮和花青素等活性成分具有清除体内自由基^[4,5]、抗炎^[4,6]、抗癌^[7]、抗肿瘤^[8]和抗辐射

[5,9,10]等多种活性,能够起到降血糖^[11]和降血脂^[12]等作用。Wu 等^[13]通过研究发现雪松松针中 2R, 3R-双氢杨梅树皮素(DMY)对金黄色葡萄球菌有强效抗菌作用,可作为新食品防腐剂开发的候选。Kim Sung Hwan 等^[14]研究发现松树皮提取物能抑制环磷酰胺引起的大鼠肝组织脂质过氧化作用。Rosa-M Vall 等^[15]研究法国海洋松树皮中低分子量的原花青素(OP)发现,用含有 150 mg/d 的 OP 临床测试 5 周发现 OP 可改善测试者心血管中的血脂。Ola El-Zein 等^[16]研究发现松树皮提取物通过影响有丝分裂原激活激酶和肌醇磷脂 3-激酶而抑制肠上皮细胞葡萄糖转运。Shiori Nakayama 等^[17]研究发现松树皮提取物中含有的儿茶素和原花青素等多酚物质可增强低密度脂蛋白和单核细胞的抗氧化能力。

目前,常用的提取方法有传统有机溶剂、微波、超声波辅助提取法和超声波-复合酶法提取法等。符群等^[18]优选超声波辅助提取红松种鳞多酚的最佳提取条件为:超声时间 52 min、超声温度 53 °C、超声功率 300 W。赵玉红等^[19]对樟子松树皮中的松多酚进行提取,比较有机溶剂提取法、超声波辅助提取法和超声波-复合酶法对松多酚提取效果的影响。但这些方法都存在缺点,例如:溶剂消耗量大、提取时间较长和提取率低。高剪切分散乳化技术是样品在高剪切分散乳化机上,依靠高速机械剪切力和超动分子渗滤技术,在数秒内把样品破碎至细微颗粒并使有效成分迅速达到组织内外平衡,通过过滤达到提取目的,其优点为提取率高、提取时间短、溶剂用量少且道、刀具耐磨等。张振兴等^[20]采用高剪切分散乳化技术提取油橄榄叶中的总黄酮。因此本文通过高剪切技术,在单因素、最陡爬坡实验的基础上,运用响应面优化设计实验对红松松针的多酚提取工艺进行进一步的优化,确定红松、臭松、马尾松、黑皮油松和红皮云杉松针多酚的最佳的提取条件。并对五种松针多酚进行抗氧化实验,比较五种松针多酚的抗氧化能力的差异性,为松针的进一步的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

红松(*Pinus koraiensis* Sieb.et Zucc.)、黑皮油松(*Pinus tabulaeformis* var. *mukdensis*.)、樟子松(*Pinus sylvestris* Linn. var. *mongolica* Litv.)、臭松(*Abies nephrolepis* (Trautv) Maxim.)、红皮云杉(*Picea*

koraiensis Nakai.)均采摘于东北林业大学林场; DPPH 和福林酚购自 Sigma 公司; ABTS 和没食子酸标准品(纯度≥98%)购自阿拉丁试剂公司;其他试剂均为分析纯,市售。

1.2 主要仪器设备

TGL-16C 台式离心机,上海安亭科学仪器厂制造; FW177 中草药粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司; FA25 型高剪切分散乳化机,上海弗鲁克流体机械制造有限公司; T6 新世纪紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司; DHG-9030A 电热恒温鼓风干燥机,巩义市予华仪器有限责任公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; FW 100 分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 松针多酚的提取

将干燥后的松针在高速粉碎机中进行电动粉碎,然后过 60 目筛。取适量松针粉末按一定的料液比进行高剪切提取,离心过滤得松针多酚提取液。

1.3.2 标准曲线的绘制及松针多酚含量的测定

没食子酸标准曲线绘制:精密吸取 1 mL 没食子酸标准溶液(10、20、30、40、50、60 μg/mL),分别置于 10 mL 试管中,5.0 mL、10%的福林酚试剂,摇匀,避光 5 min,加入 4 mL、7.5%Na₂CO₃ 水溶液,充分混匀,60 min 后在 765 nm 下测定吸光值^[21]。参比为不含提取液的空白试剂。以没食子酸的质量浓度为横坐标(X),吸光值为纵坐标(Y),得标准曲线:

$$Y=0.00909X+0.0015, R^2=0.99977.$$

松针多酚含量的测定:分别精密量取松提取液 40 μL 按上述操作测得在 765 nm 处测定吸光值,并根据没食子酸的标准曲线,计算松提取液的总酚含量。

1.3.3 松针多酚提取率

$$\text{松多酚提取率}\% = \frac{c \times V}{m} \times 100\%$$

式中, *c* 表示提取液中松多酚的浓度; *V* 表示提取液的体积, *m* 表示松粉的质量。

1.3.4 提取工艺优化

以红松松针为研究对象,改变提取条件,包括高剪切乳化分散机的转速、剪切时间、剪切温度、乙醇浓度和料液比提取,并以这 5 个因素做单因素实验,以红松松针多酚得率为考察目标,讨论各因素对红松松针多酚提取效果的影响。

表1 单因素实验表

Table 1 Single factor tests

水平	因素				
	转速/(r/min)	剪切时间/s	剪切温度/°C	乙醇浓度/%	料液比(m/V)
1	10000	90	20	40	1:6
2	14000	120	30	50	1:8
3	18000	150	40	60	1:10
4	21000	180	50	70	1:12
5	24000	210	60	80	1:14

1.3.5 最陡爬坡实验

综合单因素实验结果选取剪切时间、乙醇浓度、剪切温度这3个对红松松针多酚提取率影响最显著的因素进行最陡爬坡实验,设计见表2。

表2 最陡爬坡实验设计表

Table 2 Design of the steepest ascent experiment

实验号	剪切时间/s	乙醇浓度/%	剪切温度/°C
1	90	40	20
2	120	50	30
3	150	60	40
4	180	70	50

1.3.6 响应面优化实验

在单因素实验和最陡爬坡实验的基础上,选取剪切温度、乙醇浓度和剪切时间三因素,采用软件Box-Behnken Design(BBD)实验设计优化红松松针多酚提取工艺参数,实验因素水平见表3^[22]。

表3 Box-Behnken 实验因素水平编码表

Table 3 Factors and levels of the Box-Behnken experimental design

水平	x ₁ 剪切温度/°C	x ₂ 乙醇浓度/%	x ₃ 剪切时间/s
-1	20	50	90
0	40	60	135
1	60	70	180

1.3.7 五种松针抗氧化能力测定

1.3.7.1 DPPH·清除能力的测定

将五种松针多酚配制成浓度为18、23、30、50及100 μg/mL 的样品溶液。将1 mL 样品溶液与3.0 mL 1×10⁻⁴ mol/L DPPH·溶液混匀,放置于室温暗处30 min后测定517 nm 处吸光值^[2,23],以Trolox 作对照。每组实验均做三组平行实验,清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:A₀为DPPH与蒸馏水反应的吸光值;A₁为1 mL 样品与3 mL 无水乙醇反应的吸光值;A₂为1 mL 无水乙醇与3 mL 无水乙醇反应的吸光值。

1.3.7.2 ABTS⁺·自由基清除率的测定

将10 mL 的7 mmol/L ABTS 和0.2 mL 的140 mmol/L 过硫酸钾混合,在室温、避光的条件下静置过夜,形成ABTS⁺·储备液。使用前将ABTS⁺·储备液用80%乙醇稀释成ABTS⁺·工作液,要求在30 °C、734 nm 波长下吸光值为0.7±0.02。将五种松针多酚配制成浓度为18、23、30、50及100 μg/mL 的样品溶液,取0.1 mL 样品溶液加入2 mL ABTS⁺·工作液,充分震荡混匀,避光放置10 min,在734 nm 处测定吸光值,以Trolox 作对照^[24]。每组实验均做三组平行实验,清除率计算公式如下:

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:A₀为用蒸馏水替代多酚样液后的吸光值;A₁为样液反应后的吸光值;A₂为用蒸馏水代替ABTS 后的吸光值。

1.3.7.3 总还原力的测定

将五种松针多酚配制成浓度为50、100、150、200及250 μg/mL 的样品溶液,准确移取1.0 mL 样品液于试管中,分别加入2.5 mL、0.2 mol/L、pH 6.6 磷酸缓冲液和2.5 mL、1%铁氰化钾溶液,于50 °C 水浴中保温20 min,快速冷却,再加入2.5 mL、10%三氯乙酸溶液,4000 r/min 离心10 min,取上清液2.5 mL,依次加入2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL、0.1%三氯化铁溶液,充分振荡,静置10 min 后在700 nm 波长下测其吸光度值。另取1.0 mL 蒸馏水同以上操作参比调零,以吸光值大小表示其总还原力的大小。每组实验均做三组平行实验。

1.4 统计分析

实验中的数据均平行测定3次。以下出现的数据均以(平均值±标准误)表示。以下数据均用origin 8.0、Design-Expert 响应面分析软件和CalculSyn Demo 等软件处理数据。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验分析

2.1.1 高剪切乳化分散机的剪切速度对红松松针多酚得率的影响

在料液比为 1:10 (m/V), 乙醇溶液浓度为 60%, 剪切温度 40 °C, 剪切时间 150 s 条件下, 高剪切乳化分散机的转速分别为 10000、14000、18000、21000 和 24000 r/min 对红松松针多酚得率的影响, 以剪切速度为横坐标, 红松松针多酚得率为纵坐标作图, 如图 1 所示。

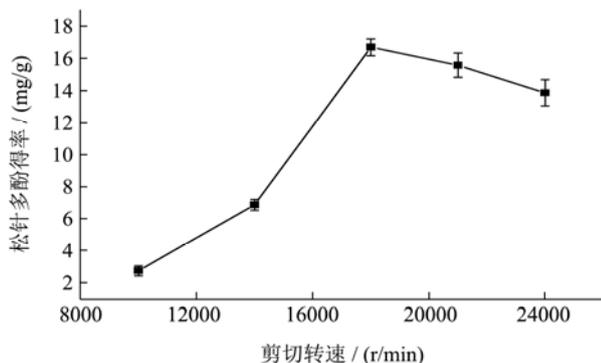


图 1 剪切机转速对红松松针多酚得率的影响

Fig.1 Effect of shear speed on the extraction of polyphenols

由图 1 可知, 在为 10000~18000 r/min 左右时, 随着剪切速度的不断增加, 松针多酚得率持续增加; 而当剪切机转速超过 18000 r/min 时, 松针多酚得率不断下降。可能是因为剪切机转速太大, 剪切过程中造成少许溶剂飞溅, 同时转速较大使得溶液的温度上升过高, 这都影响了松针多酚得率。因此, 剪切机转速 18000 r/min 是最佳的剪切转速。

2.1.2 高剪切乳化分散机的剪切时间对红松松针多酚得率的影响

在料液比为 1:10 (m/V), 乙醇浓度为 60%, 剪切温度 40 °C, 剪切机转速为 18000 r/min 条件下, 剪切时间对红松松针多酚得率的影响, 如图 2 所示。

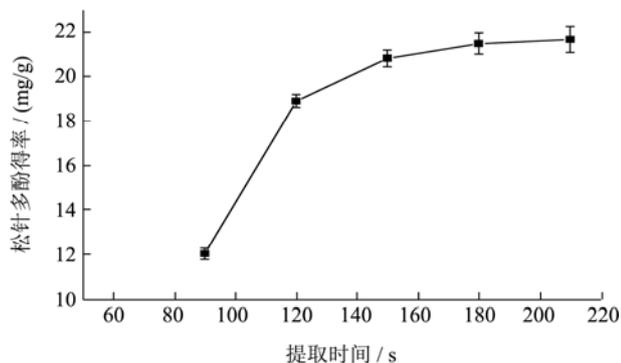


图 2 剪切时间对红松松针多酚得率的影响

Fig.2 Effect of shearing time on the extraction of polyphenols

由图 2 可知, 随着剪切时间的不断增加, 松针多酚得率也随之增加。在剪切时间低于 150 s 时, 松针多酚得率明显增加; 而当剪切时间超过 150 s 时, 随

着剪切时间的增加, 松针多酚得率基本不再提高因此将剪切时间 150 s 确定为最佳剪切时间。

2.1.3 乙醇溶液浓度对红松松针多酚得率的影响

在料液比为 1:10 (m/V), 剪切温度 40 °C, 剪切机时间 150 s, 剪切机转速 18000 r/min 条件下, 乙醇溶液浓度对红松松针多酚得率的影响, 如图 3 所示。

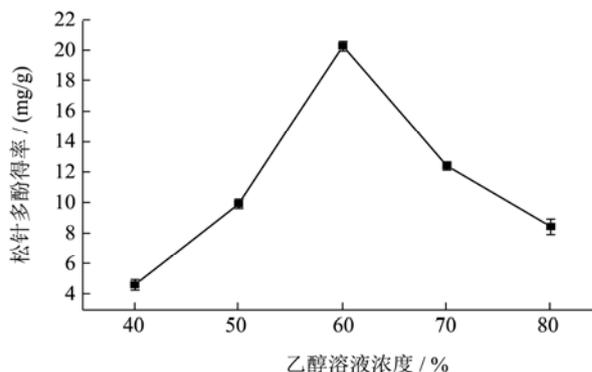


图 3 乙醇溶液浓度对红松松针多酚得率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction of polyphenols

由图 3 可知, 在乙醇溶液浓度低于 60% 时, 多酚得率随乙醇浓度的增大而逐渐提高; 而当乙醇溶液浓度大于 60% 时, 多酚得率明显下降, 可能的原因是随着乙醇浓度的升高, 可溶性小分子酚酸类化合物溶解度减小, 因此, 60% 乙醇浓度最利于多酚类物质的提取, 故选择浓度 60% 为最佳乙醇溶液浓度。

2.1.4 剪切温度对红松松针多酚得率的影响

在料液比为 1:10 (m/V), 乙醇浓度为 60%, 剪切时间为 150 s, 剪切机转速为 18000 r/min 条件下, 剪切温度对红松松针多酚得率的影响, 如图 4 所示。

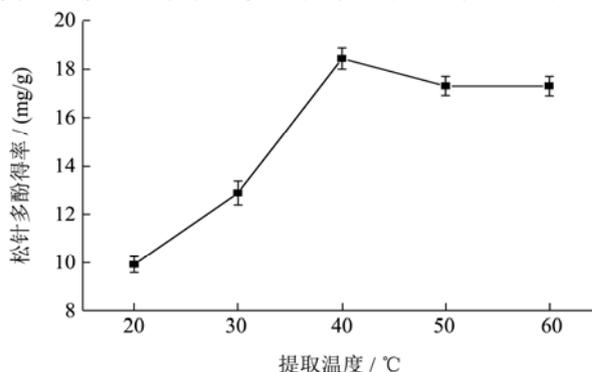


图 4 剪切温度对红松松针多酚得率的影响

Fig.4 Effect of shear temperature on the extraction of polyphenols

由图 4 可知, 在剪切温度低于 40 °C 时, 松针多酚得率随温度的升高而增大; 而当剪切温度超过 40 °C 以后, 松针多酚得率下降。可能的原因是温度过高导致有些多酚活性减弱, 因此, 选择 40 °C 为最

佳剪切温度。

2.1.5 料液比对红松松针多酚得率的影响

在乙醇浓度为 60%，剪切时间为 150 s，剪切机转速为 18000 r/min，温度为 40 °C 条件下，料液比对红松松针多酚得率的影响，如图 5 所示。

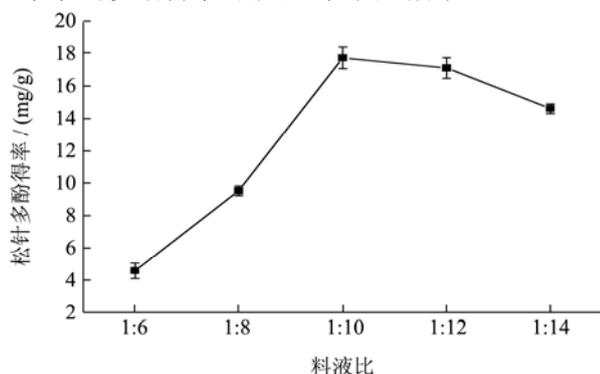


图 5 料液比对红松松针多酚得率的影响

Fig.5 Effect of liquid-to-material ratio on the extraction of polyphenols

由图 5 可知，在料液比低于 1:10 时，松针多酚得率随之增加；而当料液比大于 1:10 时，松针多酚得

率有所下降。可能是溶剂的量增加而使多酚溶液被稀释，因此，选定 1:10 为最佳料液比。

2.2 最陡爬坡实验

综合单因素实验结果固定剪切速度 18000 r/min、料液比 1:10，选取剪切时间、乙醇浓度和提取温度这 3 个对红松松针多酚提取率影响最显著的因素进行最陡爬坡实验。根据这 3 因素的效应大小比较设定它们的变化方向和步长，具体见表 4 所示。

响应面拟合方程的局限在于只有在考察的紧接区域才能充分近似真实情形，如果选择其他区域，最后做出的结果可能毫无意义。所以，本研究先做个最陡爬坡实验，以实验值变化的梯度方向为爬坡方向，根据各因素效应值的大小确定变化步长，快速地逼近最佳值区域，为建立响应面拟合方程打基础。实验 1~4 的红松松针多酚得率分别为 6.56、14.84、24.26、23.68 mg/g。表明实验 3 为最优的中心点，即剪切时间 150 s，乙醇浓度为 60%，提取温度 40 °C。

表 4 最陡爬坡实验结果

Table 4 Results of the steepest ascent experiment

实验号	剪切时间/s	乙醇浓度/%	提取温度/°C	松针多酚得率/(mg/g)
1	90	40	20	6.56
2	120	50	30	14.84
3	150	60	40	24.26
4	180	70	50	23.68

2.3 红松松针多酚提取响应面优化实验

2.3.1 响应面法实验设计及结果

在最陡爬坡实验结果的基础上，根据 Box-Behnken 实验原理设计实验，设定了高速剪切机剪切时间、乙醇浓度和剪切温度 3 因素 3 水平响应面法实验设计，其因素水平见表 5，所得实验结果见表 6。

表 5 松针多酚提取响应面实验因素水平及编码

Table 5 Factors and coded levels of Box-Behnken design

自变量	编码水平(X _i)		
	-1	0	1
A: 温度/°C	20	40	60
B: 乙醇浓度/%	50	60	70
C: 剪切时间/s	90	135	180

表 6 响应面实验结果

Table 6 Experimental design and results of response surface analysis

序号	剪切温度/°C	乙醇浓度/%	剪切时间/s	松针多酚得率/(mg/g)
6	60	60	90.00	16.42
4	60	70	135.00	18.17
11	40	50	180.00	17.19
17	40	60	135.00	20.34
13	40	60	135.00	20.66
14	40	60	135.00	20.17
2	60	50	135.00	16.41
7	20	60	180.00	15.45

转下页

接上页					
1	20	50	135.00	11.38	
16	40	60	135.00	20.79	
3	20	70	135.00	15.73	
9	40	50	90.00	13.92	
5	20	60	90.00	13.52	
8	60	60	180.00	17.46	
12	40	70	180.00	18.21	
10	40	70	90.00	18.84	
15	40	60	135.00	20.22	

表 7 回归模型方差分析表

Table 7 Analysis of variance of the primarily established quadratic regression model

来源	均方和	自由度	均方	F 值	p-value Prob>F	显著性
模型	120.51	9	13.39	82.32	<0.0001	显著
A-剪切温度	19.16	1	19.16	117.79	<0.0001	
B-乙醇浓度	18.15	1	18.15	111.59	<0.0001	
C-剪切时间	3.93	1	3.93	24.19	0.0017	
AB	1.68	1	1.68	10.31	0.0148	
AC	0.20	1	0.20	1.22	0.3063	
BC	3.80	1	3.80	23.38	0.0019	
A ²	42.32	1	42.32	260.22	<0.0001	
B ²	14.30	1	14.30	87.93	<0.0001	
C ²	10.15	1	10.15	62.43	<0.0001	
残差	1.14	7	0.16			
失拟项	0.84	3	0.28	3.69	0.1197	不显著
纯误差	0.30	4	0.076			
校正总和	121.65	16				
R ² _{Adj}	0.9786					
R ² _{Pred}	0.8861					
R ²	0.9906					
C.V/%	2.33					

应用 Design-Expert 对实验数据进行多元回归拟合, 可得二次回归多元方程为:

$$Y=20.44+1.55A+1.51B+0.70C-0.65AB-0.22AC-0.98BC-3.17A^2-1.84B^2-1.55C^2$$

通过比较方程中一次项系数的绝对值大小, 可以直接判断因子影响的主次性。由回归方程可知, 温度对松多酚的提取率影响最大, 其次是乙醇浓度, 最后是剪切时间。

由表 7 可知, 方程的 F 值为 82.32, $p<0.01$, 说明该模型回归极显著。失拟项为 3.69, 差异不显著, 说明了方程对实验拟合的情况好, 实验误差小。变异系数为 2.33, 表明了实验的可靠性; 模型相关系数 0.9906, 校正决定系数 0.9786, 表明该模型可以解释 97.86% 的响应值。该模型与实验拟合度好, 故可以用

该模型预测不同变量下的响应值。

各因素对松针多酚得率是有不同影响的。剪切温度、剪切时间和乙醇浓度 p 值 <0.01 均呈极显著水平, 剪切时间、剪切温度和乙醇浓度的二次项达到了极显著水平。

2.3.2 响应面交互作用分析

根据上述方程以及回归模型方差分析, 乙醇浓度和剪切温度、剪切时间和乙醇浓度、剪切时间和剪切温度的交互作用如图 6 所示。

图 6 是剪切时间在 135 s 下, 乙醇浓度和剪切温度的交互作用对松针多酚得率的影响。由图 6 可知, 当剪切时间不变时, 随着乙醇浓度的变大, 松针多酚得率也呈先增大后减小的趋势, 并于乙醇浓度在 60% 左右达到最大值。而当乙醇浓度不变, 随着剪切温度

的升高, 松针多酚得率也是先上升后下降, 并于 40 °C 附近达到最大值。两因素的交互作用图呈抛物线, 可取得一个最大值。

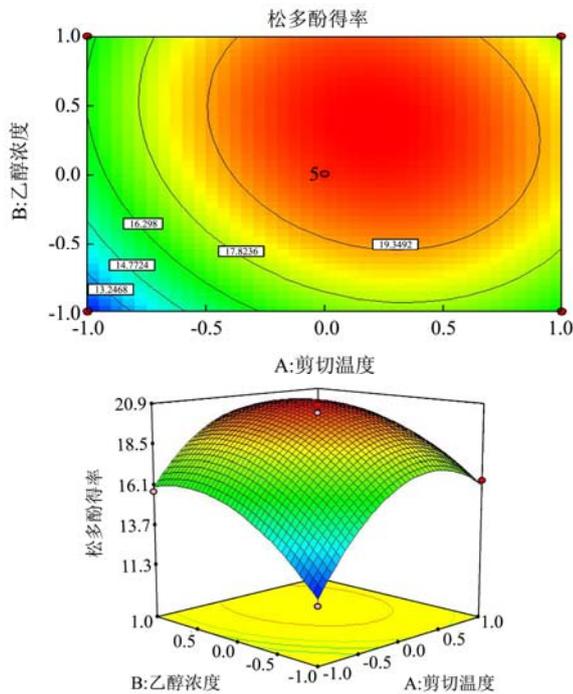


图6 乙醇浓度和剪切温度的等高线和响应面

Fig.6 Response surface and contours of the effect of ethanol concentration and shear temperature on the extraction rate of polyphenols

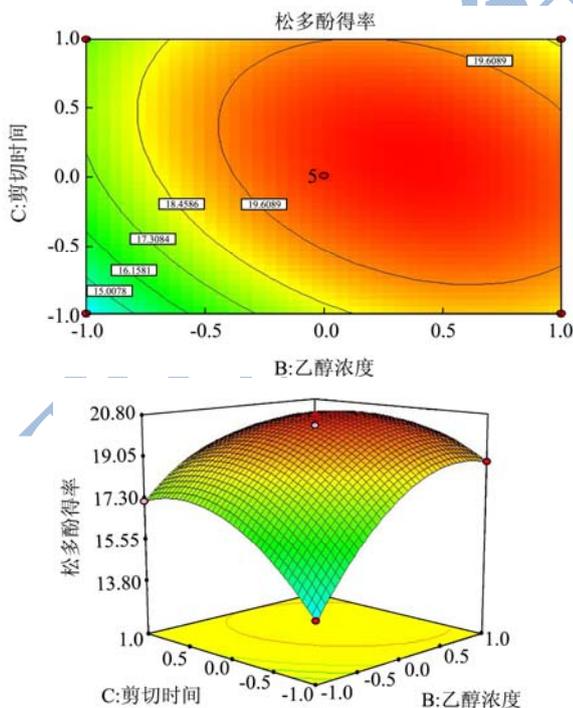


图7 乙醇浓度和剪切时间的等高线和响应面

Fig.7 Response surface and contours of the effect of ethanol concentration and shear time on the extraction rate of polyphenols

图7是剪切温度在40 °C下, 乙醇浓度和剪切时间的交互作用对松针多酚得率的影响。由图7可知, 当剪切时间不变时, 松针多酚得率随着乙醇浓度的增加呈先增大后减小的趋势, 并于乙醇浓度为60%左右达到最大值。当乙醇浓度一定时, 剪切时间的增加, 使得松针多酚得率先增大后减小, 剪切时间在160 s附近达到最大值。两因素的交互作用图呈抛物线, 可取得一个最大值。

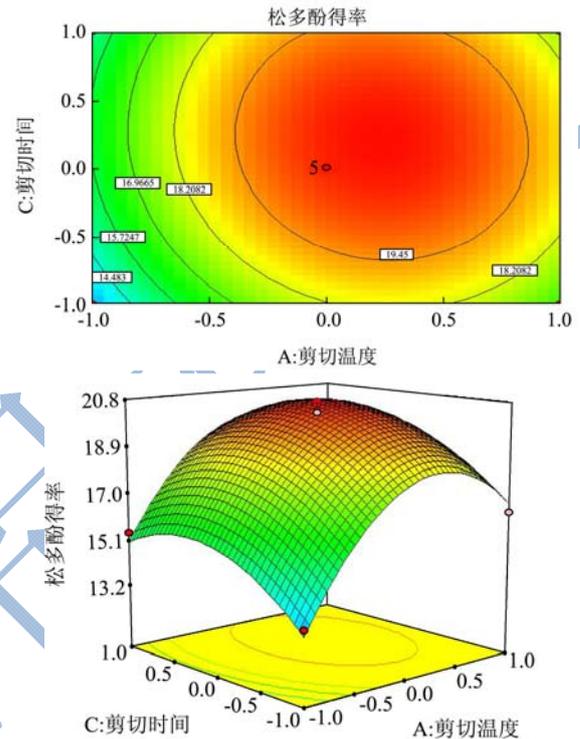


图8 剪切温度和剪切时间的等高线和响应面

Fig.8 Response surface and contours of the effect of shear temperature and shear time on the extraction rate of polyphenols

图8是乙醇浓度在60%, 剪切温度和剪切时间的交互作用对松针多酚得率的影响。由图8可知, 当剪切温度不变时, 松针多酚得率随着剪切时间的增加而先升高后下降, 剪切时间在160 s附近达到最大值。当剪切时间一定时, 剪切温度的增加, 使得松针多酚得率先增大后减小, 在40 °C左右时达到最大值。两因素的交互作用图呈抛物线, 可取得一个最大值。

此回归模型得出实验的最佳提取结果为: 乙醇浓度为63.46%, 剪切时间为139.65 s, 剪切温度为44.10 °C。此时的松针多酚得率为20.89 mg/g。

2.3.3 响应面验证实验

由于高剪切乳化分散机转速的限制, 实际的实验操作时剪切机转速18000 r/min、料液比1:10、乙醇浓度为64%、时间为140 s、温度为44 °C。在该条件下进行提取, 红松松针多酚的得率19.7623 mg/g。与模

型预测值的比较误差为 5.40%。略低于 Yi 等^[8]经大孔树脂纯化后的红松针多酚含量。

在该实验条件下,臭松、樟子松、黑皮油松和红皮云杉松针多酚的得率分别为 24.6992 mg/g、14.0626 mg/g、9.4983 mg/g 和 29.7984 mg/g。

2.4 五种松针抗氧化能力比较

2.4.1 不同浓度的五种松针多酚对 DPPH· 的清除能力

以 DPPH· 清除能力为指标,测定不同浓度的五种松针多酚提取液的 DPPH· 的清除能力,结果如图 9 所示。

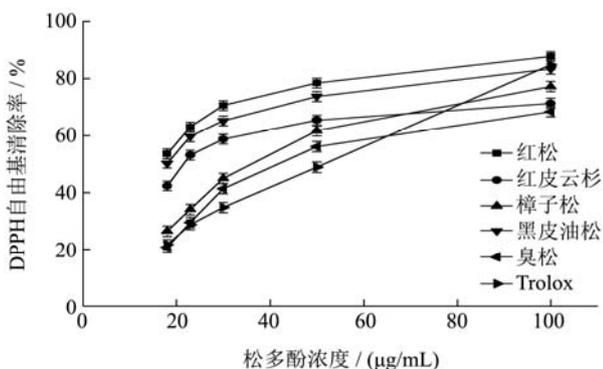


图 9 不同浓度的五种松针多酚提取液对 DPPH· 的清除能力

Fig.9 DPPH· radical scavenging activity of five different pine needle polyphenol extracts at different concentrations

由图 9 可知,五种松针多酚提取液都表现出较强的清除 DPPH· 的能力,且随浓度的升高呈一定的剂量关系,它们的清除能力的大小依次为:红松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 14.17 µg/mL±0.27) >黑皮油松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 15.89 µg/mL±0.64) >红皮云杉多酚提取液 (IC₅₀ 值 21.23 µg/mL±0.037) >樟子松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 37.04 µg/mL±0.74) >Trolox(IC₅₀ 值 41.15 µg/mL±0.55) >臭味松松针多酚提取液(IC₅₀ 值 46.42 µg/mL±1.18),在多酚浓度为 20~45 µg/mL 时,五种松针多酚提取液均呈现较好的剂量依赖关系,当浓度达到 45 µg/mL 以后,红皮云杉多酚提取液的清除率曲线趋于平缓,而其他则保持较好的剂量依赖关系。

2.4.2 不同浓度的五种松针多酚对 ABTS⁺ 的清除能力

以 ABTS⁺·清除能力为指标,测定不同浓度的五种松针多酚提取液的 ABTS⁺·的清除能力,结果如图 10 所示。

由图 10 可知,五种松针多酚均对 ABTS⁺·有一定的清除能力,它们的清除能力大小依次为:樟子松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 14.25 µg/mL±1.19) >Trolox(IC₅₀ 值 36.83 µg/mL±0.89) >红松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值

41.06 µg/mL±0.48) >黑皮油松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 49.44 µg/mL±0.29) >红皮云杉松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 71.89 µg/mL±1.38) >臭味松松针多酚提取液 (IC₅₀ 值 85.32 µg/mL±0.18)。在松针多酚提取液浓度在 20~45 µg/mL 范围时,五种松针多酚提取液均呈现较好的剂量依赖关系,且樟子松针多酚提取液对 ABTS 自由基清除能力明显强于其他松针,而当松针多酚提取液浓度大于 45 µg/mL 时,樟子松松针多酚提取液对 ABTS 自由基的清除率基本不变,其他四种的清除率则明显增大。

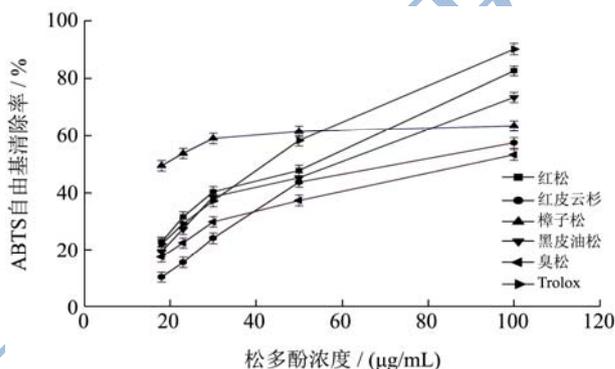


图 10 不同浓度的五种松针多酚液对 ABTS⁺· 的清除能力

Fig.10 ABTS⁺· radical scavenging activity of five different pine needle polyphenol extracts at different concentrations

2.4.3 不同浓度的五种松针多酚的总还原力

以总还原力为指标,测定不同浓度的五种松针多酚提取液的总还原力,结果如图 11 所示。

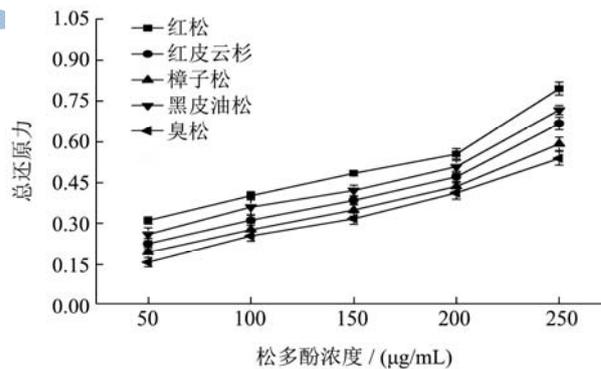


图 11 不同浓度的五种松针多酚液的总还原力

Fig.11 Total reducing power of five different pine needle polyphenol extracts at different concentrations

由图 11 可知,五种松针多酚提取液均具有较强的总还原能力,且与浓度呈正相关,它们的总还原力大小依次为:红松松针多酚提取液 (EC₅₀ 值 124.51 µg/mL±0.72) >黑皮油松松针多酚提取液 (EC₅₀ 值 158.35 µg/mL±0.10) >红皮云杉多酚提取液 (EC₅₀ 值 188.59 µg/mL±0.56) >樟子松松针多酚提取液 (EC₅₀ 值 231.16 µg/mL±1.08) >臭味松松针多酚提取液 (EC₅₀ 值 262.94 µg/mL±0.39)。松针多酚的抗氧化活性远远

高于松球果多酚和松籽多酚^[8]。

3 结论

本文通过单因素实验、最陡爬坡实验以及响应面优化分析得到红松松针多酚提取的最佳工艺, 确定最佳实验条件为: 剪切速度 18000 r/min, 温度 44 °C, 料液比 1:10, 乙醇溶液浓度 64%, 剪切时间为 140 s。在该条件下进行提取, 红松松针多酚的得率为 19.7623 mg/g。与模型预测值的比较误差为 5.40%。研究了五种松针多酚的抗氧化性, 以 DPPH·自由基清除能力、总还原力为指标, 五种松针多酚抗氧化性大小依次为: 红松松针多酚>黑皮油松松针多酚>红皮云杉松针多酚>樟子松松针多酚>臭松松针多酚。以 ABTS⁺·自由基清除能力为指标, 五种松针多酚抗氧化性大小依次为: 樟子松松针多酚>红松松针多酚>黑皮油松松针多酚>红皮云杉松针多酚>臭松松针多酚。

参考文献

- [1] Fernández-Varela R, Ratola N, Alves A, et al. Relationship between levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles and socio-geographic parameters [J]. Journal of Environmental Management, 2015, 156: 52-61
- [2] Céspedes C L, Valdezmorales M, Avila J G, et al. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (*Elaeocarpaceae*) [J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 886-895
- [3] Mei J, Chen P, Peng P. PCDD/Fs accumulation in pine needles: variation with species and pine needle age [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(1): 563-570
- [4] Chen B Y, Chen C H, Chuang Y C, et al. Schoolchildren's antioxidation genotypes are susceptible factors for reduced lung function and airway inflammation caused by air pollution [J]. Environmental Research, 2016, 149: 145-150
- [5] Jinboo J, Eulwon S, Hyungjin J. Effect of extracts from pine needle against oxidative DNA damage and apoptosis induced by hydroxyl radical via antioxidant activity [J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2009, 47(8): 2135-2141
- [6] Frontela-Saseta C, López-Nicolás R, González-Bermúdez C A, et al. Anti-inflammatory properties of fruit juices enriched with pine bark extract in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium: the effect of gastrointestinal digestion [J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2013, 53(3): 94-99
- [7] Wu D C, Li S, Yang D Q, et al. Effects of *Pinus massoniana* bark extract on the adhesion and migration capabilities of HeLa cells [J]. Fitoterapia, 2011, 82(8): 1202-1205
- [8] Yi J, Wang Z, Bai H, et al. Optimization of purification, identification and evaluation of the *in vitro* antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* pinecones [J]. Molecules, 2015, 20(6): 10450-10467
- [9] Cho S M, Lee E O, Kim S H, et al. Essential oil of *Pinus koraiensis* inhibits cell proliferation and migration via inhibition of p21-activated kinase 1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14(1): 1-9
- [10] Hui L, Wang Z, Xu Y, et al. Pine polyphenols from *Pinus koraiensis* prevent injuries induced by gamma radiation in mice [J]. Peerj, 2016, 4(4): e1870
- [11] He K, Song S, Zou Z, et al. The hypoglycemic and synergistic effect of loganin, morroniside, and ursolic acid isolated from the fruits of *Cornus officinalis* [J]. Phytotherapy Research, 2015, 30(2): 283-291
- [12] Huseini H F. Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic effects of *Pinus eldarica* Medw. nut in hypercholesterolemic rabbits [J]. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 23(1): 1-5
- [13] Wu Y, Bai J, Zhong K, et al. A dual antibacterial mechanism involved in membrane disruption and DNA binding of 2r,3r-dihydromyricetin from pine needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 463-470
- [14] Kim S H, Lee I C, Lim J H, et al. Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(2): 109-115
- [15] Valls R M, Llauroadó E, Fernández-Castillejo S, et al. Effects of low molecular weight procyanidin rich extract from french maritime pine bark on cardiovascular disease risk factors in stage-1 hypertensive subjects: Randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention trial [J]. Phytomedicine, 2016, 23(12): 1451-1461
- [16] El-Zein O, Kreydiyyeh S I. Pine bark extract inhibits glucose transport in enterocytes via mitogen-activated kinase and phosphoinositol 3-kinase [J]. Nutrition, 2011, 27(6): 707-712

- [17] Nakayama S, Kishimoto Y, Saita E, et al. Pine bark extract prevents low-density lipoprotein oxidation and regulates monocytic expression of antioxidant enzymes [J]. *Nutrition Research*, 2015, 35(1): 56-64
- [18] 符群,徐明慧,王振宇.红松种鳞多酚超声波辅助提取优化工艺及其抗氧化性研究[J].北京林业大学学报,2015,37(11): 128-135
FU Qun, XU Ming-hui, WANG Zhen-yu. Optimization of ultrasonic assisted process of extracting polyphenols from seed scales of Korean pine and their antioxidant [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(11): 128-135
- [19] 赵玉红,翟亚楠,王振宇.樟子松树皮中松多酚的提取工艺研究及提取方法比较[J].食品工业科技,2013,4:304-309
ZHAO Yu-hong, ZHAI Ya-nan, WANG Zhen-yu. Extraction of polyphenols from *Pinus Sylvestris* L. and comparison of extraction method [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 4: 304-309
- [20] 樊梓鸾,袁彬,王振宇.响应面优化高剪切乳化技术辅助提取红松精油的研究[J].北京林业大学学报,2015,37(11): 109-114
FAN Zi-luan, YUAN Bin, WANG Zhen-yu. Response surface methodology for optimizing high shear emulsifier-assisted extraction of essential oil from pine needles [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(11): 109-114
- [21] Fan Z L, Wang Z Y, Liu J R. Cold field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities *in vitro* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(2): 402-407
- [22] Tian S Q, Wang Z Y, Fan Z L, et al. Optimization of CO₂ laser-based pretreatment of corn stover using response surface methodology [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10493-10497
- [23] 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*, 2011, 13(5): 5506-5518
- [24] 樊梓鸾,王振宇.红豆越橘体外抗氧化和抗细胞增殖活性研究[J].现代食品科技,2010,10(26):1081-1086
FAN Zi-luan, WANG Zhen-yu. Antioxidant and antiproliferative activities of *Lingonberries in vitro* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 10(26): 1081-1086