

莲子皮渣中酚类物质的提取优化及抗氧化活性评价

蒋蕾¹, 林美珠¹, 茹巧美², 王淑萍¹, 黄皓¹, 罗自生¹

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058) (2. 杭州万向职业技术学院, 浙江杭州 310023)

摘要: 本文以莲子加工副产物-莲子皮渣为实验材料, 在单因素实验的基础上, 以总酚、总原花色素、DPPH[·]清除能力为响应值, 通过响应面设计优化莲子皮渣活性成分超声辅助提取条件, 建立二次响应面回归模型, 模型均显著且拟合性好。最优提取工艺为: 丙酮浓度 70%, 料液比 1:25.5 g/mL, 提取时间 1.6 h, 提取温度 50 °C。该提取条件下, 里叶白莲莲子皮渣提取物总酚、总原花色素、DPPH[·]清除能力分别为 194.54±3.63 mg GAE/g DW, 243.15±2.88 mg CE/g DW, 238.53±3.07 mg AAE/g DW, 与预测值相符, 证明实验建立的响应面模型可用于莲子皮渣中总酚、总原花色素、DPPH[·]清除能力实验结果预测。对不同品种莲子皮渣植物化学素含量及体外抗氧化活性进行测定, 发现莲子皮渣均富含多酚、类黄酮、原花色素、三萜等生物活性物质, 且具有较高体外抗氧化活性。研究表明莲子皮渣富含生物活性成分, 具有开发利用的巨大潜在价值。

关键词: 莲子皮渣; 多酚; 原花色素; 抗氧化; 响应面; 优化

文章编号: 1673-9078(2019)04-198-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.027

Extraction Optimization and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Lotus Seed Epicarp Residue

JIANG Lei¹, Jarukitt Limwachiranon¹, RU Qiao-mei², WANG Shu-ping¹, HUANG Hao¹, LUO Zi-sheng¹

(1.College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

(2.Hangzhou Wanxiang polytechnic, Hangzhou 310023, China)

Abstract: Lotus seed processing by-product-lotus seed epicarp residue was collected as experimental materials. Based on the results of single factor experiment, response surface methodology (RSM) was used to optimize the ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from lotus seed epicarp residue, and total phenolic content (TPC), total proanthocyanidin content and DPPH[·] scavenging capacity were set as response values. Experimental data were fitted to three quadratic polynomial models and the regression equations were significant with good fitting degree. The optimal extraction conditions were as follows: Acetone concentration of 70%, liquid to solid ratio of 1:25.5 g/ mL, extraction temperature as 50 °C and sonication time as 1.6 hour. Under these conditions, the practical values of responses were 194.54±3.63 mg GAE/g DW, 243.15±2.88 mg CE/g DW, 238.53±3.07 mg AAE/g DW, respectively, which were consistent with the predicted values. So the established models could accurately predict the results of total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH[·] scavenging capacity in lotus seed epicarp residue. We determined the phytochemical content and *in vitro* antioxidant activities of diverse lotus seed epicarp residue and found that they are rich in bioactive compounds including polyphenols, flavonoids, proanthocyanidins, triterpenes, and with high antioxidant activity. The study suggested that lotus seed epicarp residue contains high amount of bioactive chemicals and is of great potential for research and development.

Key words: lotus seed epicarp residue; polyphenols; proanthocyanidins; antioxidant; RSM; optimization

莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 属于睡莲科莲属的多年水生草本植物^[1], 在中国已有 2000 多年的栽种历史。莲富含生物碱、多酚、多糖、类黄酮和原花色素等活性物质^[2], 其中莲藕和莲子是最主要的食用部位。

收稿日期: 2018-11-22

基金项目: 浙江省重点研发项目 (2018C02049); 杭州市农业科研攻关专项 (20191203B31)

作者简介: 蒋蕾 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 罗自生 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

莲子具有健脾胃、安神、润肺清心、降血压、抗痢疾、抑制低血糖等功效^[3], 莲子及其加工副产物具有广泛生理活性, 用于食补和医疗。莲子皮作为莲子的不可食部分, 资源十分丰富。莲子的加工一般要经过干燥、分级、去壳、除衣和去心等工序, 在莲子加工过程中产生大量的莲子皮渣, 通常被丢弃田间或焚烧处理, 造成了资源的极大浪费和对环境的严重污染^[4]。

莲子皮富含多酚、类黄酮及原花色素等活性成分, 具有较高的抗氧化活性^[5,6]。Kredy 等^[7]从新鲜莲子皮

中分离鉴定出 20 种黄酮成分,该黄酮提取物具有强抗氧化活性,有用于疾病治疗和膳食补充剂的潜能。周德龙等^[8]研究证明莲子皮类黄酮提取物在油脂中具有抗氧化活性。Qi 和 Zhou^[9]将新鲜莲子皮提取物作为添加剂加入广式腊肠,研究发现其具有抗氧化活性及抑制前脂肪细胞分化的能力,并有明显的剂量关系,是潜在的无毒、抗氧化、抗肥胖食品添加剂。新鲜莲子皮提取物具有抑制脂肪细胞分裂、抗黑色素瘤^[10]、抗氧化等潜能,但具有难以获得和难保存的缺陷,相比之下,莲子皮渣具有大型生产的优势且易于保存,然而莲子加工副产物莲子皮渣绝大部分被废弃,仅有少量被制成食用菌的培养基^[6]。关于莲子皮渣的研究极为匮乏,因此探究如何对莲子皮渣生物活性成分进行挖掘和利用具有重要的现实意义。

本文以莲子皮渣为实验材料,在单因素实验基础上,通过响应面试验设计进一步优化莲子皮渣中活性物质提取。探索最优提取工艺,获得同时具备高总酚、高原花色素含量以及强 DPPH^{·+}清除能力的提取物。并对三品种莲莲子皮渣中植物化学素(多酚、原花色素、黄酮、三萜)含量进行测定,并通过 DPPH^{·+}清除能力试验,ABTS^{·+}清除能力试验及 FRAP 总还原能力试验对莲子皮渣提取物进行体外抗氧化活性评价。为莲子皮渣的生物活性成分挖掘及综合开发利用提供方法和思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料与预处理:试验用莲子皮渣分别来自三个品种:十里荷花,建莲,里叶白莲。从建德莲子加工工厂回收莲子加工副产物莲子皮渣,将莲子皮渣晒干后磨粉过 40 目筛得到实验材料,密封避光贮藏于-20℃冰箱。

试剂:熊果酸标准品,没食子酸标准品,儿茶素标准品,抗坏血酸标准品等,一飞生物有限公司;Folin-酚试剂,北京鼎国昌盛生物技术有限公司;1,1-苯基-2-苦肟基自由基(DPPH^{·+})、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、三吡啶基三嗪(TPTZ),阿拉丁试剂公司;无水碳酸钠、无水乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸、甲醇、硫酸铁铵、浓盐酸等,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

黄城 1000 g 高速多功能粉碎机,永康市天琪盛世工贸有限公司;UV 1750 紫外可见分光光度计,日本

岛津有限公司;RE-52AAA 旋转蒸发器,上海佳鹏科技有限公司;恒温水浴锅,上海亚荣生化仪器厂;上超牌超声波清洗器(DS-8510DTH),上海生析超声仪器有限公司;ND100-1 氮气吹扫仪,杭州瑞诚仪器有限公司;BL310、BS210S 电子天平,北京赛多利斯技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素实验

以里叶白莲莲子皮渣粉末(过四十目筛)为优化试验材料,首先进行溶剂选择(甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、水、70%有机-水溶液),后准确称取 1 g 每份实验材料于 50 mL 离心管中,与丙酮溶液混合(料液比为 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 g/mL;溶剂浓度为 40%、50%、60%、70%、80%、90%),避光置于超声波发生器(超声频率 40 kHz;功率为 600 W)中于一定温度(40、45、50、55、60、70、80℃)下提取一定时间(提取时间为 1、1.5、2、2.5、3、3.5 h),冷却至常温后高速离心(10000 r/min, 25 min),过滤取上清液定容至 50 mL,分别测定各因素不同水平作用对莲子皮渣总酚含量、总原花色素含量、DPPH^{·+}清除活性的影响,各试验平行测定三次。

1.3.2 响应面设计

采用 Box-Behnken(BB)设计优化超声辅助提取,根据单因素实验结果,选定 70%丙酮为提取溶剂,以料液比(X_1 , g/mL),提取时间(X_2 , h),提取温度(X_3 , °C)为三因素,以总酚含量、总原花色素含量、DPPH^{·+}清除能力为响应值,设计三因素三水平共 17 组试验,确定莲子皮渣中植物化学素提取的最优条件。试验因素水平设计及实验结果见 2.2.1 中表 1。

1.3.3 植物化学素测定

以响应面优化所得最优条件进行提取:准确称取 1 g 莲子皮渣粉末于 50 mL 离心管中,与 25.5 mL 70%丙酮混合,50℃下避光超声(40 kHz; 600 W)提取 1.6 h,冷却至常温后高速离心(10000 r/min, 25 min),过滤取上清液定容至 50 mL,贮藏于 4℃,用于总酚、总黄酮、总原花色素含量及抗氧化活性测定。

1.3.3.1 总酚含量测定

采用福林酚法,参照 Gutfinger^[11]方法。以没食子酸为标准品,将 1 mL 甲醇、样品稀释液及标准溶液(10、20、40、60、80、100 μg/mL)分别加入 15 mL 离心管中,加入 5 mL 10% (W/V) Folin-酚试剂,反应 5 min 后加入 4 mL 7.5% (W/V) 碳酸钠溶液。涡旋混匀后于常温下避光反应 1 h,于 765 nm 波长测定吸光度。测得标准曲线为: $y=0.0106x+0.0198(R^2=0.9989)$, 结

果表示为 mg gallic acid equivalents/g dry weight (mg GAE/g DW)。

1.3.3.2 总黄酮含量测定

采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 法, 参照 Jia 等^[12]方法。以(+)-儿茶素为标准品, 将 2.4 mL 甲醇、样品稀释液、标准溶液 (10、20、30、40、50、60、70、80 $\mu\text{g/mL}$) 分别加入 10 mL 离心管中, 与 0.4 mL 5% (W/V) NaNO_2 溶液混匀, 静置 6 min, 加入 0.6 mL 10% (W/V) $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 静置 6 min, 加入 4% NaOH 溶液 4 mL, 涡旋混匀后常温下静置 15 min, 于 510 nm 处测定吸光度。测得标准曲线为: $y=0.0151x-0.0267$ ($R^2=0.9990$), 结果以 mg catechin eq/g DW (mg CE/g DW) 表示。

1.3.3.3 总原花色素含量测定

采用盐酸-香草醛法测定, 参考 Muchuweti 等^[13]方法。以(+)-儿茶素为标准品, 将 0.5 mL 甲醇、样品稀释液及标准溶液 (10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$), 分别与 3 mL (4%) 香草醛-甲醇溶液混合, 加入 1.5 mL 浓盐酸, 涡旋混匀后, 30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min, 于 500 nm 处测定吸光度。得标准曲线为: $y=0.0023x-0.0027$ ($R^2=0.9973$), 结果表示为 mg CE/g DW。

1.3.3.4 总三萜提取及含量测定

提取 (参照曾芳芳^[14]方法): 准确称取莲子皮渣粉末 0.5 g, 加入无水乙醇 20 mL, 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 1 h, 冷却后抽滤, 滤液定容至 50 mL, 得试样溶液。取 5 mL 稀释至 25 mL, 准确吸取 0.2 mL 待测液于 90 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹吹干, 用于下一步测定。

测定: 参照 Ni 等^[15]方法, 以熊果酸为标准品, 配制 80 $\mu\text{g/mL}$ 熊果酸-乙醇标准溶液。精密吸取熊果酸标准品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于试管中, 氮吹挥干溶剂后, 并对照组、待测实验组, 分别加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.5 mL 和高氯酸 0.8 mL, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴加热 15 min, 取出至冰水中冷却, 加冰醋酸 5 mL, 摇匀后置于室温, 15 min 后在 548 nm 波长下测定吸光度, 并绘制得标准曲线: $y=0.0063x+0.0106$ ($R^2=0.9991$), 结果表示为 mg ursolic acid eq/g DW (mg UAE/g DW)。

1.3.4 体外抗氧化活性评价

1.3.4.1 DPPH $^{\cdot}$ 清除能力测定

参照 Brandwilliams 等^[16]方法, 配制 1 mmol/L DPPH 储备液, 用无水乙醇稀释得 0.2 mmol/L DPPH 标准溶液。以抗坏血酸为标准品, 取 4 mL 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液分别与 2 mL 乙醇、样品稀释液及标准溶液 (6、9、12、15、18、24、27 $\mu\text{g/mL}$) 混合, 常温下避光反应 30 min 后测定 517 nm 下的吸光度 A_X , DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=(A_0-A_X)/A_0\times 100$$

式中: A_X 为样品溶液反应后的吸光度; A_0 为 4.0 mL DPPH 溶液+2.0 mL 提取溶剂的吸光度。

抗坏血酸标准曲线: $y=0.0308x-0.0162$ ($R^2=0.9997$)。线性区间为 6~24 $\mu\text{g/mL}$ 。样品的 DPPH $^{\cdot}$ 清除能力以抗坏血酸当量表示: mg ascorbic acid eq/g DW (mg AAE/g DW)。

1.3.4.2 FRAP 总还原能力测定

参照 Benzie 等^[17]方法。TPTZ 工作液配制: 0.3 mol/L 醋酸 (pH=3.6), TPTZ 溶液 (10 mmol/L, 溶解于 40 mM HCl), 20 mmol/L FeCl_3 溶液, 三者体积比 10:1:1, 现配现用。分别移取 200 μL 甲醇、样品稀释液、抗坏血酸标准溶液 (10、20、30、40、50、60、70、80、90 $\mu\text{g/mL}$) 与 4.8 mL 的 TPTZ 工作液混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 min, 于 593 nm 处测定吸光度, 并绘制得标准曲线: $y=0.0108x-0.0505$ ($R^2=0.9989$)。其线性区间为 10~90 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表示为 mg AAE/g DW。

1.3.4.3 ABTS $^{\cdot+}$ 清除能力测定

参照 Re 等^[18]实验方法, 并适当修改。制备 ABTS 自由基储备液: 取 5.0 mL 7 mmol/L ABTS $^{\cdot+}$ 溶液, 加入 88.0 μL 过硫酸钾 (140 mmol/L), 常温下置于暗处反应 12~16 h。在波长 734 nm 处, 用乙醇将 ABTS $^{\cdot+}$ 储备液稀释至吸光度为 0.70 ± 0.02 , 备用。准确移取 0.1 mL 样品稀释液、抗坏血酸标准溶液 (25、45、55、70、85、105、125、145、165、185 $\mu\text{g/mL}$), 分别加入 3.9 mL ABTS $^{\cdot+}$ 溶液, 混匀, 在室温下反应 6 min, 于波长 734 nm 处测定吸光度 A_E 。同时移取 3.9 mL ABTS $^{\cdot+}$ 溶液, 加入 0.1 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液反应, 于波长 734 nm 处测定吸光度 A_B 。ABTS 自由基清除率 (%) 计算如下:

$$\text{ABTS 自由基清除率}(\%)=(A_B-A_E)/A_B\times 100$$

抗坏血酸标准曲线为: $y=0.0052x-0.037$ ($R^2=0.9981$)。线性区间 25~165 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表示为 mg AAE/g DW。

1.3.5 数据统计分析

单因素、植物化学素测定及体外抗氧化活性评价实验中, 各样品进行三平行三次重复, 实验结果均表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 SPSS 20 软件对实验结果进行方差分析 (ANOVA), 检验差异显著性 ($p<0.05$)。采用 Origin 9.1 统计分析数据并绘制图表。使用 Design Expert 8.0.6 版本软件进行响应面优化分析。

2 结果与讨论

2.1 莲子皮渣提取单因素实验

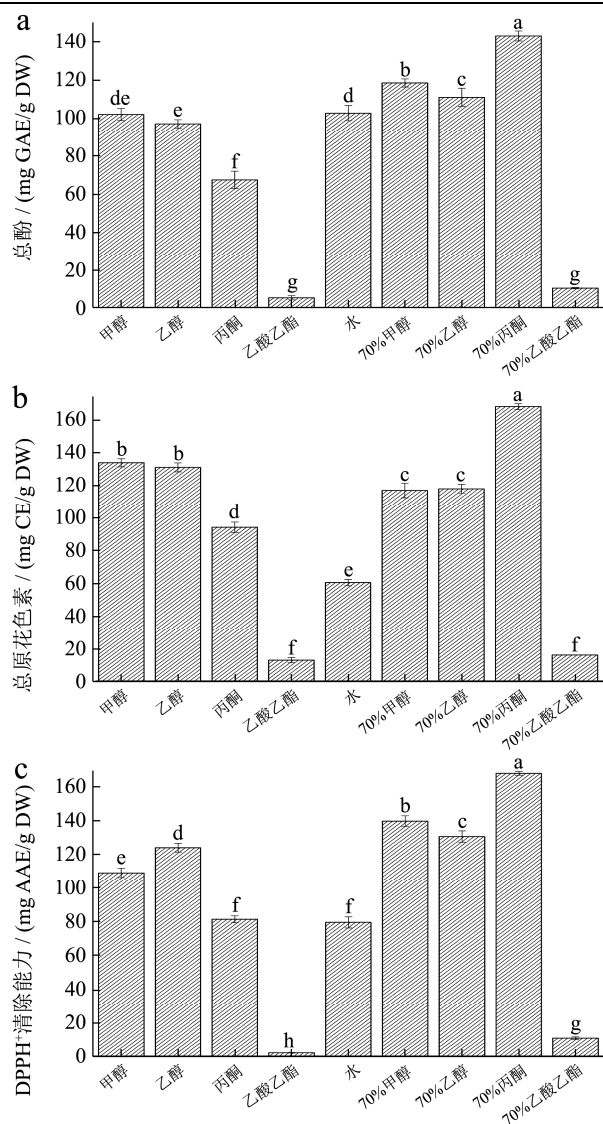


图1 提取溶剂选择对莲子皮渣总酚、总原花色素、DPPH·清除能力的影响

Fig.1 The effect of extraction solvents on total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH· scavenging capacity from lotus seed epicarp residue

注：不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)，下同。

以总酚含量、总原花色素含量及 DPPH·清除能力为三种评价指标。首先对提取溶剂进行选择，实验选用纯溶剂（甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、水）及 70% 有机溶剂-水溶液分别对莲子皮渣进行提取，恒定提取条件为：料液比 1:15 g/mL，提取时间 1 h，提取温度 40 °C。由图 1a 可知，不同溶剂提取得总酚含量大小顺序为：70% 丙酮 > 70% 甲醇 > 70% 乙醇 > 水 > 甲醇/乙醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯/70% 乙酸乙酯，与不同提取溶剂得 DPPH·清除能力高低顺序相似（图 1b）。说明对于总酚含量及 DPPH·清除能力而言，有机溶剂与水混合溶液提取效果高于纯有机溶剂，该结果与 Markom 等^[19]中结果一致。综合考察溶剂对上述三指标的提取

效果，以 70% 丙酮溶液提取效果最高，70% 乙酸乙酯提取效果最差，70% 乙醇、70% 甲醇提取效果居中。乙酸乙酯极性过小，对原花色素等提取不完全，而甲醇、乙醇、丙酮水溶液对原花色素等酚类物质有较好提取性能^[20]。此外，熊何健等^[21]比较甲醇、乙醇、丙酮水溶液对葡萄籽多酚提取效果，发现 70% 丙酮提取效果最好。选定 70% 丙酮水溶液进行后续单因素实验。

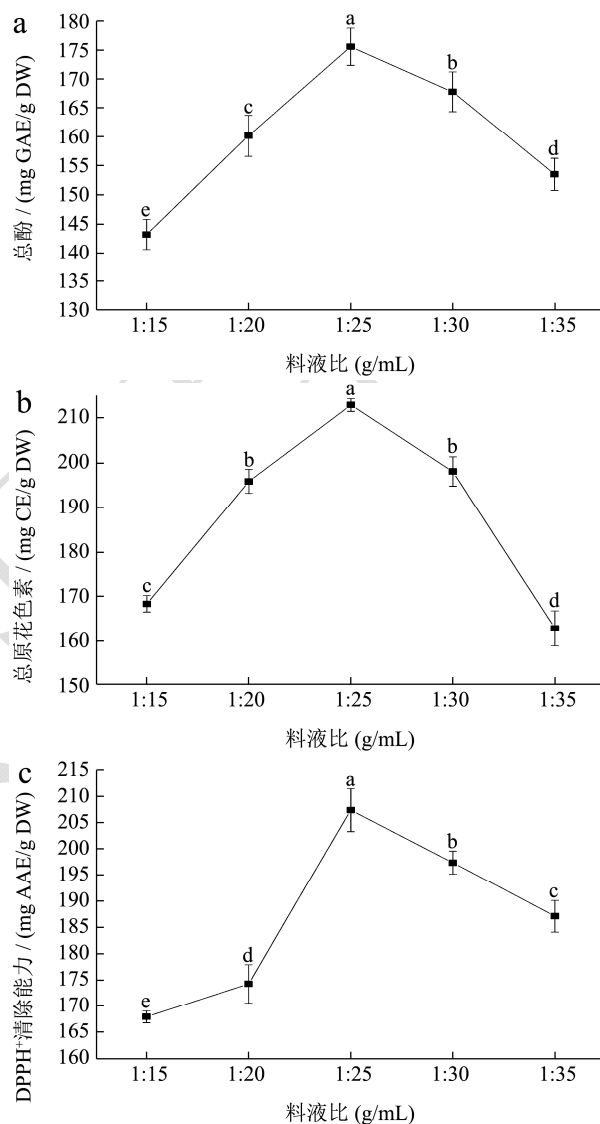


图2 料液比对莲子皮渣总酚、总原花色素、DPPH·清除能力的影响

Fig.2 Effects of solid to liquid ratio on total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH· scavenging capacity from lotus seed epicarp residue

70% 丙酮为提取溶剂，提取温度 40 °C，超声提取时间 1 h 条件下，不同料液比（1:15~1:35 g/mL）对总酚、总原花色素、DPPH·清除能力的影响如图 2 所示。料液比低于 1:25 g/mL 时，三指标值随料液比增加而上升，料液比超出 1:25 g/mL 则指标值降低。这可以由传质原理及超声能量密度在溶液中分布解释^[22]：高

料液比有更高的浓度梯度,使溶质扩散率提高进而得到更高的提取率;但当料液比超出一定范围后,溶液中超声能量密度分布的降低成为首要影响^[23],使得提取率下降。因此,选择 1:20 g/mL、1:25 g/mL、1:30 g/mL 作为三水平进行响应面优化。

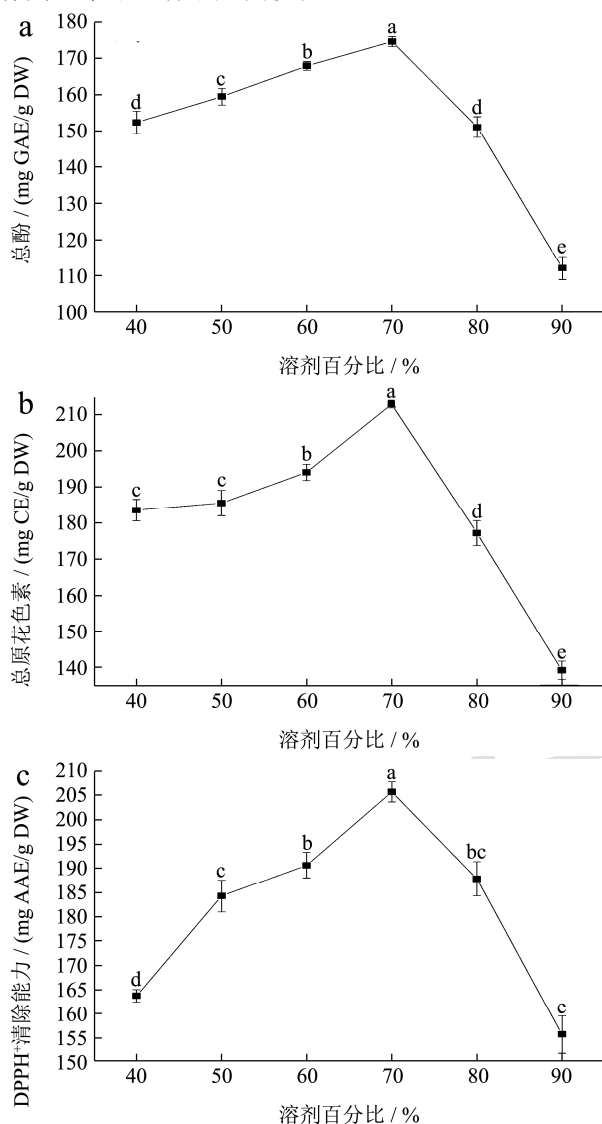


图3 溶剂百分比对莲子皮渣总酚、总原花色素、DPPH·清除能力的影响

Fig.3 The effect of solvent proportion on total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH·⁺ scavenging capacity from lotus seed epicarp residue

改变丙酮浓度 (40%~90%),保持料液比 (1:25 g/mL),提取温度 (40 °C),提取时间 (1 h) 恒定,对样品进行提取测定。由图 3 可知,丙酮浓度在 40%~70%范围内,随浓度增加,提取率上升,当丙酮浓度超过 70%后,总酚、总原花色素含量及 DPPH·⁺清除能力迅速下降,这与溶剂选择结果一致(提取率: 70%丙酮>水>丙酮),可由相似相溶原理解释。溶剂浓度上升,溶剂与植物中酚类化合物极性越接近,溶剂

分子与酚类化合物连接官能团结合越多^[24],提取率上升,当溶剂浓度继续增加使得极性偏离,脂溶性杂质溶出,导致提取率下降。原花色素中苯环、醚键结构,使得分子油溶性较强,同时分子骨架间连接的大量羟基,使得水中溶解性增强^[20],70%丙酮的油水双溶性与莲子皮渣中原花色素等酚类极性最匹配,因而提取率最高。在后续优化试验中选定 70%丙酮为提取溶剂。

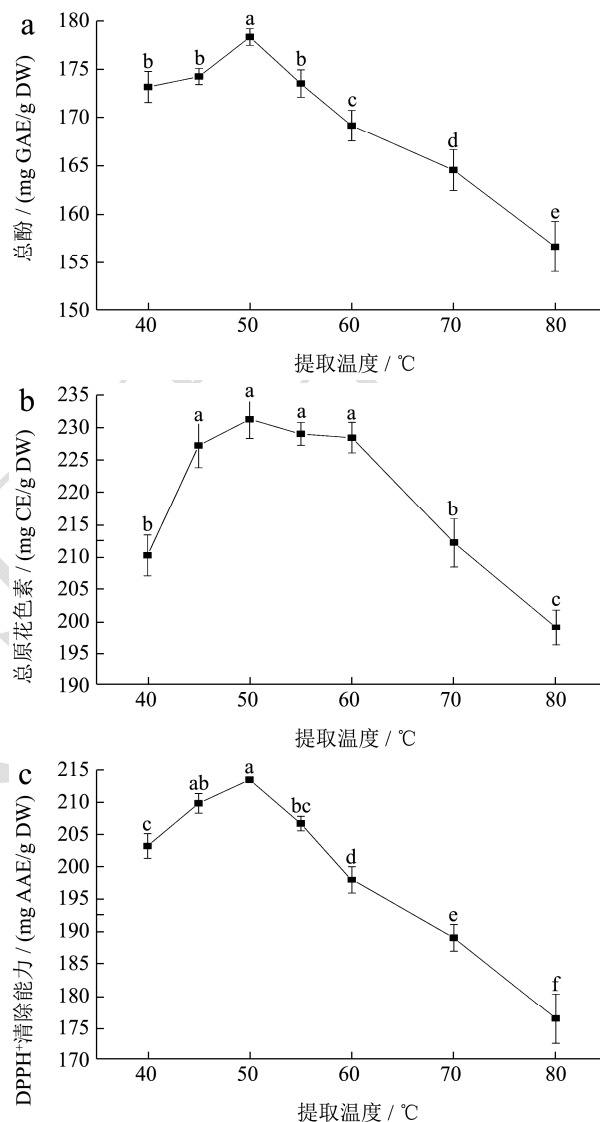


图4 提取温度对莲子皮渣总酚、总原花色素、DPPH·⁺活性的影响

Fig.4 The effect of extraction temperature on total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH·⁺ scavenging capacity from lotus epicarp residue

1 g 样品与 25 mL 70%丙酮溶液混合,采用不同温度 (40~80 °C),超声 1 h 后,用于测定,得实验结果如图 4。在 40~50 °C 范围内,总酚、DPPH·⁺活性随温度升高而增加,当温度超越 50 °C,总酚、DPPH·⁺活性随温度升高而降低。但温度在 45~60 °C 范围内变化时,总原花色素含量有最高值但变化不显著,说明原

花色素对温度稳定性更高。这是由于温度升高使酚类物质溶解率增大,扩散率增加,提取速率加快,减少溶剂粘度和表面张力,进而使得酚类物质得率上升^[25];但当温度过高时,不稳定的酚类物质受热分解,酚类物质得率下降^[26],进而导致自由基清除能力的下降。综上,选择 40、50、60 °C 三水平进行响应面优化。

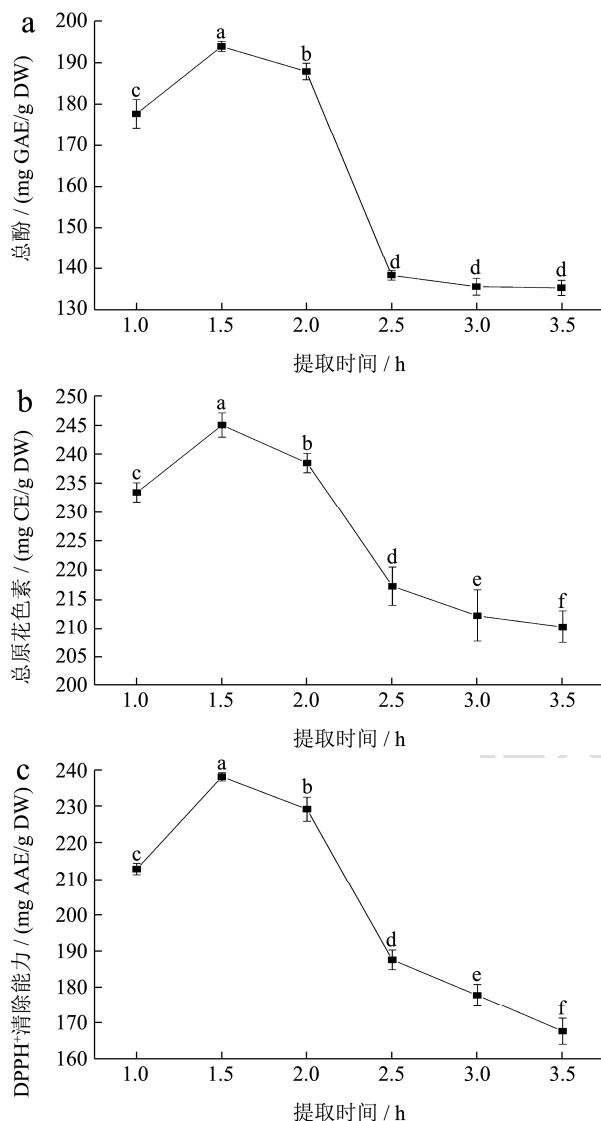


图5 提取时间对莲子皮渣总酚、总原花色素、DPPH[·]活性的影响

Fig.5 The effect of extraction time on total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH[·] scavenging capacity from lotus seed epicarp residue

表1 BB 实验设计及总酚、总原花色素、DPPH[·]清除能力响应值

Table 1 BB design and the response values of total phenolic content, total proanthocyanidin content and DPPH[·] activity

序	料液比 (X_1 , g/mL)	提取时间 (X_2 , h)	提取温度 (X_3 , °C)	Y_1 总酚 (mg GAE/g DW)	Y_2 总原花色素 (mg CE/g DW)	Y_3 DPPH [·] 清除能力 (mg AAE/g DW)
1	1:25(0)	1.5(0)	50(0)	193.46	242.96	238.49
2	1:25(0)	1.5(0)	50(0)	193.80	243.44	237.88

70%丙酮为提取溶剂,料液比 1:25 g/mL,提取温度 50 °C,超声提取时间 1 h~3.5 h,提取测定结果如图 5。当提取时间超过 2 h 后,总酚含量、总原花色素、DPPH[·]活性显著下降,推测可能由于超声时间过长,化合物结构活性遭到破坏,该现象与超声时间对刺梨多酚的影响类似^[14]。因此,选择 1 h、1.5 h、2 h 三水平进行响应面优化实验。

2.2 莲子皮渣提取响应面优化

2.2.1 响应面实验结果分析

响应面实验设计及实验结果如表 1 所示。采用 Design Expert 8.0.6 对响应面实验结果分析得总酚、总原花色素、DPPH[·]清除能力的回归模型及统计参数(表 2)。模型方差分析显示实验结果显著($p < 0.0001$)拟合模型($F_1=210.13$, $F_2=27.48$, $F_3=709.97$),且失拟项均不显著,表明模型能准确预测实验结果^[27]。 R^2 分别为 0.9963、0.9725、0.9989 表明三模型与实验数据有 99.63%、97.25%及 99.98%的符合度。校正决定系数($\text{adj } R^2$)均大于 0.9 且变异系数 CV 分别为 0.46%、1.33%、0.37%,说明方程模型具有高可信度。

模型一(总酚含量为响应值),自变量一次项中 X_1 与 X_2 显著($p < 0.01$, $F_{X1}=28.99$, $F_{X2}=371.24$), X_3 不显著($p=0.1669 > 0.05$, $F_{X3}=2.38$),平方项均在 $p < 0.01$ 水平上显著,则因素对总酚含量影响大小为:提取时间>料液比>提取温度。Gan 和 Latiff^[28]发现料液比对总酚得率有显著影响,但提取温度对总酚得率无显著贡献,该结论与本研究一致。模型二(总原花色素含量为响应值),一次项 X_1 与 X_2 在 $p < 0.05$ 水平上显著($F_{X1}=6.02$, $F_{X2}=5.81$), X_3 不显著($p=0.4015$, $F_{X3}=0.8$),平方项均显著($p < 0.01$),因素对总原花色素含量影响大小为:料液比>提取时间>提取温度。模型三(DPPH[·]清除能力为响应值),自变量一次项($p < 0.05$, $F_{X1}=59.05$, $F_{X2}=667.58$, $F_{X3}=8.95$)、二次项均显著($p < 0.01$),说明料液比、提取时间、提取温度对 DPPH[·]清除能力均有显著影响,且影响大小为:提取时间>料液比>提取温度。综上所述,料液比及提取时间对三响应值的影响显著,而提取温度对三响应值影响较小。

接上页

3	1:25(0)	2(+1)	60(+1)	182.67	223.03	222.26
4	1:25(0)	1(-1)	40(-1)	173.74	210.08	204.36
5	1:25(0)	1.5(0)	50(0)	192.84	238.84	236.90
6	1:25(0)	1(-1)	60(+1)	169.49	228.99	200.41
7	1:20(-1)	2(+1)	50(0)	183.07	216.09	213.90
8	1:25(0)	1.5(0)	50(0)	194.18	244.72	238.10
9	1:25(0)	1.5(0)	50(0)	193.95	243.39	238.29
10	1:30(+1)	1.5(0)	60(+1)	180.24	219.50	208.49
11	1:30(+1)	2(+1)	50(0)	179.71	223.75	206.85
12	1:30(+1)	1.5(0)	40(-1)	182.62	222.86	213.66
13	1:30(+1)	1(-1)	50(0)	173.23	216.81	204.19
14	1:20(-1)	1.5(0)	60(+1)	178.37	214.24	209.86
15	1:25(0)	2(+1)	40(-1)	181.63	231.28	213.02
16	1:20(-1)	1.5(0)	40(-1)	176.42	213.96	203.25
17	1:20(-1)	1(-1)	50(0)	165.26	217.80	188.86

表 2 通过 BB 实验设计分析实验结果所得二次多项式方程及统计参数

Table 2 A second-order polynomial equation and statistical parameters calculated after implementation of BB design							
	二次多项式方程	R^2	adj R^2	变异系数 CV	p	失拟项	F 值
Y_1	$+193.65+1.58X_1+5.67X_2-0.45X_3-2.83X_1X_2-1.09X_1X_3+1.33X_2X_3-7.90X_1^2-10.43X_2^2-6.33X_3^2$	0.9963	0.9916	0.46%	<0.0001 **	0.0864	210.13
Y_2	$+242.67+2.60X_1+2.56X_2+0.95X_3+2.16X_1X_2-0.91X_1X_3-6.79X_2X_3-14.88X_1^2-9.17X_2^2-10.15X_3^2$	0.9725	0.9371	1.33%	0.0001 **	0.1677	27.48
Y_3	$+237.93+2.16X_1+7.27X_2+0.84X_3-5.60X_1X_2-2.95X_1X_3+3.30X_2X_3-17.84X_1^2-16.64X_2^2-11.28X_3^2$	0.9989	0.9975	0.37%	<0.0001 **	0.1954	709.97

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

2.2.2 响应面交互作用分析

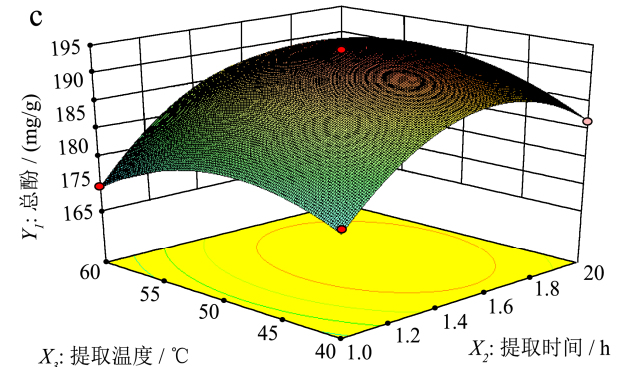
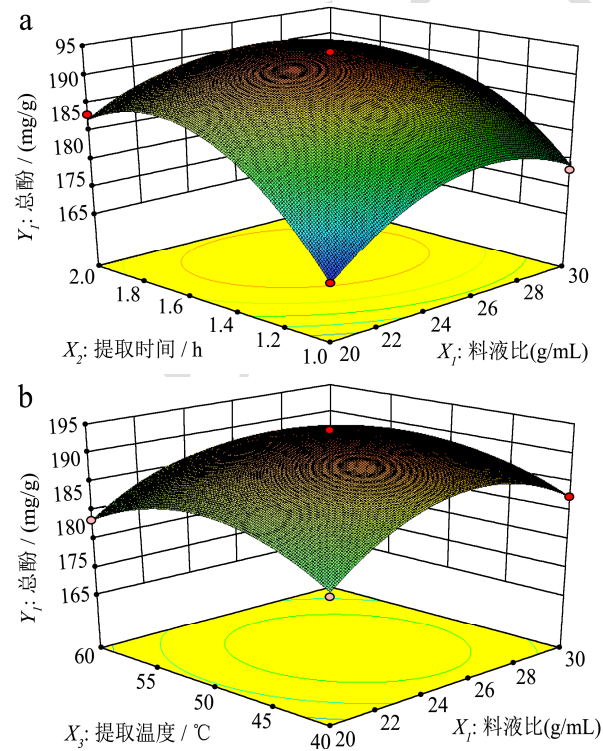


图 6 料液比、提取时间、提取温度三因素交互作用对总酚含量的响应面图

Fig.6 Response surface plot of the interaction effects of solid to liquid ratio, extraction time and extraction temperature on TPC

模型一（总酚）中，由统计结果可知，交互项 X_1X_2 在 $p<0.01$ 水平上显著， X_1X_3 、 X_2X_3 在 $p<0.05$ 水平上显著。同样，如图 6 所示，3D 响应曲面图中曲面坡度均较陡且等高线均呈椭圆形，表明三因素两两交互作用对总酚含量影响显著。图 6a 显示当提取温度恒定

(50 ℃), 料液比与提取时间的相互作用对总酚含量的影响: 两因素分别取最小值 (1:20 g/mL, 1 h) 时总酚含量为曲面最低值 (165.26 mg/g); 总酚含量随料液比及提取时间增加而增加, 当 X_1X_2 分别达到 1:25 g/mL 及 1.5 h 时, 总酚含量为曲面最高 (194.18 mg/g); 当料液比及提取时间超过最适值并继续增加, 总酚含量开始降低。该结果与 Rodrigues 和 Gas^[29] 结果类似。

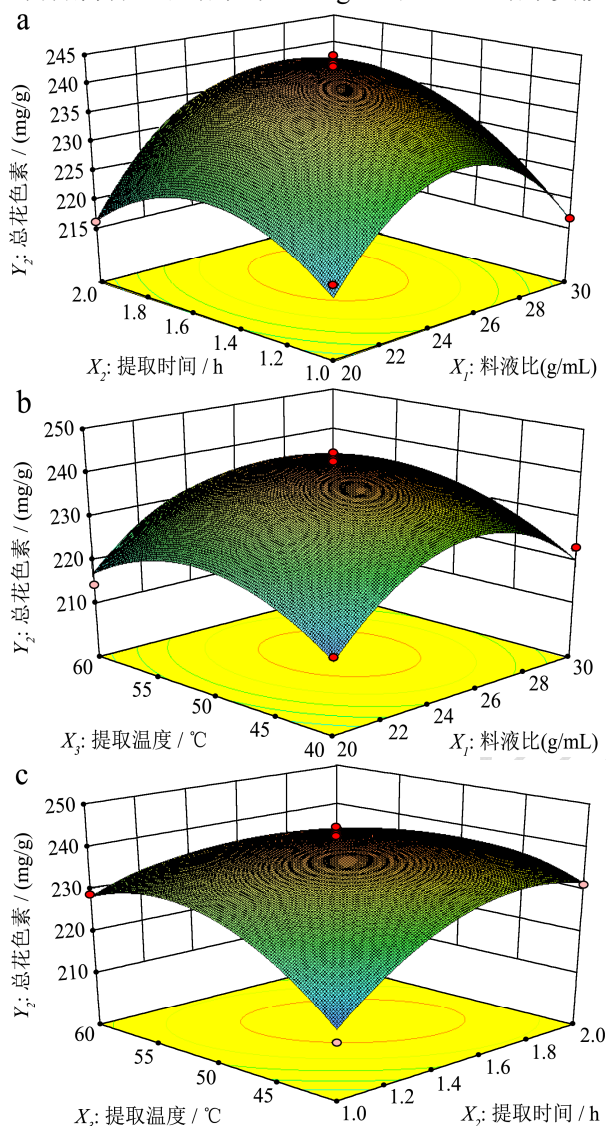


图7 料液比、提取时间、提取温度三因素交互作用对总原花色素含量的响应面图

Fig.7 Response surface plot of the interaction effects of solid to liquid ratio, extraction time and extraction temperature on total proanthocyanidin content

模型二 (总原花色素) 中, 自变量交互作用以 3D 响应曲面图 (图 7) 表示, 其中交互项 X_2X_3 在 $p<0.01$ 水平上显著, X_1X_3 、 X_1X_2 项不显著, 表明仅提取时间与提取温度交互作用显著。料液比恒定 (1:25 g/mL), 提取温度和提取时间交互作用如图 7c 所示。当提取温度为 40 ℃ 时, 提取时间增加至 1.75 h 时, 提取率有最

大值; 当温度为 60 ℃ 时, 为使提取率最高, 提取时间缩短为 1.38 h。这是由于提取温度升高有助于增加提取速率, 同时减少提取所需时间^[30]。

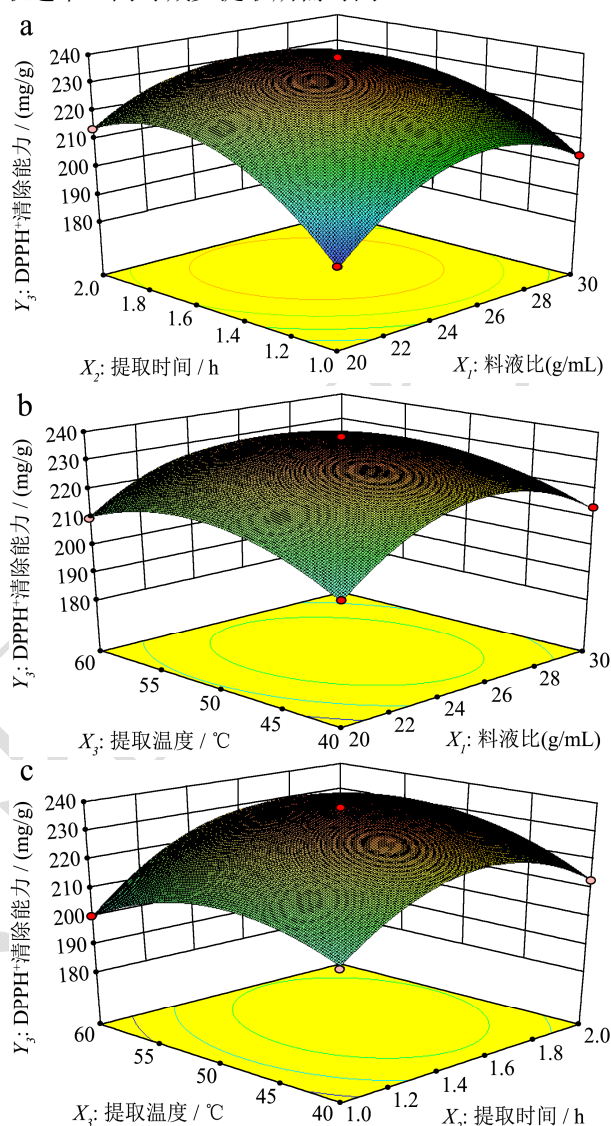


图8 料液比、提取时间、提取温度三因素交互作用对 DPPH⁺清除能力的响应面图

Fig.8 Response surface plot of the interaction effects of solid to liquid ratio, extraction time and extraction temperature on DPPH⁺ scavenging capacity

模型三 (DPPH⁺) 中, 统计分析表明三因素交互作用均极显著 ($p<0.01$), 其三维响应面如图 8 所示。 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 曲面坡度较陡, 且等高线为椭圆形。则料液比、提取时间、提取温度三因素两两交互作用对 DPPH⁺清除能力影响极显著。由于 DPPH⁺清除能力与果蔬中多酚含量高度相关, 因而提取条件对 DPPH⁺清除能力的影响与提取条件对总酚含量影响有相似性, 且提取物 DPPH⁺清除能力更易受到提取条件变化的影响。提取时间恒定 (1.5 h) 时, 提取温度与料液比交互作用如图 8b 所示, 当料液比及提取温

度分别增加至 1:25 g/mL 及 50 °C 时, DPPH^{·+}清除能力达到曲面最大值, 当两因素均高于最适值时, DPPH^{·+}清除能力下降。

2.2.3 提取优化条件确定及验证

综合优化总酚、总原花色素、DPPH^{·+}清除能力, 得到最优提取条件为: 料液比 1:25.49 g/mL, 提取时间 1.58 h, 提取温度 49.90 °C, 响应值预测结果分别为: 总酚 194.31 mg GAE/g DW, 总原花色素 242.99 mg CE/g DW, DPPH^{·+}清除能力 238.60 mg AAE/g DW, 结果可信度为 98.3%。为验证响应面模型的可行性, 考虑到实际生产的可操作性, 最优提取条件调整如下: 料液比 1:25.5 g/mL, 提取时间 1.6 h, 提取温度 50 °C。进行三次重复提取测定, 得到实际响应值分别为 194.54±3.63 mg GAE/g DW, 243.15±2.88 mg CE/g DW, 238.53±3.07 mg AAE/g DW, 与预测值相符, 证明本研究中响应面模型建立有效。

2.3 莲子皮渣植物化学素含量及体外抗氧化活性评价

2.3.1 植物化学素含量及体外抗氧化活性

在 2.2.3 所得最优提取工艺下, 对三品种莲子皮渣分别进行提取测定, 得到结果如表 3 所示。莲子皮渣中富含多种生物活性物质, 其中里叶白莲莲子皮渣中

总酚、总黄酮、总原花色素、总三萜含量均为最高 ($p<0.05$)。本文中莲子皮渣原花色素含量约为 136.88~246.35 mg CE/g DW, 而葡萄籽超微粉中原花色素含量为 70.7 mg CE/g DW^[31], 莲房原花色素含量为葡萄籽原花色素含量的 106.22%^[32], 由此可知莲子皮渣原花色素含量丰富。本研究测得莲子皮渣总三萜含量约为 83.10~174.92 mg UAE/g DW, 目前关于灵芝中三萜物质研究较多, 其含量约为 90.7 mg UAE/g DW^[33], 可见莲子皮渣中三萜类物质含量丰富, 若对莲子皮渣中三萜物质进行提取优化, 可进一步提高提取物中总三萜含量。

由于使用单一方法进行抗氧化活性评价, 方法本身的特殊性及其局限性会导致可能无法测出样品中所有物质的抗氧化性^[34], 因此本实验采用多种测定方法对莲子皮渣提取物体外抗氧化活性进行综合评价。DPPH、ABTS 自由基清除实验及 FRAP 总抗氧化能力常结合用于样品的体外抗氧化能力评价^[35]。由表 3 可知, 三种抗氧化活性评价结果表明, 莲子皮渣具有较高的体外抗氧化活性, 其中里叶白莲莲子皮渣提取物抗氧化活性最高, 而十里荷花及建莲莲子皮渣提取物抗氧化活性相近, 仅在 ABTS^{·+}清除能力上有所不同。说明 ABTS^{·+}清除能力试验灵敏度略高于 DPPH^{·+}清除能力试验及 FRAP 总还原能力实验, 该结论与 Surveswaran 等^[36]结论类似。

表 3 莲子皮渣中植物化学素含量及体外抗氧化活性

项目	十里荷花	建莲	里叶白莲
总酚	112.05±0.79 ^b	105.64±2.27 ^c	194.54±3.63 ^a
总黄酮	40.59±0.98 ^b	41.30±1.03 ^b	78.72±2.16 ^a
总原花色素	137.09±1.37 ^b	136.88±1.79 ^b	243.15±2.88 ^a
总三萜	85.48±3.64 ^b	83.10±3.15 ^b	174.92±4.83 ^a
DPPH ^{·+} 清除能力	117.68±3.23 ^b	117.88±2.19 ^b	238.53±3.07 ^a
FRAP 总还原能力	119.03±2.65 ^b	118.98±2.90 ^b	223.85±4.73 ^a
ABTS ^{·+} 清除能力	3661.97±33.84 ^b	3545.39±46.90 ^c	7973.18±64.20 ^a

注: 同一行中不同字母表明数据间具有显著差异 ($p<0.05$); 总酚 mg GAE/g DW; 总黄酮/总原花色素 mg CE/g DW; DPPH^{·+}/FRAP/ABTS^{·+} mg AAE/g DW; 总三萜 mg UAE/g DW (提取方法见 1.3.3.4)。

表 4 莲子皮渣植物化学素含量与抗氧化活性间相关性分析

Table 4 The correlation analysis between phytochemical content and antioxidant activities in lotus seed epicarp residue extract

项目	总酚	总黄酮	总原花色素	DPPH ^{·+}	FRAP	ABTS ^{·+}
总酚	1					
总黄酮	0.994**	1				
总原花色素	0.996**	0.998**	1			
DPPH ^{·+}	0.992**	0.996**	0.998**	1		
FRAP	0.997**	0.996**	0.997**	0.995**	1	
ABTS ^{·+}	0.997**	0.997**	0.999**	0.997**	0.997**	1

2.3.2 相关性分析

采用皮尔森(Pearson)相关系数进行统计分析,总酚、总黄酮、总原花色素含量与DPPH⁺、FRAP、ABTS⁺抗氧化值两两之间的相关性分析结果如表4所示。由此可知,所有结果均在 $p<0.01$ 水平上显著,表明三种抗氧化活性方法测定值之间均具有高度相关性。同时莲子皮渣中的植物化学素(总酚、总黄酮、总原花色素)含量与三种抗氧化值两两之间均高度相关,说明多酚、黄酮、原花色素均为莲子皮渣中主要抗氧化活性物质,具有较强自由基清除能力。

3 结论

本文首先通过单因素实验确定溶剂为70%丙酮,并确定待优化的因素及因素水平,再根据响应面BB设计,以总酚、总原花色素、DPPH⁺清除能力为响应值,对料液比、提取温度、提取时间进行优化,其回归模型均可有效预测实验结果。最优提取工艺为:料液比1:25.5 g/mL,提取时间1.6 h,提取温度50℃,优化后莲子皮渣提取物总酚含量、总原花色素含量及DPPH⁺清除能力分别提高到优化前的2.89倍、2.58倍及2.95倍(以单因素实验中丙酮提取结果为参考)。在最优提取条件下,对三品种莲莲子皮渣样品进行植物化学素含量及抗氧化活性测定。实验结果表明,三品种莲莲子皮渣均富含多酚、类黄酮、原花色素及三萜类活性物质,其中里叶白莲莲子皮渣植物化学素含量最高,且具有最高的体外抗氧化活性。实验结果证明莲子皮渣是理想的生物活性物质来源和抗氧化剂来源,然而目前对于莲子皮渣的开发利用极为匮乏,本文为莲子皮渣的生物活性成分挖掘和开发综合利用提供了参考思路和方法。

参考文献

- [1] 刘鑫,曲玮,梁敬钰.莲的药用研究进展[J].海峡药学,2010,22(3):1-5
LIU Xin, QU Wei, LIANG Jing-yu. Research progress of *Nelumbo nucifera* Gaertn [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 22(3): 1-5
- [2] 赵小亮,章军,马小军,等.莲不同药用部位化学成分研究综述[J].中国中医药信息杂志,2012,19(1):106-109
ZHAO Xiao-liang, ZHANG Jun, MA Xiao-jun, et al. Review on chemical constituents of different medicinal parts of *Nelumbo nucifera* Gaertn [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2012, 19(1): 106-109
- [3] Yen G C, Duh P D, Su H J. Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 379-385
- [4] Zeng, Wei - cai, Jia, et al. Antibrowning and antimicrobial activities of the water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara* [C]// Lc/ms/ms Workshop on Environmental Applications and Food Safety. 2011: 274 - 275
- [5] 李绮丽.莲子皮低聚原花青素分级分离、组分鉴定与抗氧化机理研究[D].长沙:湖南农业大学,2013
LI Qi-li. Studies on isolation, identification and antioxidant activity of oligomeric proanthocyanidins from lotus seed peel [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013
- [6] Liu Y, Ma S S, Ibrahim S A, et al. Identification and antioxidant properties of polyphenols in lotus seed epicarp at different ripening stages [J]. Food Chemistry, 2015, 185: 159-164
- [7] Kredy H M, Huang D, Xie B, et al. Flavonols of lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) seed epicarp and their antioxidant potential [J]. European Food Research & Technology, 2010, 231(3): 387-394
- [8] 周德龙,高建华,杨祎静,等.莲子壳营养成分分析及类黄酮抗氧化活性研究[J].安徽农业科学,2011,39(7):3968-3970
ZHOU De-long, GAO Jian-hua, YANG Yi-jing, et al. Analysis on the nutrient component of lotus seed shell and study on the antioxidant activity of flavonoid [J]. Journal of Anhui Agriculture and Science, 2011, 39(7): 3968-3970
- [9] Qi S, Zhou D. Lotus seed epicarp extract as potential antioxidant and anti-obesity additive in Chinese Cantonese sausage [J]. Meat Science, 2013, 93(2): 257-262
- [10] 周密,段玉清,王文兵,等.莲原花青素抗黑色素瘤的研究[J].食品科学,2009,30(11):223-226
ZHOU Mi, DUAN Yu-qing, WANG Wen-bing, et al. *In vivo* and *in vitro* inhibitory activities of proanthocyanidins from lotus seedpod (LSPC) and lotus seed hulls (LSHPC) against melanoma B16 in mice [J]. Food Science, 2009, 30(11): 223-226
- [11] Gutfinger T. Polyphenols in olive oils [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1981, 58(11): 966-968
- [12] Jia Z, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals [J]. Food Chemistry, 1999, 64(4): 555-559
- [13] Muchuweti M, Ndhlala A R, Kasiyamhuru A. Estimation of the degree of polymerization of proanthocyanidins of some wild fruits of Zimbabwe (*Uapaca kirkiana* and *Ziziphys mauritiana*) using the modified vanillin-HCl method [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2005, 85(10): 1647-1650

- [14] 曾芳芳.刺梨果实主要植物化学素及生物活性研究[D].杭州:浙江大学,2017
ZENG Fang-fang. Studies on principal phytochemical composition and biological activity of cili fruit [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017
- [15] Ni Q, Xu G, Wang Z, et al. Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo sasa argenteostriatus leaves [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(2): 2249-2262
- [16] Brandwilliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. Lwt Food Sci Technol, 1995, 28(1): 25-30
- [17] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76
- [18] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [19] Markom M, Hasan M, Daud W R W, et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri*Linn: Effects of solvents and extraction methods [J]. Separation & Purification Technology, 2007, 52(3): 487-496
- [20] 李超,王卫东.原花青素提取方法的研究进展[J].粮油加工,2009,9:145-148
LI Chao, WANG Wei-dong. The research progress of extraction methodology of proanthocyanidin [J]. Cereal and Oil Processing, 2009, 9: 145-148
- [21] 熊何健,陈益梅,吴国宏,等.葡萄籽多酚提取条件的优化[J].食品工业科技,2004,4:40
XIONG He-jian, CHEN Yi-mei, WU Guo-hong, et al. Extraction optimization of polyphenols from grape seed [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 4: 40
- [22] Şahin S, Samlı R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 595-602
- [23] Liu Y, Wei S, Liao M. Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology [J]. Industrial Crops & Products, 2013, 49(4): 837-843
- [24] Razak M, Yong P, Shah Z, et al. The effects of varying solvent polarity on extraction yield of *Orthosiphon stamineus* leaves [J]. Journal of Applied Sciences, 2012, 12: 1207-1210
- [25] Ju Z Y, Howard L R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(18): 5207-5213
- [26] Durling N E, Catchpole O J, Grey J B, et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1417-1424
- [27] Hossain M B, Brunton N P, Patras A, et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(3): 582-590
- [28] Gan C Y, Latiff A A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2011, 124(3): 1277-1283
- [29] Rodrigues S, Gas P. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(3): 869-872
- [30] Cacace J E, Mazza G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(21): 5939
- [31] 肖付才.葡萄籽原花青素检测方法的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2007
XIAO Fu-cai. Research on determination methods of proanthocyanidin from grape seed [D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2007
- [32] Wu Q, Chen H, Lv Z, et al. Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 1493-1502
- [33] 侯敏娜,刘剑.灵芝三萜的提取分离及总三萜的含量测定[J].现代中药研究与实践,2010,24(5)
HOU Min-na, LIU Jian. *Ganoderma triterpenoids* extraction and determination of the total triterpenoid [J]. Research & Practice on Chinese Medicines, 2010, 24(5)
- [34] R L P, Xianli Wu A, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4290-4302
- [35] Shukla S, Park J, Kim D H, et al. Total phenolic content, antioxidant, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities of water soluble extracts of noble starter culture Doenjang, a Korean fermented soybean sauce variety [J]. Food Control, 2016, 59: 854-861

现代食品科技