

新疆酸李多酚类物质的提取纯化工艺优化 及抗氧化活性分析

阿依加·马里克¹ 萨拉麦提·艾迪热斯^{2,3} 塔吉古丽·阿不里克木^{4,5}
阿塔吾拉·铁木尔^{2,3} 古丽菲热·伊力哈木^{2,3} 尼格尔热依·亚迪卡尔¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆维吾尔自治区农业科学院农产品加工研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091; 3. 新疆农产品加工与保鲜重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091; 4. 新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 5. 新疆特殊环境物种保护与调控生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: [目的]以新疆酸李果实为原料,探究多酚类物质制备工艺优化及其抗氧化活性。[方法]通过单因素和响应面 Box-Behnken 试验优化超声辅助复合酶法提取新疆酸李多酚类物质的最佳制备工艺条件。采用大孔树脂对新疆酸李多酚进行富集纯化,并考察纯化前后新疆酸李多酚的 DPPH 自由基、ABTS⁺ 自由基清除能力以及总抗氧化能力。[结果]超声辅助复合酶法最佳提取工艺为果胶酶与纤维素酶质量比 1:2,酶添加量 1.5%、料液比 1:29 (g/mL)、超声时间 37 min、超声温度 60 ℃,得到最佳多酚提取率 (12.82±0.43) mg/g。经过静态吸附—解吸筛选出 HPD-300 为最优纯化树脂,其吸附达到平衡需要 2 h、解吸达到平衡需要 0.5 h;HPD-300 大孔吸附树脂纯化新疆酸李多酚的最佳工艺条件为上样质量浓度 100 mg/mL、上样液体积 180 mL、吸附速率 120 mL/h、洗脱剂 (乙醇) 体积分数 60%,洗脱剂用量 210 mL;经 HPD-300 大孔吸附树脂纯化后新疆酸李多酚对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值是纯化前的 43.16 倍和 16.00 倍,总抗氧化能力也显著提高。[结论]超声辅助复合酶法结合 HPD-300 大孔吸附树脂纯化可以有效地实现新疆酸李多酚的高效富集和提纯,并能显著提高新疆酸李多酚的抗氧化活性。

关键词: 新疆酸李; 多酚; 超声辅助; 复合酶法; 纯化; 抗氧化活性

Optimization of extraction and purification process of polyphenols from *Prunus cerasifera* Ehrhart and analysis of their antioxidant activity

AYIJIA·Malike¹ SALAMET·Adirs^{2,3} TAJIGULI·Abulikemu^{4,5} ATAWULA·Tiemuer^{2,3}
GULFIRA Ylham^{2,3} NIGEREYI·Yadikaer¹

(1. School of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China; 2. Institute of Agro-products Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Processing and Preservation of Agricultural Products, Urumqi, Xinjiang 830091, China; 4. School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 5. Xinjiang Key Laboratory of Species Conservation and Regulatory Biology, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

基金项目: 新疆农业科学院农业科技创新稳定支持专项 (编号: xjnywdzc-2023003-2-7, xjnywdzc-2024003-38); 新疆维吾尔自治区“天池英才”引进计划——青年博士计划 (编号: 2021); 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项 (上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划) (编号: 2022E01023)

通信作者: 尼格尔热依·亚迪卡尔 (1987—), 女, 新疆农业大学副教授, 博士。E-mail: nigary-sy@xjau.edu.cn

收稿日期: 2024-10-17 **改回日期:** 2025-05-27

引用格式: 阿依加·马里克, 萨拉麦提·艾迪热斯, 塔吉古丽·阿不里克木, 等. 新疆酸李多酚类物质的提取纯化工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2025, 41(9): 169-178.

Citation: AYIJIA·Malike, SALAMET·Adirs, TAJIGULI·Abulikemu, et al. Optimization of extraction and purification process of polyphenols from *Prunus cerasifera* Ehrhart and analysis of their antioxidant activity[J]. Food & Machinery, 2025, 41(9): 169-178.

Abstract: [Objective] Using the fruits of *Prunus cerasifera* as raw materials, this study aimed to optimize the preparation process of polyphenols and evaluate their antioxidant activity. **[Methods]** The optimal extraction conditions for polyphenols from *P. cerasifera* were determined using ultrasound-assisted compound enzyme extraction, optimized through single-factor experiments and a Box-Behnken response surface design. Macroporous adsorption resin was employed for the enrichment and purification of the polyphenols. The DPPH radical scavenging ability, ABTS⁺ radical scavenging ability, and total antioxidant capacity of the polyphenols before and after purification were evaluated. **[Results]** The optimal extraction conditions were as follows: pectinase to cellulase mass ratio of 1:2, enzyme addition of 1.5%, solid-liquid ratio of 1:29 (g/mL), ultrasonic time of 37 min, and ultrasonic temperature of 60 °C, resulting in a maximum polyphenol yield of (12.82±0.43) mg/g. HPD-300 was identified as the optimal purification resin through static adsorption-desorption screening, with adsorption equilibrium reached in 2 hours and desorption equilibrium in 0.5 hours. The optimal purification parameters using HPD-300 resin were as follows: sample concentration 100 mg/mL, sample volume 180 mL, flow rate 120 mL/h, ethanol concentration 60%, and eluent volume 210 mL. After purification with HPD-300, the IC₅₀ values of the polyphenols for DPPH and ABTS⁺ radicals were 43.16 times and 16.00 times higher than those before purification, respectively, and the total antioxidant capacity was significantly enhanced. **[Conclusion]** The combination of ultrasound-assisted compound enzyme extraction and purification using HPD-300 macroporous adsorption resin enables efficient enrichment and purification of polyphenols from *P. cerasifera*, and significantly improves their antioxidant activity.

Keywords: *Prunus cerasifera* Ehrhart.; polyphenols; ultrasound assistance; compound enzyme method; purification; antioxidant activity

新疆酸李(*Prunus cerasifera* Ehrhart.), 俗名樱李、红叶晚李、矮樱、新疆野櫻桃李, 为蔷薇科李属植物的果实, 主产于中国新疆的南疆地区, 品种繁多且有着丰富的遗传多样性^[1]。新疆酸李气味轻微, 味道酸甜, 营养价值高, 果实中富含维生素、氨基酸、蛋白质、糖类、有机酸等有机营养成分^[2-3], 富含 Ca、Mg、Fe、Zn、Se、Mn 等矿物元素以及酚类、黄酮类等植物化学物质^[4-5], 同时还含有较为丰富的天然色素^[6], 具有抗氧化^[7]、抗炎^[5]、抗菌^[8]、治疗便秘^[9]、解毒^[10]、治疗伤口^[11]、降脂^[12]和降糖^[13]等药效作用。因缺少系统的基础研究, 制约了新疆酸李高值化健康保健食品的发展, 目前主要被加工成干果、果酱、饮料等产品。

多酚类化合物被认为是健康有益且强有力的生物活性剂^[14]。目前, 从植物资源中获取多酚类化合物的方法有有机溶剂提取法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法和超临界萃取法等^[15]。超声辅助提取具有操作简便、效率高及时间短、易与其他技术相结合等优点。将超声波与复合酶联用, 既可缩短时间, 提高效率, 又能保证其安全性, 满足天然抗氧化剂无毒无害的要求。此外, 酶反应条件温和, 特异性强, 目前尚未见超声辅助复合酶法应用于新疆酸李多酚提取的相关报道。

研究拟以新疆酸李成熟果实为原料, 利用单因素试验和响应面 Box-Behnken 试验优化酸李多酚类物质的分离纯化工艺, 并通过体外试验研究其抗氧化活性, 旨在为新疆酸李后续的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新疆酸李成熟果实: 2023 年 8 月份采集于新疆伊犁地区, 新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所;

没食子酸、磷钼钨酸: 分析纯, 上海源叶生物科技有限公司;

果胶酶: 5 万 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司;

纤维素酶: 50 U/mg, 上海源叶生物科技有限公司;

HPD-100、HPD-300、HPD-450、HPD-600、HPD-700、D101 大孔树脂: 上海源叶生物科技有限公司;

2,2'-联苯基-1-苦基肼基(DPPH): 分析纯, 北京酷来搏科技有限公司;

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS): 分析纯, 美国 Sigma 公司;

总抗氧化能力试剂盒: 南京建成生物工程研究所;

大孔树脂(AB-8): 陕西博晖生化科技有限公司;

大孔树脂(NKA-9): 蚌埠市辽源新材料有限公司。

1.2 主要仪器与设备

超声波清洗机: KQ5200DE 型, 昆山市超声仪器有限公司;

新世纪分光光度计: T6 型, 北京普析通用仪器有限公司;

酶标仪: SYNERGY-H1 型, 美国伯腾仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 试验材料预处理 将新疆酸李清洗干净, 去核, 于 50 °C 下干燥至恒重, 冷却至室温后研磨成粉, 置于干燥器保存备用。

1.3.2 多酚提取率测定 采用磷钼钨酸法^[16]对多酚含量进行检测。以没食子酸作为标准品用于绘制标准曲线, 得到回归方程为 $y=0.099\ 6x+0.049\ 6$, 相关系数 $R^2=0.996\ 5$ 。

新疆酸李的多酚提取率以每克酸李中含有的没食子酸当量表示, 具体的计算公式如式(1)所示。

$$Q = \frac{C \times V \times N}{m \times 1\ 000}, \quad (1)$$

式中:

Q ——多酚提取率, mg/g;

C ——没食子酸当量质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

V ——定容后体积, mL;

N ——稀释倍数;

m ——样品质量, g。

1.3.3 单因素试验

(1) 果胶酶与纤维素酶质量比:称取新疆酸李粉末 1 g, 分别加入果胶酶与纤维素酶质量比为 2:1, 1:1, 2:3, 1:2, 1:3 的 1.2% 复合酶, 再加入 60% 的乙醇使最终的料液比达到 1:30 (g/mL), 50 °C 超声处理 30 min, 测定上清液中新疆酸李多酚的质量浓度并计算提取率。

(2) 酶添加量:称取新疆酸李粉末 1 g, 分别加入 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0% 果胶酶与纤维素酶(质量比 1:2)的复合酶, 再加入 60% 的乙醇使最终料液比达到 1:30 (g/mL), 50 °C 超声处理 30 min, 测定上清液中新疆酸李多酚的质量浓度并计算提取率。

(3) 料液比:称取新疆酸李粉末 1 g, 加入 1.2% 果胶酶与纤维素酶(质量比 1:2)的复合酶, 分别加入料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60 (g/mL) 的 60% 乙醇, 50 °C 超声处理 30 min, 测定上清液中新疆酸李多酚的质量浓度并计算提取率。

(4) 超声时间:称取新疆酸李粉末 1 g, 加入 1.2% 果胶酶与纤维素酶(质量比 1:2)的复合酶, 再加入 60% 的乙醇使最终料液比达到 1:30 (g/mL), 50 °C 分别超声处理 20, 30, 40, 50, 60, 70 min, 测定上清液中新疆酸李多酚的质量浓度并计算提取率。

(5) 超声温度:称取新疆酸李粉末 1 g, 加入 1.2% 果胶酶与纤维素酶(质量比 1:2)的复合酶, 再加入 60% 的乙醇使最终料液比达到 1:30 (g/mL), 分别于 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C 下超声处理 30 min, 测定上清液中新疆酸李多酚的质量浓度并计算提取率。

1.3.4 响应面试验方案设计 在单因素试验方差分析的基础上, 选择酶添加量、料液比、超声时间和超声温度 4 个对多酚提取影响较大的因素, 以多酚提取率为响应值, 使用 Design Expert 13.0 软件设计四因素三水平的响应面设计(BBD)来优化提取工艺条件。

1.3.5 DPPH 自由基清除能力测定 参照 Salameet 等^[17]的方法并进行适当调整。分别从不同浓度的样品中各取 100 μ L, 将其与 100 μ L 浓度为 0.2 mmol/L DPPH 溶液一同放入 96 孔板中混匀, 于黑暗环境下静置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处吸光度。按式(2)计算 DPPH 自由基清除率。

$$R = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0} \right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——自由基清除率, %;

A_s ——反应液与样品混合后的吸光度;

A_c ——乙醇溶液与样品混合后的吸光度;

A_0 ——反应液与乙醇溶液混合后的吸光度。

1.3.6 ABTS⁺自由基清除能力测定 参照 Salameet 等^[17]的方法并进行适当调整。分别从不同浓度的样品中取 20 μ L, 将其与 180 μ L 的 ABTS⁺工作液一同放入 96 孔板中混匀, 于黑暗环境下静置 30 min, 用酶标仪测定 734 nm

处吸光度。按式(2)计算 ABTS⁺自由基清除率。

1.3.7 总抗氧化能力测定 采用总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒。

1.3.8 大孔吸附树脂的筛选 根据优化的提取工艺对新疆酸李多酚进行提取, 过滤, 合并滤液, 再用旋转蒸发仪挥去乙醇浓缩提取液至多酚质量浓度为 100 mg/mL, 放入 4 °C 冰箱保存备用。用 95% 乙醇将 8 种大孔吸附树脂 (HPD-100、HPD-300、HPD-450、HPD-600、HPD-700、AB-8、D101、NKA-9) 浸泡 24 h 后用蒸馏水洗至无醇味。取 1 g 经过处理的 8 种大孔树脂, 分别置于 8 个锥形瓶中, 每个锥形瓶加入 20 mL 的新疆酸李多酚提取液。将锥形瓶置于摇床(设定转速为 120 r/min、温度为 25 °C)上吸附 12 h 后过滤, 并测定滤液中的多酚质量浓度。大孔树脂用清水冲洗除杂, 抽干, 加入 20 mL 体积分数为 60% 的乙醇, 在摇床转速 120 r/min、温度 25 °C 条件下解吸 24 h, 过滤, 并测定滤液中多酚质量浓度。分别按式(3)~式(6)计算大孔树脂的吸附量、解吸量、吸附率和解吸率。

$$A_c = \frac{(C_0 - C_1) \times V_1}{m}, \quad (3)$$

$$A_R = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%, \quad (4)$$

$$A_Q = \frac{C_2 \times V_2}{m}, \quad (5)$$

$$R_F = \frac{C_2 \times V_2}{(C_0 - C_1) \times V_1} \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

A_c ——吸附量, mg/g;

A_R ——吸附率, %;

A_Q ——解吸量, mg/g;

R_F ——解吸率, %;

C_0 ——新疆酸李多酚在吸附之前的质量浓度, mg/mL;

C_1 ——新疆酸李多酚在吸附之后的质量浓度, mg/mL;

V_1 ——吸附过程中所用吸附液体积, mL;

m ——大孔树脂质量, g;

C_2 ——新疆酸李多酚在解吸之后的质量浓度, mg/mL;

V_2 ——解吸过程中所用解吸液体积, mL。

1.3.9 静态吸附与解吸纯化条件研究 称取 1 g 经过上述试验筛选出来的大孔树脂, 分别放置在 50 mL 离心管里, 并加入质量浓度为 100 mg/mL 的新疆酸李多酚提取液 20 mL, 将其放置在摇床上, 设定转速为 120 r/min、温度为 25 °C, 在此条件下进行吸附试验, 分别于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 h 时取样, 并且开展 3 次平行试验, 对吸附液的多酚质量浓度进行测定, 进而绘制出静态吸附曲线。用清水冲洗吸附新疆酸李多酚提取液后的大孔树脂 3 次, 再加入 20 mL 体积分数为 60% 的乙醇进行洗脱, 分别于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 h 时取样, 并且开展 3 次平行试验, 对解吸液的多酚质量浓度进行测定, 进而绘制出静态解吸曲线。

1.3.10 动态吸附与解吸纯化条件研究 根据大孔吸附

树脂筛选结果,进一步考察纯化时所需的上样质量浓度(25, 50, 75, 100, 125, 150 mg/mL)、上样液体积(30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 mL)、吸附速率(30, 60, 90, 120, 150, 180 mL/h)、洗脱剂(乙醇)体积分数(10%, 30%, 60%, 80%, 95%)和洗脱剂用量(30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 mL)对新疆酸李多酚的纯化效果。并分别根据收集的流出液和洗脱液的吸附率和解吸率进行综合评分得到动态纯化过程中最佳的上样质量浓度、上样液体积、吸附速率和洗脱剂(乙醇)体积分数条件,通过饱和洗脱液浓度来确定最佳洗脱剂用量。最后得到的 5 个最佳动态纯化条件进行验证实验。

1.4 数据处理与分析

方差分析使用 SPSS 20.0 软件;对于响应面优化试验以及与之相关的数据统计工作,则借助 Design Expert 13.0 软件完成。绘图工作运用 OriginPro 2021 软件操作。

2 结果与分析

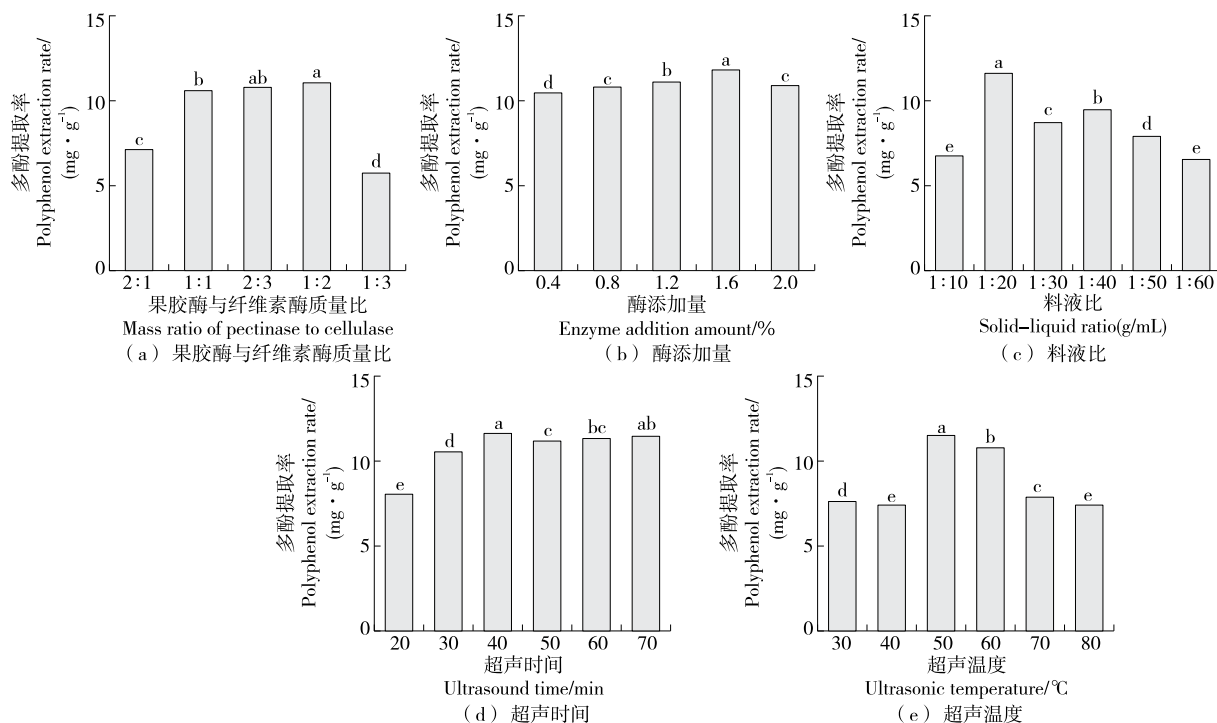
2.1 超声辅助复合酶法对新疆酸李多酚提取率的影响

由图 1(a)可知,随着复合酶中纤维素酶用量的不断增加,细胞壁的破裂速度加快,细胞内多酚类物质的释放速度也随之加快,当果胶酶与纤维素酶质量比为 1:2 时多酚提取率达到最高,持续升高果胶酶或纤维素酶的质量比例,多酚提取率显著下降($P < 0.05$)。因此,选取 1:2 作为提取新疆酸李多酚的最佳果胶酶与纤维素酶质量比。

由图 1(b)可知,多酚提取率在酶添加量为 1.6% 时达到最高值,为 11.92 mg/g,酶添加量增多时,提取率逐渐下降。这可能是由于底物浓度不变时,添加复合酶至一定值,会与底物达到饱和状态,再增加复合酶量将会抑制复合酶的酶解作用。因此,选取 1.6% 作为提取新疆酸李多酚的最佳酶添加量。由图 1(c)可知,随着溶剂的增加,新疆酸李多酚提取率呈先升后降的趋势,在料液比为 1:20 (g/mL) 时多酚提取率达到最高值,为 11.68 mg/g。因此,选择 1:20 (g/mL) 作为提取新疆酸李多酚的最佳料液比。由图 1(d)可知,新疆酸李多酚提取率在超声时间为 40 min 时达最高值,但随着超声时间的延长,多酚越不稳定,导致被氧化或分解,使多酚提取率降低。因此,选取 40 min 作为提取新疆酸李多酚的最佳超声时间。由图 1(e)可知,新疆酸李多酚含量随着超声温度的升高呈先升高后降低的趋势,而多酚提取率在超声温度为 50 °C 时达到最高值,为 11.55 mg/g。因此,对于新疆酸李多酚提取而言,50 °C 是最佳的超声温度。

2.2 响应曲面法优化新疆酸李多酚提取工艺

2.2.1 响应面优化试验设计及结果 参照单因素试验结果,借助 Design Expert 13.0 软件,针对酶添加量、料液比、超声时间和超声温度 4 个因素开展响应面优化试验设计,因素水平设计见表 1,试验结果见表 2。通过表 2 中的数据进行多元回归拟合,以多酚提取率为应变量,建立二次多项回归方程:



字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 1 各因素对新疆酸李多酚提取率的影响

Figure 1 Effect of various factors on the extraction rate of polyphenols from *Prunus cerasifera* in Xinjiang

$$Y=10.07-0.091\ 2A+1.42B-0.098\ 6C+0.443D+0.055\ 7AB-0.331\ 3AC-0.326\ 3AD-0.133\ 0BC-0.062\ 4BD-0.451\ 3CD-0.447\ 9A^2-0.418B^2-0.234\ 1C^2+0.712D^2。$$

(7)

由表3可知,模型 $F=27.15$, $P<0.000\ 1$ 影响显著。失拟项 $P=0.631\ 0(>0.05)$,表明方程的拟合程度较好。因此,利用该模型能够对试验结果进行预估。通过表3中的 F 值进行比较,酸李多酚提取率的各因素影响从大到小依次是:料液比>超声温度>超声时间>酶添加量。

表1 BBD设计因素与水平表

Table 1 BBD factors and levels

水平	A 酶添加量/%	B 料液比(g/mL)	C 超声时间/min	D 超声温度/℃
-1	1.2	1:10	30	40
0	1.6	1:20	40	50
1	2.0	1:30	50	60

表2 BBD试验设计及结果

Table 2 BBD experiment design and results

试验号	A	B	C	D	多酚提取率/(mg·g ⁻¹)
1	0	0	-1	-1	9.59
2	0	0	0	0	9.89
3	0	0	0	0	9.95
4	0	0	0	0	10.63
5	0	-1	1	0	7.92
6	-1	-1	0	0	7.86
7	-1	0	-1	0	8.74
8	0	0	0	0	10.05
9	-1	0	0	1	11.04
10	1	0	-1	0	9.95
11	1	0	0	1	10.55
12	0	1	0	1	12.10
13	0	-1	1	1	10.35
14	0	1	1	0	10.95
15	0	-1	0	-1	8.47
16	0	1	0	-1	11.61
17	1	1	0	0	10.41
18	-1	0	0	-1	9.73
19	0	-1	0	1	9.20
20	-1	1	0	0	10.47
21	0	0	1	-1	10.09
22	0	1	-1	0	10.92
23	0	0	0	0	9.82
24	0	0	-1	1	11.66
25	1	0	1	0	9.34
26	0	-1	-1	0	8.42
27	1	-1	0	0	7.58
28	-1	0	1	0	9.45
29	1	0	0	-1	10.55

表3 响应面结果方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance of response surface results

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	35.44	14	2.53	27.15	<0.000 1	**
A	0.10	1	0.10	1.07	0.318 5	
B	24.14	1	24.14	258.79	<0.000 1	**
C	0.12	1	0.12	1.25	0.282 2	
D	1.96	1	1.96	21.04	0.000 4	*
AB	0.01	1	0.01	0.13	0.720 7	
AC	0.44	1	0.44	4.71	0.047 7	*
AD	0.43	1	0.43	4.57	0.050 7	
BC	0.07	1	0.07	0.76	0.398 3	
BD	0.02	1	0.02	0.17	0.689 2	
CD	0.81	1	0.81	8.74	0.010 4	*
A ²	1.30	1	1.30	13.95	0.002 2	*
B ²	1.13	1	1.13	12.15	0.003 6	*
C ²	0.36	1	0.36	3.81	0.071 2	
D ²	3.29	1	3.29	35.26	<0.000 1	**
残差	1.31	14	0.09			
失拟项	0.88	10	0.09	0.83	0.631 0	
纯误差	0.42	4	0.11			
总离差	36.75	28				

[†] *表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$);

$$R^2=0.964\ 5, R^2_{Adj}=0.928\ 9。$$

2.2.2 响应面分析 4个因素两两交互的响应面图及等高线图,如图2所示。对新疆酸李多酚含量测定的交互项进行考察可知,酶添加量与超声时间的响应面较陡峭,等高线呈椭圆形,两者的交互作用较显著;同理,超声时间与超声温度的交互作用也较显著。这与表3中的方差分析结果一致,说明超声时间分别与酶添加量和超声温度间交互作用影响较大。

2.2.3 验证实验 根据 Design Expert 13.0 软件分析预测得到的最优提取工艺条件为:酶添加量 1.49%、料液比 1:28.58 (g/mL)、超声时间 36.47 min、超声温度 59.80 ℃,该条件下的预测值为 12.22 mg/g,考虑到实际操作是否便利及设备具体情况,将最优试验条件参数调整为:酶添加量 1.5%、料液比 1:29 (g/mL)、超声时间 37 min、超声温度 60 ℃,在该条件下进行 3 次平行验证实验,新疆酸李多酚实际提取率为(12.82±0.43) mg/g,与理论值相比,相差了 4.95%,说明该模型与实际拟合程度较好。该条件下多酚提取率与刘伟等^[18]的相近。通过超声辅助复合酶法提取新疆酸李多酚,可有效减少消耗,且提取时间短,作用条件温和,能够作为一种有效提取多酚的方法。

2.3 大孔吸附树脂筛选结果

选择不同极性的 8 种大孔树脂对新疆酸李多酚提取物进行了系统性的吸附和解吸能力检测,结果见表 4。

由表 4 可以看出,8 种大孔吸附树脂中,HPD-300 大孔

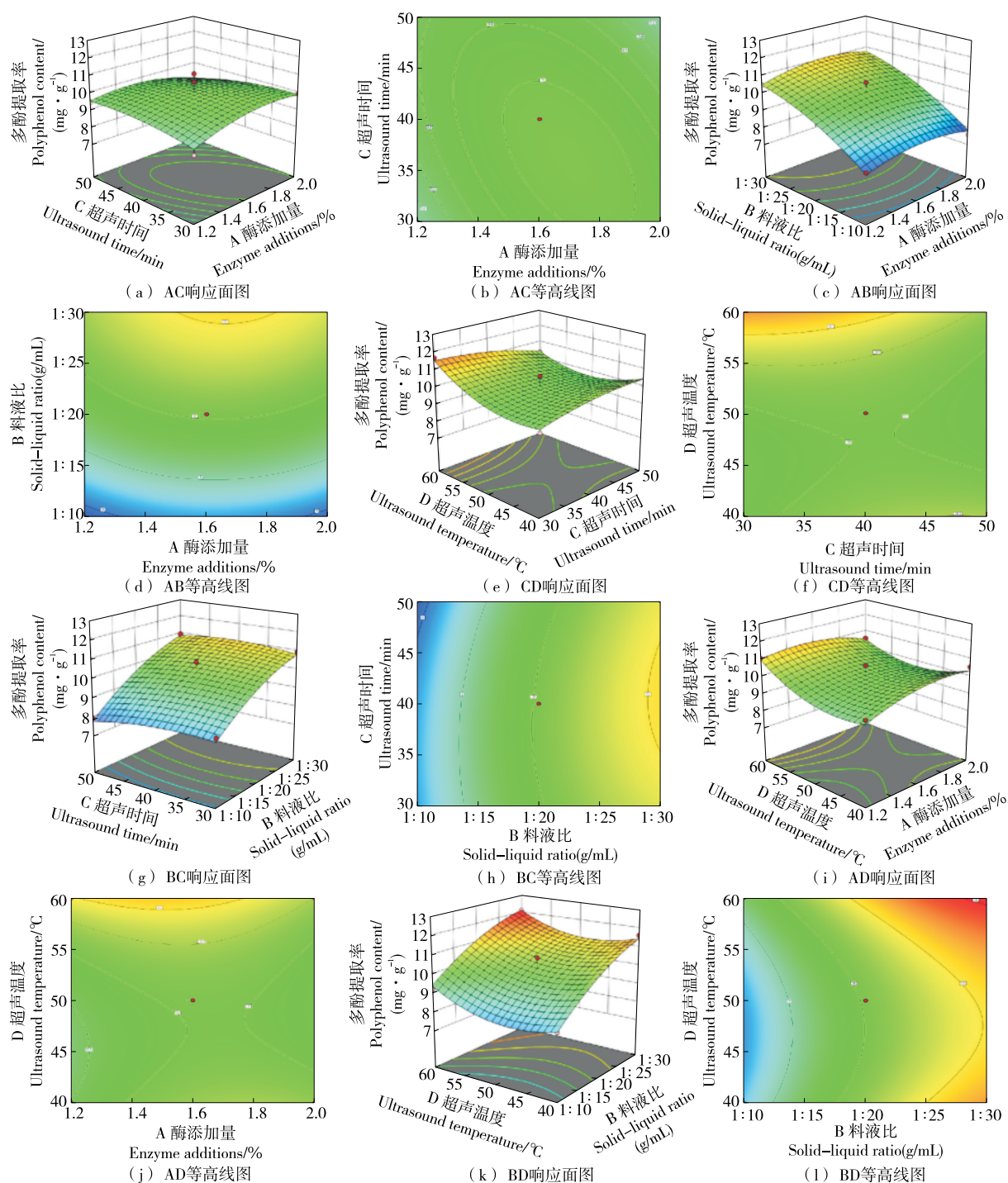


图2 4个提取因素对新疆酸李多酚提取率影响的响应面三维图及等高线图

Figure 2 Three-dimensional response surface and contour plots of the effects of four extraction factors on the polyphenol extraction rate of *Prunus cerasifera* in Xinjiang

树脂对新疆酸李多酚有较强的吸附效果,其次是HPD-100、HPD-700和D101。HPD-300大孔吸附树脂解吸效果最好,其次为HPD-700、D101和AB-8。

2.4 树脂的静态吸附与解吸

为了选择吸附和解吸性能均较好的大孔吸附树脂,

进行了进一步的吸附动力学研究,HPD-300静态吸附动力学曲线如图3所示。图3(a)显示,HPD-300大孔树脂可快速吸附新疆酸李多酚类物质,0~1.5 h吸附速率较快,2.0 h即可达到吸附平衡状态,此时的吸附量为 $(6.50 \pm 0.1) \text{ mg/g}$,之后随着时间的延长吸附量无明显变化,或许

表4 8种大孔树脂静态吸附—解吸情况[†]

Table 4 Static adsorption-desorption of eight macroporous resins

树脂	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%	综合 评分
HPD-100	7.36±0.03	64.55±0.27	67.21±0.28	65.88
HPD-300	7.50±0.02	65.80±0.16	85.25±0.27	75.53
HPD-450	7.04±0.02	61.75±0.19	78.88±0.26	70.32
HPD-600	7.12±0.02	62.44±0.22	76.67±0.27	69.56
HPD-700	7.33±0.02	64.32±0.20	84.97±0.16	74.65
AB-8	7.12±0.04	62.43±0.32	82.62±0.42	72.53
D101	7.24±0.02	63.48±0.21	83.95±0.26	73.72
NKAv9	6.66±0.01	58.42±0.11	74.36±0.18	66.39

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占50%)。

是由于吸附时间的延长,大孔树脂表面的吸附位点达到饱和状态^[19]。该结果与 Sandhu 等^[20]的相近。图3(b)显示,新疆酸李多酚在0.5 h即可被60%乙醇快速解吸并达到解吸平衡,此时树脂的解吸量为(10.53±0.12) mg/g。解吸后期,解吸率出现小幅下降趋势,这可能是由于随着时间的延长,出现了复吸现象。

2.5 树脂的动态吸附与解吸

2.5.1 上样质量浓度的影响 采用6种不同质量浓度的上样液,计算出HPD-300大孔树脂对样品的吸附率和解吸率,结果见表5。

由表5可以看出,吸附率随上样质量浓度的增加呈先增后减的趋势,其吸附率在上样质量浓度为100 mg/mL时达到最大值。上样质量浓度过高时吸附率出现下降,可能是溶液在树脂中出现积絮和沉淀导致树脂堵塞,影响了多酚在溶液和树脂中的扩散^[21]。综合评价6种上样质量浓度后,确定最佳上样质量浓度为100 mg/mL。

2.5.2 上样液体积的影响 通过比较流出液与上样液中

表5 上样质量浓度的影响[†]

Table 5 Influence of sample concentration

上样质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%	综合评分
25	61.13±4.71	82.44±1.54	71.78
50	60.96±3.65	93.38±0.27	77.17
75	60.32±2.61	96.78±0.42	78.55
100	62.90±1.00	98.92±0.72	80.91
125	59.79±1.71	91.44±0.39	75.61
150	57.60±1.63	94.87±0.24	76.24

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占50%)。

多酚含量的差别,获得最大上样量,其结果见表6。

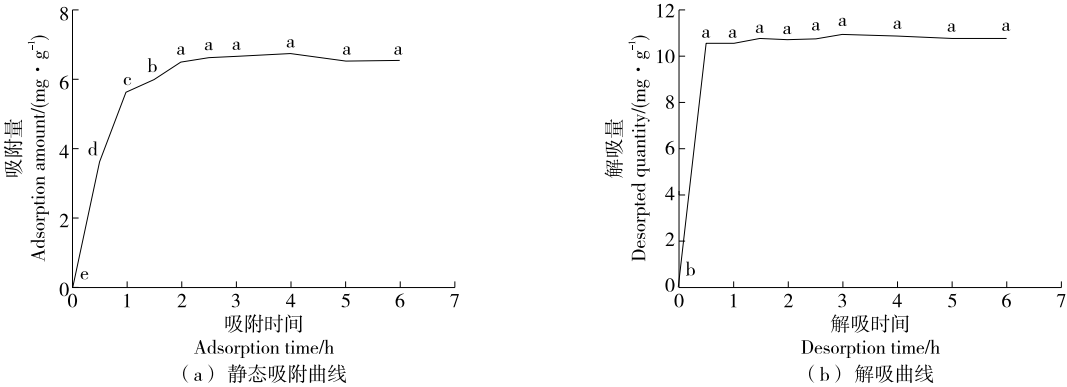
由表6可以看出,随着上样液体体积的增大,吸附率也逐渐增大,上样液体体积为180 mL时,吸附树脂处于饱和状态。过多的上样液体体积会影响大孔吸附树脂的再生能力,并且会使大孔吸附树脂的吸附率受到影响;而过少的上样液体体积可能会使吸附率降低,进而无法充分发挥其吸附能力,此结果与张腊腊等^[22]的一致。综合评价8种上样液体积后,确定最佳上样液体积为180 mL。

表6 上样液体积的影响[†]

Table 6 Influence of the volume of the sample solution

上样液体积/mL	吸附率/%	解吸率/%	综合评分
30	11.52±2.40	94.44±1.39	52.98
60	38.69±1.27	86.76±1.13	62.73
90	55.32±1.01	86.10±1.21	70.71
120	65.84±1.11	87.42±1.90	76.63
150	71.36±1.02	81.31±2.32	76.34
180	74.98±1.01	82.49±2.73	78.74
210	77.84±1.09	76.39±3.20	77.11
240	79.70±1.14	70.53±3.66	75.11

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占50%)。



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图3 HPD-300大孔吸附树脂对新疆酸李多酚的静态吸附与解吸曲线

Figure 3 Static adsorption and desorption performance curves of *Prunus cerasifera* polyphenols by HPD-300 macroporous adsorption resin

2.5.3 吸附速率的影响 在最佳上样质量浓度(100 mg/mL)下进行试验考察吸附速率对新疆酸李多酚吸附与解吸能力的影响,结果见表 7。

表 7 吸附速率的影响[†]

Table 7 Influence of adsorption rate

吸附速率/(mL·h ⁻¹)	吸附率/%	解吸率/%	综合评分
30	78.71±0.11	77.06±0.20	77.88
60	78.57±0.11	75.59±0.13	77.08
90	78.46±0.14	73.90±0.27	76.18
120	78.75±0.13	77.60±0.29	78.17
150	77.24±0.14	69.43±0.13	73.34
180	76.63±0.23	72.12±0.36	74.37

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占 50%)。

吸附速率受吸附质颗粒的内部扩散速度和外部扩散速度的控制,并且与溶液温度、吸附剂本身以及吸附质颗粒大小等因素有关^[23]。由表 7 可以看出,吸附率和解吸率在吸附速率为 120 mL/h 时达到最大。吸附率在吸附速率>120 mL/h 时逐渐下降,因为吸附流速过快,溶质分子无法更好地扩散到树脂表层,从而大大降低了吸附率。综合评价 6 种吸附速率后,确定最佳吸附速率为 120 mL/h。

2.5.4 洗脱剂(乙醇)体积分数的影响 以乙醇为洗脱液,探究洗脱剂(乙醇)体积分数对新疆酸李多酚解吸能力的影响,结果见表 8。

表 8 洗脱剂(乙醇)体积分数的影响[†]

Table 8 Influence of volume fraction of the eluent (ethanol)

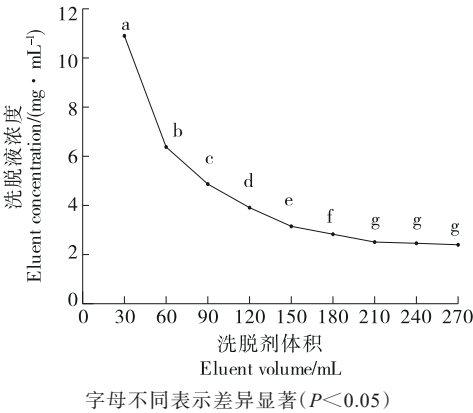
洗脱剂(乙醇)体积分数/%	吸附率/%	解吸率/%	综合评分
10	76.30±0.23	35.79±1.20	56.05
30	75.16±0.35	70.46±2.04	72.81
60	76.28±0.11	80.46±1.68	78.37
80	75.83±0.11	77.60±1.55	76.71
95	76.01±0.16	73.06±2.09	74.53

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占 50%)。

由表 8 可以看出,解吸率随洗脱剂(乙醇)体积分数的增大而逐渐增大,在洗脱剂(乙醇)体积分数为 60% 时达到最大值,或许是因为新疆酸李多酚与 60% 乙醇溶液的极性一致。当洗脱剂(乙醇)体积分数>60% 时,新疆酸李多酚的解吸率呈下降趋势,原因在于洗脱溶剂极性改变,杂质被洗脱,进而造成多酚解吸率下降^[24]。孙立兰等^[25]同样发现,洗脱剂(乙醇)体积分数达到 60% 时,芸豆皮多酚纯度为(54.68±1.97)%。因此,对 5 种洗脱剂体积分数进行综合评价,最终选择 60% 乙醇溶液作为最佳的洗脱剂。

2.5.5 洗脱剂用量的影响 洗脱剂用量与收集的洗脱液质量浓度的关系见图 4。

由图 4 可以看出,随洗脱剂用量增加,流出液质量浓度先明显降低,当洗脱剂用量>210 mL 时流出液质量浓度趋于稳定。说明洗脱剂用量达到某一个特定的量之后,多酚基本被完全洗脱。此结果与史鹏杰等^[26]的相近。因此,选择洗脱剂用量为 210 mL。



字母不同表示差异显著($P<0.05$)

图 4 洗脱剂用量的影响

Figure 4 Influence of eluent dosage

2.5.6 验证实验 通过参考以上参数,最终确定使用 HPD-300 型大孔吸附树脂,在上样质量浓度 100 mg/mL、上样液体积 180 mL、吸附速率 120 mL/h、洗脱剂(乙醇)体积分数 60%、洗脱剂用量 210 mL 条件下进行验证实验,结果见表 9。

由表 9 可以看出,验证实验结果与纯化工艺条件优化结果近似,因此可以判断出纯化工艺优化试验得到的结果较为稳定,该纯化工艺高效可行。

表 9 验证实验结果[†]

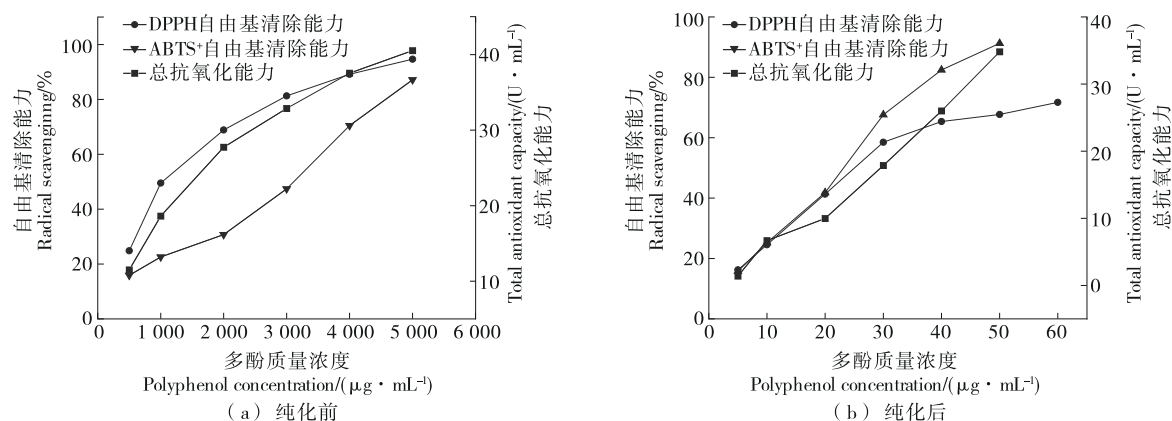
Table 9 Verification of experimental results

序号	吸附率/%	解吸率/%	综合评分
1	78.31±0.13	94.58±0.47	86.45
2	78.37±0.18	92.05±0.39	85.28
3	77.45±0.15	91.02±0.81	84.24

[†] 综合评分(吸附率和解吸率各占 50%)。

2.6 抗氧化活性分析

如图 5 所示,经过纯化后的样品,其自由基清除能力比未纯化的样品更强。或许是由于纯化后的样品中多酚含量相对较高,进而使得自由基清除能力有所提高。并且随着质量浓度的增加新疆酸李多酚表现出良好的自由基清除能力,自由基清除率与其质量浓度呈正相关。DPPH 自由基清除能力检测结果显示,纯化前后的新疆酸李多酚 IC₅₀ 值分别为 1 052.81, 24.39 μg/mL。ABTS⁺ 自由基清除能力检测结果显示,纯化前后的新疆酸李多酚 IC₅₀ 值分别为 169.62, 10.60 μg/mL。纯化后 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基清除 IC₅₀ 值是纯化前的 43.16 倍和 16.00 倍。总抗氧化能力结果显示,纯化后新疆酸李多酚的总抗氧



阳性对照 V_c 对 DPPH 和 $ABTS^+$ 自由基清除 IC_{50} 值分别为 3.72, 2.48 $\mu\text{g/mL}$

图5 新疆酸李多酚的抗氧化活性

Figure 5 Antioxidant activity of *Prunus cerasifera* polyphenols

化能力显著高于纯化前的。何袅袅等^[27]研究表明,经过纯化后的多酚,其抗氧化能力比纯化前的更强,而试验结果中纯化后酸李多酚的 DPPH 自由基清除能力、 $ABTS^+$ 自由基清除能力和总抗氧化能力虽然低于 V_c 的抗氧化活性,但均高于纯化前的。综上结果均表明新疆酸李多酚具有较强的抗氧化活性。

3 结论

超声辅助复合酶法提取新疆酸李多酚的最佳工艺条件为果胶酶与纤维素酶质量比 1:2、酶添加量 1.5%、料液比 1:29 (g/mL)、超声时间 37 min、超声温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 该条件下,新疆酸李多酚提取率可达 $(12.82 \pm 0.43) \text{ mg/g}$ 。采用 HPD-300 作为富集新疆酸李多酚的大孔吸附树脂进行纯化,最佳纯化工艺条件为上样质量浓度 100 mg/mL,上样液体积 180 mL,吸附速率 120 mL/h,洗脱时先用水洗除杂 90 mL,再用 210 mL 体积分数为 60% 的乙醇溶液洗脱,该条件下酸李多酚吸附率与解吸率的综合评分可达 85.32。抗氧化能力检测结果显示,纯化后 DPPH 自由基和 $ABTS^+$ 自由基清除 IC_{50} 值是纯化前的 43.16 倍和 16.00 倍,并具有较强的总抗氧化能力。综上,超声辅助复合酶法结合 HPD-300 大孔吸附树脂纯化可以有效地实现新疆酸李多酚的高效富集和提纯,并能显著提高酸李多酚的抗氧化活性。但该研究只是针对超声辅助复合酶法提取新疆酸李多酚开展了抗氧化测定,至于这种超声辅助复合酶法提取会不会对新疆酸李多酚生物活性产生影响,尚未知晓。新疆酸李多酚的性质、结构和潜在的生物学活性以及机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刁永强, 许正, 陈淑英, 等. 新疆野生樱桃李种质资源研究现状及保护对策[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(3): 57-61.
DIAO Y Q, XU Z, CHEN S Y, et al. Study on present status and protective strategies for germplasm resources of wild cherry

plum (*Prunus divaricata*) in Xinjiang[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2017, 36(3): 57-61.

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2015: 285.
National Administration of Traditional Chinese Medicine, "Chinese Materia Medica" Editorial Board. Chinese herbal medicine: uyghur medicine roll[M]. Shanghai: Shanghai Publisher of Science and Technology, 2015: 285.
- [3] 李君, 许正, 周龙, 等. 新疆野生樱桃李营养成分测定[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(11): 2 145-2 149.
LI J, XU Z, ZHOU L, et al. Determination of nutrition in agrestal prunus divaricatar of Xinjiang Yili[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(11): 2 145-2 149.
- [4] 赵晶晶, 傅力. 原子吸收光谱法测定野生樱桃李中微量元素[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(1): 64-68.
ZHAO J J, FU L. Determination of trace elements of Prunus divaricata L. by atomic absorption spectrometry[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2012, 49(1): 64-68.
- [5] DUAN X M, LI J, CUI J X, et al. A network pharmacology strategy combined with in vitro experiments to investigate the potential antiinflammatory mechanism of Prunus cerasifera Ehrhart[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(12): e14396.
- [6] 栗有志, 李芳, 李艳美, 等. 液相色谱-串联质谱法测定浓缩樱桃李汁中罗丹明 B 和苏丹红染料[J]. 分析科学学报, 2014, 30(4): 545-548.
SU Y Z, LI F, LI Y M, et al. Determination of rhodamine B and Sudan dyes in myrobalan plum juice concentrate by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Science, 2014, 30 (4): 545-548.
- [7] CELIK F, GUNDOGDU M, ALP S, et al. Determination of phenolic compounds, antioxidant capacity and organic acids contents of *Prunus domestica* L., *Prunus cerasifera* Ehrh. and *Prunus spinosa* L. fruits by HPLC[J]. Acta Chromatographica, 2017, 29(4): 1-4.

- [8] JAFFRI S B, AHMAD K S. Biomimetic detoxifier *Prunus cerasifera* Ehrh. silver nanoparticles: innate green bullets for moribund pathogens and persistent pollutants[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(9): 9 669-9 685.
- [9] BULUT G, HAZNEDAROĞLU M Z, DOĞAN A, et al. An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey) [J]. Journal of Herbal Medicine, 2017, 10: 64-81.
- [10] VALIAKOS E, MARSELOS M, SAKELLARIDIS N, et al. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the "Antidotes" in nikolaos myrepsos' dynameron[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 163: 68-82.
- [11] JARIĆ S, KOSTIĆ O, MATARUGA Z, et al. Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 211: 311-328.
- [12] 吐克孜·吾守尔, 王茹, 张姣姣, 等. 樱桃李果实提取物对小鼠高脂膳食诱导肥胖的预防作用[J]. 中国食品学报, 2021, 21(6): 144-149.
- WUSHUER T K Z, WANG R, ZHANG J J, et al. The preventive effect of *Prunus cerasifera* Ehrh. fruit extract on obesity induced by high-fat diet in mice[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(6): 144-149.
- [13] 刘伟, 腊萍, 杨如箴, 等. 野生樱桃李清除 DPPH 自由基能力及抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(17): 183-185.
- LIU W, LA P, YANG R Z, et al. Scavenging ability of DPPH free radical and inhibiting α -glucosidase activity of *Prunus divaricata*[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2017, 45(17): 183-185.
- [14] THAKUR M, BHATTACHARYA S, KHOSLA P K, et al. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation[J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2019, 12: 1-12.
- [15] 仇洋. 黑果腺肋花楸多酚的提取纯化及活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 5-6.
- CHOU Y. Study on extraction, purification and activity of polyphenols from *Sorbus melanocarpa*[D]. Changchun: Jilin University, 2017: 5-6.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 232-233.
- National pharmacopoeia committee. pharmacopoeia of the people's republic of China: 4 parts[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 232-233.
- [17] SALAMET E, ABLAJAN T, SODIK N, et al. Optimization of extraction process for antidiabetic and antioxidant activities of Kursi Wufarikun Ziyabit using response surface methodology and quantitative analysis of main components[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017(1): 1-14.
- [18] 刘伟, 杨如箴, 李紫薇, 等. 响应面法优化新疆野酸梅果肉多酚提取工艺研究[J]. 北方园艺, 2014(4): 123-126.
- LIU W, YANG R Z, LI Z W, et al. Optimization of polyphenol from Xinjiang wild plum flesh using response surface methodology[J]. Northern Horticulture, 2014(4): 123-126.
- [19] 赵露, 尹国利, 邹成梅, 等. 大孔吸附树脂对苦丁茶多酚类物质的吸附动力学与热力学研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(16): 39-44.
- ZHAO L, YIN G L, ZOU C M, et al. Study on adsorption kinetics and thermodynamics of polyphenols from Kudingcha by macroporous resin[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 26(16): 39-44.
- [20] SANDHU A K, GU L W. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins from muscadine (*Vitis rotundifolia*) juice pomace by use of macroporous adsorbent resins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(7): 1 441-1 448.
- [21] UMEOGUJAU F U, AKANINWOR J O, ESSIEN E B, et al. Macroporous adsorptive resin-assisted enrichment of polyphenol from *Psidium guajava* leaves improved its in vitro antioxidant and anti-hemolytic properties[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2023, 53(7): 841-848.
- [22] 张腊腊, 王玉峰, 胡浩斌, 等. HPD-600 型大孔树脂纯化黄花菜多酚工艺优化[J]. 当代化工, 2023, 52(6): 1 345-1 349, 1 400.
- ZHANG L L, WANG Y F, HU H B, et al. Optimization of purification process of polyphenols from *hemerocallis citrina* with HPD-600 macroporous resin[J]. Contemporary Chemical Industry, 2023, 52(6): 1 345-1 349, 1 400.
- [23] 王玥, 杜守颖, 徐冰, 等. 芍药苷大孔树脂静态吸附动力学研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(1): 57-60.
- WANG Y, DU S Y, XU B, et al. Static adsorption thermodynamics of macroporous resin adsorbing paeoniflorin [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 35(1): 57-60.
- [24] 袁欢, 彭莉莎, 孙梦瑶, 等. 大孔树脂对二角菱壳多酚的吸附及解吸性能研究[J]. 食品与机械, 2021, 37(4): 47-52.
- YUAN H, PENG L S, SUN M Y, et al. Study on absorption and desorption properties of macroporous resin for pericarps of *Trapa bispinosa* Roxb.[J]. Food & Machinery, 2021, 37(4): 47-52.
- [25] 孙立兰, 王坤, 张友良, 等. 芸豆皮多酚制备、纯化、鉴定及抗油脂氧化作用研究[J]. 食品工业科技, 2025, 46(2): 292-300.
- SUN L L, WANG K, ZHANG Y L, et al. Study on preparation, purification, identification and anti-lipid oxidation of kidney bean skin polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(2): 292-300.
- [26] 史鹏杰, 黄豆豆, 徐艾娜, 等. 赶黄草中大环多酚大孔树脂纯化工艺的优化[J]. 中成药, 2022, 44(1): 197-201.
- SHI P J, HUANG D D, XU A N, et al. Optimization of purification process of macrocyclic polyphenol macroporous resin of *Herba herba*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(1): 197-201.
- [27] 何泉泉, 陈雅鑫, 蔡树芸, 等. 铜藻多酚的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(3): 183-191.
- HE N N, CHEN Y X, CAI S Y, et al. Separation and purification and antioxidant activity of polyphenols from *sargassum horneri*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(3): 183-191.