

## 云南野生火棘叶甾醇提取工艺优化及体外活性研究

刘威良, 蔡建, 高文荣, 朱铃, 吕涛

### Optimization of Extraction Process and *in Vitro* Activity Study of Total Sterols from Wild *Pyracantha fortuneana* Leaves in Yunnan

LIU Weiliang, CAI Jian, GAO Wenrong, ZHU Ling, and L Tao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080041>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids and *in Vitro* Antioxidant Activity of Extract from Persimmon Leaves

食品工业科技. 2020, 41(13): 32-38,45 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.006>

#### Box-Behnken模型优化水麻叶总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析

Optimization of the Ultrasound Extraction Technology and Antioxidant Activity Analysis of the Total Flavonoids from *Debregeasia orientalis* Leaves by Box-Behnken Method

食品工业科技. 2021, 42(12): 184-190 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080230>

#### 百香果叶总酚的提取工艺优化、抗氧化活性及其抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性

Optimization Extraction Processing, Antioxidant Activity and Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Activity of Total Polyphenols from Leaves of *Passiflora edulis*

食品工业科技. 2019, 40(20): 223-227,236 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.035>

#### 白肉番石榴总黄酮提取工艺优化及体外抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process and *in Vitro* Antioxidant Activity Analysis of Total Flavonoids from White-flesh Guava(*Psidium guajava* L. cv. Pearl)

食品工业科技. 2019, 40(8): 196-201 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.033>

#### 刺果番荔枝叶多酚提取工艺优化及其体外抗氧化活性

Optimization of Extraction Process of Polyphenols from *Annona squamosa* Leaves and Its Antioxidant Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(20): 162-168 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.026>

#### 线叶旋覆花总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Inula linearifolia* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2019, 40(22): 151-156,162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.027>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘威良, 蔡建, 高文荣, 等. 云南野生火棘叶甾醇提取工艺优化及体外活性研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 187-194. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080041

LIU Weiliang, CAI Jian, GAO Wenrong, et al. Optimization of Extraction Process and *in Vitro* Activity Study of Total Sterols from Wild *Pyracantha fortuneana* Leaves in Yunnan[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 187-194. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080041

· 工艺技术 ·

# 云南野生火棘叶甾醇提取工艺优化 及体外活性研究

刘威良, 蔡建, 高文荣, 朱铃, 吕涛\*

(曲靖师范学院, 云南省高原特色果酒技术创新与应用工程研究中心, 云南曲靖 655011)

**摘要:** 为优化野生火棘叶总甾醇的提取工艺, 并探究抗氧化、美白活性。该研究以总甾醇得率为指标, 采用单因素实验考察提取溶剂、料液比、超声温度和超声时间对野生火棘叶总甾醇得率的影响, 在此基础上利用正交试验设计对提取条件进行优化; 采用 DPPH、ABTS 和亚硝酸盐法, 体外评价野生火棘叶总甾醇的抗氧化活性; 通过考察对酪氨酸酶抑制作用来评价火棘叶总甾醇的美白活性。结果表明, 野生火棘叶总甾醇的最佳提取工艺为提取溶剂无水乙醇, 超声温度 50 ℃, 料液比 1:16 g/mL, 超声时间 25 min, 得到的野生火棘叶总甾醇得率为 (11.00±0.03) mg/g; 在 0.5~5 mg/mL 范围内, 野生火棘叶总甾醇对 DPPH 自由基、ABTS<sup>+</sup> 自由基、亚硝酸根离子有很强的清除作用; 对酪氨酸酶有很强的抑制作用, 且呈现良好的量效关系。该提取工艺稳定、可靠, 可用于野生火棘叶总甾醇的提取, 野生火棘叶总甾醇可作为一种新型的天然抗氧化剂和酪氨酸酶抑制剂, 应用于功能食品中。

**关键词:** 野生火棘叶, 总甾醇, 提取工艺, 抗氧化, 美白

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)11-0187-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080041

本文网刊:



## Optimization of Extraction Process and *in Vitro* Activity Study of Total Sterols from Wild *Pyracantha fortuneana* Leaves in Yunnan

LIU Weiliang, CAI Jian, GAO Wenrong, ZHU Ling, LÜ Tao\*

(Yunnan Plateau Special Fruit Wine Technology Innovation and Application Engineering Research Center, Qujing Normal University, Qujing 655011, China)

**Abstract:** The objective of this study was to optimize the extraction process of total sterols from wild *Pyracantha fortuneana* leaves (WPFL), and explore their antioxidant and whitening activities. The yield of total sterols (WPFLTSP) was used as indicator, and the single factor experiment was used to investigate the effects of extraction solvent, solid-liquid ratio, ultrasonic temperature and ultrasonic time on the yield of WPFLTSP. Based on this, the orthogonal experimental design was used to optimize the extraction conditions. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] and nitrite methods were used to evaluate the antioxidant activity of WPFLTSP *in vitro*. The whitening activity was evaluated by the inhibitory effect on tyrosinase. The results showed that for optimal extraction process of WPFLTSP, the extraction solvent was absolute ethanol, ultrasonic temperature was 50 ℃, solid-liquid ratio was 1:16 g/mL, and ultrasonic time was 25 minutes. Under these conditions, the yield of WPFLTSP was (11.00±0.03) mg/g. In the range of 0.5~5 mg/mL, WPFLTSP had strong scavenging effects on DPPH radicals, ABTS<sup>+</sup> radicals and nitrite ions, as well as a strong inhibitory effect on tyrosinase, demonstrating a good dose-response relationship. This

收稿日期: 2023-08-10

**基金项目:** 2022 年云南省科技厅青年基础研究专项 (2106150068Y615); 2023 年度云南省地方本科高校基础研究联合专项-面上项目 (202301BA070001-080); 云南省地方本科高校基础研究联合专项资金项目-面上项目 (202301BA070001-076); 2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (G202310684011); 曲靖市市校科技创新联合专项资金-重点项目 (KJLH2023ZD04; KJLH2023ZD05); 2022 年“珠源百人计划”教育人才专项 [曲党人才 (2022) 12 号]。

**作者简介:** 刘威良 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物基功能食品药品研发, E-mail: lw12046@126.com。

\* **通信作者:** 吕涛 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 药食两用植物基抗肿瘤药物研发, E-mail: 48295413@qq.com。

extraction process was stable and reliable for extracting WPFLTPS. The WPFLTPS can be used as a new, natural antioxidant and tyrosinase inhibitor in functional foods.

**Key words:** wild *Pyracantha fortuneana* leaves; total sterols; extraction process; antioxidant; whitening

火棘 [*Pyracantha fortuneana* (Maxim.) Li], 蔷薇科火棘属的常绿小灌木, 生长于海拔 200~2800 m 的丘陵、山地、灌丛草地和河沟旁, 以野生为主, 资源丰富<sup>[1-2]</sup>。火棘作为云南“药食两用”植物资源之一, 其浑身是宝, 根、茎、叶、花、果等部位均可入药, 据《滇南本草》《云南中草药》等古籍记载, 火棘具有极高的药用保健功效, 如清热解毒、健脾消积、生津止渴等<sup>[3-4]</sup>。此外, 据《农部琐录》记载, 早在 1700 年前的三国时代就以火棘果代粮食用<sup>[5-7]</sup>。

植物甾醇 (Phytosterol, PS) 普遍存在植物的种子、花、茎叶中, 是一类以环戊烷全氢菲为母核结构的甾体化合物, 已鉴定 40 多种, 天然的 PS 主要以酯化态或游离态形式存在, 其中游离态的以  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇等为主<sup>[8]</sup>。大量研究发现, PS 具有降血脂、抗炎、解痉、抗氧化、抗肿瘤等生理功能, 被美誉为“生命的钥匙”, 因此被广泛应用于食品、医药及化妆品等行业<sup>[9]</sup>。国内外关于 PS 的提取方法有超声辅助溶剂萃取法、皂化法、分子蒸馏法、超临界流体萃取法等<sup>[10]</sup>。

本研究以云南野生火棘叶为原料, 采用超声辅助法提取 PS 粗提物, 并对提取工艺进行优化, 通过体外抗氧化和酪氨酸酶抑制实验探讨总甾醇的抗氧化能力和美白功效, 为功能产品的研发提供理论依据, 同时拓展了火棘叶资源利用的空间。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

野生火棘叶 采自云南省曲靖师范学院校园内, 经曲靖师范学院蔡建副教授鉴定为蔷薇科植物火棘的叶子; 豆甾醇 ( $\geq 98\%$ )、 $\beta$ -谷甾醇 (纯度  $\geq 98\%$ )、L-抗坏血酸 ( $V_C$ , 纯度  $\geq 99\%$ )、熊果苷 (纯度  $\geq 98\%$ )、DPPH (2,2-联苯基-1-苦基肼基)、ABTS [2,2'-联氨基双 [3-(乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐]、酪氨酸酶 ( $\geq 1120$  U/mg) 购自 Sigma-Aldrich 公司; L-酪氨酸、左旋多巴 (纯度  $\geq 99.0\%$ ) 均为分析纯, 购自上海源叶生物科技有限公司; 其余化学试剂 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

KQ-500DE 型数控超声机 昆山市超声仪器有限公司; UV-5600PC 紫外可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; HSB-III 型循环水式多用真空泵 上海亚荣生化仪器厂; DHE-9101-3 型电热鼓风干燥箱 金坛市杰瑞尔电器有限公司; JK-G-350A3 高速多功能粉碎机 上海精学科学仪器有限公司; DK-S26 型电热恒温水浴锅 上海右一仪器公司制造。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 野生火棘叶总甾醇 (WPFLTPS) 超声辅助提取

流程 采摘火棘叶  $\rightarrow$  65  $^{\circ}\text{C}$  烘干  $\rightarrow$  粉碎  $\rightarrow$  称取样品  $\rightarrow$  加入提取溶剂  $\rightarrow$  超声  $\rightarrow$  抽滤  $\rightarrow$  旋蒸浓缩  $\rightarrow$  测总体积  $\rightarrow$  稀释  $\rightarrow$  加入显色剂  $\rightarrow$  显色  $\rightarrow$  测吸光度  $\rightarrow$  计算 WPFLTPS 得率<sup>[11]</sup>。

1.2.2 标准曲线的绘制 参考张云焕等<sup>[12]</sup>实验方法, 配制质量浓度为 0.05 mg/mL 豆甾醇为标准品溶液, 分别吸取 0、1、2、3、4、5、6、7 mL 至干燥比色管中, 而后加无水乙醇定容至 8 mL, 接着加入 4 mL 硫磷铁显色剂振荡摇匀, 静置显色 15 min, 以空白管调零, 在 200~800 nm 范围内进行光谱扫描, 确定最大吸收波长为 440 nm, 使用紫外分光光度计在 440 nm 处测定各管吸光度值。豆甾醇的质量浓度为横坐标 (C), 以吸光度值 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程  $A=15.946C-0.0046$ 。该方程的决定系数  $R^2=0.9997$ , 说明线性关系良好, 能够用于定量分析。

按照上述方法, 调整适当的样品浓度, 按照式 (1) 进行 WPFLTPS 得率的计算, 公式如下:

$$Y = \frac{C \times V \times b}{m} \quad \text{式 (1)}$$

式中, Y 为 WPFLTPS 得率, mg/g; C 为野生火棘叶提取液吸光度对应的豆甾醇标准溶液的质量浓度, mg/mL; V 为浓缩样液的总体积, mL; b 为稀释倍数; m 为火棘叶质量, g。

#### 1.2.3 单因素实验

1.2.3.1 最佳提取溶剂的筛选 参考文献 [13] 的方法, 称取 5 g 样品, 固定提取温度为 20  $^{\circ}\text{C}$ , 超声提取时间为 15 min, 料液比为 1:16 g/mL, 超声功率为 400 W, 分别选用无水乙醇、正己烷、丙酮、乙酸乙酯、石油醚作为提取溶剂, 来提取火棘叶中的甾醇, 运用公式计算出 WPFLTPS 的得率, 探究提取溶剂对 WPFLTPS 得率的影响。

1.2.3.2 超声辅助提取火棘叶总甾醇的条件优化 参考靳若周等<sup>[14]</sup>的实验方法略作改进, 以无水乙醇为提取溶剂, 在料液比 1:16 g/mL、超声时间 15 min、超声温度 20  $^{\circ}\text{C}$  的基础条件下, 保持其他条件不变, 只改变其中一个因素, 以总甾醇得率为指标, 设置超声温度 20、30、40、50、60  $^{\circ}\text{C}$ , 料液比 1:8、1:12、1:16、1:20、1:24 g/mL, 超声时间 15、25、35、45、55 min 进行单因素实验, 每组重复 3 次。

1.2.4 正交试验设计 根据单因素实验所得结果和正交表进行 3 因素 3 水平正交试验设计, 如表 1。计算该条件下 WPFLTPS 得率, 再对所得数据进行方差分析, 得到最佳提取工艺。最后, 对正交试验所得的最佳提取工艺条件进行验证实验。



表 1 正交试验因素水平  
Table 1 Orthogonal experimental factor level

水平	因素		
	A 温度(℃)	B 料液比(g/mL)	C 超声时间(min)
1	40	1:12	15
2	50	1:16	25
3	60	1:20	35

### 1.2.5 WPFLTIPS 抗氧化试验

1.2.5.1 DPPH 自由基清除率的测定 参考杨菁等<sup>[15]</sup>实验方法并改进,用无水乙醇配制浓度为 0.2 mmol/L DPPH 溶液,现用现配。量取 2 mL 不同浓度(0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)的 WPFLTIPS 溶液,加入 DPPH 溶液 2 mL,室温下避光反应 30 min,以无水乙醇为空白对照, $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇和  $V_C$  溶液(0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)为阳性对照,于 517 nm 处测吸光度值。每个样品重复测 3 次,按照下列公式计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中, $A_i$  代表加入待测液的吸光度值; $A_j$  代表待测液的本底值; $A_0$  为不加待测液的对照值。

1.2.5.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的测定 参考文献的实验方法并改进<sup>[16]</sup>,取 7 mmol/L ABTS 5 mL 和 140 mmol/L 过硫酸钾 88  $\mu$ L 混合均匀,配制成 ABTS<sup>+</sup>自由基储备液,避光保存备用。取 0.1 mL 不同浓度(0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)的 WPFLTIPS 溶液,加入 3.9 mL ABTS 工作液,振荡 30 s,室温下静置 6 min 后,以无水乙醇为对照,于 734 nm 处测吸光度值,采用  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇和  $V_C$  溶液(0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)作为阳性对照。每个样品重复测 3 次,按照下列公式计算 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中, $A_i$  代表加入待测液的吸光度值; $A_j$  代表待测液的本底值; $A_0$  为不加待测液的对照值。

1.2.5.3 亚硝酸根( $\text{NO}_2^-$ )离子清除率的测定 参考童钰琴等<sup>[17]</sup>和吴海成<sup>[18]</sup>的实验方法并略作改进,以  $\text{NaNO}_2$  标准溶液浓度(C)为横坐标,以吸光度值 A 为纵坐标,在最大吸收波长 538 nm 处比色,绘制标准曲线,可得回归方程为  $A=0.0519C+0.0877$ ,  $R^2=0.9998$ ; 分别吸取不同浓度(0.5、1、2、3、4、5 mg/mL)的 WPFLTIPS、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇和  $V_C$  溶液置于比色管中,加入 5  $\mu$ g/mL 的  $\text{NaNO}_2$  溶液 2 mL,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 30 min,取出立即加入 1 mL 0.4% 对氨基苯磺酸,混匀,反应 5 min 后加入 0.2% 盐酸萘乙二胺溶液 0.5 mL,加水至 10 mL,混匀反应 15 min,以不加  $\text{NaNO}_2$  溶液的管为空白,在 538 nm 处测定各管的吸光度值,每个样品重复测 3 次。通过  $\text{NaNO}_2$  标准曲线得出残留的  $\text{NaNO}_2$  量,按照下列公式计算

$\text{NO}_2^-$ 清除率:

$$\text{NO}_2^- \text{清除率}(\%) = \frac{\text{加入标准亚硝酸钠量} - \text{亚硝酸钠残留量}}{\text{加入标准亚硝酸钠量}} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中,标准亚硝酸钠量和亚硝酸钠残留量的单位为  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 1.2.6 WPFLTIPS 对酪氨酸酶活性抑制作用的测定

酪氨酸酶的活力测定有两个步骤,酪氨酸酶单酚酶活力测定是以 L-酪氨酸为底物,酪氨酸酶二酚酶活力测定是以左旋多巴为底物<sup>[19]</sup>。样品用无水乙醇溶解并用蒸馏水配制成质量浓度分别为 0.5、1、2、3、4、5 mg/mL 的溶液。测定时按表 2 所示体积,用吸量管准确吸取 A、B、C、D 组反应液,每组都需要设置 3 个平行,充分混匀后,在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中温育 30 min,迅速倒入 10 mL 离心管中用台式高速离心机在转速为 6000 r/min 的条件下离心 15 min,迅速转移至比色皿中,于 475 nm 处测定吸光度值<sup>[20-21]</sup>。豆甾醇、熊果苷、 $V_C$  按上述方法进行测定。按下式(5)计算酪氨酸酶的抑制率:

$$\text{酪氨酸酶抑制率}(\%) = \frac{[(A-B)-(C-D)]}{A-B} \times 100 \quad \text{式 (5)}$$

式中,A、B、C、D 为各组反应液在波长为 475 nm 处的吸光度值。

表 2 反应液的组成  
Table 2 Composition of reaction solution

实验组号	A组	B组	C组	D组
底物(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0
样品(mL)	0.0	0.0	1.0	1.0
磷酸缓冲溶液(mL)	4.0	5.0	3.0	4.0
酪氨酸酶液(mL)	1.0	0.0	1.0	0.0
合计(mL)	6.0	6.0	6.0	6.0

## 1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次,数据分析采用  $T$  检验进行差异性比较,结果用均值 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )表示,使用 SPSS 25.0 软件进行方差分析及显著性检验,采用 Origin 9.0 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

#### 2.1.1 不同提取溶剂对 WPFLTIPS 提取效果的影响

如图 1 所示,不同提取溶剂的 WPFLTIPS 得率为:无水乙醇>丙酮>乙酸乙酯>正己烷>石油醚,丙酮和无水乙醇提取效果接近,但考虑到乙醇价格便宜,采购方便,丙酮属于易制毒化学品,因此,选择无水乙醇作为 WPFLTIPS 的提取溶剂。

#### 2.1.2 超声温度对 WPFLTIPS 提取效果的影响

由图 2 可知,随着温度逐渐升高,WPFLTIPS 得率会逐渐增大,当温度升高到 50  $^{\circ}\text{C}$  时总甾醇得率最高。当温度高于 50  $^{\circ}\text{C}$  时,总甾醇得率开始下降,这可能由

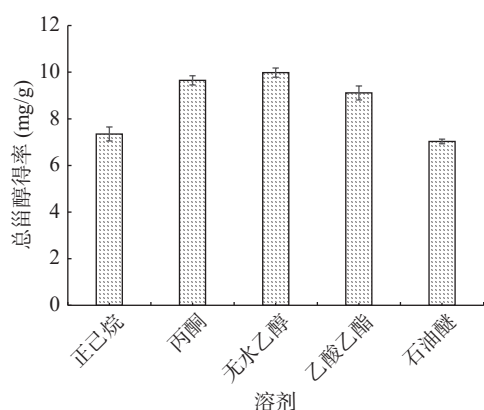


图1 不同提取溶剂对野生火棘叶总黄酮得率的影响

Fig.1 Effect of different extraction solvent on the yield of WPFLTPS

于温度过高, 黄酮在提取过程中被破坏, 从而 WPFLTPS 得率下降<sup>[22]</sup>。此外, 有研究表明当超声温度过高会加快杂质的溶出和黄酮的分解, 进而降低了黄酮的得率<sup>[23]</sup>。因此, 选择 50 ℃ 作为火棘叶中黄酮的提取温度。

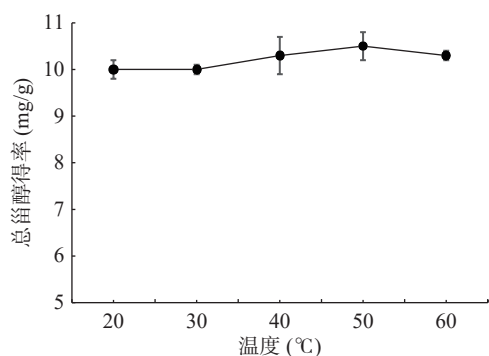


图2 超声温度对野生火棘叶总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic temperature on the yield of WPFLTPS

2.1.3 料液比对 WPFLTPS 提取效果的影响 由图3可知, WPFLTPS 得率随提取溶剂量的增加, 总黄酮的得率先快速增大, 当料液比为 1:16(g/mL)时达到峰值后开始下降。这可能是当提取溶剂用量达到一定值时, 样品中的黄酮的溶解量达到饱和, 继续增加提取溶剂的用量也不会提高总黄酮得率, 反而造成试剂的浪费或者由于长时间超声波振荡影响, 一些不稳

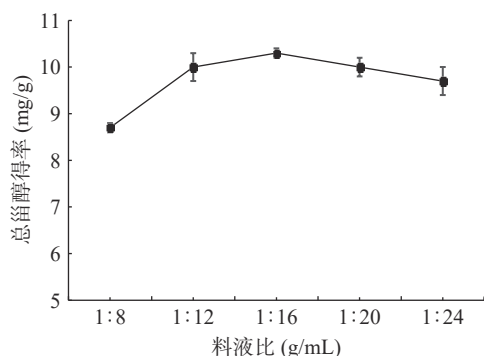


图3 料液比对野生火棘叶总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of solid-liquid ratio on the yield of WPFLTPS

定的黄酮被破坏, 导致得率下降。从经济角度考虑, 溶剂的用量不宜过大, 因此, 选择料液比 1:16(g/mL) 作为火棘叶中黄酮的提取料液比。这与刘真阳等<sup>[24]</sup> 研究结果规律相似。

2.1.4 超声时间对 WPFLTPS 提取效果的影响 由图4可知, 火棘叶中总黄酮得率随提取时间的延长逐渐降低。这是由于随着超声提取时间的延长, 火棘叶中的黄酮逐渐地溶出, 同时可能火棘叶中的其他杂质也逐渐溶解出来且溶出的越来越多, 从而影响火棘叶中总黄酮的得率。此外, 提取时间的延长可能会破坏黄酮结构, 进而降低得率<sup>[25]</sup>。因此, 选择 15 min 作为火棘叶中黄酮的超声时间。

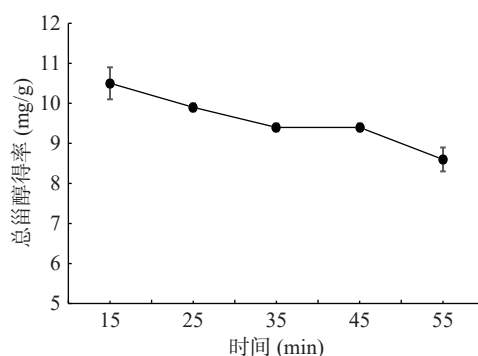


图4 超声时间对野生火棘叶总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic time on the yield of WPFLTPS

## 2.2 正交试验结果

根据单因素实验结果, 确定 A 温度(℃)、B 料液比(g/mL)、C 超声时间(min)三个影响因素的三个水平, 进行三因素三水平正交试验(如表3所示), 以确定提取火棘叶中黄酮提取的最佳工艺参数。

表3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

试验号	A	B	C	总黄酮得率(mg/g)
1	1	1	1	10.045
2	1	2	2	10.422
3	1	3	3	10.220
4	2	1	2	10.366
5	2	2	3	10.353
6	2	3	1	10.281
7	3	1	3	10.110
8	3	2	1	10.207
9	3	3	2	10.214
K <sub>1</sub>	10.299	10.174	10.178	
K <sub>2</sub>	10.333	10.327	10.334	
K <sub>3</sub>	10.177	10.238	10.228	
R	0.156	0.153	0.156	

由表3可知, K 为平均值, R 为极差, 温度、料液比和超声时间对火棘叶中总黄酮得率的影响相近。最佳因素水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, 即在提取火棘叶中的黄酮时, 提取溶剂无水乙醇, 超声功率 400 W, 超声温度 50 ℃, 料液比 1:16 g/mL, 超声时间 25 min, 因为该方案在正交试验表中并没有出现, 为了确定上述方案为超声波辅助有机溶剂提取火棘叶中黄酮的最

佳方案,按照  $A_2B_2C_2$  的条件对火棘叶样品再次进行超声波辅助有机溶剂提取,并计算得率,以此来验证火棘叶总黄酮提取的最佳工艺条件。

利用软件 SPSS 20.0 对试验数据进行方差分析,结果见表 4,显示各因素对火棘叶总黄酮的提取的影响。

表 4 正交试验方差分析  
Table 4 Variance analysis of orthogonal test

因素	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.038	2	0.019	4.653	0.177
B	0.036	2	0.018	4.370	0.186
C	0.038	2	0.019	4.679	0.176
误差	0.008	2	0.004		
总计	945.027	9			

2.3 验证实验

通过上述优化试验得到的 WPFLTPS 提取最佳组合为  $A_2B_2C_2$ , 分别做 3 组平行实验, WPFLTPS 得率为  $(11.00\pm0.03)\text{mg/g}$ , 高于正交试验表 3 中 WPFLTPS 得率最高组合  $A_1B_2C_2$  ( $10.422\text{ mg/g}$ ), 说明验证实验结果具有可靠性。

2.4 WPFLTPS 体外抗氧化活性

2.4.1 对 DPPH 自由基清除效果 由图 5 可知,在  $0.5\sim5\text{ mg/mL}$  范围内, WPFLTPS、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇对 DPPH 自由基均有不同程度的清除能力,随着浓度的增大清除作用也增大,达到一定程度后趋于平缓,呈良好的量效关系,其中 WPFLTPS 清除效果最佳,当浓度为  $5\text{ mg/mL}$  时,清除率达  $97.64\%$  与阳性对照组  $V_C$  清除率接近( $98.49\%$ ), 豆甾醇清除略高于  $\beta$ -谷甾醇,两者均明显低于 WPFLTPS。此研究结果与张东阳<sup>[11]</sup> 实验规律相似。贾硕<sup>[26]</sup> 研究发现,黑灵芝甾醇在  $5\text{ mg/mL}$  浓度时,对 DPPH 自由基清除率最高约为  $25.86\%$ , 而 WPFLTPS 抗氧化能力远高于黑灵芝甾醇。彭昕等<sup>[27]</sup> 研究发现,雷竹笋甾醇在  $3\text{ mg/mL}$  浓度时,对 DPPH 自由基清除率最高约为  $35\%$ , 而 WPFLTPS 抗氧化能力远高于雷竹笋甾醇。综上可知, WPFLTPS 具有很强的抗氧化能力可以作为天然的抗氧化剂,应用前景广阔。

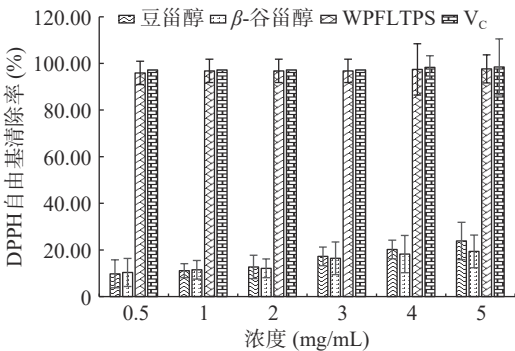


图 5 不同浓度野生火棘叶总黄酮对 DPPH 自由基清除能力  
Fig.5 DPPH free radical scavenging activities of different concentration of WPFLTPS

2.4.2 对 ABTS<sup>+</sup>自由基清除效果 由图 6 可知,在  $0.5\sim5\text{ mg/mL}$  范围内, WPFLTPS、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇对 ABTS<sup>+</sup>自由基均有不同程度的清除能力,随着浓度的增大清除作用也增大,达到一定程度后趋于平缓,呈良好的量效关系,其中 WPFLTPS 清除效果最佳,当浓度为  $5\text{ mg/mL}$  时,清除率高达  $99.81\%$ , 与阳性对照组  $V_C$  清除率持平,豆甾醇清除略高于  $\beta$ -谷甾醇,两者均明显低于 WPFLTPS。本研究结果发现火棘叶粗提物对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除作用比单体效果好,可能由于粗提物还含有其他黄酮类物质,其较强的抗氧化作用是各个单体化合物的协同作用。马雪洁等<sup>[28]</sup> 研究表明,异叶青兰总黄酮在  $0\sim1\text{ mg/mL}$  范围内对 ABTS<sup>+</sup>自由基有很好的清除作用,清除能力随着浓度增大而升高,而后趋于平稳,与本研究结果规律相似。

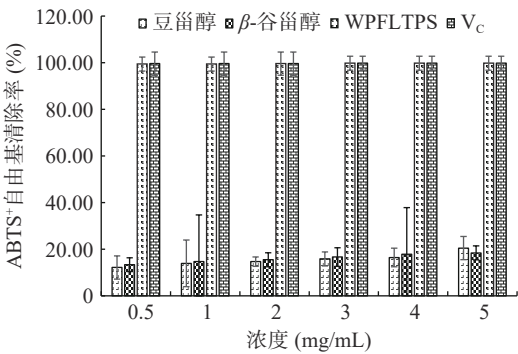


图 6 不同浓度野生火棘叶总黄酮对 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力  
Fig.6 ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging activities of different concentration of WPFLTPS

2.4.3 对亚硝酸根( $\text{NO}_2^-$ )清除效果 由图 7 可知,在  $0.5\sim5\text{ mg/mL}$  范围内, WPFLTPS、豆甾醇、 $\beta$ -谷甾醇对  $\text{NO}_2^-$ 均有不同程度的清除能力,随着浓度的增大清除作用也增大,呈良好的量效关系,其中 WPFLTPS 清除效果最佳,当浓度为  $5\text{ mg/mL}$ , 清除率达  $56.2\%$ , 低于阳性对照组  $V_C$  ( $98.00\%$ )。童钰琴等<sup>[17]</sup> 研究发现,苦荞皮总黄酮在  $2.64\text{ mg/mL}$  时对  $\text{NO}_2^-$ 清除率约为  $50\%$ , 清除能力随着浓度增大而升

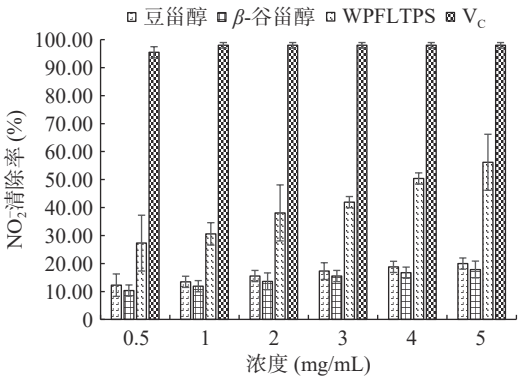


图 7 不同浓度野生火棘叶总黄酮对亚硝酸根离子的清除能力  
Fig.7  $\text{NO}_2^-$  scavenging activities of different concentration of WPFLTPS



高,而后趋于平稳,与本研究结果规律相似。吴海成<sup>[18]</sup>研究表明,玉米须甾醇的浓度为 2 mg/mL 时,NO<sub>2</sub><sup>-</sup>清除率达 78%,低于阳性对照组 V<sub>C</sub>(92%),亦与本研究结果规律相似。

综上所述,采用 3 种不同的体外抗氧化实验方法评价野生火棘叶总甾醇的抗氧化能力,结果发现,火棘叶总甾醇粗提物清除能力强于豆甾醇和  $\beta$ -谷甾醇单体化合物,可能与粗提物中还含有其他甾醇类物质有关,同时也可能由于豆甾醇和  $\beta$ -谷甾醇发挥协同作用产生较强的抗氧化作用,有待下一步研究。本次研究为新型天然抗氧化剂的开发提供科学依据,同时为野生火棘植物资源开发利用拓展了空间。

## 2.5 WPFLTPS 体外对酪氨酸酶活性的影响

2.5.1 对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制作用 由图 8 可知,在 0.5~5 mg/mL 范围内,WPFLTPS、豆甾醇对酪氨酸酶单酚酶活性均有不同程度的抑制作用,随着浓度的增大抑制作用也增强,呈良好的量效关系,其中 WPFLTPS 抑制效果最佳,当浓度为 5 mg/mL,抑制率高达 93.63%,其次是豆甾醇,抑制率达 82.53%,两者略低于阳性对照组熊果苷(抑制率为 96.77%)和 V<sub>C</sub>(抑制率为 99.28%)。

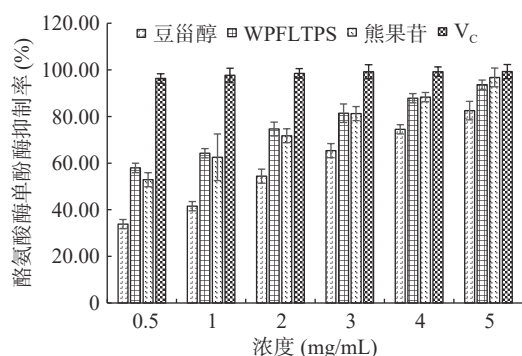


图 8 不同浓度野生火棘叶总甾醇对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制作用

Fig.8 Inhibitory effect of different concentration of WPFLTPS on the activity of monophenol oxidase in tyrosinase

王雅等<sup>[19]</sup>研究发现,在 0.1~5 mg/mL 范围内,孜然乙醇提取物不同溶剂萃取部位对酪氨酸酶单酚酶具有不同的抑制作用,随着浓度的增大抑制作用也增强,呈良好的量效关系,与本研究结果规律相似。因此,火棘叶甾醇提取物可作为一种较强的新型酪氨酸酶单酚酶的抑制剂,在食品、化妆品、医药等领域具有潜在的应用价值。

2.5.2 对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制作用 由图 9 可知,在 0.5~5 mg/mL 范围内,WPFLTPS、豆甾醇对酪氨酸酶二酚酶活性均有不同程度的抑制作用,随着浓度的增大抑制作用也增强,呈良好的量效关系,其中 WPFLTPS 抑制效果最佳,当浓度为 5 mg/mL,抑制率高达 82.53%,其次是豆甾醇,抑制率达 74%,两者趋近于阳性对照组 V<sub>C</sub>(抑制率为 100%)。黄佳楠等<sup>[29]</sup>研究发现,在 12.5~200  $\mu$ g/mL 范围内,黑果枸

杞果实提取物中花色苷对酪氨酸酶二酚酶有一定抑制作用,随着浓度的增大抑制作用也增强后趋于稳定,呈良好的量效关系,当浓度为 200  $\mu$ g/mL 时,抑制率达到最高约为 56.5%,与本研究结果规律相似。

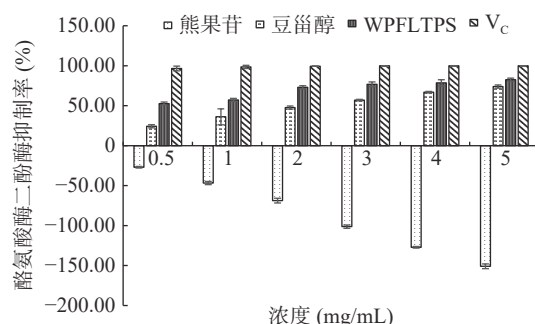


图 9 不同浓度野生火棘叶总甾醇对酪氨酸酶二酚酶活性的抑制作用

Fig.9 Inhibitory effect of different concentration of WPFLTPS on the activity of diphenolase oxidase in tyrosinase

通过本次研究发现,阳性对照组熊果苷对酪氨酸酶二酚酶呈现激活作用,当浓度为 5 mg/mL 时,抑制率为-150.99%,其原因可能与熊果苷药物浓度或与其对二酚酶敏感性相关,后期有待进一步探究。马燕燕等<sup>[30]</sup>研究发现,当浓度为 4 mg/mL 时,龙井、柿叶、贡菊、银杏叶对酪氨酸酶单酚酶的活性有明显的抑制作用,其中龙井的抑制率最高达到了 30.36%,而对二酚酶活力的抑制作用不明显,贡菊对酪氨酸酶二酚酶则表现出一定的激活作用(抑制率为-7.44%),与本研究结果规律相似。

综上所述,火棘叶总甾醇提取物、豆甾醇对酪氨酸酶有很好的抑制作用,其作用机制可能有以下几种原因:火棘叶中的甾醇类活性物质可以很好地清除氧自由基,减弱了酪氨酸的氧化反应;火棘叶甾醇作为竞争性底物,抑制了酪氨酸酶对酪氨酸的氧化作用;酪氨酸酶是一种以 Cu<sup>2+</sup>为辅助因子的金属酶,火棘叶总甾醇提取物中的活性基团与酪氨酸酶分子中的 Cu<sup>2+</sup>络合,影响了酶的活性<sup>[30]</sup>。

## 3 讨论与结论

实验室体外常用的抗氧化活性评价方法为自由基清除能力的测定,即在自由基溶液中加入抗氧化剂,根据所产生的光学差异来评估抗氧化活性<sup>[31]</sup>。此外,有研究表明,火棘果提取物有一定的美白效果,但在火棘叶中鲜见报道<sup>[32]</sup>。

因此,本文初步对野生火棘叶总甾醇的提取工艺及体外抗氧化和美白活性进行探究,采用超声辅助溶剂提取法,在单因素实验结果的基础上结合正交试验设计,优化得到最佳提取工艺参数为:提取溶剂无水乙醇,超声功率 400 W,超声温度 50  $^{\circ}$ C,料液比 1:16 g/mL,超声时间 25 min,此条件下火棘叶总甾醇得率为(11.00 $\pm$ 0.03)mg/g;接着采用 DPPH、ABTS 和亚硝酸盐法对火棘叶总甾醇抗氧化能力进行了分析,结果发现,火棘叶总甾醇很强的抗氧化能力,并呈

现剂量效应,可见火棘叶总甾醇可作为一种新型的天然抗氧化剂开展深入开发;最后采用对酪氨酸酶活性抑制作用,初步探究火棘叶总甾醇美白效果,结果发现,火棘叶总甾醇对酪氨酸酶单酚酶和二酚酶均有很强的抑制作用,且优于甾醇单体化合物豆甾醇,可见火棘叶总甾醇可作为一种新型的天然美白活性物质,应用于口服美白功能食品的研发。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 参考文献

- [1] YAO Y L, SHU C, FENG G, et al. Polysaccharides from *Pyracantha fortuneana* and its biological activity[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 1162–1174.
- [2] XU H, ZHAO C, LI Y, et al. The ameliorative effect of the *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H. L. Li extract on intestinal barrier dysfunction through modulating glycolipid digestion and gut microbiota in high fat diet-fed rats[J]. *Food Funct*, 2019, 10(10): 6517–6532.
- [3] 曾佳, 杨蓉, 李跃军, 等. 火棘的化学成分与药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 226–228. [ZENG J, YANG R, LI Y J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H. L.[J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 32(10): 226–228.]
- [4] 鄢又玉. 火棘果活性成分分析制备及其制剂基质研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016. [YAN Y Y. Research on analysis and preparation of active ingredients from *Pyracantha fortuneana* fruit and its pharmaceutical matrix[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2016.]
- [5] 乃戈日优, 李佩华, 彭正松, 等. 火棘的研究进展[J]. 四川农业科技, 2020, 4(10): 20–22. [NAI G R Y, LI P H, PENG Z S et al. Research progress of *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H. L.[J]. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 2020, 4(10): 20–22.]
- [6] 李三杰. 火棘果资源化学及其抗氧化作用研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011. [LI S J. The bioresource-chemistry and antioxidation of *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H. L.[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.]
- [7] 和玉凤, 杨少杰, 张雯, 等. 火棘不同组织中稀土元素含量的测定[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 257–260, 265. [HE Y F, YANG S J, ZHANG W, et al. Determination of the contents of rare earth elements in different tissues of *Pyracantha fortuneana*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(4): 257–260, 265.]
- [8] 张思. 南瓜籽甾醇的分离纯化及功能评价[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017. [ZHANG S. Isolation, purification and functional evaluation of pumpkin seed sterol[D]. Changsha: Agricultural University of Hunan, 2017.]
- [9] WANG Z, WANG M, LU Y, et al. Single-cell transcriptomics reveals the difference of aortic atherosclerosis response to phytosterols and oxidation products of sterols[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2023, 67(12): e2200811.
- [10] 王媛媛, 马改琴, 李跃凡, 等. 植物甾醇的提取纯化方法研究进展[J]. 中国油脂, 2024, 49(2): 114–122. [WANG Y Y, MA G Q, LI Y F, et al. Research progress on extraction and purification methods of phytosterols[J]. *China Oils and Fats*, 2024, 49(2): 114–122.]
- [11] 张冬阳. 薏米中 $\beta$ -谷甾醇的提取、分离、纯化及其功能性的研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2018. [ZHANG D Y. Extraction, separation, purification and functional research of  $\beta$ -sitosterol from coix seed[D]. Jinzhou: Jinzhou Medical University, 2018.]
- [12] 张云煊, 冯亚净, 崔兆蕊, 等. 小麦胚芽中植物甾醇提取条件优化的研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(5): 35–38. [ZHANG Y H, FENG Y J, CUI Z H, et al. Optimization on extraction of phytosterol from wheat germ by ultrasound-assisted method[J]. *Grain and Oil*, 2018, 31(5): 35–38.]
- [13] 孙莉莉, 王维宇, 王振强, 等. 热回流法提取米糠中植物甾醇的工艺优化及分离纯化[J]. 食品工业, 2021, 42(5): 63–66. [SUN L L, WANG W Y, WANG Z Q, et al. Optimization of extraction process of phytosterol from rice bran by heat reflux method and separation purification[J]. *Food Industry*, 2021, 42(5): 63–66.]
- [14] 靳若周, 李非凡, 曾媛媛, 等. 鹰嘴豆中植物甾醇的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 172–177, 184. [JIN R Z, LI F F, ZENG Y Y, et al. Optimization of extraction process of phytosterol from chickpea and its antimicrobial activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(24): 172–177, 184.]
- [15] 杨菁, 刘顶鼎, 陈滕, 等. 粉条儿菜总黄酮提取工艺优化及抗氧化、抗炎活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(2): 192–200. [YANG Q, LIU D D, CHEN T, et al. Extraction process optimization and antioxidant, anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Aletris spicata* (Thunb.) Franch.[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(2): 192–200.]
- [16] YISEOP K, YOUNGBAE K, KIHAN K A. study on DPPH and ABTS antioxidant activity and sensory evaluation of seolgitteok with walnut and health CRISIS (*Juglans Regia*) [J]. *Int J Crisis Safe*, 2021, 6(4): 2021.
- [17] 童钰琴, 李姝, 牛曼思, 等. 苦荞麸皮总黄酮体外抗氧化活性及体内解酒护肝作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 314–319, 326. [TONG Y Q, LI S, NIU M S, et al. Antioxidant activity of total flavonoids from tartary buckwheat bran *in vitro* and its effect on antialcoholism and liver protection *in vivo*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(17): 314–319, 326.]
- [18] 吴海成. 玉米须甾醇的提取纯化及抑菌活性[D]. 长春: 吉林大学, 2013. [WU H C. Extraction purification and antimicrobial activity of phytosterol from corn silk[D]. Changchun: Jilin University, 2013.]
- [19] 王雅, 杜国英, 邹红梅, 等. 孜然乙醇提取物的工艺优化及对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 164–169. [WANG Y, DU G Y, ZOU H M, et al. Optimization of extraction process of ethanol extracts from cumin (*Cuminum cyminum* L.) and measurement of anti-tyrosinase activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(9): 164–169.]
- [20] 彭思琪, 王娟. 香蕉皮总黄酮的提取及其抗氧化和抑制酪氨酸酶的活性[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(20): 132–140. [PENG S Q, WANG J. Antioxidant activity and inhibition on tyrosinase of total flavonoids extracted from banana peels[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(20): 132–140.]
- [21] 陈荣达, 史玉蕊, 刘桂明, 等. 紫娟茶花青素提取物抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 长春师范大学学报, 2020, 39(12): 90–93. [CHEN R D, SHI Y R, LIU G M, et al. Study on inhibitory effect of anthocyanin extract from Zi Juan tea on tyrosinase activity[J]. *Journal of Changchun Normal University*, 2020, 39(12): 90–93.]



- [22] 刘晓飞, 宋洁, 王薇, 等. 发芽糙米植物甾醇的提取优化及抗氧化性研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2019, 35(1): 44-48, 70. [LIU X F, SONG J, WANG W, et al. Study on extraction of phytosterol from germinated brown rice by ultrasonic assisted method and its antioxidant activity[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2019, 35(1): 44-48, 70.]
- [23] 曾夏雨, 何佳慧, 许泽文, 等. 超声波辅助提取玉竹植物甾醇工艺的优化[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5345-5348. [ZENG X Y, HE J H, XU Z W, et al. Optimization of extracting phytosterol from *Polygonatum odoratum* (Mill) Druce with ultrasonic assisted method[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(20): 5345-5348.]
- [24] 刘真阳, 张碧霄, 李非凡, 等. 白果中植物甾醇的提取工艺优化及体外释放研究[J]. 中国食物与营养, 2020, 26(8): 19-23. [LIU Z Y, ZHANG B Q, LI F F, et al. Extraction optimization and *in vitro* release of phytosterol from ginkgo[J]. Food and Nutrition in China, 2020, 26(8): 19-23.]
- [25] 龚晨, 高庆超, 常应九, 等. 沙棘甾醇化合物的分离纯化研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(9): 82-87. [GONG C, GAO Q C, CHANG Y J, et al. The separation and purification of sterol compound of *Hippophae rhamnoides* L.[J]. Food Research and Development, 2019, 40(9): 82-87.]
- [26] 贾硕. 黑灵芝甾醇组分制备、抑菌活性及其体外抗氧化活性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [JIA S. Preparation, antibacterial activity and antioxidant activity of sterol compound from *Ganoderma atrum* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]
- [27] 彭昕, 黄亮, 王平, 等. 雷竹笋总黄酮和总甾醇的抗氧化性与抑菌性[J]. 经济林研究, 2017, 35(3): 179-185. [PENG X, HUANG L, WANG P, et al. Antioxidant and antibacterial activities of total flavonoids and total sterols in *Phyllostachys praecox* shoots[J]. Nonwood Forest Research, 2017, 35(3): 179-185.]
- [28] 马雪洁, 程路峰, 杨淑梅, 等. 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1130-1133. [MA X J, CHENG L F, YANG S M, et al. Content determination of total flavonoid and its *in vitro* antioxidant activity of *Dracocephalum heterophyllum* Benth[J]. Central South Pharmacy, 2021, 19(6): 1130-1133.]
- [29] 黄佳楠, 管福琴, 李林蔚, 等. 黑果枸杞果实提取物中花色苷对酪氨酸酶活性的抑制作用初探[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(3): 75-77. [HUANG J N, GUAN F Q, LI L W, et al. Preliminary study on inhibitory effect of anthocyanins from fruit extracts of *Lycium ruthenicum* on tyrosinase activity[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2020, 29(3): 75-77.]
- [30] 马燕燕, 鲁晓翔. 龙井乙醚提取物对酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(11): 141-143. [MA Y Y, LU X X. Inhibitory mechanism of ethanol extracts from Longjing on tyrosinase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(11): 141-143.]
- [31] 王红, 彭励, 宋乐, 等. 银柴胡多糖超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 185-191. [WANG H, PENG L, SONG L, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction process and analysis of antioxidant activity of polysaccharide from *Stellariae Radix* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 185-191.]
- [32] 黄荣, 傅小红. 火棘黄酮的提取及美白功效研究[J]. 化学研究与应用, 2015, 27(3): 324-328. [HUANG R, FU X H. Research on the extraction of flavonoids from the fruits of *Pyracantha fortuneana* and their whitening activity[J]. Chemical Research and Application, 2015, 27(3): 324-328.]