

番石榴中结合多酚碱水解与酸水解法提取工艺优化的比较

骆亚丽¹,杨聪颖¹,肖航²,曹庸³,饶力群¹,郭时印²,唐忠海^{2*}¹湖南农业大学生物科学技术学院;²湖南农业大学食品科学技术学院,长沙 410128;³华南农业大学食品学院,广州 510642

摘要:以红心番石榴果肉的冻干粉末为实验材料,先提取游离多酚,剩下的残渣分别采用酸水解和碱水解法提取结合多酚。两种方法在单因素实验基础上,选择浓度、温度、时间这3个影响因素进行响应面设计。采用 Design Expert 8.0.6.1 软件进行响应面试验设计及数据分析,结果表明温度对结合多酚的得率影响显著,而且酸水解比碱水解获得的结合多酚多。最终确定为:碱水解最佳提取条件:NaOH 浓度为 7.24 mol/L,温度 98.22 °C,时间 24.88 h,此条件下结合多酚得率为 1.238%;酸水解最佳提取条件:HCl 浓度为 4.05 mol/L,温度 94.87 °C,时间 29.95 h,此条件下结合多酚得率为 2.002%。

关键词:番石榴;结合多酚;碱水解;酸水解;响应面法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.025

Optimization and Comparison of Alkali Extraction and Acid Extraction of Bound Polyphenols in *Psidium guajava* Linn.

LUO Ya-li¹, YANG Cong-ying¹, XIAO Hang², CAO Yong³, RAO Li-qun¹, GUO Shi-yin², TANG Zhong-hai^{2*}

¹College of Biological Science and Biotechnology, Hunan Agricultural University;

²College of Food Science and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

³College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In this study, the alkaline hydrolysis and acid hydrolysis conditions for extracting bound polyphenols were optimized with response surface method, after free polyphenols removed from the freeze-dried powder of *Psidium guajava*. Based on single factor experimental data, influences factors such as solution concentration, hydrolysis temperature and hydrolysis time on the extraction yield of bound polyphenols was optimized with response surface analysis. The optimized alkaline hydrolysis conditions for bound polyphenols were NaOH of 7.24 mol/L, hydrolysis temperature of 98.22 °C, hydrolysis time of 24.88 h, with the finally yield of bound polyphenols of 1.238%. The result showed that the optimized acid hydrolysis conditions were: HCl of 4.05 mol/L, hydrolysis temperature of 94.87 °C, hydrolysis time of 29.95 h, with the finally yield of bound polyphenol of 2.002%.

Key words: *Psidium guajava* Linn.; bound polyphenols; alkaline hydrolysis; acid hydrolysis; response surface methodology

番石榴 (*Psidium guajava* Linn.), 又称为芭乐, 俗名鸡矢果、拨子, 为桃金娘科番石榴属植物, 以果实入食或药, 原产美洲热带地区, 传入我国已有 300 多年历史, 主要引种栽培的省份有广东、广西、福建、海南、台湾^[1]。根据药典记载, 番石榴果实具有开胃消食、止泻通便、收敛、止痒、提高机体免疫力、消炎、治疗糖尿病、保肝护肝等多重功效^[2]。由于番

石榴具有丰富的营养和药用价值, 而引起了国内外的科研工作者的关注, 但是关于其结合多酚的研究甚少, 较多文献报道总多酚的提取方法、结构鉴定和生物活性。

植物多酚是分子中含有多个羟基结构的化合物, 在植物体内含量丰富且复杂的次生代谢产物, 其含量仅次于纤维素和木质素。植物多酚类化合物通过氢键、疏水作用或共价键与蛋白质、有机酸、胺类、脂类、碳水化合物以及其它酚类等结合成复合体而存在, 根据结合程度由疏至密依次可分为游离型、易溶的共轭型、结合型^[3]; 根据其碳骨架不同, 也可分为

收稿日期:2017-10-09 接受日期:2018-01-23

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31671858);湖南省教育厅青年基金(14B088)

* 通信作者 Tel:86-731-84617093;E-mail:tangzhonghai@hunau.edu.cn

简单酚、酚酸、萜醌、黄酮和异黄酮、单宁等不同种类^[4,5];根据多酚的萃取方法和结合方式将其可分为游离多酚(EPP)和结合多酚(NEPP)。以多种有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮)为提取剂,易提取出与植物中其他基质结合比较疏松或易溶解的酚类,常称为游离多酚,主要有游离型的黄酮类化合物、酚酸、二苯乙烯、木脂素等;而结合多酚则依然保留在提取游离多酚后的残渣中,其与细胞壁成分纤维素、脂蛋白等其它基质紧密结合,主要有原花青素类、难溶性酚酸、缩合单宁类^[6,7]。一般结合态多酚的提取,先用碱水解后再进行酸水解,即先用碱处理法使羟基酚酸类化合物游离出来,将水解产物酸化至 pH = 1~2,再用乙醚或乙酸乙酯等有机溶剂提取。Tang 等^[8]用酸、碱、酶水解三种方法提取藜麦种子中的结合多酚,上清液用乙酸乙酯和乙醚萃取。Su 等^[9]用 5 种不同溶剂提取荔枝果肉中的游离多酚,接着比较了结合多酚的酸碱水解两种提取方法,同时对 EPP 和 NEPP 进行了成分分析和抗氧化活性的测定。Matthews 等^[10]也指出可以从残渣中用硫酸水解的方法,分离制备不可萃取原花青素。

现有关于谷物、水果、中草药中多酚的提取纯化及生物活性研究的文献很多,其中对番石榴多酚的研究主要集中在总多酚或游离多酚及其含量的测定方面,而对于结合多酚的报道较少。本实验以红心番石榴果肉为原料,首先除去游离多酚,然后分别采用碱水解和酸水解的方法提取结合多酚,对酸碱浓度、水解温度、水解时间、料液比等因素进行了研究,并进一步采用响应面法对单因素进行优化,确定最佳提取方案并比较两种方法的区别。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

番石榴,2016 年 9 月采自福建漳州诏安;乙酸乙酯、丙酮、浓盐酸、甲醇、无水碳酸钠,均为分析纯,天津市大茂化学试剂厂;没食子酸标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:P2007F2387),Folin-ciocalteu 试剂(上海源聚生物科技有限公司)。Centrifuge 5424R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;FW177 型中草药粉碎机;AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵;R-1001N 型旋转蒸发仪;WB-2000 型水浴锅;Agilent-8453E 型紫外可见分光光度计(德国);SB5200DTS 双频超声波清洗机,宁

波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 没食子酸标准曲线的建立

参考 Dinarello CA^[11]方法并略作修改,准确称取 0.05 g 没食子酸标准品,加蒸馏水溶解后定容到 1 000 mL 容量瓶中,分别取 0.05 g/L 没食子酸标准溶液 0.1、2、3、4、5 mL 加入到 6 个 50 mL 棕色容量瓶中,分别加入 Folin-ciocalteu 试剂 4 mL,混匀后静置 3 min,再分别加入 10% Na₂CO₃ 溶液 4 mL,混匀后置于室温反应 90 min,于 765 nm 波长处测定吸光度,然后制作标准曲线, $Y = 83.914X + 5E-05$ ($R^2 = 0.9986$)。

1.2.2 游离多酚的提取

将新鲜番石榴削皮剔除籽,并把果肉、果皮和籽三者分开冻干,用粉碎机将冻干样品打碎成粉末,过 40 目筛,冷藏保存。以 200 g 干粉,按料液比 1:10 加入 80% 丙酮,常温下 200 W 超声提取 20 min,取出后 4 000 rpm 离心 15 min,分离上清液和滤渣。滤渣按前面步骤重复 2 次,合并上清液,在 37 °C 旋转蒸发。将浓缩物定容到 50 mL 棕色容量瓶中,得到游离多酚提取液,采用中上述的 Folin-Ciocalteu^[15]方法测定多酚含量。

1.2.3 结合多酚的提取

将滤渣用甲醇洗 3 次,蒸馏水洗 3 次,冻干后再用粉碎机打成细粉过 40 目筛。将滤渣粉末以一定的料液比用酸或碱加热水解,将水解液 pH 值调到 2,使用等体积的乙酸乙酯/乙醚(体积比 1:1)萃取 3 次,合并萃取液在 37 °C 旋转蒸发,将浓缩液用蒸馏水定容到 50 mL,得到结合多酚提取液,采用中 Folin-Ciocalteu 方法测定多酚含量。

1.2.4 单因素试验

取 1 g 滤渣干粉使用 HCl 或 NaOH 水解,研究不同酸碱浓度(2、4、6、8、10 mol/L)、水解温度(50、60、70、80、90、100 °C)水解时间(2、5、10、15、20、25 h)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)等因素对结合多酚得率的影响,结果见图 1。

1.2.5 响应面优化实验

在单因素实验基础上,选取较优的因素和水平,通过实验结果发现改变料液比对最后 NEPP 的得率影响不大,故剔除料液比这一因素,设计三因素三水平的响应面优化实验(表 1 和表 2)。运用 Design Expert 8.0.6.1 软件,根据 Box-Behnken 原理,以酸碱浓度、水解时间和水解温度为实验因素,NEPP 得率为响应值,确定 NEPP 水解的最佳条件。

表1 碱水解 Box-Behnken 设计因素水平及编码值

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design for alkaline hydrolysis experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
NaOH 浓度 NaOH concentration (mol/L)	4	6	8
水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	70	85	100
水解时间 Hydrolysis time (h)	15	20	25

表2 酸水解 Box-Behnken 设计因素水平及编码值

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken design for acid hydrolysis experiment

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
HCl 浓度 HCl concentration (mol/L)	4	6	8
水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	75	85	95
水解时间 Hydrolysis time (h)	18	24	30

2 结果与分析

2.1 没食子酸标准曲线的建立

根据 1.2.1 实验结果,以没食子酸浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)对吸光度(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.083914X + 5E-05$ ($R^2 = 0.9986$),吸光度在质量浓度为 1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间线性关系良好。

2.2 碱水解分析

2.2.1 碱水解单因素结果分析

在固定料液比 1:10,水解时间 2.5 h,水解温度 45 °C 后用盐酸调 pH 至 2,用乙酸乙酯/乙醚(体积比 1:1)萃取 3 次,由图 1(A)可以看出 NaOH 的浓度(mol/L)在 2~6 范围内番石榴 NEPP 得率有上升的趋势,在 6~10 范围内 NEPP 得率下降的趋势明显,6 mol/L NaOH 水解得到的 NEPP 最多。由于 NaOH 的浓度过低或过高均不利于 NEPP 的提取,为提高多酚含量,选择 4、6、8 mol/L 3 个水平进行响应面优化试验。在固定料液比 1:10,水解时间 2.5 h,NaOH 的浓度 6 mol/L,研究水解温度(45、50、60、70、80、90、100 °C)对 NEPP 提取的影响。由图 1(B)可以看出水解温度对 NEPP 得率影响较大,随着温度的上升 NEPP 得率呈一直上升趋势,考虑水浴温度不能超过 100 °C,故选择 70、85、100 °C 3 个水平进行响应面优化试验。在固定水解时间 2.5 h,水解温度 45 °C,NaOH 的浓度 6 mol/L,研究料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)对 NEPP 提取的影响。由图 1(C)可以看出当料液比超过 1:10 时 NEPP 得率有所下降,与其他因素比较而言,料液比对 NEPP 的得率增加较小,考虑在工艺生产中不增加后续浓缩工序的负担和减少时间劳动成本及减少工艺中废液对环境的污染,故下一步固定料液比为 1:10。在固定料液比 1:10,NaOH 的浓度 4 mol/L,水解温度 80 °C,研究水解时间(h)对 NEPP 提取的影响,由图 1(D)可以看出当水解加热时间为 20 h 时,NEPP 的得率达到最大,随着加热时间的继续延长,NEPP 的得率反而下降。根据实验结果,选择加热时间 15、20、25 h 3 个水平进行响应面分析。

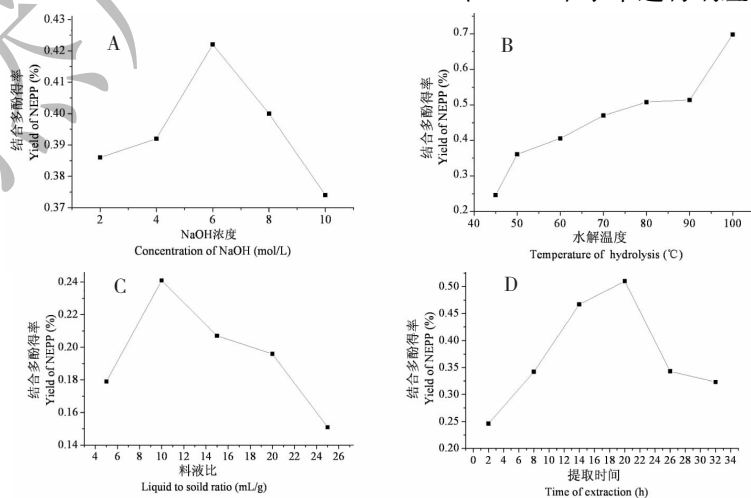


图1 NaOH 浓度(A)、水解温度(B)、液料比(C)及水解时间(D)对番石榴果肉结合多酚得率的影响

Fig. 1 Effect of NaOH concentration (A), hydrolysis temperature (B), hydrolysis time (C) and liquid to solid ratio (D) on yield of NEPP from *P. guajava*

2.2.2 NEPP 提取响应面实验实验结果

根据 1.2.5 设计,得到实验结果见表 2 和表 3。番石榴 NEPP 水解的实际因素(非编码方程)回归方程为: $Y = 4.33591 - 0.054617X_1 - 0.066108X_2 - 0.17496X_3 - 1.03333E - 003X_1X_2 + 5.30000E - 003X_1X_3 + 2.46667E - 004X_2X_3 + 4.91250E - 003X_1^2 + 5.16222E - 004X_2^2 + 3.36600E - 003X_3^2$ 式中 X_1 为 NaOH 浓度, X_2 为水解温度, X_3 为水解时间, Y 为 NEPP 得率。由表 3 可知,除 NaOH 浓度、NaOH 浓度水解时间交互、NaOH 浓度水解温度交互、水解温度水解时间的交互、NaOH 浓度 NaOH 浓

度交互作用不显著外,其他项均显著;实验选用的模型($P = 0.001$)极显著,失拟项($P > 0.05$)不显著,表明该响应面模型用于优化 NEPP 得率工艺是可行的。信噪比 Adeq Precisor = 17.759 比较高,说明该模型可以用于预测,而模型校正判定系数 $R_{adj}^2 = 0.9359$,表明 93.59% 的数据可以用此方程解释。判定系数 $R^2 = 0.9720$,说明模型拟合程度良好,可以使用该模型分析和预测番石榴 NEPP 的得率。综合上述分析,此方程能很好地分析和预测所建模型,模拟证实 3 因素 3 水平分析可行。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

实验号 No.	A:NaOH 浓度 NaOH concentration (mol/L)	B:水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	C:水解时间 Hydrolysis time (h)	结合多酚得率 Yield of NEPP (%)
1	6	100	15	1.08
2	8	100	20	1.176
3	6	85	20	0.692
4	4	85	15	0.746
5	6	100	25	1.234
6	6	85	20	0.616
7	6	85	20	0.628
8	6	85	20	0.648
9	4	70	20	0.376
10	4	85	25	0.772
11	6	70	15	0.546
12	8	85	25	0.91
13	8	70	20	0.586
14	8	85	15	0.672
15	6	70	25	0.626
16	4	100	20	1.09
17	6	85	20	0.772

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Variance analysis for each item of regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	0.91	9	0.1	26.95	0.0001***
A	0.016	1	0.016	4.33	0.0759
B	0.75	1	0.75	200.07	< 0.0001***
C	0.031	1	0.031	8.29	0.0237*
AB	3.84E-03	1	3.84E-03	1.03	0.3443

续表 3 (Continued Tab. 3)

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
AC	0.011	1	0.011	3.01	0.126 6
BC	1.37E-03	1	1.37E-03	0.37	0.564 2
A ²	1.63E-03	1	1.63E-03	0.43	0.530 7
B ²	0.057	1	0.057	15.2	0.005 9**
C ²	0.03	1	0.03	7.98	0.025 6*
残差 Residual	0.026	7	3.74E-03		
失拟项 Lack of Fit	0.01	3	3.37E-03	0.84	0.538 2
纯误差 Pure Error	0.016	4	4.01E-03		
总和 Cor Total	0.93	16			

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

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

2.2.3 NEPP 水解响应面图分析

从图 2-A 可以看出,温度的变化曲面较陡,说明温度对 NEPP 萃取率的影响较大,番石榴 NEPP 得率随着 NaOH 浓度升高也升高,水解温度变化趋势亦如此。从等高线图可以看出,水解温度轴向等高

线比 NaOH 浓度密集,表明水解温度对番石榴 NEPP 得率影响较大。从图 2-B 可以看出,水解时间的变化曲面比 NaOH 浓度陡,说明水解时间对 NEPP 得率的影响较大,番石榴 NEPP 得率随着水解温度升高也升高,NaOH 浓度变化趋势亦如此。从等高线

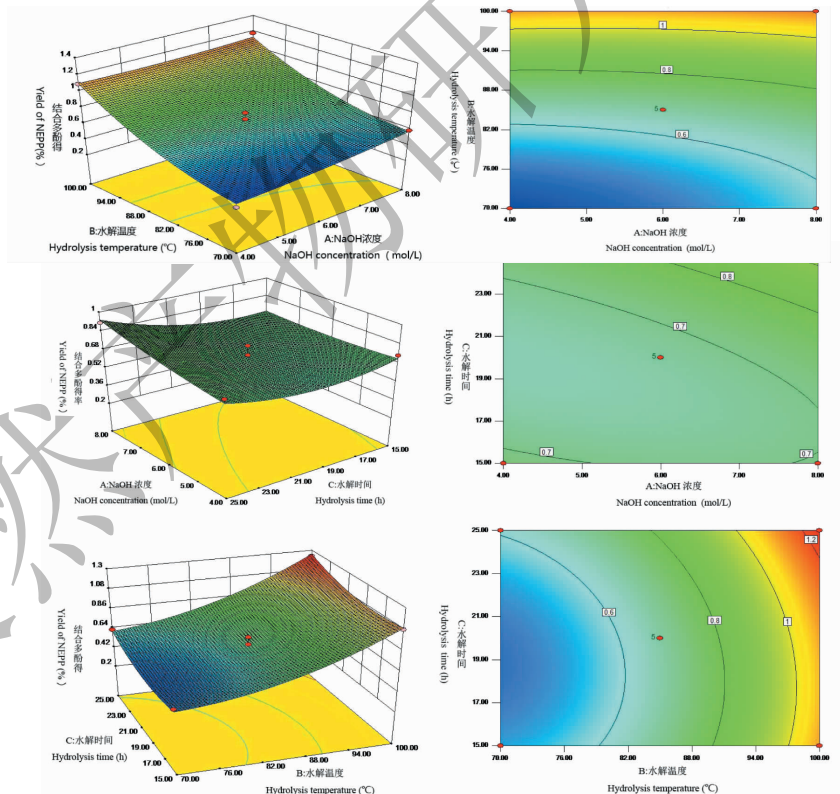


图 2 NaOH 浓度和水解温度 (A)、NaOH 浓度和水解时间 (B) 及水解温度和水解时间 (C) 对番石榴结合多酚得率影响的响应面及等高线图

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

图可以看出,水解时间轴向等高线比 NaOH 浓度密集,表明水解时间对番石榴 NEPP 得率影响较大。从图 2-C 可以看出,温度的变化曲面很陡,说明温度对 NEPP 得率的影响较大,番石榴 NEPP 得率随着水解温度升高也升高,水解时间变化趋势亦如此。从等高线图可以看出,水解温度轴向等高线比水解时间密集,表明水解温度对番石榴 NEPP 得率影响较大,等高线最小椭圆的中心在所选范围之内,表明响应值在 3 个因子设计的范围内存在最大值。

2.2.4 最优提取工艺验证

在节约成本同时使 NEPP 提取率尽可能高的前提下,通过响应面模型及其软件优化得到的最佳工艺条件为:NaOH 浓度 7.24 mol/L,水解温度 98.22 °C,水解时间 24.88 h,此时 NEPP 得率最大理论值为 1.238%。为检验该模型的可靠性,按照上述最优方案进行 3 组平行实验。实际提取条件:NaOH 浓度 7 mol/L,水解温度 98 °C,水解时间 25 h,对 3 组结果取平均值,所得 NEPP 提取率为 1.224%,实际值与预测值接近。可见此模型符合要求,可用于优化番石榴 NEPP 提取工艺。

2.3 酸水解分析

2.3.1 酸水解单因素结果分析

在固定料液比 1:10,水解温度 80 °C,水解时间 4 h 后用 NaOH 调 pH 至 2,用乙酸乙酯/乙醚(体积比 1:1)萃取 3 次,研究 HCl 的浓度对 NEPP 提取的

影响。由图 3(A)可以看出在 2~6 mol/L 范围内,NEPP 的得率明显上升,在 6 mol/L 时最高,之后随着浓度的增大 NEPP 的得率反而下降。由于 HCl 的浓度过低或过高均不利于结合多酚的提取,为提高多酚含量,选择 4、6、8 mol/L 3 个水平进行响应面优化试验。在固定料液比 1:10,HCl 的浓度 6 mol/L,水解时间 4 h,研究水解温度(60、70、80、90、100 °C)对 NEPP 提取的影响。由图 3(B)可以看出水解温度对 NEPP 得率影响较大,在 60~100 °C 范围 NEPP 得率有明显的上升趋势,考虑水浴温度不能超过 100 °C,故选择 75、85、95 °C 3 个水平进行响应面优化试验。固定水解温 80 °C,HCl 的浓度 6 mol/L,水解时间 4 h,研究(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)对 NEPP 提取的影响。由图 3(C)可以看出当料液比超过 1:25 时 NEPP 得率有所下降,与其他因素比较而言,料液比对 NEPP 的得率增加较小,料液比不作为响应面的参考因素,考虑到成本问题,下一步固定料液比为 1:25。在固定料液比 1:25,4 mol/L HCl,水解温度 80 °C,研究水解时间(h)对 NEPP 提取的影响。由图 3(D)可以看出水解时间在 4~24 h 范围内番石榴 NEPP 得率有上升的趋势,在 24~36 h 范围内 NEPP 得率有下降的趋势,水解 24 h 得到的 NEPP 最多,随着加热时间的继续延长,NEPP 的得率反而下降。根据实验结果,选择加热时间 18、24、30 h 这 3 个水平进行响应面分析。

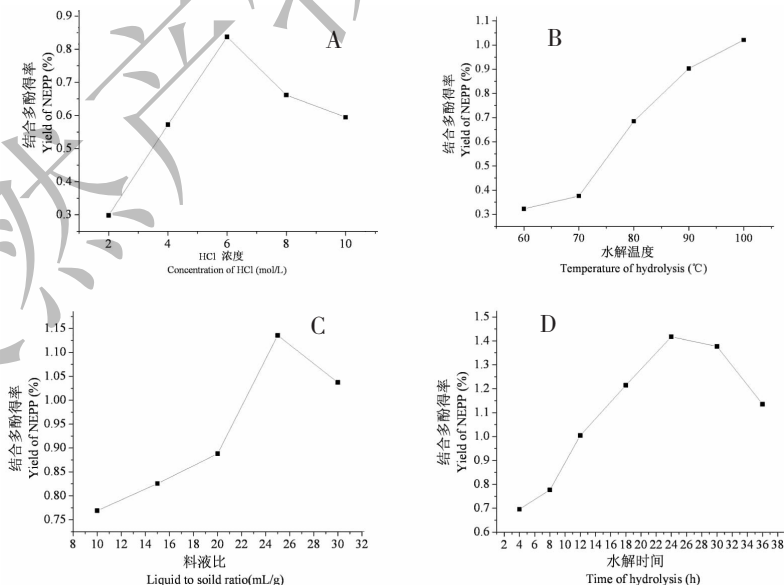


图 3 HCl 浓度(A)、水解温度(B)、液料比(C)及水解时间(D)对番石榴果肉结合多酚得率的影响

Fig. 3 Effect of HCl concentration (A), hydrolysis temperature (B), hydrolysis time (C) and liquid to solid ratio (D) on yield of NEPP from *P. guajava*

2.3.2 酸水解响应面分析

根据 1.2.5 设计,得到实验结果见表 4 和表 5。番石榴 NEPP 酸水解的实际因素(非编码方程)回归方程为: $Y = 5.89723 + 1.76674X_1 - 0.32704X_2 + 0.25382X_3 - 5.15000E - 003X_1X_2 - 0.029188X_1X_3 + 1.47917E - 003X_2X_3 - 0.063212X_1^2 + 1.99650E - 003X_2^2 - 3.61389E - 003X_3^2$ 式中 X_1 为 HCl 浓度, X_2 为水解温度, X_3 为水解时间, Y 为 NEPP 得率。由表 3 可知,除 HCl 浓度与水解温度交互、水解温度与水解时间交互作用不显著外,其他项均显著;实验选用

的模型($P = 0.0004$)极显著,失拟项($P > 0.05$)不显著,表明该响应面模型用于优化 NEPP 工艺是可行的。信噪比 Adeq Precisor = 15.307 比较高,说明该模型可以用于预测,而模型校正判定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9075$,表明 90.75% 的数据可以用此方程解释。判定系数 $R^2 = 0.9595$,说明模型拟合程度良好,可以使用该模型分析和预测番石榴 NEPP 的得率。综合上述分析,此方程能很好地分析和预测所建模型,模拟真实的 3 因素 3 水平分析可行。

表 4 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and the results

实验号 No.	A: HCl 浓度 HCl concentration (mol/L)	B: 水解温度 Hydrolysis temperature (°C)	C: 水解时间 Hydrolysis time (h)	结合多酚得率 Yield of NEPP (%)
1	6	85	24	1.054
2	4	95	24	1.65
3	6	95	30	1.496
4	8	95	24	0.788
5	8	85	30	0.314
6	6	95	18	0.962
7	6	85	24	1.054
8	6	85	24	1.001
9	6	85	24	1.169
10	4	85	18	0.312
11	8	75	24	0.542
12	4	85	30	1.399
13	6	85	24	0.953
14	8	85	18	0.628
15	4	75	24	0.992
16	6	75	18	0.913
17	6	75	30	1.092

表 5 回归方程方差分析

Table 5 Variance analysis for each item of regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	2.1	9	0.23	18.45	0.0004***
A	0.54	1.00E+00	0.54	42.74	0.0003***
B	0.23	1	0.23	18.17	0.0037**
C	0.28	1.00E+00	0.28	21.79	0.0023**
AB	0.042	1.00E+00	0.042	3.35	0.1099
AC	0.49	1	0.49	38.74	0.0004***
BC	0.032	1	0.032	2.49	0.1588
A ²	0.27	1.00E+00	0.27	21.25	0.0025**

续表 5 (Continued Tab. 5)

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
B ²	0.17	1.00E+00	0.17	13.25	0.008 3 * *
C ²	0.071	1.00E+00	0.071	5.63	0.049 5 *
残差 Residual	0.089	7	0.013		
失拟项 Lack of Fit	0.063	3	0.021	3.23	0.143 8
纯误差 Pure Error	0.026	4	6.48E-03		
总和 Cor Total	2.19	16			

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

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

2.3.3 NEPP 水解响应面图分析

从图 4-A 可以看出,温度的曲面变化显著而且一直呈上升的趋势,HCl 浓度变化曲面没有温度那么显著,说明温度对 NEPP 萃取率的影响较大,与方差分析结果一致。番石榴 NEPP 得率随着 HCl 浓度先升高后降低。从等高线图可以看出,水解温度轴向等高线比 HCl 浓度密集,表明水解温度对番石榴 NEPP 得率影响较大。从图 4-B 可以看出,水解时间的变化曲面比 HCl 浓度陡,说明水解时间对 NEPP 萃取率的影响较大,番石榴 NEPP 得率随着水解温度升高也升高,HCl 浓度先升高后降低。从等高线图可以看出,水解时间轴向等高线比 HCl 浓度密集,表明水解时间对番石榴 NEPP 得率影响较大。从图 3-C 可以看出,温度的变化曲面很陡,说明温度对 NEPP 萃取率的影响较大,番石榴 NEPP 得率随着水解温度升高也升高,水解时间变化趋势亦如此。从等高线图可以看出,水解温度轴向等高线密集,水解时间轴向等高线稀疏,表明水解温度对番石榴 NEPP 得率影响较小,等高线的中心在所选范围之内,表明响应值在 3 个因子设计的范围内存在最大值。酸水解最佳条件:HCl 浓度 4.05 mol/L,水解温度 94.87 °C,水解时间 29.95 h,这个结果与单因素有出入,可能因为浓度、水解温度、水解时间三者之间相互影响。

2.3.4 最优提取工艺验证

在节约成本同时使 NEPP 得率尽可能高的前提下,通过响应面模型及其软件优化得到的最佳工艺条件为:HCl 浓度 4.05 mol/L,水解温度 94.87 °C,水解时间 29.95 h,此时 NEPP 得率最大的理论值为 2.002%。为检验该模型的可靠性,按照上述最优方案进行 3 组平行实验。实际提取条件:HCl 浓度 4 mol/L,水解温度 95 °C,水解时间 30 h,对 3 组结果

取平均值,所得 NEPP 得率为 2.021%,实际值与预测值接近。可见此模型符合,可用于优化番石榴 NEPP 提取工艺。

3 讨论与结论

从单因素实验结果发现料液比对 NEPP 得率影响不大,进一步通过响应面分析确定出的最佳提取条件为:NaOH 浓度 7 mol/L,水解温度 98 °C,水解时间 25 h,NEPP 得率为 1.224%;HCl 浓度 4 mol/L,水解温度 95 °C,水解时间 30 h,NEPP 得率为 2.021%。阎海青^[12]碱法提取新鲜蓝莓中的 NEPP,获得最大多酚提取率为 5.43%,Li F 等采用 FC 法测定了国内 62 种水果的总酚含量,其中番石榴的多酚含量为 194.11 ± 7.01 mg galic acid equiv./100 g FW^[13]。Mahattanatawee K 等研究了 14 种美国主要消费的热带水果多酚,其中红心番石榴的总酚含量最高,为 231.67 ± 167.6 mg galic acid equiv./100 g FW,白心番石榴的总酚含量为 158.93 ± 75.4 mg galic acid equiv./100 g FW,次于杨桃 220.77 ± 15.67 158.93 ± 75.4 mg galic acid equiv./100 g FW^[14]。而在 Contreras-Calderón J 等研究的哥伦比亚 24 种常见水果中,番石榴的总酚含量为 192 ± 11.51 mg galic acid equiv./100 g FW^[15]。曹双通过碱水解法提取红心番石榴结合多酚,其 NEPP 含量为 12.41 ± 1.1 mg galic acid equiv./100 g FW^[16]。本实验 NEPP 最大得率为 2.021%,即 246.562 mg galic acid equiv./100 g FW,本实验结合多酚得率高于大多学者的多酚提取方法获得的多酚得率,可见本实验在前人的研究基础上对 NEPP 的提取有一定的突破。

碱水解番石榴 NEPP 时,温度和时间对 NEPP 得率影响显著,而且温度影响尤其显著。酸水解番

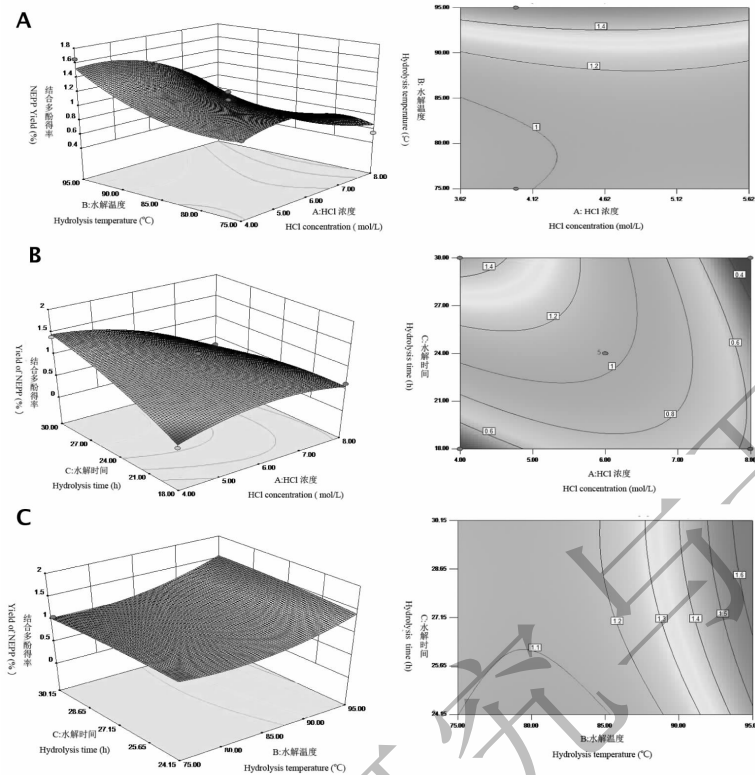


图4 HCl浓度和水解温度(A)、HCl浓度和水解时间(B)及水解温度和水解时间(C)对番石榴结合多酚得率影响的响应面及等高线图

Fig. 4 Response surface plots and contour plots showing the effects of HCl concentration and hydrolysis temperature (A), HCl concentration and hydrolysis time (B) as well as hydrolysis temperature and hydrolysis time (C) on the extraction yield of NEPP from *P. guajava*

石榴 NEPP 时这 3 个因素都对 NEPP 得率影响显著,影响顺序由大到小依次为浓度、时间、温度。单因素试验和响应面实验结果都显示,碱水解所需的最优时间比酸水解时间短,并且碱水解法获得的 NEPP 比酸水解法低,可能是酸水解更多打断了 NEPP 与结构蛋白、膳食纤维等的结合。Tang 分别用酸、碱、酶水解三种方法提取藜麦种子中结合多酚^[8],其中酸水解白藜麦得到的结合多酚为 $1.445 \pm 0.00785 \text{ mg/g}$,碱水解得到 $1.248 \pm 0.00929 \text{ mg/g}$,另外酸水解黑藜麦和红藜麦得到的结合多酚也比碱水解的多,这可能与多酚在酸性条件下可以稳定存在,而在碱性条件下会被降解有关。后期将这两种水解方法获得的 NEPP 进行成分分析以及活性测定,进一步探索两者的区别及差异存在的原因。

参考文献

1 Liu JM (刘建林), Xia MZ (夏明忠), Yuan Y (袁颖). *Psidium guajava* integrated utilization and its development

prospects in China [J]. *Forest By-Product Special China* (中国林副特产), 2005, 6: 60-62.

2 Wen J (温靖), Xu YJ (徐玉娟), Xiao GS (肖更生), et al. Research progress on nutritional value, pharmacological action and processing utility of guava fruit [J]. *Acad Period Farm Prod Proc* (农产品加工学刊), 2009, 3: 11-13.

3 Adams BK, Cai JY, Armstrong J, et al. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2005, 16: 263-275.

4 Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, et al. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines [J]. *Biochem Pharm*, 2007, 73: 1024-1032.

5 Li FH (李富华). The antioxidant and antiproliferative activities of phenolics extracted from Buck wheat [D]. Chongqing: Southwest University (西南大学), 2014.

6 Dykes L, Rooney LW. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits [J]. *Cereal Food World*, 2007, 52:

- 105-111.
- 7 Perez-jimenez J, Torres JL. Analysis of non-extractable phenolic compounds in foods: the current state of the art [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 12713-12724.
- 8 Tang Y, Zhang B, Li XH, *et al.* Bound phenolics of quinoa seeds released by acid, alkaline, and enzymatic treatments and their antioxidant and A-Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 1712-1719.
- 9 Su DX, RF, Hou FL, *et al.* Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents [J]. *J BMC Complem Altern M*, 2014, 14: 3-10.
- 10 Matthews S, Mila I, Augustin S. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45: 405-410.
- 11 Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism [J]. *Blood*, 1991, 77: 1627-1652.
- 12 Yan HQ (阎海青), Qu JR (曲静然), Chen XY (陈相艳), *et al.* Optimization of alkali extraction for non-extractable polyphenols from blueberries by response surface methodology. *Food Sci Technol* (食品科技), 2013, 38: 203-208.
- 13 Li F, Xu BT, Xu XR, *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 32 fruits [J]. *Food Chem*, 2011, 129: 345-350.
- 14 Mahattanatawee K, Manthey J, Luzio G. Total antioxidant activity and fiber content of select florida-grown tropical fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 54: 7355-7333.
- 15 José CC, Lilia CJ. Antioxidant capacity of phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombi [J]. *Food Res Int*, 2011, 44: 2047-2053.
- 16 Cao S (曹双). Antioxidant and antitumor activities of phenolics from guava (*Psidium guajava* L.) [D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2014.

(上接第 1218 页)

- 13 Jiang L, Zhang L, Kang K, *et al.* Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 130-138.
- 14 Lin ZS, Ku CF, Guan YF, *et al.* Dihydro-resveratrol ameliorates lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis [J]. *Phytother Res*, 2016, 30: 663-670.
- 15 Torun AC, Tutuncu S, Ustun B, *et al.* A study of the therapeutic effects of resveratrol on blunt chest trauma-induced acute lung injury in rats and the potential role of endocan as a biomarker of inflammation [J]. *Inflammation*, 2017, 40: 1803-1810.
- 16 Li CS (李朝胜), Sun QY (孙黔云). Effect of three chemical molecules on adhesion molecules expression in HEMCs induced by activated complement alternative pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2015, 31: 1421-1426.