

枸杞子结合多酚碱水解与酸水解提取工艺的比较和产物分析

王妍^{1,2}, 曾文俊^{1,2}, 张玉婷¹,
布尔汉·洁吾海尔阿依¹, 李艳萍³, 丁建宝^{1,3}, 李烧烧⁴, 杨晋^{1,2,5*}

¹北方民族大学化学与化学工程学院; ²国家民委化工技术基础重点实验室, 银川 750021;

³宁夏五行科技有限公司, 银川 750001; ⁴中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

⁵宁夏天然药物工程技术研究中心, 银川 750021

摘要: 为了全面评估枸杞子中的酚类成分, 本研究分别利用碱水解和酸水解法制备了其中的结合多酚 (non-extractable phenolic compounds, NEPC)。选取 Box-Behnken 实验设计建立了酸或碱的浓度、水解时间和料液比等与 NEPC 得率之间的数学模型, 并优化了水解工艺参数。碱水解过程中的时间对 NEPC 得率影响显著, 而料液比对酸水解的结果影响较大; 最佳工艺条件下, 碱水解和酸水解获得的 NEPC 分别为 0.65 ± 0.05 mg/100 g 和 0.52 ± 0.03 mg/100 g。利用 UPLC-Q-TOF-MS, 从水解产物中解析了 11 种化合物, 主要是苯丙素衍生物。11 种化合物都可在酸水解产物中被检出, 而碱水解产物中仅鉴定出 4 种物质。研究表明, 碱水解能得到更多的 NEPC, 酸水解产物则表现出良好的化合物多样性, 因此制备 NEPC 时, 应根据不同的研究目的选择水解方法。

关键词: 枸杞子; 结合多酚; 碱水解; 酸水解; 工艺优化; 产物分析

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)4-0632-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.4.010

Comparison of alkaline and acid hydrolysis extraction of non-extractable phenolic compounds in Lycii Fructus and hydrolysates analysis

WANG Yan^{1,2}, ZENG Wen-jun^{1,2}, ZHANG Yu-ting¹,
BURHAN Jawharay¹, LI Yan-pin³, DING Jian-bao^{1,3}, LI Rao-rao⁴, YANG Jin^{1,2,5*}

¹School of Chemistry and Chemical Engineering, North Minzu University; ²Key Laboratory for Chemical Engineering and Technology, State Ethnic Affairs Commission, Yinchuan 750021, China;

³Ningxia Wuxing Science and Technology Co., Ltd., Yinchuan 750001, China;

⁴Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

⁵Ningxia Research Center for Natural Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750021, China

Abstract: In order to comprehensively evaluate the phenolic components in Lycii Fructus, this study prepared non extractable phenolic compounds (NEPC) from Lycii Fructus after removing free polyphenols using alkaline hydrolysis and acid hydrolysis, respectively. The Box-Behnken experimental design method was selected to establish a mathematical model between NEPC yield and hydrolysis conditions, such as acid or alkali concentration, hydrolysis time, and material liquid ratio. The results of the response surface experimental design analysis indicated that in alkaline hydrolysis, the hydrolysis time has a significant impact on the yield of NEPC, but in acid hydrolysis, the ratio of material to liquid in acid hydrolysis has a considerable impact on the outcomes. Under the optimum circumstances, the yield of NEPC were 0.65 ± 0.05 mg/100 g for the alkaline hydrolysis process and 0.52 ± 0.03 mg/100 g for acid hydrolysis procedure, respectively. The chemical components in the hydrolysates were analyzed using UPLC-Q-TOF-MS. Eleven compounds were identified, which were the phenylpropanoids. In conclusion, the acid hydrolysate contained eleven compounds, while the alkali hydrolysis products had only four substances. Alkali hydrolysis produced more NEPC, whereas acid hydrolysate showed a good diversity of chemicals. Hence, different hydrolysis methods

收稿日期: 2023-09-11

接受日期: 2024-01-24

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(2023AAC03280); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(对外合作专项)(2020BFG2016)

* 通信作者 Tel: 86-951-2067917; E-mail: yang_jin@nun.edu.cn

should be chosen for different research purposes while preparing NEPC.

Key words: Lycii Fructus; non-extractable phenolic compounds; alkaline hydrolysis; acid hydrolysis; process optimization; hydrolysates analysis

酚类物质广泛分布于植物界,包括黄酮类、类黄酮、花青素、儿茶素等^[1],是植物中含量最丰富的次生代谢产物之一。因其强大的抗氧化特性及其在预防各种氧化应激相关疾病,如抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血压、降血糖、降血脂等方面的显著作用^[2-3],食品和天然药物/中药中的酚类物质受到越来越多的关注^[4]。在植物体内,酚类的存在形式有游离态和结合态,即可以被溶剂提取的可溶性酚类物质和不能被溶剂直接提取的结合酚类(non-extractable phenolic compounds, NEPC),后者通过酯键、糖苷键等共价键与大分子,如糖类、半纤维素、果胶、蛋白质结合,是酚类成分在植物体内的主要存在形式^[5]。对食品中的酚类物质研究发现,NEPC比游离的酚类物质表现出更好的生物活性,如相较于游离酚类,谷物中的NEPC表现出更高的过氧自由基清除能力和细胞抗氧化活性^[6]。通常认为,植物体内的酚类物质能否发挥生物活性,与其生物利用度密切相关^[7]。药物代谢研究发现,游离酚类可能受到消化液的影响发生降解,而NEPC因与大分子相连而免于被消化,进入肠道后受肠道微生物水解从而发挥生物活性^[8],甚至表现出类似缓释制剂的效应^[9],另外,还有一部分NEPC会转化为其他化合物影响人体^[10]。因此,对食品和天然药物/中药中的NEPC做深入分析,有助于全面评估酚类物质的生物活性。

枸杞子是茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,现代药理研究表明,枸杞子具有多种潜在的生物活性,这些生物活性大多与抗氧化活性相关,而抗氧化活性是枸杞多糖和酚类化合物的协同作用^[11]。本研究组在前期研究中发现,枸杞多糖的碱水解产物中可以检出没食子酸和阿魏酸^[11,12],说明其中含有NEPC,而相关分析结果提示,枸杞子中的NEPC在其抗氧化活性中发挥着重要的作用。目前,对枸杞子中的酚类物质的研究大多集中在可溶性酚类上^[13]。对NEPC的忽视,可能低估了枸杞子酚类物质的总含量、抗氧化能力及其对人体健康的积极影响。

分析NEPC,首先要采用适当的水解方法,破坏酯键和糖苷键,释放酚类成分。目前,文献中最常使用的水解方法是酸水解和碱水解^[3]。大约有30%

左右的研究采用酸(常用盐酸或硫酸)来水解NEPC与大分子之间的共价键,相较于碱水解,酸水解能够释放更多的酚类成分^[4],但是酸水解需要的高温、高酸性条件和长时间的水解往往可能造成酚类成分的降解。植物中常见的酚类成分,如阿魏酸等常以酯键与细胞壁结合,大多数的研究采用碱水解来分析植物中的NEPC。用氢氧化钠等无机碱水解NEPC时,不需要很高的温度,但是往往需要在氮气保护下避光反应,以免酚类成分被降解^[14,15]。

为了全面评估枸杞子中的酚类成分,本研究在去除枸杞子中的游离酚类成分后,分别采用酸水解和碱水解,以酚类成分的得率为评价指标,利用单因素试验和响应面法评估了酸碱浓度、水解时间和料液比对评价指标的影响,优化了碱水解和酸水解的工艺条件;并采用UPLC-Q-TOF-MS比较了不同水解方法得到的样品中的酚类成分,为针对不同的酚类成分选择合适的水解方法提供了参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);HZH-H水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);721G可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);Waters UHPLC-Q-TOF-MSE超高效液相色谱系统和Xevo G2-S Q-TOF质谱系统(美国Waters公司)。

1.2 试剂

枸杞子购于宁夏中宁县,在产地调研的基础上,丁建宝高级工程师鉴定为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,样品(NO. 20221015)保存于北方民族大学化工学院406B实验室。

没食子酸对照品(批号B20851,质量分数98%,上海泰坦科技股份有限公司);福林酚试液(批号2022121560,北京北方伟业计量技术研究院);无水乙醇、乙酸乙酯、无水碳酸钠、无水硫酸钠、冰乙酸、盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾(分析纯,上海泰坦科技股份有限公司)。甲醇、乙腈(色谱纯,德国Sigma Aldrich公司);甲酸(色谱纯,天津科密欧试剂有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 供试样品的制备

1.3.1.1 游离多酚的去除

为了避免对分析结果的影响,在水解和提取 NEPC 前,需将枸杞子中的游离多酚提取完全。结合文献^[16,17]和研究组的优化结果,将枸杞子于 50 °C 烘干,研细,过 18 目筛,按料液比 1:12 加入 70% 乙醇,回流提取 60 min,提取液 4 000 r/min 离心 15 min,分离上清液和药渣,药渣按上述步骤再重复提取 3 次,用 Folin-Ciocalteu 法测定提取液中不含酚类物质^[18]。回收药渣,50 °C 烘干,待用。

1.3.1.2 碱水解提取 NEPC

取去除游离多酚的枸杞子粗粉 1 g,精密称定,加入氢氧化钠溶液,于 37 °C 下碱水解,水解液用盐酸调 pH 3~4,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,用无水硫酸钠脱水,继于 50 °C 旋干,残渣用甲醇定容到 10 mL 量瓶中,作为供试样品溶液,采用 Folin-Ciocalteu 方法测定酚类物质含量^[18]。

1.3.1.3 酸水解提取 NEPC

取去除游离多酚的枸杞子粗粉 1 g,精密称定,加入盐酸溶液,于 80 °C 下酸水解,水解液用氢氧化钠调 pH 3~4,后续操作同“1.3.1.2”。

1.3.2 酚类物质含量的测定

1.3.2.1 没食子酸标准曲线的建立

按照《中华人民共和国药典》(2020 年版)的方法测定待测溶液中酚类物质的含量^[18]。精密称定没食子酸对照品 5 mg,加水溶解,并定容于 10 mL 量瓶中,制成每 1 mL 含 5 μg 的溶液。精密量取对

照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,加纯化水 6 mL,再加入福林酚试液 0.5 mL,摇匀,加入 20% 碳酸钠溶液 1.5 mL,用纯化水稀释至刻度,摇匀。放入 75 °C 烘箱中孵育 10 min,以纯化水代替没食子酸对照品溶液为空白,照紫外-可见分光光度法(通则 0401),于 760 nm 波长处测定吸光度。以没食子酸浓度(μg/mL)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.2.2 供试样品溶液中 NEPC 含量测定

采用 Folin-Ciocalteu 方法进行供试品溶液中 NEPC 的含量测定。

精密吸取 0.5 mL 供试样品溶液,置于 10 mL 容量瓶中,按照“1.3.2.1”中陈述的方法,于 760 nm 波长处测定吸光度,从标准曲线上读取供试样品溶液中没食子酸的浓度,计算 NEPC 的得率(mg/100 g)。

1.3.3 单因素试验设计

取去除游离多酚的枸杞子粗粉 1 g,精密称定,采用氢氧化钠或盐酸溶液水解,研究不同酸碱浓度(1、2、3、4 mol/L)、提取时间(1、1.5、2、2.5 h)和不同料液比(1:15、1:20、1:25、1:30)等工艺参数对 NEPC 得率的影响。

1.3.4 响应面法优化设计

在单因素实验基础上,选取较优的因素和水平,以工艺可控性较强的酸碱提取浓度(A)、提取时间(B)、料液比(C)为考察因素,各因素水平见表 1、2。

表 1 碱水解 Box-Behnken 设计因素水平集编码表

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

水平 Level	碱水解 Alkaline hydrolysis		
	A 提取浓度 Extraction concentration (mol/L)	B 提取时间 Extraction time (h)	C 料液比 Material liquid ratio
-1	2	1	1:15
0	3	2	1:20
1	4	3	1:25

表 2 酸水解 Box-Behnken 设计因素水平集编码表

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

水平 Level	酸水解 Acid hydrolysis		
	A 提取浓度 Extraction concentration (mol/L)	B 提取时间 Extraction time (h)	C 料液比 Material liquid ratio
-1	2	1.5	1:15
0	3	2	1:20
1	4	3.5	1:25

1.3.5 枸杞子 NEPC 提取物 UPLC-Q-TOF-MS 图谱的建立

1.3.5.1 色谱条件

Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和甲醇 (B); 流速 0.3 mL/min; 进样体积 2 μL ; 梯度洗脱^[19] (0 ~ 0.5 min, 95% A; 0.5 ~ 2.0 min, 95% → 90% A; 2.0 ~ 4.5 min, 90% → 85% A; 4.5 ~ 7.0 min, 85% → 80% A; 7.0 ~ 20.0 min, 80% → 75% A; 20.0 ~ 32.0 min, 75% → 70% A)。

1.3.5.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 毛细管电压和锥孔电压分别为 2.2 KV 和 40 V, 离子源温度为 120 $^{\circ}\text{C}$, 离子源电压 20 ~ 50 eV。分别在正、负离子模式下分析样品, 扫描范围 m/z 100 ~ 1 800。通过 MassLynx4.1 软件收集样品中正负离子数据并分析。

1.3.6 数据处理

采用 Excel 2020 对每组数据进行统计学分析, 分析结果均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果与分析

2.1 酚类物质标准曲线的建立

如图 1 所示。标准曲线方程为 $y = 0.0973x - 0.013$ ($R^2 = 0.9994$), 说明没食子酸浓度在 1 ~ 7 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 浓度与吸光度呈线性关系。

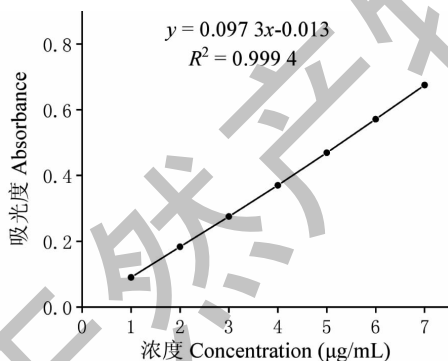


图 1 没食子酸标准曲线

Fig. 1 Standard curve of gallic acid

2.2 各单因素试验结果

2.2.1 碱水解各因素对 NEPC 得率的影响

现有文献中, 超过 70% 的研究是采用碱水解方式来得到 NEPC^[14]。在碱水解过程中, 氧气和温度对酚酸类成分的影响较大^[20], 因此, 本研究中, 碱水解是在氮气保护和室温下完成, 也没有考虑温度对 NEPC 得率的影响。氢氧化钠是碱水解过程中最常

使用的水解试剂^[21]。水解过程中, 氢氧化钠可以促进 NEPC 的释放, 如 Acosta-Estrada 等^[22]利用 4 mol/L 的氢氧化钠从 nejayote 中水解得到大量的香豆酸和阿魏酸。但是, 较高的氢氧化钠浓度可能造成酚类物质的降解^[23], 因此, 本研究中, 氢氧化钠的浓度考察范围限定在 1 ~ 4 mol/L 范围内。由图 2A 可知, 在料液比 1:20、提取时间为 2 h 时, 氢氧化钠的浓度在 1 ~ 3 mol/L 范围内变化, NEPC 的得率逐渐升高, 当氢氧化钠浓度为 3 mol/L 时, NEPC 的得率可达 0.71 ± 0.04 mg/100 g; 当碱水解溶液超过 3 mol/L 后, 水解枸杞子 NEPC 的得率急剧降低。碱水解时, 氢氧化钠溶液浓度过大, 可能造成酚酸类成分的损失, 这一观测结果与文献报道基本一致^[24]。在氢氧化钠浓度为 3 mol/L、提取时间为 2 h 时, 随着料液比的增大, NEPC 得率逐渐增大, 但在料液比超过 1:25 后, 得率有所降低 (见图 2B)。水解过程中, 较大的料液比提高细胞内外 NEPC 的浓度差, 有利于 NEPC 的扩散, 但是当料液比过大时, 将会为水解液的处理带来影响。当固定氢氧化钠浓度为 3 mol/L、料液比 1:25, 随着水解时间的延长, NEPC 的得率相应增大, 水解时间超过 2 h 后, NEPC 的得率下降。水解时间的延长, 水解得到的游离酚酸可能会发生降解。综上, 经过单因素试验优化的碱水解制备枸杞子中 NEPC 的工艺为: 使用料液比为 1:25 的 3 mol/L 氢氧化钠溶液水解 2 h, 可以得到较高的 NEPC 得率。但是, 观察图 2B, 可以发现, 在小于 1:25 的料液比时, NEPC 的得率增长并不显著, 考虑到后期的操作, 可以选择较小的料液比来进一步优化。

2.2.2 酸水解各因素对 NEPC 得率的影响

酸水解是另一种获得 NEPC 的方法, 通常需要较高的温度^[5]。酸水解过程中, 盐酸是最常使用的酸^[14], 通常使用的浓度为 2 mol/L, 如从火龙果皮^[25]和大麻籽 (*Cannabis sativa* L.) 皮^[26]中提取 NEPC, 但是也有研究使用更高的盐酸浓度, 如从废弃的红茶叶中提取使用了 3 mol/L 的盐酸^[27], 而从小麦^[28]和竹子^[29]中提取 NEPC 则用到了 6 mol/L 的盐酸。酸水解过程中, 较高的酸浓度和温度以及较长的水解时间也会导致酚类物质的降解, 因此, 在本研究中, 酸的浓度控制在 4 mol/L 以下。由图 3A 可知, 在固定料液比为 1:20, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 2 h 的条件下, NEPC 的得率随盐酸浓度的升高而升高, 当盐酸浓度达到 3 mol/L 时, 得率为 0.48 ± 0.06 mg/100 g, 之后随着酸液浓度的增大提取率下降。酸浓

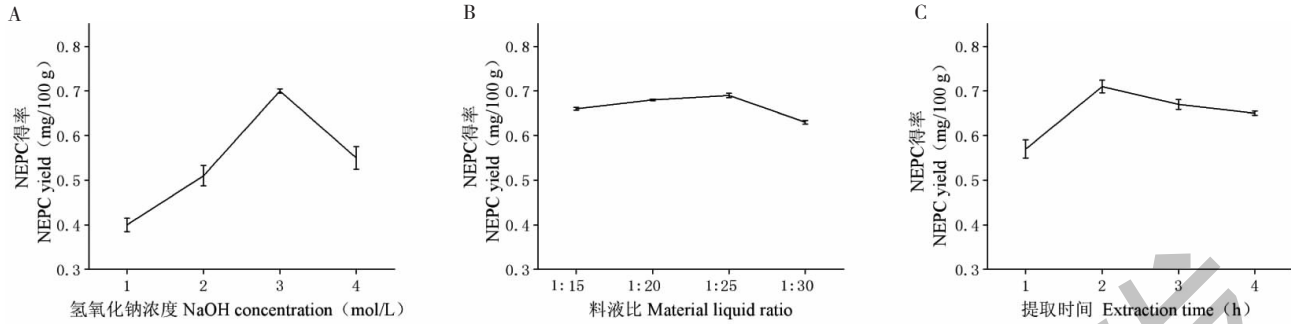


图2 碱水解过程中各因素对 NEPC 得率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of various factors on the yield of NEPC during alkaline hydrolysis process($\bar{x} \pm s, n=3$)

度的增大,有利于水解过程中糖苷键的质子化,但过高的酸浓度,则会造成酚酸类成分的降解。当盐酸浓度为 3 mol/L、80 °C 水解 2 h 时,因料液比的增加提高水解酚酸的传质系数,使 NEPC 的得率提高,当料液比超过 1:20 时,NEPC 得率下降(图 3B)。料液比增大,可能稀释水解液中 NEPC,不利于后续处理对其的富集。图 3C 中,可以观察到,以 3 mol/L

的盐酸在 80 °C 下水解,固定料液比为 1:20 时,NEPC 得率随时间延长而提高,水解 3 h 时达到最大(0.61 ± 0.12 mg/100 g),超过 3 h,NEPC 因受酸的影响,可能发生降解,得率下降。由此可知,单因素试验优化后的酸水解制备 NEPC 的工艺参数为:3 mol/L 的盐酸溶液在 80 °C 下水解 3 h,料液比固定为 1:20,可得到较高的 NEPC 得率。

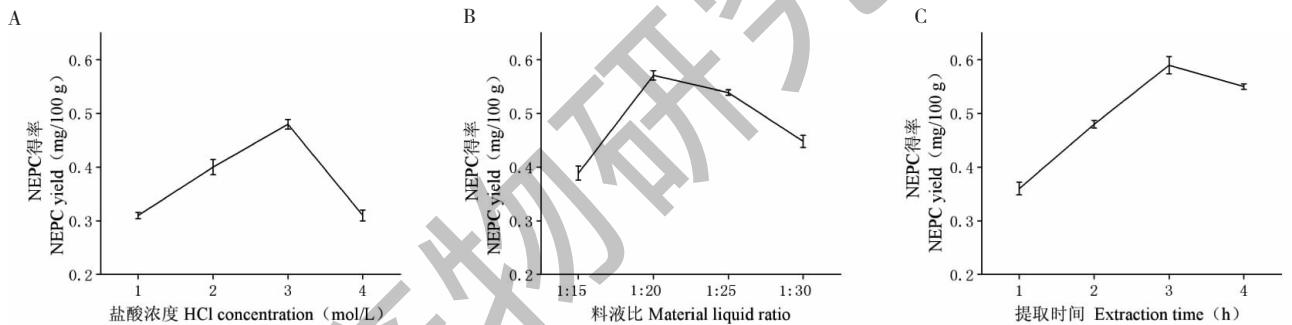


图3 酸水解过程中各因素对 NEPC 得率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of various factors on the yield of NEPC during acid hydrolysis process($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 NEPC 响应面试验设计结果

为了获得更优碱水解和酸水解制备枸杞子中 NEPC 的工艺参数,在单因素试验结果的基础上,采用 Box-Behnken 响应面试验设计法,选择碱或酸溶

液的浓度、料液比和水解时间为影响因素,考察各影响因素在实验范围内对 NEPC 的影响,优化工艺。各因素水平编码表见表 1 和表 2,实验结果见表 3。

表 3 Box-Behnken 试验设计和结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Box-Behnken Experimental Design and results($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号 No.	A	B	C	NEPC 得率 NEPC yield(mg/100 g)	
				碱水解 Alkaline hydrolysis	酸水解 Acid hydrolysis
				1	-1
2	1	-1	0	0.64 ± 0.04	0.50 ± 0.07
3	-1	1	0	0.65 ± 0.02	0.48 ± 0.04
4	1	1	0	0.65 ± 0.13	0.45 ± 0.08

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	A	B	C	NEPC 得率 NEPC yield (mg/100 g)	
				碱水解 Alkaline hydrolysis	酸水解 Acid hydrolysis
				5	-1
6	1	0	-1	0.65 ± 0.03	0.42 ± 0.16
7	-1	0	1	0.65 ± 0.08	0.45 ± 0.12
8	1	0	1	0.65 ± 0.15	0.45 ± 0.04
9	0	-1	-1	0.66 ± 0.06	0.38 ± 0.03
10	0	1	-1	0.68 ± 0.12	0.43 ± 0.13
11	0	-1	1	0.65 ± 0.07	0.40 ± 0.15
12	0	1	1	0.68 ± 0.02	0.48 ± 0.06
13	0	0	0	0.69 ± 0.08	0.57 ± 0.07
14	0	0	0	0.72 ± 0.04	0.58 ± 0.13
15	0	0	0	0.70 ± 0.09	0.63 ± 0.06
16	0	0	0	0.71 ± 0.20	0.54 ± 0.12
17	0	0	0	0.70 ± 0.11	0.57 ± 0.08

2.3.1 碱水解响应面实验结果

碱水解制备枸杞子中 NEPC 的因素回归方程为: $Y_1 = 68.37 - 0.61A + 1.80B + 1.72C - 0.37AB - 0.55AC + 1.08BC - 5.94A^2 - 6.37B^2 - 9.43C^2$; 式中, Y_1 为 NEPC 得率, A 为氢氧化钠浓度 (mol/L), B 为水解时间 (h), C 为料液比。由表 4 可知, 实验选择的模型 $P < 0.01$, 表明响应面回归模型显著, 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 试验误差小, 表明未知因素对结果影响较小, 可以用于优化碱水解制备枸杞子中 NEPC 的工艺。模型的 $R^2 = 0.9094$, $R_{adj}^2 = 0.7929$, 提示拟合程度良好。根据 P 值可知, 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对 NEPC 得率影响显著 ($P < 0.05$)。

由图 4 可知, 实验条件下, 3 个因素的变化曲面都比较陡, 说明其对 NEPC 的得率有影响, 等高线最小椭圆的中心可以在因素所选范围内, 提示 NEPC

得率的响应值在 3 个因素设计的范围内可以获得最大值, 即可以得到最优工艺参数。图 4A 中, 氢氧化钠浓度和水解时间的变化曲面都较陡, 水解时间的变化较氢氧化钠浓度陡, 说明两个因素中, 在实验条件下水解时间对 NEPC 的得率影响大于碱溶液浓度; 同理, 料液比的变化曲面较水解时间陡峭 (见图 4B), 说明其对 NEPC 得率的影响较大; 而相较于氢氧化钠浓度, 料液比的变化曲面较陡, 提示其对 NEPC 得率影响大。由此可推测, 各因素对 NEPC 含量的影响大小依次为提取时间 > 液料比 > 氢氧化钠浓度。由模型拟合得到的最优工艺为: 以 1:22 的 3 mol/L 的氢氧化钠溶液在室温下水解 2 h。按此条件进行验证试验, 制备得到的枸杞子中 NEPC 的得率为 0.65 ± 0.05 mg/100 g。

表 4 碱水解方差分析表

Table 4 Analysis of variance for alkaline hydrolysis

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square error	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	829.29	9	92.14	7.80	0.0065	**
A	2.96	1	2.96	0.25	0.6317	-
B	25.78	1	25.78	2.18	0.1830	-
C	23.63	1	23.63	2.00	0.2000	-
AB	0.54	1	0.54	0.046	0.8367	-
AC	1.19	1	1.19	0.10	0.7603	-

续表 4(Continued Tab. 4)

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square error	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
BC	4.69	1	4.69	0.40	0.548 6	-
A ²	148.64	1	148.64	12.59	0.009 4	**
B ²	170.80	1	170.80	14.47	0.006 7	**
C ²	374.54	1	374.54	31.72	0.000 8	**
残差 Residual	82.64	7	11.81	-	-	-
失拟项 Lack of fit	41.64	3	13.88	1.35	0.376 3	-
纯误差 Pure error	41.01	4	10.25	-	-	-
总和 Sum	911.94	16	-	-	-	-

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

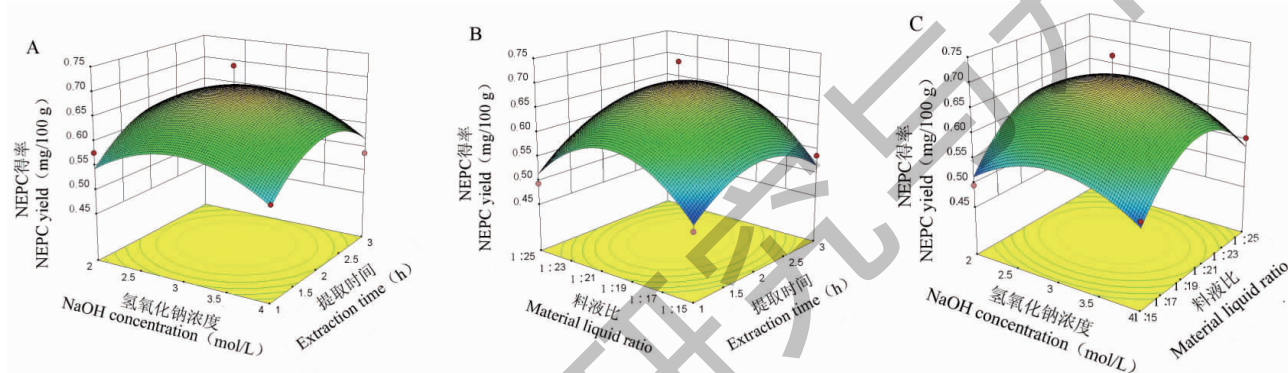


图 4 各因素交互作用对碱水解过程 NEPC 得率的影响

Fig. 4 Effect of interaction of various factors on the yield of NEPC by alkali hydrolysis

2.3.2 酸水解响应面实验结果

酸水解制备枸杞子中 NEPC 的因素回归方程为: $Y_2 = (57.61 + 0.27A + 1.18B + 1.98C - 1.37AB - 0.80AC) \times 0.81 - 4.55A^2 - 5.00B^2 - 9.81C^2$; 式中, Y_2 为 NEPC 得率, A 为盐酸浓度 (mol/L), B 为水解时间 (h), C 为料液比。由表 5 可知, 实验选择的模型 $P < 0.005$, 表明响应面回归模型极显著, 失拟项不显著 ($P > 0.05$), 试验误差小, 表明未知因素对结果影响较小, 可以用于优化碱水解制备枸杞子中 NEPC 的工艺。模型的 $R^2 = 0.9258$, $R^2_{adj} = 0.8304$, 提示拟合程度良好。根据 P 值可知, 料液比和盐酸浓度的二次项对 NEPC 得率的影响显著 ($P < 0.05$)。

由图 5 可知, 实验条件下, 3 个因素的变化曲面都比较陡, 说明其对 NEPC 的得率有影响, 等高线最小椭圆的中心可以在因素所选范围内, 提示 NEPC 得率的响应值在 3 个因素设计的范围内可以获得最大值, 即可以得到最优工艺参数。图 5A 中, 盐酸浓度和水解时间的变化曲面都较陡, 但水解时间的变化较酸浓度陡, 说明两个因素中, 实验范围内水解时

间对 NEPC 的得率影响大于盐酸溶液浓度; 同理, 料液比的变化曲面较水解时间陡比较陡 (见图 5B), 说明其对 NEPC 得率的影响较大; 而相较于盐酸浓度, 料液比的变化曲面较陡, 提示其对 NEPC 得率影响大。由此可推测, 各因素对 NEPC 含量的影响大小依次为提取时间 > 液料比 > 盐酸浓度。由模型拟合得到的最优工艺为: 以 1:20 的 4 mol/L 的盐酸溶液在 80 °C 下水解 2 h。按此条件进行验证试验, 制备得到的枸杞子中 NEPC 的得率为 0.52 ± 0.03 mg/100 g。

2.4 枸杞子水解产物的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

通过 MassLynx 4.1 软件在 MS 正、负离子模式下一级谱图中, 从 $[M-H]^-$ 、 $[M+H]^+$ 等离子形成中观察总离子流图中各色谱峰的相对分子质量, 结合文献和 UNIFI 数据库, 解析了 11 个已知化合物 (见表 6), 包括 6 个苯丙酸 (羟基苯丙酸、没食子酸、芥子酸、甲氧基没食子酸、咖啡酸、阿魏酸)、1 个香豆素 (七叶内酯)、1 个苯丙素衍生物 (vaccihin A)、2 个香豆素水解开环产物 (2,4,5-三羟基桂皮酸和

表 5 酸水解方差分析表

Table 5 Analysis of variance for acid hydrolysis

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square error	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	712.10	9	79.12	9.71	0.003 4	**
A	0.57	1	0.57	0.07	0.799 6	-
B	11.19	1	11.19	1.37	0.279 7	-
C	31.40	1	31.40	3.85	0.090 4	*
AB	7.48	1	7.48	0.92	0.370 0	-
AC	2.53	1	2.53	0.31	0.594 9	-
BC	2.61	1	2.61	0.32	0.589 3	-
A ²	87.13	1	87.13	10.69	0.013 7	*
B ²	105.33	1	105.33	12.92	0.008 8	**
C ²	405.54	1	405.54	49.75	0.000 2	**
残差 Residual	57.06	7	8.15	-	-	-
失拟项 Lack of fit	36.92	3	12.31	2.44	0.203 9	-
纯误差 Pure Error	20.14	4	5.03	-	-	-
总和 Sum	769.15	16	-	-	-	-

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

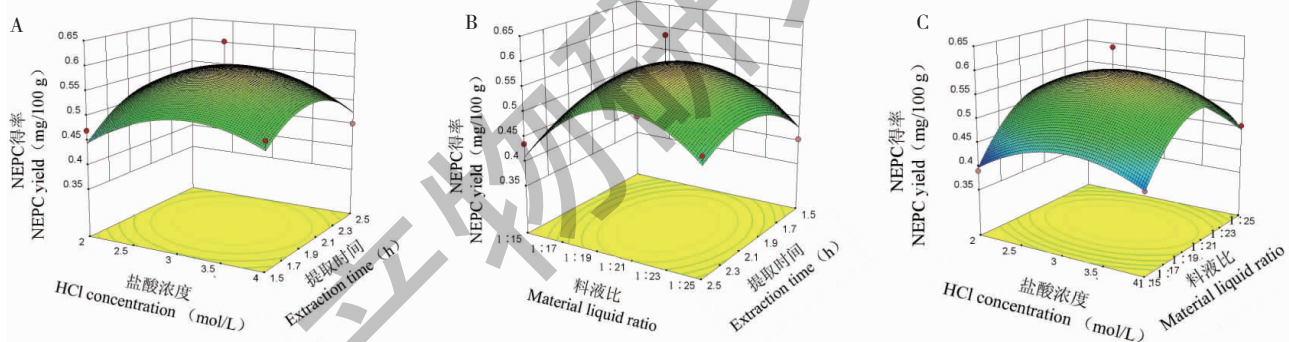


图 5 各因素交互作用对酸水解过程 NEPC 得率的影响

Fig. 5 Effect of interaction of various factors on the yield of NEPC by acid hydrolysis

2-羟基-4-甲氧基桂皮酸)和1个二苯甲酮(桑橙素)。上述11个化合物均可在酸水解产物中被检出,而从碱水解产物中鉴定了4个化合物,分别是 vacihein A、羟基苯丙酸、桑橙素和阿魏酸。

苷键是缩醛型的醚键,在碱溶液中相对稳定,但如果 NEPC 中的酚酸以酯键形式与糖、蛋白相连,则很容易被碱溶液水解,因此推测阿魏酸等4个化合物在枸杞子中,是以酯键与糖、蛋白等大分子物质连接。Vaccihein A 和桑橙素的结构中虽然没有羧基,但是枸杞多糖是酸性多糖^[11],这两个化合物可能是连接在糖醛酸上。从总离子流图可知,在碱水解产物中,阿魏酸是主要物质(见图6A),从化学结构来

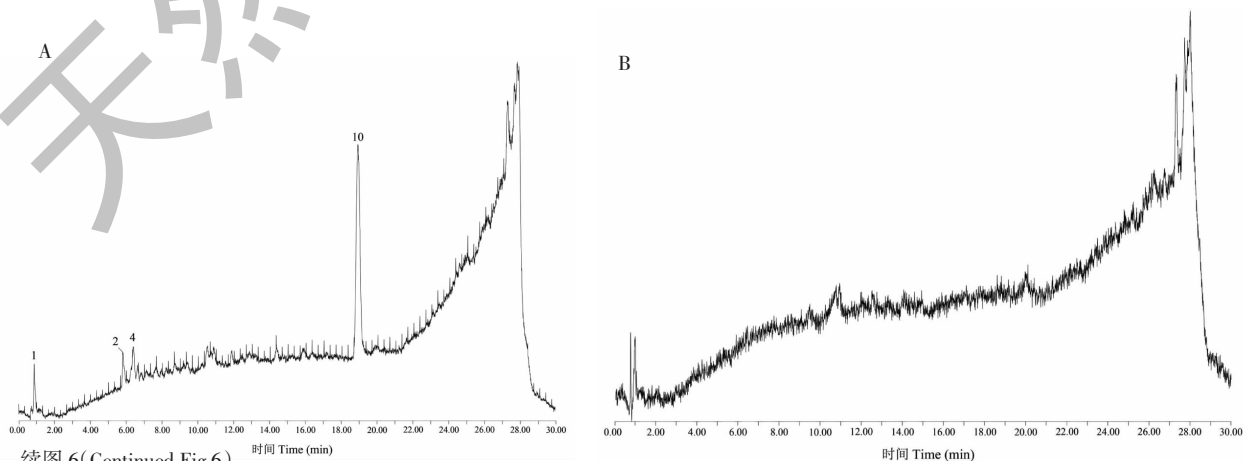
看,阿魏酸和羟基苯甲酸含有羧基和酚羟基,更倾向于通过酯键与大分子物质相连从而形成 NEPC。

有报道认为,阿魏酸仅能在碱水解产物中被检出^[15],但是在本研究中,酸水解也能使阿魏酸从 NEPC 上水解下来,推测阿魏酸在高浓度的酸溶液(6 mol/L)不稳定,本研究采用较低浓度的盐酸(4 mol/L),且水解时间较短,可以更好地保留阿魏酸。除了阿魏酸,酸水解产物中还检出了其他10种化合物,这些化合物主要是苯丙素衍生物。值得注意的是,从质谱数据中解析的化合物中,有两个可能是香豆素的水解产物,提示现有的酸水解依旧可能破坏化合物结构,无法得到原生产物。

表6 水解产物中各化合物的质谱裂解数据

Table 6 Mass spectrometry fragmentation data of various compounds in hydrolysates

序号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	实测值 Measured value		理论值 Theoretical value		主要裂解碎片 Major fragment ion (m/z)	化合物 Compound	参考文献 Reference
			$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$			
1	0.88	$C_{18}H_{18}O_9$	379.080 9	377.084 1	379.098 4	377.087 3	401.061 8 $[M+Na]^+$ 、361.071 1 $[M-H_2O]^+$ 、198.862 9 $[C_9H_{10}O_5]^+$	Vacciehin A	19
2	5.85	$C_9H_{10}O_3$	167.070 7	165.017 0	167.066 3	165.023 0	140.047 1 $[M-H_2O]^+$ 、123.044 1 $[M-COOH]^+$ 、91.055 0 $[C_7H_7]^+$	羟基苯丙酸 3-(Hydroxyphenyl) propanoic acid	30
3	6.13	$C_9H_8O_5$	-	195.064 8	197.037 2	195.039 5	219.063 4 $[M+Na]^+$ 、179.071 0 $[M-H_2O]^+$	没食子酸 Gallic acid	30
4	6.44	$C_{13}H_{10}O_6$	263.139 2	261.123 5	263.055 1	261.150 2	285.050 3 $[M+Na]^+$ 、245.058 0 $[M-H_2O]^+$ 、209.080 9 $[M-3H_2O]^+$ 、217.044 9 $[M-CO-H_2O]^+$	桑橙素 Maclurin	31
5	6.79	$C_{15}H_{14}O_2$	227.095 5	225.075 8	227.071 8	225.085 0	249.073 8 $[M+Na]^+$ 、209.081 5 $[M-H_2O]^+$ 、165.155 1 $[M-COOH-H_2O]^+$	芥子酸 Sinapic acid	32
6	8.30	$C_9H_8O_5$	197.071 1	195.065 2	197.040 5	195.051 2	179.070 9 $[M-H_2O]^+$ 、147.044 6 $[M-3H_2O]^+$ 、151.055 2 $[M-COOH]^+$ 、91.054 8 $[C_7H_7]^+$	2,4,5-三羟基桂皮酸 2,4,5-Trihydroxy cinnamic acid	-
7	8.91	$C_{10}H_{10}O_5$	211.060 7	209.044 3	211.055 8	209.057 3	167.070 7 $[M-COOH]^+$ 、179.060 3 $[M-OCH_3]^+$ 、194.117 7 $[M-H_2O]^+$	甲氧基没食子酸 Methoxy gallic acid	32
8	9.18	$C_9H_8O_4$	181.086 1	179.043 1	181.045 6	179.157 0	137.058 8 $[M-COOH]^+$ 、163.039 7 $[M-H_2O]^+$	咖啡酸 Caffeic acid	30
9	11.84	$C_9H_6O_4$	179.071 1	177.053 6	179.030 0	177.018 8	151.038 8 $[M-CO]^+$ 、123.003 7 $[M-2CO]^+$ 、161.096 7 $[M-H_2O]^+$ 、91.054 4 $[C_7H_7]^+$	七叶内酯 Esculetin	30
10	13.28	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 9	193.049 5	195.061 3	193.050 3	176.025 5 $[M-H_2O]^+$ 、151.038 5 $[M-COOH]^+$	2-羟基-4-甲氧基桂皮酸 4-Methoxy-2-hydroxy cinnamic acid	-
11	18.99	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 7	-	195.057 9	193.184 0	217.047 5 $[M+Na]^+$ 、151.037 9 $[M-COOH]^+$ 、133.028 7 $[M-COOH-H_2O]^+$	阿魏酸 Ferulic acid	32



续图 6 (Continued Fig.6)

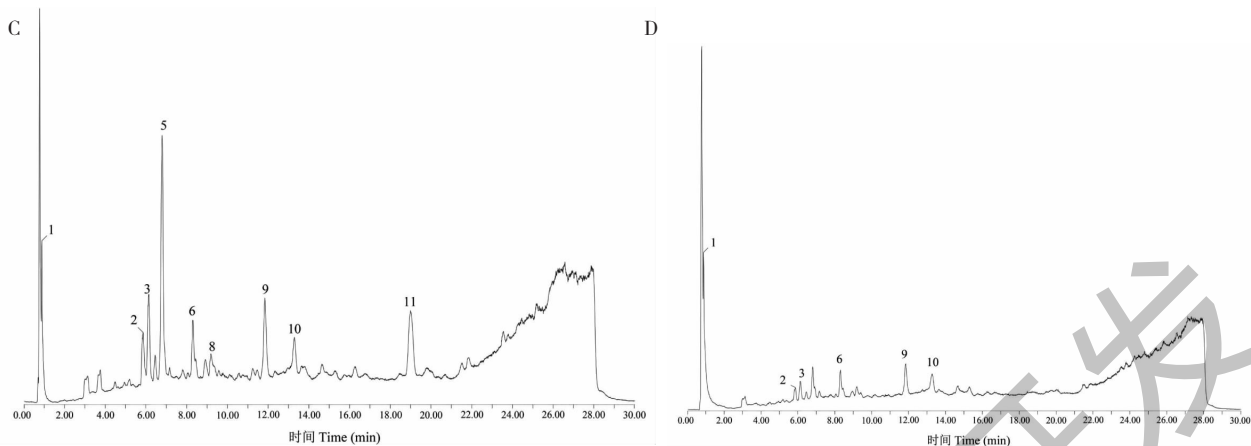


图6 水解产物的总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatograms of hydrolysates

注:A、B:碱水解产物的正、负离子模式;C、D:酸水解产物的正、负离子模式。Note:A、B:Positive and negative ion modes of alkaline hydrolysis products;C、D:Positive and negative ion modes of acid hydrolysis products.

3 讨论与结论

酚类化合物是植物中最丰富的次生代谢产物,也是最受关注的生物活性物质之一。植物中的酚类成分以游离和结合形式存在,而后者,即 NEPC 是酚类物质在植物中的主要组成形式。以往的大多数研究聚焦于游离酚类的组成和生物活性上,而对 NEPC 关注较少。目前,越来越多的研究提示,NEPC 可能是食品和天然药物/中药中重要的活性物质^[5]。同样的,对枸杞子中的游离酚类成分的研究非常深入^[32],但是未见有 NEPC 的报道。研究组前期研究发现,枸杞多糖以较弱的氢氧化钠(0.2 mol/L)即可水解得到酚类物质^[11],提示可能含有以酯键相联的酚类物质。通常认为,NEPC 以共价键形式与纤维素、蛋白、木质素等大分子相互作用,或者以离子键、物理作用结合在植物纤维或嵌入细胞内^[5]。枸杞子中的 NEPC 是联接在多糖或植物基上,还有待进一步确认。

NEPC 不能直接使用水或醇溶剂提取,要分析枸杞子中的 NEPC,必须采用碱水解或酸水解的方法来制备 NEPC。碱可以破坏酚类成分与糖、蛋白、果胶、纤维等物质间的酯键,从而释放出酚类并被检出^[33,34]。氢氧化钠是最常用到的碱水解的化合物。在碱水解过程中,酚类成分往往会因氧气、高温、光照等条件而发生降解,所以常常在氮气保护下,避光低温水解^[35]。在本研究过程中,也是在氮气保护下,以氢氧化钠为水解催化剂,低温水解的。酸水解通常采用强酸,如盐酸。盐酸不仅可以水解酯键,还可以水解糖苷键,从而有效释放出 NEPC 的单体或

低聚体^[5]。本研究中,碱水解测得的枸杞子中的 NEPC 为 0.65 ± 0.05 mg/100 g,而酸水解产物中为 0.52 ± 0.03 mg/100 g,两者的差异,可能是由于酸水解和碱水解机理的不同造成的。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与酸水解时间相同,但碱水解法制备的 NEPC 得率较高,可能是碱水解更多打断了 NEPC 与结构蛋白、膳食纤维等的结合^[36]。酸处理破坏糖苷键并溶解糖,在酸性条件下,多酚分子中的羟基容易被质子化,从而使多酚分子断裂,释放出单体或低聚体。高温下的酸性水解会导致损失一部分酚类物质^[32];而在碱性条件下,比在酸水解条件下释放得更好,多酚分子中的羟基容易被去质子化,从而使得碱水解得率比酸水解稍高,减少其损失。

以往的研究发现,通过碱水解和酸水解获得的 NEPC 存在差异。如面粉的酸水解产物中可以检出咖啡酸、儿茶素、没食子酸衍生物等,而阿魏酸仅存在于碱水解物中^[15],提示酸水解可能获得的酚类物质种类更多。本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 分析了枸杞子 NEPC 水解产物中的物质组成,总离子流图结果提示,碱水解和酸水解产物中,化合物种类并没有差异,但是酸水解产物的数量明显多于碱水解产物。这样的现象一方面可能是酚羟基在强碱环境中容易去质子化从而被破坏,导致无法被质谱检测,而酚类物质在酸性环境下较为稳定,更易被检出;另一方面,碱水解仅能破坏酚类与大分子间的酯键,而酸不仅能水解酯键,还能水解糖苷键,所以可以检出的酚类物质种类更多。从产物来看,主要是苯丙素类

衍生物,在鉴定的11个化合物中,有8个苯丙酸、1个香豆素、1个苯丙素衍生物和1个二苯甲酮。在碱水解产物中,仅能解析出4个化合物,阿魏酸是主要物质;而鉴定的11个化合物都能在酸水解产物中被检出。值得注意的是,8个酚酸中,有2个化合物可能是在水解 NEPC 过程中,香豆素内酯环开环的产物,而不是枸杞子中的原生物质,这可能与水解过程中使用的酸浓度过高有关,后期可以降低酸或碱的浓度,来获得更为完整的分子结构。而且,枸杞子中含有的 NEPC,主要含有的是苯丙酸和香豆素类成分,是否还含有其他成分,还有待于对水解产物做进一步分析。为了对枸杞子中的 NEPC 进行深入分析,后期应该以质谱检测为导向,调整水解时酸/碱的浓度,从而得到真正的属于枸杞子的原生 NEPC。

参考文献

- Deng XL, Li XL, Luo S, et al. Antitumor activity of *Lycium barbarum* polysaccharides with different molecular weights: an *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Food Nutr Res*, 2017, 61: 1399770.
- Zhao R, Cai YP, Shao XY. Improving the activity of *Lycium barbarum* polysaccharide on sub-health mice [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 2033-2040.
- Le F, Xiao X, Jing L, et al. Immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* polysaccharide extract and its uptake behaviors at the cellular level [J]. *Molecules*, 2020, 25: 1351.
- Zhang XW, Zhang MW, Dong LH, et al. Phytochemical profile, bioactivity, and prebiotic potential of bound phenolics released from rice bran dietary fiber during *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 12796-12805.
- Wang ZY, Li SY, Ge SG, et al. Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68: 3330-3343.
- Gong ES, Gao NX, Li T, et al. Effect on *in vitro* digestion on phytochemical profiles and cellular antioxidant activity of whole grains [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 7016-7024.
- Zhou S, Huang L, Wang YM, et al. Bioavailability and hypoglycemic effect of plant polyphenols: a review [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2023, 44: 211-217.
- Rocchetti G, Bhumireddy SR, Giuberti G, et al. Edible nuts deliver polyphenols and their transformation products to the large intestine: an *in vitro* fermentation model combining targeted/untargeted metabolomics [J]. *Food Res Int*, 2019, 116: 787-794.
- Rondini L, Peyrat-Maillard MN, Marsset-Baglieri A, et al. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 4338-4343.
- Gabriele R, Chioldelli G, Giuberti G, et al. Bioaccessibility of phenolic compounds following *in vitro* large intestine fermentation of nuts for human consumption [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 633-640.
- Zeng WJ, Chen LL, Li YP, et al. The effect of *in vitro* digestion on the chemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. *Food Hydrocoll*, 2023, 139: 108507.
- Zeng WJ, Lv CM, Ding JB, et al. Research progress in reaction mechanism of evaluation method for antioxidant activity *in vitro* [J]. *Chem Bioeng* (化学与生物工程), 2022, 39: 13-19.
- Mo RN, Xia YY, Qu W, et al. Research progress on polyphenols in *Fructus Lycii* [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2016, 28: 1-4.
- Caroline CM, Rafael CR, Giovana DM, et al. New insights into non-extractable phenolic compounds analysis [J]. *Food Res Int*, 2022, 157: 111487.
- Sara A, Fulgencio SC. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: a study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet [J]. *J Cereal Sci*, 2010, 51: 313-318.
- Tang WP, Li W, Yang YZ, et al. Phenolic compounds profile and antioxidant capacity of pitahaya fruit peel from two red-skinned species (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) [J]. *Foods*, 2021, 10: 1183-1183.
- Gloria DR, María LM, Merichel P. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1514: 15.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 260-261, 34, 21.
- Duan WW, Zhang ZJ, Zhu JJ, et al. Comparative analysis of the phenolic profile of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in China [J]. *Molecules*, 2022, 27: 5842.
- Jorge RG, Kong SA, Roberto LM, et al. Total phenolics, anthocyanin profile and antioxidant activity of maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, berries extract in freeze-dried polysaccharides microcapsules [J]. *Food Chem*, 2020, 313: 126115.
- Van Hung P, Maeda T, Miyatake K, et al. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method [J]. *Food Res Int*, 2009, 42: 185-190.

- 22 Acosta-Estrada BA, Serna-Saldívar SO, Gutierrez-Urbe JA. Chemopreventive effects of feruloyl putrescines from wastewater(nejayote) of limecooked white maize(*Zea mays*) [J]. *J Cereal Sci*,2015,64:23-28.
- 23 Balli D, Bellumori M, Orlandini S, et al. Optimized hydrolytic methods by response surface methodology to accurately estimate the phenols in cereal by HPLC-DAD: The case of millet [J]. *Food Chemistry*,2020,303:125393.
- 24 Tang Y, Zhang B, Li X, et al. Bound phenolics of quinoa seeds released by acid, alkaline, and enzymatic treatments and their antioxidant and α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects [J]. *J Agric Food Chem*,2016,64:1712-1719.
- 25 Tang W, Li W, Yang Y, et al. Phenolic compounds profile and antioxidant capacity of pitahaya fruit peel from two red-skinned species (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) [J]. *Foods*,2021,10:1183.
- 26 Leonard W, Zhang P, Ying D, et al. Extrusion improves the phenolic profile and biological activities of hempseed (*Cannabis sativa* L.) hull [J]. *Food Chem*,2021,346:128606.
- 27 Mukhtar B, Mushtaq M, Akram S, et al. Maceration mediated liquid-liquid extraction of conjugated phenolics from spent black tea leaves extraction of non-extractable phenolics [J]. *Anal Methods*,2018,10:4310-4319.
- 28 Benincasa P, Tosti G, Farneselli M, et al. Phenolic content and antioxidant activity of einkorn and emmer sprouts and wheatgrass obtained under different radiation wavelengths [J]. *Ann Agr Sci*,2020,65:68-76.
- 29 Li J, Li W, Deng Z, et al. Comparison of free, conjugated, and insoluble-bound phenolics and their antioxidant activities in oven-drying and freeze-drying bamboo (*Phyllostachys edulis*) shoot tips [J]. *J Food Sci*,2021,86:4223-4243.
- 30 Zhou ZQ, Xiao J, Fan HX, et al. Polyphenols from wolfberry and their bioactivities [J]. *Food Chem*,2017,214:644-654.
- 31 Zhu LY, Li WT, Deng ZY, et al. The composition and antioxidant activity of bound phenolics in three legumes, and their metabolism and bioaccessibility of gastrointestinal tract [J]. *Foods*,2020,9:1816.
- 32 Qian D, Zhao YX, Yang G, Huang LQ. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Molecules*,2017,22:911.
- 33 Luo YL, Yang CY, Xiao H, et al. Optimization and comparison of alkali extraction and acid extraction of bound polyphenols in *Psidium guajava* Linn. [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2018,30:1242-1251.
- 34 Beatriz AE, Janet AG, Sergio OS. Bound phenolics in foods, a review [J]. *Food Chem*,2014,152:46-55.
- 35 Nardini M, Cirillo E, Natella F, et al. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acid during alkaline hydrolysis [J]. *Food Chem*,2002,79:119-124.
- 36 Carboni MC, Rodrigues RC, Domeneghini MG, et al. New insights into non-extractable phenolic compounds analysis [J]. *Food Res Int*,2022,157:111487.

(上接第 631 页)

- 18 Liu DN, Luo F, Li CH, et al. Research progress on quality chemistry of Chinese white tea [J]. *J Agric Sci Technol*,2018,20:79-91.
- 19 Li Q, Jin YL, Jiang YW, et al. Dynamic changes in the metabolite profile and taste characteristics of Fu brick tea during the manufacturing process [J]. *Food Chem*,2021,344:128576.
- 20 Zhang L, Cao QQ, Granato D, et al. Association between chemistry and taste of tea: a review [J]. *Trends Food Sci Technol*,2020,101:139-149.
- 21 Chang R, Ma MJ, Luo LY, et al. Construction of a model for classifying dark teas from different areas based on biochemical components [J]. *Food Ferm Ind* (食品发酵工业),2019,45:97-98.
- 22 Song CW, Fan FY, Gong SY, et al. Taste characteristic and main contributing compounds of different origin black tea [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学),2020,53:383-394.
- 23 Wang SP, Gong ZM, Zheng PC, et al. Qingzhuan brick tea infusion: analysis of taste components and establishment of quality evaluation model [J]. *Food Sci* (食品科学),2019,40:214-219.