

# 石榴皮多酚提取工艺优化及抑菌活性研究

许 汝,王珊珊,谷 舞,李泰雅

(沈阳工学院 生命工程学院,辽宁 抚顺 113122)

**摘要:**通过单因素实验和响应面分析,研究不同乙醇浓度、料液比、提取时间和提取温度对多酚提取率的影响,探讨乙醇提取石榴皮多酚的最佳工艺。结果表明最佳工艺为:以60%的乙醇溶液作为提取剂,按1:25 g/mL的料液比,在30℃条件下提取60 min,石榴皮多酚的提取率可高达14.09%。抑菌实验表明,石榴皮多酚对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度为3 mg/mL,此时对应的抑菌圈直径分别为9.36 mm和8.64 mm。

**关键词:**石榴皮多酚;提取;响应面分析;抑菌活性

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)06-0087-06

## Optimization of extraction of pomegranate peel polyphenols and research on the bacteriostatic activity

XU Ru, WANG Shan-shan, GU Wu, LI Tai-ya

(Shenyang Institute of technology, School of life engineering, Fushun Liaoning 113122)

**Abstract:** In order to explore the best extraction technology of pomegranate peel polyphenols by ethanol under different conditions, the influences of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the extraction yield were researched by the single factor experiments and response surface analysis. The results showed that: the extraction yield of pomegranate peel polyphenols was 14.09% under the condition of taking 60% ethanol solution as extractant, with solid-liquid ratio 1:25 g/mL, at 30℃ extracting for 60 min. The results of bacteriostatic experiment showed that the minimum bacteriostasis concentration of pomegranate peel polyphenols against *staphylococcus aureus* and *escherichia coli*, was 3 mg/mL, while the diameters of the inhibition zones were 9.36 mm and 8.64 mm respectively.

**Key words:** pomegranate peel polyphenols; extraction; response surface analysis; bacteriostatic activity

石榴(*Punica granatum*)又名若榴、丹若、天浆,多年落叶果树,属于石榴科石榴属。石榴在我国种植广泛、历史悠久,具有保健、药用等多方面价值。研究发现,石榴不仅美味而且其皮中含有大量的多酚类物质,含量高达24.9%<sup>[1]</sup>。石榴多酚类物质(Polyphenols)具有抗氧化<sup>[2]</sup>、降血脂<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抑菌保鲜<sup>[5]</sup>、抗心血管疾病<sup>[6]</sup>、抗糖尿病<sup>[7]</sup>等作用。近年来石榴多酚的应用领域越来越广,且石榴皮作为石榴的副产物,不具备食用价值,因此对石榴皮多酚提取工艺的开发和研究具有重要的意义。

多酚类物质具有较大极性,易溶于亲水性极

性有机溶剂,可用水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等极性溶剂进行提取<sup>[8]</sup>,但考虑到节能环保和使用安全,一般选用乙醇或水作为溶剂<sup>[9]</sup>。唐丽丽<sup>[10]</sup>等采用乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯提取石榴皮多酚,结果表明乙醇作为提取剂时提取率最高。本实验采用不同浓度的乙醇作为提取溶剂,通过响应面分析法对提取工艺进行优化,最终确定最佳提取工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

石榴皮:抚顺市成大方圆连锁药店。

乙醇、没食子酸、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂、盐酸、磷酸、溴水、无水碳酸钠(均为分析纯):国药集团化学试剂有限公司。

收稿日期:2016-06-20

作者简介:许汝,1995年出生,女,本科。

通讯作者:王珊珊,1984年出生,女,讲师。

可见分光光度计 721:上海精密科学仪器有限公司;恒温水浴锅 HH-6:常州国华电器有限公司;电子天平 JD100-3:沈阳龙腾电子有限公司;循环水真空泵 SHZ-DⅢ:巩义市予华仪器有限公司;低速台式离心机 TDL-40B:上海安亭科学仪器厂;恒温培养箱 HPX-9052MBE:上海仪电科学仪器厂;高压立式蒸汽灭菌锅 YXQ-LS-50SⅡ:上海仪电科学仪器厂;垂直流超净工作台 SW-CJ-2FD:上海缔伦光学仪器有限公司;大容量恒温摇床 KYC1112:常州国华电器有限公司。

## 1.2 石榴皮多酚提取工艺流程

称取 5 g 石榴皮粉末,放入 250 mL 锥形瓶中,加入一定体积、一定浓度的乙醇溶液,在一定温度下的水浴锅中水浴一段时间,再将提取液离心,得到石榴皮多酚粗提液。

## 1.3 实验设计

### 1.3.1 石榴皮多酚的提取条件优化

通过控制乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度四个因素进行单因素分析,在基础设定条件中,改变其中一个因素,研究其对提取率的影响。用福林酚试剂检测得到的多酚粗提液中的多酚含量,并计算出多酚得率。

准确称取 5 份石榴皮粉末,每份 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,分别加入浓度为 20%、30%、40%、50%、60% 的乙醇 100 mL,在 50 °C 水浴锅中水浴 1 h,离心去沉淀,测定多酚含量。

准确称取 5 份石榴皮粉末,每份 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,配置 40% 的乙醇,分别按料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL 加入三角瓶中,在 50 °C 下水浴 1h,离心去沉淀,测定多酚含量。

准确称取 5 份石榴皮粉末,每份 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,按料液比 1:20 g/mL 加入 40% 的乙醇,在 50 °C 水浴锅中分别水浴 40、60、80、100、120 min,离心去沉淀,测定多酚含量。

准确称取 5 份石榴皮粉末,每份 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,按料液比 1:20 g/mL 加入 40% 的乙醇,分别置于温度为 30、40、50、60、70 °C 水浴锅中水浴 80 min,离心去沉淀,测定多酚含量。

### 1.3.2 抑菌实验

采用牛肉膏蛋白胨培养基对金黄色葡萄球菌与

大肠杆菌进行活化和扩大培养,将灭菌的培养基倒入内径 9 cm 的平板内,待凝固,接入稀释的菌悬液 100  $\mu$ L,用涂布器涂满平板,将牛津杯插在培养基上,在牛津杯中加入 20  $\mu$ L 一定浓度的多酚溶液,每个浓度做三组重复,封平板,整个操作在超净工作台中进行<sup>[11-12]</sup>。随后将平板倒置放在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。

## 1.4 测定指标与方法

### 1.4.1 多酚测定方法

#### 1.4.1.1 标准曲线的制作

配置福林酚试剂。在 150 mL 的磨口烧瓶中,加入钨酸钠 10 g、钼酸钠 2.5 g、蒸馏水 70 mL、85% 磷酸 5 mL、浓盐酸 10 mL,混合均匀后小火回流 10 h。10 h 后取下冷凝管,加入硫酸锂 15 g,蒸馏水 5 mL,溴水数滴,开口煮沸 15 min,使多余的溴水蒸发。冷却后定容至 100 mL,呈黄绿色,放入棕色试剂瓶中,冰箱中冷藏<sup>[13-14]</sup>。

配置没食子酸标准溶液。精确称取没食子酸 0.01 g,用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶中,避光保存。精确量取没食子酸标准溶液 0、2、4、6、8、10、12 mL 至 50 mL 容量瓶中定容,分别配置 0、8、16、24、32、40、48  $\mu$ g/mL 的没食子酸标准液。

绘制曲线。精确吸取配制好的没食子酸标准液 1 mL,依次加入稀释的福林酚试剂 2.5 mL,7.5% 的无水碳酸钠 2 mL,静止 2 h,使充分反应,在 765 nm 处测吸光值。

#### 1.4.1.2 样品多酚的测定

精确吸取 1 mL 石榴皮多酚稀释液,加入 2.5 mL 福林酚试剂、2 mL 7.5% 无水碳酸钠溶液,暗光下静止 2 h,使充分反应,在 765 nm 处测其吸光值,并计算多酚提取率:

多酚提取率 = (提取液浓度  $\times$  稀释倍数  $\times$  体积) / 样品质量  $\times$  100%。

### 1.4.2 体外抑菌活性的测定

将培养 24 h 后的平板从培养箱中拿出,用游标卡尺测量抑菌圈直径,单位 mm。

## 1.5 实验设计

进行单因素实验,分析不同因素对提取率的影响,确定方案进行响应面实验,采用 Design - Expert 8.0.6 软件进行响应面分析,得到最佳提取方案,通过比较单因素实验和响应面实验所得结果,确定最终方案。

## 2 结果与分析

### 2.1 绘制标准曲线

以标准品浓度为 X 轴、吸光度为 Y 轴绘制标准曲线,结果见图 1,标准曲线方程为: $y = 0.0255x - 0.0254$ ,  $R^2 = 0.9989$ 。

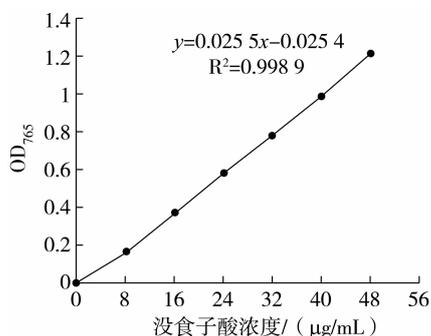


图1 没食子酸标准曲线

### 2.2 单因素实验优化石榴皮多酚提取工艺

#### 2.2.1 乙醇浓度对多酚得率的影响

由图 2 可看出,随着乙醇浓度的增加提取率先增高后降低,当乙醇浓度为 40% 时出现峰值,提取率为 13.29%,当乙醇浓度大于 50% 时,提取率变化甚微。由此可看出乙醇浓度对多酚提取的影响较明显,乙醇浓度较小时,醇溶性多酚难以被浸提,溶液中大多为水溶性多酚,随着乙醇浓度的增加,醇溶性多酚易被浸提,所以出现峰值。

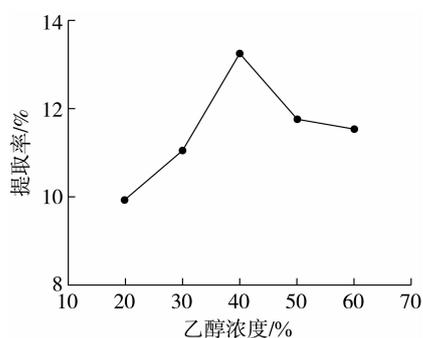


图2 乙醇浓度对提取率的影响

#### 2.2.2 料液比对多酚提取率的影响

由图 3 可看出,随着料液比的减少提取率先呈梯度迅速增高后缓慢降低,料液比为 1:10 g/mL 时提取率最低,料液比为 1:20 g/mL 时提取率最高 (13.29%),当料液比大于 1:20 g/mL 时提取率逐渐降低。

#### 2.2.3 提取时间对多酚提取率的影响

由图 4 可看出,在 50 °C 条件下水浴,随着水浴时间的延长,多酚提取率先提高后降低,水浴 80 min

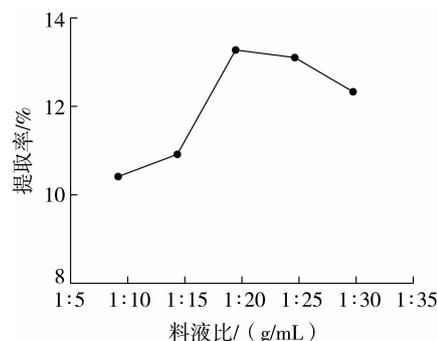


图3 料液比对提取率的影响

时提取率最高 (12.8%)。当提取时间大于 80 min 时,提取率急剧下降。

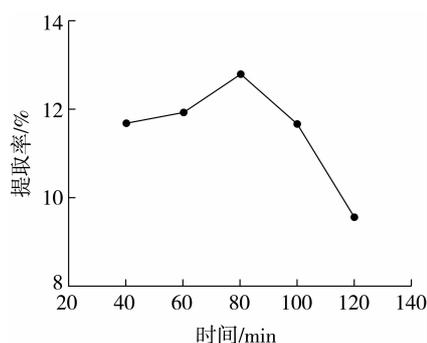


图4 时间对提取率的影响

#### 2.2.4 提取温度对提取率的影响

由图 5 可看出,随着温度的升高,多酚提取率先稳定增高后迅速降低,最适提取温度为 50 °C,该温度下的提取率为 13.52%。

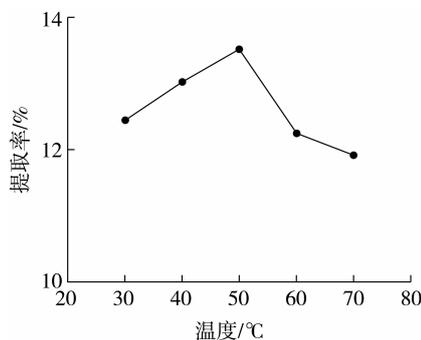


图5 温度对提取率的影响

### 2.3 响应面分析法优化石榴皮多酚提取工艺

#### 2.3.1 回归模型的建立及方差分析

在单因素实验基础上利用 Design - Expert 软件进行 Central - Composite 响应面设计和数据处理,确定最佳提取工艺。

根据单因素实验结果,以多酚提取率为考察目标,进行提取时间(A)、提取温度(B)、料液比(C)、乙醇浓度(D)4 因素 5 水平的 Central Composite De-

sign (CCD)实验设计,因素水平见表1,响应面分析方案与结果见表2。利用 Design - Expert 8.0.6 软件对实验数据进行多元回归拟合,获得以石榴皮多酚提取率为响应值的回归方程:

$$\text{提取率} = 12.93 - 0.13A - 0.25B + 0.72C - 0.016D - 0.18AB - 0.098AC - 0.17AD + 0.022BC - 0.18BD + 0.016CD - 0.12A^2 - 0.030B^2 - 0.28C^2 - 0.095D^2。$$

表1 多酚响应面实验因素水平

水平	A 提取时间/min	B 提取温度/°C	C 料液比/(g/mL)	D 乙醇浓度/%
-2	40	30	1:10	20
-1	60	40	1:15	30
0	80	50	1:20	40
1	100	60	1:25	50
2	120	70	1:30	60

表2 响应面分析方案及实验结果

序号	A	B	C	D	提取率/%
1	0	0	0	0	12.97
2	0	-2	0	0	13.23
3	1	-1	1	-1	13.30
4	-1	-1	-1	1	12.11
5	0	0	0	0	12.80
6	-2	0	0	0	12.63
7	1	1	1	1	12.20
8	0	0	0	2	12.45
9	1	1	1	-1	12.88
10	-1	1	-1	-1	11.64
11	0	0	0	0	12.91
12	1	-1	1	1	13.39
13	0	0	0	0	12.99
14	0	0	0	0	12.99
15	0	0	0	0	12.91
16	0	0	0	-2	12.51
17	-1	1	-1	1	11.66
18	0	0	2	0	13.11
19	0	2	0	0	12.25
20	-1	1	1	-1	13.42
21	2	0	0	0	12.07
22	-1	1	1	1	13.25
23	1	-1	-1	-1	12.20
24	-1	-1	1	-1	13.09
25	-1	-1	1	1	13.84
26	-1	-1	-1	-1	11.51
27	0	0	-2	0	10.41
28	1	1	-1	-1	11.57
29	1	1	-1	1	10.81
30	1	-1	-1	1	12.08

表3 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
模型	18.32	14	1.31	150.38	<0.000 1	**
A	0.43	1	0.43	49.34	<0.000 1	**
B	1.53	1	1.53	175.27	<0.000 1	**
C	12.31	1	12.31	1 414.94	<0.000 1	**
D	6.338 × 10 <sup>-3</sup>	1	6.338 × 10 <sup>-3</sup>	0.73	0.406 9	
AB	0.54	1	0.54	61.66	<0.000 1	**
AC	0.15	1	0.15	17.70	0.000 8	**
AD	0.45	1	0.45	51.20	<0.000 1	**
BC	7.656 × 10 <sup>-3</sup>	1	7.656 × 10 <sup>-3</sup>	0.88	0.363 1	
BD	0.53	1	0.53	60.82	<0.000 1	**
CD	3.906 × 10 <sup>-3</sup>	1	3.906 × 10 <sup>-3</sup>	0.45	0.513 0	
A <sup>2</sup>	0.45	1	0.45	51.33	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	0.025	1	0.025	2.86	0.111 7	
C <sup>2</sup>	2.08	1	2.08	238.56	<0.000 1	**
D <sup>2</sup>	0.25	1	0.25	28.51	<0.000 1	**
残差	0.13	15	8.702 × 10 <sup>-3</sup>			
失拟项	0.10	10	0.010	1.96	0.236 2	
纯误差	0.026	5	5.297 × 10 <sup>-3</sup>			
总变异	18.45	29				

注:\*\*表示极显著(P<0.01)。

表3 回归模型方差分析结果显示:该模型回归极显著(P<0.000 1),失拟项不显著(P>0.05),回归模型的决定系数 R<sup>2</sup> = 0.992 9,调整系数 R<sup>2</sup><sub>adj</sub> = 0.986 3,说明该模型与实际实验拟合较好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以用于石榴皮多酚提取率的理论预测。从回归方程系数显著性检验可知,各因素对多酚提取率的影响程度依次为:料液比 > 提取温度 > 提取时间 > 乙醇浓度;交互项 AB、AC、AD、BD 极显著(P<0.01);二次项 A<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对多酚提取率有极显著影响(P<0.01)。

### 2.3.2 响应面分析及最佳提取工艺研究

响应面优化主要是根据响应面的三维图以及标准残差图来对影响响应值的独立变量进行进一步的分析,从3D图中可以很直观地看出各个变量之间的交互作用对结果的影响。石榴皮多酚提取工艺优化的响应面及等高线见图6~图8,列出了交互作用极显著(P<0.01)的3项 AB、AD、BD,直观地反映了各因素对提取率响应值的影响。

图6表示提取时间和提取温度及两者交互作用对石榴皮多酚提取率的影响。从图中可以看出当提取温度较低时,随着提取时间的增长提取率先增大后降低,当提取温度较高时,随着提取时间的增长提取率越来越低;当提取时间延长时,提取温度越高提取率反而越低。

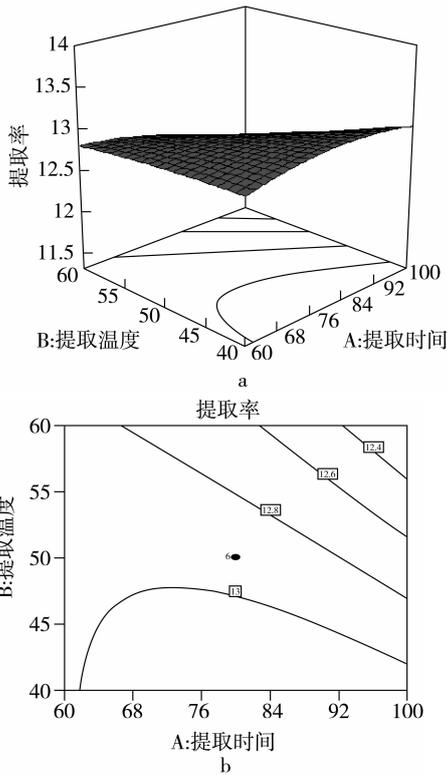


图6 提取时间和提取温度的交互作用对石榴皮多酚提取率影响的响应面(a)和等高线(b)

图7表示提取时间和乙醇浓度及两者交互作用对石榴皮多酚提取率的影响。从图中可以看出

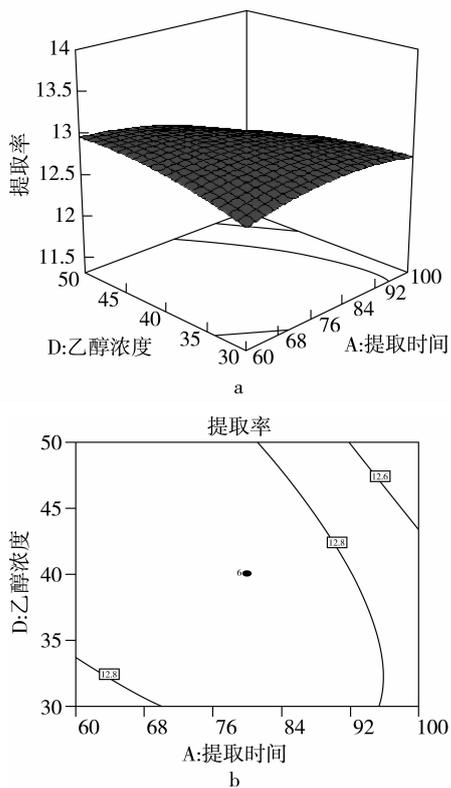


图7 提取时间和乙醇浓度的交互作用对石榴皮多酚提取率影响的响应面(a)和等高线(b)

当提取时间较长时,乙醇浓度越低提取率越高,当提取时间较短时,乙醇浓度越高提取率越大;当乙醇浓度较低时,随着提取时间的延长提取率先增高后降低,当乙醇浓度较高时,提取率随着提取时间的延长而降低。

图8表示提取温度和乙醇浓度及两者交互作用对石榴皮多酚提取率的影响。从图中可以看出当提取温度较低时,随着乙醇浓度的增大提取率逐渐提高,当提取温度较高时,随着乙醇浓度的增大提取率逐渐降低;当乙醇浓度变化时,提取温度越高提取率越低。

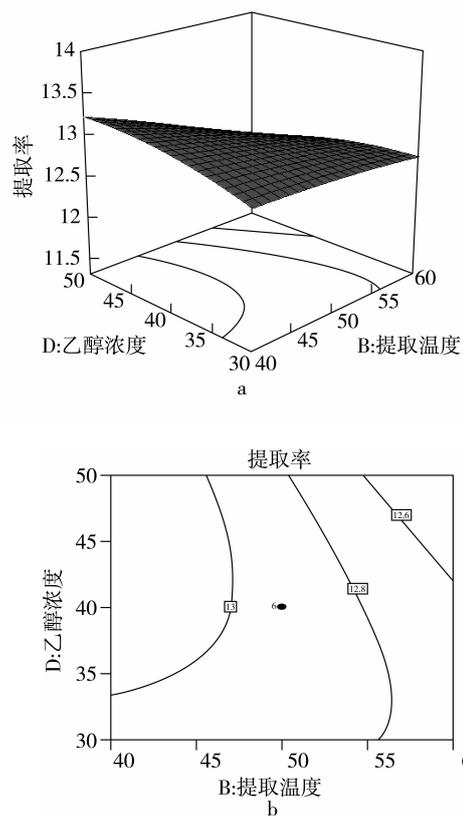


图8 提取温度和乙醇浓度的交互作用对石榴皮多酚提取率影响的响应面(a)和等高线(b)

运用 Design Expert 8.0.6 的响应面分析软件对实验结果进行优化,得到石榴皮多酚提取的最优条件为:提取时间 60.89 min,提取温度 30 ℃,料液比 1:27.25 g/mL,乙醇浓度 60%,石榴皮多酚提取率预测达到最大值 14.1849%。为符合实际操作,将最优提取条件简化为:提取时间 60 min,提取温度 30 ℃,料液比 1:25 g/mL,乙醇浓度 60%,按此工艺提取石榴皮多酚,进行3次重复实验,得到石榴皮多酚提取率的平均值为 14.09%,与预测值接近,说明响应面优化得到石榴皮多酚的提取工艺

在实践中可行。

### 2.4 石榴皮多酚抑菌活性测定

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为供试菌株,研究石榴皮多酚的抑菌活性,结果如表4所示,多酚浓度为8 mg/mL时,对应的抑菌圈直径分别为24.50 mm和20.98 mm;减小多酚的浓度,其抑菌圈直径相对减小,当浓度为3 mg/mL时,抑菌效果不明显;当浓度为2 mg/mL时将不再有抑菌效果。实验表明,石榴皮多酚最小抑菌浓度为3 mg/mL,此时对应金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径分别为9.36 mm和8.64 mm。

表4 石榴皮多酚抑菌活性测定

多酚提取液浓度 (mg/mL)	抑菌圈直径/mm	
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
1	-	-
2	-	-
3	9.36 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.64 ± 0.09 <sup>a</sup>
4	17.25 ± 0.06 <sup>b</sup>	16.35 ± 0.04 <sup>b</sup>
5	17.56 ± 0.03 <sup>c</sup>	16.87 ± 0.06 <sup>c</sup>
6	19.53 ± 0.05 <sup>d</sup>	18.62 ± 0.07 <sup>d</sup>
7	22.25 ± 0.09 <sup>e</sup>	19.51 ± 0.10 <sup>e</sup>
8	24.50 ± 0.05 <sup>f</sup>	20.98 ± 0.07 <sup>f</sup>

注:采用Duncan's multiple range test方法分析,同一列不含相同字母表示差异显著(P < 0.05, n = 3)。

### 3 结论

采用有机溶剂乙醇提取法提取石榴皮多酚,通过对乙醇浓度、料液比、提取时间和提取温度进行单因素实验和响应面分析,确定最佳提取工艺:60%的乙醇溶液按1:25 g/mL的料液比,在30℃条件下提取60 min,得提取率为14.09%。

抑菌实验测定结果表明,石榴皮多酚对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度为3 mg/mL,此时的抑菌圈直径分别为9.36 mm和8.64 mm。

石榴皮多酚的研究在近几年得到了快速发展,据文献<sup>[15-18]</sup>报道石榴皮多酚在抑制人肝癌细胞HepG2的生长、抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、抑制人宫颈癌HeLa细胞的增殖、降胆固醇作用等方面有很多应用和治疗价值。本研究采用的乙醇提取剂本身无毒、易挥发和分离处理,因此对石榴皮多酚乙醇提取工艺的研究可较好地地为石榴皮多酚在医学等方面的研究奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 李云峰,郭长江,杨继军,等. 石榴皮抗氧化物质提取及其体外抗氧化作用研究[J]. 营养学报,2004,26(2):144-147.
- [2] 王志远,李清彪,杨翠娟,等. 八种水果中的多酚含量及其抗氧化性[J]. 天然产物研究与开发,2007(6):1040-1043.
- [3] 程霜,郭长江,杨继军,等. 石榴皮多酚提取物降血脂效果的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志,2015,23(3):160-162.
- [4] 王春梅. 石榴皮多酚抗肿瘤活性机制的初步研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2013.
- [5] 黄和,曹湛慧,曹增梅,等. 番石榴多酚对虾肉糜的保鲜效果研究[J]. 食品与机械,2014,30(1):159-161.
- [6] Hossain FLA. Effect of pomegranate (Punica granatum) peels and its extract on obese hypercholesterolemic rats [J]. Pakistan Journal of Nutrition,2009,8(8):1251-1258.
- [7] Das A K, Mandal S C, Banerjee S K, et al. Studies on the hypoglycaemic activity of Punica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats [J]. Phytotherapy Research, 2001,15(7):628-637.
- [8] 贾冬英,姚开,谭薇,等. 石榴皮中多酚提取条件的优化[J]. 林业化学与工业,2006,26(3):123-126.
- [9] 朱彩平,张艳霞,张晓,等. 石榴皮多酚提取方法研究进展[J]. 食品与发酵工业,2015,41(11):243-246.
- [10] 唐丽丽,刘邻渭,马兆瑞,等. 石榴皮多酚物质提取工艺研究[J]. 山西农业科学,2015,43(9):1179-1182.
- [11] Li W B, Sun H Y, Zhou J W, et al. Antibacterial activities, antioxidant contents and antioxidant properties of three traditional Chinese medicinal extracts [J]. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2015, 10:131-137.
- [12] Sun H Y, Li Z, Liu W X, et al. In vitro antibacterial activities of antibiotics and traditional Chinese medicinal herb extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus [J]. Asian Journal of Chemistry, 2014,26(1):298-302.
- [13] Vernel S, Rudolf O, Rosa M, Lamuela-Raventos. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods in Enzymology, 1999, 10(3):152-178.
- [14] 刘硕谦,刘仲华,黄建安. 紫外分光光度法检测水皂角总多酚的含量[J]. 食品工业科技,2003,24(6):76-77.
- [15] 李佳. 石榴皮多酚对人肝癌细胞 HepG2 的抗肿瘤活性及其分子机制研究[D]. 西安:陕西师范大学,2015.
- [16] 章迅,吴艾平,章永红. 石榴皮多酚对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖及凋亡的影响[J]. 天津中医药大学学报,2012,12,31(4):214-217.
- [17] 马倩倩. 石榴皮多酚对肝细胞胆固醇合成影响及其分子机制研究[D]. 西安:陕西师范大学,2013.
- [18] 杨滨,李婉萍,姜晓明,等. 石榴皮多酚的提取及其对人宫颈癌 HeLa 细胞作用的研究[J]. 山东医药,2010,50(24):50-51.

