

## 石榴皮活性物质提取及其 W/O/W 乳液稳态化包埋研究

左云会<sup>1,2</sup>, 胡腾根<sup>2</sup>, 朱永清<sup>3</sup>, 徐玉娟<sup>2</sup>, 唐语谦<sup>1\*</sup>, 余元善<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510641

<sup>2</sup> 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所 广州 510610

<sup>3</sup> 四川省农业科学院园艺研究所 成都 610066)

**摘要** 石榴是药食同源的水果,在加工过程会产生大量石榴皮渣等副产物。为提高石榴副产物利用率,本文采用不同方法提取石榴皮活性成分,研究其抗氧化活性。采用水包油包水型乳液(W/O/W 乳液)对其进行稳态化包埋,研究 W/O/W 对多酚稳定性及生物利用率的影响。结果表明:相比超高压提取和酶法提取,超声辅助醇提法具有较高的多酚提取率,为 25%。石榴皮渣活性提取物对 DPPH、羟基自由基清除力、总还原力好于 VC;ABTS<sup>+</sup>清除活性与 VC 无显著差异;在质量浓度 0.4 mg/mL 以下时,对超氧阴离子清除能力高于 VC。W/O/W 乳液能提高石榴皮渣活性提取物的储藏稳定性,且可使石榴皮活性物质免受体外胃消化的影响,靶向地在模拟小肠内传递和释放。本研究为石榴皮副产物的深加工提供了理论参考。

**关键词** 石榴皮;多酚;抗氧化活性;W/O/W 乳液;稳态化包埋

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0167-17 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.016

石榴为石榴科石榴属植物,不仅具有较高的营养价值,还具有良好的保健及医用功能<sup>[1]</sup>。中国作为石榴种植产业大国,种植面积达到 12 万 hm<sup>2</sup>,年产量 120 万 t 左右。石榴籽和石榴花等都得到较为充分的利用,而石榴皮资源作为石榴加工废料,在鲜果中的比重较大,除少数药用外,大多未加工利用,造成极大的资源浪费。石榴皮含有丰富的营养成分,富含多酚、黄酮类等活性成分。研究发现,相比果肉和种子,石榴果皮中多酚含量最为丰富。刘佩等<sup>[2]</sup>研究了 9 种植物源多酚的分离提取,发现石榴皮多酚提取含量最高(523.05 mg/g)。从石榴皮中提取活性物质,可促进石榴副产物的加工、利用,减少资源浪费。

目前提取多酚的方法多样,其中超声波辅助提取法具有显著优势。植物组织和细胞因空化泡的快速产生和破裂产生的强大冲击波和局部高温、高压等副作用而遭到破坏,促进细胞内溶液和溶剂的对流和溶质交换,具有持续时间短,提取能

力强的优点。Pan 等<sup>[3]</sup>用不同方法从石榴皮中提取多酚,发现超声辅助提取法比传统溶剂法的提取时间缩短 90%,得率提高 24%。

体内自由基增多是引发癌症、肿瘤、衰老等疾病的直接原因。近年来,国内外研究表明石榴中含有多酚等活性物质,石榴皮中多酚以水解单宁为主<sup>[4]</sup>,极易被氧化的邻位酚羟基赋予其较强的抗氧化性,它能有效防止自由基对健康细胞的有害影响,从而防治多种疾病。唐鹏程等<sup>[5]</sup>研究发现,与没食子酸和绿茶多酚比较,石榴皮提取物具有良好的清除自由基及抑制脂质过氧化的能力。Li 等<sup>[6]</sup>比较了石榴皮和石榴浆提取物的抗氧化作用,石榴皮浸提物中含有大量抗氧化物质,具有更强的自由基清除效果和抑制低密度脂蛋白氧化的能力。

然而,多酚物质对环境较为敏感,见光遇热易分解。双层乳液的制备可保护多酚类物质免受不利环境的损害,并提高其生物利用率。双层乳液是将一种乳液包埋在另一种乳液中,每个分散的球状体呈囊状结构,单个或多个水相室通过一层油相隔间与连续水相隔开。更常见形态是水包油包水(W/O/W)型,一种含有较小的油滴的水连续系统,可以封装和保护敏感的水溶性成分。Xia 等<sup>[7]</sup>通过制备双层乳液来递送不稳定的 VC 和 VE,最终获得稳定的含有 VC 和 VE 的 W/O/W 乳液化妆品。

**收稿日期:** 2023-09-06

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2021YFD1600800);广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515010662)

**第一作者:** 左云会,女,硕士生

**通信作者:** 余元善 E-mail: yuyuanshan2016@qq.com  
唐语谦 E-mail: yqtang@scut.edu.cn

综上所述,本研究针对石榴皮渣加工率低、资源浪费严重等问题,提取其活性成分。通过活性物质的稳态化包埋实现靶向递送,最终使石榴副产物高效利用,提升了附加值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

成熟软籽石榴,四川会理。没食子酸(纯度 $\geq 98\%$ )、芦丁(纯度 $\geq 95\%$ )、半乳糖醛酸(纯度 $\geq 97\%$ )、纤维素酶(50 U/mg)、果胶酶(500 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg),购于上海源叶生物科技有限公司;胃蛋白酶、脂肪酶,由 Sigma-Aldrich 公司提供。所有其它化学试剂均为分析纯。

### 1.2 设备与仪器

WRH-100TB1S 热泵干燥机,广东威而信实业有限公司;DL-400B 智能超声波清洗器,上海之信仪器有限公司;NU-C200R-E 台式离心机,天美(中国)科学仪器有限公司;T25 digital ULTRA-TURRAX®均质机,艾卡(广州)仪器设备有限公司;SHHP-57DZM-600 高静压设备,山西三水河科技股份有限公司;NVC-2200B 真空旋蒸仪,上海爱朗仪器有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,上海力辰邦西仪器科技有限公司;HWS-24 电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;UV-1900i 紫外分光光度计,日本岛津公司;Malvern Zetasizer Nano ZSE 纳米粒径电位分析仪,英国 Worcestershire 公司;CX41 生物显微镜,埃克森(北京)科技有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 原料前处理 成熟软籽石榴除去病果和裂果,剥皮并置于 50℃下恒温干燥,粉碎后过 80 目筛,粉末避光保存在干燥处备用。

#### 1.3.2 活性物质提取及含量测定

##### 1.3.2.1 活性物质的提取

1) 超声辅助醇提法 参考文献[8]方法,略有改动。精确称取 10 g 石榴皮粉末于 500 mL 锥形瓶中,加入 250 mL 70%甲醇混匀,320 W 超声提取 30 min 后,12 000 $\times$ g,离心 4 min,去除残渣,收集上层清液,即为石榴皮活性物质提取液。

2) 超高压提取法 参考文献[9]方法,略有改动。称取一定量石榴皮粉末装入铝箔复合袋中,按

一定料液比加入 58.2%乙醇水溶液至料液比为 1:41,抽真空后密封;将袋子放入高压设备容腔,手动升压到 583 MPa 后保压 2 min;迅速卸除容腔压力;取出后过滤即得到石榴皮活性物质提取液,按照以上操作提取 2 次后合并提取液。

3) 酶法提取 参考文献[10]方法,略有改动。精密称取石榴皮粉末 5.0 g,置于 250 mL 干燥锥形瓶中,加入复合酶质量分数为 3%(44.2%纤维素酶、31.6%果胶酶和 24.2%木瓜蛋白酶),再加入磷酸盐缓冲液(pH 5)至料液比为 1:18,50℃水浴酶解 4 h,反应结束后,立即在沸水中灭酶 10 min,抽滤,滤液定容至 100 mL。

##### 1.3.2.2 多酚含量的测定

1) 没食子酸标准曲线的绘制 取 0.04 g 没食子酸标准品加水溶解并定容到 1 000 mL 容量瓶中,得到 0.04 mg/mL 的没食子酸标准溶液。用蒸馏水稀释一定倍数得到质量浓度分别为 0.008,0.016,0.024,0.032,0.04 mg/mL 的没食子酸溶液。分别吸取上述溶液各 1.0 mL 于 10 mL 具塞试管中,并分别加入福林酚试剂 2 mL,摇匀后分别加入 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液 2 mL,充分混匀后在室温下避光静置 60 min,于 760 nm 测得吸光值。将没食子酸质量浓度( $X$ )与所测得的吸光值( $Y$ )进行线性回归,得到其线性直线回归方程。

2) 提取液中多酚含量的测定 将提取液稀释一定倍数,按上述相同步骤测定其吸光值,按照线性方程计算出多酚质量浓度,进而可得到石榴皮中的多酚含量,以没食子酸物质含量表示(mg-GAE/g)。

$$\text{总酚含量(mgGAE/g)} = \frac{c \times v \times n}{m} \quad (1)$$

式中: $c$  为样品多酚质量浓度(以没食子酸质量浓度计),mg/mL; $v$  为提取液总体积,mL; $n$  为稀释倍数; $m$  为石榴皮粉末质量,g。

##### 1.3.2.3 黄酮含量测定

1) 芦丁标准曲线的绘制 称取芦丁标准品 10.5 mg,用 70%甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中,即得 0.21 mg/mL 的芦丁溶液。分别量取芦丁溶液 0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中,精密加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 1 mL,摇匀放置 6 min,加入 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 1 mL,摇匀放

置6 min, 加入4% NaOH溶液8 mL, 然后加入70%甲醇溶液定容, 摇匀, 放置15 min, 在508 nm波长处测定吸光度, 以吸光度(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线。

2) 提取液中黄酮含量的测定 样品溶液稀释一定倍数, 精密吸取样品溶液2.0 mL于25 mL容量瓶中, 按上述相同步骤测定其吸光值, 根据标准曲线方程计算黄酮质量浓度, 进而计算得出石榴皮中黄酮含量, 以芦丁物质含量表示(mgRE/g)。

$$\text{黄酮含量(mgRE/g)} = \frac{c \times v \times n}{m} \quad (2)$$

式中:  $c$  为样品黄酮质量浓度, mg/mL;  $v$  为提取液体积, mL;  $n$  为稀释倍数;  $m$  为石榴皮粉末的质量, mg。

### 1.3.3 抗氧化活性测定

1.3.3.1 DPPH 自由基清除率 配制浓度为0.129 mmol/L的DPPH工作液。试管中加入1 mL不同质量浓度(8~40  $\mu\text{g/mL}$ ) VC溶液试液/石榴皮提取液和4 mL DPPH工作液, 室温避光放置10 min, 于520 nm处测定吸光度( $A_1$ )。1 mL无水乙醇代替VC溶液试液/石榴皮提取液测定混合液的吸光度( $A_0$ ), 4 mL无水乙醇代替4 mL DPPH工作液测定混合液的吸光度( $A_2$ ), 按式(3)计算试液的DPPH·清除率。并计算 $\text{IC}_{50}$ 。 $\text{IC}_{50}$ 代表当清除率达到50%时所需的样品质量浓度, 该值越小, 表示抗氧化性越强。

$$\text{DPPH 清除率(\%)} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (3)$$

1.3.3.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率 吸取300  $\mu\text{L}$ 不同质量浓度(0.02~0.1 mg/mL) VC溶液/石榴皮提取液加入6 mL ABTS<sup>+</sup>工作液中, 混合均匀, 室温避光静置10 min后, 于波长734 nm下测其吸光度( $A_i$ ), 以300  $\mu\text{L}$ 无水乙醇代替同体积的VC溶液/石榴皮提取液测定得到( $A_c$ ), 以6 mL蒸馏水代替同体积的ABTS<sup>+</sup>工作液测定得到( $A_j$ )。按式(4)计算样液的ABTS<sup>+</sup>清除率。

$$\text{ABTS 清除率(\%)} = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}) \times 100 \quad (4)$$

1.3.3.3 总还原力测定 在1.5 mL不同质量浓度(0.02~0.1 mg/mL)的VC/石榴皮提取物溶液中加入1.5 mL pH 6.6的磷酸盐缓冲液, 1.5 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液, 50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min。取出后加入

1 mL 10%  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ 溶液, 4 000 r/min离心5 min。取出1.0 mL上清液, 依次加入2.0 mL蒸馏水、1 mL 0.1%  $\text{FeCl}_3$ , 振荡混合后静置5 min, 700 nm处测量吸光度。以VC为标准制作标准曲线, 水为空白对照。

1.3.3.4 羟基自由基清除率 分别取1 mL不同质量浓度(0.2~1.0 mg/mL) VC溶液/石榴皮提取液, 依次加入1 mL 1.8 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ 、1 mL 0.09 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 振荡混匀, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min后, 加入1 mL 9 mmol/L水杨酸-乙醇, 振荡混匀, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min, 在波长510 nm下测吸光度为 $A_1$ ; 用1 mL去离子水替代测试溶液, 测定吸光度为 $A_0$ ; 用2 mL去离子水替代1 mL  $\text{FeSO}_4$ 和1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、1 mL乙醇替代水杨酸-乙醇, 测定吸光度为 $A_2$ 。按式(5)计算-OH清除能力。

$$-\text{OH 清除能力} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}) \times 100 \quad (5)$$

1.3.3.5 超氧阴离子清除率 在试管中依次加入4.5 mL pH 8.2的0.05 mol/L的Tris-HCl缓冲液、0.1 mL不同质量浓度(0.02~0.1 mg/mL) VC溶液/石榴皮提取液, 25  $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热20 min, 后加入0.4 mL 25  $^{\circ}\text{C}$ 提前预热的2.5 mmol/L邻苯三酚溶液, 继续25  $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应4 min, 加入2滴8 mol/L HCl终止反应, 在300 nm处测定吸光度值 $A_2$ ; 以蒸馏水取代测试溶液测得吸光值 $A_0$ ; 以蒸馏水取代邻苯三酚测得吸光值 $A_1$ 。VC作为阳性对照。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率(\%)} = (1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0}) \times 100 \quad (6)$$

1.3.4 W/O乳液制备 取一定体积的0.7 mg/mL石榴皮提取物水溶液作为内水相W; 在食用油中加入5%(V/V) span80, 之后室温下搅拌15 min后制成油相O。之后将内水相W、油相O进行混合, 在10 000 r/min下均质2 min, 得到W/O乳液。

1.3.4.1 油水比对乳液稳定性的影响 选取葵花油作油相, 水相为石榴皮提取液, 乳化剂添加量为5%, 设置油相和水相比例(油水比)为9:1, 8:2, 7:3, 6:4研究不同油水比对乳液稳定性的影响。

1.3.4.2 食用油种类对乳液稳定性的影响 选取油水比为9:1, 乳化剂添加量为5%, 比较葵花油和大豆油对乳液稳定性的研究。

1.3.4.3 乳化剂添加量对乳液稳定性的影响 选



取葵花油作油相,油水比为9:1,乳化剂添加量为油相得1%,5%,10%,研究其对乳液稳定性的影响。

1.3.4.4 氯化钠添加量对乳液稳定性的影响 选取葵花油作油相,油水比为9:1,乳化剂添加量为油相得5%,在水相添加NaCl(0,5,10 mmol/L)研究其对乳液稳性的影响。

1.3.5 W/O/W乳液制备 首先,将1%乳清蛋白(WPI)和1%低酯果胶(LM)分别溶于去离子水,室温下搅拌2 h,之后置于4℃冰箱中过夜。将WPI和LM混合搅拌1 h,制成外水相,在外水相中加入制备好的W/O初乳,7 000 r/min下均质2 min,制得W/O/W乳液。

1.3.5.1 内外比对乳液稳定性的影响 W/O乳液作内相,外水相为WPI-LM混合溶液,设置内相和外水相比例(内外比)为1:9,2:8,3:7,4:6,研究不同内外比对乳液稳定性的影响。

1.3.5.2 WPI和LM添加量对乳液稳定性的影响

外水相制备过程中,将溶解好的WPI溶液和LM溶液按不同比例(1:1,2:1,3:1)混合,研究不同比例添加量对乳液稳定性的影响。

1.3.6 乳液表征

1.3.6.1 微观结构 吸取适量乳液到载玻片上,覆盖盖玻片,使其平铺均匀后在光学显微镜下观察。其中,W/O乳液用4倍物镜观察,W/O/W乳液用10倍物镜观察。

1.3.6.2 Zeta-电位和粒径测定 将乳液用超纯水稀释一定倍数,在25℃条件下用Zetasizer测量Zeta电位和粒径。

1.3.6.3 乳化活性和乳化稳定性测定 将40 μL双层乳液与8 mL 0.1% SDS溶液中混合均匀。在500 nm波长下测定吸光度 $A_0$ 。60 min后再次测定吸光度 $A_{60}$ 。按式(7)、式(8)计算乳液活性指数( $E_{AI}$ )和乳液稳定性指数( $E_{SI}$ )。

$$E_{AI} = 2 \times 2.303 \times \frac{A_0 N}{C \theta \times 10000} \quad (7)$$

$$E_{SI} = \frac{30 A_0}{A_0 - A_{60}} \quad (8)$$

式中: $N$ 为稀释倍数,取200; $C$ 为W/O/W乳液形成前外水相添加的蛋白质的质量浓度,g/mL; $\theta$ 为双层乳液中油相的体积分数,%。

1.3.6.4 储藏稳定性测定 将制备好的乳液室温下放置1,3,7,10 d,用相机记录乳液的状态。

1.3.6.5 流变性质测定 采用旋转流变仪测定W/O/W乳液的流变性质。取1.5 mL乳液置于直径40 mm的平行板之间。设置参数:测量间隙为1 mm,温度为25℃。剪切速率范围为0.1~100 s<sup>-1</sup>,以对数变化规律扫描黏度曲线。

1.3.6.6 包埋率测定 取2 mL乳液在15 000 r/min下离心10 min后,用注射器收集下层清液,过0.45 μm滤膜得到滤液。然后采用福林酚法测定滤液中的多酚含量。

$$\text{包埋率 EE(\%)} = \frac{A_T - A_I}{A_T} \times 100 \quad (9)$$

式中: $A_T$ 为在内水相中添加的石榴皮多酚总量,mg; $A_I$ 为新鲜制备的双重乳液中迁移到外水相的石榴皮多酚初始量,mg。

1.3.7 模拟体外消化 胃消化阶段:100 mL超纯水中加入0.2 g氯化钠和0.7 mL浓盐酸室温下完全溶解制备模拟胃液。实验开始前40 min将0.032 g胃蛋白酶加入到模拟胃液中,室温下搅拌制备模拟胃液工作液。

肠消化阶段:150 mL超纯水加入5.5 g CaCl<sub>2</sub>和32.87 g NaCl充分搅拌制得肠道液体。100 mL 5 mmol/L PBS缓冲液(pH 7.0)中加入5.357 g胆盐,在室温下搅拌过夜制备胆盐溶液。肠期反应前30 min在100 mL 5 mmol/L PBS缓冲液(pH 7.0)中加入2.4 g粉状脂肪酶混合制备脂肪酶溶液。

每次研究前,将乳液稀释10倍,所有工作液37℃预热10 min。取10 mL样品乳液进行胃消化,首先用1 mol/L盐酸将胃液工作液pH值调至1.2,取10 mL胃液工作液与样品乳液混合,然后用1 mol/L NaOH调pH值至2.0,37℃避光水浴100 r/min连续搅拌2 h,最后用0.25 mol/L NaOH迅速调pH值至7.0,完成胃模拟消化阶段。取5 mL消化液继续下一阶段消化,加入3 mL肠道液体和7 mL胆盐溶液,再用0.25 mol/L NaOH调节pH值至7.0,而后加入5 mL脂肪酶溶液,37℃避光水浴100 r/min连续搅拌2 h完成肠模拟消化。模拟消化完成后取2 mL消化物与2 mL蒸馏水涡旋,15 000 r/min离心10 min,收集滤液用于分析

和测定石榴皮多酚释放率。

1.3.8 数据统计与分析 实验数据采用软件 Graphpad Prism7 作图, 软件 SPSS26 进行方差分析。采用 Duncan 法进行显著性分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。所有数据均为平行测定 3 次的结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 活性物质含量

由图 1a 可以看出, 不同方法提取所得石榴皮多酚、黄酮含量有所不同, 由多到少排序为: 超声辅助醇提法 > 酶解提取法 > 超高压提取法, 多酚含量依次为 250, 175.55, 123.00 mgGAE/g, 黄酮含量依次为 49.65, 36.00, 10.25 mgRE/g, 由此可知, 超声辅助醇提所得多酚和黄酮含量显著高于其它提取方法, 造成这种现象的原因是机械破碎和超声波的空化效应加速了浸出液从原料到溶剂的扩散, 从而使提取率提高。此外, 大量研究也表明, 超

声辅助醇提取法能提高多种植物中的多酚和黄酮提取率, 是一种高效的提取活性物质的方法。例如张婷婷等<sup>[11]</sup>采用不同方法提取陈皮中的黄酮, 得出的结论是超声提取法提取橙皮苷、川陈皮素、桔皮素的提取率均高于其它方法。

原料前处理方式不同, 也会影响植物活性物质的提取得率。由图 1b 可知, 相比于未干燥组, 经过热泵干燥处理后, 超声辅助醇提石榴皮活性物质显著提高, 多酚含量为 250 mgGAE/g, 是未烘干处理多酚含量的 1.48 倍。造成这种现象的原因可能如王林枫等<sup>[12]</sup>在研究干燥处理对苹果渣多酚含量影响的报道一致, 在苹果渣的干燥过程中, 一方面多酚酶发挥作用导致苹果多酚降低, 另一方面缩合反应的发生引起多酚含量增加, 干燥初始阶段主要是多酚酶在发挥作用, 当多酚氧化酶基本失活后, 多酚就不再分解, 进入以缩合反应为主的阶段, 此时多酚含量会升高。

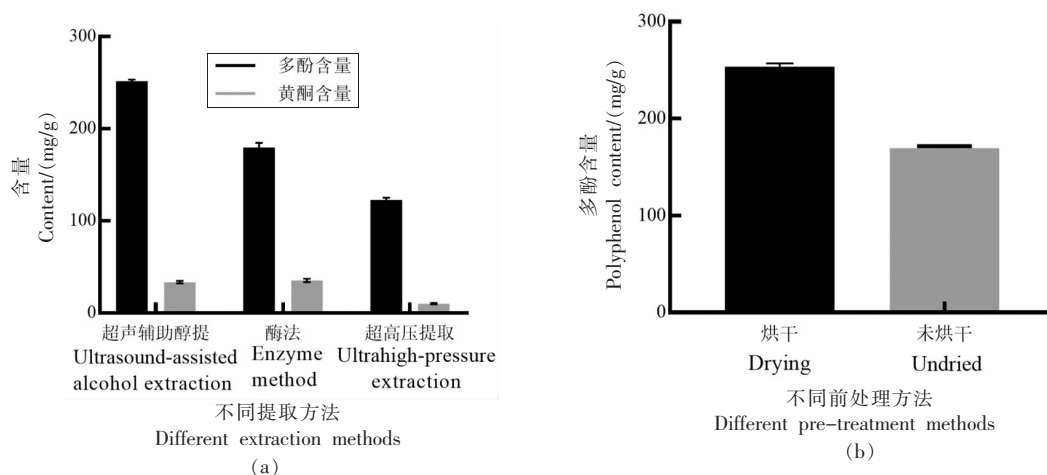


图 1 不同提取方法(a)、不同前处理方法(b)对提取石榴皮活性物质含量影响

Fig.1 Effects of different extraction methods (a) and different pre-treatment methods (b) on the content of extracted active substances of pomegranate peel

### 2.2 抗氧化能力

2.2.1 DPPH 自由基清除率 紫色的 DPPH 醇溶液当遇到存在抗氧化活性的物质时会发生褪色, 褪色程度与样品抗氧化能力成正比<sup>[13]</sup>。如图 2a 所示, 在 8~24  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 石榴皮提取物对 DPPH 的清除率逐渐上升; 而当提取物浓度为 24  $\mu\text{g/mL}$  时, 其对 DPPH 清除率达到最大为 65%; 当提取物浓度进一步增加时, 其对 DPPH 清除率出现下降

趋势。但与 VC 清除能力相比, 提取物对 DPPH 具有比 VC 更好的清除能力。通过拟合方程算出石榴皮提取物对 DPPH 的清除作用的  $\text{IC}_{50}$  为 17.64  $\mu\text{g/mL}$ 。邓娜等<sup>[14]</sup>发现石榴籽多酚类成分对 DPPH 清除作用的  $\text{IC}_{50}$  为 110.356  $\mu\text{g/mL}$ , 是石榴皮提取物的 6.26 倍, 而石榴瓢中多酚类成分对 DPPH 清除作用的  $\text{IC}_{50}$  为 171.987  $\mu\text{g/mL}$ , 比石榴皮提取物高出将近 10 倍, 表明石榴皮相比其它部位具有较

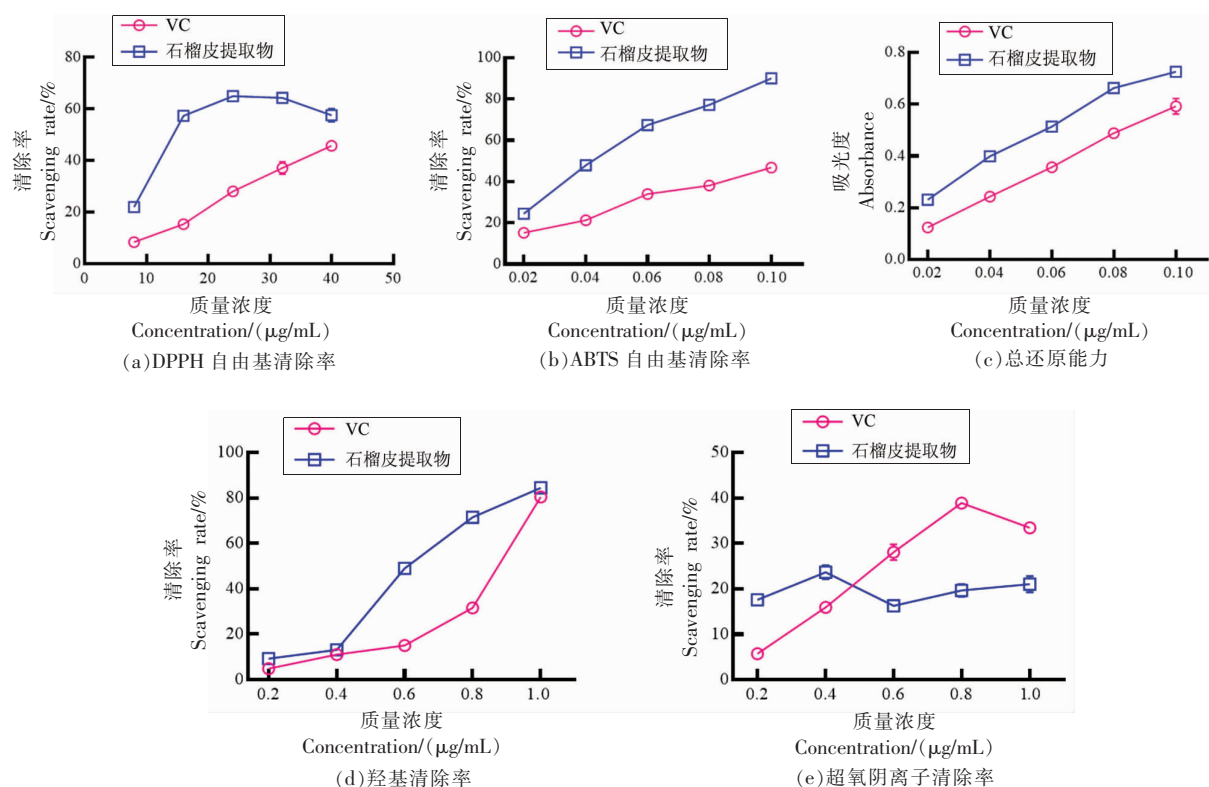


图2 石榴皮提取物抗氧化研究

Fig.2 Antioxidant study of pomegranate peel extract

高的抗氧化性能。

**2.2.2 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率** 由图 2b 可知,相同浓度下,石榴皮提取物对 ABTS<sup>+</sup>的清除效果高于 VC 且随着浓度的增加,这种趋势逐渐增大。结果表明石榴皮提取物对 ABTS<sup>+</sup>具有良好的清除能力,且好于阳性对照 VC。石榴皮提取物对 ABTS<sup>+</sup>清除作用的 IC<sub>50</sub>=39.66 μg/mL。范金波等<sup>[15]</sup>研究发现白藜芦醇对 ABTS<sup>+</sup>清除作用的 IC<sub>50</sub> 为 56.0 μg/mL,这与石榴皮提取物对 ABTS<sup>+</sup>清除作用的 IC<sub>50</sub> 相接近。

**2.2.3 总还原力测定** 以普鲁士蓝[Fe<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)<sub>3</sub>]之生成量作为指标来评价抗氧化剂总还原力,其在 700 nm 处有特征吸收峰,吸光值愈高表示样品的还原力越强。如图 2c 所示,在 0.02~0.1 mg/mL 质量浓度范围内,石榴皮提取物和 VC 的吸光度与各自质量浓度呈现出线性关系,其中 VC 的线性方程为  $y = 5.875x + 0.0075$ ,  $R^2 = 0.9999$ ,提取物的线性方程为  $y = 6.335x + 0.1243$ ,  $R^2 = 0.9856$ 。随浓度的增大呈现上升趋势,表明石榴皮提取物和 VC 对 Fe<sup>2+</sup>还原能力随浓度的增加逐渐增强;且相

同浓度下,石榴皮提取物的还原能力要强于 VC。这与李国秀等<sup>[16]</sup>的研究结果类似。

**2.2.4 羟基自由基清除率** -OH 是对人体造成氧化损伤中最重要的表现因子<sup>[17]</sup>,它可使人体内糖类、蛋白质等物质发生氧化反应,还可与脂质反应生成脂自由基,导致细胞的功能、结构发生改变。如图 2d 所示,在质量浓度 0.2~1.0 mg/mL 范围内,随着 VC 和石榴皮提取物浓度增加,其清除-OH 的能力呈现上升趋势,石榴皮提取物对-OH 清除作用的 IC<sub>50</sub>=0.6209 mg/mL,VC 对-OH 清除作用 IC<sub>50</sub>=0.8555 mg/mL,由此可见石榴皮提取物对-OH 清除效果强于 VC。

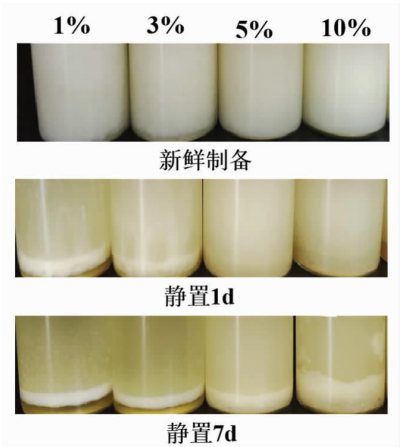
**2.2.5 超氧阴离子清除率** O<sub>2</sub><sup>•-</sup>是一种在生物体代谢过程中产生的自由基。它是物质自由基连锁反应中的初始物质,与-OH 结合,产生破坏细胞 DNA 和损害人体功能的产物<sup>[18]</sup>。由图 2e 可知,在 0.2~1.0 mg/mL 范围内,石榴皮提取物对 O<sub>2</sub><sup>•-</sup>的清除率随浓度增加变化规律不明显,VC 对 O<sub>2</sub><sup>•-</sup>清除率随浓度的增加先上升后下降;当质量浓度低于 0.4 mg/mL 时石榴皮提取物的清除能力要高于

VC;浓度进一步增加,VC 对  $O_2\cdot^-$ 清除能力逐渐强于石榴皮提取物。

2.3 石榴皮活性物质的稳态化包埋

石榴皮活性物质性质不稳定,容易发生氧化降解,不易长期保存,且在人体生物利用度较低,对其进行乳液包埋期望可以提高稳定性和生物利用度。石榴皮多酚主要为水溶性多酚,因此首先选用 W/O 体系对其进行包埋。

通过试验发现油水比为 9:1 和 8:2 时乳液放置较长时间不分层,所以在此基础上进一步分析其乳化稳定性。油水比为 8:2 和 9:1 制备的 W/O 的 ESI 分别为 191.85,750 min,后者显著高于前者,所以选取油水比 9:1 进行后续试验。其次优化乳化剂 span80 的添加量,使用不同 span80 含量制备的 W/O 乳液新鲜制备和在室温下(未避光)储藏 1,7 d 前后的外观如图 3 所示。新鲜制备的 W/O 乳液外观均一,且由于体系中的石榴皮提取液浓度较低,所有乳液外表均呈乳白色。在室温下(未避光)放置 1 d,1%,3%span80 添加量的 W/O 乳液出现明显分层,说明在这两个浓度的 span80 不足以长时间稳定油水界面层。5%和 10%添加量的 W/O 乳液仍保持均一体系。放置 7 d 后,W/O 乳液均出现不同程度分层,乳液的颜色加深,且 10%



注:图中百分数为 Span80 添加量。

图 3 不同储藏时间 W/O 乳液表观图像

Fig.3 Different storage time W/O emulsion apparent image

span80 添加量的乳液出现絮状沉淀,相比之下 5% span80 制备的乳液稳定性较好。此外,图 4a 中计算 ESI 发现 span80 添加量逐渐增加时,乳化稳定性先增后减,在 5%时 ESI 达到最大值。综上,得知 span80 含量为油相体积的 5%制备出的 W/O 乳液效果较好,因此在后续的双重乳液制备中使用此条件。

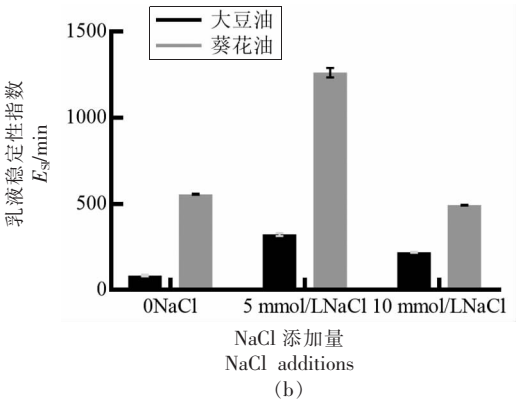
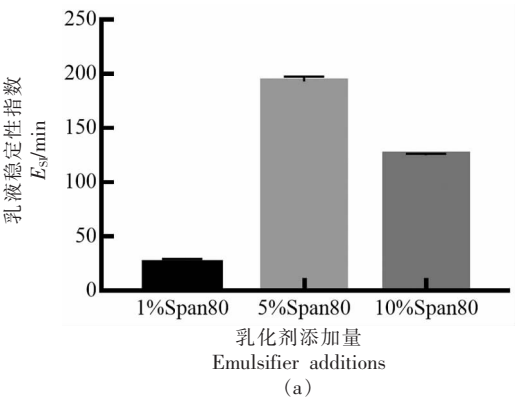


图 4 不同乳化剂添加量(a)、不同 NaCl 添加量(b)对乳液 ESI 影响

Fig.4 Effect of different emulsifier additions (a) and different NaCl additions (b) on the ESI of emulsions

比较大豆油和葵花籽油对于乳液稳定性的影响,由图 4b 可以看出葵花籽油制备的乳液 ESI 相对较高,因此选择葵花油作油相。此外,研究发现随着 NaCl 添加量的增加,W/O 乳液的 ESI 先上升后下降,NaCl 添加量为 5 mmol/L 时 ESI 最大为 1

284.19 min,明显高于其它几组。光学显微观察也证实了 NaCl 添加量为 5 mmol/L 时乳液粒径均一,分散均匀,乳液稳定性较好(图 5)。

2.4 W/O/W 乳液

W/O 体系虽然提高了多酚的储藏稳定性,但



其在人体不易消化利用，为达到在人体利用率提高的目的，还需在此基础上再进行 W/O/W 包埋。

在上述优化条件下进行 W/O 乳液制备,而后制备 W/O/W 乳液(图 6)。

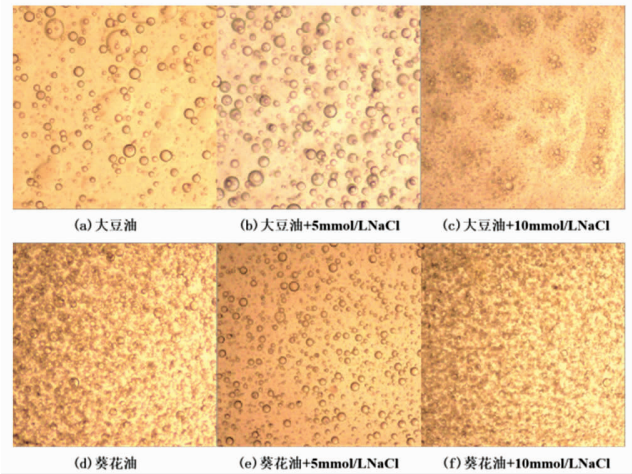


图 5 W/O 乳液显微镜图像

Fig.5 W/O emulsion microscope images

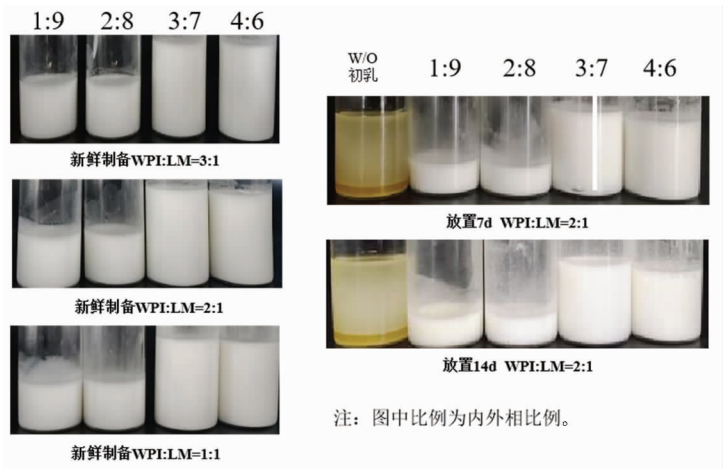


图 6 W/O/W 乳液表观图像

Fig.6 W/O/W emulsion apparent image

2.4.1 WPI-LM 不同质量比、不同添加量的 W/O/W 乳液显微图像 在光学显微镜下观察 W/O/W 乳液，如图 7 所示,W/O/W 乳液微观结构是球型液滴,内部还包含有小液滴<sup>[19]</sup>。图 7a 中当外水相 WPI:LM=2:1 时，外水相添加量为 60%的 W/O/W 乳液具有更加均匀的液滴分布。外部水相中较高的 LM 含量会增加外部水相的黏度，使其牢固地吸附在液滴表面，有利于液滴之间的相互吸引和桥连絮凝<sup>[20]</sup>,WPI:LM=1:1 时表现最为明显。放置一周后的显微观察从图 7b 可以看到乳液液滴有不同程度的变大,这与粒径测试结果相一致。粒径

增大却没有形成相分离,这是因为 W/O/W 乳液为防止 WPI-LM 凝聚引起油分离，从而在油滴周围形成抗性外层<sup>[21]</sup>。

2.4.2 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对 W/O/W 乳液乳化稳定性和乳化活性的影响 由表 1 可知，外水相添加量一定的情况下随着 LM 含量增加,W/O/W 乳液乳化活性呈现降低的趋势,在 WPI:LM=1:1 时表现最为显著。界面上乳化剂的吸附量会影响乳液的乳化活性大小<sup>[22]</sup>。LM 含量越高,外部水相的黏度就越高,液滴表面吸附的复合物就越多,不仅会与 Span80 竞争,而且还会造成



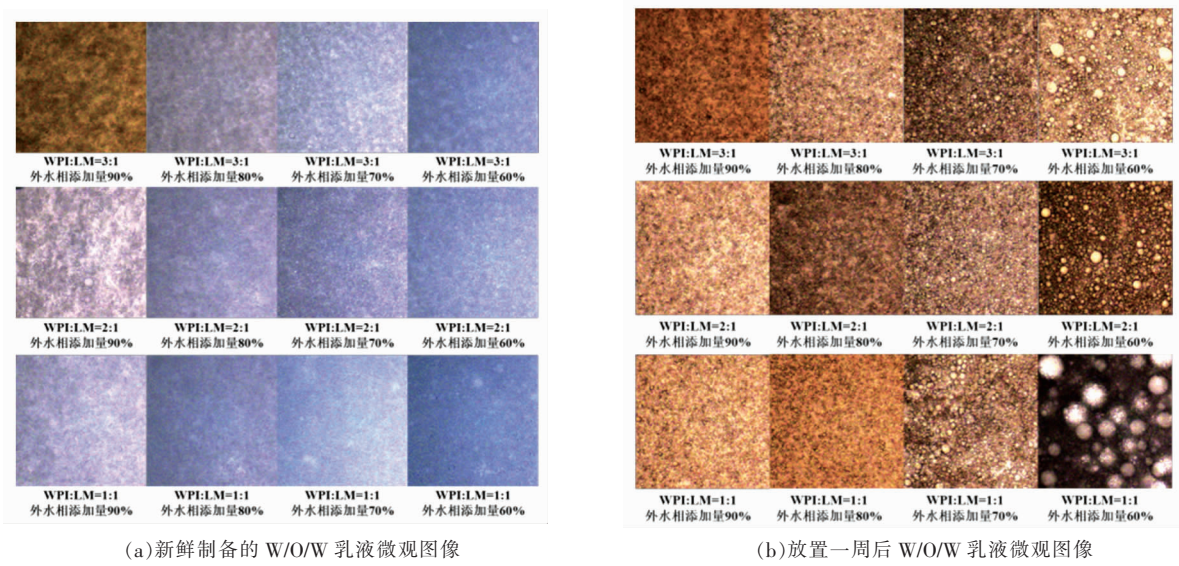


图 7 W/O/W 乳液显微镜图像  
Fig.7 W/O/W emulsion microscope images

液滴之间的吸附聚集和乳剂破损，从而降低乳剂性能。另一方面图 8a 中可以看出，当外水相中 WPI:LM=2:1 时，改变外水相的占比发现乳化稳定性波动不大，在 51.26~69.20 m<sup>2</sup>/g 范围内波动，而在外水相占比 60%时的乳液表现出较小的

EAI,为 51.26 m<sup>2</sup>/g。有研究表明界面张力越低乳化剂的乳化性能越高<sup>[23]</sup>。出现此现象可能是由于加入 LM 阴离子打破了 WPI 颗粒之间的聚集，暴露出更多的疏水基团,增加了它们与油滴的结合,影响了乳化能力。

表 1 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对 W/O/W 乳液乳化活性的影响

$E_{AI}/(m^2/g)$	外水相添加量/%			
	90	80	70	60
WPI:LM=3:1	73.29	56.09	63.53	61.36
WPI:LM=2:1	69.20	57.43	61.84	51.26
WPI:LM=1:1	42.47	38.94	29.88	37.46

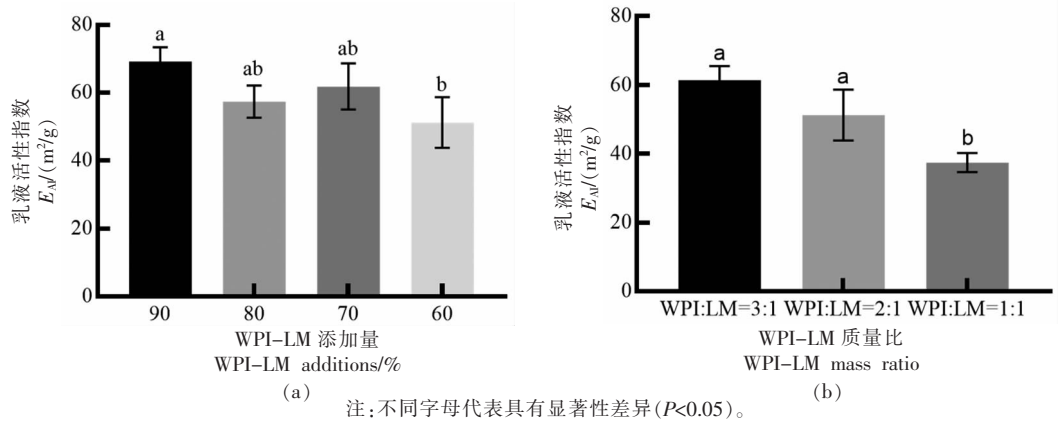
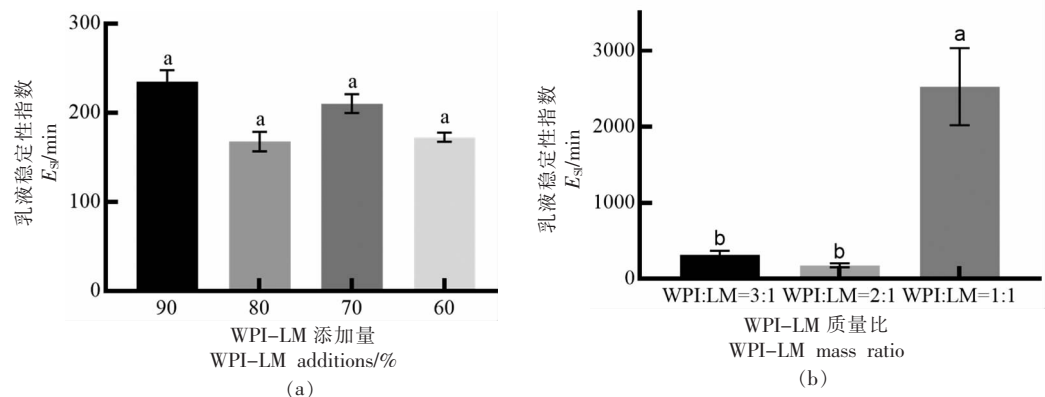


图 8 WPI-LM 不同添加量(WPI:LM=2:1)(a)、不同质量比(外水相占比 60%)(b)对 W/O/W 乳液乳化活性的影响  
Fig.8 Effect of different additions of WPI-LM (WPI:LM=2:1)(a) and mass ratios (60% of external aqueous phase)(b) on the emulsifying activity of W/O/W emulsions

表 2 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对 W/O/W 乳液乳化稳定性的影响

Table 2 Effect of different mass ratios and additions of WPI-LM on the emulsion stability of W/O/W emulsions

$E_{50}/\text{min}$	外水相添加量/%			
	90	80	70	60
WPI:LM=3:1	142.71	130.29	352.10	315.78
WPI:LM=2:1	239.21	167.14	209.21	178.19
WPI:LM=1:1	789.79	1 053.49	2 047.48	3 047.78



注:不同字母代表具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图 9 WPI-LM 不同添加量(WPI:LM=2:1)(a)、不同质量比(外水相占比 60%)(b)对 W/O/W 乳液乳化稳定性的影响

Fig.9 Effects of different additions of WPI-LM (WPI:LM=2:1) (a) and different mass ratios (60% of external water phase) (b) on the emulsion stability of W/O/W emulsions

由表 2 可知,当 WPI:LM=3:1 和 2:1 时,改变外水相占比得到的乳液乳化稳定性无显著变化,乳化稳定性指数在 130.29~315.78 min 范围内上下浮动。而当 WPI:LM=1:1 时,乳液乳化稳定性显著升高,且随着外水相占比的减少,乳化稳定性呈现一个上升的趋势,依次为 789.79,1 053.49,2 047.48,3 047.78 min。这可能是由于 LM 的加入,外部水相的黏度变大,液滴表面吸附更多的复合物,从而使得 WPI-LM 复合物在界面上的乳化能力发生了变化<sup>[23]</sup>。当 WPI:LM=2:1,改变外水相占比计算得到的 ESI,最大为 239.21 min,最小为 167.14 min,无显著性差异。综合比较  $E_{M1}$  和  $E_{S1}$ ,WPI:LM=2:1,外水相添加量为 60%时乳液具有较好的乳化性能。

利用蛋白质/多糖复合物将生物活性化合物装载入多乳液中,可以提供高包封效率、高氧化保护和控制包封化合物的释放<sup>[24]</sup>。表 3 所示为乳液放置 1 周后对乳液进行了活性物质包埋率测定,放置 1 周后,乳液的内水相与油界面发生了聚合,

使得包埋在乳液内部的活性物质向外转移到外水相,程度不一。随着外水相占比的减少,包埋率呈现一个上升趋势,当 WPI:LM=3:1,外水相占比 60%时包埋率最高为 86.99%,当外水相比比例更大时,W/O/W 乳液内部活性物质更容易被大量释放到外层,原因可能是外水相中含有的大量生物大分子使得其与内相存在渗透压差异,在渗透压作用下内水相发生膨胀,油膜破裂,从而导致包埋的活性成分流失。另一方面,当外水相添加量为 60%时,逐渐增加外水相中 LM 添加量,发现当 WPI:LM=2:1 时,乳液的包埋率最高为 90.08%。

2.4.3 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对 W/O/W 乳液粒径及 PDI 的影响 乳液粒径及其分布常被用来评判乳液的稳定性,液滴粒径越小,乳液愈加稳定。由表 4 可知,当 WPI 与 LM 比值固定时,外水相占比少的 W/O/W 乳液具有更大的粒径,这与 Lin 等<sup>[25]</sup>研究发现一致:多重乳液液滴的平均直径随着内相含量的增加而增加。此外,有研究<sup>[26]</sup>表明适量多糖加入有助于液滴粒径的减小。较高的

表 3 WPI-LM 不同质量比、不同添加量的 W/O/W 乳液对活性物质的包埋率

Table 3 WPI-LM encapsulation rate of active substances by W/O/W emulsions with different mass ratios and different additions

包埋率/%	外水相添加量/%			
	90	80	70	60
WPI:LM=3:1	30.68 <sup>Cab</sup>	45.11 <sup>Bb</sup>	86.65 <sup>Aa</sup>	86.99 <sup>Ab</sup>
WPI:LM=2:1	9.22 <sup>Bb</sup>	51.73 <sup>Cb</sup>	85.23 <sup>Ba</sup>	90.08 <sup>Aa</sup>
WPI:LM=1:1	35.77 <sup>Ba</sup>	70.97 <sup>Aa</sup>	84.67 <sup>Aa</sup>	77.96 <sup>Ac</sup>

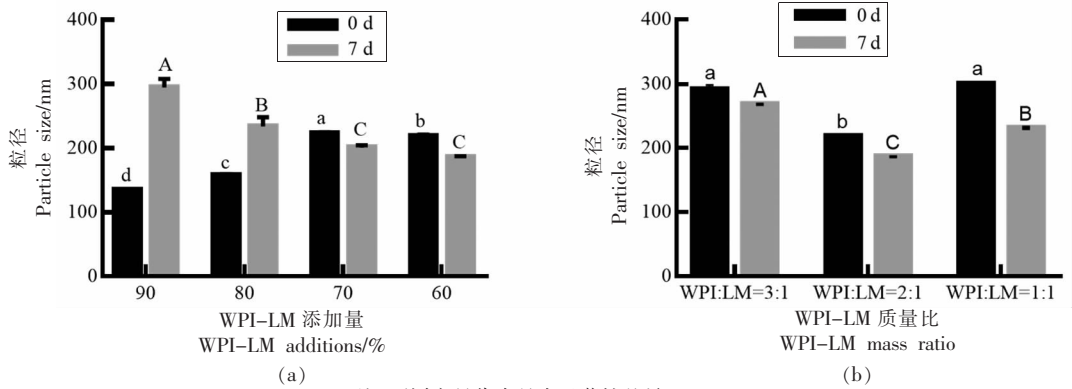
注:不同大写字母代表不同外水相添加量下存在显著性差异( $P<0.05$ );不同小写字母代表不同质量比下具有显著性差异( $P<0.05$ )。

表 4 不同储藏时间 W/O/W 乳液平均粒径

Table 4 Different storage time W/O/W emulsion particle size on average

粒径/nm		外水相添加量/%			
		90	80	70	60
WPI:LM=3:1	0 d	165.97 ± 10.9 <sup>Bc</sup>	156.47 ± 1.16 <sup>Bc</sup>	156.27 ± 2.5 <sup>Bd</sup>	291.4 ± 7.01 <sup>Ab</sup>
	7 d	229.53 ± 20.95 <sup>Bb</sup>	207.3 ± 5.16 <sup>Bb</sup>	224.33 ± 2.35 <sup>BCb</sup>	268.27 ± 0.9 <sup>Ac</sup>
WPI:LM=2:1	0 d	135.33 ± 0.12 <sup>Dd</sup>	157.97 ± 2.01 <sup>Cc</sup>	223.5 ± 1.73 <sup>Ab</sup>	218.93 ± 2.25 <sup>Bc</sup>
	7 d	294.77 ± 13.2 <sup>Aa</sup>	233.83 ± 14.61 <sup>Ba</sup>	201.07 ± 3.79 <sup>Cc</sup>	186.5 ± 0.95 <sup>Cf</sup>
WPI:LM=1:1	0 d	156.4 ± 1.7 <sup>Ccd</sup>	151.25 ± 1.65 <sup>Cc</sup>	198.9 ± 7.3 <sup>Bc</sup>	299.15 ± 4.15 <sup>Aa</sup>
	7 d	233.33 ± 19.11 <sup>Bb</sup>	233.67 ± 5.46 <sup>Ba</sup>	266.53 ± 1.64 <sup>Aa</sup>	231.53 ± 1.48 <sup>Bd</sup>

注:不同大写字母代表不同外水相添加量下存在显著性差异( $P<0.05$ );不同小写字母代表不同质量比下具有显著性差异( $P<0.05$ )。



注:不同字母代表具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图 10 WPI-LM 不同添加量(WPI:LM=2:1)(a)、不同质量比(外水相占比 60%)(b)不同储藏时间 W/O/W 乳液粒径  
Fig.10 WPI-LM with different additions (WPI:LM=2:1) (a), different mass ratios (60% of external water phase)(b) and different storage time W/O/W emulsion particle size

外水相含量导致内部液滴在储存过程中相互集聚,形成较小的液滴。图 10 看出当外水相所占 60%时,WPI:LM=3:1 和 1:1 具有较大粒径分别为 (291.4±7.01)nm 和 (299.15±4.15)nm,而 2:1 的 W/O/W 乳液具有较小的粒径 (218.93±2.25)nm ( $P<0.05$ ),这可能是由于 LM 添加量的不同导致的差异。乳液 PDI 维持在 0.2~0.5 之间,表明粒径分布较为均匀(表 5)。

放置 1 周后,乳液粒径有一定程度的增加,这可以用“奥斯特瓦尔德成熟”来解释,小液滴由于其溶解能力较好、分子通过连续相的扩散而不断生长。另一方面,液滴在储存期间会发生聚集,大液滴的聚集率比小液滴高得多,因此,在贮藏过程中,由于奥斯特瓦尔德的成熟率和聚结率较高,液滴的尺寸增大。在 Tang 等<sup>[27]</sup>的制备包封甜菜苷和姜黄素的 W/O/W 乳液研究中也得到相同的结果。



有研究表明粒径大小与界面张力有一定关系,界面张力的降低会使得乳液液滴粒径变小,稳定性变好<sup>[28]</sup>,而界面张力值主要取决于蛋白质的分子质量与结构。WPI:LM=2:1和1:1外水相占比较少(70%,60%)的组别出现粒径减小的现象,推测可能由于Span80和WPI是两亲分子,往往在界

面上存在疏水相互作用,这将协同降低界面张力。放置1周后WPI:LM=2:1乳液随着外部水相比例的减少,颗粒大小也趋于减小,这主要是由于乳液中油相的增加和外部水相LM的增加引起的。Diaz-Ruiz等<sup>[29]</sup>制备W/O/W乳液用于包埋反式白藜芦醇的研究中得到了同样的结果。

表 5 不同储藏时间 W/O/W 乳液 PDI  
Table 5 Different storage time W/O/W emulsion PDI

PDI		外水相添加量/%			
		90	80	70	60
WPI:LM=3:1	0 d	0.3537 ± 0.03 <sup>Bcd</sup>	0.2633 ± 0.01 <sup>Gl</sup>	0.2873 ± 0.03 <sup>Cb</sup>	0.4117 ± 0.03 <sup>Ab</sup>
	7 d	0.4213 ± 0.05 <sup>Bbc</sup>	0.5217 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	0.4223 ± 0.01 <sup>Ba</sup>	0.4633 ± 0.01 <sup>ABa</sup>
WPI:LM=2:1	0 d	0.2683 ± 0.01 <sup>Gl</sup>	0.338 ± 0.01 <sup>Bc</sup>	0.417 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	0.4157 ± 0.01 <sup>Ab</sup>
	7 d	0.5627 ± 0.12 <sup>Aa</sup>	0.4337 ± 0.01 <sup>Bb</sup>	0.3913 ± 0.01 <sup>Ba</sup>	0.347 ± 0.03 <sup>Bc</sup>
WPI:LM=1:1	0 d	0.379 ± 0.03 <sup>Bbcd</sup>	0.263 ± 0.01 <sup>Gl</sup>	0.4117 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	0.4793 ± 0.02 <sup>Ba</sup>
	7 d	0.4783 ± 0.04 <sup>Aab</sup>	0.4563 ± 0.06 <sup>Aab</sup>	0.399 ± 0.02 <sup>Aa</sup>	0.459 ± 0.02 <sup>Aa</sup>

注:不同大写字母代表不同外水相添加量下存在显著性差异( $P<0.05$ );不同小写字母代表不同质量比下具有显著性差异( $P<0.05$ )。

2.4.4 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对乳液 Zeta-电位的影响 Zeta-电位主要反映乳液液滴间相互作用的大小,液滴间随着吸引力增大不会不断发生聚集,Zeta-电位绝对值越高,粒子间的静电斥力也就越大,乳液愈加稳定<sup>[30]</sup>。表 6 为不同储藏时间 W/O/W 乳液 Zeta-电位。0 d 的乳液电位绝对值在 30 mV 以上,放置 1 周以后电位绝对值有所降低,在 25~30 mV 范围波动。图 11a 看出当 WPI:LM=2:1 时,0 d 的乳液的电位绝对值变化不明显,电位变化具有先增后减的趋势,在外水相添加量为 80%时,具有最大电位绝对值为 (34.47±0.35)mV。放置 1 周后,电位绝对值有一定程度下

降,此时发现外水相占比较高的乳液电位发生显著下降,整体呈现出来随着外水相占比的减少电位绝对值上升趋势,这是因为外水相占比较高的乳液中液滴分散程度较大,静电斥力相对减弱,电位绝对值发生一定程度下降。这与李杨等<sup>[31]</sup>的研究结果相一致。图 11b 当外水相添加量固定为 60%时,WPI:LM=1:1 时的乳液具有较高的电位绝对值为(36.2±1.32)mV,WPI:LM=2:1 和 3:1 的电位绝对值相差不大。相对而言当 WPI:LM=2:1,外水相占比 60%的乳液放置 1 周前后变化不明显,乳液比较稳定。

表 6 不同储藏时间 W/O/W 乳液 Zeta-电位  
Table 6 Different storage time W/O/W emulsion Zeta potential

Zeta-电位/mV		外水相添加量/%			
		90	80	70	60
WPI:LM=3:1	0 d	30.63 ± 0.7 <sup>Bb</sup>	34.2 ± 0.4 <sup>Aa</sup>	29.93 ± 0.38 <sup>BCab</sup>	29.43 ± 0.32 <sup>Cb</sup>
	7 d	18.7 ± 0 <sup>Bc</sup>	27.03 ± 0.47 <sup>Ac</sup>	17.5 ± 0.6 <sup>Gl</sup>	26.23 ± 0.68 <sup>Ac</sup>
WPI:LM=2:1	0 d	30.87 ± 0.46 <sup>Bb</sup>	34.47 ± 0.35 <sup>Aa</sup>	30.73 ± 0.31 <sup>Ba</sup>	31.03 ± 0.93 <sup>Bb</sup>
	7 d	22.47 ± 0.64 <sup>Gl</sup>	22.9 ± 0.46 <sup>Gl</sup>	27.73 ± 0.15 <sup>Bc</sup>	31.23 ± 0.23 <sup>Ab</sup>
WPI:LM=1:1	0 d	33 ± 0.1 <sup>Ba</sup>	30 ± 0.46 <sup>Cb</sup>	29.6 ± 0.82 <sup>Cb</sup>	36.2 ± 1.32 <sup>Aa</sup>
	7 d	25.03 ± 0.47 <sup>Bc</sup>	23.47 ± 0.55 <sup>Gl</sup>	29.7 ± 0.17 <sup>Ab</sup>	25 ± 1.28 <sup>Bc</sup>

注:不同大写字母代表不同外水相添加量下存在显著性差异( $P<0.05$ );不同小写字母代表不同质量比下具有显著性差异( $P<0.05$ )。

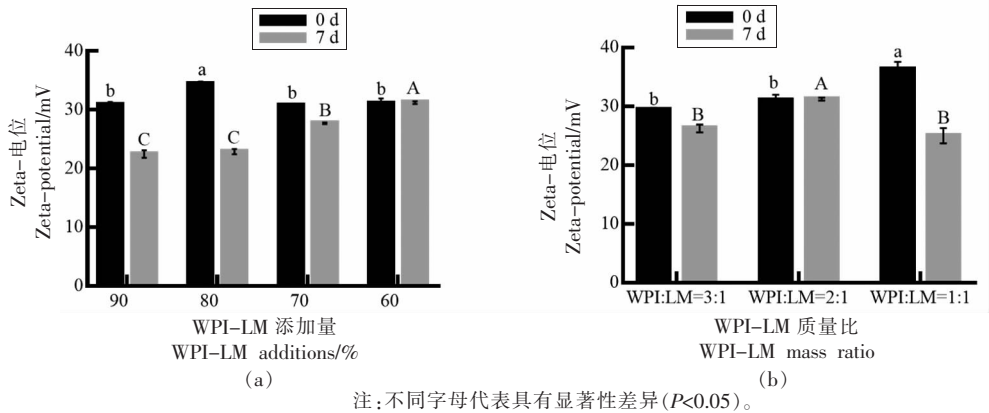


图 11 WPI-LM 不同添加量(WPI:LM=2:1) (a)、不同质量比(外水相 60%) (b)不同储藏时间 W/O/W 乳液电位  
Fig.11 WPI-LM with different additions (WPI:LM=2:1) (a), different mass ratios (60% external aqueous phase) (b) different storage times W/O/W emulsion potential

2.4.5 WPI-LM 不同质量比、不同添加量对 W/O/W 乳液流变性质的影响 流变学是研究物质在外力作用下的变形和流动的科学。乳液的黏度越高,乳液中的颗粒被阻止移动的程度就越大,乳液中颗粒的絮凝和聚集就越小,乳液就越稳定<sup>[32]</sup>。由图 12 可知,乳液黏度随着剪切速率的增大逐渐降低,表明乳液是非牛顿流体<sup>[33]</sup>。同一剪切速率下,固定 WPI:LM=2:1,随着外水相添加量的增加,乳液的黏度逐渐减小。这可能是在外部水相占比较

高的 W/O/W 乳液中液滴大量分散,剪切过程中液滴之间的网络断裂,且断裂后液滴之间的网络重组率低于网络断裂率,导致分子间力降低,从而降低了黏度。图 12b 可看出,当外水相添加量为 60% 时,随着 LM 添加量的增多,乳液的黏度逐渐提高,当 WPI:LM=1:1 时 W/O/W 乳液的黏度最大,这可能是 LM 本身的黏度降低了乳液体系的流动性,从而使得乳液稳定。这与前面的研究结果相一致。

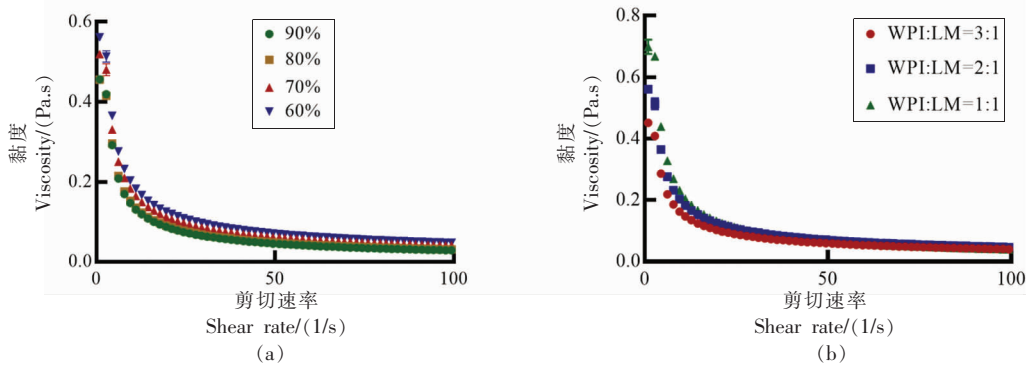


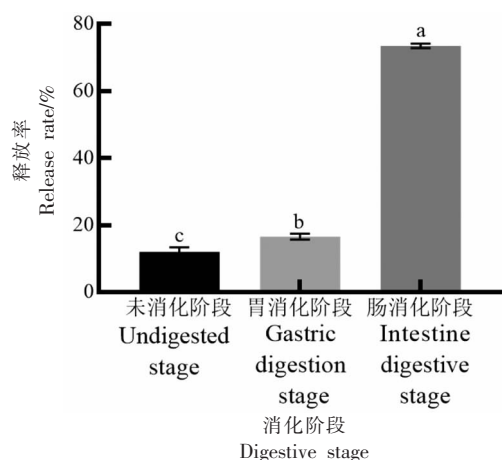
图 12 WPI-LM=2:1,外水相不同添加量(a)、外水相添加量为 60%,WPI-LM 不同质量比(b)的 W/O/W 乳液的黏度-剪切速率曲线图

Fig.12 Viscosity-shear rate curves of W/O/W emulsions with WPI-LM=2:1, different additions of external aqueous phase(a), 60% addition of external aqueous phase, and different mass ratios of WPI-LM (b)

2.5 体外胃肠模拟消化释放率

在最优条件下制备石榴皮活性物质 W/O/W 乳液,并对其消化特性进行了研究,图 13 为体外胃肠模拟消化释放率结果。结果发现在胃中消化

阶段,活性物质释放率不高,而在肠消化阶段有一个较高的释放率。外水相(WPI:LM=2:1)占比 60%的 W/O/W 乳液初始包埋率为 87.36%(释放率为 12.64%)。经胃消化后,复乳包埋的活性物质少



注:不同字母代表具有显著性差异( $P<0.05$ )。

图 13 W/O/W 乳液体外胃肠模拟消化释放率

Fig.13 *In vitro* gastrointestinal simulated digestion release rate of W/O/W emulsions

量被释放,释放率为 16.65%。在万欣等<sup>[34]</sup>的负载姜黄素的乳液研究中有提到在胃消化阶段,乳液具有一定的界面张力可以抵抗胃蛋白酶的消化,因此可以保持其原来的形状。此时的乳剂颗粒仍然具有双层结构,活性成分主要存在于内部水相中<sup>[25]</sup>。肠道消化过程中活性物质释放率达到73.81%,这时 W/O/W 双层乳结构在酶的作用下变成 W/O 乳液,而 W/O 乳液的油层进一步被水解。Flores 等<sup>[35]</sup>在研究体外消化过程中微胶囊化蓝莓花青素的总酚含量时也得到了同样的结论。

### 3 结论

本文采取超声辅助醇提法、超高压法和酶法提取对石榴皮进行了活性成分提取,发现超声辅助醇提法得到的多酚含量(250 mgGAE/g)、黄酮含量(49.65 mgRE/g)远高于其它。此外石榴皮渣活性提取物对 DPPH、-OH 清除能力和总还原力都好于 VC;对 ABTS<sup>+</sup>清除活性与 VC 无显著差异;质量浓度 0.4 mg/mL 以下石榴皮渣活性提取物对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>清除能力高于 VC。通过单因素实验确定制备石榴皮活性物质 W/O 乳液的最优条件:油相选取葵花油、乳化剂添加量为 5%、水相中加入 5% 0.1 mol/L NaCl、油水比为 9:1 的条件下初乳具有较好稳定性,在此基础上制备 W/O/W 乳液。选用 WPI 和 LM 作为外水相,研究了不同质量比、不同添加量对乳液稳定性的研究,通过显微观察,粒径电位测

定,计算乳化活性、乳化稳定性以及储藏稳定性,最终确定制备 W/O/W 乳液选用 WPI:LM=2:1,外水相添加量占比 60%,此时的乳液具有较好稳定性。在 W/O/W 乳液递送研究中,体外模拟胃肠消化试验在胃中释放率几乎可以忽略,而在肠消化之后释放率可以达到 70%以上,表明 W/O/W 乳液可以使石榴皮活性物质耐受胃的消化,靶向地在小肠内释放。通过本研究可以为石榴皮的深加工及 W/O/W 靶向递送提供理论指导。

### 参 考 文 献

- [1] 苏娜,张丽,段龙艳,等. 响应面优化热浸提法提取石榴皮总多酚的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(9): 78-83.  
SU N, ZHANG L, DUAN L Y, et al. Optimization of extraction process of total polyphenols from pomegranate peel by response surface method [J]. Journal of Anhui Agri.Sci, 2017, 45(9): 78-83.
- [2] 刘佩,杜国荣,赵鹏涛,等. 9 种植物源多酚的分离提取及其涩感评价[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 1025-1032.  
LIU P, DU G R, ZHAO P T, et al. Separation and extraction of nine plant polyphenols and evaluation of astringency[J]. Jiangsu Journal of Agr Sci, 2021, 37(4): 1025-1032.
- [3] PAN Z L, QU W J, MA H L, et al. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel[J]. Ultrasonics - Sonochemistry, 2011, 19(2): 365-372.
- [4] CAM M, HISIL Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels[J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 878-885.
- [5] 唐鹏程,焦士蓉,唐远谋,等. 石榴皮提取物体外抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(1): 12-15.  
TANG P C, JIAO S R, TANG Y M, et al. Comparison and study on the antioxidant activity of pomegranate peel extract[J]. Food Research and Development, 2012, 33(1): 12-15.
- [6] LI Y F, GUO C J, YANG J J, et al. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract[J]. Food Chemistry, 2005, 96(2): 254-260.



- [7] XIA Q, YAO Y L. Preparation and evaluation of a W/O/W double emulsion containing both vitamin C and vitamin E[J]. Materials Science Forum, 2011, 694: 783–787.
- [8] 王露. 番石榴叶活性多酚组分快速鉴别及发酵释放与转化机制[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- WANG L. Quick identification and the mechanism in the release and transformation by fermentation of active phenolics components in guava leaves [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [9] 严陇兵, 刘邻渭, 刘晓丽, 等. 超高压提取石榴皮多酚的工艺研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(9): 41–49.
- YAN L B, LIU L W, LIU X L, et al. Process study on the extraction of pomegranate peel polyphenols by ultra-high pressure [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(9): 41–49.
- [10] 王占一, 廖成斌, 公金艳, 等. 复合酶提取石榴幼果总黄酮工艺优化及其抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 178–183, 188.
- WANG Z Y, LIAO C B, GONG J Y, et al. Complex enzymatic extraction of total flavonoids from pomegranate fruitlets and their anti- $\alpha$ -glucosidase activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 178–183, 188.
- [11] 张婷婷, 梁燕, 彭灿. 不同方法提取陈皮中黄酮类有效成分含量比较[J]. 中国药业, 2021, 30(13): 40–43.
- ZHANG T T, LIANG Y, PENG C. Comparison of flavonoids content in pericarpium citri reticulatae extracted by different methods[J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(13): 40–43.
- [12] 王林枫, 杨改青, 张世君, 等. 不同处理方式对苹果渣中苹果多酚含量的影响[J]. 饲料工业, 2008, 29(21): 48–52.
- WANG L F, YANG G Q, ZHANG S J, et al. Effect of different treatments on the content of apple polyphenols in apple pomace[J]. Feed Industry Magazine, 2008, 29(21): 48–52.
- [13] FAN L P, LI J W, DENG K Q, et al. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1849–1854.
- [14] 邓娜, 乔沈, 高蕊, 等. 响应面试验优化石榴皮多酚提取工艺及石榴不同部位多酚的抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(6): 39–43.
- DENG N, QIAO S, GAO X, et al. Optimization of extraction process of polyphenols from pomegranate peel by response surface methodology and antioxidant activity analysis of polyphenols in different parts of pomegranate fruit[J]. Food Science, 2016, 37(6): 39–43.
- [15] 范金波, 蔡茜彤, 冯叙桥, 等. 5种天然多酚类化合物抗氧化活性的比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 77–83.
- FAN J B, CAI Q T, FENG X Q, et al. Comparison of antioxidant activity of five natural polyphenolic compounds[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(7): 77–83.
- [16] 李国秀, 李建科, 马文哲. 三种来源的石榴多酚抗氧化活性比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 109–112.
- LI G X, LI J K, MA W Z. Comparative study on antioxidant activities of three sources of pomegranate polyphenols[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 109–112.
- [17] FLOEGEL A, KIM D O, CHUNG S J, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(7): 1043–1048.
- [18] GONG G P, ZHAO J X, WEI M, et al. Structural characterization and antioxidant activities of the degradation products from *Porphyra haitanensis* polysaccharides[J]. Process Biochemistry, 2018, 74: 185–193.
- [19] 黄耀成. W/O/W 双重乳液的制备及其对葡萄籽原花青素负载作用的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- HUANG Y C. Preparation of W/O/W double emulsion and its loading effect on grape seed proanthocyanidins[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [20] ZHAO Y, WANG X, LI D, et al. Effect of anionic polysaccharides on conformational changes and antioxidant properties of protein-polyphenol binary covalently-linked complexes[J]. Process Biochemistry, 2020, 89: 89–97.
- [21] ESFANJANI A F, JAFARI S M, ASSADPOUR E. Preparation of a multiple emulsion based on pectin-

- whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets[J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1962–1969.
- [22] PUPPO M C, BEAUMAL V, SPERONI F, et al.  $\beta$ -Conglycinin and glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperature–high–pressure treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25 (3): 389–397.
- [23] YE A. Interfacial composition and stability of emulsions made with mixtures of commercial sodium caseinate and whey protein concentrate[J]. Food Chemistry, 2008, 110(4): 946–952.
- [24] JIMENEZ-ALVARADO R, BERISTAIN C I, MEDINA-TORRES L, et al. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(8): 2425–2433.
- [25] LIN J W, MENG H C, YU S J, et al. Genipin–crosslinked sugar beet pectin–bovine serum albumin nanoparticles as novel pickering stabilizer[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106306.
- [26] SU J Q, GUO Q, CHEN Y L, et al. Characterization and formation mechanism of lutein pickering emulsion gels stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin–gum arabic composite colloidal nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105276.
- [27] TANG X Y, WANG Z M, MENG H C, et al. Robust W/O/W emulsion stabilized by genipin–cross–linked sugar beet pectin–bovine serum albumin nanoparticles: Co-encapsulation of betanin and curcumin.[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(4): 1318–1328.
- [28] ANDRADE J, CORREDIG M. Vitamin D<sub>3</sub> and phytosterols affect the properties of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and protein interfaces[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 54: 278–283.
- [29] DIAZ-RUIZ R, MARTINEZ-REY L, LACA A, et al. Enhancing trans -resveratrol loading capacity by forcing W1/O/W2 emulsions up to its colloidal stability limit[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 193: 111130.
- [30] BHATTACHARJEE S. DLS and zeta potential–What they are and what they are not?[J]. Journal of Controlled Release, 2016, 235: 337–351.
- [31] 李杨, 李礼佳, 和铭钰, 等. 大豆亲脂蛋白–甲基纤维素 W/O/W 乳液稳定性研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(7): 395–403, 434.
- LI Y, LI L J, HE M Y, et al. Preparation and stability characterization of soybean lipophilic protein methyl cellulose W/O/W emulsion[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(7): 395–403, 434.
- [32] 谢燕萍, 张修齐, 蔡志祥, 等. 单月桂酸甘油酯接枝改性阿拉伯胶及其乳化性能[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 28–34.
- XIE Y P, ZHANG X Q, CAI Z X, et al. Emulsifying properties of glyceryl monolaurate grafted gum arabic[J]. Food Science, 2019, 40(18): 28–34.
- [33] GE A L, IQBAL S, KIRK T V, et al. Modulating the rheological properties of oil–in–water emulsions using controlled WPI–polysaccharide aggregation in aqueous phases [J]. Journal of Food Engineering, 2021, 297: 110488.
- [34] 万欣, 陆佳燕, 高蕊, 等. 载姜黄素纳米乳液的制备及体外模拟消化特性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 244–252.
- WAN X, LU J Y, GAO R, et al. Preparation of curcumin nanoemulsion and its *in vitro* simulated digestion characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 244–252.
- [35] FLORES F P, SINGH R K, KERR W L, et al. Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during *in vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2014, 153: 272–278.

### Studies on the Extraction of Active Substances from Pomegranate Peel and Its Steady State Embedding of W/O/W Emulsion

Zuo Yunhui<sup>1,2</sup>, Hu Tenggen<sup>2</sup>, Zhu Yongqing<sup>3</sup>, Xu Yujuan<sup>2</sup>, Tang Yuqian<sup>1\*</sup>, Yu Yuanshan<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641

<sup>2</sup>Sericulture and Agricultural Products Processing Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences,

Guangzhou 510610

<sup>3</sup>*Institute of Horticulture, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066)*

**Abstract** Pomegranate is a medicinal food, and a large amount of pomegranate peel and other by-products are produced during processing. In order to improve the utilization of pomegranate by-products, the active ingredients of pomegranate peel were extracted by different methods and their antioxidant activities were investigated in this paper. Subsequently, these bioactives were steadily encapsulated by water-in-oil-in-water emulsion (W/O/W) emulsion and the effect of W/O/W on the stability and bioavailability of polyphenols was investigated. The results showed that the ultrasound-assisted alcoholic extraction obtained higher yield of polyphenols with 25% than the ultra-high pressure extraction and enzymatic assisted extraction. The DPPH, hydroxyl radical scavenging and total reducing power of bioactives extracted from pomegranate peel was better than VC. While the ABTS<sup>+</sup> scavenging activity of the bioactives was not significantly different from that of VC. And its scavenging activity of superoxide anion was higher than that of VC when its concentration was lower than 0.4 mg/mL. W/O/W emulsion could improve the storage stability of the bioactive extracted from pomegranate peel, and protect the active substances in gastric digestion to targeted delivery and release in the simulated small intestine. This study provides theoretical reference for the further processing of pomegranate peel by-products.

**Keywords** pomegranate peel; polyphenols; antioxidant activity; W/O/W emulsion; steady state encapsulation