

石榴籽多酚的提取及其种壳种仁抗氧化活性研究

任亚梅, 李光辉, 许永涛

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 以安徽怀远所产的“玉石籽”石榴为试材, 研究乙醇体积分数、提取温度、提取时间、螯合剂六偏磷酸钠的添加量、pH 值及料液比对提取效果的影响, 并对提取工艺进行优化; 分别提取石榴籽种壳及种仁中的多酚类物质, 比较石榴籽种壳及种仁提取物中总酚、黄酮及原花色素含量及体外抗氧化能力。结果表明: 在 pH4.0、提取温度 60℃、六偏磷酸钠添加量 0.4%、液料比 20:1 的条件下, 用 60% 乙醇提取 100min, 石榴籽中多酚的提取效果较好; 石榴籽富含原花色素, 原花色素是石榴籽抗氧化成分中的主要成分, 石榴籽中多酚类物质——尤其是原花色素主要集中于种仁部位。

关键词: 石榴籽; 种壳; 种仁; 多酚; 抗氧化性

Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from Pomegranate Seeds

REN Ya-mei, LI Guang-hui, XU Yong-tao

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: Orthogonal array design was employed to optimize the extraction of polyphenols from the seeds of pomegranate cultivar “Yushizi” grown in Huaiyuan of Anhui province. The extraction efficiency of polyphenols was investigated with respect to ethanol concentration, temperature, extraction time, addition level of sodium hexametaphosphate as a chelating agent, pH and material/liquid ratio. The total phenol, total flavonoid, total proanthocyanidin contents of the whole seeds, kernels and husks of pomegranate and the *in vitro* antioxidant effects of their polyphenol extracts were compared. Better results for the extraction of polyphenols were achieved after 100 min of extraction under the conditions: pH 4.0, 60 °C, 0.4% sodium hexametaphosphate addition, and 20:1 solid-to-liquid ratio. Pomegranate seeds were rich in proanthocyanidins as the major antioxidant components in it. Polyphenols especially proanthocyanidins were mainly present in the seed kernels of pomegranate.

Key words: pomegranate seed; pomegranate seed husk; pomegranate seed kernel; phenol; antioxidation

中图分类号: Q946.8; S665.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0031-05

石榴(*Punica granatum* L.), 属石榴科石榴属, 落叶灌木或小乔木^[1]。石榴具有消炎、降血脂、血糖, 降胆固醇, 防止冠心病、高血压、糖尿病等多种功效^[2]。目前, 对石榴的研究主要集中在营养成分、加工工艺及提取物药理等方面^[3-13], 然而深加工后的石榴废弃物如石榴籽、石榴皮的有效加工研究较少, 尤其对石榴籽的研究尚处在初级阶段, 已有研究者分析了石榴籽中抗氧化活性成分, 明确了黄酮类物质、原花色素等有效成分在石榴籽抗氧化中所起到的作用, 但是抗氧化成分在种壳及种仁中的分布情况即石榴籽种仁及种壳中有

效成分的含量及活性差异未见报道; 为此, 在优化总酚提取工艺的基础上, 研究抗氧化成分在种壳及种仁的分布及其活性的差异性, 旨在为石榴籽的加工利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以安徽怀远所产的“玉石籽”石榴为试材。石油醚(沸程 30~60℃)、六偏磷酸钠(SH)、无水乙醇、碳酸钠、冰醋酸、亚硝酸钠、硝酸铝、铁氰化钾(AR)、

收稿日期: 2011-01-14

基金项目: 西安市科技计划项目(YF07127)

作者简介: 任亚梅(1970—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为果品蔬菜的贮藏及加工。E-mail: yameiren@yahoo.com

二苯代苦味酰基自由基(DPPH 自由基)、VC、VE、香草醛、Folin-Ciocalteu 试剂均为分析纯。

1.2 仪器

高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; 紫外分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; HW·SY11-K 型电热恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表公司; 旋转蒸发器 瑞士 Büchi 公司; 漩涡混合器 上海金达生化仪器厂。

1.3 方法及

1.3.1 石榴籽总酚的提取

1.3.1.1 提取工艺流程

原料→粉碎→脱脂→溶剂提取→浓缩

1.3.1.2 单因素试验

石榴籽在 40℃ 烘干至含水量 12% 后, 粉碎并过 40 目筛, 经石油醚脱脂(萃取温度 50℃, 萃取时间 8h)后, 准确称取干粉 5g, 加一定的乙醇溶液和 SH, 在一定的温度和 pH 值下提取一定时间, 然后计算石榴籽多酚的提取量。重复测定 3 次, 取平均值。

1.3.1.3 提取工艺的优化

在单因素试验的基础上, 选取对多酚提取率影响较大的 4 个因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行优化, 得出石榴籽提取多酚工艺的较优参数。

1.3.2 石榴籽种仁与种壳在石榴籽中所占质量百分比的测定

称取 20g 石榴籽, 将石榴籽种壳和种仁手工分离, 在分离过程中尽量保持籽仁的完整, 然后分别称量, 计算种仁与种壳在石榴籽中所占的质量百分比。重复测定 3 次, 取其平均值。

1.3.3 石榴籽及其种壳、种仁提取物的制备

称取经石油醚脱脂后的石榴籽粉、种壳粉和种仁粉各 5g, 分别在较优条件下水浴振荡, 辅助提取后离心并分离; 重复提取 3 次, 合并提取液。

1.3.4 总酚含量的测定

参考徐金瑞等^[14]的方法并略有改进。用 10mL 乙醇溶液溶解 0.5g 没食子酸, 蒸馏水定容至 100mL, 分别移取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0mL 至 100mL 容量瓶中, 加入 1mL 福林-薛卡多(folin-ciocalteu, FC)试剂(0.5~8min)和 2mL 10% 碳酸钠溶液, 用蒸馏水定容。置于 45℃ 水浴 5min 后在 765nm 波长处测定其吸光度。每个质量浓度做 3 个平行实验, 取平均值, 绘制标准曲线, 得到吸光度(X)与没食子酸标准溶液质量浓度(Y)之间的回归方程为: $Y = 3.0507X - 1.4101$, $R^2 = 0.9968$ 。分别取全石榴籽提取液和种壳及种仁样品溶液各 4mL, 按照上述制作方法, 测定其吸光度, 计算

样品中的多酚含量。样品中的多酚以没食子酸的含量表示。

$$\text{多酚提取量}/(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times n}{m}$$

式中: C 为没食子酸的质量浓度 $/(mg/mL)$; V 为溶液体积 $/mL$; n 为稀释倍数; m 为取样量 $/g$ 。

1.3.5 黄酮含量测定

采用 $NaNO_3-Al(NO_3)_3-NaOH$ 光度法^[15]。

1.3.6 原花色素含量测定

采用香草醛-硫酸法^[16-17]。

1.3.7 抗氧化性测定

DPPH 自由基清除能力的测定参考文献[18]方法; 还原力的测定参考文献[19]方法。

2 结果与分析

2.1 石榴籽中多酚提取工艺的优化

2.1.2 单因素试验

2.1.2.1 乙醇体积分数及料液比分别对石榴籽中多酚提取量的影响

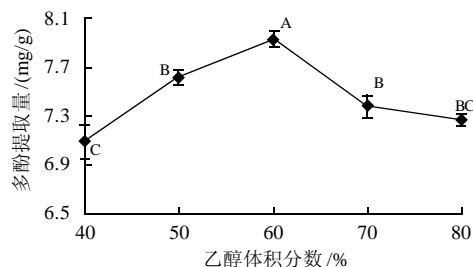


图1 乙醇体积分数对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction efficiency of polyphenols

在液料比 20:1、温度 45℃ 且不添加 SH 的条件下, 分别用 40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇溶液提取 60min, 测定结果见图 1。由图 1 可见, 随着乙醇体积分数的增加, 多酚提取量率先增加后下降的趋势, 乙醇体积分数 60% 时, 多酚提取量最大, 为 7.93mg/g。

在乙醇体积分数 60%、温度 45℃ 且不添加 SH 的条件下, 分别用液料比 5:1、10:1、15:1、20:1 和 25:1 乙醇溶液提取 60min, 测定结果见图 2。可见当液料比由 5:1 增加到 25:1 时, 多酚的提取量逐渐增加, 但是液料比由 20:1 增至 25:1 时, 提取率仅增加约 1.76%, 增加不显著, 故选用 20:1 为较优液料比。

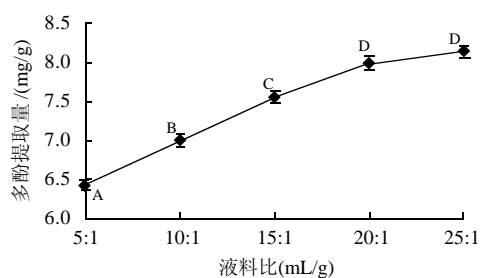


图2 液料比对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.2 Effect of solid-to-liquid ratio on the extraction efficiency of polyphenols

2.1.2.2 提取时间及SH添加量分别对石榴籽中多酚提取量的影响

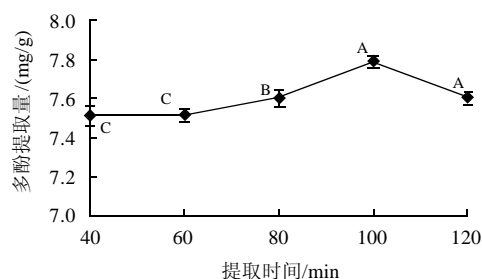


图3 提取时间对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the extraction efficiency of polyphenols

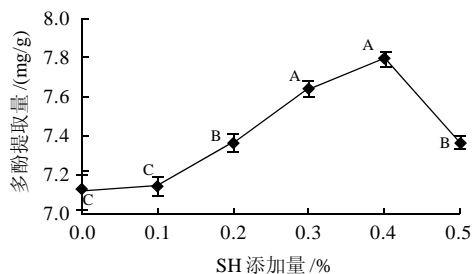


图4 SH添加量对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.4 Effect of addition level of sodium hexametaphosphate on the extraction efficiency of polyphenols

用60%乙醇溶液、料液比20:1及不添加SH时,提取时间对多酚提取量的影响见图3。可见随着提取时间的延长,石榴籽中多酚提取率逐渐增加,提取时间为100min时,多酚的提取量最高,之后下降,因此100min为较优提取时间。

用60%乙醇溶液,在料液比为20:1、提取100min时,SH的不同添加量对石榴籽中多酚提取量的影响见图4。可见随着SH添加量的增加,多酚的提取量先增加后减小。当添加量为0.4%时,提取率达到最大为7.79mg/g,较对照高出9.5%;随着SH添加量的继续增加,多酚提

取量下降至7.35mg/g。原因是SH是金属离子螯合剂,能螯合提取液中的金属离子,提高多酚的溶解度;但是随着添加量的继续增大,SH就会结合提取液中的水分,使提取液极性下降,导致多酚在提取液中的溶解度降低,多酚的提取量下降。故SH添加量为0.4%时,石榴籽中多酚的提取量较大。

2.1.2.3 pH值及提取温度分别对石榴籽多酚提取量的影响

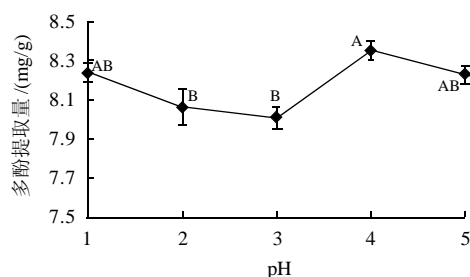


图5 pH值对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.5 Effect of pH on the extraction efficiency of polyphenols

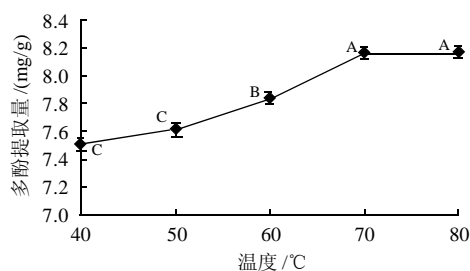


图6 提取温度对石榴籽多酚提取量的影响

Fig.6 Effect of temperature on the extraction efficiency of polyphenols

用60%的乙醇溶液,在料液比20:1、提取100min、SH添加量0.4%、温度45℃时,分别在提取液的pH值为1.0、2.0、3.0、4.0和5.0进行提取,提取结果见图5。可见pH值为4.0时,多酚物质的提取量最大,继续增大pH值,多酚的提取量降低。当pH值低于3.0后,随着pH值的降低,提取液颜色逐渐变红,吸光度急剧增大。出现这种情况的主要原因是提取液中含有丰富的原花色素,在低pH值条件下降解为花色苷所致,因此多酚提取时,提取液的pH值不能低于3.0,提取液的pH值用乙酸调节为4.0较合适。

用60%的乙醇溶液,在料液比20:1、提取100min、SH添加量0.4%、pH4时,提取温度对多酚提取量的影响见图6。可见随着提取温度的升高,多酚提取率逐渐升高,70~80℃以后多酚的提取率增加不显著。原因可能为适宜的提取温度能够降低提取溶剂的黏度,促进多酚物质在提取溶剂中的扩散,从而缩短扩散时间,但

是温度过高会促进提取物中多酚的氧化,使多酚的提取效率降低。综合考虑,60℃为石榴籽中多酚的较优提取温度。

2.1.3 石榴籽多酚提取工艺的优化

由单因素试验可知,石榴籽中多酚的提取量主要受到pH值、乙醇体积分数、提取温度和SH的添加量的影响,因此在料液比为20:1,提取100min时,选择这4个因素进行优化,结果见表1。可见A、B、C、D 4个因素对多酚提取效果影响的主次顺序为A>C>D>B,石榴籽中提取多酚的最优组合为A₁B₃C₃D₃。得出石榴籽中多酚的较优提取条件为:pH4.0、乙醇体积分数60%、提取温度60℃、SH的添加量0.4%时,多酚的提取量最高,为8.398mg/g。

表1 石榴籽中多酚提取正交试验设计及结果
Table 1 Orthogonal array design arrangement and results

试验号	A pH	B 乙醇体积 分数/%	C 温度/ ℃	D 六偏磷酸钠 添加量/%	提取量/ (mg/g)
1	4.0	40	50	0.2	7.796
2	4.0	50	55	0.3	8.173
3	4.0	60	60	0.4	8.398
4	4.5	40	55	0.4	7.669
5	4.5	50	60	0.2	7.653
6	4.5	60	50	0.3	7.330
7	5.0	40	60	0.3	7.779
8	5.0	50	50	0.4	7.632
9	5.0	60	55	0.2	7.813
k ₁	8.122	7.748	7.586	7.754	
k ₂	7.551	7.819	7.885	7.761	
k ₃	7.741	7.847	7.943	7.900	
R	0.571	0.099	0.357	0.146	

2.2 石榴籽种仁和种壳在石榴籽中所占的质量百分比
在20g石榴籽中,种壳质量(15.01±0.36)g,种仁质量(4.99±0.20)g,所以种壳和种仁分别占石榴籽总质量的75%和25%。

2.3 石榴籽种壳与种仁中多酚、黄酮和原花色素的含量比较

石榴籽各部位的总酚、原花色素和黄酮含量见表2。可见石榴籽富含多酚类物质,且以原花色素为主,石榴籽中原花色素的含量远远高于黄酮含量,这与赵国建等^[20]的研究结果相吻合;石榴籽种仁、种壳中的多酚化合物均以原花色素为主,而且种仁中多酚、原花色素和黄酮含量都大于种壳中的含量;石榴籽中多酚类物质尤其是原花色素主要集中于种仁部分。原因是种壳已经高度木质化,纤维素为主要组成部分,营养及活性成分大大降低,使得石榴籽中抗氧化活性成分集中于种

仁部分。这一研究结果可以为人们进一步开发利用石榴籽提供一定的理论依据,尤其是对石榴籽种仁的开发有重要的意义。

表2 石榴籽及各部分中总酚、原花色素及黄酮含量
Table 2 Total phenol, total flavonoid, total proanthocyanidin contents of the whole seeds, kernels and husks of pomegranate

供试物质	总酚/(mg/g)	原花色素/(mg/g)	总黄酮/(mg/g)
石榴籽	8.763	8.353	0.381
种壳	2.501	2.418	0.086
种仁	24.267	23.483	0.779

2.4 石榴籽、种壳、种仁粉提取物对DPPH自由基的清除作用和还原力

石榴籽提取物、种仁与种壳提取物、VE、和VC对DPPH自由基的清除率和还原力见表3。由表3可知,石榴籽、种壳及种仁提取物都具有一定的抗氧化作用,但是差异明显。石榴籽提取物、种仁与种壳提取物、VE、和VC在质量浓度为0.1mg/mL时,对DPPH自由基的清除能力的大小顺序为:石榴籽种仁提取物>VC>石榴籽提取物>VE>种壳提取物;石榴籽提取物、种仁与种壳提取物、VE和VC在质量浓度为0.01mg/mL时,还原力的大小顺序为:石榴籽种仁提取物>石榴籽提取物>VC>VE>种壳提取物。石榴籽有着较强的体外抗氧化能力,而且种仁与种壳的抗氧化能力相差悬殊,因此,将种仁和种壳分开研究具有较大的应用价值,对石榴籽的进一步开发利用有着较大的意义。

表3 石榴籽不同部位提取物对DPPH自由基的清除能力以及还原力的差异

Table 3 Comparison of DPPH free radical scavenging activity and reducing power of polyphenol extracts from the whole seeds, kernels and husks of pomegranate

测定指标	石榴籽提取物	种仁提取物	种壳提取物	VC	VE
DPPH自由基清除率/%	10.99	32.34	0.59	26.23	5.80
还原力	0.501	0.842	0.037	0.347	0.057

3 结论与讨论

通过研究提取条件对石榴籽中总酚提取效果的影响以及比较石榴籽种壳及种仁提取物中总酚、原花色素的含量及其抗氧化活性的差异性,分析推测了石榴籽中主要的抗氧化活性成分及其在石榴籽中的分布部位。

3.1 在pH4.0、提取温度60℃、六偏磷酸钠添加量0.4%、料液比20:1的条件下,用60%的乙醇进行提取,石榴籽中多酚的提取效果最好。

3.2 石榴籽富含原花色素, 原花色素是石榴籽抗氧化成分的主要成分, 与赵国建^[20]等的研究结果相一致; 石榴籽中多酚类物质尤其是原花色素主要集中于种仁部位, 这对石榴籽的进一步开发利用有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 汪小飞, 周耘峰, 孙龙, 等. 石榴的经济与植物文化价值研究[J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(4): 29-31.
- [2] 李海霞, 王钊, 刘延泽. 石榴科植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 28(2): 765-766.
- [3] 武云亮. 石榴资源的开发利用与产业化发展[J]. 资源与开发, 1995, 15(4): 208-209.
- [4] ARTIK N, CEMEROGLU B, MURAKAMI H, et al. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by HPLC[J]. Fruit Process, 1998, 8(12): 492-499.
- [5] 郭松年. 石榴汁花色苷稳定性、抗氧化性及其组分鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [6] 董周永, 郭松年, 赵国建, 等. 石榴果皮提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3): 582-587.
- [7] 董周永, 胡青霞, 郭松年, 等. 石榴果皮中抑菌活性物质提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 274-277.
- [8] ASISH K D, MANDAL S C, BANERJEE S K., et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 68(1/3): 205-208.
- [9] ASISH K Das, 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): 628-629.
- [10] ELSWIJK D A V, SCHOBEL U P, LANSKY E P, et al. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry[J]. Phytochemistry, 2004, 65(2): 233-241.
- [11] ABDEL W S M, ELFIKI N M, MOSTAFA S F, et al. Characterization of certain steroid hormones in *Punica granatum* L. seeds[J]. Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University), 1998, 36(1): 11-15.
- [12] 付中喜, 林茜, 杨丽娜, 等. 石榴籽提取物体外抗氧化活性研究[J]. 实用预防医学, 2010, 17(3): 564-566.
- [13] 赵国建, 刘兴华. 石榴籽原花色素提纯及其功能性研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2532-2537.
- [14] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华. 黑大豆种质抗氧化能力及其与多酚和花色苷含量的关系[J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1545-1552.
- [15] 孙建霞, 孙爱东, 白卫滨, 等. 苹果多酚的提取工艺及其对油脂的抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 122-124.
- [16] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科技出版社, 2000.
- [17] PENG Z, HAYASAKA Y, BAND P G, et al. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography[J]. Agric Food Chem, 2001, 49(1): 26-31.
- [18] 白红进, 汪河滨, 罗锋. 黑果枸杞色素的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 190-192.
- [19] JAYAPRAKASHA G K, SINGH R P, SAKARIAH K K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro[J]. Food Chem, 2001, 73(3): 285-290.
- [20] 赵国建, 李桂峰, 董周永. 石榴籽中多酚的提取及其抗氧化作用研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2532-2537.