



孙兴荣, 卞景阳, 刘琳帅, 等. 黑柿子多酚的提取及抗氧化作用的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(4):85-89.

黑柿子多酚的提取及抗氧化作用的研究

孙兴荣, 卞景阳, 刘琳帅, 任翠梅, 杨 丽, 顾 鑫

(黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316)

摘要:为优化黑柿子多酚的提取工艺,并考察黑柿子多酚的抗氧化性能。以黑柿子为原料,确定黑柿子多酚提取的最佳工艺,并评价提取物体外抗氧化活性。在单因素试验结果的基础上,以黑柿子多酚提取率为指标,通过正交试验研究乙醇浓度、料液比、提取温度和提取时间 4 个因素对黑柿子多酚提取率的影响。结果表明:在乙醇浓度 70%,料液比 1:40,提取温度 50 ℃,提取时间 50 min 的条件下,黑柿子多酚提取率可达 23.1 mg·g⁻¹。黑柿子多酚提取液对 DPPH 自由基的半清除质量浓度为 10.66 μg·mL⁻¹。表明黑柿子多酚具有较强的抗氧化作用。

关键词:黑柿子;多酚;提取;抗氧化

柿子隶属柿科(Ebenaceae)柿属(*Diospyros kaki* L.),是多年生落叶果树。我国是柿子的原产国并且是世界上柿子的主要产区,拥有悠久的

柿子栽培历史。柿树在山西、陕西、河南、河北、山东、云南广泛种植^[1]。柿子是一种优良的保健水果,具有很高的药用价值和经济价值。柿子中 VC 含量较高,传统中医认为柿果具有润肺、清热、化痰、止咳和解酒等功效,可治疗热咳、吐血和口疮^[2]。柿子中含有的天然多酚类物质,使其具有抗氧化、降低胆固醇、调节血糖、提高免疫力、抗癌、抗炎症等多重保健功效^[3]。

收稿日期:2018-11-19

第一作者简介:孙兴荣(1984-),女,硕士,助理研究员,从事作物栽培研究。E-mail:dqnkysxr@126.com。

通讯作者:卞景阳(1980-),男,博士,助理研究员,从事作物栽培研究。E-mail:bjy19800926@163.com。

Optimizing and Comparative of Vacuum Freeze-Drying and Drying Method of Bletillae Rhizoma Decoction Pieces

RAO Wen-xia¹, ZHAGN Min², LIN Jing², ZHANG Kai-yuan¹, ZHOU Kang², YIN Hong-xiang²

(1. College of Chinese Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: In order to investigate the best drying technology of bletillae rhizoma decoction pieces, and to provide reference for the modern research of drying technology of other traditional Chinese medicine decoction pieces. The polysaccharides content and intrinsic viscosity of bletillae rhizoma were determined in the combination of steaming and raw slices, thickness of 0.1 cm and 0.2 cm, drying and vacuum freeze-drying, and the drying rate of bletillae rhizoma was further determined, the curve of drying rate was drawn, the best factors were selected, and the sensory quality was compared to determine bletillae rhizoma and its slices. The results showed that the eutectic point of bletillae rhizoma decoction pieces was -11.6 ℃; the optimum conditions of vacuum freeze-drying were as follows 0.2 cm raw slices, pre-freezing at -25 ℃ for 2 hours and vacuum freeze-drying(-45 ℃=0.28 MPa) for 4 hours. The decoction pieces were white in color, flat in shape, well-sectioned, with the best sensory quality, and suitable for prescription slices; the optimum conditions of drying method were as follows 0.2 cm steaming slices, 60 ℃ constant temperature drying for 2 hours, although the decoction slices were clean and smooth in color. However, the sensory quality is poor, but the content of polysaccharide and intrinsic viscosity are the highest, which is suitable for pharmaceutical factory feeding. In this paper, the eutectic point of bletillae rhizoma was reported for the first time, and the optimum drying conditions of bletillae rhizoma decoction pieces were determined, which provided important reference data for the further improvement of bletillae rhizoma standard in Chinese Pharmacopoeia.

Keywords: bletillae rhizoma; vacuum freeze-drying; drying method; eutectic point; polysaccharide of bletillae rhizoma; characteristic viscosity

由于柿子采收期较为集中,容易软化腐烂,除鲜食和少量加工柿饼之外,每年有大量柿子腐烂变质而浪费,给农民造成很大的经济损失。柿子每年的加工率不足 10%。目前柿子加工技术落后,生产效率低下,难以形成工业化生产。柿子深加工产业的落后,严重影响了柿子产业链的良性发展。市场上迫切需求一种先进技术,开发功能性柿子产品。

黑柿子产品的研制,是以黑蒜的生产技术为依托,以新鲜的柿子为原料,采用变温发酵技术熟化而成,加工过程中不添加任何的添加剂,在保留原有成分的同时,多酚类物质含量明显增加,大大增加其保健功效。

植物多酚广泛存在于多种植物叶、根、皮、果中,具有较强的抗氧化作用,能够促进人体健康^[4-7],其药理作用和保健功效已引起人们的高度重视^[8]。林款等^[9]用甲醇提取西青果中的多酚类物质,并且研究提取温度、料液比、甲醇浓度和提取时间对多酚提取率的影响,并确定最佳提取工艺。采用 DPPH 自由基清除法、ABTS 法、总还原力法、氧化自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity,ORAC)法综合评价西青果多酚的抗氧化活性。陈秋娟等^[10]以马蹄皮为原料,提取了其中的多酚,采用还原力和羟自由基清除率法评价抗氧化活性,实验表明马蹄皮多酚具有很强的总还原力和羟自由基清除能力。林诗洋等^[11]采用超声辅助法提取了辣木叶中的多酚,研究了辣木叶多酚对 DPPH 自由基、羟自由基、 H_2O_2 清除能力、还原能力、总抗氧化能力,试验结果表明:辣木叶多酚粗提液具有较强抗氧化活性,是一种潜在的抗氧化剂。本研究对黑柿子多酚物质提取工艺进行研究,并探讨其抗氧化活性,为黑柿子产品的推广及其开发以多酚类物质为功效因子的保健食品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黑柿子由黑龙江省农业科学院大庆分院食品研究室研制。

Folin-酚试剂,合肥博美生物科技有限责任公司;没食子酸,济宁泰诺化工有限公司;DPPH 自由基,美国 Sigma 公司;其他常用试剂(分析纯),国药集团。

ME204E 型分析天平,梅特勒-托利多公

司;T6 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器公司;HH-1 型恒温水浴锅,金坛市盛蓝仪器制造公司;S20 型精密 pH 计,梅特勒-托利多公司。

1.2 方法

1.2.1 黑柿子多酚的提取 称取黑柿子冻干粉 1 g 装入烧瓶中,按照工艺条件置于恒温水浴锅中进行提取,结束后用布氏漏斗进行抽滤,得滤液,后将滤液置于旋转蒸发仪(40℃)中进行浓缩,用 25 mL 容量瓶进行定容,并计算黑柿子多酚的提取量,进行 3 次平行重复试验,取平均值。

1.2.2 黑柿子多酚提取量的测定 采用福林-酚比色法^[12],测定黑柿子多酚的含量。准确称取 0.1 g 没食子酸标准品,用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶。依次吸取没食子酸标准工作溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL 至 100 mL 容量瓶中,加入 5 mL 福林-酚试剂,摇匀反应液,5 min 后向每个容量瓶中加入 7.5% 碳酸钠溶液 4 mL,用蒸馏水定容至刻度,室温静置 60 min,在 765 nm 处测定吸光度,以没食子酸浓度为横坐标,765 nm 吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,并进行回归分析。

1.2.3 黑柿子多酚物质提取工艺的单因素实验

乙醇浓度:采用 1.2.1 方法提取黑柿子多酚类物质,固定黑柿子多酚提取反应条件为浸提温度为 60℃,浸提时间为 50 min,料液比为 1:10($g \cdot mL^{-1}$),考察 10%,30%,50%,70%,90% 不同乙醇浓度对多酚物质提取率的影响。

浸提温度:固定黑柿子多酚提取的反应条件为乙醇体积浓度 50%,浸提时间为 50 min,料液比为 1:10($g \cdot mL^{-1}$),考察 30,40,50,60,70℃ 不同提取温度对黑柿子多酚提取率的影响。

浸提时间:固定黑柿子多酚提取的反应条件为乙醇体积浓度 50%,浸提温度为 60℃,料液比为 1:10($g \cdot mL^{-1}$),考察 30,50,70,90,110 min 不同浸提时间对黑柿子多酚提取率的影响。

料液比:固定黑柿子多酚提取的反应条件为乙醇体积浓度 50%,浸提温度为 60℃,浸提时间为 50 min,考察料液比为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50($g \cdot mL^{-1}$),不同料液比浓度对黑柿子多酚提取率的影响。

1.2.4 正交设计试验 在单因素的基础上,以浸提温度、浸提时间、料液比、乙醇的浓度 4 因素进行正交试验设计,确定黑柿子多酚的最佳提取条件,试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factor and level of orthogonal test

水平 Level	A 乙醇浓度 Ethanol concentration/%	B 浸提时间 Extraction time/min	C 浸提温度 Extraction temperature/℃	D 料液比 Material liquid ratio/(g·mL ⁻¹)
1	30	50	50	1:30
2	50	70	60	1:40
3	70	90	70	1:50

1.2.5 抗氧化活性的测定 对 DPPH 自由基的清除:参照文献[13]略作修改,在具塞试管中加入不同浓度的黑柿子多酚溶液 1.5 mL 和 1.5 mL 0.1 mmol·L⁻¹ 的 DPPH 溶液,充分混匀后,于室温下反应 30 min 后测定 517 nm 处溶液的吸光度值。空白组为 1.5 mL 乙醇溶液和 1.5 mL 一定浓度的黑柿子多酚溶液,对照组为 1.5 mL 乙醇溶液和 1.5 mL DPPH 溶液,以抗坏血酸作为阳性对照,临用前用蒸馏水配置,清除率(*E*)计算公式如下:

$$E(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}) \times 100$$

式中:*A*₁为黑柿子多酚溶液吸光度值;*A*₂为空白组吸光度值;*A*₃为对照组吸光度值。

1.2.6 数据分析 采用 SPSS 19.0 进行数据分析及作图。

2 结果与分析

2.1 没食子酸标准曲线

没食子酸标准曲线如图 1 所示,没食子酸在浓度(0~60)μg·mL⁻¹内与其 765 nm 吸光值呈良好的线性关系,在此范围内的线性回归方程为 *y*=0.010 4*x*+0.003 1, *R*²=0.999 4。

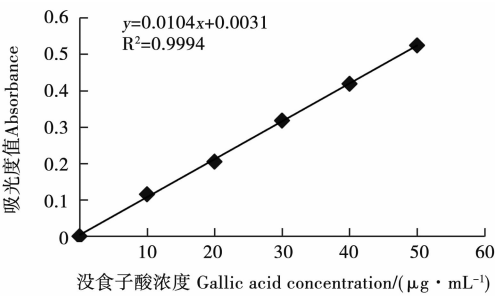


图 1 没食子酸标准曲线
Fig.1 Standard curve line of gallic acid

2.2 提取条件对黑柿子多酚提取率的影响

2.2.1 乙醇浓度 由图 2 可得,多酚提取率随着乙醇浓度的增加而上升,当乙醇浓度为 50% 时多酚含量最高,之后随着乙醇浓度的升高,总多酚提

取率下降。
2.2.2 浸提温度 由图 3 可得,随着浸提温度的升高,黑柿子多酚提取率不断增大。当温度达到 50 ℃时,温度升高提取率增长缓慢,70 ℃时提取率最高。

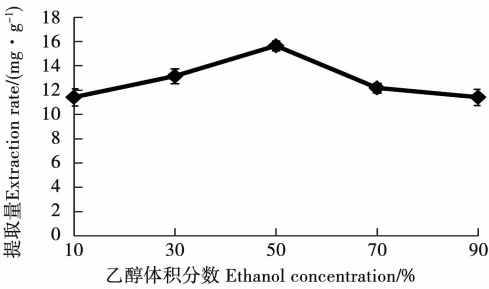


图 2 乙醇体积分数对黑柿子多酚提取的影响
Fig.2 Effect of ethanol concentration on extraction rate of black persimmon

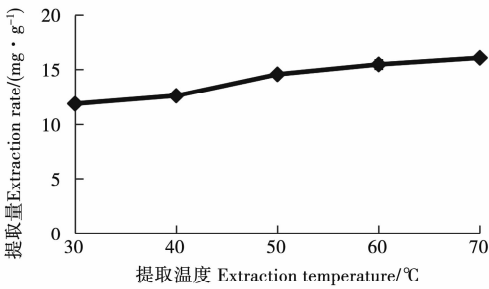


图 3 浸提温度对黑柿子多酚提取率的影响
Fig.3 Effect of temperature on extraction rate of black persimmon

2.2.3 浸提时间 由图 4 可知,黑柿子多酚提取率,随着浸提时间的增加,呈现先提高后降低的变化趋势。提取时间为 70 min 时提取率最高。

2.2.4 料液比 由图 5 可知,料液比是影响黑柿子多酚物质提取率的一个重要因素。随着料液比增加,多酚物质的提取率先增加后降低,料液比为 1:40 时多酚的提取率最大。

2.3 提取工艺的优化

在单因素的基础上,对影响黑柿子多酚提取率的因素条件乙醇浓度、浸提时间、浸提温度、料

液比进一步进行正交试验,分析黑柿子多酚在不同的浸提条件下的提取率,确定黑柿子多酚的最佳提取工艺条件。

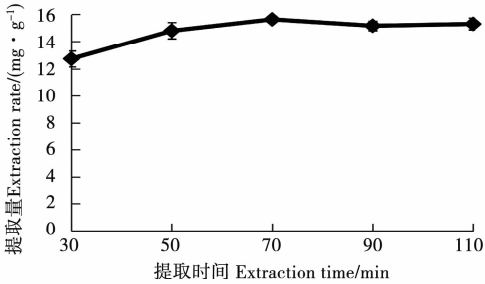


图 4 浸提时间对黑柿子多酚提取率的影响
Fig. 4 Effect of time on extraction rate of black persimmon

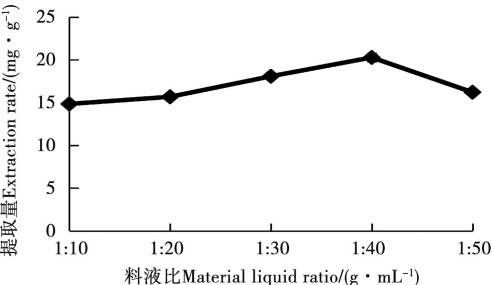


图 5 料液比对黑柿子多酚提取的影响
Fig. 5 Effect of material liquid ratio on extraction rate of black persimmon

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results					提取率 Extraction rate /(mg·g ⁻¹)
序号 No.	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	19.7
2	1	2	2	2	19.9
3	1	3	3	3	20.1
4	2	1	2	3	16.9
5	2	2	3	1	14.1
6	2	3	1	2	19.9
7	3	1	3	2	22.1
8	3	2	1	3	21.4
9	3	3	2	1	18.1
k ₁	19.9	19.6	20.3	17.3	
k ₂	17.0	18.5	18.3	20.6	
k ₃	20.5	19.4	18.8	19.5	
R	3.5	1.1	2.0	3.3	

由极差分析可知,4 个因素对黑柿子多酚提取量大小的影响顺序是 A>D>C>B,即乙醇浓

度>料液比>浸提温度>浸提时间。由正交试验与验证试验结果可知,黑柿子多酚的最佳提取工艺条件为 A₃B₁C₁D₂,即乙醇浓度为 70%,浸提时间为 50 min,浸提温度为 50℃,料液比为 1:40,黑柿子多酚的提取率为 23.1 mg·g⁻¹。

2.4 抗氧化活性的测定

黑柿子多酚提取液和抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除作用如图 6 所示。不同质量浓度的黑柿子多酚及其抗坏血酸对 DPPH 自由基均有清除能力,且清除率与剂量相关。黑柿子多酚对 DPPH 自由基半清除质量浓度 IC₅₀ 为 10.66 μg·g⁻¹,抗坏血酸 IC₅₀ 为 56.02 μg·g⁻¹。试验表明黑柿子多酚清除 DPPH 自由基能力强于抗坏血酸。

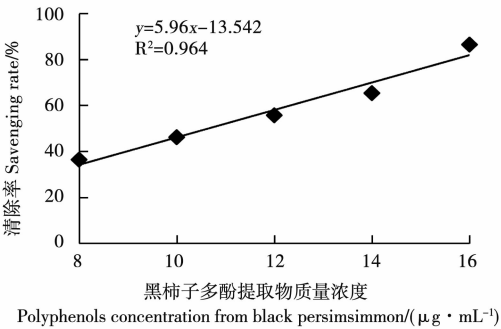
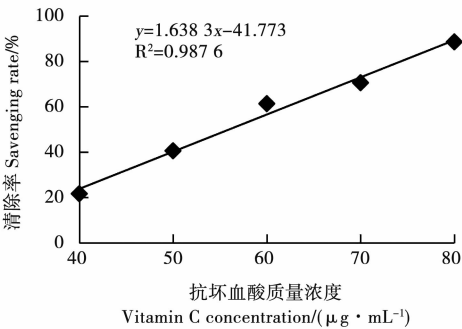


图 6 黑柿子多酚提取物及抗坏血酸对 DPPH 自由基清除作用
Fig. 6 Scavenging rate of polyphenols from black persimmon and vitamin C on DPPH free radicals

3 结论与讨论

黑柿子多酚提取率在乙醇浓度 10%~50% 范围内不断增加,可能是乙醇浓度在这个范围内有利于破坏多酚与蛋白质、多糖等物质之间的氢键和疏水作用力,促使多酚渗出,但如果乙醇浓度太高,则其他脂溶性成分浸出率较多,不利于多酚类物质的提取^[14]。黑柿子多酚提取率随提取温度的升高而增大,究其原因可能是温度上升提高

了溶剂中多酚物质的扩散速度。分子运动速度加快,氢键更容易断裂,黑柿子中多酚物质的渗透、溶解、扩散速度也加快,因而多酚类物质更容易从细胞内溶出。黑柿子多酚提取率随着提取时间延长呈现先增大后降低的趋势,这可能是在一定的时间范围内,延长浸提时间有利于黑柿子中的多酚类物质的浸出,但时间过长可能造成黑柿子中的多酚物质被氧化^[15]。黑柿子多酚提取率随着料液比的增加呈现先增大后降低的趋势,当料液比大于1:40时,多酚提取率降低,可能是因为此时乙醇对多酚的溶解已经基本达到饱和。黄佳佳^[16]研究了黑蒜多酚对DPPH自由基清除效果,自由基清除率分别达到相同质量浓度L-抗坏血酸的97.83%,IC₅₀值为3.68 mg·mL⁻¹。可见黑柿子多酚对DPPH自由基的清除作用强于黑蒜多酚。

本文采用乙醇浸提法提取黑柿子中的多酚,以黑柿子中多酚的提取量为评价指标,通过单因素和正交试验确定了黑柿子多酚的最佳提取工艺。黑柿子多酚的最佳提取工艺条件是乙醇体积分数70%,浸提时间为50 min,浸提温度为50℃,料液比为1:40。在最佳的提取条件下,黑柿子多酚的提取率为23.1 mg·g⁻¹。抗氧化测定表明黑柿子多酚具有较强的抗氧化活性。

参考文献:

- [1] 刘滔,朱维,李春美.我国柿子加工产业的现状与对策[J].食品工业科技,2016,24(37):369-375
- [2] 高青山.柿子的营养价值及其利用[J].山西果树,2015(1):10-12.
- [3] 丁轲,胡婉珊,郭琳博,等.基于液质联用检测柿子多酚成分

的分离与鉴定[J].中国农学通报,2012,28(24):270-277.

- [4] Bhullar K S,Rupasinghe H P V. Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols[J]. Food Chemistry,2015,168(21):595-605.
- [5] Boruah D C,Devi R,Tamuli S,et al. Hypolipidemic activity of crude polyphenols from the leaves of *Clerodendron colebrookianum* Walp in cholesterol fed rats[J]. Journal of Food Science and Technology,2014,51(1):3333-3340.
- [6] 张建伟,刘海燕,张森.茶多酚对大强度耐力运动小鼠免疫功能的影响[J].食品科技,2012,33(11):367-369.
- [7] Alvarez J,Wijngaard H,Arendt E K,et al. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking[J]. Food Chemistry,2010,119(2):770-778.
- [8] 刘丽香,Tanguy L,梁兴飞,等. Folin-Ciocalteu比色法测定苦丁茶中多酚含量[J].茶叶科学,2008,28(2):101-106.
- [9] 林款,茹琴,梁征,等.西青果多酚的提取纯化及其抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2018,39(5):70-76.
- [10] 陈秋娟,谢微,苏辉兰,等.马蹄皮多酚的提取及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2017(12):113-117.
- [11] 林诗洋,罗晓莲,赵存朝,等.辣木叶中多酚提取及抗氧化活性研究[J].食品与发酵科技,2018,54(2):63-68.
- [12] 牛广财,闫公听,朱丹,等. Folin-Ciocalteu比色法测定沙棘酒中总多酚含量的工艺优化[J].食品与机械,2016,32(4):80-83,142.
- [13] Liu L X,Sun Y,Laura T,et al. Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha* C. J. Tseng[J]. Food Chemistry,2009,112(1):35-41.
- [14] 程正涛,丁庆波,张昊,等.海红果多酚提取工艺优化[J].食品科学,2010,31(24):172-176.
- [15] 张梅梅,郑维发,赵艳霞,等.正交实验法优化桦褐孔菌多酚类物质的提取工艺研究[J].菌物学报,2010,29(5):760-766.
- [16] 黄佳佳,杨昭,李燕杰,等.超声波辅助提取黑蒜多酚及体外抗氧化性探究[J].食品科技,2018,43(4):212-217.

Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from Black Persimmon

SUN Xing-rong, BIAN Jing-yang, LIU Lin-shuai, REN Cui-mei, YANG Li, GU Xin

(Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China)

Abstract: In order to optimize the extraction technology of polyphenols from black persimmon and investigate its antioxidant activity. This work studied the optimization of the extraction conditions of polyphenols from black persimmon and evaluated the antioxidant of black persimmon polyphenols *in vitro*. Univariate experiments and orthogonal experiments design were employed to study effect of different ethanol concentration, the ratio of liquid to material, extraction temperature and extraction time on extraction rate of polyphenols. The results showed that the optimize parameters of extraction were ethanol concentration of 70%, the ratio of liquid and material of 1:40, extraction temperature 50℃ and extraction time 50 min. The IC₅₀ values of the obtained extract against DPPH, was 10.66 μg·mL⁻¹, respectively, suggesting that black persimmon polyphenols have a remarkable antioxidant effect.

Keywords: black persimmon; polyphenols; extraction; antioxidant