

# 酿酒葡萄皮渣中多酚物质的提取及其对羟基自由基的清除研究

孙静涛<sup>1</sup>, 董娟<sup>2</sup>, 屈静雅<sup>2</sup>, 史学伟<sup>2</sup>

(1. 石河子开发区神内天禹生物技术有限公司, 新疆石河子 832000)

(2. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

**摘要:** 本文以酿酒葡萄皮渣为研究对象, 通过单因素试验以及正交试验研究了超声波辅助提取对葡萄皮渣多酚得率的影响, 并对工艺条件进行优化, 确定了提取葡萄皮渣多酚的最佳工艺参数为: 超声时间 30 min, 温度 60 °C, 料液比 1:20 (g/mL), 超声功率 200 W, 在该条件下葡萄皮渣多酚得率为 6.72 mg/g。并研究了葡萄皮渣多酚粗提物对羟基自由基的清除能力, 结果表明: 在实验浓度范围内, 当添加的葡萄皮渣多酚的质量浓度为 0.79 mg/mL 时, 对羟基自由基的清除率可达 78.64%。

**关键词:** 葡萄皮渣多酚; 超声波辅助提取法; 羟基自由基清除

文章编号: 1673-9078(2012)12-1743-1746

## Extraction of Polyphenols and its Free Radical Scavenging Capacities in Grape Skin Residue

SUN Jing-tao<sup>1</sup>, DONG Juan<sup>2</sup>, QU Jing-ya<sup>2</sup>, SHI Xue-wei<sup>2</sup>

(1. Shihezi Development Zone shennei tianyu Bio-technology Co., Ltd, Shihezi 832000, China)

(2. Food College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** The influence of yield rate from ultrasonic extraction of grape skin residue polyphenols from wine was studied by single factor experiment and the orthogonal experiment in this paper. The optimum technological parameters were determined as follows: ultrasonic time 30min, temperature 60 °C, ratio of material to liquid 1:20 (g/mL) and ultrasonic power 200 W. Under these conditions, grape polyphenols yield rate was 6.72 mg/g. Crude grape polyphenols were extracted to investigate hydroxyl free radical scavenging capacities by Fenton, and evaluate their antioxidant activities. When the mass concentration of grape polyphenols was 0.79 mg/mL, the ratio of hydroxyl free radical scavenging can reach 78.64%.

**Keywords:** grape polyphenols; ultrasonic wave assisted extraction; hydroxyl free radical scavenging

新疆是国际公认的酿酒葡萄最佳种植区, 并已将酿酒葡萄及葡萄产业的发展列为重点发展的特色果品产业化的规划, 葡萄酒厂在新疆迅速发展, 生产能力逐年呈规模化发展。然而, 在葡萄酒的加工过程中, 约有加工葡萄量20%~30%的皮渣产生, 各葡萄酒生产厂大多将生产葡萄酒时产生的皮渣做肥料或直接扔掉, 这样不仅极易造成环境污染, 也将发酵皮渣中含有的高附加值的白葡萄酒浪费掉<sup>[1]</sup>。研究表明, 葡萄皮渣中的多酚具有延缓衰老、预防心脏病及减缓癌变进程的高水平抗氧化剂<sup>[2]</sup>。因此, 综合利用酿酒葡萄皮渣, 不仅可以消除环境污染, 而且还可带来巨大的经济效益和社会效益。

收稿日期: 2012-09-17

作者简介: 孙静涛 (1981-), 男, 生产主管, 研究方向: 植物提取

通讯作者: 董娟 (1981-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品安全与检测

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及仪器

酿酒葡萄皮渣 (新疆石河子张裕天珠葡萄酒厂); 福林酚 (美国 sigma 公司); 石油醚、乙醚、没食子酸、碳酸钠、无水乙醇、抗坏血酸、水杨酸、30% 过氧化氢、硫酸亚铁, 均为分析纯。

双频数控超声波仪 (昆山市超声仪器有限公司); 紫外分光光度计 UVmini-1240 (日本岛津公司); 恒温水浴锅 HSQ-3 (上海智诚分析仪器制造有限公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酿酒葡萄皮渣多酚提取物的制备

酿酒葡萄皮渣→晾干、粉碎、过筛→乙醚、石油醚脱脂→干燥→超声波处理浸提→抽滤→乙醇定容→稀释→测吸光值→计算多酚得率。

采用单因素试验<sup>[3-5]</sup>和正交试验设计。单因素为：提取时间、提取温度、超声波功率和料液比。在单因素试验的基础上，为了全面考察这4个因素的作用大小和优化组合，采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验进行进一步研究。

### 1.2.2 多酚含量的测定

参考徐金瑞等的方法<sup>[6]</sup>并略有改进：吸取多酚提取物1 mL，摇匀，再加0.5 mL福林酚试剂，充分摇匀，1 min之后，加入20%碳酸钠溶液1.5 mL，混匀定容。在45 °C下反应10 min，于765 nm波长下测定吸光度。以没食子酸标准品代替样品作标准曲线，得到标准曲线回归方程为 $y = 77.254x + 0.0211$ ， $R^2 = 0.9983$ ，其中 $y$ =吸光度， $x$ =溶液中没食子酸含量。样品中的多酚含量已没食子酸的含量表示，计算公式为：

$$\text{多酚得率}(\text{mg/g}) = \text{CNV}/\text{M}$$

式中：C：多酚质量浓度(mg/g)，N：稀释倍数50，M：酿酒葡萄皮渣质量(g)，V：提取液体积(mL)。

### 1.2.3 多酚清除羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )的测定方法<sup>[7,8]</sup>

利用Fenton体系， $\text{H}_2\text{O}_2$ 与 $\text{Fe}^{2+}$ 混合产生 $\cdot\text{OH}$ ，在体系内加入水杨酸捕捉 $\cdot\text{OH}$ 并产生有色物质，该物质在510 nm下有最大吸收。反应体系中含8.8 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mL、9 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  2 mL、9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液 2 mL，不同浓度的样品2 mL。最后加入 $\text{H}_2\text{O}_2$ ，37 °C反应0.5 h，以蒸馏水为参比，在510 nm下测定吸光度。考虑到样品本身的吸光值，同时以蒸馏水代替 $\text{H}_2\text{O}_2$ 进行测定。以VC为对照品，按下式计算 $\cdot\text{OH}$ 清除率。

$$\cdot\text{OH}\text{清除率} = [\text{A}_0 - (\text{A}_x - \text{A}_{x_0}) / \text{A}_0] \times 100\%$$

式中： $\text{A}_0$ 为空白对照液的吸光度， $\text{A}_x$ 为加入样品后的吸光度， $\text{A}_{x_0}$ 为样品的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声波辅助法提取酿酒葡萄皮渣多酚的单因素实验

#### 2.1.1 超声时间对葡萄皮渣多酚得率的影响

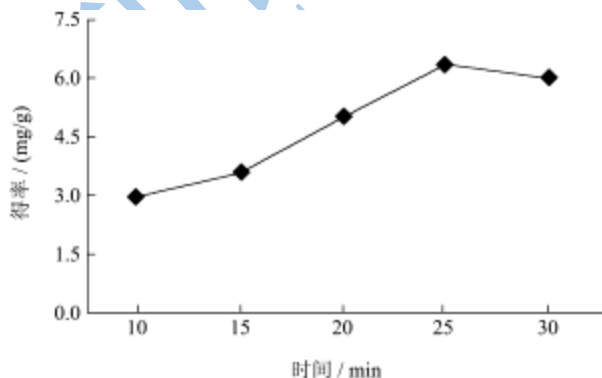


图1 超声时间对葡萄皮渣多酚得率的影响

Fig.1 Effects of ultrasonic time on grape polyphenols yield rate

称取皮渣粉样品 0.5g，超声波频率为 45 kHz，按

料液比为 1:20，加入 50%的乙醇溶液，在温度为 60 °C，超声功率为 200W 的条件下，分别超声提取，结果见图 1。

从图 1 可以看出提取时间对葡萄皮渣多酚得率有一定的影响，随着超声波处理时间的延长，葡萄皮渣多酚得率不断提高，当处理时间在 10~25 min 之间时，葡萄皮渣多酚得率上升较快，当处理时间在 25~30 min 时，葡萄皮渣多酚得率曲线上升的趋势变缓甚至下降。主要原因是随着处理时间的延长，溶液体系的渗透压达到了平衡，在 25 min 左右系统趋于平衡。再延长时间造成提取物中多酚的氧化，为了提高产品的得率和缩短提取时间，本试验选择较佳的超声波处理时间为 25 min。

#### 2.1.2 温度对葡萄皮渣多酚得率的影响

称取皮渣粉样品 0.5 g，超声波频率为 45 kHz，按料液比为 1:20，加入 50%的乙醇溶液，在超声功率为 200 W，超声提取 20 min，结果见图 2。

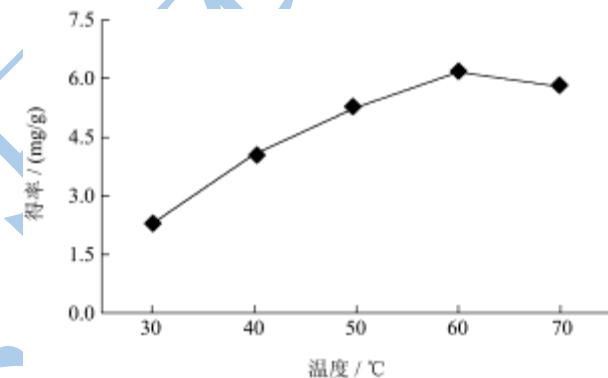


图2 温度对葡萄皮渣多酚得率的影响

Fig.2 Effects of temperature on grape polyphenols yield rate

从图 2 可以看出温度对葡萄皮渣多酚得率的影响比较明显，处理温度为 30~60 °C时随着处理温度的升高，葡萄皮渣多酚得率从 2.29 mg/g 增加到 6.23 mg/g，处理温度为 60~70 °C时，葡萄皮渣多酚得率从 6.23 mg/g 降至 5.85 mg/g。由此可见，随着超声波处理温度的不断增大，葡萄皮渣多酚得率先增加后降低，原因可能是处理温度过高，使葡萄皮渣多酚中部分活性成分热敏变性，导致葡萄皮渣多酚得率下降。综合考虑，选择较佳的超声波处理温度为 60 °C。

#### 2.1.3 功率对葡萄皮渣多酚得率的影响

称取皮渣粉样品 0.5 g，超声波频率为 45 KHz，按料液比为 1:20，加入 50%的乙醇溶液，在温度为 60 °C的条件下，超声提取 20 min，结果见图 3。

从图 3 可以看出功率对葡萄皮渣多酚得率有一定影响，随着超声功率的增大，葡萄皮渣多酚得率不断上升，这是因为超声波功率越大，空化作用和机械作用越强烈，分子扩散速度也越快。但在 180 W 到 200 W

之间, 葡萄皮渣多酚得率增加趋势缓慢, 所以考虑到经济因素, 选择超声波功率为 180 W 即可得到较高的得率。

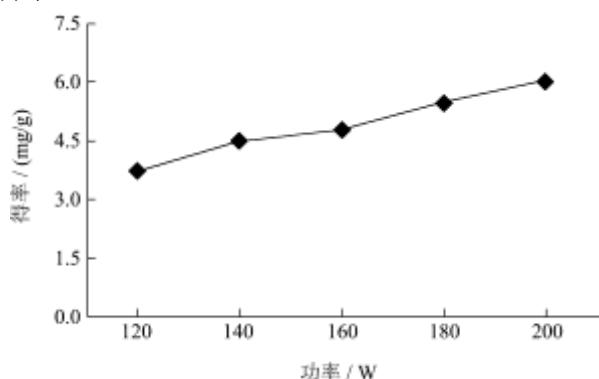


图3 功率对葡萄皮渣多酚得率的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic power on grape polyphenols yield rate

### 2.1.4 料液比对葡萄皮渣多酚得率的影响

称取皮渣粉样品 0.5 g, 超声波频率为 45 KHz, 分别按料液比为 1:16, 1:18, 1:20, 1:22, 1:24, 加入 50% 的乙醇溶液, 在温度为 60 °C, 超声功率分别为 200 W 的条件下, 超声提取 20 min, 结果见图 4。

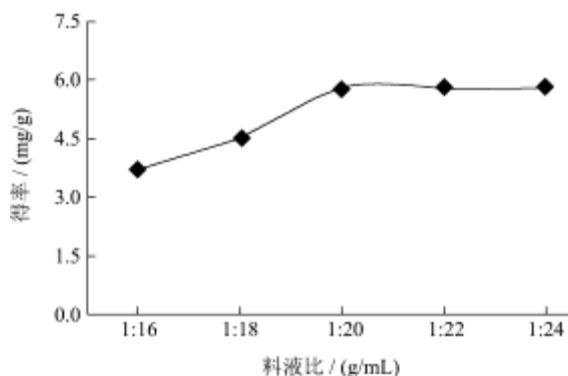


图4 料液比对葡萄皮渣多酚得率的影响

Fig.4 Effects of ratio of material to liquid on grape polyphenols yield rate

从图 4 可以看出料液比对葡萄皮渣多酚得率有一定的影响, 在料液比 1:16~1:24(g/mL) 的范围内, 随着提取溶剂用量的增加, 葡萄皮渣多酚得率逐渐增大, 这是因为对于一定量的酿酒葡萄皮渣粉来说, 溶剂用量的增加降低了多酚的浓度, 增加了原料与有机溶剂接触面的浓度差, 从而提高了多酚向溶剂的扩散速度, 使葡萄皮渣多酚得率增加。但是当料液比降低到 1:20 后, 多酚得率随料液比的变化率趋于平缓, 考虑实际中的生产成本要求, 选择料液比 1:20 为后续试验的料液比较为适当。

### 2.2 超声波辅助提取法影响因素的正交优化

由以上单因素可以看出, 仅考虑一种因素当其达到一定程度后对葡萄皮渣多酚得率的提升作用就减

小, 必须考虑多个因素, 因此在上述单因素试验的基础上, 以葡萄皮渣多酚得率为评价指标, 对温度、超声时间、料液比、功率 4 个因素做  $L_9(3^4)$  正交试验。结果见表 1。

表 1 正交试验结果

序号	A(温度 /°C)	B(时间 /min)	C[料液比 (g/mL)]	D(功率 /W)	葡萄皮渣多酚得率 / (mg/g)
1	1	1	1	1	3.65
2	1	2	2	2	4.53
3	1	3	3	3	5.41
4	2	1	2	3	5.78
5	2	2	3	1	4.62
6	2	3	1	2	6.57
7	3	1	3	2	4.06
8	3	2	1	3	4.51
9	3	3	2	1	6.55
K <sub>1</sub>	13.59	13.49	14.73	14.82	
K <sub>2</sub>	16.97	13.66	16.86	15.16	
K <sub>3</sub>	15.12	18.53	14.09	15.70	
k <sub>1</sub>	4.53	4.50	4.91	4.94	
k <sub>2</sub>	5.66	4.55	5.62	5.05	
k <sub>3</sub>	5.04	6.18	4.70	5.23	
R	1.13	1.68	0.92	0.29	
顺序	B>A>C>D				
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	
优组合	A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>				6.72

结果表明, 经过正交试验各因素对得率的影响程度依次为B>A>C>D, 即超声时间>温度>料液比>功率。综合考虑后得各因素的最佳水平组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即超声时间30 min, 温度60 °C, 料液比1:20 (g/mL), 超声功率200 W。经3次验证试验, 以该工艺条件从葡萄皮渣中提取多酚, 得率为6.72 mg/g。

### 2.3 葡萄皮渣多酚对羟基自由基(·OH)的清除作用

根据 1.2.3 的实验方法得到不同浓度的葡萄皮渣多酚和 VC 对羟基自由基清除率的影响, 结果见图 5。

由图5可知, 在实验浓度范围内, 对对照Vc对羟基自由基的清除率可达到99.85%, 葡萄皮渣多酚清除率可达到78.64%, 表明VC和葡萄皮渣多酚都具有很强的羟基自由基清除能力, 其清除率随着浓度的增加而提高, 量效关系非常明显。Vc清除羟基自由基的能力极强, 清除50%的羟基自由基所需浓度仅为0.13 mg/mL。葡萄皮渣多酚清除50%的羟基自由基所需浓度为0.38 mg/mL。

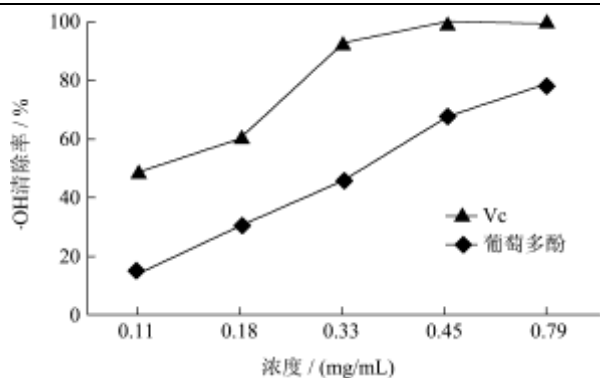


图5 葡萄皮渣多酚和Vc对羟基自由基的清除效果

Fig.5 Hydroxyl free radical scavenging capacities of grape polyphenols and Vc

### 3 结论

超声波辅助提取的空化效应加速了植物有效成分的浸出,另外它的次级效应如机械振动、乳化、扩散、击碎、化学效应等也能加速有效成分的扩散释放,因此超声波辅助提取法提取多酚具有短时、高效、节能等优点。随着对多酚提取物抗氧化活性研究的不断深入,其应用领域表现出日益广阔的发展前景<sup>[9]</sup>,以上实验结果表明,葡萄多酚对羟基自由基有较强的清除作用,在一定范围内,清除效果随浓度的增加而增强,其清除率与浓度间有一定的量效关系。

### 参考文献

- [1] 梁宇晨,杨杨.葡萄发酵皮渣综合处理工艺和设备[J].现代农业装备,2009,21:15-17
- [2] Richardo da silva JM, Darmon N, Fernandez Y, et al. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(5):1549-1550
- [3] 郭雄飞,倪慧,卿德刚,等.葡萄籽中多酚类物质的提取和纯化工艺[J].西北农业学报,2009,18(4):351-354
- [4] 高振鹏,岳田利,袁亚宏,等.超声波强化有机溶剂提取石榴籽油的工艺优化[J].农业机械学报,2008,39(5):77-80
- [5] 李华,沈洁.超声波法从葡萄籽中提取多酚的研究[J].酿酒科技,2005,5:89-91
- [6] XUJR, ZHANG M, IAU X H. Correlation between antioxidation and content of total phenolics and anthocyanin in black soybean accessions [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(8): 1545-1552 (in Chinese)
- [7] 陈留勇,孟宪军,贾薇,等.黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J].食品科学,2004,25(1):167-170
- [8] 王临宾,马倩倩,徐怀德,等.超声波辅助提取苹果叶多酚及其抗氧化性研究[J].西北农业学报,2010,19(8):126-131
- [9] 赵国建.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