

梨中不同形态酚类化合物的抗氧化活性对比分析

赵旭¹, 郑必胜^{1,2}, 周萌^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641) (2. 广州现代产业研究院, 广东广州 511458)

摘要: 本文采用溶剂提取法对梨皮和梨肉中的自由酚和结合酚进行提取, 并采用 DPPH·法测量梨皮及梨肉的抗氧化活性。研究表明, 梨皮中总酚含量为 $(201.26 \pm 6.90) \times 10^2$ mg/g 鲜梨 (以没食子酸计), 其中自由酚为 135.3 ± 1.57 mg; 结合酚为 42.46 ± 3.05 mg; 梨肉中总酚含量为 $(23.73 \pm 2.28) \times 10^2$ mg/g 鲜梨肉 (以没食子酸计), 其中自由多酚含量为 12.54 ± 0.98 mg, 结合酚 11.19 ± 1.30 mg。黄酮含量与多酚含量呈良好正相关。通过比较梨皮梨肉中两种自由酚抗氧化活性, 得出梨肉自由酚的抗氧化活性最高, DPPH·清除率的 EC₅₀ 为 248.59 μg/mL, AE 值为 0.0040; 梨肉结合酚的抗氧化活性较低, DPPH·清除率的 EC₅₀ 为 1043.24 μg/mL, AE 值为 0.0010。

关键词: 梨; 多酚; 黄酮; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2013)5-969-972

Extraction and Antioxidant Activity of Polyphenols from Pear

ZHAO Xu¹, ZHENG Bi-sheng^{1,2}, ZHOU Meng^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Modern Industrial Technology Research Institute, Guangzhou 510640, China)

Abstract: This study was designed to investigate the extraction of free and bound phenol from the peels and the flesh of pear by solvent extraction method. The antioxidant activity of the peels and the flesh was also studied using the DPPH· assay. The results showed that the total phenol in peels was 201.26 ± 6.90 mg gallic acid equivalents per 100 g fresh pear peels, including 135.36 ± 1.57 mg soluble free phenol and the 42.46 ± 3.05 mg bound phenol. And the total phenol in the flesh was lower with the value of 23.73 ± 2.28 mg gallic acid equivalents per 100 g fresh pear flesh, including 12.54 ± 0.98 mg soluble free phenol and 11.19 ± 1.30 mg bound phenol. The content of the flavonoid had a positive correlation with the content of the total phenol. Comparing the antioxidant activities of the peels and fresh, the free phenol in pear flesh had the highest antioxidant activity, with the values of DPPH· scavenging rate EC₅₀ and AE being of 248.59 μg/mL and 0.0040, respectively. The bound phenol in the pear fresh had the lowest antioxidant activity, with the values of DPPH· scavenging rate EC₅₀ and AE being of 1043.24 μg/mL and 0.0010, respectively.

Key words: pear; phenol; flavonoids; antioxidant activity

在日常饮食中, 梨不仅是大众喜爱的水果, 并以其很高的营养价值备受众多科研人员所青睐。大量文献表明, 梨中含有大量具有抗氧化活性的植物化学物质如多酚类物质和黄酮类物质。据报道, 黄酮类化合物、酚类化合物都具有清除自由基的作用^[1], 从而可以降低患结肠癌、乳腺癌、冠心病和糖尿病等慢性疾病的风险^[2,3]。

Gorinstein 等人实验结果表明, 水果皮中的总酚含量约为去皮水果的 2 倍^[4]。目前植物多酚的提取方法主要有: 溶剂提取、微波辅助提取、超声波辅助提取、

生物酶解提取、离子沉淀提取、超临界流体萃取、膜技术提取等^[5-9]。迄今为止, 国内外用于评价植物抗氧化能力的方法已有很多^[10-11], 如硫氰酸盐(thiocyanate)法、硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)法、抗氧化能力指数法(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)、化学发光法等。DPPH·检测法则是一种灵敏、简单易行的有效方法。本文利用溶剂提取的方法, 对梨皮及梨肉中的多酚和黄酮进行提取, 并采用 DPPH·检测法测量其抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

无水丙酮, 江苏强盛化工有限公司; 无水乙醇, 天津市永大化学试剂有限公司; 去离子水, 没食子酸粉末, 天津市大茂化学试剂厂; 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 中国医药上海化学试剂公司; 钼酸

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 广州市科技计划项目(12S542080076)

作者简介: 赵旭(1987-), 女, 硕士, 研究方向为天然产物分离纯化新方法新技术

通讯联系人: 郑必胜(1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为糖类物质及其药物制备

钠($\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 北京化工厂; 85%磷酸, 浓盐酸, 硫酸锂, 广州化学试剂厂; 双氧水, 7% Na_2CO_3 , 天津市化学试剂一厂; 芦丁, 国药集团化学试剂有限公司; 亚硝酸钠; 氢氧化钠, 成都市联合化工试剂研究所; 硝酸铝, 广州化学试剂厂; 乙酸乙酯, 无水甲醇, DPPH。

贡梨(产自安徽砀山), 清洗干净并凉干。

1.2 实验方法

1.2.1 没食子酸及芦丁标准曲线的确定

用去离子水将没食子酸配制浓度依次为 40、80、120、150、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用 Folin-Ciocalteu 比色法, 用分光光度计在波长为 760 nm 处, 测定吸光值。以没食子酸标准溶液的浓度对吸光度作标准曲线回归方程。

用硝酸铝显色法进行标准曲线的绘制。用 95%乙醇溶液配制 1 mg/mL 的芦丁对照品储备液, 并配成 0.01~0.06 mg/mL 共 6 个浓度点, 在波长为 500 nm 下测定吸光值, 并绘制标准曲线。

1.2.2 自由多酚及结合酚的提取

取梨皮(梨肉)和 80%冷丙酮(1:2 m/V)混合, 然后在榨汁机中进行捣碎, 过滤, 滤液回收, 滤渣用 80%丙酮在冰水浴中进行搅拌提取 5 次, 每次 10 min。过滤后把滤液合并, 8000 r/min 离心 10 min, 用真空旋转蒸发器进行浓缩到 90%的液体被蒸发为止, 以去离子水定容至 25 mL。滤渣回收, 在冰箱里面冷藏贮存备用。

取经过 10 s 烫漂的梨皮(梨肉)和 80%冷乙醇, 80%冷丙酮、冷水(1:2 m/V)混合, 然后在榨汁机中进行捣碎, 过滤。从所得的梨皮(梨肉)滤渣里面取 10 g 进行结合酚提取, 直接用 10 mL 4 mol/L NaOH 在室温下震荡水解 1 h, 震荡过程中离心管内必须充满氮气, 然后用盐酸进行中和, 再用 60 mL 乙酸乙酯分别提取 4 次。于离心机中进行 4000 r/min 离心 10 min, 用移液管吸取上层清液(有机层), 收集到烧瓶中, 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发至干, 把剩下的物质定容于 10 mL 水中, 在冰箱里面冷藏贮存备用。

1.2.3 总多酚的测量

采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[12]测量梨皮(梨肉)提取液中的多酚含量。取 0.5 mL 自由多酚待测样品(或待测结合多酚样品)进行稀释, 稀释定容至 10 mL。用分光光度计在波长 760 nm 处进行测量。

计算公式: 样品多酚含量($10^2 \text{ mg}/\text{g}$ 鲜样品) = $C_1 \times V_1 \times N_1 / M_1 \times 100$

注: C_1 为由吸光值根据没食子酸标准曲线回归方程计算出来的样品溶液中多酚类化合物的浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$; V_1 为样品提取

液浓缩后定容的体积, mL; N_1 为待测样品的总稀释倍数, 20; M_1 为样品的质量, g。

1.2.4 黄酮类化合物含量的测量

采用硝酸铝显色法^[13]对梨皮(梨肉)提取液中的黄酮含量进行测量。取已定容至 25 mL 的自由多酚样品 1 mL(或定容至 10 mL 的结合多酚样品 0.5 mL)用 95%乙醇进行稀释, 定容至 10 mL。于波长为 500 nm 处测吸光度。样品溶液中黄酮的浓度则由吸光值根据芦丁标准曲线回归方程计算出来。

计算公式: 样品黄酮含量($10^2 \text{ mg}/\text{g}$ 鲜样品) = $C_2 \times V_2 \times N_2 / M_2 \times 100$

注: C_2 为由吸光值根据芦丁标准曲线回归方程计算出来的样品溶液中黄酮含量, mg/mL ; V_2 为样品提取液浓缩后定容的体积, mL; N_2 为待测样品的总稀释倍数, 200; M_2 为样品的质量, g

1.2.5 梨皮梨肉中的自由酚及结合酚对 DPPH· 自由基清除率的测定

采用 DPPH· 方法对梨皮梨肉中的自由酚和结合酚进行抗氧化性评价^[14-15]。取少量甲醇溶解 19.716 mg DPPH·, 再用无水乙醇定容至 250 mL, 配成 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的溶液。

分别取自由多酚待测样品 20、60、90、120、150、180、210、240 μL (或结合多酚待测样品 20、30、45、60、90、120、150 μL), 稀释定容至 2 mL, 与 2 mL 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ DPPH· 溶液混匀反应 30 min 后, 以蒸馏水为参比, 用分光光度计于 517 nm 波长处测量吸光度值, 记为 A_0 。分别取自由多酚样品 20、60、90、120、150、180、210、240 μL (或结合多酚待测样品 20、30、45、60、90、120、150 μL), 稀释定容至 2 mL, 与无水乙醇混匀反应 30 min 后, 以蒸馏水为参比, 用分光光度计于 517 nm 波长处测量吸光度值, 记为 A_r 。取 2 mL 200 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ DPPH· 溶液与 2 mL 蒸馏水混匀反应 30 min 后, 以蒸馏水为参比, 用分光光度计于 517 nm 波长测量吸光度值, 记为 A_s 。

DPPH· 的清除率(%) = $[1 - (A_s - A_r) / A_0] \times 100$

以反应时的多酚浓度为横坐标, DPPH· 的清除率为纵坐标, 作出梨皮梨肉自由及结合酚的 DPPH· 清除率曲线。并分别求出半数有效浓度(EC_{50})和消除能力(AE)。

2 结果与讨论

2.1 没食子酸和芦丁标准曲线

按 1.2.1 所示的方法, 没食子酸的标准曲线如图 1 所示, 线性方程 $y = 0.005x + 0.0129$ ($r = 0.9995$)。

黄酮的芦丁标准曲线如图 2 所示, 线性方程为

$y=10.228x-0.0015$ ($r=0.9981$)。

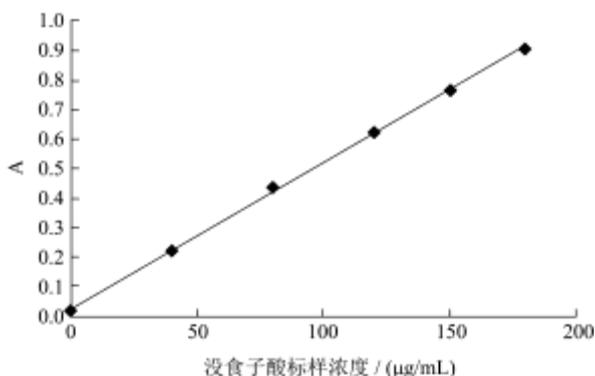


图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of gallic acid

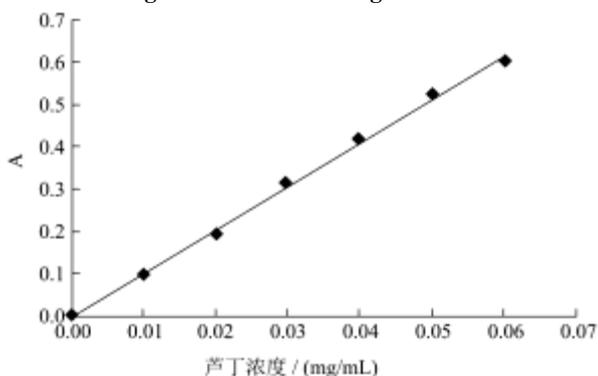


图2 芦丁标准曲线

Fig.2 Standard curve of rutin

2.2 梨皮梨肉自由及结合酚含量的比较

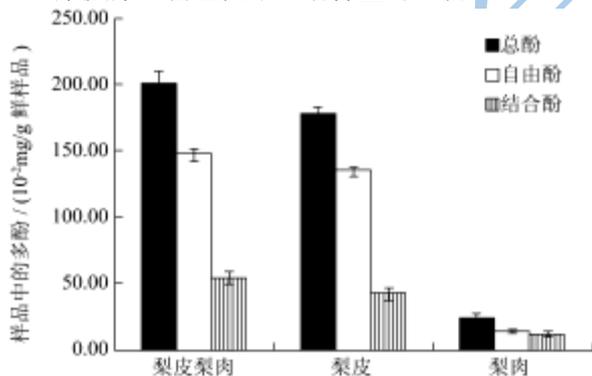


图3 梨皮梨肉自由及结合酚的含量的比较

Fig.3 Comparison of contents of free and bound phenol from pear peels and fresh

如图3所示,梨皮中自由多酚的含量是 $(135.37 \pm 1.57) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨皮,结合多酚含量是 $(42.46 \pm 3.05) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨皮;而梨肉中自由多酚含量是 $(12.54 \pm 0.98) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨肉,结合多酚含量是 $(11.19 \pm 1.30) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨肉。在自由多酚和结合多酚中,梨皮的多酚含量明显比梨肉的多酚含量高。梨皮的自由多酚含量比结合多酚含量高出一倍以上,而梨肉的自由多酚含量与结合多酚含量接近,量较少。

如图4所示,梨皮自由多酚中黄酮含量为 $(159.25 \pm 18.69) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨皮,梨皮结合多酚中黄酮含量为 $(83.91 \pm 5.22) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨皮;梨肉自由多酚中黄酮含量为 $(14.00 \pm 4.03) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨肉,梨肉结合多酚中黄酮含量为 $(7.27 \pm 1.45) \times 10^{-2}$ mg/g 新鲜梨肉。由此可见,梨皮中的黄酮含量远远高于梨肉。

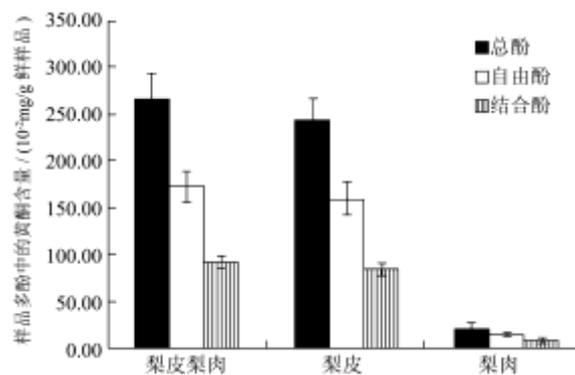


图4 梨皮梨肉多酚中的黄酮含量比较

Fig.4 Comparison of flavone contents in phenol of pear peels and fresh

2.3 梨皮梨肉自由及结合酚的抗氧化性评价

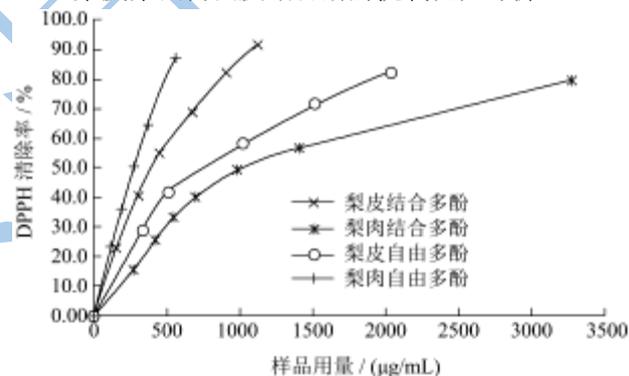


图5 梨皮梨肉自由及结合酚的 DPPH· 清除率曲线

Fig.5 DPPH· scavenging rate curves of free and bound phenol in pear peels and fresh

梨皮梨肉的抗氧化能力如图5所示,由图5和方法1.2.5中公式可以求出,梨皮自由多酚 DPPH· 自由基清除率的 EC_{50} 为 $698.40 \mu\text{g/mL}$, AE 值为 0.0014;梨肉自由多酚 DPPH· 自由基清除率的 EC_{50} 为 $248.59 \mu\text{g/mL}$, AE 值为 0.0040。梨皮结合多酚 DPPH· 自由基清除率的 EC_{50} 为 $356.47 \mu\text{g/mL}$, AE 值为 0.0028;梨肉结合多酚 DPPH· 自由基清除率的 EC_{50} 为 $1043.24 \mu\text{g/mL}$, AE 值为 0.0010。

当 DPPH 清除率为 50% 时,梨肉自由酚 AE 值最高,梨皮结合酚 AE 值次之,梨肉结合酚 AE 值最低。由此可知,梨肉自由多酚的抗氧化性最强,而梨肉结合多酚的抗氧化性最弱。如图6所示,就总抗氧化活性而言,梨皮的抗氧化性能高于梨肉,虽然梨皮中自

由多酚含量较多,但推测是由于其酚羟基的位置等原因不利于其与自由基进行电子配对,故消除自由基能力比较弱;相反,在梨肉自由酚中的多酚含量比较低,但仍然有与梨皮结合多酚相近的抗氧化能力,可能是由于结构问题,如酚羟基的位置等比较有利于其余自由基的电子配对,消除自由基能力较强。

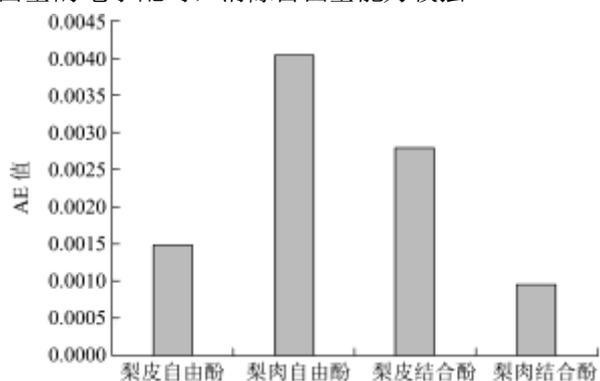


图6 梨皮梨肉自由及结合酚的DPPH·消除率AE值

Fig.6 AE values of DPPH· scavenging rates of free and bound phenol in pear peels and fresh

3 结论

本文用乙酸乙酯对梨皮梨肉中的多酚进行有效提取,并对其自由酚与结合酚的抗氧化能力进行比较。结果显示,梨皮梨肉中多酚含量依次为,梨皮自由酚>梨皮结合酚>梨肉自由酚>梨肉结合酚;黄酮含量依次为,梨皮自由酚中的黄酮>梨皮结合酚中的黄酮>梨肉自由酚中的黄酮>梨肉结合酚中的黄酮;总抗氧化活性依次为,梨肉自由酚>梨皮结合酚>梨皮自由酚>梨肉结合酚。综合比较梨皮和梨肉,得出梨皮较梨肉有更丰富的多酚来源,梨皮中多酚的抗氧化效果较梨肉更高。故梨皮是一种有价值的副产品,可以通过干燥磨成粉末等手段做成一种食品的添加剂,增加食品的营养价值。

参考文献

- [1] 方允中,郑荣梁,沈文梅.自由基生命科学进展[M].北京:原子能出版社,1993
- [2] Smigel K. Fewer colon polyps found in men with high-fiber, low fat diets [J]. Natl. Cancer Inst. 1992, 84: 80-81
- [3] Thompson L U. Antioxidant and hormone-mediated health benefits of whole grains [J]. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1994,

34: 473-497

- [4] Lin Long-Ze, Hamly J M. Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (Pyrus spp.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56: 9094-9101
- [5] 裘爱泳,刘军海,张海晖.植物多酚提取和应用[J].粮食与油脂.2003,6:10-11
- [6] Kafui Kwami Adom, Rui Hai Liu. Antioxidant Activity of Grains [J]. Agric. Food Chem, 2002, 50: 6182-6187
- [7] Kahkonen M P, Hopia A I, Vuorela H J, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds [J]. Agric Food Chem., 1999, 47: 3954-3962
- [8] Zielinski H, Kozłowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions [J]. J. Agric Food Chem, 2000, 48: 2008-2016
- [9] Halvorsen B L, Holte K, Myhrstad M C, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants [J]. Nutr. 2002, 132:461-471
- [10] 彭长连,陈少薇,林植芳,等.用清除有机自由基DPPH·法评价植物抗氧化能力[J].生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6):658-661
- [11] Llorach R, Martínez-Sánchez A, Tomás-Barberán FA, et al. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole [J]. Food Chem., 2008, 108:1028-1038
- [12] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods Enzymol, 1999, 299: 152-178
- [13] 龚晓武,李炳奇,刘丹丹,等.红景天黄酮提取及其抗氧化活性研究[J].西北林学院学报,2011,26(3):136-138
- [14] Concepcion S M, Jose A L. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents [J]. Food Res Int, 1999, 32(1):407
- [15] S T Chow, W W Chao, Y C Chung. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red extract[J]. J Food Sci, 2003, 68(1):21