

# Research on Separation, Purification and Antioxidation of Polyphenols from Pomegranate Peel

Daichun Huang, Hiuping Qiu, Wen Luo, Guoqiang Xu, Qinglu Liang, Hongmei Deng\*

Technology Research Center for Lingnan Characteristic Fruits & Vegetables Processing and Application Engineering of Guangdong Province, Food Science Innovation Team of Guangdong Higher Education Institutes, Development Center of Technology for Fruit & Vegetables Storage and Processing Engineering, College of Environmental and Biological Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming Guangdong  
Email: \*dhm005@126.com

Received: Aug. 20<sup>th</sup>, 2018; accepted: Sep. 6<sup>th</sup>, 2018; published: Sep. 14<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

Using pomegranate peel as raw material, based on single factor experiment, orthogonal experiments were used to optimize the extraction conditions of polyphenols from pomegranate peel. The polyphenols of the pomegranate peel were purified by the macroporous adsorption resin method. The color reaction and UV spectrum analysis were used. The purified pomegranate peel polyphenols were characterized, and the antioxidative properties of the pomegranate peel polyphenols obtained after purification were further studied. The experimental results showed that the optimal conditions for the extraction of polyphenols from pomegranate peel were as following: ethanol volume fraction 70%, solid-liquid ratio 1:30 (g/mL), extraction temperature 55°C, extraction time 5 h, extraction rate 12.68%, and DM130 resin. The purified polyphenols from pomegranate peel had good effects, and the purity of the purified product was 90.56%. The purified product contained phenolic substances. The purified macroporous resin had good antioxidant activity.

## Keywords

Pomegranate Peel, Polyphenols, Isolation and Purification, Antioxidant

# 石榴皮多酚的分离纯化及抗氧化性研究

黄戴纯, 丘慧萍, 罗文, 徐国强, 梁庆禄, 邓红梅\*

广东石油化工学院环境与生物工程学院, 广东高校果蔬加工与贮藏工程技术开发中心, 广东普通高校食品科学创新团队, 广东省岭南特色果蔬加工及应用工程技术研究中心, 广东 茂名

\*通讯作者。

Email: dhm005@126.com

收稿日期: 2018年8月20日; 录用日期: 2018年9月6日; 发布日期: 2018年9月14日

## 摘要

以石榴皮为原料, 在单因素试验的基础上用正交试验优化石榴皮多酚提取的工艺条件, 利用大孔吸附树脂对石榴皮多酚进行纯化, 通过显色反应和紫外光谱分析对纯化后石榴皮多酚进行性质鉴定, 并进一步研究了纯化后的石榴皮多酚的抗氧化性。结果表明: 石榴皮多酚提取的最优工艺条件是乙醇体积分数70%、料液比1:30 (g/mL)、提取温度55℃、提取时间5 h, 提取率为12.68%; DM130树脂纯化石榴皮多酚效果较好, 纯化物纯度为90.56%; 初步判断纯化物含有酚类物质; 大孔吸附树脂纯化物抗氧化性作用较好。

## 关键词

石榴皮, 多酚, 分离纯化, 抗氧化性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

石榴(*Punica granatum L.*)又名若榴、丹若、天浆, 是石榴科(Punicaceae)石榴属(*Punica L.*)植物, 果实美观鲜艳、营养丰富[1]。目前, 石榴最主要的消费途径是鲜食, 或者被加工成果汁、果酱和果酒。石榴皮为石榴加工的副产物, 往往被丢弃, 不仅浪费资源, 而且污染环境。有研究报道, 石榴皮富含多酚类物质, 在干皮中的质量分数约为10%~21% [2]。多酚具有抗肿瘤活性, 抑菌及抗病毒活性, 抗心脑血管疾病的活性, 抗氧化和延缓衰老活性等生理活性, 近年来相关研究已经引起了国内外广泛的关注[3] [4] [5]。本实验将没有食用价值的石榴皮充分利用, 从中提取得到具有生物活性、医用价值的多酚, 达到变废为宝的目的, 为石榴资源多元化、可持续发展提供理论依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

材料: 蒙自石榴。选用新鲜的石榴, 取皮, 并晒干, 粉碎后在干燥避光条件下贮藏待用。

大孔吸附树脂: D101, DM130, AB-8, NKA-9, S-8。

试剂: 无水乙醇、没食子酸、福林-酚试剂,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 等均为分析纯。

仪器与设备: NRY-1102C 立式恒温摇床(上海南荣实验室设备有限公司); RE-3000 真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); DZF-6050 真空冷冻干燥机(临海市永浩真空设备有限公司); 722N 可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司)等。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 石榴皮中多酚含量及提取率的测定

以没食子酸为标准品, 采用福林酚法[6]检测石榴皮中多酚含量。以吸光值为纵坐标, 没食子酸质量

(mg)为横坐标, 制作标准曲线, 得回归方程:  $y = 0.1277x + 0.0528$  ( $R^2 = 0.9994$ )。根据标准曲线计算提取液中多酚含量及提取率。

### 2.2.2. 石榴皮多酚提取的单因素试验

石榴皮多酚提取的因素很多, 本实验主要考察不同的乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%)、提取时间(2 h、3 h、4 h、5 h、6 h)、提取温度(45℃、50℃、55℃、60℃、65℃)和料液比(1:15 g/mL、1:20 g/mL、1:25 g/mL、1:30 g/mL、1:35 g/mL) 4 个因素对石榴皮多酚提取率的影响。

### 2.2.3. 石榴皮多酚提取条件的正交试验优化

为进一步优化提取工艺条件, 以乙醇体积分数、提取时间、提取温度、料液比为因素, 石榴皮多酚提取率为考察指标, 设计  $L_9(3^4)$  正交试验如表 1 所示。

### 2.2.4. 大孔吸附树脂纯化石榴皮多酚

#### 1) 最佳树脂的筛选

选取 D101、DM130、AB-8、NKA-9、S-8 树脂, 根据参考文献[7] [8]的方法进行预处理, 以吸附率、解析率为指标, 按下面公式计算, 筛选出分离纯化石榴皮多酚类化合物性能最好的树脂。

$$\begin{aligned} \text{吸附量}(mg/g) &= [(\rho_0 - \rho_e) \times V_0] / m & \text{吸附率}(\%) &= (\rho_0 - \rho_e) \times 100 / \rho_0 \\ \text{解吸率}(\%) &= \rho_d \times 100\% / (\rho_0 - \rho_e) & \text{回收率}(\%) &= \rho_d \times 100\% / \rho_0 \end{aligned}$$

式中:  $\rho_0$  为提取物溶液中多酚质量浓度, mg/mL;  $V_0$  为提取物溶液体积, mL;  $m$  为树脂质量, g。

#### 2) DM130 树脂对石榴皮多酚的动态吸附与解吸

参考文献[8]的方法, 以流出体积为横坐标, 流出液的吸光值为纵坐标, 绘制动态吸附曲线和洗脱曲线, 确定最佳上样量和乙醇洗脱剂的用量。

#### 3) DM130 树脂纯化后石榴皮多酚的含量测定

按筛选出的较优条件分别对石榴皮多酚的粗提液进行纯化后, 用旋转蒸发器在 50℃ 下旋转蒸发, 除去解析液中的乙醇, 再真空冷冻干燥除去水分, 得到纯化后的多酚干粉, 按照以下公式计算纯度。

$$\text{纯化物纯度}(\%) = \frac{\text{纯化物粉末中的多酚含量}}{\text{纯化物粉末质量}} \times 100\%$$

### 2.2.5. 石榴皮多酚物质初步鉴定

#### 1) 多酚的紫外光谱分析

将石榴皮多酚粗提物和纯化物用甲醇溶解。在 200~400 nm 波长范围内扫描器紫外可见光谱。

#### 2) 特征显色反应

分别称取 0.2 g 石榴皮多酚粗提物 4 份, 放入 4 支试管(编号为 1~4 号), 向试管 1 中加入 10% 氢氧化钠溶液, 试管 2 中加入香兰素 + 盐酸, 观察其显色反应, 以确定酚羟基的存在; 向试管 3 中加入硫酸, 向试管 4 中加入锌粉 + 盐酸进行显色反应, 确定黄酮类物质的存在。纯化的石榴皮多酚的显色反应操作步骤同上。

### 2.2.6. 石榴皮多酚的抗氧化性研究

#### 1) 石榴皮多酚对 DPPH 自由基清除实验

试样体系溶液的配制: 取 6 支棕色比色管, 依次加入 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 的石榴皮多酚溶液, 然后各加入 0.1 g/mL DPPH 溶液 0.5 mL, 最后用无水乙醇溶液定容至 2.5 mL; 标准体系溶液配制

**Table 1.** Orthogonal experimental factor and level**表 1.** 正交实验因素和水平

水平	因素			
	A 乙醇体积分数/%	B 提取温度/℃	C 料液比/g·mL <sup>-1</sup>	D 提取时间/h
1	60	50	1:20	3
2	70	55	1:25	4
3	80	60	1:30	5

方法相同,但样品溶液改为无水乙醇;对照样品 VC<sub>1</sub> 配制方法相同,但样品溶液改成 0.004 mg/mL 的 VC<sub>1</sub> 溶液。各溶液在 517 nm 处测定吸光值后按如下公式计算。

$$DPPH\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_{\text{标准}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{标准}}} \times 100\%$$

## 2) 石榴皮多酚对羟基的清除实验

试样体系:取 6 支棕色比色管(0~5 号),分别向 6 支比色管中依次加入 3 mL 0.6 mg/mL 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液、3 mL 4 mg/mL 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、2 mL 0.9 mg/mL 的水杨酸溶液。其中 0 号比色管在 38℃ 水浴加热 20 min 后,在 510 nm 波长下测定吸光值 X<sub>1</sub>,1~5 号试管按顺序加入 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL 的石榴皮多酚溶液,然后分别用去离子水定容至 10 mL 振荡摇匀后 38℃ 水浴加热 20 min,在 510 nm 波长下测定吸光值 X<sub>2</sub>。

标准体系溶液:用等体积去离子水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加入体系中反应,在 510 nm 波长下测定吸光值 X<sub>3</sub>;

对照品 VC<sub>2</sub>:与样品反应体系配制方法相同,但试样溶液改为 0.2 mg/mL 的 VC<sub>2</sub> 溶液。羟基的自由基清除率用如下公式计算:

$$\text{羟基自由基清除率}(\%) = \frac{X_1 - (X_2 - X_3)}{X_1} \times 100\%$$

### 2.2.7. 数据分析方法

文中图使用 Excel 软件,正交试验使用正交设计助手和 IBM SPSS 22.0 软件。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 单因素实验结果

乙醇体积分数、提取温度、提取时间和料液比对石榴皮多酚提取率的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,乙醇体积分数为 70% 时,多酚的提取率最大,为 9.86%,提取温度在 55℃ 左右提取率维持在 9.73% 左右;当提取时间为 4 h 时多酚的提取率为 9.86%,料液比为 1:20 (g/mL) 时,多酚提取率最大。四个因素对石榴皮多酚提取率的影响较明显。因此可确定正交试验的因素和水平。

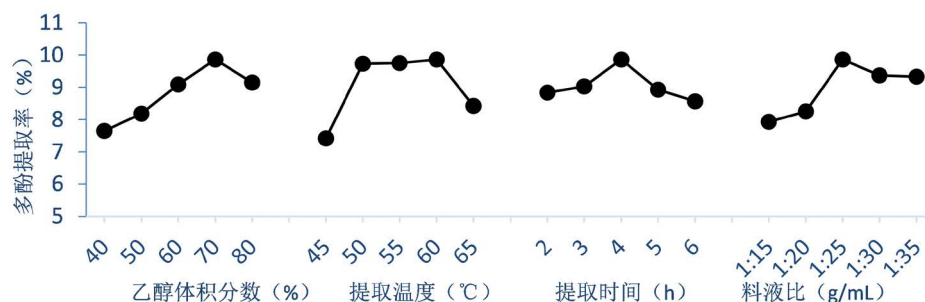
### 3.2. 最佳工艺条件的确定

正交试验结果如表 2 所示。

使用 SPSS 22.0 进行方差分析,结果如表 3 所示。

由表 2 极差分析可见,影响提取的因素大小为:料液比 > 提取时间 > 乙醇体积分数 > 提取温度,最佳提取条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub> 时即乙醇体积分数 80%、提取温度 60℃、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 5 h。

从表 3 方差分析可知,料液比和提取时间对石榴皮多酚的提取影响显著,乙醇体积分数和提取温度



**Figure 1.** Effect of different factors on the extraction rate of polyphenols from pomegranate peel  
**图 1.** 不同因素对石榴皮多酚提取率的影响

**Table 2.** Orthogonal experimental design and results of polyphenol extraction process from pomegranate peel  
**表 2.** 石榴皮多酚提取工艺的正交实验设计及结果

试验号	因素				提取率/%
	A 乙醇体积分数/%	B 提取温度/°C	C 料液比/g·mL <sup>-1</sup>	D 提取时间/h	
1	1	1	1	1	7.41
2	1	2	2	2	10.52
3	1	3	3	3	11.64
4	2	1	2	3	11.13
5	2	2	3	1	10.2
6	2	3	1	2	8.66
7	3	1	3	2	12.00
8	3	2	1	3	9.31
9	3	3	2	1	10.45
K <sub>1</sub>	9.86	10.18	8.46	9.35	
K <sub>2</sub>	9.99	10.01	10.70	10.39	
K <sub>3</sub>	10.59	10.25	11.28	10.69	
R	0.73	0.24	2.82	1.34	

**Table 3.** Analysis of variance of orthogonal tests of polyphenol extracted from pomegranate peel  
**表 3.** 石榴皮多酚提取的正交试验的方差分析

来源	第III平方和	自由度	平均值平方	F	P	显著性
修正的模型	17.174 <sup>a</sup>	6	2.862	62.634	0.016	*
截距	926.594	1	926.594	20275.571	0.000	
乙醇体积分数	0.901	2	0.450	9.853	0.092	
料液比	13.306	2	6.653	145.584	0.007	**
提取时间	2.967	2	1.484	32.464	0.030	*
错误	0.091	2	0.046			
总计	943.859	9				
校正后总数	17.266	8				

a.  $R^2 = 0.995$  (调整的  $R^2 = 0.979$ ); \*表示差异显著; \*\*表示差异极显著。

对石榴皮多酚的提取影响不显著。为了节约成本,确定石榴皮多酚的提取的最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub> 即乙醇体积分数 70%、提取温度 55℃、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 5 h。在最佳组合提取条件下,进行三次重复验证试验,得石榴皮多酚提取率为 12.68%。

### 3.3. 树脂的筛选

5 种树脂对石榴皮多酚对石榴皮粗提取液总多酚的吸附量、吸附率、解析率以及回收率见表 4。

由表 4 看出 DM130 具有最高的吸附率和解析率分别为 85.00%、71.93%,回收率是 75%,相比其他几种的大孔树脂都高,这可能与它本身较高的比表面积和较小的孔径以及合适的表面积结构有关,所以选定 DM130 分离和纯化石榴皮多酚。

### 3.4. 大孔吸附树脂动态吸附与解析

当流出液的多酚质量浓度 pf (mg/mL) 达到其上样液的 10% 时即认为多酚已达泄露点。以 pf 对流出液体积(V)作图,同一浓度的上样液以 2 BV/h 流速上柱后的动态吸附曲线见图 2。

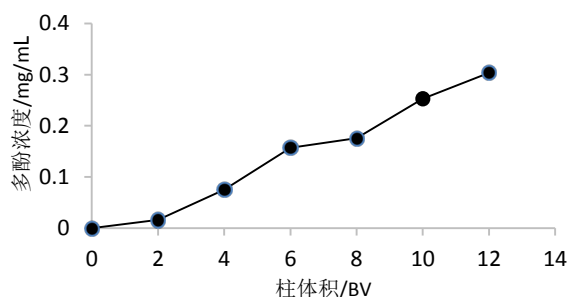
由图 2 可知,上样量从 2 BV 时开始有较大幅度的多酚泄露,之后随着上样量的不断增大,泄漏量也逐渐增加,到了 10 BV 之后,流出液的多酚浓度(0.25 mg/mL)已经超过上样液(2 mg/mL)的 10% 浓度了,即已达到泄漏点。达到 12 BV,上样完毕。一般而言,上样量越小,流出液多酚浓度就越低,吸附率会越高,上样量多会导致纯化周期延长,使效率降低[9] [10]。综合考虑,5 g 树脂选择上样量为 12 BV 是适宜的。

由图 3 可知,当 70%乙醇洗脱剂的用量为 1 BV 时,多酚的解析量不大,此时洗脱剂中的多酚浓度为 0.41 mg/mL,随后洗脱剂的用量逐渐增加,多酚浓度也逐渐增大,在洗脱剂用量为 3 BV 时,洗脱剂中的多酚含量是最大的,为 40.17 mg/mL。绝大部分的多酚在洗脱剂的用量为 5 BV 时洗脱下来,所以乙醇洗脱剂的用量为 5 BV。

**Table 4.** Static Adsorption Performance of Five Macroporous Adsorption Resins

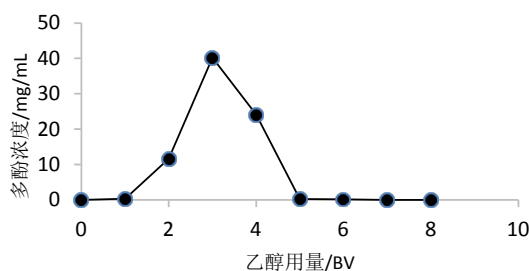
**表 4.** 5 种大孔吸附树脂静态吸附性能

树脂型号	极性	吸附量(mg/g)	吸附率(%)	解析率(%)	回收率(%)
D101	非极性	95.38	76.30	87.29	66.60
DM130	非极性	106.25	85.00	88.26	75.00
AB-8	弱极性	102.25	81.80	83.86	68.60
NKA-9	极性	98.38	78.70	80.30	63.20
S-8	极性	103.88	83.10	87.12	72.40



**Figure 2.** Polyphenol adsorption curve of pomegranate peel

**图 2.** 石榴皮多酚吸附曲线



**Figure 3.** Polyphenols desorption curve of pomegranate peel  
**图 3.** 石榴皮多酚解析曲线

纯化后石榴皮多酚纯度是 90.56%，比纯化前的 20.58%提高了 69.98%。可见，采用大孔吸附树脂纯化效果较好。

### 3.5. 多酚的性质鉴定

#### 3.5.1. 特征颜色反应

分别取石榴皮粗提物(样品 1)和大孔吸附树脂纯化物(样品 2)，加入显色剂，通过观察颜色变化对样品定性分析。实验结果如表 5 所示。

由表 5 可见石榴皮粗提物和多酚纯化物里面都含有黄酮类物质的结构特征  $C_6-C_3-C_6$ ，此外也都含有酚羟基，所以初步判断提取物及纯化物中都含有多酚类物质。

#### 3.5.2. 紫外光谱分析

在 200~400 nm 波长范围内扫描器紫外可见光谱，结果如图 4 所示。

由图 4 可见，石榴皮粗提物、大孔吸附树脂纯化物在 260 nm 处都具有吸收峰，符合多酚类物质苯甲酰结构紫外光谱吸收特点。在 300~400 nm 间也有吸收峰，但紫外吸收不明显，这说明黄酮类化合物 I 带吸收弱，表明含有少量的黄酮类物质。

### 3.6. 石榴皮多酚的抗氧化性分析

#### 3.6.1. 对 DPPH 的清除作用

石榴皮多酚粗提物和多酚纯化物和对 DPPH 自由基清除作用见图 5。由图 5 可知，石榴皮多酚粗提物和多酚纯化物在一定范围内随着质量的提高，清除自由基的能力也逐渐增强，其剂量效应整体呈较好的直线关系，图中显示多酚纯化物的自由基清除率为 14%~51%左右，维生素 C 的清除率在 25%~59%，二者相差不大，多酚粗提物的自由基清除率表现为最低，这与时双千[10]的结果相似。说明石榴皮多酚具有较强的自由基清除能力，即具有较好的抗氧化性。

#### 3.6.2. 对羟自由基的清除能力

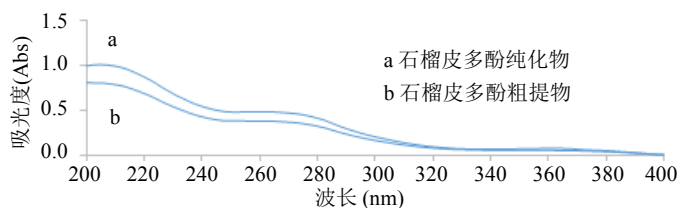
石榴皮多酚粗提物和多酚纯化物和对羟基清除作用见图 6。由图 6 可知，石榴皮多酚粗提物和多酚纯化物在一定范围内随着质量的提高，对羟自由基清除作用也逐渐增强，多酚纯化物对羟自由基清除率为 20%~25%，多酚粗提物的最差，为 13%~18%。维生素 C 的羟基清除率明显高于石榴皮多酚的清除率，说明石榴皮多酚对羟自由基的清除率不如维生素 C 效果好。

## 4. 结论

1) 石榴皮多酚的优化提取条件为：乙醇体积分数 70%、提取温度 55℃、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 5 h，在此条件下石榴皮多酚提取率为 12.68%。

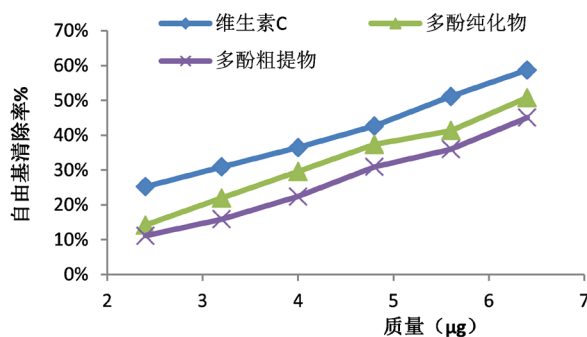
**Table 5.** Characteristic color reaction  
**表 5.** 特征颜色反应

实验号	试剂	反应结果		结果分析
		样品 1	样品 2	
1	10%氢氧化钠	深黄	淡黄	存在邻二酚羟基取代或 3, 4, -二羟基取代
2	香兰素 + 盐酸	粉红色	粉红色	含酚羟基
3	硫酸	橙黄	褐黄	含甲氧基黄酮
4	锌粉 + 盐酸	无明显颜色变化	无明显颜色变化	不含黄酮醇、二氢黄酮及二氢黄酮醇类或含量极少



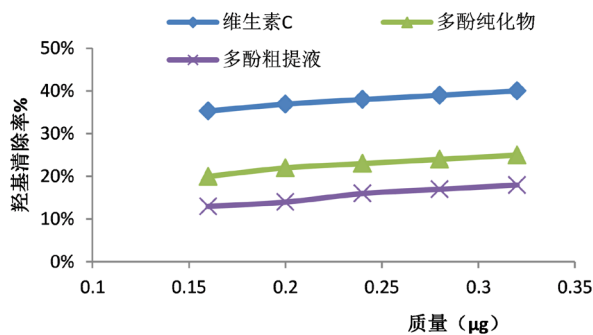
**Figure 4.** Ultraviolet scan of polyphenols from pomegranate peel before and after purification

**图 4.** 纯化前后石榴皮多酚紫外扫描图



**Figure 5.** The DPPH free radical clearance of pomegranate peel phenols

**图 5.** 石榴皮多酚对 DPPH 自由基的清除率



**Figure 6.** The hydroxyl group Clearance of Pomegranate Peel Phenols

**图 6.** 石榴皮多酚对羟自由基的清除率

2) DM130 树脂是试验的 5 种大孔吸附树脂中分离纯化石榴皮多酚效果最好的, 其纯化石榴皮多酚最佳条件为: 上样量为 12 BV, 70%乙醇洗脱剂用量为 5 BV, 大孔吸附树脂纯化后的纯度为 90.56%, 比纯



化前的 20.58%提高了 69.98%。

3) 显色反应和紫外光谱扫描结果分析都表明, 石榴皮粗提物和纯化物里面含有黄酮类物质的结构特征  $C_6-C_3-C_6$ , 此外也都含有酚羟基, 所以初步判断提取物及纯化物中都含有多酚类物质。

4) 在抗氧化性方面, 纯化后的石榴皮多酚对 DPPH 自由基和羟基的清除率比石榴皮多酚粗提物效果好。

## 基金项目

广东省岭南特色果蔬加工关键技术及应用工程技术研究中心项目(粤科函产学研字[2015]1487号); 广东普通高校食品科学创新团队项目(2016KCXTD020); 广东高校果蔬加工与贮藏工程技术开发中心(2012gczx B001); 广东石油化工学院大学生创新创业项目(201711656036); 广东石油化工学院“教学质量与教学改革工程”建设项目(广油教(2017)19号)。

## 参考文献

- [1] 李志洲. 微波辅助提取石榴叶中多酚类物质的工艺[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 72-75.
- [2] 王华斌, 包晓玮, 韩海霞. 新疆石榴皮多酚提取工艺研究[J]. 食品与机械, 2010, 26(5): 137-140.
- [3] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 李雪莹, 王文杰, 武永刚. 植物单宁的生理作用及经济价值[J]. 西部林业科学, 2005, 34(1): 66-69.
- [5] 宋立江, 狄宝, 石碧. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势[J]. 化学进展, 2000, 12(2): 161-170.
- [6] 游见明, 曹新志. 福林酚法测定茶树中茶多酚的分布水平[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(10): 2417-2419.
- [7] 曾臻, 刘后根, 洪艳平, 等. 大孔树脂纯化桃花总黄酮工艺及抗氧化性研究[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(1): 182-189.
- [8] 邓红梅, 陈奕君, 林壮辉, 等. 芒果苷的分离纯化及鉴定研究[J]. 农产品加工, 2018(6): 1-9.
- [9] 徐玉霞, 王华斌. 大孔吸附树脂纯化海红果黄酮工艺的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1297-1302.
- [10] 时双千. 石榴皮多酚超声影响和抗氧化性及与卵清蛋白作用研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2017.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [br@hanspub.org](mailto:br@hanspub.org)