

# 石榴叶总酚测定及提取工艺研究

邱涛涛<sup>1</sup>, 王华<sup>2,\*</sup>, 毛世红<sup>1</sup>

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 2. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

**摘要:** 以石榴叶为原料, 采用 Folin-Ciocalteu 法定量测定石榴叶提取液中总酚含量, 通过单因素试验和正交试验对石榴叶总酚的提取工艺进行探讨。确定其最佳提取条件为: 料液比 1:25(g/ml), 温度 70℃, 提取溶剂为 75% 乙醇, 提取时间 1.5h。综合考虑成本因素, 原料过 1mm 筛较为适宜, 按照该工艺提取石榴叶总酚的得率为 16.63%。

**关键词:** 石榴叶; 总酚; Folin-Ciocalteu 法; 提取

Study on Determination and Extraction of Total Polyphenols from Leaves of *Punica granatum* L.

QIU Tao-tao<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>2,\*</sup>, MAO shi-hong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

**Abstract:** Folin-Ciocalteu method was used to determine the content of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.. The effect of extraction conditions on the extraction rate of total polyphenols from extracts was evaluated by single factor and orthogonal tests. The optimal extraction conditions of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L. are as follows: 75% alcohol as extraction solvent, temperature 70℃, extraction time 1.5 h, material to liquid ratio 1:20 and 1 mm of particle size. Under these conditions, the maximum extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L. was 16.63%.

**Key words:** leaves of *Punica granatum* L.; total polyphenols; Folin-Ciocalteu; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0131-04

植物总酚是一类具有抗氧化和清除自由基功能的活性物质, 由于其在治疗心脑血管疾病、预防癌症以及抗衰老等方面具有显著功效, 被广泛地应用于医疗和保健行业, 具有极大的开发和利用前景。

石榴叶(leaves of *Punica granatum* L.)为石榴科植物石榴的叶片, 据《图经本草》记载:“榴叶者, 主咽喉燥渴、止下利漏精、止血之功能”, 尤其在助消化抗胃酸过多, 抗胃溃疡等方面具有显著功效<sup>[1]</sup>。现代科学研究证明, 石榴叶含有没食子酸、熊果酸、甘露醇、鞣花酸、短叶苏木酚、黄酮苷类化合物等多种活性成分, 其中黄酮类物质含量高达 3.59mg/g, 是一种理想的绿色药用资源<sup>[2-4]</sup>。本研究以石榴叶为原料, 寻求从石榴叶中提取总酚的最佳工艺条件, 以期为提高石榴的经济利用价值提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

石榴叶, 产于重庆。

乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、碳酸钠、钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂、磷酸、盐酸和溴水均为分析纯; 一水合没食子酸标准品 Sigma 公司。

TU-1901 型紫外分光光度计; 万分之一电子天平; 组织捣碎机; 恒温水浴锅; 旋转蒸发仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 石榴叶总酚的提取工艺流程

干燥 回流浸提 过滤 真空浓缩 定容 UV测定

#### 1.2.2 石榴叶总酚含量的测定方法<sup>[5]</sup>

没食子酸标准曲线的绘制: 准确称取一水合没食子酸 0.110 ± 0.001g, 用水完全溶解后, 转移到 100ml 容量瓶中定容, 配制成浓度为 1000mg/L 的没食子酸标准溶液; 用移液管吸取 0、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0ml 标准溶液到 100ml 容量瓶中, 定容。分别吸取上述标准溶液 1.0ml, 加蒸馏水 5ml、FC 显色剂(配制方法参照文献 [6])1ml, 7.5% 碳酸钠溶液 3ml, 混匀, 45℃ 水浴 1.5h 后, 在 765nm 波长下测定系列标准溶液的吸光度, 绘制标准曲线, 求回归方程。

收稿日期: 2008-11-03

作者简介: 邱涛涛(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: gxqiutaotao@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 王华(1963-), 男, 副研究员, 研究方向为柑橘贮藏与加工。E-mail: wanghua40@126.com

石榴叶总酚含量的测定：取样品溶液 1.0ml，其他步骤同标准溶液测定方法，根据标准曲线求得其浓度，并计算出总酚含量。

### 1.2.3 最大吸收波长扫描

分别在没食子酸和石榴叶样品中添加 FC 试剂制成显色检测液，检测波长从 400nm 开始到 900nm 进行扫描，确定总酚最大吸收峰对应下的波长。

### 1.2.4 回收率测定

取不同总酚浓度的石榴叶样品，分别加入 1.00mg 的没食子酸，以蒸馏水作空白，分别测定总酚含量，计算回收率。

### 1.2.5 稳定性和精密度检测

分别在没食子酸和石榴叶样品中添加 FC 试剂后，45 水浴放置，隔 10min 测其吸光度，计算稳定性。

准确称取一定量的石榴叶样品 5 份，按上述操作，测其吸光度，得出总酚含量，计算精密度。

### 1.2.6 提取单因素试验

准确称取  $2.00 \pm 0.01$ g 干燥的石榴叶粉，置于 250ml 平底烧瓶中，进行回流提取。改变提取条件，测定石榴叶提取液中总酚含量，确定得率，以确定提取因素变化范围及各因素的较佳值。

### 1.2.7 正交试验

在单因素试验的基础上进行正交试验，以确定最佳提取方案。

$$\text{总酚得率(\%)} = \frac{VCn}{1000W} \times 100$$

式中：V 为试样定容体积，ml；C 为试样中酚浓度，mg/ml；n 为稀释倍数；W 为试样质量，g。

## 2 结果与分析

### 2.1 最大吸收波长扫描

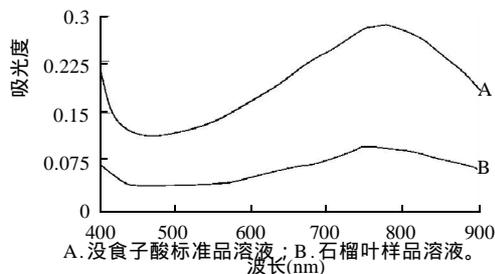


图1 没食子酸标准品溶液和石榴叶样品溶液紫外吸收光谱

Fig.1 UV absorption spectrogram of standard gallic acid and extracts of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

检测波长的扫描从 400~900nm，在 765nm 处出现峰值，如图 1，结果表明没食子酸标准品溶液和石榴叶样品制成显色检测液后最大吸收波长一致，均为 765nm，确定 765nm 为石榴叶中总酚的测定波长。

### 2.2 标准曲线的绘制

根据上述方法绘制标准曲线，即在 765nm 处测定吸光度，以没食子酸标准品浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，得到相应回归方程  $y=0.10717x - 0.00127$ ， $R^2=1.0000$ ，其线性范围为  $0 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ 。标准曲线见图 2。

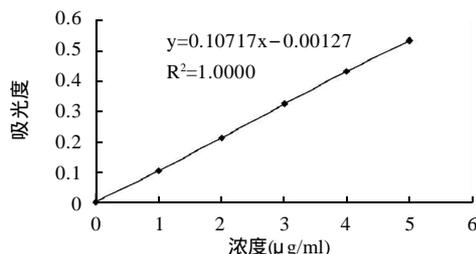


图2 没食子酸标准曲线图

Fig.2 Standard curve of gallic acids

### 2.3 回收率测定

对不同总酚浓度石榴叶样品分别添加 1.00mg 没食子酸，进行回收率检验，检验结果如表 1。从表 1 可以看出，本方法的平均回收率为 100.31%，相对标准偏差为 0.92%。表明 Folin-Ciocalteu 法测定石榴叶中总酚含量具有较好的准确性。

表1 石榴叶总酚加标回收率测定

Table 1 Average spike recovery of total polyphenol in extract of leaves of *Punica granatum* L. and RSD

序 号	样品中总酚 的含量(mg)	标准品 加入量(mg)	测定量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	相对标准偏 差(%)
1	1.28	1.00	2.27	99.56		
2	2.56	1.00	3.62	101.80		
3	3.84	1.00	4.86	100.53	100.31	0.92
4	5.12	1.00	6.12	100.10		
5	6.40	1.00	7.37	99.56		

### 2.4 稳定性和精密度检测

没食子酸和石榴叶样品溶液添加 FC 试剂后，45 水浴，每隔 10min 测定吸光度(图 3)。90min 后，曲线变得相对平坦，吸光度已经基本持平，因此，本实验采用 45 水浴，90min 作为 FC 试剂显色反应时间。

精密度的实验结果见表 2，采用 t 检验法( $p=95\%$ )得出，该方法的置信区间为  $(2.554 \pm 0.031) \text{ mg/g}$ ， $RSD=0.97\%$ ，其检验结果是  $p>0.05$ ，测定值之间无显著性差异。因此，采用 Folin-Ciocalteu 法测定石榴叶中总

酚含量, 相对标准偏差较小, 说明结果重现性好, 精密度较高, 所得数据精确。

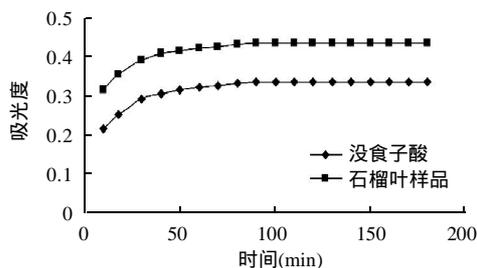


图3 反应时间对吸光度的影响

Fig.3 Effects of reaction time on absorbance

表2 精密度实验结果

Table 2 Result of precise experiment

实验号	1	2	3	4	5
测定量(mg)	2.59	2.52	2.54	2.55	2.55
RSD(%)	0.97				

### 2.5 提取溶剂对石榴叶中总酚提取效果的影响

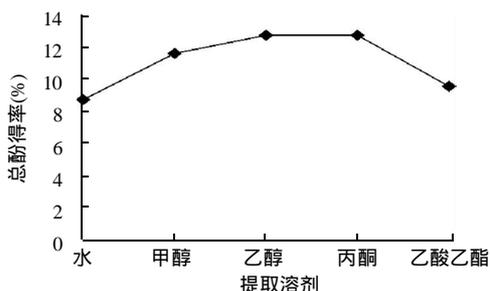


图4 不同提取溶剂对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.4 Effects of different solvents on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

如图4所示, 乙醇和丙酮的总酚得率明显高于其他三种溶剂, 但由于丙酮毒性、挥发性较高, 其产品中残留溶剂对人体有害, 浸提液色泽极深, 脂溶性成分较多, 产品成本高, 因而本实验选用乙醇-水溶液作提取溶剂。

### 2.6 乙醇浓度对石榴叶中总酚提取效果的影响

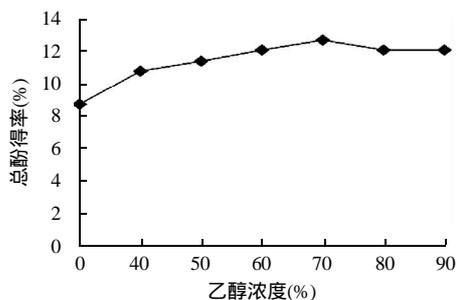


图5 乙醇浓度对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.5 Effects of ethanol concentration on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

从图5可以看出, 总酚得率随着乙醇浓度的提高而逐渐升高, 在70%时达到最高。但随着浓度进一步提高, 总酚得率逐渐降低。说明乙醇浓度过高时, 一些醇溶性杂质、色素、亲脂性强的成分等溶出增多, 这些成分与总酚竞争同乙醇-水分子结合, 使组织的通透性下降, 干扰因素随之增大。

### 2.7 浸提时间对石榴叶中总酚提取效果的影响

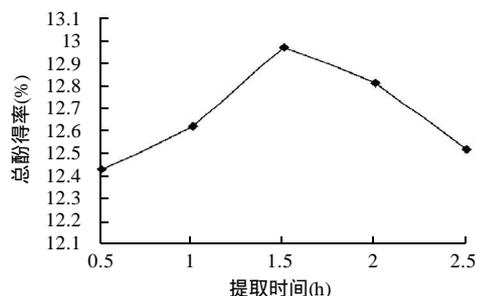


图6 浸提时间对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.6 Effects of extract time on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

如图6所示, 随着浸提时间的增加, 总酚得率也逐渐增大, 当提取时间达到1.5h时, 达到峰值, 此时提取效果最佳。当提取时间进一步延长(>1.5h), 溶剂中有效成分浓度逐渐增大, 和固相中的浓度差逐渐变小, 有效成分很难进一步溶解。同时, 酚类化合物长时间存在于溶液中, 其稳定性受到影响, 反而导致得率有所下降, 因此最佳提取时间为1.5h。

### 2.8 料液比对石榴叶中总酚提取效果的影响

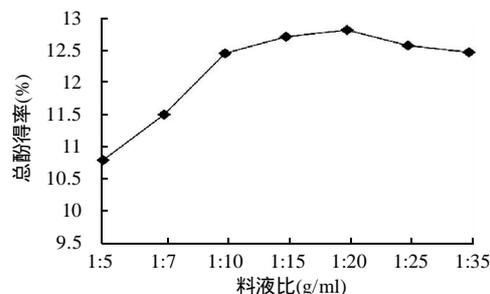


图7 料液比对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.7 Effects of ratio of material to liquid on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

由图7可以看出, 当料液比由1:5逐渐变化至1:20时, 总酚得率随之逐渐增大。这是因为溶剂量大, 溶剂中的有效成分浓度低, 与物料及溶剂边界层的有效成分浓度差大, 扩散推动力大, 因而得率高。当料液比达到1:20后继续增加溶剂量总酚得率增加已近平缓, 考虑到浸提液的用量过多, 会给浓缩、过滤、干燥等后续工作带来困难, 因此最佳料液比为1:20。

### 2.9 提取温度对石榴叶中总酚提取效果的影响

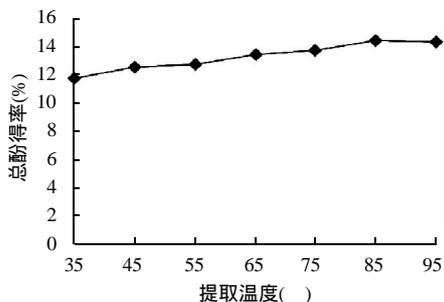


图8 提取温度对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.8 Effects of extraction temperature on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

如图8所示,在35~85 范围内,随着温度的升高,总酚得率也随之升高。在实验过程中,温度在80 后,提取液中出现黑色黏性团状物,主要是树脂、色素以及酚类的混合物,当温度超过85 ,总酚得率下降。原因是温度过高石榴叶组织中的黏液杂质大量溶出,以及总酚稳定性降低所导致,因此石榴叶总酚的最佳提取温度为75 。

#### 2.10 原料粒径对石榴叶中总酚提取效果的影响

考虑成本因素,本实验原料选取过1mm(18目)筛的粒径。

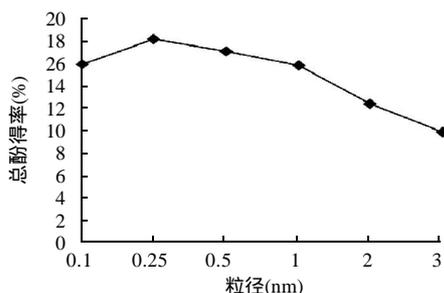


图9 粒径对石榴叶中总酚提取效果的影响

Fig.9 Effects of material particle size on extraction rate of total polyphenols from leaves of *Punica granatum* L.

#### 2.11 正交试验确定最佳提取工艺

在单因素试验的基础上,选取温度、乙醇浓度、料液比、提取时间四个主要因素做四因素三水平正交试验,因素水平见表3,试验方案及结果分析见表4。

表3 正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test

水平	乙醇浓度(%)	温度(°C)	时间(min)	料液比(g/ml)
1	70	65	120	1:25
2	75	70	60	1:15
3	65	75	90	1:20

表4 正交试验结果极差分析

Table 4 Results and range analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总酚得率(%)
1	1	1	1	1	16.21
2	1	2	2	2	16.36
3	1	3	3	3	16.14
4	2	1	2	3	16.18
5	2	2	3	1	16.63
6	2	3	1	2	16.29
7	3	1	3	2	16.09
8	3	2	1	3	16.30
9	3	3	2	1	16.04
K <sub>1</sub>	48.70	48.48	48.81	48.88	
K <sub>2</sub>	49.11	49.29	48.59	48.74	
K <sub>3</sub>	48.44	48.47	48.86	48.63	
k <sub>1</sub>	16.23	16.16	16.27	16.76	T=146.24596
k <sub>2</sub>	16.37	16.43	16.20	16.25	
k <sub>3</sub>	16.15	16.16	16.29	16.29	
R	0.22	0.27	0.09	0.51	

石榴叶中总酚提取正交试验结果及其各因素与总酚提取效果的影响关系,见表4。极差分析表明,各因素对石榴叶总酚提取效果影响的程度从高到低依次为D>B>A>C,即对石榴叶中总酚的提取影响最大的是料液比,其次是温度和乙醇浓度,影响最小的是时间。结合k值可知最佳提取条件应为D<sub>1</sub>B<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即料液比1:25、温度70 、75%乙醇作为提取溶剂,提取时间1.5h。按照该工艺,石榴叶中总酚粗提物的得率为16.63%。

### 3 结论

通过单因素和正交试验,确定对石榴叶中总酚提取影响最大的是料液比,其次是温度和乙醇浓度,影响最小的是时间。其最佳提取条件为料液比为1:25(g/ml),温度70 ,提取溶剂浓度为75%乙醇,提取时间1.5h,选取过1mm筛的原料。按照该工艺石榴叶中总酚粗提物的得率为16.63%。

#### 参考文献:

- [1] 李定格,张增敏,陈晓建,等.石榴叶水浸剂对大鼠胃酸分泌和试验性胃溃疡作用的研究[J].中药药理与临床,2003,19(6):23.
- [2] HUSSEIN S A M, BARAKAT H H, MERFORT I, et al. Tannins from the leaves of *Punica granatum*[J]. Phytochemistry, 1997, 45(4): 819-823.
- [3] 林佳,李琰,徐丽珍,等.石榴叶的化学成分研究[J].中南药学,2005,3(2): 70-72.
- [4] 吴静,支金虎.石榴叶中总黄酮含量的测定[J].河西学院学报,2006,22(2): 49-50.
- [5] 李静,聂继云,王孝娣,等. Folin-Ciocalteus 法测定葡萄和葡萄酒中的总酚[J].中国南方果树,2007,36(6): 86-87.
- [6] 楼书聪.化学试剂配制手册[M].2版.南京:江苏科学技术出版社,2002: 1178-1180.