

柿子醇提取物的体外抗氧化研究

徐胜龙¹, 杨建雄^{1,2,*}

(1. 陕西师范大学物理学与信息技术学院, 陕西 西安 710062

2. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 目的: 研究柿子(甜柿)醇提取物(extracts of non-astringent persimmons, EP)体外抗氧化作用。方法: 用70%乙醇制备柿子提取物, 并对其主要活性成分的含量进行测定; 以BHT、VC、D-甘露醇为阳性对照, 测定了EP的总抗氧化活性、还原力、脂质过氧化以及清除DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子的能力。结果: EP的总糖、多酚及黄酮类含量分别为62.03%、0.33%、0.725%。EP具有较好的总抗氧化活性和总还原性, 能抑制脂质过氧化和清除自由基。其对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基、脂质过氧化的IC₅₀分别为0.8、4.1、2.1、4.2mg/ml。结论: EP具有明显的抗氧化活性。

关键词: 柿子; 抗氧化活性; 清除自由基; 体外

In vitro Antioxidant Properties of Extract of Non-astringent Persimmons

XU Sheng-long¹, YANG Jian-xiong^{1,2,*}

(1. College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Objective To study the antioxidant properties of extract of non-astringent persimmons (*Diospyros kaki*) (EP) *in vitro*. Method: The extract of non-astringent persimmons were prepared by 70% alcoholic reflux. The content of the active components of EP was mensurated. The antioxidant activity of the EP has been analyzed by using different assays, such as total antioxidant activity, reducing power, hydroxyl radical scavenging assay, superoxide radical scavenging assay, DPPH radical scavenging assay and lipid peroxidation assay. Antioxidant activities of BHT, VC, and D-mannitol were as a positive control. Result: The contents of total saccharides, total phenolic, and total flavonoid in EP were 62.03%, 0.33%, 0.725%, respectively. EP was proved with total antioxidant activity in evidence, effective reducing power, inhibition of lipid peoxidation and free radical, scavenging activity. The IC₅₀ values of inhibition for DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical and lipid peroxidation assay were 0.8, 4.1, 2.1 and 4.2mg/ml, respectively. Conclusion: EP has obvious antioxidant activities *in vitro*.

Key words persimmons; antioxidant; free radical scavenging *in vitro*

中图分类号: R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0131-04

柿子(*Diospyros kaki*)又名朱果, 柿科, 柿属, 为热带、亚热带植物, 世界各地均有柿树栽培。成熟的柿果色泽鲜艳, 味甜多汁, 具有较高的营养和药用价值。对柿子的营养成分和活性成分报道很多, 其中有重要生理及药理功效的成分主要有甘露醇、葡萄糖、果糖、五环三萜类化合物、各种无机盐、维生素、类胡萝卜素和鞣质类等。

柿子在我国存有广阔的资源 and 开发利用空间。现已有食品加工机构对柿果肉进行多种开发利用^[1]。研究表

明其具有抗动脉硬化、预防心血管疾病、抗肿瘤、抗老化、抗微生物、止血作用, 并已进入临床应用, 具有广阔的应用价值。一般认为柿子果实中的抗氧化作用主要是因为其果肉内含有多酚类物质^[2]。也有报道干柿皮有抗氧化作用, 可降低血液胆固醇, 具有抗动脉粥样硬化的作用^[3]。柿种子内含有丹宁类化合物, 具有很强的抗氧化活性, 能有效清除肝脏内的过氧化反应物和降低卵磷脂的过氧化氢水平^[4]。但目前对柿子及其醇提取物的体外抗氧化活性还没有系统的研究。

收稿日期: 2007-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20175012)

作者简介: 徐胜龙(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为膜与细胞生物物理。E-mail: shenglxu@126.com

* 通讯作者: 杨建雄(1954-), 男, 教授, 研究方向为天然产物的分离与评价。E-mail: jxyang@snnu.edu.cn

本实验以陕西关中地区的临潼火晶柿子为研究对象,用70%乙醇进行提取,制备了柿子的醇提取物(EP),测定了EP主要有效成分的含量,并对其抗氧化活性进行较全面的评价,为甜柿的深加工和开发利用提供一定实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

陕西临潼火晶柿子新鲜果实 西安南郊农贸市场。

1.2 试剂

bibutyl hydroxyl toluene (BHT)、吩嗪硫酸甲脂(PMS) Applichem公司; β -胡萝卜素 Merck公司; 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)、phenazine methosulphate (PMS)、linoleic acid、没食子酸、福林酚试剂、Tween-20、D-甘露醇 Sigma公司; L-抗坏血酸、 $K_3Fe(CN)_6$ 、2-脱氧-D-核糖(DR)、氮兰四唑(NBT)、NADH、2-硫代巴比妥酸(TBA) 均为国产分析纯。

1.3 EP的制备及有关成分的含量测定

1.3.1 EP的制备

称取柿子203g,用蒸馏水淋洗三次,晾干,充分匀浆,然后以1:10(柿子/70%酒精,W/V)混匀,80℃回流3h,粗提液用纱布滤除絮状物,减压抽滤,并于50℃旋转蒸发,浓缩。浓缩提取液于50℃烘箱内干燥成浸膏状。于4℃冰箱保存备用。

1.3.2 总多酚的测定

以没食子酸(0.1mg/ml甲醇溶)为标准品,采用福林试剂法,于760nm处测吸光度。运用线性回归方程计算其总多酚的含量。

1.3.3 总黄酮类的测定

采用分光光度法,以芦丁(0.2mg/ml,60%乙醇配制)为标准品,于510nm处测吸光度,运用线性回归方程计算其总黄酮的含量。

1.3.4 总糖和多糖的测定

采用苯酚-硫酸法测定糖含量^[5],以葡萄糖为标准品,运用线性回归方程进行计算。取浸膏状提取物2份,一份加蒸馏水溶解,用于测定总糖含量。另一份加蒸馏水溶解,再加3倍于蒸馏水体积的无水乙醇混匀,静止2h,4000r/min离心10min。沉淀物依次用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗2次,50℃水浴蒸干,置105℃烘箱内干燥12h,得恒重多糖。称取恒重多糖粉末配制最终工作液0.2mg/ml,用于测定多糖的含量。

1.4 抗氧化活性的测定

1.4.1 DPPH自由基清除活性的测定

根据Yamaguchi等人提出的DPPH自由基分析法^[6],于517nm处测吸光度。阳性对照为VC、BHT,抑制

率计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A_e/A_o) \times 100$$

式中, A_o 为未加样品的吸光度; A_e 为样品的吸光度。

1.4.2 超氧阴离子自由基 O_2^- ·活性清除能力的测定

采用氮兰四唑(NBT)还原法测定EP对超氧阴离子活性的清除能力^[7],于560nm处测吸光度,VC做阳性对照。为了消除样品对实验结果的影响,各个浓度均设置样品对照,抑制率计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - E/C) \times 100$$

式中,E为样品组的吸光度为样品对照组的吸光度; C 为未加样品的吸光度。

1.4.3 羟基自由基清除的活性测定

用2-脱氧-D-核糖法测定粗提物对羟基自由基的清除活性^[8]。于532nm处测吸光度,D-甘露醇做阳性对照。为了消除样品对实验结果的影响,各个浓度均设置样品对照,抑制率计算同1.4.2。

1.4.4 总抗氧化活性的测定

依据 β -胡萝卜素/亚油酸的自氧化体系产生的过氧化物测定总抗氧化活性^[9-10]。于470nm处测吸光度,阳性对照为VC、BHT,吸光度大表示其抗氧化活性强。

1.4.5 还原力活性测定

用Oyaizu.M等提出的还原三价铁离子法测定EP的还原能力^[11]。于700nm处测吸光度,VC、BHT做阳性对照,吸光度大表明其还原能力强。

1.4.6 脂质过氧化的测定

用 Fe^{2+} 诱导发生脂质过氧化,测定终产物丙二醛的含量评价脂质过氧化^[12]。于532nm处测吸光值,VC做阳性对照。为了消除样品对实验结果的影响,各个浓度均设置样品对照,抑制率计算同1.4.2。

1.5 统计学处理

所有试验均平行三次,数据采用Excel处理,用 $\bar{X} \pm SD$ 表示。

2 结果与分析

2.1 提取物得率

收得浸膏状提取物26.69g,得率为13.35%。另称取1.063g浸膏状EP,于105℃干燥12h,得恒重0.9614g,得浸膏中干物质含量为90.44%。

2.2 总酚类的含量

根据线性回归方程 $y = 0.06x - 0.0133$ ($R^2 = 0.948$,式中,y为浓度,x为吸光度)计算,得浸膏状EP内总多酚含量为0.33%。

2.3 总黄酮类的含量

根据线性回归方程 $y = 9.409x + 0.0064$ ($R^2 = 0.9985$,

式中, y 为吸光度, x 为浓度) 计算, 得浸膏状 EP 内总黄酮类的含量为 0.725%。

2.4 总糖的含量

用醇沉法分离多糖与单糖, 分别测定含量, 根据线性回归方程: $A=6.68x-0.0422$ ($R^2=0.9989$, 式中, A 为吸光度, x 为浓度) 计算, 得 EP 中单糖含量为 29.49%, 根据寡糖分解成单糖的换算系数 0.9, 多糖含量为 32.54%, 则总含糖量为 62.03%。

2.5 清除 DPPH 自由基的作用

表 1 VC、BHT、EP 清除 DPPH 自由基能力(n=3)

Table 1 DPPH radical-scavenging activity of VC, BHT, EP(n=3)

VC, BHT ($\mu\text{g/ml}$)	VC 抑制 率(%)	BHT 抑 制率(%)	EP (mg/ml)	EP 抑制 率(%)
10	55.31±0.61	19.59±1.65	0.4	16.09±1.55
20	88.56±0.50	36.87±0.70	0.4	29.38±1.32
30	93.39±0.37	46.43±3.12	0.6	39.13±0.48
40	95.93±0.31	52.07±3.10	0.8	49.47±1.29
50	95.24±0.19	65.29±1.37	1.0	59.53±1.21
60	95.36±1.20	71.34±1.68	1.2	68.12±0.44

有文献表明柿子的醇提取物比水提取物清除 DPPH 的能力强, 这可能与多酚类等有效成分易溶于醇类溶剂有关^[13]。由表 1 可以看出, EP 对 DPPH 自由基有很好的清除作用, 其 IC_{50} 为 0.8 mg/ml , 且有明显的剂量依赖性。但人工合成的抗氧化剂 BHT 的 IC_{50} 为 0.037 mg/ml , VC 对 DPPH 的清除能力高于 BHT 和 EP, 因此用 EP 替代 VC、BHT 时需要增加用量。不过 EP 为天然食品的提取物, 在安全性方面有明显的优势。

2.6 清除超氧阴离子自由基 $O_2^- \cdot$ 的作用

由表 2 可知, EP 能有效地清除体外产生的 $O_2^- \cdot$, IC_{50} 为 2.1 mg/ml 。虽然其清除 $O_2^- \cdot$ 的能力较 VC (其 IC_{50} 为 0.052 mg/ml) 弱, 但在同类天然提取物中, IC_{50} 能达到 2.1 mg/ml , 已经是很可贵的了, 且 EP 的稳定性比 VC 要好得多。因此, EP 在清除 $O_2^- \cdot$ 方面的作用很值得开发利用。

表 2 VC 和 EP 清除 $O_2^- \cdot$ 能力(n=3)

Table 2 Superoxide anion radical scavenging activity of VC and EP(n=3)

VC ($\mu\text{g/ml}$)	VC 抑制率(%)	EP (mg/ml)	EP 抑制率(%)
10	2.31±0.42	2.0	49.12±5.13
20	2.36±0.72	2.4	58.03±2.18
30	7.25±0.65	2.8	58.63±2.05
40	8.33±0.42	3.2	60.07±0.42
50	45.41±1.56	3.6	63.40±0.51
60	73.34±0.33	4.0	58.98±1.67

2.7 清除羟基自由基的作用

表 3 可以看出, D-甘露醇的 IC_{50} 为 2.3 mg/ml , EP 的 IC_{50} 为 4.1 mg/ml 。可见, EP 对羟基自由基有很好的清除作用。羟基自由基是已知最强的氧化剂, EP 能很好的清除羟基自由基, 说明其有良好的抗氧化作用, 同时也能说明, 柿子是一种有保健价值的水果。

表 3 EP 和 D-甘露醇对羟基自由基的清除能力(n=3)

Table 3 Scavenging effects of EP and D-mannitol on hydroxyl radical(n=3)

D-甘露醇 (mg/ml)	D-甘露醇抑 制率(%)	EP (mg/ml)	EP 抑制 率(%)
0.1	6.60±0.93	4.0	48.97±1.78
0.5	22.93±0.72	5.0	55.31±0.53
1.0	40.69±1.15	6.0	60.39±2.05
5.0	67.22±0.86	7.0	63.31±5.87
10.0	77.72±0.35	8.0	62.22±2.07

2.8 总抗氧化能力

表 4 VC、BHT 和 EP 的总抗氧化能力(n=3)

Table 4 Total antioxidant activity of VC, BHT and EP(n=3)

时间 (min)	$A_{570\text{nm}}$			
	阴性 对照	VC (0.3 mg/ml)	BHT (0.3 mg/ml)	EP (1.5 mg/ml)
0	1.389±0.012	1.277±0.021	1.407±0.031	1.458±0.026
25	0.338±0.031	1.207±0.014	1.339±0.045	1.272±0.019
50	0.133±0.016	1.118±0.041	1.364±0.044	1.127±0.009
75	0.095±0.009	0.902±0.088	1.332±0.034	1.015±0.057
100	0.069±0.002	0.754±0.066	1.245±0.016	0.912±0.054
125	0.055±0.006	0.499±0.104	1.234±0.021	0.778±0.067
150	0.049±0.005	0.222±0.107	1.164±0.011	0.644±0.069
175	0.043±0.005	0.040±0.026	1.110±0.018	0.524±0.067

β -胡萝卜素易被氧化而褪去黄色, 在反应体系中亚油酸氧化产生过氧化物使 β -胡萝卜素褪色, 当反应体系中有抗氧化剂时, 褪色速度缓慢, 且褪色程度与抗氧化活性呈负相关。由表 4 可见, EP、BHT 和 VC 均表现出强的总抗氧化活性, 且活性稳定, 其抗氧化能力的大小依次为: BHT > VC > EP。EP 的总抗氧化能力虽然略低于 VC 和 BHT, 但 EP 的稳定性较 VC 强, 安全性较 BHT 好, 综合而看, EP 有良好的抗氧化作用。

2.9 总还原力

物质的还原能力可以看作其潜在抗氧化性的重要体现^[11]。有表 5 可知, EP 具有较强的还原力, 且有较好的剂量依赖性, 表明其具有潜在的抗氧化性。

2.10 脂质过氧化抑制率

脂类在活性氧条件下产生自由基, 引发链式反应, 形成脂质过氧化。抗氧化剂可与脂质过氧化中间产物脂自由基或脂氧自由基反应, 终止链式反应, 从而抑制脂质氧化。低密度脂蛋白的氧化是动脉硬化发病机制之一, 因而清除自由基, 抗脂质过氧化是防治动脉粥样

表5 VC、BHT和EP的总还原力(n=3)
Table 5 Reducing power of VC, BHT and EP(n=3)

VC (mg/ml)	VC (A _{700nm})	BHT (mg/ml)	BHT (A _{700nm})	EP (mg/ml)	EP (A _{700nm})
0.10	0.68±0.02	0.1	0.153±0.010	5.0	0.54±0.03
0.12	0.90±0.01	0.2	0.211±0.006	6.0	0.65±0.02
0.14	1.11±0.01	0.3	0.247±0.008	7.0	0.77±0.02
0.16	1.28±0.02	0.4	0.270±0.009	8.0	0.87±0.02
0.18	1.52±0.03	0.5	0.274±0.006	9.0	1.01±0.01
0.20	1.72±0.04	0.6	0.289±0.005	10.0	1.15±0.03

硬化病理过程的重要保护措施。由表6可见,EP对脂质过氧化有较好的抑制作用,且有较好的剂量依赖性,其IC₅₀为4.2mg/ml。

表6 VC和EP的脂质过氧化抑制率(n=3)
Table 6 Inhibition of Vc and EP on peroxidation of polyunsaturated fatty acid from yolk (n=3)

VC (μg/ml)	VC 抑制率 (%)	EP (mg/ml)	EP 抑制率 (%)
10	18.15±7.985	1.0	13.04±1.881
20	28.59±4.377	2.0	23.06±3.226
30	53.02±1.906	3.0	34.14±0.984
40	67.42±0.417	3.5	38.65±1.091
50	74.53±0.659	4.0	47.51±0.342
60	82.67±0.324	4.5	53.76±0.424

3 结论

EP有较强的清除DPPH自由基的能力,能有效清除羟基自由基,对O₂·有较强的清除作用,对脂质过氧化有明显的抑制作用,有较强的总还原力和总抗氧化力,且都有较好的剂量依赖性。表明EP是一种很好的天然抗氧化剂,也能说明柿子具有很好的抗氧化作用。本实验的研究结果可为柿子在保健营养和药用方面的进一步开发利用提供参考。

参考文献:

- [1] 刘月梅,白卫东,鲁周民,等.我国柿子加工研究进展[J].西北林学院学报,2007,22(2):152-155.
- [2] 张雅利,郭辉,田忠民.柿子的药理作用研究及临床应用[J].中成药,2006,28(5):720-720.
- [3] SHELA G, GUSTAW W K, ELZBIETA B, et al. The influence of persimmon peel and persimmon pulp on the lipid metabolism and antioxidant activity of rats fed cholesterol [J]. Nutritional Biochemistry, 1998 (9): 223-227.
- [4] HONG S A, TAE I J, JOOY L, et al. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: *in vitro* and *in vivo* [J]. Nutrition Research, 2002, 22: 1265-1273.
- [5] 徐斌,董英,林琳,等.改良苯酚-硫酸法测定苦瓜多糖含量[J].食品科技,2005(7):79-82.
- [6] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity by foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62(6): 1201-1204.
- [7] LIU F, OOI V E C, CHANG S T. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts [J]. Life Science, 1997, 60(10): 763-771.
- [8] PERUMAL S, KLAUS B. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 10-19.
- [9] SOFIA C, MONICA R G, FRANCISCO R M, et al. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano chemical and functional characterization via LC-MS and *in vitro* assays [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2006, 38(1): 62-69.
- [10] NASCIMENTO M A, SILVA A K, FRANCA L C, et al. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): preliminary study of its antioxidant activity [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(12): 1387-1391.
- [11] OYAIZU M. Studies on products of browning reaction: antioxidant activity of products of browning reaction [J]. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.
- [12] ZHANG E X, YU L J, ZHOU Y L, et al. Studies on the peroxidation of polyunsaturated fatty acid from lipoprotein induced by iron and the evaluation of the anti-oxidative activity of some natural products [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1996, 28: 218-222.
- [13] 陈湘宁,王武装,武学瑞,等.柿子中不同成分与抗氧化活性关系的研究[J].食品科学,2006,27(12):100-113.