

## 柿子单宁的制备及其抗氧化活性研究

顾海峰<sup>1</sup>, 李春美<sup>1\*</sup>, 徐玉娟<sup>1,2</sup>, 张洁<sup>1</sup>, 窦宏亮<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广州 510610)

**摘要:** 利用含有 1% 盐酸的无水甲醇提取柿子果肉中的单宁, 粗提液经大孔树脂 AB-8 初步纯化后, 再经超滤膜法制得柿子单宁两级分: 高分子量单宁(High Molecular Weight Tannin, HMWT) 以及小分子量单宁(Small Molecular Weight Tannin, SMWT)。HMWT 具有良好的水溶性, 凝胶渗透色谱(GPC) 分析表明其分子量分布范围为  $1.16 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^4$ 。抗氧化试验表明: HMWT 对 2-脱氧-D-核糖、甲基紫、水杨酸体系产生的羟基自由基均具有很强的清除能力, 其最大清除率分别为 90.47%、96.46%、87.77%; HMWT 对邻苯三酚自氧化和亚油酸脂质过氧化亦有较强的抑制作用, 其最大抑制率分别为 56.57%、69.63%。在所有体系中 HMWT 抗氧化能力呈明显的剂量效应关系, 且效果均强于相同浓度的葡萄籽原花青素(OPC) 及 SMWT, 同时表明 HMWT 是柿子单宁的主要抗氧化活性组分。

**关键词:** 柿子单宁; 超滤分级; 抗氧化活性

**中图分类号:** TS201.1

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-6819(2007)5-0241-05

顾海峰, 李春美, 徐玉娟, 等. 柿子单宁的制备及其抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 241-245.

Gu Haifeng, Li Chunmei, Xu Yujuan, et al. Preparation and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(5): 241-245. (in Chinese with English abstract)

## 0 引言

自由基是在生物体内呈游离状态, 带有不配对电子的分子、原子或离子。大量研究表明, 氧自由基诱导的脂质过氧化反应与许多疾病的发生有密切关系<sup>[1]</sup>。植物多酚因具有优异的抗氧化、清除自由基等作用在预防和治疗由自由基引起的疾病如肿瘤、炎症等方面显示出独特的优越性, 现已在临床医学、化妆品等领域得到广泛应用<sup>[2,3]</sup>。柿子是中国的第五大时令水果, 具有解酒、降血压、解蛇毒、抗癌和抗病毒等多种功能<sup>[4]</sup>。研究表明, 柿子单宁是其主要的功效成分, 但迄今为止, 国内外研究者对抗氧化活性植物多酚的研究主要以葡萄籽、莲房、苹果等为材料, 对柿子单宁(Persimmon tannin, PT) 的抗氧化活性则鲜见报道。关于柿子单宁提取物的抗氧化作用, 国外仅 Ahn、Han 等对柿叶和柿核提取物进行了研究, 发现柿核和柿叶提取物具有自由基清除能力, 并能抑制细胞中脂质过氧化<sup>[5,6]</sup>。Gorinstein 等研究表明, 柿皮和柿果肉对实验小鼠具有显著的抗氧化降血脂和降胆固醇作用<sup>[7]</sup>。由于柿子单宁结构复杂、分子量大, 分离分析较为困难, 以往的研究都是以粗提物或果皮果肉直接作为试验材料, 受试材料成分复杂, 往往难以准确反映柿子单宁的抗氧化活性。因此, 本文通过提取分离得到不同级分的柿子单宁, 并系统研究了分子量大于 1 万的柿子单宁抗氧化活性, 旨在为柿子的深加工和高附加值产品开发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

柿品种为陕西木瓜瓜, 2005 年 11 月购自湖北水果市场。大孔树脂 AB-8 购自天津南开大学化工厂。

### 1.2 试剂

葡萄籽原花青素(OPC) 标准对照品: 原花青素含量  $\geq 95.0\%$ , 低聚原花青素  $\geq 60.0\%$ , 购于天津尖峰天然产物研究开发有限公司。

97% 2-脱氧-D-核糖, 购自美国 sigma 公司; 99% 亚油酸, 购自美国 Amresco 公司; 乙腈, 色谱纯, 购自美国 Fisher 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器与设备

Varian Prostar 410 高效液相色谱仪(美国 Varian 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Millipore xx 80 002 30 蠕动泵(瑞士 Millipore 公司); 聚砜中空纤维超滤组件(外压式, 外型尺寸  $\Phi 50 \sim 386$  mm, 截留分子量 1 万, 天津天方膜分离工程公司); SCR20BC 高速冷冻离心机(日本日立公司); UV-1700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); Heidolph 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); DZ-2A 真空干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 柿子单宁粗品的制备

取一定量的柿子果肉, 去皮捣碎后用 12 倍的含 1% 盐酸的无水甲醇于 90℃ 下提取 3 次, 每次 40 min, 合并提取液<sup>[8]</sup>。提取液静置过夜后抽滤, 于 45℃ 下减压浓缩, 将处理好的 AB-8 大孔树脂装入  $2.0 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$  玻璃色谱柱, 柱床体积 60 mL。浓缩液加水稀释至 12 mg/mL 以 2 mL/min 上柱, 充分吸附后先用蒸馏水淋洗至洗出液用苯酚-硫酸法检测不出糖为止, 再用 3 倍柱床体积的无水甲醇以 2 mL/min 洗脱, 将洗脱液减压浓缩, 50℃

收稿日期: 2006-07-03 修订日期: 2007-04-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270938)

作者简介: 顾海峰(1982-), 男, 浙江温岭人, 研究方向为天然产物化学。武汉 华中农业大学食品科技学院, 430070。

Email: ericwind1982@126.com

\*通讯作者: 李春美, 博士, 副教授, 研究方向为天然活性成分化学。

武汉 华中农业大学食品科技学院, 430070。

Email: lichmyl@126.com

真空干燥得到柿子单宁粗品。

#### 1.4.2 柿子单宁的超滤分级

取 3 g 柿子单宁粗品,溶于 3 L 水,过滤。在常温和 0.05 MPa 操作压力下,将柿子单宁水溶液以 10 L/h 的透过速率通过截留分子量 10000~30000(外压式)的聚砜中空纤维超滤膜,所得截留液返回料液瓶加 1 L 水重复过膜,循环 3 次,分别得到透过液和截留液。将透过液和截留液分别减压浓缩,50℃ 真空干燥,得到柿子单宁两级分:高分子量单宁(HMWT)以及小分子量单宁(SMWT),两部分得率分别为 83.6% 和 11.2%,经香草醛-盐酸法测得 HMWT 中缩合单宁含量为 90.1%,SMWT 不含缩合单宁,经 Folin-Denis 法测得其总酚含量为 87.4%。

#### 1.4.3 SMWT 和 HMWT 的高效液相色谱(HPLC)分析

Varian Prostar 410 高效液相色谱仪,液相色谱条件:色谱柱: Hypersil ODS2(4.6 mm×200 mm, 5 μm);流动相 A 液: 2% 乙酸;B 液: 乙腈。梯度洗脱程序: 0~10 min, 10% B; 10~15 min, 20% B; 15~20 min, 40% B; 20~25 min, 55% B; 25~35 min, 55% B。流速 0.8 mL/min,柱温: 30℃;样品经 0.45 μm 滤膜过滤,进样量: 10 μL;二极管阵列检测器;检测波长: 280 nm。

#### 1.4.4 凝胶渗透色谱法(GPC)测定 HMWT 相对分子量分布

Aglient 1100 高效液相色谱仪,凝胶渗透色谱条件:色谱柱: Aglient pl aquagel OH 30(7.5 mm×300 mm, 8 μm);检测器: 示差折光检测器和二极管阵列检测器联用;流动相: 水检测波长: 280 nm;柱温: 25℃;流速: 1.0 mL/min,样品浓度: 1 mg/mL,进样量: 50 μL。单分散试样标准品: 聚乙烯醇,分子量分别为: 106、194、620、1470、4120、11840、26000,绘制校正曲线。

#### 1.4.5 柿子单宁在不同体系中的抗氧化能力测定

1) 柿子单宁在 2-脱氧-D-核糖体系中清除羟基自由基的能力

参照黄文<sup>[9]</sup>的方法,在一系列 25 mL 比色管中依次加入 pH 7.4 的磷酸缓冲液 0.4 mL, 0.1 mL 不同浓度 HMWT, 1.04 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA) 0.1 mL, 1 mmol/L FeCl<sub>3</sub> 0.1 mL, 12 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mL, 60 mmol/L 2-脱氧-D-核糖 0.1 mL, 2 mmol/L 抗坏血酸 0.1 mL,加水使总体积为 1.0 mL。然后将试管置于 37℃ 的恒温水浴锅中保持 1 h,取出,迅速添加 1 mL 25% 的 HCl 及 1% 硫代巴比妥酸(TBA) 1 mL,在 100℃ 沸水中加热 15 min,取出,冷却,加入 3 mL 正丁醇萃取,然后于 532 nm 处测定吸光值,同时以 OPC 及 SMWT 为对照。

对羟基自由基的清除率按以下公式计算:

$$\eta = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

式中  $\eta$ ——2-脱氧-D-核糖体系中羟基自由基清除率,%;  $A_0$ ——不加清除剂的空白吸光度;  $A_1$ ——加入清除剂和 2-脱氧-D-核糖的吸光度;  $A_2$ ——样品在体系中吸光度(不加脱氧核糖)。

2) 柿子单宁在甲基紫体系中清除羟基自由基的能力

参考刘立明,朱兴松<sup>[10,11]</sup>等方法修改,在一系列 25 mL 比色管中分别加入 1.0 mL 2.06×10<sup>-2</sup> mmol/L 甲基紫溶液, 0.5 mL 不同浓度的样品溶液 HMWT(空白对照以同体积水代替), 1.0 mL 0.5 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液, 1.0 mL 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,用 pH 4.6 的醋酸缓冲溶液稀释到 10 mL,摇匀,放置 30 min 后,在波

长 578 nm 处测定吸光度,同时以 OPC 及 SMWT 为对照。

其对羟基自由基的清除率按以下公式计算:

$$\eta' = [(A_1' - A_2' - A_0') / (A_1' - A_0')] \times 100\%$$

式中  $\eta'$ ——甲基紫体系中羟基自由基清除率,%;  $A_1'$ ——加入一定量样品的吸光度;  $A_2'$ ——样品本身的吸光度(不加甲基紫);  $A_0'$ ——未加清除剂的体系吸光度;  $A_1'$ ——未加 Fenton 试剂及清除剂的吸光度。

3) 柿子单宁在水杨酸体系中清除羟基自由基的能力

参考 Smirnoff, 邓乾春等人的方法<sup>[12,13]</sup>,略有修改。取若干 10 mL 离心管,依次加入 1 mL 不同浓度的 HMWT, 8.0 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 0.3 mL, 20 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.25 mL, 3.0 mmol/L 的水杨酸 1 mL。将离心管于 37℃ 反应 30 min,流水冷却,各管分别加入 0.45 mL 的蒸馏水,使体系最终体积为 3.0 mL, 2000 r/min 离心 10 min,取上清液于 510 nm 下测定吸光值,同时以 OPC 及 SMWT 为对照。

其对羟基自由基的清除率按以下公式计算:

$$\eta'' = [A_0'' - (A_1'' - A_2'')] / A_0'' \times 100\%$$

式中  $\eta''$ ——水杨酸体系中羟基自由基清除率,%;  $A_0''$ ——未加清除剂的吸光值;  $A_1''$ ——加入清除剂的吸光值;  $A_2''$ ——试剂空白的吸光值。

4) 柿子单宁清除超氧阴离子自由基的能力

参照吴海涛等人的方法<sup>[14]</sup>,取 50 mmol/L, pH 8.2 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL(含有 2 mmol/L EDTA),加 0.1 mL 不同浓度的 HMWT,于 25℃ 保温 10 min,然后加入 25℃ 预温的 5 mmol/L 的邻苯三酚(10 mmol/L 的 HCl 配制) 0.2 mL,混匀后迅速加入干燥的比色皿中,在 320 nm 下每隔半分钟测定一次吸光值,以等体积 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚溶液为空白调零,对照组以等体积去离子水代替样品。作吸光度随时间变化曲线的回归方程,其斜率为邻苯三酚的自氧化速率  $V$ 。同时以 OPC 及 SMWT 为对照。

其对超氧阴离子抑制率按以下公式计算:

$$R = [(V_0 - V_1) / V_0] \times 100\%$$

式中  $R$ ——对超氧阴离子的抑制率,%;  $V_0$ ——邻苯三酚自氧化速率,1/min;  $V_1$ ——样品中邻苯三酚自氧化速率,1/min。

5) 柿子单宁抑制亚油酸脂质过氧化的能力

参考 Kishida, 孟洁等人的方法<sup>[15,16]</sup>,在 10 mL 0.2 mol/L pH=7.4 的磷酸钠缓冲液中,加入 2.5% 的亚油酸乙醇液 4.1 mL,二次蒸馏水 4.9 mL,并加入 1 mL 2.54×10<sup>-3</sup> g/L FeSO<sub>4</sub> 作催化剂形成底物溶液。加入占底物质量 0.02%, 0.06%, 0.08%, 0.10% 的 HMWT,混匀后于 40℃ 培养箱中反应 18 h,取出待测样品,迅速加入 1 mL 25% 的三氯乙酸混匀,放置,终止反应。然后加入 1 mL 0.67% 的 TBA,于沸水浴中加热 15 min。取出冷却后加入 4 mL 正丁醇,摇匀,于 8000 r/min 离心 8 min,取正丁醇液,于 532 nm 下比色测定吸光度,同时以 OPC 及 SMWT 为对照。

其对亚油酸脂质过氧化抑制率按以下公式计算:

$$R' = [OD_0 - (OD_1 - OD_2) / OD_0] \times 100\%$$

式中  $R'$ ——对亚油酸脂质过氧化抑制率,%;  $OD_0$ ——不加抗氧化剂的吸光度;  $OD_1$ ——加入抗氧化剂的吸光度;  $OD_2$ ——

样品本身在体系中的吸光度。

## 2 结果与分析

### 2.1 柿子单宁不同级分的 HPLC 分析

将 SMWT 以及 HMWT 组分在相同液相色谱条件下进行测定,从图 1、2 可以看出柿子单宁粗品通过超滤分级可以有效地分离 SMWT 以及 HMWT。从图 1 可以看出 SMWT 中各个组分得到了良好的分离,主要有 4 个峰。其中峰 1 紫外最大吸收在 271 nm 处,质谱负离子扫描得到的核质比( $m/z$ )为 169,经与标准品对照,确定其为没食子酸。峰 2、3、4 的最大吸收均在 275 nm 左右,结合定性、质谱分析确定它们主要是小分子酚酸类物质,但具体结构有待进一步研究确证。定性分析表明 HMWT 为典型的多酚类化合物,HPLC 分析呈一个较大的包峰,表明其为分子量较大的酚类聚合物。

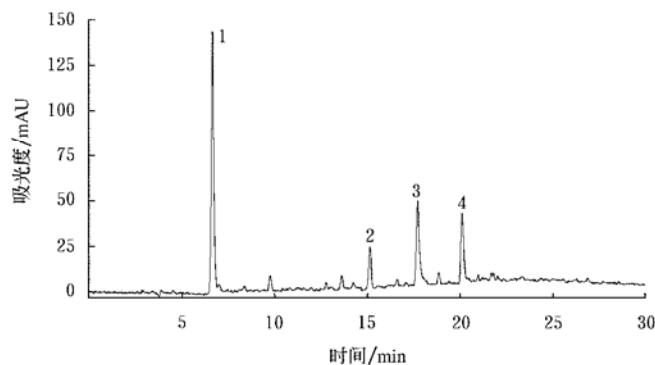


图 1 SMWT 的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of Small Molecular Weight Tannin(SMWT)

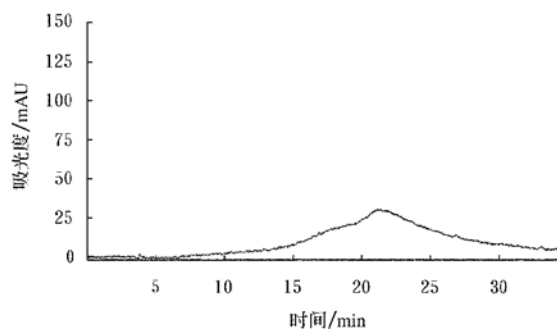


图 2 HMWT 的高效液相色谱图

Fig. 2 High performance liquid chromatogram High Molecular Weight Tannin(SMWT)

### 2.2 HMWT 的相对分子量

经纯化得到的 HMWT 呈深红褐色,粉末近乎黑色,表面带少许金属光泽。在口腔中给人以强烈的苦涩味。在水中的溶解性较强,最大溶解度为 500 mg/mL。

以不同分子量的聚乙烯醇作为标准样品进行凝胶渗透色谱(GPC)分析,得到校正曲线。GPC 结果(图 3)表明, HMWT 在保留时间 5.244 min 处出现一个主峰,利用校正曲线可以将 GPC 色谱图中的横坐标换成相对分子量坐标,而得到 HMWT 的相

对分子质量分布。结果表明其相对分子量分布在  $1.16 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^4$  之间。

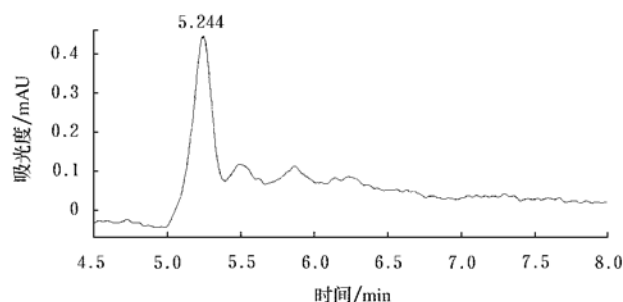


图 3 柿子高分子量单宁的凝胶渗透色谱图

Fig. 3 Gel Permeation Chromatogram(GPC) of HMWT

### 2.3 柿子单宁清除羟基自由基能力

由图 4a 可知,不同浓度的柿子单宁对 2-脱氧-D-核糖体系产生的羟基自由基均具有较强的清除作用,且在试验浓度范围内呈明显的剂量效应关系。其半数清除浓度为 80  $\mu\text{g/mL}$ ,当浓度达 150  $\mu\text{g/mL}$  时其清除率为 90.47%,而在此浓度下 OPC 及 SMWT 组分的清除率分别为 84.8%,20.72%。

从图 4b 可以看出, HMWT 在甲基紫体系中清除  $\cdot\text{OH}$  能力也呈明显的剂量效应关系,其半数清除浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$ 。当浓度增至 35  $\mu\text{g/mL}$  时清除率达 96.46%,而在此浓度下 OPC 以及 SMWT 组分的清除率分别为 86.64%,34.85%。

在水杨酸体系中(图 4c), HMWT 在低浓度时清除羟基自由基能力较低,随着浓度的增加清除能力明显增强,在 100~240  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内增长趋势较为缓慢,在 366.7  $\mu\text{g/mL}$  时达到最大值 87.77%,在此浓度下的 OPC 以及 SMWT 组分的清除率分别为 76.3%,24.39%。

### 2.4 柿子单宁对邻苯三酚自氧化的抑制作用

邻苯三酚在碱性条件下,能迅速自氧化生成一系列在 320 nm 左右处有强烈光吸收的中间产物,并同时释放出  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。试验结果表明,不同浓度的 HMWT 对邻苯三酚的自氧化都有一定的抑制作用,当 HMWT 浓度为 0.5 mg/mL 时其抑制率仅为 5.96%,但随着样品浓度的增大,其抑制率明显增强,当浓度达 5 mg/mL 时,抑制率达 56.57%。这表明在试验剂量范围内 HMWT 水溶液与邻苯三酚的自氧化速率的抑制率呈明显的量效关系。而 5 mg/mL 的 OPC 以及 SMWT 对超氧阴离子的抑制率分别为 61.4%,9.82%,结果表明 HMWT 的抑制能力略低于 OPC 但远远大于 SMWT。

### 2.5 柿子单宁抑制亚油酸脂质过氧化能力

亚油酸的氧化产物过氧化物可分解产生二级产物丙二醛,丙二醛与硫代巴比妥酸作用生成 TBA 染料,最大吸收波长为 532 nm。由吸光值的大小可判断丙二醛产生的多少,并评估各样品在催化条件下的抗氧化效果。

试验结果表明, HMWT 在  $\text{Fe}^{2+}$  催化条件下对于亚油酸脂质过氧化均有一定的抑制作用且呈明显的剂量效应关系。在底物浓度为 0.1% 时 HMWT 的抑制率达到了 66.93%,在此底物浓度下的 OPC 的抑制率为 37.33%,而 SMWT 的抑制率为 -4.39%,表现出一定的促氧化作用。

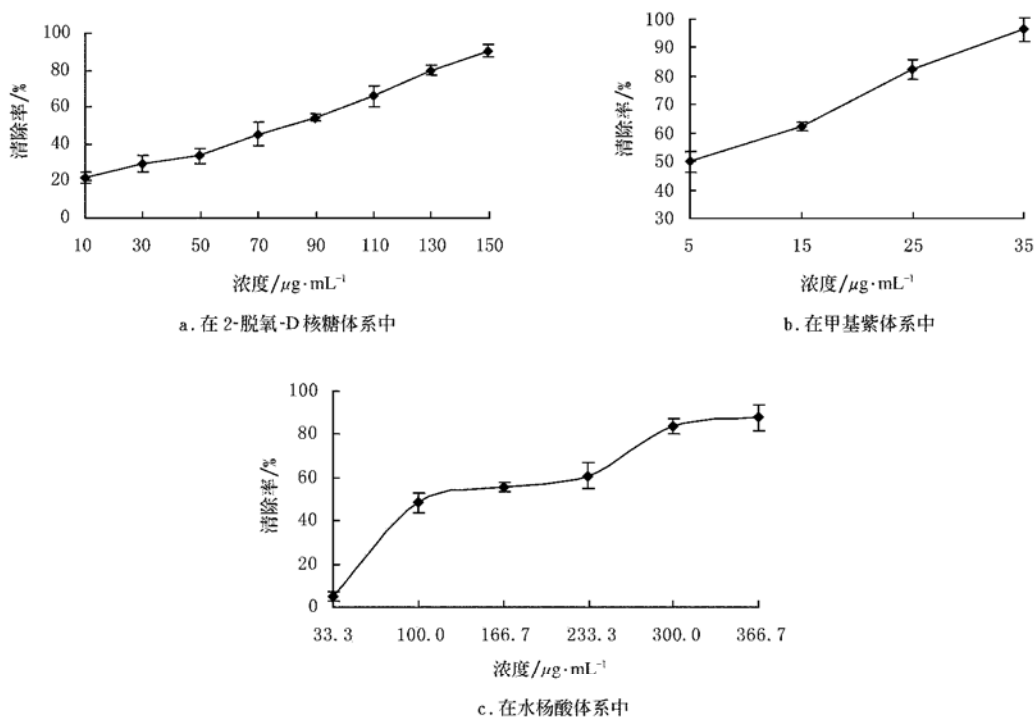


图4 不同体系中 HMWT 对羟基自由基清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of HMWT on hydroxyl radical in different systems

### 3 讨论

抗氧化功能的研究方法可以分为体内试验和体外试验两大类,其中体外试验简单、快速,应用较多。体外测定抗氧化及自由基清除能力的方法包括电子自旋捕集(ESR)技术、脱氧核糖核酸降解法、水杨酸法、化学发光法等多种。抗氧化剂在不同的体系或介质中由于作用机理不同,将显示出不同的抗氧化或促氧化作用,所以对任何一种抗氧化剂的评估都与试验体系紧密相关,单一的体系往往很难全面体现其生物学意义,需要多种体系相互补充,来研究其在不同体系的真实效应。本试验采用了多种体系对柿子单宁 HMWT 级分的抗氧化能力进行了综合评价。结果表明 HMWT 在不同抗氧化体系中对羟基自由基、超氧阴离子自由基均表现出较强的清除效果,由于柿子单宁中 HMWT 占 83.6% 且 HMWT 的清除能力均强于相同浓度下的 OPC 以及 SMWT 组分,说明 HMWT 是柿子单宁主要的抗氧化活性组分。

植物单宁的生物活性与其聚合度有关,以往对其他来源的原花青素生物活性的研究表明,当聚合度大于 3 时,原花青素的溶解度和抗氧化能力均随着聚合度的增加而降低<sup>[17]</sup>。本试验研究表明,作为一种大分子量单宁, HMWT 表现出与其他高聚合度的单宁所不同的水溶性以及抗氧化活性,这可能与其特定的空间结构密切相关,因此进一步研究 HMWT 的结构与生物活性的关系对阐明柿子单宁的生物活性机理及其高附加值产品的开发具有重要的意义。有关这方面的研究工作正在进行之中。

### 4 结论

1) 大孔树脂 AB-8 结合超滤膜法可以得到较为纯净的

HMWT,它是柿子单宁中的主体抗氧化活性成分,其相对分子量分布为  $1.16 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^4$ ,具有良好的水溶性。

2) HMWT 在不同体系中对羟基自由基、超氧阴离子自由基均具有较强的清除能力,可有效抑制亚油酸脂质过氧化,呈明显的剂量效应关系。HMWT 是柿子单宁中的主体抗氧化组分,且 HMWT 抗氧化能力在大多数体系中要优于相同浓度下的葡萄籽原花青素。

#### [参考文献]

- [1] 石 碧,狄 莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 124- 133.
- [2] 何洪英. 单宁的生理活性[J]. 饮料工业, 2001, 4(5): 19- 21.
- [3] 韩丙均,彭梨旭. 植物多酚提取技术及其开发应用现状[J]. 华南农业大学学报, 2005, 11(1): 21- 26.
- [4] Wu Paiwen, Lucy Sun Hwang. Determination of soluble persimmon tannin by high performance chromatography [J]. Food Research International, 2002, 35: 793- 800.
- [5] Hong Seok Ahn, Tae Il Jeon, Joo Yong Lee, et al. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo [J]. Nutrition Research, 2002, 22: 1265- 1273.
- [6] Han J, Kang S, Choue R. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* [J]. Fitoterapia, 2002, 73: 710- 712.
- [7] Shela Gorinstein, Gustaw W. Kulasek, Elzbieta Bartnikowska. 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.
- [8] Chavan U D, Shahidi F, Nacz M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by

- different solvents[J]. Food Chemistry, 2001, 75: 509– 512.
- [9] 黄文, 谢笔钧, 王益, 等. 白果蛋白质的分离、纯化、理化特性及其抗氧化活性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1537– 1543.
- [10] 刘立明, 刘丽虹, 宋功武, 等. 分光光度法测定 Fenton 体系中产生的羟自由基[J]. 湖北大学学报, 2002, 24(2): 326– 328.
- [11] 朱兴松. 甲基紫光度法测定 Fenton 体系中产生的羟自由基[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2003, 19(5): 592– 594.
- [12] Smirnoff N, Cumbes O J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057– 1060.
- [13] 邓乾春, 陈春艳, 潘雪梅, 等. 白果活性蛋白的酶法水解及抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(11): 155– 159.
- [14] 吴海涛, 张, 缪琪, 等. 牡蛎水提液的抗氧化特性[J]. 食品发酵工业, 2005, 31(4): 42– 45.
- [15] Kishida E, Tokumaru S, Ishitani Y, et al. Comparison of the formation of malondialdehyde and thiobarbituric acid reactive substances from autoxidized fatty acids based on oxygen consumption [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1993, 41: 1598– 1600.
- [16] 孟洁, 杭珊. 核桃仁活性成分的提取及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2001, 22(12): 44– 47.
- [17] 孙芸. 葡萄籽原花青素聚合度与功效关系的研究[D]. 江南大学, 2004.

## Preparation and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp

Gu Haifeng<sup>1</sup>, Li Chunmei<sup>1\*</sup>, Xu Yuiuan<sup>1,2</sup>, Zhana Jie<sup>1</sup>, Dou Hongliana<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Sericulture and Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** Persimmon tannin was extracted from persimmon pulp with methanol acidified with 1% HCl, then AB-8 macroporous adhesive resin and polysulfone ultrafilter membrane with molecular weight cutoff of 10000 were employed to purify and fractionate the crude extract, and two fractions: Small Molecular Weight Tannin(SMWT) and High Molecular Weight Tannin(HMWT) were obtained. The molecular weight distribution of HMWT was determined to be in the range of  $1.16 \times 10^4$  to  $1.54 \times 10^4$ . Antioxidant properties of HMWT were evaluated in 2-deoxy-D-Ribose system, methyl violet system, salicylic acid system, pyrogallol autoxidation system, and linoleic acid lipid peroxidation system. The maximum scavenging rate of HMWT on hydroxyl radical in 2-deoxy-D-Ribose, methyl violet and salicylic acid system were 90.47%, 96.46% and 87.77%, respectively; the maximum inhibiting effect of HMWT on pyrogallol autoxidation and linoleic acid lipid preoxidation were 56.57% and 69.63%, respectively. HMWT exhibited excellent antioxidant activity in all tested systems in a dose-dependent manner and the antioxidant activity of HMWT was significantly stronger than those of SMWT and grape seeds proanthocyanidins(OPC). This results suggest that HMWT is the main antioxidant in persimmon pulp.

**Key words:** persimmon tannin; ultrafiltration fraction; antioxidant activity