

# 红枣色素中活性成分含量 与抗氧化活性的相关性

邵佩兰<sup>1</sup>, 徐明<sup>2</sup>, 郭晓丹<sup>1</sup>, 李宛陶<sup>1</sup>, 周华佩<sup>1</sup>, 郑安然<sup>1</sup>

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021;

2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021)

**摘要:**为明确红枣色素抗氧化作用的物质基础,测定碱提、超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素中总多酚、花色苷和总黄酮含量,采用还原能力、 $O_2^-$ ·和 DPPH·清除能力评价其抗氧化活性,并分析色素活性成分含量与抗氧化活性之间的关系。结果表明:不同方法提取色素活性成分含量存在显著差异( $p < 0.05$ ),以碱提色素最高;不同方法提取色素均具有较强抗氧化活性,且清除  $O_2^-$ ·、DPPH·能力差异显著( $p < 0.05$ );相关性研究显示总多酚、总黄酮含量与清除  $O_2^-$ ·、DPPH·能力呈显著正相关( $p < 0.05$ ),花色苷含量与清除 DPPH·( $r = 0.874$ )能力呈明显正相关,表明多酚和黄酮可能是红枣色素抗氧化作用的主要物质基础。

**关键词:**红枣色素,活性成分,抗氧化,相关性

## Correlation between active component contents and antioxidant activity of jujube pigment

SHAO Pei-lan<sup>1</sup>, XU Ming<sup>2</sup>, GUO Xiao-dan<sup>1</sup>, LI Wan-tao<sup>1</sup>, ZHOU Hua-pei<sup>1</sup>, ZHENG An-ran<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. College of Life Science, Nanjing University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** In order to determine the material base of antioxidation effect of jujube pigment, the total polyphenols, anthocyanins and flavonoids content of the pigment respectively obtained by alkali extraction, ultrasound-assisted alkali extraction and enzyme-ultrasound assisted alkali extraction were measured. Antioxidant activities of the pigment were evaluated by three antioxidant methods, including reducing power, superoxide anion radical scavenging capacity and DPPH radical scavenging capacity, and the correlative relationships between the contents of active components and antioxidant activity in pigment were analyzed. The results showed that the contents of active components on different extraction methods had significantly difference with each other ( $p < 0.05$ ), and the contents of active components by alkali extraction were highest. The pigments extracted by different methods had good antioxidant activities, and had a significant difference on scavenging superoxide anion radical and DPPH radical ( $p < 0.05$ ). The results of correlation study showed that the correlations between the contents of total polyphenols, total flavonoids and superoxide anion radical, DPPH radical scavenging capacity were significant positive ( $p < 0.05$ ). There also was an obviously positive correlation between the contents of anthocyanins and the scavenging capacity on DPPH radical ( $r = 0.874$ ). The results indicated that polyphenols and flavonoids might be the main material base of antioxidation effect of jujube pigment.

**Key words:** jujube pigment; active component; antioxidant; correlation

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)17-0171-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.025

自由基是人体生命活动中各种生化反应的中间代谢产物,过量的自由基可导致细胞和组织器官损伤,诱发各种疾病的发生<sup>[1]</sup>,科学研究发现,植物中天然抗氧化物质可消除人体代谢过程中多余的内源性活性氧自由基,阻断自由基对体内大分子物质如

DNA 的氧化和损伤,减少心脑血管疾病的发生<sup>[2]</sup>。食用植物的天然色素大多为花青素类、黄酮类、类胡萝卜素类化合物,不仅安全可靠、色泽自然、来源丰富、且大多具有生物活性,可清除导致炎症、动脉硬化、肿瘤等多种疾病的活性氧自由基。红枣色素是从加

收稿日期: 2016-01-27

作者简介: 邵佩兰(1963-),女,大学本科,教授,研究方向:食品化学与营养、天然产物提取及应用, E-mail: nxshpl@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(31260375);宁夏大学大学生科技创新与人文社会科学研究项目(14NXG19)。

工枣汁、枣酒的废弃枣渣中提取的水溶性红色素,其色泽鲜艳,安全无毒,且具有一定的止泻、抗菌、抗癌、抗病毒等功能<sup>[3]</sup>,是一种较为理想的天然色素资源。现有研究多集中于红枣色素的提取、性质、结构的初步研究上<sup>[4-5]</sup>,而对于红枣色素抗氧化活性成分及其抗氧化能力的研究较少。本实验采用还原力及超氧阴离子、DPPH 自由基清除体系评价红枣色素的体外抗氧化活性,并探讨其与总多酚、花色苷和总黄酮含量的相关性,以期为深入研究红枣色素抗氧化活性的物质基础以及进一步的开发利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

红枣色素 宁夏灵武长枣加工枣汁的废渣,经预处理、烘干,粉碎后分别采用碱提、超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提法提取,经过滤、离心、真空冷冻干燥后制得红枣色素制品;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、芦丁标品、没食子酸标品 美国 Sigma 公司;钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、亚硝酸钠、硝酸铝、过硫酸钾、维生素 C、邻苯三酚等试剂 均为国产分析纯。

UV-2000 型紫外可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司;KQ-100DB 型数控超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司;AL204 型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;ST-02A 型多功能粉碎机 上海树立仪器仪表有限公司;101-3 型电热恒温鼓风干燥箱 上海东星建材实验设备有限公司;JDG-0.2 真空冻干实验机 兰州科近真空冻干技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 红枣色素 3 种提取方法 称取一定量粉碎枣皮粉,以料液比 1:20 (g/mL) 加入 0.4 mol/L NaOH 溶液,75 °C 提取 2 h,过滤、离心(3000 r/min,5 min)、浓缩、冷冻干燥,备用。超声辅助碱提条件为加入 0.4 mol/L NaOH 溶液于 75 °C、80 W 超声提取 30 min;酶-超声辅助碱提条件为用 1.25% 果胶酶酶解 30 min,加入 0.4 mol/L NaOH 溶液于 75 °C、80 W 超声提取 30 min。

1.2.2 总多酚含量的测定 参照文献[6],采用 Folin-Ciocalteu 法,以没食子酸为标准品,绘制标准曲线。按照标准方法做适当改动,取 3.0 g 样品,加水 60 mL,加入 1 mol/L F-C 试剂 5 mL,加入 20% 碳酸钠溶液 15 mL,混合,20 °C 放置 2 h 后,以试剂空白作参比,在 765 nm 下测定吸光度,结合标准曲线计算样品中的多酚含量。

1.2.3 花色苷含量的测定 采用 pH 示差法<sup>[7]</sup>,吸取 2 mL 样品溶液,分别用 pH1.0(0.2 mol/L KCl 缓冲液)和 pH4.5(0.2 mol/L NaAc 缓冲液)稀释至 20 mL,混匀,用 2 mL 溶剂加 18 mL 相应缓冲液作空白,分别测定样品稀释液在 510 nm 和 700 nm 处的吸光度 A。花色苷的含量(以矢车菊色素-3-葡萄糖苷计)。

花色苷含量(mg/g) = (A/εL) × MW × DF × V/Wt

式中:A 为吸光度,  $A = (A_{510 \text{ nm pH}1.0} - A_{700 \text{ nm pH}1.0}) - (A_{510 \text{ nm pH}4.5} - A_{700 \text{ nm pH}4.5})$ ;ε 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的消光系数,26900;DF 为稀释因子;MW 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量 449.2;V 为最终体积/mL;Wt 为产品质量/g;L 为光程,1 cm。

1.2.4 总黄酮含量的测定 参照文献[8],采用  $\text{NaNO}_2 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3 - \text{NaOH}$  显色法,以芦丁为标准品,绘制标准曲线,根据标准曲线计算样品中总黄酮的含量。

1.2.5 抗氧化活性的测定 还原力的测定(铁氰化钾还原法)、超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )清除能力的测定(邻苯三酚自氧化法),参考文献<sup>[9]</sup>的方法;

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中: $A_1$  表示样品吸光度; $A_2$  表示将邻苯三酚用等体积蒸馏水代替的吸光度; $A_0$  表示将样品溶液用等体积蒸馏水代替的吸光度。DPPH 自由基(DPPH·)清除能力的测定(DPPH-甲醇法),参考文献<sup>[10]</sup>的方法:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

式中: $A_1$  表示样品吸光度; $A_2$  表示将 DPPH 乙醇溶液用等体积无水乙醇代替的吸光度; $A_0$  表示将样品溶液用等体积无水乙醇溶液代替的吸光度。

1.2.6 数据分析 所有实验均为 3 次平行,实验结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS18.0 进行数据分析(显著性界值为  $p < 0.05$ ,极显著性界值为  $p < 0.01$ ),相关性分析采用相关系数法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗氧化活性成分含量

测定总多酚、总黄酮含量的线性回归方程(图 1、2)分别为  $y = 0.0012x + 0.0005$ ,  $R^2 = 0.9997$  和  $y = 0.0123x + 0.0014$ ,  $R^2 = 0.9991$ 。红枣色素中抗氧化活性成分含量(表 1)以总多酚最高,总黄酮次之,花色苷最低,且碱提、超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素的抗氧化活性成分含量间差异显著( $p < 0.05$ )。总多酚含量变异范围为 6.325~12.580 mg/g,花色苷含量变异范围为 0.022~0.160 mg/g,总黄酮含量变异范围为 0.368~3.200 mg/g,其中碱提色素中总多酚、花色苷和总黄酮含量均最高,分别为  $(12.580 \pm 0.042)$  mg/g、 $(0.160 \pm 0.02)$  mg/g 和  $(3.200 \pm 0.007)$  mg/g,显著高于超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素( $p < 0.05$ )。酶-超声辅助碱提色素中花色苷、总黄酮含量高于超声辅助碱提色素,但总多酚含量最低,且差异显著( $p < 0.05$ )。采用碱提过程中因不断搅拌使枣皮粉得以充分接触溶剂,使红枣色素的浸出更为彻底,其中的总多酚等活性成分含量也相对较高;超声辅助碱提过程中,虽然超声的机械效应、空化效应和热效应有利于有效成分溶出,但枣皮粉在一定时间后沉于底部,一定程度上影响了活性成分的浸出;酶-超声辅助碱提中因纤维素酶、果胶酶的分解作用使枣皮发生絮凝,减缓了色素的浸出,从而影响了抗氧化活性物质的浸出。

### 2.2 抗氧化活性

还原力是其抗氧化活性的重要体现,还原力越强,抗氧化活性越强;超氧阴离子自由基可引发体内

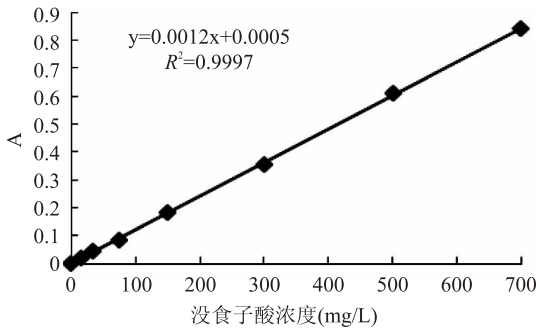


图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 The standard curve of gallic acid

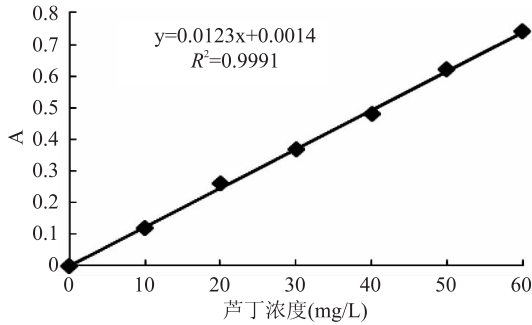


图2 芦丁标准曲线

Fig.2 The standard curve of rutin

表1 抗氧化活性物质含量比较

Table 1 Comparison of contents on the antioxidant components among the different methods

抗氧化活性物质 (mg/g)	碱提	超声辅助碱提	酶-超声辅助碱提
总多酚	12.580 ± 0.042 <sup>a</sup>	9.045 ± 0.001 <sup>b</sup>	6.325 ± 0.130 <sup>c</sup>
花色苷	0.160 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.022 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.124 ± 0.003 <sup>b</sup>
总黄酮	3.200 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.368 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.523 ± 0.001 <sup>b</sup>

注:同行字母不同表示差异显著( $p < 0.05$ )。

脂质过氧化,生成氧化性更强的羟自由基、脂质过氧化物等活性氧而加快机体衰老,并诱发多种疾病;DPPH法具有较好的稳定性,因此,常被用来评价物质的抗氧化能力。分析红枣色素的还原力、 $O_2^{\cdot-}$ 及DPPH·清除率并比较不同方法提取色素的抗氧化活性(图1~3),结果表明红枣色素具有较强的抗氧化能力,随着色素浓度的增加,其还原力和清除 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH·能力逐渐增加,且呈一定的量效关系。3种方法提取的色素具有不同的抗氧化活性,其中以碱提色素抗氧化活性最强。低浓度时色素的还原力较弱,且不同方法间差异不显著( $p > 0.05$ ),浓度超过0.3 mg/mL时,碱提、酶-超声辅助碱提色素的还原力迅速上升,但当浓度达0.5 mg/mL时,不同方法间还原力又很接近。色素对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力以碱提色素最好,其清除率明显高于超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素( $p < 0.05$ ),且碱提、超声辅助碱提色素的清除率高于同浓度下的 $V_c$ 。碱提色素对DPPH·的清除率明显高于超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素,但超声辅助碱提色素与酶-超声辅助碱提色素清

除DPPH·能力差异不显著( $p > 0.05$ )。3种方法提取色素的抗氧化活性存在差异,可能与不同方法提取色素所含总多酚、花色苷、总黄酮含量不同有关;另外,天然植物色素大多为混合物,所含活性成分十分复杂,各种抗氧化物质之间的相互关系尚没有搞清楚;加之生物体内由于自由基的种类、产生机理、产生部位以及所作用的靶点不同,不同的体外抗氧化能力测定只是针对不同自由基的清除效果。因此,判断红枣色素的抗氧化能力,应尽量选择多种抗氧化评价方法综合判断。

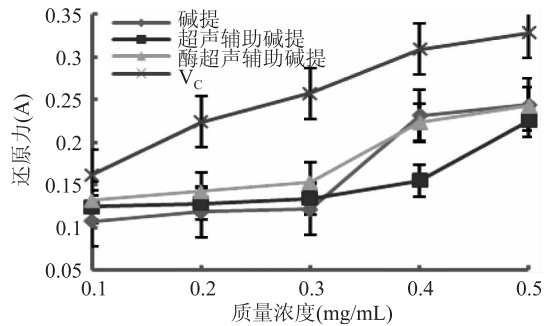


图3 红枣色素的还原力

Fig.3 Reducing power of jujube pigment

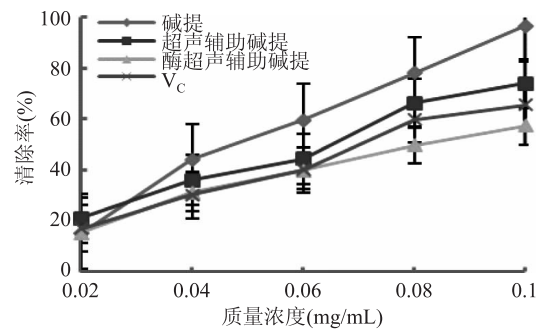


图4 红枣色素对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力

Fig.4 Superoxide anion radical Scavenging capacities of jujube pigment

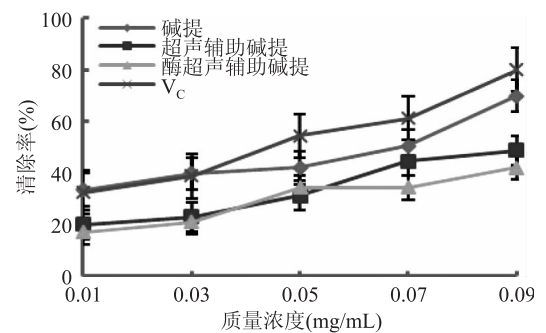


图5 红枣色素对DPPH·的清除能力

Fig.5 DPPH radical scavenging capacities of jujube pigment

### 2.3 抗氧化活性成分含量与抗氧化活性的相关性

为进一步明确红枣色素的抗氧化活性与其总多酚、花色苷和总黄酮含量之间的关系,对不同方法提取色素中总多酚、花色苷和总黄酮含量与还原力、 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH·的清除能力进行相关性分析(表2)。色素中总多酚、花色苷和总黄酮含量与不同方法测得的抗氧化活性相关性不同,总多酚含量与还原力、

$O_2^-$ ·及 DPPH·清除能力间的相关系数分别为-0.991 ( $p > 0.05$ )、0.990、0.742 ( $p < 0.05$ )；花色苷含量与还原力、 $O_2^-$ ·及 DPPH·清除能力间的相关系数分别为-0.777、0.196 ( $p > 0.05$ )、0.874 ( $p < 0.05$ )；总黄酮含量与还原力、 $O_2^-$ ·及 DPPH·清除能力间的相关系数分别为-0.146 ( $p > 0.05$ )、0.806 ( $p < 0.05$ )、0.972 ( $p < 0.01$ )。此外， $O_2^-$ ·与 DPPH·清除能力间也存在极显著相关性 ( $p < 0.01$ )，但还原力与  $O_2^-$ ·及 DPPH·清除能力间相关性不显著 ( $p > 0.05$ )。黄酮和多酚类化合物是植物抗氧化活性的主要物质基础<sup>[12]</sup>，多酚和黄酮中酚羟基结构中的邻位酚羟基很容易被氧化成醌类结构，同时对活性氧等自由基具有很强的捕捉能力<sup>[13]</sup>，这使得多酚和黄酮具有较强的抗氧化性以及清除自由基的能力，且抗氧化活性的强弱与其所含多酚和黄酮类成分含量的高低具有较高的相关性。通过研究发现，总多酚、总黄酮含量与红枣色素抗氧化活性的相关性较强，此结果与游凤等的报道一致<sup>[14-15]</sup>，花色苷含量与抗氧化活性的相关性较弱，说明多酚和黄酮是抗氧化作用的重要因子，对抗氧化活性具有重要贡献，表明多酚和黄酮可能是红枣色素抗氧化作用的主要物质基础。研究还发现不同的抗氧化体系与红枣色素中的多酚和黄酮相关性表现各异，这可能是由于红枣色素中多酚和黄酮的种类及结构不同所引起的，因此还需进一步研究和探讨红枣色素多酚和黄酮化合物的种类、化学结构及其构效关系。

表2 抗氧化活性物质含量与抗氧化活性的相关性

Table 2 Correlation between antioxidant components and antioxidant activity

相关系数	还原力	$O_2^-$ ·清除率	DPPH·清除率
总多酚	-0.991	0.990**	0.742*
花色苷	-0.777	0.196	0.874*
总黄酮	-0.146	0.806*	0.972**
还原力	1.000	-0.780	-0.607
$O_2^-$ ·清除能力		1.000	0.971**
DPPH·清除能力			1.000

注：“\*\*”表示具有显著相关性 ( $p < 0.01$ )，“\*”表示具有较强相关性 ( $p < 0.05$ )。

### 3 结论

采用碱提、超声辅助碱提和酶-超声辅助碱提3种方法提取的红枣色素活性成分含量间存在差异，碱提色素中总多酚、花色苷和总黄酮含量最高。3种方法提取色素均具有较强的抗氧化能力，且呈明显的量效关系，其中碱提色素的抗氧化活性明显高于超声辅助碱提、酶-超声辅助碱提色素。总黄酮含量与红枣

色素抗氧化活性的相关性最强，总多酚次之，花色苷最弱，表明黄酮和多酚可能是红枣色素抗氧化活性的主要物质基础，还需进一步研究和探讨红枣色素黄酮、多酚类化合物的种类、化学结构及其构效关系。

### 参考文献

- [1] Prior R L, Wu X. Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health [J]. American Journal of Biomedical Sciences, 2013, 5(2): 126-139.
- [2] 戴青原. 内脂脂肪素对氧化应激 HUVECs 的作用及其分子机制研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2014.
- [3] 向延菊, 王大伟. 利用微波技术提取红枣色素工艺研究 [J]. 保鲜与加工, 2010, 10(1): 45-47.
- [4] Zhang Q, Shen G N, Wang S Z, et al. Identification of pigments from jujube fruit skin [J]. Agricultural Science & Technology, 2010, 11(4): 110-112, 183.
- [5] 马奇虎. 枣皮红色素的提取纯化及其结构的初步鉴定 [D]. 银川: 宁夏大学, 2014.
- [6] Zhong H Y, Bedgood D R, Bishop A G, et al. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils [J]. Food chemistry, 2007, 100(4): 1544-1551.
- [7] Ronald E W, Terry E A, Eric A D, et al. Handbook of food analytical chemistry. pigments, colorants, flavors, texture and bioactive food components [M]. Wiley US, 2005: 19-24.
- [8] Kim D O, Chun O K, Kim Y J, et al. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(22): 6509-6515.
- [9] 谢丽源, 张勇, 彭卫红, 等. 桑黄胞内多糖免疫及抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2011, 32(9): 276-281.
- [10] Shukla S, Mehta A, Mehta P, et al. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of Caesalpinia bonducella F. Seed in experimental animal models [J]. Food and Chemical toxicology. 2010, 48(1): 61-64.
- [11] 夏敦岭, 任小林, 李演利, 等. 冬枣果皮红色素的紫外可见光谱分析 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(6): 144-147.
- [12] Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of Azadirachta indica, Terminalia arjuna, Acacia nilotica, and Eugenia jambolana Lam. trees [J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1106-1114.
- [13] Velioglu Y S, Mazza G, Gao L, et al. Activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and products [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 4113-4117.
- [14] 游凤. 红枣果皮功能成分提取、分离与纯化工工艺的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [15] 孙协军, 李秀霞, 冯彦博. 冬枣黄酮抗氧化活性的研究 [J]. 包装与食品机械, 2015, 33(2): 12-16.

(上接第 170 页)

Research, 1998, 306(1-2): 1-10.

[22] N Atichokudomchai, S Varavinit, P Chinachoti. A study of annealing and freeze-thaw stability of acid-modified tapioca starch by differential scanning calorimetry [J]. Starch, 2002(8): 54, 343-349.

[23] PH Hermans, A Weidinger. Quantitative X-Ray

Investigations on the Crystallinity of Cellulose Fibers: A Background Analysis [J]. Journal of Applied Physics, 1948, 19(5): 491-506.

[24] RF Tester, SJJ Debon. Annealing of starch - A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules 2000, 27(1): 1-12.