

腌制前后橄榄提取物的抗氧化和抗炎活性比较

聂稳¹, 邓广牒¹, 徐新玉¹, 胡海娥³, 李学莉³, 贺丽苹^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 华南农业大学测试中心, 广东广州 510642) (3. 东鹏饮料(集团)股份有限公司, 广东深圳 518055)

摘要: 该研究旨在研究橄榄腌制后提取物的抗氧化和抗炎活性变化。采用清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基和总还原力法评价抗氧化活性, 建立脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞模型评价抗炎活性, 利用超高效液相色谱串联飞行质谱对腌制橄榄提取物进行成分鉴定。结果显示, 鲜橄榄的水、 $\phi=70\%$ 乙醇、乙酸乙酯三种溶剂提取物的总酚含量为 70.33~126.42 mg/g, 总黄酮含量为 3.46~6.19 mg/g, 腌制后橄榄提取物总酚含量为 78.67~150.92 mg/g, 总黄酮含量为 4.09~6.65 mg/g, 且 UPLC-Q-TOF-MS/MS 从中分析鉴定出 11 种多酚化合物; 鲜橄榄提取物抗氧化能力依次为 70% 乙醇>乙酸乙酯>水, 70% 乙醇提取物清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 为 0.09 mg/mL、0.03 mg/mL, 而腌制后乙酸乙酯提取物的抗氧化能力最强, 清除 DPPH、ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 分别为 0.05 mg/mL、0.02 mg/mL; 在浓度为 0.10 mg/mL 时, 鲜橄榄提取物对 LPS 致炎模型的 NO 抑制率为 7.51%~30.47%, 而腌制橄榄不同溶剂提取物对细胞 NO 抑制率为 10.84%~34.85%。以上结果表明腌制后橄榄提取物的抗氧化和抗炎活性优于鲜橄榄, 以腌制橄榄为原料开发相关功能食品具有良好的应用潜力。

关键词: 橄榄; 腌制; 抗氧化; 抗炎

文章编号: 1673-9078(2023)01-104-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0144

Comparison on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Canarium album* L before and after Pickling

NIE Wen¹, DENG Guangdie¹, XU Xinyu¹, HU Haie³, LI Xueli³, HE Liping^{1,2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Instrumental Analysis & Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (3. Eastroc Beverage Group Co. Ltd., Shenzhen 518055, China)

Abstract: The changes in the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts from *Canarium album* L after pickling were investigated. The antioxidant activities of different extracts were evaluated by the DPPH scavenging assay, ABTS⁺ scavenging assay and total reducing power assay. The anti-inflammatory activity was evaluated through establishing a lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophage model. The compositions of the extracts from *Canarium album* L after pickling were identified by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass/mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). The results showed that the water, 70% ethanol and ethyl acetate extracts from the fresh *Canarium album* L had total phenolic contents of 70.33~126.42 mg/g and total flavonoid contents of 3.46~6.19 mg/g. After pickling, the three corresponding extracts had total phenolic contents of 78.67~150.92 mg/g and total flavonoid contents of 4.09~6.65 mg/g, with 11 polyphenolic compounds being identified by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The order of the antioxidant capacity for the extracts from fresh *Canarium album* L was 70% ethanol > ethyl acetate > water, with the IC₅₀ values of the 70% ethanol extract for scavenging DPPH and ABTS⁺ free radicals being 0.09 mg/mL and 0.03 mg/mL, respectively. After pickling, the ethyl acetate extract had the highest antioxidant capacity, with its IC₅₀ values for scavenging DPPH and ABTS⁺ free radicals being 0.05 mg/mL and 0.02 mg/mL, respectively. At the

引文格式:

聂稳, 邓广牒, 徐新玉, 等. 腌制前后橄榄提取物的抗氧化和抗炎活性比较[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 104-112

NIE Wen, DENG Guangdie, XU Xinyu, et al. Comparison on the antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Canarium album* L before and after pickling [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 104-112

收稿日期: 2022-02-14

基金项目: 广东省科技创新战略专项 (2018B030322010)

作者简介: 聂稳 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与配料, E-mail: niewengong@163.com;

通讯作者: 贺丽苹 (1965-), 女, 博士, 高级实验师, 研究方向: 食品质量与安全, 食品分析化学, E-mail: 582262409@qq.com

concentration of 0.10 mg/mL, the NO inhibitory rates in the LPS-induced inflammation model were 7.51%~30.47% for the extracts from fresh *Canarium album* L extract and 10.84%~34.85% for the extracts from pickled *Canarium album* L. The above results showed that the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extracts from pickled *Canarium album* L were higher than those of the fresh *Canarium album* L. Therefore, pickled *Canarium album* L has a potential to be used as raw materials for developing related functional food products.

Key words: *Canarium album* L; pickling; antioxidant capacity; anti-inflammatory

橄榄 (*Canarium album* L.) 又称青果, 是一种橄榄科橄榄属植物果实, 具有丰富的营养价值和保健作用, 其广泛分布在广东、福建、台湾等中国南方地区^[1]。《农书》、《本草纲目》、《日华子本草》等典籍记载橄榄具有清咽生津、治咽喉痛等功效^[2]。现代药理研究表明橄榄具有抑菌^[3]、抗氧化^[4]、抗炎^[5]、降脂^[6]等生物活性, 从中发现多酚、黄酮、三萜和苯丙素类等 40 余种生物活性成分^[7]。其中多酚是橄榄主要活性物质, 主要为没食子酸和鞣花酸^[8]。张亮亮等^[9]研究发现橄榄具有良好的抗氧化活性, 其多酚提取物对 DPPH 自由基清除率高于抗坏血酸; Zhang 等^[10]发现橄榄中的苯丙素化合物可以抑制脂多糖诱导 BV-2 神经胶质细胞炎症介质 NO 的分泌。作为药食两用水果之一, 橄榄的食用价值十分突出。然而新鲜橄榄入口苦涩, 采摘后易褐变不便储藏, 民间通常采用腌制的方式保存及食用^[11]。

腌制不仅可以延长食物保存期, 还可以提升营养价值。在腌制过程中微生物的发酵作用可以促使活性较弱的前体物质转变为活性更强的成分, 从而提高生物活性^[12,13]。研究表明, 乳酸杆菌可以通过生物转化多酚提高浆果果汁的生物活性和功能特性^[14]。Cheng 等^[15]利用干酪乳杆菌发酵蓝莓渣, 显著性提高了生物利用率和缓解肥胖诱导的炎症作用。据报道, 萝卜腌制后其抗氧化能力提高了 6%^[16], 腌制沙芥提取物缓解小鼠疼痛能力显著高于新鲜沙芥^[17]。在微生物的直接或间接作用下, 腌制可以提高很多食品的生物活性。目前研究集中在鲜橄榄化学成分的分离鉴定和活性评价, 而对腌制橄榄局限于风味研究^[18]和腌制工艺优化^[19]等方面, 民间有食用腌制橄榄的历史, 且相传咸橄榄具有一定的食疗作用, 然而腌制后橄榄的抗氧化、抗炎活性以及活性成分的变化等却鲜有文献报道, 缺乏系统深入的研究。

本文对橄榄腌制前后的总多酚、总黄酮以及没食子酸、鞣花酸等酚酸含量进行测定, 对腌制橄榄提取物中所含多酚类物质进行初步鉴定, 进一步探究了腌制前后橄榄提取物的抗氧化和抗炎活性变化并进行相关性分析, 从而阐明橄榄腌制前后活性变化的原因, 以为橄榄功能产品开发和深加工提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

橄榄, 东鹏饮料有限公司提供 (檀香橄榄, 2018 年 11 月采摘于福建潮安县); 甲醇, 色谱纯, 德国 Meker 公司; 没食子酸、鞣花酸, 纯度 $\geq 98\%$, 上海麦克林生化科技有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; RAW264.7 小鼠巨噬细胞, 中国科学院昆明细胞库; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素, 美国 Thermofisher 公司; 地塞米松 (DEX)、脂多糖 (LPS)、噻唑蓝 (MTT)、小鼠 NO 试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 其余所用试剂均为国产分析纯。

UPLC1290-6540B Q-TOF 液相色谱-质谱联用仪, 美国安捷伦公司; LC-15C 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; EnSpire 酶标仪, 德国 Perkin-Elmer 公司; ME204 电子天平, 美国梅特勒公司; RE-52AA 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; FD1 型真空冷冻干燥机, 北京博医康技术公司; KQ-500B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 橄榄样品收集及不同溶剂提取物制备

鲜橄榄按公司工艺以食盐腌制晾晒 5 个月得到咸橄榄。取鲜橄榄和同批次腌制后的咸橄榄各 1 kg 低温运送至实验室, 分离果核与果肉, 将橄榄果肉粉碎冻干过 100 目筛得到样品原料, 以水、 $\varphi=70\%$ 乙醇和乙酸乙酯分别进行提取, 料液比为 1:10 (g:mL), 超声 (500 W, 30 min) 提取 2 次, 合并提取液后浓缩, 冻干处理存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.2.2 腌制橄榄提取物分析鉴定及总多酚、总黄酮含量测定

1.2.2.1 提取物成分鉴定

色谱柱: Diamonsil C18 (250 \times 4.6 mm, 5 μm), 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积: 10 μL , 流动相: 乙腈 (A), 0.20% 甲酸水 (B), 0~5 min, 20% A; 5~15 min, 20%~50% A; 15~20 min, 50%~90% A; 20~25 min, 90% A; 25~30 min, 10% A。

质谱参数: 电喷雾离子源 (ESI), 采用负离子模式,

干燥气温度为 300 °C, 干燥气 (N₂) 流速为 9 L/min, 毛细管电压为 3 500 V, 碎裂电压为 130 V, 扫描范围(*m/z*) 为 100~1 100, 数据处理软件为安捷伦 MASS HUNTER。

1.2.2.2 没食子酸、鞣花酸含量的测定

用甲醇溶解样品配制成 1 mg/mL 的工作液, 进样前过 0.22 μm 滤膜。色谱柱: Diamonsil C18 (250×4.60 mm, 5 μm), 进样体积: 10 μL, 检测波长: 280 nm, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 °C。流动相: 0.10% 甲酸水(A), 甲醇(B), 5~10 min, 8% B~15% B; 10~15 min, 15%~20% B; 15~20 min, 20%~40% B; 20~25 min, 40%~50% B; 25~35 min, 50%~80% B; 35~45 min, 80% B; 45~50 min, 80%~8% B。

1.2.2.3 总酚和总黄酮的测定

采用福林酚法^[20]测定总酚含量, 以没食子酸作标准曲线 ($y=0.0056x+0.01$, $R^2=0.9984$), 每克干物质总多酚含量以没食子酸当量表示 (mg/g); 采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[20]测定总黄酮, 以芦丁作标准曲线 ($y=0.0005x+0.0024$, $R^2=0.9978$), 每克干物质总黄酮含量以芦丁当量表示 (mg/g)。

1.2.3 抗氧化能力评价

1.2.3.1 DPPH 自由基清除率测定

参考 Pereira 等^[21]方法。称取 11.80 mg DPPH 并用无水乙醇定容到 5 mL 容量瓶, 稀释 100 倍后得到 6×10^{-5} mol/L 的 DPPH 工作液。用甲醇将不同溶剂提取物稀释成 0.02~0.14 mg/mL 的待测样液, 移取待测样液 0.05 mL 至 96 孔板中, 加入 0.15 mL 的 DPPH 工作液并避光反应 30 min, 在 517 nm 处测定吸光值。

$$D = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D——DPPH 自由基清除率, %;

*A*₁——样品组吸光值;

*A*₀——溶剂组吸光值。

1.2.3.2 ABTS⁺自由基清除率测定

参考 Pereira 等^[21]方法。称取 38.40 mg ABTS⁺ 和 6.62 mg 过硫酸钾, 用三级水溶解后定容到 10 mL 容量瓶, 室温避光反应 12~16 h。测试前用三级水稀释 ABTS⁺ 工作液, 使其在 734 nm 波长下的吸光值为 0.70±0.02。移取 0.02~0.14 mg/mL 浓度待测液 0.05 mL 于 96 孔板中, 加入 0.15 mL ABTS⁺ 工作液后室温下避光反应 6 min, 在 734 nm 处测定吸光值。

$$B = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

B——ABTS⁺ 自由基清除率, %;

*A*₁——样品组吸光值;

*A*₀——溶剂组吸光值。

1.2.3.3 总还原能力测定

参考王俊亮等^[22]的方法, 分别移取待测样液、PBS (pH 值 6.6) 缓冲溶液、*m*=1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL 并混匀, 在 50 °C 条件下水浴 20 min, 待冷却至室温后加入 2.50 mL ρ =10% 三氯乙酸, 在 3 000 r/min 转速下离心 10 min, 移取 5 mL 上清液, 加入 5 mL 甲醇和 1 mL *m*=0.1% 三氯化铁溶液, 混匀后在 700 nm 处测定吸光值, 吸光值越大表明总还原能力越强。

1.2.4 抗炎活性评价

1.2.4.1 细胞活性

利用小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 进行实验, 培养基采用含有 10% (V/V) 胎牛血清、1% (V/V) 双抗 (100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素) 的高糖完全培养基 (DMEM), 在 37 °C 下细胞培养箱 (5% CO₂) 培养细胞, 2~3 d 进行传代。

参考李伟等^[23]的方法。用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解样品, 以完全培养基稀释成不同浓度 (25、50、100、200 μg/mL) 的样品工作液 (保持 DMSO 终浓度为 0.1%)。实验设置空白组、正常细胞对照组和不同浓度样品处理组, 取对数生长期的 RAW 264.7 细胞, 用 DMEM 培养基调整细胞浓度为每毫升 5×10^4 个, 吸取 0.20 mL 至细胞培养 96 孔板中继续孵育 24 h, 之后弃去旧培养基, 再加入 0.20 mL 样品工作液共同培养 24 h。在培养结束后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 0.02 mL, 再继续孵育 4 h, 培养结束时弃上清液, 每孔加入 0.15 mL DMSO 溶解振荡 10 min, 在 570 nm 波长处测定各孔吸光值, 按以下公式计算细胞活性。

$$C = \frac{A_1 - A_0}{A_c - A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

C——细胞活性, %;

*A*₁——样品处理组吸光值;

*A*_c——正常对照组吸光值;

*A*₀——空白组吸光值。

1.2.4.2 细胞分泌一氧化氮 (NO) 含量的测定

参考李伟等^[23]的方法。每孔加入 RAW 264.7 细胞悬液 0.20 mL (保持细胞密度为每孔 10^4 个), 在细胞培养箱孵育 24 h 后弃去旧培养基, 正常对照组加入 0.20 mL 新配制的完全培养基 DMEM, 模型组以 1 μg/mL 的 LPS 完全培养基替代。样品组加入 0.20 mL 不同浓度样品的新鲜完全培养基 (含有 1 μg/mL 的 LPS), 阳性对照组加入 0.20 mL 浓度为 0.10 mg/mL 的 DEX。待细胞培养 24 h 后, 将细胞上清液转移至新的

细胞培养板, 加入 0.05 mL GriessI 和 GriessII 试剂, 暗处避光反应 10 min, 在 540 nm 处测定吸光值。根据试剂盒说明计算 NO 含量。

1.3 数据分析

采用 Excel 进行数据分析, 实验结果以平均值±误差表示; 采用 SPSS 23 进行单因素显著性分析, $p < 0.05$ 表示具有显著性, 绘图软件为 Origin 2019b。

2 结果与讨论

2.1 腌制橄榄乙酸乙酯提取物成分分析鉴定

在预实验中发现, 腌制后橄榄的乙酸乙酯提取物中总酚含量最高。为进一步深入了解成分组成, 利用高分辨质谱对其进行了分析鉴定, 总离子流图如图 1 所示。

参考文献^[24-26]和 Chemspider、Mass bank 库比对分析, 如表 1 所示, 共鉴定出 11 种多酚化合物。这些多酚化合物共分为 4 类, 没食子酸 (Gallic Acid)、3-*O*-没食子酸酰基奎宁酸 (3-*O*-Galloylquinic Acid)、鞣花酸 (Ellagic Acid)、异柯里拉京 (Isocorilagin), 间双没食子酸 (Digallic Acid)、短叶苏木酚酸 (Brevifolincarboxylic Acid) 等 6 种酚酸; 鞣花酸 4-*O*- β -D-木糖苷 (Gallic Acid 4-*O*- β -D-Xylopyranoside) 等 1 种酚酸糖苷; 金丝桃苷 (Hyperoside) 等 1 种黄酮糖苷; 没食子酸甲酯 (Methyl Gallate)、没食子酸乙酯 (Ethyl Gallate) 和短叶苏木

酚酸甲酯 (Methyl Brevifolincarboxylate) 等 3 种酚酸酯。从表 1 可知, 出现较多质荷比为 169、125 的离子碎片, 为没食子酸的特征离子碎片^[27], 表明咸橄榄乙酸乙酯提取物中的酚类物质主要是没食子酸衍生物。多酚作为植物次级代谢产物, 由于苯环上连接羟基, 具有清除氧自由基、维持机体免疫等作用, 表现出一定的抗氧化和抗炎活性, 可作为食品添加剂用于食品生产加工中^[28]。因此, 以咸橄榄为原料开发相关功能食品具有一定的应用潜力。腌制过程中会产生亚硝酸盐从而影响人的身体健康, 但在咸橄榄的实际食用和加工中需要对咸橄榄进一步脱盐处理后, 作为饮料原料或添加辅料制作成蜜饯进行销售, 故安全低盐的咸橄榄成品开发值得进一步探究。

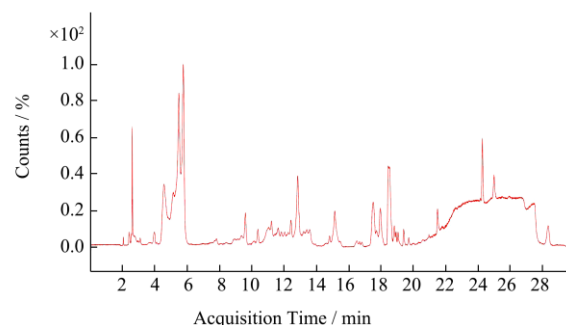


图 1 腌制橄榄乙酸乙酯提取物总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of compounds of ethyl acetate extract from *Canarium album* L. after pickling

表 1 多酚成分鉴定

Table 1 Identification of phenolic compounds

序号	保留时间/min	[M-H] ⁻ (m/z)		误差(10 ⁻⁶)	分子式	二级碎片离子 MS/MS (m/z)	化合物	参考文献
		测定值	理论值					
1	5.35	169.014 7	169.014 2	2.19	C ₇ H ₆ O ₅	125.024 4*, 81.034 8*	没食子酸	[24,25]
2	5.50	343.067 9	343.067 1	3.03	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	191.056 4*, 169.014 1*, 125.025 8*	3- <i>O</i> -没食子酰基奎宁酸	[24,25]
3	11.64	183.030 4	183.029 9	2.36	C ₈ H ₈ O ₅	168.006 6*, 124.016 6*, 78.011 5	没食子酸甲酯	[25,26]
4	12.44	633.072 8	633.073 3	-0.82	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	463.051 5, 300.999 3*, 169.014 3*	异柯里拉京	[24]
5	12.85	291.015 0	291.014 6	0.69	C ₁₃ H ₈ O ₈	247.025 0*, 219.030 0, 191.035 0*	短叶苏木酚酸	[24]
6	13.38	321.025 6	321.025 2	-0.88	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	169.014 2*, 125.024 7*, 79.019 0	间双没食子酸	[25]
7	15.09	305.030 4	305.030 3	0.29	C ₁₄ H ₁₀ O ₈	273.004 2*, 245.009 8*, 217.014 5*	短叶苏木酚酸甲酯	[26]
8	15.25	197.045 8	197.045 5	1.29	C ₉ H ₁₀ O ₅	169.014 8*, 124.016 6*, 78.011 4	没食子酸乙酯	[25,26]
9	17.52	433.041 9	433.041 2	0.35	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	300.998 8*, 243.999 8*, 132.022 1*	鞣花酸-4- <i>O</i> - β -D-木糖苷	[24]
10	17.74	463.088 4	463.088 2	0.27	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	300.026 5*, 271.024 8*	金丝桃苷	[24,25]
11	18.48	300.999 4	300.998 9	1.06	C ₁₄ H ₆ O ₈	283.996 3*, 229.014 5*, 145.029 7	鞣花酸	[24,25]

注: *表示主要的定性碎片离子。

2.2 腌制橄榄提取物中没食子酸、鞣花酸、总酚和总黄酮含量比较

采用高效液相色谱法对橄榄中没食子酸、鞣花酸进行定量分析, 结果如图 2 所示。以标准品为参照, 确定出峰时间 9.06 min、32.06 min 的组分别为没食子酸和鞣花酸。同等浓度下, 对比鲜橄榄, 腌制后乙酸

乙酯提取物中没食子酸、鞣花酸的峰响应值变高。结合表 2 可知,与鲜橄榄(没食子酸为 0.19~4.58 mg/g,鞣花酸为 4.24~24.37 mg/g)相比,腌制后咸橄榄没食子酸和鞣花酸均显著提高 ($p < 0.05$),其含量分别为 4.24~24.37 mg/g 和 1.80~70.56 mg/g。常强等^[24]对鲜橄榄中的多酚进行定性分析后发现含有没食子酸衍生物(3-*O*-没食子酰基奎宁酸)和鞣花酸衍生物(柯勒黎酸、老鹳草素衍生物)等成分,以没食子酸或鞣花酸基团缩合形成的高聚合酚,容易在弱酸性条件下水解生成鞣花酸和没食子酸^[29],有研究指出果蔬腌制过程中乳酸杆菌的代谢活动会降低溶液的 pH 值^[30],推测橄榄腌制后没食子酸和鞣花酸衍生物在腌制期间发生了水解,导致游离态没食子酸、鞣花酸含量上升。相似研究指出余甘子腌制后其没食子酸和鞣花酸的含量均显著上升,与余甘子中没食子酰基化合物与鞣花单宁类物质发生了水解有关^[31]。

根据相似相溶原理,不同极性溶剂会影响植物提取物中多酚和黄酮的含量。从表 2 可知,鲜橄榄不同溶剂提取物总酚含量高低依次为 70% 醇提取物(126.42 mg/g)、乙酸乙酯提取物(79.51 mg/g)、水提取物(70.33 mg/mL),不同溶剂间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。与 Kuo 等^[32]发现鲜橄榄中不同溶剂中总多酚的含量为 49.70~209.40 mg/g,且 50% 醇提取物提取效果最佳的研究结果相似,鲜橄榄中的多酚和黄酮与多糖结合,因此 70% 乙醇具有更好的提取效应。而腌制

后橄榄多酚的含量依次为乙酸乙酯 > 70% 乙醇 > 水,相比鲜橄榄分别提高了 89.81%、11.20%、11.86%,其中咸橄榄乙酸乙酯提取物中的总酚最高,含量为 140.58 mg/g。腌制过程中细胞膜和细胞壁的通透性增加,部分酚类物质溶出,另外腌制过程中高聚酚可能水解成没食子酸、鞣花酸等游离酚从而影响到总酚含量。胡玉霞^[33]也研究发现雪里蕻腌制三周后总酚含量上升 41%,没食子酸含量比腌制前提高 140.91%,与腌制过程中高聚合酚的水解有关,但王文华等^[34]却发现腌制后鹅绒藤中总黄酮含量下降了 24.30%,由于不同原料所含有的多酚和黄酮成分不同,以及腌制条件不同导致物质变化规律不一致。

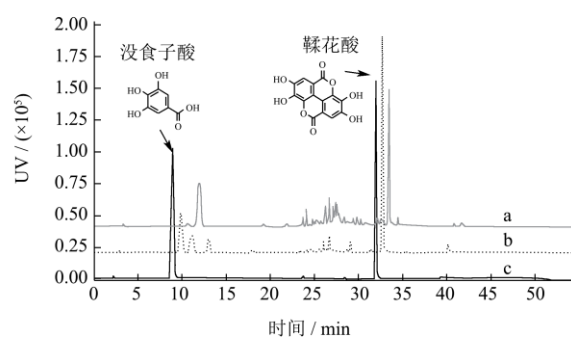


图 2 橄榄乙酸乙酯提取物 280nm 波长下高效液相色谱图
Fig.2 High performance liquid chromatography of ethyl acetate extract from *Canarium album* L. before and after pickling

注: a 鲜橄榄, b 咸橄榄, c 混合标准品。

表 2 橄榄腌制前后不同溶剂提取物的总多酚、总黄酮含量 (mg/g)

Table 2 The contents of total polyphenols, total flavonoids of different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling

提取物	鲜橄榄			咸橄榄		
	水	$\varphi=70\%$ 乙醇	乙酸乙酯	水	$\varphi=70\%$ 乙醇	乙酸乙酯
总多酚	70.33 \pm 1.44 ^e	126.42 \pm 0.42 ^c	79.51 \pm 2.09 ^d	78.67 \pm 1.10 ^d	140.58 \pm 1.91 ^b	150.92 \pm 5.42 ^a
总黄酮	3.46 \pm 0.10 ^c	6.19 \pm 0.06 ^a	4.25 \pm 0.66 ^b	4.09 \pm 0.43 ^{bc}	6.06 \pm 0.60 ^a	6.65 \pm 0.41 ^a
没食子酸	0.19 \pm 0.02 ^d	1.45 \pm 0.02 ^c	4.58 \pm 0.14 ^b	4.24 \pm 0.22 ^b	5.56 \pm 0.24 ^b	24.37 \pm 1.29 ^a
鞣花酸	1.29 \pm 0.08 ^e	10.48 \pm 0.81 ^d	54.91 \pm 1.53 ^b	1.80 \pm 0.10 ^e	16.38 \pm 1.72 ^c	70.56 \pm 2.87 ^a

注: 同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($p < 0.05$)。

2.3 腌制橄榄提取物的抗氧化能力

2.3.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除率可反映天然产物抗氧化能力^[35]。从图 3 可知, Vc 对 DPPH 自由基的清除率显著性高于样品组 ($p < 0.05$), 在 0.02~0.14 mg/mL 时, 橄榄提取物的 DPPH 自由基清除率变化呈上升趋势, 具有剂量依赖效应。研究中通常采用 IC₅₀ 评价清除能力大小, IC₅₀ 越小表明对 DPPH 自由基清除能力越强, 则抗氧化能力越强^[36]。从表 3 可知, 鲜橄榄不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基 IC₅₀ 大小依次为水

(0.12 mg/mL) > 乙酸乙酯 (0.11 mg/mL) > 70% 乙醇 (0.09 mg/mL), 变化趋势与 Kuo 等^[32]研究鲜橄榄不同溶剂提取物抗氧化效果相似。而咸橄榄乙酸乙酯提取物清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.05 mg/mL, 对 DPPH 自由基的清除能力最强。

表 3 橄榄腌制前后不同溶剂提取物对 DPPH 的 IC₅₀ 值 (mg/mL)

Table 3 The IC₅₀ value of different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling against DPPH radicals

项目	水提取物	$\varphi=70\%$ 醇提取物	乙酸乙酯提取物
鲜橄榄	0.12	0.09	0.11
咸橄榄	0.10	0.07	0.05

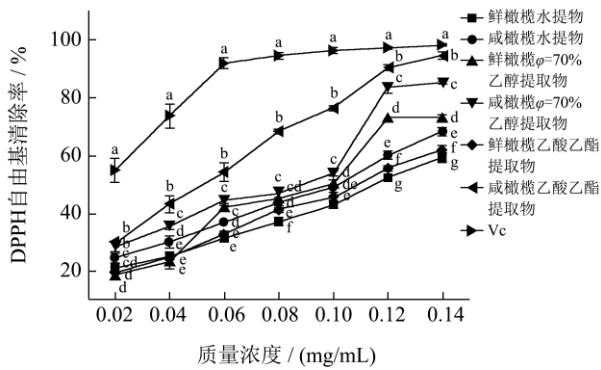


图3 橄榄样品不同提取物清除 DPPH 自由基能力

Fig.3 Scavenging effects of different solvent extracts from fresh and pickled *Canarium album* L. on DPPH radicals

注: 相同浓度下不同字母表示具有显著性差异, $p < 0.05$ 。

图4、5同。

2.3.2 ABTS⁺自由基清除能力

从图4可知,在0.06 mg/mL时,咸橄榄乙酸乙酯提取物的ABTS⁺自由基清除率为96.53%,与Vc无显著性差异($p > 0.05$)。表4中鲜橄榄提取物的ABTS⁺自由基清除能力依次为70%醇提取物($IC_{50}=0.03$ mg/mL) > 乙酸乙酯提取物($IC_{50}=0.04$ mg/mL) > 水提取物($IC_{50}=0.06$ mg/mL),而腌制后咸橄榄乙酸乙酯提取物清除ABTS⁺能力最高, IC_{50} 为0.02 mg/mL,其次是70%醇提取物(0.03 mg/mL)和水提取物(0.05 mg/mL),橄榄不同溶剂提取物对ABTS⁺清除变化趋势与DPPH基本保持一致。李婧雯等^[37]研究蒲公英根的抗氧化能力时,同样发现水、乙醇、乙酸乙酯等溶剂提取物对DPPH、ABTS⁺自由基的清除变化趋势相似。

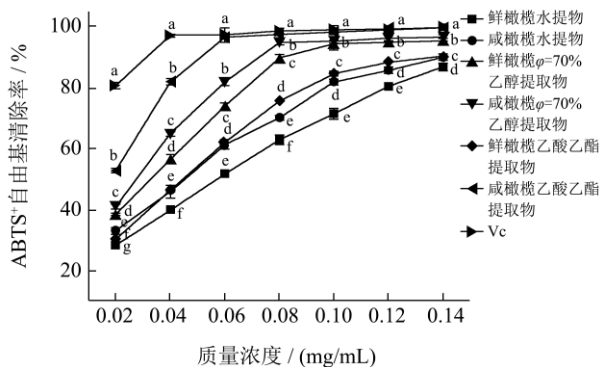


图4 橄榄样品不同提取物清除 ABTS⁺ 自由基能力

Fig.4 Scavenging effects of different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling on ABTS radicals

表4 橄榄腌制后不同提取物对ABTS⁺的IC₅₀值(mg/mL)

Table 4 The IC₅₀ value of different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling against ABTS⁺ radicals

项目	水提取物	$\varphi=70\%$ 醇提取物	乙酸乙酯提取物
鲜橄榄	0.06	0.03	0.04
咸橄榄	0.05	0.03	0.02

2.3.3 总还原能力

从图5可知,在浓度为0.02~0.14 mg/mL,橄榄提取物的总还原能力与质量浓度具有剂量依赖效应,在0.10 mg/mL时,总还原能力大小依次为咸橄榄乙酸乙酯提取物 > 咸橄榄70%乙醇提取物 > 鲜橄榄70%乙醇提取物 > 其余样品组,其余组的总还原能力差异较小($p > 0.05$)。橄榄腌制前后不同溶剂提取物总还原能力的趋势与清除ABTS⁺、DPPH能力变化趋势不一致,可能是抗氧化评价体系原理的不同导致不一样的趋势变化^[38]。

从结果可知,鲜橄榄70%醇提取物抗氧化能力优于水提取物及乙酸乙酯提取物,而腌制后咸橄榄的乙酸乙酯提取物表现出最强的抗氧化能力,其次是70%乙醇提取物和水提取物。研究表明,天然产物的抗氧化能力与多酚、黄酮含量有关^[39],梁泽明等^[40]比较三种蓝莓的抗氧化能力时,发现总酚和总黄酮含量高的大兴安岭野生蓝莓抗氧化能力优于其它蓝莓,清除DPPH、ABTS⁺能力与总多酚、总黄酮之间显著正相关($r > 0.80$, $p < 0.05$)。推测咸橄榄乙酸乙酯提取物具有最强的抗氧化能力与总酚和黄酮含量有关。

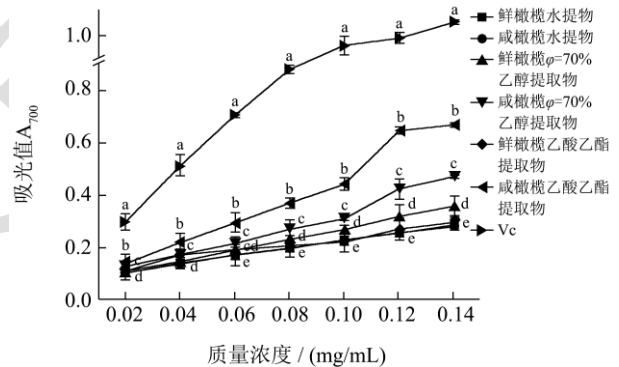


图5 橄榄腌制后不同溶剂提取物总还原能力

Fig.5 Total reducing capacity of different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling

2.4 腌制橄榄提取物的抗炎活性

2.4.1 细胞活力

MTT法是利用活细胞中线粒体可以将噻唑蓝(MTT)还原为不溶于水的蓝紫色晶体甲臞,通过DMSO溶解甲臞后测定吸光值从而评估细胞活性^[41]。本实验测定了不同浓度下腌制前后橄榄提取物对RAW 264.7细胞活性的影响,如图6所示,在0.40 mg/mL时,咸橄榄乙酸乙酯提取物的细胞存活率为88.99%,与正常细胞103.10%相比具有极显著性差异($p < 0.01$),其它浓度下细胞存活率为95.91%~107.44%。细胞存活率低于90%表明样品浓度过高,会影响细胞正常增殖^[23],故选25~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围进

行后续实验。

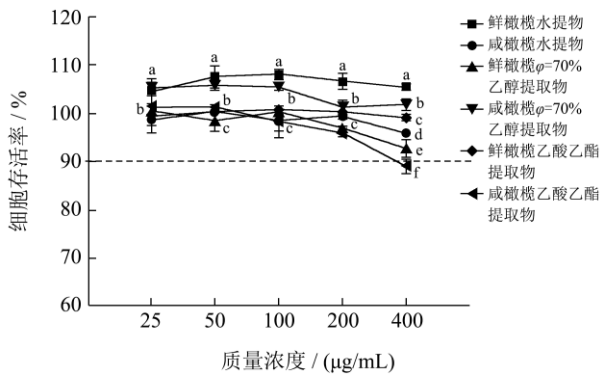


图6 橄榄腌制前后不同溶剂提取物对细胞活性的影响

Fig.6 Effect of the different solvent extracts from *Canarium album* L. before and after pickling on RAW 264.7 cells viability

2.4.2 腌制橄榄提取物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞分泌 NO 的影响

NO 是一种维持机体免疫的细胞因子，参与机体内的若干生理过程，机体发生炎症反应时会分泌大量的 NO，而过量的 NO 会导致细胞凋亡^[42]。如图 7 所示，与正常组相比，LPS 处理下细胞 NO 分泌水平显著提高 ($p < 0.01$)，含量为 $25.34 \mu\text{mol/L}$ ，表明 $1 \mu\text{g/mL}$ 的 LPS 可刺激细胞产生炎症反应。地塞米松是一种缓解炎症的类固醇类药物，含有地塞米松 (DEX) 的阳性对照组比模型组细胞 NO 分泌含量降低了 45%。与 LPS 模型组相比，橄榄提取物作用下细胞 NO 分泌量均显著降低 ($p < 0.05$)，呈现剂量依赖性。在浓度为 0.10 mg/mL 时，鲜橄榄溶剂提取物对细胞 NO 抑制率从高到低顺序为：乙酸乙酯 (30.47%) > 70% 乙醇 (23.37%) > 水 (7.51%)。Kuo 等^[43]利用 RAW264.7 细胞筛选橄榄最强抗炎组分，发现乙酸乙酯部位抗炎活性最强，与含有穗花杉黄酮等抗炎活性物质有关。腌制后橄榄提取物中，减轻细胞产生 NO 的能力依次为乙酸乙酯提取物 (34.85%) > 70% 乙醇提取物 (34.23%) > 水提取物 (10.84%)。总体而言，咸橄榄乙酸乙酯提

取物的抗炎活性表现最好，并且在高浓度 0.20 mg/mL 时，对 LPS 诱导细胞炎症反应下 NO 的抑制率接近 50%。NO 是由细胞诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 合成的，橄榄提取物可能通过抑制 iNOS 信号的活化从而减少 NO 的分泌^[44]。

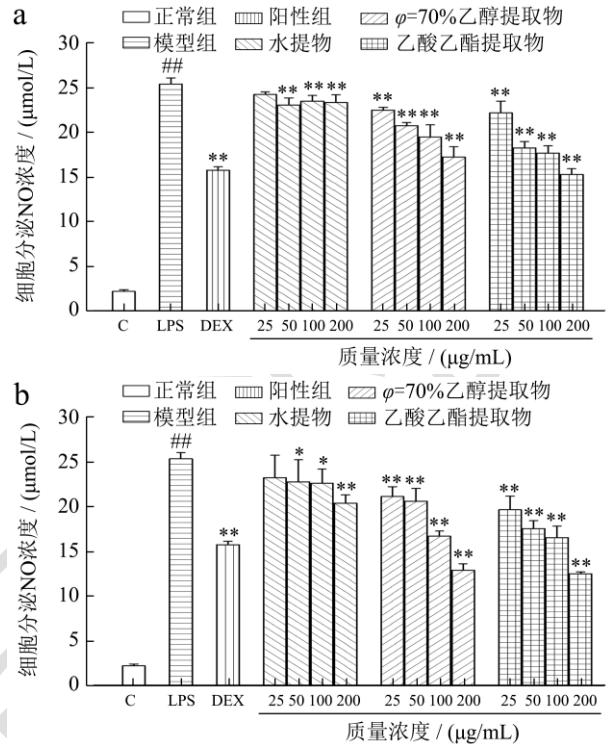


图7 橄榄不同溶剂提取物对 LPS 诱导 Raw 264.7 细胞分泌 NO 的影响

Fig.7 Effect of the different solvent extracts from *Canarium album* L. on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells

注：a 为鲜橄榄，b 为咸橄榄。模型组 VS 对照组“##”表示 $p < 0.01$ ，“#”表示 $p < 0.05$ ；样品组 VS 模型组“***”表示 $p < 0.01$ ，“**”表示 $p < 0.05$ 。

2.5 相关性分析

表5 抗氧化、抗炎活性的相关性分析

Table 5 Pearson correlation coefficients between antioxidant and anti-inflammatory capacity and component contents

	总酚	总黄酮	没食子酸	鞣花酸	DPPH 清除率	ABTS ⁺ 清除率	总还原能力	细胞 NO 抑制率
总酚	1							
总黄酮	0.88*	1						
没食子酸	0.83*	0.97**	1					
鞣花酸	0.71	0.71	0.79	1				
DPPH 清除率	0.94**	0.91*	0.87*	0.56	1			
ABTS ⁺ 清除率	0.97**	0.78	0.74	0.58	0.94*	1		
总还原能力	0.96**	0.96**	0.92*	0.70	0.96**	0.89*	1	
细胞 NO 抑制率	0.85*	0.64	0.69	0.82*	0.74	0.85*	0.77	1

注：“*”表示显著 $p < 0.05$ ；“**”表示极显著 $p < 0.01$ 。

天然产物的抗氧化和抗炎活性与多酚、黄酮具有一定的相关性^[45-47]。对橄榄腌制前后不同溶剂提取物的抗氧化和抗炎能力与总酚、总黄酮含量进行相关性分析,结果如表5所示,清除DPPH、ABTS⁺自由基、总还原能力与总酚含量显著相关(相关系数 r 分别为0.94、0.07和0.96, $p < 0.01$), DPPH清除率、总还原力与总黄酮显著相关(r 值分别为0.91和0.96, $p < 0.05$), 细胞NO抑制率与橄榄总多酚,总黄酮含量之间存在相关性(r 值分别为0.85和0.64)。另外, DPPH清除率、总还原力与没食子酸相关系数分别为0.87、0.92, 细胞NO抑制率与鞣花酸含量相关系数为0.82, 均呈现显著正相关($p < 0.05$)。表明多酚和黄酮是橄榄提取物发挥抗氧化和抗炎活性的主要物质基础,没食子酸、鞣花酸可能是其中重要活性成分,腌制前后橄榄提取物的抗氧化能力和抗炎活性的差异与其所含多酚、黄酮的含量差异有关。

3 结论

本研究比较了橄榄腌制后,提取物中多酚、黄酮、没食子酸和鞣花酸等主要酚酸含量的差异,以及抗氧化、抗炎活性的变化。结果表明,鲜橄榄70%乙醇提取物具有较高的总多酚和黄酮含量,腌制后咸橄榄水、70%乙醇、乙酸乙酯三种溶剂提取物中的总多酚和黄酮含量均高于鲜橄榄,且乙酸乙酯提取物中富含主要多酚物质没食子酸和鞣花酸,从腌制后橄榄的乙酸乙酯提取物中共鉴定出11种活性成分,其中酚酸5种,酚酸酯3种,酚酸糖苷1种,黄酮糖苷1种;鲜橄榄70%醇提取物对DPPH和ABTS⁺清除率高于其乙酸乙酯提取物、水提取物,腌制后咸橄榄乙酸乙酯提取物在所有提取中表现出最强的抗氧化能力;腌制前后橄榄乙酸乙酯提取物减轻炎症效果均优于其他溶剂提取物。腌制后橄榄乙酸乙酯提取物活性增强与多酚、黄酮含量升高有关。总体而言,腌制橄榄比鲜橄榄表现出更强的抗氧化和抗炎活性,造成的变化可能是由于橄榄腌制后组织通透性增强,游离酚和黄酮更多溶出,其次腌制后聚合酚可能水解成没食子酸和鞣花酸等与抗氧化和抗炎活性密切相关的重要活性物质。但多酚类物质在腌制过程中的具体代谢变化以及微生物的代谢关联需进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 赖瑞联,陈瑾,冯新,等.橄榄多酚类物质研究进展[J].热带作物学报,2018,39(12):2532-2541
- [2] 张福平,陈蔚辉,林建新.橄榄的营养保健价值及开发利用[J].食品研究与开发,2002,23(4):48-49
- [3] 项昭保,胡波,何从林.橄榄抑菌活性部位研究[J].食品工业科技,2013,34(12):149-152
- [4] Chang Q, Su M, Chen Q, et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of Chinese olive (*Canarium album* L.) cultivars [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(6): 1369-1377
- [5] Kuo C, Liu T, Hsu T, et al. Protection of Chinese olive fruit extract and its fractions against advanced glycation endproduct-induced oxidative stress and pro-inflammatory factors in cultured vascular endothelial and human monocytic cells [J]. Journal of Functional Foods, 2016, 27: 526-536
- [6] Yeh Y, Chiang A, Hsieh S. Chinese Olive (*Canarium album* L.) fruit extract attenuates metabolic dysfunction in diabetic rats [J]. Nutrients, 2017, 9(10): 1123-1141
- [7] 伍晓玲,项昭保.橄榄营养成分和生物活性物质研究进展[J].食品工业科技,2017,38(24):346-352
- [8] 何志勇,夏文水.橄榄果实中酚类化合物的分析研究[J].安徽农业科学,2008,36(26):11406-11407
- [9] 张亮亮,杨志伟,林益明.橄榄多酚抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2008,29(4):57-59
- [10] Zhang S, Huang Y, Li Y, et al. Anti-neuroinflammatory and antioxidant phenylpropanoids from Chinese olive [J]. Food Chemistry, 2019, 286: 421-427
- [11] 任思琪,蒋璇靓,林艺芬,等.橄榄加工技术和综合利用研究进展[J].包装与食品机械,2015,33(5):46-50
- [12] 宋明辉,桑娜,乔长晟.酿酒酵母枸杞发酵物抗氧化性能研究[J].食品研究与开发,2017,38(19):14-18
- [13] 李丹倩,梁嘉怡,钟晓晴,等.火龙果皮发酵物对脂多糖诱导RAW264.7 细胞炎症的缓解作用[J].现代食品科技,2021, 37(5):23-30
- [14] Hole A S, Rud I, Grimmer S, et al. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(25): 6369-6375
- [15] Cheng Y, Wu T, Chu X, et al. Fermented blueberry pomace with antioxidant properties improves fecal microbiota community structure and short chain fatty acids production in an *in vitro* mode [J]. LWT - Food Science and Technology, 2020, 125: 109260-109269
- [16] 余小林,林薇,徐步前.不同处理对数种果蔬抗氧化活性稳定性的影响[J].食品科学,2004,25(6):66-69
- [17] 李聪,惠琅,白斌,等.腌制沙芥提取物镇痛和镇咳活性研究[J].西北大学学报(自然科学版),2010,40(6):999-1003

- [18] 肖更生,徐芳,唐道邦,等.腌制因素对橄榄盐坯风味物质的影响[J].食品科学,2011,32(20):142-145
- [19] 周美龄.橄榄盐胚表层析出物的控制技术研究[D].福州:福建农林大学,2016
- [20] 王存堂,高增明,姜辰昊,等.黄色洋葱皮不同溶剂多酚提取物的总酚、总黄酮含量及抗氧化活性[J].食品工业科技,2019,40(20):325-328
- [21] Pereira J A, Pereira A P G, Ferreira I C F R, et al. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(22): 8425-8431
- [22] 王俊亮,肖苏尧,陈运娇,等.广林 9 号桉叶多酚抗氧化活性研究[J].食品科学,2012,33(1):20-24
- [23] 李伟,朱华伟,陈运娇,等.余甘子不同溶剂提取物抗炎活性的研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(3):418-424
- [24] 常强,苏明华,陈清西,等.基于超高效液相色谱-串联质谱的橄榄果实多酚测定及其抗氧化活性分析[J].食品科学,2017,38(24):150-158
- [25] 邢宇航,郑焯宇,薛璐,等.不同品种芒果核中多酚类化合物的鉴定及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2022,43(9):63-70
- [26] Yeh Y T, Lu T J, Lian G T, et al. Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit regulates glucose utilization by activating AMP-activated protein kinase [J]. The FASEB Journal, 2020, 34(6): 7866-7884
- [27] He Z, Xia W. Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS [J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1307-1311
- [28] Sobhani M, Farzaei M H, Kiani S, et al. Immunomodulatory; anti-inflammatory/antioxidant effects of polyphenols: a comparative review on the parental compounds and their metabolites [J]. Food Reviews International, 2021, 37(8): 759-811
- [29] Cheng H S, Ton S H, Abdul Kadir K. Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects [J]. Phytochemistry Reviews, 2017, 16(1): 159-193
- [30] Xiao Y, Xiong T, Peng Z, et al. Correlation between microbiota and flavours in fermentation of Chinese Sichuan paocai [J]. Food Research International, 2018, 114: 123-132
- [31] 李琦,孙朋,李静,等.盐炙对广西余甘子中没食子酸、鞣花酸和表儿茶素含量的影响[J].时珍国医国药,2019,30(9):2155-2158
- [32] Kuo C, Liu T, Hsu T, et al. Antioxidant and antiglycation properties of different solvent extracts from Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015, 8(12): 1013-1021
- [33] 胡玉霞.雪里蕻腌渍过程中理化成分及其抗氧化性变化研究[D].杭州:浙江大学,2007
- [34] 王文华,丁娜,汪荷澄.腌制对鹅绒藤中活性成分含量的影响[J].中国酿造,2015,34(4):137-140
- [35] Floegel A, Kim D, Chung S, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(7): 1043-1048
- [36] 田强,赵琳,罗毅冲,等.厚朴籽不同溶剂提取物抗氧化活性比较分析[J].食品工业科技,2019,40(18):54-58
- [37] 李婧雯,包怡红.不同溶剂的蒲公英根提取物的抗氧化活性及降糖能力比较分析[J].现代食品科技,2020,36(5):64-72
- [38] 张勇,黄思涵,林大都,等.福建观音座莲叶提取物不同萃取部位成分含量及与抗氧化相关性分析[J].食品工业科技,2021,42(14):49-54
- [39] Wei S, Derito C M, Liu M K, et al. Cellular antioxidant activity of common vegetables [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(11): 6621-6629
- [40] 梁泽明,陈春,伍惠仪,等.三种蓝莓抗氧化及抗 Hep G2 细胞增殖活性的比较分析[J].现代食品科技,2019,35(6):48-55
- [41] 文祎,王振,蔡淑娴,等.铁观音茶提取物对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症反应的抑制作用及机制[J].食品工业科技,2018,39(17):294-299
- [42] Guo C, Yang L, Luo J, et al. Sophoraflavanone G from sophora alopecuroides inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells by targeting PI3K/Akt, JAK/STAT and Nrf2/HO-1 pathways [J]. International Immunopharmacology, 2016, 38: 349-356
- [43] Kuo Y, Yeh Y, Pan S, et al. Identification and structural elucidation of anti-inflammatory compounds from Chinese olive (*Canarium Album* L.) fruit extracts [J]. Foods, 2019, 8(10): 441-455
- [44] Hsieh S, Hsieh W, Chiang A, et al. The methanol-ethyl acetate partitioned fraction from Chinese olive fruits inhibits cancer cell proliferation and tumor growth by promoting apoptosis through the suppression of the NF- κ B signaling pathway [J]. Food & Function, 2016, 7(12): 4483-4797
- [45] 任曼妮,高增明,王存堂.不同溶剂提取对洋葱皮中多酚含量及抗氧化活性的影响[J].食品与发酵工业,2019,45(17):189-193
- [46] 郭瑞,李焱,王萍.三种龙葵果提取物的体外抗氧化及抗炎活性评价[J].现代食品科技,2020,36(2):94-101
- [47] Li W, Zhang X, Chen R, et al. HPLC fingerprint analysis of *Phyllanthus emblica* ethanol extract and their antioxidant and anti-inflammatory properties [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 254: 112740-112755

现代食品科技