

桑葚、甘蔗糖蜜多酚的成分鉴定 及其复配物的抗氧化活性

潘振辉¹, 董宇豪², 陈显伟², 刘禹志¹, 陈春², 李生花¹, 黄强², 扶雄^{2*}

(1. 广州酒家集团利口福食品有限公司, 广东广州 511442)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为探索酚类提取物及其复配物的协同增效作用, 以桑葚和甘蔗糖蜜多酚作为研究对象, 分别测定其总酚、黄酮含量及酚类组成, 基于单一提取物的总酚含量按一定配比制得复配物, 评价抗氧化活性。结果表明, 桑葚游离多酚(MFP)占桑葚总酚含量的90.3%, 为677.62 mg 没食子酸当量(Gallic Acid Equivalent, GAE)/100 g, 黄酮含量为736.65 mg 芦丁当量(Rutin Equivalent, RE)/100 g, 共检测出原儿茶酸、3,4-二羟基苯丙酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、矢车菊素3-O-葡萄糖苷和芦丁8种多酚物质, 其中矢车菊素3-O-葡萄糖苷含量占92.6%。甘蔗糖蜜多酚(SMP)总酚含量为339.69 mg GAE/100 g, 总黄酮含量为314.61 mg RE/100 g, 主要单体包括没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、芦丁和表儿茶素9种多酚物质。在0~10 mg/mL的浓度范围内SMP、MFP及其复配物具有良好的抗氧化活性且呈现量效关系。同时, 两种复配物的抗氧化活性优于SMP和MFP, 其中中效原理计算复配物DPPH自由基清除能力的0.25 IC₅₀、0.5 IC₅₀、0.75 IC₅₀、1 IC₅₀、1.25 IC₅₀、1.5 IC₅₀的联合作用指数CI分别为0.73、0.85、0.94、0.91、0.89和0.90, 均小于1, 表明桑葚和甘蔗糖蜜多酚复配物具有协同抗氧化作用。

关键词: 桑葚多酚; 甘蔗糖蜜多酚; 成分鉴定; 联合抗氧化

文章编号: 1673-9078(2023)07-246-254

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0891

Composition Analysis of Mulberry Polyphenols and Sugarcane Molasses Polyphenols and the Antioxidant Activity of Their Mixture

PAN Zhenhui¹, DONG Yuhao², CHEN Xianwei², LIU Yuzhi¹, CHEN Chun², LI Shenghua¹, HUANG Qiang², FU Xiong^{2*}

(1. Guangzhou Restaurant Group Likofu Food Co. Ltd., Guangzhou 511442, China)

(2. College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To investigate the synergism of polyphenol extracts and their mixtures, the total phenolic content, total flavonoid content, and phenol composition of mulberry and sugarcane molasses polyphenols were determined. Additionally, the antioxidant activity of their mixture, which was formulated based on the total phenolic content of each extract, was assessed. Mulberry free polyphenols (MFP) were found to account for 90.3% of the total phenolic content of mulberry molasses (at 677.62 mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g), and their total flavonoid content was 736.65 mg rutin equivalent (RE)/100 g. Eight polyphenols were detected, including protocatechuic acid, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, cyanidin 3-glucoside, and rutin. Cyanidin 3-glucoside accounted for 92.6% of the total phenolic content. Sugarcane molasses polyphenols (SMP) had a total phenolic content of 339.69 mg GAE/100 g and total flavonoid content of 314.61 mg RE/100 g. Their polyphenol monomers included gallic acid, protocatechuic

引文格式:

潘振辉,董宇豪,陈显伟,等.桑葚、甘蔗糖蜜多酚的成分鉴定及其复配物的抗氧化活性[J].现代食品科技,2023,39(7):246-254.

PAN Zhenhui, DONG Yuhao, CHEN Xianwei, et al. Composition analysis of mulberry polyphenols and sugarcane molasses polyphenols and the antioxidant activity of their mixture [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 246-254.

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 华南理工大学-广州酒家产学研合作项目(31-C-2020-027)

作者简介: 潘振辉(1976-),男,本科,高级工程师,研究方向:食品研发, E-mail: sof100@163.com

通讯作者: 扶雄(1971-),男,博士,教授,研究方向:功能碳水化合物, E-mail: lfxfu@scut.edu.cn

acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, and epicatechin. At concentrations of 0~10 mg/mL, SMP, MFP, and their mixtures showed excellent antioxidant activities, with clear dose-response relationships. Further, the SMP+MFP mixture had higher antioxidant activities than either SMP or MFP alone. Furthermore, the combination index (CI) values calculated using the median-effect principle for 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5 of the IC₅₀ concentrations (for DPPH radical scavenging activity) of the mixture were 0.73, 0.85, 0.94, 0.91, 0.89, and 0.90, respectively. Notably, all CI values were less than 1; therefore, SMP+MFP mixtures exhibited synergism in antioxidant activity.

Key words: mulberry polyphenols; sugarcane molasses polyphenols; composition identification; synergistic antioxidation

桑葚, 又叫桑葚子、桑果、桑枣等, 属于桑葚科桑葚属, 广泛分布于亚洲、欧洲、北美、南美和非洲。成熟桑葚果实具有较优的口感及丰富的营养物质, 如脂肪酸、氨基酸、维生素及微量元素等, 多种生物活性物质如多酚、多糖, 因较高的营养价值及保健功能被广泛研究^[1]。作为药食同源的物质, 桑葚果实在民间医学中已被使用了数千年, 用于治疗糖尿病、高血压、肝损伤和肾损伤等疾病^[2]。

糖蜜是一种深棕色、半流动的粘稠液体, 作为制糖产业的主要副产物之一, 占甘蔗原料总产量的2%~4%^[3]。除糖类、蛋白质等基本营养物质外, 糖蜜中含有丰富的天然活性多酚、矿物质、维生素及色素等, 具有较高的应用价值。

大量研究表明桑葚中的多酚类化合物具有抗癌、抗氧化、抗疲劳、降血糖等多种生理功效^[4]。目前, 对于不同品种桑葚多酚的含量、组成及其生物活性已有不少的研究, 但由于其生产成本较高, 无法大量生产及广泛应用; 甘蔗糖蜜作为制糖工业的副产物, 除50%的糖类组成外, 含有大量的活性多酚类物质^[5], 有效利用了工业副产物, 生产成本低, 但目前对于甘蔗糖蜜提取物的研究尚且不多, 且主要集中于提取工艺的优化, 对于其成分鉴定及生物活性的研究较少。当物质间联合呈现协同作用时, 可在较低的剂量下有效提高单个成分的活性, 降低生产成本的同时提高利用价值, 目前对于桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚的联合使用是否具有协同作用尚未有报道。

因此, 本章以桑葚和甘蔗糖蜜为原料, 分别提取两者中的酚类物质, 对其中的总酚含量、黄酮含量和酚类组分进行定量和定性分析; 联合 ORAC 氧自由基吸收能力、DPPH·清除能力、ABTS⁺清除能力综合分析两种多酚及其复配物的抗氧化活性, 并根据复配物的联合指数探究二者之间的协同增效作用, 从而为多酚的联合使用在抗氧化方面的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑葚鲜果购买于四川攀西农果蔬直供店(四川凉山彝族自治州德昌县), 使用时挑选成熟度与大小一致、饱满无虫害的样品; 甘蔗糖蜜来源于珠海中美普莱健康科技有限公司。

D101 大孔树脂, 广东东鸿公司; 福林酚、荧光素钠、2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH), 上海麦克林公司; 水溶性维生素 E (Trolox), 美国 Sigma 公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS), 上海源叶公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

DL-5C 高速离心机, 上海安亭科学仪器公司; Digital 高速匀浆机, 上海欧河机械有限公司; Hei-VAP 旋转蒸发仪, 德国 Heidolph 公司; ZQTY-70 恒温培养箱, 上海知楚仪器有限公司; XW-50A 旋涡振荡仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 多功能酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 1260 Infinity II 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 374-90906C 荧光化学分析仪, 上海赛默飞世尔科技有限公司; FE20 PLUS pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; KQ-300DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酚类物质的提取

1.3.1.1 桑葚游离酚的提取

桑葚清洗晾干, 提取出霉变、损伤、不饱满的桑葚, 准确称量 50 g 的桑葚, 按 1:10 (m/V) 的比例加入事先预冷的 $\varphi=80\%$ 丙酮, 用高速匀浆机均质研磨 3~5 min, 在 1 006 g, 5 min 的条件下离心, 收集上清液以待备用, 滤渣继续加入丙酮均质研磨, 重复操作 5~6 次左右直到上清液澄清为止。收集上清液, 45 °C 真空旋转浓缩除去丙酮, 最后所得样品用超纯水定容至 50 mL, 储存于 -40 °C 冰箱备用。所有样品重复提取三次^[6]。

1.3.1.2 桑葚结合酚的提取

收集桑葚游离酚提取后的残渣, 加入 25 mL

4 mol/L NaOH 溶液在室温下震荡混合 2 h, 震荡结束后用 HCl 调 pH 值至 1~2, 用乙酸乙酯萃取 3 次左右直至溶液变得澄清, 合并萃取液 45 °C 真空旋转浓缩除去乙酸乙酯, 超纯水溶解并定容至 50 mL, 储存于 -40 °C 冰箱备用。所有样品重复提取三次。

1.3.1.3 甘蔗糖蜜多酚提取

参考孔繁晟^[7]的方法并进行适当的修改进行甘蔗糖蜜多酚的提取。首先将大孔树脂经 95%乙醇 (V/V)、 $\varphi=5\%$ HCl (m/V) 及 4% NaOH (m/V) 进行预处理, 随后称取 50 g 甘蔗糖蜜, 加入 200 mL 蒸馏水稀释, 用 HCl 将 pH 值调至 4~5, 加入两倍糖蜜重量的树脂, 在恒温震荡箱里 37 °C 震荡吸附 12 h, 过滤得到树脂, 树脂经过超纯水洗涤三遍, 除去树脂表面粘附的糖浆后, 加入 250 mL $\varphi=80\%$ 乙醇, 继续在恒温震荡箱里震荡 12 h 进行解析, 之后过滤收集解析液, 解析液在 45 °C 真空旋转浓缩除去乙醇和大部分水, 超纯水溶解并定容至 50 mL, 储存于 -40 °C 冰箱备用。所有样品重复提取三次。

1.3.2 总酚含量测定

采用福林酚法^[8]测定桑葚和甘蔗糖蜜多酚提取物中总酚含量。以没食子酸作为标准溶液, 测定 760 nm 波长下样品反应液的吸光度。通过没食子酸标准曲线计算得到样品中总酚含量, 并表示为毫克没食子酸当量 (Gallic Acid Equivalents, GAE) 每百克样品, 即 mg GAE/100 g。

1.3.3 总黄酮含量测定

参考 Dewanto 等^[9]的方法测定桑葚和甘蔗糖蜜多酚提取物中总黄酮含量。以芦丁作为标准溶液, 测定 510 nm 波长下样品反应液的吸光度。通过芦丁的标准曲线计算得到样品中的总黄酮含量, 并表示为毫克芦丁当量 (Rutin Equivalents, RE) 每百克样品, 即 mg RE/100 g。

1.3.4 高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测定多酚组成与含量

表 1 HPLC 洗脱程序

Table 1 Gradient program of HPLC

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
5	92	8
10	85	15
25	65	35
30	50	50
31	0	100
36	95	5
50	95	5

采用安捷伦 1260 色谱仪结合二极管阵列检测器

(HPLC-DAD), 用自动进样器对样品进行色谱分离。色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (4.6×250 mm, 5 μm), 进样量为 10 μL , 柱温为 35 °C, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为乙腈, 流速为 0.8 mL/min, 洗脱程序见表 1。所有标准品用 HPLC 级甲醇溶解, 样品经 0.22 μm 滤膜过滤后分析。吸光度设定在 254、280、325 和 520 nm, 测定结果表示为每 100 g 样品中所含物质的含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$)。所有样品重复三次^[10]。

1.3.5 抗氧化活性测定

1.3.5.1 ORAC 氧自由基吸收能力测定

将待测样品稀释到合适浓度, 分别取 20 μL 不同浓度的样品或 Trolox 标准溶液加到 96 孔黑板中, 空白组加入 20 μL 磷酸盐缓冲液, 再在各孔中加入 200 μL 荧光素钠溶液, 混匀, 37 °C 避光孵育 20 min, 孵育结束后, 迅速加入 AAPH 溶液 20 μL , 混匀后在 485 nm 激发波长和 538 nm 发射波长, 37 °C 的条件下, 每 3 min 自动检测一次, 共检测 35 次。所有样品重复三次。以 Trolox 制作标准曲线 ($y=0.6627x+4.5377$, $R^2=0.9998$) 根据荧光曲线面积 (Area Under the Curve, AUC) 计算样品 ORAC 值, 计算公式见公式 (1), 结果表示为每 100 g 样品的 μmol Trolox 当量 (Trolox Equivalent, TE), 即 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ ^[11]。

$$AUC = AUC_{\text{样品}} - AUC_{\text{空白}} \quad (1)$$

式中:

AUC ——计算为样品或标品荧光衰退曲线的曲线下面积与空白对照荧光衰退曲线的曲线下面积的差值。

$AUC_{\text{样品}}$ ——样品或标品荧光衰退曲线的曲线下面积;

$AUC_{\text{空白}}$ ——空白对照荧光衰退曲线的曲线下面积。

1.3.5.2 DPPH 自由基清除能力测定

将样品用蒸馏水稀释至合适梯度, 用无水乙醇配置 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液, 将不同浓度梯度的样品溶液和 DPPH 溶液等体积混合, 漩涡震荡混溶后避光放置 30 min, 在 517 nm 波长处测量吸光度, 以 Trolox 作为阳性对照, 重复实验三次, 计算公式如下^[12]:

$$C = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

C ——DPPH·清除率, %;

A_1 ——样品组的吸光值;

A_2 ——样品+乙醇组的吸光值;

A_3 ——DPPH+乙醇组的吸光值;

A_4 ——水+乙醇组的吸光值。

实验结果用 IC_{50} 表示, 即 DPPH 清除率为 50% 时

样品的浓度。

1.3.5.3 ABTS⁺自由基清除能力测定

将 5 mL 的 ABTS 溶液 (7 mmol/L) 和 0.088 mL 过硫酸钾溶液 (0.14 mmol/L) 混匀, 室温下避光放置 12~16 h 形成 ABTS⁺ 自由基储备液, 用水稀释使其在 734 nm 处的吸光值为 0.7±0.2, ABTS 溶液现配现用。将 1 mL ABTS 溶液和 0.2 mL 不同浓度梯度的样品溶液或 Trolox 标准溶液旋涡震荡混合, 室温下避光放置 30 min, 用多功能酶标仪在 734 nm 处测量吸光值, 以 Trolox 作为阳性对照, 重复实验三次, 计算公式同(2), 实验结果用 IC₅₀ 表示^[13]。

1.3.6 联合抗氧化活性测定

1.3.6.1 联合指数计算

为评价桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚相互作用的效应, 采用 Chou 和 Talady^[14] 在 1983 年提出的联合指数 (Combination Index, CI) 确定两种多酚提取物相互作用是产生协同效果还是拮抗效果。CI 值的计算见公式 (3)。

$$CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}} \quad (3)$$

式中:

CI——联合指数。CI<1 表示两种药物具有协同作用, CI=1 表示具有加和作用, CI>1 表示具有拮抗作用;

D₁ 和 D₂——两种药物联合作用抑制率为 X% 时各自的单药浓度;

D_{x1} 和 D_{x2}——药物 1 和药物 2 单独使用抑制率为 X% 时的浓度;

X——一般取 50。

1.3.6.2 桑葚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合对 ORAC 氧自由基清除作用

根据实验 ORAC 氧自由基吸收能力测定的结果, 在 Trolox 标准曲线范围内, 两种多酚提取物设置四种由低到高的梯度浓度, 将同等级浓度的两种提取物等体积混合使用。

1.3.6.3 桑葚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合对 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除作用

根据桑葚或者甘蔗糖蜜多酚提取物的 DPPH 或 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 值, 配备各提取物 0.25 IC₅₀、0.5 IC₅₀、0.75 IC₅₀、1 IC₅₀、1.25 IC₅₀、1.5 IC₅₀ 的梯度浓度 (表示为相应 IC₅₀ 的倍数浓度), 将相同 IC₅₀ 倍数的两种提取物等体积混合使用。

1.3.7 数据分析

所有结果用“平均值±标准差”的形式表示, 所有实验重复三次。Origin 9.1 进行图表绘制, compuSyn 软件计算 CI 值, SPSS 25 进行数据分析及差异显著性评

价 (P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 酚类提取物的化学组成及成分分析

2.1.1 总多酚含量

桑葚游离多酚 (MFP)、桑葚结合多酚 (MBP) 和甘蔗糖蜜多酚 (SMP) 的总多酚含量如图 1 所示。三种多酚提取物中多酚含量从高到低分别是桑葚游离多酚、甘蔗糖蜜多酚、桑葚结合多酚, 各提取物中桑葚含量存在较大差异 (P<0.05)。桑葚多酚中游离酚含量达到 677.62 mg GAE/100 g, 结合酚的含量为 73.22 mg GAE/100 g。桑葚游离酚的含量明显高于结合酚含量, 占桑葚总多酚含量的 90.25% (m/m), 表明桑葚中的多酚主要以游离形式存在, 这一结果与游庭活^[15] 的研究一致, 但该实验测得游离酚和结合酚的含量低于上述研究中报道的含量值, 这可能与桑葚的品种、生长环境和多酚提取方法等因素有关。甘蔗糖蜜中多酚含量为 339.69 mg GAE/100 g, 约为桑葚游离多酚的一半, 低于 Desco^[16] 通过乙醇分流的方法从甘蔗糖蜜中提取多酚含量 (1 740 mg GAE/100 g), 说明提取方法以及甘蔗糖蜜的来源不同可能影响甘蔗糖蜜总酚的含量。

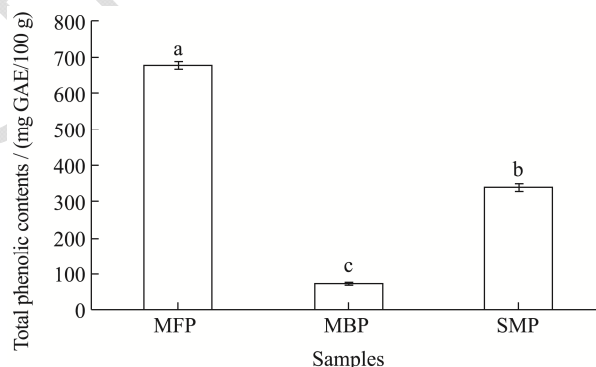


图 1 桑葚中游离酚 (MFP)、结合酚 (MBP) 和甘蔗糖蜜多酚 (SMP) 中的总多酚含量

Fig.1 The total polyphenol contents of mulberry free polyphenol (MFP), mulberry bound polyphenol (MBP) and cane molasses polyphenol (SMP)

注: 图中不同字母表示具有显著性差异。下同。

2.1.2 总黄酮含量

由图 2 所知, 三种提取物中的总黄酮含量具有显著性差异 (P<0.05), 其含量高低顺序为桑葚游离多酚 (736.65 mg RE/100 g) > 甘蔗糖蜜多酚 (314.61 mg RE/100 g) > 桑葚结合多酚 (69.13 mg RE/100 g)。由图 1 和图 2 所知, 三种提取物中黄酮含量的高低顺序跟总酚含量的高低顺序基本相同, 使用 Pearson 相关性分析后发现, 多酚与黄酮

含量之间存在较强的相关性 ($R^2=0.998$)。

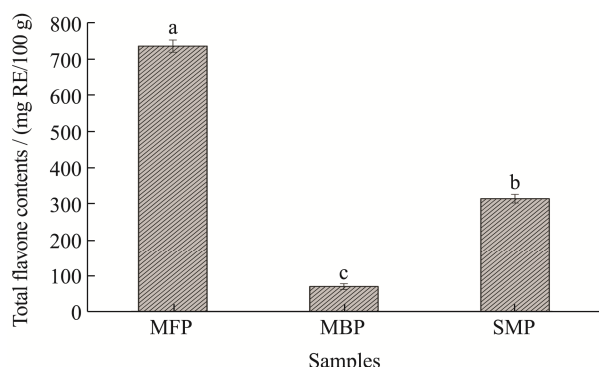


图2 桑葚游离酚(MFP)、结合酚(MBP)和甘蔗糖蜜多酚(SMP)中的总黄酮含量

Fig.2 The total flavone contents of mulberry free polyphenol (MFP), mulberry bound polyphenol (MBP) and cane molasses polyphenol (SMP)

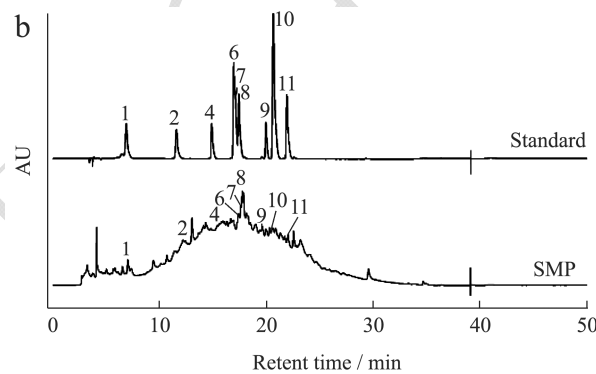
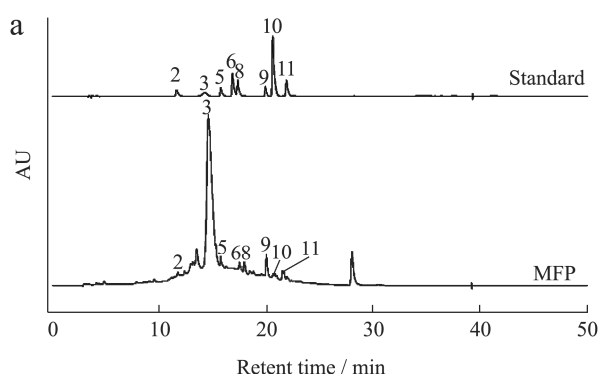


图3 桑葚多酚(a)和甘蔗糖蜜多酚(b)的高效液相色谱图

Fig.3 High performance liquid chromatography of mulberry free polyphenol (a) and cane molasses polyphenol (b)

注: 1为没食子酸, 2为原儿茶酸, 3为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷, 4为绿原酸, 5为3,4-二羟基苯丙酸, 6为咖啡酸, 7为表儿茶素, 8为丁香酸, 9为芦丁, 10为对香豆酸, 11为阿魏酸。

表2 桑葚游离多酚(MFP)和甘蔗糖蜜多酚(SMP)中主要酚类化合物组成

Table 2 Major phenolic compounds in MFP and SMP

多酚单体	桑葚游离酚/($\mu\text{g/g}$)	甘蔗糖蜜多酚/($\mu\text{g/g}$)
没食子酸	-	6.92±0.41 ^{de}
原儿茶酸	22.09±0.09 ^c	19.95±1.05 ^c
绿原酸	-	19.59±0.55 ^c
3,4-二羟基苯丙酸	94.41±11.56 ^b	-
咖啡酸	2.31±0.70 ^c	5.39±0.83 ^f
丁香酸	25.19±4.78 ^c	5.88±0.38 ^{ef}
对香豆酸	4.64±0.44 ^c	4.97±0.49 ^f
阿魏酸	10.67±2.04 ^c	7.87±0.12 ^d
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	2 366.59±64.07 ^a	-
表儿茶素	-	24.23±0.03 ^a
芦丁	26.20±1.30 ^c	21.66±0.90 ^b

注: 同一列不同上标表示样品间差异显著 ($P<0.05$)。

Jin 等^[17]研究中国 4 个地区 8 种桑葚中的多酚含量,发现矢车菊素-3-O-葡萄糖苷是所有 8 种桑葚中含

2.1.3 多酚组成与含量分析

上述研究表明,桑葚中游离酚含量明显高于结合酚含量,因此本文后续的研究中不再考虑桑葚结合酚。采用 HPLC 法对桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚中的主要多酚成分和含量进行了鉴定,结果如表 2 所示。桑葚游离多酚中共发现 8 种多酚,分别是 6 种酚酸类物质原儿茶酸 (22.09 $\mu\text{g/g}$)、3,4-二羟基苯丙酸 (94.41 $\mu\text{g/g}$)、咖啡酸(2.31 $\mu\text{g/g}$)、丁香酸(25.19 $\mu\text{g/g}$)、对香豆酸 (4.64 $\mu\text{g/g}$)、阿魏酸 (10.67 $\mu\text{g/g}$) 和 2 种类黄酮物质,矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (2 366.59 $\mu\text{g/g}$)、和芦丁 (26.20 $\mu\text{g/g}$)。其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷含量明显高于其他多酚含量,占总含量的 92.6% (m/m),其次是 3,4-二羟基苯丙酸,其含量也比其他多酚高一倍以上。

量最高的多酚物质,这与本结果一致,这是因为黑桑葚作为一种深色浆果物质,花色苷类化合物是它的主

要显色物质。甘蔗糖蜜中共发现 9 种多酚, 分别是 7 种酚酸类物质没食子酸 (6.92 $\mu\text{g/g}$)、原儿茶酸 (19.95 $\mu\text{g/g}$)、绿原酸 (19.59 $\mu\text{g/g}$)、咖啡酸 (5.39 $\mu\text{g/g}$)、丁香酸 (5.88 $\mu\text{g/g}$)、对香豆酸 (4.97 $\mu\text{g/g}$) 和阿魏酸 (7.87 $\mu\text{g/g}$) 以及两种黄酮类物质表儿茶素 (24.23 $\mu\text{g/g}$) 和芦丁 (21.66 $\mu\text{g/g}$)。孔繁晟^[7]通过大孔树脂提取的甘蔗糖蜜多酚中主要含有没食子酸、咖啡酸、绿原酸和阿魏酸四种酚酸, 本研究中 4 种物质全部检测到外还多检测出 5 种多酚。

研究表明, 桑葚游离酚中多酚组成和甘蔗糖蜜多酚组成不尽相同, 如桑葚游离酚中含量最高的矢车菊素-3-O-葡萄糖苷和 3,4-二羟基苯丙酸在甘蔗糖蜜多酚中均未被检测到。两种多酚提取物中一些相同的组分其含量也不相同, 如桑葚游离酚中咖啡酸含量是甘蔗糖蜜多酚中的五倍左右。因此, 两种提取物会因为多酚组合和含量的不同而具有不同的生物活性。最后需要注意的是, 两种多酚提取物中成分组成复杂, 而因为检测手段和多酚标准品的限制, 其他一些多酚单体物质可能未能检测到。

2.2 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚体外抗氧化活性

2.2.1 ORAC 氧自由基吸收能力

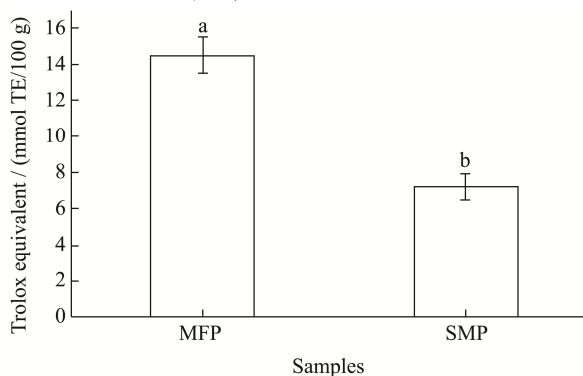


图4 桑葚和甘蔗糖蜜多酚吸收 ORAC 氧自由基的 Trolox 当量值

Fig.4 Trolox equivalent of MFP and SMP

如图 4 所示, 桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物均具有 ORAC 氧自由基吸收能力, 桑葚游离多酚提取物的吸收能力为 14.48 mmol TE/100 g, 甘蔗糖蜜多酚提取物的吸收能力为 7.20 mmol TE/100 g。桑葚游离多酚提取物的 ORAC 氧自由基吸收能力明显高于甘蔗糖蜜多酚的提取物, 这可能与多酚和黄酮的含量有关^[18]。

2.2.2 DPPH·清除能力

桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物对 DPPH·清除能力见图 5。从图中可知, 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚对 DPPH·均具有一定的清除能力, 且对 DPPH·的清除率随浓度的增加而变大, 具有一定量效关系。桑葚游

离多酚提取物的 IC₅₀ 值为 829.81 $\mu\text{g/mL}$, 明显低于甘蔗糖蜜多酚的 IC₅₀ 值 (4 142.64 $\mu\text{g/mL}$), 可能与其总酚与总黄酮含量有关。尽管两种提取物的 DPPH·清除率均低于 Trolox, 但其良好的天然活性和较低的毒副作用, 仍是未来抗氧化剂的一种潜在选择。

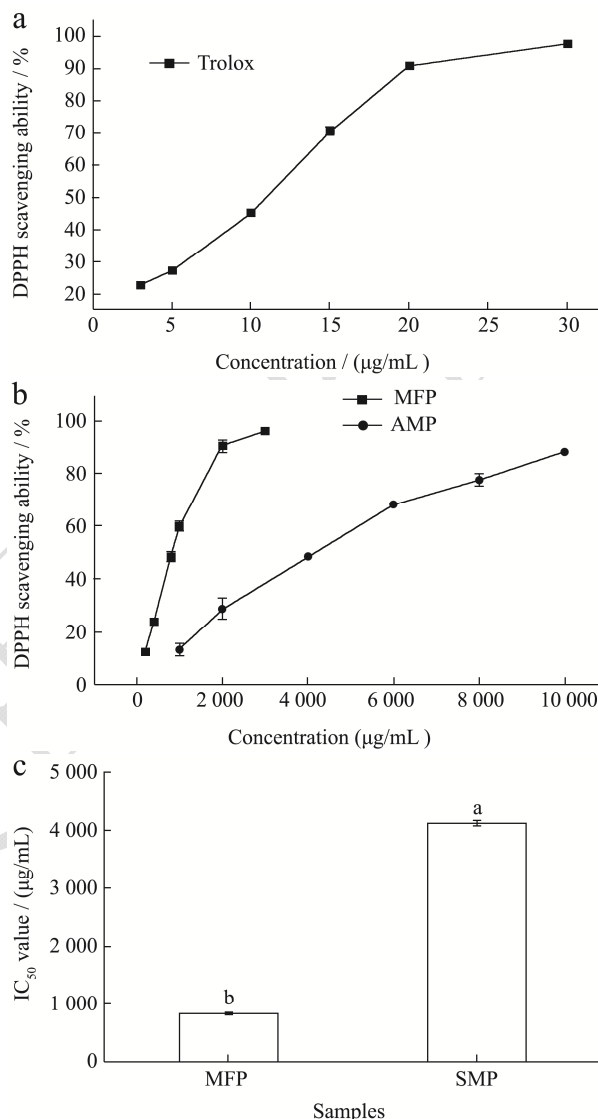


图5 Trolox (a)、桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚 (b) DPPH·清除能力及 IC₅₀ 值 (c)

Fig.5 DPPH· scavenging ability of Trolox (a), FMP and SMP (b), and their IC₅₀ value (c)

2.2.3 ABTS⁺·清除能力

如图 6 所示, 随着两种提取物浓度的提高, 其对 ABTS⁺·清除能力也不断提高, 说明两种多酚提取物对 ABTS⁺·清除率也具有量效关系。桑葚游离多酚提取物和甘蔗糖蜜多酚提取物的 IC₅₀ 值分别为 1 555.08 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 250.43 $\mu\text{g/mL}$ 。桑葚游离多酚提取物和甘蔗糖蜜多酚提取物对 ABTS⁺·清除能力的强弱能力跟 DPPH 一致, 与总酚和总黄酮含量均呈现良好的正相关性^[19]。

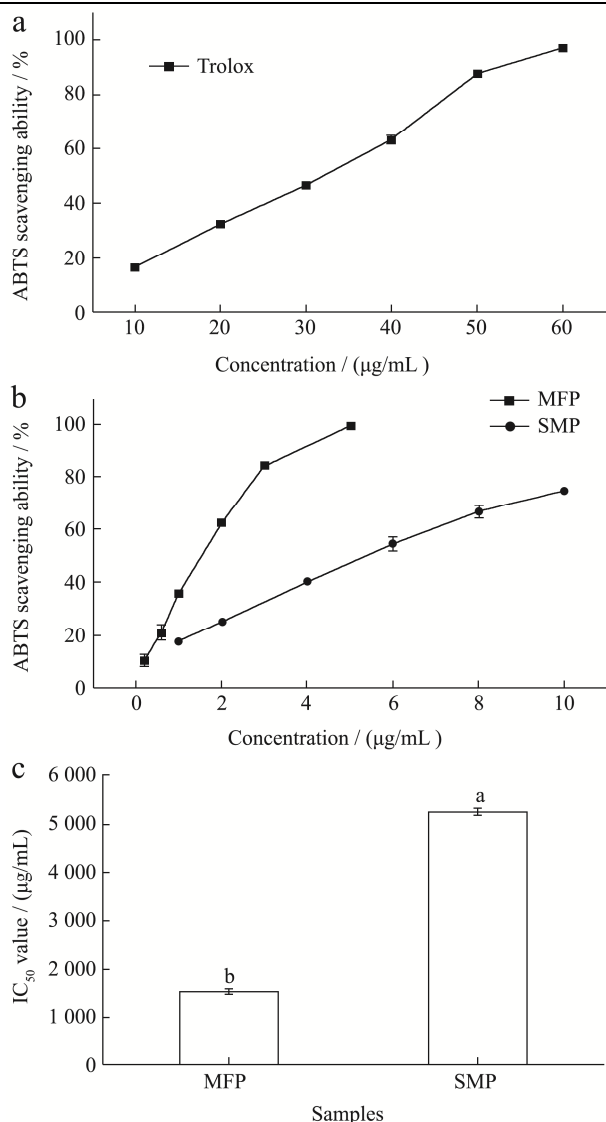


图6 Trolox (a)、桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚 (b) ABTS⁺清除能力及 IC₅₀ 值 (c)

Fig.6 ABTS⁺ scavenging ability of Trolox (a), FMP and SMP (b), and their IC₅₀ value (c)

2.3 联合抗氧化活性

2.3.1 多酚联合对 ORAC 氧自由基吸收能力

表3 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合对 ORAC 氧自由基吸收能力的 CI 值

Table 3 CI value for MFP and SMP combination at ORAC

项目	MFP+SMP/(mg/mL)			
	0.125+0.25	0.25+0.5	0.5+1	0.75+1.5
CI 值	0.92±0.02 ^a	0.86±0.06 ^{ab}	0.83±0.2 ^b	0.88±0.04

表4 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合对 DPPH 自由基清除能力的 CI 值

Table 4 CI value for MFP and SMP combination at DPPH scavenging ability

项目	0.25 IC ₅₀	0.5 IC ₅₀	0.75 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1.25 IC ₅₀	1.5 IC ₅₀
CI 值	0.73±0.02 ^d	0.85±0.01 ^c	0.94±0.03 ^a	0.91±0.02 ^{ab}	0.89±0.01 ^b	0.90±0.02 ^b

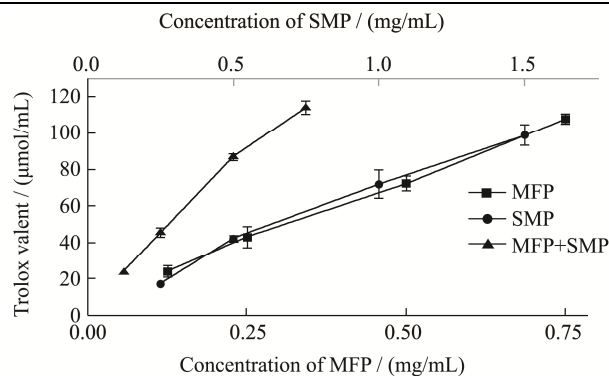


图7 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚及其联合在不同质量浓度下吸收 ORAC 氧自由基的 Trolox 当量值

Fig.7 Trolox equivalent of MFP, SMP and MFP+SMP in different mass concentration for ORAC

根据上述结果,在 Trolox 的标曲范围内,对桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物设置了四个质量梯度浓度,桑葚游离多酚质量浓度梯度为 0.125、0.25、0.5、0.75 mg/mL,甘蔗糖蜜多酚质量浓度梯度为 0.25、0.5、1、1.5 mg/mL,两种提取物按从低到高的顺序对应等体积混合联合使用,探究两种多酚提取物复配使用对 ORAC 氧自由基吸收能力的作用效果,结果如表 3 和图 7 所示。从图中可知,在一定范围内,桑葚多酚、甘蔗糖蜜多酚及其联合物均具有吸收氧自由基的能力,且呈一定的量效关系。通过 compuSyn 软件计算 4 种质量浓度下的 CI 值,发现 4 种质量浓度下的 CI 值均小于 1,说明桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物不同浓度的联合在 ORAC 氧自由基吸收方面均具有协同能力。

2.3.2 多酚联合对 DPPH 自由基清除能力

两种提取物的不同质量浓度倍数 IC₅₀ 联合对 DPPH 清除能力及 CI 值如表 4 和图 8 所示。由图中可知,在相同清除率的条件下,桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚的联合使用质量浓度明显低于单种提取物的质量浓度。通过 compuSyn 软件计算不同 IC₅₀ 质量浓度下两种多酚提取物联合使用的 CI 值发现所有的组合结果都小于 1,说明桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物不同质量浓度的联合对 DPPH 的清除均具有协同效果。值得注意的是,在较低质量浓度下,CI 值相对更小,协同作用更明显,可能的原因是随着质量浓度的升高,提取物的抑制效率逐渐饱和,继续提高质量浓度时 DPPH 的清除率变化变小,使协同作用不再明显^[20]。

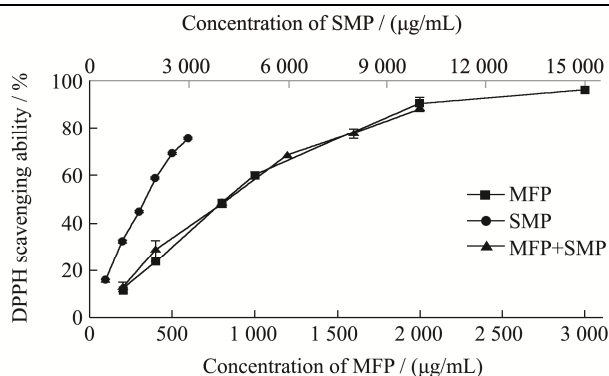


图8 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚及其联合在不同质量浓度下 DPPH 清除率

Fig.8 DPPH scavenging ability of MFP, SMP and MFP+SMP in different concentration

2.3.3 多酚联合对 ABTS⁺ 自由基清除能力

桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合使用对 ABTS⁺ 自由基清除能力 CI 值如表 5 和图 9 所示。两种提取物的联合对 ABTS⁺ 自由基具有一定的清除能力，但是通过 compuSyn 软件计算，发现只在低质量浓度

表 5 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物联合对 ABTS⁺ 自由基清除能力的 CI 值

Table 5 CI value for MFP and SMP combination at ABTS⁺ scavenging ability

	0.25 IC ₅₀	0.5 IC ₅₀	0.75 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1.25 IC ₅₀	1.5 IC ₅₀
CI 值	0.90±0.02 ^b	0.94±0.11 ^b	1.07±0.01 ^a	1.11±0.02 ^a	1.09±0.01 ^a	1.17±0.01 ^a

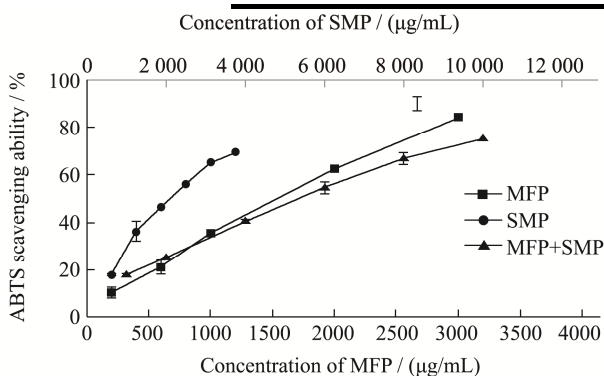


图9 桑葚多酚和甘蔗糖蜜多酚及其联合在不同质量浓度下 ABTS⁺ 自由基清除率

Fig.9 ABTS⁺ scavenging ability of MFP, SMP and MFP+SMP in different mass concentration

3 结论

通过分析桑葚多酚提取物和甘蔗糖蜜多酚提取物中多酚黄酮含量、植物化学组成、体外抗氧化性活性及联合抗氧化性活性，得到的主要结论如下：

(1) 桑葚中游离多酚占总多酚的 90%左右，达到 677.62 mg GAE/100 g，甘蔗糖蜜中多酚含量约为 339.69 mg GAE/100 g，而黄酮含量与多酚含量具有很强的正相关性。

(2) 桑葚游离多酚中共鉴定出 8 种多酚，包括 6

(0.25 IC₅₀ 和 0.5 IC₅₀) 才有协同效果，当质量浓度大于等于 0.75 IC₅₀ 时便现出拮抗作用。两种多酚联合对 ABTS 自由基清除能力的 CI 值大致呈上升趋势，其原因与 DPPH 的解释可能是一样的。

对三种体外抗氧化实验结果比较可以发现，桑葚多酚和甘蔗多酚提取物的联合使用对 ORAC 氧自由基吸收和 DPPH 自由基清除都具有协同效果，对 ABTS⁺ 自由基的清除在低质量浓度下表现出协同效果，高质量浓度时表现出拮抗效果，表明两种多酚提取物的联合抗氧化作用效果会随自由基种类和质量浓度的不同而有不同的结果。此外，酚类化合物的抗氧化能力与成分组成具有很强的相关性，包括酚类物质中的儿茶素类、没食子酸、阿魏酸及芦丁等物质^[19]，当二者结合形成复配物时，C₆-C₃ 型酚类物质与 C₆-C₃-C₆ 型酚类物质结合时，呈现更优的协同作用，可有效提高相关单体物质的含量并弥补单一样品的组成成分不足，由此复配物的抗氧化活性得到提高，二者呈现协同作用。

种酚酸和 2 种黄酮，其中矢车菊素-3-O-葡萄糖苷为其主要物质。甘蔗糖蜜多酚中共鉴定出 9 种多酚，包括 7 种酚酸和 2 种黄酮，各组分之间含量比较平均。

(3) 在桑葚游离多酚和甘蔗糖蜜多酚提取物的体外抗氧化评价 (ORAC、DPPH、ABTS) 中发现两种植物提取物均具有抗氧化活性且在一定质量浓度范围内呈剂量关系。

(4) 两种植物提取物的联合使用在 ORAC 和 DPPH 测定中，全质量浓度具有协同效应，在 ABTS 测定中，低质量浓度 (0.25 IC₅₀ 和 0.5 IC₅₀) 具有协同效应，高质量浓度具有拮抗效应。

综上，酚类物质的抗氧化水平与总酚及总黄酮含量具有良好的正相关性，且与酚类组成相关，复配后具有抗氧化协同增效的作用，为天然抗氧化剂及其复配物的研发利用提供参考。

参考文献

[1] 施俊香,肖小平,贾亚洲,等.桑果开发前景广阔[J].西北园艺,1999,2:2-3.

[2] Xu X, Huang Y Y, Xu J W, et al. Anti-neuroinflammatory and antioxidant phenols from mulberry fruit (*Morus alba* L.) [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 68: 103914.

[3] 黄忠华,罗左青,雷光鸿,等.纯固体甘蔗糖蜜与液体甘蔗糖

- 蜜发酵生产酒精的对比研究[J].轻工科技,2012,28:3-4.
- [4] de Rosso V V, Hillebrand S, Montilla E C, et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and acai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21: 291-299.
- [5] 张捷,董爱军.糖蜜的资源化利用(上)[J].中国甜菜糖业, 2007,2:38-40.
- [6] 王怀玲.蓝莓多酚化合物抗衰老活性及作用机制研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [7] 孔繁晟.甘蔗糖蜜中活性因子降血糖血脂作用及机理研究 [D].广州:华南理工大学,2015.
- [8] Gao Y, Guo X B, Liu Y, et al. A full utilization of rice husk to evaluate phytochemical bioactivities and prepare cellulose nanocrystals [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10482.
- [9] Dewanto V, Wu X Z, Adom K K, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 3010-3014.
- [10] Dou Z, Chen C, Fu X. The effect of ultrasound irradiation on the physicochemical properties and alpha-glucosidase inhibitory effect of blackberry fruit polysaccharide [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 96: 568-576.
- [11] 王晶.江西蜜柑酚类化合物抗氧化、抗癌、抗衰老活性及作用机理研究[D].广州:华南理工大学,2020.
- [12] 董竹平.辣木叶多糖的分离纯化、结构表征及免疫活性研究[D].广州:华南理工大学,2018.
- [13] 罗虹建.茶树菇多糖与白藜芦醇协同抗衰老作用研究[D].福州:福建农林大学,2017.
- [14] Chou T C, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 1983, 4: 450-454.
- [15] 游庭活.桑椹多酚类化合物抗氧化及延缓衰老作用研究 [D].广州:广东药学院,2015.
- [16] Deseo M A, Elkins A, Rochfort S, et al. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract [J]. Food Chemistry, 2020, 314: 126180.
- [17] Jin Q, Yang J F, Ma L Y, et al. Comparison of polyphenol profile and inhibitory activities against oxidation and alpha-glucosidase in mulberry (Genus *Morus*) cultivars from China [J]. Journal of Food Science, 2015, 80: C2440-C2451.
- [18] Sousa E O, Miranda C M B A, Nobre C B, et al. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts [J]. Industrial Crops and Products, 2015, 70: 7-15.
- [19] 胡来丽,秦礼康,王玉珠,等.紫皮百香果精粉酚类物质剖析及抗氧化活性评价[J].食品与发酵科技,2022,58(3):19-25.
- [20] 庞道睿.杨桃酚类物质降脂作用及其改善肝脂变性的机理研究[D].广州:华南理工大学,2018.