

# 诺丽发酵果汁中抗氧化物质的研究

梁寒峭,程池,张露,陈建国\*

中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心,北京 100027

**摘要:**本实验针对茜草科植物诺丽的发酵果汁中抗氧化物质进行了定性和定量研究。采用系统预实验法对其不同极性的洗脱部位可能含有的化学成分进行预实验,探索了各个部位的化学成分。采用 DPPH· 自由基清除、ABTS<sup>+</sup>· 自由基清除和 FRAP 三种实验方法对各部位洗脱物的抗氧化活性进行了测定,结果显示 50% ~ 90% 乙醇洗脱部位抗氧化能力最强,此部位主要含有多酚类、黄酮类、香豆素内酯类和蒽醌类成分,并且研究表明抗氧化能力与多酚成分的含量成极显著相关。本研究结果表明多酚类物质是诺丽发酵果汁发挥抗氧化作用的主要功能成分。

**关键词:**诺丽发酵果汁;定性定量;多酚成分;抗氧化

中图分类号:Q949.391

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.9.025

## Screening of Antioxidant Components in Noni Fermentation Juice

LIANG Han-qiao, CHENG Chi, ZHANG Lu, CHEN Jian-guo\*

China Center of Industrial Culture Collection, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China

**Abstract:** In this study, quantitative and qualitative analyses were carried out for screening of antioxidant substance in Noni (*Morinda citrifolia* L, Rubiaceae) fermentation juice. The chemical components of the different fractions eluted from macroporous resin HP-20 were preliminary analyzed. The content of phenols and antioxidant activity were evaluated through Folin-Ciocalteu method, DPPH· and ABTS<sup>+</sup>· scavenging rates and Ferric-reducing antioxidant power assays. The results showed the active fractions located in the 50%-90% ethanol eluted fractions, which were composed of phenols, flavonoids, coumarins and anthraquinone. Significant correlation between phenols content and antioxidant activity suggested that noni fermentation juice had strong antioxidant activity, and the phenols were the main functional components and potential of acting as natural antioxidant.

**Key words:** Noni fermentation juice; quantitative and qualitative analyses; phenols; antioxidant

发酵食品是在人类进化史中自然环境下形成的具有独特的风味物质、丰富的营养物质和良好的贮藏特性的一类食品。最早的发酵食品可能始于史前 10,000 年左右的前雅利安人时期,从餐余废物的利用开始演变,公元前 6000 年时近东地区出现了酿酒,埃及出现了面包,古巴比伦人开始了发酵肉肠的制作,4000 年前中国出现了以发酵形式储存的蔬菜。随着文明的进步和发酵工艺技术的日渐完善,人们开始更多的关注发酵食品的营养和治疗价值<sup>[1]</sup>。

诺丽 (NONI) 学名海巴戟天 (*Morinda citrifolia*), 是一种主要生长在南太平洋群岛的茜草科 (Rubi-

aceae) 植物,在波利尼西亚已有长达 2000 年的食用和药用历史,是当地一种重要的发酵食物和药物。由于其果实具有多纤维、多籽、口感不佳的特点,因此多采用发酵后取汁食用的方法,通过发酵的过程不但形成了独特的风味,并且提高了营养价值和功能性。诺丽采用自然发酵的方式,利用其自身携带的宝贵且丰富的内生菌资源完成发酵过程。在此过程中微生物的代谢过程可将果实中不溶性的高分子物质降解为可溶性易被人体利用的小分子化合物,并产生具有抗氧化活性的物质<sup>[2]</sup>。目前研究报道多围绕诺丽果、叶和籽的成分与功能,对发酵后的果汁研究表明多糖、多酚、黄酮和皂苷类物质是其主要的功能成分,采用有机溶剂萃取法对其抗氧化活性成分的研究不利于后期生产应用<sup>[5]</sup>,因此本研究利用在生产中较易实现的树脂纯化方法对其发酵果

收稿日期:2016-04-05 接受日期:2016-06-08

基金项目:国家自然科学基金(31300008);中国食品发酵工业研究院科技发展基金(博士基金)(15 院科-博士 02)

\* 通讯作者 E-mail: cij123@126.com

汁的抗氧化成分类型进行了研究,为诺丽的进一步开发利用提供科学依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 材料与试剂

诺丽发酵果汁(批次为 20150111)为纯发酵果汁,由海南诺尼产业园开发有限公司生产,采用自然发酵工艺,新鲜采摘后的诺丽果清洗晾干后,恒温 28 ℃ 发酵 12 个月后离心过滤除果泥后得到发酵果汁。没食子酸标准品:百灵威科技有限公司(210917);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、三吡啶三吡啶(TPTZ)和 Folin-Ciocalteu 试剂:美国 Sigma;异羟肟酸铁、三氯化铁、三氯化铝、香草醛、盐酸、镁粉、溴酚蓝、 $\alpha$ -萘酚、硫酸、乙醇等试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

真空旋转浓缩仪:美国 LABCONCO 公司;超声

清洗机:KQ5200,昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发仪:IKA-RV10,德国艾卡公司;循环水式多用真空泵:SHB-III,郑州长城科工贸有限公司;721 型分光光度计,UNICO-JV2000。

## 2 实验方法

### 2.1 样品制备及化学成分系统预试验<sup>[3,4]</sup>

量取 500 mL 诺丽发酵果汁加入已经前处理活化后的 HP-20 大孔树脂 20 g,搅拌吸附 2 h 后,装入  $\Phi \times L$  为 4 × 15 cm 的玻璃层析柱中,分别以 200 mL 的纯水、10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇和无水乙醇依次洗脱,得到组分 1 ~ 7,洗脱速度为 2 mL/min,未经过洗脱的原果汁记为组分 0。洗脱液 1 ~ 7 各取 1 mL 供检识下列各类成分:多酚、黄酮、蒽醌、香豆素、皂苷、生物碱、多糖、有机酸和蛋白质。具体方法见表 1。

表 1 化学成分系统预试验方法

Table 1 Preliminary analysis methods for chemical components

化学成分 Chemical Components	试液或反应名称 Reagent/ Reaction	检测方法 Analysis Method
多酚 Phenols	FeCl <sub>3</sub> 试验	加入 1% ~ 5% FeCl <sub>3</sub> 乙醇溶液 1 ~ 2 滴,加盐酸酸化,显绿、蓝绿或暗紫色为阳性
	香草醛-盐酸反应	加入 4% 香草醛甲醇溶液后加入浓盐酸酸化,显红色为阳性反应
黄酮 Flavonoids	盐酸-镁粉反应	加入数毫克镁粉,滴加数滴盐酸,必要时水浴上微热,显红-紫色为阳性反应
	AlCl <sub>3</sub> 试验	喷洒 5% AlCl <sub>3</sub> 乙醇溶液,晾干,置紫外光灯下观察,呈黄色或黄绿色荧光为阳性反应
蒽醌 Anthraquinones	醋酸镁反应	滴加 0.5% 醋酸镁乙醇溶液,反应液呈红色为阳性反应
香豆素 Coumarins 或内酯类 Lactones	异羟肟酸铁反应	加入溶液 I、II 各 5 滴,置沸水浴上加热 3 ~ 4 min,冷却后用稀盐酸调至 pH 3-4,再加入溶液 III 1 ~ 2 滴,显橙红或紫红色为阳性反应。溶液 I:7% 盐酸羟胺甲醇溶液(新鲜配制);溶液 II:10% 氢氧化钾甲醇溶液;溶液 III:1% 氯化铁甲醇溶液。
皂苷 Saponins	泡沫反应	用力振荡 1 min,产生大量持续泡沫,放置或加热不减少提示含有皂苷
生物碱 Alkaloids	碘化铋钾反应	加 1 ~ 2 滴试剂,产生橘红色浑浊或沉淀为阳性反应。试剂配制:7.3g 碘化铋钾、冰醋酸 10 mL 加水 60 mL
多糖 Polysaccharides	$\alpha$ -萘酚硫酸反应	加入 10% $\alpha$ -萘酚乙醇溶液 2 ~ 3 滴,混匀,沿试管壁缓缓加入少量硫酸,二液面交界处产生紫红色环为阳性反应。
有机酸 Organic acids	溴酚蓝试验	0.1% 溴酚蓝的乙醇溶液,作薄层色谱显色剂,喷洒后,蓝色背景上呈黄色斑点
蛋白质 Proteins	茚三酮反应	加入 2 ~ 3 滴 0.2% 茚三酮乙醇溶液,沸水浴上加热 5 min,放冷,显蓝色或蓝紫色

### 2.2 抗氧化活性<sup>[5]</sup>

#### 2.2.1 DPPH 自由基清除能力测定

取 2 mL 系列浓度的诺丽发酵果汁不同组分样品,加入 2 mL 浓度为 3.94 mg/L DPPH 乙醇溶液(现配现用),避光反应 30 min,在波长 517 nm 处测定吸光度  $A_s$ ,以相同体积的水代替样品为空白对照  $A_0$ ,相同体积的乙醇代替 DPPH 乙醇溶液反应作为

样品对照  $A_c$ ,计算样品 DPPH 自由基清除率,  $DPPH \cdot$  清除率(%) =  $[1 - (A_s - A_c) / A_0] \times 100$ 。

#### 2.2.2 ABTS + · 自由基清除能力测定

ABTS 溶液与 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 水溶液避光反应 12 ~ 16 h 生成 ABTS + ·,当天使用。取 500  $\mu$ L 系列浓度的诺丽发酵果汁不同组分样品,加入 4.5 mL ABTS 溶液混匀,避光反应 6 min,在波长 734 nm 处测定吸光

度  $A_s$ , 相同体积的水代替 ABTS 溶液反应作为样品对照  $A_c$ , 计算样品  $ABTS^+$  清除率,  $ABTS^+$  清除率 (%) =  $[1 - (A_s - A_c) / 0.700] \times 100$ 。

### 2.2.3 总抗氧化能力测定

采用铁还原/抗氧化能力 (Ferric reducing/antioxidant power, FRAP) 分析法评价诺丽果汁的总抗氧化活性。TPTZ 溶液、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  溶液和醋酸缓冲液 (pH 3.6) 配制成 FRAP 工作液 (现配现用)。取 1 mL 系列浓度的诺丽发酵果汁不同组分样品, 加入 FRAP 工作液 3 mL, 混匀后 37 °C 水浴反应 30 min, 于 593 nm 处读取吸光度, 最终结果以  $FeSO_4$  (mg/100 mL) 等量抗氧化能力表示。

### 2.3 诺丽发酵果汁不同组分总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalteu (FC) 比色法<sup>[6]</sup>: 以没食子酸质量为横坐标  $x$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), 以吸光度  $y$  为纵坐标绘制标准曲线, 测定回归方程为:  $y = 0.010x + 0.017$ ,  $R^2 = 0.9981$ 。精密吸取诺丽发酵果汁不同组分样品 1.0 mL 于 10 mL 比色管中, 依次加入 1.0 mL FC 试剂 (0.2 mol/L) 和 2 mL 15%  $Na_2CO_3$ , 去离子水定容至 10 mL, 充分混合后室温放置 1 h, 于 760

nm 波长下测定吸光度, 计算总酚含量。

结果计算: 根据标准曲线计算样品中多酚的含量:  $X = (m \times V_1) / (V_2 \times 1000)$ , 公式中  $X$  为总酚含量 (mg/mL);  $m$  为依据标准曲线计算出待测液中多酚的质量 ( $\mu\text{g}$ );  $V_1$  为组分的总体积;  $V_2$  为组分实验测定用体积。

### 2.4 数据分析

采用 SPSS v19.0 软件进行统计分析, 数据结果以“平均值  $\pm$  标准差” ( $n = 3$ ) 表示, Pearson 法进行相关性分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 化学成分系统预试验

试验结果表明诺丽发酵果汁中含有多酚、黄酮、蒽醌、香豆素、皂苷、生物碱、多糖、有机酸和蛋白质等成分, 其中多糖、有机酸和蛋白质类成分主要集中于极性部位, 黄酮、蒽醌、香豆素和皂苷类成分集中于中等极性部位, 多酚类成分普遍存在于各个极性部位, 结果见表 2。

表 2 诺丽发酵果汁不同组分化学成分系统预试验结果

Table 2 Preliminary analysis for chemical components of different fractions

化学成分 Chemical Components	试液或反应名称 Reagent/ Reaction	正反应指标 Indication of positive reaction	试验结果 Results						
			1	2	3	4	5	6	7
质量 Quality (g)	-	-	7.6	0.41	1.66	2.17	0.56	0.1	0.52
多酚 Phenols	$FeCl_3$ 试验	呈绿、蓝绿、蓝紫、墨绿色	+	+	+	+	+	+	+
	香草醛 - 盐酸反应	红色	+	+	+	+	+	+	+
黄酮 Flavonoids	盐酸 - 镁粉反应	显红 - 紫红色	-	-	+	+	+	-	-
	$AlCl_3$ 试验	紫外灯下显黄 - 绿色荧光	-	-	+	+	+	+	-
蒽醌 Anthraquinones	醋酸镁反应	反应液呈红色	-	+	+	+	+	+	+
香豆素 Coumarins 或内酯类皂苷 Saponins	异羟肟酸铁反应	橙红色或紫红色	-	+	+	+	+	+	+
	泡沫反应	产生大量持续泡沫, 放置或加热不减少	-	-	-	+	-	-	-
生物碱 Alkaloids	碘化铋钾反应	呈橘红色沉淀	-	-	-	-	-	+	+
多糖 Polysaccharides	$\alpha$ -萘酚硫酸反应	液面处产生紫红色圆环	+	+	+	-	-	-	-
有机酸 Organic acids	溴酚蓝试验	滤纸片, 蓝色背景下呈黄色斑点	+	-	-	-	-	-	-
蛋白质 Proteins	茚三酮反应	呈蓝色、紫色	+	+	-	-	-	-	-

### 3.2 抗氧化活性实验结果

#### 3.2.1 DPPH· 自由基清除能力

DPPH· 是一种很稳定的以氮为中心的自由基,

若受试物能将其清除, 则表明受试物具有降低羟基自由基、烷基自由基或过氧化自由基的有效浓度和打断脂质过氧化链的作用。诺丽发酵果汁不同极性

洗脱部分对 DPPH· 的清除能力见图 1。组分 4~6 均具有较强的清除效果,能力排序为:6>5>4>0>3>7>2>1。从结果可以看出,主要 DPPH· 清除活性部位集中在 50%~90% 乙醇的洗脱部分,活性均强于未经过大孔树脂洗脱的发酵汁,但低于同浓度的阳性对照 Vc。50% 清除率时,组分 6 浓度最小,为 0.035 mg/L,组分 4 和 5 浓度其次,均为 0.039 mg/L,其它组分 IC<sub>50</sub> 值均接近或大于 0.100 mg/L。

### 3.2.2 ABTS<sup>+</sup>· 自由基清除能力

诺丽发酵果汁不同极性洗脱部分对 ABTS<sup>+</sup>· 的清除能力见图 2。组分 4~6 均具有较强的清除效果,能力排序为:5>4>6>0>3>7>2>1。与

DPPH· 清除能力实验结果一致,组分 4~6 活性均强于组分 0,但低于同浓度的阳性对照 Vc。三组分之间的活性排列变化不大。50% 清除率时,组分 5 浓度最小,为 0.196 mg/L,组分 4 浓度其次,为 0.200 mg/L,然后是组分 6 为 0.210 mg/L,其它组分 IC<sub>50</sub> 值均大于 0.400 mg/L。

### 3.2.3 总抗氧化能力

采用 FRAP 方法测定诺丽发酵果汁不同极性洗脱部分抗氧化能力,结果见图 2,能力排序为:6>5>4>0>3>2>1≈7。浓度小于 0.1 mg/mL 时,组分 4~6 的活性与阳性对照 Vc 接近。8 个组分中,组分 6 对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力最强。

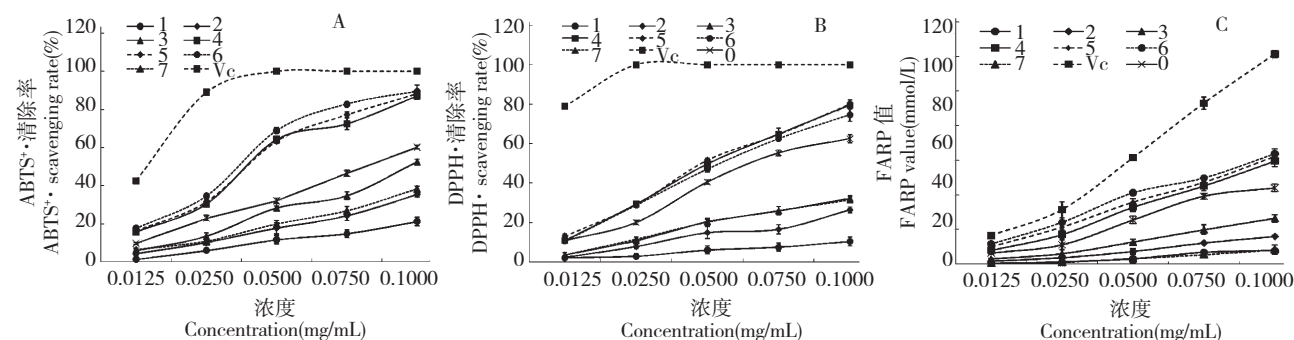


图 1 诺丽发酵果汁不同组分 DPPH· 自由基清除能力 (A)、ABTS<sup>+</sup>· 自由基清除能力 (B) 及总抗氧化能力 (C)

Fig. 1 DPPH· radical scavenging activity (A), ABTS<sup>+</sup>· radical scavenging activity (B) and FRAP value (C) of different fractions of noni fermentation juice

### 3.3 诺丽发酵果汁不同组分总酚含量的测定结果

如图 2 所示,7 个组分的多酚含量差异较大,其中组分 4~6 含量较高,均大于 150 mg/g,相反的极性处于两端的组分 1 和 7 最小,均小于 50 mg/g。由此可见大孔树脂 HP-20 对诺丽发酵果汁的多酚类物质起到了很好的富集作用,且主要分布于中等偏小极性洗脱部位。

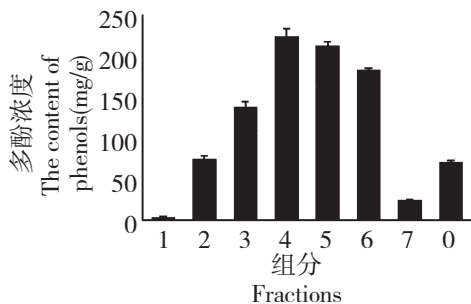


图 2 诺丽发酵果汁不同组分多酚含量

Fig. 2 The phenols contents in different fractions of noni fermentation juice

### 3.4 多酚含量与抗氧化活性相关性分析

通过 Pearson 法相关性分析,如表 3 所示,三种抗氧化体系的活性结果趋势基本一致,多酚含量与 DPPH· 自由基、ABTS<sup>+</sup>· 自由基清除能力和总抗氧化能力之间均有极显著的相关性 ( $P < 0.01$ ),相关系数分别为 0.954、0.926 和 0.950。进一步以不同组分多酚含量为横坐标,抗氧化活性为纵坐标进行相关性分析,相关方程和相关系数分别为  $y = 0.3086x + 20.8977$ ,  $R^2 = 0.9110$ ;  $y = 0.1161x + 2.9428$ ,  $R^2 = 0.8246$ ;  $y = 0.0008x - 0.0060$ ,  $R^2 = 0.8388$ ,由相关性方程以及图中曲线的变化趋势表明多酚含量与三种抗氧化活性均成正相关关系,由此可见,诺丽发酵果汁发挥抗氧化功能与其中的多酚成分具有很大的相关性。

## 4 讨论

自由基是人生理代谢过程中产生的一种活性分

表3 多酚含量与抗氧化性相关分析

Table 3 The correlation between the phenols content and antioxidant activity

	多酚含量 Phenols content	DPPH	ABTS	FRAP
多酚含量 Phenols content	1			
DPPH	0.954 **	1		
ABTS	0.926 **	0.986 **	1	
FRAP	0.950 **	0.984 *	0.969 **	1

注:显著相关, \*  $P < 0.05$ ; 极显著相关, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Significant correlation, \*  $P < 0.05$ ; extremely significant correlation, \*\*  $P < 0.01$ .

子,可作为第二信使参与细胞信号的传导<sup>[7]</sup>,其数量过多则会导致细胞和组织器官的损伤,从而诱发各种疾病和加速机体衰老。研究表明诺丽果汁在抑菌消炎、降血脂、保护心血管和抑制肿瘤方面均有明显的作用<sup>[8]</sup>,这些作用的发挥与其抗氧化能力密切相关。例如,诺丽果能够有效抑制动脉硬化即是一种与低密度脂蛋白氧化相关的疾病,诺丽果提取物可以通过抑制铜离子发生催化反应,避免自由基生成从而发挥作用<sup>[9]</sup>;此外有研究表明诺丽可通过提高抗氧化酶活性的途径显著提高肝组织中 SOD 和 GSH-Px 活力,从而起到抗衰老的作用<sup>[10]</sup>;以吸烟者为研究对象,对诺丽果汁在体内的抗氧化活性进行评价,结果表明服用诺丽果汁 30 天可显著降低重度吸烟者体内血浆过氧化物阴离子数量及脂质过氧化物水平<sup>[11]</sup>。

本研究首次利用大孔树脂 HP-20 对诺丽发酵果汁不同极性部位进行富集纯化,对各个部位的成分进行了定性研究,多糖、有机酸和蛋白主要集中在极性较大部位(组分 1 和 2),多酚、黄酮、蒽醌和香豆素类成分分布较广,几乎有机相洗脱组分均有分布,生物碱主要在极性较小部位。采用 DPPH· 自由基清除、ABTS<sup>+</sup>· 自由基清除和 FRAP 三种方法研究了各个洗脱部位的抗氧化活性,结果表明中等及偏小极性部位抗氧化活性很强,组分 4~6 表现出较处理前原液更强的活性,通过定性实验检测出这三个部位的主要成分类型为多酚(黄酮、蒽醌和香豆素类结构也属于多酚类),故本实验以多酚类成分为指征,并通过 Pearson 法进行成分含量和活性强弱的相关性分析,结果表明多酚类成分的含量高低直接影响其抗氧化活性的强弱,因此推诺丽发酵果

汁发挥抗氧化活性的主要成分是多酚类,也可能是其表现出其他药理活性的物质基础。本研究为诺丽发酵果汁的进一步活性成分的分离纯化研究和药理作用探索奠定了理论和方法基础。

### 参考文献

- Edward R. Farnworth. Handbook of Fermented Functional Foods, 2nd Edition. London: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 2-3.
- Li LT (李里特), Ma YL (马艳莉). The changes and regulation on ingredients and nutritional-functional factors during food fermenting. *J Chin Instit Food Sci Technol* (中国食品学报), 2011, 9(11): 82-92.
- Li XH (李晓花), Niu YF (牛迎凤), Yuan C (元超), et al. The chemical constituents of *Aspidopterys obcordata* Hemsl by comprehensive preliminary test. *Guiding J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2014, 20(5): 17-21.
- Zheng XY (郑晓艳), Sha M (沙玫). Preliminary analysis for chemical components of *Sarcopyramis nepalensis* Wall in South Fujian Province. *Fujian Anal Testing* (福建分析测试). 2014, 23(4): 54-56.
- Chen JG (陈建国), Liang HQ (梁寒峭), Li X (李雪), et al. Separation and antioxidant activity of polyphenols with different polarities from Xisha noni juice. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2015, 41: 163-166.
- Liu Q (刘清), Li Y (李玉), Yao HY (姚慧源). Determination of total polyphenol in barley seed extracts by Folin-Ciocalteu colorimetry. *Food Sci Technol* (食品科技), 2007, 4: 175-177.
- Chen JG (陈建国), Li X (李雪), Cheng C (程池). Study in noni antioxidant activity. *Geriatrics Health Care* (老年医学与保健), 2013, 19: 418-421.
- Zhang WM (张伟敏), Wei J (魏静), Shi RC (施瑞诚), et al. Progress of the study on compounds in noni fruit and their biological activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发). 2007, 19: 1087-1091.
- Younos C, Rolland A, Fleurentin J, et al. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med*, 1990, 56: 430-434.
- Zhang JJ (张建军), Wang LY (王林元), Ou LN (欧丽娜), et al. Study on evaluation of antioxidant activity of Noni juice in vivo. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 7: 392-406.
- Wang MY, Lutfiyya MN, Vicki WH, et al. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. *Chem Central J*, 2009, 3: 1-5.