

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90084

生熟酸枣仁及其皮、仁成分差异性与抗氧化活性研究

Study on composition difference and antioxidant activity of peel and kernel from raw and fried semen of *Ziziphi spinosae*

肖凤琴¹ 刘 晖¹ 杨亦柳¹ 于 倩¹ 李 佳¹

XIAO Feng-qin¹ LIU Hui¹ YANG Yi-liu¹ YU Qian¹ LI Jia¹

张红印¹ 邵 帅¹ 李光哲¹ 严铭铭^{1,2}

ZHANG Hong-yin¹ SHAO Shuai¹ LI Guang-zhe¹ YAN Ming-ming^{1,2}

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 吉林省中药保健食品科技创新中心, 吉林 长春 130117)

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117, China; 2. Jinlin Provincial Science and Technology Innovation Center of Health Food of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130117, China)

摘要:目的:揭示生熟酸枣仁及其皮、仁成分差异性与抗氧化活性。方法:采用 DPPH 自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^- \cdot$)、ABTS 自由基清除能力和铁离子还原能力(FRAP)测定生熟酸枣仁皮、仁、全枣仁的抗氧化活性。并采用紫外—可见分光光度计(UV)对酸枣仁不同组织部位皮、仁和全枣仁的成分进行研究。结果:生熟酸枣仁皮、仁、全枣仁均具有一定的抗氧化作用,其抗氧化能力大小为皮>全枣仁>仁。生熟酸枣仁(皮)中总黄酮、总皂苷、总酚酸含量高于全枣仁和仁,各样品总多糖含量无明显差异。结论:生熟酸枣仁皮、仁、全枣仁均具有抗氧化活性。

关键词:酸枣仁;成分差异性;体外抗氧化活性;相关性分析

Abstract: Objective: This study aimed to reveal the composition differences and antioxidant activities of kernel and peel from raw and fried semen from *Ziziphi spinosae*. **Methods:** Using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion radical ($\text{O}_2^- \cdot$), 2, 2'-amino-di (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid) ammonium salt (ABTS) free radical scavenging ability and ferric reducing antioxidant

power (FRAP) to determine the antioxidant activity of peel, kernel and jujube benevolence from different semen. Moreover, the components of peel, kernel and jujube benevolence were also studied by UV spectrophotometer. **Results:** The results showed that the peel, kernel, and jujube benevolence of all the semen had certain antioxidant effects, and the order of their antioxidant capacity was peel > jujube benevolence > kernel. The composition study showed that the contents of total flavonoids, total saponins and total phenolic acids in the semen peel were higher than those in jujube benevolence and kernel, and there was no significant difference in the content of total polysaccharides among samples. Therefore, the pharmacodynamic material basis of antioxidant activity in the peel was verified to be flavonoids, saponins and phenolic acids. However, there was no significant difference in antioxidant activity, total saponins, total flavonoids, total phenolic acids and total polysaccharides between the raw and fried semen. **Conclusion:** The peel, kernel and jujube benevolence of raw and fried *Ziziphi spinosae* semen all have antioxidant activity, and this provides a theoretical basis for the further development and market application of *Z. spinosae* semen.

Keywords: *Ziziphi spinosae* semen; chemical composition; antioxidant activity *in vitro*; correlation analysis

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YEC1702100);吉林省中药保健食品科技创新中心资助项目(编号:20180623041Tc)

作者简介:肖凤琴,女,长春中医药大学在读博士研究生。

通信作者:严铭铭(1968—),女,长春中医药大学教授,博士生导师,博士。E-mail:yanmm595@yahoo.com.cn

李光哲(1972—),男,长春中医药大学副教授,硕士生导师,博士。E-mail:ligz@nenu.edu.cn

收稿日期:2021-09-30

酸枣仁为鼠李科植物酸枣干燥成熟的种子,是卫生部颁布的第一批药食同源药物,富含皂苷、生物碱、黄酮、酚酸、脂肪油以及多糖等多种成分,在改善睡眠、抗焦虑、改善记忆、抗氧化方面具有良好的药理活性,临床上常被用于治疗失眠等中枢神经系统疾病^[1-2]。

研究^[3-4]表明,酸枣仁中的黄酮类、皂苷类、酚酸类

以及脂肪酸类成分具有良好的抗氧化活性。而有关酸枣仁皮部位、仁部位的抗氧化活性研究尚未见报道。课题组前期研究发现,酸枣仁具有良好的抗氧化活性,且酸枣仁皮部位治疗失眠的作用优于仁部位。

研究拟探讨生熟酸枣仁的皮、仁、全枣仁对超氧阴离子自由基、羟基自由基、DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除率及对铁离子的还原能力,并对其成分进行分析,旨在为酸枣仁作为天然抗氧化剂开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

紫外—可见分光光度计:UV-1700 型,日本岛津公司;
数显恒温水浴锅:HH-6 型,金坛市佳美仪器有限公司;

电子天平:AB135-S 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

电子天平:MS303S 型,奥豪斯仪器有限公司;

超声波清洗器:KQ-205B 型,昆山市超声仪器有限公司;

低速台式离心机:DT5-2B 型,北京时代北利离心机有限公司;

高效液相色谱仪:Agilent1260 型,美国 Agilent Technologies 公司;

粉碎机:MFJ-W300 型,北京利仁科技股份有限公司;

多功能酶标仪:Infinite M200pro 型,瑞士 Tecan 公司。

1.2 材料与试剂

酸枣仁:河北仁心药业有限公司;

DPPH:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

Tris-HCl:分析纯,广州赛国生物科技有限公司;

邻苯三酚:分析纯,天津市光复精细化工研究所;

邻二氮菲、 $K_3Fe(CN)_6$:分析纯,天津永晟精细化工有限公司;

$FeCl_3$:分析纯,西陇科学股份有限公司;

三氯乙酸:分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;

芦丁标准品、没食子酸标准品:中国药品生物制品检定所;

人参皂苷 Re 标准品:上海源叶生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备 按 2020 版《中华人民共和国药典》中的炮制方法对酸枣仁进行炒制^[5],制得熟酸枣仁。将生熟酸枣仁进行剥离,分别得到相应的皮和仁共 6 种样品:生、熟酸枣仁(全枣仁),生、熟酸枣仁(仁),生、熟酸枣皮(皮)。

1.3.2 体外抗氧化活性研究

(1) 样品制备:精密称取生熟酸枣仁的皮部位、仁部位和全枣仁(过四号筛)各 2 g,加入 70%乙醇 20 mL 回流提取 2 h,提取液转移至 50 mL 试管中,滤渣用 5 mL 体积分数为 70%乙醇洗涤,合并洗液与滤液,离心,取上清液,并用 70%乙醇定容至 25 mL。

(2) 超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)清除率测定:参照李

欣然等^[6]的方法并修改。采用邻苯三酚自氧化法,试验组为 A_1 ,以 0.3 mL 蒸馏水代替邻苯三酚溶液作为样品对照组 A_2 ,以 0.1 mL 蒸馏水代替样品液作为空白对照组 A_0 ,并测定 420 nm 处吸光度值,蒸馏水调 0。按式(1)计算 $O_2^- \cdot$ 的清除率。

$$C = \frac{A_0 - A_1 + A_2}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C ——自由基清除率,%;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

(3) 羟基自由基($\cdot OH$)清除率测定:参照张思颀等^[7]的方法并修改。取邻二氮菲溶液 1 mL 于各试管,加入 2 mL PBS 溶液,1 mL 样品液,混匀后加入 1 mL $FeSO_4$ 溶液,混匀,加入 1 mL H_2O_2 溶液,混匀。37 °C 水浴 1 h,测定 536 nm 处吸光度值 A_1 ,用蒸馏水调 0。以 1 mL 蒸馏水代替样品液测得 A_2 ;以 1 mL 蒸馏水代替 H_2O_2 溶液测得 A_0 。按式(2)计算 $\cdot OH$ 清除率。

$$C = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

C ——羟基自由基($\cdot OH$)清除率,%;

A_0 ——空白对照组吸光度值;

A_1 ——样品组吸光度值;

A_2 ——样品对照组吸光度值。

(4) DPPH 自由基清除率测定:参照张雪娇等^[8]的方法并修改。于 96 孔板中加入样品溶液 100 μL ,再加入 DPPH 溶液 100 μL ,涡旋混匀。暗室反应 30 min,测定 517 nm 处吸光度值 A_1 ;以 100 μL 甲醇代替 DPPH 溶液作为样品对照组,测定吸光度值 A_2 。按式(1)计算 DPPH 自由基清除率。

(5) ABTS 自由基清除率测定:参照张雪娇等^[8]的方法并修改,取 0.4 mL ABTS 工作液,用 pH 为 7.4 的 PBS 溶液稀释,常温下 734 nm 处吸光值为(0.7 \pm 0.2)。将 0.2 mL ABTS 工作液与 10 μL 不同浓度样品混合,常温避光反应 6 min,测定 734 nm 处吸光度,平行 3 次。按式(3)测定 ABTS 自由基清除率。

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

式中:

C ——ABTS 自由基清除率,%;

A_1 ——样品+ABTS 溶液吸光度值;

A_0 ——PBS 溶液+ABTS 溶液的吸光度。

(6) FRAP 还原能力测定:取样品液 2.5 mL,分别加入 PBS 溶液 2.5 mL,1% $K_3Fe(CN)_6$ 溶液 2.5 mL,混匀,50 °C 水浴 20 min,取出后迅速冷却,加入 10%三氯乙酸溶液 2.5 mL,混匀,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液

2.5 mL,加蒸馏水 2.5 mL,0.1% FeCl₃ 溶液 0.5 mL,摇匀,静止 10 min,测定 700 nm 处吸光度值 A₁,以 2.5 mL 蒸馏水代替样品溶液作为样品对照组,测得 A₂,以蒸馏水作空白调 0,按式(4)计算还原能力大小^[9]。

$$C = A_1 - A_2, \quad (4)$$

式中:

C——还原能力;

A₁——样品组吸光度值;

A₀——样品对照组吸光度。

1.3.3 不同组织部位成分差异性分析

(1) 总黄酮含量测定:取生熟酸枣仁的全枣仁、皮和仁粉末(过四号筛)各 2 g,参照 2020 版《中国药典》中大豆黄卷总黄酮含量测定方法,以芦丁为对照品,以相应试剂为空白。根据芦丁标准曲线,计算样品中总黄酮含量。

(2) 总皂苷含量测定:取生熟酸枣仁的全枣仁、皮和仁粉末(过四号筛)各 2 g,参照 2020 版《中国药典》中人参茎叶总皂苷含量测定方法,以人参皂苷 Re 为对照品,以相应试剂为空白。根据人参皂苷 Re 标准曲线,计算样品中总皂苷含量。

(3) 总多糖含量测定:取生熟酸枣仁的全枣仁、皮和仁粉末(过四号筛)各 2 g,参照 2020 版《中国药典》中玉竹总多糖含量测定方法,以无水葡萄糖为对照品,以相应试剂为空白。根据无水葡萄糖标准曲线,计算样品中总多糖含量。

(4) 总酚酸含量测定:取生熟酸枣仁的全枣仁、皮和仁粉末(过四号筛)各 2 g,参照 2020 版《中国药典》中大血藤总酚酸含量测定方法,以没食子酸为对照品,以相应试剂为空白。根据没食子酸标准曲线,计算样品中总酚酸含量。

2 结果与分析

2.1 抗氧化活性

2.1.1 超氧阴离子清除率 超氧阴离子可诱导脂质、蛋白质及 DNA 的氧化损伤,在活性氧的形成中起重要作用,因此可通过测定抗氧化剂的超氧阴离子清除率来评价其抗氧化能力^[10]。由图 1 可知,生熟酸枣仁不同组织部位均对超氧阴离子具有一定的清除作用,其中生酸枣仁(全枣仁)的清除能力最强;熟酸枣仁(皮)和(仁)的清除能力强于生酸枣仁(皮)和(仁)部位,表明炮制后提高了酸枣仁(皮)和(仁)对超氧阴离子自由基的清除作用。

2.1.2 羟基自由基清除率 羟基自由基能杀死红细胞,降解 DNA、细胞膜和多糖化合物,是毒性最大的氧自由基^[11]。由图 2 可知,生熟酸枣仁不同部位对羟基自由基的清除率不同,其中,仁部位对羟基自由基的清除率最弱,皮的最高,其次为全枣仁,且熟制的各样品的清除率高于生品。

2.1.3 DPPH 自由基清除率 由图 3 可知,生熟酸枣仁各组织部位对 DPPH 自由基均具有一定的清除能力,其中皮的清除力高于相应的全枣仁与仁。

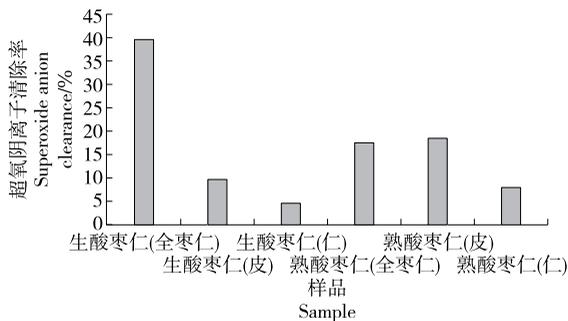


图 1 生熟酸枣仁不同组织部位的超氧阴离子自由基清除率

Figure 1 Determination results of superoxide anion clearance in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

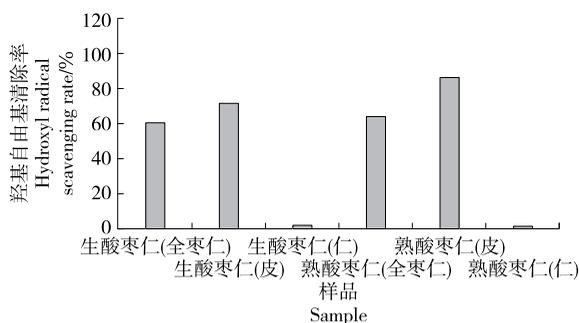


图 2 生熟酸枣仁不同组织部位的羟基自由基清除率

Figure 2 Determination results of hydroxyl radical scavenging rate in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

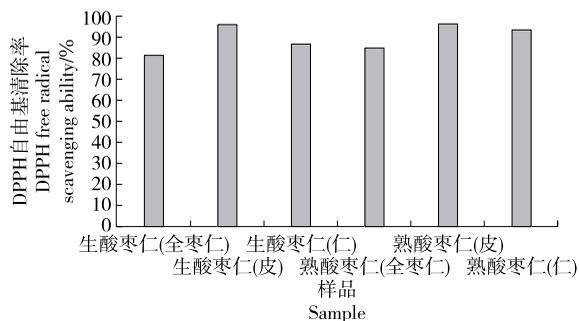


图 3 生熟酸枣仁不同组织部位的 DPPH 自由基清除率

Figure 3 Determination results of DPPH radical scavenging rate in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

2.1.4 ABTS 自由基清除率 由图 4 可知,酸枣仁各样品对 ABTS 自由基均具有较好的清除力;其中酸枣仁(皮)对 ABTS 自由基的清除作用高于全枣仁与仁,且熟酸枣仁的清除率整体高于生酸枣仁。

2.1.5 FRAP 还原能力 还原能力可以用来评价试验样品的抗氧化能力,吸光度值越大,抗氧化剂的抗氧化能力越强^[12]。由图 5 可知,各样品均具有一定的还原能力,其中酸枣仁(皮)的还原能力高于全枣仁与仁,生熟酸枣仁

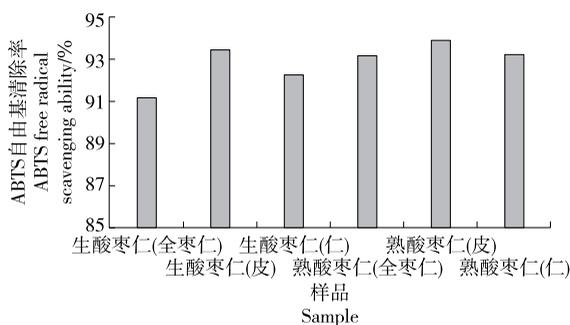


图4 生熟酸枣仁不同组织部位的ABTS自由基清除率
Figure 4 Determination results of ABTS radical scavenging rate in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

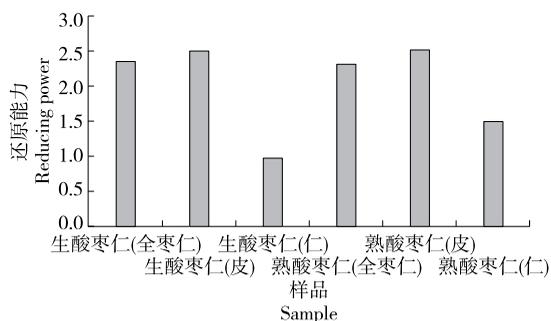


图5 生熟酸枣仁不同组织部位的FRAP还原能力
Figure 5 Determination results of FRAP reduction ability in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

(仁)的还原能力较对应的全枣仁与皮稍弱。

综上,酸枣仁各部位对超氧阴离子自由基、羟基自由基、DPPH 自由基及 ABTS 自由基的清除能力大小均为皮>全枣仁>仁;且酸枣仁(皮)的还原能力强于对应的全枣仁与仁。因此,酸枣仁各部位的抗氧化能力强弱为皮>全枣仁>仁,酸枣仁炮制前后的抗氧化活性并无明显区别。

2.2 酸枣仁不同组织部位的成分含量

由表 1 可知,生酸枣仁(皮)中总黄酮含量最高,各样

表 1 生熟酸枣仁不同组织部位的成分含量

Table 1 Determination results of chemical components in different tissue parts of raw and ripe ziziphi spinosae semen

样品	总黄酮含量	总皂苷含量	总酚酸含量	总多糖含量
生酸枣仁(全枣仁)	1.35	17.47	16.58	18.26
生酸枣仁(皮)	2.98	26.92	18.35	15.32
生酸枣仁(仁)	0.34	14.23	3.67	12.88
熟酸枣仁(全枣仁)	1.73	19.30	17.57	16.63
熟酸枣仁(皮)	2.59	25.26	22.47	15.25
熟酸枣仁(仁)	0.51	10.34	4.06	11.14

品仁中总黄酮含量整体低于全枣仁与皮;各样品皮中总皂苷、总酚酸含量高于全枣仁与仁;各样品中总多糖含量相近,全枣仁与皮中的多糖含量高于仁;酸枣仁炮制前后各样品中总皂苷、总黄酮、总酚酸以及总多糖含量未发生明显变化。

3 结论

试验表明,酸枣仁不同组织部位均具有良好的抗氧化活性,其中酸枣仁(皮)的抗氧化活性强于全枣仁与仁的,且酸枣仁(皮)中总黄酮、总皂苷、总酚酸含量均高于酸枣仁,可初步推测酸枣仁(皮)中起抗氧化活性作用的药效物质基础为黄酮、皂苷和酚酸类成分;此外,酸枣仁炮制前后抗氧化活性无明显差别。后续可采用不同研究方法对酸枣仁各组织部位进行体内抗氧化活性研究。

参考文献

- [1] 杜晨晖,崔小芳,裴香萍,等.酸枣仁皂苷类成分及其对神经系统作用研究进展[J].中草药,2019,50(5):1258-1268.
DU Chen-hui, CUI Xiao-fang, PEI Xiang-ping, et al. Research progress of ziziphi spinosae semen and their effects on nervous system[J]. Chinese Herbal Medicine, 2019, 50(5): 1258-1268.
- [2] 张婷,张岩,王文彤,等.酸枣仁中黄酮成分及其药理作用研究进展[J].天津药学,2018,30(1):69-74.
ZHANG Ting, ZHANG Yan, WANG Wen-tong, et al. Research progress of flavonoids in ziziphi spinosae semen and their pharmacological effects[J]. Tianjin Pharmacy, 2018, 30(1): 69-74.
- [3] 马琦,袁其朋,丁柯,等.酸枣仁抗氧化成分提取及其活性[J].过程工程学报,2010,10(4):756-761.
MA Qi, YUAN Qi-peng, DING Ke, et al. Extraction and activity of antioxidant components from wild jujube kernel [J]. Journal of Process Engineering, 2010, 10(4): 756-761.
- [4] 王子健,刘颖,刘思斌,等.UPLC-HRMSⁿ结合高能诱导裂解快速鉴定麦冬中高异黄酮类成分[J].质谱学报,2016,37(6):481-491.
WANG Zi-jian, LIU Ying, LIU Si-bing, et al. Rapid identification of high isoflavones in Ophiopogon japonicus by UPLC hrmsn combined with high energy induced pyrolysis[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2016, 37(6): 481-491.
- [5] 贺素容,王晶,吴博,等.响应面法—中心复合法优选炒酸枣仁炮制工艺[J].中医药导报,2020,26(15):52-55.
HE Su-rong, WANG Jing, WU Bo, et al. Optimization of processing technology of fried sour jujube kernel by response surface methodology central composite method[J]. Guide to Traditional Chinese Medicine, 2020, 26(15): 52-55.
- [6] 李欣燃,王绪英,许子怡,等.红车轴草不同部位多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2021,37(9):173-178.
LI Xin-ran, WANG Xu-ying, XU Zi-yi, et al. Optimization of extraction technology and antioxidant activity of polyphenols from different parts of trifolium rubra[J]. Food & Machinery, 2021, 37(9): 173-178.

(下转第 140 页)