

# 不同品种苹果籽总酚含量与抗氧化相关性研究

徐颖<sup>1,2</sup>, 樊明涛<sup>1,\*</sup>, 冉军舰<sup>3</sup>, 程拯良<sup>1</sup>, 戚一曼<sup>1</sup>

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

2.陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021; 3.河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:**为探讨苹果籽总酚含量与抗氧化相关性及其抗氧化的物质基础,以7个品种苹果籽为材料,采用Folin-Ciocalteu法测定总酚含量,FRAP法、ABTS<sup>+</sup>·法、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除法、·OH清除法和DPPH自由基清除法评价抗氧化活性,高效液相色谱法进行多酚成分分析。结果表明:7个品种苹果籽总酚含量范围为5.74~17.44 mg GAE/g(以干质量计),抗氧化性优于茶多酚、VC和2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT),蜜脆苹果籽具有最高的总酚含量和最好的抗氧化能力。除DPPH自由基清除法外,多酚含量与其他4种方法测得的抗氧化数据具有显著正相关( $r=0.771\sim0.984$ )。根皮苷为苹果籽多酚抗氧化的主要成分。

**关键词:**苹果籽; 总酚; 抗氧化; 相关性

## Correlation between Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Apple Seeds from Seven Cultivars

XU Ying<sup>1,2</sup>, FAN Mingtao<sup>1,\*</sup>, RAN Junjian<sup>3</sup>, CHENG Zhenggen<sup>1</sup>, QI Yiman<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

3. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the correlation between the total phenolic content and antioxidant activity in apple seeds from seven cultivars. The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method, the antioxidant activity was evaluated by total reducing capacity, 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS) scavenging, superoxide anion scavenging, hydroxyl free radical scavenging and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assays, and the polyphenol composition of apple seeds was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). It was shown that Honeycrisp exhibited the highest total phenolic content and the best antioxidant properties among seven apple cultivars. Antioxidant activity of polyphenols in apple seeds was significantly positively correlated with total phenolic content ( $r = 0.771\sim0.984$ ), with the exception of DPPH scavenging capacity. Compared to tea polyphenols, vitamin C (VC) and 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), apple seed polyphenols exhibited better antioxidant activity. Phloridzin, which accounted for 79.76%~86.67% of the total phenolic content as determined by HPLC, was the dominant antioxidant component in apple seeds. Polyphenols extracted from apple seeds could have a wide application prospect because they act as the safe, non-toxic natural antioxidants.

**Key words:** apple seeds; total phenolic; antioxidant; correlation

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)01-0079-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201501015

苹果籽是苹果渣的主要成分之一,对苹果渣进行烘干、分离处理,可得到大量干苹果籽。我国是世界上苹果产量最大的国家之一,年产量约3 500万 t,其中30%左右用于果汁果酱加工。按鲜果与产生果渣的比例约为5:1<sup>[1]</sup>推算,每年产生果渣约200万 t,苹果籽约2.4万 t。

苹果籽营养丰富,蛋白含量34%,脂肪含量27.7%<sup>[2]</sup>,还含有多酚类物质。苹果多酚(apple polyphenols, AP)是苹果次生代谢产物,是苹果中所含多元酚类物质的总称,苹果籽多酚的种类丰富,主要有二氢查尔酮类(dihydrochalcones)、对羟基肉桂酸类

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130204110032)

作者简介: 徐颖(1978—),女,讲师,博士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail: xuying@sust.edu.cn

\*通信作者: 樊明涛(1963—),男,教授,博士,主要从事食品安全研究。E-mail: fanmt@nwsuaf.edu.cn

(hydroxycinnamic acids)、黄烷-3-醇类(flavan-3-ols)和黄酮醇类(flavonols)。含量较高的物质有根皮苷(phloridzin)、绿原酸(chlorogenic acid)、原花青素B<sub>2</sub>(procyanidin B<sub>2</sub>)和表儿茶素(epicatechin)<sup>[3-4]</sup>。苹果多酚可以通过清除氧自由基而保护机体免受氧化应激的影响<sup>[5-6]</sup>。此外,还可作为还原剂、氢供体以及金属螯合剂起到抗氧化的作用<sup>[7]</sup>。目前,市场上出现了添加葡萄籽提取物、石榴籽提取物的化妆品,对苹果籽进行加工利用,同样具有可观经济价值。

体外抗氧化活性的测定方法有铁离子还原法(ferric reducing/antioxidant power, FRAP)、ABTS<sup>+</sup>·清除法、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除法、·OH清除法、DPPH自由基清除法等。本实验采用上述几种方法综合评价苹果籽多酚的抗氧化性。目前,研究苹果皮抗氧化性的文献[8-11]报道较多,但是对苹果籽抗氧化性的研究较少。本实验对7种苹果籽总酚含量及其体外抗氧化活性进行测定,探讨其相关性及其抗氧化机制,为苹果籽多酚的加工利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

选取具有代表性的7个苹果品种,分别为秦阳、红盖露、黄元帅、红星、蜜脆、富士和秦冠,其中秦阳、红盖露为早熟品种,黄元帅、红星和蜜脆为中熟品种,富士和秦冠为晚熟品种。样品均为采自种于西北农林科技大学园艺场的10年生苹果树的成熟果实。

根皮苷标准品(纯度>99.8%); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, 相对分子质量394.3); 三吡啶三咪唑(2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ, C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>, 相对分子质量312.34); 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>, 相对分子质量548.68); Folin-酚试剂; 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, BHT); 色谱甲醇; 其他试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

高效液相色谱(含1525二元泵, 2998双通道紫外检测器, 2707自动进样器, Breeze色谱管理软件等) 美国Waters公司; SHB-III循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司; R-200型旋转蒸发器 瑞士Büchi公司; cp2245型分析天平 德国Sartorius公司; Milli-Q超

纯水仪 美国Millipore公司; KQ-2500E型数控超声波清洗器 昆山禾创有限公司; UV-2800型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

准确称取1.00 g苹果籽样品于研钵中, 加10 mg VC防止氧化, 加入30 mL甲醇, 充分研磨, 转移到100 mL三角瓶中, 超声提取30 min, 用旋转蒸发仪40 °C条件下浓缩至干, 用甲醇溶解残留物定容至10 mL, 此为苹果籽多酚样品液, 过0.45 μm滤膜, 用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析苹果籽多酚组成, 同时用于总酚含量测定和抗氧化活性分析。取0.2 g VC, 用水定容至100 mL, 取0.1 mL用水定容至10 mL, 此时VC溶液质量浓度为20 μg/mL。取0.2 g BHT, 用甲醇定容至100 mL, 取0.1 mL用甲醇定容至10 mL, 此时BHT溶液质量浓度为20 μg/mL。以20 μg/mL VC和20 μg/mL BHT溶液作为对照。

#### 1.3.2 总酚含量测定

采用Folin-Ciocalteu法测定总酚含量<sup>[12]</sup>。取0.5 mL没食子酸标准液或样品溶液与5 mL蒸馏水混合, 再加入1 mL的Folin-Ciocalteu反应液。室温下放置10 min后与3 mL 15% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液混合均匀, 避光反应2 h, 于765 nm波长处测定吸光度。以蒸馏水为空白对照。标准曲线回归方程:  $y=0.1208x+0.0021$  ( $R^2=0.9998$ )。总酚含量以没食子酸计, 单位为mg GAE/g(以干质量计, 下同)。

#### 1.3.3 色谱条件<sup>[13]</sup>

色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相A: 体积分数1%的乙酸水溶液, 流动相B: 甲醇; 梯度洗脱时间程序: 0~10 min, 5%~30% B; 10~25 min, 30%~50% B; 25~35 min, 50%~70% B; 35~40 min, 70%~5% B; 柱温为30 °C; 流速为1.0 mL/min; 进样量为20 μL; 检测器为紫外检测器, 检测波长为280 nm。

#### 1.3.4 体外抗氧化活性测定

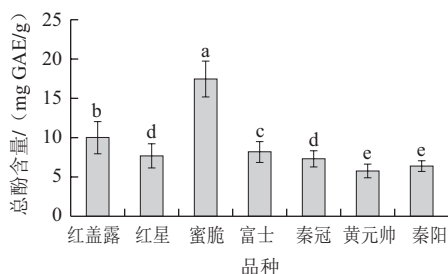
采用FRAP法测定, 参照Benzie等<sup>[14]</sup>的方法; ABTS<sup>+</sup>·清除率测定, 参照Re等<sup>[15]</sup>的方法; O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除率测定, 参照聂凌鸿等<sup>[16]</sup>的方法; ·OH清除率测定, 参照李艳伏等<sup>[17]</sup>的方法。

### 1.4 数据分析

采用SPSS17.0 Pearson法进行相关分析, Duncan法进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 7种苹果籽总酚含量



小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图1 7种苹果籽总酚含量

Fig.1 Total polyphenol contents of apple seed extracts of seven cultivars

由图1可知, 蜜脆籽的总酚含量最高, 为17.44 mg GAE/g, 显著高于其他品种, 其他品种总酚含量按照由高到低顺序依次为红盖露、富士、红星、秦冠、秦阳, 黄元帅最低 (5.74 mg GAE/g), 仅为蜜脆籽总酚含量的1/3。

### 2.2 抗氧化活性

#### 2.2.1 总还原力和4种自由基清除能力

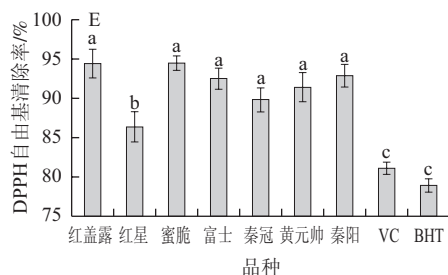
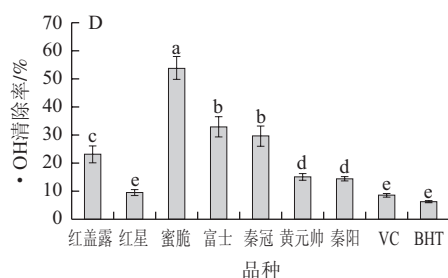
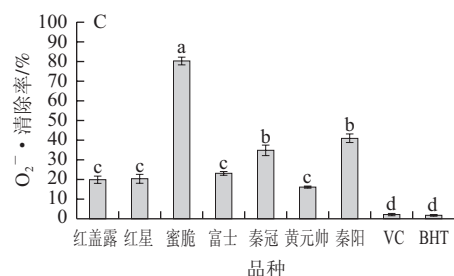
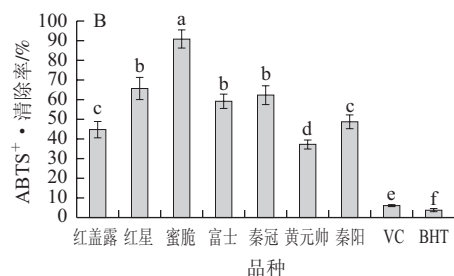
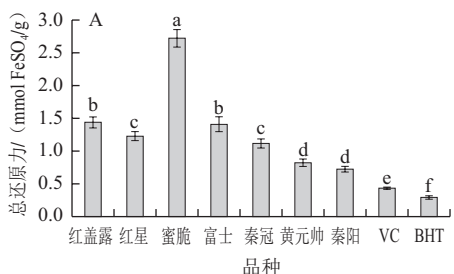


图2 7种苹果籽多酚的还原力和自由基清除能力

Fig.2 Reducing power and radical scavenging activity of apple seed polyphenols of seven cultivars

由图2A可知, 7种苹果籽多酚的总还原能力在0.729~2.725 mmol FeSO<sub>4</sub>/g (以干质量计, 下同)。蜜脆籽多酚总还原能力显著高于其他品种, 红盖露、富士、红星、秦冠次之, 黄元帅、秦阳较弱。由图2B可知, 7种苹果籽多酚的ABTS<sup>+</sup>·清除率为37.14%~90.86%。蜜脆籽多酚的清除率显著高于其他品种, 红星、秦冠、富士、秦阳次之, 红盖露、黄元帅较弱。由图2C可知, 7种苹果籽多酚的O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除率为16.10%~80.32%。蜜脆籽多酚的清除率显著高于其他品种, 秦阳、秦冠次之, 富士、红星、红盖露、黄元帅较弱。由图2D可知, 7种苹果籽多酚的·OH清除率为9.49%~53.62%。蜜脆籽多酚的清除率显著高于其他品种, 富士、秦冠、红盖露次之, 黄元帅、秦阳、红星较弱。由图2E可知, 苹果籽多酚对DPPH自由基的清除效果均较好, 除红星外, 其余6个品种的清除率均在90%以上, 差异不显著。蜜脆、红盖露籽多酚的清除率最高, 其余依次为秦阳、富士、黄元帅、秦冠、红星。

#### 2.2.2 苹果籽多酚与3种抗氧化剂清除自由基能力比较

自由基清除率达到50%时所对应的抗氧化剂的浓度即半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 可以评价其抗氧化能力<sup>[18]</sup>。由表1可知, 苹果籽多酚对ABTS<sup>+</sup>·、O<sub>2</sub><sup>-</sup>·、·OH 3种自由基的清除能力约是茶多酚的4倍, 对DPPH自由基的清除能力约是茶多酚的10倍; 苹果籽多酚对4种自由基清除能力依次是VC的8.7、28.6、16.8、17.7倍, 依次是BHT的30、60、31、117倍。因此, 苹果籽多酚的抗氧化能力明显优于茶多酚、VC和BHT。

表1 苹果籽多酚与3种抗氧化剂IC<sub>50</sub>  
Table 1 IC<sub>50</sub> of apple seed polyphenols and three antioxidants

样品	ABTS <sup>+</sup> ·	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·	·OH	DPPH自由基
苹果籽多酚	20.04±1.54	6.23±0.08	0.97±0.03	0.34±0.01
茶多酚	87.50±4.22	24.30±2.06	4.78±0.52	3.71±0.82
VC	174.00±6.87	178.05±7.63	16.30±1.48	6.03±0.73
BHT	601.12±10.24	374.07±8.36	30.08±2.78	40.00±3.06

2.3 苹果籽总酚含量与抗氧化性相关分析

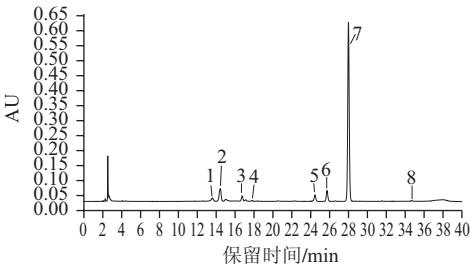
表2 苹果籽总酚含量与抗氧化性相关分析  
Table 2 Correlation between total phenolic content and antioxidant activity of apple seeds

指标	总酚含量	FRAP	ABTS <sup>+</sup> ·清除率	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·清除率	·OH清除率	DPPH自由基清除率
总酚含量	1					
FRAP	0.984**	1				
ABTS <sup>+</sup> ·清除率	0.808*	0.842*	1			
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·清除率	0.825*	0.771*	0.809*	1		
·OH清除率	0.854*	0.877*	0.792*	0.785*	1	
DPPH自由基清除率	0.486	0.406	0.009	0.426	0.557	1

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

由表2可知，总酚含量和FRAP值在0.01水平极显著正相关，除DPPH自由基清除率外，总酚含量和其他3种方法所得的自由基清除率在0.05水平显著正相关。因此在以后的苹果籽抗氧化评价中，可以通过测定多酚含量来初步预测其抗氧化能力，这样能大幅度减少实验工作量。

2.4 苹果籽多酚抗氧化的物质基础



1.儿茶素；2.原花青素B<sub>2</sub>；3.绿原酸；4.表儿茶素；  
5.阿魏酸；6.金丝桃苷；7.根皮苷；8.槲皮素。

图3 蜜脆苹果籽多酚高效液相色谱

Fig.3 Chromatograms of Honeycrisp apple seed polyphenols

以蜜脆苹果籽多酚色谱图为例，其余品种未列出，由图3可知，苹果籽多酚主要有根皮苷、金丝桃苷、绿原酸、儿茶素、原花青素B<sub>2</sub>、表儿茶素、5-阿魏酸、槲皮素等，其中含量最多的多酚是根皮苷，7个品种中，根皮苷含量占总酚含量的79.76%~86.67%，说明根皮苷是苹果籽主要的多酚物质和抗氧化成分。

3 讨论

根皮苷属于二氢查尔酮类，是根皮素的葡萄糖

苷，Lu等<sup>[19]</sup>研究发现，根皮苷约占苹果籽多酚的75%，Fromm等<sup>[3]</sup>研究发现，根皮苷占苹果籽单体多酚的79%~92%。Lu等<sup>[20]</sup>对苹果渣多酚抗氧化及自由基清除作用研究表明，根皮苷具有较强的抗氧化活性，对DPPH自由基清除能力约为VE的2倍，对超氧阴离子自由基清除能力约为VE的2.5倍。本研究表明苹果籽多酚的抗氧化性明显优于茶多酚、VC和BHT，这主要是以根皮苷为主的各种多酚协同作用的结果。多酚由于含有多羟基结构，可以起清除自由基的作用，其机理主要有3种<sup>[21]</sup>：一是提供氢原子给自由基，使自由基变成稳定物质， $ArOH + R \cdot \rightarrow ArO \cdot + RH$ ；二是通过电子转移使自由基变成稳定物质， $ArOH + R \cdot \rightarrow ArO \cdot + R^-$ ；三是螯合金属离子，阻止金属离子引发自由基反应， $H_2O_2 + M^{n+} \rightarrow OH^- + \cdot OH + M^{(n+1)+}$ 。例如，多酚能够供氢生成稳定的物质而将超氧阴离子自由基清除，通过电子转移将DPPH自由基、 $ABTS^+ \cdot$ 清除，通过与 $Fe^{2+}$ 螯合，阻止 $Fe^{2+}$ 催化生成 $\cdot OH$ 的反应而将羟自由基清除。

蜜脆是美国明尼苏达大学园艺系以“Macoun”与“Honeygold”杂交培育而成的中熟苹果新品种。2001年引入陕西，2006年12月通过陕西省果树品种审定委员会审定并命名<sup>[22]</sup>。研究发现实验的7个品种中，蜜脆苹果籽具有最高的总酚含量和最好的抗氧化能力。蜜脆苹果不仅口感甜脆，而且籽的抗氧化性能也很优良，以后的生产实践可以对蜜脆品种加以重视。

4 结论

实验的7个品种苹果籽多酚均具有较强的抗氧化能力，蜜脆苹果籽具有最高的总酚含量和最好的抗氧化能力。除DPPH自由基法外，多酚含量与FRAP值、 $ABTS^+ \cdot$ 清除率、 $O_2^- \cdot$ 清除率、 $\cdot OH$ 清除率具有显著正相关性。根皮苷为苹果籽多酚抗氧化的主要成分。苹果籽多酚的抗氧化性优于茶多酚、VC和BHT，与人工合成的抗氧化剂相比，从苹果籽中提取的多酚物质作为安全天然、无毒的抗氧化剂，具有广泛的应用范围和销售市场，对保证食品质量安全具有深远意义。

参考文献：

[1] 于修焯, 李志西, 杜双奎. 苹果籽脂肪酸组成成分分析初报[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(1): 155-156.  
[2] 李志西, 李元瑞, 于修焯, 等. 苹果籽及其油的理化特性研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(11): 71-73.  
[3] FROMM M, SANDRA B, CARLE R, et al. Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(5): 1232-1242.



- [4] FROMM M, LOOS H M, BAYHA S, et al. Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds[J]. Food Chemistry, 2013, 136(8): 1277-1287.
- [5] AUCLAIR S, SILBERBERG M, GUEUX E, et al. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(14): 5558-5563.
- [6] KO S H, CHOI S W, YE S K, et al. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma[J]. Journal of Medicinal Food, 2005, 8(1): 41-46.
- [7] ALONSO-SALCES R M, BARRANCO A, ABAD B, et al. Polyphenolic profiles of *Basque cider* apple cultivars and their technological properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(10): 2938-2952.
- [8] van der SLUIS A A, DEKKER M, de JAGER A, et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year and storage conditions[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(8): 3606-3613.
- [9] WOLFE K, LIU R H. Antioxidant activity of apple peels[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(3): 609-614.
- [10] CHINNICI F, BENDINI A, GAIANI A, et al. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(15): 4684-4689.
- [11] DROGOUDI P D, MICHAILIDIS Z, PANTELIDIS G. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars[J]. Scientia Horticulturae, 2008, 115(2): 149-153.
- [12] CHAOVANALIKIT A, WROLSTAD R E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties[J]. Food Chemistry and Toxicology, 2004, 69(1): 67-72.
- [13] 冉军舰, 樊明涛, 赵政阳, 等. 高效液相色谱法测定不同品种苹果芽中根皮苷的含量[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 1-7.
- [14] BENZIE I F F, STRAIN J J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [15] RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9): 1231-1237.
- [16] 聂凌鸿, 宁正祥. 广东淮山水溶多糖的分离纯化及体外抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11): 129-133.
- [17] 李艳伏, 徐怀德, 陈金海. 木瓜蛋白酶水解核桃粕蛋白产物抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 8-14.
- [18] 齐高强, 赵忠, 李巨秀. 山杏种皮提取物体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 40-45.
- [19] LU Y, FOO L. Constitution of some chemical components of apple seed[J]. Food Chemistry, 1998, 61(1): 29-33.
- [20] LU Y, FOO L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68(2): 81-85.
- [21] LEOPOLDINI M, MARINO T, RUSSO N, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism[J]. Journal of Physical Chemistry A, 2004, 108(22): 4916-4922.
- [22] 郭学军, 王小军, 马峰旺. 蜜脆苹果的生长习性及其栽培要点[J]. 西北园艺, 2009(8): 33-34.