DOI:10.12441/spyswjs.20230216001 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0153-10

红糖中酚类化合物的抗氧化活性研究

陈荣华[1,2] 王明伟[1,2] 江 波[1,2] 陈静静[1,2*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:为探究红糖的抗氧化活性及其成分,作者首先采用叔丁基过氧化氢(*tert*-butyl hydroperoxide,*t*-BHP)诱导的Caco-2细胞作为氧化损伤模型,以评估红糖提取物对细胞存活率、细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平和细胞抗氧化能力(cellular antioxidant activity,CAA)的影响,并采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术对红糖中的主要活性成分——酚类化合物进行分析。结果表明,红糖提取物能够改善由*t*-BHP造成的细胞凋亡,可显著降低细胞内ROS水平,具有一定的抗氧化活性,每克红糖提取物的CAA值相当于12.27 μmol槲皮素。另外,红糖提取物中含有原儿茶酸、香草酸、绿原酸、氯化矢车菊素、香豆素和芹菜素等酚类化合物。该研究为红糖及红糖提取物的活性研究和相关功能性产品的开发提供了理论依据。

关键词:细胞试验;氧化应激;酚类化合物;活性氧检测;细胞抗氧化活性

Study on Antioxidant Activities of Phenolic Compounds in Non-Centrifugal Sugar

CHEN Ronghua[1,2] *WANG Mingwei*[1,2] *JIANG Bo*[1,2] *CHEN Jingjing*[1,2*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate the antioxidant activity of non-centrifugal sugar, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-induced Caco-2 cells were used as the model of oxidative damage to assess the effects of non-centrifugal sugar crude extracts on cell viability, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, and cellular antioxidant activity (CAA). Additionally, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was employed to analyze the main active phenolic compounds in non-centrifugal sugar. The results demonstrated that the non-centrifugal sugar extract could alleviate apoptosis induced by *t*-BHP, significantly reduce intracellular ROS levels, and exhibit notable antioxidant activity. The CAA value of the non-centrifugal sugar extract was equivalent to 12.27 μmol quercetin per gram of extract. Moreover, the non-centrifugal sugar extract contained phenols substances such as protocatechuic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, cyanidin chloride, coumarin, and apigenin. This study provides a theoretical foundation for exploring the bioactivity of non-centrifugal sugar and its extracts, as well as the development of related functional products.

Keywords: cellular assays; oxidative stress; phenolic compounds; reactive oxygen species detection; cellular antioxidant activity

红糖是一种传统的糖制品[1],中医认为其具有 活血化瘀、缓中止痛、益气补血等作用[2]。红糖的

基金项目:崇左市科技计划项目(FA2020015)。

通信作者:陈静静(1986—),女,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事食品活性组分的分离纯化与生物活性研究。E-mail: jingjinc@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-02-16 **修回日期:**2023-04-20

制作包括6个步骤：切割甘蔗、榨取果汁、澄清果汁、加热蒸发得到糖浆、加热浓缩得到半固体产品、倒入模具冷却[3-4]。由于其精炼程度较低，甘蔗汁中的营养成分几乎没有损失，因此红糖中含有多种矿物质、维生素、酚类化合物等。研究表明，红糖具有一定的抗氧化活性，但关于红糖提取物在细胞层面的抗氧化研究很少。作者拟在细胞水平上对红糖提取物的抗氧化活性及成分进行初步探究。

MTT法和CCK-8法是测试细胞毒性的常见方法[5]，为了确定红糖提取物是否具有细胞毒性，作者选用CCK-8法测定细胞毒性[6]。在CCK-8试验过程中，WST-8的染料被细胞中的脱氢酶还原，形成水溶性的橙色产物。细胞脱氢酶产生量与活细胞的数量相关，可以通过微孔板阅读器记录485 nm处的吸光度来评估细胞存活率[7]。同时，利用*t*-BHP诱导Caco-2细胞产生氧化损伤，构建氧化损伤模型以探讨红糖提取物对细胞的保护作用。CAA法可检测细胞抗氧化活性，能够直接评估细胞的氧化应激能力[8]。该方法通过测定抗氧化剂抑制细胞内2’，7’-二氯荧光素二乙酸酯（2’，7’-dichlorodihydrofluorescein diacetate，DCFH-DA）探针氧化的能力来评估抗氧化能力。DCFH-DA能监测细胞内过氧化自由基，非极性特性使其可以快速穿过细胞膜并在细胞内被脱乙酰化为2’，7’-二氯二氢荧光素（2’，7’-dichlorodihydrofluorescein，DCFH）[9]。向反应体系中加入自由基发生器2，2-偶氮二（2-甲基丙基咪）二盐酸盐（2，2’-azobis（2’-methylpropionamidine）dihydrochloride，AAPH）促进细胞内产生自由基，可与细胞内本身存在的内源性ROS一起，使细胞内的DCFH转变为能够发荧光的2’，7’-二氯荧光素（2’，7’-dichlorofluorescein，DCF）。此时，如果外源性抗氧化剂能够进入细胞，可猝灭自由基防止DCFH被氧化成DCF[10]。

红糖中的酚类化合物与其降低胆固醇和减肥的功效相关[11]，是红糖中的主要活性成分。酚类化合物是指在同一苯环上具有多个酚羟基官能团的化合物，具有很强的抗氧化活性。酚类化合物的抗氧化机制有2种：一是酚类化合物直接作用于自由基、螯合金属离子或抑制氧化酶活性以减缓氧化过程[12-15]；二是增强体内抗氧化酶的活性或保护其免受损伤[16-17]。因此，推测红糖中的酚类化合物可能是其抗氧化活性的来源。作者在细胞水平上对红糖提取物进行抗氧化活性研究，并检测红糖提取物中酚类化合物的种类与质量分数，为红糖及红糖提取物的活性研究和相关功能性产品的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红糖：南京甘汁园糖业有限公司；DMSO：北京索莱宝科技有限公司；HBSS缓冲液、TrypLE™ Select酶：美国赛默飞世尔科技公司；DCFH-DA探针：上海碧云天生物技术有限公司；黑色96孔板：美国康宁公司；*t*-BHP：国药集团化学试剂有限公司；AAPH：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胎牛血清：康宁（中国）有限公司；DMEM培养基、CCK-8试剂盒、PBS缓冲液、青霉素/链霉素抗生素、细胞培养板、细胞培养瓶：生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2 仪器与设备

分析天平：XPR226CDR型，梅特勒托利多仪器（上海）有限公司；pH计：FE20型，梅特勒托利多仪器（上海）有限公司；恒温水槽：HS-800D型，上海一恒科学仪器有限公司；台式高速离心机：TGL-15B型，上海安亭科学仪器厂；超声波清洗器：KM-100DE型，上海科导超声仪器有限公司；超低温冰箱（−80 ℃）：905-ULTS型，美国赛默飞世尔科技公司；倒置显微镜：Axio Vert A1型，德国蔡司公司；CO_2恒温培养箱：INC246型，德国美墨尔特有限公司；酶标仪：Spectra Max M2型，美国伯乐公司。

1.3 试验方法

1.3.1 红糖提取物的制备

称取20 g红糖，以水为溶剂，料液比为1 g∶20 mL，提取时间为150 min，提取温度为90 ℃。旋蒸提取液，浓缩得到共21.57 g液体。取旋蒸后的液体冷冻干燥48 h，得到红糖提取物。

1.3.2 Caco-2细胞传代

Caco-2细胞在DMEM培养基中生长，培养箱条件为37 ℃、CO_2体积分数5%。当细胞生长2~3 d至对数生长期，即培养瓶中细胞即将长满时，可以进行传代操作。取出培养瓶，倒掉培养瓶中的原培养基，加入5 mL PBS缓冲液，清洗细胞15 s后弃去PBS缓冲液。然后加入1 mL的TrypLE™ Select酶，使其浸没培养瓶底部的细胞，并将培养

瓶放回培养箱中消化1 min。取出培养瓶置于显微镜下观察，轻拍培养瓶底部使细胞变圆并从瓶底脱落。随后加入5 mL完全培养基终止消化。使用移液管轻轻吹打培养瓶中的细胞，进一步使细胞分散。将细胞悬液转移至15 mL离心管中，于1 000 r/min离心1 min。离心完成后，小心移除上清液，保留底部的细胞沉淀。向离心管中加入3 mL完全培养基，轻轻吹打使细胞分散均匀。最后，从重悬的细胞悬液中吸取1 mL培养基加到含有5 mL完全培养基的新培养瓶中，放入培养箱中继续培养。

1.3.3 *t*-BHP诱导Caco-2细胞氧化应激模型的建立

过氧化氢是构建细胞氧化应激模型最常用的物质[18]，在过氧化氢的刺激下，细胞会发生连接减弱的情况；同时，过氧化氢在细胞中会引起炎症反应，导致细胞损伤[19]。与过氧化氢相比，*t*-BHP不仅可以构建细胞氧化损伤模型，还能用于研究天然化合物对细胞的保护作用[20]。Chen等[21]研究发现橙皮苷能保护肝细胞免受*t*-BHP诱导的细胞损伤。Aherne等[22]研究了黄酮类化合物对*t*-BHP和甲萘醌诱导的Caco-2细胞DNA单链断裂的保护作用。Ramos等[23]比较了槲皮素、熊果酸和芦丁对*t*-BHP诱导的HepG-2细胞氧化损伤的保护作用。

将细胞接种在96孔板中，每孔约为2×10^5个细胞。设置细胞培养箱的条件为37 ℃、CO_2体积分数5%、相对湿度95%，将培养瓶放入培养箱培养24 h。在显微镜下观察细胞，当细胞即将长满时，可以进行氧化应激模型的建立。取143 μL质量分数70%的*t*-BHP，加入10 mL去离子水配成100 mmol/L的母液，再用完全培养基将其分别稀释为50、100、150、200、250 μmol/L的*t*-BHP溶液。

将96孔板中的完全培养基吸出，用PBS清洗一遍，再加入含有不同浓度*t*-BHP的培养基，在培养箱中继续培养12 h。每孔加入20 μL的CCK-8溶液，37 ℃培养1 h，待溶液变红后，通过酶标仪测定样品在485 nm处的吸光度，并按式(1)计算细胞存活率。

$$W=(A_s-A_k)/(A_d-A_k)\times100\% \quad (1)$$

式中：

W——细胞存活率，%；

A_s——试验孔的吸光度，包含细胞、CCK-8溶液和红糖提取物；

A_k——空白孔的吸光度，包含CCK-8溶液但没有细胞；

A_d——对照孔的吸光度，包含细胞、CCK-8溶液但没有红糖提取物。

1.3.4 细胞存活率的测定

接种及培养方式同1.3.3，将接种后的96孔板放入培养箱培养24 h。在显微镜下观察细胞，当细胞即将长满时进行细胞存活率的测定。空白组仅加入培养基、不含细胞；对照组加入细胞和培养基；处理组分为：150 μmol/L *t*-BHP、150 μmol/L *t*-BHP加不同质量浓度红糖提取物(质量浓度分别为100、200、300、400、500、1 000 μg/mL)。处理组、空白组与对照组均设6个复孔，培养12 h后，用CCK-8法检测细胞存活率。

1.3.5 细胞内ROS水平的测定

接种及培养方式同1.3.3，将接种后的96孔板放入培养箱中培养24 h。在显微镜下观察细胞，当细胞即将长满时，进行细胞内ROS水平的测定。各组的操作方式参考1.3.4，每组各设6个复孔，培养12 h。按照ROS检测试剂盒说明书检测细胞内ROS水平。用无血清培养基以体积比1∶1 000稀释DCFH-DA，使其终浓度为10 μmol/L。吸出原培养基，加入200 μL稀释后的DCFH-DA溶液，在37 ℃，CO_2体积分数5%的培养箱中培养20 min。用PBS清洗3次，洗去残留在细胞外的DCFH-DA。设置酶标仪的激发波长为488 nm，发射波长为525 nm。细胞内ROS水平按式(2)计算。

$$R=F/F_0\times100\% \quad (2)$$

式中：

R——细胞内ROS水平，%；

F——损伤模型组或药物干预组的荧光强度；

F_0——对照组的荧光强度。

1.3.6 细胞抗氧化活性的测定

将培养至15~40代的细胞接种到黑色96孔板中，接种量约为2×10^5个/孔。在培养箱中培养24 h后进行细胞抗氧化活性的测定。去除原培养基，用PBS清洗细胞表面。分别加入200 μL含有红糖提取物(质量浓度分别为0、50、100、200、400、500 μg/mL)和DCFH-DA荧光探针(30 μmol/L)的培养基，或加入含有槲皮素(浓度分别为0、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0 μmol/L)和DCFH-DA荧光探针(30 μmol/L)的培养基，每个样品设3个复孔。放入细

胞培养箱中培养 1 h，去除原培养基并使用 PBS 清洗细胞表面。每孔加入 200 μL 含有 AAPH（600 μmol/L）的 HBSS 缓冲液。检测荧光值，设置激发波长和发射波长分别为 485 nm 和 538 nm，每隔 5 min 测定 1 次，共检测 1 h。CAA 值的计算公式如式（3）所示[24]。

$$C = 100 - \int_0^{60} A_S / \int_0^{60} A_C \times 100 \quad (3)$$

式中：

C——CAA 值；

$\int_0^{60} A_S$——加入不同质量浓度红糖提取物后的时间（0~60 min）-荧光强度曲线下的积分面积；

$\int_0^{60} A_C$——空白对照组的时间（0~60 min）-荧光强度曲线下的积分面积；

红糖提取物的半数有效质量浓度（EC_{50}）根据 lg（C/D）对 lg G 的中效原理来计算。其中 C 为样品作用效应（CAA 值），D 为 100−CAA 值，G 为红糖提取物的质量浓度。EC_{50} 值以 3 次平行试验计算得出，将 EC_{50} 值转化为 CAA 值。红糖提取物的 CAA 值以每克红糖提取物中含有槲皮素的物质的量计（μmol/g）。

1.3.7 红糖中总酚质量分数测定

用去离子水分别配制 0.02 mg/mL 的没食子酸标准溶液、0.25 mol/L 的福林酚试剂和质量分数 15% 的 Na_2CO_3 溶液。分别取 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 的没食子酸标准溶液置于不同的试管中，并用去离子水将每个试管中的总体积补至 1 mL。接着向每管中加入 0.5 mL 福林酚试剂，静置 3 min 后再加入 1 mL 的 Na_2CO_3 溶液，静置 30 min。以 Na_2CO_3 溶液为空白对照，设置分光光度计波长为 760 nm，测定并记录各样品的吸光度，绘制标准曲线。采用相同的方法处理红糖提取物，根据吸光度和标准曲线计算红糖提取物中的总酚质量分数。

1.3.8 高效液相色谱法测定酚类化合物质量分数

分别配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的绿原酸、香豆素、原儿茶酸、咖啡酸、没食子酸、芹菜素、香草酸、氯化矢车菊素、木犀草素、阿魏酸的甲醇标准溶液，各取 1 mL 于试管中混匀，然后分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 混合标准溶液置于不同的试管中，用甲醇将每个试管的总体积补至 1 mL。对红糖提取物进行相同的稀释处理。于 12 000 r/min 离心 5 min，用 0.22 μm 的滤膜过滤，最后装入液相小瓶中，4 ℃下保存待测。

采用高效液相色谱法对 10 种酚类标准溶液、5 个梯度混合标准溶液和 3 个红糖提取物进行测定。通过比较各酚类标准品色谱图中的保留时间、混合标准品色谱图的保留时间和峰面积绘制 10 种酚类化合物的质量浓度响应曲线，并计算红糖提取物中 10 种酚类化合物的质量浓度。高效液相色谱条件为：C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm），检测波长 280 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。流动相 A 为 V（甲醇）∶V（乙酸）∶V（水）=10∶2∶88，流动相 B 为 V（甲醇）∶V（乙酸）∶V（水）=90∶2∶8，流量为 0.7 mL/min。流动相 A 按以下梯度程序洗脱：0~45 min，0~50%；45~70 min，50%~100%。

1.3.9 酚酸种类测定

采用 HPLC-MS/MS 对红糖提取物中的酚酸种类进行测定。HPLC 条件：色谱柱为 BEH C_{18}（2.1 mm×150 mm×1.7 μm），进样量 5 μL，柱温 45 ℃，检测波长 280 nm，流量 0.3 mL/min。流动相 A 为体积分数 0.1% 的甲酸，流动相 B 为体积分数 100% 的乙腈。动相 A 按以下梯度程序洗脱：0~40 min，100%~70%；40~45 min，70%~20%；45~50 min，20%~0；50~55 min，0~100%。质谱条件：电离模式为 ESI^+，毛细管电压 3 500 V，锥孔电压 30 V，离子源温度 100 ℃，脱溶剂气体温度 400 ℃，脱溶剂气体流量 700 L/h，锥形气体流量 50 L/h，碰撞能量 6 eV，探测器电压 1 800 V，质荷比（m/z）20~2 000。

1.4 数据处理

所有试验均重复 3 次，结果以平均值±标准偏差的形式表示。使用 SPSS 软件（IBM SPSS 20）对数据进行统计分析，Duncan 法做多重比较，$P<0.05$ 表示差异显著。使用 Origin 8.0 软件作图。

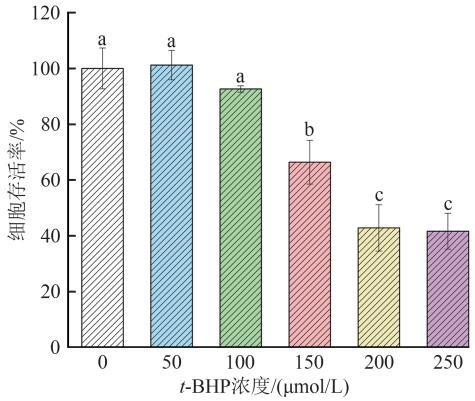
2 结果与讨论

2.1 细胞试验结果

2.1.1 *t*-BHP 作用浓度的确定

采用 CCK-8 法测定细胞存活率时，选择使细胞存活率接近 60% 的浓度作为损伤剂量，以建立 Caco-2 氧化损伤模型。如图 1 所示，除浓度为 50 μmol/L 的 *t*-BHP，其余浓度下的 *t*-BHP 均显著抑制了 Caco-2 细胞的生长。当浓度超过 150 μmol/L

时，细胞损伤过度，不适合作为细胞氧化损伤模型。当*t*-BHP浓度为150 μmol/L时，细胞存活率约为60%，因此选择150 μmol/L的*t*-BHP来构建Caco-2细胞损伤模型，且此浓度下的氧化损伤可恢复。



不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图1　*t*-BHP浓度对Caco-2细胞存活率的影响

Fig. 1　Effect of *t*-BHP concentration on the viability of Caco-2 cells

2.1.2　红糖提取物质量浓度的确定

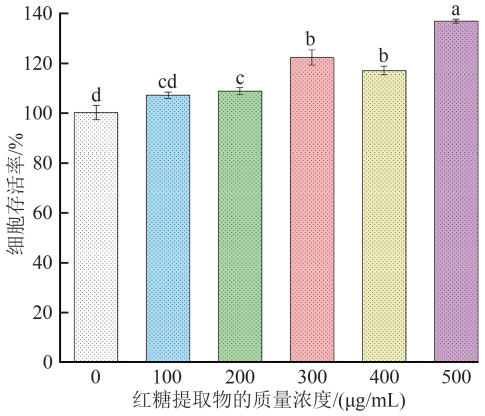
红糖提取物质量浓度为100~500 μg/mL时均未对细胞的增殖产生不利影响，见图2。红糖提取物可促进Caco-2细胞的增殖，因此后续试验中这5种质量浓度的红糖提取物均可选用。

2.1.3　红糖提取物对氧化应激细胞存活率的影响

红糖提取物质量浓度对氧化应激细胞存活率的影响见图3。对照组（仅添加*t*-BHP组）的细胞存活率显著下降，仅为71.26%。加入不同质量浓度的红糖提取物后，细胞存活率与对照组相比显著升高。当红糖提取物质量浓度为200、500 μg/mL时，细胞存活率分别是对照组的1.56倍和1.62倍。表明红糖提取物不仅能够显著提高Caco-2的细胞存活率，而且可以抑制*t*-BHP造成的氧化损伤。

2.1.4　红糖提取物对细胞内ROS水平的影响

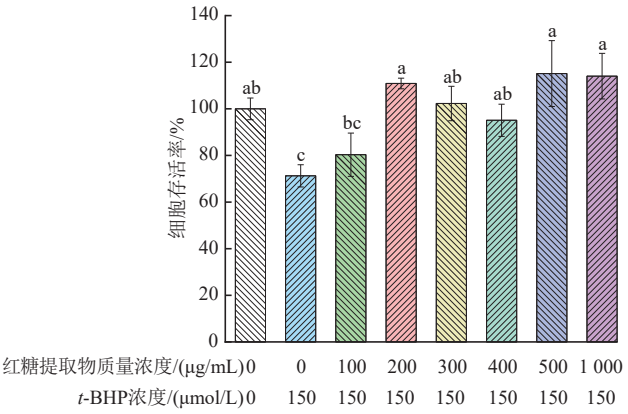
与空白对照组相比，添加了浓度为150 μmol/L的*t*-BHP后，Caco-2细胞内的ROS水平显著提高，见图4。随着红糖提取物质量浓度的升高，细胞内ROS水平逐渐下降，表明其对ROS的清除能力逐渐增强。当红糖提取物的质量浓度达到1 000 μg/mL时，ROS水平比对照组下降了30.19%，表明红糖提取物能够显著降低细胞内ROS水平，对细胞具有很好的保护作用。



不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图2　红糖提取物对Caco-2细胞存活率的影响

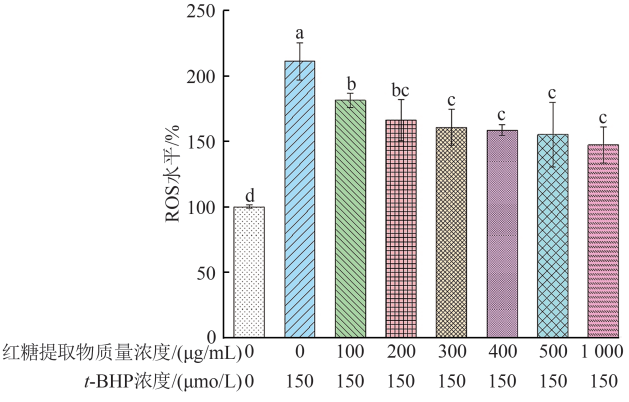
Fig. 2　Effect of non-centrifugal sugar extract on the viability of Caco-2 cells



不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图3　红糖提取物质量浓度对Caco-2细胞存活率的影响

Fig. 3　Effect of the mass concentration of non-centrifugal sugar extract on the viability of Caco-2 cells



不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

图4　红糖提取物质量浓度对Caco-2细胞内ROS水平的影响

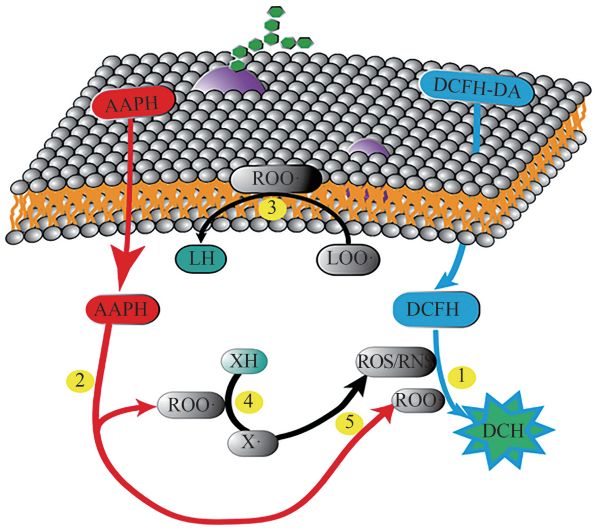
Fig. 4　Effect of the mass concentration of non-centrifugal sugar extract on ROS level in Caco-2 cells

2.1.5 红糖提取物对细胞抗氧化活性的影响

DCFH-DA 和抗氧化剂促进 ROS 猝灭的原理如图 5 所示。DCFH-DA 进入细胞后发生脱乙酰化，以 DCFH 的形式存在[9]。此时向反应体系中添加自由基发生器——AAPH，可促进细胞体系内产生自由基。这些外源性自由基与细胞内本身存在的内源性 ROS 一起，可以将细胞内的 DCFH 氧化成具有荧光性的 DCF。如果此时有外源性抗氧化剂进入细胞，就能够猝灭自由基防止 DCFH 被氧化成 DCF[10]，猝灭自由基的方式共 5 种：1）外源性抗氧化剂能够在 ROS 接触到 DCFH 染料之前竞争性地猝灭 ROS；2）与 AAPH 直接反应，防止自由基形成；3）抑制脂质过氧化；4）与烷基过氧自由基反应；5）抑制细胞内氧化[8]。

ROS 是一类氧衍生的小分子，包括氧自由基超氧化物（O_2^-•）、羟基（•OH）、过氧烷基（RO_2•）和烷氧基（RO•）以及某些非自由基等[25]，与多种疾病的发病机制密切相关[26]。在低浓度时，ROS 在调节细胞内信号传导和维持细胞内稳态方面具有重要作用，如抵御病原体入侵、清除恶性细胞、促进伤口愈合等[27]。当细胞受到外界刺激时，会产生大量的 ROS，为了应对这种氧化应激，细胞会提高抗氧化酶活性[28]。近年来，由于人们频繁暴露于污染物、药物、电离辐射、重金属离子等各种刺激物，这些外源性因素成为引发氧化应激的重要原因。与槲皮素结果类似，红糖提取物能够有效抑制细胞内的 DCFH 转化为 DCF，且随着红糖提取物质量浓度的增加，细胞内的荧光强度逐渐减弱，见图 6。

根据结果计算出 CAA 值，依据公式进一步计

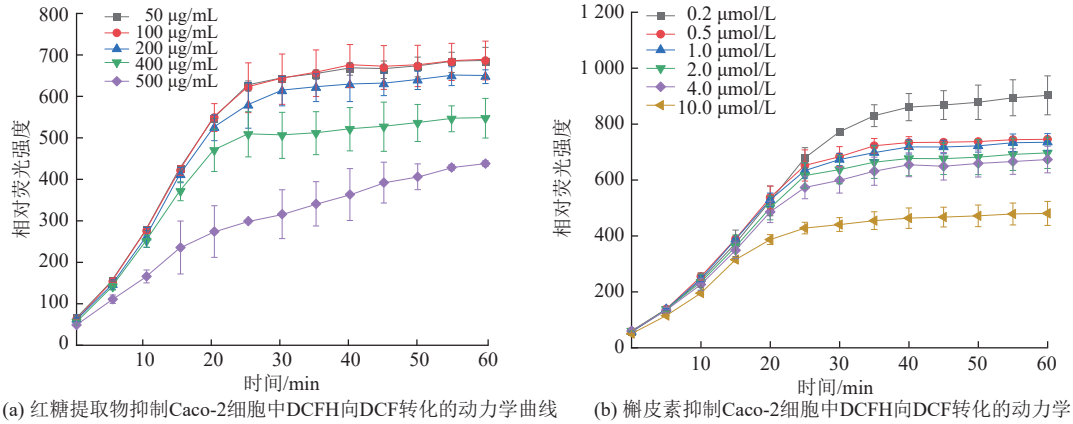


ROO• —烷基过氧自由基；ROS—活性氧；RNS—活性氮；XH/X• —抗氧化剂/抗氧化自由基；LH/LOO• —脂质过氧自由基。

图 5 抗氧化剂与 DCFH-DA 的作用机制

Fig. 5 Mechanism of action of antioxidants and DCFH-DA

算出 lg（*C*/*D*）及 lg *G*，并绘制红糖提取物的中效原理图，见图 7。拟合方程 lg（*C*/*D*）=1.705 1×lg *G*−5.083 1、lg（*C*/*D*）=2.064 4×lg *G*−5.583 5、lg（*C*/*D*）=1.852 4×lg *G*−5.388 6，尽管这 3 个试验得出的 R^2 并不高，但结合其他试验结果可知，其结果仍然可用[29]。EC_{50} 是根据中值效应曲线的线性拟合方程，在 *C*/*D*=1 时计算得出的质量浓度，计算出红糖提取物的 EC_{50} 为 758.32 μg/mL。同时参照 Wolfe 等[29]的研究，使用槲皮素作为标准品进行抗氧化试验，以槲皮素的质量浓度为横坐标，CAA 值为纵坐标作图，得到标准曲线 $y=18.745x^{0.433\,11}$，见图 8。通过该标准曲线求得对应的横坐标值，即为每克红糖提取



(a) 红糖提取物抑制Caco-2细胞中DCFH向DCF转化的动力学曲线 (b) 槲皮素抑制Caco-2细胞中DCFH向DCF转化的动力学曲线

图 6 红糖提取物、槲皮素抑制 Caco-2 细胞中 DCFH 向 DCF 转化的动力学曲线

Fig. 6 Kinetic curves of DCFH to DCF conversion in Caco-2 cells inhibited by non-centrifugal sugar extract and quercetin

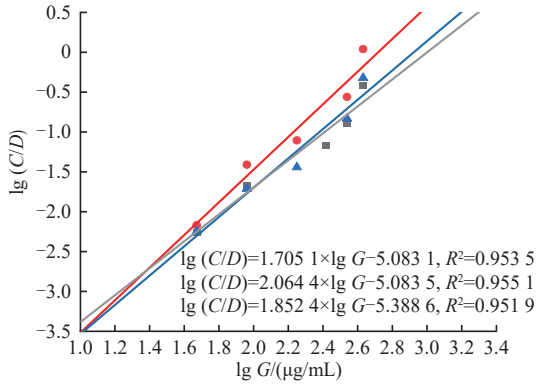


图 7　中效原理图

Fig. 7　Median effect plots

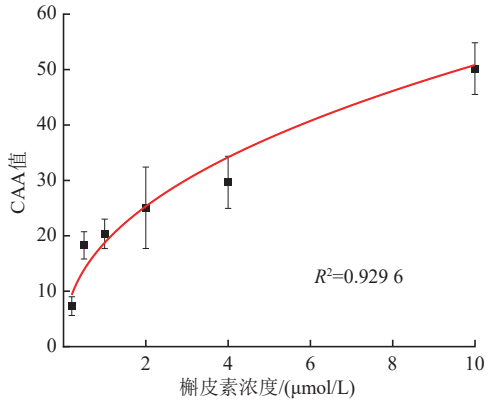


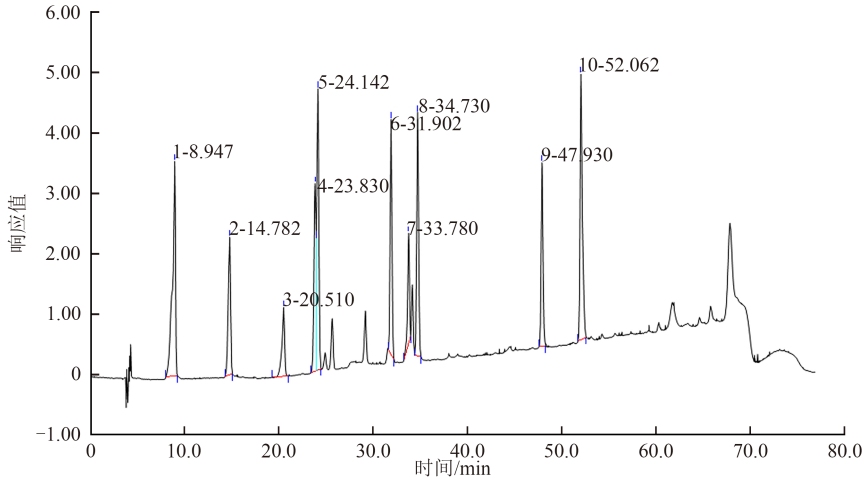
图 8　槲皮素抑制过氧自由基诱导 DCFH 氧化剂量反应曲线

Fig. 8　Dose-response curves for the inhibition of peroxyl radical-induced DCFH oxidation by quercetin

物中含有槲皮素的物质的量，从而计算出细胞的 CAA 值为 12.27 μmol/g。有研究表明，红糖提取物的抗氧化能力低于黑加仑酚类提取物和红茶酚类提取物，但高于荔枝果肉酚类提取物。由于该试验中使用的红糖酚类提取物是混合物，无法比较单独酚类化合物的抗氧化效果。在未来的研究中，作者将会对红糖提取物进行纯化，分离出不同的酚类化合物单体，然后按照红糖酚类提取物中主要酚类的质量比配制混合物，并对主要的酚类化合物单体和混合物的抗氧化活性进行比较。

2.2　红糖提取物中酚类化合物的质量分数

通过没食子酸标准曲线计算得到红糖中总酚质量分数为 5.91 mg/g。利用高效液相色谱对混合标准品和红糖提取液中的酚类化合物进行分离，色谱图见图 9~10。结果表明红糖中含有的 6 种酚类化合物种类和质量分数分别为：原儿茶酸（0.43±0.04）mg/g、香草酸（0.86±0.07）mg/g、绿原酸（1.41±0.03）mg/g、氯化矢车菊素（1.44±0.08）mg/g、香豆素（0.40±0.03）mg/g、芹菜素（0.11±0.02） mg/g 。推测红糖中酚类化合物质量分数可能与原料、生产商采用的工艺以及贮存条件等因素有关，而同一品种不同批次红糖间的总酚质量分数差别不大[30]。



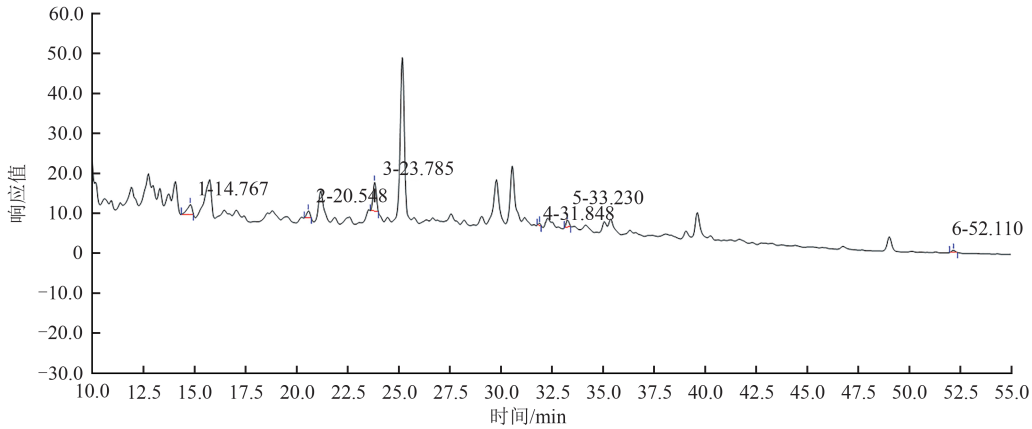
1—没食子酸；2—原儿茶酸；3—香草酸；4—绿原酸；5—咖啡酸；6—氯化矢车菊素；7—香豆素；8—阿魏酸；9—木犀草素；10—芹菜素。

图 9　10 种酚类化合物标准样品的高效液相色谱图

Fig. 9　High-performance liquid chromatography of ten standard samples of phenolic compounds

2.3　红糖提取物中的酚酸种类

采用 HPLC-MS/MS 测定红糖提取物的酚酸总离子流液相色谱图，见图 11。通过分析发现，除了 2.2 中鉴定的酚类化合物外，红糖提取物中还含有 2-羟基苯乙酸、4-羟基苯甲酸、6-甲基水杨酸、丁香酸、邻羟基肉桂酸和水杨酸，见表 1。



1—原儿茶酸；2—香草酸；3—绿原酸；4—氯化矢车菊素；5—香豆素；6—芹菜素。

图 10　红糖提取物中酚类化合物的高效液相色谱图

Fig. 10　High-performance liquid chromatography of phenolic compounds in non-centrifuge sugar extract

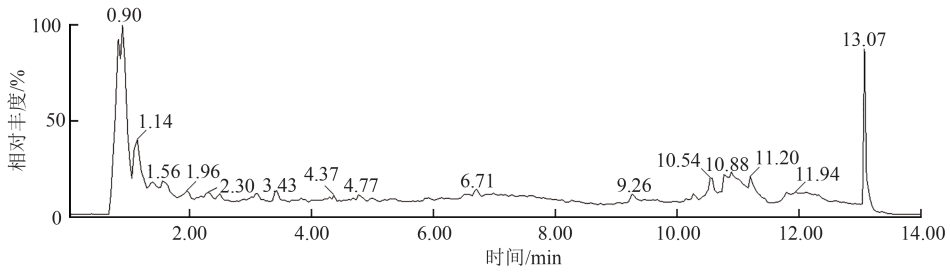
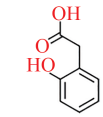
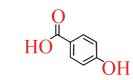
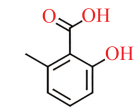
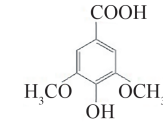
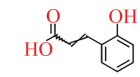
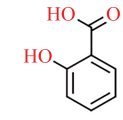


图 11　红糖提取物的总离子流液相色谱图

Fig. 11　Total ion flow chromatogram of non-centrifugal sugar extract

表 1　高效液相色谱串联质谱法鉴定的酚酸参数

Table 1　Parameters of phenolic acids identified by HPLC-MS/MS

化合物名称	保留时间/min	*m/z*	碰撞能量/eV	分子式	结构式
2-羟基苯乙酸	2.34	197.049 8	105，150	$C_8H_8O_3$	
4-羟基苯甲酸	3.24	137.024 9	68	$C_7H_6O_3$	
6-甲基水杨酸	2.34	197.049 8	105，150	$C_8H_8O_3$	
丁香酸	2.34	197.049 8	105，150	$C_8H_8O_3$	
邻羟基肉桂酸	1.14	327.092 2	493	$C_9H_8O_3$	
水杨酸	3.24	137.024 9	68	$C_7H_6O_3$	

3 结论

作者对红糖提取物的细胞抗氧化活性及其成分进行了研究。结果表明，红糖提取物能够有效降低由*t*-BHP诱导的细胞凋亡并改善细胞的氧化损伤，可显著降低细胞内ROS水平。当红糖提取物质量浓度为1 000 μg/mL时，细胞内ROS水平比对照组下降了30.19%，红糖提取物的CAA值达到了12.27 μmol/g。红糖提取物中含有原儿茶酸、香草酸、绿原酸、氯化矢车菊素、香豆素、芹菜素、2-羟基苯乙酸、4-羟基苯甲酸、6-甲基水杨酸、丁香酸、邻羟基肉桂酸和水杨酸等酚类化合物，可能是发挥抗氧化活性的物质。该研究为红糖及其相关产品的进一步研究和开发提供了理论依据。

参考文献

[1] 邵维明，徐广才.“互联网+”背景下云南腊勐小木榨红糖非物质文化遗产发展研究[J]. 农学学报，2021，11(1)：91-94.
SHAO W M，XU G C. The development of intangible cultural heritage of the wood-pressed brown sugar under the background of “Internet +” in lameng town，Longling county，Yunnan province [J]. Journal of Agriculture，2021，11(1)：91-94.(in Chinese)

[2] 车夏宁，陈海军，王宝，等. 红糖营养成分评估与健康功效研究进展[J]. 中国调味品，2020，45(9)：194-200.
CHE X N，CHEN H J，WANG B，et al. Research progress of nutritional assessment and health functions of brown sugar [J]. China Condiment，2020，45(9)：194-200.(in Chinese)

[3] 保国裕，蓝艳华，朱绍熹. 甘蔗原汁红糖的活性营养物与开发应用优势[J]. 甘蔗糖业，2015，44(1)：30-36.
BAO G Y，LAN Y H，ZHU S X. The active nutrients and application development advantages of brown sugar [J]. Sugarcane and Canesugar，2015，44(1)：30-36.(in Chinese)

[4] 平秋婷，余娟，余构彬，等. 功能红糖的发展概述[J]. 甘蔗糖业，2018，47(4)：47-51.
PING Q T，YU J，YU G B，et al. Development overview of brown sugar with special function [J]. Sugarcane and Canesugar，2018，47(4)：47-51.(in Chinese)

[5] JIAO G Z，HE X，LI X，et al. Limitations of MTT and CCK-8 assay for evaluation of graphene cytotoxicity [J]. RSC Advances，2015，5(66)：53240-53244.

[6] CAI L，QIN X J，XU Z H，et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method [J]. ACS Omega，2019，4(7)：12036-12042.

[7] GUAN S，GE D，LIU T Q，et al. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells [J]. Toxicology *in Vitro*，2009，23(2)：201-208.

[8] KELLETT M E，GREENSPAN P，PEGG R B. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line [J]. Food Chemistry，2018，244：359-363.

[9] LÓPEZ-ALARCÓN C，DENICOLA A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products：a review on chemical and cellular-based assays [J]. Analytica Chimica Acta，2013，763：1-10.

[10] LIAO W Z，NING Z X，CHEN L Y，et al. Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2，2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) -induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2014，62(34)：8648-8654.

[11] 杜瑜欣，李玉铭，高焌茹，等. 甘蔗多酚提取工艺及其在食品工业中的应用进展[J]. 中国调味品，2018，43(7)：173-177.
DU Y X，LI Y M，GAO J R，et al. Research progress on the extraction technology of sugarcane polyphenols and their application in food industry [J]. China Condiment，2018，43(7)：173-177.(in Chinese)

[12] HARISH N M A，SATHISHA U V，MANOHAR M P，et al. Cytoprotective and antioxidant activity studies of jaggery sugar [J]. Food Chemistry，2009，115(1)：113-118.

[13] SUN J，HE X M，ZHAO M M，et al. Antioxidant and nitrite-scavenging capacities of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) tops [J]. Molecules，2014，19(9)：13147-13160.

[14] 吴萌萌，刘怡，严馨，等. 苦荞麸皮黄酮提取物及有效成分的抑菌活性[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(11)：77-83.
WU M M，LIU Y，YAN X，et al. Antibacterial activities of flavonoid extracts of tartary buckwheat bran and its effective components [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(11)：77-83.(in Chinese)

[15] 朱怡霖，张海生，赵鑫帅，等. 大孔树脂分离纯化横山老黑豆酚类物质[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(9)：103-110.
ZHU Y L，ZHANG H S，ZHAO X S，et al. Separation and purification of polyphenol in Hengshan black soybean by macroporous resin [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2019，38(9)：103-110.(in Chinese)

[16] GEORGE M，ABRAHAM T E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs：alginate and chitosan：a review [J]. Journal of Controlled Release，2006，114(1)：1-14.

[17] 梁进欣，白卫东，杨娟，等. 植物多酚的研究进展[J].

农产品加工，2020（21）：85-91.
LIANG J X，BAI W D，YANG J，et al. Research progress on plant polyphenols[J]. Farm Products Processing，2020（21）：85-91.（in Chinese）

[18] 封弦，翁佩芳，吴祖芳，等. 乳酸菌发酵接骨木果汁降血糖与抗氧化活性机理[J]. 食品与生物技术学报，2022，41（8）：95-103.
FENG X，WENG P F，WU Z F，et al. Preliminary study on hypoglycemic antioxidant activity and mechanism of elderberry juice fermented by lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41（8）：95-103.（in Chinese）

[19] 赵敏，刘冬妍. ROS在高氧肠道中的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2016，25（8）：948-951.
ZHAO M，LIU D Y. Role of ROS in the hyperoxia intestinal tract[J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology，2016，25（8）：948-951.（in Chinese）

[20] SLAMENOVA D，KOZICS K，HUNAKOVA L，et al. Comparison of biological processes induced in HepG2 cells by *tert*-butyl hydroperoxide（*t*-BHP）and hydroperoxide（H_2O_2）：the influence of carvacrol[J]. Mutation Research，2013，757（1）：15-22.

[21] CHEN M C，GU H G，YE Y Y，et al. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of *tert*-butyl hydroperoxide in human hepatocytes[J]. Food and Chemical Toxicology，2010，48（10）：2980-2987.

[22] AHERNE S A，O'BRIEN N M. Mechanism of protection by the flavonoids，quercetin and rutin，against *tert*-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells[J]. Free Radical Biology and Medicine，2000，29（6）：507-514.

[23] RAMOS A A，LIMA C F，PEREIRA M L，et al. Antigenotoxic effects of quercetin，rutin and ursolic acid on HepG2 cells：evaluation by the comet assay[J]. Toxicology Letters，2008，177（1）：66-73.

[24] LIU S M，HUANG H H. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay，plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity（CAA）assay[J]. Journal of Functional Foods，2015，18：1095-1105.

[25] FRUEHAUF J P，MEYSKENS F L. Reactive oxygen species：a breath of life or death?[J]. Clinical Cancer Research，2007，13（3）：789-794.

[26] PRASAD S，GUPTA S C，TYAGI A K. Reactive oxygen species（ROS）and cancer：role of antioxidative nutraceuticals[J]. Cancer Letters，2017，387：95-105.

[27] ZHANG H，LIU R H，TSAO R. Anthocyanin-rich phenolic extracts of purple root vegetables inhibit pro-inflammatory cytokines induced by H_2O_2 and enhance antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells[J]. Journal of Functional Foods，2016，22：363-375.

[28] SOUZA-GRINEVICIUS V M，KVIECINSKI M R，SANTOS-MOTA N S，et al. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction，oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells[J]. Journal of Ethnopharmacology，2016，189：139-147.

[29] WOLFE K L，LIU R H. Cellular antioxidant activity（CAA）assay for assessing antioxidants，foods，and dietary supplements[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2007，55（22）：8896-8907.

[30] 张芳铭，滕海辉，金永学，等. 红糖总多酚的提取测定及体外抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业，2020，46（11）：231-237.
ZHANG F M，TENG H H，JIN Y X，et al. Extraction and determination of total polyphenols from brown sugar and its antioxidative effect *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industries，2020，46（11）：231-237.（in Chinese）

（责任编辑：刘冬梅）