

蓝莓花青素的抗氧化活性研究

王健, 潘利华* (合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]研究蓝莓花青素的抗氧化活性。[方法]采用酸化乙醇提取蓝莓鲜果中的蓝莓花青素,并通过羟自由基、DPPH 自由基、 H_2O_2 、超氧阴离子自由基及 Fe^{3+} 清除率试验评价蓝莓花青素的抗氧化能力。[结果]蓝莓花青素对羟自由基、DPPH 自由基、 H_2O_2 、超氧阴离子自由基及 Fe^{3+} 清除率随着浓度的增大而增强,其抗氧化活性高于相同浓度的抗坏血酸。[结论]蓝莓花青素具有很高的抗氧化活性,可以作为天然抗氧化剂进行开发。

关键词 蓝莓;花青素;抗氧化活性

中图分类号 S663.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05487-03

Antioxidant Activity of Blueberry Anthocyanin

WANG Jian et al (School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] To determine the antioxidant activity of anthocyanin from blueberry. [Method] The anthocyanin were extracted with acidified ethanol from the fresh blueberry and the antioxidant activities of blueberry anthocyanin were determined by $\cdot OH$, DPPH \cdot , H_2O_2 , superoxide anion and Fe^{3+} removal experiments. [Result] The $\cdot OH$, DPPH \cdot , H_2O_2 , superoxide anion and Fe^{3+} removal rates of blueberry anthocyanin increased with its concentrations and were superior to that of Vc at the same concentration. [Conclusion] Blueberry anthocyanin possessed high antioxidant activity, which can be developed as natural antioxidants.

Key words Blueberry; Anthocyanins; Antioxidant Activity

蓝莓,是杜鹃花科越橘属多年生常绿灌木,自2003年引种种植成功以来,蓝莓正快速成为我国农业发展中的新兴产业^[1]。蓝莓果为深蓝色浆果,含有丰富的花色素,约占鲜果的0.07%~3.38%^[2]。美国农业部人类营养中心的研究结果显示,蓝莓果中的花色素在所有水果和蔬菜之中含量最高,具有促进视红素再合成、提高免疫力、抗心血管疾病、抗衰老等多种生理活性功能,在食品、化妆品、药品等领域有着广阔的应用前景^[3-7]。

笔者采用酸化乙醇浸提蓝莓果中的花青素,并评价蓝莓花青素的抗氧化活性,以期蓝莓花青素抗氧化剂的研发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 蓝莓鲜果,安徽徽王食品有限公司惠赠。主要试剂:矢车菊素-3-葡萄糖苷,上海抚生实业有限公司;DP-PH, Sigma 公司。主要仪器:UV-1600 分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;GL-20G-II 冷冻离心机,安亭科学仪器厂;R-201 旋转蒸发仪,上海申生生物技术有限公司。

1.2 蓝莓花青素提取 称取 100.0 g 清洗干净的蓝莓鲜果,利用组织捣碎机将其捣碎成蓝莓浆,再置于提取瓶中,按料液比 1:8 g/ml 在 50 °C、pH 3.0 条件下采用 75% 的酸化乙醇浸提 150 min^[8-10]。将浸提液在 10 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min,取上清液,进行含量测定。

1.3 蓝莓花青素含量测定 采用双波长 pH 示差法^[11],以矢车菊素-3-葡萄糖苷为参照。取待测液 1.0 ml,加入 pH 4.5 的 0.4 mol/L NaAc-HAc 缓冲溶液或 pH 1.0 的 0.25 mol/L KCl-HCl 缓冲溶液 9.0 ml,摇匀,转入光路长为 1 cm 的

比色皿中,以蒸馏水代替样品溶液做空白对照,分别在 510 和 700 nm 波长处测定其吸光度。花青素含量按下式计算:

$$Y(\text{mg/g}) = A \times M_w \times DF \times 100 / (\varepsilon \times l)$$

式中, $A = (OD_{510} - OD_{700})pH_{1.0} - (OD_{510} - OD_{700})pH_{4.5}$; $M_w = 449.2 \text{ g/mol}$, 矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔质量; DF 为待测液稀释倍数; $\varepsilon = 26\,900 \text{ L/mol cm}$, 矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数。

1.4 蓝莓花青素的抗氧化活性分析

1.4.1 羟自由基 ($\cdot OH$) 清除能力测定^[12]。分别取不同浓度 (29.74、14.87、7.44、4.96、3.72 及 2.97 mg/L) 的蓝莓花青素溶液 0.2 ml 置于试管内,各试管再分别加入 0.15 mmol/L $FeSO_4$ 1.0 ml、2 mmol/L 水杨酸 0.4 ml、6 mmol/L H_2O_2 1.0 ml 及蒸馏水 0.4 ml,混匀后置于 37 °C 恒温水浴内,1 h 后取出冷却,测定波长 510 nm 处 OD 值。以抗坏血酸作为阳性对照,按下式计算蓝莓花青素对 $\cdot OH$ 的清除率:

$$\cdot OH \text{ 的清除率} = [OD_{\text{空白}} - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}})] / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.4.2 DPPH 自由基 (DPPH \cdot) 清除能力测定^[13]。分别取 0.5 ml 不同浓度 (29.74、14.87、7.44、4.96、3.72 及 2.97 mg/L) 的蓝莓花青素溶液置于试管内,各试管再分别加入 0.004% 的 DPPH 溶液 2.5 ml,置于 37 °C 恒温水浴内,30 min 后取出冷却,测定波长 515 nm 处 OD 值。以抗坏血酸作为阳性对照,按下式计算蓝莓花青素对 DPPH \cdot 的清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [OD_{\text{空白}} - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}})] / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.4.3 H_2O_2 清除能力测定^[14]。将 H_2O_2 溶于 0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液,配制成 40 mmol/L 的 H_2O_2 溶液。分别取 3.4 ml 不同浓度 (29.74、14.87、7.44、4.96、3.72 及 2.97 mg/L) 的蓝莓花青素溶液置于试管内,各试管再分别加入 H_2O_2 溶液 0.6 ml,混匀。用 3.4 ml 蒸馏水和 0.6 ml 的磷酸缓冲液调零,测定波长 230 nm 处 OD 值。以抗坏血酸作为阳

基金项目 安徽省 2012 年度科技攻关项目 (1201032075)。
作者简介 王健 (1986 -), 男,安徽合肥人,硕士,从事食品化学研究, E-mail: wj1417@126.com。* 通讯作者,副教授,博士,从事中草药与功能食品化学研究, E-mail: panlihua@hfut.edu.cn。
收稿日期 2013-04-07

性对照,按下式计算蓝莓花青素对 H_2O_2 的清除率:

$$H_2O_2 \text{ 的清除率} = [OD_{\text{空白}} - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}})] / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.4.4 超氧阴离子自由基清除能力测定^[15]。取6支干燥洁净的试管依次分别加入0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.0 ml,再分别加入不同浓度(29.74、14.87、7.44、4.96、3.72及2.97 mg/L)的蓝莓花青素溶液1.0 ml和0.2 mmol/L的邻苯三酚溶液1.0 ml,混匀后,置于25℃恒温水浴,反应4 min后立即滴加2滴8 mol/L的HCl终止反应,并测定波长420 nm处OD值。以抗坏血酸作为阳性对照,按下式计算蓝莓花青素对超氧阴离子自由基的清除率:

$$\text{超氧阴离子自由基的清除率} = [OD_{\text{空白}} - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}})] / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

1.4.5 Fe^{3+} 清除能力测定^[16]。分别取不同浓度的蓝莓花青素溶液(29.74、14.87、7.44、4.96、3.72及2.97 mg/L)2.5 ml置于干燥的试管内,各试管再分别加入pH 6.6的磷酸盐缓冲液2.5 ml和1%的铁氰化钾溶液2.5 ml,混匀后置于50℃水浴条件下反应20 min,取出急速冷却后分别加入10%的三氟乙酸溶液2.5 ml,混匀,再离心取上清液5.0 ml。各上清液中分别加入4.0 ml蒸馏水及1.0 ml 0.1%的三氯化铁溶液,静置10 min后,测定波长700 nm处OD值。以抗坏血酸作为阳性对照,按下式计算蓝莓花青素对行 Fe^{3+} 的清除率:

$$Fe^{3+} \text{ 的清除率} = [OD_{\text{空白}} - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{对照}})] / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 蓝莓花青素对 $\cdot OH$ 的清除作用 $\cdot OH$ 活性强,常参与各种不同类型的反应。通常因其参与各种反应造成蛋白质、核酸、脂质和多糖等生命物质的氧化损伤,使细胞坏死或突变,影响正常生命代谢活动^[17-19]。蓝莓花青素对 $\cdot OH$ 清除能力可反映其抗氧化作用程度。蓝莓花青素对 $\cdot OH$ 清除率结果见图1。不同浓度的蓝莓花青素清除羟自由基的能力高于29.74 mg/L的抗坏血酸,且蓝莓花青素清除 $\cdot OH$ 的能力随浓度的增加而增强。

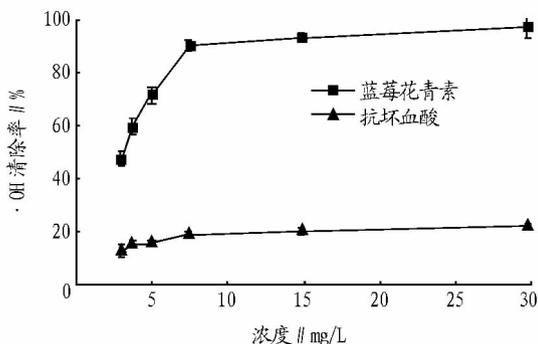


图1 不同浓度蓝莓花青素对 $\cdot OH$ 清除率

2.2 蓝莓花青素对 DPPH \cdot 的清除作用 由图2可知,蓝莓花青素对 DPPH \cdot 清除作用显著,且清除率高于抗坏血酸。在2.97~29.74 mg/L浓度范围内,随着浓度的增大其其对 DP-

PH \cdot 清除率在81.75%~96.69%范围内不断提高。

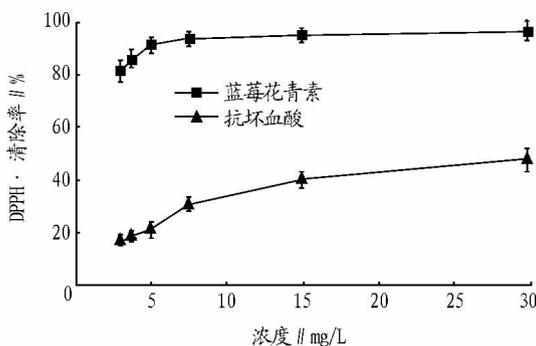


图2 不同浓度蓝莓花青素对 DPPH \cdot 清除率

2.3 蓝莓花青素对 H_2O_2 的清除作用 由图3可知,蓝莓花青素对 H_2O_2 的清除率在2.97~29.74 mg/L浓度范围内,随着浓度的增大清除率不断提高,其中在29.74 mg/L时,对 H_2O_2 的清除率达到95.06%。抗坏血酸在29.74 mg/L时对 H_2O_2 的清除率为80.25%,明显低于蓝莓花青素对 H_2O_2 的清除能力。

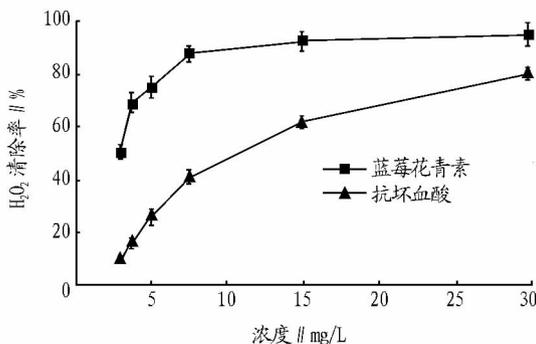


图3 不同浓度蓝莓花青素对 H_2O_2 清除率

2.4 蓝莓花青素对超氧阴离子自由基的清除作用 由图4可知,各浓度的蓝莓花青素对超氧阴离子自由基的能力清除能力较高,且随着浓度的增大清除能力不断增强。在花青素浓度29.74 mg/L时,清除率达到40.30%。蓝莓花青素对超氧阴离子自由基的清除能力高于抗坏血酸。

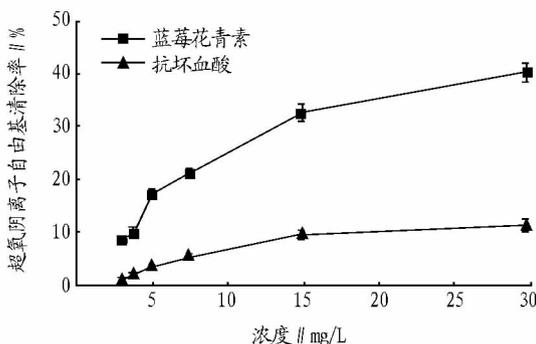


图4 不同浓度蓝莓花青素对超氧阴离子自由基清除率

2.5 蓝莓花青素对 Fe^{3+} 的清除作用 由图5可知,在相同浓度条件下蓝莓花青素对 Fe^{3+} 的清除能力明显高于抗坏血酸。在2.97~29.74 mg/L浓度范围内,随着浓度的增大蓝莓花青素对 Fe^{3+} 的清除率提高显著,而阳性对照组的清除率提

高并不显著。

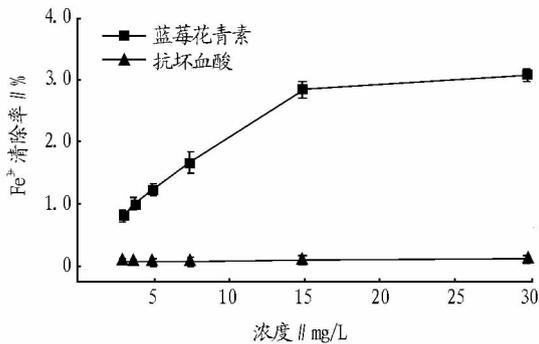


图5 不同浓度蓝莓花青素对 Fe³⁺ 清除率

3 结论

蓝莓花青素对羟基自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、H₂O₂ 及 Fe³⁺ 的清除率随着浓度的增大而增强,均高于相同浓度的抗坏血酸,可以作为天然抗氧化剂进行开发应用。

参考文献

- [1] 黄文江,周守标,王晖. 安徽越橘属植物资源[J]. 中国野生植物资源, 2004,23(3):16-18.
- [2] HOSSEINIAN F S, BETA T. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other manitoba berries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007,55(26):10832-10838.
- [3] WANG S Y, LIN H S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000,48(2):140-146.
- [4] FARIA A, OLIVEIRA J, NEVES P, et al. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(17):6896-6902.
- [5] KALT W, BLUMBERG J B, MCDONALD J E, et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs [J]. Journal of

- Agriculture and Food Chemistry, 2008,56(3):705-712.
- [6] NORTON C, KALEA A Z, HARRIS P D. Wild blueberry-rich diets affect the contractile machinery of the vascular smooth muscle in the Sprague-Dawley rat [J]. Journal of Medical Food, 2005,8(1):8-13.
- [7] 金杰,李志西,张锋,等. 桑葚醋提取物抗氧化性的研究[J]. 中国酿造, 2005,7(10):20-22.
- [8] LAPORNIK B, PROSEK M, WONDRA A G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time [J]. Journal of Food Engineering, 2005,71(2):214-222.
- [9] 马养民, 逯文静. 蓝莓果中花青素的乙醇提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011,35(9):21768-21769,21958.
- [10] 杨雪飞,潘利华,罗建平. 蓝莓色素的超声提取工艺及稳定性[J]. 食品科学, 2010,20(31):251-255.
- [11] LEE J, DURST R W, WROLSTAD R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study [J]. Journal of AOAC international, 2005,88(5):1269-1278.
- [12] 徐向荣,王文华,李华斌. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基及其应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999,26(1):67-69.
- [13] 贾冬英,曹冬冬,姚开. 荸荠皮提取物对 DPPH 自由基清除活性[J]. 天然产物研究与开发, 2007,19(5):745-747.
- [14] 赵春贵,张立伟,董建华,等. 肉桂酸及其衍生物对活性氧 H₂O₂ 清除作用[J]. 化学研究与应用, 2004,16(5):685-687.
- [15] 俞梅兰,余燕影,曹树稳. 槲皮素自氧化作用影响其超氧阴离子自由基清除能力的研究[J]. 食品工业科技, 2006,27(3):75-78.
- [16] 景永帅,吴兰芳,张振东,等. 绞股蓝提取物抗氧化活性评价[J]. 山地农业生物学报, 2010,29(1):43-47.
- [17] LICHTENTHÄLER R, RODRIGUES R B, MAIA J G, et al. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruit [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2005,56(1):53-64.
- [18] DU Q, ZHENG J, XU Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008,21(5):390-395.
- [19] PANTELIDIS G E, VASILAKAKIS M G, MANGANARIS A, et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and comelian cherries [J]. Food Chemistry, 2007,102(3):777-783.

(上接第 5486 页)

处理时间 20 min; D 为活性炭用量 35 g/L, 处理时间 30 min; E 为活性炭用量 30 g/L, 处理时间 40 min; F 为活性炭用量 25 g/L, 处理时间 30 min; G 为活性炭用量 30 g/L, 处理时间 20 min; H 为活性炭用量 25 g/L, 处理时间 20 min; I 为活性炭用量 30 g/L, 处理时间 30 min; J 为原浓缩橙汁。小组(6人)感官评定结果如表4。由表4可知, C号的感官评分最高, 其脱苦条件为常温 20℃, 活性炭用量 35 g/L, 处理时间 20 min。因此, 此条件为较适脱苦工艺。

表4 浓缩橙汁各脱苦条件下的感官评定

序号	苦味	风味	色泽	总分
A	5.0	3.0	6.0	14.0
B	4.0	3.0	4.0	11.0
C	4.8	5.0	8.5	18.3
D	5.8	8.0	3.5	17.3
E	6.4	5.5	5.0	16.9
F	5.0	5.5	2.5	13.0
G	5.2	6.0	7.0	18.2
H	5.2	3.8	8.5	17.5
I	6.0	3.7	3.0	12.7
J	1.0	1.0	10.0	12.0

2.6 浓缩橙汁的脱苦对橙汁品质的影响 采用最佳工艺处理, 脱苦对橙汁品质如表5。由表5可知, 脱苦前后浓缩橙汁体积损失率为 23.2%, 质量损失率为 36.8%, 可溶性固形物

损失率为 16.3%, 总酸度损失 7.2%, 维生素损失率 13.6%。损失率均较大, 今后的研究方向应为在提高脱苦率的前提下, 尽量避免橙汁品质的降低。

表5 脱苦后对橙汁品质的影响

橙汁	体积	质量	可溶性固形物	总酸度	维生素 C
	ml	g	含量/g	定度/ml	定度/ml
原橙汁	100.0	126.1	63.7	54.12	8.66
脱苦橙汁	76.8	79.7	53.3	50.20	7.48
损失率/%	23.2	36.8	16.3	7.2	13.6

3 结论

活性炭对浓缩橙汁脱苦的最佳工艺调节为: 脱苦条件为常温 20℃, 活性炭用量 35 g/L 浓缩果汁(可溶性固形物 50.5%), 处理时间 20 min。采用上述工艺处理, 得到的浓缩果汁中柚皮苷和柠檬苦素的脱除率分别为 49.5% 和 73.5%。脱苦后浓缩橙汁苦味明显变淡, 风味自然, 口感适中。

参考文献

- [1] ADAMIN W R, CARLINI D T L, DIGIACOMO G R. Debittering of orange juice by using adsorbent resins [J]. Derivati Agrumari, 2000,70(2):101-104.
- [2] 叶兴乾. 果品蔬菜加工工艺学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] 王鸿飞, 李和生. 柚皮苷酶对柑桔类果汁脱苦效果的研究[J]. 农业工程学报, 2004(11):174-177.
- [4] ANNO R L. Gene found for keeping citrus juice sweet [J]. Florida Grower, 1999,92(1):13-16.