

# 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<sup>[1]</sup>。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%<sup>[2]</sup>。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<sup>[3-7]</sup>。

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<sup>[8-10]</sup>。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<sup>[11]</sup>,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:

$$Y(\text{mg/g}) = A \times M_w \times DF \times 100 / (\varepsilon \times 1)$$

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<sup>[12]</sup>**。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<sup>[13]</sup>**。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<sup>[14]</sup>**。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**<sup>[15]</sup>。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 °C 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**<sup>[16]</sup>。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 °C 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<sup>[17-19]</sup>。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。

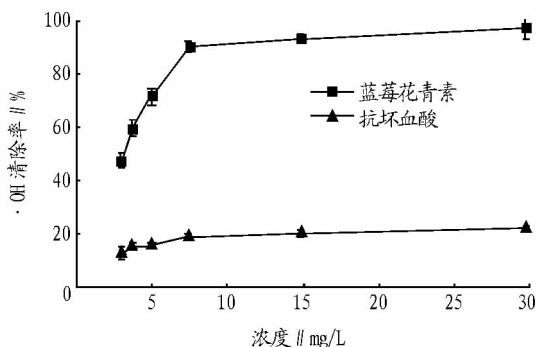


图 1 不同浓度蓝莓花青素对  $\cdot OH$  清除率

**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。

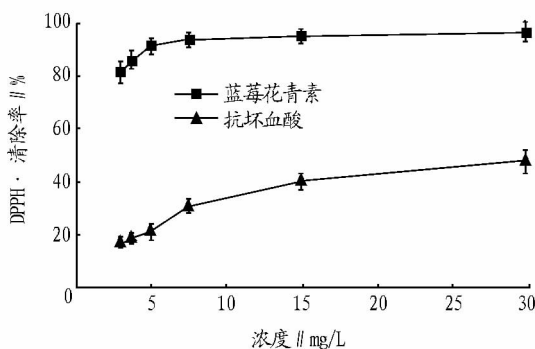


图 2 不同浓度蓝莓花青素对 DPPH  $\cdot$  清除率

**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。

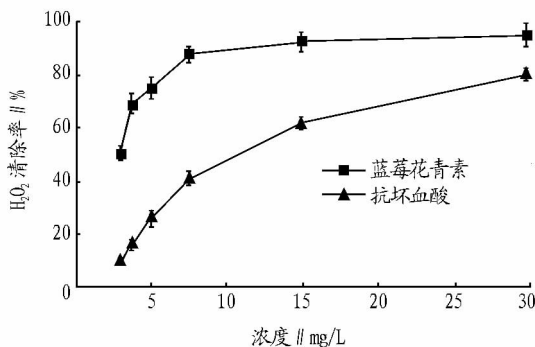


图 3 不同浓度蓝莓花青素对  $H_2O_2$  清除率

**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。

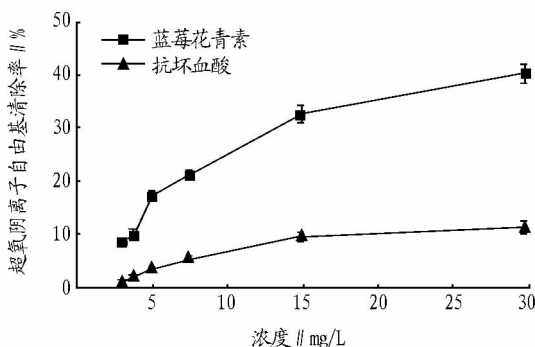


图 4 不同浓度蓝莓花青素对超氧阴离子自由基清除率

**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。

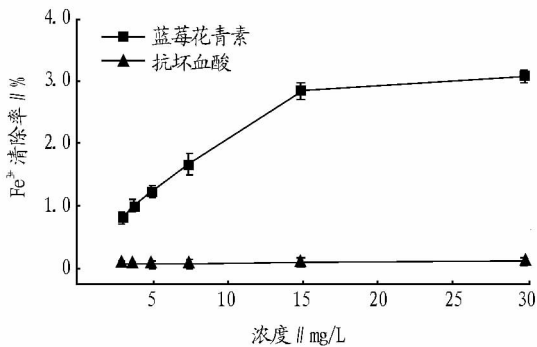


图5 不同浓度蓝莓花青素对 Fe<sup>3+</sup> 清除率

### 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及 Fe<sup>3+</sup> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<br>ml | 质量<br>g | 可溶性固形物<br>含量//g | 总酸度<br>定度//ml | 维生素 C<br>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.