

苏 丁,蔡位辉,张德巧,等. 越橘果实中花青素含量及抗氧化能力分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):339-341.

越橘果实中花青素含量及抗氧化能力分析

苏 丁,蔡位辉,张德巧,吴明究

(鲜活果汁工业<昆山>有限公司,江苏昆山 215300)

摘要:对笃斯越橘、蔓越橘、兔眼越橘的 2 个品种和高丛越橘的 1 个品种果实花青素含量和抗氧化能力进行了对比分析。结果表明,每 100 g 冻果中,兔眼越橘园蓝果实中花青素含量最高,为 276.24 mg,而笃斯越橘的含量最低,为 67.85 mg,仅为兔眼越橘园蓝的 24.8%。不同越橘果实对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基的清除能力及还原能力表现各有不同,综合分析,高丛越橘蓝丰果实具有较强的清除各自由基能力,抗氧化能力较强。不同种越橘果实花青素含量与其抗氧化能力没有相关性。

关键词:越橘;花青素;抗氧化能力

中图分类号:TS255.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0339-03

花青素是一种黄酮类色素,存在于大部分的花和果实中,一些植物的茎和叶也含有花青素^[1]。花青素作为一种天然食用色素,安全、无毒,并具有一定的营养和药理作用,如抗氧化活性、抗肿瘤、保护视力等生理活性功能,在一些功能性食品和化妆品中已有应用,并已越来越受到人类重视^[2]。长期以来,富含花青素植物受到广泛的关注与研究^[3-4],作为越橘属的蔓越橘、笃斯越橘则少有报道,同时在体外测定天然抗氧化物质的活性时,需要着重考虑其系统组成、可氧化底物类型、加速氧化的方式、测定氧化能力的方法。花青素抗氧化效果也受其他因素的影响,如系统的多相性和不均一性,引发剂的类型、其他成分及他们之间的相互作用。鉴于此,在对花青素进行抗氧化能力评价时必须选择不同氧化条件,采用几种方法来测定不同的氧化产物^[5]。本研究以笃斯越橘、蔓越橘、兔眼越橘园蓝、兔眼越橘灿烂和高丛越橘蓝丰的果实为试验材料,通过对清除 DPPH 自由基能力、清除超氧阴离子自由基能力、清除羟自由基能力和还原能力 4 个方面的测定,综合评价不同越橘果实的抗氧化能力,为开发高端越橘加工产品提供依据。

收稿日期:2013-04-09

基金项目:江苏省昆山市农业科技计划(编号:KN1236)。

作者简介:苏 丁(1982—),女,河南南阳人,硕士研究生,主要从事水果加工利用研究。Tel:(0512)36621225;E-mail:sandy_su@sunjuice.com.cn。

通信作者:蔡位辉,硕士。Tel:(0512)57561353;E-mail:weihui.cai@sunjuice.com.cn。

参考文献:

- [1]孙灵霞.木枣枣皮红色素的提取工艺及其稳定性研究[D].西安:陕西师范大学,2005:1-49.
- [2]Ramage G,Vande Walle K,Wickes B L,et al. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of candida albicans biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2001,45(9):2475-2479.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂、仪器

1.1.1 原料 供试材料有 5 个,均为冷冻果实:笃斯越橘(产自黑龙江大兴安岭),蔓越橘(产自美国),兔眼越橘园蓝(产自江苏南京),兔眼越橘灿烂(产自江苏南京),高丛越橘蓝丰(产自辽宁丹东)。

1.1.2 试剂 无水甲醇、盐酸、氯化钾、乙酸钠、邻苯三酚、硫酸亚铁、氯化铁、铁氰化钾、水杨酸、三羟甲基氨基甲烷、过氧化氢、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)均为分析纯,购自国药集团。

1.1.3 仪器 ZH-D 全温振荡器,苏州精达公司生产;UV-1800PC 紫外可见分光光度计,上海美谱达公司生产;DC-0506 低温恒温槽,上海舜宇恒平公司生产;Adventurer 电子分析天平、BTC628/728 冰砂机,美国 Bartec 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 花青素提取液制备 挑选不同越橘冻果,除去杂质与叶梗,粉碎,打浆,每个越橘各取(2.00±0.10)g 浆液,参照文献[6]方法并改进提取花青素,提取溶剂为含有 0.1% HCl 的无水甲醇(体积比),料液比为 1:15(g:mL),提取温度 30℃,提取时间 1 h,收集提取混合物,过滤除去滤渣,滤液用提取溶剂定容至 50 mL,得到不同种越橘果实的花青素提取液。

1.2.2 比色法测定花青素含量 参照文献[7],取“1.2.1”节中 5 个越橘果实的花青素提取液各 1 mL,分别加入 0.4 mol/L 乙酸钠溶液(pH 值 4.50)和 0.025 mol/L 氯化钾溶

[3]Schmid C,Rotenberg J S. Neurodevelopmental toxicology[J]. Neurologic Clinics,2005,23(2):321-336.

[4]Holstege C P,Dobmeier S. Cardiovascular complications associated with poisoning[J]. Emerg Med Clin NA,2005,23(4):1195-1217.

[5]陈 奇.中药药理研究方法学[M]. 2 版.北京:人民卫生出版社,2006:131.

[6]彭 亮,赵 鹏.白刺色素的安全性评价及其抗氧化功能的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(6):506-510.

液(pH 值 1.0),定容至 50 mL,摇匀,静置 15 min 后转入光路为 1 cm 的石英比色皿中,以蒸馏水为空白对照,采用紫外-可见分光光度计分别在 520 nm 和 700 nm 测定其吸光度。

花青素浓度 (mg/L) = $A/\varepsilon L \times 10^3 \times MW \times$ 稀释倍数,其中, D 为最终吸光度, $D = (D_{520\text{ nm}} - D_{700\text{ nm}})_{\text{pH} 1.0} - (D_{520\text{ nm}} - D_{700\text{ nm}})_{\text{pH} 4.50}$, MW 为摩尔质量,以矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷分子量 449.2 计, ε 为矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷摩尔吸光系数(29 600), L 为比色皿光路长(1 cm)。

1.2.3 抗氧化活性测定

1.2.3.1 DPPH 清除率测定 参照文献[8]的测定方法并作改进。准确称取 4 mg DPPH,用无水甲醇定容至 100 mL,摇匀待测。将按照方法 1.2.1 制备的 5 个越橘果实花青素提取液分别用无水甲醇稀释 5 倍,按表 1 加样反应。

表 1 DPPH 反应体系	
编号	反应体系
0	0.6 mL 无水甲醇+3.00 mL DPPH 溶液
1	0.6 mL 样品+3.00 mL DPPH 溶液
2	0.6 mL 样品+3.00 mL 无水甲醇

将反应液混合均匀后,于室温、避光条件下静置 30 min,在 517 nm 处测定 3 个反应体系的吸光值。清除率 $K = [1 - (D_1 - D_2)/D_0] \times 100\%$,其中 D_0, D_1, D_2 为反应体系 0、1、2 的吸光度。

1.2.3.2 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率测定 采用水杨酸法。按照文献[9]的方法。将按照方法“1.2.1”制备的 5 个越橘果实花青素提取液分别用无水甲醇稀释 5 倍,按照表 2 加样,混匀,30 ℃ 反应 0.5 h,以蒸馏水作参照,在 510 nm 处测定吸光度。清除率 = $[1 - (D_1 - D_2)/D_0] \times 100\%$,其中 D_0, D_1, D_2 分别为反应体系 0、1、2 的吸光度。

表 2 水杨酸法反应体系	
编号	反应体系
0	2 mL 蒸馏水+2 mL FeSO ₄ 溶液+ 2 mL H ₂ O ₂ 溶液+2 mL 水杨酸溶液
1	2 mL 样品+2 mL FeSO ₄ 溶液+ 2 mL H ₂ O ₂ 溶液+2 mL 水杨酸溶液
2	2 mL 样品+2 mL FeSO ₄ 溶液+ 2 mL H ₂ O ₂ 溶液+2 mL 蒸馏水

1.2.3.3 超氧阴离子清除率测定 超氧阴离子清除率采用邻苯三酚自氧化法测定,参照文献[10]。取 pH 值 8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,4.2 mL 蒸馏水,混合均匀后在 25 ℃ 恒温水浴中保温 20 min,取出后立即加入在 25 ℃ 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL(以 10 mmol/L HCl 配制,空白管用 10 mmol/L HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液),迅速摇匀后倒入比色皿,每隔 0.5 min 在 320 nm 处测定溶液的吸光度,计算线性范围内每 1 min 吸光度增加值。

样品活性测定:将按照方法“1.2.1”制备的 5 个越橘果实花青素提取液分别用无水甲醇稀释 5 倍,取 pH 值 8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,3.2 mL 蒸馏水,混合均匀后在 25 ℃ 恒温水浴中保温 20 min,取出后立即加入提取液 1 mL,在 25 ℃ 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL,余下操作与邻苯三酚自氧化法测定一致。

清除率 = $(\Delta D_0 - \Delta D)/\Delta D_0 \times 100\%$, ΔD_0 为邻苯三酚自

氧化速率, ΔD 为加入提取液后邻苯三酚的自氧化速率,单位为每 0.5 min 吸光度的增加值。

1.2.3.4 还原能力测定 本试验参考 Oyaizu 方法^[11]并略作改动。该方法实际上是测定被测物质将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺ 的能力。将按照方法“1.2.1”制备的 5 个越橘果实花青素提取液分别用无水甲醇稀释 5 倍,各提取液分别移取 1 mL 加入 pH 值 6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5 mL,1% 铁氰化钾 2.5 mL,混匀后于 50 ℃ 恒温水浴保温 20 min,再加入 10% 三氯乙酸 2.5 mL 混匀,移取 2.5 mL 于试管中,加蒸馏水 2.5 mL 和 0.1% FeCl₃ 0.5 mL,常温下反应 5 min 后于 700 nm 测定吸光度,吸光值越高说明反应体系的还原能力越强。

2 结果与分析

2.1 不同越橘果实中花青素含量

由表 3 可知,每 100 g 冻果中,兔眼越橘品种园蓝果实中花青素含量最高,为 276.24 mg,而笃斯越橘的含量最低,为 67.85 mg,仅为兔眼越橘园蓝的 24.8%。蔓越橘果实中花青素含量也较低,兔眼越橘灿烂和高丛越橘蓝丰果实中花青素含量相差不大。

表 3 越橘不同种果实中花青素含量		
越橘	提取液中花青素浓度 (mg/L)	每 100 g 冻果中花青素 含量(mg)
笃斯越橘	27.27 ± 0.48a	67.85 ± 1.05f
蔓越橘	30.89 ± 0.00b	76.47 ± 0.00g
兔眼越橘灿烂	83.77 ± 0.48c	206.34 ± 0.40h
兔眼越橘园蓝	111.05 ± 0.83d	276.24 ± 2.08i
高丛越橘蓝丰	84.05 ± 0.48e	209.08 ± 0.40j

注:同列中不同字母表示差异达 0.05 显著水平。

2.2 抗氧化能力

2.2.1 清除 DPPH 作用 不同越橘果实的花青素提取液对 DPPH 自由基的清除能力见图 1。5 个越橘果实花青素提取液清除 DPPH 自由基的能力都较强,均超过 50%,其中高丛越橘蓝丰果实提取液清除 DPPH 自由基能力最强,达到 85.74%。

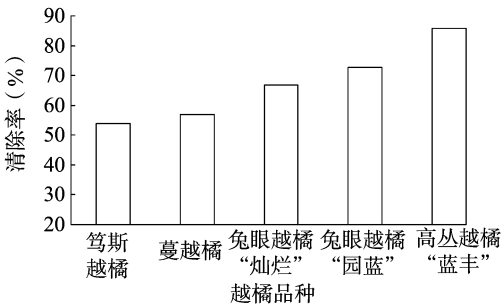


图1 越橘不同果实的花青素提取液清除DPPH的能力

2.2.2 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力 由图 2 可知,不同越橘果实的花青素提取液清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力大小为笃斯越橘 > 蔓越橘 > 高丛越橘蓝丰 > 兔眼越橘灿烂 > 兔眼越橘园蓝。兔眼越橘灿烂、园蓝和高丛越橘蓝丰的清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的能力较弱,均低于 50%。

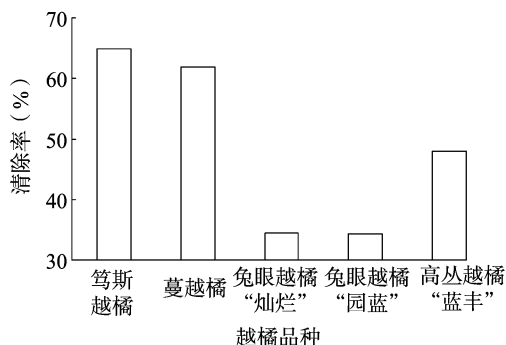


图2 不同越橘果实的花青素提取液清除羟自由基的能力

2.2.3 清除超氧阴离子能力 不同越橘果实的花青素提取液清除超氧阴离子能力的大小为兔眼越橘灿烂 > 兔眼越橘园蓝 > 蔓越橘 > 笃斯越橘 > 高丛越橘蓝丰。

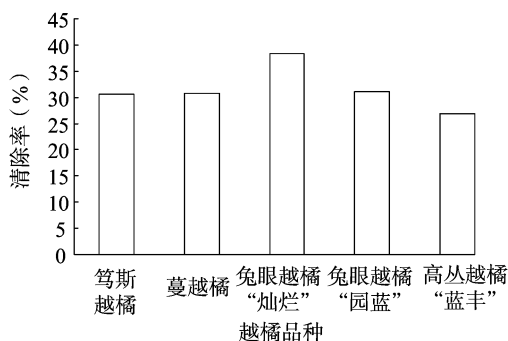


图3 不同越橘果实的花青素提取液清除超氧阴离子能力

2.2.4 还原能力 不同越橘果实花青素提取液的还原能力是依据在 700 nm 吸光度^[10]来判定的。由图 4 知,其还原能力从大到小依次为:蔓越橘 > 高丛越橘蓝丰 > 兔眼越橘灿烂 > 兔眼越橘园蓝 > 笃斯越橘。

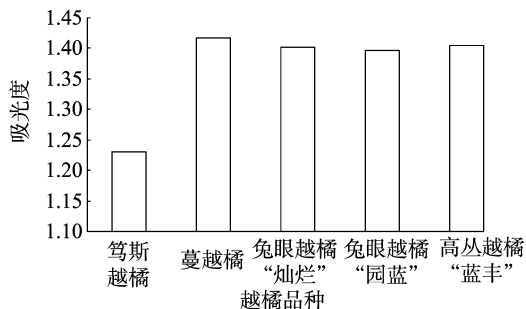


图4 不同越橘果实的花青素提取液还原能力

3 讨论

本试验结果表明,兔眼越橘园蓝果实中花青素含量最高,而笃斯越橘的花青素含量最低,仅为兔眼越橘园蓝的 24.8%。不同越橘果实花青素提取液在清除不同自由基及还原能力表现不同,高丛越橘蓝丰果实花青素提取液清除 DPPH 自由基的能力最强,笃斯越橘果实花青素提取液清除羟自由基的能力最强,兔眼越橘灿烂果实花青素提取液清除超氧阴离子能力最强,蔓越橘果实花青素提取液的还原能力最强。虽然 5 个越橘果实花青素提取液清除自由基能力及还原能力各有差异,相对而言,高丛越橘蓝丰果实具有较强的清

除各自自由基能力及还原能力,抗氧化能力较强。

本试验结果还表明,不同越橘果实中花青素含量与抗氧化能力没有相关性,对于这一点前人也有研究,但结论不一,陈健等^[12]及刘文旭等^[13]得出酚类物质含量与抗氧化活性呈显著线性相关,而 Marina 等^[14]研究认为抗氧化活性与酚类物质含量无相关性。另外,本研究所用的试验材料为冻果提取液,尚未除去其中的糖、蛋白质及其他活性物质如多酚^[15-16]等,其抗氧化活性可能不能仅以花青素含量来评测,因此需要对提取液进行纯化处理,研究花青素与糖、蛋白质、其他活性物质是否存在协同或拮抗作用,以探索花青素单体的生理活性。

参考文献:

- [1] 孙 视, 於 虹, 赵友谊, 等. [J]. 植物与环境学报, 2001, 10 (4): 59 - 60.
- [2] 张秀丽, 李劲涛, 杨 军. 植物花色苷定性定量研究方法[J]. 西师范大学学报: 自然科学版, 2006, 27(3): 300 - 303.
- [3] 刘 玮, 钱慧碧, 辛秀兰, 等. 蓝莓果渣中总黄酮的提取纯化及抗氧化性能的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 216 - 219.
- [4] Faria A, Oliveira J. Antioxidant properties of prepared blueberry extracts[J]. Agri Food Chem, 2005, 53: 6896 - 6902.
- [5] 徐清萍, 钟桂芳, 孟 君. 抗氧化剂抗氧化方法研究进展[J]. 食品工程, 2007(2): 23 - 25.
- [6] Rodriguez - saona L E, Wrolstad R E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins[J]. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001, 1(1): 1 - 11.
- [7] Giusti M M, Wrolstad R E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV - visible spectroscopy[J]. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001, 1(2): 1 - 13.
- [8] Cerezo A B, Cuevas E, Winterhalter P, et al. Anthocyanin composition in cabernet sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification[J]. Food Research International, 2010, 43: 1577 - 1584.
- [9] 李颖畅, 李冰心, 吕春茂, 等. 酰基化蓝莓花色苷的稳定性和对氧自由基清除能力[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 212 - 214, 257.
- [10] 陈留勇, 孟宪军, 贾 薇, 等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 167 - 170.
- [11] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of product browning reactions prepared from glucose amine[J]. J P J Nutrition, 1986, 44: 307 - 315.
- [12] 陈 健, 孙爱东, 高雪娟, 等. 蓝莓花青素的提取及抗氧化性的研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(2): 126 - 129.
- [13] 刘文旭, 黄午阳, 曾晓雄, 等. 草莓、黑莓、蓝莓中多酚类物质及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 130 - 133.
- [14] Marina H I, Lehtonen P J, Hopia A I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 25 - 31.
- [15] Laura A R, Alvarez - Parrilla E, Gonzalez - Aguilar G A. Fruit and vegetable phyto chemicals - chemistry, nutritional value and stability [M]. USA: Blackwell Publishing, 2010: 53 - 54.
- [16] Lee J, Wrolstad R E. Extraction of anthocyanin and polyphenolics from blueberry processing waste[J]. Food Chemistry and Toxicology, 2004, 69(7): 564 - 573.