

红树莓花色苷的提取及抗氧化活性研究

肖军霞¹, 黄国清^{1,2}, 仇宏伟¹, 王成荣^{1,*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266109; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用酸化乙醇法提取红树莓中的花色苷, 通过正交试验确定花色苷提取的最佳条件, 同时对红树莓花色苷提取物的抗氧化活性进行研究。结果表明, 以盐酸酸化的 80% 乙醇溶液(pH3)按 1:20(g/mL)的料液比在 60℃提取红树莓 1.5h, 此条件下, 鲜果中花色苷提取量达 0.625mg/g。在实验范围内, 红树莓花色苷提取物的还原能力、对羟自由基和超氧阴离子自由基的抑制率均随质量浓度的升高而增加。红树莓花色苷提取物抑制羟自由基和超氧阴离子自由基的半数有效浓度(EC₅₀)分别为 0.175mg/mL 和 0.699mg/mL, 说明红树莓花色苷提取物抑制羟自由基比抑制超氧阴离子自由基的能力强。

关键词: 红树莓; 花色苷; 提取; 抗氧化

Extraction and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Red Raspberry

XIAO Jun-xia¹, HUANG Guo-qing^{1,2}, QIU Hong-wei¹, WANG Cheng-rong^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Acidified ethanol method was applied to extract anthocyanins from red raspberry (*Rubus idaeus*), and the optimal extraction conditions were determined by orthogonal array design. Treatment at 60 °C for 1.5 h using 20-fold volume of 80% ethanol aqueous solution containing hydrochloric acid (pH 3) as extraction solvent provided optimum extraction of anthocyanins, and an anthocyanin yield of 0.625 mg/g was achieved. In addition, the resulting extract was evaluated for its antioxidant activity. It was found that the extract displayed dose-dependent reducing power and abilities to scavenge hydroxyl and superoxide anion free radicals in the concentration range investigated here, and that the half-maximal effective concentrations (EC₅₀) against hydroxyl and superoxide anion free radicals were 0.175 mg/mL and 0.699 mg/mL, respectively, indicating that the extract has stronger ability to scavenge hydroxyl free radicals than to scavenge superoxide anion free radicals.

Key words: red raspberry; anthocyanins; extraction; antioxidation

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0015-04

红树莓(*Rubus idaeus*)为蔷薇科悬钩子属多年生落叶果树, 小灌木, 俗称“覆盆子”、“托盘”、“马林”、“梅子”等^[1]。红树莓营养丰富齐全, 含有多人体不可缺少且易吸收的营养元素, 如VB₂、钙、锌、铁、镁等, 尤其是VC含量是苹果的5倍^[2-3]。此外, 红树莓中含量丰富的花色苷, 是其主要的呈色物质。现代医学证明, 红树莓花色苷具有抗氧化、抗突变、降低血清及肝脏中脂肪含量等功能^[4-5]。

目前食品工业上所用的色素多为合成色素, 随着科学技术的发展和人类对健康的重视, 人们对天然色素的需求量会越来越大。红树莓已被开发加工成多种营养美

味的食品, 但对其色素的提取及功能性研究较少。本实验研究了红树莓花色苷的提取条件和抗氧化活性, 为开发功能性天然色素和综合利用红树莓资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷冻红树莓由莱阳冷食厂提供, 使用之前于室温解冻。

95%乙醇、盐酸、乙酸、30%双氧水、三氯乙酸、抗坏血酸、2-巯代巴比妥酸、铁氰化钾、L-蛋氨酸、核黄素、脱氧核糖等试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-07-19

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAD22B07); 农业部“948”项目(2006-G27-7);

校高层次人才启动基金项目(630630)

作者简介: 肖军霞(1977—), 女, 副教授, 博士, 主要从事天然产物化学与微囊化研究。E-mail: achievexiao@163.com

*通信作者: 王成荣(1958—), 男, 教授, 博士, 主要从事农产品加工与贮藏研究。E-mail: qauwcr@126.com

1.2 仪器与设备

UV-2000 紫外分光光度计 上海尤尼科仪器有限公司; RE-52B 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; CP-214 奥豪斯电子分析天平 上海皖宁精密科学仪器有限公司; TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 提取工艺

红树莓→研磨→恒温水浴提取→过滤→真空浓缩→冷冻干燥→红树莓花色苷提取物

1.3.2 花色苷含量的检测方法

1.3.2.1 最大吸收波长的测定

将红树莓解冻, 搅碎, 准确称取 5.0g 红树莓匀浆, 按 1:10 料液比加用盐酸酸化的 pH3 80% 乙醇溶液置于 50℃ 水浴锅中浸提 1h, 浸提液经过滤除去残渣得滤液。在 400~700nm 范围内进行扫描, 确定花色苷的最大吸收波长。

1.3.2.2 测定方法

参考冯建光等^[6]方法稍做改动。准确吸取上述滤液 1mL 与 10mL pH1.0 的盐酸缓冲液混合, 摇匀; 再准确吸取上述滤液 1mL 与 10mL pH4.5 醋酸缓冲液混合, 摇匀。分别用 pH1.0、pH4.5 的缓冲液为空白对照, 于最大吸收波长处测吸光度, 按照公式计算花色苷提取量。

$$X = \frac{\Delta TVFM \times 1000}{\varepsilon bm}$$

式中: X 为红树莓花色苷含量/(mg/g); ΔT 为吸光度 A_{pH1} 和 $A_{pH4.5}$ 的差值; V 为稀释体积/L; F 为稀释倍数; M 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔质量(449g/mol); ε 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数[29600L/(mol·cm)]; m 为样品质量/g; b 为比色皿厚度(1cm)。

1.3.3 红树莓花色苷提取正交试验设计

采用 $L_9(3^3)$ 正交试验设计方法, 对提取溶剂、料液比和浸提温度等影响因素(具体的因素水平根据前期单因素试验结果而确定)进行研究, 提取 1 次, 时间 1.5h, 以筛选最佳提取条件(表 1)。

表 1 正交试验条件因素水平表
Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素		
	A 温度/℃	B 料液比/(g/mL)	C pH3 乙醇体积分数/%
1	50	1:10	60
2	60	1:15	70
3	70	1:20	80

1.3.4 红树莓花色苷提取物抗氧化活性研究

1.3.4.1 待测溶液的配制

按最佳工艺条件提取红树莓花色苷, 经冷冻干燥得到红树莓花色苷提取物, 用蒸馏水配制成质量浓度 1mg/mL 贮备液, 4℃ 冰箱中保存待用。临用前稀释到所需质量浓度。

1.3.4.2 还原能力的测定

采用铁氰化钾还原法测定^[7-8]。取不同质量浓度的红树莓花色苷提取物各 1mL, 分别加入 0.2mL 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH6.6)、0.5mL 质量分数 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 于试管中, 混匀在 50℃ 水浴中反应 20min 后, 用流水速冷, 再加入 1mL 质量分数 10% 三氯乙酸混匀, 以 3000r/min 离心 10min 后取 1.5mL 上清液, 加 0.2mL 质量分数 1% $FeCl_3$ 和 3mL 蒸馏水摇匀, 放置 5min, 以蒸馏水调零, 测定 A_{700} 。 A_{700} 越大, 表示还原能力越强。

1.3.4.3 对羟自由基($\cdot OH$)的抑制作用

采用 D-脱氧核糖-铁体系法测定^[9-10]。依次加入 0.4mL 50mmol/L pH7.5 的磷酸缓冲液及 1.04mmol/L EDTA、1.0mmol/L $FeCl_3$ 、2.0mmol/L VC 和 10.0mmol/L H_2O_2 各 0.1mL, 再分别加入不同质量浓度的红树莓花色苷提取物 0.1mL(对照管不加, 补蒸馏水 0.1mL)和 0.1mL 60mmol/L 脱氧核糖(试剂空白管不加, 补蒸馏水 0.1mL), 混匀。保证各管终体积为 1.0mL, 在 37℃ 保温 1h 后取出加入 1.0mL 质量分数 25% 盐酸终止反应, 然后加 1.0mL 质量分数 1.0% 硫代巴比妥酸(TBA), 沸水浴反应 15min 显色, 冷却后于 532nm 波长处测定吸光度。计算样品对基自由基的抑制率:

$$\cdot OH \text{ 抑制率} \% = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为对照的吸光度; A_1 为加入清除剂后的吸光度; A_2 为试剂空白的吸光度。

1.3.4.4 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)的抑制作用

采用核黄素-蛋氨酸光照法测定^[11-12]。以 pH7.8 0.05mol/L 磷酸盐缓冲溶液作溶剂, 配制含 1.3×10^{-2} mol/L 蛋氨酸、 1.3×10^{-6} mol/L 核黄素、 6.3×10^{-5} mol/L 氮蓝四唑(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)、 1×10^{-4} mol/L EDTA 及不同质量浓度的红树莓花色苷提取物, 总体积为 10mL。在 25~30℃ 用功率为 20W 的荧光灯管照射 20min 后于 560nm 波长处测定吸光度。未加红树莓花色苷提取物的体系吸光度为 A , 加红树莓花色苷提取物后的吸光度为 A_1 。

$$\text{超氧阴离子自由基抑制率} \% = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

1.3.5 统计分析

每个实验重复3次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SAS统计软件进行 t 检验和方差分析,并以LSD法进行各组间的两两比较。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的测定

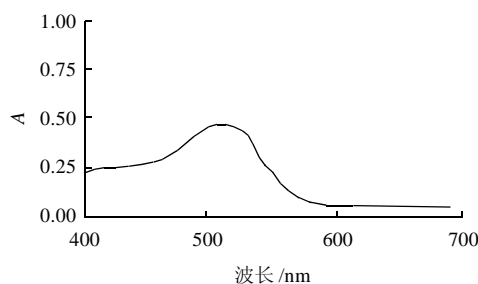


图1 红树莓花色苷可见光扫描图

Fig.1 Visible scanning spectrum of red raspberry anthocyanin

由图1可知,红树莓花色苷的最大吸收波长在510nm处,因此测定红树莓花色苷含量时都在此波长下进行测定。

2.2 正交试验结果

表2 红树莓花色苷提取正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	花色苷提取量/(mg/g)
1	1	1	1	0.5306
2	1	3	2	0.5807
3	1	2	3	0.5531
4	2	2	1	0.5556
5	2	1	2	0.5623
6	2	3	3	0.6252
7	3	3	1	0.5640
8	3	2	2	0.5189
9	3	1	3	0.5067
k_1	0.5548	0.5332	0.5501	
k_2	0.5810	0.5425	0.5540	
k_3	0.5299	0.5900	0.5617	
R	0.0511	0.0568	0.0116	

表3 正交试验方差分析结果

因素	自由度	偏差平方和	F比	F临界值
A	2	0.004	1.2	
B	2	0.006	1.8	
C	2	0	0	
误差	6	0.01		$F_{0.05(2,6)}=5.14$

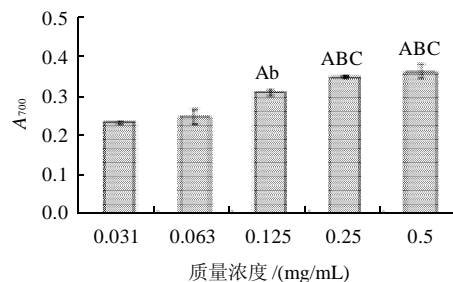
由表2中极差的相对大小得到影响红树莓花色苷提取的主次顺序为料液比>浸提温度>乙醇体积分数,最

佳组合为 $A_2B_3C_3$ 。由表3方差分析可知,各因素对红树莓花色苷提取量的影响差异不显著,综合考虑红树莓花色苷提取效果,根据极差分析结果选取浸提红树莓花色苷的最佳条件为pH3、80%乙醇溶液按1:20(g/mL)的料液比在60℃提取红树莓浆1.5h,在此条件下,鲜果中花色苷提取量达0.625mg/g。

2.3 红树莓花色苷提取物抗氧化活性

2.3.1 还原能力

还原能力的大小可以反映抗氧化活性的大小^[13]。由图2可知,与0.031、0.063、0.125mg/mL红树莓花色苷提取物相比,0.25、0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物的还原能力极显著升高($P < 0.01$),但0.25mg/mL和0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物的还原能力没有显著差异($P > 0.05$)。红树莓花色苷提取物的还原能力在实验范围内随质量浓度的增加而增大。



A: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$,与0.031mg/mL的红树莓花色苷提取物比较; B: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$,与0.063mg/mL的红树莓花色苷提取物比较; C: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$,与0.125mg/mL的红树莓花色苷提取物比较; D: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$,与0.25mg/mL的红树莓花色苷提取物比较。下同。

图2 红树莓花色苷提取物的还原能力

Fig.2 Reducing capacity of red raspberry anthocyanin extract

2.3.2 对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制作用

羟自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基,它可以通过电子转移、加成以及脱氢等方式与生物体内的多种分子作用,造成糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等物质的氧化性损伤,使细胞坏死或突变^[14]。由图3可知,与0.031、0.063、0.125mg/mL红树莓花色苷提取物比较,0.25、0.5mg/mL红树莓花色苷提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制作用极显著升高($P < 0.01$),但0.25mg/mL和0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物对 $\cdot\text{OH}$ 的抑制作用没有显著差异($P > 0.05$)。红树莓花色苷提取物在实验范围内对 $\cdot\text{OH}$ 均有抑制作用,并且随质量浓度增加其抑制率增强。红树莓花色苷提取物抑制 $\cdot\text{OH}$ 的半数有效浓度(EC_{50})为0.175mg/mL,说明红树莓花色苷富含供氢体,具有提供氢质子的能力,可使具有高度氧化性的自由基还原,从而终止自由基连锁反应,起到抑制自由基的目的。

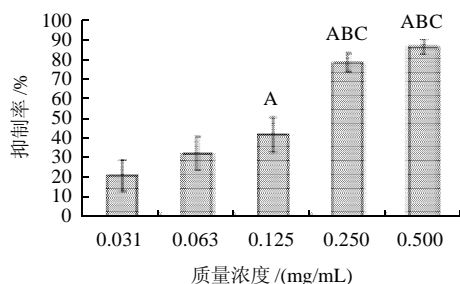
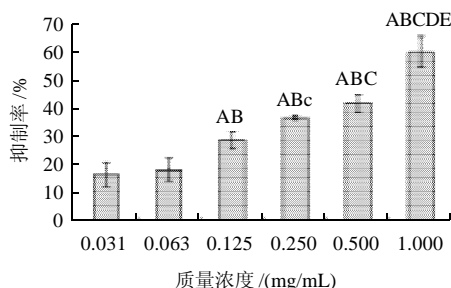


图3 红树莓花色苷提取物对羟自由基的抑制作用

Fig.3 Scavenging capacity of red raspberry anthocyanin extract against hydroxyl radicals

2.3.3 对 $O_2^{\cdot -}$ 的抑制作用

超氧阴离子自由基的形成最早,是氧进行单电子的还原反应首先生成的产物。由它可生成羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢、脂质过氧化物(ROOH)及单线态氧等其他活性氧,引发人体许多疾病的生理变化过程。由图4可知,与0.031、0.063mg/mL的红树莓花色苷提取物比较,其他质量浓度的红树莓花色苷提取物对 $O_2^{\cdot -}$ 的抑制作用均呈极显著升高($P < 0.01$),但0.25mg/mL和0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物对 $O_2^{\cdot -}$ 的抑制作用没有显著差异($P > 0.05$)。红树莓花色苷提取物在实验范围内,对 $O_2^{\cdot -}$ 均有抑制作用,且随质量浓度的增加其抑制率增强。红树莓花色苷提取物抑制 $O_2^{\cdot -}$ 的半数有效浓度(EC_{50})为0.699mg/mL。



E: $P < 0.01$, e: $P < 0.05$, 与0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物比较。

图4 红树莓花色苷提取物对超氧阴离子自由基抑制作用

Fig.4 Scavenging capacity of red raspberry anthocyanin extract against superoxide anion radicals

自由基是在机体氧化反应中自然产生的强氧化性化合物,可损害机体的组织和细胞,引起慢性疾病及衰老效应,而抗氧化剂是一类能够阻断自由基产生和清除自由基的物质。适量补充外源性抗氧化剂来提高机体对自由基的清除能力,使机体内自由基产生与清除保持平衡,对于延缓人体衰老和预防各种老年性疾病具有重要意义^[15]。红树莓花色苷提取物抑制 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的半数有效浓度(EC_{50})分别为0.175mg/mL和0.699mg/mL,说明红树莓花色苷提取物抑制 $\cdot OH$ 比抑制 $O_2^{\cdot -}$ 的能力强,与文献[16]报道结果不一致。这可能是与采用的红树莓花色苷提取方法不同有关,所得到的红树莓花色苷

成分不同,导致最终抗氧化能力不同。

3 结 论

以pH3 80%乙醇溶液按1:20(g/mL)的料液比在60℃提取红树莓浆1.5h,此条件下,鲜果中花色苷提取量为0.625mg/g。红树莓花色苷在实验范围内,还原能力、对 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的清除率都随着质量浓度的升高而增加,其中0.5mg/mL的红树莓花色苷提取物对 $\cdot OH$ 的抑制率达87.32%,1mg/mL的红树莓花色苷提取物对 $O_2^{\cdot -}$ 抑制率达60.82%。红树莓花色苷提取物抑制 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的半数有效浓度(EC_{50})分别为0.175mg/mL和0.699mg/mL,说明红树莓花色苷提取物抑制 $\cdot OH$ 比抑制 $O_2^{\cdot -}$ 的能力强。

本研究表明,红树莓花色苷提取物具有较强的还原能力,对 $\cdot OH$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 均具有较强抑制作用,在相同质量浓度时,红树莓花色苷提取物对 $\cdot OH$ 比 $O_2^{\cdot -}$ 的抑制作用强。研究结果显示红树莓花色苷具有直接清除自由基活性,是一种值得开发的具有较强抗氧化作用的天然色素。

参考文献:

- [1] 房玉林,赵现华,张昂,等.不同酿造工艺对树莓干酒香气成分的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(11):197-202.
- [2] 王文芝.树莓果实营养成分初报[J].西北园艺,2001(2):13-14.
- [3] 王彦辉,张清华.树莓优良品种与栽培技术[M].北京:金盾出版社,2003.
- [4] 方忠祥,倪元颖.花青素生理功能研究进展[J].广州食品工业科技,2001,17(3):56-58.
- [5] 刘建华,张志军,李淑芳.树莓中功效成分的开发浅论[J].食品科学,2004,25(10):370-373.
- [6] 冯建光,谷之英.葡萄皮色素的示差法测定[J].分析检测,2001,9(1):85-86.
- [7] 吴春.花色素抗氧化作用的研究[J].哈尔滨商业大学学报,2003,4(3):492-494.
- [8] McCORD J M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury[J]. New England Journal of Medicine, 1985, 312: 159-163.
- [9] 焦中高,刘杰超,王思新.黑莓红色素对活性氧自由基和亚硝基的清除作用[J].食品添加剂,2004,25(4):127-128.
- [10] 周冉,李淑芬,张大成.鹿茸提取物体外抗氧化活性分析[J].食品科学,2009,30(9):33-36.
- [11] 白燕,秦碧霞,刘莺,等.含硒含硫氨基酸清除超氧阴离子自由基的研究[J].营养学报,2009,31(1):26-29.
- [12] TANG Bo, WANG Yan, CHEN Zhenzhen. Catalytic spectrofluorimetric determination of superoxide anion radical and superoxide dismutase activity using *N,N*-dimethylaniline as the substrate for horseradish peroxidase(HRP)[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2002, 58(12): 2557-2562.
- [13] 何玲玲,王新,刘彬,等.板栗多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2010,26(2):72-75.
- [14] 张燕平,戴志远,陈肖毅.紫苏提取物体外清除自由基能力的研究[J].食品工业科技,2003,24(10):67-71.
- [15] 邓靖,莫正昌,汲广全,等.蛇菰提取物体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2010,31(5):23-25.
- [16] 孙希云,赵秀红,张琦,等.红树莓花色苷粗提取抗氧化性能与抑菌作用研究[J].食品工业科技,2009,30(3):132-135.