

蓝莓花色苷抗氧化活性的研究

李颖畅¹, 孟宪军²

1(渤海大学化学与化工学院, 辽宁锦州, 121000) 2(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳, 110161)

摘要 采用4种体外实验模型对蓝莓花色苷抗脂质体过氧化、还原力和清除羟基自由基、超氧阴离子自由基进行了研究, 并与抗坏血酸进行比较。结果表明: 蓝莓花色苷具有抗脂质体过氧化能力, 还原能力和清除羟基自由基、超氧阴离子自由基能力。蓝莓花色苷抗脂质体过氧化能力强于抗坏血酸; 还原能力和清除超氧阴离子自由基不如抗坏血酸; 低浓度时, 花色苷清除羟基自由基和抗坏血酸接近, 高浓度时强于抗坏血酸。蓝莓花色苷抗脂质体过氧化、清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的 IC_{50} 分别为 165.97、141.12、345.71 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词 蓝莓, 花色苷, 抗氧化

蓝莓(blueberry), 又称越橘、蓝浆果, 属杜鹃花科(Ericaceae) 越橘属(Vaccinium. spp) 多年生落叶或常绿灌木。蓝莓果实含有丰富的花色苷, 花色苷是花青素与糖以糖苷键结合而成的一类化合物, 花色苷具有抗氧化、清除自由基等作用^[1]。目前常用的抗氧化剂均为人工合成, 如 BHA(丁基羟基茴香醚)、BHT(二丁基羟基甲苯) 和 PG(没食子酸丙酯), 实验证明人工合成抗氧化剂对人体有一定的毒副作用^[2]。而富含各种天然抗氧化物质的水果和蔬菜的抗氧化活性及抗氧化成分的研究倍受瞩目, 以天然抗氧化剂取代合成抗氧化剂是食品添加剂的发展趋势。目前已对紫甘薯花色苷、黑大豆种皮花色苷和草莓花色苷等的抗氧化作用进行过研究^[3~5], 但对蓝莓花色苷抗氧化研究甚少, 本文选取几种测定抗氧化活性的体系对蓝莓花色苷的体外抗氧化活性进行了试验, 对寻求新型高效的天然抗氧化剂, 提高蓝莓的利用价值具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝莓果, 沈阳市双翼果业生产示范基地, 7 月中旬采收。

无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、柠檬酸、柠檬酸钠、大豆卵磷脂、三氯乙酸、硫代巴比妥酸、硫酸亚铁、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、六氰合铁酸钾、三氯化铁、水杨酸、邻苯三酚、三羟基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、过氧化氢、抗坏血酸, AB-8 大孔树脂(天津海光化工有限公司)。

UV-1600 型紫外可见分光光度计(北京瑞利分

析仪器公司), pH S-25 型酸度计(上海理达仪器厂), 电热恒温水浴锅(常州国华电器有限公司), RE-52 型旋转蒸发器(上海博通经贸有限公司), SHZ-IIIB 型循环水真空泵(上海华琦科学仪器有限公司), 电子天平(上海天平仪器厂), HZQ-F 全温振荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), 玻璃层析柱(上海青浦沪西仪器厂); HL-2 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂); DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓花色苷的制备

取一定量蓝莓果, 破碎, 用 pH=3 的体积分数 60% 乙醇溶液按 1g : 15mL 的比例混合均匀, 于 40℃ 下浸提 2h 后抽滤, 收集滤液, 40℃ 减压浓缩得到红色粘稠的粗提液, 经 AB-8 大孔树脂纯化, 40℃ 减压浓缩得到纯化的蓝莓花色苷浓缩液, 真空干燥得到紫黑色粉末。

1.2.2 抗脂质过氧化能力的测定^[6,7]

1.2.2.1 试液的配制

(1) 脂质体 PBS 分散系(LLS): 300g 卵磷脂溶解于 30mL 10mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS), 冰浴震荡。

(2) 三氯乙酸(TCA)-硫代巴比妥酸(TBA)-盐酸(HCl) 混合液: 15g TCA, 0.37g TBA, 2.1 mL 浓盐酸依序放入 100 mL 水中。

1.2.2.2 测定步骤

分别于样品管中依次加入 1mL 卵磷脂溶液(LLS)、1mL 0.4 mmol/L 硫酸亚铁、1mL 样品, 混匀。避光于 37℃ 水浴 60min, 加入 2mL TCA-TBA-HCl 混合液, 90~100℃ 水浴 15 min, 迅速冷却, 以 3 000r/min 转速离心 10 min, 取上清液在 535 nm 测

第一作者: 在读博士, 讲师(孟宪军为通讯作者)。

收稿日期: 2007-07-23

吸光度 A_s 。空白管以 1 mL 重蒸水代替 1 mL 样品, 操作方法同样品管, 可测得空白管的吸光度 A_c , 参比管中以 1 mL 重蒸水代替 1 mL 卵磷脂, 抗坏血酸为阳性对照。

$$\text{抑制率}/\% = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

1.2.3 还原力的测定^[3]

取不同浓度花色苷 2.5 mL 于试管中, 依次加入 2.5 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=6.6) 和 2.5 mL 质量分数 1% 六氰合铁酸钾溶液 $[K_3Fe(CN)_6]$, 于 50℃ 水浴保温 20 min 后, 快速冷却, 再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸 (TCA), 以 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液 2.5 mL, 依次加入 2.5 mL 蒸馏水, 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 充分混匀, 静置 10 min 后, 在 700 nm 处测定其吸光值, 吸光值越大表示还原力越强 (以蒸馏水作参比)。

1.2.4 清除羟自由基 ($\cdot OH$) 的测定^[8]

按照 Smirnov (1989) 的方法 (有改动)。利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 反应产生 $\cdot OH$, 在体系内加入水杨酸捕捉并产生有色物质, 该物质在 510 nm 下有最大吸收。反应体系中含 8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 10 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL, 10 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 分别加入不同浓度蓝莓花色苷溶液 1 mL。最后加 H_2O_2 启动反应, 37℃ 反应 0.5 h, 以蒸馏水作参比, 在 510 nm 下测定各浓度的吸光度。考虑花色苷本身的吸光值, 以 10 mmol/L $FeSO_4$ 1 mL, 10 mmol/L 水杨酸-乙醇 1 mL, 不同浓度的蓝莓花色苷溶液 1 mL 和 1 mL 蒸馏水作为花色苷的本底值。清除率计算公式:

$$\text{清除率}/\% = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100$$

其中: A_0 为对照液的吸光度, A_1 为加入花色苷溶液后的吸光度, A_2 为不加显色剂 H_2O_2 花色苷溶液的吸光度。抗坏血酸作阳性对照。

1.2.5 清除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 的测定^[10]

1.2.5.1 采用邻苯三酚自氧化法测定

取 4.5 mL pH 8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 4.2 mL 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 恒温水浴中保温 20 min 后, 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杯, 每隔 0.5 min 在 320 nm 处测定溶液的吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加。

1.2.5.2 样品活性测定

取 4.5 mL pH 8.2 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 3.3 mL 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 恒温水浴中保温 20 min 后, 取出后立即加入一定浓度的花色苷溶液 0.9 mL, 和 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杯, 每隔 0.5 min 在 320 nm 处测定溶液的吸光度, 计算线性范围内每分钟吸光度的增加, 计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = (\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0 \times 100$$

其中: ΔA_0 为邻苯三酚自氧化速率, ΔA 为加入蓝莓花色苷后邻苯三酚的自氧化速率, 单位均为吸光度每分钟的增值。

1.2.6 数据分析

采用 DPS 软件进行统计分析, 文中的数值为 3 次测定结果的平均值。

2 结果与分析

2.1 蓝莓花色苷抗脂质过氧化能力

由图 1、图 2 可见, 由 Fe^{2+} 引发的卵磷脂脂质体体系中蓝莓花色苷对脂质体有明显的抑制作用, 抑制率随花色苷浓度的增加而增大。不同浓度花色苷对脂质体过氧化的抑制率差异显著, 当蓝莓花色苷浓度为 150 $\mu g/mL$ 时, 对脂质过氧化的抑制率为 47.78%, 当蓝莓花色苷的浓度为 300 $\mu g/mL$ 时, 对脂质过氧化的抑制率为 72.92%。蓝莓花色苷抗脂质过氧化能力明显优于抗坏血酸, 蓝莓花色苷的 IC_{50} 为 165.97 $\mu g/mL$, 抗坏血酸 IC_{50} 为 4.60 mg/mL 。

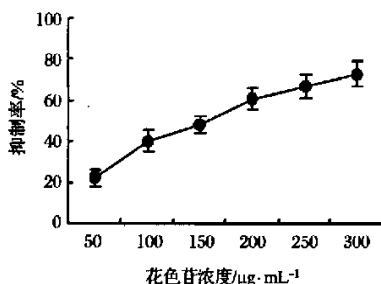


图 1 蓝莓花色苷对脂质过氧化的抑制作用

2.2 蓝莓花色苷还原力

一般情况下, 样品的还原力与抗氧化活性有明显的相关性^[9,10]。从图 3、图 4 可以看出, 在一定浓度范围内, 蓝莓花色苷还原力随其浓度的增加而增强, 不同浓度之间花色苷还原力差异显著。蓝莓花色苷具有较强的还原能力, 但低于同浓度抗坏血酸的还原

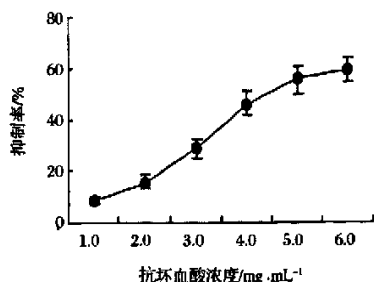


图2 抗坏血酸对脂质过氧化的抑制作用

力。蓝莓花色苷浓度为 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,吸光度为 0.777, 抗坏血酸浓度为 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,吸光度已达到 1.672, 抗坏血酸的还原力大约是蓝莓花色苷还原力的 2.15 倍。

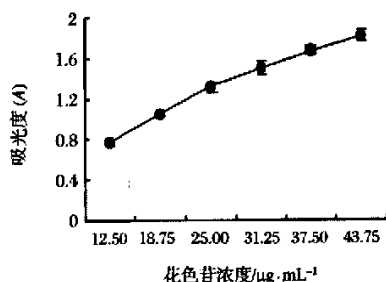


图3 蓝莓花色苷的还原力

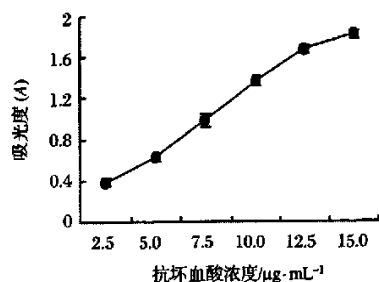


图4 抗坏血酸的还原力

2.3 蓝莓花色苷清除羟自由基能力

蓝莓花色苷具有供氢能力, H 与自由基结合, 使之还原为惰性化合物或是稳定的自由基, 从而可以清除机体内过多的有害自由基。羟自由基是毒性最大的活性氧, 对细胞内 DNA 的破坏作用最大^[1]。由图 5 可见, 在一定浓度范围内, 随花色苷浓度的增大, 对羟自由基的清除率增强, 其清除率和蓝莓花色苷浓度 (50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 呈线性关系。花色苷浓度低于 50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 清除率和抗坏血酸的相接近, 花色苷浓度高于 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 清除率高于抗坏血酸, 花色苷 IC_{50} 为 141.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗坏血酸 IC_{50} 为 161.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 蓝莓花色苷清除超氧阴离子自由基能力

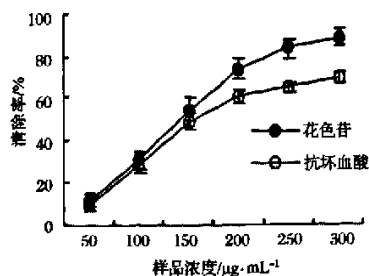


图5 蓝莓花色苷和抗坏血酸对羟自由基清除能力

邻苯三酚在碱性条件下, 能迅速自氧化, 释放出 O_2^- , 生成带色的中间产物, 在反应的最初几分钟内, 中间产物的积累与时间成线性关系。当释放出的 O_2^- 受到抑制或清除时, 就可以阻止中间产物的积累, 花色苷对邻苯三酚自氧化的抑制率可作为他对 O_2^- 清除率的表征, 根据其自氧化速率变化来计算花色苷对 O_2^- 的清除率。由图 6、图 7 可知, 花色苷具有清除 O_2^- 的作用, 随着花色苷浓度的增加, 对超氧阴离子自由基清除率提高, 但花色苷对 O_2^- 的清除作用不如抗坏血酸, 花色苷 IC_{50} 为 345.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 抗坏血酸 IC_{50} 为 4.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

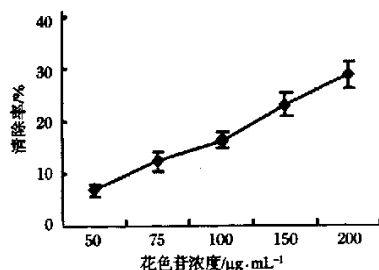


图6 蓝莓花色苷对超氧阴离子自由基清除能力

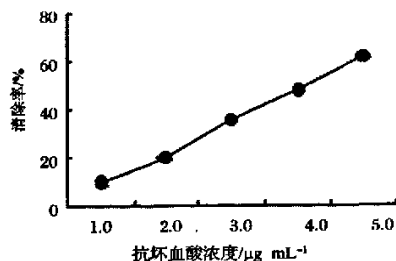


图7 抗坏血酸对超氧阴离子自由基清除能力

3 讨论

(1) 由于花色苷对铁离子具有螯合能力, 随着反应系统花色苷剂量的增加, 其对铁离子的螯合百分比也增加, 可使脂质氧化的起始反应减慢与氢过氧化物

所产生的 LO 及 LOO 自由基也相对减少。由于花色苷类结构中大分子间的共振效应,螯合铁离子的能力高于抗坏血酸,表现出抗脂质过氧化能力高于抗坏血酸。

(2) 蓝莓花色苷的还原力小于抗坏血酸,可能是花色苷结构中的 -OH 数量少于抗坏血酸,因此还原力小于抗坏血酸。与紫心甘薯花色苷比较^[9],蓝莓花色苷的还原力高于紫心甘薯花色苷。

(3) 分别采用 Smirnoff(1989)方法和邻苯三酚自氧化法测定蓝莓花色苷清除羟自由基和超氧阴离子能力自由基,结果表明蓝莓花色苷有较强的清除羟自由基能力,而且随其浓度的增大对羟自由基的清除能力呈增强的趋势,并略好于抗坏血酸,蓝莓花色苷清除超氧阴离子的能力低于抗坏血酸。

4 结 论

蓝莓花色苷具有抗脂质体过氧化能力,还原能力和清除羟基自由基、超氧阴离子自由基能力。蓝莓花色苷在抗脂质体过氧化能力方面强于抗坏血酸,在还原能力和清除超氧阴离子自由基能力方面不如抗坏血酸,在清除羟基自由基方面,低浓度时二者接近,高浓度时花色苷强于抗坏血酸。

蓝莓花色苷抗脂质过氧化、清除羟基自由基、清除超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 分别为 165.97、141.12、345.71 μg/mL。

参 考 文 献

1 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M], 北京: 化学工业出版社,

2004, 1~58

- 2 凌关庭. 食品添加剂手册(第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 685~690
- 3 姜平平, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 紫心甘薯花色苷抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2002(6), 8~11
- 4 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑大豆种皮花色苷的提取及其抗氧化作用研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(8), 161~164
- 5 Kjersti Aaby, Grete Skrede, Ronald E. Wrolstad. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*) [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10), 4 032~4 040
- 6 张尔贤, 俞丽君, 周意林, 等. Fe²⁺ 诱发脂蛋白 PUFA 过氧化体系及对若干天然产物抗氧化作用的评价[J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(2), 218~292
- 7 樊金玲, 丁霄霖. 沙棘籽提取物抗氧化活性与酚类组成的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4), 529~524, 554
- 8 Smironff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4), 1 051~1 560
- 9 GOW Chinyen, Hui-Yinchen. Antioxidant Activity of various tea extracts in reaction to their antimutagenicity [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(1), 27~32
- 10 Duh P D, Yen G C. Antioxidant activities of three herbal water extracts[J]. Food Chem, 1997, 60, 639~645
- 11 吴文林, 胡天喜. 几种黄酮类化合物对羟自由基引起的 DNA 损伤的保护作用[J]. 自由基生命科学进展, 1997(5), 101~104

Studies on the Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry

Li Yingchang¹, Meng Xianjun²

1(College of chemistry and chemical engineering, Bohai University, Jinzhou 121000, China)

2(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

ABSTRACT Inhibiting lipid peroxidation, reducing power, scavenging hydroxyl free radicals and superoxide anions of anthocyanin from blueberry were studied. The results showed that anthocyanin could inhibit lipid peroxidation, has the ability of reduction, scavenging hydroxyl free radicals and superoxide anions. The anthocyanin from blueberry has better lipid peroxidation inhibition ability than ascorbic acids, but worse than ascorbic acids on reduction and scavenging superoxide anions. The scavenging ability of superoxides anions was almost the same with ascorbic acids at low concentration but better than ascorbic acids at high concentration. The superoxide ability, scavenging hydroxyl free radicals and anions capacity and IC₅₀ of inhibiting were 165.97, 141.12, 345.71 μg/mL.

Key words blueberry, anthocyanin, antioxidation