

蓝莓、紫薯与葡萄籽原花青素提取及其清除自由基能力的比较

王丹丹, 张 万^①

(辽东学院农学院, 辽宁丹东 118003)

摘 要: 运用有机溶剂法和酶解法提取蓝莓、葡萄籽和紫薯中的原花青素, 对提取条件进行了优化; 采用 DPPH 法测定三者原花青素抗氧化活性及清除自由基能力。结果表明, 最佳条件下, 原花青素含量依次为: 葡萄籽 (89.88 mg/g) > 蓝莓 (37.80 mg/g) > 紫薯 (17.10 mg/g), 三者清除自由基的能力为 $AE_{\text{葡萄籽}} (0.014 0) > AE_{\text{蓝莓}} (0.008 1) > AE_{\text{紫薯}} (0.005 9)$ 。

关键词: 蓝莓; 紫薯; 葡萄籽; 原花青素; DPPH 法

中图分类号: Q976-33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4939 (2015) 03-0180-06

原花青素 (proanthocyanidins, PC) 属于花青素 (cyanidin) 类物质^[1,2], 是一种有着特殊分子结构的类黄酮类多酚化合物^[7]。原花青素具有较强的清除自由基和抑制氧化损伤的能力, 分别是维生素 E 和维生素 C 的 50 倍和 20 倍^[3,4], 其可被有机体快速、充分吸收, 且半衰期较长^[6]; 原花青素能延缓衰老, 享有“口服化妆品”的美誉, 原花青素还具有抗癌、抗辐射、抗疲劳、抗血小板凝集及预防动脉粥样硬化等作用; 所以, 原花青素因具有较高的经济及保健价值而备受大众的青睐。蓝莓、紫薯和葡萄籽为人们生活中常见的富含原花青素的食物, 但至今未见三种材料原花青素含量及抗氧化能力比较的报道, 本实验以此为目的, 以期为三种植物原花青素含量比较及食品天然抗氧化领域提供可靠的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验材料: 蓝莓、紫薯、葡萄采自丹东市, 成熟采收并冷藏。

1.2 仪器和材料

RE-5298A 旋转蒸发器 (上海亚荣); UV757CRT 型紫外-可见分光光度计 (上海精

科); 打浆机; TP-214 型电子天平 (丹佛仪器北京有限公司); 恒温水浴锅 (HH-S, 江苏国胜实验仪器厂) 等。

1.3 试剂

甲醇、乙醇、硫酸均为分析纯; 纤维素酶、石油醚、香草醛、原花青素标准品、DPPH 自由基等。

1.4 实验原理与方法

采用有机溶剂法和酶解法提取原花青素。由于植物细胞壁主要成分为纤维素, 因此在提取液中加入纤维素酶辅助, 可大大提高原花青素的提取率; 二苯基苦味肼基自由基 (DPPH) 是一种稳定的以氮为中心的自由基, 具有单一电子, 故能接受一个电子或氢离子, 在 517 nm 波长处有最大吸收值, 其醇溶液呈紫色, 且其浓度与吸光度呈明显线性关系。将原花青素加入 DPPH 乙醇溶液后, DPPH 的单电子被捕捉, 造成 DPPH 数量减少而使其颜色变浅; 因此, 可在波长 517 nm 处检测原花青素对 DPPH 自由基的清除效果, 在最大光吸收波长处的吸光值下降, 吸光度水平的降低表明抗氧化性的增加, 从而以评价试验样品的抗氧化能力, 此抗氧化能力用抑制率来表示, 抑制率越大, 抗氧化性越强。

① 收稿日期: 2015-05-04

作者简介: 王丹丹 (1982—), 女, 辽宁大连人, 硕士, 讲师, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

1.5 实验步骤

1.5.1 实验材料的预处理

将蓝莓、紫薯用清水洗净, 切成小块, 用打浆机破碎, 烘干过筛; 将葡萄去肉, 取出葡萄籽, 进行烘干, 粉碎后过筛处理, 之后进行脱脂、浸泡, 收取上清液备用。

1.5.2 原花青素提取条件的优化

针对提取液中乙醇浓度、提取时间、物料比、pH 值以及温度进行优化^[8,9]。

1.5.2.1 乙醇浓度

取3种植物材料各2g, 乙醇浓度梯度设为55%、60%、65%、70%、75%, 其他条件为: 物料比1:15 (w/v), 浸提时间120 min, pH 5, 提取温度45℃, 加入10 mg 纤维素酶, 将提取物4000 r/min 离心10 min、定容至200 mL, 分别取滤液2 mL, 运用香草醛-硫酸法测定原花青素含量。

1.5.2.2 温度

取3种材料各2g, 温度梯度设为40℃、45℃、50℃、55℃、60℃, 乙醇浓度65%, 其他条件同“1.5.2.1”, 测定原花青素含量。

1.5.2.3 提取时间

取3种材料各2g, 时间梯度设为100、110、120、130、140 min, 乙醇浓度65%, 其他条件同“1.5.2.1”,

1.5.2.4 物料比

取3种材料各2g, 物料比 (w/v) 梯度设为1:10、1:12、1:15、1:17、1:20, 乙醇浓度65%, 其他条件同“1.5.2.1”测定原花青素含量。

1.5.2.5 pH 值

取3种材料各2g, pH 值梯度设为3、4、5、6、7, 乙醇浓度65%, 其他条件同“1.5.2.1”,

测定原花青素含量。

1.6 原花青素的含量检测

以三种物质各自的最适条件提取原花青素, 并通过香草醛-硫酸法计算原花青素的含量。

1.7 原花青素清除自由基能力分析

称取0.0800g 葡萄籽提取物, 65%乙醇定容至100 mL。分别配制浓度为0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL DPPH 乙醇溶液, 分别取上面5种不同浓度的DPPH 葡萄籽乙醇溶液各1mL于5支, 再分别加入8mL 65%乙醇溶液。采用动力学监测法, 测定溶液随时间变化的吸光度A, 每30s读取1次, 待吸光度基本不变时, 药物与自由基反应完全, 记录最终吸光度A₂。

$$\text{自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100$$

式中A₁为加药后DPPH溶液的吸光度; A₂为样品溶液自身的吸光度; A₀为未加药DPPH溶液的空白吸光度。

根据葡萄籽原花青素清除DPPH自由基的曲线, 计算得到DPPH自由基原始质量浓度减少至50% (稳定态) 时葡萄籽原花青素的用量为半数有效量 (EC₅₀)。自由基清除能力AE = 1/EC₅₀, 根据AE的大小判断抗氧化剂清除自由基的能力的大小。

2 结果分析

2.1 乙醇浓度对原花青素提取的影响

图1所示, 三种植物材料中葡萄籽的原花青素提取率最高, 其中葡萄籽的最适乙醇提取浓度为65%; 紫薯为70%; 而蓝莓为60%。

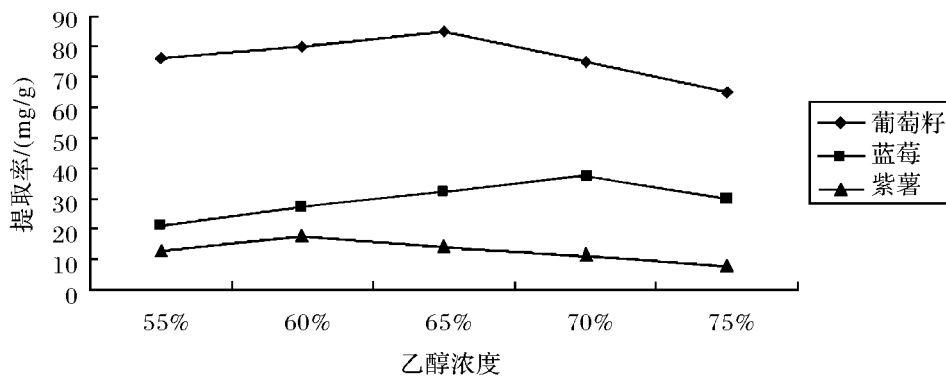


图1 乙醇浓度对原花青素提取率的影响

2.2 温度对原花青素提取的影响

图 2 所示, 原花青素对温度较敏感, 且不同样

品的最适提取温度相差较大, 蓝莓和葡萄籽的最适温度约为 40 ℃, 而紫薯则为 60 ℃。

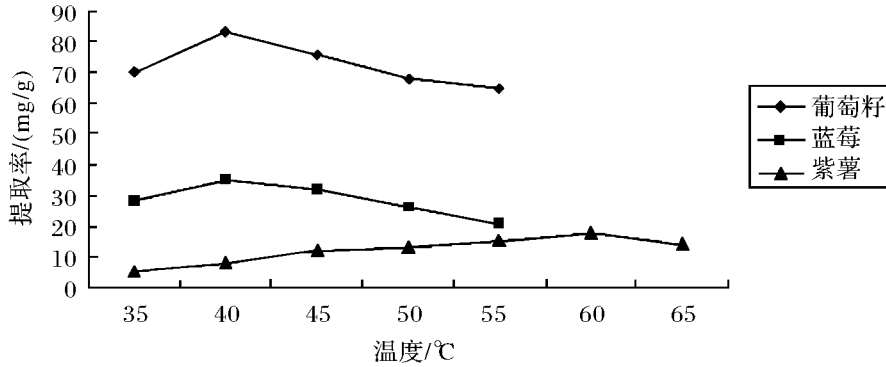


图2 温度对原花青素提取率的影响

2.3 时间对原花青素提取的影响

图 3 表明, 100 min 时已有原花青素浸出, 在随后的大约 20 min 内原花青素的浸出量达到峰值,

随后略有下降。其原因可能是原花青素较不稳定, 长时间提取会导致其降解, 致使提取率下降。

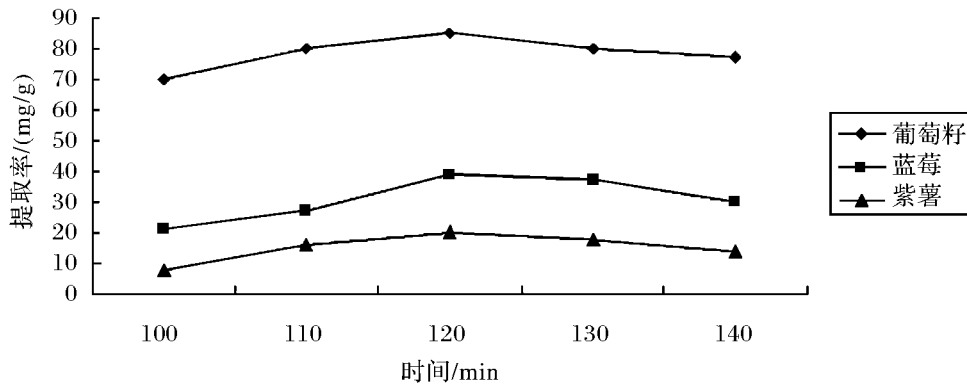


图3 时间对原花青素提取率的影响

2.4 物料比对原花青素提取的影响

一般来说, 物料比越大, 原花青素的提取率也越高, 但由图 4 可知, 当物料比达到一定程度时,

提取率反而降低, 可能原因是物料比过大, 加之提取时间过长, 导致浸出的原花青素部分降解, 提取率下降。

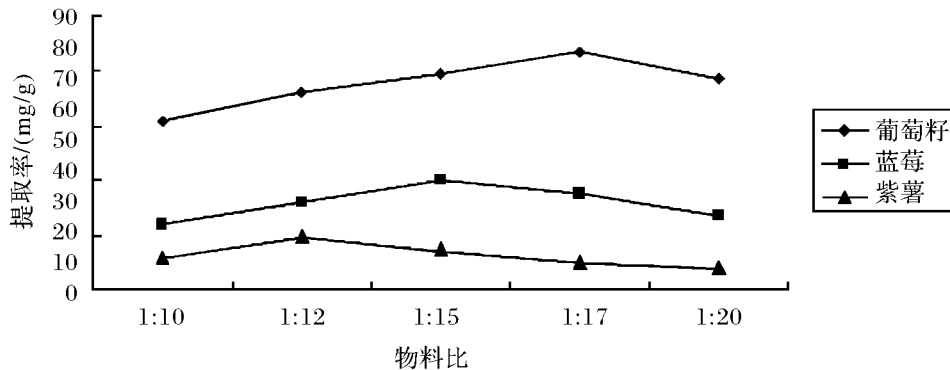


图4 物料比对原花青素提取率的影响

2.5 pH 值对原花青素提取的影响

图 5 所示, 供试样品的最适 pH 值有差异, 紫

薯的最适 pH 值为 6, 蓝莓最适 pH 为 4; 葡萄籽的最适 pH 为 5; 且过酸或过碱都会使原花青素降解。

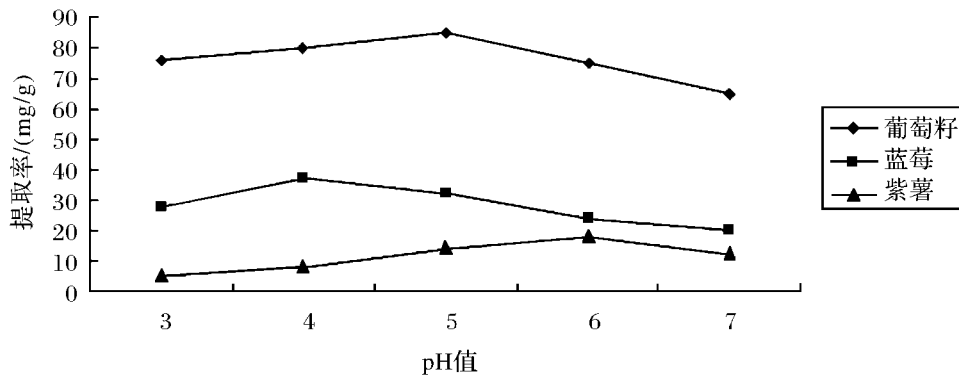


图5 pH值对原花青素提取率的影响

2.6 原花青素的含量检测

2.6.1 回归方程的制备

采用香草醛-硫酸法, 以购得的原花青素标准品为对照品。将已定容的溶液取 1 mL 并加入 5 mL 显色剂 (硫酸和香草醛溶液 1:1), 在室温下显色 20 min, 500 nm 波长处测定吸光值; 注意避光保存。

原花青素的浓度 (C) 与吸光度 (A) 的回归方程:

$$A = 3.4364C + 0.0023 \quad R^2 = 0.9952$$

原花青素含量 D (mg/g):

$$D = (V \times C \times n) / W$$

式中 V 为试剂定容体积 (mL), n 为稀释倍数, C 为试剂中原花青素浓度 (mg/mL), W 为试剂重量 (g)。

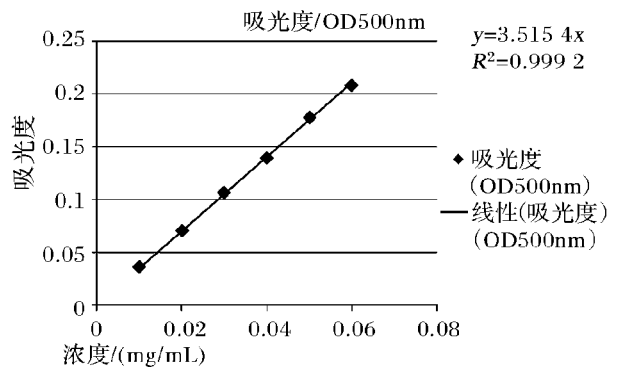


图6 原花青素标准曲线

2.6.2 葡萄籽原花青素的最适提取条件

表1 葡萄籽原花青素最适提取条件

乙醇浓度 /%	提取温度 /℃	提取时间 /min	物料比 (1:x)	pH 值	吸光度 /A	浓度 / (mg/mL)	含量 / (mg/g)
65	40	120	17	5	0.62	179.75	89.88

2.6.3 蓝莓原花青素的最适提取条件

表2 蓝莓原花青素最适提取条件

乙醇浓度 /%	提取温度 /℃	提取时间 /min	物料比 (1:x)	pH 值	吸光度 /A	浓度 / (mg/mL)	含量 / (mg/g)
60	40	120	15	4	0.26	75.59	37.80

2.6.4 紫薯原花青素的最适提取条件

表3 薯原花青素最适提取条件

乙醇浓度 /%	提取温度 /℃	提取时间 /min	物料比 (1:x)	pH 值	吸光度 /A	浓度 / (mg/mL)	含量 / (mg/g)
70	60	120	12	6	0.12	34.20	17.10

由表1、表2和表3可得: 在各自最适条件下, 葡萄籽原花青素提取率 (89.88 mg/g) > 蓝莓 (37.80 mg/g) > 紫薯 (17.10 mg/g)。

2.7 DPPH 法测定葡萄籽中原花青素清除自由基的能力

2.7.1 DPPH 标准曲线

设置 5 个浓度梯度,在 517 nm 波长处测其吸光值,每个浓度测三次取平均值,绘制标准曲线,得回归方程 $y = 0.0147x + 0.0145$ ($R^2 = 0.9997$)。

表 4 不同浓度 DPPH 标准溶液吸光度值

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	9.1	13.6	22.7	45.3	90.6
吸光值	0.1415	0.2068	0.3424	0.6821	1.316

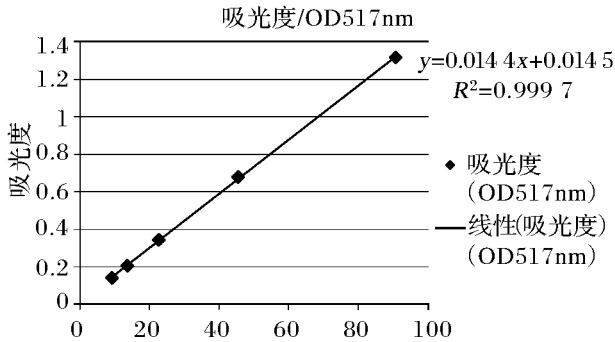


图 7 DPPH 标准品紫外测定标准曲线图

2.7.2 自由基清除率测定

DPPH 自由基溶液中加入浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL 原花青素,30 min 后,溶液颜色变化不大,反应完全,记录各浓度的吸光度,计算清除率 (如表),并绘制原花青素加入量与 DPPH 残留率线性关系,得到回归方程 $Y = -0.2878X + 85.663$ ($R^2 = 0.9997$)。

表 5 原花青素对自由基的清除率

测定次数	各管光度值 OD _{517nm}				
	1	2	3	4	5
A ₀	3.010	1.243	1.010	0.901	0.789
A ₁	0.912	0.683	0.594	0.543	0.482
A ₂	0.030	0.030	0.031	0.030	0.030
清除率 (%)	29.3	52.5	55.7	56.9	57.3

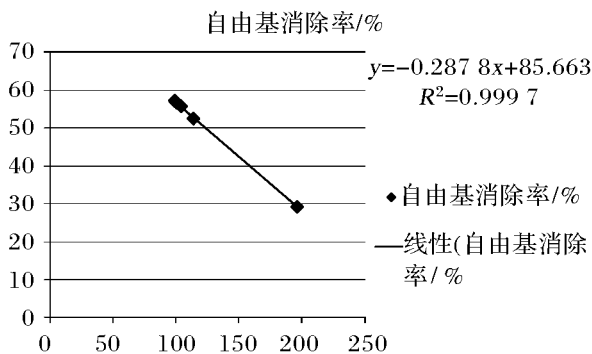


图 8 原花青素加入量与 DPPH 残留率线性关系

由图 8 可知葡萄籽原花青素清除 DPPH 自由基

的 EC₅₀ 为 71.27 mg/g, AE 为 0.014 0; 相同方法得到蓝莓原花青素清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 为 123.12 mg/g, AE 为 0.008 1; 得到紫薯原花青素清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 为 168.75 mg/g, AE 为 0.005 9。

3 实验结论

在各自最适条件下,葡萄籽原花青素提取率 (89.88 mg/g) > 蓝莓 (37.80 mg/g) > 紫薯 (17.10 mg/g); 且乙醇浓度、提取温度、提取时间、物料比、pH 值都影响原花青素的提取率; 葡萄籽原花青素清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 值为 71.27 mg/g, AE 为 0.014 0; 三种样品原花青素提取物对 DPPH 的清除能力大小依次为,即 AE 葡萄籽 (0.014 0) > AE 蓝莓 (0.008 1) > AE 紫薯 (0.005 9), 显而易见,原花青素具有较高的保健价值和经济价值。文章研究为开发和利用原花青素提供依据。

参考文献:

- [1] TOSHIKI A. Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from Azuki beans to peroxy radicals [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54 (10): 2499 - 2504.
- [2] TOSHIKI A. Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from Azuki beans in aqueous systems [J]. Agric Biol chem, 1988, 52 (11): 2717 - 2722.
- [3] YAMAKOSHI J, SAITO M, KATAOKA S, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin - rich extract from grape seeds [J]. Food and Chemical Toxicology. 2002, 40: 599 - 607.
- [4] PORTER L J, HRSTICH L N, CHAN B G. The conversion of procyanidins and prode - lphinidins to cyanidin and delphinidin [J]. Phytochemistry, 1986, 25 (1): 223 - 230.
- [5] 冷春玲, 宋洁. 吡咯喹啉醌生物学功能研究进展 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2014, 21 (2): 103 - 108.
- [6] 林黎娟. 癌基因 DEK 蛋白表达判断肺鳞状细胞癌预后临床价值 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2013, 20 (3): 189 - 193.
- [7] 刘萍, 王文君. 紫番薯原花青素的提取和稳定性研究. 食品工程, 2012, 6 (2): 24 - 27.

- [8] 刘丽萍, 赵颖. 葡萄籽中原花青素的功能及提取工艺 [J]. 食品与药品, 2006, 12 (8): 172-173.
- [9] 吕丽爽, 潘道东. 微波对葡萄籽中低聚原花青素 (OPC.s) 提取的影响 [J]. 食品与机械, 2004, 20 (6): 31-32.
- [10] 李晓静, 赵国欣. 原花青素的分析方法概述 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (1): 125-126.
- [11] 王丹丹. 辽宁地区大白菜基因组 DNA 的 RAPD 分析 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2014, 21 (4): 272-277.
- [12] 徐亚维, 赵杨, 魏馨. 黑豆皮原花青素提取工艺的优化 [J]. 贵州农业科学, 2011, 39 (12): 229-231.
- [13] 姚开, 何强, 吕远平. 葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法比较 [J]. 化学研究与应用, 2002, 14 (2): 230-232.
- [14] 杨滢滢, 王雪青, 庞广昌. 原花青素抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 食品科学, 2008, 29 (10): 694-697.
- [15] 张爱军, 沈继红, 马小兵, 等. 葡萄籽的开发与利用 [J]. 中国油脂, 2004, 29 (3): 55-57.
- [16] 赵超英, 姚小曼. 葡萄籽提取物原花青素的营养保健功能 [J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12 (6): 38-41.
- [17] 张海晖, 李金凤, 段玉清. 板栗壳原花青素提取及其稳定性研究 [J]. 食品科学, 2011, 32 (08): 5-9.
- [18] 周玮婧, 孙智达, 谢笔钧, 等. 荔枝皮原花青素提取、纯化及抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30 (8): 68-71.
- [19] 张贺. 大气混合污染物对大鼠肺脏中血红素氧合酶 1 表达的影响 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2013, 20 (4): 247-252.
- [20] 张梅, 刘利, 季长波, 等. 辽宁凤凰山保护区大型真菌的物种组成和生态特征 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2013, 19 (2): 94-99.
- [21] 张兴茂, 林松毅, 刘静波, 等. 长白山笃斯越桔果实原花青素浸提工艺的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28 (11): 186-189.
- [22] 张艳红. 丹东野生杜鹃花有性繁殖的生态因子研究 [J]. 辽东学院学报: 自然科学版, 2014, 21 (1): 20-22.

(责任编辑: 龙海波)

Extraction of Procyanidins from Blueberry, Purple Sweet Potato and Grape Seed and Their Free Radical – scavenging Capacity

WANG Dan – dan, ZHANG Wan

(College of Agriculture, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

Abstract: Procyanidins were extracted from blueberry, purple sweet potato and grape seed by organic solvent method and enzyme hydrolysis method. The extraction conditions were optimized. The antioxidant activity and free radical – scavenging capacities of the extracted procyanidins were analyzed by DPPH assay. The results showed that under optimal conditions, the procyanidin content in grape seeds, blueberry and purple sweet potato was 89.88 mg/g, 37.80 mg/g and 17.10mg/g, respectively. The free radical – scavenging capacity (AE) of procyanidins extracted from grape seeds, blueberry and purple sweet potato was 0.014 0, 0.008 1 and 0.005 9, respectively.

Key words: blueberry; purple sweet potato; grape seed; procyanidin; DPPH assay