

文章编号:1673-1689(2011)06-0818-04

蓝莓冻果多酚粗提物体外抗氧化活性的研究

解利利¹, 张 慇^{*1}, 孙金才²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 宁波海通食品科技有限公司, 浙江 慈溪 315300)

摘 要: 选用过氧化氢体系、羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系、亚硝酸盐体系、还原能力对蓝莓冻果多酚粗提物进行抗氧化活性的测定, 并与 VC 做对比。在试验浓度范围内(0.5~10 mg/mL), 蓝莓冻果的多酚粗提物对几种体系有不同程度的抗氧化作用, 清除过氧化氢能力较强, 清除羟基自由基和亚硝酸盐的能力明显弱于 VC, 还原能力及清除超氧阴离子能力与 VC 较为接近。

关键词: 蓝莓; 多酚粗提物; 维生素 C

中图分类号: Q 505

文献标识码: A

Study on Antioxidation Activities of Freezing Blueberry Polyphenol

XIE Li-li¹, ZHANG Min^{*1}, SUN Jin-cai²

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Ningbo Haitong Food Science & Technology Ltd. Co, Cixi 315300, China)

Abstract: In this study, the antioxidation and deoxidize activity of blueberry polyphenol was studied and compared with VC using the hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide radical, nitrite system as index. Results demonstrated that the blueberry polyphenol exhibited different antioxidation activities in these radicals. The scavenging activity to nitrite system and hydroxyl radical was lower, but the hydrogen peroxide system was higher than that of VC. Furthermore, , scavenging activities to deoxidize activity and superoxide radical system were equal to VC.

Key words: blueberry, polyphenol extraction, VC

蓝莓(blueberry), 又称越橘、蓝浆果, 属杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(Vaccinium. sp)多年生落叶或常绿灌木。蓝莓果实近圆形, 呈现深蓝色。蓝莓果含有丰富的花色苷, 另外还含有碳水化合物、有机酸、纤维素、VC、黄酮、钾、钙、磷等矿物质^[1-3]。此外蓝莓果实中富含大量的单宁类物质, 同花色苷、黄酮物质等一起称为蓝莓多酚物质。

自由基是生物体新陈代谢过程中产生的一类

可以单独存在的具有高度氧化活性并带有一个或几个不配对电子的原子团或原子, 其化学性质相当活跃。近年来人们对健康的关注度越来越高, 关于自由基的生理特性和毒性研究也越来越为深入。研究表明, 体内自由基的存在跟心脑血管疾病、糖尿病、肝炎等有极为密切的关系, 致癌、促癌和癌的形成也都有氧自由基的产生和参与^[4]。因此, 有关抗氧化剂清除自由基的研究受到广泛的关注, 能够

收稿日期: 2010-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(21176104)。

* 通信作者: 张慇(1962-), 男, 浙江平湖人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事农产品加工与贮藏研究。

Email: jiangnan.edu.cn

起到抗氧化作用的果蔬等更是关注的焦点。

国外对蓝莓花色苷类物质的功能性研究起步较早且较为透彻,有很多相关的文献报道^[5-7],日本更有专门生产蓝莓保健品的企业。在中国,由于资源限制等各种因素,对蓝莓的研究和加工利用起步较晚,对蓝莓功能性成分的研究报道相对较少。李颖畅等人进行了蓝莓花色苷的大孔树脂纯化研究^[8]。本文主要研究了蓝莓多酚粗提物在过氧化氢体系、羟基自由基体系、超氧阴离子自由基体系、亚硝酸盐体系、还原能力等体系中清除自由基的作用,并与VC作对比。

1 实验材料

1.1 实验原料

蓝莓冻果:浙江海通食品集团提供。

1.2 实验仪器与试剂

721 可见分光光度计:上海第三分析仪器厂生产;HH-S 型水浴锅:郑州长城科工贸有限公司产品;CJJ78-1 型磁力加热搅拌器:金坛市大地自动化仪器厂生产;FA1104 分析天平($d=0.001\text{g}$),上海天平仪器厂生产;飞鸽 TDL-60B 离心机:上海安亭科学仪器厂生产;R205B 旋转蒸发器:上海申顺科技有限公司产品;U410 超低温冰箱:New BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.;冷冻干燥机:实验室自行设计组装。

无水乙醇、单宁酸、FC 试剂、亚硝酸钠、硫酸铝、无水乙酸钠、冰醋酸、三氯乙酸、硫代硫酸钠、柠檬酸、无水碳酸钠、可溶性淀粉、碘化钾、浓硫酸、邻二氮菲、柠檬酸、酒石酸、抗坏血酸、 FeCl_3 、 FeSO_4 、 H_2O_2 、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaOH 、盐酸萘乙二胺、邻苯三酚、三羟基胺基甲烷(Tris)、亚硝酸钠、浓盐酸、去离子水。

2 实验方法

2.1 蓝莓冻果粗多酚的提取及有效成分的测定

取蓝莓冻果整果破碎,加无水乙醇用微波提取两次,合并提取液。提取液旋转蒸干,至超低温冰箱深度冷冻($-60\text{ }^\circ\text{C}$),取出,冷冻干燥备用。

取冻干物进行多酚有效成分含量的测定,单宁测定采用 FC 法^[9],总单体花色苷测定采用 pH 示差法^[10],分光光度计法测定黄酮类物质^[11]。

2.2 蓝莓多酚粗提物清除 $\cdot\text{OH}$ 能力的测定

取 5 mmol/L 的邻二氮菲溶液 1.5 mL ,加入 $\text{pH } 7.4$ 的磷酸盐缓冲液 2.0 mL ,充分混匀后,加入 7.5 mmol/L 的 FeSO_4 溶液 1.0 mL ,立即混匀,再

加入 1.0 mL/L 的 H_2O_2 1.0 mL ,最后以蒸馏水补充至 10.0 mL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 1 h ,在 510 nm 处测定吸光度(此为损伤管吸光度 A_1);之后加入不同浓度的提取物稀释液 1 mL ,再加 1.0 mL/L 的 H_2O_2 1.0 mL A_2 ,未损伤管不加提取物和 H_2O_2 按下式计算清除率^[12]:

$$\cdot\text{OH 清除率}/\% = \frac{A_2 - A_1}{A_0 - A_1} \times 100$$

2.3 蓝莓多酚粗提物清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力的测定

取 4.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液,于 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中预热 20 min ,分别加入 1 mL 不同浓度的样品液和 0.4 mL 25 mmol/L 的邻苯三酚溶液,混匀后,于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应 5 min ,然后加入 8 mol/L 的 HCl 溶液 1 mL 终止反应,然后在 299 nm 处测定吸光度 A_1 ,空白以蒸馏水代替样品液,测定吸光度 A_0 。按下式计算清除率^[13]。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{清除率}(100\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

2.4 蓝莓多酚粗提物清除 H_2O_2 能力的测定

用 $\text{pH } 7.4$ 的磷酸盐缓冲液配制 10 mmol/L 的 H_2O_2 ,取 5 mL 上述溶液加入 5 mL 不同浓度的样品液,混合均匀后在 248 nm 处测得其吸光度为 A_1 ,实验中以不加样品液的 H_2O_2 吸光度为 A_0 ,以不加 H_2O_2 的样品溶液吸光度为 A_2 ^[14]。

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

2.5 蓝莓多酚粗提物模拟胃液条件下清除 NO_2^- 能力的测定

取 5 mL 不同浓度样品液加入 5 mL 模拟胃液,再加入 3 mL ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$) NaNO_2 应用液,混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴反应 30 min ;立即往反应液中加入 2 mL ,质量浓度为 0.4% 对氨基苯磺酸溶液,混匀静置 5 min 后加入 1 mL 盐酸萘乙二胺溶液,混匀,静置 15 min , 540 nm 处测定吸光度值 A_s ,空白以蒸馏水做代替,测定吸光度值 A_c ^[15]。按下式计算清除率:

$$\text{NaNO}_2 \text{清除率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

2.6 蓝莓多酚粗提物还原能力的测定

在 2.5 mL $\text{pH } 6.6$ 的磷酸盐缓冲液中加入不同浓度的样品液 2.5 mL ,质量浓度为 1% 的铁氰化钾溶液 2.5 mL ,混合物在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 20 min 后,再加入 2.5 mL 体积分数 10% 的三氯乙酸溶液,然后以 3000 r/min 离心分离 10 min ,取上层清液 5 mL 加蒸馏水 5 mL 和 0.1% FeCl_3 溶液 1 mL ,在 700 nm 处测定吸光度,吸光度越高,还原能力越强^[16]。

3 结果与讨论

3.1 多酚粗提物有效成分的测定

取干燥后的蓝莓冻果多酚粗提物进行主要有效成分含量的测定,其中单宁质量分数为 0.29%,总单体花色苷为 1.54%,黄酮为 0.22%。

3.2 蓝莓多酚粗提物清除 $\cdot\text{OH}$ 及 O_2^- 能力试验

羟基自由基是最为活泼的自由基,同时也是毒性最大的自由基,它可与细胞中的任何分子发生反应产生损害,且反应速度很快。分别配制不同浓度梯度的蓝莓多酚溶液和 VC 溶液进行清除 $\cdot\text{OH}$ 能力试验,以质量浓度(mg/mL)为横坐标,清除率(%)为纵坐标作图 1。相同浓度下蓝莓多酚和 VC 对超氧阴离子的清除能力结果也如图 1 所示。

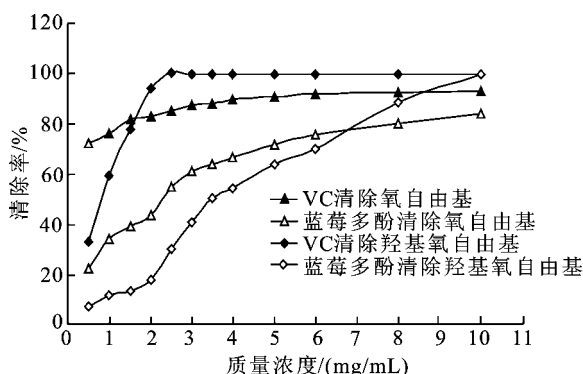


图 1 不同质量浓度样液和 VC 清除 $\cdot\text{OH}$ 及 O_2^- 的能力

Fig. 1 Scavenging $\cdot\text{OH}$ and O_2^- free radical by the extracts from blueberry and VC

如图 1 所示,VC 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力随着浓度的增大呈直线上升趋势,浓度 2.5 mg/mL 时清除率即达到 100%。蓝莓多酚清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力相对 VC 较弱,随着物质浓度的增大清除率呈现先慢后快的上升趋势,并在 10 mg/mL 时达到 100%。蓝莓多酚对 $\cdot\text{OH}$ 有一定的清除能力,说明蓝莓多酚粗提物中含有氢供体,并且可以提供氢质子,能够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,起到抑制或清除自由基的目的。

低浓度的 VC 对 O_2^- 即有较强的清除能力,在浓度为 0.5 mg/mL 时清除率达到 72.13%,随后清除率随着浓度的增大不断增大,质量浓度 ≥ 6 mg/mL 时 VC 对 O_2^- 的清除能力趋于平缓。相比较而言,蓝莓多酚清除 O_2^- 的能力趋势与 VC 类似,也呈现小幅度连续上升趋势,但清除能力总体较 VC 弱,浓度为 0.5 mg/mL 的蓝莓多酚清除 O_2^- 仅为 21.71%,远低于同浓度下 VC 的 72.13%。

3.3 蓝莓多酚粗提物清除 H_2O_2 及 NO_2^- 能力试验

配制不同浓度梯度的样品液进行清除 H_2O_2 及

NO_2^- 的试验,同时用抗坏血酸(VC)最对比试验,的得到结果如下图所示。

从图 2 可以看出,蓝莓多酚粗提物对 H_2O_2 的清除能力随着物质浓度的增大几乎呈直线上升,在 3.0 mg/mL 时清除率已经达到 100%。VC 对 H_2O_2 的清除能力趋势与蓝莓多酚一致,但低浓度时,其清除能力强于蓝莓多酚,在质量浓度为 1.5 mg/mL 时清除率即达到 96.50%;质量浓度 ≥ 2.0 mg/mL 时,VC 对 H_2O_2 的清除率为 100%。

对亚硝酸盐的清除能力如图 2 所示,可以看出 VC 清除 NO_2^- 的能力明显强于蓝莓多酚。蓝莓多酚粗提物清除 NO_2^- 的能力在质量浓度为 1 mg/mL 时即达到最高点(约 55%),此后随着浓度的不断增大,其对 NO_2^- 的清除能力不再提升。

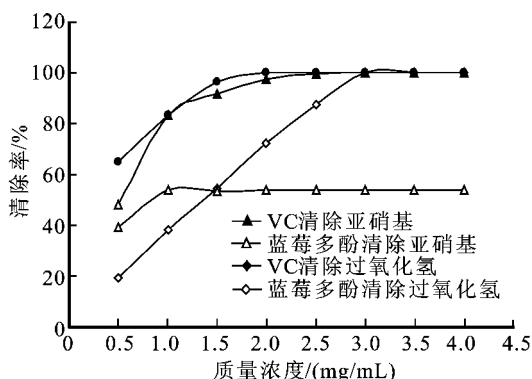


图 2 不同浓度样液和 VC 清除 H_2O_2 及 NO_2^- 的能力

Fig. 2 Scavenging NO_2^- and H_2O_2^- free radical by the extracts from blueberry and VC

3.4 蓝莓多酚粗提物还原能力试验

由图 3 可知,蓝莓多酚同 VC 一样有较强的还原能力,是良好的电子供应体。在试验浓度范围内,随着物质浓度的不断增大,样液的还原不断增强,低物质浓度(≤ 3 mg/mL)时,蓝莓多酚的还原能力与 VC 相近,随着物质浓度的继续加大,两者的还原能力都呈上升趋势,但差距逐渐拉大,且还原能力都在物质浓度 >9 mg/mL 时趋于平缓。

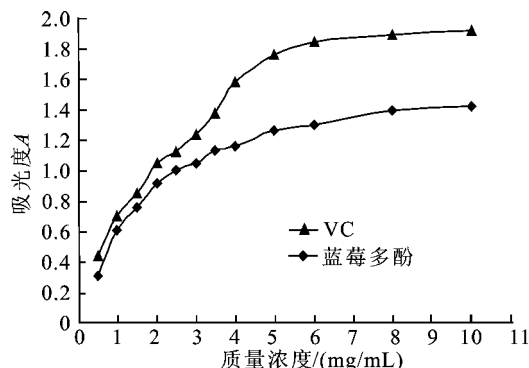


图 3 不同浓度样液和 VC 的还原能力

Fig. 3 Scavenging activities to deoxidize activity of the extracts from blueberry and VC

4 结 语

体外抗氧化性实验结果表明,蓝莓多酚粗提物对过氧化氢、羟基自由基、氧自由基的清除能力随着浓度的不断增加逐渐提高,最终清除率都可接近或达到100%,尤其对过氧化氢的清除能力较强,低质量浓度时($<3\text{ mg/mL}$)清除过氧化氢能力略低

于VC,高浓度时清除过氧化氢能力与VC相当。还原能力随着物质浓度的增大不断增强,在 9 mg/mL 时开始趋于平缓。蓝莓多酚粗提物对亚硝基的清除能力较弱,清除率小于55%。以上实验结果表明,没有进行纯化的蓝莓多酚粗提物已经表现出良好的抗氧化作用,其多酚的具体组成、结构及抗氧化机理有待于进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 胡雅馨,李京,惠伯棣. 蓝莓果实中主要营养及花青素成分的研究[J]. 食品科学, 2006, 10: 600—603.
HU Ya-xin, LI Jing, HUI Bai-di. Study on the main constituents of nutrition and anthocyanin of Blueberry[J]. **Food science**, 2006, 10: 600—603. (in Chinese)
- [2] 陈宏毅,于战平,曲福玲. 蓝莓的综合开发利用与产业化发展对策研究[J]. 世界农业, 2009, 2: 67—69.
CHEN Hong-yi, YU Zhan-ping, QU Fu-ling. Comprehensive utilization and industry development strategies of blueberry [J]. **World Agriculture**, 2009, 2: 67—69. (in Chinese)
- [3] 李咏梅. 越橘的开发利用价值[J]. 特种经济动植物, 2002(6): 23.
LI Yong-mei. The value of Blueberry on development and utilization[J]. **Special Economic Animal and Plant**, 2002(6): 23. (in Chinese)
- [4] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [5] Kader F, Rove B, Girardin M, et al. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries [J]. **Food Chemistry**, 1996, 55(1): 35—40.
- [6] Skrede G, Wrolstid R E, Durst R W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. **Journal of Food Science**, 2000, 65(20): 357—364.
- [7] Su Min-Sheng, Chien Po-Jung. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation[J]. **Food Chemistry**, 2007, 104: 182—187.
- [8] 李颖畅,郑凤娥,孟宪军. 大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 496—500.
LI Ying-chang, ZHENG Feng-e, MENG Xian-jun. Studies on purification of anthocyanins from blueberry fruits by macroporous resins[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 496—500. (in Chinese)
- [9] Ajaj, Gurdeep Kaur. Colorimetric determination of capsaicin-aocum fruits with the folinciocalteu reagent[J]. **Mikrochimica Acta[Wien]**, 1979, 1: 81—86.
- [10] 陈双,史俊燕,钟洁等. 小麦麸皮中总黄酮微波辅助提取技术研究[J]. 粮食与饲料工业, 2008, 9: 26—28.
CHEN Shuang, SHI Jun-yan, ZHONG Jie, et al. A study on extracting flavonoids from wheat bran with microwave-aided extraction[J]. **Food and Feed Industry**, 2008, 9: 26—28. (in Chinese)
- [11] Tibor Fuleki, FJ Francis. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries[J]. **Journal of Food Science**, 1968, 33: 72—77.
- [12] 郭亚力,李聪,欧灵澄等. 槐米中天然抗氧化剂的提取及其抗自由基性能研究[J]. 食品科学, 2004, 25(7): 154—157.
GUO Ya-li, LI Cong, OU Ling-cheng, et al. Studies on the capability of resistance to oxidation and separation of natural antioxidant in flos sophora Immaturus[J]. **Food Science**, 2004, 25(7): 154—157. (in Chinese)
- [13] 郭丽萍,卢家炯,仇宏伟. 香蕉皮多酚清除自由基作用的初步研究[J]. 食品科技, 2007, 6: 131—134.
GUO Li-ping, LU Jia-jiong, QIU Hong-wei. Study on antioxidation activities of banana peel poly-phenol[J]. **Food Science and Technology**, 2007, 6: 131—134. (in Chinese)
- [14] 王静,刘大川. 紫(白)苏叶黄酮类化合物抗氧化性能的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(3): 33—36.
WANG Jing, LIU Da-chuan. Study on antioxidation activities of perilla leaves falconoids[J]. **China Oils and Fats**, 2004, 29(3): 33—36. (in Chinese)
- [15] 库尔班·吐松,展锐,张宏等. 顶羽菊抗氧化活性研究[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(3): 406—412.
Kurban Tursun, ZHAN Rui, ZHANG Hong, et al. Study on antioxidant activity of acroptilon re-pens[J]. **Letters in Biotechnology**, 2010, 21(3): 406—412. (in Chinese)
- [16] 周波,王晓红,陈丽丽等. 玉米紫色植株色素体外抗氧化活性实验研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(4): 23—25.
ZHOU Bo, WANG Xiao-hong, CHEN Li-li, et al. Antioxidant activities of pigment from maize purple plant in vitro[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(4): 23—25. (in Chinese)