

蓝莓饮料总花色苷抗氧化性研究

齐迹¹, 毛燕^{2*}, 张宁², 闫林²

(1. 吉林省产品质量监督检验院, 长春 130103; 2. 吉林省食品检验所, 长春 130103)

摘要: **目的** 研究不同品牌蓝莓饮料总花色苷抗氧化性的差异。**方法** 将蓝莓饮料中的液体和果肉通过过滤分离, 通过 DPPH 和 ABTS 两种抗氧化性光谱检测方法检测液体和果肉的抗氧化能力, 优化了果肉中花色苷的提取条件, 最后对比研究了不同品牌蓝莓饮料总花色苷抗氧化能力。**结果** 蓝莓饮料中果肉里花色苷提取条件为: 在 100% 超声功率下, 用 60% 酸性乙醇溶液进行超声提取, 30 min/次, 提取 5 次。市售的蓝莓饮料, 其总花色苷抗氧化性相差不大。**结论** 目前吉林省市场上不同品牌蓝莓饮料的总花色苷抗氧化性无显著差异。**关键词:** 蓝莓饮料; 超声辅助提取; 花色苷; 抗氧化性

Study on antioxidant capacity of total anthocyanin in blueberry beverage

QI Ji¹, MAO Yan^{2*}, ZHANG Ning², YAN Lin²

(1. Jilin Province Product Quality Supervision Test Institute, Changchun 130103, China;
2. Jilin Province Institute for Food Control, Changchun 130103, China)

ABSTRACT: Objective To make a comparison and analysis of the antioxidant capacity of total anthocyanin in blueberry beverage of different brands. **Methods** The liquid part and flesh part in blueberry beverage were separated by means of filtration, and their antioxidant capacity was compared by DPPH and ABTS spectroscopic ways. The extraction condition of blueberry flesh was optimized. Finally, the antioxidant capacity of total anthocyanin in several brands of blueberry beverage was compared. **Results** The extraction condition of anthocyanin in blueberry flesh was by applying 60% acid ethanol solution to 30 min extracting with ultrasonic each time, with totally 5 times under 100% power. There are little differences of the antioxidant capacity of total anthocyanin among several commercially available brands of blueberry beverage. **Conclusion** The antioxidant capacity of total anthocyanin in different brands of blueberry beverage showed no obvious difference in the market of Jilin province.

KEY WORDS: blueberry beverage; ultrasonic-assisted extraction; anthocyanin; antioxidant activity

1 引言

蓝莓野果味酸甜, 风味独特, 营养丰富, 被誉为“果肉之王”。蓝莓中的主要成分是花青素, 在植物体内常与各种单糖结合形成糖苷, 称为花色苷。研究表

明, 蓝莓花色苷有很强的抗氧化性, 可抗自由基、延缓衰老、防止细胞的退行性改变、抑制血小板聚集、有效预防大脑病变、动脉硬化等病症^[1-7]。蓝莓的生物活性和药理价值都是与花色素的抗氧化性紧密联系的^[8], 因此“抗氧化性”理所当然就成为评价蓝莓饮料药理价

基金项目: 吉林省质量技术监督局科技计划项目(2012ZJK05, 2012ZJK10)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan of Jilin Province Bureau of Quality and Technology Supervision (2012ZJK05, 2012ZJK10)

通讯作者: 毛燕, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为能力验证的策划和组织, 食品检测方法的研究。E-mail: maoyan201205@163.com

***Corresponding author:** MAO Yan, Doctor, Assistant Researcher, Jilin Province Institute for Food Control, No. 2699, Yiju Road, High and New Technology Industrial Development District, Changchun 130103, China, E-mail: maoyan201205@163.com

值的一个重要指标。目前,市场上100%原汁蓝莓价格相差上百倍^[9],由于没有相应的蓝莓生产标准,企业就理所当然地各自为政,造成了市场混乱。所以,研究蓝莓饮料中总花色苷抗氧化性非常必要,有助于监管各蓝莓饮品生产厂家,有效地避免掺假行为。

目前,检测食品中某成分抗氧化性的方法主要有硫氰酸盐法、测总自由基捕获抗氧化参数(total radical-trapping antioxidant parameter, TRAP 检测)、测三价铁还原抗氧化剂的能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP 检测)、DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, 二苯基苦基肼自由基)清除能力检测和 ABTS⁺ [2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐]清除能力检测法等^[10]。以上几种光谱检测方法各有优缺点,应选择合适的方法来进行蓝莓饮料中总花色苷抗氧化性的研究。刘文旭等^[11]采用 ABTS 法对草莓、黑莓、蓝莓中多酚类物质及其抗氧化性进行研究,Marja^[12]和 Gabriella^[13]采用 DPPH 法对蓝莓中花色苷的抗氧化性进行研究。本文采用并比较了 DPPH 和 ABTS 两种抗氧化性检测方法。

国内外许多学者做了大量花色苷提取方法的研究,提取方法主要有溶剂萃取法、超临界液体萃取法、超声波辅助提取法和酶法等^[14]。其中溶剂萃取法是最常用的提取方法,酶法为一种新的提取方法,尚未广泛应用,借助超声波提取花色苷是近年来发展的新技术。对于有些花色苷类色素,有机溶剂不易渗透细胞壁和细胞膜,不能很好地将提取物从细胞器中溶出,使提取时间延长,采用超声波辅助萃取可大大缩短时间,降低生产能源、溶剂消耗以及废物的产生,从而提高萃取效率,对于热敏感花色苷通过超声波辅助萃取,可以降低提取温度,避免在温度过高的情况下发生氧化降解反应。因此,本文选用了超声波辅助提取法来提取蓝莓饮料果肉中的花色苷。

本文首先将蓝莓饮料中的液体和果肉通过过滤分离,随后采用 DPPH 和 ABTS 两种检测方法检测液体和果肉的抗氧化性能力,优化了果肉中花色苷的超声辅助提取条件,并对比研究了不同品牌蓝莓饮料中总花色苷抗氧化能力。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

U3900 紫外-可见分光光度计(日本日立);

KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器。

Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromate-2-carboxylic acid, 奎诺二甲基丙烯酸酯, Sigma 公司); ABTS[2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐, Sigma 公司]; DPPH(2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2'-联苯基-1-苦基肼基, Sigma 公司); 乙醇(分析纯,北京化工厂); 过硫酸钾(K₂S₂O₈, 分析纯,北京化工厂); 柠檬酸(分析纯,上海国药); 无水乙醇(分析纯,北京化工厂); 超纯水(Milli-Q 系统,电阻率>18 MΩ·cm)。

①号蓝莓饮料为长白高山越桔酒有限公司出品的极品蓝莓汁,420 mL 装;②号蓝莓饮料为长白高山越桔酒有限公司出品的蓝牙蓝莓汁饮料,420 mL 装;③号蓝莓饮料为吉林省泉阳天然饮品有限公司出品的蓝莓果汁饮料,410 mL 装;④号蓝莓饮料为长白高山越桔酒有限公司出品的蓝牙蓝莓汁饮料,300 mL 装。

2.2 蓝莓饮料的前处理过程

取一瓶从超市购买的蓝莓饮料,通过滤纸过滤将蓝莓饮料中的液体和果肉分离。将过滤得到的果肉转移至烧杯中,用 100 mL 60%的酸性乙醇溶液(pH 2~3, 制备方法是往 1000 mL 的容量瓶中加入 600 mL 的无水乙醇,约 20~30 mL 的柠檬酸水溶液,加超纯水至快到刻度,用 pH 试纸测溶液的 pH 值,并进行调节)超声提取果肉中的花色苷,分别采用 40%和 100%的超声功率,每次超声 20 min 或 30 min。每次超声后,通过抽滤将果肉和提取液分离,保存提取液并进行分析,果肉用于下一次提取。

2.3 DPPH 法测蓝莓饮料的总抗氧化性

将 1 mL 的样品(蓝莓饮料中的液体或果肉提取液)加入到 3 mL 0.04 mg/mL 的 DPPH 溶液中(用无水乙醇配制),室温下完全混合,30 min 后测试其在 517 nm 处的吸收值^[15]。

2.4 ABTS 法测蓝莓饮料的总抗氧化性

7 mmol/L 的 ABTS 和 2.45 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 溶液在避光条件下静置 16 h 产生 ABTS⁺自由基,再用 80%乙醇稀释至在 734 nm 波长处的吸光度为 0.700±0.005。将 3.9 mL 的 ABTS⁺溶液(吸光度为 0.700±0.005)加入到 0.1 mL 的待测样品中,混合均匀。室温下放置 6 min,立刻记录在 734 nm 波长处的吸光度。在相同条件下测定 80%乙醇稀释的不同浓度

Trolox 标准溶液, 根据吸光度绘制标准曲线, 并将样品产生的吸光度与标准 Trolox 进行对照, 结果表述为 Trolox 当量抗氧化能力, 即 mmol Trolox/100 mL^[11]。

用 80% 的乙醇溶液分别配制浓度为 0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 mmol/L 的 Trolox 标准溶液, 3.9 mL 的 ABTS⁺溶液加入到 0.1 mL 的 Trolox 标准溶液中, 同时用 0.1 mL 80% 的乙醇溶液作为空白, 混合均匀, 室温下放置 6 min 后, 立刻记录其在 734 nm 波长处的吸光度, 拟合直线: $Y = -0.7701X + 0.6685$, $R^2 = 0.9995$, 其中 X 和 Y 分别表示 Trolox 标准溶液的浓度和测试溶液在 734 nm 波长处的吸光度。

3 结果与讨论

3.1 蓝莓饮料花色苷的定性研究

蓝莓中的花色苷为水溶性色素, 在醇溶液和水溶液中的溶解性都比较好, 并且在中性或弱碱性溶液中不太稳定, 在酸性条件下比较稳定, 因此, 采取在酸性乙醇溶液中辅助超声的方式提取花色苷, 在破坏植物细胞膜的同时, 溶解花色苷^[15]。图 1 中的实线是蓝莓饮料中液体的紫外-可见光谱图, 虚线是蓝莓饮料中分离出的果肉采用超声法辅助提取法提取 1 次, 提取液的紫外-可见光谱图。如图 1 虚线所示, 在约 540 nm 处有吸收峰, 是花色苷的特征吸收^[16], 图 1 实线在 540 nm 处也有明显的吸收, 说明蓝莓饮料的液体和果肉中都含有花色苷。

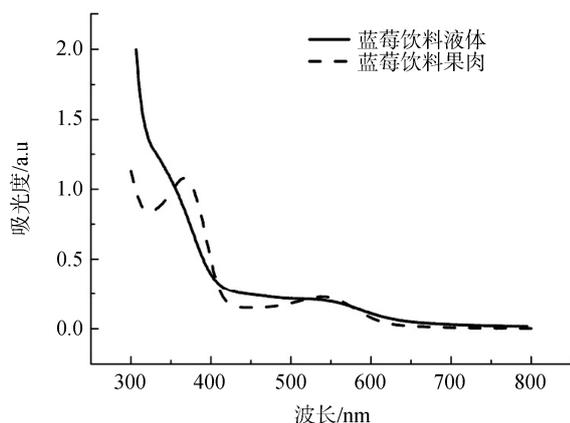


图 1 蓝莓饮料中液体(实线)和果肉提取液(虚线)的紫外-可见光谱图

Fig. 1 UV-vis spectra of liquid drinks (solid line) and blueberry flesh extract (dash line) in blueberry beverage

将蓝莓饮料中分离出的果肉采用超声辅助提取法, 在 40% 超声功率下, 每次提取 20 min, 提取 3 次, 对比 3 次提取液的紫外-可见吸收光谱图。如图 2 所示, 3 次提取液在 540 nm 处都有吸收峰, 说明 3 次提取过程都从果肉中提取出了部分花色苷。

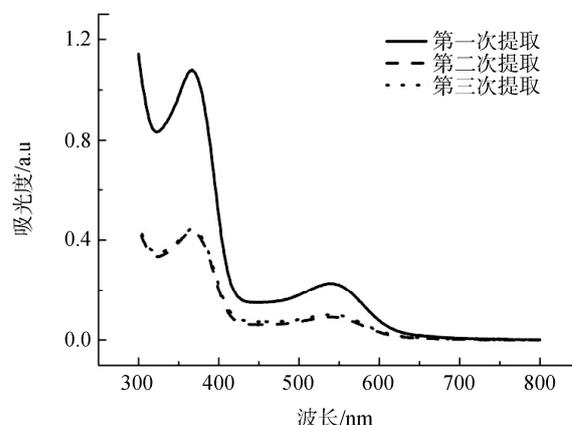


图 2 超声提取法提取蓝莓饮料中的果肉, 得到提取液的紫外-可见光谱图

Fig. 2 UV-vis spectra of extract from blueberry flesh in blueberry beverage using ultrasonic treatment

3.2 DPPH 和 ABTS 抗氧化性检测方法的比较

研究用 DPPH 法测蓝莓饮料的总抗氧化性, 首先考察了 DPPH 溶液的紫外-可见吸收光谱图, 如图 3 中实线所示, 在 517 nm 处有吸收峰。当向蓝莓饮料液体中加入乙醇溶液作为空白, 如图 3 中点线所示, 在约 550 nm 处有吸收峰(与图 1 相比, 吸收峰稍有红移, 可能是由加入乙醇后, 溶剂极性的变化引起的); 当向蓝莓饮料液体中加入 DPPH 溶液后, 再测试混合液的紫外可见光谱图, 如图 3 中虚线所示, 发现在 517 nm 处并没有出现 DPPH 的特征吸收峰, 说明 DPPH 与抗氧化剂——花色苷发生了反应, 可以根据在 517 nm 处吸收值的降低来判断抗氧化剂的量。

研究用 ABTS 法测蓝莓饮料的总抗氧化性, 首先考察了 ABTS⁺溶液的可见光谱图, 如图 4 所示, 在约 740 nm 处有吸收峰。将 3.9 mL 的 ABTS⁺溶液加入到 0.1 mL 的蓝莓饮料液体中混合, 可以观察到 ABTS⁺溶液立刻由浅蓝绿色变为无色透明, 并且在 734 nm 处几乎无吸收, 说明蓝莓饮料液体具有很强的抗氧化性。

DPPH 本身为深紫色, 与抗氧化剂反应后, 变为无色或浅黄色, 反应示意图如图 5 所示。由图 3 可知, 蓝莓饮料中的液体在与 DPPH 反应后, 在 540 nm 附

近仍有吸收, 而用DPPH法测蓝莓饮料的总抗氧化性, 需要测试 DPPH 溶液与样品混合后在 517 nm 处的吸收值, 蓝莓饮料中的液体还原后在 540 nm 附近的吸收可能会影响其抗氧化性的测试。因此, 在本文中选用 ABTS 法来测定蓝莓饮料的总抗氧化性。

3.3 蓝莓饮料中果肉里花色苷提取条件的优化

首先, 对比 40%超声功率和 100%超声功率条件下, 蓝莓饮料果肉里花色苷的提取效率。测试超声提取液与 ABTS⁺溶液混合反应后, 在 734 nm 处的吸收值, 计算其当量抗氧化能力。如表 1 所示, 很明显, 在 100%超声功率下, 果肉提取液的抗氧化能力更强, 即对果肉里花色苷的提取效率更高。

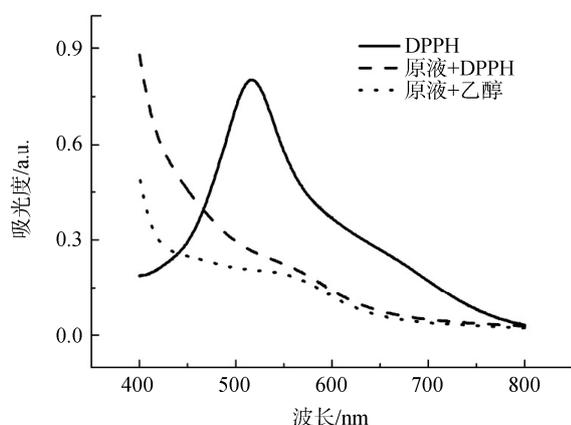


图 3 DPPH 溶液(实线)、蓝莓饮料液体分别加入 DPPH 溶液(虚线)和乙醇(点线)后的紫外-可见光谱图

Fig. 3 UV-vis spectra of DPPH solution (solid line), liquid in blueberry beverage after addition of DPPH solution (dash line) and ethanol (dot line), respectively

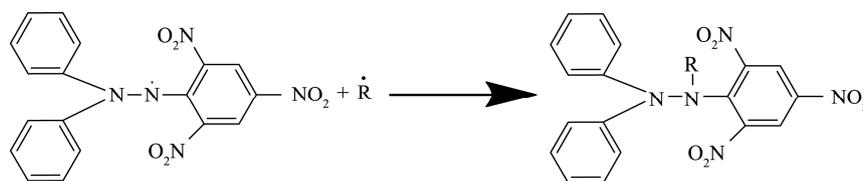


图 5 DPPH 与抗氧化剂的反应示意图

Fig. 5 The illustration of DPPH and antioxidant

表 1 不同超声功率条件下果肉提取液的抗氧化能力

Table 1 Antioxidant capacity of blueberry flesh extract under different ultrasonic power

与 ABTS ⁺ 溶液混合	40%超声功率			100%超声功率		
	1 st 提取液	2 nd 提取液	3 rd 提取液	1 st 提取液	2 nd 提取液	3 rd 提取液
在 734 nm 处的吸收值	0.450	0.563	0.584	0.340	0.433	0.497
当量抗氧化能力(mmol/L Trolox)	0.284	0.137	0.110	0.454	0.321	0.230

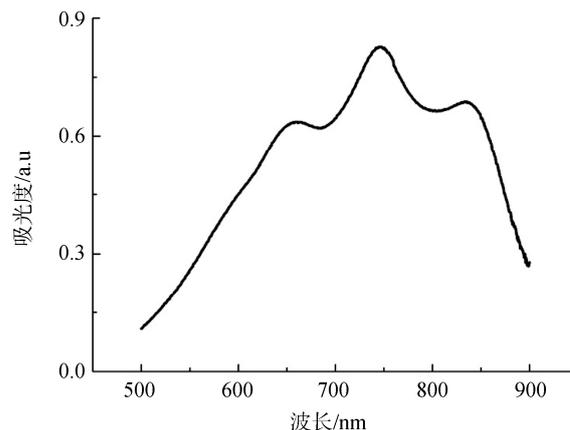


图 4 ABTS⁺溶液的可见光谱图

Fig. 4 UV-vis spectra of ABTS⁺ solution

然后, 对比在 100%超声功率条件下, 每次超声时间为 20 min 和 30 min, 蓝莓饮料中果肉里花色苷的提取效率。测试超声提取液与 ABTS⁺溶液混合反应后, 在 734 nm 处的吸收值, 计算其当量抗氧化能力。如表 2 所示, 很明显, 30 min/次的超声时间, 果肉提取液的抗氧化能力更强, 即对果肉里花色苷的提取效率更高。

由表 2 也能看出, 随着提取次数的增加, 果肉提取液的抗氧化能力越来越弱。从节能和提取效率综合考虑, 提取次数定为 5 次。综上所述, 蓝莓饮料中果肉里花色苷的提取条件为: 在 100%的超声功率下, 用 60%的酸性乙醇溶液进行提取, 30 min/次, 提取 5 次。

表 2 不同超声时间下果肉提取液的抗氧化能力
Table 2 Antioxidant capacity of blueberry flesh extract under different ultrasonic time

与 ABTS ⁺ 溶液混合	20 min/次					
	1 st 提取液	2 nd 提取液	3 rd 提取液	4 th 提取液	5 th 提取液	6 th 提取液
在 734 nm 处的吸收值	0.313	0.338	0.462	0.468	0.602	0.610
当量抗氧化能力(mmol/L Trolox)	0.460	0.426	0.259	0.251	0.070	0.059
与 ABTS ⁺ 溶液混合	30 min/次					
	1 st 提取液	2 nd 提取液	3 rd 提取液	4 th 提取液	5 th 提取液	6 th 提取液
在 734 nm 处的吸收值	0.123	0.302	0.389	0.479	0.542	0.587
当量抗氧化能力(mmol/L Trolox)	0.716	0.475	0.357	0.236	0.151	0.090

3.4 几种不同品牌蓝莓饮料总抗氧化能力的比较

首先将蓝莓饮料中的液体和果肉通过过滤分离, 然后采用优化的超声辅助条件提取果肉中的花色苷, 最后对比不同品牌蓝莓饮料中总花色苷抗氧化能力。如表 3 所示, 不同品牌蓝莓饮料中总花色苷抗氧化能力为: ④号 > ③号 > ②号 > ①号, 且不同品牌蓝莓饮料总花色苷抗氧化能力相差不大。

表 3 不同品牌蓝莓饮料的总抗氧化能力
Table 3 Total antioxidant capacity of blueberry beverage with different brands

不同品牌蓝莓饮料	①号	②号	③号	④号
包装量(mL)	420	420	410	300
总抗氧化能力 (mmol Trolox/100 mL)	0.1257	0.1338	0.1364	0.1401

4 结 论

本文通过紫外-可见吸收光谱法实现了蓝莓饮料总花色苷抗氧化性的对比分析。首先将蓝莓饮料中的液体和果肉通过过滤分离, 然后采用超声辅助提取法提取果肉中的花色苷, 最后对比不同品牌蓝莓饮料总花色苷抗氧化能力, 从而确定不同品牌蓝莓饮料的保健药理作用, 对于蓝莓饮料市场的监管具有重要的参考价值。另外, 本研究也为其他果汁饮料抗氧化性的测定提供了一定的技术参考, 对于加强企业自身产品质量控制, 加强国家对生产企业的流通领域的监管, 保护消费者的合法权益具有重要意义。

参考文献

[1] 李颖畅, 孟宪军, 孙靖靖, 等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化

作用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 44-48.

Li YC, Meng XJ, Sun JJ, *et al.* Effects of anthocyanins from blueberry on lowering the cholesterol and antioxidant [J]. Food Ferm Ind, 2008, 34(10): 44-48.

[2] 杨红澎, 蒋与刚. 蓝莓的活性成分、吸收代谢及其神经保护作用研究进展[J]. 卫生研究, 2010, 39(4): 525-528.

Yang HP, Jiang YG. Research process of bioactive constituents, absorption, metabolism, and neuroprotective effects from blueberry [J]. J Hyg Res, 2010, 39(4): 525-528.

[3] 张婧. 蓝莓花色苷对血管紧张素 II 致人脐静脉血管内皮细胞凋亡的保护作用[D]. 长春: 吉林大学, 2013.

Zhang J. Protective effects of blueberry anthocyanin on Ang II-induced apoptosis to human umbilical vein endothelial cells [D]. Changchun: Jilin University, 2013.

[4] 丁小静. 蓝莓提取物对急性化学性肝损伤的干预作用[D]. 长春: 吉林大学, 2010.

Ding XJ. Intervention effects of blueberry extract on acute chemical liver injury [D]. Changchun: Jilin University, 2010.

[5] 孙贵宝. 蓝莓的保健作用及各国栽培发展趋势[J]. 农机化研究. 2002, 3: 225.

Sun GB. The health benefits of blueberry and its development trend of growth all over the world [J]. J Agric Mech Res, 2002, 3: 225.

[6] Cristina A, Barbara S, Rachel L, *et al.* Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory [J]. Nutr Neurosci, 2005, 8(2): 111-120.

[7] Mark K, Ronald L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(5): 2222-2227.

[8] Shirley Z, Taharat Y, Manashi B, *et al.* Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(6): 675-683.

- [9] 国内蓝莓饮料为何价格差距大[J]. 农民科技培训, 2011, 02: 43.
Why the price gap is big among domestic blueberry beverage [J]. Farmer Sci Tech Train, 2011, 02: 43.
- [10] Singh S, Singh RP. In vitro methods of assay of antioxidants: an overview [J]. Food Rev Int, 2008, 24: 392-415.
- [11] 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.
Liu WX, Huang WY, Zeng XX, *et al.* Phenolic content antioxidant capacity of strawberry, blackberry and blueberry [J]. Food Sci, 2011, 32(23): 130-133.
- [12] Marja P, Johanna H, Velimatti O, *et al.* Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities [J]. J Sci Food Agric, 2003, 83(14): 1403-1411.
- [13] Gabriella G, Susanna B. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties [J]. Food Chem, 2009, 112(4): 903-908.
- [14] 李颖畅. 蓝莓花色苷提取纯化及生理功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
Li YC. Study on extraction, purification and functional characteristic of blueberry anthocyanins [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2008.
- [15] 杨转琴, 王磊, 范娜, 等. 柚皮黄酮化合物含量及抗氧化性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(04): 102-105.
Yang ZQ, Wang L, Fan N, *et al.* Study on flavones content and antioxidative activity from pomelo peel [J]. Food Sci, 2006, 27(04): 102-105.
- [16] 王继萍, 柏广新, 李锦然, 等. 溶剂萃取法提取蓝莓中花色苷[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1952-1953.
Wang JP, Bai GX, Li JR, *et al.* Solvent extraction for determination of blueberry anthocyanins [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(12): 1952-1953.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



齐 迹, 高级工程师, 主要研究方向为精细化工。

E-mail: ermao.ccv@qq.com



毛 燕, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为能力验证的策划和组织, 食品检测方法。

E-mail: maoyan201205@163.com