

黑果腺肋花楸中花青素的提取及其 抗氧化活性研究

孙燕¹, 李成忠¹, 张焕新^{1*}, 卞玲玲¹, 赵宝元²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 园林园艺学院, 泰州 225300; 2. 泰州市青禾农科科技有限公司, 泰州 225300)

摘要: **目的** 探究黑果腺肋花楸浆果花青素提取工艺、花青素组成和抗氧化活性。**方法** 通过单因素实验考察料液比、乙醇浓度、提取时间和提取温度 4 个因素对黑果腺肋花楸浆果花青素提取率的影响, 并通过正交实验优化花青素提取条件, 探究优化提取花青素工艺。采用高效液相色谱-二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array method, HPLC-DAD)系统对经大孔树脂纯化后的花青素进行鉴定, 并以维生素 C 为对照, 测定了 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除率和总还原力等指标, 评价了其抗氧化活性。**结果** 黑果腺肋花楸浆果花青素提取最佳工艺为: 料液比、乙醇浓度、提取时间和提取温度分别为 1:40 (g/mL)、65%、30 min 和 50 °C, 花青素的平均提取率为 7.430 mg/g, 相对标准偏差为 1.62%。鉴定出矢车菊-己糖苷二聚体(17.02%)、矢车菊素-3-半乳糖苷(39.41%)、矢车菊-3-葡萄糖苷(9.35%)、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷(11.21%)、矢车菊-3-木糖苷(15.63%)、矢车菊素-3-芸香糖苷(4.27%)和矢车菊素-3-槐糖苷(3.11%)共 7 种花色苷。纯化后花青素的 DPPH、羟基自由基清除能力和总还原力显著高于维生素 C ($P < 0.05$), 超氧阴离子自由基清除能力略大于维生素 C。**结论** 最佳提取条件下, 花青素的平均提取率可达 7.430 mg/g, 经大孔树脂纯化后, 共鉴定出 7 种花色苷, 其中矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-槐糖苷为新检出的 2 种花色苷。所提取花青素具有较强的抗氧化能力, 可作为一种天然抗氧化剂获取来源。

关键词: 黑果腺肋花楸; 花青素; 提取; 抗氧化活性

Optimization of extraction process and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa*

SUN Yan¹, LI Cheng-Zhong¹, ZHANG Huan-Xin^{1*}, BIAN Ling-Ling¹, ZHAO Bao-Yuan²

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, School of Landscape and Horticulture, Taizhou 225300, China;
2. Taizhou Qinghe Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

基金项目: 江苏省林业科技示范与推广项目(LYKJ[2020]29)、江苏省“青蓝工程”优秀教学团队(苏教师函[2020]10号)、江苏省现代农业(花卉)产业技术体系泰州推广示范基地(JATS[2021]390)、泰州市科技支撑计划项目(TN202005)、江苏农牧科技职业学院核心技术创新项目(NSF2021ZR04)、泰州市第五期“311”高层次人才培养工程项目(2017-1-4-2)

Fund: Supported by the Jiangsu Forestry Science and Technology Demonstration and Promotion Project (LYKJ[2020]29), the Jiangsu Excellent Teaching Team of “Blue Project” (Su Teacher’s Letter[2020] No.10), the Jiangsu Modern Agriculture (Flower) Industrial Technology System Taizhou Promotion Demonstration Base (JATS[2021]390), the Taizhou Science and Technology Support Plan Project (TN202005), the Jiangsu Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology Vocational College Core Technology Innovation Project (NSF2021ZR04), and the Taizhou Phase V “311” High Level Talent Training Project (2017-1-4-2)

*通信作者: 张焕新, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: hxinzh@hotmail.com

*Corresponding author: ZHANG Huan-Xin, Professor, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, No.8, East Phoenix Road, Taizhou 225300, China. E-mail: hxinzh@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To explore the extraction technology, anthocyanin composition and antioxidant activity of *Aronia melanocarpa*. **Methods** The single factor experiment was used to investigate the effects of solid-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the extraction rate of anthocyanin from *Aronia melanocarpa*, and the extraction conditions of anthocyanin were optimized by orthogonal test, and the optimal extraction process of anthocyanin was explored. The anthocyanins purified by macroporous resin were identified by high performance liquid chromatography-diode array method (HPLC-DAD) system, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical, superoxide anion radical scavenging rate and total reducing power were used to evaluate its antioxidant activity. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: Solid-liquid ratio, ethanol concentration, extraction time and temperature 1:40 (g/mL), 65%, 30 min and 50 °C, respectively, and the average extraction rate of anthocyanin was 7.430 mg/g, and the relative standard deviation was 1.62%. Seven kinds of anthocyanins were identified, including cyanidin hexoside dimer (17.02%), cyanidin-3-galactoside (39.41%), cyanidin-3-glucoside (9.35%), cyanidin-3-arabinoside (11.21%), cyanidin-3-xyloside (15.63%), cyanidin-3-rutinoside (4.27%) and cyanidin-3-sophoroside (3.11%). The DPPH, hydroxyl radical scavenging capacity and total reducing power of purified anthocyanin were significantly higher than those of vitamin C ($P < 0.05$), and the scavenging capacity of superoxide anion radical is slightly higher than that of vitamin C. **Conclusion** Under the optimum extraction conditions, the average extraction rate of anthocyanins can reach 7.430 mg/g. After purification by macroporous resin, 7 kinds of anthocyanins are identified, among which cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-sophoroside are two newly detected anthocyanins. The extracted anthocyanin has strong antioxidant capacity and can be used as a natural antioxidant source.

KEY WORDS: *Aronia melanocarpa*; anthocyanin; extraction; antioxidant activity

0 引言

黑果腺肋花楸又名不老莓、野樱莓,是一种外形类似蓝莓的浆果。原产于北美东北部,在波罗地沿岸至太平洋沿岸均有分布,是集食用、药用、园林和生态等价值于一身的珍贵树种^[1]。黑果腺肋花楸的果实中含有花青素、原花青素、黄酮、维生素 B₁₇ 等^[2],其果实及提取物具有清除自由基的功能,因此对心血管疾病、抗突变等具有一定的治疗效果^[3]。花青素属类黄酮化合物,小分子的天然花青素具有保护心血管系统、抗衰老和抗癌等生物作用。作为药食同源的黑果腺肋花楸,由于果实中花青素提取物含有很好的抗氧化活性,其果实成为功能性食品和天然药物的重要原料^[4]。长江中下游地区陆续出现了黑果腺肋花楸大面积的生产和栽培,相关学者对黑果腺肋花楸的研究多集中在其栽培技术、化学成分及药理活性^[5]、抑菌活性^[6]、结构鉴定^[7-8]、产品开发^[9-10]、叶片^[11]和不同产地黑果腺肋花楸中花青素含量^[12]、加工条件对活性成分的影响^[13]等方面,已有研究表明,黑果腺肋花楸中花青素含量丰富^[10],花青素具有较强的抗氧化能力^[14],可作为一种天然抗氧化剂获取来源。目前常用溶剂提取法、超声波辅助提取法和超临界萃取法从黑果腺肋花楸果粉中提取花青素^[15],但对提取花青素的组成鉴定、抗氧化性能综合评价的研究较少。

本研究采用有机溶剂提取法^[16],以酒石酸为弱酸

化剂来防止非酰基的花青素水解,采用正交实验设计优化黑果腺肋花楸浆果花青素类化合物的提取工艺,探索一种低成本、高提取效率的花青素提取工艺,并对黑果腺肋花楸提取花青素的组成和抗氧化活性进行评价,以期在黑果腺肋花楸花青素的提取和资源综合利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂

黑果腺肋花楸果实采自江苏农牧科技职业学院中药园。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(分析纯,美国 Sigma 公司); 矢车菊素-3-半乳糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊-3-木糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊-己糖苷二聚体、矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊-3,5-二己糖苷、花青素 3-芦丁糖甙、氯化花青素-3-桑布双糖苷、氯化花青素-3-槐糖苷、矢车菊素-3-槐糖苷(分析纯,上海惠诚生物科技有限公司); LX-32 大孔树脂(西安蓝晓科技新材料股份有限公司); 其他试剂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

实验所用水均为新煮沸的无 CO₂ 的蒸馏水。

1.2 仪器与设备

AL204-型分析天平(子天平)、EL20K 精密 pH 计(梅特

勒-托利多中国有限公司); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH 显数恒温水浴锅(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); Frontier™ 5000 Multi Pro 多功能离心机[奥豪斯国际贸易(上海)有限公司]; LC-1020A 高效液相色谱仪、Shimpack VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黑果腺肋花楸花青素提取工艺

将冷冻的黑果腺肋花楸浆果室温自然解冻、清洗、晾干表面水分, 准确称取 5.00 g 黑果腺肋花楸浆果。按照 1:20 (g/mL) 的料液比加入含 2% 酒石酸的 65% 乙醇溶液, 并使用破壁机破碎。经超声波 35 °C 振荡处理 50 min 加速花青素溶出, 然后 8000 r/min 离心 5 min, 得到样品制备液。

1.3.2 花青素的富集

提取花青素溶液置于暗色试剂瓶中在 0 °C 的条件下于冰箱冷藏 12 h, 然后以 2000 r/min 的转速离心分离, 取上清液并调节其 pH 至 3.0。参考相关文献^[17-18], 取 6 g 酸碱活化处理后 LX-32 大孔树脂, 与处理好的提取液 150 mL 一起加入到 250 mL 的具塞三角瓶中, 置于摇床上室温静态吸附 4 h, 然后抽滤除去吸附液, 并用离子水清洗 3 次, 最后分别用 70%、95% 的乙醇溶液 150 mL 各室温下振荡解吸 3.5 h, 收集抽滤液蒸发掉乙醇后进行真空冷冻干燥, 制得花青素冻干粉。

1.3.3 黑果腺肋花楸花青素含量测定

采用 pH 示差法测定花青素提取率, 以矢车菊素葡萄糖苷为标准品绘制标准曲线^[19], 黑果腺肋花楸花青素含量计算公式见式(1)。

$$\text{黑果腺肋花楸花青素含量}/(\text{mg/g}) = \frac{A \times V_1 \times V_2}{K \times V_3 \times m \times 10^3} \quad (1)$$

式中: A 为测量样品吸光度; V_1 为提取液体积(mL); V_2 为待测液体积(mL); K 为标准曲线斜率; V_3 为提取液稀释体积(mL); m 为样品质量(g)。

1.3.4 料液比对提取率的影响

取 5 g 黑果腺肋花楸浆果, 在 2% 的酒石酸乙醇溶液(乙醇浓度 65%)、提取时间为 50 min、提取温度为 35 °C 的条件下, 以酸性乙醇作为空白对照实验, 以不同料液比[1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:80 (g/mL)]超声辅助提取花青素测定原花青素提取率。

1.3.5 乙醇浓度对提取率的影响

取 5 g 黑果腺肋花楸浆果, 在按照 1:50 (g/mL) 的料液比加入 2% 的酒石酸乙醇溶液(乙醇浓度 65%)、提取时间为 50 min、提取温度为 35 °C 的条件下, 以酸性乙醇作为空白对照实验, 以不同乙醇浓度(50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%)超声辅助提取花青素测定原花青素提取率。

1.3.6 提取时间对提取率的影响

取 5 g 黑果腺肋花楸浆果, 在按照 1:50 (g/mL) 的料液比加入 2% 的酒石酸乙醇溶液(乙醇浓度 65%)、提取温度为 35 °C 的条件下, 以不同提取时间(10、20、30、40、50、60 min)超声辅助提取花青素测定提取率和吸光量。

1.3.7 提取温度对提取率的影响

取 5 g 黑果腺肋花楸浆果, 在按照 1:50 (g/mL) 的料液比加入 2% 的酒石酸乙醇溶液(乙醇浓度 65%)、提取时间为 50 min 的条件下, 以酸性乙醇作为空白对照实验。以不同提取温度(30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 °C)超声辅助提取花青素测定提取率。

1.3.8 黑果腺肋花楸花青素提取工艺优化

在单因素实验基础上, 确定不同单因素的水平范围, 以花青素得率为考察指标, 采用四因素三水平正交实验设计 $L_9(3^4)$, 优化花青素提取的最佳工艺组合, 各因素与水平见表 1。

表 1 正交因素水平
Table 1 Factors and levels in orthogonal experiment

水平	因素			
	A 料液比 (g/mL)	B 乙醇 浓度/%	C 提取 时间/min	D 提取 温度/°C
1	1:20	60	30	40
2	1:30	65	40	45
3	1:40	70	50	50

1.3.9 高效液相色谱-二极管阵列检测器分析

采用外标法, 用高效液相色谱仪及二极管阵列检测器分析提取花青素单体的种类和含量, 色谱操作条件: 样品浓度 2 mg/mL; 柱温 30 °C; 进样量 25 μL; 流速 1 mL/min; 检测波长 520 nm^[20]。

1.3.10 黑果腺肋花楸的抗氧化活性

(1) DPPH 自由基的清除率测定

将样液配制成一定不同质量浓度的样液稀释液, 用无水乙醇将 7.9 mg 的 DPPH 试剂定容至 100 mL 棕色容量瓶中。将 2 mL 不同质量浓度的稀释样液与 2 mL DPPH 乙醇溶液加入至比色管中静置 20 min, 于 517 nm 处测定吸光值, 记作 A_x ; 将 2 mL 不同质量浓度的稀释样液与 2 mL 95% 乙醇混合溶液加入到比色管中, 记作 A_y ; 将 2 mL 不同质量浓度的样液溶剂与 2 mL DPPH 乙醇混合溶液加入到比色管中, 记作 A_0 ^[21], DPPH 自由基清除率计算公式见式(2)。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - (A_x - A_y)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

(2) 羟基自由基的清除率测定

分别精密称取 0.5004 g 硫酸亚铁和 0.1985 g 双氧水定

容至 200 mL 容量瓶中, 配制 9 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和 8.8 mmol/L 的双氧水溶液。称取适量水杨酸, 配制 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液。依次在比色管中加入 1 mL 硫酸亚铁溶液、1 mL 水杨酸-乙醇溶液、1 mL 不同稀释度的样液、1 mL 双氧水溶液, 并用蒸馏水定容至 10 mL。在 37 °C 下水浴 10 min, 以空白试剂作参比, 于 510 nm 处测定吸光值 A_x 。将空白试剂的吸光值记作 A_0 ^[22], 羟基自由基清除率计算公式见式(3)。

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

(3) 超氧阴离子自由基清除率测定

配制 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 溶液、pH 为 8.2 的缓冲液、10 mmol/L 的 HCl 溶液备用。依次在对照管和样品管中加入 4.5 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 和 4.2 mL 蒸馏水后, 于 25 °C 水浴锅中恒温水浴 20 min。后在样品管中加入在水浴锅中水浴达 25 °C 的邻苯三酚溶液, 对照管中则加入 0.3 mL 10 mmol/L 的 HCl 溶液。迅速摇匀后, 每隔 30 s 在波长为 420 nm 处测定其吸光值, 记作 A ; 其随时间对照溶液的吸光值的变化率, 记作 ΔA_0 ; 以 1 mL 的相同体积的样液代替蒸馏水测定其氧化速率, 记作 ΔA_1 ^[23], 超氧阴离子自由基清除率计算公式见式(4)。

$$\text{超氧阴离子自由基清除率}/\% = \frac{\Delta A_1 - \Delta A_0}{\Delta A_0} \times 100\% \quad (4)$$

(4) 总还原力测定

依次在离心管中加入 2 mL 不同稀释度的样液和 5 mL 浓度为 0.2 mol/L pH 为 6.6 的缓冲溶液, 快速混匀后加入 5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 在 50 °C 水浴 20 min。取出后迅速冷却并加入 5 mL 10% 三氯化铁溶液, 混匀后离心(3000 r/min) 10 min。依次加入 6 mL 上清液、6 mL 的蒸馏水和 2 mL 的 0.1% 三氯化铁溶液至比色管中。混匀后静置 10 min, 在 700 nm 处测定吸光值, 记作 A_m ; 以空白试剂记作 A_0 ^[24], 还原力计算公式见式(5)。

$$\text{还原力} = A_m - A_0 \quad (5)$$

1.3.11 数据处理

数据采用 IBM SPSS Statistics 23 和 Origin 2019b 进行处理。

2 结果与分析

2.1 料液比对提取率的影响

在料液比分别为 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:80 (g/mL) 时, 黑果腺肋花楸中花青素平均提取率($n=3$)分别为 3.31、4.23、4.91、5.70、5.69 和 5.67 mg/g。结果表明: 当料液比在 1:20 到 1:50 (g/mL) 之间, 花青素的提取率随着提取液增加而显著增加($P<0.05$), 当料液比在 1:50 到 1:80 (g/mL) 之间时, 提取率随提取液增加无显著变化($P>0.05$)。这主要是因为初始随着提取液增加, 原料与提取液接触面和固液面

浓度差增加, 有利于花青素的浸出, 当提取液继续增加时, 这种增加对花青素萃取的效率显著降低。考虑到提取效率和提取成本, 选用 1:40、1:50、1:60 3 个水平进行正交实验, 优化提取工艺。

2.2 乙醇浓度对提取率的影响

当乙醇浓度分别在 50%、55%、60%、65%、70%、75% 和 80% 时, 其花青素平均提取率($n=3$)分别为 5.48、5.65、5.81、6.21、5.92、5.73 和 5.62 mg/g。结果表明: 乙醇浓度小于 65% 时, 花青素提取率显著增加($P<0.05$), 乙醇浓度大于 65% 时, 花青素提取率显著降低($P<0.05$), 故乙醇浓度为 65% 时提取效率最高。这可能是因为在乙醇浓度为 65% 时, 黑果腺肋花楸中花青素的极性与之相近, 有利于花青素的溶出^[25]。为进一步调高提取效率, 选用 60%、65%、70% 3 个水平进行正交实验, 优化提取工艺。

2.3 提取时间对提取率的影响

提取时间分别为 10、20、30、40、50 和 60 min 时, 花青素平均提取率($n=3$)分别为 5.48、5.66、5.82、6.22、5.91 和 5.72 mg/g。结果表明: 提取时间由 10 min 延长至 60 min, 提取率先增加后降低, 提取时间为 40 min 时, 花青素提取率最高。这可能是由于为增加提取效率, 提取过程在一定温度下进行, 随着提取时间的增加, 部分花青素因受温度的影响而降解^[26]。为进一步优化提取效率, 选用 30、40、50 min 3 个水平进行正交实验, 优化提取工艺。

2.4 提取温度对提取率的影响

提取温度分别为 30、35、40、45、50、55、60、65、70 和 75 °C 时, 花青素提取率分别为 5.69、6.86、6.91、6.41、5.82、5.16、5.08、4.97、4.85 和 4.70 mg/g。结果表明: 随着提取温度的增加, 花青素提取率呈现先增加后快速降低的趋势, 并且在 45 °C 时提取率最高。这可能是在一定的提取时间内, 温度低于 45 °C 时, 随着温度的增加, 花青素分子运动速度增加, 可更高效地扩散到萃取液中, 当提取温度高于 45 °C 时, 提取温度升高导致原花青素降解^[27], 因此提取率下降, 同时该实验也证明黑果腺肋花楸中花青素在低于 45 °C 条件下, 性质较为稳定。为进一步优化提取效率, 选用 40、45、50 °C 3 个水平进行正交实验, 优化提取工艺。

2.5 黑果腺肋花楸花青素提取工艺优化

黑果腺肋花楸原花青素提取工艺参数正交实验结果如表 2 所示, 结果表明: 在实验确定水平范围内, 各因素对花青素得率的影响大小依次为: $D > B > A > C$, 最佳提取条件为 $A_3B_2C_1D_3$, 即料液比、乙醇浓度、提取时间和提取温度分别为 1:40 (g/mL)、65%、30 min 和 50 °C。正交实验结果的方差分析如表 3 所示, 由表 3 可知, 4 个实验因素对提取率均有显著影响($P<0.05$)。

由于最佳提取条件 $A_3B_2C_1D_3$ 不属于正交实验中的任何一组, 因此采用该最佳提取条件提取黑果腺肋花楸原花青素进行验证, 结果表明, 采用该条件提取花青素的平均提取率为 7.430 mg/g (相对标准偏差为 1.62%), 略高于正交实验组内最大提取率, 介于已有报道的 3.61~7.50 mg/g 之间^[28-29], 与最高提取率接近。

2.6 黑果腺肋花楸提取物花色苷组成成分分析

大孔树脂纯化后的黑果腺肋花楸花青素在 520 nm 下的 HPLC 图谱如图 1 所示, 图 1 中 1、2、3、4、5、6 和 7 号出峰分别为矢车菊-己糖苷二聚体、矢车菊素-3-半乳糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊-3-木糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-槐糖苷共 7 种花色苷, 占比分别为: 17.02%、39.41%、9.35%、11.21%、15.63%、4.27%和 3.11%。已有黑果腺肋花楸提取花青素中, 分别鉴定出了 3 种^[27]、4 种^[28]和 6 种^[29]花色苷, 且均为矢车菊素类花色苷。其中已有报道的矢车菊-3-半乳糖苷、矢车菊-3-阿拉伯糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊-己糖苷二聚体和矢车菊-3,5-二己糖苷在本实验中检出, 矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-槐糖苷为新检出, 矢车菊-3,5-二己糖苷未检出, 这可能与提取和纯化方法有关。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验表
Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment table

实验序号	因素				提取率/(mg/g)
	A 料液比 (g/mL)	B 乙醇浓度/%	C 提取时间/min	D 提取温度/°C	
1	3	2	3	1	7.098
2	3	3	1	2	7.270
3	2	1	3	2	6.659
4	2	3	2	1	6.655
5	2	2	1	3	7.500
6	1	3	3	3	7.421
7	1	1	1	1	6.500
8	3	1	2	3	7.220
9	1	2	2	2	7.077
k1	6.999	6.793	7.094	6.751	
k2	6.942	7.230	6.984	7.002	
k3	7.196	7.115	7.059	7.384	
R	0.254	0.437	0.110	0.633	
最优水平	A_3	B_2	C_1	D_3	

表 3 正交实验方差分析
Table 3 Variance analysis of the orthogonal experiment

因素	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
A	0.115	2	0.057	237.417	0.046
B	0.322	2	0.161	665.457	0.027
C	0.019	2	0.1	209.716	0.048
D	0.666	2	0.33	1376.901	0.019
误差	0.000	1			
总计	503.953	10			
修正后总计	1.222	9			

注: $R^2=1.000$ (调整后 $R^2=0.998$)。

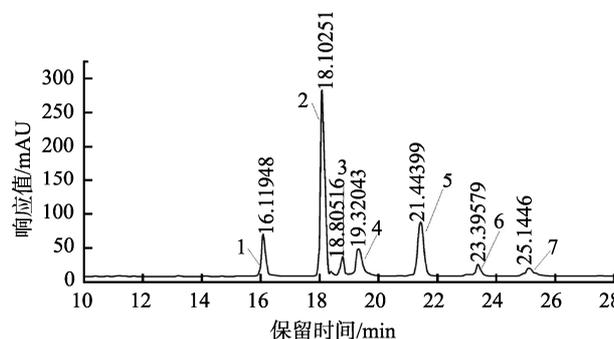


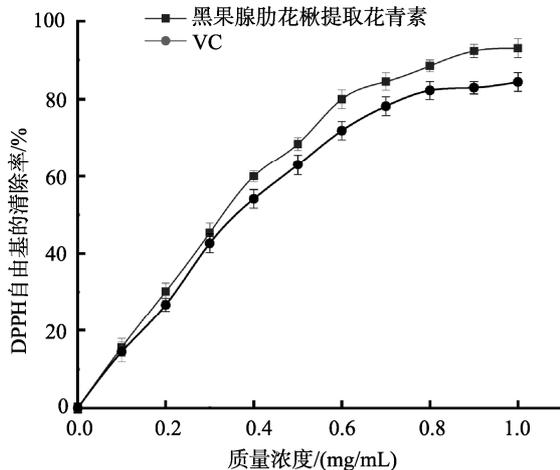
图 1 大孔树脂纯化后的黑果腺肋花楸花青素 HPLC-DAD 图谱
Fig.1 HPLC-DAD chromatogram of anthocyanin from *Aronia melanocarpa* after purification with macroporous resin

2.7 黑果腺肋花楸提取花青素的抗氧化活性

花青素类化合物能有效去除自由基, 故而显示抗氧化性, 其抗氧化作用主要表现为酚羟基与自由基反应脱去酚羟基中的氢原子, 与自由基结合, 其自身脱去酚羟基氢形成共振稳定半醌式自由基结构, 从而终止自由基的链式反应^[26]。为研究黑果腺肋花楸提取花青素的抗氧化活性, 以维生素 C (vitamin C, VC)为对照, 对经大孔树脂纯化后的黑果腺肋花楸提取花青素的 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除率和总还原力等抗氧化指标进行了测定。

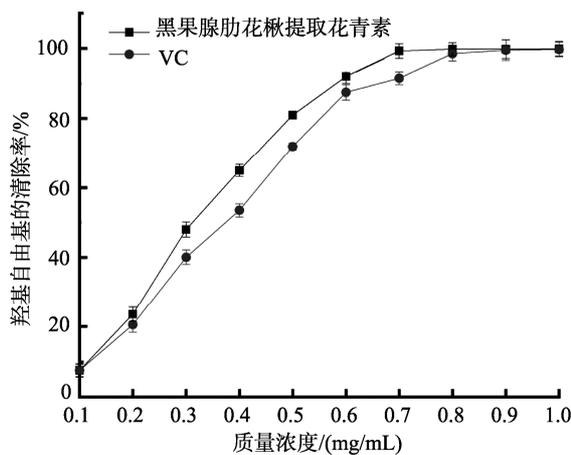
2.7.1 DPPH 自由基清除率的测定

黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 对 DPPH 自由基清除能力如图 2 所示, 由图 2 可知, 随着花青素质量浓度的升高, 其清除 DPPH 自由基的能力显著增加, 且清除 DPPH 自由基能力随质量浓度变化趋势与 VC 类似, 均在质量浓度大于 0.8 mg/mL 时增加速度趋于平缓。相同测定条件下, 黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 的半数抑制浓度(half-inhibitory concentration, IC_{50})分别是 0.322 和 0.360 mg/mL, 所提取花青素在质量浓度大于 0.2 mg/mL 时, DPPH 自由清除能力显著大于 VC ($P<0.05$)。

图 2 DPPH 自由基的清除率测定($n=3$)Fig.2 Determination of DPPH free radical scavenging rates ($n=3$)

2.7.2 羟基自由基清除率的测定

黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 对羟基自由基清除能力如图 3 所示, 由图 3 可知, 其对羟基自由基有着明显的清除效果, 随着花青素质量浓度的升高, 其清除羟基自由基的能力显著增加, 但清除羟基自由基能力显著高于 VC, 相同测定条件下, 黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 的 IC_{50} 分别是 0.329 和 0.348 mg/mL, 所提取花青素质量浓度在 0.2~0.8 mg/mL 范围内, 羟基自由基清除能力显著大于 VC ($P<0.05$)。

图 3 羟基自由基清除率测定($n=3$)Fig.3 Determination of hydroxyl radical scavenging rates ($n=3$)

2.7.3 超氧阴离子自由基清除率的测定

黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 对超氧阴离子自由基清除能力如图 4 所示, 由图 4 可知, 随着花青素质量浓度的升高, 其清除超氧阴离子自由基的能力显著增加, 且清除超氧阴离子自由基能力随质量浓度变化趋势与 VC 类似, 当质量浓度大于 0.7 mg/mL 时增加速度趋于平缓, 两者抗氧化能力接近, 这可能是由于随着质量浓度的增加, 试剂中超氧阴

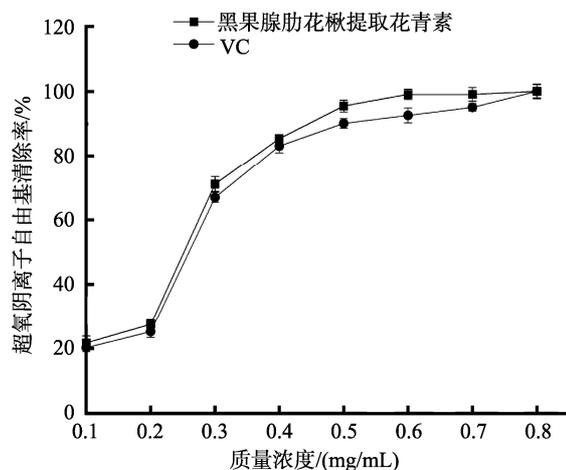
离子自由基趋于完全清除, 相同测定条件下, 黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 的 IC_{50} 分别是 0.211 和 0.236 mg/mL, 所提取花青素质量浓度在 0.1~0.7 mg/mL 范围内, 的超氧阴离子自由基清除能力略大于 VC。

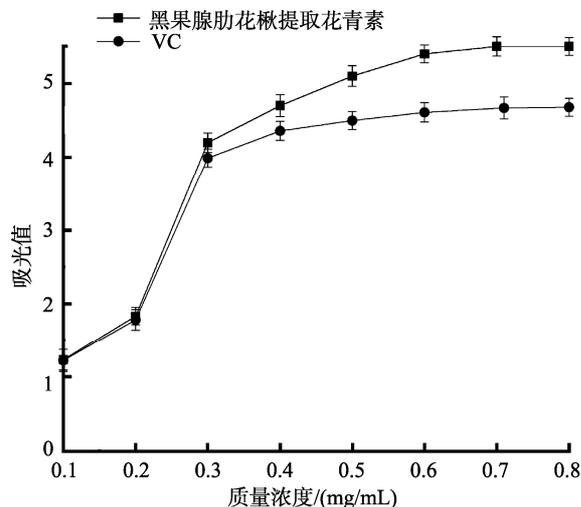
2.7.4 总还原力测定

铁离子还原力作为抗氧化活力的一个重要指标, 样品对铁离子的还原力越强, 其抗氧化能力越强。黑果腺肋花楸提取花青素和 VC 总还原力测定结果如图 5 所示, 由图 5 可知, 随着花青素质量浓度的升高, 其总还原力呈现较明显的线性增加, 相同测定条件下, 当质量浓度大于 0.3 mg/mL 时, 黑果腺肋花楸提取花青素的总还原力显著大于 VC ($P<0.05$)。

3 结果与讨论

本研究通过单因素、正交实验对黑果腺肋花楸浆果花青素提取工艺进行了优化, 在最优实验条件下, 花青素的平均提取率可达 7.430 mg/g(相对标准偏差为 1.62%)。花青素提取液经 LX-32 大孔树脂纯化后, 经 HPLC-DAD 分析, 鉴定出矢车菊-己糖苷二聚体、矢车菊素-3-半乳糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖苷、矢车菊-3-木糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-槐糖苷共 7 种花色苷, 其中矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-槐糖苷为新检出的 2 种花色苷。以 VC 为对照, 对比了纯化后的花青苷混合物的 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基清除率和总还原力等抗氧化指标, 在一定的浓度范围和相同检测条件下, 提取的花青素抗氧化能力总体高于 VC。与已有原料提取花青素的组成相比^[30-31], 黑果腺肋花楸花青素提取物种花色苷种类比较单一, 均属矢车菊家族花色苷, 更有利于分离出单体, 而且具有较强的抗氧化能力^[32-34], 是一种优质的天然抗氧化剂获取来源, 具有较高的研究和开发利用价值。

图 4 超氧阴离子自由基清除率测定($n=3$)Fig.4 Determination of superoxide anion radical scavenging rates ($n=3$)

图 5 总还原力测定($n=3$)Fig.5 Determination of total reducing power ($n=3$)

参考文献

- 魏丽萍. 黑果腺肋花楸的食药价值及开发前景分析[J]. 山西农经, 2019, (16): 82, 84.
WEI LP. Analysis on the food and drug value and development prospect of *Aronia melanocarpa* [J]. Shanxi Agric Econ, 2019, (16): 82, 84.
- MÜLLER L, WEEVER F, HÜBNER F, et al. Characterization of oligomeric proanthocyanidin-enriched fractions from *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott via high-resolution mass spectrometry and investigations on their inhibitory potential on human topoisomerases [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69: 11053–11064.
- 孙婉婷, 王赛, 王猛, 等. 近年来国外黑果腺肋花楸提取纯化及功能作用研究进展[J]. 食品工业, 2019, 40(11): 262–265.
SUN WT, WANG S, WANG M, et al. Research progress of extraction, purification and function of *Aronia melanocarpa* in recent years [J]. Food Ind, 2019, 40(11): 262–265.
- 孙智谋, 周旭, 张佳霖, 等. 黑果腺肋花楸花青素抗氧化功能的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 220–224.
SUN ZM, ZHOU X, ZHANG JL, et al. Research progress on antioxidative function of anthocyanin in *Aronia melanocarpa* [J]. Food Res Dev, 2017, 38(16): 220–224.
- XU YY, QIU Y, REN H, et al. Optimization of ultrasound-assisted aqueous two-phase system extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* pomace by response surface methodology [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2017, 47(3): 312–321.
- 邓皓天, 朱金艳, 孔彦文, 等. 响应面法优化黑果腺肋花楸花色苷抑菌活性工艺的研究[J]. 食品科技, 2021, 46(6): 200–206.
DENG HT, ZHU JY, KONG YW, et al. Optimization of antibacterial activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* by response surface methodology [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(6): 200–206.
- 李国明, 张丽萍, 易平, 等. 黑果腺肋花楸挥发油化学成分及总黄酮含量分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1920–1926.
LI GM, ZHANG LP, YI P, et al. Study on the chemical composition of volatile oil and total flavone content of *Aronia melanocarpa* [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1920–1926.
- WOO HW, LEE JS. Characterization of electrospun *Aronia melanocarpa* fruit extracts loaded polyurethane nanoweb [J]. Fash Text, 2021, 8(1): 12–21.
- 李海波, 王淑娟, 杨亚平, 等. 黑果腺肋花楸果汁产品品质分析与综合评价体系建立与应用[J/OL]. 现代食品科技: 1–10. [2021-12-06]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0331>
LI HB, WANG SJ, YANG YP, et al. Quality analysis of commercial *Aronia melanocarpa* juices and the establishment and application of the comprehensive evaluation system [J]. Mod Food Sci Technol: 1–10. [2021-09-23]. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0331>
- PARK YJ, PULIGUNDLA P, MOK C. Decontamination of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.) by cold plasma treatment and its effects on biochemical composition and storage quality of their corresponding juices [J]. Food Sci Biotechnol, 2021, 30(3): 1–7.
- 郝思奥, 李艳, 贺艳楠, 等. 黑果腺肋花楸黄酮提取物修复小鼠急性酒精肝损伤的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(14): 30–35.
HAO SAO, LI Y, HE YN, et al. Studies of the effects of flavone extracts from black chokeberry on acute alcoholic liver injury in mice [J]. Food Res Dev, 2021, 42(14): 30–35.
- ZDUNIĆ G, ALIMPIĆ A, DEJAN J, et al. In vitro hypoglycemic, antioxidant and antineurodegenerative activity of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) leaves [J]. Ind Crops Prod, 2020, 148: 112328–112328.
- HWANG ES, LEE YJ. Effects of different cultivated regions on bioactive compound content and antioxidant activity of aronia (*Aronia melanocarpa*) [J]. Korean J Food Preserv, 2020, 27(4): 457–467.
- 杨舒乔, 王迪, 高彦祥. 黑果腺肋花楸功能性研究进展及其应用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(13): 206–213.
YANG SQ, WANG D, GAO YX. Advances in studies on the function and application of *Aronia melanocarpa* [J]. Food Res Dev, 2021, 42(13): 206–213.
- 扶庆权. 正交试验法优化苹果皮中原花青素的提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, 5(1): 112–116.
FU QQ. Study on the extraction process of procyanidins from apple peel by orthogonal test [J]. China Food Addit, 2011, 5(1): 112–116.
- 张振源, 胡晓颖, 李国平, 等. 酶法超声联合提取黑果腺肋花楸多酚及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(9): 209–215.
ZHANG ZY, HU XY, LI GP, et al. Enzymatic ultrasonic extraction and antioxidant activity of total polyphenols from *Aronia melanocarp* [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(9): 209–215.
- 刘玲玲, 孙彤彤, 陈小强, 等. 林生茜草果实花青素纯化及稳定性分析[J]. 精细化工, 2021, 38(2): 341–349, 357.
LIU LL, SUN TT, CHEN XQ, et al. Purification and stability analysis of anthocyanin from *Rubia sylvatica* Nakai fruit [J]. Fine Chem, 2021, 38(2): 341–349, 357.
- 李绮丽. 莲子皮低聚原花青素分级分离、组分鉴定与抗氧化机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
LI QL. Studies on isolation, identification and antioxidant activity of oligomeric proanthocyanidins from lotus seed peel [J]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013.
- WANG YH, ZHU JY, MENG XJ, et al. Comparison of polyphenol, anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts [J]. Food Chem, 2016, 197: 522–529.
- 季梅, 李强, 姜红祥. 高效液相色谱-质谱检测红葡萄皮中花色苷[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2240–2243.

- JI M, LI Q, LOU HX. HPLC-DAD-MS-MS determination of anthocyanins in red grape skin [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(12): 2240–2243.
- [21] 段艳波, 蒋福宇, 高品一, 等. 萝卜清除 DPPH 自由基活性研究[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(19): 6155–6180.
DUAN YB, JIANG FY, GAO PY, *et al.* Study on DPPH free radical scavenging activity of radish [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2014, 42(19): 6155–6180.
- [22] 冯娇, 肖海鸿. 不同产地银柴胡黄酮含量及其抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(5): 8–12.
FENG J, XIAO HH. Study on the flavonoids content and antioxidant activity of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata* cultivated from different areas [J]. *China Food Addit*, 2021, 32(5): 8–12.
- [23] 黄仁术, 胡晓梦, 何惠利. 大别山野葛根异黄酮超声辅助提取工艺的响应面优化与还原力测定[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(1): 51–57.
HUANG RS, HU XM, HE HL. Optimization of response surface and determination of reducing power of ultrasonic assisted extraction of isoflavones from *Pueraria lobata* in Dabie Mountains [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(1): 51–57.
- [24] 张海霞, 包良, 王晓兰, 等. 紫色马铃薯花青素的提取和稳定性评价[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(11): 103–108.
ZHANG HX, BAO L, WANG XL, *et al.* Evaluation of extraction and stability of anthocyanins from purple potato [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(11): 103–108.
- [25] 朱学伸, 赵文, 林淑鑫, 等. 黑豆种皮中原花青素的提取和纯化研究[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(1): 154–160.
ZHU XS, ZHAO W, LIN SX, *et al.* Extraction and purification of procyanidins from black bean seed coats [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2018, 34(1): 154–160.
- [26] 谢翀, 林琳, 吴戈仪, 等. 荔枝生理落果中 A 型原花青素提取纯化鉴定及抗氧化活性研究 [J/OL]. *食品工业科技*: 1–12. [2021-09-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050048>
XIE C, LIN L, WU GY, *et al.* Extraction, purification, identification of A-type procyanidine from litchi fruitlet and antioxidant activity [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*, 1–12. [2021-09-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021050048>
- [27] 张卉, 尤小明, 刘姝含, 等. 黑果腺肋花楸花青素的分离纯化[J]. *食品工业*, 2021, 42(11): 193–197.
ZHANG H, YOU XM, LIU SH, *et al.* Separation, purification of anthocyanins from *Aronia prunifolia* ‘Viking’ [J]. *Food Ind*, 2021, 42(11): 193–197.
- [28] 国石磊. 黑果腺肋花楸花色苷分离纯化、结构鉴定及其抗氧化活性研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2015.
GUO SL. Purification, structure identification of anthocyanins and its antioxidant activity from *Aronia melanocarpa* [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2015.
- [29] 位路路, 林杨, 王月华, 等. 黑果腺肋花楸花色苷提取工艺优化及其抗氧化活性和组成鉴定[J]. *食品科学*, 2018, 39(12): 239–246.
WEI LL, LIN Y, WANG YH, *et al.* Optimization of extraction of anthocyanins from berries of *Aronia melanocarpa* and their antioxidant activity and composition [J]. *Food Sci*, 2018, 39(12): 239–246.
- [30] 王晗, 朱华平, 李文钊, 等. 桑葚提取物中花青素分析及其体外抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(15): 170–175.
WANG H, ZHU HP, LI WZ, *et al.* Anthocyanins in mulberry extract and their *in vitro* antioxidant activity [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(15): 170–175.
- [31] 王伟, 布丽根·加冷别克, 胡晓东. 葡萄籽原花青素的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *保鲜与加工*, 2020, 20(6): 101–108.
WANG W, BULIGEN JLBK, HU XD. Optimization of extraction technique of proanthocyanidins from grape seed and its antioxidant activity [J]. *Storage Process*, 2020, 20(6): 101–108.
- [32] 李彦, 李鑫, 刘景玲, 等. 鸡血藤原花青素的纯化及活性评价[J]. *食品科学*, 2016, 37(17): 45–51.
LI Y, LI X, LIU JL, *et al.* Purification and bioactivity evaluation of proanthocyanidins from *Spatholobi caulis* [J]. *Food Sci*, 2016, 37(17): 45–51.
- [33] 周玮婧, 隋勇, 孙智达, 等. 荔枝皮原花青素与 VC、VE 的协同抗氧化研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 5–8.
ZHOU WJ, SUI Y, SUN ZD, *et al.* Synergistic antioxidant effects of procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp and VC or VE [J]. *Food Sci*, 2012, 33(3): 5–8.
- [34] 余修亮, 朱志平, 李佳桥, 等. 莲子壳原花青素超声提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 99–109.
YU XL, ZHU ZP, LI JQ, *et al.* Optimization of the extraction process of proanthocyanidins from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seed epicarp and their antioxidant activities [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(12): 99–109.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



孙 燕, 硕士, 副教授, 主要研究方向为植物资源与天然产物开发利用。
E-mail: 274241487@qq.com



张焕新, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。
E-mail: hxinxz@hotmail.com