

“黑美人”马铃薯中原花青素抗氧化性研究

杨晓辉*, 蔡慧珍, 汪 岭, 任彬彬

宁夏医科大学公共卫生学院, 银川 750004

摘要: 在超声辅助下从“黑美人”马铃薯中提取原花青素, 提取浓缩液经 AB-8 大孔吸附树脂填充柱纯化后, 所得产物中原花青素含量为 93.59%, 得率为 4.3%。抗氧化性研究表明, 其对 DPPH· 自由基、·OH 自由基和 O₂⁻ 自由基具有显著的清除效果, 清除率与其浓度成正相关, 且不输于 V_c, 尤其是对 ·OH 自由基和 O₂⁻ 自由基的清除作用明显高于 V_c。表明“黑美人”马铃薯原花青素有较强的抗氧化性, 这为进一步开发利用“黑美人”马铃薯提供必要的理论支持。

关键词: “黑美人”马铃薯; 原花青素; 抗氧化性

中图分类号: TS201

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.014

Antioxidant Activity of Proanthocyanidins from “Black Beauty” Potatoes

YANG Xiao-hui*, CAI Hui-zhen, WANG Ling, REN Bin-bin

College of Public Health, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: Proanthocyanidins were ultrasonically extracted from “Black Beauty” potatoes and further separated by AB-8 macroporous resin. The concentration of proanthocyanidins in the purified extract was 93.59%, and the yield of proanthocyanidins was determined to be 4.3%. Proanthocyanidins of “Black Beauty” potatoes had strong scavenging effects against DPPH radicals, ·OH radicals and O₂⁻ radicals. The scavenging rates of proanthocyanidins were positively related to its concentration, and did not lower than that of V_c. The scavenging effects against ·OH radicals and O₂⁻ radicals were obviously higher than that of V_c. This study provided theoretical basis for further development and utilization to proanthocyanidins from “Black Beauty” potatoes.

Key words: “Black Beauty” potatoes; proanthocyanidins; antioxidant activity

原花青素 (Proanthocyanidins, 简称 PC) 是广泛存在于植物界和食品中的一大类天然多酚化合物的总称, 它是由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成^[1]。研究证明, 原花青素拥有强有力的抗氧化^[2,3]、清除自由基以及改善体循环的特殊功效, 并能预防 80 多种因自由基而引起的疾病, 包括抗肿瘤、抗心肌缺血, 抗炎症, 抑制阿尔兹海默症, 抑制动脉粥样硬化等^[4-8], 尤其是其体内活性, 更是其它抗氧化剂无法比拟的。

原花青素的性质与原花青素的组成和结构相关^[9,10], 而且不同材料, 甚至同一材料的不同部位, 用不同方法得到的原花青素各不相同, 这也导致其生物活性相差甚远。因此, 寻找新的富含原花青素的资源, 研究其中的原花青素活性也越来越多的引

起科学家的关注。文献报道的原花青素资源主要有葡萄皮、葡萄籽^[1,9]等。本研究拟从航天技术育种研发出的特色植作物——“黑美人”马铃薯中提取分离原花青素, 研究其对 DPPH· 自由基、·OH 自由基和 O₂⁻ 自由基清除作用, 以此来对“黑美人”马铃薯中原花青素的抗氧化性进行初步评定, 为进一步开发利用“黑美人”马铃薯提供必要的理论支持, 同时也为进一步研究原花青素的活性和构效关系、提高其生物利用率提供思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜“黑美人”马铃薯 (购于宁夏新大地黑土豆发展专业合作社); PC 对照品 (北京上立方联合化工技术研究院); AB-8 大孔吸附树脂 (南开大学化工厂); 邻苯三酚 (天津市凯通化学试剂有限公司); DPPH 自由基 (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, Ruitaibio, 日本); Tris (三羟甲基氨基甲烷, 国药集团化学试剂

有限公司);抗坏血酸(天津市科密欧化学试剂有限公司);水杨酸(国药集团化学试剂有限公司); H_2O_2 (上海广诺化学科技有限公司);硫酸亚铁;无水乙醇;盐酸等。

1.2 仪器与设备

日立 L-2000 型高效液相色谱仪;日立 3310 紫外可见分光光度计;Vis-7220N 分光光度计;AL-204 梅特勒分析天平(瑞士梅特勒);JYL-C012 九阳料理机(九阳股份有限公司);KQ 3200DA 型数控超声波清洗器(昆山市仪器厂);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HH.SY21-Ni 电热恒温水浴锅(北京市医疗设备总厂);Neofuge 15R 型高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司);Heal Force 超纯水净化仪(力新仪器有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 “黑美人”马铃薯原花青素的提取、分离、纯化^[7,11]

将“黑美人”马铃薯清洗干净后,晾干,用料理机榨汁(在榨汁过程中不加入任何溶液)成匀浆后,准确称取 100.0 g 于烧杯中,按料液比 1:7.5 (W/V)加入 75% 的乙醇,在超声振荡器(超声功率为 80%)中于 60 °C 提取 30 min。最后,将烧杯中提取后的溶液在离心沉淀机上以 1000 ~ 3000 rpm 递增的速度离心 5 min,取其上清液进行真空抽滤弃去提取剂,浓缩液上 AB-8 大孔吸附柱进行分离纯化。先采用去离子水洗脱至流出液在紫外可见光区无吸收,再用 75% 的乙醇洗脱至褐色物质全部流出,将 75% 乙醇洗脱液真空浓缩、乙酸乙酯萃取,酯相蒸去溶剂,冷冻干燥,得原花青素褐色粉末,称取该粉末 10.00 mg,用 75% 无水乙醇完全溶解后,准确定容至 50 mL,摇匀,待测。

1.3.2 “黑美人”马铃薯原花青素含量检测

准确称取原花青素标准品 10 mg,用 75% 乙醇溶解后准确定容至 50 mL,摇匀,制得浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准应用液。分别精密移取上述标准应用液 2、4、5、6、7.5、10 mL 至 10 mL 容量瓶中,用 75% 乙醇准确定容至刻度,得到浓度分别为 40、80、100、120、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的原花青素标准系列溶液,摇匀待测。以 75% 的乙醇溶液为空白,紫外分光光度法于 286 nm 测定标准系列溶液和 1.3.1 所得待测液的吸光度值,绘制吸光度-浓度标准曲线,求出回归方程,以此计算纯化后的产物中原花青素的含量。

1.3.3 “黑美人”马铃薯原花青素清除 DPPH· 自由基能力测定^[1]

取 2.0 mL 不同浓度的样品,分别加入 2.0 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH-乙醇溶液,摇匀,放置 30 min,测定 517 nm 下的吸光值 $A_{\text{样品}}$ 。以样品提取液加乙醇作为对照管,以样品溶剂加 DPPH-乙醇液作为空白管,分别以相同方法测得 517 nm 下 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{空白}}$,平行做三次,取均值。以抗坏血酸作为参比物,考察样品清除 DPPH· 的能力。

$$\text{DPPH}\cdot \text{清除能力}(\%) = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

1.3.4 “黑美人”马铃薯原花青素清除·OH 自由基能力测定^[12]

参照 Smirnoff 的方法,利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合,产生·OH,在体系内加入水杨酸捕捉·OH,并产生有色物质,该有色物质在 510 nm 下有最大吸收,通过测定 A_{510} 值可以定量判断·OH 的清除程度,并可估算出·OH 的清除率。

反应体系(4 mL)包括:1 mL H_2O_2 (8.8 mmol/L),1 mL $FeSO_4$ (9 mmol/L),1 mL 水杨酸(9 mmol/L),1 mL 样品溶液(0.4 mg/mL)。 H_2O_2 最后加入以启动整个反应。反应体系在 37 °C 条件下保温 60 min,在 15000 rpm 条件下离心 6 min,于 510 nm 处检测吸光度,空白组以蒸馏水代替样品溶液,平行做三次,取均值。以抗坏血酸作为参比物,考察样品清除·OH 的能力。

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = [(A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\%$$

1.3.5 “黑美人”马铃薯原花青素清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基能力测定^[13]

在碱性条件下(pH 8.2),邻苯三酚发生自氧化反应,生成 $O_2^{\cdot-}$ 和有色中间产物,该有色物在 325 nm 处吸收峰值减小。故通过测定 A_{325} 值可以定量判断自氧化反应的程度,并可计算出原花青素的清除率。

取 0.2 mL 样品溶液,以蒸馏水定容为 1.0 mL,加入 3 mL Tris-HCl (pH = 8.2),25 °C 水浴 20 min 后,加入 10 mmol/L 邻苯三酚 100 μL ,精确反应 4 min,滴入 6 mol/L HCl 100 μL 终止反应,在 325 nm 处测定吸光度,平行做三次,取均值空白组以蒸馏水代替样品溶液。以抗坏血酸作为参比物,考察样品清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力。

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 “黑美人”马铃薯原花青素的纯度

原花青素在 40 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内有良好的线性关系,符合比尔定律,回归方程为 $A = 0.04753 + 0.01377C, R = 0.9999$ 。此条件下测得纯化后的产物中原花青素含量为 93.59%,得率为 4.3%。

2.2 “黑美人”马铃薯原花青素清除 DPPH· 自由基能力

按照 1.3.3 的方法,测得“黑美人”马铃薯原花青素溶液和 V_C 溶液清除 DPPH· 自由基能力,结果见图 1。由图 1 可以看出,“黑美人”马铃薯原花青素及 V_C 溶液都有着较强的清除 DPPH· 自由基的能力,并且随着浓度的增加,清除率也逐渐增加。“黑美人”马铃薯原花青素提取液的浓度达到 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可达到 90% 以上的清除率。“黑美人”马铃薯原花青素和 V_C 的浓度为 10 ~ 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,“黑美人”马铃薯原花青素对 DPPH· 自由基的清除效果较 V_C 对 DPPH· 自由基的清除效果略高些;当二者浓度增至 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以后,二者对 DPPH· 自由基的清除能力相当。且“黑美人”马铃薯原花青素提取液的 IC_{50} 达到了 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 V_C 溶液的 IC_{50} 为 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

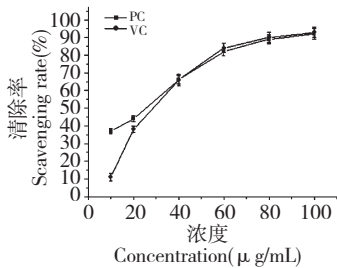


图 1 “黑美人”马铃薯原花青素对 DPPH· 自由基的清除
Fig. 1 DPPH free radical scavenging capacity of proanthocyanidins from “Black Beauty” potatoes

2.3 “黑美人”马铃薯原花青素清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力

按照 1.3.4 的方法,测得“黑美人”马铃薯原花青素溶液和 V_C 溶液清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力,其实验结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,“黑美人”马铃薯原花青素与 V_C 对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力随着浓度的增加,清除率都呈上升趋势,但同浓度下“黑美人”马铃薯原花青素对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率明

显比 V_C 强。当“黑美人”马铃薯原花青素和 V_C 的浓度均为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,二者对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别为 35.1% 和 10.8%;当浓度增至 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,二者对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率分别提高到 85.0% 和 65.2%,随后随着浓度的增加,对 $\cdot\text{OH}$ 清除能力的增加幅度减少。由此可见,在一定浓度范围内,二者对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果与其浓度之间存在量效关系,且“黑美人”马铃薯原花青素对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果明显优于 V_C 。

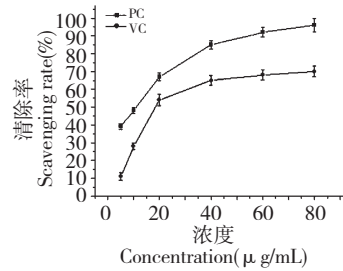


图 2 “黑美人”马铃薯原花青素对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging capacity of proanthocyanidins from “Black Beauty” potatoes

2.4 “黑美人”马铃薯原花青素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基能力

按照 1.3.5 的方法,测得“黑美人”马铃薯原花青素溶液和 V_C 溶液清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基能力,其实验结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,“黑美人”马铃薯原花青素与 V_C 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 均有明显的清除作用,当“黑美人”马铃薯原花青素的浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率达到 82%,远高于 V_C 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除率;且“黑美人”马铃薯原花青素溶液的 IC_{50} 为 8.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 V_C 溶液的 IC_{50} 为 38.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明“黑美人”马铃薯原花青素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基的能力较 V_C 更强。

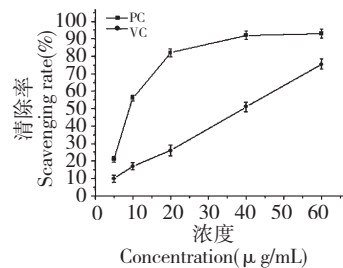


图 3 “黑美人”马铃薯原花青素清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 自由基能力
Fig. 3 Superoxide anion free radical scavenging capacity of proanthocyanidins from “Black Beauty” potatoes

3 讨论

“黑美人”马铃薯富含原花青素,提取、纯化后的产物中原花青素含量为 93.59%,得率为 4.3%。抗氧化性研究表明,其对 DPPH·自由基、·OH 自由基和 O₂⁻ 自由基具有显著的清除效果,清除率与其浓度成正相关,且不输于 V_C,尤其是对·OH 自由基和 O₂⁻ 自由基的清除作用明显高于 V_C,表明“黑美人”马铃薯原花青素有较强的抗氧化性,这为进一步开发利用“黑美人”马铃薯提供必要的理论支持,同时也将为进一步研究原花青素的活性和构效关系、提高其生物利用率提供思路。

参考文献

- Hu BR(胡博然),Zhu Y(朱勇),Xu J(徐洁),*et al.* Comparative application of ESR and spectrophotometry to evaluate the antioxidant activity of Grape Seed proanthocyanidins. *Food Sci*(食品科学),2013,34(1):33-37.
- Yan E(阎娥),Liu JL(刘建利),Yuan JF(原江锋),*et al.* Study on extraction and antioxidation activity of procyanidins from broad bean shell. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2009,30(2):65-67.
- Yu HJ(禹华娟),Sun ZD(孙智达),Xie BJ(谢笔钧). Enzyme assistant extraction of procyanidins from seedpod of Lotus and the comparison of antioxidant activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2010,22:154-158.
- Yan SF(闫少芳),Li Y(李勇),Wu J(吴娟),*et al.* Study of the effect of grape seed extract procyanidin on blood lipid regulation and mechanism. *Chin J Food Hygiene*(中国食品卫生杂志),2003,15:302-304.
- Ma YB(马亚兵),Gao HQ(高海青),You BA(由倍安),*et al.* Anti-atherosclerosis effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits. *J Shandong Univ, Health Sci*(山东大学学报,医学版),2003,41:646-650.
- Huo WL(霍文兰). Study on extraction, purification and antioxidation of proanthocyanidins from rice brain of sorghum seed. *Food Sci Technol*(食品科技),2008,10:145-148.
- Zhou WJ(周玮婧),Sun ZD(孙智达),Xie BJ(谢笔钧),*et al.* Extraction, purification and antioxidation evaluation of procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp. *Food Sci*(食品科学),2009,30(8):68-71.
- Chen C(陈婵),Huang Q(黄琼),Peng H(彭宏),*et al.* Study on the stabilization and antioxidant activity of proanthocyanidins from purple sweet potato. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),2012,40:17308-17310.
- Zhao D(赵丹),Zeng XA(曾新安),Xu ZY(徐中岳). Study on the antioxidant activities of different polymerization degree grape skin proanthocyanidins. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业),2012,38:104-107.
- Wang WJ(王文君),Deng ZT(邓镇涛),Xiang CH(向灿辉),*et al.* Study on stability and antioxidant activity of proanthocyanidins from purple sweet potatoes. *Food Ind*(食品工业),2012,33:105-109.
- Yang XH(杨晓辉),Wang L(汪岭). Analysis and determination of proanthocyanidins in Heimeiren potatoes by ultraviolet spectrophotometry. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),2010,38:13643-13644.
- Yan J(颜军),Gou XJ(苟小军),Zou QF(邹全付),*et al.* Determination of hydroxyl radical generating from fenton reaction by spectrophotometry. *J Chengdu Univ, Nat Sci*(成都大学学报,自科版),2009,28(2):91-93.
- Chen LH(陈莉华),He CZ(贺诚志),Tan LY(谭林艳),*et al.* Investigation of antioxidant activities of extracts of Hong Guo Shen. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:174-177.
- Wang CZ, Zhang HY, Li WJ, *et al.* Chemical constituents and structural characterization of polysaccharides from four typical bamboo species leaves. *Molecules*, 2015, 20: 4162-4179.
- Shang YF, Kim SM, Um BH. Optimization of pressurized liquid extraction of antioxidants from black bamboo leaves. *Food Chem*, 2014, 154: 164-170.
- Xu J, Qian JQ, Li SQ. Enzymatic acylation of isoorientin isolated from antioxidant of bamboo leaves with palmitic acid and antiradical activity of the acylated derivatives. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239: 661-667.

(上接第 349 页)