

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-026-10

# 三种提取方法对铁皮石斛花色苷稳定性和抗氧化性的影响

李晓娇,刘忆明,王建钧,高胜润,何春燕,宋志姣\*

保山学院资源环境学院,保山 678000

**摘要:**研究不同提取方法的铁皮石斛中花色苷的含量、稳定性及其抗氧化活性。采用浸提法、微波法和超声波法,从铁皮石斛中提取花色苷,pH 示差法测定花色苷的含量;考察温度、光照、金属离子和食品添加剂对铁皮石斛花色苷的稳定性影响;通过对羟基自由基、DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除能力探讨抗氧化活性。浸提法、微波法、超声波法所提取的铁皮石斛花色苷的含量分别为量依次为 7.56、9.63、9.12 mg/100 g;稳定性实验表明,温度的改变对 3 种提取方法得到的花色苷影响较大,随着温度升高,颜色逐渐加深。在阳光照射下,3 种提取方法得到的花色苷,但在室内自然光和避光条件下稳定性较好。 $Mg^{2+}$ 、 $Al^{3+}$  对铁皮石斛花色苷有增色作用, $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  和  $Fe^{3+}$  能使花色苷明显褪色, $Ca^{2+}$  对铁皮石斛花色苷的稳定性影响较小。抗坏血酸和蔗糖使花色苷明显褪色,而苯甲酸钠对花色苷有稳定作用;体外抗氧化体系实验表明,浸提法、微波法、超声波法提取的铁皮石斛花色苷对 OH 自由基的  $IC_{50}$  分别为 3.349、3.155、3.338 mg/L,对 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  分别为 0.119、0.71、0.088 mg/L,对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的  $IC_{50}$  分别为 0.571、0.455、0.482 mg/L。微波法提取的铁皮石斛花色苷含量最高,且抗氧化能力较高。

**关键词:**铁皮石斛;花色苷;稳定性;抗氧化活性

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.004

## Effects of Three Extraction Methods on the Stability and Antioxidant Activities of Anthocyanins from *Dendrobium officinale*

LI Xiao-jiao, LIU Yi-ming, WANG Jian-jun, GAO Sheng-run, HE Chun-yan, SONG Zhi-jiao\*

School of Resources and Environment, Baoshan University, Baoshan 678000, China

**Abstract:** The content, stability and antioxidant activity of anthocyanins from *Dendrobium officinale* by different extraction methods were studied, and the content of anthocyanin was determined by pH differential method. The anthocyanins were extracted from *Dendrobium officinale* by organic solvent, microwave and ultrasonic wave. The effects of temperature, sunlight, metal ions and food additives on the stability of anthocyanins were investigated, and the antioxidant activity was investigated by scavenging hydroxyl radical, DPPH radical and ABTS<sup>+</sup> radical. The result showed that: Microwave-assisted extraction made the highest yields (9.63 mg/100 g), followed by ultrasonic-assisted extraction (9.12 mg/100 g) and organic solvent extraction (7.56 mg/100 g); the Stability experiments showed that the change of temperature had great effect on the anthocyanins of *Dendrobium officinale*. As the temperature rose, the color gradually deepened. The anthocyanins were extremely unstable when exposed to sunlight. However, the anthocyanins extracted from the three extraction methods under sunlight were more stable than under natural and indoor natural light. Metal ions such as  $Mg^{2+}$  and  $Al^{3+}$  had hyperchromic effect on the anthocyanins, while  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Fe^{3+}$  could result in fading of the color,  $Ca^{2+}$  had little influence on the stability of the anthocyanins. Ascorbic acid and sucrose significantly faded the anthocyanins, but sodium benzoate could exert negative effects; In vitro antioxidant system experiments showed that the  $IC_{50}$  of anthocyanins from *Dendrobium officinale* extracted by organic solvent, microwave-Assisted and ultrasonic-Assisted extraction was 3.349、3.155、3.338 mg/L for scavenging hydroxyl radical, 0.119、0.71、0.088 mg/L for scavenging DPPH radical and 0.571、0.455、0.482 mg/L for scavenging ABTS<sup>+</sup> radical. The content of anthocyanins extracted from *Dendrobium officinale* by microwave is the highest and the antioxidant ability is higher.

收稿日期:2018-06-27 接受日期:2018-10-16

基金项目:保山市科技局第五批“保山市中青年学术与技术带头人”(zqnxshjsdtr2016(03));国家级大学生创新训练项目(201710686001);保山学院教学教改项目(16B002JGY)

\*通信作者 Tel:86-018987505166;E-mail:janeolo@163.com

**Key words:** *Dendrobium officinale*; anthocyanins; stability; antioxidant activity

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是兰科(*Orchidaceae*)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本植物<sup>[1]</sup>,是我国传统名贵的药用植物。主要分布于中国的安徽、浙江、云南、贵州、四川等省份<sup>[2]</sup>,以及越南、缅甸、泰国等地<sup>[3]</sup>。近年来,国内外对铁皮石斛化学成分进行大量的研究,发现铁皮石斛的化学成分主要为多糖、生物碱、氨基酸、微量元素、菲类、联苄类、倍半萜类、香豆素等<sup>[4,5]</sup>,并已证明铁皮石斛茎中存在丰富的花色苷<sup>[6]</sup>。

花色苷类化合物是类黄酮合成途径的有色末端产物,具有2-苯基苯并吡喃阳离子的母核结构,是一种广泛存在于植物中的水溶性天然安全色素。花色苷主要存在于水果(苹果、葡萄、火龙果、桑椹等)、蔬菜(胡萝卜、马铃薯等)、谷薯类(小麦、玉米等)、豆类(黄豆、蚕豆等)等植物体内<sup>[7]</sup>。花色苷的具有较多的生物活性,包括抗氧化活性、改善视力作用,抗癌、抗突变作用、保护肝脏作用、减肥作用、抗糖尿病作用、抗炎、抑菌作用、改善记忆力作用、抗衰老作用、抗动脉粥样硬化作用、抗辐射损伤作用抗炎活性和抗癌作用<sup>[8-10]</sup>,但对铁皮石斛花色苷的抗氧化活性研究还未见报道。目前花色苷的提取方法主要有:有机溶剂提取法、水提法、超临界流体萃取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、微生物发酵提取法、酶法提取法、液态静高压法辅助提取、亚临界水提取法、加压溶剂萃取法、双水相萃取法、高压脉冲电场辅助提取法<sup>[11]</sup>。朱璐等<sup>[12]</sup>分别采用浸提法、超声波法和微波法提取紫薯花色苷,并比较其抗氧化性。研究表明,采用超声波或微波辅助提取有助于保持提取的紫薯花色苷的抗氧化活性,且微波辅助提取法效果最好。

近年来,人们对食品安全问题越来越重视,天然食用色素特别是具有生物活性的功能性天然色素的研究成为现代食品科学的前沿和热点,因此开发功能性天然色素产品具有广阔市场前景和较高的经济价值,这对于食品、医药和日化行业都有着重要的意义。云南省保山市是云南铁皮和紫皮石斛的主要种植区,为充分利用铁皮石斛植物资源,本工作以铁皮石斛鲜条为试材,分别采用溶剂浸提法、微波法、超声法三种提取方法提取铁皮石斛花色苷,并比较三种提取方法获得的花色苷的稳定性和抗氧化活性,为铁皮石斛的天然色素开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

铁皮石斛,无霉烂的铁皮石斛鲜条,10月中旬采收于云南保山龙陵县勐兴镇。

1,1-二苯基-2-三硝基苯基(DPPH),购自美国sigma公司;ABTS(2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐)sigma公司;抗坏血酸,国药集团化学试剂有限公司;盐酸、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢、无水乙醇等均为分析纯。

N-1001 旋转蒸发仪,东京理化;HH-S26S 数字恒温水浴锅,金坛市大地自动化仪器厂;UV5100 紫外/可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;721 可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;EPED-10TH 实验室超纯水器,南京易普易达科技发展有限公司;SHB-Ⅲ A 循环水式多用真空泵,上海爱郎仪器有限公司;AS3120A 超声波清洗器,宁波新芝科技生物股份有限公司;C70F23 格兰仕微波炉广州格兰仕微波炉电器制造有限公司;FE20 型 PH酸度计,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 花色苷的提取

##### 1.2.1.1 溶剂浸提法提取花色苷<sup>[13]</sup>

将铁皮石斛鲜条除去叶片,称取50 g,切成约5~6 mm长、1~2 mm厚的小段,按料液比1:20 g/mL加入1000 mL体积分数为1% 盐酸-乙醇溶液,于40 ℃恒温水浴锅中提取120 min,提取液减压抽滤,滤液在40 ℃下用旋转蒸发仪浓缩,并回收乙醇,将提浓缩液于棕色瓶中4 ℃保存备用。

##### 1.2.1.2 微波辅助法提取花色苷

将铁皮石斛鲜条除去叶片,称取50 g,切成约5~6 mm长、1~2 mm厚的小段,按料液比1:20 g/mL加入1000 mL体积分数为1% 盐酸-乙醇溶液,在350 W 微波功率下加热90 s,于40 ℃恒温水浴锅中提取60 min,提取液减压抽滤,滤液在40 ℃下用旋转蒸发仪浓缩,并回收乙醇,将提浓缩液于棕色瓶中4 ℃保存备用。

##### 1.2.1.3 超声波辅助法提取花色苷<sup>[14]</sup>

将铁皮石斛鲜条除去叶片,称取50 g,切成约5~6 mm长、1~2 mm厚的小段,按料液比1:20 g/mL加入1000 mL体积分数为1% 盐酸-乙醇溶液,

于40℃超声功率300 W的条件下超声辅助提取60 min, 提取液减压抽滤, 滤液在40℃下用旋转蒸发仪浓缩, 并回收乙醇, 将提浓缩液于棕色瓶中4℃保存备用。

### 1.2.2 铁皮石斛花色苷的紫外-可见光谱特征

取铁皮石斛色素提取浓缩液0.5 mL稀释至50 mL, 用紫外-可见分光光度计在200~700 nm波长范围内扫描, 获得铁皮石斛色素的紫外-可见图谱。

### 1.2.3 花色苷含量的测定

利用花色苷和黄酮的结构特征, pH 1.0时, 在510~540 nm处, 花色苷和黄酮均有最大吸收峰, 而当pH4.5时, 花色苷转化为无色的查尔酮形式, 在510~540 nm处无吸收峰, 可用pH示差法测定总花色苷的含量<sup>[15-17]</sup>。通过紫外-可见波长扫描, 确定铁皮石斛花色苷的最大吸收波长532 nm, 取1 mL提取浓缩液, 分别用pH1.0的氯化钾缓冲液(0.2 mol/L HCl: 0.2 mol/L KCl = 25: 67, v/v)和pH4.5的乙酸钠溶液(1 mol/L HCl: H<sub>2</sub>O: 1 mol/L NaAc = 100: 60: 90, v/v)定容至50 mL, 室温下平衡20 min, 分别测定样品在532 nm和700 nm下的吸光度<sup>[18,19]</sup>。

按照下式计算吸光度值:  $A = (A_{518} - A_{700})pH_{1.0} - (A_{518} - A_{700})pH_{4.5}$

原样液中花色苷浓度为:  $C(mg \cdot L^{-1}) = (A \times M_w \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times l)$

式中:  $M_w$  为样品中主要花色苷的分子量,  $M_w = 449.2$ ; DF为稀释因子, 此处为10;  $\varepsilon$  为样品中主要花色苷的摩尔吸收率,  $\varepsilon = 26\,900$ ;  $l$  为比色皿的厚度/cm。

提取量(mg/100 g 鲜条) =  $C \times V \times 10^{-3} \times 20 / 100 g$

式中: C为原样液中花色苷浓度 mg/L, V为提取液总体积, 此处为100 mL。

### 1.2.4 铁皮石斛花色苷理化性质研究

#### 1.2.4.1 溶解性试验

取丙酮、甲苯、乙酸、80%乙醇、氯仿、乙酸乙酯、石油醚、水各10 mL于比色管中, 分别加入花色苷提取浓缩液0.5 mL, 观察其溶解情况。

#### 1.2.4.2 颜色反应

参照肖军霞等<sup>[20]</sup>的方法, 在滤纸上滴加3~4滴铁皮石斛提取液, 然后置于浓氨水上方熏一段时间, 观察颜色变化; 在滤纸上滴加3~4滴铁皮石斛提取液, 然后滴加饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液4~5滴, 将其放置在空气中, 观察颜色变化情况; 准确量取1 mL

铁皮石斛提取液于比色管中稀释至5 mL, 滴加2~3滴1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液, 摆晃溶液, 观察溶液颜色变化情况, 然后再加入几滴1 mol/L的HCl溶液, 振荡, 观察颜色变化情况; 准确量取1 mL铁皮石斛提取液于比色管中稀释至5 mL, 滴加3~4滴3% FeCl<sub>3</sub>溶液, 摆晃溶液, 观察溶液颜色变化情况; 取铁皮石斛提取液14份, 每份1 mL, 用0.5 mol/L NaOH和0.5 mol/L HCl将14份铁皮石斛提取液配制为pH1.0~14.0的溶液, 观察溶液颜色变化情况。

### 1.2.5 花色苷稳定性实验<sup>[21]</sup>

#### 1.2.5.1 热稳定性实验

参考刘敬华<sup>[22]</sup>的方法略作修改, 将铁皮石斛花色苷浓缩液稀释15倍, 再分别取25 mL铁皮石斛花色苷溶液7份, 于7个比色管中, 在不同温度水浴中各加热3 h, 快速冷却后, 用蒸馏水定容25 mL测定 $\lambda_{max}$ 处的吸光度, 并观察其颜色变化。

#### 1.2.5.2 光稳定性实验

参照张弘<sup>[23]</sup>的方法并稍作改动, 将铁皮石斛花色苷浓缩液稀释15倍, 再分别取25 mL铁皮石斛花色苷溶液3份, 于3个比色管中, 置于室内避光处、阳光直射处(室外晴天)、室内自然光处保存, 7天后测定 $\lambda_{max}$ 处的吸光度值, 并观察其颜色变化。

#### 1.2.5.3 金属离子对花色苷稳定性的影响

参照焦岩<sup>[24]</sup>的方法稍作修改, 将铁皮石斛花色苷浓缩液稀释15倍, 再吸取铁皮石斛花色苷提取液5 mL于9个比色管中, 分别加入离子浓度为 $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L的Mg<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>溶液容至15 mL。在室内避光处放置7 d后, 测定其 $\lambda_{max}$ 处的吸光度值并观察其颜色变化。

#### 1.2.5.4 食品添加剂对花色苷稳定性的影响

参照李颖畅<sup>[25]</sup>的方法, 将铁皮石斛花色苷浓缩液稀释15倍, 再取10 mL铁皮石斛花色苷提取液, 分别加不同浓度的食品添加剂(抗坏血酸、苯甲酸钠、蔗糖)溶液15 mL, 室内避光处放置15天后测定其 $\lambda_{max}$ 处的吸光度值。

### 1.2.6 抗氧化活性研究方法

#### 1.2.6.1 花色苷对羟基自由基清除能力测定

参照李颖畅<sup>[21]</sup>的方法略作修改, 取不同浓度的铁皮石斛花色苷溶液1 mL, 浓度为9 mmol/L水杨酸溶液1 mL, 9 mmol/L FeSO<sub>4</sub>溶液1 mL, 加入0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液1 mL, 在37℃下水浴30 min, 冷却至室温, 加入蒸馏水稀释至10 mL, 在510 nm波长处测定吸光度值, 以Vc作为对照。

羟基自由基清除率的计算按下式计算。

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

式中: $A_1$  为加入样品的吸光度; $A_2$  为无显色剂时样品的本底值; $A_0$  为不加样品的吸光度。

#### 1.2.6.2 花色苷对 DPPH 自由基清除能力测定

DPPH<sup>·</sup>(二苯代苦味酰基自由基)是一种稳定的有机自由基,能够用来评价抗氧化物质的供氢能力,当 DPPH<sup>·</sup> 中加入的物质含有抗氧化剂时,抗氧化剂能够与孤对电子配对,使其 517 nm 处的最大吸收峰处吸光度减小,故可以根据吸光度值变化来评价铁皮石斛花色苷对 DPPH<sup>·</sup> 的清除能力。

参照朱璐<sup>[12]</sup>的方法略做修改,配制 0.2 mmol/L 的 DPPH<sup>·</sup> 溶液,放于棕色瓶中在低温冷藏保存,在比色管中加入不同浓度的铁皮石斛花色苷溶液和 DPPH<sup>·</sup> 溶液各 5 mL,充分混合后在室温避光下放置 30 min,在 517 处测定溶液的吸光值,以 Vc 作为对照。

DPPH<sup>·</sup> 清除率的计算按下式计算。

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

式中: $A_1$  为加入样品的吸光度; $A_2$  为无显色剂时样品的本底值; $A_0$  为不加样品的吸光度。

#### 1.2.6.3 花色苷对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力测定

由于活性氧能够将 ABTS 氧化为 ABTS<sup>+</sup>,呈现蓝绿色。当加入具有抗氧化能力的样品后,试样会与 ABTS<sup>+</sup> 发生一系列反应从而使蓝绿色褪去。ABTS<sup>+</sup> 在 734 nm 处有最大吸收峰,故可以根据吸光度值的变化来测定对铁皮石斛花色苷的清除能力。

参照文献方法<sup>[26]</sup>稍加修改,储备液:7.4 mmol/L ABTS 溶液和 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液,等体积混合,室温下避光反应 12~16 h。ABTS 工作液:吸取 1 mL 储备液以无水乙醇稀释,使吸光度在 734 nm 波长处达 0.700 ± 0.02。取 0.6 mL 不同浓度样品溶液与 7.4 mL ABTS 工作液混合,在室温下避光放置 6 min,于 734 nm 处测定吸光值。

ABTS<sup>+</sup> 清除率的计算按下式计算。

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

式中: $A_1$  为加入样品的吸光度; $A_2$  为无显色剂时样品的本底值; $A_0$  为不加样品的吸光度。

#### 1.2.7 数据处理

实验操作重复 3 次,采用 SPSS 20.0 软件中的 one-way ANOVA (Duncan test) 对数据进行统计分

析。

## 2 结果与分析

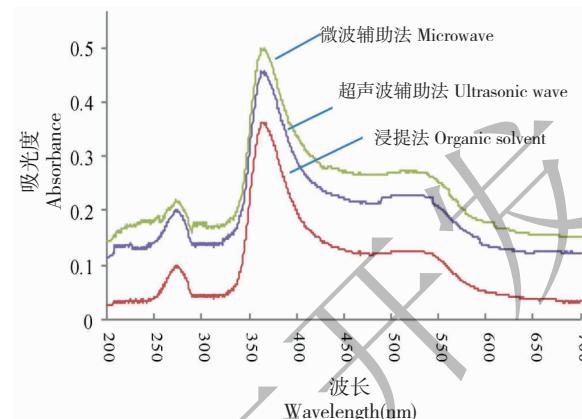


图 1 铁皮石斛花色苷紫外扫描图

Fig. 1 The absorption spectrum of the anthocyanins of dendrobium officinale

### 2.1 铁皮石斛花色苷的光谱特征

花色苷是类黄酮化合物,在 280 nm 和 520 nm 左右的两个波长处有特征吸收峰,而在紫外区 300~350 nm 和 240~285 nm 有干扰花色苷分析的其他类黄酮化合物(如黄烷酮、黄酮、黄烷醇、黄酮醇等)特征吸收峰<sup>[27]</sup>。查阅资料可知,花色苷的最大吸收区通常在 500~550 nm 范围内<sup>[28]</sup>。花色苷最大吸收波长一个在可见光区的 500~540 nm 附近,另一个在紫外 275~350 nm 附近<sup>[29,30]</sup>。由图 1 可知,不同提取方法提取的铁皮石斛色素最大吸收波长分别为 525、532、533 nm,且在 250~300 nm 内有特征吸收,由此判断铁皮石斛色素属于花色苷类色素。

### 2.2 不同提取方法提取量比较

结果如表 1,浸提法、微波辅助法、超声波辅助法三种方法提取铁皮石斛中的花色苷提取量差异显著( $P < 0.05$ ),其中微波辅助法提取量最高。

### 2.3 铁皮石斛花色素理化性质鉴定

#### 2.3.1 溶解性

结果如表 2,该色素不溶于氯仿、石油醚、甲苯、乙酸乙酯等非极性溶剂,而易溶于水、乙酸、乙醇等极性溶剂。可以判断该色素属于水溶性色素,溶解现象符合花色苷的特征。

#### 2.3.2 颜色反应

3 种提取方法的铁皮石斛提取液在不同试剂中的颜色反应均相同,见表 3。铁皮石斛色素遇浓氨

表 1 不同提取方法花色苷的提取量

Table 1 The extraction amount of anthocyanins from different methods

提取方法 Extraction method	浸提法 Organic solvent	微波辅助法 Microwave	超声波辅助法 Ultrasonic wave
花色苷提取量 Anthocyanin extraction quantity mg/100 g (fresh)	7.56 ± 0.06	9.63 ± 0.09	9.12 ± 0.06

表 2 铁皮石斛花色苷的溶解性

Table 2 The solubility of anthocyanins from dendrobium officinale

溶剂 Solvent	水 Water	乙酸 Acetic acid	80% 乙醇 80% Ethanol	丙酮 Acetone	氯仿 Chloroform	石油醚 Mineral ether	甲苯 Toluene	乙酸乙酯 Ethyl acetate
溶解性 Solubility	易溶 Soluble	易溶 Soluble	易溶 Soluble	易溶 Soluble	不溶 Insoluble	不溶 Insoluble	不溶 Insoluble	不溶 Insoluble
色相 Dyestuff	淡红 Carmoi-sine	淡红 Carmoisine	淡红 Carmoisine	淡红 Carmoisine	-	-	-	-

水后,颜色先变蓝后褪色,由于浓氨水呈碱性,能够改变溶液的 pH,解离出铵根离子能与色素分子相结合,通过改变色素的结构从而导致溶液褪色<sup>[31]</sup>。当铁皮石斛色素遇到碳酸钠,由于碳酸钠的碱性会使溶液的 pH 升高,溶液变蓝,但 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 与 Na<sup>+</sup> 均不会与色素分子相结合,不会使溶液的蓝色褪去;当铁皮石

斛色素遇 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 时,溶液颜色褪去,原因是 SO<sub>2</sub> 作用于花色苷类色素的苯并吡喃环的 4 位碳上,生成了一种无色物质,滴加 HCl 后,溶液呈酸性,因而又恢复红色,此现象符合花色苷的特点。当铁皮石斛提取液遇 5% FeCl<sub>3</sub>,溶液先变紫后变棕褐色,这是化合物中含有酚羟基的特征性反应。

表 3 铁皮石斛色苷的颜色反应

Table 3 The color reaction of anthocyanins from dendrobium officinale

试剂 Reagent	NH <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O	饱和 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Saturated Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5% FeCl <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> + HCl
变色情况 Discoloration situation	变蓝后褪色 Fade after becoming blue	变蓝不褪色 Turn blue and not fade	棕褐色 Sepia	褪色后恢复红色 Fade and return to red

不同 pH 环境对 3 种提取方法的铁皮石斛色素的颜色影响均相同,如图 2,铁皮石斛色素在不同 pH 条件下呈现不同颜色,当溶液浓度在 pH1.0-pH6.0 之间时,溶液均呈现红色,并且随着 pH 值的增大,溶液的颜色也逐渐加深,当溶液 pH 值为 3 时

呈深红色,当溶液 pH 值等于 5 时,颜色变为淡紫色。由此可见,铁皮石斛色素的显色反应现象均符合花色苷的特性,再结合紫外可见-光谱特征,可初步判断铁皮石斛色素主要成分为花色苷。



图 2 不同 pH 条件的铁皮石斛花色苷显色情况

Fig. 2 The color of pigment from dendrobium officinale in different pH

## 2.4 不同提取方法花色苷的稳定性比较

### 2.4.1 温度对花色苷稳定性影响

由图3可知,3种方法提取的铁皮石斛花色苷稳定性受温度影响较大,但在25~45℃的条件下,花色苷稳定性均较好(较对照组 $P>0.05$ )。随着温度升高和加热时间的增长,溶液的颜色加深,吸光度也随之增大,这是由于花色苷在加热条件下通过分子自聚作用使颜色增强<sup>[32]</sup>。微波法提取的铁皮石斛花色苷较浸提法和超声法提取的铁皮石斛花色苷稳定。因此,在考察3种方法提取的铁皮石斛花色苷抗氧化活性时,3种方法均在40℃下提取。

### 2.4.2 光照对花色苷稳定性影响

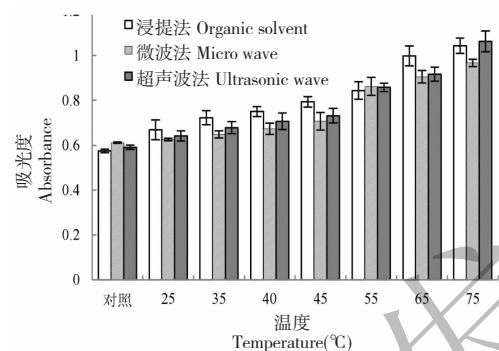
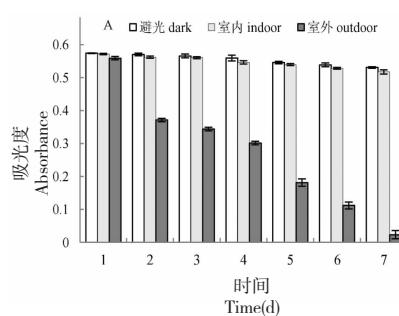


图3 温度对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

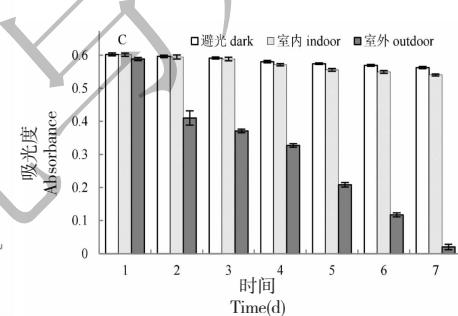
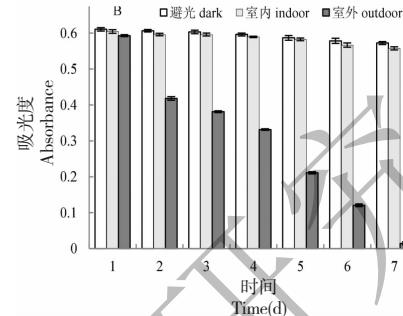
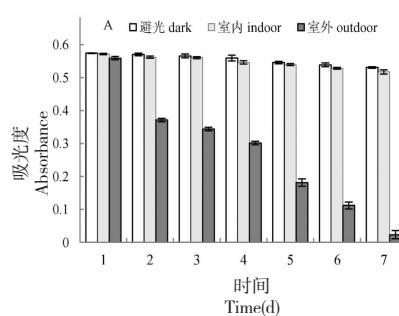


图4 光照对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 4 The effect of light on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

注:A. 浸提法铁皮石斛花色苷提取液;B. 微波法铁皮石斛花色苷提取液,下同。

Note: A. Extraction of anthocyanin from *Dendrobium candidum*; B. Microwave extraction of anthocyanin from *Dendrobium candidum*; C. Ultrasonic extraction of anthocyanin from *Dendrobium candidum*, the same below.

如图4所示,在避光和室内自然光下保存,稳定性均较好,但在室外,受太阳光照射后,3种提取方法的花色苷吸光度降低幅度要比室内避光和室内自然光条件下,稳定性较差,这是因为光照能加快花色苷的分解<sup>[33]</sup>。贮存第7天,室内避光、室内自然光

和室外自然光花色苷的保留率分别为:88.51%、85.24%、3.67%(浸提法),89.62%,88.1%,2.46%(微波法),89.36%,85.83%,3.42%(超声波法)。所以保存花色苷溶液时,应避光、低温于室内保藏。

### 2.4.3 金属离子对花色苷稳定性的影响

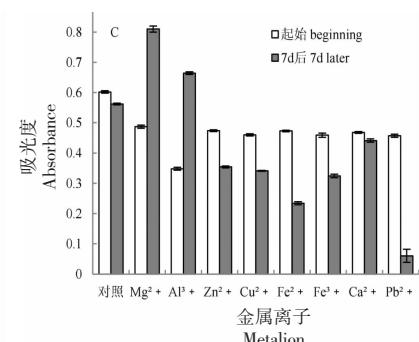
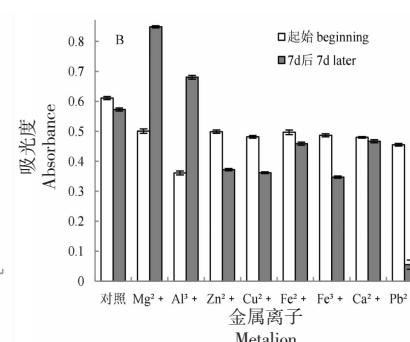
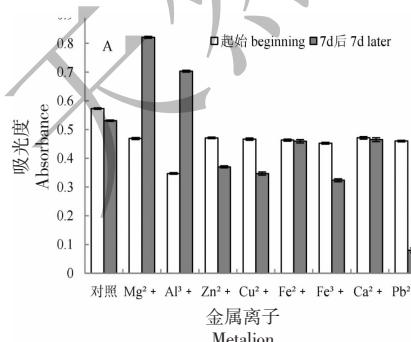


图5 金属离子对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 5 The effect of metallic ions on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

如图 5 所示,  $\text{Ca}^{2+}$  对铁皮石斛花色苷的稳定性影响较小;  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  对铁皮石斛花色苷有增色作用, 可能是金属离子与花色苷结合, 形成高度着色且稳定的金属络合物<sup>[34]</sup>;  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  对铁皮石斛花色苷的影响最大, 其中  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  能使花色苷明显褪色, 并有白色沉淀生产, 因而在生产应用中应尽量避免与  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  等金属离子的接触。

#### 2.4.4 食品添加剂对花色苷稳定性的影响

从图 6 可以看出, 3 种提取方法得到的铁皮石斛花色苷的吸光度均随着抗坏血酸浓度增加而降低, 抗坏血酸本身并不会使花色苷降解, 而是抗坏血酸的降解产物脱氢抗坏血酸、糠醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  引起了花色苷的降解<sup>[35]</sup>。花色苷的 C-2 位受到  $\text{H}_2\text{O}_2$  的亲核攻击开环生成查尔酮, 进一步降解为无色的酯类和香豆素类衍生物<sup>[36]</sup>。由此可见其对抗坏血酸比较敏感, 在使用时尽量避免与还原剂接触。

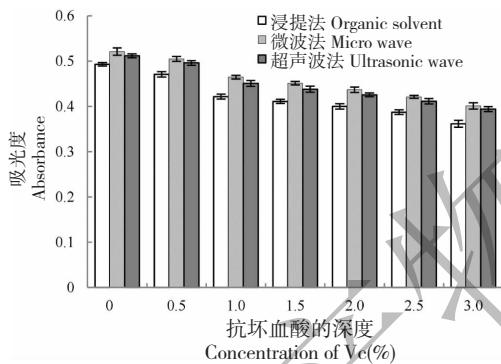


图 6 抗坏血酸对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 6 The effect of ascorbic acid on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

#### 2.4.4.2 苯甲酸钠对花色苷稳定性的影响

苯甲酸钠是食品防腐剂, 经常会添加到食品和饮料中。由图 7 可以看出, 随苯甲酸钠浓度增加, 3 种提取方法得到的铁皮石斛花色苷的吸光度增大, 说明苯甲酸钠对铁皮石斛花色苷有稳定作用。因此可以使用苯钾酸钠增加花色苷溶液的稳定性, 且苯甲酸钠浓度越高效果越明显。

#### 2.4.4.3 蔗糖对花色苷稳定性的影响

在一些添加花色苷类色素食品中, 经常也会添加蔗糖, 所以研究蔗糖对树莓花色苷稳定性的影响具有重要意义。由图 8 可知, 在相同的贮藏时间内, 蔗糖处理组花色苷吸光度高于对照组, 随着蔗糖浓

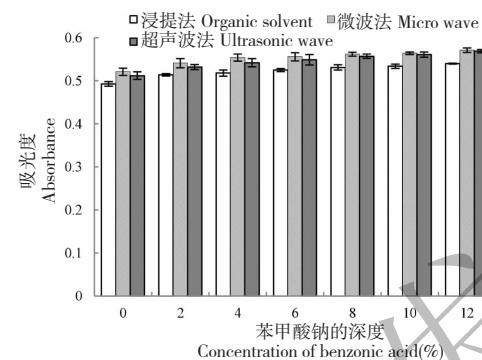


图 7 苯甲酸钠对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 7 The effect of sodium benzoate on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

度的增加, 3 种提取方法得到的铁皮石斛花色苷的吸光度均降低, 这是由于在低浓度的糖存在下, 糖及其降解产物均能引起花色苷的降解, 特别是糖的典型降解产物糠醛对花色苷的降解能力较强<sup>[23]</sup>。

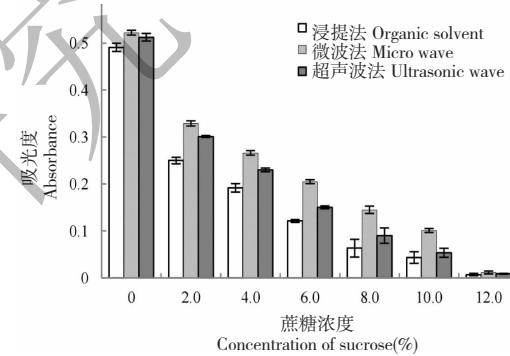


图 8 蔗糖对铁皮石斛花色苷稳定性的影响

Fig. 8 The effect of sucrose on the stability of anthocyanins from *dendrobium officinale*

#### 2.5 不同提取方法花色苷的抗氧化活性比较

##### 2.5.1 不同提取方法花色苷对 OH 自由基清除能力比较

由图 9 可知, 铁皮石斛花色苷浓度在 0.329 ~ 9.27 mg/L 范围内, 随着花色苷浓度增大, 对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力均相应增大。当浸提法、微波辅助法、超声波辅助法提取的花色苷浓度分别小于 1.40、1.61、1.44 mg/L 时, 对  $\cdot\text{OH}$  的清除能力略高于  $V_c$ , 而当浓度增大时, 清除能力低于  $V_c$ 。当 3 种花色苷提取液浓度增大到 9.27 mg/L 时, 清除能力均接近  $V_c$ , 可分别达到 90.13%、92.06%、91.09%。在 0.29 ~ 2.318 mg/L 时, 微波法提取物和浸提法提取物对  $\cdot\text{OH}$  清除能力差异显著 ( $P < 0.05$ ), 超声波法提取物和浸提法提取物对  $\cdot\text{OH}$  清除能力差异不

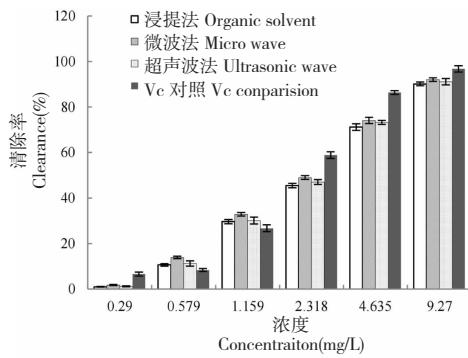


图9 铁皮石斛花色苷对羟基自由基清除能力

Fig. 9 The capability of anthocyanins from *dendrobium officinale* on scavenging hydroxyl radicals

显著( $P > 0.05$ )。通过 SPSS 22.0 软件计算得到 3 种铁皮石斛花色苷及 V<sub>c</sub> 对 ·OH 的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值分别为 3.349、3.155、3.338、2.507 mg/L。清除 ·OH 的能力大小为: V<sub>c</sub> > 微波辅助提取液 > 超声波辅助提取液 > 浸提法铁皮石斛花色苷提取液。

### 2.5.2 不同提取方法花色苷对 DPPH 自由基清除能力比较

由图 10 可以看出,当浸提法、微波辅助法、超声波辅助法提取的花色苷浓度分别大于 0.121、0.087、0.106 mg/L 时,铁皮石斛花色苷对 DPPH<sup>·</sup> 的清除能力均高于 V<sub>c</sub>。当 3 种提取液浓度增大到 1.159 mg/L 时,对 DPPH<sup>·</sup> 的清除率可分别达到 92.78%、94.21%、93.07%。在质量浓度小于 0.145 mg/L 时,3 种提取物对 DPPH<sup>·</sup> 的清除能力的差异显著( $P < 0.05$ ),在 0.145 ~ 1.159 mg/L 时,3 种提取物对 DPPH<sup>·</sup> 的清除能力的差异不显著( $P > 0.05$ )。通过 SPSS 22.0 软件计算得到 3 种铁皮石斛花色苷及 V<sub>c</sub> 对 DPPH<sup>·</sup> 的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>

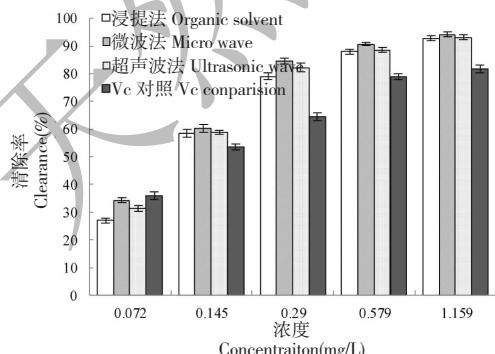


图10 铁皮石斛花色苷对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 10 The capability of anthocyanins from *dendrobium officinale* on scavenging DPPH radicals

值分别为 0.119、0.071、0.088、0.116 mg/L。实验结果表明,铁皮石斛花色苷是一种可开发的天然色素,其清除 DPPH<sup>·</sup> 的能力很强,3 种方法提取的花色苷溶液,当质量浓度在 0.29 mg/L 时,DPPH<sup>·</sup> 清除率可达到 80% 以上。

### 2.5.3 不同提取方法花色苷对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力比较

由图 11 可以看出,3 种方法提取的铁皮石斛花色苷对 ABTS<sup>+</sup> 的清除能力与 V<sub>c</sub> 相比较弱,但当浓度达到 1.159 mg/L 时,清除能力均接近 V<sub>c</sub>,可分别达到 91.34%、93.31%、92.17%。在 0.072 ~ 0.145 mg/L 时,微波法提取物、超声波法提取物与浸提法提取物对 ·ABTS<sup>+</sup> 的清除能力差异显著( $P < 0.05$ ),在 0.29 ~ 0.579 mg/L 时,微波法提取物、超声波法提取物与浸提法提取物对 ·ABTS<sup>+</sup> 的清除能力差异极显著( $P < 0.01$ ),在 1.159 mg/L 时,3 种提取物对 ·ABTS<sup>+</sup> 的清除能力的差异不显著( $P > 0.05$ )。通过 SPSS 22.0 软件计算得到 3 种铁皮石斛花色苷及 V<sub>c</sub> 对 ABTS<sup>+</sup> 的半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值分别为:0.571、0.455、0.482、0.075 mg/L,其清除能力大小为:V<sub>c</sub> > 微波辅助提取液 > 超声波辅助提取液 > 浸提法铁皮石斛花色苷提取液。PH · 清除率可到达到 80% 以上。

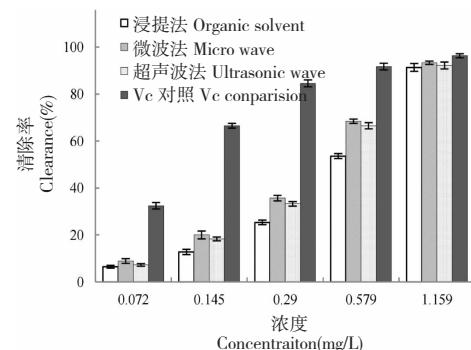
图11 铁皮石斛花色苷对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力

Fig. 11 The capability of anthocyanins from *dendrobium officinale* on scavenging ABTS radicals

## 3 结论

以本课题组得到的浸提法、微波法和超声波法的最佳工艺参数结合稳定性试验结果,对提取条件稍作修改来提取铁皮石斛花色苷,并通过铁皮石斛花色苷粗提液的紫外可见光谱特征、溶解性实验和颜色反应,初步判断,铁皮石斛色素属于类黄酮的花

## 色苷色素。

3种花色苷粗提物的稳定性实验表明,温度的改变对三种铁皮石斛花色苷影响较大,随着温度升高,颜色逐渐加深。在阳光照射下,三种花色苷极不稳定,但在室内自然光和避光条件下稳定性较好。 $\text{Ca}^{2+}$ 对铁皮石斛花色苷的稳定性影响较小, $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 对铁皮石斛花色苷有增色作用, $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ 能使花色苷明显褪色。抗坏血酸和蔗糖使花色苷明显褪色,而苯甲酸钠对花色苷有稳定作用。

3种花色苷粗提物对 $\text{OH}^-$ 、DPPH·和ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力表明,铁皮石斛花色苷具有一定的抗氧化能力,且微波法、超声波法和浸提法提取的铁皮石斛花色苷抗氧化能力依次降低。采用微波法有助于保持提取的铁皮石斛花色苷的抗氧化活性,微波法、超声波法、浸提法提取的铁皮石斛花色苷对 $\text{OH}^-$ 、DPPH·和ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力的 $\text{IC}_{50}$ 值分别为3.155、0.071、0.455、3.338、0.088、0.482、3.349、0.119、0.571 mg/L。由上述结论可知,对铁皮石斛花色苷的提取应采用微波法,具有较好的抗氧化活性。

3种粗提物的抗氧化活性有显著差异,这部分工作我们课题组目前正在纯化工艺条件探索,会在后期完成不同提取方法得到的铁皮石斛花色苷粗提物的成分鉴定。

3种提取方法提取得到的铁皮石斛花色苷在相同浓度下抗氧化活性有显著差异,但采用的铁皮石斛为同一批原料,说明是提取方法造成了粗提物成分差异,这可能是由于微波辐射,对铁皮石斛花色苷的结构影响较小,因而保持了抗氧化活性,在后期研究中还需要对铁皮石斛花色苷进行纯化,分析不同提取方法的花色苷提取液主要成分,并从生物体内氧化代谢的角度来进一步探究铁皮石斛花色苷的抗氧化作用。

## 参考文献

- Ji ZH(吉占和). Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing: Science Publishing House, 1999.
- Bao XS(包雪声). Dendrobium officinalis(中国药用石斛)[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2001.
- Bao XS(包雪声), Shun QS(顺庆生), Chen LZ(陈立钻). Color atlas of *dendrobium officinale* in China(中国药用石斛彩色图谱)[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 2001: 56-60.
- Li GF(李桂峰), Li JJ(李进进), Xu JY(许继勇), et al. Summary of *dendrobium officinale* research[J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2010, 33: 150-153.
- Li H(李昊), Lyu DH(吕鼎豪). Advance in studies on chemical constituents in *dendrobium officinale*[J]. *Chin J Spectr Lab*(光谱实验室), 2013, 30: 1845-1849.
- Li XJ(李晓娇), Yan AF(晏爱芬), Yang LH(杨丽华), et al. Extraction and anti-microbial activities of anthocyanins from Longling *dendrobium candidum*[J]. *J Agri Sci Technol*(中国农业科技导报), 2017, 19: 119-127.
- Sun JX(孙建霞), Zhang Y(张燕), Sun ZJ(孙志健), et al. Summary of resource distribution and qualitative and quantitative analysis methods of anthocyanin[J]. *Food Sci*(食品科学), 2009, 5: 263-268.
- Tong X(童鑫), Zhang MW(张名位), Chi JW(池建伟), et al. The main biological activity and preparation of anthocyanins[J]. *Food Technol*(食品科技), 2016, 41: 233-238.
- Duan YB(段雅彬). Protective effect of *lycium ruthenicum murr.* against radiation injury in mice and mechanism study[D]. Xining: Qinghai University(青海大学), 2016.
- Fu HZ(付辉战), Hu TG(胡腾根), Zou XY(邹宇晓), et al. Overview on functional characteristics and extraction methods of anthocyanins[J]. *Farm Prod Proc*(农产品加工), 2017, 8: 48-54.
- Fan XY(樊馨怡). Progress in extraction and purification of anthocyanins[J]. *Agri Technol*(农业与技术), 2016, 26(24): 31-33.
- Zhu L(朱璐), Dong F(董福), Feng XQ(冯叙桥), et al. Comparative antioxidant activities of anthocyanins extracted from purple sweet potato by organic solvent, ultrasonic-assisted and microwave-assisted extraction[J]. *Food Sci*(食品科学), 2015, 36(19): 83-88.
- Li JX(李金星), Hu HZ(胡志和), Ma LZ(马立志), et al. Study on conditions of anthocyanins from blueberry pomace by ultrasonic-assisted extraction[J]. *Food Sci Technol*(食品工业科技), 2013, 34: 255-259.
- Elisia I, Hu CHUN, Popovich DG, et al. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101: 1052-1058.
- Sellappan S, Casimir CA, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries[J]. *Agricu Food Chem*, 2002, 50: 2432-2438.
- Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries[J]. *Food Chem*, 2007, 102: 777-783.
- Fuleki T, Francis FJ. Quantitative methods for anthocyanins.

1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries [J]. *J Food Sci*, 1968, 33(1): 72-77.
- 18 Tang L(唐琳), Li ZJ(李子江), Zhao L(赵磊), et al. Comparison of two pH methods for determining anthocyanins from flower petals of rose [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2009, 30: 310-313.
- 19 Xiao JX(肖军霞), Huang GQ(黄国清), Geng X(耿欣). Qualitative determination of red raspberry pigment and its extraction [J]. *Food Res Dev(食品研究与开发)* 2012, 33: 112-115.
- 20 Yang XN(杨晓娜), Xu L(徐玲), Zhao CL(赵昶灵), et al. Extraction and stability of anthocyanins from dendrobium devonianum grown in Longling [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2015, 36(9): 49-54.
- 21 Li YC(李颖畅), Meng XJ(孟宪军). Studies on the antioxidant activity of anthocyanins from blueberry [J]. *Food Ferment Ind(食品与发酵工业)*, 2007, 33(9): 61-64.
- 22 Liu JH(刘敬华), Wang ZY(王振宇). Study on antioxidative activity and stability on the refined and high purity of anthocyanins of *Lonicera edulis* [J]. *Food Sci Technol(食品工业科技)*, 2013, 34(19): 87-92.
- 23 Zhang H(张弘), Zheng H(郑华), Chen J(陈军), et al. Study on stability of cochineal extract [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2008, 29(11): 59-64.
- 24 Jiao Y(焦岩), Chang Y(常影). Study on stability and antioxidant activity of anthocyanins from purple Onion skin [J]. *Food Ind(食品工业)*, 2013, 34(8): 27-29.
- 25 Li YC(李颖畅), Ma C(马驰), Lyu YF(吕艳芳), et al. Study on the stability of anthocyanins of raspberry [J]. *Food Sci Technol(食品工业科技)*, 2014, 35: 205-208.
- 26 MJTJ A, Dallinga JS, Voss HP, et al. A new approach to access the total antioxidant capacity using the TEAC assay [J]. *Food Chemistry*, 2004, 88: 567-570.
- 27 Lv Y(卢钰), Dong XY(董现义), Du JP(杜景平), et al. Research progress on anthocyanins [J]. *J Shandong Agri Univ(山东农业大学学报)*, 2004, 35: 315-320.
- 28 Harborne JB. The chromatographic identification of anthocyanins pigments [J]. *J Chromatogr*, 1958, 1: 473-488.
- 29 Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins [J]. *Biochemistry J*, 1958, 70(1): 22-28.
- 30 Sun ZW(孙中武). *Phytochemistry* [M]. Haerbing: Northeast Forestry University press, 2001: 96-98.
- 31 Goto T, Kondo T. Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation [J]. *Angewandte Chem International Edition*, 1991, 30(1): 17-33.
- 32 Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins [D]. Helsinki: University of Helsinki, 2005.
- 33 Yu XN(于晓南), Zhang QX(张启翔). Anthocyanin in ornamental plant and color express [J]. *Sci Sil Sin(林业科学)*, 2002, 38: 147-153.
- 34 Sun JX(孙建霞), Zhang Y(张燕), Hu XS(胡小松), et al. Structural stability and degradation mechanisms of anthocyanins [J]. *Sci Agri Sin(中国农业科学)*, 2009, 42: 996-1008.
- 35 Zhao ZD(赵子丹), Ge Q(葛谦), Niu Y(牛艳). Research progress on stability of anthocyanins [J]. *Ningxia J Agri Fores Sci & Tech(宁夏农林科技)*, 2016, 57(2): 50-53.
- 36 Cao SQ(曹少谦). Studies on structure of anthocyanins from blood orange and related degradation mechanism during processing [D]. Wuhan: Central China Agricultural University (华中农业大学), 2009.

(上接第 18 页)

- 19 Wang JS(王健松), Li YB(李远彬), Wang LL(王羚郦), et al. GC-MS analysis on supercritical CO<sub>2</sub> fluid and subcritical fluid extractions of agarwood essential oils [J]. *Lishizhen Medi Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2017, 28: 1082-1085.
- 20 Li X(李响), Wang WF(王卫飞), Zhou R(周瑢), et al. Supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction of the essential oil from Chinese eaglewood [J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2014, 35: 280-283.
- 21 Deng HM(邓红梅), Zhou RJ(周如金), Tong HQ(童汉清). Study on extraction technique of the essential oil from Chinese eaglewood by Supercritical CO<sub>2</sub> extraction [J]. *Lishizhen Medi Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2009, 20: 577-579.

Chinese eaglewood [J]. *Sci Technol Food Ind(食品工业科技)*, 2014, 35: 280-283.

- 21 Deng HM(邓红梅), Zhou RJ(周如金), Tong HQ(童汉清). Study on extraction technique of the essential oil from Chinese eaglewood by Supercritical CO<sub>2</sub> extraction [J]. *Lishizhen Medi Mater Med Res(时珍国医国药)*, 2009, 20: 577-579.