

黑枸杞中抗氧化物质的提取及花青素含量分析

崔逸¹, 蒋彩云^{1*}, 张翔², 何海艳¹, 陶晓琳¹, 王瑞¹

(1. 江苏经贸职业技术学院 工程技术系, 江苏省食品安全工程技术研发中心, 江苏 南京 210007; 2. 南京视果黑枸杞开发有限公司, 江苏 南京 211135)

摘要: 通过单因素试验和正交试验, 确定黑枸杞中抗氧化物质的最佳提取工艺条件。结果表明影响提取效果的主要因素为: 提取时间 < 提取温度 < 提取剂 < 料液比; 最佳提取工艺条件为: 超声提取、料液比 1:25(g/mL)、温度 50℃、溶剂 60%乙醇、时间 25 min。以维生素 C 作为标准物质, 对黑枸杞的总抗氧化性进行评价。采用 pH 示差法测定黑枸杞中花青素含量。

关键词: 黑枸杞; 花青素; 抗氧化; 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH); pH示差法

Extraction and Content Analysis of Anthocyanin from *Lycium Ruthenicum* Murr

CUI Yi¹, JIANG Cai-yun^{1*}, ZHANG Xiang², HE Hai-yan¹, TAO Xiao-lin¹, WANG Rui¹

(1. Department of Engineering and Technology, Jiangsu Vocational Institute of Commerce, Jiangsu Engineering and Research Center of Food Safety, Nanjing 210007, Jiangsu, China; 2. Aishiguo Development Company, Nanjing 211135, Jiangsu, China)

Abstract: The optimum extract conditions of the main antioxidant in black wolfberry were studied through single factor test and orthogonal test. The results showed that the primary and secondary factors of extraction effect were as follows: extraction time < extraction temperature < concentration of solvent < the ratio for material and liquid.

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20161479); 江苏省高校自然科学研究项目(16KJB150043); 江苏省青蓝工程; 江苏省大学生创新训练计划(201612407015Y); 江苏经贸职业技术学院重大课题(JSJM15005)

作者简介: 崔逸(1989—), 男(汉), 助教, 硕士研究生; 研究方向: 纳米复合材料在食品及环境分析方面的应用研究。

* 通信作者: 蒋彩云, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 纳米复合材料在食品及环境分析方面的应用研究。

参考文献:

- [1] 郁迪, 丁冬各, 王斌. 绿鳍马面鲈(*Navodon septentrionalis*) 鱼皮胶原蛋白的分离纯化及理化性质研究[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(5): 1055-1061
- [2] 郑海旭, 李八方, 侯虎, 等. 白鲢鱼皮明胶提取过程中脱脂工艺的优化[J]. 食品科技, 2016, 41(1): 229-233
- [3] Subhan F, Ikram M, Shehzad A, et al. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(8): 4703-4707
- [4] 王国强, 何力, 贾鲁君. 长鳍金枪鱼鱼皮胶原蛋白肽制备工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 105-110
- [5] 黄雯, 袁春红, 徐萌, 等. 斑点叉尾鮰和蓝点马鲛鱼皮中胶原蛋白的提取与性质研究[J]. 海洋渔业, 2016, 38(2): 198-204
- [6] 陈良, 刘辉, 湛素华, 等. 鱼皮胶原提取的工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 281-284
- [7] Alfaro A D, Fonseca G G, Prentice-Hernandez C. Enhancement of Functional Properties of Wami Tilapia (*Oreochromis urolepis hornorum*) Skin Gelatin at Different pH Values [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(8): 2118-2127
- [8] Bae I, Osatomi K, Yoshida A, et al. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes[J]. Food Chem, 2008, 108(1): 49-54
- [9] 楚水晶, 农绍庄, 柳春山, 等. 酶法提取马面鱼鱼皮胶原蛋白的工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 234-137, 241

收稿日期: 2016-11-15

The best extract conditions with ultrasonic extraction were identified that the ratio of solvent to black wolfberry, temperature, extract solvent, and time were 1:25 (g/mL), 50 °C, 60 % ethanol and 25 min respectively. The antioxidant activity in black wolfberry was evaluated using vitamin C as the standard substance. In addition, the content of anthocyanin in black wolfberry was determined by pH differential method.

Key words: black wolfberry; anthocyanin; antioxidant; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); pH differential method

黑枸杞是枸杞属科^[1],多年生灌木,具棘刺,浆果呈球形,皮薄,成熟后果皮呈紫黑色,紫色的果皮含有丰富的花青素,能有效清除体内的自由基,由于其长寿的作用而受到人们的追捧,制药和保健价值明显高于红枸杞^[2]。花青素,是一类水溶性的类黄酮化合物^[3],在自然界中普遍存在,超过 300 种。黑枸杞中所含的花青素由 16 种生物类黄酮组成,不仅是当前大多数植物花青素中功能最优良的,而且比多数植物花青素有更优良的生理活性。花青素从根本上讲是一类强有力的抗氧化剂,它能够清除体内某种自由基对人体的作用^[4-6]。

以黑枸杞为原料,具有抗氧化功能的维生素 C 作为标准参照,对黑枸杞中抗氧化活性物质进行提取,并对黑枸杞中的花青素含量进行测定。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

黑枸杞:南京视果黑枸杞开发有限公司;1,3-丁二醇、丙酮、醋酸钠(分析纯):上海凌峰化学试剂有限公司;1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、无水乙醇、维生素 C(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;实验用水均为去离子水。

1.2 试验仪器

超声波清洗器(KQ-500E):昆山市超声仪器有限公司;电子分析天平(FA2104N):上海菁华科技仪器有限公司;万能高速粉碎机(FW100)、电热恒温干燥箱(DGF 30/23-mA):天津市泰斯特仪器有限公司;循环水式多用真空泵(SHB-III):郑州长城科工贸有限公司;可见分光光度计(UV-6300):上海美谱达仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 配制 DPPH·标准溶液及清除率的计算

以无水乙醇作为溶剂,配制浓度为 0.4 mmol/L 的 DPPH·标准溶液,置于暗处备用。

提取液经稀释 100 倍后,按以下方法操作:

反应溶液($A_{\text{反应液}}$):提取液 2 mL 和 DPPH·标准溶液 2 mL 混合;空样溶液($A_{\text{空样液}}$):提取溶剂 2 mL 和

DPPH·标准溶液 2 mL 混合;空白溶液($A_{\text{空白}}$):2 mL 无水乙醇和 2 mL 提取液混合。将上述溶液置于避光处反应 30 min 后,于 517 nm 波长处测定吸光度值。按(1)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = \frac{1 - (A_{\text{反应液}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{空样液}}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 维生素 C 标准溶液的配制及标准曲线的制作

以纯净水作为溶剂,配制浓度为 0.10 mg/mL 的维生素 C 标准溶液。采用逐级稀释的方法,得到浓度梯度分别为 0.008、0.010、0.012、0.014、0.016、0.018、0.020 mg/mL 的维生素 C 标准溶液。

参照 1.3.1 中的操作方法,将提取液换成不同浓度的维生素 C 标准溶液,于 517 nm 波长下测定相应的吸光度值,得出对应的 DPPH·清除率,制作标准曲线。

1.3.3 总抗氧化能力的测定

根据得到的最佳工艺条件处理黑枸杞粉,取提取液 1 mL 稀释到 100 mL 容量瓶中,测出其 DPPH·溶液的清除率,再根据标准曲线计算出每克黑枸杞样品的维生素 C 当量。

1.3.4 pH 示差法测定黑枸杞中花青素含量

取黑枸杞提取液 28.8 mL,稀释至 1 000 mL 后,准确量取 20 mL(两份),分别用 pH = 1、pH = 4.5 的缓冲溶液定容至 100 mL,在波长 517 nm 处测定其吸光值,平行测定 6 次。根据 T Fuleki 的研究^[7]结合比尔定律公式 $A = ebc$ (A :吸光度, e :摩尔吸收系数, c :吸光物质的浓度, b :吸收层厚度),得到黑枸杞花青素含量的计算公式如下:

$$X = \Delta TVFM_1 / (e \times M_2) \quad (2)$$

式中: X 为花青素含量; ΔT 为提取液在 pH = 1 和 pH = 4.5 缓冲溶液中的吸光度之差; F 为稀释度; V 为稀释的体积, mL; M_1 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量值为 449.2; M_2 为样品的质量, g; e 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的消光系数值为 26 900^[8]。

2 结果与分析

DPPH·是一种稳定的脂性自由基,其乙醇溶液呈

紫色,在 517 nm 处有明显吸收峰。在有自由基清除剂存在时,会导致吸收峰减弱,从而使其褪色^[9-10]。

通过可见分光光度计法,检测 DPPH·标准溶液与提取液反应后的吸光度值的变化,测定样品清除自由基的能力。建立提取液清除率的评价体系,以该标准体系为判断依据,进行单因素试验和正交试验,确定最佳提取工艺。

2.1 单因素试验

2.1.1 提取溶剂对黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的影响

称取 1.0 g 黑枸杞粉末于 25 mL 溶剂中,溶剂分别采用纯水、无水乙醇、70%乙醇、1,3-丁二醇、丙酮,在室温下静置 30 min,抽滤得到样品的提取液。提取剂对提取效果影响见图 1。

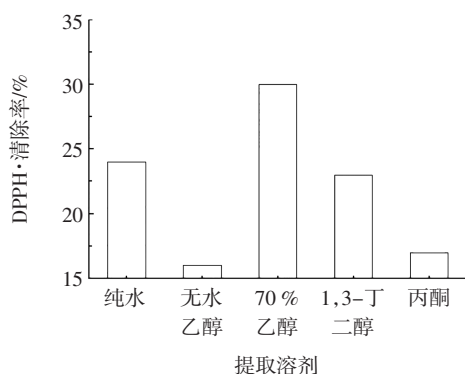


图 1 提取剂对提取效果影响

Fig.1 Effects of different solvents on extraction effect

由图 1 可知,用 70%乙醇提取时,得到的提取物抗氧化能力最强。

在考虑到节约的前提下,又分别采用 50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、无水乙醇作为溶剂,在室温下浸提 30 min,抽滤得到样品的提取液。乙醇浓度对提取效果影响见图 2。

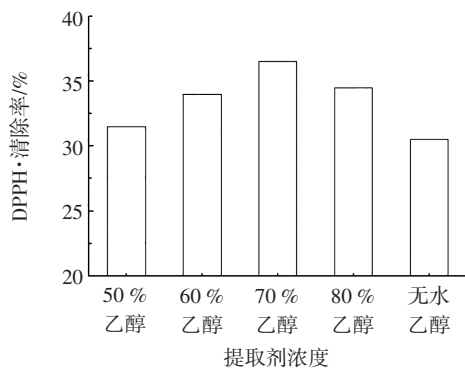


图 2 乙醇浓度对提取效果的影响

Fig.2 Effects of the ethanol concentration on extraction effect

由图 2 可知,70%乙醇提取效果最佳。

2.1.2 提取方式对黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的影响

称取 1.0 g 黑枸杞粉末于 25 mL 70%乙醇中,提取温度为 40 ℃,提取方式分别为:超声、振荡、水浴、搅拌、静置,提取时间为 30 min,抽滤得到样品的提取液。提取方式对提取效果影响见图 3。

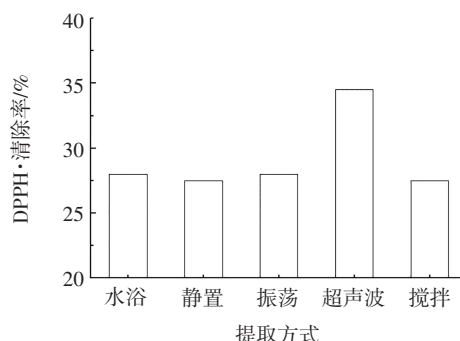


图 3 提取方式对提取效果的影响

Fig.3 Effects of different methods on extraction effect

由图 3 可知,超声波辅助方式(超声频率 40 kHz)提取效果最好。这是由于超声波辅助是利用超声波的热效应、空化作用、机械作用使得胞外溶剂更容易进入细胞,加速细胞壁的破碎,从而促进胞内物质溶出,提高提取效率。

2.1.3 提取时间对黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的影响

称取 1.0 g 黑枸杞粉末于 25 mL 70%乙醇中,提取温度为 40 ℃,超声波辅助提取,提取时间分别为:15、25、35、45、55 min,抽滤得到样品的提取液。提取时间对提取效果影响见图 4。

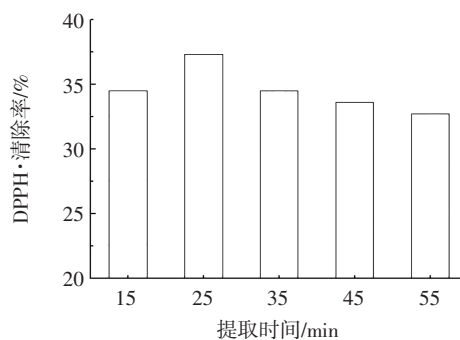


图 4 提取时间对提取效果的影响

Fig.4 Effects of extraction time on extraction effect

由图 4 可知,随着时间的延长,提取效果呈现先升高后降低的趋势,在 25 min 时提取效果最好。这是由于随着时间的延长,抗氧化物浸出率增加,但抗氧化物被氧化的程度也相应增加。

2.1.4 提取温度对黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的影响

称取 1.0 g 黑枸杞粉末于 25 mL 70%乙醇中,依次

将提取温度设定为 20、30、40、50、60 ℃, 提取时间为 25 min。提取温度对提取效果影响见图 5。

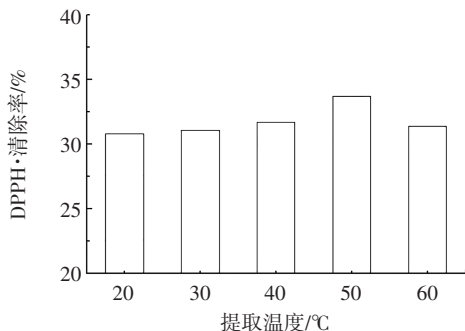


图 5 提取温度对提取效果的影响

Fig.5 Effects of extraction temperature on extraction effect

由图 5 可知,当温度低于 50 ℃时,提取效果随着温度的升高而相应增加,但当温度超过 50 ℃后,提取效果呈现降低的趋势。这是由于在低温条件下,抗氧化物质的溶解度小,不能被完全提取,随着温度的升高,提取效果逐渐增强,但由于抗氧化物质本身容易被氧化,温度继续升高,会增加抗氧化物质的氧化程度,从而影响提取效果,因此,最佳提取温度为 50 ℃。

2.1.5 料液比(g/mL)对黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的影响

称取 1.0 g 黑枸杞粉末于 70 %乙醇中,提取温度为 50 ℃,提取时间为 25 min,依次将液料比设定为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30(g/mL)进行提取。料液比对提取效果影响见图 6。

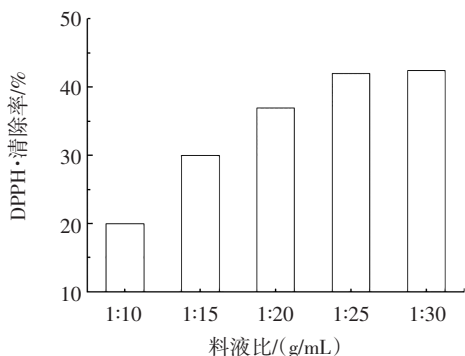


图 6 料液比与提取效果的关系图

Fig.6 Effects of the ratio for material and liquid on extraction effect

由如图 6 可知,提取效果随着乙醇用量的增加而增加,当料液比达 1:25(g/mL)后,乙醇用量继续增大,但提取效果增加不明显。因此,料液比为 1:25(g/mL)时,提取效果最佳。

2.2 正交试验

根据单因素的试验结果,选取影响黑枸杞中抗氧化活性成分提取效果的主要因素水平设计正交试验

(见表 1)。对 $L_9(3^4)$ 正交试验结果进行极差分析(见表 2)和方差分析(见表 3)。

表 1 正交试验因素水平设计

Table 1 The orthogonal design method

水平	A 提取剂	B 提取温度/℃	C 提取时间/min	D 料液比/(g/mL)
1	60%乙醇	45	20	1:23
2	70%乙醇	50	25	1:25
3	80%乙醇	55	30	1:27

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号	A	B	C	D	清除率/%
1	1	1	1	1	29
2	1	2	2	2	34
3	1	3	3	3	32
4	2	1	2	3	27
5	2	2	3	1	42
6	2	3	1	2	39
7	3	1	3	2	40
8	3	2	1	3	33
9	3	3	2	1	41
K_1	1.62	1.43	1.24	1.18	
K_2	1.57	1.46	1.31	1.45	
K_3	1.39	1.27	1.17	1.25	
k_1	0.54	0.48	0.41	0.39	
k_2	0.52	0.49	0.44	0.48	
k_3	0.46	0.42	0.39	0.42	
极差 R	0.08	0.07	0.05	0.09	
因素主次	D>A>B>C				
优选方案	$D_2A_1B_2C_2$				

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值
A	1.22	2	0.11	0.81
B	0.81	2	0.41	0.35
C	0.42	2	0.21	0.28
D	0.56	2	0.28	0.37
误差	0.002 6	2	0.001 3	

由表 2 可知,四因素对提取效果的影响顺序为:提取时间<提取温度<提取剂<料液比。由表 3 可知,所选取的 4 个因素对黑枸杞提取工艺的影响都较为明显。最佳提取工艺条件是:料液比为 1:25(g/mL),提取剂为 60 %乙醇,提取温度为 50 ℃,提取时间为 25 min。

根据正交试验中的优选方案,称取 3 份 1.0 g 黑枸杞样品,分别加入 25 mL 的 60 %乙醇,50 ℃下超声波辅助提取 25 min 得到提取液,测定清除率分别为:

46.72%、43.01%、48.25%，即平均清除率为45.99%，验证了正交试验结果是可靠的。

2.3 黑枸杞总抗氧化能力的测定

以维生素C浓度为横坐标,以DPPH·清除率为纵坐标,建立标准曲线,见图7所示。

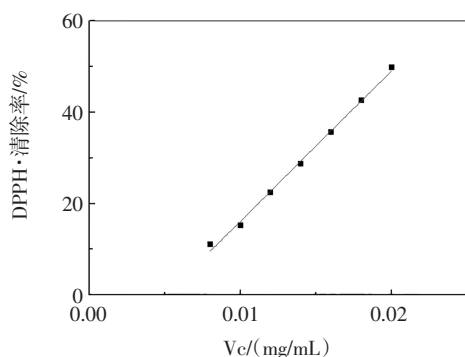


图7 维生素C溶液浓度与DPPH·清除率的标准曲线

Fig.7 Standard curve of vitamin C solution with DPPH· scavenging activity

由图7可知,维生素C浓度和DPPH·清除率之间符合线性关系,其线性方程为: $y = 32.911x - 0.1671$ 。

采用最佳提取工艺条件对黑枸杞进行提取,测定提取液的清除率,通过标准曲线计算出每克黑枸杞样品中抗氧化成分的维生素C当量为109.73 mg。

2.4 黑枸杞中花青素含量的测定

采用pH示差法测定提取液中的花青素含量,按照公式(2)进行计算,得到黑枸杞中的花青素含量为

表4 黑枸杞中花青素含量的测定

Table 4 The determination of the content of anthocyanin in black wolfberry

编号	A ₁ (pH=1)	A ₂ (pH=4.5)	ΔA	花青素含量/ (mg/g)	花青素含量平 均值/(mg/g)
1	0.806	0.369	0.437	25.331	
2	0.985	0.426	0.559	32.410	
3	0.982	0.347	0.635	36.782	
4	1.004	0.385	0.619	35.880	32.647
5	0.976	0.352	0.624	36.157	
6	0.876	0.370	0.506	29.322	

32.65 mg/g。

3 结论

通过超声波辅助提取法对黑枸杞中抗氧化成分进行提取,通过单因素试验和正交试验分别检查了不同的因素如提取剂浓度、提取时间、料液比、提取温度等对黑枸杞中抗氧化成分提取效果的影响,每个因素对抗氧化率的影响由小到大的顺序为:提取时间<提取温度<提取剂<料液比。确定黑枸杞抗氧化成分的最佳提取工艺条件为:提取溶剂60%乙醇,料液比1:25(g/mL),提取时间25 min,提取温度50℃。根据维生素C与DPPH·清除率的标准曲线,计算出每克黑枸杞中总抗氧化性的维生素C当量为109.73 mg。此外,采用pH示差法测定出黑枸杞中花青素含量为32.65 mg/g。

参考文献:

- [1] 谭亮,董琦,曹静亚,等.黑果枸杞中花色苷的提取与结构鉴定[J].天然产物研究与开发,2014,26(11):1797-1802,1760
- [2] 杨斌,王向未.黑枸杞及其功能性成分在食品工业中的应用及开发进展[J].食品与生物,2014(10):22-23
- [3] 张玲艳,王宏权.黑枸杞花青素的提取及其抗氧化活性研究[J].食品工业,2014,35(12):88-91
- [4] 李进,瞿伟菁,张素军,等.黑果枸杞色素的抗氧化活性研究[J].中国中药杂志,2006,31(14):1179-1183
- [5] 陈宝,张立颖.黑枸杞总黄酮的提取工艺[J].食品研究与开发,2013,34(17):20-23
- [6] 何如喜.超声波辅助提取野生黑果枸杞花青素工艺研究[J].青海师范大学学报(自然科学版),2015(1):49-55
- [7] Fule T. Quantitative methods for anthocyanins I, extraction and determination of total anthocyanins in cranberryies [J]. J of Food Science, 1986, 33(8): 72-77
- [8] 孙中武.植物化学[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2000:190
- [9] 蒋彩云,郑萍,李春花,等.雪菊中抗氧化活性物质的提取工艺研究[J].江苏调味副食品,2016(1):25-26,40
- [10] 蒋彩云,李小华,苏烁.黑莓籽抗氧化面膜的制备[J].江苏调味副食品,2013(3):13-16,28

收稿日期:2016-11-11