

# 紫苏等 4 种天然色素抗氧化能力的比较

徐亚民<sup>1,2</sup>, 马 越<sup>1</sup>, 赵晓燕<sup>1</sup>, 魏 蕾<sup>3</sup>, 孟宪军<sup>2</sup>

(1. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097; 2. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161;

3. 北京市农林科学院科技信息研究所, 北京 100097)

**摘要:**以紫苏、紫甘蓝、黑米、紫甘薯这 4 种天然色素为试验材料, 从还原力、抗脂质过氧化和清除自由基等方面对它们的抗氧化能力进行了研究和评价。结果表明, 这 4 种色素具有一定的还原能力; 对亚油酸过氧化有抑制作用, 在试验浓度范围内, 最大抑制率分别为 24.56%, 33.04%, 45.61%, 54.39%; 对 DPPH 自由基有明显的清除能力, 最大清除率为 92.59%, 93.2%, 78.4%, 66.29%; 对超氧阴离子也有一定的清除能力, 最大清除率为 46.85%, 57.69%, 41.2%, 65.08%。紫苏、甘蓝、黑米、甘薯色素是优良的具有抗氧化功能的天然色素。

**关键词:**天然色素; 抗氧化能力; 脂质过氧化; 超氧阴离子; DPPH 自由基

**中图分类号:**TS209; R151.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2007)02-0187-04

## The Comparison of Antioxidant Activity of Four Natural Pigments from Folium Perilliae

XU Ya-min<sup>1,2</sup>, MA Yue<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-yan<sup>1</sup>, WEI Lei<sup>3</sup>, MENG Xian-jun<sup>2</sup>

(1. National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100097, China; 2. Shenyang

Agricultural University, Shenyang 110161, China; 3. Institute of Information on Science and

Technology of Agriculture, Beijing Academy of Agriculture and Forestry

Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** In this study, folium perilliae, purple cabbage, black rice and purple sweet potato were studied to assess their antioxidant activity by different analytical methods: total reducing activity, inhibitory effect on lipid peroxidation, free radical scavenging activity on DPPH and superoxide anion radical. The results showed that they had reducing capacity. According to the test concentration, the maximum scavenging rate on the peroxidation of linoleic acid was 24.56%, 33.04%, 45.61%, 54.39%; the maximum scavenging rate on DPPH was 92.59%, 93.2%, 78.4%, 66.29%; the maximum inhibition rate on superoxide anion radical was 46.85%, 57.69%, 41.2%, 65.08%. They were natural, excellent, edible and strong antioxidative pigment.

**Key words:** Natural pigment; Antioxidant effect; Lipid peroxidation; Superoxide anion; 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

花青素(Anthocyanidin), 又称花色素, 是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素, 属类黄酮化合物。它是植物花瓣的主要呈色物质, 水果、蔬菜、花卉等的不同颜色大部分与之有关, 在植物细胞液泡不同的 pH 值条件下, 使花瓣呈现五彩缤纷的颜色<sup>[1]</sup>。

在植物中提取的花青素, 作为一种天然食用色素, 安全、无毒、资源丰富, 而且具有一定营养和药理

作用, 在食品、化妆、医药等方面有着巨大的应用潜力。大量研究表明: 花青素具有抗氧化、抗突变、预防心脑血管疾病、保护肝脏、抑制肿瘤细胞发生等多种生理功能。不仅如此, 花青素还与食品的抗氧化性有密切关系<sup>[1,2]</sup>。

目前, 花青素的抗氧化性得到研究人员的广泛关注, 国内吕晓玲、姜平等<sup>[3,4]</sup>分别对甘薯和紫苏色素的还原能力、抗脂质过氧化和脱氧核糖氧化损

收稿日期: 2006-08-14

作者简介: 徐亚民(1979-), 男, 河北承德人, 在读硕士, 主要从事果蔬深加工及活性物质研究

通讯作者: 赵晓燕(1969-), 女, 黑龙江林甸人, 副研究员, 主要从事蔬菜深加工研究。

伤抑制作用进行了测试;王天元<sup>[5]</sup>通过过氧化值(POV)法测试了紫苏种皮的抗脂质过氧化能力;胡博路等<sup>[6]</sup>测试了紫苏叶对脂质过氧化和活性氧自由基的抑制作用;肖湘等<sup>[7]</sup>测试了黑米的清除活性氧和抑制脂质过氧化的能力;张名位等<sup>[8]</sup>研究了黑米皮提取物清除活性氧、羟自由基和 DPPH 自由基的抗氧化能力。国外 Ilhami Gulcin 等<sup>[1]</sup>测定了紫苏的抗氧化性和清除自由基能力等。

本试验对从紫苏、紫甘蓝、黑米、紫甘薯中提取的天然色素的还原能力、抗脂质过氧化能力、清除 DPPH 自由基和超氧阴离子能力进行了研究,并对它们的抗氧化能力进行了比较,旨在评价它们可能的抗氧化生理活性,为开发具有抗氧化功能的天然食用色素提供理论和应用依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 原料 紫苏色素( $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (522 nm) = 12.95)、紫甘蓝色素( $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (530 nm) = 21.5)、黑米色素( $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (535 nm) = 12.56)、紫甘薯色素( $E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (528 nm) = 9.58)等色素均由青岛鹏远天然色素研究所惠赠。

1.1.2 主要仪器与试剂 日本 UV-240 型紫外-可见分光光度计,电热恒温培养箱,电热恒温干燥箱,恒温水浴锅,分析天平,奥立龙 828 型 pH 计。

磷酸盐,柠檬酸,六氰合铁酸钾( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ),三氯乙酸,三氯化铁;亚油酸(New Jersey, USA),氯化亚铁,盐酸,硫氰酸铵;DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基)(Sigma),无水乙醇;邻苯三酚,Tris(三羟甲基氨基甲烷)(Sigma);VC, Trolox(VE 的一种变体)(Sigma)。以上药品除柠檬酸为化学纯外,其他都为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 还原能力的测定 采用普鲁士蓝法<sup>[9]</sup>测定天然色素的还原能力。

取一定浓度的样品溶液 0.5 mL,加入 0.2 mol/L pH6.6 的磷酸盐缓冲液和 1% 的  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液各 2.5 mL 并混合均匀,混合液 50℃ 保温 20 min 后,快速冷却,加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液,混合后以 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液 2.5 mL,加入 2.5 mL 蒸馏水和 1 mL 0.1% 的  $\text{FeCl}_3$ ,摇匀,10 min 后 700 nm 下测定吸光值  $A_{700}$ 。

1.2.2 抗脂质过氧化能力的测定 采用硫氰酸铁(FTC)法<sup>[10,11]</sup>测定天然色素的抗脂质过氧化能力。

1.2.2.1 40℃ 加速亚油酸自动氧化反应 将浓度

为 0.5 mg/mL 的各样品溶液 4 mL 分别加入具塞试管中,加入 4.1 mL 4.0% 亚油酸,8 mL 0.05 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液和 3.9 mL 去离子水,置于(40±1)℃ 电热恒温培养箱中,每隔 24 h 用 FTC 法测定 1 次过氧化物生成量,以吸光值表示。对照用 4 mL 无水乙醇代替样液,VC 和 Trolox 为标准抗氧化剂。

1.2.2.2 FTC 法 取(40±1)℃ 恒温培养液 0.1 mL,分别加入 9.7 mL 75% 乙醇和 0.1 mL 30% 硫氰酸铵,然后加入 0.1 mL 0.02 mol/L 氯化亚铁溶液(3.5% 盐酸为溶剂),准确反应 3 min,于 500 nm 波长下测定吸光值  $A_{500}$ 。根据下式计算样品对亚油酸过氧化的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

1.2.3 清除 DPPH 自由基能力的测定 采用 DPPH 法<sup>[12]</sup>测定天然色素清除 DPPH 自由基的能力。

吸取一定浓度的各样品溶液 0.5 mL,分别加入 0.2 mmol/L DPPH 无水乙醇液 2 mL,摇匀后于 40℃ 恒温避光静置 30 min,于 517 nm 波长处测定各反应液的吸光值。反应总体积为 4 mL,用无水乙醇补足,无水乙醇作试剂空白。按下式计算样品对 DPPH 自由基的清除率:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中: $A_j$  为试剂空白与样品混合液的吸光值; $A_i$  为 DPPH 与样品混合液的吸光值; $A_c$  为 DPPH 与试剂空白混合液的吸光值。

1.2.4 抑制邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子能力的测定 采用邻苯三酚法<sup>[9,13]</sup>测定天然色素抑制超氧阴离子的能力。

1.2.4.1 邻苯三酚自氧化速率的测定 在 10 mL 试管中加入 4.5 mL 0.05 mol/L pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲液,同时加入 1 mL 双蒸水,于 25℃ 下恒温水浴 20 min,然后加入 3 mL 25℃ 下预热的邻苯三酚溶液,迅速摇匀,倒入 1 cm 的比色杯内,420 nm 波长处比色,每隔 30 s 记录 1 次吸光值  $A_{420}$ ,邻苯三酚自氧化速率控制在 0.06/min 左右。反应 3 min 后,加 1 滴 10 mol/L 的盐酸终止反应,静置 5 min 后测得吸光值定为  $A_0$ ,可表示邻苯三酚自氧化速率。

1.2.4.2 样品抑制邻苯三酚自氧化的能力 在 10 mL 试管中加入 4.5 mL 0.05 mol/L pH8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,加入 1 mL 样品,25℃ 下平衡 4 min,再按上述方法,测定邻苯三酚的自氧化速率,得到吸光值  $A_1$ ;同时作一试剂空白  $A_2$ ,依下式计算样品对邻苯三酚自氧化的抑制能力:

$$\text{抑制率}(\%) = [A_0 - (A_1 - A_2)] / A_0 \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种天然色素的还原能力

一般情况下,样品的还原能力与其抗氧化活性之间有显著的相关性,还原能力的高低可以间接反映抗氧化能力的强弱。因此,本试验对 4 种天然色素提取物的还原能力进行了测定,并进行比较。结果如图 1 所示。

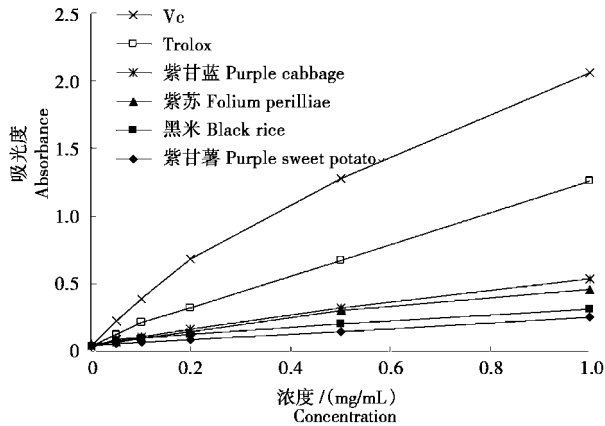


图 1 4 种色素还原能力比较(700 nm)

Fig 1 The comparison of reducing power of the four pigments(700 nm)

根据 1.2.1 的测定法,在波长 700 nm 处测定的吸光值越大,则表明其还原能力越强。由图 1 可见,在所测浓度范围内,4 种天然色素的还原能力随其浓度的增加而增强,当浓度为 1 mg/mL 时,吸光值分别为紫甘蓝色素 0.541、紫苏色素 0.456、黑米色素 0.314、紫甘薯色素 0.257,表明这 4 种天然色素均具有一定的还原能力,且还原能力强弱为:紫甘蓝>紫苏>黑米>紫甘薯。

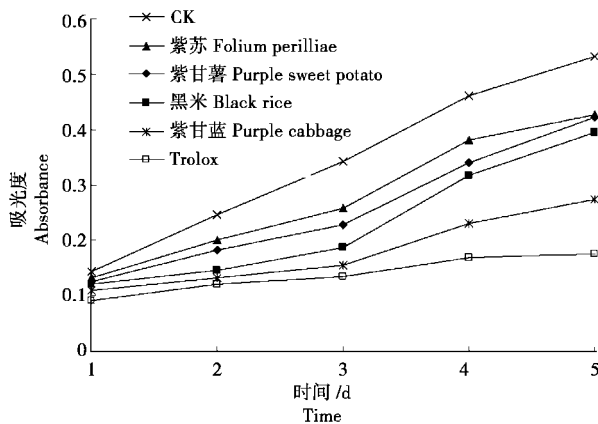


图 2 4 种色素对亚油酸过氧化抑制作用比较(500 nm)

Fig 2 The comparison of inhibitory effect of the four pigments on the peroxidation of linoleic acid

### 2.2 4 种天然色素抗脂质过氧化能力

FTC 比色法是基于在酸性条件下,脂质氧化形成的过氧化物可将  $\text{Fe}^{2+}$  氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ ,然后  $\text{Fe}^{3+}$  与硫

氰酸根离子可形成在 480~515 nm 内有最大吸收的红色络合物。以吸光值的高低间接表征物质抗脂质过氧化的活性,其吸光值越小,表明物质的抗脂质过氧化能力越强。图 2 表明了亚油酸在 40℃ 条件下过氧化物生成量与时间的关系。

可以看出,在 40℃ 恒温条件下,亚油酸的自氧化反应十分显著,而加入浓度为 0.5 mg/mL 的各色素提取物后,亚油酸过氧化作用受到了不同程度的抑制,且抑制能力顺序为:紫甘蓝>黑米>紫甘薯>紫苏。

### 2.3 4 种天然色素清除 DPPH 自由基的能力

DPPH 是一种稳定的以氮为中心的自由基,其乙醇溶液呈紫色。当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时,其孤电子被配对,吸收消失或减弱,导致溶液颜色变浅,吸光度变小,其变化程度与自由基清除程度呈线性关系。故该法可以用来表征某种物质对自由基的清除能力,通常用清除率表示。清除率越大,表明该物质清除自由基的能力越强。本试验通过测试对 DPPH 自由基的清除能力来评定紫苏等 4 种天然色素的抗氧化能力。结果如图 3 所示。

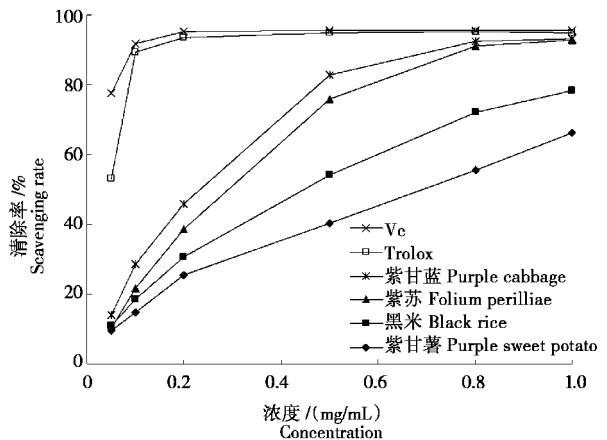


图 3 4 种色素对 DPPH 自由基清除作用比较

Fig 3 The comparison of DPPH free radical scavenging activity of the four pigments

由图 3 可以看出,4 种天然色素均具有清除 DPPH 自由基的能力,并且随着浓度的增加,清除能力增强。当浓度为 1 mg/mL 时,紫甘蓝的清除率达到 93.2%、紫苏次之,为 92.6%、黑米达到 78.4%、紫甘薯最低,仍达 66.3%。

### 2.4 4 种天然色素抑制邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子的能力

超氧阴离子自由基是所有氧自由基中的第一个自由基,与多种疾病有密切关系,可以经过一系列反应生成其他氧自由基,因此,具有特别的意义<sup>[14]</sup>。本试验采用邻苯三酚自氧化法测试了 4 种天然色素对邻苯三酚自氧化过程中产生的超氧阴离子的清除

作用。

邻苯三酚在碱性条件下能够迅速自氧化, 释放出超氧阴离子, 加入清除剂后能够清除其中的超氧阴离子, 从而使邻苯三酚自氧化速率降低。图 4 表示 4 种天然色素及标准抗氧化剂 VC 和 Trolox 对邻苯三酚自氧化产生的超氧阴离子的清除的能力。

由图 4 可以看出, 在试验浓度范围内, 4 种天然色素对邻苯三酚自氧化产生的超氧阴离子的清除能力随浓度的增加而增强, 且清除能力的强弱为: 紫甘薯> 紫甘蓝> 紫苏> 黑米。但与强抗氧化剂 VC 和 Trolox 相比, 色素对超氧阴离子的清除能力偏低, 需进一步提高色素浓度和纯度。

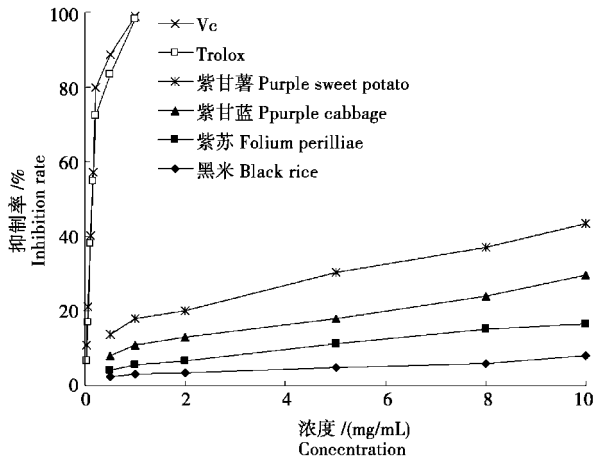


图 4 4 种色素对邻苯三酚自氧化抑制效果比较

Fig 4 The comparison of inhibitory effect of the four pigments on the auto oxidation of pyrogallol

### 3 结论与讨论

自由基具有高度的活性, 是人体生命活动中多种生化反应的中间代谢产物。一旦自由基产生过多或抗氧化体系出现故障, 体内自由基代谢就会出现失衡, 从而导致膜质过氧化和细胞损伤, 引起人体衰老和心脏病、动脉硬化、癌症、炎症、糖尿病等严重疾病。这时摄入一些抗氧化剂或自由基清除剂以协助维持体内自由基代谢平衡, 对于预防疾病发生和保持肌体健康就显得十分重要<sup>[14, 15]</sup>。

本试验研究结果显示, 紫苏、紫甘蓝、黑米和紫甘薯色素具有一定的还原能力。同时试验证实, 这 4 种天然色素还具有一定的抗脂质过氧化能力, 并对 DPPH 自由基具有较强的清除效果, 对超氧阴离子自由基也有一定的清除能力。这充分显示了它们具有一定的抗氧化的生理功能, 给这 4 种天然色素的进一步推广应用提供了依据。

试验结果还显示, 紫苏、紫甘蓝、黑米、紫甘薯的抗氧化能力的强弱在本试验中并不完全一致, 只有

还原能力和清除 DPPH 自由基的能力强弱一致, 顺序为紫甘蓝> 紫苏> 黑米> 紫甘薯。可能是它们对铁离子的螯合能力不同所致, 而本文所涉及的试验体系中有 2 种试验含有铁离子, 这与 Ilhami Gulcin 等<sup>[1]</sup>的研究结果是一致的; 此外, 这 4 种天然色素的抗氧化能力在同等浓度下低于标准抗氧化剂 VC 和 Trolox, 但我们可以采取增加色素浓度和提高纯度的办法, 提高它们的抗氧化能力。目前, 我们正采用大孔树脂和硅胶柱色谱对天然色素进行纯化, 提高它们的纯度, 并进一步将开展天然色素的辅助提高免疫力的动物试验。

作为天然食用色素, 它们除了安全、无毒, 色泽自然柔和、鲜艳稳定外, 还具有抗氧化和清除自由基的生理功能, 是值得进一步研究和开发的, 希望能开发出新一代的功能性食品。

### 参考文献:

- [1] Ilhami Gulcin, Dali Berashvili, Akcahan Gepdiremen. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankenensis* decne [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005(101): 287–293.
- [2] 赵晓燕, 马越. 番茄红素的溶剂残留去除及其延缓衰老作用的研究[J]. *华北农学报*, 2005, 20(6): 107–108.
- [3] 吕晓玲, 朱惠丽, 姜平平, 等. 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J]. *中国食品添加剂*, 2003(5): 22–26.
- [4] 姜平平, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 紫心甘薯花色苷抗氧化活性体外实验研究[J]. *中国食品添加剂*, 2002(6): 8–12.
- [5] 王天元. 紫苏子种皮抗氧化能力的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(1): 131–133.
- [6] 胡博路, 杭璐. 紫苏叶对脂质过氧化和活性氧自由基的作用[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(11): 9–11.
- [7] 肖湘, 卢刚, 张捷, 等. 黑色食品色素清除活性氧功效及抗氧化活性[J]. *药物生物技术*, 2000, 7(2): 112–115.
- [8] 张名位, 郭宝江, 池建伟, 等. 黑米皮提取物的体外抗氧化作用与成分分析[J]. *中国粮油学报*, 2005, 20(6): 49–55.
- [9] 刘杰超, 王思新, 焦中高, 等. 苹果多酚提取物抗氧化活性的体外试验[J]. *果树学报*, 2005, 22(2): 106–110.
- [10] 罗伟强. 山楂叶提取物抗氧化性能的研究[J]. *广西民族学院学报*, 2002, 5(8): 69–70.
- [11] 吕晓玲, 曹东旭, 张泽生, 等. 天然萝卜红色素的抗脂质过氧化功能[J]. *食品科学*, 2001, 22(5): 19–21.
- [12] 贾冬英, 姚开, 何强, 等. 柚皮提取物不同级分的抗氧化活性研究[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2004, 36(6): 48–50.
- [13] 郑建仙. 功能性食品(第三卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [14] Jan Pokorny, Nedyalka Yanishlieva, Michael Gordon. Antioxidants in food [M]. CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, 2001.
- [15] 高俊玲, 崔建忠, 孙树勋. 氧自由基检测技术的研究进展[J]. *华北煤炭医学院学报*, 1999, 1(5): 403–404.