

玫瑰茄花青素纯化、鉴定及抗氧化活性评价

田美玲, 陈沁雯, 刘斌雄, 李长城, 方婷*

(福建农林大学食品科学学院, 国家蔬菜加工技术研发分中心, 福建福州 350002)

摘要: 以玫瑰茄为原料制备花青素, 利用 Amberlite XAD-7 大孔树脂进行纯化, 采用傅里叶红外光谱及超高效液相色谱串联飞行时间质谱对玫瑰茄花青素纯化物 (Purified Roselle Anthocyanins, PRA) 中花色苷进行鉴定, 并评价 PRA 在体外和 HepG2 细胞内的抗氧化活性。结果表明, 玫瑰茄花青素纯化后花青素含量提高了 6.35 倍, 达到 175.27 mg/g。PRA 中含有五种花色苷, 以飞燕草素-3- 桑布双糖苷相对丰度最高, 占总花色苷丰度的 57.35%。PRA 具有良好的体外抗氧化作用。当 PRA 质量浓度为 0.23 mg/mL 时, 对 1, 1- 二苯基-2- 苦基肼自由基 (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil, DPPH) 自由基清除率达 90%; PRA 质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 对羟自由基清除率达 97.85%。PRA 还具有良好的 HepG2 细胞内抗氧化活性。200 μ g/mL PRA 处理使 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞内活性氧水平从 117.47% (以对照组 2',7'- 二氯荧光素荧光强度为 100%) 降低至 102.09%, 一氧化氮含量由 53.18 nmol/mL 降低至 45.79 nmol/mL, 超氧化物歧化酶活力由 18.19 U/mg prot 升高至 35.05 U/mg prot, 过氧化氢酶活力由 10.10 U/mg prot 升高至 19.38 U/mg prot。综上, PRA 花色苷以飞燕草素-3- 桑布双糖苷为主, 且具有良好的体外抗氧化活性和体内抗氧化应激能力。该研究结果为玫瑰茄花青素的高值化开发以及潜在健康功效提供理论依据。

关键词: 玫瑰茄; 花青素; 结构鉴定; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2024)07-155-165

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0805

Purification, Identification, and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Roselle

TIAN Meiling, CHEN Qinwen, LIU Binxiang, LI Changcheng, FANG Ting*

(College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, National R&D Center for Vegetable Processing, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Roselle was used as a raw material for extracting anthocyanins. The anthocyanins were purified using Amberlite XAD-7 macroporous resin. Purified roselle anthocyanins (PRA) were identified using Fourier-transform infrared spectroscopy and ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. The antioxidant activity of PRA *in vitro* and in HepG2 cells was evaluated. The results showed that the anthocyanin content in PRA increased by 6.35-fold, reaching 175.27 mg/g. PRA contained five anthocyanins, of which delphinidin-3-sambubioside was the most abundant, accounting for 57.35% (*m/m*) of the total anthocyanins. PRA exhibited high antioxidant activity *in vitro*. The DPPH scavenging rate reached 90% when the PRA concentration was 0.23 mg/mL, and the hydroxyl radical scavenging rate was 97.85% at a PRA concentration of 2.0 mg/mL. Additionally, PRA showed high intracellular antioxidant activity in HepG2 cells. Treatment with 200 μ g/mL PRA significantly reduced the H₂O₂-induced HepG2 intracellular reactive oxygen

引文格式:

田美玲,陈沁雯,刘斌雄,等.玫瑰茄花青素纯化、鉴定及抗氧化活性评价[J].现代食品科技,2024,40(7):155-165.

TIAN Meiling, CHEN Qinwen, LIU Binxiang, et al. Purification, identification, and antioxidant activity of anthocyanins from roselle [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 155-165.

收稿日期: 2023-07-04

基金项目: 福建省中青年教育科研项目 (JAT220065); 福建省高校产学研合作项目 (2021N5011)

作者简介: 田美玲 (1990-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养学, E-mail: tml0214@163.com

通讯作者: 方婷 (1981-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 非热力果蔬加工技术及预测微生物学, E-mail: Tina930@163.com

species level and nitric oxide content from 117.47% (taking the 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence intensity of the control group as 100%) and 53.18 nmol/mL to 102.09% and 45.79 nmol/mL, respectively. PRA treatment significantly increased the superoxide dismutase and catalase activities from 18.19 and 10.10 U/mg prot to 35.05 and 19.38 U/mg prot, respectively. The main component of PRA anthocyanins was delphinidin-3-sambubioside, which exhibited strong antioxidant activity *in vitro* and anti-oxidative stress response effects *in vivo*. These results provide a theoretical basis for the high-value development and the potential health benefits of roselle anthocyanins.

Key words: roselle; anthocyanin; structural identification; antioxidation

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa* L.) 又名洛神花, 是锦葵科木槿属植物^[1]。玫瑰茄因其花萼色泽如玫瑰红, 被称为植物界的红宝石, 且其营养价值较高, 是传统的药食两用作物^[2]。玫瑰茄适应性强, 栽培简单, 既能独自生长, 也可以与粮食作物一起种植, 产量高品质好, 是一种极具潜力的经济作物, 在我国广东、广西、福建、云南等地均有一定种植规模^[3]。

玫瑰茄花萼富含花青素, 含量占其干重的 1.7%~2.5% (*m/m*)^[4]。大量研究表明, 玫瑰茄花青素提取物具有保护肝细胞、抗氧化、降血糖等作用^[5,6]。而玫瑰茄提取物的营养功效主要归功于其花青素成分。玫瑰茄水提取物和玫瑰茄花青素对扑热息痛诱导的大鼠肝毒性具有相同的缓解作用^[7]。因此, 玫瑰茄是绿色天然和具有健康功效的花青素的良好来源^[4]。

花青素在植物中多以花色苷的形式存在。花色苷是由花青素和糖以糖苷键连接形成的类黄酮化合物, 基本结构为 C6-C3-C6, 即两个芳环和一个含氧杂环, C6-C3-C6 核上取代基不同, 形成不同花青素^[8]。目前, 食品中常见的花青素有 6 种, 分别为矢车菊色素、飞燕草色素、天竺葵色素、芍药色素、牵牛花色素和锦葵色素^[9]。玫瑰茄花色苷主要有飞燕草素-3-O-桑布双糖和矢车菊素-3-O-桑布双糖^[4]。这些花色苷结构赋予花色苷降血脂、降血压、抗炎、抗氧化性能和增强免疫能力等功效^[10]。

现有市售玫瑰茄色素含有较多的多糖、蛋白等杂质, 这些杂质导致色素储存时易吸潮且稳定性差, 因此需要对玫瑰茄色素进行分离纯化。大孔树脂吸附技术已广泛用于天然产物纯化, 其中 Amberlite XAD-7 树脂由于安全性强、重复利用率高, 在花青素分离纯化中广为应用^[11,12]。玫瑰茄花青素谱已有报道^[13], 但纯化后玫瑰茄花青素中花色苷成分的分析鉴定研究有限。另外, 玫瑰茄花青素体内抗氧化应激作用的研究有待扩展。因此, 本试验选择大孔树脂 Amberlite XAD-7 对玫瑰茄花青素进行纯化,

对纯化的花色苷进行较为全面的鉴定, 最后对玫瑰茄花青素体外和细胞内抗氧化性能进行综合评价。该研究为天然色素原料的发掘、玫瑰茄色素品质的提升以及玫瑰茄附加值的提高提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玫瑰茄 'H190' 品种, 鲜果含水率 88%~91% (*m/m*), 鲜萼片占鲜果质量的 60%~65% (*m/m*) 购自福建虎妈一家生态农业有限公司。1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil, DPPH)、槲皮素 (纯度 98%)、青链霉素混合液、噻唑兰 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、总抗氧化能力测定试剂盒、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性检测试剂盒、一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 含量检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; 超氧阴离子和羟自由基清除能力测定试剂盒, 购于苏州科铭生物技术有限公司; 胰酶液 (0.25%) 和活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测试剂盒, 购于上海翊圣生物科技有限公司; 高糖培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 和胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), 购于美国 Gibco 公司; 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 测定试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所; 其他化学试剂均为分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

5418R 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Vertex 70 傅里叶红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; 1290-6545 超高效液相色谱串联飞行时间质谱 (Ultrahigh-performance Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS), 美国安捷伦公司; RE-52 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; CCL-170B-8 二氧化碳培养箱, 新加坡

ESCO 公司; SpectraMaxi3x 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; Nikon ECLIPSE Ti 倒置荧光显微镜, 日本尼康公司; 明澈 D24UV 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 玫瑰茄花青素制备

成熟中期玫瑰茄鲜花萼冻干后粉碎过 50 目筛获得玫瑰茄冻干粉, 然后按照课题组前期优化的工艺提取玫瑰茄花青素粗提液^[14]。花青素粗提液参考 Solarte 等^[12]方法进行纯化。取 Amberlite XAD-7 大孔吸附树脂, 活化后湿法装柱 (30 mm×200 mm), 使用 550 mL 蒸馏水平衡柱床, 取 400 mL 花青素粗提物 (1 g/mL) 上样, 先后使用 400 mL 蒸馏水和 80% (V/V) 乙醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩 (40 °C) 去除乙醇后冷冻干燥得到玫瑰茄花青素纯化物 (Purified Roselle Anthocyanins, PRA)。

1.3.2 PRA 色价测定

采用 Abeda 等^[15]方法测定 PRA 色价。准确称取 0.01 g PRA, 用 pH 值为 3.0 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液配成 0.1 mg/mL 溶液, 并用酶标仪在 518 nm 处测定吸光度值。色价 (CV) 按公式 (1) 计算:

$$B = \frac{A}{c} \times \frac{1}{100} \quad (1)$$

式中:

B——色价, CV;

A——样品在 518 nm 处吸光度值;

c——样品质量浓度, g/mL;

1/100——质量浓度换算系数。

1.3.3 红外光谱检测

准确称取 1 mg PRA 与 200 mg 溴化钾在玛瑙研钵中充分混合研磨, 混合物使用固体压片在 15~20 MPa 压力下压成透明锭片, 然后使用傅里叶变换红外光谱仪于 4 500~500 cm⁻¹ 范围进行扫描。

1.3.4 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定 PRA 中花色苷

样品进样准备: 准确称取 0.05 g PRA, 用 50% (V/V) 甲醇水溶液配制成 1 mg/mL 溶液, 然后过 0.22 μm 有机滤膜后备用。

液相条件: 安捷伦 Zorbax SB-C18 柱 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 柱温 35 °C; 进样体积 1 μL; 流动相 A 为 0.5% (V/V) 乙酸铵水溶液, B 为乙腈, 流

速 0.4 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 95% (V/V) A; 1.5~5.5 min, 5% (V/V) A; 5.5~8.0 min, 5% (V/V) A; 8.0~8.5 min, 95% (V/V) A; 8.5~10.0 min, 95% (V/V) A。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI); 干燥气温度: 320 °C; 干燥气流量: 10 L/min; 鞘气温度: 350 °C; 鞘气流量: 11 L/min; 锥孔电压: 65 V; 破碎电压: 80 V; 正模式扫描范围为 50~2 000 m/z, 采用噤吟 (121.050 873) 和 HP-0921 (922.009 798) 进行质量数实时校准; 负模式扫描范围为 40~2 000 m/z, 采用 TFANH4 (112.985 587) 和 HP-0921 (1 033.988 109) 进行质量数实时校准。

1.3.5 PRA 体外抗氧化能力检测

(1) 总抗氧化能力、羟自由基清除能力和超氧阴离子清除能力测定

按照试剂盒说明书所描述的方法测定不同质量浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL) PRA 和 Vc (阳性对照) 溶液总抗氧化能力、羟自由基清除能力和超氧阴离子清除能力。

(2) DPPH 自由基清除能力的测定

采用 Wu 等^[16]方法测定不同质量浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 mg/mL) PRA 和 Vc (阳性对照) 溶液 DPPH 清除能力。

1.3.6 PRA 对 HepG2 细胞氧化损伤的影响

1.3.6.1 PRA 对 HepG2 细胞活力的影响

将处于对数生长期的 HepG2 细胞消化制成细胞悬液, 然后以每孔 5×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h, 吸弃上清液。实验组加入 200 μL 不同质量浓度 PRA (800、400、200、100、50 和 25 μg/mL) 的完全培养基, 空白组加入 200 μL 完全培养基, 每个处理重复 3 个孔。继续培养 24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力^[17]。

1.3.6.2 H₂O₂ 体外诱导 HepG2 细胞氧化损伤模型的建立

按 1.3.6.1 培养 HepG2 细胞。实验组加入 200 μL 含不同浓度 H₂O₂ (50、100、200、400 和 800 μmol/L) 的完全培养基, 空白组为完全培养基, 每个处理重复 3 个孔。培养 24 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力^[18]。

1.3.6.3 PRA 对 H₂O₂ 诱导的 HepG2 氧化损伤的影响

按 1.3.6.1 培养 HepG2 细胞。实验组加入 200 μL 含 100 μg/mL 或 200 μg/mL PRA 的完全培养基, 阳性对照组加入 200 μL 含 5 μg/mL 槲皮素的完全培养基, 模型组和对照组加入 200 μL 完全培养基。继续培养 24 h, 用 PBS 清洗两次后, 对照组加入完全培

培养基, 其余各组加入含 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 完全培养基处理 6 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力。

1.3.6.4 HepG2 细胞内 ROS、SOD、CAT 和 NO 水平检测

按 1.3.6.3 培养细胞, 按照试剂盒说明书所描述的方法测定 HepG2 细胞内 ROS、SOD、CAT 和 NO 水平。

1.4 数据分析

除非另有说明, 采用 IBM SPSS 软件 (20.0 version, 美国 IBM 公司) 对数据进行分析, 组间差异使用 Duncan 新复极差法检验, 数据以“平均值 \pm 标准差”表示, 采用 GraphPad Prism 7.0 对实验结果图进行绘制。

2 结果与讨论

2.1 玫瑰茄花青素纯化前后对比分析

玫瑰茄花青素常用作食品着色剂^[19]。而玫瑰茄粗提物呈块状, 质地较硬, 颜色为黑紫色 (图 1a)。这是由于粗提物含有糖类, 蛋白质等杂质, 所以冻干后的样品吸潮较快, 粘结严重。同时, 玫瑰茄花色苷是其花青素具有活性功能的重要组分, 为了提高花青素活性, 通常对玫瑰茄花青素粗提物进行纯化。研究表明, 经 AmberliteXAD-7 大孔吸附树脂纯化后的样品呈粉末状且较为细腻轻盈, 颜色为紫红色, 不容易吸潮 (图 1b)。

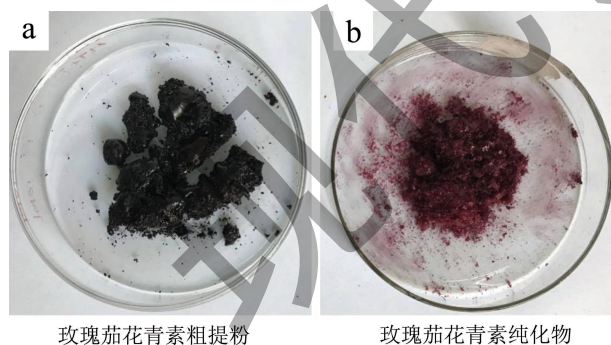


图 1 玫瑰茄花青素纯化前 (a) 后 (b) 对比

Fig.1 Comparison of anthocyanins from roselle before and after purification

玫瑰茄花青素纯化前后各项指标对比如表 1。玫瑰茄鲜花萼 (650.11 g) 经过干燥、提取、纯化一系列方法处理可得到 5.08 g PRA, 得率为 0.78% (m/m), 其总花青素含量为 175.27 mg/g, 样品纯度质量分数从 2.76% 升高到 17.53%。纯化前玫

瑰茄花青素色价为 8.89, 纯化后为 52.76, 花青素富集倍数为 6.35。Yang 等^[4]使用 DM21 大孔树脂纯化玫瑰茄粗提物得到优质花青素纯化物, 其花青素富集倍数为 5.96, 与本研究的富集倍数相近。说明本研究对玫瑰茄花青素粗提物进行较好的纯化。

表 1 玫瑰茄花青素纯化前后各项指标对比

Table 1 Comparison of various indexes before and after purification of anthocyanin from roselle

指标	纯化前	纯化后
粉末质量/g	25.93 \pm 1.27 ^a	5.08 \pm 0.10 ^b
总花青素含量/(mg/g)	27.60 \pm 1.52 ^a	175.27 \pm 4.51 ^b
纯度/(%, m/m)	2.76 \pm 0.15 ^a	17.53 \pm 0.45 ^b
色价	8.89 \pm 0.20 ^a	52.76 \pm 0.49 ^b

注: 同行右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2 PRA 红外光谱分析

PRA 红外光谱图如图 2 所示, 其红外特征吸收峰及其对应的官能团如下: 3 383.08、2 929.81 和 1 448.51 cm^{-1} 分别为酚羟基 (O-H) 伸缩振动、C-H 伸缩振动和 C-H 变角振动^[20]。另外, 1 200~1 000 cm^{-1} (1 197.77、1 114.83、1 068.54 和 1 043.47 cm^{-1}) 对应于糖 C-OH 基团和糖苷键的 C-O-C 的振动, 表明 PRA 分子中存在吡喃糖环^[21]; 930~815 cm^{-1} 范围内的特征峰表明分子内存在 α -糖苷键或 β -糖苷键^[20,22], 表明 PRA 分子中存在糖苷和双糖苷。此外, 1 610~1 430 cm^{-1} (1 608.60、1 512.19、1 448.51 cm^{-1}) 为芳香环 C=C 伸缩振动, 609.49 cm^{-1} 为芳香环 C-H 变形振动。综上, PRA 分子中有酚羟基、芳香环、C-H 和 C-O-C 伸缩振动、C-H 的变角振动和芳香环 C-H 变形振动, 说明 PRA 为花色苷元-单糖苷/双糖苷类结构物质。

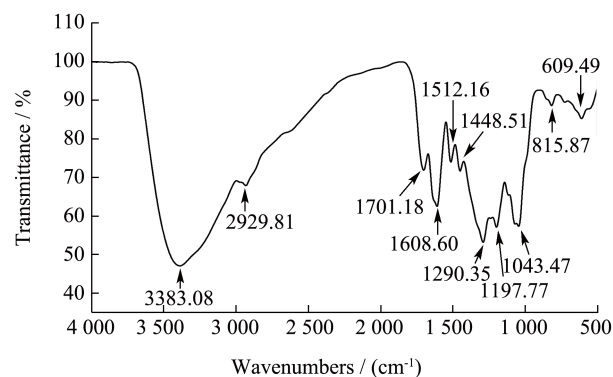


图 2 PRA 傅里叶红外光谱图

Fig.2 Fourier-transform infrared spectroscopy of PRA

表 2 PRA中花青素类化合物鉴定结果

Table 2 The identification results of anthocyanins in PRA

编号	保留时间/min	化合物	分子式	理论质量(m/z)	实测质量(m/z)	MS^2	误差/ $(\times 10^{-6})$
a	1.270	矢车菊素 -3-O- 半乳糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100 6	449.108 3 [M+H] ⁺	287	0.89
b	2.615	飞燕草素 -3- 桑布双糖苷	$C_{26}H_{28}O_{16}$	596.137 7	597.149 9 [M+H] ⁺	303	0
c	2.640	飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.095 5	465.103 3 [M+H] ⁺	303	1.02
d	2.693	矢车菊素 -3- 桑布双糖苷	$C_{26}H_{28}O_{15}$	580.142 8	579.135 4 [M-H] ⁻	287	-0.59
e	3.056	飞燕草素 -3-O- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.095 5	465.106 3 [M+H] ⁺	303	1.7

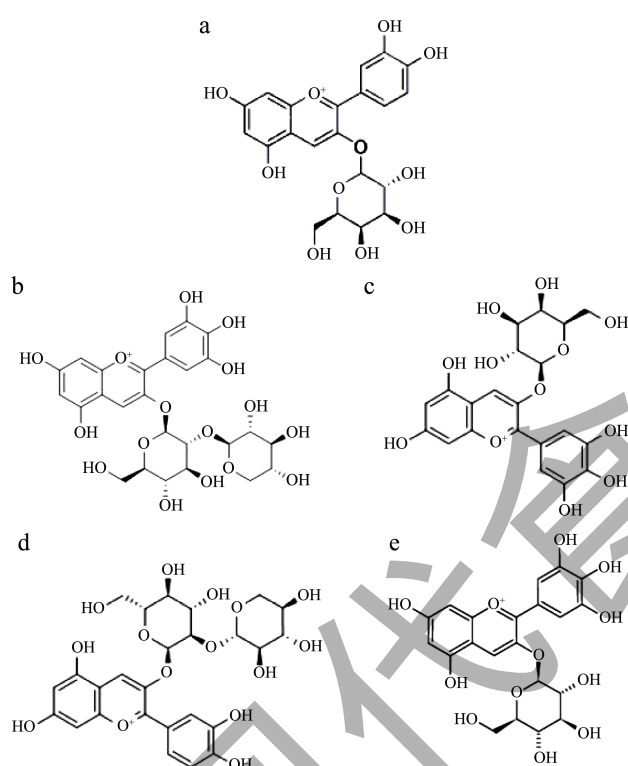


图 3 花青素单体结构式

Fig.3 Anthocyanin monomer structure

注: (a) 矢车菊素 -3-O- 半乳糖苷; (b) 飞燕草素 -3- 桑布双糖苷; (c) 飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷; (d) 矢车菊素 -3- 桑布双糖苷; (e) 飞燕草素 -3-O- 葡萄糖苷。图 4 同。

2.3 PRA中花青素鉴定

使用 UPLC-Q-TOF-MS 对 PRA 的花青素进行进一步鉴定, 对总离子流色谱峰各峰主要成分进行分子量分析, 得到 PRA 样品中主要成分的精确分子量, 结合色谱的保留时间和出峰顺序, 同时与现有文献、自建库收录的天然单体进行比对, 初步鉴定 PRA 花青素分子式。进一步通过 Mass Hunter 软件

中 Formula Calculator、Mass Calculator 等计算板块在 5×10^{-6} 的质量偏差范围内计算各化合物精确分子式, 并与自建库数据进行比较鉴定, 可知 PRA 中含有五种花色苷, 飞燕草素 -3- 桑布双糖苷、矢车菊素 -3- 桑布双糖苷、飞燕草素 -3-O- 葡萄糖苷、矢车菊素 -3-O- 半乳糖苷与飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷 (表 2), 结构如图 3 所示。

以花色苷对应的母离子为基础提取离子流色谱图及和相应的质谱谱图 (图 4), 根据谱图峰面积, 结合物质保留时间, 计算各个花色苷相对含量, 结果可得飞燕草素 -3- 桑布双糖苷、矢车菊素 -3- 桑布双糖苷、飞燕草素 -3-O- 葡萄糖苷、矢车菊素 -3-O- 半乳糖苷与飞燕草素 -3-O- 半乳糖苷的丰度百分比为 57.35%、6.17%、8.22%、16.42% 和 11.84%。其中飞燕草素 -3- 桑布双糖苷是 PRA 中含量最高的花色苷, 占了总花色苷一半以上的含量。孟翔宇^[23]和 Xu 等^[24]对玫瑰茄花色苷结构的鉴定也得出玫瑰茄含有飞燕草素 -3- 桑布双糖苷和矢车菊素 -3- 桑布双糖苷这一结果, 并发现飞燕草素 -3- 桑布双糖苷相对含量高于矢车菊素 -3- 桑布双糖苷。Diana 等^[13]的研究中, 发现除上述的五种花色苷外, 玫瑰茄花萼还有飞燕草素 -3-O- 芸香糖苷、燕草素 -3-O- 己糖苷、矢车菊素 -3- 二己糖苷和飞燕草素 -3- 二己糖苷等花色苷, 与本研究结果有所不同。这可能是由于玫瑰茄花色苷在纯化过程中有一定的损失。同时, 花色苷的合成因生长环境如光照、温度、水分、土壤等条件的差异而不同, 因此玫瑰茄的品种和产地的不同会导致花色苷成分的不同^[25]。在本研究中, 我们的结果表明飞燕草素 -3- 桑布双糖苷是玫瑰茄花青素的主要花色苷, 占总花色苷丰度的 50% 以上。

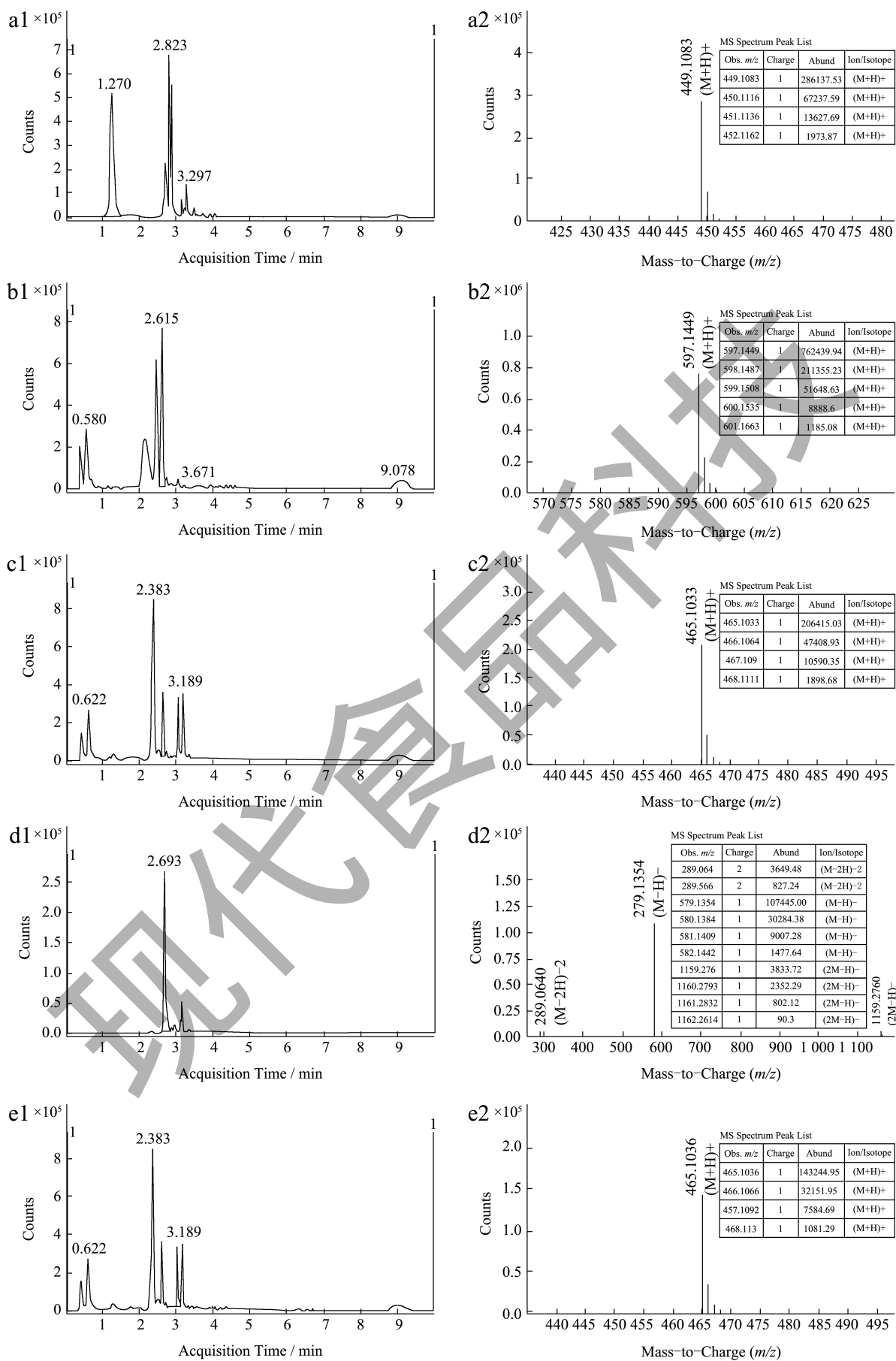


图4 花色苷提取离子色谱图 (左) 及对应的质谱图 (右)

Fig.4 Extracted ion chromatogram and mass chromatogram of anthocyanin

2.4 PRA体外抗氧化能力

花色苷不仅赋予了成熟果蔬斑斓的色彩还具有多种生物活性,如抗氧化、抗炎和抗肥胖等作用^[26]。抗氧化活性是花色苷最显著的生物活性^[27]。因此本研究首先对PRA体外抗氧化性进行测定。以Vc为阳性对照,对不同质量浓度的PRA和Vc总抗氧化能力以及对超氧阴离子、DPPH自由基和羟自由基的清除能力进行了比较研究。结果表明,在给定的质量浓度范围内,PRA质量浓度与其抗氧化能力呈正相关,即随着PRA质量浓度的增加,其抗氧化能力越强,且PRA的抗氧化能力强于Vc(图5)。特别是PRA对羟自由基的清除能力,随着质量浓度的增加,PRA与Vc清除羟自由基能力差异随之增加。当PRA质量浓度在2 mg/mL时,对羟自由基清除率达97.85%,而同质量浓度下的Vc对羟自由基清除率为21.62%。另外,PRA对DPPH自由基清除能力的 IC_{50} 为0.1 mg/mL,而Vc为 IC_{50} 为0.13 mg/mL。在PRA质量浓度为0.5、0.25和2.0 mg/mL时,其对超氧阴离子、DPPH自由基和羟自由基的清除率超过95%(图5)。Wu等^[16]研究表明,玫瑰茄花青素提取物在质量浓度为1~5 mg/mL时,DPPH自由基清除活性为20%~60%。当样品浓度达到7.5 mg/mL时,DPPH自由基清除活性在80%以上,且DPPH自由基清除能力的 IC_{50} 为4.06 mg/mL。与其研究结果相比,PRA质量浓度在0.2 mg/mL时,对DPPH自由基清除率为82.14%, IC_{50} 为0.1 mg/mL。说明在同等质量浓度下,纯化后的玫瑰茄花青素对DPPH自由基清除能力明显强于粗提物。这可能是由于本研究纯化后的花青素主要由飞燕草素和矢车菊素花色苷组成,而飞燕草素黄酮和矢车菊素黄酮B环具有强抗氧化性的3',4'-邻位羟基结构^[28]。同时,飞燕草素黄酮B环酚羟基数量在常见的花青素种类中最多,这也贡献了PRA的抗氧化性^[28]。此外,在孟翔宇^[23]的研究中,花色苷纯化物样品质量浓度为0.85 mg/mL时,其对羟自由基的清除率为97.12%。与其研究结果相比,PRA质量浓度在2.0 mg/mL时,对羟自由基清除率达97.85%。造成这一结果的原因可能是其采用AB-8树脂纯化玫瑰茄花青素粗提物,色价提高了12.85倍,产品纯度高。而本实验玫瑰茄花青素粗提物经AmberliteXAD-7树脂纯化后色价仅提高了5.93倍,纯化物的纯度较低。综上,这些结果表明本研究中得到的PRA具有良好的体外抗氧化能力。

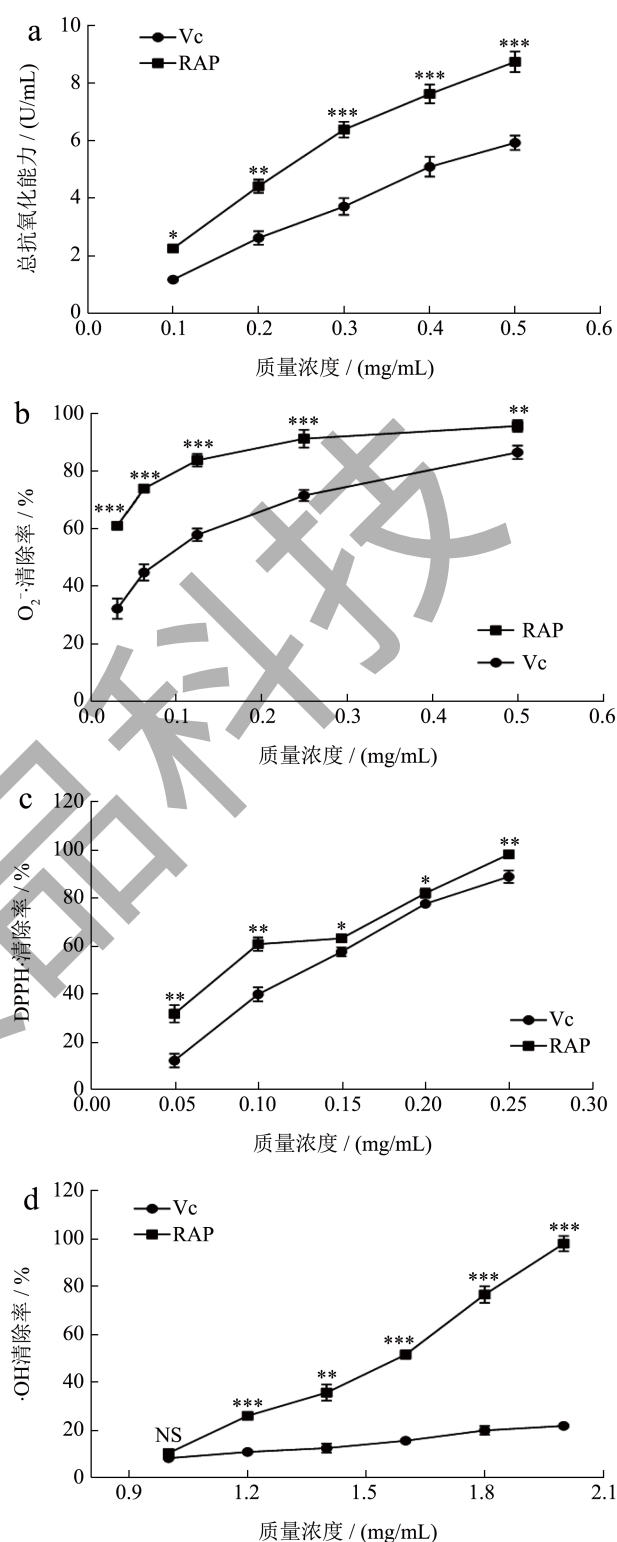


图5 PRA总抗氧化能力(a)以及对超氧阴离子(b)、DPPH自由基(c)和羟自由基(d)的清除效果
Fig.5 Total antioxidant capacity (a), superoxide anions scavenging capacity (b), DPPH free radicals scavenging capacity (c), and hydroxyl radicals scavenging capacity (d) of PRA

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. NS not significant, PRA vs Vc.

2.5 PRA对H₂O₂诱导的HepG2氧化应激的影响

氧化应激是自由基积累过多的负面效应，往往会导致其他健康细胞的恶化和死亡^[29]。氧化应激是与衰老相关的退行性疾病，如癌症、糖尿病、阿尔茨海默症和帕金森等疾病的促成因素^[30]。本研究中PRA花色苷都含有C₃-C₄邻二羟基结构，这有利于细胞内自由基的清除^[31]，暗示PRA具有良好的抗氧化应激能力。肝细胞由于含有丰富的线粒体，其需要持续的氧气和能量供应才能正常运作，因而容易受到氧化应激。因此，本研究采用H₂O₂诱导的HepG2细胞氧化损伤模型，进一步在细胞内研究PRA的抗氧化应激能力。

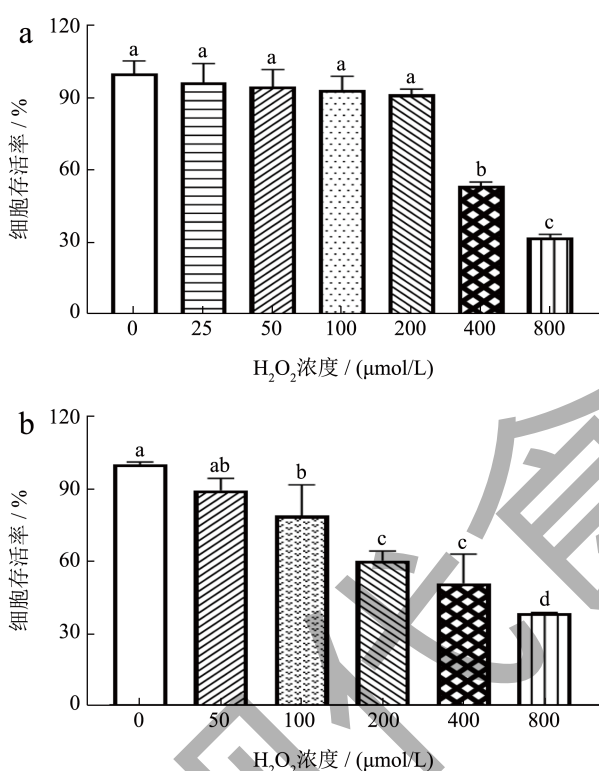


图6 不同质量浓度PRA (a) 和H₂O₂ (b) 对HepG2细胞活性的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of PRA (a) and H₂O₂ (b) on the viability of HepG2 cells

注：不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

首先采用MTT法检测25~800 μg/mL PRA干预(24 h)对HepG2细胞的毒性作用，结果表明，PRA在25~200 μg/mL质量浓度时细胞存活率都在90%以上，无细胞毒性(图6a)。结合PRA抗氧化性随着质量浓度的增大而增强的研究结果，选择100和200 μg/mL剂量进行后续的细胞实验。其次，采用MTT法检测50~800 μmol/L H₂O₂干预6 h

对HepG2细胞存活率的影响，结果表明，H₂O₂对HepG2细胞的存活率呈浓度递增，对细胞抑制作用越明显的趋势(图6b)。以HepG2细胞存活率50%~70%为指标^[32]，确定诱导细胞氧化损伤模型的H₂O₂浓度为200 μmol/L(细胞存活率为60.08%)。

使用PRA对HepG2细胞预保护24 h，200 μmol/L H₂O₂诱导细胞氧化氧化应激结果表明，PRA处理显著降低H₂O₂诱导的细胞形态肿大、数量减少及细胞间间隙增大(图7a)。从细胞存活率也可以看出，PRA处理后，氧化损伤的HepG2细胞存活率由61.56%增加至70.88%~80.75%(图7b)，且PRA处理对氧化损伤细胞的保护效果显著优于阳性对照槲皮素。这些结果表明100和200 μg/mL质量浓度下的PRA对由H₂O₂造成的氧化损伤具有显著的保护效果。

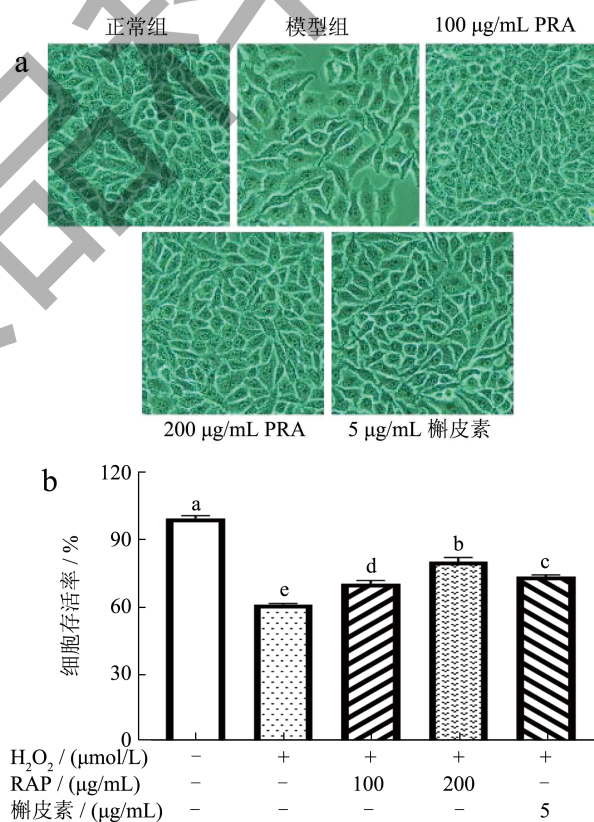


图7 PRA对受损HepG2细胞形态(a)和存活率(b)的影响

Fig.7 Effect of PRA on the morphology (a) and survival rate (b) of damaged HepG2 cells

ROS、NO、SOD和CAT是评价细胞氧化应激反应的重要指标^[33]。对HepG2细胞内ROS水平、NO含量、SOD活力和CAT活力进行测定，

以槲皮素为阳性对照, 评价 PRA 对 H_2O_2 诱导的 HepG2 氧化应激的影响。由图 8 可知, 与对照组相比, H_2O_2 处理显著增加 HepG2 细胞内 ROS 水平和 NO 含量, 显著降低细胞内 SOD 和 CAT 活力, 而 PRA 和槲皮素处理能显著恢复 H_2O_2 引起的 ROS 水平、NO 含量、SOD 活力和 CAT 活力变化。具体来说, 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ PRA 处理使细胞内 ROS 水平从 117.47% (以对照组 2',7'-二氯荧光素 (2',7'-Dichlorofluorescein, DCF) 荧光强度为 100%) 分别降低至 107.83% 和 102.09%, NO 含量由 53.18 nmol/mL 分别降低至 50.35 nmol/mL 和 45.79 nmol/mL, SOD 活力由 18.19 U/mg prot 分别升高至 27.31 和 35.05 U/mg prot, CAT 活力由 10.10 U/mg prot 分别升高至 13.06 U/mg prot 和 19.38 U/mg prot。这些结果表明 100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ PRA 处理显著降低 H_2O_2 诱导的 HepG2 氧化应激损伤, 且高剂量 PRA 处理效果更优。花色苷中含有酚羟基, 可以提供电子以中和活性氧, 从而减弱了由 ROS 积累引起的氧化损伤^[34], 而飞燕草素糖苷具有五个酚羟基, 这可能赋予 PRA 良好的抗氧化活性。Xu 等^[24]的研究表明玫瑰茄中提取的飞燕草素-3-桑布双糖苷可以显著减轻 H_2O_2 引起 HepG2 细胞氧化应激反应, 包括 ROS 过量产生, 谷胱甘肽耗竭, 线粒体膜电位降低和线粒体膜过氧化, 且 20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的效果优于 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。这些结果表明 PRA 能显著降低 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞氧化应激, 且花色苷可能是主要功能成分。PRA 强大的抗氧化应激能力使其具有缓解与衰老相关的退行性疾病的潜力, 且在一定质量浓度范围内, PRA 质量浓度越高, 缓解疾病的效果越强。但是由于所采用的 PRA 的纯度不高, 不能忽视其他化合物的作用或综合作用, 关于 PRA 对细胞氧化损伤保护的机制还需要做进一步研究。

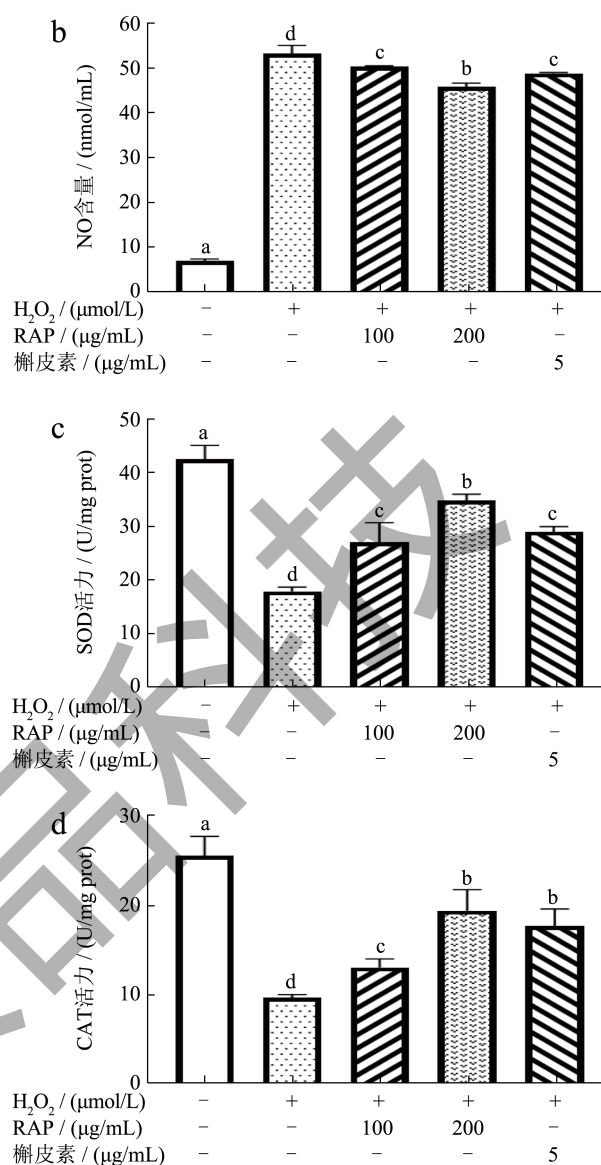
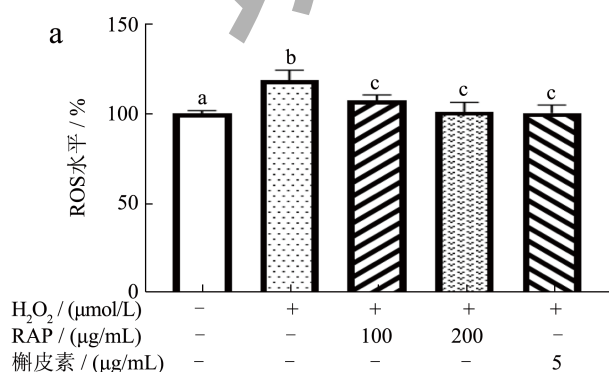


图 8 细胞内相对 ROS 水平 (a)、NO 含量 (b)、SOD 活力 (c) 以及 CAT 活力 (d)

Fig.8 Intracellular ROS level (a), NO content (b), SOD activity (c), and CAT activity (d)

3 结论

玫瑰茄花青素粗提物通过大孔树脂纯化后花青素含量提高了 6.35 倍, 达到 175.27 mg/g。PRA 中含有五种花色苷, 以飞燕草素-3-桑布双糖苷相对含量最高。PRA 质量浓度与其体外抗氧化能力呈正相关, 且在相同质量浓度下, PRA 的抗氧化能力强于阳性对照 Vc。PRA 还具有良好的 HepG2 细胞内抗氧化活性, 能显著降低 H_2O_2 诱导的 ROS 水平和 NO 含量增加, 显著增加 H_2O_2 诱导的 SOD 活力和 CAT 活力降低。这些结果暗示 PRA 在预防或改善

与衰老相关的退行性疾病具有潜在作用,为玫瑰茄花青素作为食品天然色素和营养强化剂的进一步开发利用提供科学依据。

参考文献

- [1] ISLAM M M, Food and medicinal values of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Linne Malvaceae) plant parts: A review [J]. Open Journal of Nutrition and Food Sciences, 2019, 1: 14-20.
- [2] RIZKIYAH D N, PUTRA N R, YUNUS M A C, et al. Insight into green extraction for roselle as a source of natural red pigments: A review [J]. Molecules, 2023, 28(3): 1-15.
- [3] 郝纯青.玫瑰茄红色素的提取纯化及性质研究[D].南昌:南昌大学,2011.
- [4] YANG D, LI M, WANG W, et al. Separation and purification of anthocyanins from roselle by macroporous resins [J]. Lwt-Food Science and Technology, 2022, 161: 1-8.
- [5] NAZRATUN NAFIZAH A H, BUDIN S B, ZARYANTEY A H, et al. Aqueous calyces extract of roselle or *Hibiscus sabdariffa* Linn supplementation improves liver morphology in streptozotocin induced diabetic rats [J]. Arab Journal of Gastroenterology, 2017, 18(1): 13-20.
- [6] AMER S A, AL-KHALAIFAH H S, GOUDA A, et al. Potential effects of anthocyanin-rich roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract on the growth, intestinal histomorphology, blood biochemical parameters, and the immune status of broiler chickens [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(3): 1-20.
- [7] ALI B H, MOUSA H M, EL-MOUGY S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus Sabdariffa* Linn on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats [J]. Phytotherapy Research, 2003, 17(1): 56-9.
- [8] JOKIOJA J, YANG B, LINDERBORG K M. Acylated anthocyanins: A review on their bioavailability and effects on postprandial carbohydrate metabolism and inflammation [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(6): 5570-5615.
- [9] KHOO H E, AZLAN A, TANG S T. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [J]. Food and Nutrition Research, 2017, 61(1): 1-21.
- [10] MA Z, DU B, LI J, et al. An insight into anti-inflammatory activities and inflammation related diseases of anthocyanins: A review of both *in vivo* and *in vitro* investigations [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(20): 1-17.
- [11] CONTRERAS J, ALCAZAR-VALLE M, LUGO-CERVANTES E, et al. Mexican native black bean anthocyanin-rich extracts modulate biological markers associated with inflammation [J]. Pharmaceuticals, 2023, 16(6): 1-20.
- [12] SOLARTE N, CEJUDO-BASTANTE M J, HURTADO N, et al. First accurate profiling of antioxidant anthocyanins and flavonols of *Tibouchina urvilleana* and *Tibouchina mollis* edible flowers aided by fractionation with Amberlite XAD-7 [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(4): 2416-2423.
- [13] DIANA A C, IZAERNANDA P R, JARA P J, et al. Comparison of the bioactive potential of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MSE and their anti-obesity effect *in vivo* [J]. Food Research International, 2019, 126(12): 1-9.
- [14] 陈沁雯,林胜岚,刘斌雄,等.不同干燥方法对玫瑰茄品质的影响及其花青素的提取工艺优化[J].食品研究与开发, 2020,41(8):75-82.
- [15] ABEDA H Z, KOUASSI M K, YAPO K D, et al. Production and enhancement of anthocyanin in callus line of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) [J]. International Journal of Recent Biotechnology, 2014, 2(1): 45-56.
- [16] WU H Y, YANG K M, CHIANG P Y. Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1-13.
- [17] SENTHILRAJA P, KATHIRESAN K. *In vitro* cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of Marine Yeast [J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2015, 5(3): 80-84.
- [18] ZHAO Y, LIU S, SHENG Z, et al. Effect of pinolenic acid on oxidative stress injury in HepG2 cells induced by H₂O₂ [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(10): 5689-5697.
- [19] ROY S, RHIM J W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(14): 2297-2325.
- [20] ALY A A, ALI H G M, ELIWA N E R. Phytochemical screening, anthocyanins and antimicrobial activities in some berries fruits [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(2): 911-920.
- [21] CHEN P, LIU L, CHENG Z, et al. Structure elucidation and *in vitro* rat intestinal fermentation properties of a novel sulfated glucogalactan from *Porphyra haitanensis* [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(2): 596-606.
- [22] LU Y, XU L, CONG Y, et al. Structural characteristics and anticancer/antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Trichoderma kangansensis* [J]. Carbohydrate

- Polymers, 2019, 205: 63-71.
- [23] 孟翔宇.玫瑰茄花色苷提取与分离纯化及特性研究[D].天津:天津商业大学,2019.
- [24] XU Y, HU D, BAO T, et al. A simple and rapid method for the preparation of pure delphinidin-3-O-sambubioside from roselle and its antioxidant and hypoglycemic activity [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 39: 9-17.
- [25] 刘笑宏,李公存,沙玉芬,等.不同品种蓝莓花色苷及其抗氧化活性分析[J].*中国酿造*,2020,39(2):120-124.
- [26] ALAM M A, ISLAM P, SUBHAN N, et al. Potential health benefits of anthocyanins in oxidative stress related disorders [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2021, 20(4): 705-749.
- [27] 徐玉岩,张韵寒,钱远宇,等.花青素类成分药理作用的研究进展[J].*现代药物与临床*,2022,37(8):1886-1891.
- [28] 俞文英,张欢欢,吴月国,等.黄酮类化合物的构效关系及其在肺部炎症疾病中的应用[J].*中草药*,2018,49(20): 4912-4918.
- [29] KANDOLA K, BOWMAN A, BIRCH-MACHIN M A. Oxidative stress-a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics [J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2015, 37 (Suppl 2): 1-8.
- [30] LI Y, ZHAO T, LI J, et al. Oxidative stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the pathogenesis and treatment of aging-related diseases [J]. *Journal of Immunology Research*, 2022, 2022: 1-12.
- [31] YI L, CHEN C Y, JIN X, et al. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity [J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(3): 583-90.
- [32] 张业尼,钱磊,陈雪,等.过氧化氢诱导HepG2细胞氧化应激模型的建立[J].*食品研究与开发*,2018,39(5):160-164.
- [33] LIU L, ZHAO L, LIU Y, et al. Rutin ameliorates cadmium-induced necroptosis in the chicken liver via inhibiting oxidative stress and MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Biological Trace Element Research*, 2022, 200(4): 1799-1810.
- [34] CHEN W, XU Y, ZHANG L X, et al. Wild raspberry subjected to simulated gastrointestinal digestion improves the protective capacity against ethyl carbamate induced oxidative damage in Caco-2 Cells [J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2016, 2016: 1-12.