

# 蓝莓花青素糖苷和苷元制备技术及其抗氧化活性研究

王二雷, 陈晶晶, 刘静波

(吉林大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130062)

**摘要:** 已有研究表明蓝莓花青素具有较强抗氧化作用, 但花青素以何种结构形式存在会具备更强的抗氧化活性国内外尚无系统报道。本文运用组合的浸提、萃取、柱色谱等技术手段研究了蓝莓花青素糖苷及苷元的制备技术, 采用紫外光谱、高效液相色谱进行了纯度分析及结构鉴定, 并通过考察花青素样品对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力来比较两种样品中抗氧化能力强弱。结果如下: 蓝莓花青素糖苷经酸化乙醇浸提、乙酸乙酯萃取、Amberlite XAD-7HP 大孔树脂层析分离后, 制得了纯度达 59.46% 的花青素糖苷, 并从中鉴定出 14 种糖苷单体; 在此基础上, 将糖苷纯化物进行酸水解、层析分离后, 制得了纯度为 50.58% 的蓝莓花青素苷元, 从中鉴定出 5 种苷元单体; 得出蓝莓花青素苷元的抗氧化能力显著高于糖苷形式 ( $p < 0.05$ ), 且为 Trolox 对照品抗氧化能力的 1.31~1.72 倍。本研究结果表明, 将蓝莓花青素糖苷转化为苷元形式能增强花青素的抗氧化活性。

**关键词:** 蓝莓; 花青素; 花青素苷元; 柱层析; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)10-175-181

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.027

## Preparation of Blueberry Anthocyanin Glycosides and Aglycones and Their Antioxidant Activity

WANG Er-lei, CHEN Jing-jing, LIU Jing-bo

(College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** Several studies have noted the high antioxidant activity of anthocyanins in blueberry fruits. However, there have been no studies on the structural form (glycosides or aglycones) of anthocyanins providing the highest antioxidant activity. In the present study, a combination of extraction (solid-liquid and liquid-liquid) and column chromatography was used for preparing blueberry anthocyanin glycosides and aglycones, and ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used to determine the purity and structure of anthocyanin extracts. The antioxidant activities of two anthocyanin samples were evaluated by the hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging activities. After acid-ethanol solid-liquid extraction, ethyl acetate liquid-liquid extraction, and chromatographic separation on macroporous resins, the anthocyanin glycoside extract was obtained with a purity of 59.46%, and 14 glycoside monomers were identified. Based on this finding, the purified anthocyanin glycoside extract underwent acid hydrolysis and chromatographic separation to yield blueberry anthocyanin aglycone extract with a purity of 50.58%, and five aglycone monomers were identified. The antioxidant capacity of anthocyanin aglycones was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of glycosides, and was 1.31 to 1.72 times that of the Trolox reference. The results of the present study indicate that transforming anthocyanin glycosides into aglycone forms improve their antioxidant activity.

**Key words:** blueberry; anthocyanin; aglycones; column chromatography; antioxidant

越桔 (*Vaccinium uliginosum* L) 为杜鹃花科 (*Ericaceae*) 越桔属 (*Vaccinium* Sp.) 植物。国外称越桔为蓝莓, 是一种古老且具有较高经济价值和广阔

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271907)

作者简介: 王二雷 (1981-), 男, 博士, 实验师, 研究方向: 营养与功能食品

通信作者: 刘静波 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 营养与功能食品

开发前景的小浆果树种。在我国, 野生蓝莓主要分布于黑龙江、内蒙古、吉林长白山等地区, 年产量约为 2 万吨。目前, 我国蓝莓有近 90% 用于出口日本等国, 仅有 10% 用于满足国内需求。在国内, 蓝莓主要以直接鲜食形式消费或加工成果酒、果汁、果酱等初级产品, 而高附加值的蓝莓产品在国内市场上寥寥无几, 随着我国蓝莓产量的逐年增加, 只有开发高附加值的蓝莓产品, 才能促进我国蓝莓产业蓬勃发展。

蓝莓果实中富含多种营养成分,如黄酮类、有机酸类、花青素类、维生素类、多糖类、多种矿物元素、超氧化物歧化酶等,具有增强视力、抗氧化、抗癌、增强人体免疫力等功能。近年来,大量研究表明,蓝莓之所以具有极高的抗氧化活性,是因为果实中含有大量的花青素<sup>[1]</sup>。花青素属于类黄酮化合物,除具有抗氧化作用外,还具有多种药理作用,如抗炎症、延缓衰老、预防动脉硬化等作用<sup>[2,3]</sup>。花青素在天然植物中主要以糖苷形式或酰化产物的形式存在,极少以游离的花青素苷元形式存在。目前大量关于蓝莓果实中花青素抗氧化作用研究多集中于花青素糖苷形式,而关于花青素苷元的抗氧化活性鲜有报道。

已有研究表明,黄酮苷元的功能活性明显优于糖苷型黄酮,黄酮苷元的效价是黄酮苷效价的7~10倍,并且仅有苷元型黄酮可以直接进行动物血液被吸收利用。花青素属于类黄酮化合物,与黄酮类化合物在结构上均具有C6-C3-C6骨架<sup>[4]</sup>,从理论上判断,花青素苷元应比糖苷具备更强的生物活性。此外,花青素结构中糖基的存在,导致花青素的相对分子量大、水溶性好、膜通透性差、不易吸收,相比之下,苷元形式的花青素的分子量减少、脂溶性增加、更易于透过细胞膜发挥作用。

本文拟对长白山野生蓝莓中花青素糖苷及苷元种类进行鉴定,并采用提取、萃取、大孔树脂层析法对花青素糖苷及苷元进行纯化制备技术研究,比较两种样品的抗氧化作用强弱。本研究拟为蓝莓花青素苷元类高附加值产品的开发提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

野生蓝莓采自于吉林省长白山地区,位于东经127°42'55"~128°16'48",北纬41°41'49"~42°25'18"之间的地带,采收季节8~9月。果实采摘后,立即于-20℃冷冻保藏备用。葡萄样品对照,品种名称:巨峰,购自于长春市普通超市。

### 1.2 试剂与设备

#### 1.2.1 试剂

盐酸、无水乙醇、甲醇、甲酸均为分析纯级,购于北京化工厂;色谱级甲醇,购于德国Merk公司;矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品(分子量448.2,纯度>97%)、氯化矢车菊素标准品(分子量322.7,纯度>98%)、DPPH自由基、ABTS自由基、Trolox标准品、Amberlite XAD-7HP大孔树脂(粒径范围:20~60

目)均购于Sigma-Aldrich公司。配制试剂所用的水为去离子水、高效液相色谱实验用水超纯水。

#### 1.2.2 主要仪器设备

岛津LC-1020A高效液相色谱仪,检测器类型:二极管阵列检测器(DAD);岛津UV-22550紫外分光光度计;RE252旋转蒸发仪,上海安亭电子仪器厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 蓝莓果实中花青素糖苷的分离纯化工艺

蓝莓果实中花青素的纯化步骤主要包括:提取工艺、萃取工艺、大孔树脂层析等步骤,通过一系列的纯化工艺,使蓝莓花青素粗提物具备一定纯度,纯化流程见图1所示。

取冷冻蓝莓果实200g,首先经组织捣碎机或研钵捣碎,用2L、70%乙醇(含0.1% HCl)在室温条件下闭光浸提24h,经离心(3000 r/min, 10 min, 10℃),过滤,果实残渣再次经过提取,合并两次滤液,经旋转蒸发仪浓缩(温度<50℃)后,使浓缩液的体积控制在100 mL左右。将浓缩液与乙酸乙酯按1:1体积在分液漏斗内混合进行萃取,萃取时间为4h,萃取次数为3次。取经过萃取的花青素粗提液上Amberlite XAD-7HP大孔树脂柱(2.6×50 cm, 20~60目),先用4L去离子水(含0.01% HCl)以1 mL/min的流速进行洗脱,去除大部分水溶性的还原糖类、蛋白类、有机酸类杂质,再用500 mL、40%的乙醇(含0.01% HCl)进行洗脱,收集紫色洗脱液部分,再用0.5 L、80%乙醇冲洗柱内残留杂质。将紫色洗脱液部分进行旋转蒸发浓缩处理,再经真空冷冻干燥,制得蓝莓花青素糖苷样品。

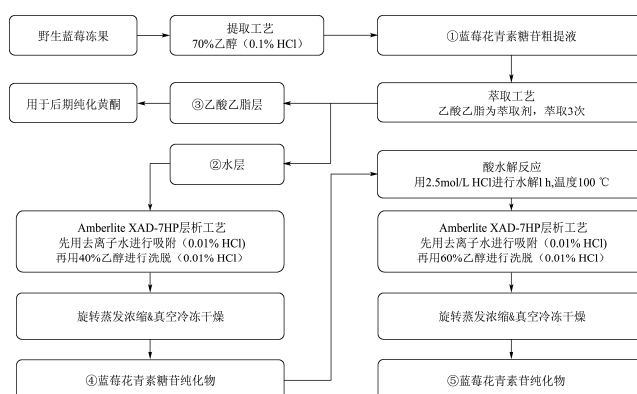


图1 蓝莓花青素糖苷及苷元的制备工艺流程

Fig.1 Preparation of blueberry anthocyanin glycosides and aglycones

注:图中①~⑤代表不同阶段制得样品编号。

1.3.2 蓝莓果实中花青素苷元的分离纯化工艺  
在制得蓝莓花青素糖苷的基础上,对蓝莓花青素

昔元的纯化过程包括：酸水解<sup>[5]</sup>、柱层析等步骤，见图1所示。取60 mL、2.5 mol/L HCl加入到100 mL具塞试管中，取20 mg的蓝莓花青素糖苷样品与之混合，摇匀，将试管放入水浴锅中，于100 °C条件下反应1 h，取出后迅速冷却至常温后备用。再将反应液过Amberlite XAD-7HP大孔树脂柱，先用500 mL去离子水（含0.01% HCl）以1 mL/min的流速进行洗脱，去除还原糖类杂质，再用300 mL、60%的乙醇（含0.01% HCl）进行洗脱，收集紫色洗脱液，将紫色洗脱液部分进行旋转蒸发浓缩处理，再经真空冷冻干燥，制得蓝莓花青素昔元样品。取葡萄果实10 g，用50 mL 70%乙醇（含0.1% HCl）在室温条件下闭光浸提24 h，经离心（3000 r/min，10 min，10 °C），过滤，取1 mL滤液加入到10 mL、2.5 mol/L HCl中，进行酸水解处理，将反应后的葡萄花青素昔元粗提液保存备用。

### 1.3.3 高效液相色谱法（HPLC-DAD）鉴定花青素单体种类

利用HPLC-DAD测定蓝莓样品中花青素单体的种类，主要基于以下三种方法的组合：花青素糖苷或昔元出峰规律、花青素糖苷或昔元标准品的标定、已有文献报道<sup>[6]</sup>。测定方法<sup>[7]</sup>如下：分别取1 mg蓝莓花青素样品，花青素糖苷用20 mL、3%的甲酸溶解，花青素昔元用20 mL、3%甲酸甲醇溶液（含20%乙醇）溶解，分别经0.45 μm的微孔滤膜过滤后，通过自动进样器上样，每次上样体积5 μL，对照品采用花青素糖苷标准品、昔元标准品及葡萄花青素昔元对照品。色谱柱：岛津Shimpack VP-ODS色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相A为：色谱级纯甲醇；流动相B为：3%甲酸水溶液。梯度洗脱程度如下：B：85%，0~5 min；80%，6~10 min；75%，11~25 min；75%，26~30 min；30%，31~46；30%，47~52 min；85%，53~65 min。流速0.5 mL/min。波长：530 nm柱温：常温。时间：65 min。

### 1.3.4 高效液相色谱法测定蓝莓样品中花青素纯度

花青素糖苷测定步骤<sup>[8]</sup>：精密称定5 mg矢车菊素-3-O-葡萄糖苷标准品，用3%的甲酸溶液溶解后定容，配制出5个浓度梯度：0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL。利用以上高效液相色谱法测定标准品溶液峰面积值，并绘制标准工作曲线。样品中花青素糖苷含量测定：精密称定5 mg样品，用3%的甲酸溶液配制浓度为0.05 mg/mL，在530 nm处检测样品中花青素糖苷单体构成，计算出每种单体峰面积大小，并将所有花青素糖苷单体的峰面积进行求和，将其代入标准曲线回归方程，计算出样品液中花青素糖苷的浓度，

根据浓度折算出初始样品中花青素糖苷的百分含量（即纯度）。

花青素昔元测定步骤<sup>[8]</sup>：精密称定5 mg矢车菊素标准品，用3%甲酸甲醇溶液（含20%乙醇）溶解后定容，配制出5个浓度梯度：0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL。利用以上高效液相色谱法测定标准品溶液峰面积值，并绘制标准工作曲线。样品中花青素含量测定：精密称定5 mg样品，用3%的甲酸甲醇溶液配制浓度为0.05 mg/mL，在530 nm处检测样品中花青素昔元单体构成，计算出每种单体峰面积大小，并将所有花青素昔元单体的峰面积进行求和，将其代入标准曲线回归方程，计算出样品液中花青素昔元的浓度，根据浓度折算出初始样品中花青素昔元的百分含量（即纯度）。

### 1.3.5 蓝莓花青素糖苷及昔元清除DPPH自由基能力

DPPH自由基清除能力评价方法<sup>[9]</sup>：以95%乙醇为溶剂，配制0.2 mmol/L的DPPH自由基溶液，向试管中加入4 mL DPPH自由基溶液，再分别加入0.2 mL 0.1 mg/mL蓝莓花青素糖苷或昔元样品，混合均匀后反应30 min，用紫外-可见分光光度计在517 nm下测定吸光度值（OD值）的变化情况。配制2 mmol/L的Trolox标准品母液，再分别稀释成0.1~1.0 mmol/L的系列标准品溶液，分别与DPPH自由基溶液反应，测定不同标准品溶液与自由基反应后的OD值变化情况，按照如下公式计算Trolox标准品对DPPH自由基的清除率大小，绘制出标准曲线，通过构建出的标准回归方程计算蓝莓花青素样品清除DPPH自由基的清除能力。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100$$

注：A<sub>0</sub>为DPPH初始OD值，A<sub>x</sub>为DPPH反应后OD值。

### 1.3.6 蓝莓花青素糖苷及昔元清除ABTS自由基能力

ABTS自由基清除能力评价方法<sup>[9]</sup>：将ABTS自由基配制为7 mmol/L水溶液，与2.45 mmol/L的过硫酸钾按体积比1:1混合，置于暗处孵育16 h，得到ABTS自由基储备液，从中吸取2 mL稀释一定倍数，使其在734 nm下的吸光度值为0.70±0.05，得到ABTS自由基工作液，取0.2 mL、0.1 mg/mL蓝莓花青素糖苷或昔元溶液与4 mL ABTS工作液混合，在23 °C反应6 min，测量反应混合液在734 nm处的OD值，以纯水做空白对照。同样以Trolox为标准品，通过绘制标准曲线，衡量蓝莓花青素样品的抗氧化能力。ABTS自由基清除率计算如下公式：

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A'_0 - A'_x}{A'_0} \times 100$$

式中:  $A'_0$  为 ABTS 初始 OD 值,  $A'_x$  为 ABTS 反应后 OD 值。

### 1.3.7 数据统计分析

实验所得数据为平行测定 3 次取平均值, 采用 Excel 和 Origin 8.5 软件进行数据分析和作图; 利用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, 通过 T 检验进行组间数据比较,  $p \leq 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蓝莓花青素糖苷的分离纯化结果

野生蓝莓果实中含有丰富的还原糖类、有机酸类、果胶类以及大量非花青素的黄酮类物质, 这些物质的存在可能会干扰花青素的生物活性的评价, 因此必须先除去这些杂质。蓝莓果实经 70% 酸化乙醇抽提后, 通过过滤步骤能除去部分果胶类和其它水不溶性杂质。但大部分脂溶性的杂质尚存在于花青素的醇提液中, 利用乙酸乙酯能有效除去花青素浓缩液中大部分的脂溶性成分。但花青素浓缩液中的有机酸类、还原糖类及少量的非花青素的黄酮类依然与花青素共存, 从而影响了花青素的纯度和活性评定。通过采用 Amberlite XAD-7HP 树脂, 在样品的吸附阶段, 利用酸化的去离子水便能去除大部分的还原糖类、有机酸类等杂质, 再用 40% 的酸化乙醇进行洗脱, 能将大部分的花青素类物质洗脱下来, 而非花青素的黄酮类杂质则持续吸附在柱子上, 采用 80% 的酸化乙醇进行洗脱, 能将大部分的黄酮类杂质洗脱除去, 从而实现了花青素与其它杂质的分离。

通过比较花青素粗提液 (图 1 中①) 与经萃取、大孔树脂层析后的蓝莓花青素纯化液 (图 1 中②) HPLC 色谱图 (图 2a 和图 2c), 可知, 纯化样品与粗提液相比, 二者均含有 14 种花青素单体, 只是在含量比例构成上略有差别, 说明蓝莓花青素糖苷的纯化过程未破坏野生蓝莓植物中花青素的原始构成。由于花青素与非花青素的黄酮类化合物在极性上比较接近, 采用高浓度的酸化乙醇 (>50%) 只能将花青素与其它黄酮类同时洗脱下来, 从而造成了花青素类物质分离过程的困难, 为充分洗脱花青素类物质, 而又防止非花青素的黄酮类被洗脱下来, 因此本实验采用 40% 的酸化乙醇对花青素进行洗脱。考虑到黄酮类化合物在 360 nm 下有紫外吸收峰<sup>[10]</sup>, 通过比较蓝莓花青素粗提液与纯化液在 360 nm 下的 HPLC-DAD 色谱图, 得出蓝莓花青素粗提液中含有多种黄酮类化合物 (图 2b),

而经过萃取、层析后的蓝莓花青素纯化液中则几乎不含有黄酮类化合物 (图 2d), 此结果表明本实验中花青素纯化工艺的有效性。

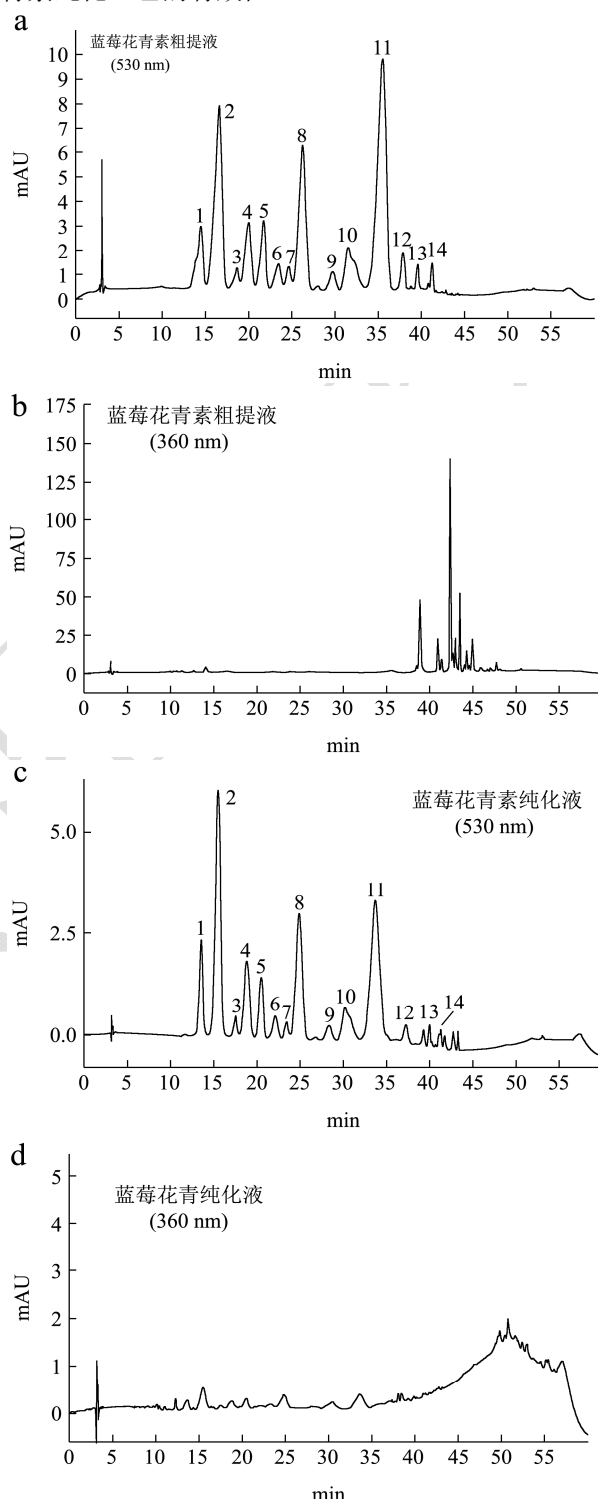


图 2 长白山野生蓝莓果实中花青素糖苷粗提液及纯化液在不同波长下的 HPLC-DAD 检测结果

Fig.2 HPLC-DAD profiles of anthocyanin glycosides from crude extracts and purified extracts at different wavelengths

注: 1, 飞燕草素-3-O-半乳糖苷; 2, 飞燕草素-3-O-葡萄糖苷; 3, 矢车菊素-3-O-半乳糖苷; 4, 飞燕草素-3-O-阿拉伯糖苷

昔; 5, 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷; 6, 牵牛花素-3-O-半乳糖苷; 7, 矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷; 8, 牵牛花素-3-O-葡萄糖苷; 9, 芍药素-3-O-半乳糖苷; 10, 锦葵色素-3-O-半乳糖苷; 11, 锦葵色素-3-O-葡萄糖苷; 12, 锦葵色素-3-O-阿拉伯糖苷; 13, 牵牛花素-3-O-木糖苷; 14, 锦葵色素-3-木糖苷。

利用分光光度法对蓝莓花青素提取物进行含量测定, 得出花青素纯化样品的纯度为 59.46%。在测得花青素提取物总纯度的基础上, 利用花青素的标准品(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷, 图 2c) 及结合我们前期利用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 对蓝莓花青素果实中花青素单体鉴定的基础上, 得出蓝莓花青素纯化样品中 14 种花青素单体均以糖苷形式存在(图 2), 而未检出苷元形式的花青素单体。通过对蓝莓果实花青素粗提液及纯化物进行结构鉴定, 得出二者均包含 5 种基本花青素苷元, 分别为飞燕草素、牵牛花素、锦葵色素、矢车菊素和芍药花素; 并得出花青素母核连接的糖苷以六碳糖(包括半乳糖苷和葡萄糖苷)和五碳糖(阿拉伯糖、木糖)形式存在, 且以六碳糖形式为主。

## 2.2 蓝莓花青素苷元的分离纯化结果

现已发现自然界中有超过 500 种以上的花青素单体<sup>[11]</sup>, 但组成花青素的苷元却只有 23 种, 而植物中最常见的有 6 种, 分别为矢车菊素(Cyanidin, 简称 Cy)、天竺葵素(Pelargonidin, 简称 Pg)、芍药花素(Peonidin, 简称 Pn)、飞燕草素(Delphinidin 简称 De)、牵牛花素(Petunidin, 简称 Pt)和锦葵色素(Malvidin, 简称 Mv)。通过以上对蓝莓果实中花青素糖苷化学结构进行分析, 我们得出蓝莓果实中含有常见的 5 种花青素苷元(De、Pt、Mv、Cy、Pn), 而不含有 Pg 苷元<sup>[7]</sup>。为充分验证蓝莓果实花青素糖苷中所含苷元种类, 我们将蓝莓果实花青素糖苷粗提液(图 1 中①)进行了酸水解(图 3a), 由图可知, 蓝莓果实花青素糖苷经水解后, 制得 5 种花青素苷元, 苷元种类的鉴定则通过业已证明的葡萄花青素苷元<sup>[12]</sup>对照品(图 3c) 及花青素苷元标准品(图 3d) 保留时间来确定。经过鉴定, 得出, 图 3a 中花青素苷元按保留时间先后顺序依次为 De (Rt=39.08 min)、Cy (Rt=41.61 min)、Pt (Rt=42.42 min)、Pn (Rt=43.81 min)、Mv (Rt=44.08 min)。经过酸水解后的蓝莓花青素纯化样品(图 1 中⑤), 同样含有 5 种基本花青素苷元(图 3b), 且 5 种苷元与粗提液(图 3a) 及葡萄对照品(图 3c) 中花青素苷元的出峰时间保持一致。通过对蓝莓花青素苷元纯化物进行纯度分析, 得出其纯度为 50.58%, 此纯度略低于蓝莓花青素糖苷粗品纯度(59.46%)。我们分析其可能的原因: 苷元样品中尽管去除了酸水解过程中生成的

还原糖类杂质, 但酸水解反应过程受强酸、高温的影响, 导致了一些反应副产物的生成, 从而影响了蓝莓花青素苷元的纯度。

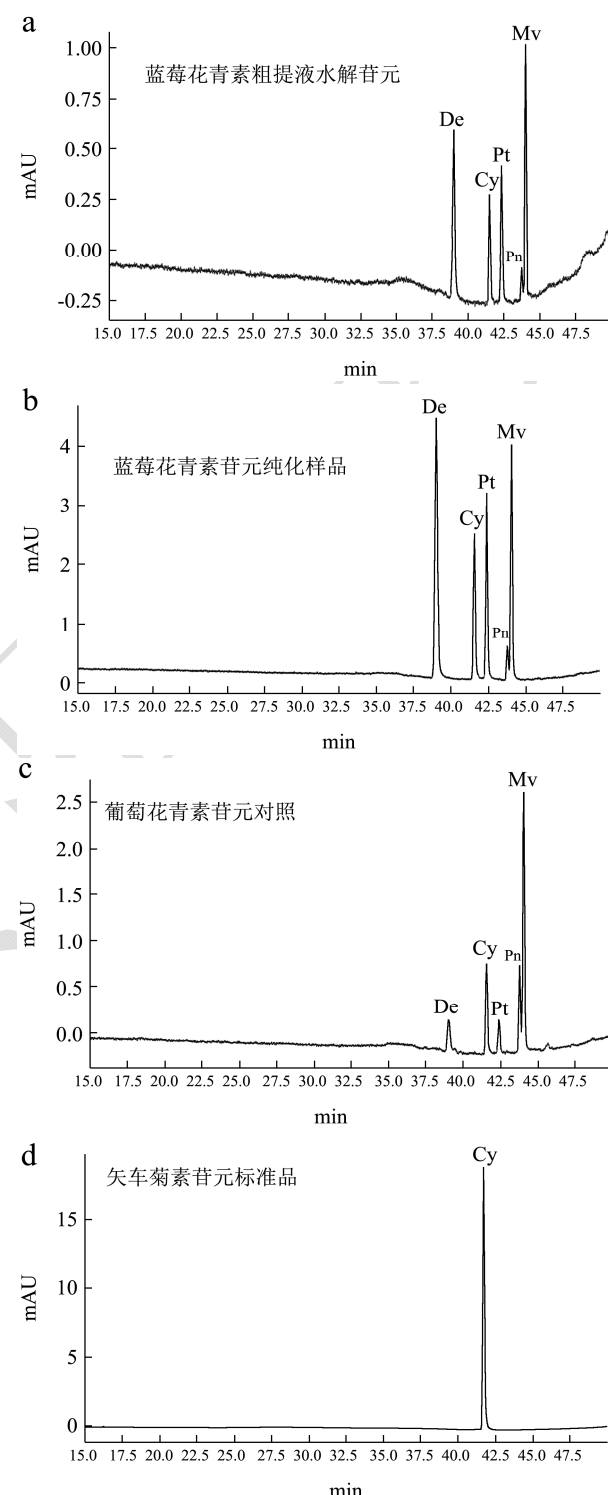


图 3 蓝莓花青素粗提液与苷元纯化样品中苷元组分的 HPLC-DAD 检测结果

Fig.3 HPLC-DAD chromatograms of blueberry anthocyanin aglycones from crude glycoside extract and purified aglycone extract

注: 飞燕草素(De); 矢车菊素(Cy); 牵牛花素(Pt); 芍药色

素(Pn); 锦葵色素(Mv)。

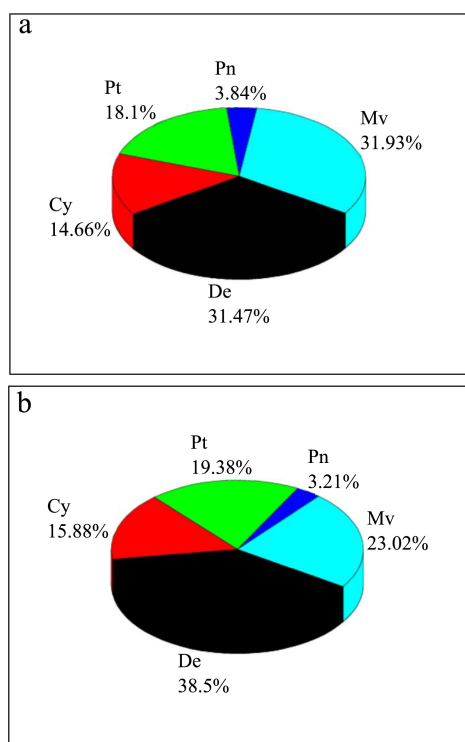


图4 两种蓝莓花青素样品中5种苷元比例的比较结果

Fig.4 Comparison of the peak area ratios of five anthocyanin aglycones from two anthocyanin samples

注: a, 蓝莓花青素糖苷粗提液经酸水解后苷元构成; b, 蓝莓花青素苷元纯化物苷元构成。

为考察蓝莓花青素苷元制备过程中5种苷元单体的变化规律, 我们考察了图1中①和⑤处得到的样品中苷元比例的差别。将蓝莓花青素糖苷粗提液(图1中①)进行酸水解, 采用高效液相色谱法检测所得水解液中花青素苷元的比例构成, 并与蓝莓花青素苷元纯化物(图1中⑤)相比较。图4a和b分别对应了以上两种样品中的花青素苷元的含量百分比。图4b与图4a相比, 花青素糖苷主要经历了一次萃取、两次柱层析步骤, 导致了De所占比例增加了7%, Mv比例减少了9%, 而Cy、Pt、Pn的比例未有明显变化。造成以上两种苷元显著变化的可能原因有两个: 第一, De的极性较大, 导致几乎所有飞燕草素-3-O-葡萄糖苷(De-3-O-glu)均被萃取到了水层, 相比之下, 由于锦葵色素-3-O-葡萄糖苷(Mv-3-O-glu)的极性较弱, 萃取步骤中, 有少量的Mv被萃取到乙酸乙酯层, 造成了Mv的损失; 第二, De-3-O-glu的极性较大, 在第一次层析步骤中, 40%的酸化乙醇能充分将大部分De-3-O-glu洗脱下来, 而未能将大部分的Mv-3-O-glu洗脱下来, 从而造成了Mv的损失。尽管花青素苷元的纯化过程造成了苷元比例的变化, 但却提高了苷元样品的整体纯度, 减少了后期抗氧化评价过程中其它

脂溶性或黄酮类杂质的影响, 并对深入研究花青素苷元的其它功能特性具有重要意义。

### 2.3 蓝莓花青素糖苷及苷元的抗氧化能力评价结果

价结果

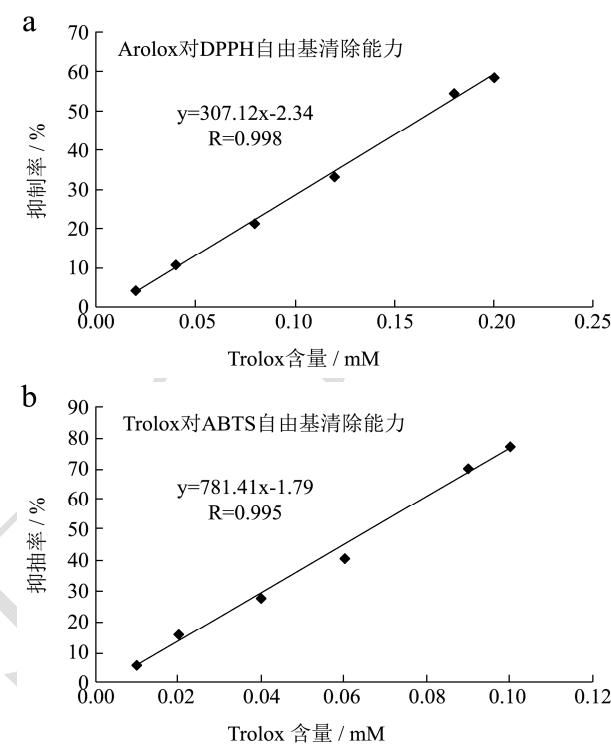


图5 Trolox 对 DPPH 及 ABTS 自由基的清除能力标准工作曲线

Fig.5 Standard curve of the DPPH and ABTS free radical scavenging abilities of Trolox standard

通过考察蓝莓花青素糖苷及苷元对 DPPH 自由基、ABTS 自由基的清除能力来评价其抗氧化能力强弱。Trolox 是一种维生素 E 的类似物, 在本实验中可用作蓝莓花青素样品抗氧化能力的参照物。首先评价了 Trolox 对 DPPH 自由基及 ABTS 自由基的清除能力, 并分别绘制了标准曲线(图5), 图中横坐标轴为 Trolox 摩尔含量(mM), 纵坐标轴为抑制率(%). 图5a为 DPPH 自由基清除能力的标准曲线, 得到的回归方程为  $y=307.12x-2.34$ , 相关系数  $R=0.99$ ; 图5b为 Trolox 对 ABTS 自由基清除能力的标准曲线, 得到的回归方程为  $y=781.41x-1.79$ , 相关系数  $R=0.99$ 。通过测定两种蓝莓花青素样品的 OD 值, 将其代入回归方程, 从而计算出样品对两种自由基的抑制率(图6)。由图6a可知, 蓝莓花青素糖苷对于 DPPH 自由基的抑制能力 ( $5710.56 \pm 294.34 \mu\text{M trolox/DW g}$ ) 显著低于 ( $p < 0.05$ ) 苷元的抑制能力 ( $6876.29 \pm 435.78 \mu\text{M trolox/DW g}$ ), 在考察两种花青素样品对 ABTS 抑制能力时(图6b), 也得到了同样的结果(糖苷为

3747.49±403.20 μM trolox/DW g, 苷元为 5231.62±580.89 μM trolox/DW g,  $p<0.05$ )。由此得出, 蓝莓花青素苷元形式比糖苷形式具备更强的自由基清除能力。此外, 由图 6a 和 b 可知, 蓝莓花青素苷元清除自由基能力约为 Trolox 的 1.31~1.72 倍, 而蓝莓花青素糖苷清除自由基能力约为 Trolox 的 0.94~1.43 倍。蓝莓花青素苷元的抗氧化能力之所以高于蓝莓花青素糖苷, 分析其可能的原因主要有 2 点<sup>[13]</sup>: (1) 花青素的主要活性位点在苷元(母核)上, 等质量的花青素糖苷摩尔数要低于苷元中摩尔数, 从而造成单位质量的花青素苷元抗氧化能力要优于糖苷形式; (2) 花青素苷元(母核)的糖苷化主要发生在 C 环的 3-OH 位上, 由于糖苷的引入, 会造成花青素分子上原子间的扭角和共价结构的改变, 从而破坏苷元原有的平面结构, 这种结构上的改变会削弱花青素的抗氧化能力。

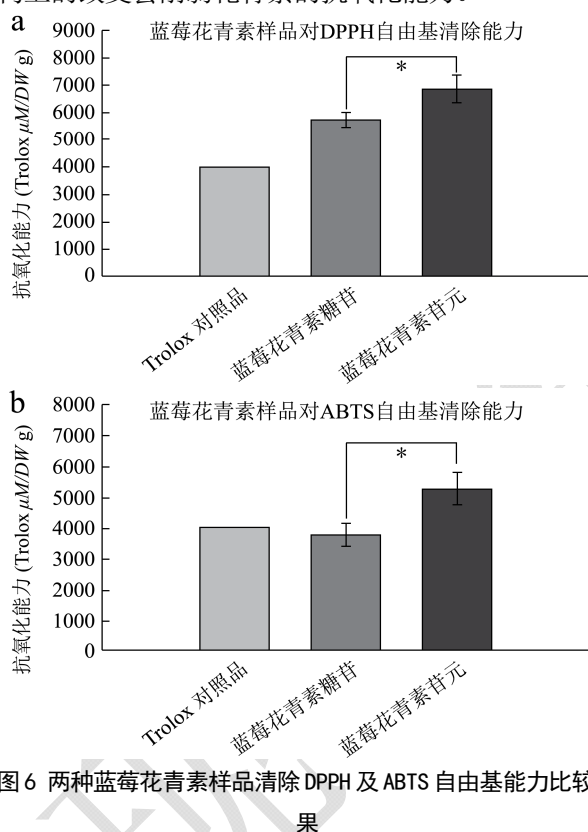


图 6 两种蓝莓花青素样品清除 DPPH 及 ABTS 自由基能力比较结果

Fig.6 Comparison of the DPPH and ABTS free radical scavenging abilities of two blueberry anthocyanin samples

已有研究表明, 肿瘤、癌症或其它疾病的发生都与过量自由基的产生有关联<sup>[14]</sup>, 则研究抗氧化剂可以有效地对抗其所带来的危害。目前, 维生素 E、维生素 C 和 β-胡萝卜素已被公认为非常有效的天然抗氧化剂, 本实验结果证实蓝莓花青素苷元的抗氧化效果明显强于维生素 E 的类似物 Trolox, 说明蓝莓花青素苷元作为抗氧化剂具有更佳广泛的应用前景, 在抗肿瘤、抗癌等功能作用方面也同样具有重要研究意义。

### 3 结论

本文运用提取、萃取、层析等技术研究了蓝莓果实中花青素糖苷及苷元的制备工艺, 并比较了两种花青素样品的抗氧化能力。所得结论如下:

3.1 构建了蓝莓花青素糖苷的纯化工艺, 制得了纯度为 59.46% 的蓝莓花青素糖苷纯化物, 从中鉴定出 14 种花青素糖苷单体;

3.2 以蓝莓花青素糖苷为基础, 采用酸水解、柱层析等技术, 制得了纯度为 50.58% 的蓝莓花青素苷元纯化物, 从中鉴定出 5 种花青素苷元单体;

3.3 通过考察蓝莓花青素样品对 DPPH、ABTS 自由基的清除能力, 证实了蓝莓花青素苷元的抗氧化能力优于糖苷形式, 且为 Trolox 对照品抗氧化能力的 1.31~1.72 倍。

3.4 由于本实验侧重于对蓝莓花青素提取物的功效研究, 后期将深入分离蓝莓花青素糖苷及苷元单体成分, 以便准确评价其量效、构效关系。本研究为深入探索蓝莓花青素苷元潜在功能活性及开发苷元系列产品提供了理论基础。

### 参考文献

- [1] Norberto S, Silva S, Meireles M, et al. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview [J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(4): 1518-1528
- [2] Speciale A, Cimino F, Saija A, et al. Bioavailability and molecular activities of anthocyanins as modulators of endothelial function [J]. *Genes & Nutrition*, 2014, 9(4): 1-19
- [3] He F, Mu L, Yan G L, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9057-9091
- [4] He J, Giusti M M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010, 1: 163-187
- [5] You Q, Wang B, Chen F, et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(1): 201-208
- [6] Barnes J S, Nguyen H P, Shen S, et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(23): 4728-4735
- [7] Wang E, Yin Y, Xu C, et al. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using

- combined chromatographic techniques [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1327: 39-48
- [8] 王二雷. 蓝莓花青素高纯提取物的制备技术及诱导肿瘤细胞凋亡作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014
- WANG Er-lei. Preparation of high-purity blueberry anthocyanin extracts and induced apoptosis of tumor cells [D]. Changchun: Jilin University, 2014
- [9] Garzón G, Wrolstad R. Major anthocyanins and antioxidant activity of nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*) [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(1): 44-49
- [10] Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000(1): 657-691
- [11] Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández M E, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 859-871
- [12] Xu Y, Simon J E, Ferruzzi M G, et al. Quantification of anthocyanidins in the grapes and grape juice products with acid assisted hydrolysis using LC/MS [J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(4): 710-717
- [13] Başkan K S, Tütem E, Akyüz E, et al. Assessment of the contributions of anthocyanins to the total antioxidant capacities of plant foods [J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 241: 529-541
- [14] 夏冬, 孙军燕, 刘娜娜, 等. 藻蓝蛋白抗氧化作用及其药理活性研究进展[J]. *海洋科学*, 2015, 39(7): 130-135
- XIA Dong, SUN Jun-yan, LIU Na-na, et al. Research progress of the antioxidant activity of phycocyanin and its application [J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(7): 130-135