

东北野生蓝莓花色苷组分分析及其抗氧化性比较

郭晓倩¹, 房子舒², 刘凤娇¹, 廖小军¹, 胡小松¹, 张燕¹, 陈芳¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 国家果蔬加工工程技术研究中心, 农业部重点开放实验室, 北京 100083) (2. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209)

摘要: 本文以东北地区的野生蓝莓为原料, 比较了三种不同产地野生蓝莓间的基本组分和抗氧化活性。利用高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱 (HPLC-DAD-MS) 法对三种蓝莓花色苷的分析可知, 东北地区野生蓝莓中含有花色苷 14~16 种, 以单糖苷配基为主, 酰基化率低。含有除天竺葵素以外的 5 种常见花青素结构类型, 且以飞燕草素衍生物、牵牛花素衍生物和锦葵素衍生物所占比例较高, 分别占比 34.89~42.21%、25.96~32.95%、22.77~31.17%。其中, 黑龙江野生蓝莓的可溶性固形物含量较低, 且可滴定酸含量较高, 其风味较酸不宜鲜食; 吉林野生蓝莓的可溶性固形物含量最高, 适宜作为加工品种, 且其总酚含量、总花色苷含量最高, 具有最高的 DPPH 清除率、O₂⁻清除率和铁还原力等抗氧化活性, 此结果可能与其糖苷配基单糖种类多且酰基化率低有关。

关键词: 蓝莓; 花色苷; 组分分析; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2016)3-313-320

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.048

Analysis of Anthocyanins Composition in Wild Blueberry Varieties from Northeast China and Their Antioxidant Activities

GUO Xiao-Qian¹, FANG Zi-Shu², LIU Feng-Jiao¹, LIAO Xiao-Jun¹, HU Xiao-Song¹, ZHANG Yan¹, CHEN Fang¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, National Engineering Research Centre for Fruit and Vegetable Processing, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China) (2. Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China)

Abstract: The essential components and antioxidant activities of three wild blueberry varieties from different production areas of Northeast China were compared. The anthocyanins of the three wild blueberry samples were analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). The results showed 14 to 16 types of anthocyanins, mainly in monoglycoside form with a low rate of anthocyanin acetylation. There are five common anthocyanins in blueberry, and the delphinidin derivatives, petunidin derivatives, and malvidin derivatives dominate, accounting for 34.89~42.21%, 25.96~32.95%, and 22.77~31.17% of the total, respectively. Among the three wild blueberry varieties, Heilongjiang wild blueberry had a relatively low content of total soluble solids (TSS) and a relatively high content of titratable acid (TA), and is not suitable for fresh consumption. Jilin wild blueberry had the highest TSS, total phenolic, and total anthocyanin content, indicating that the Jilin wild blueberry is suitable for processing. Additionally, Jilin blueberry exhibited the highest levels of hydroxyl radicals (OH) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), O₂⁻ scavenging rates, and ferric reducing power. This result might be related to the numerous types of monoglycosides and the low rate of anthocyanin acetylation in Jilin blueberry.

Key words: blueberry; anthocyanins; composition analysis; antioxidant activity

蓝莓 (Blueberry) 又称越橘, 属杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium* spp.) 多年生落叶或常绿灌木。蓝莓果实呈蓝色, 色泽诱人, 口感酸甜细腻, 具有特殊的香气和风味。因其功能性和可食用性

收稿日期: 2015-04-10

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAD31B05)

作者简介: 郭晓倩 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 张燕 (1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事非热加工技术理论与应用研究

的并存, 蓝莓已逐渐成为一种受到大众欢迎的浆果。我国的东北地区的野生蓝莓资源丰富, 生长在东北原始森林中的野生蓝莓 Vc 含量是苹果的几十倍, 被誉为中国“浆果之王”^[1]。且蓝莓果实含有丰富的花色苷, 在 40 种具有抗氧化效果的蔬菜和水果中, 蓝莓的花色苷含量最高^[2]。花色苷是一种存在于植物中的赋予植物红、蓝、紫等鲜艳颜色的水溶性色素, 对人体具有多种生理功能。已知花色苷具备很强的抗氧化效果, 可以清除体内的自由基, 延缓衰老, 调节血脂水平,

抑制胆固醇的吸收,同时有消除眼睛疲劳、改善视力的作用,还具备提高记忆力、抗变异、抗癌、抗过敏、保护胃粘膜等多种功能^[3,4],是一种有极高营养价值的功能性物质。

但迄今为止,有关不同产地野生蓝莓之间花青素类物质含量,以及抗氧化能力差异的报道较为少见。本文对比研究了我国东北地区三个产地三种野生蓝莓的各项理化指标、多酚含量和总花色苷含量,运用高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱(HPLC-DAD-MS)法对三种蓝莓的花色苷组成进行分析,并通过蓝莓果浆对 DPPH 清除率、O₂ 的清除率以及铁还原能力(FRAP)的测定,对不同地区野生蓝莓间的抗氧化活性进行了比较,旨在比较东北地区不同产地野生蓝莓之间的物种差异性,提高东北地区蓝莓资源的开发利用,以及为高花青素含量蓝莓品种的挑选及加工方式的选择提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 实验试剂

邻苯三酚、愈创木酚、没食子酸、Folin-Ciocalteu 试剂等均为分析纯药品,购于北京蓝弋化学试剂公司。V_C 标品、DPPH、TPTZ 等购于 sigma 公司。色谱级甲醇、乙腈、甲酸购于韩国首尔 SK 化学药品有限公司。

1.2 实验仪器

868 型 pH 计,美国奥立龙公司;WAY-2S 型阿贝折光仪,上海精密科学仪器有限公司;Waters-2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Waters2996 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;Quattro Micro 三重四级杆串联质谱仪,英国 Micromass 公司;ASB Venusil C18 柱,美国艾杰尔公司;UV-762 紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。

2 材料与方法

2.1 材料及预处理

采用的三种野生蓝莓分别是辽宁丹东地区野生蓝莓、黑龙江大兴安岭地区野生蓝莓和吉林长白山地区野生蓝莓。鲜果采摘后置于-20℃冰箱冻藏保存。实验时,将蓝莓冻果从-20℃冰箱取出,置于4℃冰箱内解冻后打浆备用。

2.2 方法

2.2.1 pH 的测定

采用 pH 计在常温下测定蓝莓浆的 pH 值,待读数稳定后记下读数。

2.2.2 可溶性固形物(TSS)含量的测定

采用阿贝折光仪,以去离子水作为空白,选取温度校正模式,测定结果的单位为 Brix。

2.2.3 可滴定酸(TA)含量的测定

采用电位滴定法,用自动滴定仪测定蓝莓果实的可滴定酸含量,模式选择 pH 8.1。取 10 g 蓝莓浆,用 0.1 mol/L 的 NaOH 进行滴定,记录滴定液体积,以柠檬酸每毫摩尔 0.070 g 计算。

2.2.4 总酚含量的测定

采用 Folin 酚法测定总酚的含量,并略作修改^[5]。取 10 g 蓝莓浆,加入 60 mL 80% 甲醇,混匀,超声提取 30 min,在 12000 g、4℃ 下离心 10 min,收集上清液,并在沉淀中再次加入 20 mL 80% 甲醇,重复上述操作。将两次收集的上清液定容到 100 mL 容量瓶,4℃ 下备用。Folin-ciocalteu 试剂用超纯水按 1:9 (V:V) 稀释 10 倍,取 0.4 mL 提取液与 2 mL 稀释的 Folin-ciocalteu 试剂混合,加入 1.8 mL 7.5% 的 Na₂CO₃ 溶液,常温下避光保持 1 h,测定 765 nm 处的吸光值。没食子酸标准曲线 $y=0.0076x+0.1444$ ($R^2=0.9999$),总酚含量按照以下公式计算:吸光度值 $A=0.0076 \times \text{总酚含量} + 0.1444$ 。

2.2.5 总花色苷含量的测定

测定方法采用 pH 示差法,并略作修改^[6]。样品处理方式同 2.2.4。取两个 10 mL 容量瓶各加入 1 mL 花色苷提取液,分别用 pH 1.0 缓冲液[0.2 mol/L KCl: 0.2 mol/L HCl=25: 67 (V/V)]和 pH 4.5 缓冲液[1 mol/L NaAc: 1 mol/L HCl:H₂O=100:60:90 (V/V/V)]定容,在冰箱中静置 1 小时,分别在 510 nm 和 700 nm 下测吸光值。总花色苷含量(Total anthocyanins, TAc_y)按下式计算(结果以矢车菊色素-3-葡萄糖苷计):

$$T_{Acy} (\text{mg}/100 \text{ g FW}) = A \times 449.2 \times 10 / 26900$$

注: $A = A_{\text{pH}1.0} - A_{\text{pH}4.5}$; 26900 为矢车菊色素 3-葡萄糖苷的摩尔消光系数; 449.2 是矢车菊色素 3-葡萄糖苷的摩尔分子质量。

2.2.6 花色苷的鉴定

(1) 样品前处理

取 10 g 蓝莓浆,加入 20 mL 0.1% HCL 的色谱纯无水甲醇溶液,4℃ 下静置提取 2 h,在 12000 r/min、4℃ 下离心 10 min,四层纱布过滤得花色苷提取液,收集上清液,并在沉淀中再次重复上述操作。将两次收集的上清液定容到 100 mL 容量瓶。取适量提取液过 0.45 μm 的有机系微孔滤膜,然后再过 0.22 μm 微孔滤膜,取 1 mL 置于样品瓶中待 HPLC-DAD-MS 检

测。

(2) 色谱条件

应用 Waters-DAD 系统, 色谱柱为 Venusil ASB-C18 (250 ×4.6 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 进样量 20 μL, 流速 0.4 mL/min, 在 520 nm 下测定。流动相 A 为含 5% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为乙腈。采用梯度洗脱, 洗脱程序为: 流动相 B 的初始比例为 15%, 随后在 35 min 内由 15% 线性增大到 30%, 然后回到原始浓度 15% B, 平衡基线 30 min, 总时间为 40 min。

(3) 全扫描模式 (MS Scan) 质谱条件

正离子 (ESI⁺) 数据采集模式产生准分子离子峰 [M⁺H]⁺; m/z 扫描范围: 100 ~ 900 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 40 V; 萃取电压 5.0 V; 源温度: 110 °C; 脱溶剂温度: 450 °C; 脱溶剂气: 650 L/h; 锥孔反吹气: 50 L/h; RF 透镜电压: 0.5 V。

2.2.7 抗氧化能力的测定

(1) DPPH 自由基清除率

参照 Brand-William 等^[7]的方法, 并略作修改。按照下式计算 DPPH 自由基清除率, 通过计算样品的 IC₅₀ 浓度 (清除 50% DPPH 自由基时所需浓度) 来比较样品之间的差异, 同时用抗坏血酸作为阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率} (\%) = \frac{A_0 - (A_s - A_c)}{A_0} \times 100\%$$

注: A₀-100 μL 蒸馏水+3.0 mL DPPH 溶液的吸光度值; A_s-100 μL 样品溶液+3.0 mL DPPH 溶液的吸光度值; A_c-100 μL 样品溶液+3.0 mL 无水甲醇的吸光度值。

(2) 超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 清除能力

参照 Finkelstein 等^[8]用邻苯三酚自氧化法测定样品清除 O₂⁻ 能力的方法, 并略作修改。通过计算样品的 IC₅₀ 浓度 (清除 50% DPPH 自由基时所需浓度) 来比较不同样品间的区别, 同时用抗坏血酸作为阳性对照。

$$\text{O}_2^- \text{清除率} (\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

注: A₀ 邻苯三酚自氧化率; A 样品溶液氧化率。

(3) 铁还原能力

参照 Benzie 等^[9]的方法, 并略作修改。将蓝莓打浆取上清液后用去离子水稀释 5 倍。取 100 μL 样品液, 加到 4 mL TPTZ 工作液中, 混匀, 37 °C 反应 10 min, 直接测定 593 nm 处的吸光值。工作液由 10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L FeCl₃ 溶液和 0.3 mol/L 醋酸缓冲液 (pH=3.6) 以体积比 1:1:10 配置而成。样品的铁还原能力用 Vc 的当量 (ug) 来表示, 单位为 ug Vc/g 果浆。

Vc 标准曲线如图 1: $y=0.0002x+0.1475$ ($R^2=0.9966$)。

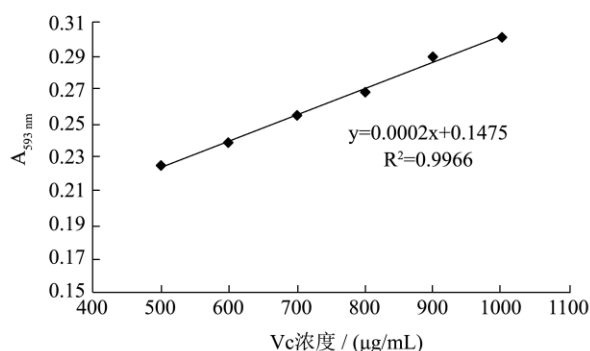


图 1 Vc 标准曲线

Fig.1 Standard curve for vitamin C at 593 nm

2.3 数据统计与分析

所有实验均重复三次, 应用方差分析 (ANOVA) 对试验数据进行差异显著性分析 (SPSS_12.0), 显著水平 $p>0.05$ 时, 表示差异不显著, 当 $p<0.05$ 时, 表示差异显著。用 Origin_Pro 7.5 统计分析数据并制图。

3 结果与讨论

3.1 蓝莓理化指标分析

表 1 列出了不同产地野生蓝莓间的基本成分。三种蓝莓的可溶性固形物含量在 9.20%~13.30% 之间, 可滴定酸含量在 2.15%~2.77% 之间, pH 在 2.7 附近。其中, 吉林野生蓝莓的可溶性固形物含量显著高于其他三种, 且其 pH 适中、可滴定酸适中, 提示这种蓝莓适宜加工。而黑龙江野生蓝莓的可溶性固形物含量最低, 且可滴定酸含量最高, 表明此种蓝莓风味较酸不宜鲜食。

表 1 不同产地野生蓝莓的基本理化指标

Table 1 Essential physicochemical indexes of wild blueberries from different production areas

蓝莓产地	可溶性固形物/°Brix	可滴定酸/%	pH
辽宁	9.20±0.11 ^a	2.15±0.05 ^a	2.69±0.01 ^b
黑龙江	9.60±0.10 ^a	2.77±0.36 ^b	2.63±0.01 ^a
吉林	13.30±0.12 ^b	2.52±0.17 ^b	2.67±0.01 ^b

注: 同一列中不同字母表示有显著性差异 ($p<0.05$)。

3.2 总酚含量及总花色苷含量

酚类化合物是广泛存在于水果、蔬菜和谷类食物中的植物次生代谢产物, 有多种生物活性, 尤其在预防心脑血管、癌症以及衰老方面发挥着十分重要的作用^[10]。因此, 测定果实中的总酚含量有助于对其品质进行评价。结果如图 2 所示, 不同蓝莓间总酚差异显著, 从低到高依次为辽宁野生 < 黑龙江野生 < 吉林野

生, 吉林产地的野生蓝莓其总酚含量最高为 394 mg/100 g。这几种总酚含量均在 276 mg~394 mg 之间, 符合前人的研究结果^[11]。

花色苷具有很好的抗氧化作用, 因此测定果实中的花色苷可以有效的评价果实的品质。测定结果如图 3 所示, 吉林野生蓝莓的花色苷含量最高, 其余两种蓝莓的花色苷含量在 100~150 mg/100 g 之间, 三种蓝莓的花色苷含量在 126~308 mg/100 g 之间。此结果与李颖畅^[12]的测定结果基本相同。就总酚和花色苷含量而言, 野生品种优于栽培品种, 且以吉林野生蓝莓花色苷含量最高。

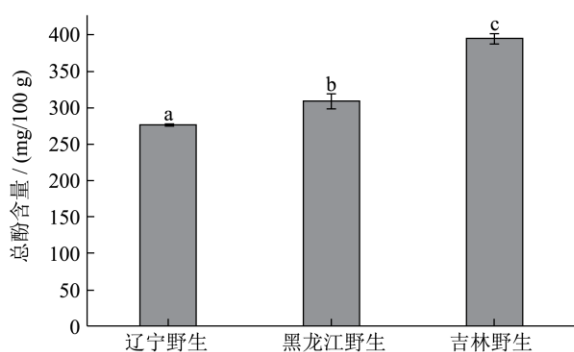


图 2 不同产地野生蓝莓的总酚含量

Fig.2 Total phenolic content of wild blueberries from different production areas

注: 图中不同字母表示有显著性差异 ($p < 0.05$)。

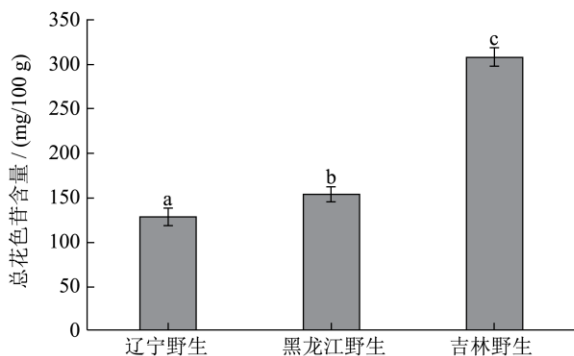


图 3 不同产地野生蓝莓的总花色苷含量

Fig.3 Total anthocyanin content of wild blueberries from different production areas

注: 图中不同字母表示有显著性差异 ($p < 0.05$)。

3.3 花色苷种类鉴定与分析

对不同产地的野生蓝莓花色苷粗提物进行 HPLC-DAD-MS 分析后, 将实验结果与已有文献^[13, 14]中的紫外光谱图、质谱图和保留时间等信息进行比对分析, 对蓝莓中的花色苷进行鉴定, 从三种蓝莓中共鉴定出 16 种花色苷, 具体分析结果如图 4 和表 2 所示。

从辽宁野生蓝莓中鉴定出 14 种花色苷。具体分析

结果如图 4 (a) 和表 2 所示。

通过 MS 分析, 峰 1、峰 2、峰 3 的分子离子 M^+ 分别为 m/z 465、 m/z 479、 m/z 493, 碎片离子为 m/z 303、 m/z 317、 m/z 331, 分别是飞燕草素、牵牛花素、锦葵素。结合光谱信息, 碎片离子 m/z 303 $[M-162]^+$ 、 m/z 317 $[M-162]^+$ 、 m/z 331 $[M-162]^+$ 均是失去一分子半乳糖获得的, 因此, 判断该三种物质可能是飞燕草素 3-半乳糖苷、牵牛素 3-半乳糖苷、锦葵素 3-半乳糖苷。

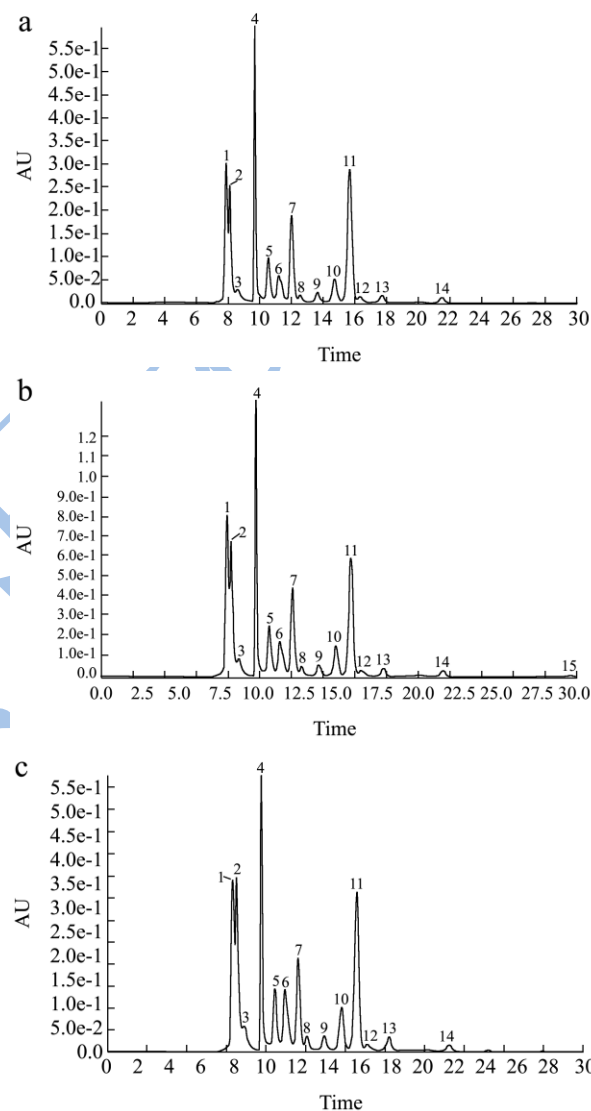


图 4 三产地野生蓝莓花色苷的 HPLC-DAD 光谱图 (520 nm)

Fig.4 HPLC-DAD chromatograms of anthocyanins in wild blueberries from three production areas at 520 nm

注: a: 辽宁野生蓝莓; b: 吉林野生蓝莓; c: 黑龙江野生蓝莓。

峰 4 的保留时间 9.75 min, 但其分子离子 M^+ 和裂解碎片均与峰 1 相同, 因此是峰 1 的一个同分异构体, 根据 Wu&Prior 等人^[14]的结果中的保留时间推断其糖苷应为葡萄糖。因此, 判断该物质可能是飞燕草 3-葡萄糖苷。

峰 6、峰 10 的分子离子 M^+ 分别为 m/z 449、 m/z 493，裂解碎片为 m/z 287、 m/z 331，分别是矢车菊素和锦葵素，结合光谱信息，碎片离子 m/z 287 $[M-162]^+$ 、 m/z 331 $[M-162]^+$ 均是失去一分子葡萄糖获得的，因此，推断该两种物质可能是矢车菊素 3-葡萄糖苷和锦葵素 3-葡萄糖苷。

峰 5、峰 8、峰 9、峰 13 的分子离子 M^+ 为 m/z 435、 m/z 287、 m/z 449、 m/z 463，碎片离子为 m/z 303、 m/z 287、 m/z 317、 m/z 331，分别是飞燕草素、矢车菊素、牵牛花素、锦葵素。碎片离子 m/z 303 $[M-132]^+$ 、 m/z 287 $[M-132]^+$ 、 m/z 317 $[M-132]^+$ 、 m/z 331 $[M-132]^+$ 是失去一分子阿拉伯糖获得的，且 m/z 303 正是飞燕草素。因此，判断该四种物质可能是飞燕草素 3-阿拉伯糖苷、矢车菊素 3-阿拉伯糖苷、牵牛素 3-阿拉伯糖苷和锦葵素 3-阿拉伯糖苷。

峰 7 的分子离子 M^+ 和碎片离子均与峰 2 相同，应为峰 2 的同分异构体，根据 Wu&Prior 等人^[4]的保留时间推断其糖苷应为葡萄糖。因此，判断该物质可能是牵牛素 3-葡萄糖苷。峰 11 的分子离子 M^+ 和碎片离子均与峰 10 相同，应为峰 10 的一个同分异构体，根据已有研究鉴定其糖苷应为葡萄糖，推断该物质可能为锦葵素 3-葡萄糖苷。峰 12 的分子离子 M^+ 和碎片离子均与峰 9 相同，应为峰 9 的一个同分异构体，根

据已有研究鉴定其糖苷应为阿拉伯糖。推断该物质可能为牵牛素 3-阿拉伯糖苷。峰 14 的分子离子 M^+ 和碎片离子均与峰 13 相同，应该是峰 13 的一个同分异构体，根据已有研究，其糖苷应为阿拉伯糖。因此推断该物质可能为锦葵素 3-阿拉伯糖苷。

从吉林野生蓝莓中鉴定出 16 种花色苷。具体分析结果如图 4 (b) 和表 2 所示，质谱图解析见后。除峰 15 外，其余峰的分子离子 M^+ 和碎片离子均可在前两种蓝莓的花色苷种类中找到，不再赘述。峰 15 的保留时间为 29.55 min，通过 MS 分析，其分子离子 M^+ 为 m/z 535，碎片离子为 m/z 331。其中碎片离子 m/z 331 $[M-162-42]^+$ 是失去一分子葡萄糖和一分子乙酸获得的，且 m/z 331 是锦葵素。因此，推断该物质可能是锦葵素 3-(6"-乙酰化) 葡萄糖苷。

黑龙江野生蓝莓中鉴定出 14 种花色苷。具体分析结果如图 4 (c) 和表 2 所示。除峰 10 外，其余峰的分子离子 M^+ 和碎片离子均可在辽宁野生蓝莓的花色苷类型中找到，不再赘述。峰 10 的保留时间为 14.77 min，通过 MS 分析，其分子离子 M^+ 为 m/z 463，碎片离子为 m/z 301。其中碎片离子 m/z 301 $[M-162]^+$ 是失去一分子葡萄糖获得的，且 m/z 301 是芍药素。因此，推断该物质可能是芍药素 3-葡萄糖苷。

表 2 不同产地野生蓝莓的花色苷种类鉴定表

Table 2 Identification of anthocyanins in wild blueberries from different production areas

peak	tR /min	[M] ⁺ /(m/z)	MSMS /(m/z)	Anthocyanin	辽宁野生	黑龙江野生	吉林野生
1	7.91	303	465	飞燕草素 3-半乳糖苷	+	+	+
2	8.20	317	479	牵牛素 3-半乳糖苷	+	+	+
3	8.68	331	493	锦葵素 3-半乳糖苷	+	+	+
4	9.75	303	465	飞燕草素 3-葡萄糖苷	+	+	+
5	10.61	303	435	飞燕草素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+
6	11.23	287	449	矢车菊素 3-葡萄糖苷	+	+	+
7	12.08	317	479	牵牛素 3-葡萄糖苷	+	+	+
8	12.59	287	419	矢车菊素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+
9	13.66	317	449	牵牛素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+

10a	14.77	301	463	芍药素 3-葡萄糖苷		+	+
10b	14.77	331	493	锦葵素 3-葡萄糖苷	+		+
11	15.73	331	493	锦葵素 3-葡萄糖苷	+	+	+
12	16.38	317	449	牵牛素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+
13	17.79	331	463	锦葵素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+
14	21.60	331	463	锦葵素 3-阿拉伯糖苷	+	+	+
15	29.55	331	535	锦葵素 3-(6"-乙酰化)葡萄糖苷			+

注：“+”代表该品种中含有此种花色苷。

各野生蓝莓在 520 nm 下的 HPLC-DAD 光谱图较为类似，虽然各峰面积有所不同，但其出峰顺序和峰物质较为吻合。为了更加深入的了解三种蓝莓花色苷的不同之处，将三种蓝莓的花色苷的种类及分布整理汇总如表 3 所示。从表中可以看出，花色苷种类最为丰富的是吉林产地的野生蓝莓，拥有 16 种花色苷。其次是辽宁产地和黑龙江产地的野生蓝莓，各拥有 14 种。

三种野生蓝莓的花色苷种类很接近，相同花色苷达到 13 种，且出峰顺序保持一致。与同时期所做的辽宁地区栽培种蓝莓的花色苷鉴定结果相比较（数据未发表），发现栽培种蓝莓的酰基化花色苷更多，单糖配基的花色苷种类较少。花色苷的酰基化能够较大提高其稳定性，但是它的抗氧化活性也相应较弱^[15]。此外，蓝莓花色苷的糖苷键以单糖为主，整体结构以二聚体为主。刘翠^[16]的研究发现，花青素的生理活性与单体组成、单体之间连接键的形成及聚合度有关，其抗氧化能力比较为：单体<多聚体<二聚体，这可能就是蓝莓花色苷活性较高的原因之一。

表 3 不同产地野生蓝莓中花色苷含量分布

Table 3 Distribution of anthocyanin content in wild blueberries from different production areas

花色苷种类	辽宁野生	黑龙江野生	吉林野生
飞燕草素 3-半乳糖苷	16.25	15.06	17.86
牵牛素 3-半乳糖苷	13.64	15.06	13.18
锦葵素 3-半乳糖苷	3.15	3.36	2.97
飞燕草素 3-葡萄糖苷	16.69	14.45	17.36
飞燕草素 3-阿拉伯糖苷	4.73	5.38	5.30
矢车菊素 3-葡萄糖苷	4.29	6.76	4.90
牵牛素 3-葡萄糖苷	11.44	8.90	10.48
矢车菊素 3-阿拉伯糖苷	0.70	1.18	0.95

牵牛素 3-阿拉伯糖苷	1.41	1.63	1.41
芍药素 3-葡萄糖苷	-	5.25	4.43a
锦葵素 3-葡萄糖苷	3.85	-	4.43a
锦葵素 3-葡萄糖苷	22.94	19.65	17.90
牵牛素 3-阿拉伯糖苷	0.93	0.79	0.89
锦葵素 3-阿拉伯糖苷	1.23	1.71	1.14
锦葵素 3-阿拉伯糖苷	0.88	0.83	0.86
锦葵素 3-(6"-乙酰化)葡萄糖苷	-	-	0.10

注：表中数据为各花色苷峰面积占同一品种花色苷总峰面积的比例（%）；a表示当同一峰中含两种花色苷时，每种花色苷按此峰面积的一半计算。

三种不同产地野生蓝莓的花色苷主要由飞燕草素和牵牛花素以及锦葵素衍生物组成，矢车菊素衍生物其次，芍药素衍生物最低，不含天竺葵素衍生物。飞燕草素衍生物是最主要的花色苷，含量在 34.89~42.21%之间。其次是牵牛花素衍生物，含量在 25.96~32.95%之间。锦葵素衍生物含量在 22.77~31.17%之间。花色苷所带的糖苷配基主要以半乳糖、葡萄糖和阿拉伯糖为主。

3.4 三种蓝莓间抗氧化能力的比较

3.4.1 DPPH 清除率

三种蓝莓的 DPPH 清除率结果如图 5 所示。三种野生蓝莓的 DPPH 清除率在果浆含量大于 20% 后均接近 100%，吉林野生蓝莓的清除率最高。通过每种蓝莓的拟合线性公式计算出清除 50% DPPH 自由基时的果浆含量 IC₅₀，结果表 4 所示，IC₅₀ 越低表示样品清除 50% 自由基所需的浓度越小，既抗氧化能力越好。因此，三种蓝莓的抗氧化能力从高到低依次是吉林野生蓝莓>黑龙江野生蓝莓>辽宁野生蓝莓。

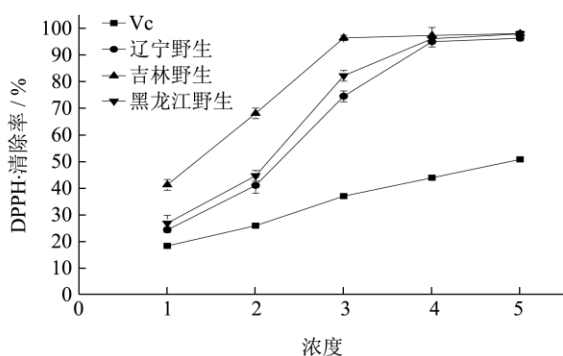


图5 不同产地野生蓝莓的 DPPH 清除率

Fig.5 DPPH scavenging rate of wild blueberries from different production areas

蓝莓果浆含量: 1、2%; 2、5%; 3、10%; 4、20%; 5、30%

Vc 浓度: 1、40 μg/mL; 2、80 μg/mL; 3、120 μg/mL; 4、160 μg/mL; 5、200 μg/mL

表4 不同产地野生蓝莓清除 DPPH·和的·O₂的 IC₅₀值

Table 4 50% inhibitory concentration for DPPH·and O₂ scavenging activities of wild blueberries from different production areas

蓝莓品种	IC ₅₀	
	DPPH 清除率	O ₂ 清除率
辽宁野生种	7.80%	30.93%
吉林野生种	2.94%	27.13%
黑龙江野生种	6.01%	17.91%

将此结果与三种蓝莓的多酚含量和花色苷含量测定结果比对,发现其 DPPH 清除能力与多酚含量以及花色苷含量线性相关成正比,由此表明抗氧化活性与花青素类物质含量具有相关性,这与周方等^[17]得出的结论不一致。此外,刘翠^[16]的研究发现,花青素的生理活性与单体组成、单体之间连接键的形成及聚合度有关,其抗氧化能力单体<多聚体<二聚体。只有吉林野生蓝莓含有一种酰化花色苷,其余产地的野生蓝莓只含有单体花色苷,这可能是野生种蓝莓 DPPH 清除率高于栽培种的原因。

3.4.2 O₂ 清除率

虽然超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 不能直接诱导生物和食品体系中的脂类氧化,但它会在金属离子催化下发生 Fenton 反应产生有高活性的 OH,因此常用样品对超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 的清除能力来反映其抗氧化活性^[18]。

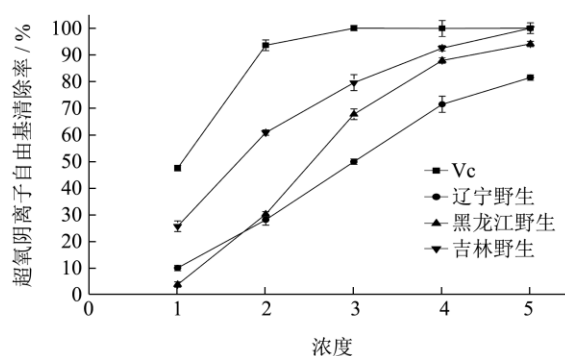


图6 不同产地野生蓝莓的 O₂ 清除率

Fig.6 O₂ scavenging rate of wild blueberries from different production areas

蓝莓果浆含量: 1、10%; 2、20%; 3、30%; 4、40%; 5、50%

Vc 浓度: 1、0.5 mg/mL; 2、1 mg/mL; 3、1.5 mg/mL; 4、2 mg/mL; 5、2.5 mg/mL

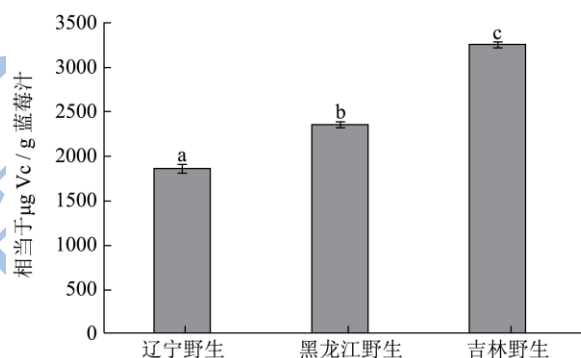


图7 不同产地野生蓝莓的铁还原力

Fig.7 FRAP of wild blueberries from different production areas

注: 图中不同字母表示有显著性差异 (p<0.05)。

4种蓝莓的 O₂ 清除率结果如图6所示,此结果趋势与 DPPH 清除率结果相同。由表4中的 IC₅₀ 值可看出清除能力从低到高依次为辽宁野生蓝莓<黑龙江野生蓝莓<吉林野生蓝莓。

将此结果与多酚含量以及花色苷含量对比,呈线性正相关,与 DPPH 结果一致。但是 O₂⁻ 的清除效果 IC₅₀ 浓度明显大于清除 DPPH,说明蓝莓对 O₂⁻ 的清除能力低于 DPPH。

3.4.3 铁还原力

铁还原力测定结果如图7所示,三种产地野生蓝莓的铁还原力有显著差异,吉林野生蓝莓的铁还原力最高,为当量浓度 3.259 mg Vc/g 蓝莓汁,其次是黑龙江野生蓝莓 2.346 mg Vc/g 蓝莓汁、然后是辽宁野生蓝莓 1.857 mg Vc/g 蓝莓汁。此结果与 DPPH、O₂⁻ 清除率趋势保持一致,且和总酚、花色苷含量呈正相关。此结果与 Tsai 等^[19]研究的 Roselle 水提取物结果大致相同。

综合以上三种指标考察,吉林野生蓝莓的DPPH清除率、O₂清除率和铁还原力均为最高,是三种蓝莓体外抗氧化活性最好的品种。此结果与其总酚含量和总花色苷含量呈线性正相关。可能也与其糖苷配基单糖种类多且酰基化率低有关。其次是黑龙江野生品种、辽宁野生品种。

4 结论

4.1 黑龙江野生蓝莓的可溶性固形物含量较低,且可滴定酸含量较高,其风味较酸不宜鲜食;吉林野生蓝莓具有最高的可溶性固形物含量,适宜作为加工品种。

4.2 吉林野生蓝莓的总酚含量和总花色苷含量最高,分别为395 mg/100 g和308 mg/100 g,且含有花色苷16种,高于含有14种花色苷的辽宁地区及黑龙江地区的野生蓝莓。三种野生蓝莓的糖苷配基均以单糖为主,酰基化率低。四种蓝莓中的花色苷含量从低到依次是辽宁野生<黑龙江野生<吉林野生。

4.3 吉林野生蓝莓的DPPH清除率、O₂清除率和铁还原力均为最高,是体外抗氧化活性最好的品种。此结果与其总酚含量和总花色苷含量线性相关,可能也与其糖苷配基单糖种类多且酰基化率低有关。抗氧化能力从大到小依次为吉林野生>黑龙江野生>辽宁野生。

参考文献

- [1] 吴树森,黄鑫,张友谊,等.大兴安岭野生蓝莓生长气候环境分析[J].中国野生植物资源,2014(4):55-57
WU Shu-sen, HUANG Xin, ZHANG You-yi, et al. Growth climate and environment analysis of wild blueberry in Greater Khingan Mountains [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2014(4): 55-57
- [2] 柳嘉,赵竟,景浩.笃斯越桔多酚提取物成分分析及其抗氧化活性的研究[J].食品科技,2009(9):220-224
LIU Jia, ZHAO Jing, JING Hao. Composition analysis and antioxidant activity of bog bilberry polyphenol extract [J]. Food Science and Technology, 2009(9): 220-224
- [3] Graf D, Seifert S, Jaudszus A, et al. Anthocyanin-Rich juice lowers serum cholesterol, leptin, and resistin and improves plasma fatty acid composition in fischer rats [J]. PLoS One, 2013(No.6): 1-5
- [4] Cai H, Marczyklo TH, Teller N, et al. Anthocyanin-rich red grape extract impedes adenoma development in the Apc(Min) mouse: pharmacodynamic changes and anthocyanin levels in the murine biophase [J]. European Journal of Cancer, 2010(No.4): 811-817
- [5] Cao X, Zhang Y, Zhang F, et al. Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(5): 877-885
- [6] Xu Z, Wu J, Zhang Y, et al. Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO₂ [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7151-7157
- [7] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25-30
- [8] Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1980, 200(1): 1-16
- [9] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical biochemistry, 1996, 239(1): 70-76
- [10] Mattila P, Hellström J, Törönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7193-7199
- [11] Prior R L, Cao G, Martin A, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(7): 2686-2693
- [12] 李颖畅,孟宪军,修英涛,等.化学发光法测定蓝莓花色苷对氧自由基的清除作用[J].食品研究与开发杂志, 2008, 3:72-75
LI Ying-chang, MENG Xian-jun, XIU Ying-tao, et al. Chemiluminescence determination of Blueberry anthocyanins on oxygen free radical scavenging effects [J]. Food Research and Development, 2008, 3: 72-75
- [13] Tian Q, Konczak I, Schwartz S J. Probing anthocyanin profiles in purple sweet potato cell line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(16): 6503-6509
- [14] Wu X, Prior R L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries [J]. Journal of Agricultural And Food Chemistry, 2005, 53(7): 2589-2599
- [15] Odake K, Terahara N, Saito N, et al. Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoea

- batatas [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(6): 2127-2130
- [16] 刘翠. 中国野生笃斯越橘花青素的提取分离, 组分分析及抗氧化活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009
- LIU Cui. Purification, composition analysis and anti-oxidation activity of anthocyanidins in Blueberries (*Vaccinium uliginosum*) of China [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009
- [17] 周方, 赵宏飞, 杨洋. 高丛蓝莓品种花青素含量与抗氧化能力比较[J]. 西南林学院学报, 2011, 31(5): 53-57
- ZHOU Fang, ZHAO Hong-fei, YANG Yang. Comparative study on anthocyanin level and antioxidant activity among the tall-stemmed blueberry cultivars [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2011, 31(5): 53-57
- [18] 刘志东, 郭本恒, 王荫榆. 抗氧化活性检测方法的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 563-567
- LIU Zhi-dong, GUO Ben-heng, WANG Yin-yu. Methods to determine antioxidative activity [J]. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20(3): 563-567
- [19] Tsai P J, McIntosh J, Pearce P, et al. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract [J]. *Food Research International*, 2002, 35(4): 351-356