

# 栽培蓝莓—园蓝的抗氧化活性及其活性化合物的定性定量

简卫琴<sup>1,2</sup>, 张枝润<sup>1</sup>, 韩中惠<sup>1</sup>, 柏石头<sup>1,2</sup>, 张维明<sup>1</sup>, 赵声兰<sup>2</sup>, 李忠荣<sup>1</sup>, 邱明华<sup>1,2</sup>

(1. 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201; 2. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

**摘要:**为测定栽培蓝莓—园蓝果实中的抗氧化活性及其总花色苷含量,以贵州产园蓝鲜果为原料,经甲醇处理、大孔吸附树脂分离得出抗氧化活性最好的部位。然后对其进行了制备分离得到一单体化合物,经<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、ESI-MS进行了结构鉴定,利用Rp-HPLC进行了该化合物的含量测定。以该化合物为对照品,对园蓝果实中总花色苷含量进行了定量分析。研究表明:贵州产园蓝提取物富含花青素部分1mg/mL浓度的抗氧化活性与等浓度的维生素C的活性相当,鉴定的单体化合物为锦葵色素-3-O-葡萄糖,其纯度达96%,园蓝鲜果中总花青素平均含量为627.7mg/100g。指出了园蓝鲜果花色苷含量高,主成分为锦葵色素-3-O-葡萄糖,花青素具有较好的抗氧化活性。建议每人每天食用2g园蓝鲜果作为人体补充抗氧化剂的来源。

**关键词:**园蓝;抗氧化性;花色苷;锦葵色素-3-O-葡萄糖  
中图分类号:R284 文献标识码:A

文章编号:1674-9944(2014)11-0077-04

## 1 引言

兔眼蓝莓为杜鹃花科(*Ericaceae*)越橘属(*Vaccinium*)野生兔眼越橘(*Vaccinium ashei* Reade)类品种中选育出来的栽培品种,因果实成熟前其颜色红如兔眼而得名。园蓝(*Gardenblue*)为兔眼蓝莓栽培品种之一。蓝莓具有丰富的营养价值,果实富含花青素、维生素、黄酮类化合物等<sup>[1]</sup>。花青素(*Anthocyanin*)又名花色素,属类黄酮类化合物,是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,多以糖苷形式存在,又称花色苷。蓝莓花青素种类丰富,有报道的花色苷有18种<sup>[2]</sup>。不同越橘品种总花青素含量差别较大。杨桂霞等对16种越橘果鲜果

的花色苷含量做了测定,结果花色苷含量为258.76~613.18mg/100g<sup>[3]</sup>。花青素具有很多生物活性,如抗氧化活性,Li-Qion等研究发现飞燕草色素和花青素-3-O-葡萄糖为蓝莓中主要抗氧化活性成分<sup>[4]</sup>;抗肿瘤活性,Andrea Bunea等研究发现蓝莓栽培品种Torro的花青素(ARF-T)含量超过500μg/mL时,对转移性黑色素瘤B16-F10小鼠细胞的增殖具有一定的抑制作用,同时ARF-T能够诱导细胞凋亡和提高脾细胞对肿瘤细胞杀伤活性<sup>[5]</sup>;同时还具有降脂<sup>[6]</sup>、预防心脑血管疾病、保护肝脏、降低DNA氧化损伤<sup>[7]</sup>等多种生物活性。目前蓝莓总花青素含量测定方法主要有紫外、pH示差

收稿日期:2014-10-15

基金项目:中科院—贵州省合作计划科技支黔计划项目(编号:XBGZ-2012)资助

作者简介:简卫琴(1990—),女,江西吉安人,硕士研究生,主要从事中药化学方面的研究工作。

通讯作者:邱明华(1963—),男,云南丽江人,博士,研究员,博士生导师,主要从事植物资源化学研究。

## Analysis of Restrict Factor of Vegetation Recovery in "Five Mining Areas" of Xishan Forestry Center

Xiao Ronghua

(Southwest Forestry University, Jian 343000, China)

**Abstract:** Xishan forestry center, which is located in the western suburbs of Kunming and in Dianchi Lake belt, is an important ecological barrier of Kunming. In recent years, the demand for building stone shoots up due to the economic and social development in Kunming, which, makes the rapid increase of mining areas of "five mining areas" in the field region and causes great destruction of the original forest vegetation. Therefore, the ecological governance of local ecological landscape and Dianchi Lake basin is seriously affected. Based on field visits, and combined with the practical situation of "five mining areas" in Xishan forestry center, the article adopts AHP, namely analytic hierarchy process to analyze the restrict factors of vegetation recovery in "five mining areas" in the field region. In the end, the article summarizes that the serious shortage of capital investment, ambiguous mining right and, poor site conditions are the main factors which block the vegetation recovery in "five mining area". The article provides some references and basis for the relevant decision-making sections.

**Key words:** five mining areas; Xishan Forestry center; vegetation recovery; AHP

法及 HPLC 等,其中 HPLC 法快速、稳定、方便、可靠<sup>[2]</sup>。本文以蓝莓品种园蓝的甲醇提取物为原料,采用活性追踪的方法,对活性最好的部分进行分离纯化,采用<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、ESI-MS 技术对得到花色苷进行结构鉴定,并将其作为标准品,采用 HPLC 法测定园蓝中总花青素含量。

## 2 仪器、材料与试剂

### 2.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);澳柯玛冰柜(澳柯玛股份有限公司);XY-FD-50S 钟罩式冻干机(上海欣谕仪器有限公司);超声波清洗器(巩义市予华仪器有限责任公司);21 型可见光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);AV800 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);Xevo TQ-S 超高压液相色谱三重四级杆串联质谱联用仪(英国 Waters 公司)。

### 2.2 材料与试剂

园蓝成熟果实于 2012 年 8 月份在贵州麻江蓝莓种植基地采摘,采摘后于 -4℃ 冰箱中存放;Diaion HP-20 大孔吸附树脂(日本三菱树脂株式会社);200-300 目硅胶(青岛谱科分离材料有限公司);Sephadex LH-20 凝胶(GE);色谱纯甲醇(Hipure Chem);分析纯 85% 磷酸(川东化工有限公司);水为纯净水;其他试剂皆为分析纯。

## 3 方法分析

### 3.1 兔眼蓝莓花青素羟自由基清除率的研究

#### 3.1.1 待测液的制备

取一定量的园蓝鲜果用榨汁机匀浆后,以 1:5 料液比添加含有 3% 冰醋酸的甲醇溶液,浸泡 1h 后,超声提取 30min,过滤除去果渣,减压浓缩,得到浸膏。浸膏以 Diaion HP-20 为固定相,纯水、10%、30%、50%、100% 甲醇水和 50% 丙酮水梯度洗脱,洗脱液经 TLC 划段,分为 10 段:Fr. 1~10,把这 10 部分分别配成浓度为 1mg/mL 和 10mg/mL 的待测液。

#### 3.1.2 羟自由基清除率实验

采用 Fenton 体系测定个段位(Fr. 1~10)对·OH 的抑制作用。Fe<sup>2+</sup>与邻二氮菲能够生成稳定的橙红色络合物在 536nm 波长有最大吸收峰,A536 与络合物的含量存在线性关系,通过计算 A536 吸收值的变化,得到样品对·OH 的清除能力,测定方法见表 1。

表 1 自由基清除率测定方法

溶液用量/mL	样品空白	未损伤	损伤	样品
150mmol/L 磷酸盐缓冲溶液	1	1	1	1
样品液	0.25	—	—	0.25
0.75mmol/L 邻二氮菲	—	1	1	1
0.75mmol/L FeSO <sub>4</sub>	—	1	1	1
0.01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	—	—	0.5	0.5
蒸馏水	2.5	0.75	0.25	—

混匀后再 37℃ 水浴 60min,取出后立即在 536nm 波长处以空白管调零,测定其吸光度

清除率采用下列方法进行计算:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}) \div (A_{\text{未损伤}} - A_{\text{损伤}}) \times 100.$$

### 3.2 标准品的制备

#### 3.2.1 色谱条件

色谱柱 4.6×250nm, ZORBAX SB-C18, Agilent; 柱温 35℃; 进样量 5 μL; 流量 1.000mL/min; 检测波长 520nm; 流动相 A 为 1% 磷酸水, B 为甲醇; 洗脱梯度 0~25min 20% (B)→30% (B), 25~35min 30% (B)→45% (B), 35~40min 45% (B)→50% (B)。

#### 3.2.2 花色苷的分离纯化

对上述浸膏过 Diaion HP-20 柱后得到的 Fr. 10 进行分离纯化。以硅胶为固定相, 氯仿/甲醇/水为洗脱系统, 梯度为 8:2:0.2→7:3:0.5→6:4:1。通过 HPLC 分析检测分为 Fr. 4.1~Fr. 4.4。Fr. 4.4 经反复 Sephadex LH-20 纯化得到化合物 1。采用<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、ESI-MS 技术鉴定其结构。

### 3.3 总花青素含量的测定

#### 3.3.1 待测液的配制

(1) 对照品配制。精密称取化合物 12.200mg 于 10mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 0.22mg/mL 的标准品溶液, 用 0.22μm 滤膜过滤备用, 标准品的 HPLC 色谱分析图见图 1。

(2) 样品液的配制。称取园蓝鲜果 2.0000g (Md), 碾碎, 甲醇超声提取, 减压浓缩, 得浸膏 0.3422g (Mt), 精密称取浓缩物 0.0541g 于 10mL 容量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 5.4100mg/mL 的供试品溶液, 供试品溶液的 HPLC 色谱分析图见图 1。

#### 3.3.2 标准曲线的绘制

取配制好的对照品溶液, 按 2.3.1 项下的色谱条件进行分析, 进样量分别为: 1、2、3、4、5、7、10 μL, 重复测试 3 次。以化合物 1 质量(μg)为横坐标, 峰面积平均值为纵坐标作图, 进行线性回归分析, 计算得线性方程:  $y = 903.19x + 0.4347, R^2 = 0.9999$ , 结果表明, 标准品化合物 1 在 0.22~2.2μg 与峰面积成良好线性关系。

#### 3.3.3 精密度实验

取上述标准品溶液, 按 3.2.1 项的色谱条件下进行检测, 进样量 5 μL, 重复进样 6 次, 结果显示峰面积 RSD 为 1.65%。

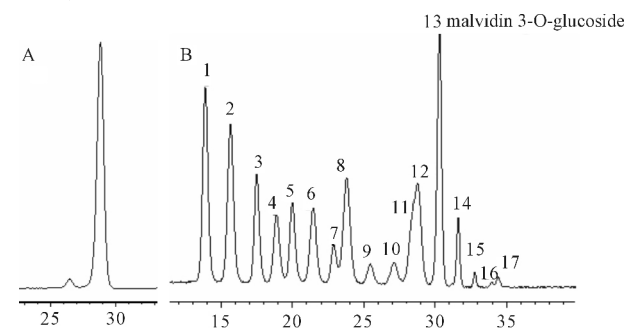


图 1 标准品锦葵色素-3-O-葡萄糖(A)、供试品溶液(B) HPLC 色谱图

#### 3.3.4 稳定性试验

取鲜果园蓝按 3.3.1 中(1)段方法制备供试品溶液, 室温放置, 按上述色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24h

进行检测。结果显示峰面积 RSD 为 1.21%，表明该方法在 24 h 内稳定性良好。

3.3.5 重现性实验

取鲜果园蓝按 3.3.1 中(2)段方法平行制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件进行检测,结果 6 份供试品溶液总峰面积的 RSD 为 0.75%。

3.3.6 加样回收实验

精密称取园蓝鲜果浸膏 50.4000mg,加标准品溶液 5mL 于 10mL 容量瓶中,用分析纯甲醇定容得样品液,平行 3 份。按上述色谱条件进行检测,结果加样回收率分别为 95.42%、94.71%和 95.64%,RSD 为 0.51%。

3.3.7 总花青素含量测定

取园蓝鲜果按 3.3.1 中(2)方法制备供试品溶液,平行 3 份,按上述色谱条件进行检测,根据外标法计算,得到花青素的含量,浸膏中花青素含量计算公式如下:

$$x_i \% = \frac{X_j}{C_i \times 10^{-3} \times V_j} \times 100$$

式中: $x_i$  为提取物浸膏中花青素含量; $X_j$  为供试品溶液 5 $\mu$ L 进样量中花青素含量(mg); $C_i$  为供试品溶液浓度(mg/mL); $V_j$  为供试品溶液的进样量( $\mu$ L)。

冻干果中花青素含量计算公式如下:

$$x_i \% = x_i \times \frac{M_i}{M_d}$$

式中: $x_i$  为园蓝鲜果中花青素含量; $M_i$  为园蓝鲜果提取物浸膏的质量(g); $M_d$  为园蓝鲜果的质量(g)。

4 结果分析

4.1 抗氧化作用

Diaion HP-20 划段后各 Fraction 的抗氧化活性如图 2 所示,可知在高浓度下(10mg/mL)除 Fr.1(糖)和 Fr.8(紫色未知)活性较低外,其他各部分均有较好的抗氧化活性;但是低浓度(1mg/mL)除 Fr.10 的抗氧化活性与 Vc 的抗氧化活性相当,其余部分的抗氧化活性明显降低,而其中有 520nm 特征吸收峰的为 Fr.10,说明 Fr.10 为含花青素段。实验说明,高、低浓度下花青素部分均有良好的抗氧化活性,且低浓度时的抗氧化活性与等浓度的维生素 C 的活性相当。

4.2 化合物 1 结构鉴定

化合物 1 为紫色粉末,易溶于甲醇,ESI-MS: $m/z$  493[ $M^+$ ],碎片离子峰 331,通过核磁共振谱图数据分析,化合物 1 的化学结构确定为锦葵色素-3-O-葡萄糖(malvidin 3-O-glucoside)<sup>[8]</sup>。经 HPLC 峰面积归一化法测得其含量 96%。

化合物 1 的波谱数据:<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, CD<sub>3</sub>OD):9.062 (s, H-4)、8.017(s, H-2', 6'), 7.001 (d, J = 0.8 Hz, H-8)、6.691(d, J=1.6Hz, H-6)、4.028(s, 2 x-CH<sub>3</sub>)、5.378(d, J=8Hz, H-1'')、3.670(t, J=8Hz, H-2'')、3.579(t, J=8.8Hz, H-3'')、3.438(t, J=8.8Hz, H-4'')、3.942(q, J=2.4Hz, H-5'')、4.315 (m, H-6''a)、4.090 (m, H-6''b); C13-DEPT (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):162.59(C-2, q)、144.4(C-3, q)、135.72(C-4, t)、157.92(C-5, q)、102.46(C-6, d)、169.

29(C-7, q)、93.96(C-8, d)、156.53(C-9, q)、112.25 (C-10, q)、118.45(C-1', q)、109.24(C-2', C-6', t)、148.35(C-3', C-5', q)、144.80(C-4', q)、55.88 (-CH<sub>3</sub>)、55.87(-CH<sub>3</sub>)、101.93(C-1'', t)、73.63(C-2'', t)、77.54(C-3'', t)、69.80(C-4'', t)、76.82(C-5'', t)、60.99(C-6'', d)。

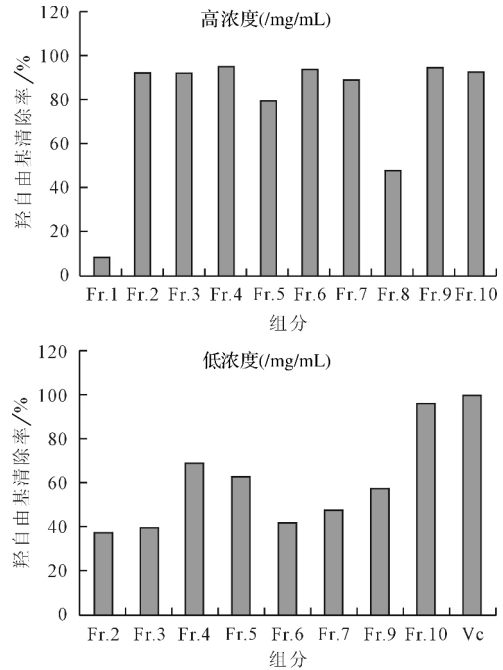


图 2 高、低浓度下各段的抗氧化活性

4.3 总花青素含量

从表 2 中可知,园蓝鲜果甲醇提取物浸膏中花青素的百分含量为 3.669%,鲜果中总花青素平均含量为 627.7mg/100g。用相同的方法测得园蓝冻干果中总花青素含量为 4.709g/100g。园蓝鲜果花色苷中化合物 1 含量最高为 126.8mg/100g。

5 结语

园蓝提取物具有较强的抗氧化活性:非花青素部分在高浓度的情况下具有较好的抗氧化活性,而花青素部分在低浓度的情况下就能达到与高浓度时相当的抗氧化活性,且与 Vc 的清除自由基的能力相当,都说明园蓝花青素具有很好的抗氧化活性。同时实验还表明园蓝花青素中,主成分为锦葵色素-3-O-葡萄糖。对其花青素含量进行测定,不仅能为花青素的综合利用提供理论依据和数据支持,还可以指导人们对蓝莓花青素的日常使用,据报道每人每天摄入花青素量约为 12.5mg<sup>[9]</sup>,以此推算如果是食用以上的品种的蓝莓鲜果,每人每天食用约 2g 园蓝鲜果即可满足摄入花青素的要求。

表 2 园蓝鲜果花青素含量分析表

样品编号	$X_j / (\times 10^{-4} \text{mg})$	$x_i \%$	$x_i \%$
1	9.943	3.676	0.6290
2	9.904	3.661	0.6264
3	9.924	3.669	0.6277
花青素平均含量	9.924	3.669	0.6277

## 参考文献:

- [1] 朱麟,凌建刚,康孟利,等.不同包装方式对兔眼蓝莓保鲜效果的影响[J].食品与发酵工业,2012,38(3):190~193.
- [2] Gad G. Yousef, Allan F. Brown, Yayoi Funakoshi, et al. Efficient Quantification of the Health—Relevant Anthocyanin and Phenolic Acid Profiles in Commercial Cultivars and Breeding Selections of Blueberries (*Vaccinium* spp.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2013(61): 4806~4815.
- [3] 杨桂霞,范海林,李亚东,等. RP—HPLC 法测定栽培种越橘果中花色苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1222~1224.
- [4] Li—Qiong Sun, Xiao—Ping Ding, Jin Qi, et al. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum—effect relationships and DP—PH—HPLC—DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China [J]. *Food Chemistry*, 2012(132): 759~765.
- [5] Andrea Bunea, Dumitrita Rugina, Zorita Seonta, et al. Analysis and Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16—F10 metastatic murine melanoma cells [J]. *Phytochemistry*, 2013(95): 436~444.
- [6] Tao Wu, Xueming Qi, Yan Liu, et al. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high—fat diet fed C57BL/6 mice [J]. *Food Chemistry*, 2013(141): 482~487.
- [7] Xiaolan Yang, Lei Yang, et al. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010(48): 2374~2379.
- [8] Maria J. Aguirre, Yo Y. Chen, Mauricio Isaacs, et al. Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry [J]. *Food Chemistry*, 2010(121): 44~48.
- [9] Wu X, Beecher GR, Holden J M, et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(11): 4069~4075.

## Antioxidant Activity of the Cultivated Blueberry—Gardenblue and Qualitative and Quantitative Analysis of Active Compounds of Cultivated Blueberry—Gardenblue

Jian Weiqin<sup>1,2</sup>, Zhang Zhirun<sup>1</sup>, Han Zhonghui<sup>1</sup>, Bai Shitou<sup>1,2</sup>, Zhang Weiming<sup>1</sup>, Zhao Shenglan<sup>2</sup>, Li Zhongrong<sup>1</sup>, Qiu Minghua<sup>1,2</sup>

(1. *State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China*; 2. *Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China*)

**Abstract:** The Objective of the article is to determine the antioxidant activity and quantification of anthocyanin in the cultivated blueberry—gardenblue. The Method of the experiment is that taking the fresh fruit of gardenblue cultivated in Guizhou province as raw material and extracting the part of the best antioxidant activity through methanol treatment and macroreticular resin. Then, the preparative separations of part of the best antioxidant activity gets monomeric compound which is tested <sup>1</sup>H—NMR, <sup>13</sup>C—NMR and ESI—MS, and quantitative analysis of the monomeric compound is done based on Rp—HPLC. Considering the compound as a comparison product, the experiment makes a quantitative analysis of total anthocyanidins. The results show that in the extracted part which contains anthocyanidins, 1mg/mL concentration's antioxidant activity is equivalent to that of the same concentration of Vitamin C. The appraised monomeric compound is malvidin—3—O—glucose whose purity reaches 96%. The average content of total anthocyanin of gardenblue's fresh fruits is 627.7mg/100g. The conclusion is that the gardenblue contains the richest anthocyanin whose main component is malvidin 3—O—glucose, and, anthocyanin shows a better antioxidant activity. Therefore, the article advises that people should consume 2 g fresh fruits of gardenblue everyday as the source of antioxidant.

**Key words:** gardenblue; antioxidant activity; anthocyanin; malvidin 3—O—glucose