

学校代码：10225
学 号：S12810

学 位 论 文

蓝靛果花色苷分离及其抗氧化 与抗癌功能研究

刘 奕 琳

指导教师姓名：王振宇 教授 东北林业大学
申请学位级别：硕 士 学 科 专 业：食品科学
论文提交日期：2012年4月 论文答辩日期：2012年6月
授予学位单位：东北林业大学 授予学位日期：2012年6月

答辩委员会主席：
论文评阅人：

东北林业大学

University Code: 10225

Register Code : S12810

Dissertation for the Degree of Master

Seperation and reseach on antioxidant and anticancer anthocyanin of Lonocera edulis

Candidate: Liu Yilin
Supervisor: Prof.Wang Zhenyu
Associate Supervisor:
Academic Degree Applied for: Master of Engineering
Speciality: Food Science
Date of Oral Examination: June,2012
University: Northeast Forestry University

摘要

蓝靛果作为一种野生浆果具有丰富的生物活性成分，并且具有极高的营养保健功能，其花色苷天然无毒，可以作为天然色素应用在食品色素中。蓝靛果花色苷还具有抗氧化性和抗癌作用，相关报道有很多，但大多是关于花色苷粗提物或者纯化后的总花色苷，蓝靛果中的花色苷种类较多，不同种类的花色苷的抗氧化性和抗癌作用尚无报道。

本实验研究了蓝靛果花色苷经梯度洗脱分离纯化后，在抗氧化性和抗癌作用方面的比较，筛选出功能最强的洗脱物，并且对蓝靛果花色苷的提取也做了研究，为后续实验做了铺垫。旨在为其今后的开发利用提供参考。

采用有机溶剂萃取法提取蓝靛果的花色苷，通过单因素和响应面实验确定最佳的提取条件。各因素对蓝靛果花色苷提取量的影响作用从大到小为：乙醇浓度>温度>液料比。提取剂乙醇浓度 61%，液料比 81:1，提取温度 59℃，提取时间 60min。

利用不同的自由基评价体系比较了花色苷粗提物及其纯化后的洗脱物的抗氧化性，筛选出清除率最高的组分。实验结果表明在·OH 体系中，60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对羟自由基的清除率最高；在 $O_2^{\cdot-}$ 体系中，60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对超氧自由基的清除率最高；在 DPPH 体系中，40%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 DPPH 自由基的清除率最高；在 ABTS 体系中，10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 ABTS 自由基的清除率最高。总体看来，10%、40%、50%和 60%乙醇洗脱物的抗氧化活性较 20%、30%、70%和 80%乙醇洗脱物高。

将不同的蓝靛果花色苷洗脱物作用于人肺癌 A-549、人肝癌 HepG2 和人宫颈癌 Hela 三种常见的癌细胞 24h、48h 和 72h，采用四甲基偶氮唑盐（MTT）比色法测定癌细胞抑制率。实验结果表明每种蓝靛果花色苷洗脱物对三种癌细胞都有抑制作用，并呈现量效和时效关系。其中 10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对三种癌细胞的抑制率最高。

综上所述，蓝靛果具有很好的抗氧化性和抗癌作用，是值得开发并运用到食品药品等领域的天然绿色食品。

关键词 蓝靛果；花色苷；抗氧化性；抗癌

Abstract

Lonicera edulis as a wild berries with rich biological active components, and has high nutrition and health care function. It's anthocyanins are natural non-toxic, can be used as natural pigment in food pigment application. *Lonicera edulis* anthocyanin has antioxidant and anticancer effects, there are many reports, but mostly on anthocyanin bold or purified anthocyanins, *Lonicera edulis* anthocyanins in many types, different types of anthocyanin antioxidant and anticancer effects has not been reported yet.

The experimental study of *Lonicera edulis* anthocyanin by separation and purification, the comparison of antioxidant and anticancer effects, screening out the most powerful elution, and also did study of *Lonicera edulis* anthocyanin extraction, paving the way for a follow-up experiment. Designed for the future development and utilization of reference.

Using organic solvent extraction of *Lonicera edulis* anthocyanin, through the single factor and response surface experiment to determine the optimal extraction conditions. The factors of *Lonicera edulis* anthocyanin extraction volume effect from big to small is: ethanol concentration > temperature > liquid ratio. Extraction of ethanol concentration is 61%, liquid ratio is 81:1, the extraction temperature is 59 degrees, extraction time is 60min.

The use of different free radical evaluation system comparison of anthocyanin extracts and purified the eluted analyte oxidation resistance, screening out the clearance rate highest fractions. The experimental results show that in the OH system, 60% ethanol elution of anthocyanin eluate on hydroxyl radical scavenging rate is highest; in $O_2^{\cdot-}$ system, 60% ethanol elution of anthocyanin eluate on superoxide radical scavenging rate is highest; in the DPPH system, 40% ethanol elution patterns glycoside eluate on DPPH radical scavenging rate is highest; in the ABTS system, 10% ethanol elution of anthocyanin eluate on ABTS radical scavenging rate. Overall, 10%, 40%, 50% and 60% ethanol elution of antioxidant activity higher than the 20%, 30%, 70% and 80% ethanol elution.

Different *Lonicera edulis* anthocyanin elution effects on human lung cancer A-549, human hepatoma HepG2 and human cervical carcinoma Hela three common tumor cells of 24h, 48h and 72h, using four methyl thiazolyl tetrazolium salt (MTT) colorimetric method for the determination of cancer cell inhibition rate. The experimental results show that each kind of *Lonicera edulis* anthocyanin eluate on three kinds of tumor cells are inhibited, and presents the dose-effect and time-effect relationship. Among the 10% ethanol elution of anthocyanin eluate on three kinds of tumor cell inhibition rate maximum.

To sum up, *Lonicera edulis* has very good antioxidant and anticancer effects, it is developed and applied to food medicine and other fields of the natural green food.

Keywords *Lonicera edulis*;anthocyanin;antioxidance;anticancer

摘要	I
Abstract	II
1 绪论	1
1.1 蓝靛果的研究现状.....	1
1.1.1 蓝靛果的营养价值.....	1
1.1.2 蓝靛果的药用价值.....	1
1.1.3 蓝靛果的抗氧化性.....	2
1.1.4 蓝靛果的开发现状与前景.....	2
1.2 花色苷的结构和性质.....	2
1.2.1 花色苷的结构.....	3
1.2.2 花色苷的性质.....	3
1.3 花色苷的提取.....	3
1.3.1 有机溶剂萃取.....	3
1.3.2 生物酶解萃取.....	4
1.3.3 超临界 CO ₂ 提取.....	4
1.3.4 超声波辅助提取.....	4
1.3.5 微波辅助提取.....	4
1.3.6 高压脉冲电场辅助提取.....	5
1.4 花色苷的纯化.....	5
1.4.1 柱层析.....	5
1.4.2 薄层层析.....	6
1.4.3 高速逆流色谱.....	6
1.4.4 膜分离法.....	7
1.4.5 重结晶法.....	7
1.5 花色苷的定量测定.....	7
1.5.1 单一 pH 法.....	7
1.5.2 pH 示差法.....	7
1.5.3 差减法.....	8
1.6 花色苷的生理功能.....	8
1.6.1 抗氧化活性.....	8
1.6.2 抗癌作用.....	8
1.6.3 延缓衰老和预防各种老年疾病.....	9
1.6.4 抗炎、抗菌.....	9

1.7 研究目的和意义	10
1.8 研究内容和方法	10
2 响应面法优化蓝靛果花色苷提取工艺参数	11
2.1 引言	11
2.2 实验材料及仪器	11
2.2.1 实验材料	11
2.2.2 实验仪器	11
2.3 实验方法	11
2.3.1 原料预处理	11
2.3.2 花色苷含量的测定	12
2.3.3 蓝靛果花色苷的单因素提取	12
2.3.4 响应面实验方案	13
2.4 实验结果与分析	14
2.4.1 测定波长的选择	14
2.4.2 乙醇浓度对花色苷提取的影响	14
2.4.3 液料比对花色苷提取的影响	15
2.4.4 温度对花色苷提取的影响	15
2.4.5 时间对花色苷含量的影响	16
2.4.6 响应面法优化结果	16
2.5 本章小结	19
3 蓝靛果花色苷抗氧化性的研究	20
3.1 引言	20
3.2 实验材料及仪器	20
3.2.1 实验材料	20
3.2.2 实验仪器	20
3.3 实验方法	21
3.3.1 蓝靛果花色苷粗提液的制备	21
3.3.2 大孔树脂的预处理与湿法装柱	21
3.3.3 大孔树脂的筛选	21
3.3.4 蓝靛果花色苷洗脱物的制备	21
3.3.5 羟自由基清除能力的测定	21
3.3.6 超氧自由基清除能力的测定	22
3.3.7 DPPH 自由基清除能力的测定	22
3.3.8 ABTS 自由基清除能力的测定	22
3.4 实验结果与分析	22
3.4.1 大孔树脂的筛选	22

3.4.2 分级洗脱花色苷清除羟自由基的能力	23
3.4.3 分级洗脱花色苷清除超氧自由基的能力.....	24
3.4.4 分级洗脱花色苷清除 DPPH 自由基的能力	25
3.4.5 分级洗脱花色苷清除 ABTS 的能力	26
3.5 本章小结.....	26
4 蓝靛果花色苷抗癌功能的研究	28
4.1 引言	28
4.2 实验材料及仪器	28
4.2.1 实验材料.....	28
4.2.2 实验仪器.....	28
4.3 实验方法.....	29
4.3.1 溶液的配制.....	29
4.3.2 细胞培养.....	29
4.3.3 蓝靛果花色苷洗脱物的制备.....	30
4.3.4 蓝靛果花色苷对癌细胞抑制率的测定	30
4.4 实验结果与分析	30
4.4.1 蓝靛果花色苷洗脱物对人肺癌 A-549 细胞的抑制作用	30
4.4.2 蓝靛果花色苷洗脱物对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用	32
4.4.3 蓝靛果花色苷洗脱物对人宫颈 Hela 细胞的抑制作用.....	33
4.5 本章小结.....	34
结论.....	35
参考文献	36
攻读学位期间发表的学术论文	43
致谢.....	44

1 绪论

1.1 蓝靛果的研究现状

蓝靛果忍冬(*Lonicera edulis Turcz.*)也简称为蓝靛果,民间俗称黑瞎子果,部分地区也称之为羊奶子或者山茄子等等,是被子植物门的忍冬科的忍冬属。它是一种生长地区较为广泛的落叶灌木,喜欢湿润冷凉性气候,能够适应寒冷。一般生长于山林、湿地和丛林灌木之中^[1~3]。蓝靛果的品种较多,都是从欧洲的原始种变异而来,主要分布在亚洲、美洲和欧洲。在中国的东北和华北地区其野生资源广泛,尤其在长白山地区和大小兴安岭^[4,5]。在其中含有大量天然活性成分,比如花青素、维生素、矿质元素等。作为一种纯天然的可食用浆果并且具有极高的营养价值和保健价值,已经成为世界珍稀浆果。近年来蓝靛果忍冬受到国内外学者的重视,对其生物学特征、品种选育、人工栽培和营养成分测定等方面做了大量的实验研究^[6~9]。作为一种营养丰富的绿色浆果其已经具有广阔的发展空间。

1.1.1 蓝靛果的营养价值

作为一种浆果蓝靛果的营养极其丰富。国外的实验中鉴定出蓝靛果中含有丰富的氨基酸、维生素、矿质元素等大量的生物活性物质;还有研究中发现蓝靛果中的碳水化合物以葡萄糖为最多,其中的多元醇以山梨糖醇为最多,有机酸中以柠檬酸含量为最多;Anikina,E.V等其他研究人员从蓝靛果提取物中检测出苦味物质;其中苦味物质是三种苹果酸酯,二丁基苹果酸酯含量最多。国内研究测得微量元素在其干物质中的种类及含量,以及维生素、总酸、总糖在鲜果中的含量;研究者还测定出其中含有十六种氨基酸,必需氨基酸有九种;蓝靛果中含有维生素 B1、维生素 B2、抗坏血酸、尼克酸等多种维生素,其中尼克酸含量比水果高出近百倍,并且含有丰富的氨基酸,其中必需氨基酸占总量 40%,黄酮类化合物总含量为 1.3%^[10]。

1.1.2 蓝靛果的药用价值

现代医学和大量的实验研究表明蓝靛果可以降低血压,防止毛细血管破裂,并且具有清热解毒的功效;还有实验表明蓝靛果具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤能力,可以缓解癌症病人在放疗后的不良反应和化疗后的白细胞减少。有研究表明蓝靛果的叶子中 V_C 的含量为 0.07%;Zholobova,Z.P.^[11]证实果实中含有丰富的天然活性物质,例如花青素、芸香苷和儿茶酸等。临床实验表明这些活性物质具有抗病毒和抗炎等功效。有实验表明蓝靛果没有毒性^[12];金政^[13~15]研究了蓝靛果对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的影响,实验结果表明蓝靛果能减少小鼠肝细胞中脂滴和溶酶体的数量,缩小肝小叶损伤区域,增强琥珀酸脱氢酶的活性、降低血清谷草转氨酶和酸性磷酸酶的活性,还能促进线粒体恢复和再生,得出的结论是蓝靛果提取物对肝脏损伤具有保护作用;邱绍婕等^[16,17]等实验人

员,研究了蓝靛果对小鼠的耐高温、抗疲劳、耐缺氧能力,以及提高应激反应能力,发现蓝靛果具有提高这些指标的能力,且能明显缓解小鼠服用化疗药后白细胞的降低和体重减轻,提高其成活率;韩京振^[18]等其他研究人员,研究证明,蓝靛果能改善小鼠心肌氧的供应和需求,保护缺氧的小鼠,对治疗冠心病有一定作用。其乙酸乙酯提取物能够抑制肉瘤和肝癌实体瘤的生长^[19],并且可以诱导白血病 HL-60 细胞凋亡^[20]。

1.1.3 蓝靛果的抗氧化性

蓝靛果不仅营养丰富药用功能显著^[21],还可以作为天然抗氧化剂^[22]。蓝靛果中含有丰富的氨基酸、维生素、微量元素,以及大量的黄酮、多酚和花色苷^[23]。大量的实验显示蓝靛果的抗氧化性高于很多浆果类植物。蓝靛果的提取物对各种自由基都有很高的清除能力^[24]。并且其具有化学抑制及治疗的功能^[25,26]。

蓝靛果提取液的高效液相色谱分析显示:其中存在有鞣花酸,槲皮素 3-糖苷,槲皮素 3-鼠李糖苷,4,5,7-三羟基黄酮 3-糖苷及其衍生物,花青素 3-糖苷及其衍生物,花葵素 3-糖苷,花青素 3-木糖苷,二羧酸酰化花青素 3-糖苷衍生物^[20],这些都是具有抗氧化性,其中的花青素 3-糖苷最强。实验表明花色苷可以用于射线保护剂、催产素和化疗药物^[27]、降低毛细血管脆性、抑制血小板聚集、加强组织中的胶原蛋白基质交联^[28]。花青素具有抗氧化和防止射线损伤的能力^[29]。

1.1.4 蓝靛果的开发现状与前景

蓝靛果因其具有的功能,在国际市场也具有了广阔的发展前景,如今俄罗斯将蓝靛果加工成保健饮料,专为宇航员饮用,提高宇航员的身体机能从而更好的适应外太空的生存环境。国际的很多研究人员对其进一步开发利用做了深入研究,也有了可喜的成果。我们还可以从两个方面对其进行开发,一方面要改进蓝靛果有关产品的现有生产工艺,提高生产效率和产品质量,建立品牌效益;另一方面更加深入的研究其深加工,开发出有利于人体健康的一系列营养保健品和药品,提高蓝靛果的经济效益,实现更长远的发展。

1.2 花色苷的结构和性质

随着人类生活水平的不断提高,老百姓对自身的健康越来越重视,俗话说病从口入,食品安全问题越来越受关注,其中食品添加剂中的合成色素的安全性就引起了重视。因此研究及开发无毒的还具有保健功能的天然色素迫在眉睫。在颜色鲜艳的高等植物中往往存在着花色苷,在自然界中它的颜色较为鲜艳,从橘黄到蓝色都是它的显色范围,人们对于这种颜色正是对食物的渴望色,因此花色苷能够代替合成色素应用到食品中^[30]。花色苷不仅具有诱人的颜色,并且具有一系列的生理功能,例如抗氧化活性,预防心脑血管疾病、延缓衰老、抗癌、治疗糖尿病等功能^[31]。

1.2.1 花色苷的结构

花色苷属于黄酮类化合物,具有黄酮类特有的C6-C3-C6碳骨架结构,由花青素(anthocyanidins)和糖(saccharides)经糖苷键(glycosidic bond)缩合而成^[32,33]。天然花色苷配基(花青素)的基本结构为3,5,7-三羟基-2-苯基苯并吡喃。目前已知天然花色苷有250多种^[34],常见的有17种,其中主要存在于植物中的有6种,即锦葵色素、芍药色素、天竺葵色素、牵牛花色素、飞燕草色素和矢车菊色素^[35]。最有可能与花色素成苷的单糖依次是:葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。花色素分子上可以连接1个或几个糖基,可以连接单糖和寡糖。通过改变花色苷分子中的羟基数目、羟基的甲基化程度、连接到花色苷分子上的糖的种类、数量及位置、连接到分子上的有机酸的数量和种类等,可以形成大量的花色苷^[36,37]。花色苷也会以酰基化的形式存在,能够与其酰基化的有机酸主要有香豆酸、芥子酸、咖啡酸、苹果酸、阿魏酸、琥珀酸、丙二酸、羟基苯甲酸和乙酸等。

1.2.2 花色苷的性质

花色苷(anthocyanin)一般溶于水、乙醇、稀酸碱等极性溶剂中,是一类天然的水溶性色素,能被活性炭吸附,遇到醋酸铅试剂沉淀^[38]广泛存在于植物的根、茎、叶、花、果实等器官的细胞液中,并且花色苷的颜色会随PH的变化而表现不同的颜色,从酸性到碱性,呈现出红色、紫色到蓝色的颜色变化。花色苷类色素通常均一地溶解在细胞液中,并消除“水合一去水合平衡”,稳定存在于细胞液中^[39]。

1.3 花色苷的提取

目前,提取天然花色苷的方法主要有有机溶剂萃取、生物酶解萃取、超临界提取、超声波辅助法、微波辅助法和高压脉冲电场辅助提取法。其中最常用的是有机溶剂萃取法。

1.3.1 有机溶剂萃取

有机溶剂萃取法是为常见的提取方法,由于花色苷的物理性质易溶于极性溶剂,因此通常采用水、甲醇、乙醇和丙酮等作为溶剂进行萃取。由于在弱碱性溶液和中性溶液中花色苷不是很稳定,可以置于弱酸性的溶剂中。可采用酸性甲醇溶液作为溶剂^[40]。甲醇的提取率比乙醇高二十个百分点,比水高七十个百分点^[41]。但考虑到甲醇具有毒性,在食用色素生产中可选用1%的盐酸乙醇溶液,但这种提取条件能改变色素的原始状态。因此选择一定浓度的乙醇溶液为最佳。

影响有机溶剂萃取法的因素很多:溶剂种类、料液比、pH值、温度、提取次数和样品颗粒大小等。已经有许多研究分别采用甲醇、乙醇、丙酮与水进行配比,对各种来源的花色苷进行萃取。

1.3.2 生物酶解萃取

生物酶解提取技术是根据酶反应具有专一性和高效性的特点，选择恰当的酶就可以水解或降解细胞壁组成成分：纤维素、半纤维素和果胶，通过破坏细胞壁结构，使其破裂，细胞内的成分就可以溶于溶剂中，达到提取目的。经常用的是纤维素酶和果胶酶。李颖畅等^[42]分别用纤维素酶、果胶酶以及两者的复合物对蓝莓果中的花色苷进行萃取，结果表明纤维素酶的提取效果最佳。卢锋波等^[43]对黑莓花色苷的酶法提取工艺条件进行优化，实验表明产量最高时的加酶量为 0.21%、酶解温度为 42.7℃、酶解时间为 1.46h。刘瑞军等^[44]对越橘花色苷的酶法提取进行研究，结果表明加酶量为 2%、酶解温度 55℃、酶解时间为 60min。

影响生物酶解萃取效率的因素有加酶量、酶解温度和酶解时间。在研究中，这三种条件是必须要谨慎研究的。

1.3.3 超临界 CO₂ 提取

超临界 CO₂ 提取技术是一种采用超过临界温度和临界压力的流体作为溶剂的提取过程。其优点是结合了气体和液体的萃取特点，从液体或固体物料中分离有效成分，具有安全性好，时间短，得率高和萃取量大等优点。张树宝^[45]利用超临界 CO₂ 提取技术对大花葵花色苷进行萃取，结果得到最佳的提取工艺条件为：料液比 1:25、萃取压力 25Mpa、萃取温度 60℃、萃取时间 45min。实验结果表明，超临界 CO₂ 提取法可以代替传统的有机溶剂萃取法来提取花色苷，而且 CO₂ 安全无毒价廉，无污染并且没有溶剂残留的问题，利于热敏性物质萃取。

影响超临界 CO₂ 提取效率的因素有萃取压力、萃取温度和萃取时间等。

1.3.4 超声波辅助提取

超声波是频率大于 20000Hz 的弹性机械波，在媒介传承过程中可以产生空化效应、机械效应和热效应。在天然植物中提取有效成分时，细胞壁是提取过程中主要的阻碍，利用超声波辅助技术使其破壁，加强了有效成分从细胞液中释放出来，超声波辅助提取操作简单、提取率较高、提取速度快，并且有效成分的结构不易被破坏。由于以上的优点超声波辅助提取已经被研究人员广泛使用。刘德江等^[46]采用超声波辅助提取对蓝靛果色素进行提取，利用响应面法确定最佳提取条件，实验表明超声波辅助提取法使提取时间缩短，提取效率也有所提高。孟宪军^[47]等采用超声波辅助提取法对蓝莓花色苷进行提取，并用响应面进行优化，得到提取的最佳参数为：提取液乙醇浓度 52.28%，提取温度 39.27℃，提取时间 37.17min。

影响超声波辅助提取的因素有超声波功率、超声时间、超声温度等。

1.3.5 微波辅助提取

微波辅助提取技术的原理是：植物细胞中的某些物质成分吸收微波辐射，被选择性加热温度迅速上升，细胞中的水分蒸发产生压力使细胞膜和细胞壁上形成微小的通道，

从而使有效成分从细胞内溶解释放出来。此技术具有效率高、选择性强和时间短等特点。李巨秀^[48]采用微波辅助提取法对石榴的花色苷进行萃取,实验得出了最佳的工艺条件,并且发现微波的输出功率对花色苷的提取率有显著影响。张朝红^[49]采用微波辅助提取法对果桑花色苷进行萃取,实验结果表明最佳的工艺条件为微波输出功率 540W,提取时间 100s。

影响微波辅助提取的因素有微波输出功率、提取时间等。

1.3.6 高压脉冲电场辅助提取

高压脉冲电场辅助提取技术是一种新兴的有效成分的提取技术,已经开始应用于食品加工业中,主要用于给液态食品灭酶杀菌。其原理是高压脉冲电场施加给细胞膜的脉冲电压超过了细胞膜本身的电位,从而击穿细胞膜,提高了细胞膜的通透性,进而使细胞内的有效成分充分溶出^[50]。此技术具有提取时间短,温度低,提取率高等特点。张燕等^[51]等参与高压脉冲电场对红莓花色苷进行提取,实验结果表明 3.0kV/cm 的高压脉冲电场处理 60 到 420 个脉冲均能破坏红莓的细胞膜,提高了通透性,使花色苷从细胞内充分的溶出,由此可见高压脉冲电场辅助提取技术能够提高花色苷的提取率,并且能够缩短提取的时间。

1.4 花色苷的纯化

花色苷通过以上提取方式萃取后经过浓缩干燥后是色素的粗制品,其中还含有大量的杂质,例如糖类、蛋白、脂肪、无机盐、金属离子等等,产品的纯度低、溶解性差,因此未来获得高纯度的花色苷就必须进一步纯化。目前纯化的方法有柱层析、薄层层析、高速逆流色谱、膜分离和重结晶等。

1.4.1 柱层析

1.4.1.1 大孔树脂层析

大孔树脂是一种有机高聚物的吸附剂。大孔树脂具有吸附性的来源于氢键或范德华力,其颗粒内部是有很多的孔道的多孔性结构,不同分子量的有机化合物通过大孔树脂的吸附解吸过程达到分离纯化的目的^[52]。大孔树脂具有吸附量大、机械强度高、选择性好、速度快、易解吸,并且能再生可以反复使用等优点,生产成本较低,因此国内外在纯化天然色素时多采用大孔树脂层析。王振宇^[53]等比较了几种不同类型树脂对蓝靛果色素的纯化效果,通过静态吸附和解吸实验发现,X-5 树脂对其吸附效果最佳,饱和吸附量为 0.0517g/mL,上样条件在 pH=2.0,流速 1.0mL/min~1.5mL/min,洗脱剂为 60%乙醇,洗脱流速 1.0mL/min。

1.4.1.2 凝胶柱层析

凝胶层析是利用具有孔隙结构的凝胶作为固定相,根据被分离物质的分子大小和形状的不同,在孔隙中流动的速度不同,因此流出的前后顺序不同而实现分离的一种层析法^[54]。Andersen^[55]等利用 Amberlite XAD-7 和 Sephadex LH-20 对草莓花色苷进行层析分

离，并用高效液相色谱鉴定花色苷种类。其优点就是操作条件温和和应用范围广，分离高分子物质效果好。

1.4.1.3 离子交换层析

离子交换层析的固定相是离子交换剂，是另一种层析分离技术。固定相上有与其结合的离子，样品中的溶质离子能够与其进行交换，不同的溶质离子与离子交换剂上离子化的基团的亲和力和结合条件不同，洗脱液流过时，样品中的离子按结合力的强弱进行先后洗脱，进而分离目标成分。按照基质的所带正负电荷分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。马淑青^[56]就是采用阳离子交换树脂对紫甘薯进行分离纯化，通过进行吸附率和解吸率的实验筛选出离子交换树脂，结果表明 D061 的吸附及解析效果的综合评价最佳，并且能够应用于工业化生产。

1.4.1.4 硅胶层析

硅胶层析法的分离原理是根据物质在硅胶上的吸附力大小不同而得到分离，用于分离具有极性差异的物质，通常硅胶较易吸附极性较大的物质，而极性较弱的物质不易被吸附。层析过程即为反复的吸附和解析。极性小到极性大的物质通过流动相乙酸乙酯或者石油醚，氯仿，甲醇、水、正丁醇或醋酸依次洗脱下来，最后可以加入少量氨水或冰醋酸。由压力的不同柱子可以分为：加压柱，常压柱，减压柱。徐忠^[57]等人采用硅胶层析对千日红花色苷进行分离纯化，通过实验得出纯化的最佳条件为柱温 35℃，径长比 1:30。此方法的优点是操作简单分离效果理想。

1.4.2 薄层层析

薄层层析是将硅胶纤维素等固定相制成薄板，流动相经过薄板从而分离的层析方法。其特点是样品用量少分析快速，但不能进行大量产品的分离。Harbome^[58]以硅胶为固定相，筛选展开剂为乙酸乙酯、2mol/L HCl、甲酸的用量比为 85:9:6 时分离效果最佳，得到芍药苷和锦葵苷。Heidari^[59]采用薄层层析分离葡萄中的花青素，固定相为微晶纤维素，展开剂为等体积的正丁醇和盐酸，分离后的条带用 0.01% HCl 的甲醇溶液洗脱得到花色苷的单体。

1.4.3 高速逆流色谱

高速逆流色谱(High-speed Countercurrent Chromatography, 简称 HSCCC)是一种无载体的液-液分离色谱，因为在其分离过程中没有任何载体，因此不用担心载体对分离过程的影响。在实验过程中，样品在一对几乎互不相溶的溶剂相中传递，由于在两种溶剂中有效成分的分配系数不同，从而能够实现分离有效成分的目的。基于运转螺旋管内两相溶剂的单向性流体动力学平衡，使逆流色谱体系的分离效率更高，此色谱具有操作灵活效率高，处理量大成本低等优点。Degenhardt^[60]用装有 3 个螺旋管柱的高速逆流色谱仪分离已经初步纯化过的黑加仑提取物，得到了 4 种花色苷。

1.4.4 膜分离法

膜分离法是根据生物膜对物质具有选择性通透的原理而建立的分离方法,可以对混合样品的不同成分进行分离纯化,此技术具有分离、浓缩、纯化和精制的功能,并且高效节能,操作简单易于控制,因此从 20 世纪 60 年代以来已经广泛应用于生物制药和食品化工等领域。顾名思义,需要分离纯化的混合物根据膜孔径的大小被截留或者通过,是在分子范围内进行分离,是一种物理过程,因此安全环保,不会对目标物质造成破坏,是较为理想的分离方法。李玉山^[61]等采用超滤法对越橘花色苷进行纯化,能够有效的截留粗提物中的多糖、蛋白质、胶质等大分子杂质。膜分离也有缺点,一般处理量小,而且膜表面的存积物会越来越多,导致无法再过滤,这样就需要定期清理,提高效率。

1.4.5 重结晶法

花色苷溶液遇醋酸铅后会产生沉淀,收集沉淀并向其加入盐酸化的乙醇,会形成氯化铅白色沉淀,过滤除去白色沉淀即可得到纯净的花色苷溶液,再经过浓缩冻干可得纯度较高的花色苷粉末。但是由于醋酸铅有巨毒,所以此方法不适合食品色素的生产。

1.5 花色苷的定量测定

1.5.1 单一 pH 法

花色苷的光谱曲线有两个吸收峰,分别在 500~540nm 和 350~380nm 范围内,在新鲜浆果的花色苷粗提物中,能够干扰花色苷的最大吸收区的物质很少,因此可以通过测定适当波长处的吸光度来计算花色苷的含量。测定时,花色苷需要在 pH 不变的溶液中进行。由于不同花色苷在最大吸收峰处的摩尔消光系数 ϵ 或比消光度 E 的值差距很小,所以一般用平均比消光度(avE)误差小于 0.2%^[62],公式如下: $C=100EVM/\epsilon_0$ 式中 C 为花色苷的质量浓度(mg/mL); E 为所测得的消光值; V 为稀释倍数; M 为标准花色苷的相对分子量; ϵ_0 为标准花色苷的分子消光系数。

1.5.2 pH 示差法

pH 示差法的依据之一是花色苷发色团的结构转换是 pH 的函数,依据之二是超干扰作用的褐色降解物的特性不随 pH 而变化。通过实验确定两个对花色苷吸光度差距最显著的 pH,并且对花色苷稳定,根据公式计算花色苷含量^[63]。但是这种方法测定出的花色苷浓度要比其理论浓度低,因为辅色素的不完全转化导致了这种结果^[64]。pH 为 1 时,花色苷以 2-苯基苯并吡喃的形式存在。pH 为 4.5 时,花色苷以甲醇假碱的形式存在,此时差距最明显,因此选择 pH 为 1.0 和 4.5^[65]。计算公式如下:花色苷含量(% ,w/w)=($A/\epsilon L$) \times MW \times DF \times V/Wt \times 1000 式中: A ——吸光度; ϵ ——矢车菊花素-3-葡萄糖苷的消光系数, 26900; DF——稀释因子; MW——矢车菊花素-3-葡萄糖苷的分子量, 449.2; V——最终体积, mL; Wt——产品重量, mg; L——光程, 1cm;

$$A=A_{\text{pH}1.0}-A_{\text{pH}4.5} \circ$$

1.5.3 差减法

二氧化硫或亚硫酸盐能够漂白花色苷,漂白后的花色苷在可见光的光谱特征消失,而在花色苷的最大吸收区的干扰物质却基本不能被二氧化硫或亚硫酸盐漂白。因此首先测定样品在可见光区的最大吸光度,然后经漂白后测定在最大吸收峰的吸光度,花色苷的吸光度则为两者的差值,参考花色苷标准曲线,即可将吸光度换算成花色苷浓度。差减法因所使用的漂白剂也能降低某些干扰组分的吸光度而使总花色苷的实测浓度比理论浓度偏高^[66],另外,此法不适合于C4位上有苯基或甲氧基的花色苷的定量分析,计算公式如下: $C=(A1-A2)/k$ 式中:C为花色苷的浓度(mg/mL);A1和A2分别为二氧化硫或亚硫酸盐漂白前后的溶液吸光度;k为采用标准花色苷绘制的标准曲线的斜率。

1.6 花色苷的生理功能

1.6.1 抗氧化活性

自由基(free radical)是指能够独立存在的,具有不成对电子的分子、原子、离子和基团^[67]。自由基具有很高的化学活性,非常活泼,极易与周围物质发生反应,并易对机体产生迅速而强烈的损伤^[68]。与氧结合后的活性氧自由基有超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基、烷氧基和单线态氧等等^[69],能够对机体造成很大的伤害,引起很多的疾病如糖尿病、冠心病、动脉粥样硬化等。自由基氧化致衰理论认为生物体内具有一整套产生和清除自由基的平衡体系,随着机体的衰老和外界环境的影响导致平衡体系失衡从而产生大量的自由基。

花色苷的结构中有多个酚羟基,属于羟基供体,它在植物组织中的主要作用是保护植物中易氧化的成分。研究员通过评价花色苷的还原力、清除自由基能力、抑制脂质过氧化能力等体系来检测抗氧化能力。研究表明,花色苷类色素对DPPH、ABTS⁺、羟自由基、超氧自由基等的清除能力极强,可防止机体的氧化损伤,同时能激活抗氧化防御体系,能促进超氧化物歧化酶、谷胱甘肽酶的活性。Yang等^[70]从紫玉米中提取花色苷,并得到矢车菊素-3-葡萄糖苷、天竺葵色素-3-葡萄糖苷、芍药色素-3-葡萄糖苷等花色苷,并证实了紫玉米花色苷清除DPPH的能力和Fe³⁺还原能力都比BHT强。并且与花色苷的浓度呈正相关。实验研究表明,黑米皮花色苷能显著增强大鼠血清和肝脏总抗氧化能力^[71]。

花色苷抗氧化的途径主要有:①抑制自由基的产生或直接清除自由基。花色苷清除自由基的功能主要和它分子中的羟基有关,特别是3-位或3'-、4'-、5'-位羟基有关^[72]。②激活抗氧化酶体系。由于抗氧化酶具有清除自由基的作用,因此通过激活过氧化氢酶、过氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等也可起到抗氧化作用。③与诱导氧化的过度金属络合,可以直接降低LDL的氧化程度,也可抑制Fenton反应,从而抑制活性氧自由基产生的作用。

1.6.2 抗癌作用

据统计,每年全世界有将近上千万的人死于癌症,由于自然环境严重污染,存在大

量致癌物,如各种化学致癌物、各种辐射、慢性炎症等在长期接触后都会引起基因突变,导致癌症。其中自由基学说是众多学说之一。研究人员越来越重视从可食用的植物中提取有效的抗癌成分。

目前国内外的许多研究证实了花色苷对多种癌症有不同程度的抑制作用,这是由于其具有较强的抗氧化活性,能够抑制细胞增殖使其凋亡等作用。目前已经研究出花色苷针对乳腺癌、结肠癌、白血病和皮肤癌等都有抑制作用。随着科技的进步、工业的发展,各种癌症的发病率也随之提高。Lala^[73]分别将越橘花色苷、野樱桃花色苷和葡萄花色苷作用于得结肠癌的雄鼠,研究其化学预防作用。实验表明,添加了花色苷的膳食减少了结肠癌细胞的增生,并且环氧化酶因子的表达也降低了。Serafino^[74]等研究了矢车菊素-3-葡萄糖苷对于黑色素细胞瘤增殖和分化的影响,实验表明此花色苷可以减少癌细胞的增殖,并且能够诱发癌细胞的分化,与时间剂量成正相关。Hou^[75]等研究花色苷的抗癌作用,作用于白血病细胞,研究出6种花色苷不全诱导细胞凋亡。飞燕草素是最强的诱导物,与时间剂量成正相关。也有研究显示矢车菊素有降低前列腺癌细胞中环氧化酶的水平,具有抑制前列腺癌细胞的作用^[76]。Lamy^[77]研究了三种花色苷抑制恶性胶质癌细胞的转移作用,研究表明三种都能够抑制其转移,其中飞燕草素的抑制作用最强。Shih^[78]研究了飞燕草素、矢车菊素、芍药色素、锦葵花素和天竺葵素五种花色苷对胃癌细胞的增殖作用。其中锦葵花素的作用最明显,并有凋亡小体出现。

1.6.3 延缓衰老和预防各种老年疾病

自由基可导致脂肪、蛋白质、核酸和糖分子的氧化损害,是一些疾病如癌症、心血管疾病、糖尿病和神经性疾病,以及衰老和关节炎等的重要病因^[79]。花色苷由于能够清除自由基,因此对这些疾病具有预防和治疗的作用。

桑葚花色苷能够减少肝血清中的总胆固醇、甘油三酯、谷草转氨酶和谷丙转氨酶,从而预防由衰老引起的肝功能障碍,能够明显降低衰老,提高小鼠的学习能力、记忆力和认知能力^[80]。糖尿病患者体内的活性氧过多而引起氧化应激是胰岛素抵抗的根本原因^[81]。郭红辉^[82]等研究出具有邻苯二酚结构的矢车菊素和牵牛花素能够有效的清除活性氧,从而改善氧化应激引起的胰岛素抵抗。高血压是引发各种老年疾病的重要危险因素,体内血管紧张素转换酶的调节是引起高血压的主要原因之一。有研究显示从玫瑰花萼中提取到的两种花色苷能够抑制紧张素转换酶的活性,通过竞争活性部位达到抑制目的,从而降低高血压的产生^[83]。

1.6.4 抗炎、抗菌

炎症是机体对于刺激的一种防御反应,是各种炎症细胞和致炎因子共同参与的。巨噬细胞能够产生环氧化酶-2(COX-2)和一氧化氮合酶(NOS),两种诱导性蛋白酶在炎症反应中具有重要的角色。COX-2和NOS在其他炎性诱导因素(Ox-LDL,TNF- α)刺激下能迅速提高其蛋白的表达量,发挥酶活性合成炎性介质产物一氧化氮、前列腺素(PG),进一步引

起炎症反应的放大^[84]。有实验可以证明，花色苷能够调节这两种酶的基因和蛋白水平，从而具有良好的抗炎作用。

花色苷也可作为抗菌剂使用，并且具有无污染不产生耐药性等优点。有实验表明，紫甘薯花色苷对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有一定的抑制作用，但对于黑曲霉和啤酒酵母并没有抑制作用，樟树果花色苷能抑制空气和水中微生物的生长，防止食物腐烂^[85]。

1.7 研究目的和意义

随着人们生活水平的不断提高，人类不再只限于食物的美味性，而是需要更加有利于健康的食品。现在各种各样的恶劣环境造成了人体的各种疾病，威胁人类的健康。自由基理论是学者们讨论的热点，人体自身能够产生自由基，受到外界环境的刺激也能够产生自由基，大量实验证明，自由基是产生很多疾病的重要原因之一，因此寻找一种有效的清除自由基的天然产物是现代学者研究的热点。

另外，癌症是威胁人类生命的主要疾病，由于生存环境的不断恶劣，癌症发病率不断上升。现代治疗癌症的医学手段主要有手术切除、化疗和放疗，但是其治疗的副作用是极其大的，会给患者带来极大的痛苦，并且受到病灶位置、适应症和年龄的各种限制，治疗的效果不够理想。因此，很多研究者试图通过诱导肿瘤细胞凋亡来治疗癌症，开发天然的抗肿瘤药物成为研究的热点。天然产物的毒副作用小，可以减少患者用药后的痛苦，因此备受关注。

近年来研究者发现某些天然产物具有抗癌作用，因此开发了一系列抗癌保健产品，对癌症的预防和控制起到了举足轻重的作用。其中蓝靛果作为一种天然的食用浆果对多种癌细胞具有抑制作用，其作用机理与抗氧化、调控细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡和分化、影响血管生成和肿瘤细胞信号传导等有关。因此对蓝靛果提取物的防癌抗癌作用，值得进一步深入研究。

本试验通过确定蓝靛果中不同花色苷洗脱物的抗氧化性，再以癌细胞为靶细胞，采用体外细胞培养研究不同花色苷洗脱物对癌细胞的抑制率，从而确定出最佳组分。

1.8 研究内容和方法

(1) 响应面法优化蓝靛果花色苷提取工艺实验

通过单因素实验考察乙醇浓度、液料比、温度和时间来确定提取的最佳条件，在此基础上建立响应面实验方案，确定提取的最佳工艺参数。

(2) 蓝靛果花色苷的抗氧化活性

大孔树脂吸附蓝靛果花色苷粗提物，并利用不同浓度的乙醇溶液对蓝靛果花色苷进行梯度洗脱获得洗脱物。通过体外抗氧化实验比较洗脱物的抗氧化性。

(3) 蓝靛果花色苷的抗癌功能

通过培养肺癌细胞、肝癌细胞和宫颈癌细胞比较洗脱物的抗癌作用，确定抗癌作用最强的花色苷洗脱物。

2 响应面法优化蓝靛果花色苷提取工艺参数

2.1 引言

蓝靛果忍冬含有丰富的花青素、维生素、矿质元素和氨基酸等物质，是一种世界珍稀、纯天然的可食用浆果，具有极高的营养价值和保健价值。作为一种新兴的绿色浆果，蓝靛果已经具有广阔的发展前景。

蓝靛果之所以具有丰富的营养价值、药用价值和极高的抗氧化性，是因为其果实中具有丰富的花色苷，花色苷是一类具有很强生理功能的黄酮类化合物。最大限度的从蓝靛果中提取出花色苷是本章的目的。国内外的研究者对于花色苷的提取做了很多研究，花色苷的提取方法有很多，有机溶剂萃取法是最传统的提取方式，其他的方法也是在此基础上的一些辅助手段，比如超声波辅助、微波辅助、酶法等，但是这些方法都会或多或少的改变花色苷的结构性质等方面，因此本章选择了最传统的有机溶剂萃取法，并且选择了乙醇作为有机溶剂，乙醇是毒性最低的有机溶剂，适用于食品类的生产。利用单因素实验和响应面优化实验对蓝靛果花色苷的提取工艺参数进行了优化，确定了最佳提取工艺条件，为蓝靛果花色苷后续的实验研究奠定了基础。

2.2 实验材料及仪器

2.2.1 实验材料

无水乙醇	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
乙酸钠	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
氯化钾	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
盐酸	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
蓝靛果		采摘于大兴安岭

2.2.2 实验仪器

电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9240	上海一恒科技有限公司
电热恒温水浴锅	DK-98-11A	天津市泰斯特仪器有限公司
电子分析天平	FA2004	上海天平仪器厂
离心机	TKL-5	上海科兴仪器有限公司
紫外可见分光光度计	T6	北京普析通用公司
高速万能粉碎机	FW100	苏州江东精密仪器有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 原料预处理

采摘后的蓝靛果除去树叶等杂质，置于 40℃ 恒温烘干箱中，烘干后粉碎成粉末状置于干燥器内备用。

2.3.2 花色苷含量的测定

2.3.2.1 pH 示差法的原理及缓冲液的配制

花色苷的颜色随 pH 值的改变而发生变化, 而干扰物质的特征光谱不随 pH 的改变而变化。为了让 pH 示差法更准确更灵敏, 选择的两个 pH 处测定的花色苷的吸光值差异最显著, 并且花色苷相当稳定。pH 为 1 时, 花色苷以 2-苯基苯并吡喃的形式存在。pH 为 4.5 时, 花色苷以甲醇假碱的形式存在, 因此选择 pH 为 1.0 和 4.5^[86]

pH4.5 的缓冲液的制备:准确称取 1.64g 乙酸钠用蒸馏水定容 100mL, 用盐酸调 pH(4.5±0.1)。

pH 1 的缓冲液的制备:准确称取 1.49g KCl 用蒸馏水定容至 100mL。准确量取 1.7 mL 盐酸用蒸馏水定容至 100mL, 配制成 0.2 mol/L 盐酸溶液,将 KCl 溶液与盐酸溶液以 25:67 的比例混合。用 KCl 溶液调 pH(1.0±0.1)。

2.3.2.2 平衡时间的确定

因为花青素在溶液介质中存在 4 种结构形式, 这 4 种结构形式在某一 pH 下处于动态平衡, 当 pH 改变时, 动态平衡发生转移, 总的趋势是 pH 降低时, 平衡向红色的 2-苯基苯并吡喃阳离子移动; pH 升高时平衡向蓝色醌式移动。一定时间后达到一个新的平衡。因此提取液用缓冲液稀释后, 必须先静置一段时间, 等动态平衡处于稳定后, 才能测定吸光值。

分别移取 2 份 2mL 花色苷提取液, 分别用 pH1.0 和 pH4.5 的缓冲溶液定容至 50mL, 在所选择的测定波长下测定吸光值, 每隔 10min 测定一次吸光值, 直至稳定。

2.3.2.3 经验公式的选择

$$\text{花色苷含量}(\%, \text{w/w}) = (A / \epsilon L) \times MW \times DF \times V / Wt \times 1000$$

式中: A——吸光度; ϵ ——矢车菊花素-3-葡萄糖苷的消光系数, 26900;

DF——稀释因子; MW——矢车菊花素-3-葡萄糖苷的分子量, 449.2;

V——最终体积, mL; Wt——产品重量, mg; L——光程, 1cm;

$$A = A_{\text{pH}1.0} - A_{\text{pH}4.5}$$

2.3.3 蓝靛果花色苷的单因素提取

2.3.3.1 乙醇浓度对花色苷提取的影响

称取 1 克的蓝靛果粉末于 150mL 锥形瓶中, 按照液料比 80:1、50℃恒温水浴锅、时间 1h 条件下, 以乙醇浓度 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%进行提取, 3000r/min 离心 5min, 取上清液用 200mL 容量瓶定容, 并用 pH 示差法测定其花色苷提取量。每个乙醇浓度做三个平行样, 取平均值比较其花色苷提取量。确定提取的最佳乙醇浓度。

2.3.3.2 液料比对花色苷提取的影响

称取 1 克的蓝靛果粉末于 150mL 锥形瓶中, 按照实验得出的最佳乙醇浓度、50℃恒温水浴锅、时间 1h 条件下, 以液料比 20:1, 40:1, 60:1, 80:1, 100:1, 120:1 进行提

取, 3000r/min 离心 5min, 取上清液用 200mL 容量瓶定容, 并用 pH 示差法测定其花色苷提取量。每个液料比做三个平行样, 取平均值比较其花色苷提取量。确定提取的最佳液料比。

2.3.3.3 温度对花色苷提取的影响

称取 1 克的蓝靛果粉末于 150mL 锥形瓶中, 按照实验得出的最佳乙醇浓度和最佳液料比、时间 1h 条件下, 以温度 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃进行提取, 3000r/min 离心 5min, 取上清液用 200mL 容量瓶定容, 并用 pH 示差法测定其花色苷提取量。每个温度做三个平行样, 取平均值比较其花色苷提取量。确定提取的最佳温度。

2.3.3.4 时间对花色苷提取的影响

称取 1 克的蓝靛果粉末于 150mL 锥形瓶中, 按照实验得出的最佳液料比、最佳乙醇浓度、最佳温度条件下, 以时间 20min, 40min, 60min, 80min, 100min, 120min 进行提取, 3000r/min 离心 5min, 取上清液用 200mL 容量瓶定容, 并用 pH 示差法测定其花色苷提取量。每个液料比做三个平行样, 取平均值比较其花色苷提取量。确定提取的最佳时间。

2.3.4 响应面实验方案

根据单因素实验结果设定因素水平, 采用 Minitab 软件的 Box Behnken 实验设计原理^[87]选取影响蓝靛果花色苷提取量的 3 个主要因素: 乙醇浓度、液料比和温度进行响应面优化组合, 因素水平设计见表 2-1

表 2-1 实验设计因素水平及编码

Table 2-1 The factors and level of experiment

因素	水平		
	-1	0	1
X ₁ 乙醇浓度/%	50	60	70
X ₂ 液料比/(mL/g)	70	80	90
X ₃ 温度/℃	50	60	70

注: 表中各自变量编码值与真实值之间的关系分别为: $X_1=(x_1-60)/10$, $X_2=(x_2-80)/10$, $X_3=(x_3-60)/10$

2.4 实验结果与分析

2.4.1 测定波长的选择

蓝靛果花色苷的提取液经稀释后，经光谱扫描如下图所示，确定其最大吸收波长为 531nm。

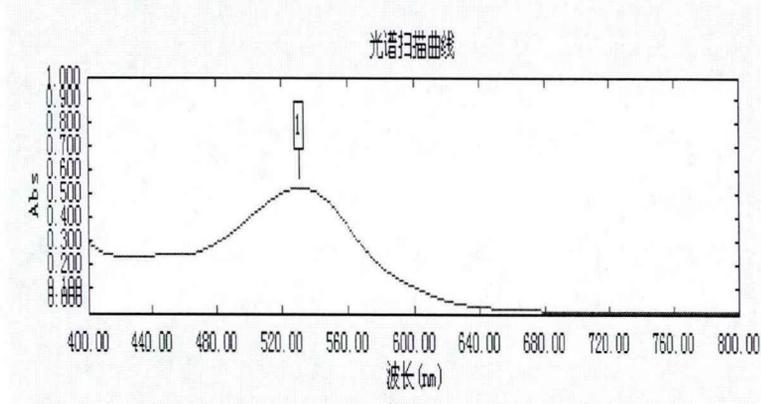


图 2-1 蓝靛果花色苷提取液光谱扫描线

Fig 2-1 Spectral scanning curve of *Lonicera edulis* anthocyanin extract

2.4.2 乙醇浓度对花色苷提取的影响

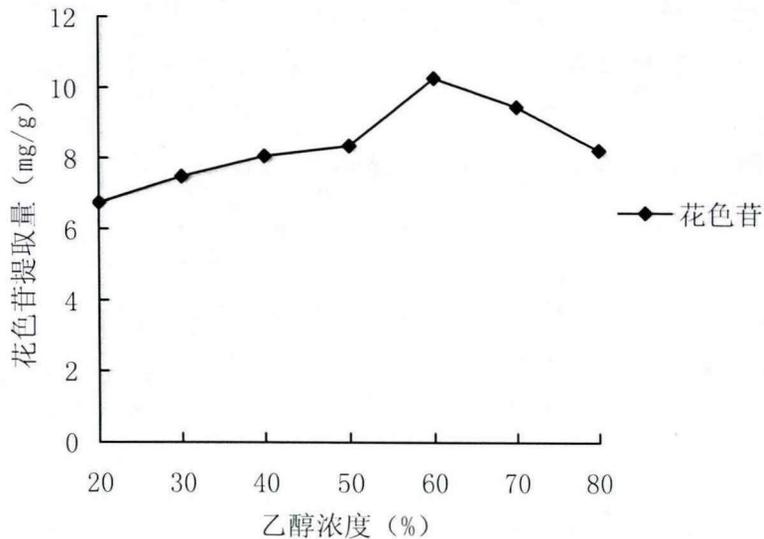


图 2-2 乙醇浓度对花色苷提取的影响

Fig 2-2 Effect of the concentration of ethanol on anthocyanin extraction

图 2-2 的提取条件为液料比 80:1、50℃恒温水浴、提取 1h，由图可以看出，开始花色苷的提取量随乙醇浓度的增加而增加，当乙醇浓度达到 60%时提取量最高，此后随着乙醇含量增加，花色苷提取量则开始降低。因此花色苷的提取量随乙醇浓度的增加呈现先上升后下降的趋势，乙醇达到 60%时花色苷提取量最大，此时花色苷的提取量为 10.263mg/g，因此确定乙醇浓度为 60%作为最佳乙醇浓度。

2.4.3 液料比对花色苷提取的影响

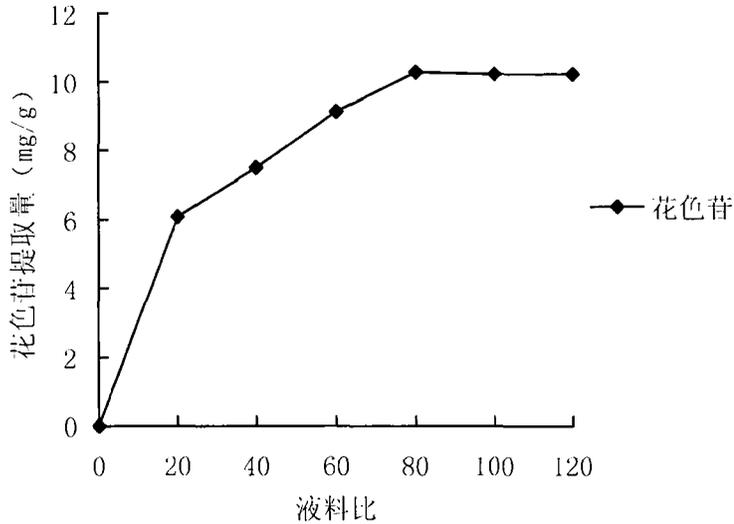


图 2-3 液料比对花色苷提取的影响

Fig 2-3 Effect of liquid material ratio on anthocyanin extraction

图 2-3 的提取条件为乙醇浓度 60%、50℃恒温水浴、提取 1h，由图可以看出，随着液料比的增加，花色苷提取量升高，当液料比达到 80:1 时，花色苷的含量为 10.263mg/g，蓝靛果中的花色苷基本提取出来，再增大液料比时，花色苷提取量不再上升，为了不浪费资源，考虑到此时的花色苷提取量达到了最大值，因此确定液料比为 80:1 作为最佳提取液料比。

2.4.4 温度对花色苷提取的影响

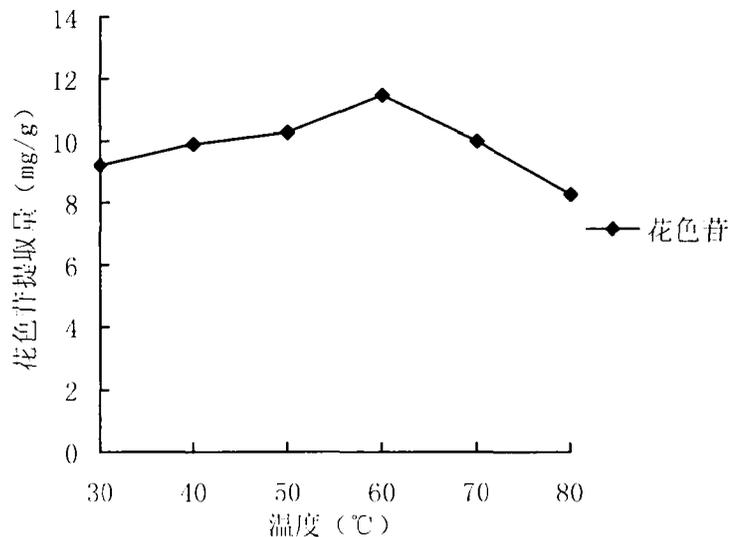


图 2-4 温度对花色苷提取的影响

Fig 2-4 Effect of temperature on anthocyanin extraction

图 2-4 的提取条件为乙醇浓度 60%、液料比 80:1、提取 1h，由图可以看出，花色苷提取量随温度的升高而增加，当温度达到 60℃时含量最高，此后随着温度的增加，花色

苷提取量降低，呈现先上升后下降的趋势。温度达到 60℃时花色苷提取量最大，此时花色苷提取量为 11.458mg/g，蓝靛果中的花色苷基本提取出来，因此确定温度为 60℃作为最佳提取温度。

2.4.5 时间对花色苷含量的影响

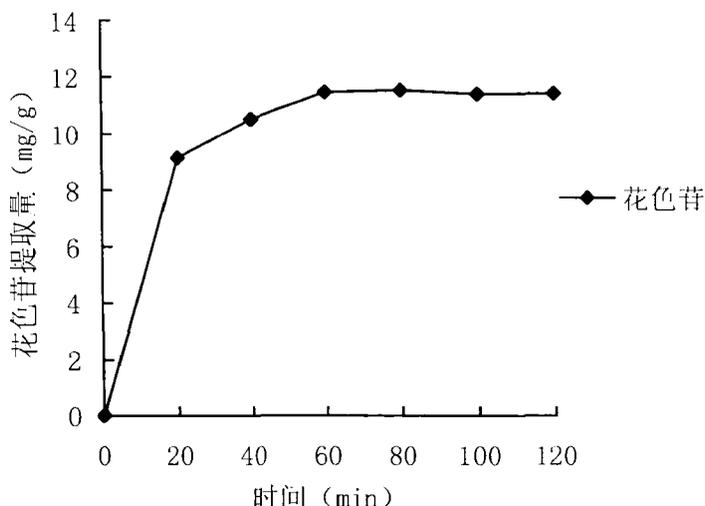


图 2-5 时间对花色苷提取的影响

Fig 2-5 Effect of time on anthocyanin extraction

图 2-5 的提取条件为乙醇浓度 60%、液料比 80:1、60℃恒温水浴，由图可以看出，随着提取时间的增长，花色苷提取量升高，当时间在 60min 处，花色苷的提取量为 11.458mg/g，几乎达到最大值，再延长时间，花色苷含量虽然继续升高，但幅度平稳，为了不浪费资源，考虑到此时的花色苷提取量几乎达到了最大值，因此确定 60min 作为最佳提取时间。

2.4.6 响应面法优化结果

2.4.6.1 响应面实验结果及回归模型

利用 Minitab 软件中 Box-Behnken 设计三因素三水平的响应面，设计表及结果如表 2-2 所示。

表 2-2 Box-behnken 试验设计及结果

Table 2-2 The design and results of Box-behnken experiment

序号	X ₁	X ₂	X ₃	花色苷提取量 (mg/g)
1	-1	-1	0	8.560
2	1	-1	0	9.119
3	-1	1	0	8.157
4	1	1	0	9.639
5	-1	0	-1	8.352
6	1	0	-1	9.444
7	-1	0	1	8.235
8	1	0	1	8.937
9	0	-1	-1	9.392
10	0	1	-1	10.227

11	0	-1	1	9.873
12	0	1	1	9.639
13	0	0	0	11.414
14	0	0	0	11.466
15	0	0	0	11.495

2.4.6.2 回归模型的分析

采用 Minitab 数据统计分析软件对实验数据进行多元回归拟合, 得到乙醇浓度(X_1)、液料比(X_2)、温度(X_3)的二次多项回归方程: $Y=11.458+0.479X_1+0.09X_2-0.091X_3-1.815X_1^2-0.774X_2^2-0.901X_3^2+0.231X_1X_2-0.098X_1X_3-0.267X_2X_3$

对回归方程进行显著性分析和方差分析, 结果如表 2-3、2-4 所示。

表 2-3 回归系数显著性分析

Table 2-3 Significance analysis of regression coefficient

项	系数	系数标准误	T	P
常量	11.4583	0.07009	163.482	0.000**
X_1	0.4794	0.04292	11.169	0.000**
X_2	0.0898	0.04292	2.091	0.091
X_3	-0.0914	0.04292	-2.129	0.087
X_1X_1	-1.8152	0.06318	-28.731	0.000**
X_2X_2	-0.7744	0.06318	-12.258	0.000**
X_3X_3	-0.9012	0.06318	-14.264	0.000**
X_1X_2	0.2308	0.06070	3.802	0.013*
X_1X_3	-0.0975	0.06070	-1.606	0.169
X_2X_3	-0.2673	0.06070	-4.403	0.007**

注: *差异显著 $P<0.05$; **差异极显著 $P<0.01$ 。

表 2-4 回归模型方差分析

Table 2-4 Analysis of variance in regression

来源	自由度	平方和	均方	F	P
回归	9	18.0835	2.00928	136.34	0.000
线性	3	1.9696	0.65655	44.55	0.000
平方	3	15.5772	5.19240	352.32	0.000
交互作用	3	0.5367	0.17890	12.14	0.010
残差误差	5	0.0737	0.01474		
失拟	3	0.0703	0.02344	13.92	0.068
纯误差	2	0.0034	0.00168		
合计	14	18.1572			

由表 2-3 回归系数显著性分析可知, 一次项的显著性顺序为: $X_1>X_3>X_2$, 即各因素对蓝靛果花色苷提取量的影响作用从大到小为: 乙醇浓度>温度>液料比; 二次项均极为显著; 交互项中 X_1X_2 和 X_2X_3 较为显著, X_1X_3 交互作用不显著。由表 2-4 可以看出, 模型 $P=0.000<0.01$, 表明回归模型极为显著; 失拟项 $P=0.068>0.05$ 不显著, 表明模型可以用来对实验进行拟合, 不需要引入更高次数的项, 校正复相关系数的平方 $R^2=0.9959$, 二次回归方程拟合度较好, 可用于理论值预测。

2.4.6.3 花色苷提取量响应面分析与优化

通过将三个因素中固定一个变量进行降维分析, 用软件对结果进行分析并得到三维响应曲面图和二维等值线图。由此对其中两两因素交互作用的影响进行分析和评价, 以

确定最佳因素水平。

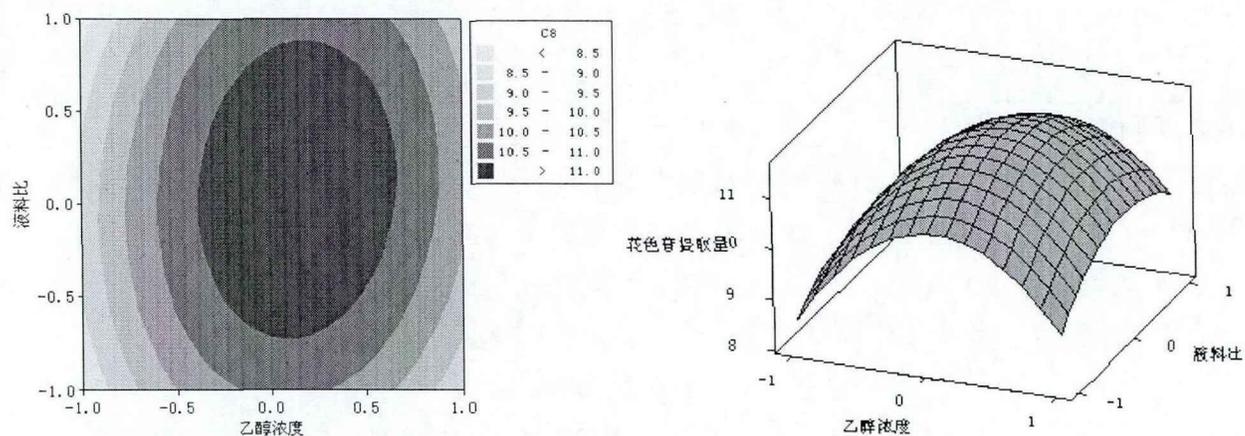


图 2-6 乙醇浓度和液料比对花色苷提取量影响的等值线和曲面图

Fig 2-6 Contour line and surface chart of ethanol concentration and liquid material ratio on anthocyanin extraction

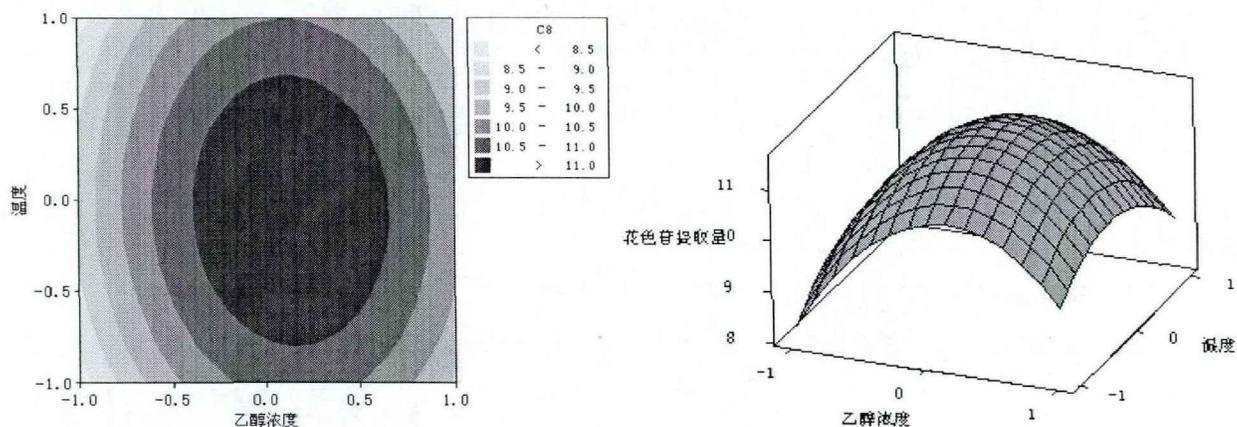


图 2-7 乙醇浓度和温度对花色苷提取量影响的等值线和曲面图

Fig 2-7 Contour line and surface chart of ethanol concentration and temperature on anthocyanin extraction

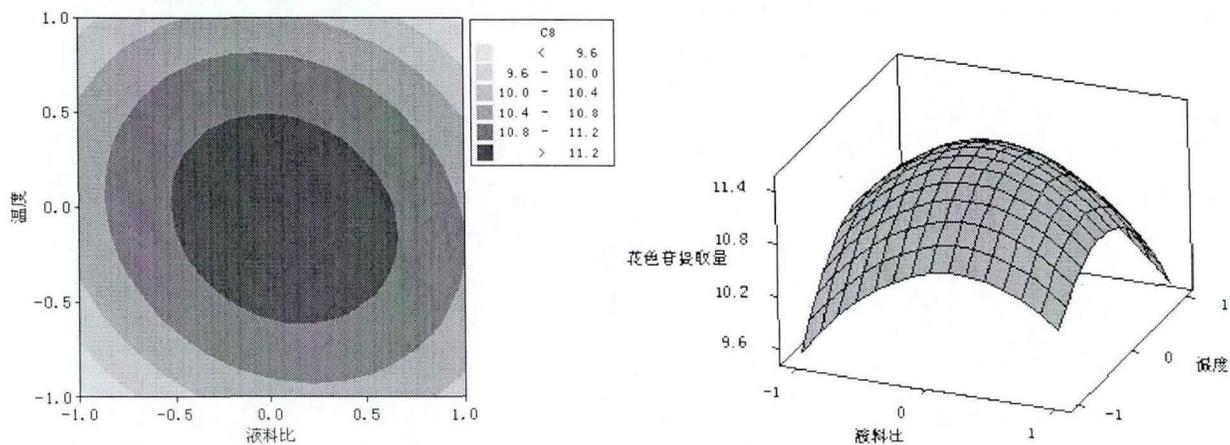


图 2-8 液料比和温度对花色苷提取量影响的等值线和曲面图

Fig 2-8 Contour line and surface chart of liquid material ratio and temperature on anthocyanin extraction

图 2-6 至图 2-8 是各因素的交互作用对响应值的影响,可以直观的从图中看出,乙醇浓度对花色苷提取量的影响最为显著,曲面较陡;相比之下,液料比和温度曲线较缓和,影响较小。

通过对上述二次回归方程求偏导,得到编码值 $X_1=0.139$ $X_2=0.091$ $X_3=-0.072$,此时的花色苷提取量理论值为 11.522mg/g ,与编码值相对应的实际值为 $x_1=61.39\%$, $x_2=80.91:1$, $x_3=59.28^\circ\text{C}$ 。考虑到实际操作和生产,将最佳工艺条件确定为:乙醇浓度 61%,液料比 81:1,温度 59°C 。

2.4.6.4 验证实验

按照优化后的工艺参数进行验证实验,工艺条件为乙醇浓度 61%,液料比 81:1,温度 59°C ,提取后测定其花色苷提取量为 11.501mg/g ,与理论值相差 0.18%,因此响应面法对蓝靛果花色苷提取条件的优化是可行的,得到的提取条件具有实际应用价值。

2.5 本章小结

本章主要研究了有机溶剂萃取法提取蓝靛果花色苷的最佳工艺参数,以蓝靛果花色苷提取量为衡量指标,通过单因素实验和响应面优化实验,确定了最佳提取工艺条件。得出以下结论:

(1) 通过单因素实验确定了各因素的最佳提取条件:乙醇浓度 60%,液料比 80:1,提取温度 60°C ,提取时间 60min。在此条件下,蓝靛果花色苷的提取量最佳。

(2) 在单因素实验的基础上进行了响应面优化实验,确定了最佳的工艺参数:乙醇浓度 61%,液料比 81:1,温度 59°C 。在此条件下获得的花色苷提取量为 11.501mg/g 。各因素对蓝靛果花色苷提取量的影响作用从大到小为:乙醇浓度>温度>液料比。

3 蓝靛果花色苷抗氧化性的研究

3.1 引言

现代研究表明,很多疾病如组织器官老化、肿瘤、心血管疾病等都与过剩的自由基有关。一些外源性天然抗氧化剂能拮抗体内过量的自由基,从而预防相关疾病的发生。据研究表明,天然色素花色苷具有消除自由基、抗衰老、抗氧化、抗癌等多种生理活性功能^[88,89]。因此寻找高效的天然花色苷抗氧化剂已经成为人们研究的热点。

蓝靛果忍冬(*Lonicera edulis Turcz.*),又名蓝靛果、黑瞎子果、山茄子、羊奶子等,属被子植物门忍冬科(*Caprifoliaceae*)忍冬属(*Lonicera*)植物,落叶灌木^[90]。蓝靛果忍冬含有丰富的花青素、维生素、矿质元素和氨基酸等物质,是一种世界珍稀、纯天然、野生的可食用浆果,具有极高的营养与保健价值^[91,92],并且是天然花色苷的良好来源^[93]。国内外的研究显示,蓝靛果与其他许多产品相比有很强的抗氧化活性,从蓝靛果提取物中分离出的天然产物具有化学抑制和化学治疗的活性^[94,95]。评价抗氧化性的方法有很多,例如清除羟自由基、超氧自由基、DPPH 自由基等,以及测定还原力,脂质过氧化能力等等。以往的实验多是以蓝靛果花色苷总洗脱物作为研究对象,并没有将其分离开比较其抗氧化性,因此本实验用不同浓度的乙醇进行梯度洗脱得到不同花色苷洗脱物,并对各洗脱物清除·OH、O₂⁻、DPPH 和 ABTS 的能力进行比较,以 V_C 作为阳性对照。筛选出抗氧化能力最强的洗脱物,旨在为蓝靛果资源的综合开发利用及研究提供一定的参考依据。

3.2 实验材料及仪器

3.2.1 实验材料

蓝靛果		采摘于大兴安岭
无水乙醇	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
甲醇	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
DPPH		Sigma 公司
ABTS		Sigma 公司
FeSO ₄	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
30%过氧化氢	AR	天津市耀华化学试剂有限公司
水杨酸钠	AR	上海市浦化工有限公司
焦性没食子酸	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
铁氰化钾	AR	中国惠世生化试剂有限公司
三氯乙酸	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂
三氯化铁	AR	天津市东丽区天大化学试剂厂

3.2.2 实验仪器

旋转蒸发器	R-205B	上海申胜仪器公司
漩涡混合器	XW-80A	江苏海门市其林贝尔仪器公司
电子分析天平	FA2004	上海天平仪器厂

台式离心机

TKL-5

上海科兴仪器有限公司

紫外可见分光光度计

T6

北京普析通用公司

3.3 实验方法

3.3.1 蓝靛果花色苷粗提液的制备

取蓝靛果粉末，根据上一章得出的最佳工艺参数进行提取，即用 61%乙醇溶液做提取剂，液料比为 81:1，59℃恒温水浴，提取 60min，3000r/min 离心 5min 后取上清液，回收的滤渣再提取两次，合并三次的上清液，低温旋转蒸发浓缩后得到蓝靛果花色苷粗提液。

3.3.2 大孔树脂的预处理与湿法装柱

大孔树脂在使用前都要进行预处理，首先用无水乙醇浸泡 24h，使树脂充分溶胀，再用蒸馏水清洗到无醇味儿为止，然后用 5%盐酸浸泡 4h，用蒸馏水清洗至 pH 呈中性，最后用 3%氢氧化钠浸泡 4h，同样用蒸馏水清洗至 pH 呈中性，即预处理完成。

湿法装柱是常用的装柱方法，操作简单方便，装柱前先在柱子里装入一定量的蒸馏水，将预处理后的大孔树脂倒入蒸馏水并搅拌均匀，并迅速沿着玻璃棒倒入柱子中，同时打开柱子活塞，使水沿着下面的口缓缓流出，要始终保证树脂层面的上面有几厘米的蒸馏水，不可让树脂中有气泡产生。

3.3.3 大孔树脂的筛选

准确称取预处理后的 X-5、AB-8、D4020、NKA-9 和 ADS-7 树脂各 10g，分别置于 100mL 的具塞锥形瓶中，并分别加入 50mL 蓝靛果花色苷粗提液（在 531nm 下吸光度为 A），在恒温水浴摇床中常温 100r/min 振荡 4h，过滤后取上清液在 531nm 下测定吸光度 A_1 ，将过滤后的大孔树脂置于 100mL 的具塞锥形瓶中，分别加入 50mL 60%的乙醇溶液，在恒温水浴摇床中常温 100r/min 振荡 4h，过滤后取上清液在 531nm 下测定吸光度 A_2 ，按照公式分别计算吸附率和解吸率，评价筛选出适合的大孔树脂。

$$\text{吸附率}(\%) = (A - A_1) / A \times 100\% ; \text{解吸率}(\%) = A_2 / (A - A_1) \times 100\%$$

3.3.4 蓝靛果花色苷洗脱物的制备

将预处理好的大孔树脂以湿法装柱，所用柱子的径长比为 1:10。上样速度为 1mL/min，吸附 4h 后进行洗脱，洗脱剂依次为水，10%乙醇，20%乙醇，30%乙醇，40%乙醇，50%乙醇，60%乙醇，70%乙醇，80%乙醇，每种洗脱剂所用体积为两倍的柱体积，洗脱速度为 5mL/min，收集除了水以外的各洗脱液，并且低温旋转蒸发浓缩各洗脱液后真空冷冻干燥得洗脱物粉末，置于干燥器内备用，测定抗氧化性时，称取各洗脱物一定量配制成指定浓度的待测样品，4℃冷藏保存。

3.3.5 羟自由基清除能力的测定

参照徐建国等^[96]采用的水杨酸钠络合法略作改动，测定样品清除羟自由基的能力。反应体系中依次加入样品液 1mL，浓度为 6mmol/L FeSO_4 溶液 2mL，浓度为

6mmol/LH₂O₂ 溶液 2mL, 将反应体系混合均匀放置 10min, 再加入浓度为 6mmol/L 水杨酸钠溶液 2mL, 静置 30min 后于 510nm 波长下用蒸馏水调零, 并测定吸光值 A₁; 将上述体系中的水杨酸钠溶液用相同体积的蒸馏水代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₂; 将上述体系中的样品溶液用相同体积的蒸馏水代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₀。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100\%$$

3.3.6 超氧自由基清除能力的测定

参照郭雪峰^[97]方法略作改动, 测定样品清除超氧自由基的能力。反应体系中依次加入浓度为 50mmol/L Tris-HCl 溶液 5.7mL, 样品溶液 0.2mL, 浓度为 6mmol/L 邻苯三酚溶液 0.1mL, 将混合物反应 4min, 滴入 2 滴 HCl 终止反应, 在 320nm 波长下测定吸光值 A₁; 将邻苯三酚用等体积的蒸馏水代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₂; 将样品溶液用等体积的蒸馏水代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₀。超氧自由基清除率 (%) = [1 - (A₁ - A₂)/A₀] × 100%

3.3.7 DPPH 自由基清除能力的测定

参照 Blois 等^[98]的方法略作改动, 测定样品清除 DPPH 自由基的能力。配制 0.2mmol/L DPPH 乙醇溶液, 放在棕色试剂瓶中于 4℃ 保存, 在试管中加入 2mL DPPH 乙醇溶液及 2mL 样品溶液, 混合均匀在室温避光放置 30min, 于 517nm 波长下用无水乙醇调零, 并测定吸光值 A₁; 将 DPPH 乙醇溶液用等体积的无水乙醇代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₂; 将样品溶液用等体积无水乙醇溶液代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₀。DPPH 自由基清除率 (%) = [1 - (A₁ - A₂)/A₀] × 100%

3.3.8 ABTS 自由基清除能力的测定

参照 Wanwisa 等^[99]方法略作改动, 测定样品清除 ABTS 自由基的能力。用 2.6mmol/mL 过硫酸钾溶液溶解 ABTS 甲醇溶液, 配制成 7.4mmol/mL ABTS 储备液, 室温避光静置 12~24h 后 4℃ 保藏。现用时取 1mL 储备液用甲醇稀释 54.7 倍, 在 734nm 吸光值为 0.700±0.020, 甲醇调零。在试管中加入 2.850mL ABTS 测定液及 0.150mL 样品溶液, 混合均匀在室温避光放置 2h, 于 734nm 波长下用甲醇调零, 并测定吸光值 A₁; 将 ABTS 测定液用等体积的蒸馏水代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₂; 将样品溶液用等体积甲醇溶液代替, 其他操作相同, 测定吸光值 A₀。ABTS 自由基清除率 (%) = [1 - (A₁ - A₂)/A₀] × 100%

3.4 实验结果与分析

3.4.1 大孔树脂的筛选

大孔树脂是一类具有网状孔穴结构的高分子吸附剂, 通过与有机物的范德华力和本身的多孔结构来筛选分子大小不同的有机物质^[100]。每种树脂因其极性、孔径、比表面积的不同对花色苷的吸附强弱不同, 从表 3-1 可以看出, 每种树脂对蓝靛果花色苷都有吸附作用, 但效果不同。在这 5 种树脂中, ADS-7 的吸附率最高, 吸附效果最好, 其次

是 AB-8 和 X-5, 解吸率最高的是 X-5, 要高于 ADS-7 近 11 个百分点, 并高于 AB-8 近 6 个百分点。因此综合考虑树脂的吸附率和解吸率, 本实验确定了 X-5 大孔树脂为纯化蓝靛果花色苷的最佳树脂。

表 3-1 大孔树脂对蓝靛果花色苷的吸附能力和解吸能力

Table 3-1 The adsorption and desorption capacity of macroporous resin on *Lonicera edulis* anthocyanin

树脂型号	吸附率 (%)	解吸率 (%)
X-5	83.6	88.2
AB-8	85.1	82.7
D4020	71.8	66.9
NKA-9	58.9	60.3
ADS-7	88.3	77.4

3.4.2 分级洗脱花色苷清除羟自由基的能力

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)是化学性质最活泼的一种自由基, 几乎可以与所有的生物大分子发生反应, 危害性极大, 在生物体内甚至导致细胞死亡和突变。基于水杨酸根可以捕获羟基自由基生成 2,3-二羟基苯甲酸和 2,5-二羟基苯甲酸, 在波长 510nm 处有最大吸收的原理, 建立一种 Fenton 反应产生羟基自由基的方法。按照 3.3.5 的方法, 以 V_C 作阳性对照, 8 种花色苷洗脱物及花色苷粗提物对羟自由基的清除率如图 3-1 所示, 并计算其 IC_{50} 如表 3-2 所示。

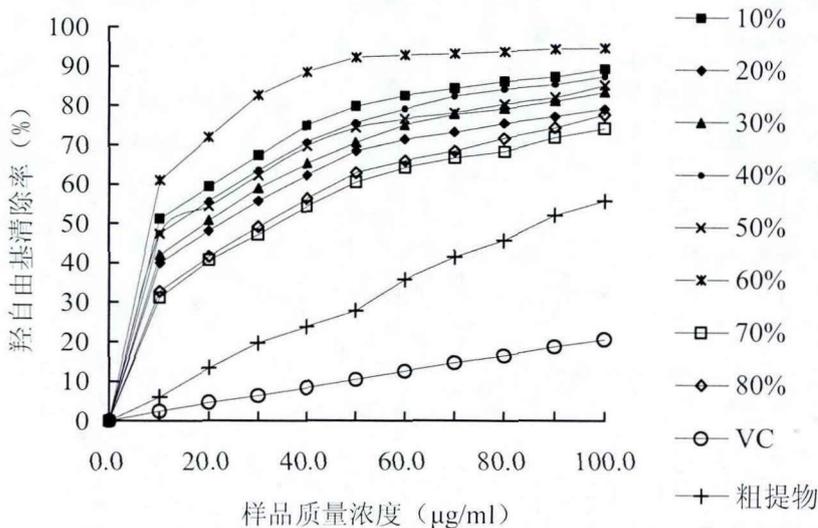


图 3-1 各种样品对羟自由基的清除能力

Fig 3-1 The scavenging capacity of samples on hydroxyl free radical

表 3-2 分级洗脱花色苷清除羟自由基的 IC_{50}

Table 3-2 The IC_{50} of the scavenging capacity of anthocyanin on hydroxyl free radical

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	V_C	粗提物
IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	9.75	22.53	19.20	12.99	13.73	8.20	34.09	31.24	254.63	86.80

由图 3-1 可以看出, 每种花色苷洗脱物对羟自由基都有较好的清除能力, 均高于 V_C

对照组，并且清除率随质量浓度的增加而增大，呈现明显的量效关系。根据表 3-2 可以比较出不同花色苷洗脱物对羟自由基的清除能力大小依次为：60%乙醇>10%乙醇>40%乙醇>50%乙醇>30%乙醇>20%乙醇>80%乙醇>70%乙醇>粗提物>V_C。

3.4.3 分级洗脱花色苷清除超氧自由基的能力

超氧阴离子自由基(O₂⁻)是生物体中产生量最多的一种氧自由基，其活泼性虽不大，但寿命较长，扩散性较强，可引起核酸链断裂、多糖解聚、不饱和脂肪酸过氧化，进而引起膜的损伤，是某些酶失活并改变线粒体氧化磷酸化作用。在碱性条件下(pH8.2)，邻苯三酚发生自氧化反应，生成超氧阴离子自由基(O₂⁻)和中间产物，该中间产物在 320 nm 处有一特征吸收峰。当加入自由基清除剂时，O₂⁻的生成受到抑制，自氧化过程受阻，在 320 nm 处的吸收减弱。按照 3.3.6 的方法，以 V_C 作阳性对照，8 种花色苷洗脱物及花色苷粗提物对超氧自由基的清除率如图 3-2 所示，并计算其 IC₅₀ 如表 3-3 所示

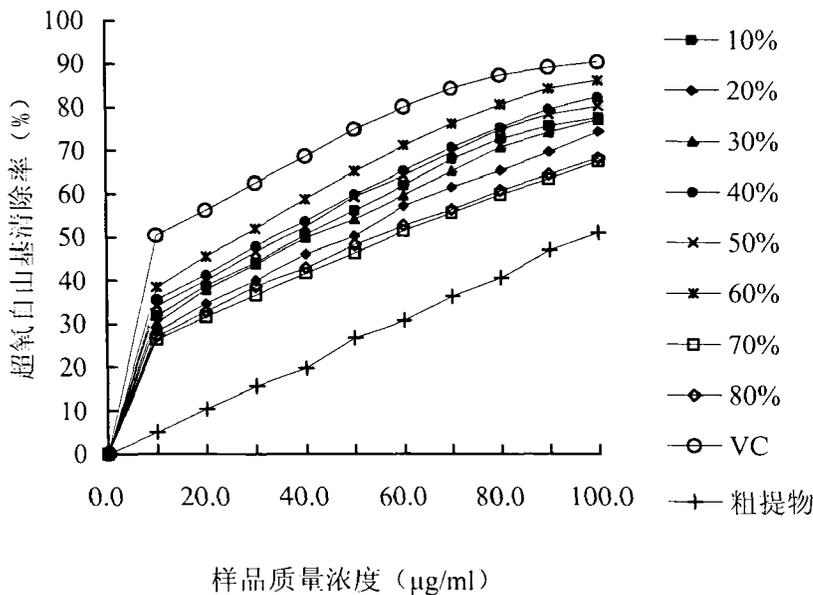


图 3-2 各种样品对超氧自由基的清除能力

Fig 3-2 The scavenging capacity of samples on superoxide free radical

表 3-3 分级洗脱花色苷清除超氧自由基的 IC₅₀

Table 3-3 The IC₅₀ of the scavenging capacity of anthocyanin on superoxide free radical

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	V _C	粗提物
IC ₅₀ (µg/ml)	39.14	49.41	40.49	33.61	35.88	27.00	57.24	53.99	9.93	97.47

由图 3-2 可以看出，每种花色苷洗脱物对超氧自由基都有一定的清除能力，并且清除率随质量浓度的增加而增大，呈现明显的量效关系，但均低于 V_C 对照组。根据表 3-3 可以看出不同花色苷洗脱物对超氧自由基的清除能力大小依次为：V_C>60%乙醇>40%乙醇>50%乙醇>10%乙醇>30%乙醇>20%乙醇>80%乙醇>70%乙醇>粗提物。

3.4.4 分级洗脱花色苷清除 DPPH 自由基的能力

二苯基苦味肼基自由基(DPPH·)是一种稳定的以氮为中心的自由基, DPPH·乙醇溶液呈紫色,其浓度与吸光度呈线性关系。在 DPPH·乙醇溶液中加入样品后,其中的抗氧化活性物质可以与 DPPH·结合或发生替代,使 DPPH·数量减少,溶液颜色变浅,其在 517 nm 波长处的吸光度不断减小,直至达到稳定。按照 3.3.7 节的方法,以 V_C 作阳性对照,8 种花色苷洗脱物及花色苷粗提物对 DPPH 自由基的清除率如图 3-3 所示,并计算其 IC₅₀ 如表 3-4 所示。

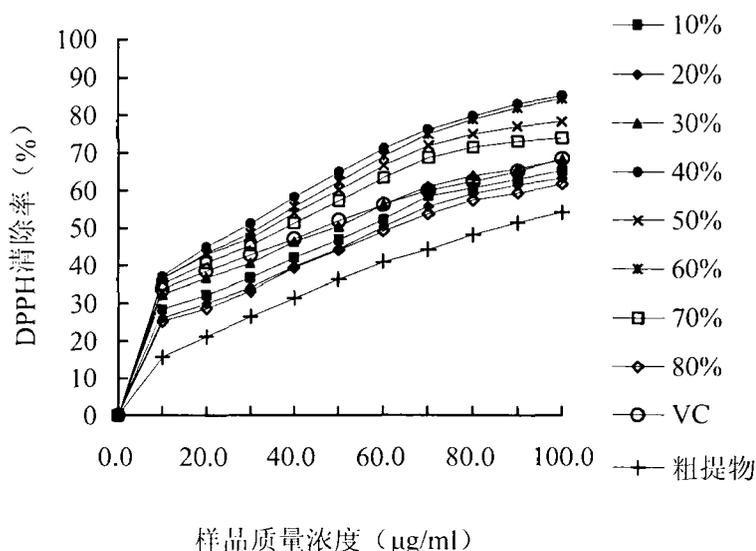


图 3-3 各种样品对 DPPH 的清除能力

Fig 3-3 The scavenging capacity of samples on DPPH free radical

表 3-4 分级洗脱花色苷清除 DPPH 自由基的 IC₅₀

Table 3-4 The IC₅₀ of the scavenging capacity of anthocyanin on DPPH free radical

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	V _C	粗提物
IC ₅₀ (µg/mL)	55.86	59.48	49.06	28.17	34.14	32.11	37.98	61.99	45.96	85.66

由图 3-3 可以看出,每种洗脱物对 DPPH 都有一定的清除能力,清除率在 V_C 对照组上下,并且清除率随质量浓度的增加而增大,呈现明显的量效关系。根据表 3-4 可以看出不同花色苷洗脱物对 DPPH 自由基的清除能力大小依次为:40%乙醇>60%乙醇>50%乙醇>70%乙醇>30%乙醇>V_C>10%乙醇>20%乙醇>80%乙醇>粗提物。

3.4.5 分级洗脱花色苷清除 ABTS 的能力

ABTS[2, 2'-边氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-6 磺酸)]是一种供氢体。该方法作为一种用于体外测定物质总抗氧化能力的新方法,按照 3.3.8 节的方法,以 V_C 作阳性对照,8 种花色苷洗脱物及花色苷粗提物对 ABTS 自由基的清除率如图 3-4 所示,并计算其 IC_{50} 如表 3-5 所示。

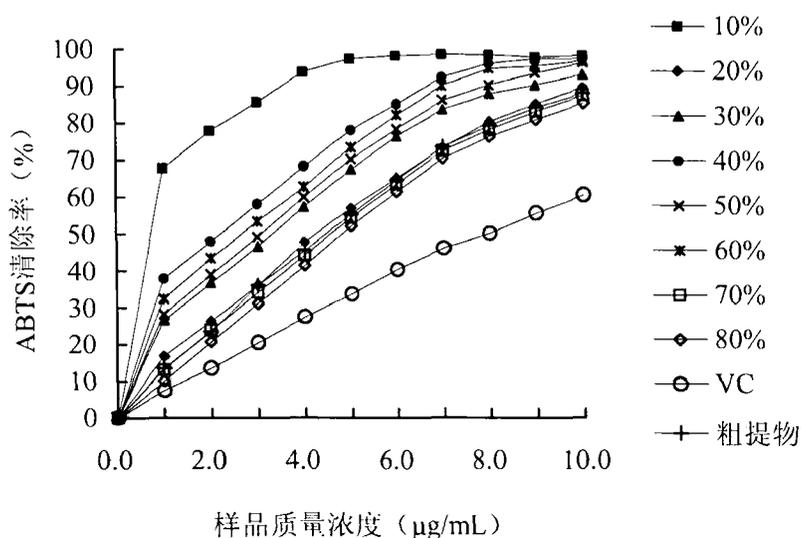


图 3-4 各种样品对 ABTS 的清除能力

Fig 3-4 The scavenging capacity of samples on ABTS free radical

表 3-5 分级洗脱花色苷清除 ABTS 自由基的 IC_{50}

Table 3-5 The IC_{50} of the scavenging capacity of anthocyanin on ABTS free radical

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	V_C	粗提物
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	0.74	4.24	3.31	2.20	3.07	2.66	4.57	4.79	7.96	4.46

由图 3-4 可以看出,每种洗脱物对 ABTS 都有很强的清除能力,均高于 V_C 对照组,并且清除率随质量浓度的增加而增大,呈现明显的量效关系。根据表 3-5 可以看出不同花色苷洗脱物对 ABTS 自由基的清除能力大小依次为:10%乙醇>40%乙醇>60%乙醇>50%乙醇>30%乙醇>20%乙醇>粗提物>70%乙醇>80%乙醇> V_C 。

3.5 本章小结

本章将蓝靛果花色苷粗提物进行了分离纯化,比较了不同洗脱物的抗氧化性,得到了一下结论:

(1) 通过评价五种大孔树脂对蓝靛果花色苷的吸附和解吸能力,确定了 X-5 大孔树脂为纯化蓝靛果花色苷的最佳树脂。

(2) 在 $\cdot\text{OH}$ 体系中,60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物清除羟自由基的 IC_{50} 最低,因此其清除羟自由基的能力最强。并且每种洗脱物的清除能力均高于 V_C 对照组和花色苷粗提物。

(3) 在 $O_2^{\cdot-}$ 体系中, 60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物清除超氧自由基的 IC_{50} 最低, 因此其清除超氧自由基的能力最强, 并且每种洗脱物的清除能力均高于花色苷粗提物, 但均低于 V_C 对照组。

(4) 在 DPPH 体系中, 40%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 DPPH 自由基的 IC_{50} 最低, 因此其清除 DPPH 自由基的能力最强, 高于 V_C 对照组和花色苷粗提物。但有的洗脱物清除率低于 V_C 对照组。

(5) 在 ABTS 体系中, 10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 ABTS 自由基的 IC_{50} 最低, 因此其清除 ABTS 自由基的能力最强, 并且每种洗脱物的清除能力均高于 V_C 对照组, 但 70%和 80%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物清除能力较花色苷粗提物低。

(6) 通过测定抗氧化性可见, 不同洗脱物中的花色苷及其衍生物对不同的自由基表现出了不同的抗氧化能力, 这是由于花色苷抗氧化的主要途径有三种: ①抑制自由基的产生或直接清除自由基。花色苷清除自由基的功能主要和它分子中的羟基有关, 特别是 3-位或 3'-、4'-、5'-位羟基有关。②激活抗氧化酶体系。通过激活过氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等来达到抗氧化效果, 而抗氧化酶的重要生理功能也在于其对自由基的清除作用。③与诱导氧化的过度金属络合, 可以直接降低 LDL 的氧化程度, 也可抑制 Fenton 反应起到抑制活性氧自由基产生的作用^[10]。总体看来, 10%、40%、50%和 60%乙醇洗脱物的抗氧化活性较 20%、30%、70%和 80%乙醇洗脱物高。

4 蓝靛果花色苷抗癌功能的研究

4.1 引言

据统计,每年全世界有将近上千万的人死于癌症,由于自然环境严重污染,存在大量致癌物,如各种化学致癌物、各种辐射、慢性炎症等在长期接触后都会引起基因突变,诱发各种疾病,最终引发癌症。其中自由基学说是众多学说之一。研究人员越来越重视从可食用的植物中提取有效的抗癌成分。

目前国内外的许多研究证实了花色苷对多种癌症有不同程度的抑制作用,这是由于其具有较强的抗氧化活性,能够抑制细胞增殖使其凋亡等作用。目前已经研究出花色苷针对乳腺癌、结肠癌、白血病和皮肤癌等都有抑制作用。上一章实验已经表明蓝靛果花色苷具有很强的抗氧化能力,本章选取了抗氧化性较强的蓝靛果花色苷洗脱物,利用MTT法对三种最为常见的肿瘤细胞的癌细胞抑制率进行比较,即肺癌细胞、肝癌细胞和宫颈癌细胞,筛选出癌细胞抑制率最高的花色苷洗脱物,为治疗癌症提供一定参考资料。

4.2 实验材料及仪器

4.2.1 实验材料

人肺癌细胞株A-549	哈尔滨工业大学实验室提供
人肝癌细胞株HepG2	哈尔滨工业大学实验室提供
人宫颈癌细胞株Hela	哈尔滨工业大学实验室提供
胰蛋白酶	天津市灏洋生物制品有限责任公司
胚胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
DMEM培养基	Gibco公司
二甲基亚砜(DMSO)	Amresco公司
蓝靛果	采摘于大兴安岭
无水乙醇	天津市东丽区天大化学试剂厂

4.2.2 实验仪器

YP2001N电子天平	上海精密科学仪器有限公司
旋转蒸发仪	上海申胜仪器公司
DK-98-1电热恒温水浴锅	天津市泰斯特仪器有限公司
超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
水平摇床	北京六一仪器厂
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Forma 公司

GL-16G-C型高速冷冻离心机	上海科兴仪器有限公司
96孔培养板	Greiner 公司
TDL-5台式离心机	上海安亭科学仪器厂
酶标仪	Biocell 公司

4.3 实验方法

4.3.1 溶液的配制

4.3.1.1 PBS缓冲液

用双蒸水溶解PBS缓冲液的颗粒，并定容至1000mL，高压灭菌后4℃冷藏保存备用。使用前需加入100μg/mL青霉素和链霉素，再次定容灭菌即可。

4.3.1.2 MTT溶液

准确称取50mg MTT，溶解于配制好的PBS缓冲液中，充分溶解后过0.22μm滤菌膜，并分装后-20℃保存备用。

4.3.1.3 胰蛋白酶溶液

准确称取0.25g胰蛋白酶溶解在100mL配制好的PBS缓冲液中，充分溶解后过0.22μm滤菌膜，并4℃冷藏保存备用。

4.3.1.4 牛血清

牛血清在使用前必须灭活，将牛血清瓶置于56℃水浴锅中30min，进行灭活后分装，分装后抽样做无菌试验，放置在-20℃以下保存，防止血清反复冻融导致蛋白变性。

4.3.1.5 细胞培养液

DMEM培养基过0.22μm滤菌膜，并加入10%已灭活的胚胎牛血清，并加入0.1%双抗（100μg/mL青霉素和100μg/mL链霉素）。

4.3.2 细胞培养

4.3.2.1 细胞的复苏

将冷冻管从液氮罐中取出，迅速放入已经预热的水浴锅中解冻，约一两分钟能完全溶解，取出用酒精棉球擦干外壁，1000r/min离心10min，丢弃上清液，加入培养液，用移液枪吹打细胞悬液使其均匀分布，调整细胞浓度在 $1\sim 5\times 10^5$ 个/mL，放入培养瓶中在37℃的CO₂培养箱中培养24h，换液视细胞情况而定。

4.3.2.2 细胞的培养

人肺癌细胞A-549、人肝癌细胞HepG2和人宫颈癌细胞均用含10%胎牛血清的DMEM作为细胞培养基。三种细胞株置于37℃的CO₂培养箱中培养，取对数生长期的细胞进行实验。

4.3.2.3 细胞传代

首先将需要量的PBS缓冲液、培养基和胰蛋白酶放入37℃水浴锅中预热。紫外灯照

射超净工作台后用打开通风，点燃酒精灯并用酒精棉擦拭工作台。从培养箱中取出培养瓶在显微镜下观察细胞。

在超净工作台里打开培养瓶，瓶口要在酒精灯上灼烧灭菌，吸去旧培养液，再用PBS缓冲液清洗两遍，加入适量的胰蛋白酶液，保证覆盖细胞即可，在倒置显微镜中观察细胞消化程度，在适当的时机吸去胰蛋白酶液，然后加入新的培养液，用移液枪吹打细胞使其吹散并均匀悬浮于培养液中，观察细胞量，吸取一部分细胞悬液分装在新的培养瓶中，加入适量培养液，放入CO₂培养箱中继续培养，当生长面积占瓶底面积80%时继续传代。

4.3.3 蓝靛果花色苷洗脱物的制备

取蓝靛果粉末，按照确定的最佳提取工艺参数进行提取，即用61%乙醇做提取剂，液料比为81:1，59℃水浴，提取60min，3000r/min离心5min后取上清液，回收的滤渣再提取两次，合并三次的上清液，50℃旋转蒸发浓缩后得到蓝靛果花色苷粗提液。

将预处理好的大孔树脂以湿法装柱，所用柱子的径长比为1:10。上样速度为1mL/min，吸附4h后进行洗脱，洗脱剂依次为水，10%乙醇，20%乙醇，30%乙醇，40%乙醇，50%乙醇，60%乙醇，每种洗脱剂所用体积为两倍的柱体积，洗脱速度为5mL/min，收集除了水以外的各洗脱液，并且低温旋转蒸发浓缩各洗脱液后真空冷冻干燥得洗脱物粉末，置于干燥器内备用。

测定其抗癌作用时，称取一定量洗脱物用培养基配制成指定浓度的样品，过0.22μm滤菌膜后封口，4℃冷藏保存。

4.3.4 蓝靛果花色苷对癌细胞抑制率的测定

将三种癌细胞培养至对数期，经胰蛋白酶消化后，用培养基稀释成 1×10^5 个/mL。在96孔板的每孔中加入100μL的细胞悬液，置于37℃的CO₂培养箱中培养24h。再取出孔板在每孔中加入设定好浓度的样品液，同时设不加样的为空白对照，分别培养24h、48h和72h。

培养时间到后，将每孔中加入10μL MTT（5mg/mL），置于37℃的CO₂培养箱中培养4h。用移液枪移去上清液，再加入150μL DMSO溶液，振荡10min使其充分溶解，用酶标仪测定OD值。并计算抑制率：

$$\text{细胞生长抑制率} = (1 - \text{实验组OD} / \text{对照组OD}) \times 100\%$$

4.4 实验结果与分析

4.4.1 蓝靛果花色苷洗脱物对人肺癌 A-549 细胞的抑制作用

图4-1中A、B、C这三幅图分别表示，在对肺癌细胞加药后分别培养了24h、48h和

72h后的抑制率图。从图中可以看出，每种洗脱物对肺癌A-549细胞都有一定的抑制作用，随着样品质量浓度的增加，抑制率也随之升高，呈现了量效关系，并且随着培养时间的增长，抑制率也有所上升，呈现时效关系。三幅图中可以看出，10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物的抑制率均为最高，且浓度为1.0mg/mL时在培养了24h、48h和72h后的对肺癌细胞的抑制率分别为44.62%、53.64%和59.42%。

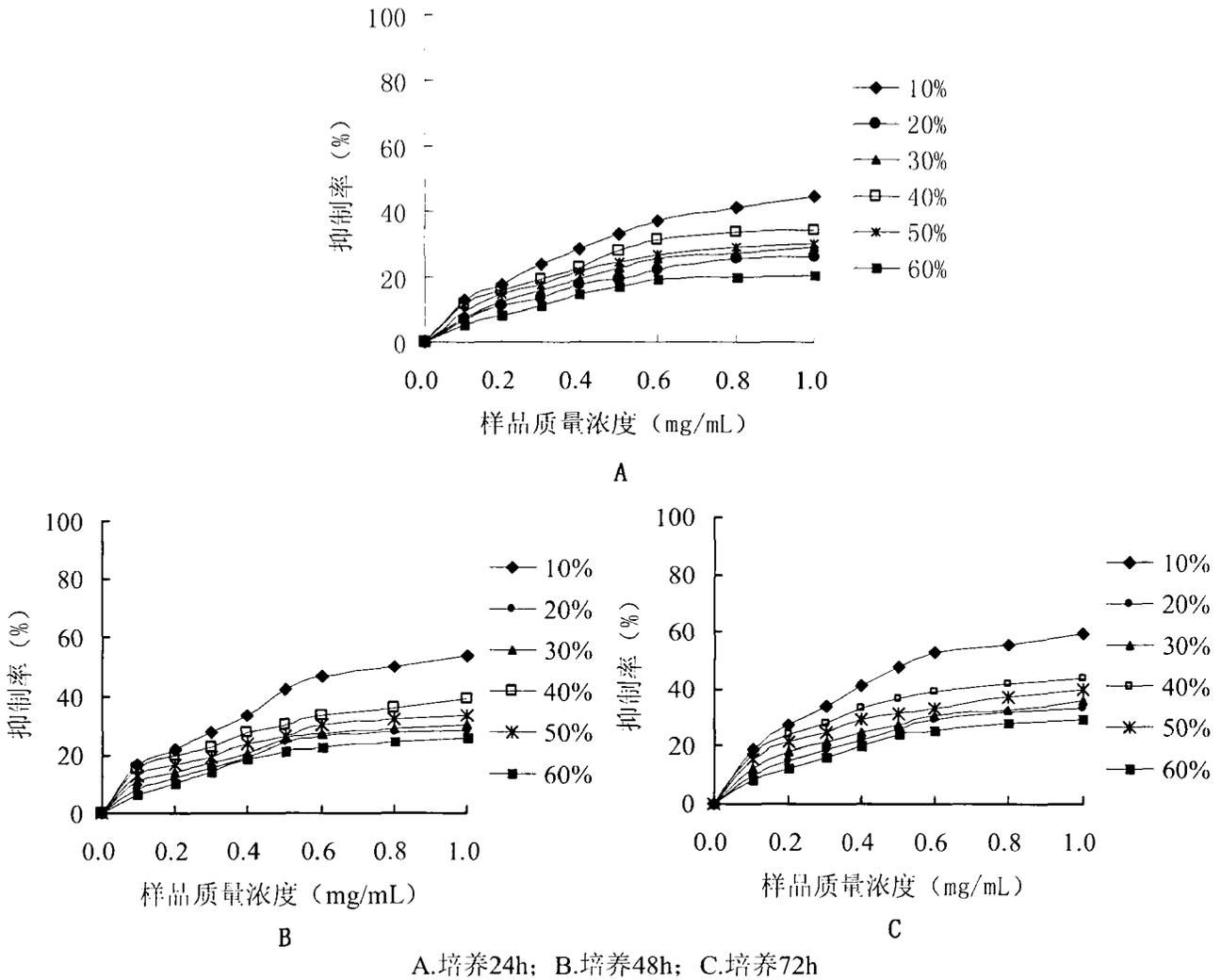


图4-1 洗脱物对肺癌细胞的抑制率

Fig 4-1 The inhibition rate of elution on lung cancer cell

表4-1 洗脱物对肺癌细胞的 IC_{50} (72h)

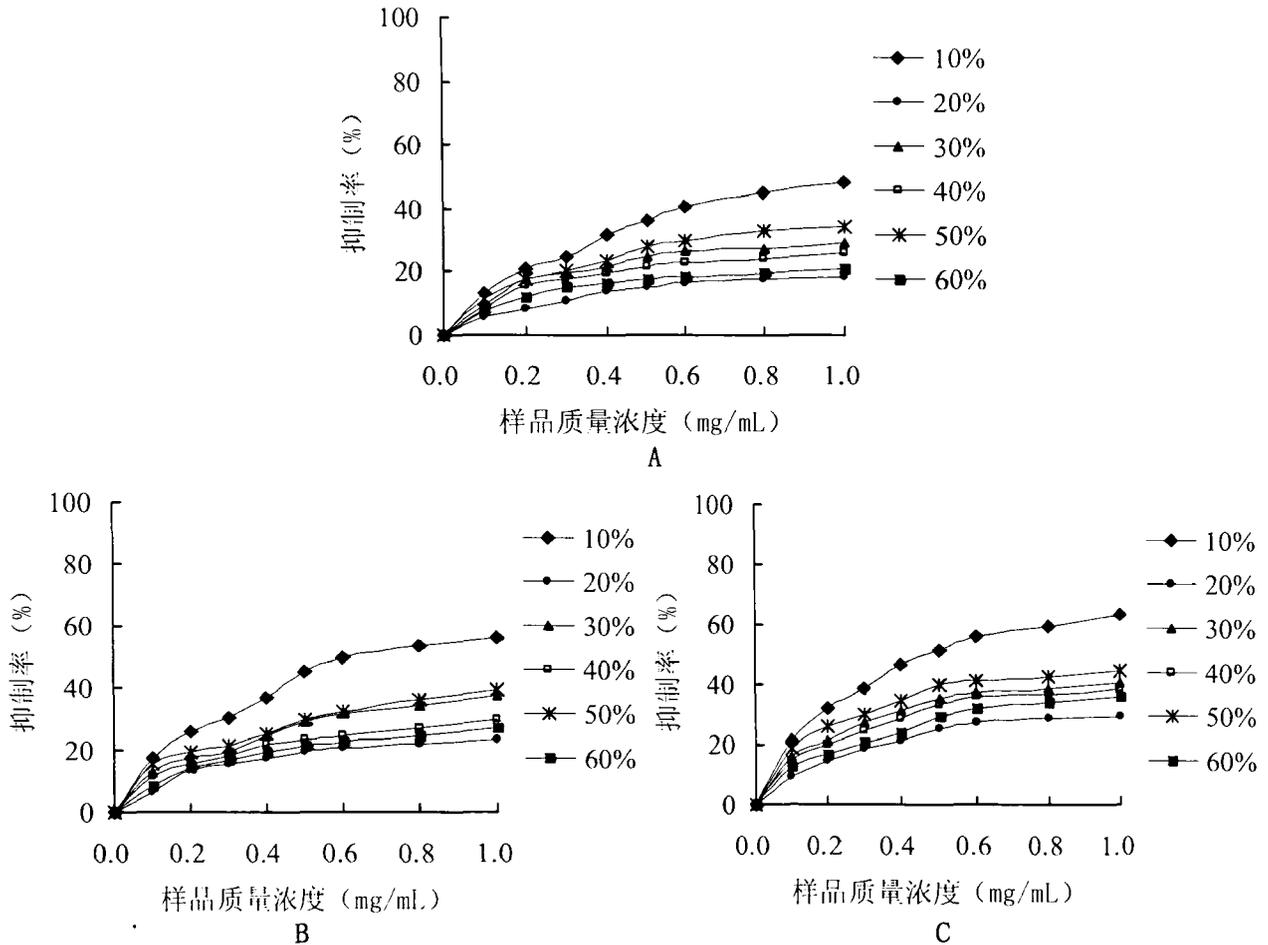
Table 4-1 The IC_{50} of the inhibition rate of elution on lung cancer cell (72h)

	10%	20%	30%	40%	50%	60%
IC_{50} (mg/mL)	0.605	2.451	2.204	1.527	1.925	2.829

从表4-1洗脱物对肺癌细胞的 IC_{50} 可以看出六种洗脱物对肺癌细胞的抑制率从大到小为10% > 40% > 50% > 30% > 20% > 60%。

4.4.2 蓝靛果花色苷洗脱物对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用

图4-2中A、B、C这三幅图分别表示，在对肝癌细胞加药后分别培养了24h、48h和72h后的抑制率图。从图中可以看出，每种洗脱物对肝癌A-549细胞都有一定的抑制作用，随着样品质量浓度的增加，抑制率也随之升高，呈现了量效关系，并且随着培养时间的增长，抑制率也有所上升，呈现时效关系。三幅图中可以看出，10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物的抑制率均为最高，且浓度为1.0mg/mL时在培养了24h、48h和72h后的对肝癌细胞的抑制率分别为48.11%、56.2%和63.21%。



A.培养24h; B.培养48h; C.培养72h

图4-2 洗脱物对肝癌细胞的抑制率

Fig 4-2 The inhibition rate of elution on liver cancer cell

表4-2 洗脱物对肝癌细胞的IC₅₀ (72h)

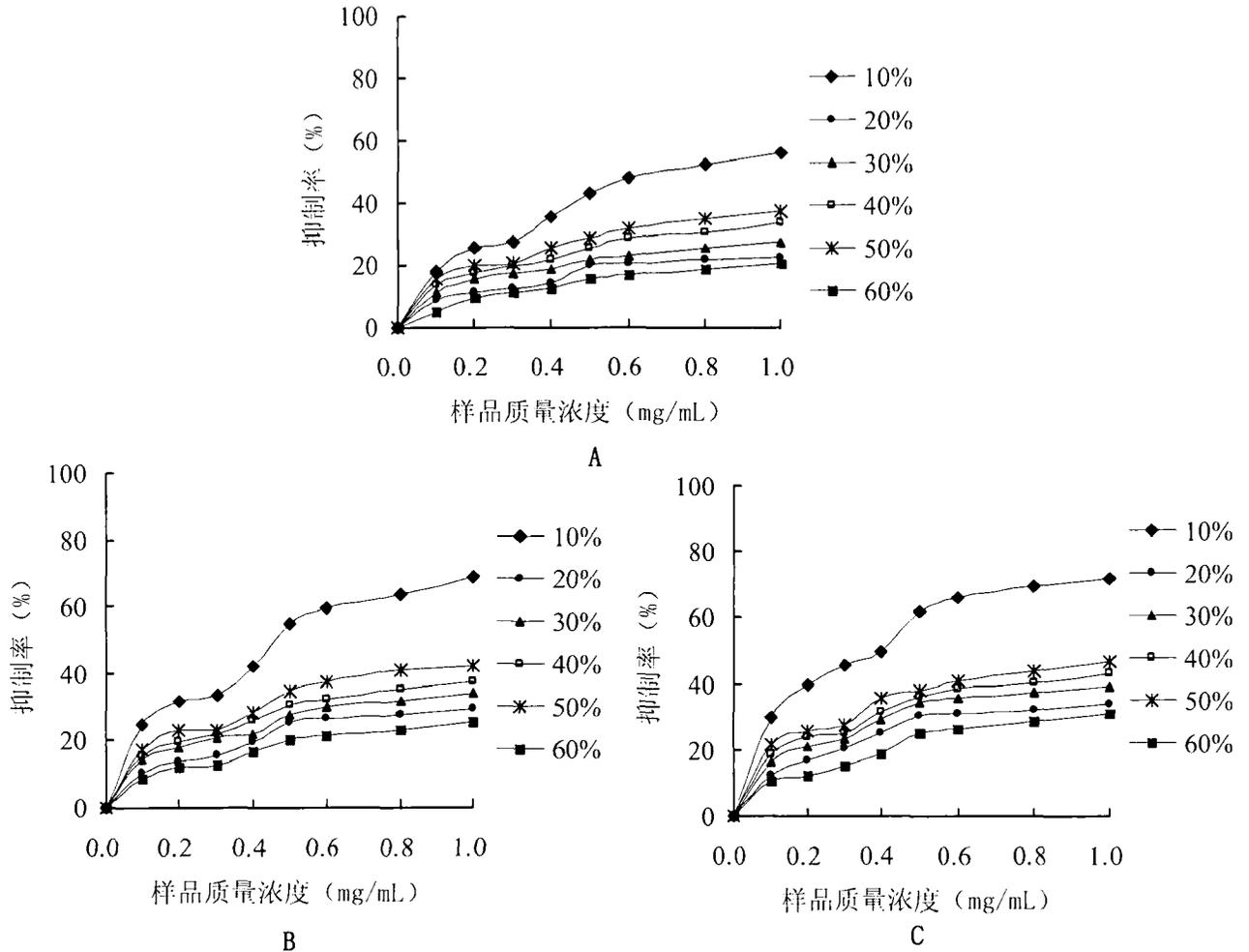
Table 4-2 The IC₅₀ of the inhibition rate of elution on liver cancer cell (72h)

	10%	20%	30%	40%	50%	60%
IC ₅₀ (mg/mL)	0.473	3.911	2.234	2.643	1.591	3.125

从表4-2洗脱物对肝癌细胞的IC₅₀可以看出六种洗脱物对肝癌细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 30% > 40% > 60% > 20%。

4.4.3 蓝靛果花色苷洗脱物对人宫颈 Hela 细胞的抑制作用

图4-3中A、B、C这三幅图分别表示,在对宫颈癌细胞加药后分别培养了24h、48h和72h后的抑制率图。从图中可以看出,每种洗脱物对宫颈癌A-549细胞都有一定的抑制作用,随着样品质量浓度的增加,抑制率也随之升高,呈现了量效关系,并且随着培养时间的增长,抑制率也有所上升,呈现时效关系。三幅图中可以看出,10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物的抑制率均为最高,且浓度为1.0mg/mL时在培养了24h、48h和72h后的对宫颈癌细胞的抑制率分别为56.09%、68.64%和72.12%。



A.培养24h; B.培养48h; C.培养72h

图4-3 洗脱物对宫颈癌细胞的抑制率

Fig 4-3 The inhibition rate of elution on cervical cancer cell

表4-3 洗脱物对宫颈癌细胞的 IC_{50} (72h)

Table 4-3 The IC_{50} of the inhibition rate of elution on cervical cancer cell (72h)

	10%	20%	30%	40%	50%	60%
IC_{50} (mg/mL)	0.404	3.061	1.932	1.609	1.414	4.371

从表4-2洗脱物对宫颈癌细胞的 IC_{50} 可以看出六种洗脱物对宫颈癌细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 40% > 30% > 20% > 60%。

4.5 本章小结

癌症是至今都难以攻克疾病之一，很多人的死亡都是因为癌症，治疗难度极大，目前常用的治疗恶性肿瘤的方法有手术切除、放射疗法和化学疗法，这些方法却不能彻底的治愈肿瘤，存在毒副作用并且复发率高，让患者忍受很大的痛苦。因此从天然产物中寻找具有抗肿瘤作用的并且毒副作用小的生物活性成分已经成为抗肿瘤药物的发展趋势。

本实验研究了蓝靛果花色苷洗脱物对人肺癌A-549细胞、人肝癌HepG2细胞和人宫颈癌Hela细胞的抑制率，采用了MTT法测定不同蓝靛果花色苷洗脱物对三种癌细胞的抑制作用。从对人肺癌A-549细胞进行的测定结果可以看出六种洗脱物对肺癌细胞的抑制率从大到小为10% > 40% > 50% > 30% > 20% > 60%；从对人肝癌HepG2细胞进行的测定结果可以看出六种洗脱物对肝癌细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 30% > 40% > 60% > 20%；从对人宫颈癌Hela细胞进行的测定结果可以看出六种洗脱物对宫颈癌细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 40% > 30% > 20% > 60%。

从上述结果可以筛选出抑制效果最强的洗脱级分，即10%花色苷洗脱物在质量浓度为1.0mg/mL培养了72h后对人肺癌A-549细胞、人肝癌HepG2细胞和人宫颈癌Hela细胞的抑制率分别为59.42%、63.21%和72.12%。

结论

蓝靛果作为一种野生浆果，具有丰富的花色苷等生物活性成分，更好的开发利用蓝靛果的保健功能，并运用在食品医药等方面具有很大的意义。本文研究了蓝靛果花色苷粗提物的提取工艺以及纯化后的抗氧化性和抗癌作用，得到了以下结论：

(1) 通过单因素实验和响应面实验确定了蓝靛果花色苷的最佳提取工艺条件：乙醇浓度 61%，液料比 81:1，提取温度 59℃，提取时间 60min。在此条件下，蓝靛果花色苷的提取量最大，达到 11.501mg/g。各因素对蓝靛果花色苷提取量的影响作用从大到小为：乙醇浓度>温度>液料比。

(2) 在不同的自由基评价体系中，每种花色苷洗脱物都表现出不同的清除能力。在·OH 体系中，60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对羟自由基的清除能力高于其他洗脱物；在 O_2^- 体系中，60%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对超氧自由基的清除能力高于其他洗脱物；在 DPPH 体系中，40%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 DPPH 自由基的清除能力高于其他洗脱物；在 ABTS 体系中，10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对 ABTS 自由基的清除能力高于其他洗脱物。由此可见，不同洗脱物中的花色苷及其衍生物对不同的自由基表现出了不同的抗氧化能力。总体看来，10%、40%、50%和 60%乙醇洗脱物的抗氧化活性较 20%、30%、70%和 80%乙醇洗脱物高。

(3) 利用MTT法比较了蓝靛果花色苷洗脱物对三种癌细胞的抑制作用，实验结果表明10%乙醇洗脱后的花色苷洗脱物对三种癌细胞的抑制率均最高，对人肺癌A-549细胞的抑制率从大到小为10% > 40% > 50% > 30% > 20% > 60%；对人肝癌HepG2细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 30% > 40% > 60% > 20%；对人宫颈癌Hela细胞的抑制率从大到小为10% > 50% > 40% > 30% > 20% > 60%。抑制效果最强的10%花色苷洗脱物，在质量浓度为2.0mg/mL培养了72h后对人肺癌A-549细胞、人肝癌HepG2细胞和人宫颈癌Hela细胞的抑制率分别为59.42%、63.21%和72.12%。

(4) 本实验对蓝靛果花色苷的抗氧化性和抗癌作用进行了研究，为蓝靛果进一步的开发利用提供了参考依据。可以看出蓝靛果花色苷具有很高的抗氧化性和抗癌功能，在食品中，可作为天然色素在为食物增添色彩的同时起到抗氧化剂的功能，进而作为保健食品；在化妆品中，添加少量的蓝靛果花色苷，可以作为保护皮肤的天然抗氧化剂；蓝靛果花色苷也可应用到药品中，发挥其抗癌抗氧化作用。最终旨在使蓝靛果花色苷对食品工业和人类健康发挥巨大的作用。

参考文献

- [1]邵树云,田喜均,岳宝昌,等.黑龙江省主要野生经济植物图谱.哈尔滨:东北林业大学出版社,2001:418
- [2]聂绍荃,袁晓颖,杨逢建,等.黑龙江植物资源志.哈尔滨:东北林业大学出版社,2003:636~637
- [3]周以良,董世林,聂绍荃.黑龙江树木志.哈尔滨:黑龙江省科学技术出版社,1986:525
- [4]霍俊伟,睢薇,阮瑞雪.黑龙江省野生蓝靛果忍冬染色体的观察.中国林副特产,2004,8(4):15~16
- [5]李恒,刑桂菊,廉美丹,等.药用植物-蓝靛果.中国林副特产,2002,(1):10
- [6]汪矛,谷安根.蓝靛果忍冬的果实解剖及其分类意义.植物研究,1988,8(4):203~205
- [7]刘希财,王元舒.蓝靛果忍冬色素提取工艺的研究.北京园艺,2012:(6):16~18
- [8]丁健.国内蓝靛果的发展及利用研究进展.加工与储藏,2011(14):61~62
- [9]许双庆,王培清.蓝靛果忍冬栽培技术.北方园艺,1989(7):19
- [10]向延菊,王大伟.蓝靛果忍冬的研究现状及其发展前景.塔里木农垦大学学报,2004,16(4):26~29
- [11]Zholobova,ZP.Basis for commercial cultivation of blue honeysuckle. Sadovodstvo IV inogradarstvo, 1990, (8):23~25
- [12]侯江雁,李彦冰,崔立杰.蓝靛果保健颗粒的制备和毒理实验.中医药学报,2001,29(3):58
- [13]金政,金美善,李相伍,等.蓝靛果对四氯化碳损伤小鼠肝脏保护作用的组织化学研究.延边大学医学学报,2001,24(1):18~20
- [14]金政,王启伟,金美善,等.肝损伤后溶酶体和酸性磷酸酶活性改变和蓝靛果的作用.延边大学医学学报,2001,24(2):79~81
- [15]王启伟,金政,李相伍,等.蓝靛果对四氯化碳损伤小鼠血清谷草转氨酶的影响.延边大学医学学报,2001,24(3):191~193
- [16]邱绍婕,李盈,蔡和金,等.蓝靛果果汁对小鼠应激反应的影响.哈尔滨医药,2001,21(1):20
- [17]邱绍婕,李盈,贾颖,等.蓝靛果果汁对小鼠化疗药物副反应的影响.哈尔滨医药,2002,22(5):44~45
- [18]韩京振,金政,金松竹,等.蓝靛果抗氧化作用的实验研究.中国中医药科技,2002,9(1):45~46
- [19]杨恩月,金光,洪淳赞.蓝靛果乙酸乙酯提取物对小鼠 S180 肉瘤和肝癌 H22 实体

- 瘤的抑制作用. 延边大学医学学报, 2005,28(2):104~107
- [20]Shiow Y Wang,Linda Bowman,Min Ding.Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries(*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells.Food Chemistry, 2008,(107):1261~1269
- [21]王宏涛, 叶云, 肖顺林, 等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响. 辽宁中医杂志, 2007,34(3):360~361
- [22]WangH, CaoG, Prior, RL.Total antioxidant capacity of fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, (44):701~705
- [23]Wang SY, LinHS.Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, (48):140~146
- [24]Wang SY, JiaoH. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, (48):5677~5684
- [25]Ding, M, FengR, Wang SY, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. Journal of Biological Chemistry, 2006, (281):17359~17368
- [26]FengR, Bowman LL, LuY, et al. Blackberry extracts inhibit activating protein 1 activation and cell transformation by perturbing the mitogenic signaling pathway. Nutrition and Cancer, 2004,50(1):80~89
- [27]Wang H, Cao G, Prior RL.Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, (45):304~309
- [28]Morazzoni P, Bombardelli E. *Vaccinium myrtillus* L. Fitoterapia, 1996, (LXVII): 3~29
- [29]Tsuda T, Horio F, UchidaK, et al. Dietary cyanidin 3-o-beta-d-glucoside rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. The Journal of Nutrition, 2003, (133):2125~2130
- [30]Gongjian Fan, Yongbin Han, Zhenxin Gu, et al. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. LWT, 2008(41):1412~1416
- [31]Araceli Castaneda-Ovando, Made Lourdes Pacheco-Hernandez, Ma. Elena Paez-Hernandez, et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 2009, 113(4):859~871
- [32] KAY C D, KROON PA, CASSIDY A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. Molecular Nutrition & Food Research, 2009, 53 (S1): S92~101
- [33] PRIOR R L, WU X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic

- patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 2006, 40(10):1014~1028
- [34]郭松年. 石榴汁花色苷稳定性、抗氧化性及其组分鉴定. 西北农林科技大学博士学位论文, 2008
- [35]Jin ming kong, Lian sai chia, et al. analysis and biological activities of anthocyanin. *Phytochemistry*, 2003,64:923~933
- [36] Kong JM, Chia L S, Goh N K, et a.l Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003, 64(5):923~933
- [37]赵云荣, 王世雷. 植物花青素研究进展. *安徽农业科学*, 2008, 36 (8):3095~3097
- [38]郭耀东. 葡萄皮花色苷提取纯化技术及稳定性研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008
- [39]陈建, 陈晨甜, 吕长平. 观赏植物花色形成影响因子研究进展. *现代园艺*, 2009,(6):4~6
- [40]姜平平, 吕晓玲, 朱惠丽. 花色苷类物质分离鉴定法. *中国食品添加剂*, 2003,24(4):108~111
- [41]R P METIVIER, F J FRANCIS, F M CLYDESDALE.Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 1980(45):1099~1100
- [42]李颖畅, 孟宪军. 酶法提取蓝莓果中花色苷的研究. *食品工业科技*, 2008,29(04):215~218
- [43]卢锋波, 刘桂玲, 王烁, 等. 响应面法优化果胶酶酶解提取黑莓花色苷的工艺参数. *食品科学*, 2010,31(16):11~15
- [44]刘瑞军, 谢鑫, 胡立新. 越橘花色苷酶法加酸提取工艺. *食品研究与开发*, 2010,31(9):177~180
- [45]张树宝. 超临界 CO₂ 萃取大花葵花色苷工艺的研究. *特产研究*, 2006,(1):29~33
- [46]刘德江, 刘娟. RSM 法优化蓝靛果色素的提取工艺. *林产化工*, 2012,(03):59~61
- [47]孟宪军, 王成, 宋德群. 响应面法优化超声提取蓝莓花色苷工艺的研究. *食品科技*, 2010,35(9):249~253
- [48]李巨秀, 王仕钰, 房红娟. 石榴花色苷的微波辅助提取及抗氧化活性研究. *食品科学*, 2010,31(18):165~169
- [49]张朝红, 古月华, 房红娟. 微波辅助提取果桑花色苷的工艺研究. *食品科学*, 2010,31(18):192~195
- [50]韩永斌. 紫甘薯花色苷提取工艺与组分分析及其稳定性和抗氧化性研究. 南京农业大学博士学位论文, 2007
- [51]张燕, 李玉杰, 胡小松. 高压脉冲电场 (PEF) 处理对红莓花色苷提取过程的影响. *食品与发酵工业*, 2006,32(6):129~132
- [52]郭耀东. 葡萄皮花色苷提取纯化技术及稳定性研究. 西北农林科技大学硕士学位论文

- [52]郭耀东. 葡萄皮花色苷提取纯化技术及稳定性研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008
- [53]王振宇, 田福. 大孔树脂吸附纯化蓝靛果红色素的研究. 食品研究与开发, 2008,29(8):184~188
- [54]于东, 陈桂星, 方忠祥. 花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究进展. 食品发酵与工业, 2009,35(3):127~133
- [55]Y. M. Andersen, T. Fossen, K. Torskangerpoll, et al. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry*, 2004,65(4):405~410
- [56]马淑青, 吕晓玲, 范辉. 阳离子交换树脂二次纯化紫甘薯花色苷的研究. 离子交换与媳妇, 2010,26(3):218~225
- [57]徐忠, 博凯. 千日红花色苷的酶法提取及纯化研究. 食品与发酵工业, 2006,32(8):139~141
- [58]Harborne J B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *J Biochem*, 1958,70:22~28.
- [59]Heidari R, Khalafi I, Dolatabadzadeh N. Anthocyanin pigments of siahe sardast grapes *Journal of Sciences. Islamic Republic of Iran*, 2004,15 (2):113~117.
- [60]Degenhardt A, Knapp H, Winterhalter P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Agric Food Chem*, 2000,48(2):338~343.
- [61]李玉山, 王经安. 越橘花色苷不同提取工艺研究. 化学工程师, 2009,(3):58~60
- [62]Fuleki T, Francis F J. Quantitative methods for anthocyanins.I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 1968,33:72~77
- [63]Dangles O, Saito N, Brouillard R. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *J Am Chem Soc*, 1993,115:3125~3132
- [64]Prodanov M P, Domnguez JA, Blzquez I. Some aspects of the quantitative/ qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. *Food Chemistry*, 2005,90:585~596
- [65]Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*, 2005,88(5):1269~1278
- [66]Markakis P. Anthocyanins as food colors. San Diego Academic Press, 1982
- [67]杨庆明. 大麦及麦芽提取物抗氧化活性研究. 西北师范大学硕士学位论文, 2009
- [68]刘海. 试述自由基及抗自由基中药. 实用中医药杂志, 2007,23(5):327~328
- [69]郑荣梁. 自由基生物学. 北京: 高等教育出版社, 1992
- [70]YANG Z D,ZHAI W W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted

- from the seed and cob of purple corn (*Zeamays L.*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010,11:169~176.
- [71]张名位, 张瑞芬, 郭宝江, 等. 黑米皮花色苷的抗氧化与降血脂作用. *营养学报*,2006,28(5):404~408
- [72]KONG J M, CHIAL S, GOHN K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003,64(5):923~933
- [73]LAIA G, MALIK M, ZHAO C, et al. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*,2006,54(1):84~93
- [74]SERAFINO A, SINIBALDI-VALLEBONA P, LAZZARINO G. Differentiation of human melanoma cells induced by cyaniding-3-O-beta-glucopyranoside. *FASEB J*,2004,18(15):1940~1942.
- [75]HOU D X, OSE T, LIN S, et al. Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol*, 2003, 23(3):705~712
- [76]MUNOX-ESPADA A C, WATKINS B A. Cyanidin attenuates PGE2 production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*, 2006,17(9):589~596
- [77]LAMY S, LAFLEUR R, BEDARD V, et al. Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system. *J Cell Biochem*,2007,100 (1):100~111
- [78]SHIH P H, YEH C T, YEN G C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(10):1557~1566
- [79]郑荣梁, 黄中洋. 自由基生物学 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007
- [80] SHIH P-H, CHANY C, LIAO JW, et al. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea L.*) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *Journal of nutritional biochemistry*,2010,21(7):598~605
- [81]HOUSTIS N, ROSEN E D, LANDER E S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*,2006,440:944~948
- [82]郭红辉, 胡艳, 刘驰, 等. 花色苷抗氧化及改善胰岛素抗性的体外研究. *营养学报*, 2009,31(5):490~493
- [83] DEYANIRA OJIDA, ENRIQUE JIM NEZ-FERRER, ALEJANDRO ZAMIPA, et al. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins dephinidin-and cyaniding-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010,127:7~10

- [84] SURHY J, CHUNG S, CHAH H, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals down regulation of COX-2 and NOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*, 2001, 480-481: 243~268.
- [85] 褚衍亮, 王娜. 樟树果花色苷组分鉴定及抑菌防腐研究. *安徽农业科学*, 2010, 38(20): 10907~10909
- [86] Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*, 2005, 88(5): 1269~1278
- [87] 费荣昌. 实验设计与数据处理(第四版). 江南大学教材, 2001, 59~63
- [88] 唐传核, 彭志英. 天然花色苷类色素的生理功能及应用前景. *饮食与速冻食品工业*, 2000(1): 26~28
- [89] 薛红玮, 陈向民, 牟德华. 花色苷类色素抗氧化活性研究进展. *食品研究与开发*, 2009, 30(7): 190~192
- [90] WANG Lishu, STONER G D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*, 2008, 269: 281~290
- [91] 向延菊, 郑先哲, 王大伟. 野生浆果资源——蓝靛果忍冬利用价值的研究现状及应用前景. *东北农业大学学报*, 2005, 36(5): 699~671.
- [92] 王宏涛, 叶云, 肖顺林, 等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(3): 360~361
- [93] 莫巍. 彩叶树种叶片中花青素含量的测定及动态分析. *新疆农业科学*, 2007, 44(S2): 138~140
- [94] WANG H, CAO G, PRIOR RL. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, (44): 701~705
- [95] DING M, FENG R, WANG SY, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemo preventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, (281): 17359~17368
- [96] 徐建国, 胡青平. 决明子水提物体外清除自由基活性的研究. *食品科学*, 2006, 27(6): 73~75
- [97] 郭雪峰, 岳永德, 汤锋, 等. 用清除超氧阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(8): 1823~1826
- [98] BLOIS MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. *Nature*, 2002, 26: 1199~1200
- [99] WANWISA B, SOOTTAWAT B, WANNOP V, et al. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 2008, 106: 185~193
- [100] 周丽萍. Ralls 苹果多酚分离及抗氧化与脂肪代谢调节作用研究. 东北林业大学硕

士论文, 2010

[101] 倪勤学, 霍艳荣, 陆国权. 花色苷保健功能的研究进展 [J]. 安徽农业学, 2010,38(35):20025~20028

攻读学位期间发表的学术论文

- [1]王振宇,刘奕琳. 蓝靛果乙醇洗脱物的抗氧化活性研究. 食品工业科技, 2012(9):163-165
- [2]刘奕琳,王振宇. 蓝靛果中花色苷含量的测定及其体外抗氧化性. 中国林副特产, 2011(5):14-16
- [3]刘奕琳,王振宇. 蓝靛果花色苷乙醇洗脱物抗癌活性的研究. 食品工业科技, 2012(19)

致谢

衷心感谢导师王振宇教授，文章是在导师王振宇教授对本人的精心指导下完成的，导师一丝不苟的工作作风和严谨求实的治学态度，对我也产生了深刻的影响。他经常教导我们的一句话“老老实实做人，踏踏实实做事”已经深深影响的我，不仅是在学习和实验方面起到了很好的影响，还在生活方面收获感动，他的言传身教将使我终生受益。

在进行实验研究期间，感谢食品专业的各位教授热心指导与帮助，不胜感激。感谢实验室全体老师和同学的热情帮助和支持！

感谢学校的老师和同窗们的关心和支持！感谢所有帮助过我的人们！

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 东北林业大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期：

年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 东北林业大学 有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 东北林业大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：

刘奕琳

导师签名：

王振宇

签字日期：2012年6月12日

签字日期 2012 年 6 月 12 日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：