

笃斯越橘果实花色苷的色谱分离纯化、结构表征与抗氧化活性评价

齐璐瑶, 杨光, 石伟, 袁林丽, 纪丽莲, 张建梅*

(苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏苏州 215009)

摘要: 笃斯越橘果实富含丰富的花色苷, 具有重要的开发价值, 但目前其花色苷的系统研究仍较有限。该研究对笃斯越橘果实中的花色苷类化合物进行了分离纯化与结构鉴定, 并系统评价了其抗氧化活性及构效关系。采用 0.1% 盐酸水溶液提取、大孔树脂柱层析、葡聚糖 LH-20 凝胶柱色谱及制备型高效液相色谱技术, 从笃斯越橘果实中分离得到 7 个花色苷单体, 其中化合物 1、3、5、6、7 为首次从该植物中报道。抗氧化评价结果表明, 在 DPPH 和 ABTS 自由基清除实验中, 所有花色苷的活性均显著优于阳性对照 Vc; 在还原力实验中, 各花色苷及 Vc 的还原力随浓度升高而增强, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时化合物 2 吸光度最高, Vc 为 0.33, 与化合物 5、7 等活性较强的花色苷相当。构效关系分析表明, B 环邻二酚结构是高效抗氧化活性的关键, 含该结构的化合物 2 和 3 活性最强; B 环三羟基 (化合物 7) 次之; 甲氧基化或单羟基取代均导致活性下降。该研究揭示了笃斯越橘果实花色苷的化学多样性及其抗氧化构效规律, 为其作为天然抗氧化剂和高附加值产品的开发提供了理论依据。

关键词: 笃斯越橘; 花色苷; 分离纯化; 抗氧化; 构效关系

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0650

Chromatographic Separation, Purification, Structural Characterization, and Antioxidant Activity Evaluation of Anthocyanins from The Fruits of *Vaccinium Uliginosum* L.

QI Luyao, YANG Guang, SHI Wei, YUAN Linli, JI Lilian, ZHANG Jianmei*

(School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China)

Abstract: *Vaccinium uliginosum* L. fruits are rich in anthocyanins and possess significant development value, however, systematic studies on their anthocyanin profiles remains limited. In this study, anthocyanins from *V. uliginosum* L. fruits were isolated, purified, and structurally characterized, and their antioxidant activities as well as structure-activity relationships were systematically evaluated. Using 0.1% hydrochloric acid aqueous solution for extraction, followed by macroporous resin column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and preparative high-performance liquid chromatography, seven anthocyanin monomers were isolated from *V. uliginosum* L. fruits, among which compounds 1, 3, 5, 6, and 7 are reported from this plant for the first time. The antioxidant evaluation results showed that in both DPPH and ABTS radical scavenging assays, all tested anthocyanins exhibited significantly higher activities than the positive control vitamin C (Vc). In the reducing power assay, the reducing capacities of all anthocyanins and Vc increased with increasing concentration; at 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, compound 2 showed the highest absorbance, while Vc exhibited a value of 0.33, comparable to those of compounds 5 and 7, which also demonstrated strong reducing power. Structure-activity relationship analysis indicated that the ortho-dihydroxyl moiety on the B-ring is the key structural feature responsible for high antioxidant activity, with compounds 2 and 3 (containing this moiety) exhibiting the strongest activities, followed by compound 7 (bearing a trihydroxy B-ring), whereas methoxylation or mono-hydroxyl substitution led to decreased activity. This study reveals the chemical diversity of anthocyanins from *V. uliginosum* L. fruits and the structure-activity rules governing their antioxidant properties, thereby providing a theoretical basis for their development as natural antioxidants and high-value-added products.

Key words: *Vaccinium uliginosum* L.; anthocyanins; separation and purification; antioxidant; structure-activity relationship

收稿日期: 2026-04-26; 修回日期: 2026-07-29; 接受日期: 2026-07-30

基金项目: 江苏省协同创新项目 (HSXT30412)

作者简介: 齐璐瑶 (2001-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: qiluyao_761@163.com

通讯作者: 张建梅 (1992-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物药理学, E-mail: jmzhang@usts.edu.cn

花青素 (Anthocyanidin) 是一类水溶性天然色素, 常与葡萄糖、半乳糖等糖苷通过糖苷键结合形成花色苷 (Anthocyanin), 属类黄酮类化合物^[1,2]。花色苷广泛存在于植物果实中, 其分子结构中的多酚羟基赋予其优异的自由基清除能力, 在缓解氧化应激、延缓衰老及增强免疫等方面表现出显著活性, 并在视力保护、抗肿瘤及改善代谢性疾病等方面具有潜在应用价值^[3-6]。自由基是生物体代谢产生的含未配对电子的原子或分子, 生理状态下其产生与清除处于动态平衡, 但紫外线、污染等外源刺激可诱发氧化应激, 导致脂质过氧化、蛋白质羰基化及 DNA 损伤, 进而与衰老、心血管疾病及神经退行性疾病的发生密切相关^[7-11]。因此, 从天然产物中发掘高效、低毒的抗氧化剂已成为功能食品领域的研究热点。

笃斯越橘 (*Vaccinium uliginosum* L.) 是杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium* L.) 落叶灌木, 又称笃斯、蓝莓、黑豆树, 甸果及地果等, 是我国北方高海拔地区重要的野生果树资源, 主要分布于黑龙江、吉林及辽宁等省份^[12]。野生笃斯越橘的果实及叶片中含有丰富的黄酮类、多糖类及有机酸等多种功能成分, 同时含有花青素和槲皮素等活性物质^[12,13]。其中, 花色苷作为其最具特色的活性组分, 展现出较高的研究与开发潜力。目前, 针对笃斯越橘花色苷的研究多集中于提取工艺优化及粗提物的活性评价^[14-17]。例如, 王化等^[18]证实其粗提物具有良好的 DPPH 自由基清除能力, 勾智丽^[19]则运用响应面法对提取参数进行了系统优化。然而, 现有研究对花色苷单体化学结构的认识仍较为有限, 结构解析主要依赖高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS)^[20], 该方法虽能提供分子量与部分碎片信息, 但对同分异构体中的空间构型及细微结构差异辨别能力不足, 易导致鉴定偏差^[21]。

基于此, 本研究以笃斯越橘果实为原料, 采用多种色谱分离技术获取高纯度花色苷单体, 并借助核磁共振波谱技术 (NMR) 实现其精细结构鉴定。在此基础上, 通过 DPPH、ABTS 自由基清除法及铁氰化钾还原法, 从氢原子转移、电子转移及还原能力等多重机制系统评价各花色苷单体的抗氧化活性。研究结果旨在揭示笃斯越橘花色苷的化学多样性及构效规律, 为其作为天然抗氧化剂及高附加值产品的开发提供理论依据与物质基础。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 原料来源

笃斯越橘果实采自黑龙江省大兴安岭地区图强林场, 为杜鹃花科越橘属植物笃斯越橘 (*Vaccinium uliginosum* L.) 的果实。

1.1.2 试剂

甲醇、三氟乙酸 (分析纯), 成都市科隆化学品有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯), 上海萨恩化学技术有限公司; 氘代甲醇-d₄、代三氟乙酸, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶, 瑞士 Pharmacia Biotech 公司; Amberlite XAD-7HP 离子交换大孔吸附树脂, 上海笛柏生物科技有限公司; 2,2-二苯基-1-苦基肼基 (DPPH)、2,2-联氮二 (3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS), Sigma 公司; 抗坏血酸 (Vc)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯化铁、过硫酸钾, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 仪器

Bruker AVANCE 600 MHz 核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; NP7000 制备型高效液相色谱仪, 江苏汉邦科技有限公司; LC-20AD 分析型高效液相色谱仪, 日本岛津仪器有限公司; R501 旋转蒸发仪, 巩义市英峪高科仪器厂; Neptune C₁₈ 分析型色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 广州菲罗门科学仪器有限公司; UniSil C₁₈ 制备色谱柱 (50 mm×250 mm, 10 μm), 成都铼谱科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取

笃斯越橘果实 (10 kg) 经组织粉碎, 置于 20 L 含有体积分数为 0.1% 的盐酸水溶液中室温浸泡过夜, 浑浊的提取液先以纱布缓慢过滤, 滤液离心得澄清的花色苷提取液。

1.2.2 分离

1.2.2.1 大孔吸附树脂粗分

将澄清的花色苷提取液直接通过 Amberlite XAD-7HP 大孔吸附树脂柱 (30 cm×120 cm) 进行充分吸附。依次

用酸化的纯水(含体积分数 0.01%的 HCl)、体积分数 30%的乙醇溶液(含体积分数 0.01%的 HCl)和体积分数 80%的乙醇溶液(含体积分数 0.01%的 HCl)进行梯度洗脱。收集颜色最深、富含花色苷的 30%乙醇洗脱组分,于不超过 40 °C 条件下减压浓缩,得花色苷粗提物浓缩液。

1.2.2.2 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离

将上述浓缩液经 Sephadex LH-20 凝胶柱(4.2 cm×150 cm)色谱分离,以体积分数 30%的甲醇溶液(含体积分数 0.05%的三氟乙酸)等度洗脱。按红色色带分部收集,合并后得到 5 个组分(Fr.1~Fr.5)。

1.2.2.3 反相制备型 HPLC 色谱纯化

采用反相制备型 HPLC 对 Fr.1~Fr.5 分别进行进一步纯化。检测波长为 278 nm,体积流量为 50 mL min⁻¹,流动相为甲醇-水(含体积分数 0.1%的三氟乙酸)体系。具体洗脱条件及所得化合物如下:Fr.1 以甲醇:水(40:60)洗脱,得到化合物 3(87 mg, t_R=42.8 min)、6(8 mg, t_R=34.3 min)和 7(12 mg, t_R=51.1 min);Fr.2 以甲醇:水(45:55)洗脱,得到化合物 1(48 mg, t_R=37.9 min);Fr.3 以甲醇:水(40:60)洗脱,得到化合物 3(125 mg, t_R=38.5 min);Fr.4 以甲醇:水(43:57)洗脱,得到化合物 2(125 mg, t_R=32.1 min)和 4(51 mg, t_R=40.7 min);Fr.5 以甲醇:水(45:55)洗脱,得到化合物 5(32 mg, t_R=41.2 min)。

1.2.2.4 化合物纯度检测

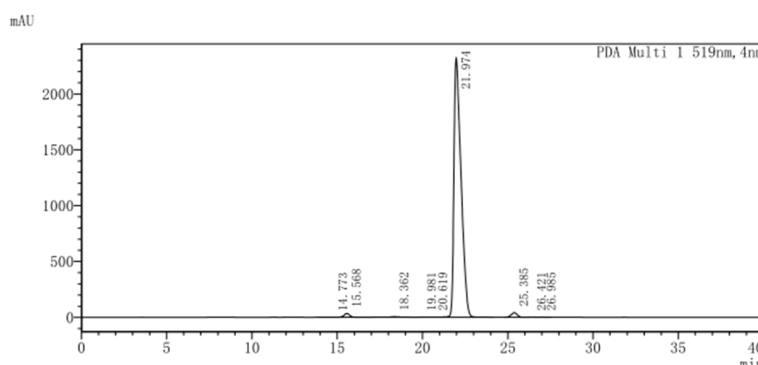


图 1 化合物 1 的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatography spectrum of compound 1

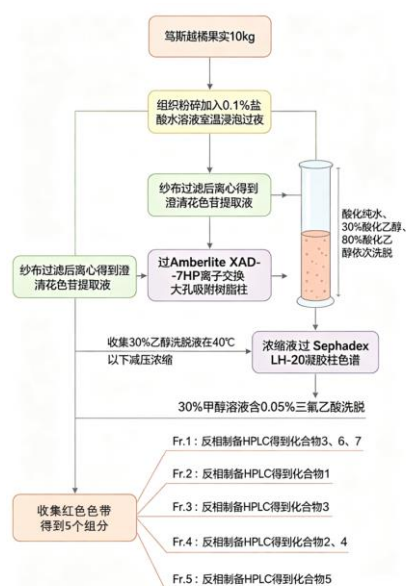


图 2 笃斯越橘果实中花色苷的提取与分离流程图

Fig.2 Flow diagram of anthocyanins extraction and separation from *Vaccinium uliginosum* L. fruits

将制备型 HPLC 所得各单体化合物,采用分析型 HPLC 在相同色谱条件下进行纯度检测。经面积归一化法计算,化合物 1~7 的 HPLC 纯度均大于 95% (化合物 1 的 HPLC 图谱见图 1),满足后续结构鉴定和抗氧化活性测试的要求。

笃斯越橘果实中花色苷的提取分离流程如图 2 所示。

1.2.3 DPPH 自由基清除

配制 0.2 mmol L^{-1} 的 DPPH 甲醇溶液作为工作液, 避光保存备用。将待测化合物用相应溶剂进行倍比稀释, 得到浓度分别为 200、100、50、25、 $12.5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 的系列工作液。采用 96 孔酶标板进行测定。分别取 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 上述不同浓度的样品溶液置于孔板中, 加入 $150 \text{ } \mu\text{L}$ DPPH 工作液, 充分混匀。室温下避光反应 30 min 后, 于 517 nm 波长处测定吸光度, 记为 A_1 。同时测定以下两组对照: $50 \text{ } \mu\text{L}$ 样品溶液与 $150 \text{ } \mu\text{L}$ 甲醇混合后的吸光度 A_2 , 以及 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 样品溶液与 $150 \text{ } \mu\text{L}$ DPPH 工作液反应后的吸光度 A_3 。以抗坏血酸 (Vc) 为阳性对照, 每个浓度设置 3 个平行重复。DPPH 自由基清除率计算公式 (1):

$$D_0 = \frac{(A_3 - A_2) - (A_1 - A_2)}{A_3 - A_2} \times 100 \quad (1)$$

式中:

D_0 ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——空白吸光度;

A_3 ——对照吸光度。

1.2.4 ABTS 自由基清除

取 $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 待测样品母液, 经倍比稀释得到系列浓度工作液 (200、100、50、25、 12.5 、 6.25 、 $3.125 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$)。采用 96 孔酶标板进行测定。分别取 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 不同浓度样品溶液加入孔板中, 再加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ ABTS 工作液, 振荡混匀后于室温避光反应 6 min 。反应结束后, 于 734 nm 波长处测定吸光度。以超纯水代替样品溶液作为阴性对照, 以超纯水代替 ABTS 工作液作为空白对照。每个浓度设置 3 个平行重复。ABTS 阳离子自由基清除率计算公式 (2):

$$D_0 = \frac{(A_3 - A_2) - (A_1 - A_2)}{A_3 - A_2} \times 100 \quad (2)$$

式中:

D_0 ——ABTS 阳离子自由基清除率, %;

A_1 ——样品组吸光度;

A_2 ——空白吸光度;

A_3 ——对照吸光度。

1.2.5 还原能力测定

配置 $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 待测样品, 依次倍比稀释至 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, $3.125 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 等系列浓度工作液。在离心管中依次加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 样品溶液、 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol L^{-1} , pH 值为 6.6) 和 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 体积分数为 1% 的铁氰化钾溶液, 充分混匀。将混合液置于 $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ 水浴中反应 20 min 。反应结束后, 加入 $250 \text{ } \mu\text{L}$ 体积分数为 10% 的 TCA 溶液, 混匀后静置 5 min 以终止反应。取 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 上清液 (或混合液) 转移至新离心管中, 依次加入 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 蒸馏水和 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 体积分数为 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 混匀后避光反应 20 min 。以超纯水代替样品溶液、其余试剂相同作为空白对照。反应结束后, 于 700 nm 波长处测定各组的吸光度。按照下列公式 (3) 计算还原能力:

$$D_0 = A_2 - A_1 \quad (3)$$

式中:

D_0 ——总还原力;

A_1 ——空白吸光度;

A_2 ——样品组吸光度。

1.2.6 数据分析

所有实验均设 3 个重复, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准方差表示。采用双因素方差分析 (Two-way ANOVA) 及 Tukey

多重比较检验进行统计学分析,不同小写字母(a, b, c, d)表示具有差异显著($P<0.05$),并用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 化合物的结构鉴定

化合物 1: 红色粉末。ESI-MS:535[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 8.89 (1H, s, H-4), 8.22 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6'), 7.97 (1H, brs, H-2'), 6.97 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5'), 6.86 (1H, s, H-8), 6.67 (1H, s, H-6), 5.22 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glc-H-1), 4.57 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, Glc-H-6a), 4.30 (1H, dd, $J = 11.5, 7.4$ Hz, Glc-H-6b), 3.82 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, Glc-H-5), 3.68 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, Glc-H-2), 3.56 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, Glc-H-3), 3.44 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, Glc-H-4), 3.42 (2H, s, malonyl-H-2); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.6 (C-7), 170.2 (malonyl-C-3), 168.7 (malonyl-C-1), 164.1 (C-2), 159.1 (C-5), 157.7 (C-9), 155.8 (C-4'), 147.4 (C-3'), 145.5 (C-3), 136.7 (C-4), 128.4 (C-6'), 121.1 (C-1'), 118.3 (C-2'), 117.4 (C-5'), 113.2 (C-10), 103.6 (Glc-C-1), 103.5 (C-6), 95.3 (C-8), 77.9 (Glc-C-3), 76.0 (Glc-C-5), 74.6 (Glc-C-2), 71.3 (Glc-C-4), 65.5 (Glc-C-6), 41.8 (malonyl-C-2)。以上数据与文献^[22]报道基本一致,故鉴定该化合物为矢车菊素-3-O-(6-丙二酰葡萄糖苷)。

化合物 2: 红色粉末。ESI-MS:449[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 8.99 (1H, s, H-4), 8.22 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, H-6'), 8.01 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 6.98 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5'), 6.86 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 6.65 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 5.29 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-H-1), 3.94 (1H, dd, $J = 12.1, 2.1$ Hz, Glc-H-6a), 3.74 (1H, dd, $J = 12.1, 5.9$ Hz, Glc-H-6b), 3.69 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, Glc-H-2), 3.59 (1H, m, Glc-H-5), 3.56 (1H, m, Glc-H-3), 3.47 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, Glc-H-4); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.5 (C-7), 163.9 (C-2), 159.2 (C-5), 157.5 (C-9), 155.8 (C-4'), 147.3 (C-3'), 145.6 (C-3), 136.6 (C-4), 128.3 (C-6'), 121.1 (C-1'), 118.3 (C-2'), 117.4 (C-5'), 113.3 (C-10), 103.7 (Glc-C-1), 103.4 (C-6), 95.1 (C-8), 78.8 (Glc-C-5), 78.1 (Glc-C-3), 74.8 (Glc-C-2), 71.1 (Glc-C-4), 62.3 (Glc-C-6)。以上数据与文献^[22]报道基本一致,故鉴定该化合物为矢车菊素-3-O-葡萄糖苷。

化合物 3: 红色粉末。ESI-MS:611[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 8.87 (1H, s, H-4), 7.75 (2H, s, H-2', 6'), 6.86 (1H, s, H-8), 6.67 (1H, s, H-6), 5.30 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, Glc-H-1), 4.66 (1H, s, Rham-H-1), 4.07 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, Glc-H-6a), 3.81 (1H, brs, Rham-H-2), 3.73 (1H, m, Glc-H-2), 3.71 (1H, m, Rham-H-3), 3.63 (1H, m, Glc-H-6b), 3.61 (1H, m, Glc-H-3), 3.59 (1H, m, Rham-H-5), 3.56 (1H, m, Glc-H-5), 3.44 (1H, t, $J = 9.4$ Hz, Glc-H-4), 3.34 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, Rham-H-4), 1.15 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, Rham-H-6); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.3 (C-7), 163.9 (C-2), 158.8 (C-5), 157.5 (C-9), 147.5 (C-3', 5'), 145.8 (C-3), 144.8 (C-4'), 135.4 (C-4), 120.0 (C-1'), 113.1 (C-10), 112.7 (C-2', 6'), 103.4 (Glc-C-1), 103.2 (C-6), 102.2 (Rham-C-1), 95.1 (C-8), 77.9 (Glc-C-4), 77.4 (Glc-C-3), 74.7 (Glc-C-2), 73.9 (Rham-C-3), 72.4 (Glc-C-5), 71.8 (Rham-C-4), 71.2 (Rham-C-2), 69.7 (Rham-C-5), 17.8 (Rham-C-6)。以上数据与文献^[23]报道基本一致,故鉴定该化合物为飞燕草素-3-O-芸香糖苷。

化合物 4: 红色粉末。ESI-MS:463[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 9.06 (1H, s, H-4), 8.26 (1H, dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, H-6'), 8.24 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 7.07 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, s, H-8), 6.69 (1H, s, H-6), 5.34 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, Glc-H-1), 4.04 (3H, s, -OCH₃), 3.95 (1H, dd, $J = 12.2, 1.8$ Hz, Glc-H-6a), 3.74 (1H, dd, $J = 12.2, 6.2$ Hz, Glc-H-6b), 3.68 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, Glc-H-2), 3.59 (2H, m, Glc-H-3, 5), 3.46 (1H, t, $J = 9.4$ Hz, Glc-H-4); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.8 (C-7), 164.1 (C-2), 159.4 (C-5), 157.9 (C-9), 156.5 (C-4'), 149.5 (C-3'), 145.6 (C-3), 137.3 (C-4), 128.9 (C-6'), 121.1 (C-1'), 117.6 (C-5'), 115.2 (C-2'), 113.6 (C-10), 103.8 (Glc-C-1), 103.4 (C-6), 95.3 (C-8), 78.9 (Glc-C-5), 78.2 (Glc-C-3), 74.9 (Glc-C-2), 71.2 (Glc-C-4), 62.4 (Glc-C-6)。以上数据与文献^[24]报道基本一致,故鉴定该化合物为芍药素-3-O-葡萄糖苷。

化合物 5: 红色粉末。ESI-MS:433[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 9.05 (1H, s, H-4), 8.57 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 7.02 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 6.90 (1H, s, H-8), 6.65 (1H, s, H-6), 5.27 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, Glc-H-1), 3.92 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, Glc-H-6a), 3.71 (1H, dd, $J = 11.8, 5.9$ Hz, Glc-H-6b), 3.64 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, Glc-H-2), 3.54 (2H, m, Glc-H-3, 5), 3.43 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, Glc-H-4); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.8 (C-7), 166.6 (C-2), 164.5 (C-5), 159.4 (C-9), 157.9 (C-4'), 145.4 (C-3), 137.7 (C-4), 135.7 (C-2', 6'), 120.8 (C-1'), 117.8

(C-3', 5'), 113.6 (C-10), 103.9 (Glc-C-1), 103.4 (C-6), 95.2 (C-8), 78.8 (Glc-C-5), 78.2 (Glc-C-3), 74.8 (Glc-C-2), 71.1 (Glc-C-4), 62.4 (Glc-C-6)。以上数据与文献^[25]报道基本一致, 故鉴定该化合物为天竺葵素-3-O-葡萄糖苷。

化合物 6: 红色粉末。ESI-MS: 597[M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 8.86 (1H, s, H-4), 7.73 (2H, s, H-2', 6'), 6.83 (1H, s, H-8), 6.63 (1H, s, H-6), 5.47 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1), 4.70 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Xyl-H-1), 4.00 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, Glc-H-2), 3.93 (1H, dd, *J* = 12.1, 1.9 Hz, Glc-H-6a), 3.79 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, Glc-H-3), 3.76 (1H, dd, *J* = 12.1, 5.6 Hz, Glc-H-6b), 3.62 (1H, m, Xyl-H-5a), 3.60 (1H, m, Glc-H-5), 3.53 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, Glc-H-4), 3.37 (1H, m, Xyl-H-4), 3.29 (1H, t, *J* = 8.9 Hz, Xyl-H-3), 2.98 (1H, t, *J* = 11.0 Hz, Xyl-H-5b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.3 (C-7), 163.9 (C-2), 159.1 (C-5), 157.4 (C-9), 147.5 (C-3', 5'), 145.4 (C-3), 144.7 (C-4'), 135.3 (C-4), 120.0 (C-1'), 113.0 (C-10), 112.7 (C-2', 6'), 106.1 (Xyl-C-1), 103.3 (C-6), 101.6 (Glc-C-1), 95.0 (C-8), 82.6 (Glc-C-2), 78.6 (Glc-C-5), 78.0 (Glc-C-3), 77.7 (Xyl-C-3), 75.8 (Xyl-C-2), 70.8 (Xyl-C-4), 70.7 (Glc-C-4), 67.1 (Xyl-C-5), 62.2 (Glc-C-6)。以上数据与文献^[26]报道基本一致, 故鉴定该化合物为飞燕草素-3-O-桑布双糖苷。

化合物 7: 红色粉末。ESI-MS: 581 [M]⁺。 ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 8.86 (1H, s, H-4), 8.20 (1H, dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, H-6'), 7.92 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 6.93 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.82 (1H, s, H-8), 6.61 (1H, s, H-6), 5.43 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1), 4.79 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, Xyl-H-1), 3.97 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, Glc-H-2), 3.95 (1H, m, Glc-H-6a), 3.81 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, Glc-H-3), 3.77 (1H, m, Glc-H-6b), 3.73 (1H, m, Xyl-H-5a), 3.62 (1H, m, Glc-H-5), 3.53 (1H, t, *J* = 9.4 Hz, Glc-H-4), 3.44 (1H, m, Xyl-H-4), 3.33 (1H, t, *J* = 9.1 Hz, Xyl-H-3), 3.20 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, Xyl-H-2), 3.09 (1H, t, *J* = 10.9 Hz, Xyl-H-5b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD-TFA-*d*₁ (19:1, V/V)) δ 170.3 (C-7), 163.6 (C-2), 159.1 (C-5), 157.3 (C-9), 155.8 (C-4'), 147.4 (C-3'), 145.2 (C-3), 135.8 (C-4), 128.8 (C-6'), 121.0 (C-1'), 118.3 (C-2'), 117.3 (C-5'), 113.0 (C-10), 105.6 (Xyl-C-1), 103.3 (C-6), 101.4 (Glc-C-1), 95.1 (C-8), 81.5 (Glc-C-2), 78.6 (Glc-C-5), 78.2 (Glc-C-3), 77.9 (Xyl-C-3), 75.7 (Xyl-C-2), 71.0 (Xyl-C-4), 70.8 (Glc-C-4), 67.2 (Xyl-C-5), 62.2 (Glc-C-6)。以上数据与文献^[26]报道基本一致, 故鉴定该化合物为矢车菊素-3-O-桑布双糖苷。

化合物 1 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱图如图 3 所示, 化合物 1-7 的化学结构如图 4 所示。

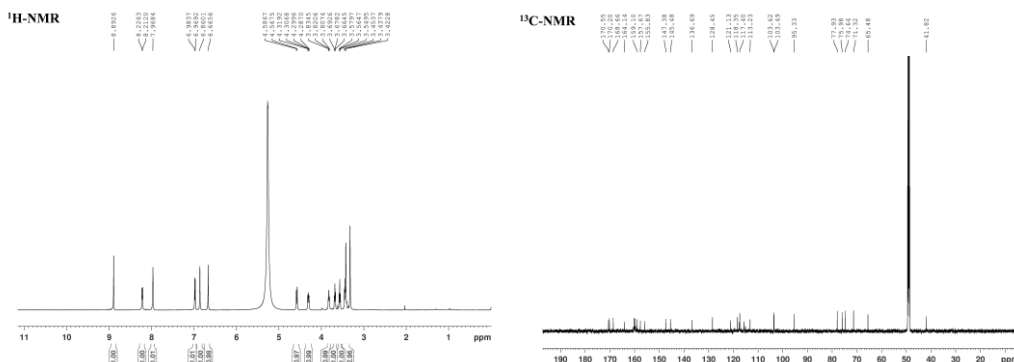


图 3 化合物 1 的氢谱和碳谱谱图

Fig.3 ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of compound 1

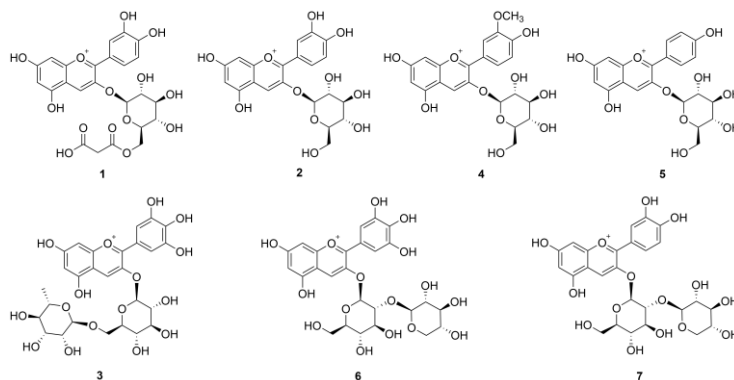


图 4 花色苷化合物 1~7 的化学结构

Fig.4 Chemical structures of anthocyanin compounds 1~7

2.2 抗氧化能力评价

生物体内的氧化应激与多种慢性疾病的发生发展密切相关,当代谢处于不平衡状态时,过量产生的自由基会攻击脂质、蛋白质和核酸,引起氧化损伤^[27]。抗氧化剂能够通过氢原子转移(HAT)或单电子转移(SET)等机制清除自由基^[28]。本实验采用三种基于不同原理的体外评价体系,综合评价花色苷化合物的抗氧化活性。

通过测定 DPPH 自由基清除率判断花色苷的抗氧化能力,以 IC_{50} 值(清除率为 50%时抗氧化剂的浓度)作为评价指标,值越小清除效果越好。图 5 显示,各花色苷的自由基清除能力随浓度升高而逐渐提高,其 IC_{50} 值分别为 44.93、28.91、30.72、54.17、46.33、39.62、35.75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。所有受试花色苷的抗氧化能力均高于阳性对照物 Vc ($84.05 \mu\text{mol L}^{-1}$)。构效关系分析表明,B 环邻二酚和邻三酚结构片段是 DPPH 清除活性的关键,化合物 2、3、6 和 7 均含此类结构片段而表现出较强的活性,这是因为邻位羟基能够通过分子内氢键稳定氧化后形成的半醌自由基,从而高效清除 DPPH。此外,甲氧基($-\text{OCH}_3$)取代羟基会降低活性:化合物 4 含 $3'-\text{OCH}_3$,其 IC_{50} 值分别为 $54.17 \mu\text{mol L}^{-1}$,活性最弱,这是因为甲氧基无法提供氢原子,且空间位阻干扰了自由基的稳定化。而 B 环仅含单羟基的化合物 5 活性相对较弱,证实单酚结构难以有效稳定自由基。化合物 1 的抗氧化活性显著弱于化合物 2,表明丙二酰取代基的存在不利于抗氧化活性,主要是因为丙二酰基的引入一方面通过空间位阻和电子效应削弱了花青素核心 B 环邻苯二酚结构供氢和稳定自由基的能力^[29],另一方面可能改变其分子稳定性和肠道代谢途径,进而影响整体抗氧化表现^[30]。综上,花色苷清除 DPPH 自由基的能力主要取决于 B 环羟基的数量与位置,其中邻二酚很邻三酚为较优结构单元,甲氧基化和单羟基均导致活性下降。

在 ABTS 自由基清除实验中,各花色苷及阳性对照 Vc 的清除率随浓度升高而逐渐增强,呈现明确的剂量-效应关系(图 6)。通过非线性拟合计算各化合物的 IC_{50} 值,依次为 16.28、10.85、11.74、13.57、14.04、13.14 和 $12.09 \mu\text{mol L}^{-1}$,阳性对照物 Vc 的 IC_{50} 值为 $69.82 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。所有受试花色苷的 ABTS 清除能力均显著优于 Vc,其中化合物 2、3、6 和 7 的活性相对较强,结果与 DPPH 实验一致,B 环含邻二酚和邻三酚结构片段的化合物表现出较强的 ABTS 清除能力。

在还原力实验中,各花色苷及阳性对照 Vc 的还原力随浓度升高而逐渐增强,吸光度越大表示还原力越强(图 7)。在最高浓度 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时,各化合物的吸光度分别为 0.20、0.34、0.31、0.25、0.33、0.29 和 0.33,阳性对照 Vc 在该浓度下的吸光度为 0.33。其中化合物 2 的吸光度最大,还原力最强;化合物 1 的吸光度最小,还原力最弱。该结果与 DPPH、ABTS 试验基本一致,B 环含邻二酚和邻三酚结构的化合物表现出较强的还原力。

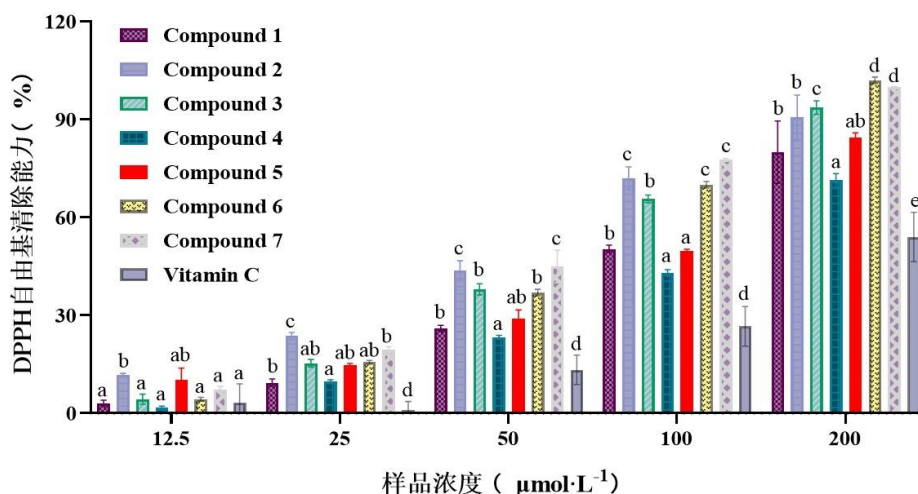


图 5 花色苷化合物 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 DPPH free radical scavenging activity of anthocyanin compounds

注: 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。下图同。

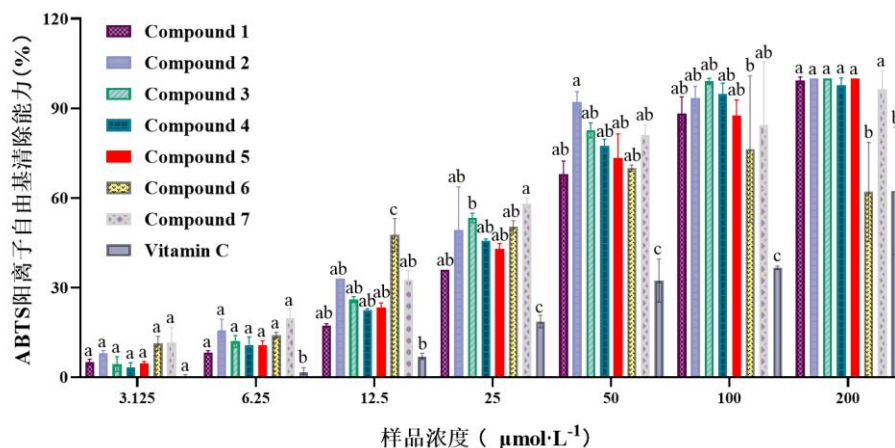


图6 花色苷化合物 ABTS 自由基清除能力

Fig.6 ABTS free radical scavenging activity of anthocyanin compounds

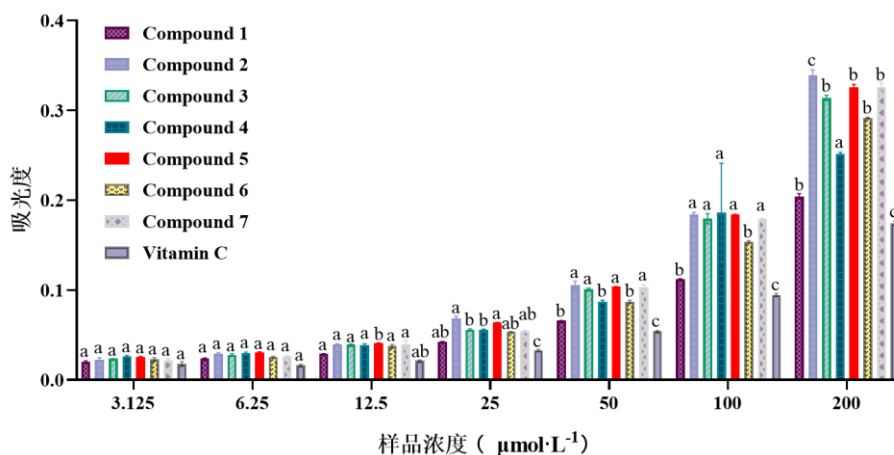


图7 花色苷化合物还原力分析

Fig.7 Reducing power assay of anthocyanin compounds

3 结论

本研究将 Amberlite XAD-7HP 大孔吸附树脂柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱与制备型 HPLC 三种分离纯化技术进行系统组合,成功构建了适用于笃斯越橘果实花色苷类化合物的高效分离体系。通过质谱与核磁共振波谱技术对所得单体进行结构鉴定,明确了各化合物的取代基种类、数量及连接位置,最终从笃斯越橘果实中分离并鉴定了 7 个花色苷类化合物,其中化合物 1、3、5、6 和 7 为首次从该植物资源中报道,进一步丰富了笃斯越橘花色苷的化学信息库。

在此基础上,结合抗氧化活性评价与构效关系分析发现,B 环含邻二酚和邻三酚结构片段是花色苷高效清除 DPPH 和 ABTS 自由基的关键活性单元,而甲氧基化或单羟基取代均导致活性下降。上述结果系统揭示了笃斯越橘果实中花色苷类化合物的化学组成及其抗氧化构效规律,深化了其化学成分多样性与生物活性的认识,为该资源的深度开发利用提供了重要的理论依据。此外,所获得的花色苷单体为后续开展抗氧化、抗炎等生物活性研究奠定了坚实的物质基础,对于开发基于天然花色苷的功能性食品及相关健康产品具有重要的实践指导意义。

参考文献

- [1] KHOO H E, AZLAN A, TANG S T, et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [J]. Food & Nutrition Research, 2017, 61(1): 1361779.
- [2] 刘静波,陈晶晶,王二雷,等.蓝莓果实中花色苷单体的色谱分离纯化[J].食品科学,2017,38(2):206-213.
- [3] MA X, JIN Z, RAO Z, et al. Health benefits of anthocyanins against age-related diseases [J]. Frontiers in Nutrition, 2025, 12: 1618072.
- [4] 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): 404.
- [5] WU T, JIANG Z, YIN J, et al. Anti-obesity effects of artificial planting blueberry (*Vaccinium ashei*) anthocyanin in high-fat diet-treated mice [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2016, 67(3): 257-264.
- [6] 陈文超,刘回民,刘景圣.花青素抗肿瘤活性的研究进展[J].食品研究与开发,2016,37(1):211-215.
- [7] NOGUCHI N, SAITO Y, NIKI E. Lipid peroxidation, ferroptosis, and antioxidants [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2025, 237: 228-238.
- [8] CHANDIMALI N, BAK S G, PARK E H, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review [J]. Cell Death Discovery, 2025, 11(1): 19.
- [9] DAI X, HUANG Z, LYU R. Free radicals in health and disease [J]. MedComm, 2025, 6(10): e70396.
- [10] LIU H, JIAO Y, WANG P C, et al. Oxidative stress and antioxidant therapeutic mechanisms [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2026, 278: 108962.
- [11] HAJAM Y A, RANI R, GANIE S Y, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives [J]. Cells, 2022, 11(3): 552.
- [12] 苏上,王丽金,吴杰,等.笃斯越桔化学成分及其功能活性的研究进展[J].植物学报,2016,51(5):691-704.
- [13] 代晶.笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum* L.)果实多糖的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2016.
- [14] 李阳阳,彭瞰看,杨九双,等.笃斯越橘果实花青素提取及稳定性研究[J].食品研究与开发,2016,37(24):46-49.
- [15] 吴杰,郑影,谷思云,等.笃斯越橘产品花色苷抗氧化活性评价[J].食品工业科技,2012,33(22):181-185.
- [16] 刘荣,冷梅.笃斯越橘花色苷抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2012,33(15):96-100.
- [17] 魏殿文,王振宇.响应面优化笃斯越橘花色苷提取研究[J].国土与自然资源研究,2011,3:75-76.
- [18] 王化,周丽萍,何丹娆,等.笃斯越桔和欧洲越桔抗氧化活性及花色苷组成比较研究[J].食品科技,2018,43(12):66-71.
- [19] 勾智丽.笃斯越桔花色苷提取工艺的研究[J].防护林科技,2019,12:47-50.
- [20] LI R, WANG P, GUO Q Q, et al. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 116-120.
- [21] XUE Z, LI H, YANG B. Positional isomerization of phenylethanoid glycosides from *Magnolia officinalis* [J]. Natural Product Communications, 2016, 11(12): 1861-1863.
- [22] FOSSEN T, ANDERSEN O M. Cyanidin 3-O-(6"-succinyl- β -glucopyranoside) and other anthocyanins from *Phragmites australis* [J]. Phytochemistry, 1998, 49(4): 1065-1068.
- [23] OSORIO C, HURTADO N, DAWID C, et al. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits [J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1915-1921.
- [24] CUI C, ZHANG S, YOU L, et al. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) and identification of the major anthocyanins [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1): 1-8.
- [25] TSUDA T, OHSHIMA K, KAWAKISHI S, et al. Antioxidative pigments isolated from the seeds of *Phaseolus vulgaris* L. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(2): 248-251.
- [26] CABRITA L, ANDERSEN O M. Anthocyanins in blue berries of *Vaccinium padifolium* [J]. Phytochemistry, 1999, 52(8): 1693-1696.
- [27] 曾维才,石碧.天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J].化工进展,2013,32(6):1205-1213.
- [28] GULCIN I, ALWASEL S H. DPPH radical scavenging assay [J]. Processes, 2023, 11(8): 2248.
- [29] 古春梅,余鹄游,夏陈,等.黑青稞麸皮花青素分离鉴定及其生物活性研究[J].粮食与油脂,2024,37(9):47-53.
- [30] HUANG J, YANG C, PAN X, et al. Effect of glycosylation, acylation and pyranylation at cyanidin C-ring on its interaction with vitamin C in apple juice beverage matrix [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2025, 105(1): 362-371.