李舜尧, 郭小妮, 臧慧明, 等. 蓝莓提取物抗氧化活性及对 t-BHP 诱导 L-02 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(14): 420−432. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050250

LI Shunyao, GUO Xiaoni, ZANG Huiming, et al. Antioxidant Activity of Blueberry Extract and Its Protection Effect on t-BHP-induced Oxidative Damage of L-02 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(14): 420−432. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050250

·营养与保健·

蓝莓提取物抗氧化活性及对 t-BHP 诱导 L-02 细胞氧化损伤的保护作用

李舜尧[1], 郭小妮[2], 臧慧明[3], 李　松[1], 辛秀兰[1], 张　强[1,*]

（1.北京科技职业大学生物工程学院, 北京 100176;
2.天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457;
3.吉林省普蓝高科技有限公司, 吉林长春 130103）

摘　要: 为明确蓝莓提取物中绿原酸同系物和花青素的组成及其对人 L-02 肝细胞的保护作用，本文对 15 个不同品种、产地和地理位置的蓝莓样品，采用有机溶剂提取和大孔吸附树脂分离的方法制得绿原酸提取物（chlorogenic acid extracts，CGAE）和花青素提取物（anthocyanin extracts，ANTE），在体外开展了自由基清除实验，L-02 肝细胞抗氧化酶活实验。结果表明：15 个蓝莓样品绿原酸和花青素两种提取物成分的平均含量为：绿原酸>新绿原酸>隐绿原酸>异绿原酸 B>异绿原酸 A>异绿原酸 C，飞燕草素>牵牛花素>芍药色素>锦葵色素>矢车菊素。相关性分析表明：绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸含量与 DPPH、$ABTS^+$自由基清除率呈显著负相关，与 FRAP、RP 呈显著正相关，飞燕草素-3-半乳糖苷和飞燕草素-3-阿拉伯糖苷含量与 FRAP、RP 呈显著正相关，与 $ABTS^+$自由基清除率呈负相关，但只有飞燕草素-3-阿拉伯糖苷显著，而飞燕草素-3-葡萄糖苷与 $ABTS^+$自由基清除率呈显著正相关，与 FRAP、RP 呈显著负相关。在矢车菊素、牵牛色素、芍药色素和锦葵色素中，仅矢车菊素-3-葡萄糖苷与 FRAP、RP 呈显著负相关，牵牛花素-3-半乳糖苷、牵牛花素-3-阿拉伯糖苷与 FRAP、RP 呈显著正相关，表明不同品种、不同产地和地理位置的蓝莓，其活性成分含量及抗氧化活性存在显著差异，并利用主成分分析（Principal Component Analysis，PCA）从统计学角度证实了不同品种的化学特征差异，构建细胞水平的功能性验证模型，优化并最终确定了造模条件为 350 μmol/L t-BHP 处理 4 h，在细胞模型中验证了 CGAE 和 ANTE 提取物的保护作用，综上，20~60 μg/mL CGAE 和 15~25 μg/mL ANTE 显著降低 ROS 水平的同时，显著提高 GSH-Px 和 SOD 的活性，且 ANTE 的抗氧化效果显著高于 CGAE，本文筛选出高抗氧化活性蓝莓提取物，为蓝莓提取物的抗氧化应用研究提供参考。

关键词: 蓝莓, 绿原酸同系物, 花青素, 抗氧化, 细胞氧化损伤, 保护作用

中图分类号: S663.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)14−0420−13

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025050250

本文网刊:

Antioxidant Activity of Blueberry Extract and Its Protection Effect on t-BHP-induced Oxidative Damage of L-02 Cells

LI Shunyao[1], GUO Xiaoni[2], ZANG Huiming[3], LI Song[1], XIN Xiulan[1], ZHANG Qiang[1,*]

（1.College of Biotechnology, Beijing Polytechnic University, Beijing 100176, China;
2.College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
3.Jilin Province Pulan High-Tech Co., Ltd., Changchun 130103, China）

Abstract: To elucidate the composition of chlorogenic acid homologs and anthocyanins in blueberry extracts and their protective effects on human L-02 hepatocytes, the present study utilized organic solvent extraction and macroporous

收稿日期: 2025−05−26

基金项目: 北京市教委科研计划资助项目（KM202310858002）。

作者简介: 李舜尧（1987−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物开发与利用, E-mail: 103007@bpi.edu.cn。

*** 通信作者:** 张强（1988−）, 男, 博士, 工程师, 研究方向: 小浆果资源利用与加工推广, E-mail: 867959208@qq.com。

adsorption resin separation to prepare chlorogenic acid extracts (CGAE) and anthocyanin extracts (ANTE) from 15 blueberry samples of distinct cultivars, origins, and geographical locations. *In vitro* experiments were conducted to assess free radical scavenging capacity and evaluate the activity of antioxidant enzymes in L-02 hepatocytes. The results showed that chlorogenic acid>neochlorogenic acid>cryptochlorogenic acid>isochlorogenic acid B>isochlorogenic acid A>isochlorogenic acid C and delphinidin>petunidin>peonidin>malvidin>cyanidin in the average content of chlorogenic acids and anthocyanins in 15 blueberry samples. Correlation analysis showed that the contents of chlorogenic acid, neochlorogenic acid, and cryptochlorogenic acid were significantly negatively correlated with DPPH and $ABTS^+$ radical scavenging rates, and significantly positively correlated with FRAP and RP. The contents of delphinidin-3-galactoside and delphinidin-3-arabinoside were significantly positively correlated with FRAP and RP, and negatively correlated with $ABTS^+$ radical scavenging rate, but only the correlation for delphinidin-3-arabinoside was significant. In contrast, delphinidin-3-glucoside was significantly positively correlated with $ABTS^+$ radical scavenging rate, and significantly negatively correlated with FRAP and RP. Among cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin, only cyanidin-3-glucoside was significantly negatively correlated with FRAP and RP, while petunidin-3-galactoside and petunidin-3-arabinoside were significantly positively correlated with FRAP and RP. The results indicated that the active component content and antioxidant activity of blueberries varied significantly depending on the different cultivars, growing regions, and geographical origins. Principal component analysis (PCA) was employed to statistically validate the distinct chemotypic profiles among different varieties. A functional validation model at the cellular level was established, and the optimal induction conditions were determined as treatment with 350 μmol/L t-BHP for 4 hours. Using this optimized model, the protective effects of both CGAE and ANTE extracts were rigorously evaluated. In summary, 20~60 μg/mL CGAE and 15~25 μg/mL ANTE significantly reduced ROS levels while significantly increasing the activities of GSH-Px and SOD, and the antioxidant effect of ANTE was significantly higher than that of CGAE. This study screened blueberry extracts with high antioxidant activity, providing a reference for research on the antioxidant applications of blueberry extracts.

Key words: blueberry; chlorogenic acid homologues; anthocyanin; antioxidant activity; cellular oxidative damage; protective effect

蓝莓是一种风味独特的小浆果，从 20 世纪 80 年代开始推广种植，2020~2024 年，我国蓝莓种植面积由 6.64 万 hm^2 增至 9.59 万 hm^2，产量由 34.72 万 t 增至 78 万 t[1]。蓝莓逐渐成为人们喜爱的水果，销售市场仍有巨大的上升空间[2]。因此，在蓝莓市场不断扩大的同时，开发和利用蓝莓加工（如果汁、果酱生产）过程中产生的果皮、果渣等副产品势在必行[3−4]。

蓝莓果实营养丰富，含有有机酸[5]、酚酸[6]、类黄酮[7]、花青素[8] 等生物活性成分，具有抗氧化[9]、抑制癌细胞增殖和迁移[10−11] 等作用。大量文献已证实，在蓝莓丰富的多酚类物质中，绿原酸是蓝莓中含量最高、占比最大的酚酸类物质[12]，绿原酸（chlorogenic acid, CA），别名 3-O-咖啡酰奎宁酸，是奎宁酸与咖啡酸脱水缩合形成的一种酯类化合物[13]。尽管异绿原酸 A、B、C 等在蓝莓中含量较低，但结构的差异，如咖啡酰基的数量、位置以及羟基肉桂酸的种类，已被广泛证实会显著影响其生物活性，因此不同绿原酸同系物因其结构差异可能具有不同的生物活性和功效[14−15]。花青素是使其呈现独特蓝色并贡献其最主要抗氧化活性的关键成分，因蓝莓基因型不同，组成也不同，目前文献报道蓝莓中检出的花青素有近百种，包括单糖化、乙酰化、氯化、甲基化形成的飞燕草素、矢车菊素、锦葵色素、芍药色素、矮牵牛素、天竺葵素[16−17]。二者共同构成了蓝莓抗氧化及其他生理活性的物质基础。因此，对其进行精准的定性与定量分析，对于全面评价蓝莓提取物的质量、阐明其功效物质基础具有重要意义。

抗氧化功能是评价生物成分活性的重要方式，目前针对蓝莓花青素提取物的研究主要集中在抗氧化活性及其对氧化损伤的保护作用方面。已有研究通过多种体外和体内模型，包括人肝癌细胞 HepG2[18]、大鼠糖尿病模型[19]、丙烯酰胺诱导小鼠模型[20]、维生素 E 缺乏大鼠模型[21] 及 HaCaT 细胞模型[22]，证实蓝莓花青素能够显著提高超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）和谷胱甘肽-S-转移酶（GST）等抗氧化酶的活性，降低丙二醛（MDA）、活性氧（ROS）、H_2O_2 和 THF-α 等氧化应激标志物水平，并对化学诱导或营养缺乏所致的细胞损伤具有保护作用。然而，现有研究仍存在若干尚未解决的问题：不同蓝莓品种、提取物剂量及成分差异对效果的影响尚需系统比较。

不同品种蓝莓的干燥、浓缩、纯化等提取方法会影响提取物中有效成分的含量，从而影响自由基和细胞的活性。野生蓝莓的生物活性成分种类和含量均高于人工驯化品种，以美登为代表的短丛蓝莓的有效成分含量高于我国高从蓝莓[23−24]。此外，Muñoz-fariña 等[25] 以生物可利用性为评价指标，对比冻干（9.4 mmol TE/g DW）和渗透脱水（4.0 mmol TE/g DW）后发现，对流干燥（29.1 mmol TE/g DW）能更好地保存总多酚、总花青素和抗氧化能力。

本文将研究蓝莓中绿原酸同系物提取物和花青素提取物的组成及其与四种自由基抗氧化性的相关

性, 并评价其对 t-BHP 损伤的 L-02 人正常肝细胞的保护作用, 旨在为蓝莓的开发利用提供数据支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

甲酸、乙醇　优级纯, 北京化学试剂研究所有限责任公司; 甲醇、乙腈(色谱纯)、12 孔板、24 孔板　赛默飞世尔科技公司; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼　上海阿拉丁生化科技有限公司; 抗坏血酸、磷酸氢二钠、铁氰化钾、三氯乙酸、醋酸钠、六水合氯化铁、七水合硫酸亚铁　分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)　美国 Greiner 公司; t-BHP、DCFH-DA　美国 Sigma 公司; L-02 细胞系、RPMI 1640 培养基　武汉益普生物有限公司; AB-8 树脂　沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 青霉素与链霉素双抗混合液　美国 Greiner 公司; SOD 酶试剂盒、GSH-Px 酶试剂盒　南京建成生物试剂公司; 蓝莓果实采摘期为各地区成熟期, 采摘后样品冷冻至−20 ℃, 第 2 d 运至北京科技职业大学生物工程学院, 于−80 ℃ 条件下保存, 确保蓝莓采摘保存条件一致。样品信息如表 1 所示。

表 1　蓝莓样品名称与产地信息

Table 1　Sample names and origins of germplasm of the preserved 15 blueberries

序号	编号	品种	产地	地理位置(经度×纬度)
1	B1	Oneal	湖北省随州市安居镇	113°85′E×31°60′N
2	B2	Sharpblue	湖北省随州市安居镇	113°85′E×31°60′N
3	B3	Northland	湖北省随州市安居镇	113°85′E×31°60′N
4	B4	Misty	湖北省随州市安居镇	113°85′E×31°60′N
5	B5	Oneal	湖南省长沙市长沙县	113°24′E×28°59′N
6	B6	Bluecrop	湖南省长沙市长沙县	113°24′E×28°59′N
7	B7	Northland	湖南省长沙市长沙县	113°24′E×28°59′N
8	B8	Misty	湖南省长沙市长沙县	113°24′E×28°59′N
9	B9	Oneal	云南省丽江市玉龙县	100°23′E×26°83′N
10	B10	Sharpblue	云南省丽江市玉龙县	100°23′E×26°83′N
11	B11	Northland	云南省丽江市玉龙县	100°23′E×26°83′N
12	B12	Eureka	云南省丽江市玉龙县	100°23′E×26°83′N
13	B13	Misty	云南省丽江市玉龙县	100°23′E×26°83′N
14	B14	Powderblue	湖北省武汉市江夏区	114°35′E×30°09′N
15	B15	Gardenblue	湖北省武汉市江夏区	114°35′E×30°09′N

ELX800 酶标仪　美国伯腾仪器有限公司; Fresco 21 离心机、−80 ℃ 冷冻柜　赛默飞世尔科技公司; Triple Quad 5500+质谱仪　美国 AB Sciex 公司; TD5A-WS 离心机　金坛区金南仪器制造有限公司; T 25 easy clean digital ULTRA-TURRAX 分散机　广州艾卡仪器设备有限公司; GL-88B 涡旋混合器　海门市其林贝尔仪器制造有限公司; HK5200 超声波清洗器　昆山禾创超声仪器有限公司; B-300base-BUCHI 旋转蒸发仪　瑞士步琦公司; Pilot7-12E 真空冷冻干燥机　北京博医康仪器有限公司; Nikon ECLIPSE TS100 尼康倒置显微镜　日本 Nikon 公司; WB-2000 水浴锅　郑州长城科工贸有限公司; CO_2 培养箱　美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1　蓝莓提取物制备　为优化提取工艺并为后续细胞实验制备统一标准的提取物, 本研究选取活性成分含量较高的 B13 品种为代表进行蓝莓提取物的制备。蓝莓绿原酸提取物(chlorogenic acid extracts, CGAE): 取成熟度一致的 B13 完整果实, 与 30% 的乙醇水溶液以 1∶25 g/mL 的比例在组织破碎机中匀浆 10 min, 匀浆转速为 12000 r/min, 然后以 3500 r/min 的转速离心 10 min, 上清液在 80 mBar 真空度、45 ℃ 条件下旋转蒸发, 浓缩后用高纯度氮气吹干。

蓝莓花青素提取物(anthocyanin extracts, ANTE): 取成熟度一致的 B13 完整果实, 与 90%的乙醇水溶液以 1∶25 g/mL 的比例在组织破碎机中匀浆 10 min, 匀浆转速为 12000 r/min, 然后以 3500 r/min 的转速离心 10 min, 收集上清液, 注入 AB-8 大孔吸附树脂层析柱中纯化, 纯水清洗杂质, 乙醇洗脱, 洗脱液在 80 mBar 真空度、45 ℃ 条件下旋转蒸发, 浓缩液分装于蒸发皿中, −80 ℃ 冷冻干燥。

1.2.2　绿原酸同系物与花色苷的含量测定　参考 Figueira 等[26] 的方法, 称取约 100 mg 蓝莓绿原酸或花青素提取物, 与 50 mL 甲酸∶水(0.2∶99.8, v/v)混匀, 在 25 ℃ 下均质 30 min, 然后在 20 ℃ 下超声水浴 30 min, 并在 12000 r/min 下离心 10 min。残留物加入 50 mL 0.2% 甲酸水溶液再次萃取, 离心后合并上清液, 使用去离子水定容至 100 mL。吸取 1 mL 样品, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 用 HPLC 系统和配备负离子模式电喷雾源的 Triple Quad 5500+进行 HPLC-ESI-MSMS 分析。使用 Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 粒径 1.8 μm)进行分离。流动相为水(A)和乙腈(B)的混合物, 甲酸含量均为 0.1%, 流速为 0.2 mL/min, 采用梯度洗脱模式。流动相的组成变化如下: 0~2 min, 20% B; 2~15 min, 80% B; 15~23 min, 100% B, 进样量为 3 μL。色谱柱温度为 30 ℃, 温度为 500 ℃。帘式气体为 30, 碰撞气体为 9, 离子喷雾电压为 4500 V。检测采用动态多反应监测模式, 负离子监测模式测定绿原酸同系物, 采用外标法定量, 正离子监测模式测定花色苷, 采用归一化面积法定量, 表 2 列出了绿原酸同系物的定性定量参数。

1.2.3　蓝莓提取物清除 DPPH 自由基活性的测定　根据 Gao 等[27] 的方法测定 DPPH 自由基清除率。将样品溶液(50 μL)和 DPPH 试剂(0.1 mmol/L, 0.2 mL)混合, 在 25 ℃ 下孵育 60 min。然后使用多检测微孔板阅读器在 517 nm(Ax)处测量吸光度。对照组用相同体积的甲醇和 DPPH 试剂混合(A_0)。

表 2　绿原酸同系物的方法验证数据

Table 2　Method validation data of chlorogenic acid homologues

序号	中文	英文	保留时间	标准曲线	回归系数R^2	线性范围(ng/mL)	重复性(RSD, %)	回收率(%)	检出限(ng/mL)
1	绿原酸	Chlorogenic acid	8.980	y=1544.5x−7829	0.9977	1.05~525	1.26	96.67	0.1
2	新绿原酸	Neochlorogenic acid	10.861	y=8533.6x−14683	0.9993	1~500	4.25	99.25	0.1
3	隐绿原酸	Cryptochlorogenic acid	10.983	y=2071.5x−14429	0.9977	2.12~1060	3.33	99.05	0.1
4	异绿原酸A	Isochlorogenic acid A	13.954	y=311.91x−111.03	0.9988	1.46~730	2.76	98.54	0.5
5	异绿原酸B	Isochlorogenic acid B	12.052	y=3031.6x−20361	0.9979	1.58~790	2.68	100.67	0.5
6	异绿原酸C	Isochlorogenic acid C	14.023	y=2547.5x−13374	0.9981	1~500	2.43	103.58	0.5

注: 序号1~6的样品添加量分别为1.05、5、10.6、14.6、15.8、10 ng/mL。

根据 DPPH 自由基清除率公式和样品清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 分析蓝莓的抗氧化活性。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - Ax}{A_0} \times 100 \quad \text{式（1）}$$

式中: Ax 表示样品在 517 nm 吸光度值; A_0 表示对照组在 517 nm 吸光度值。

1.2.4　蓝莓提取物清除 $ABTS^+$自由基活性的测定　根据 Thaipong 等[28] 的方法测定 $ABTS^+$自由基清除率。将样品溶液(20 μL)加入 ABTS 溶液(0.14 mmol/L, 180 μL)中, 在 37 ℃ 避光条件下放置 30 min, 记录 734 nm 吸光度(Ax)。对照组混合相同体积的乙醇和 ABTS 试剂, 测量吸光度作为对照(A_0)。根据 $ABTS^+$自由基清除率公式和样品清除 $ABTS^+$自由基的 IC_{50} 分析蓝莓的抗氧化活性。

$$ABTS^+\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - Ax}{A_0} \times 100 \quad \text{式（2）}$$

式中: Ax 表示样品在 517 nm 吸光度值; A_0 表示对照组在 517 nm 吸光度值。

1.2.5　蓝莓提取物铁还原能力的测定　根据 Gao 等[27] 的方法测定 FRAP(ferric reducing antioxidant power, FRAP)。每份样品溶液(20 μL)加入 180 μL FRAP 试剂(10 mmol/L 三吡嗪溶液: 0.3 mol/L 醋酸钠缓冲溶液: 20 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$溶液的体积比=1∶10∶1, 35 ℃ 水浴孵育 30 min)。然后, 将反应混合物在 30 ℃ 下暗处孵育 10 min。然后在 593 nm 波长处测定吸光度 y。铁还原抗氧化能力以硫酸亚铁浓度 x 当量 μmol/100 g 表示, 硫酸亚铁标准曲线为 y=0.1557x+0.0821, R^2=0.9976。

1.2.6　蓝莓提取物还原力的测定(RP)　还原力(reducing power, RP)的测定参考 Wang 等[29] 的方法, 1.25 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mmol/L, pH6.6)和 1.25 mL 铁氰化钾(1%)加入 0.5 mL 样品溶液中, 在 50 ℃ 水浴中孵育 20 min。孵育后, 加入 2.5 mL 冰冷的三氯乙酸(10%), 高速(3000 r/min)离心 10 min, 在 2.5 mL 上清液中加入 2.5 mL 蒸馏水。加入 0.5 mL 0.1% 氯化铁, 10 min 后在 700 nm 波长处读取吸光度 y。用水代替样品溶液作为空白对照。还原力测定以维生素 C 浓度 x 当量 μmol/100 g 表示, 维生素 C 标准曲线为 y=7.8545x+0.0333, R^2=0.9975。

1.2.7　MTT 法测定 L-02 肝细胞活力　L-02 细胞在含有 10% 胎牛血清、链霉素(100 μg/mL)和青霉素(100 单位/mL)的 RPMI1640 培养基中培养, 37 ℃、5% CO_2 的湿润环境中培养 48 h。

参考柏志全等[30] 的方法, 采用 MTT 比色法评价 L-02 细胞活力, 将 L-02 细胞以 1.8×10^5 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 每孔 200 μL, 于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去上清液。培养 24 h 后, 用 100 μL 含有不同浓度 CGAE(2.5~300 μg/mL)和 ANTE(0.625~300 μg/mL)的生长培养基孵育细胞 24 h。孵育结束后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 用无菌 PBS 配制), 在 37 ℃、5% CO_2 条件下继续孵育 4 h。小心吸弃上清液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO), 置于摇床上低速振荡 10 min, 使紫色甲臜结晶充分溶解。使用酶标仪在 490 nm 波长处测量吸光度, 细胞活力按以下公式计算。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{实验组吸光度值}}{\text{空白对照组吸光度值}} \times 100 \quad \text{式（3）}$$

1.2.8　t-BHP 氧化损伤 L-02 肝细胞模型的建立　参考雷鸣等[31] 的方法, 将 L-02 细胞以 1.8×10^5 个/孔的密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 后, 用 200 μL 含不同浓度 CGAE(2.5~300 μg/mL)或 ANTE(0.625~300 μg/mL)的生长培养基孵育细胞 12 h, 然后加入 200 μL t-BHP(350 μmol/L)4 h。

1.2.9　蓝莓提取物抗 L-02 肝细胞模型活性氧的测定　L-02 细胞复苏后, 接种于 24 孔板中, 每孔加约 1.5×10^5 个, 培养 24 h 后, 模型组、阴性对照组不加药, 加 2 mL 基础培养基, 实验组依次加入 2 mL 20 μg/mL CGAE1、40 μg/mL CGAE2、60 μg/mL CGAE3、80 μg/mL CGAE4、100 μg/mL CGAE5、5 μg/mL ANTE1、10 μg/mL ANTE2、15 μg/mL ANTE3、20 μg/mL ANTE4、25 μg/mL ANTE5。预处理 12 h 后, PBS 润洗一次, 每孔均加入 10 μmol/L DCFH-DA, 孵育 45 min。药物组和模型组再加入 2 mL 350 μmol/L t-BHP 溶液(阴性组用 2 mL 培养基代替)处理 1、2、2.5、3、3.5 h。加 PBS 润洗细胞两次, 洗净 PBS 后, 精确加入 200 μL PBS。用冻融法收集细胞样液, 取 100 μL 用荧光酶标仪测定荧光强度。

1.2.10 蓝莓提取物抗 L-02 肝细胞模型超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的测定 L-02 细胞复苏后，接种于 12 孔板中，每孔加约 3×10^5 个，培养 24 h 后，模型组和阴性对照组不加药，加 2 mL 基础培养基，实验组加 20 μg/mL CGAE1、40 μg/mL CGAE2、60 μg/mL CGAE3、15 μg/mL ANTE3、20 μg/mL ANTE4、25 μg/mL ANTE5。预处理 12 h 后，阴性模型组外，药物组和模型组均加入 2 mL 350 μmol/L t-BHP 溶液处理 2 h。贴壁细胞添加 PBS 润洗两次，洗净 PBS 后加入 500 μL PBS，用冻融法收集细胞样液。测定方法参照南京建成试剂盒说明书。

1.3 数据处理

每个样品取三个平行进行分析，结果以平均值±标准差(SD)表示。蓝莓果实之间的差异采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为显著统计学意义。统计分析使用了 SPSSv20.0、Cytoscape 3.9.1 和 Origin 2021。

2 结果与分析

2.1 蓝莓 CGAE 中绿原酸同系物的含量分析

通过高效液相色谱-质谱联用仪，应用多反应监测模式鉴定蓝莓样品中 6 种绿原酸同源物的含量，如表 3 所示。

蓝莓样品中绿原酸同系物的平均含量为：绿原酸>新绿原酸>隐绿原酸>异绿原酸 A>异绿原酸 B>异绿原酸 C。绿原酸和新绿原酸是含量最高的两种绿原酸类成分，二者合计占 6 种绿原酸同系物总量的 98.80%。15个蓝莓样品中，绿原酸含量最高的是 B13(231.92 μg/g)，新绿原酸含量的变幅为 5.45~41.98 μg/g，最高的是 B2(41.98 μg/g)。隐绿原酸含量的变幅为 0.25~1.45 μg/g，最高的是 B10(1.45 μg/g)，最低的是 B5(0.25 μg/g)。其他 3 种绿原酸同源物的含量均低于 0.5 μg/g，含量较低。

2.2 蓝莓 ANTE 中花色苷的组成分析

本研究基于 AB Sciex 公司花青素质谱库，根据一、二级质谱碎片，采用多反应监测模式在 15 个 ANTEs 中共鉴定出 13 种花色苷单体，根据碎片丰度，采用归一化面积法分析花色苷的组成及比例，如图 1 所示。

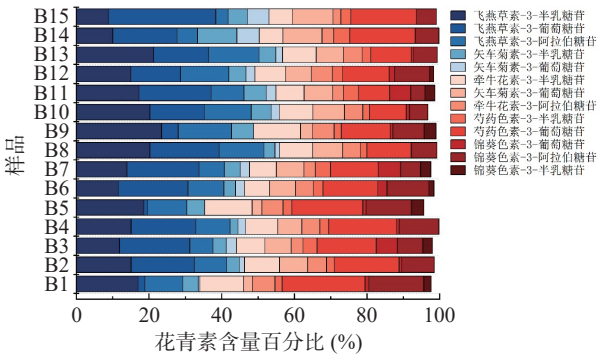


图 1 15 种蓝莓花青素提取物中花色苷含量百分比(%)

Fig.1 Relative anthocyanins content percentage in ANTE of 15 blueberries (%)

蓝莓样品中花青素的平均含量为：飞燕草素>牵牛花素>芍药色素>锦葵色素>矢车菊素，花色苷含量最高的是矢车菊素-3-半乳糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷、芍药色素-3-葡萄糖苷，三者占总花青素含量的 47.32%，样品间 RSD 值依次为 26.96%、49.38% 和 26.19%。上述 RSD 反映 15 个不同蓝莓品种间特定花色苷单体的积累能力存在明显差异。B5 和 B9 没有检测到矢车菊素-3-葡萄糖苷，B14 和 B15 锦葵色素-3-半乳糖苷和锦葵色素-3-葡萄糖苷。

2.3 CGAE 和 ANTE 的火山图差异分析

15 个蓝莓样品中 6 种绿原酸同源物和 13 种花青素含量的差异如火山图所示。

如图 2(a)所示，6 种绿原酸同源物差异显著

表 3 蓝莓绿原酸提取物中绿原酸同系物的含量

Table 3 Content of chlorogenic acid homologs in CGAEs

样品编号	绿原酸 (μg/g)	新绿原酸 (μg/g)	隐绿原酸 (μg/g)	异绿原酸A ($\times10^{-2}$μg/g)	异绿原酸B ($\times10^{-3}$μg/g)	异绿原酸C ($\times10^{-3}$μg/g)
B1	52.97±0.83^{j}	17.47±1.89^{def}	0.38±0.06^{g}	0.33±1.25^{f}	0.36±5.77^{g}	0.03±4.87^{fg}
B2	85.05±4.96^{h}	41.98±0.88^{a}	0.94±0.06^{c}	0.46±1.75^{d}	0.42±0.20^{d}	0.04±3.09^{de}
B3	142.38±1.20^{c}	22.99±1.09^{c}	0.25±0.03^{h}	0.31±1.19^{fg}	1.32±3.56^{b}	0.11±3.10^{a}
B4	102.74±1.28^{f}	23.04±1.92^{c}	0.46±0.04^{fg}	0.27±1.03^{h}	0.44±5.74^{c}	0.06±3.83^{c}
B5	49.34±3.81^{j}	6.67±1.31^{gh}	0.25±0.02^{h}	0.92±3.48^{b}	0.33±3.26^{h}	0.04±4.59^{ef}
B6	91.45±2.57^{g}	8.99±1.98^{g}	0.73±0.04^{d}	0.16±0.60^{i}	0.31±9.48^{i}	0.04±3.11^{f}
B7	66.24±3.29^{i}	16.24±0.50^{f}	0.64±0.06^{e}	0.28±1.07^{gh}	0.44±5.96^{c}	0.06±1.44^{c}
B8	115.02±1.20^{e}	16.5±1.98^{ef}	0.4±0.04^{g}	0.02±6.90^{k}	0.02±3.24^{l}	0.02±2.67^{h}
B9	89.49±2.57^{g}	16.25±1.80^{f}	0.45±0.04^{fg}	0.02±7.39^{k}	0.01±3.28^{l}	0.01±2.87^{i}
B10	185.18±2.57^{b}	23.4±1.98^{c}	1.45±0.09^{a}	0.29±1.09^{gh}	0.26±6.45^{j}	0.02±5.25^{h}
B11	117.76±2.62^{e}	18.95±1.98^{de}	0.50±0.05^{f}	0.53±2.01^{c}	1.46±5.56^{a}	0.07±3.57^{b}
B12	33.67±0.31^{k}	5.45±0.54^{h}	0.45±0.05^{fg}	0.37±1.41^{e}	0.39±4.80^{f}	0.05±1.48^{d}
B13	231.92±3.81^{a}	39.13±1.32^{b}	1.06±0.06^{b}	1.42±5.38^{a}	0.45±1.34^{c}	0.03±2.93^{g}
B14	81.49±1.20^{h}	19.28±1.80^{d}	0.46±0.03^{fg}	0.38±1.43^{e}	0.40±8.14^{e}	0.04±2.12^{fg}
B15	131.67±2.47^{d}	24.11±0.88^{c}	0.97±0.03^{c}	0.12±4.56^{j}	0.16±3.56^{k}	0.02±1.64^{h}

注：同列不同小写字母表示数据差异显著，$P<0.05$。

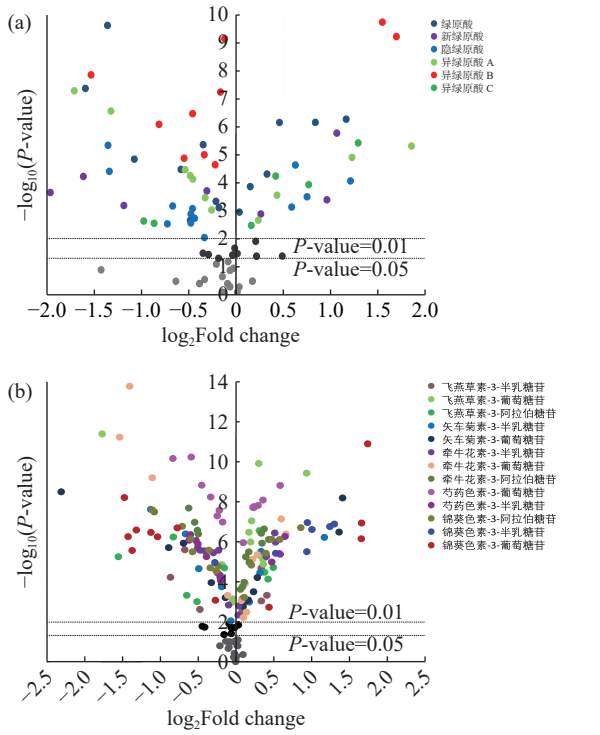


图 2　CGAE 和 ANTE 活性成分差异分析

Fig.2　Variance analysis of active ingredient of CGAE and ANTE

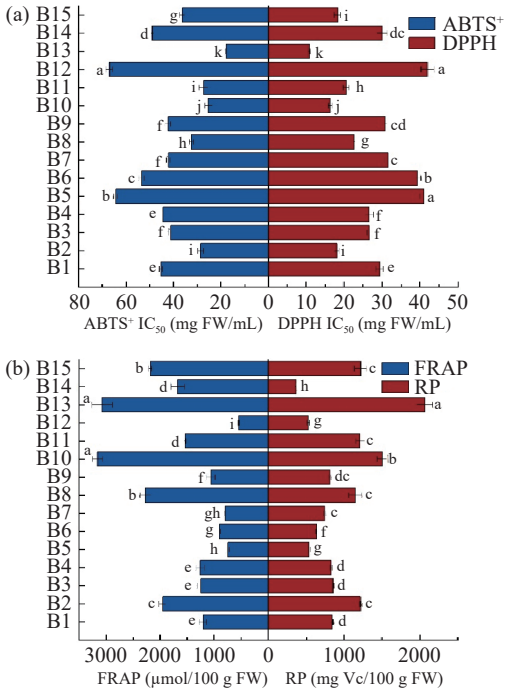


图 3　蓝莓 CGAE 抗氧化分析

Fig.3　Antioxidant analysis of CGAE

注：图中数字上方的不同小写字母表示数据差异显著，P<0.05；图 4、图 7~图 11 同。

(P<0.05)，在火山图中均匀分布，绿原酸和异绿原酸 B 在样品间差异最大，P 值显著性最高，异绿原酸 C 在样品间差异最小，P 值显著性最低。13 种花青素的火山图如图 2(b)所示，蓝莓样品中差异和显著性最大的是矢车菊素-3-葡萄糖苷和锦葵色素-3-葡萄糖苷，样品间差异和显著性最小的是飞燕草素-3-半乳糖苷、芍药色素-3-半乳糖苷、牵牛花素-3-半乳糖苷。

2.4　CGAE 抗氧化活性分析

如图 3(a)所示，15 个样品的 ABTS$^+$自由基清除 IC_{50} 平均值为 41.10 mg/mL，其中，B13 和 B10 的 IC_{50} 最低，分别为 17.78 和 25.18 mg/mL，表明二者清除 ABTS$^+$自由基的能力最强；而 B12 和 B5 的 IC_{50} 最高，分别为 67.07 和 64.30 mg/mL，表明二者清除 ABTS$^+$自由基的能力最弱。15 个样品的 DPPH 自由基清除 IC_{50} 平均值为 26.96 mg/mL，B13 和 B10 的 IC_{50} 最低，平均为 13.60 mg/mL，表明二者清除 DPPH 自由基的能力最强；而 B12 和 B5 的 IC_{50} 最高，分别为 42.03 和 40.98 mg/mL，表明二者清除 DPPH 自由基的能力最弱。

FRAP 的抗氧化活性如图 3(b)所示，15 个样品的平均自由基清除活性当量为 1573.15 μmol/100 g。B13 和 B10 的 FRAP 值最高，分别为 3072.9 μmol/100 g 和 3152.96 μmol/10 0g，表明二者的铁离子还原能力最强；而 B12 和 B5 的 FRAP 值最低，分别为 547.58 μmol/100 g 和 802.11 μmol/100 g，表明二者的铁离子还原能力最弱。RP 抗氧化活性评价显示，15 种 CGAE 的平均自由基清除活性为 968.31 mg/100 g，B13 的 RP 值最高 2062.06 mg/100 g，表明其还原能力最强；而 B14、B12 和 B5 的 RP 值最低，分别为 363.26、528.31 和 538.16 mg/100 g，表明其还原能力最弱。综合四种抗氧化指数，在 15 种 CGAE 样品中，B13、B10 综合抗氧化能力最为突出。

2.5　ANTE 抗氧化活性分析

ANTE 清除及还原 4 种自由基的抗氧化分析如图 4 所示。

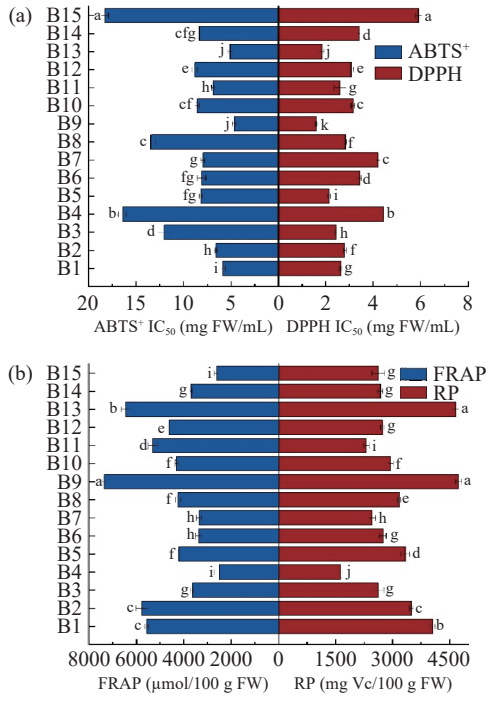


图 4　蓝莓 ANTE 抗氧化分析

Fig.4　Antioxidant analysis of ANTE

如图 4(a)所示，15 个样品的 ABTS⁺自由基清除 IC_{50} 平均值为 9.28 mg/mL。其中 B9 和 B13 的 IC_{50} 最低，分别为 4.65 mg/mL 和 5.08 mg/mL，表明二者清除 ABTS⁺自由基的能力最强；而 B15 和 B4 的 IC_{50} 最高，分别为 18.27 和 16.43 mg/mL，表明二者清除 ABTS⁺自由基的能力最弱。15 个样品的 DPPH 自由基清除 IC_{50} 平均值为 3.10 mg/mL，B9 和 B13 的 IC_{50} 最低，平均为 1.71 mg/mL，表明二者清除 DPPH 自由基的能力最强；而 B15 和 B4 的 IC_{50} 最高，分别为 2.92 和 4.43 mg/mL，表明二者清除 DPPH 自由基的能力最弱。

FRAP 的抗氧化活性如图 4(b)所示，15 个样品的平均自由基清除当量为 4465.06 μmol/100 g。B9 和 B13 的 FRAP 值最高，分别为 7346.11 和 6463.32 μmol/100 g，表明二者的铁离子还原能力最强；而 B4 和 B15 的 FRAP 值最低，分别为 2504.37 和 2631.09 μmol/100 g，表明二者的铁离子还原能力最弱。RP 抗氧化活性评价显示，15 个样品的平均自由基清除当量为 3082.01 mg/100 g，B9 和 B13 的 RP 值最高，分别为 4739.86 和 4665.70 mg/100 g，表明二者的还原能力最强；而 B4 和 B7 的 RP 值最低，分别为 1627.32 和 2463.71 mg/100 g，表明二者的还原能力最弱。

在 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除实验中，ANTE 的 IC_{50} 值均低于 CGAE，表明 ANTE 在单位浓度下对自由基的清除效率更高。综合四种抗氧化评价指标，在 15 个 ANTE 样品中，B9 和 B13 的抗氧化活性显著优于其他样品，B1 和 B2 在部分指标上也表现出较好的活性。

2.6 CAGE 和 ANTE 与抗氧化活性相关性分析

绿原酸同源物与抗氧化活性的相关性分析见图 5a，绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸含量与 DPPH、ABTS⁺自由基清除率呈显著(P<0.05)负相关，与 FRAP、RP 呈显著(P<0.05)正相关，而异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 与抗氧化活性均无显著相关性。CGAE 中绿原酸与 FRAP 和 RP 的相关系数大于新绿原酸和隐绿原酸，新绿原酸与 ABTS⁺和 DPPH 自由基清除率的相关系数大于绿原酸和隐绿原酸。花色苷与抗氧化活性的相关性分析见图 5b。飞燕草素-3-半乳糖苷和飞燕草素-3-阿拉伯糖苷含量与 FRAP、RP 呈显著(P<0.05)正相关，与 ABTS⁺自由基清除率呈负相关，但只有飞燕草素-3-阿拉伯糖苷显著(P<0.05)，而飞燕草素-3-葡萄糖苷与 ABTS⁺自由基清除率呈显著(P<0.05)正相关，与 FRAP、RP 呈显著(P<0.05)负相关。在矢车菊素、牵牛色素、芍药色素和锦葵色素中，仅矢车菊素-3-葡萄糖苷与 FRAP、RP 呈显著(P<0.05)负相关，牵牛花素-3-半乳糖苷、牵牛花素-3-阿拉伯糖苷与 FRAP、RP 呈显著(P<0.05)正相关，其余均与抗氧化活性无显著性相关。在 ANTE 中，花青素以飞燕草素为主，占总量的 41.24%，其次是牵牛色素，占 20.68%。

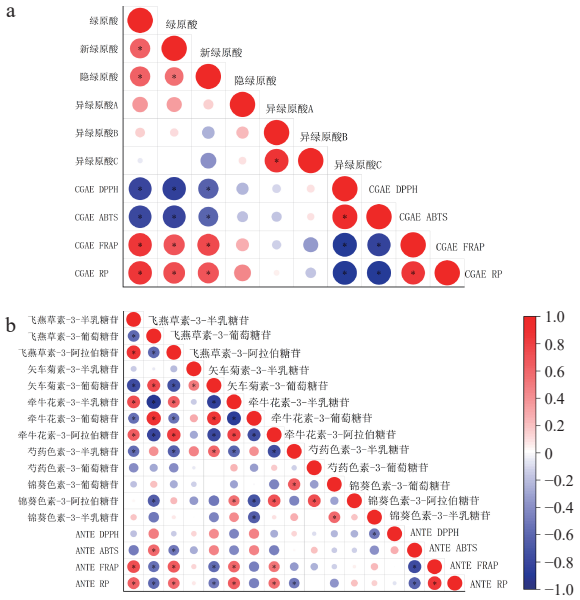


图 5 CAGE 和 ANTE 活性成分与抗氧化指标相关性分析

Fig.5 Visualization of the correlation of assay indicator parameters in CAGE and ANTE

注：*表示显著性水平，P<0.05。

2.7 CAGE 和 ANTE 与抗氧化活性主成分分析

15 个蓝莓样品的 19 个检测指标主成分分析结果如图 6 所示：PC1 和 PC2 的方差贡献率分别为 37.59% 和 14.40%。不同蓝莓样品的得分分布较为分散，其中 B14 和 B15 在 PC1 正半轴具有较高得分，B9、B1 和 B5 在 PC1 负半轴具有较高得分，B3 在 PC2 正半轴具有较高得分，而 B10 和 B13 在 PC2 负半轴具有较高得分。综合载荷分布来看，PC1 主要与绿原酸同系物相关，PC2 主要与花青素相关。在 19 个检测指标中，隐绿原酸、绿原酸、新绿原酸在 PC1 上具有较高的负载荷，表明它们与 PC1 呈较强的负相关；而飞燕草素-3-葡萄糖苷、牵牛色素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷在 PC2 上具有较高的正载荷，表明它们与 PC2 呈较强的正相关。

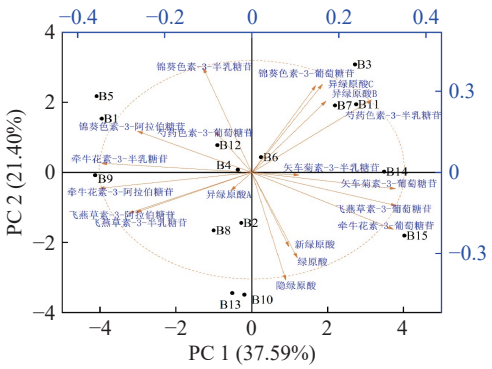


图 6 15 种蓝莓活性成分的主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of different components of 15 blueberries

2.8　CGAE 和 ANTE 对 L-02 细胞的细胞毒性试验

图 7(a)显示了 CGAE 对 L-02 细胞的细胞毒性检测结果。结果表明，当 CGAE 浓度为 100 μg/mL 时，L-02 细胞的存活率为 86%；当 CGAE 浓度为 150 μg/mL 时，L-02 细胞的存活率仅为 33%。当 CGAE 浓度超过 200 μg/mL 时，细胞毒性的差异并不显著。ANTE 对 L-02 细胞的细胞毒性检测见图 7(b)，浓度为 2.5~10 μg/mL 的 ANTE 可促进 L-02 细胞增殖，而浓度为 20~75 μg/mL 的 ANTE 则对 L-02 细胞有毒性。ANTE 浓度超过 75 μg/mL 时对细胞的毒性较强，细胞存活率低于 20%。因此，在随后的细胞损伤保护作用研究中，选择了浓度为 20、40、60、80、100 μg/mL 的 CGAE 和浓度为 5、10、15、20、25 μg/mL 的 ANTE，并分别编码为 CGAE1、CGAE2、CGAE3、CGAE4、CGAE5、ANTE1、ANTE2、ANTE3、ANTE4、ANTE5。

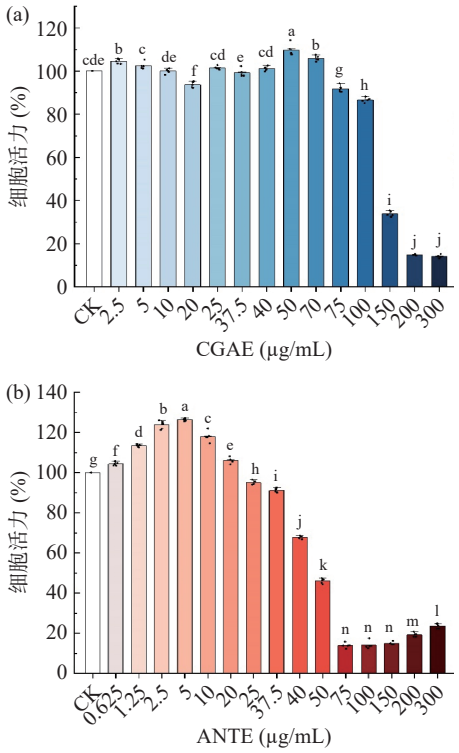


图 7　CGAE 和 ANTE 对 L-02 细胞的细胞毒性试验

Fig.7　Cytotoxicity assay of CGAE and ANTE on L-02 cells

2.9　t-BHP 损伤剂对 L-02 细胞的影响

图 8 显示了 t-BHP 损伤剂的剂量和时间对 L-02 细胞的影响。结果表明，当浓度低于 200 μmol/L 时，t-BHP 在 1~4 h 内不会对细胞造成毒性。当 t-BHP 浓度为 1000 μmol/L 时，1~2 h 内细胞损伤不明显，细胞存活率大于 87%，这表明 t-BHP 在短时间内对细胞损伤的影响有限。在 3~4 h 内，细胞损伤受 t-BHP 浓度的影响，当 t-BHP 浓度大于 300 μmol/L 时，损伤有显著差异。因此，结合损伤剂的浓度、损伤时间和损伤效果，选择 t-BHP 浓度为 350 μmol/L 和处理时间为 4 h 作为构建后续细胞损伤保护模型的操作参数。

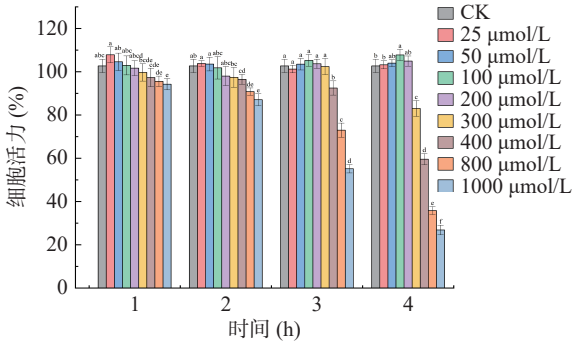
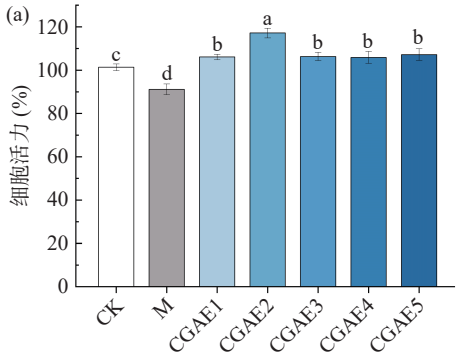


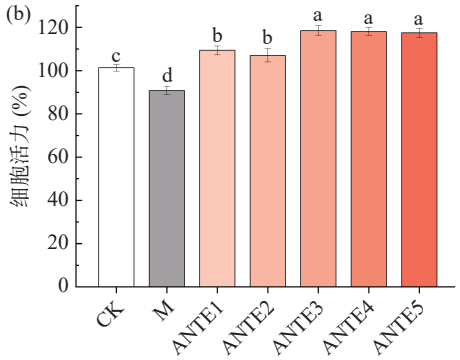
图 8　t-BHP 损伤剂对 L-02 细胞的影响

Fig.8　Effect of dose and time of t-BHP damaging agent on L-02 cells

2.10　CGAE 和 ANTE 对 L-02 细胞损伤的保护作用

CGAE 和 ANTE 对细胞的保护作用如图 9。图 9(a)和图 9(b)显示 CGAE 和 ANTE 对 L-02 细胞的繁殖有促进作用，其中 CGAE2 孵育 12 h 的 L-02 细胞存活率为 117%，细胞存活率最高；ANTE3 孵育 12 h 的 L-02 细胞存活率为 118%，细胞存活率最高。CGAE 和 ANTE 保护 T-BHP 损伤模型如图 9(c)和图 9(d)所示，CGAE2 的存活率最高，为 63%；ANTE3、ANTE4、ANTE5 的存活率较高，均超过 59%。结果表明，CGAE 和 ANTE 对 t-BHP 损伤的 L-02 细胞具有保护作用，其中 CGAE2、ANTE3、ANTE4 和 ANTE5对细胞的保护作用最为显著。





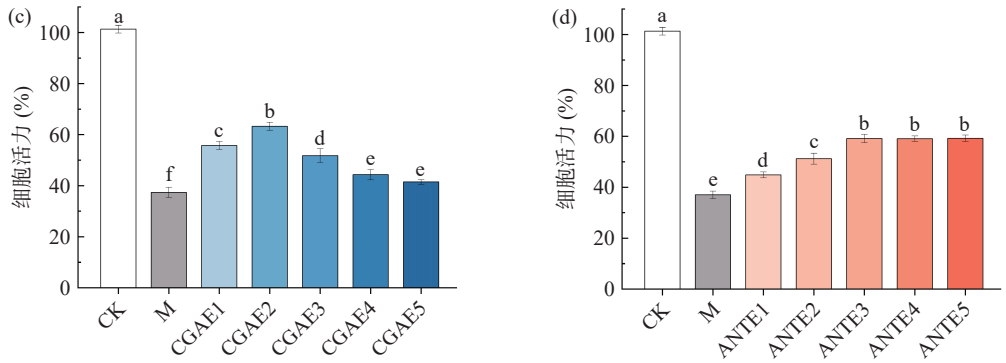


图 9　CGAE 和 ANTE 对 L-02 细胞损伤的保护作用

Fig.9　Protective effects of CGAE and ANTE on injury to L-02 cells

注:(a)CGAE 对 L-02 细胞繁殖活力的影响;(b)ANTE 对 L-02 细胞繁殖活力的影响;(c)CGAE 对受 t-BHP 损伤的 L-02 细胞的保护作用;(d)ANTE 对 t-BHP 损伤的 L-02 细胞的保护作用。

2.11　CGAE 和 ANTE 对 t-BHP 损伤 L-02 总 ROS 的影响

图 10 显示了 350 μmol/L t-BHP 处理细胞不同时间后细胞内总 ROS 的相对值。结果表明,350 μmol/L t-BHP 损伤 L-02 细胞 2 h 后,M 组细胞内 ROS 最高,CGAE 组和 ANTE 组细胞内 ROS 总量低于 M 组,CGAE 组与 CK 组相近,说明 CGAE 和 ANTE 均能清除 ROS,且 CGAE 清除 t-BHP 损伤 L-02 细胞内 ROS 的效果优于 ANTE。

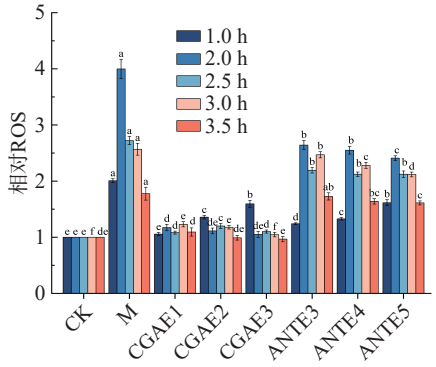


图 10　CGAE 和 ANTE 在不同处理时间对 t-BHP 损伤的 L-02 细胞中 ROS 的影响

Fig.10　Effects of CGAE and ANTE on ROS in t-BHP-damaged L-02 cells at different treatment times

2.12　CGAE 和 ANTE 对 t-BHP 损伤 L-02 细胞 GSH-Px 和 SOD 酶活的影响

图 11 显示了 t-BHP 损伤后 L-02 细胞胞内 GSH-Px 和 SOD 的活性。结果表明,350 μmol/L t-BHP 处理 2 h 后,L-02 细胞的 GSH-Px 活性显著(P<0.05)下降。CGAE 组和 ANTE 组的 GSH-Px 活性明显高于 M 组(26.29 U/mg prot),其中 CGAE3 和 ANTE5 的活性较高,ANTE5(49.01 U/mg)高于 CGAE3(46.94 U/mg)。T-BHP 损伤后,L-02 细胞的 SOD 活性降低,CGAE 组和 ANTE 组的 SOD 活性高于 M 组(74.45 U/mL),其中 CGAE3 和 ANTE5 的活性最高,ANTE5(82.07 U/mL)高于 CGAE3(80.78 U/mL),但差异不显著。结果表明,CGAE 和 ANTE 均能保护 t-BHP 损伤 L-02 细胞的 GSH-Px 和 SOD 活性,且 ANTE 的效果优于 CGAE。

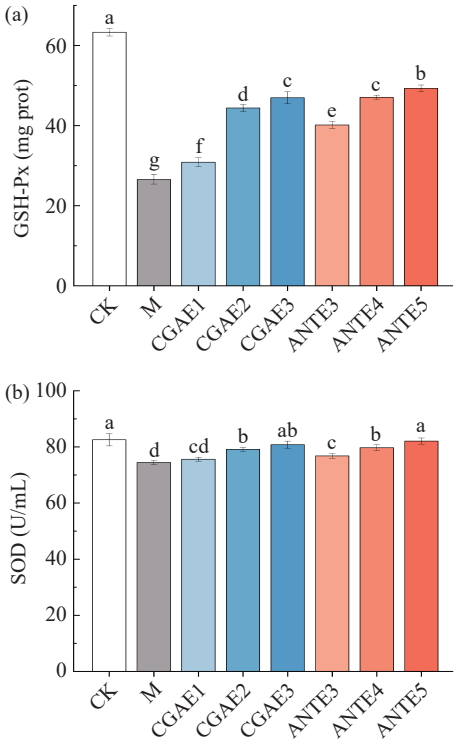


图 11　CGAE 和 ANTE 对 t-BHP 损伤 L-02 细胞 GSH-Px 和 SOD 酶活的影响

Fig.11　Effects of CGAE and ANTE on GSH-Px and SOD activities in L-02 cells after t-BHP injury

3　讨论

本研究在 15 种蓝莓果皮和果肉中分别制备具有高花色苷和绿原酸同系物含量的蓝莓特征性提取物。Connor 等[32] 研究了 9 种蓝莓,基因型和栽培环境显著影响蓝莓总花色苷的含量,发现蓝金和北陆两个品种抗氧化活性最高,其他学者在对多种蓝莓的研究中分别发现‘北春’[33]、‘北蓝’和‘北陆’[34]、‘园蓝’[35]是各自研究中抗氧化活性最高的蓝莓品种。本文选

取 4 个蓝莓产区的 15 种蓝莓，以 ABTS$^+$、DPPH 自由基清除率、FRAP、RP 与抗氧化性能相关的指标为评价依据，研究发现，在 15 个绿原酸提取物中，长沙‘Misty’、丽江‘Sharpblue’、丽江‘Misty’抗氧化活性最高；在 15 个花青素提取物中，随州‘Oneal’、随州‘Sharpblue’、丽江‘Oneal’、丽江‘Misty’抗氧化活性最高，不同品种和不同产地对蓝莓抗氧化活性的影响存在显著性差异，这与文献 [32−35] 报道相一致。吕玲珠[36] 研究发现蓝莓的抗氧化活性与总花色苷含量没有显著的量效关系，而与不同品种间花色苷组分、结构及其含量有关。绿原酸是 *V. ashei* 蓝莓杂交衍生物中抗氧化活性最显著的成分，占总抗氧化活性的 62.5%，而花青素是兔眼品种和北高丛品种抗氧化活性的主要成分[37]，分别占总抗氧化活性的 76.2% 和 76.8%。本文在研究活性成分与抗氧化活性相关性时发现，在 15 种绿原酸提取物中，绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸含量与 DPPH、ABTS$^+$自由基清除率呈显著负相关，与 FRAP、RP 呈显著正相关；在 15 种花青素提取物中，绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸含量与 DPPH、ABTS$^+$自由基清除率呈显著负相关，与 FRAP、RP 呈显著正相关，飞燕草素-3-半乳糖苷和飞燕草素-3-阿拉伯糖苷含量与 FRAP、RP 呈显著正相关，与 ABTS$^+$自由基清除率呈负相关，但只有飞燕草素-3-阿拉伯糖苷显著，而飞燕草素-3-葡萄糖苷与 ABTS$^+$自由基清除率呈显著正相关，与 FRAP、RP 呈显著负相关。在矢车菊素、牵牛色素、芍药色素和锦葵色素中，仅矢车菊素-3-葡萄糖苷与 FRAP、RP 呈显著负相关，牵牛花素-3-半乳糖苷、牵牛花素-3-阿拉伯糖苷与 FRAP、RP 呈显著正相关，这与文献 [36−37] 类似。不同品种、产地及地理位置的蓝莓样品在其活性成分组成与抗氧化活性上存在显著差异。这种差异存在的原因在于基因型和环境因子的共同作用，二者通过影响次生代谢途径，决定了活性成分的合成与积累。

不同栽培品种拥有其独特的遗传背景，这直接决定了其合成特定酚类物质（如绿原酸同系物）和花青素单体（如飞燕草素、锦葵素）的代谢途径的强弱与效率[38]。某些品种可能具有更高效的二羟基 B 环花青素（如飞燕草素）合成途径，而另一些品种则可能更倾向于积累三羟基或甲基化衍生物（如锦葵素）。这直接解释了为何 PCA 分析中，PC2 能够成功地将 B9, B13 和 B1 依据其花青素特征成分进行有效区分。在本研究中，同一产地（如云南丽江）的不同品种（如 B9 ‘Oneal’与 B13 ‘Misty’），其活性成分含量与抗氧化活性呈现显著差异，这正是基因型起主导作用的直接证据。

与此同时，环境因子则扮演着关键的“调控者”角色。产地的气候、土壤、海拔等差异构成了所谓的“风土效应”，通过胁迫刺激影响植物的次生代谢。光照（光强与光质）是影响花青素合成的关键环境信号。较高的光照强度（特别是紫外光 UV-B）能显著上调花青素生物合成相关基因的表达，促进其积累以保护植物组织免受光损伤。温差（较大的昼夜温差）有助于白天光合产物的大量积累，并在低温的夜晚减缓呼吸消耗，为合成酚酸和花青素等次生代谢产物提供更充足的前体物质[39−40]。本研究中，同一品种（如‘Misty’）在不同产地（湖北随州 B4 与云南丽江 B13）表现出明显不同的成分，丽江产区的样品在多项指标上表现更优。这可能与云南丽江较高的海拔、更强的紫外线辐射以及显著的昼夜温差等环境条件更利于活性成分的积累。PCA 分析中，PC1 更多地与绿原酸同系物相关，而 B10（丽江‘Sharpblue’）和 B13（丽江‘Misty’）在 PC2 上呈现负相关并与其他品种显著区分。这表明，丽江产区的特定环境条件放大了 B10 和 B13 这两个特定基因型在花青素合成上的内在优势，促使植物合成更多的酚类物质以应对环境胁迫，最终转化为其卓越的抗氧化活性，使得它们最终成为综合表现最优的品种。这对于指导蓝莓优良品种选育、规范化种植基地的选址以及生产高质量、高附加值的功能性食品原料具有重要的理论与实践意义。

在对不同提取方法的研究中发现，离心溶剂萃取法生产的蓝莓提取物与酶提取法和超声波提取法相比，提取效率高、纯度高，能有效降低蓝莓花青素的氧化分解[41]。蓝莓粗提取物的含量与 ABTS$^+$自由基清除率呈剂量反应关系，纯化的多酚提取物和花青素提取物的 ABTS$^+$自由基清除率分别是粗提取物的 2.36 倍和 2.55 倍[42]。本研究采用大孔吸附树脂 AB-8 纯化 ANTE，测定了 15 份蓝莓样品中的 6 种绿原酸同系物和 13 种花青素。在 ABTS$^+$、DPPH 自由基清除率、FRAP、RP 等抗氧化性评价中，CGAE 和 ANTE 均显示出显著的抗氧化活性。

本研究在检测不同绿原酸提取物以及同系物时发现，尽管蓝莓绿原酸提取物（CGAE）中，绿原酸和新绿原酸是含量上的绝对主导成分，构成了其抗氧化活性的主要物质基础，但我们不能因此忽视微量同系物，如异绿原酸 A、B、C 的潜在贡献。这些同系物含量虽低，但在多种绿原酸同系物共存时，其抗氧化效果并非简单的加和关系，而是可能通过以下机制产生“1+1>2”的协同效果，有研究表明这种协同效果可能是再生机制—种酚类物质在中和自由基后自身被氧化为活性较低的酚氧自由基，另—种具有更低氧化电位的同系物可以为其提供氢原子，使其再生还原，从而形成—个高效的抗氧化循环网络，显著延长整体的抗氧化持续时间[43]。也有报道认为协同机制是不同机制靶点间的互补，不同结构的同系物可能偏好不同的抗氧化机制。例如，某些同系物可能更擅长直接清除自由基，而另一些可能更善于螯合金属离子（如 Fe^{2+}、Cu^{2+}），后者是催化脂质过氧化链式反应的关键因子。通过多靶点攻击，它们能更全面地抑制氧化应

激[44]。特定微量同系物可能因其独特的结构而具有异常高的本征抗氧化活性。尽管其绝对含量低,但其单位分子的抗氧化效率(如 ORAC 值)可能远高于主要成分。因此,它们的“质量效应”虽小,但“活性贡献”却可能远超其含量比例[45]。此外,这些微量成分可能作为激活特定信号通路的关键激动剂,在极低浓度下即可启动细胞的抗氧化防御系统(如 Nrf2 通路),这与主要成分通过直接清除自由基的机制形成互补[46]。

此外,人们还对蓝莓提取物在生理活动中的抗氧化活性进行了研究。蓝莓花青素能迅速清除氧自由基,从而抵御细胞中的氧化应激[47]。体外实验表明,200~400 μg/mL 的蓝莓花青素提取物能剂量依赖性地抑制 B16~B10 细胞株的增殖[48]。30 μg/mL 花青素-3-葡萄糖苷可减少 C57BL/6 角蛋白形成细胞中紫外线介导的氧化[49]。大鼠研究表明,以 200 mg/kg 的剂量连续 5 周服用蓝莓提取物可降低烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的活性和黄嘌呤氧化酶的表达,并恢复动物肺部抗氧化转录因子 Nrf2 的表达[50];以 12.5 mg/kg 的剂量连续 35 d 服用蓝莓提取物可抑制中性粒细胞的氧化,并明显改善软组织肿胀和骨帽的形成[51]。本研究构建 CGAE 和 ANTE 对损伤剂 t-BHP 处理的人肝细胞 L-02 的保护模型,并用 ROS、SOD 和 GSH-Px 的抗氧化能力评价了细胞活力,结果表明:20~60 μg/mL CGAE 和 15~25 μg/mL ANTE 能保护 t-BHP 损伤的 L-02 细胞,具有显著的 GSH-Px 和 SOD 活性,且 ANTE 抗氧化性能优于 CGAE。ANTE 之所以在细胞模型中表现出比 CGAE 更优异的综合保护效果,很可能是因为其花青素组分及其代谢物不仅能直接抗氧化,更擅长于“智能”地调节 Nrf2 等核心信号通路,从而高效启动细胞自身的 SOD、GSH-Px 等防御模式。

4 结论

本研究采用 HPLC-MRM-MSMS-ESI 技术,对 15 个不同品种和产地的蓝莓样品的绿原酸提取物(CGAE)和花青素提取物(ANTE)进行了系统的化学成分鉴定与定量分析,并结合体外化学抗氧化实验和细胞氧化损伤保护实验,全面评价了两类提取物的生物活性,得出以下主要结论:在 15 个蓝莓样品的 CGAE 中共鉴定出 6 种绿原酸同系物,各组分含量差异显著,平均含量排序为:绿原酸 > 新绿原酸 > 隐绿原酸 > 异绿原酸 B > 异绿原酸 A > 异绿原酸 C。其中,绿原酸和新绿原酸是绝对主导成分,二者合计占同系物总量的 98.80%。不同品种间绿原酸含量差异悬殊,B13(丽江‘Misty’)含量最高(231.92 μg/g),B12(丽江‘Eureka’)含量最低(33.67 μg/g),前者为后者的 6.9 倍。在 15 个蓝莓样品的 ANTE 中共鉴定出 13 种花青素单体,平均含量排序为:飞燕草素>牵牛花素>芍药色素>锦葵色素>矢车菊素。矢车菊素-3-半乳糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷和芍药色素-3-葡萄糖苷为最主要成分,三者占总花青素含量的 47.32%。B5(长沙‘Oneal’)和 B9(丽江‘Oneal’)中未检出矢车菊素-3-葡萄糖苷,B14(武汉‘Powderblue’)和 B15(武汉‘Gardenblue’)中未检出锦葵色素-3-半乳糖苷和锦葵色素-3-葡萄糖苷,表明花色苷组成受品种和产地因素的显著影响;体外抗氧化活性评价结果表明,ANTE 的 ABTS 和 DPPH 自由基清除 IC_{50} 平均值分别为 9.28 和 3.10 mg/mL,显著优于 CGAE(41.10 和 26.96 mg/mL),表明 ANTE 的单位浓度抗氧化效率远高于 CGAE。在 15 个品种中,丽江产区的 B13 和 B10 在 CGAE中抗氧化活性最高,丽江产区的 B9 和 B13 在 ANTE中抗氧化活性最高,表明云南丽江产区的特定品种在积累抗氧化活性成分方面具有显著优势;相关性分析和主成分分析揭示了不同提取物中起关键作用的抗氧化成分:在 CGAE 中,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸与 DPPH、ABTS、FRAP 和 RP 四种抗氧化指标均呈显著正相关(P<0.05),是决定 CGAE 抗氧化活性的关键物质基础;在 ANTE 中,飞燕草素与 ABTS、FRAP 和 RP 呈显著正相关(P<0.05),是 ANTE抗氧化活性的主要贡献者;细胞毒性试验确定了 CGAE 和 ANTE 的安全作用范围:CGAE 浓度低于 100 μg/mL 时对 L-02 细胞无明显毒性,ANTE 浓度在 2.5~10 μg/mL 范围内可促进细胞增殖。在此基础上,成功构建了 350 μmol/L t-BHP 处理 4 h 的L-02 细胞氧化损伤模型。细胞保护实验表明,20~60 μg/mL 的 CGAE 和 15~25 μg/mL 的 ANTE 可显著降低 t-BHP 诱导的细胞内 ROS 水平,并有效提高 GSH-Px 和 SOD 的酶活性,对氧化损伤的 L-02 细胞表现出显著的保护作用。其中,ANTE 在提高 GSH-Px 和 SOD 酶活性方面的效果优于 CGAE,推测与其花青素组分的高效自由基清除能力和细胞信号通路调节能力有关。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 李亚东, 刘成, 魏鑫, 等. 2024 年中国蓝莓产业发展报告[J]. 吉林农业大学学报, 2025, 47(1): 1−14. [LI Yadong, LIU Cheng, WEI Xin, et al. Development report of 2024 China blueberry industry[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2025, 47(1): 1−14.]

[2] URTADO-ROMERO A, ZEPEDA-HERNÁNDEZ A, URIBE-VELÁZQUEZ T, et al. Utilization of blueberry-based ingredients for formulating a synbiotic Petit Suisse cheese: Physicochemical, microbiological, sensory, and functional characterization during cold storage[J]. Lwt, 2023, 183: 114955.

[3] 李亚东, 盖禹含, 王芳, 等. 2021 年全球蓝莓产业数据报告[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(1): 1−12. [LI Yadong, GAI Yuhan, WANG Fang, et al. Global blueberry industry report 2021[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022, 44(1): 1−12.]

[4] 吴林, 胡晶, 唐雪东, 等. 我国蓝莓产业的现状与思考[J]. 中

国果树，2025(2)：1−5. ［WU Lin, HU Jing, TANG Xuedong, et al. Current situation and thinking of the blueberry industry in China[J]. China Fruits, 2025(2): 1−5.］
［5］ ZHANG Jia, NIE Jiyun, LI Jing, et al. Evaluation of sugar and organic acid composition and their levels in highbush blueberries from two regions of China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(9): 2352−2361.
［6］ ROJAS-OCAMPO E, TORREJÓN-VALQUI L, MUÑÓZ-ASTECKER L D, et al. Antioxidant capacity, total phenolic content and phenolic compounds of pulp and bagasse of four Peruvian berries[J]. Heliyon, 2021, 7(8): e07787.
［7］ SEZER E D, OKTAY L M, KARADADAŞ E, et al. Assessing anticancer potential of blueberry flavonoids, quercetin, kaempferol, and gentisic acid, through oxidative stress and apoptosis parameters on HCT-116 cells[J]. Journal of Medicinal Food, 2019, 22(11): 1118−1126.
［8］ BARNES J S, NGUYEN H P, SHEN Sijia, et al. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(23): 4728−4735.
［9］ DRAGOVI{Ć}-UZELAC V, SAVI{Ć} Z, BRALA A, et al. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48: 214−221.
［10］ KAUSAR H, GUPTA R C. Berry anthocyanidins inhibit key events of lung cancer metastasis: Effects on miRNA and protein targets[J]. Cancer Research, 2011, 71(8_Supplement): 3693.
［11］ XUE Bin, ZHAO Bei, LUO Shuangyan, et al. Inducing apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines via Nrf2/HO-1 signalling pathway of blueberry and blackcurrant powder manipulated oat bran paste extracts[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 89: 104967.
［12］ MUSTAFA A M, ANGELONI S, ABOUELENEIN D, et al. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130743.
［13］ SHAMANTHAKA SASTRY M C, NARASINGA RAO M S. Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11 S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(12): 2103−2110.
［14］ BAJKO E, KALINOWSKA M, BOROWSKI P, et al. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity[J]. LWT, 2016, 65: 471−479.
［15］ CLIFFORD M N, JOHNSTON K L, KNIGHT S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 2900−2911.
［16］ OUTCHKOUROV N S, KARLOVA R, HÖLSCHER M, et al. Transcription factor-mediated control of anthocyanin biosynthesis in vegetative tissues[J]. Plant Physiology, 2018, 176(2): 1862−1878.
［17］ YANG Wenjuan, GUO Yuxi, LIU Meng, et al. Structure and function of blueberry anthocyanins: A review of recent advances[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 88: 104864.
［18］ LI Xuenan, LIU Huangyou, LÜ Lingzhu, et al. Antioxidant activity of blueberry anthocyanin extracts and their protective effects against acrylamide-induced toxicity in HepG2 cells[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2017, 53(1): 147−155.
［19］ SONG Yu, HUANG Lili, YU Jianfeng. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling[J]. Journal of Neuroimmunology, 2016, 301: 1−6.
［20］ ZHAO Mengyao, WANG Pengpu, ZHU Yuchen, et al. Blueberry anthocyanins extract inhibits acrylamide-induced diverse toxicity in mice by preventing oxidative stress and cytochrome P450 2E1 activation[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 95−101.
［21］ RAMIREZ-TORTOSA C, ANDERSEN Ø M, GARDNER P T, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2001, 31(9): 1033−1037.
［22］ ROY S, KHANNA S, ALESSIO H M, et al. Anti-angiogenic property of edible berries[J]. Free Radical Research, 2002, 36(9): 1023−1032.
［23］ CHAI Zhi, HERRERA-BALANDRANO D D, YU Hong, et al. A comparative analysis on the anthocyanin composition of 74 blueberry cultivars from China[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 102: 104051.
［24］ VASILIKI P. The effect of wild blueberry anthocyanins and phenolic acids on innate immunity: The compliment system[D]. Maine, University of Maine, 2018, 10−15.
［25］ MUÑOZ-FARIÑA O, LÓPEZ-CASANOVA V, GARCÍA-FIGUEROA O, et al. Bioaccessibility of phenolic compounds in fresh and dehydrated blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)[J]. Food Chemistry Advances, 2023, 2: 100171.
［26］ FIGUEIRA J A, PORTO-FIGUEIRA P, PEREIRA J A M, et al. Free low-molecular weight phenolics composition and bioactivity of *Vaccinium padifolium* Sm fruits[J]. Food Research International, 2021, 148: 110580.
［27］ GAO Pan, LIU Ruijie, JIN Qingzhe, et al. Comparative study of chemical compositions and antioxidant capacities of oils obtained from two species of walnut: *Juglans regia* and *Juglans sigillata*[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 279−287.
［28］ THAIPONG K, BOONPRAKOB U, CROSBY K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(6-7): 669−675.
［29］ WANG S Y, CHEN Hangjun, CAMP M J, et al. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade)[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 855−864.
［30］ 柏志全，胡巢凤，孙丽萍. 天麻素对乙醇诱导肝细胞株 L02 细胞损伤的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2010, 26(3): 211−213. ［BAI Zhiquan, HU Chaofeng, SUN Liping. The effect of gastrodine on hepatitic cell line L02 injury induced by ethanol[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2010, 26(3): 211−213.］
［31］ 雷鸣，徐应淑，孙静波，等. 异槲皮苷对叔丁基过氧化氢诱导的 L-02 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发，2017, 29(4): 563−568. ［LEI Ming, XU Yingshu, SUN Jingbo, et al. Protective effect of isoquercitrin on t-BHP-induced oxidative damage of L-02 cells[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(4): 563−568.］
［32］ CONNOR A M, LUBY J J, TONG C B S, et al. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic

content, and anthocyanin content among blueberry cultivars[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2002, 127(1): 89−97.
[33] 吕春茂, 杨宏, 孟宪军, 等. 不同成熟期“北春”越橘花色苷含量及抗氧化研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 130−134. [LÜ Chunmao, YANG Hong, MENG Xianjun, et al. Study on content and antioxidant activity of anthocyanins from different maturity of Northcountry bilberry fruits[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 130−134.]
[34] 周丽萍, 朱良玉, 张悦. 北方主要越橘栽培品种果实品质及抗氧化能力的比较[J]. 中国林副特产, 2012(5): 4−6. [ZHOU Liping, ZHU Liangyu, ZHANG Yue. Comparison of quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity between blueberry cultivars mainly cultivated in North China[J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2012(5): 4−6.]
[35] 曲文茹, 姜文洁, 孙晓红. 不同蓝莓品种多酚含量、抗氧化能力和抑菌活性的测定与比较[C]. 中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集. 中国食品科学技术学会, 2018: 187−188. [QU W R, JIANG W J, SUN X H. Determination and comparison of polyphenol content, antioxidant capacity and antibacterial activity of different blueberry varieties[C]. Abstracts of the 15th Annual Conference of the Chinese Society of Food Science and Technology. Chinese Society of Food Science and Technology, 2018: 187−188.]
[36] 吕玲珠. 蓝莓品质评价及其花色苷对丙烯酰胺所致 HepG2 细胞损伤的保护作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016. [LÜ Lingzhu. Study on the quality evaluation of blueberry and the protective effect of anthocyanins on HepG2 cell damage induced by acrylamide[D]. Changchun: Jilin University, 2016.]
[37] LI C, LI J, LI X, et al. Application of widely targeted metabolomics strategy to reveal the evolution of phenolic color-contributing metabolites during the high pressure processing and thermal processing of blueberry juice[J]. Food Chemistry: X, 2025, 28: 102566.
[38] JAISWAL R, KARAKÖSE H, RUHMANN S, et al. Identification of phenolic compounds in berries of narrow-leafed lupin by LC-MS and NMR spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(32): 7841−7849.
[39] KALT W, McDONALD J E, FILLMORE S A E, et al. Blueberry cultivar and harvest season affect fruit quality and nutritional composition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(32): 9265−9276.
[40] LI D, LI B, MA Y, et al. Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids concentrations and the antioxidant activity of various blueberry cultivars: Correlation and comparison[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 128394.
[41] LI Xiang, ZHU Feiying, ZENG Zhiwen. Effects of different extraction methods on antioxidant properties of blueberry anthocyanins[J]. Open Chemistry, 2021, 19(1): 138−148.
[42] YANG Sen, WANG Chao, LI Xingyuan, et al. Investigation on the biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(2): 614−627.
[43] LIU D, SHI J, COLINA I Y, et al. The synergistic antioxidant effect of natural polyphenols in red raspberry[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130589.
[44] LEOPOLDINI M, RUSSO N, CHIODO S, et al. Multitargeted antioxidant activity of hydroxybenzoic acids: A structure-activity relationship study[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(42): 13372−13383.
[45] LIU H, QIU N, DING H, et al. Polyphenols: Synergistic effects and mechanisms of action in the prevention of diseases[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(30): 8434−8457.
[46] CORREIA R T P, BORGES K C, MEDEIROS M F D, et al. Synergistic, additive and antagonistic antioxidant activities in the mixture of phenolics in orange and apple juices[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(5): 1957−1966.
[47] KALT W, CASSIDY A, HOWARD L R, et al. Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins[J]. Advances in Nutrition, 2020, 11(2): 224−236.
[48] BUNEA A, RUGINĂ D, SCONŢA Z, et al. 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.
[49] MURAPA P, DAI Jin, CHUNG M, et al. Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes[J]. Phytotherapy Research, 2012, 26(1): 106−112.
[50] TÜRCK P, FRAGA S, SALVADOR I, et al. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension[J]. Nutrition, 2020, 70: 110579.
[51] FIGUEIRA M E, OLIVEIRA M, DIREITO R, et al. Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 83: 1191−1202.