

# 体外消化对蓝莓提取物抗氧化、抗癌及组分的影响

薛宏坤<sup>1</sup>, 谭佳琪<sup>2</sup>, 王瑜<sup>3</sup>, 王鑫<sup>3,4\*</sup>

(1. 东北农业大学 工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 哈尔滨海关, 黑龙江 哈尔滨 150028)

**摘要:** 以蓝莓为原料, 考察了体外消化前、后蓝莓提取物(总酚和花色苷)含量、抗氧化性、抗癌作用及花色苷组成的变化, 并推测了花色苷的降解途径。分别采用福林-酚法和 pH 示差法测定总酚和花色苷含量; 以脂质体的抑制率、DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力评价体外消化前后提取物的抗氧化能力; 利用高效液相色谱-电喷雾二级质谱联用技术分析花色苷组成。结果表明, 与未经消化的提取物相比, 经肠道消化后样品总酚含量增加 47.21%, 花色苷含量降低 71.82%, 脂质体的抑制率、DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率分别提高 38.45%、29.41% 和 29.12%; 对 HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 HeLa 人宫颈癌细胞的生长抑制作用显著增加, 蓝莓花色苷组分由 12 种降为 9 种。对胃肠消化花色苷的降解过程推测发现, 矢车菊素-3-葡萄糖苷降解形成槲皮素的过程与天竺葵素-3-葡萄糖苷降解成山柰酚的过程机制相同。

**关键词:** 体外消化; 蓝莓提取物; 抗氧化性; 抗癌作用; 花色苷组分; 生物工程

中图分类号: TS255.42 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2019)03-0461-08

## Effects of *in vitro* Digestion on Antioxidant Activity, Anti-cancer Activity and Composition of Blueberry Extracts

XUE Hong-kun<sup>1</sup>, TAN Jia-qi<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>3</sup>, WANG Xin<sup>3,4\*</sup>

(1. College of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 3. College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China; 4. Harbin Customs, Harbin 150028, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Changes in total polyphenols and anthocyanins contents, antioxidant capacity and anticancer effect, anthocyanins compositions of blueberry extracts before and after *in vitro* digestion were investigated. The degradation pathway of anthocyanins was speculated. The total polyphenols content and anthocyanins content were measured by Folin-Ciocalteu reagent method and pH differential method, respectively. The antioxidant capacity of the extracts before and after *in vitro* digestion was evaluated by the inhibition rate of liposomes, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ABTS<sup>+</sup> free radicals scavenging abilities. Furthermore, the compositions of anthocyanins were analyzed using by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-EIS-MS). The results indicated that after *in vitro* digestion the content of total polyphenols increased by 47.21%, while that of anthocyanins decreased by 71.82%, and the inhibition rate of liposomes, scavenging rates of DPPH and ABTS<sup>+</sup> free radicals increased by 38.45%, 29.41% and 29.12%, respectively. Blueberry extracts could significantly inhibit the growth of HepG2 hepatoma cells, A549 lung cancer cells and HeLa human cervical cancer cells. The varieties of anthocyanins decreased from twelve to nine. The degradation process of gastrointestinal anthocyanins revealed that the process of degradation of cyanidin 3-glucoside to form quercetin was similar to that of degradation of pelargonidin 3-glucoside into kaempferol.

**Key words:** *in vitro* digestion; blueberry extracts; antioxidant activity; anti-cancer; anthocyanins

compositions; biological engineering

**Foundation item:** National Science and Technology Support Program (2017YFD0401204-5)

蓝莓果实中含有丰富的花青素、维生素、黄酮等活性成分<sup>[1]</sup>。其中,花青素是一类水溶性天然色素,属于多酚类化合物,在植物细胞液中多以糖苷键形成花色苷而存在<sup>[2]</sup>。花色苷具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老等功效<sup>[3]</sup>。关于蓝莓的研究主要集中在花色苷提取和组分鉴定方面。目前,对机体摄入花色苷在胃肠道内消化稳定性的报道较少。因此,研究花色苷在胃肠道中的消化稳定性,对深入分析花色苷在机体内的生物利用率有重要意义。

Manach<sup>[4]</sup>等研究发现,在人体血浆中仅有质量分数 1%的花色苷被消化吸收。王月华<sup>[5]</sup>等研究发现,经胃肠消化后蓝莓果提取物总酚含量增加 48.2%,花色苷含量降低 67.6%。Vitaglione<sup>[6]</sup>等研究发现,原儿茶酸是人体摄入花色苷单体中矢车菊-3-葡萄糖苷的主要代谢物,占人类摄入花色苷总量的 73%。以上研究表明,消化稳定性是生物活性物质对机体功效的影响因素。虽然体外消化模型不同于人或动物模型,但体外消化模型研究活性成分的生物利用率更接近于在人或动物体内活性成分被生物体利用的情况;且该模型具有简单、快捷、成本低和重演性好等优点。

鉴于此,采用体外模拟人体胃肠消化的方法,考察了蓝莓提取物在消化前后总酚、总花色苷含量,抗氧化能力和对 HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 Hela 人宫颈癌细胞生长抑制作用的变化,花色苷组成以及降解途径。以期为科学评价蓝莓的营养价值和抗氧化活性提供理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与试剂

蓝莓于 2017 年 7 月下旬,采摘于黑龙江省大兴安岭地区。挑选成熟度均一的蓝莓进行打浆,然后放在-18 °C 冰箱中将其冷冻 24 h,再置于真空冷冻干燥机中干燥 48 h,取出用粉碎机进行粉碎,过 40 目筛,制成果粉,避光,密封保存在 4 °C 冰箱中,备用。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、2,2'-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS)、2,3,5-三苯基-2h-四唑氯化物 (TPTZ)、水溶性 V<sub>E</sub> (Trolox), 美国 Sigma 公司;胃蛋白酶 (活力 2.33 U/g)、胰蛋白酶 (活力 10.01 U/g) 和福林酚,北京鼎国生物试剂有限公司;醋酸、水杨酸、浓盐酸、氯化铁、冰乙酸均为 AR,天津市富宇精细化工有限公司;甲酸、

乙腈、甲醇、乙醇均为色谱纯,美国 Fisher 公司;超纯水(过 0.45 μm 滤膜),天津市科密欧化学试剂有限公司;大豆卵磷脂 (LLS)、硫代巴比妥酸 (TBA)、三氯乙酸 (TCA),国际集团化学试剂有限公司;HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 Hela 人宫颈癌细胞,哈尔滨医科大学提供。

HZQ-F 全温振荡培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;UV-3200 扫描型紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;PHS-550 雷磁 pH 计,上海仪电科学仪器有限公司;Milestone ETHOSA 微波消解/萃取系统,意大利 Labtech 仪器股份有限公司;DRYER 真空冷冻干燥器,德国 Siemens 公司;KH19A 台式高速高性能离心机,湖南凯达科学仪器有限公司;Agilent1260 高效液相色谱-布鲁克质谱联用仪,美国 Agilent 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蓝莓提取物制备

准确称取 (2.00 g) 蓝莓粉末,按照料液比 (料为蓝莓粉末,单位 g;液为乙醇溶液,单位 mL) 1 : 30 加入体积分数为 60%乙醇溶液充分混合,50 °C 下微波提取 5 min,真空抽滤得上清液,滤渣按上述方法重复提取 3 次至滤渣无色,合并 3 次抽滤所得的滤液,在 40 °C 下旋转蒸发将其浓缩,收集浓缩液。用 500 mL 装有 HPD-700 大孔树脂的玻璃柱在层析柜中对收集的浓缩液进行分离纯化<sup>[7]</sup> (纯化条件:上样溶液质量浓度为 0.75 g/L、上样流速 0.5 mL/min、pH 2.0 和洗脱剂体积分数为 60%乙醇、洗脱流速 1.5 mL/min),收集 HPD-700 大孔树脂纯化后滤液,将其再次浓缩至无乙醇残留,将得到的浓缩液冷冻干燥成粉末,得到蓝莓提取物,将粉末密封于真空塑料袋中,置于-20 °C 冰箱中避光保存,备用。

#### 1.2.2 体外消化过程模拟

模拟体外消化过程参考 Ryu<sup>[8]</sup> 的方法并稍作改动。模拟分为两个阶段,第一阶段胃消化:称取 (0.20 g) 蓝莓提取物,加入 50 mL 质量分数为 0.9% NaCl 溶液将其溶解,用 1 mol/L 盐酸将溶液 pH 调至 2.0 (未消化样品溶液),随后加入 (0.16 g) 胃蛋白酶,将混合液置于 37 °C 充满氮气的恒温振荡培养箱中避光振荡 4 h (胃消化样品溶液)。第二阶段肠消化:向上述经胃消化得到的消化液中加入 0.5 mol/L NaHCO<sub>3</sub>,将溶液 pH 调至 7.5,然后分别加入 12 mL 2.0 g/L 胰蛋白酶液和 6 mL 12.0 g/L 胆酸盐,

同上述条件避光振荡 4 h。消化 4 h 后取出样品, 用 1.0 mol/L 盐酸将样品酸化至 pH 2.0, 在 4 °C 下以 4000 r/min 将样品离心 15 min, 取上清液, 置于 4 °C 冰箱中冷藏备用 (肠消化样品溶液)。

### 1.2.3 总酚含量测定

消化前、后蓝莓提取物中总酚含量测定参考 Koyu<sup>[9]</sup> 的方法并稍作改动。准确量取 100 mL 稀释 5 倍的样品溶液, 然后加入 1.25 mL 福林酚试剂, 将其充分搅拌混合, 25 °C 避光反应 4 h, 加入 1.0 mL 饱和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液, 避光 2 h, 在 760 nm 处测定其吸光度。以没食子酸 (GAE) 标样质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得方程为:  $y=4.8106x+0.0735$  ( $R^2=0.9997$ ), GAE 在 10~250 mg/L 内有良好的线性关系, 结果以每升样品溶液含有的 GAE 质量表示 (mg GAE/L)。

### 1.2.4 花色苷含量测定

采用 pH 示差法测定消化前后样品总花色苷含量, 参考于泽源<sup>[10]</sup> 的方法并略做改动。取 1 mL 样品溶液, 分别加入 9 mL pH 1.0 氯化钾缓冲液和 9 mL pH 4.5 乙酸钠缓冲液, 将其充分混合, 避光 1 h, 分别在 520 和 700 nm 处测定其吸光值, 总花色苷含量 ( $c$ ) 用每升样品溶液中含有矢车菊-3-葡萄糖苷 (Cyd-3-G) 的质量表示 (mg Cyd-3-G/L), 其表达式如式 (1) 所示。

$$c = \frac{[(A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}] \times 449.2 \times 1000}{26900 \times l} \times f \quad (1)$$

式中:  $c$  为总花色苷含量, mg Cyd-3-G/L;  $A_{520}$  和  $A_{700}$  分别为样品在 520 和 700 nm 处的吸光值;  $f$  为稀释倍数; 449.2 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量; 26900 为矢车菊素-3-葡萄糖苷的消光系数;  $l$  为比色皿光程, cm。

## 1.2.5 消化前后蓝莓提取物抗氧化能力测定

### 1.2.5.1 抗脂质过氧化能力

参照李颖畅<sup>[11]</sup> 的方法并略作改动。将消化前后的样品用体积分数为 60% 乙醇配制成不同质量浓度的溶液 (0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 和 1.50 g/L), 分别取 1 mL, 然后分别加入 1 mL LLS 溶液、1 mL 0.4 mol/L 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液, 充分混合。避光 37 °C 水浴 1 h, 加入 2 mL TCA-TBA-HCl (15 g TCA, 0.37 g TBA, 2.1 mL 浓盐酸) 混合液, 避光水浴 15 min, 以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液在 535 nm 处测定其吸光值。按式 (2) 计算脂质体抑制率, IC<sub>50</sub> 值为在 535 nm 处, 抑制率达到 50% 时所需的样品浓度。

$$\text{脂质体抑制率} / \% = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A_s$  为样品的吸光值;  $A_c$  为以 1 mL V<sub>c</sub> 溶液代替 1 mL 样品溶液, 操作同上, 测得空白管的吸光值。

### 1.2.5.2 DPPH 自由基清除能力

参照封燕<sup>[12]</sup> 等方法并略作改动。将消化前后的样品用体积分数 60% 的乙醇配制成不同质量浓度的溶液 (0.10、0.20、0.40、0.60、0.70 和 0.80 g/L), 从中分别取出 2 mL 置于 10 mL 具塞比色管中, 然后分别加入 2.8 mL DPPH 溶液并将其混合, 避光室温下放置 30 min, 在 517 nm 处分别测定其吸光值, 以同样的方法测定相同浓度 V<sub>c</sub> 对 DPPH 自由基清除能力, 按照式 (3) 计算 DPPH 的清除率。IC<sub>50</sub> 值为在 517 nm 处, DPPH 自由基清除率达到 50% 时所需的样品浓度。

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (3)$$

### 1.2.5.3 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力

参照李楠<sup>[13]</sup> 的方法并稍作修改。ABTS<sup>+</sup> 储备液的制备: 5 mL ABTS (7 mmol/L) 与 88 μL 过硫酸钾 (140 mmol/L) 充分混合避光 12 h。将消化前后样品溶液用体积分数为 60% 的乙醇配制成不同质量浓度的溶液 (7.50、15.00、30.00、60.00 和 120.00 mg/L), 从中分别取出 0.4 mL 置于 10 mL 具塞比色管中, 然后加入 4 mL ABTS<sup>+</sup> 工作液并将其充分混合, 避光室温下放置 10 min, 在 734 nm 处分别测定其吸光值。以相同浓度 V<sub>c</sub> 作对照, 按照式 (4) 计算 ABTS<sup>+</sup> 的清除率, IC<sub>50</sub> 值为在 734 nm 处, ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率达到 50% 时的样品浓度。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} / \% = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (4)$$

### 1.2.6 MTT 测定

将消化前后的样品参照郭孝萱<sup>[14]</sup> 的方法溶解于 DMEM 培养基中, 将其配制成质量浓度为 1.0 g/L 的溶液, 溶液过 0.22 μm 滤膜, 经除菌置于 -20 °C 冰箱中保存。HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 Hela 人宫颈癌细胞均培养于含有质量分数 10.0% 胎牛血清, 质量分数 1.0% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, 将其置于 37 °C, 含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及 90% 湿度的培养箱中常规培养。将处于对数生长期的 HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 Hela 人宫颈癌细胞按  $8 \times 10^4$  个/mL 的密度分别接种于 96 孔培养板, 贴壁培养 24 h。弃去上清, 然后用 PBS 清洗 3 次, 准确移取 100 μL 样品加入到每个孔中, 继续培养 24 h, 加入 1.0 g/L MTT 的无血清 DMEM 培养液 100 μL, 静止 4 h 后弃上清, 最后加入 DMSO, 置摇床低速振 5 min, 490 nm 处测定吸光度。细胞存活率按照式 (5) 计算。

$$\text{细胞存活率} / \% = A_s / A_c \times 100 \quad (5)$$

### 1.2.7 HPLC-ESI-MS 法对消化前后样品花色苷组分测定

未消化样品: 经纯化后的蓝莓粉末 (0.20 g), 用质量分数 1% 盐酸-甲醇溶液溶解, 将其配制成

0.1 g/L 的样品溶液, 过 0.45 μm 滤膜, 备用。消化后样品: 将收集到的消化后的上清液经 C<sub>18</sub> 固相萃取柱, 然后将 5 mL 消化后上清液缓慢压过柱子, 用去离子水去除干扰物质后, 用 5 mL 甲醇洗脱目标物, 收集洗脱液, 经 0.22 μm 滤膜, 备用。

HPLC 条件: XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流速 0.8 mL/min, 进样量 20 μL, 温度 25 °C, 检测波长 520 nm, 流动相由乙腈(A)和质量分数 0.1% 甲酸水溶液(B)构成, 梯度洗脱如下: 0~45 min: 0~45% A, 100%~55% B; 45~60 min: 45%~0 A, 55%~100% B。质谱条件: 正离子模式, 全自动二级质谱扫描, 扫描范围 *m/z* 50~1000; 干燥气压力 2.76×10<sup>5</sup> Pa; 流量 12 L/min; 温度 350 °C; 电压 3500 V。

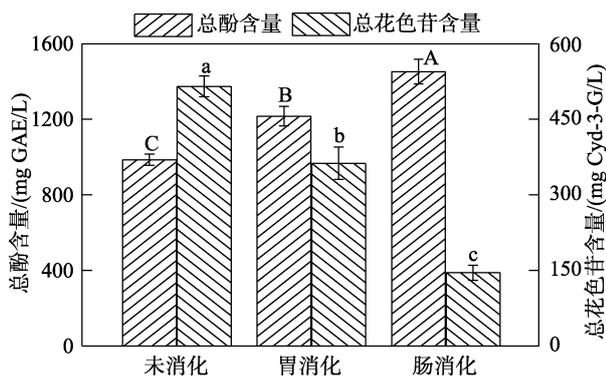
### 1.3 数据处理

每次实验重复 3 次, 结果用平均值±标准差表示, 采用 SPSS22.0 软件对每一组数据进行方差分析(ANOVA), 组间差异比较用 Duncan 检测, *P*<0.05 认为组间具有显著性差异; 采用 SAS8.0 软件分析结果的显著差异; Origin9.0 进行绘图和 Chemical Draw15.0 绘制花色苷降解过程图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 模拟体外消化对总酚和总花色苷含量的影响

体外消化前后, 样品总酚和总花色苷含量变化如图 1 所示。



不同字母表示差异显著 (*P*<0.05), 下同

图 1 体外胃肠消化对蓝莓提取物总酚和总花色苷含量的影响

Fig. 1 Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on the total polyphenols and anthocyanins contents in blueberry extracts

由图 1 可知, 在消化前蓝莓提取物总酚含量为 (986.45±30.32) mg GAE/L, 经胃消化后, 总酚含量显著增加 (*P*<0.05), 其含量达到 (1216.28±52.19) mg GAE/L, 较未消化前提高了 23.30%。在肠道消化阶

段, 总酚含量到达 (1452.19±65.23) mg GAE/L, 显著高于未消化蓝莓提取物总酚含量 (*P*<0.05), 较未消化时提高了 47.21%。结果表明, 体外消化有利于蓝莓提取物总酚含量的增加。与王月华<sup>[5]</sup>等和 Toydemir<sup>[15]</sup>等分别研究模拟体外消化对蓝莓果提取物总酚含量以及体外消化对酸樱桃总酚含量影响的结果一致。

由图 1 还可知, 在未消化时样品总花色苷含量为 (515.22±20.23) mg Cyd-3-G/L。经胃消化后样品总花色苷含量显著降低到 (402.35±22.19) mg Cyd-3-G/L (*P*<0.05)。这与 Lee<sup>[16]</sup>等在探究 pH 对果汁、饮料、天然着色剂和葡萄酒中总花色苷含量影响的研究结果相似。对比未消化样品, 发现经肠道消化后, 总花色苷含量显著降低到 (145.19±15.23) mg Cyd-3-G/L (*P*<0.05), 较未消化前降低了 71.82%。这种现象归因于花色苷在碱性条件下结构改变, 随 pH 增加黄烺盐阳离子被水亲核攻击而水合, 生成无色甲醇假碱, 然后转化为无色查尔酮<sup>[17]</sup>。

### 2.2 模拟体外消化对抗氧化能力的影响

模拟体外消化前后, 样品与 V<sub>C</sub> 对照液对脂质体抑制能力及 DPPH 和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的结果如图 2 所示。

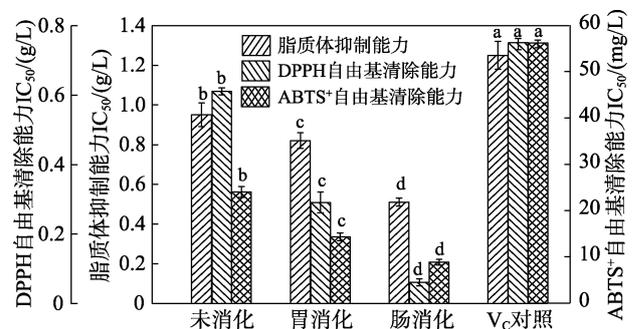


图 2 体外胃肠消化对蓝莓提取物抗氧化活性的影响

Fig. 2 Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on the antioxidant activities of blueberry extracts

由图 2 可知, 未消化、胃消化、肠消化和 V<sub>C</sub> 样品对脂质体抑制率的 IC<sub>50</sub> 分别为 (0.95±0.06)、(0.82±0.04)、(0.51±0.02) 和 (1.25±0.07) g/L, IC<sub>50</sub> 越低说明抗氧化能力越强。V<sub>C</sub> 的 IC<sub>50</sub> 显著高于其他样品 (*P*<0.05), 表明 V<sub>C</sub> 对抗脂质过氧化能力显著低于其他样品。经肠消化样品的 IC<sub>50</sub> 显著低于其他样品 (*P*<0.05), 表明经肠消化样品抗脂质过氧化能力最强。其原因是经肠消化后, 蓝莓提取物总酚含量显著增加 (*P*<0.05)。酚类能够直接与酶和非酶系统产生的氧自由基发生反应, 避免发生脂质过氧化反应而产生脂质过氧化物<sup>[18]</sup>。

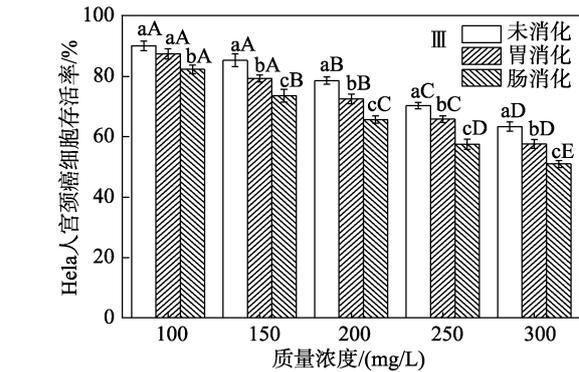
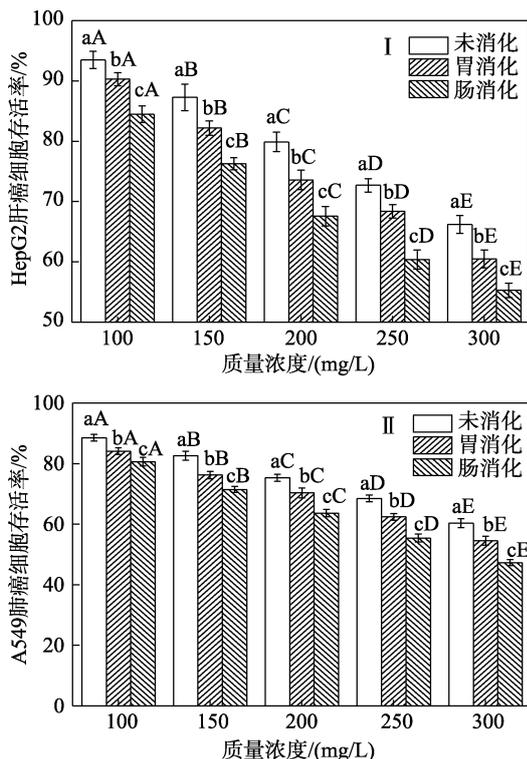
由图 2 可知, 未消化、胃消化、肠消化的样品

和对照品  $V_C$  对 DPPH 自由基清除率的  $IC_{50}$  分别为 (0.61±0.01)、(0.29±0.03)、(0.06±0.01) 和 (0.75±0.02) g/L。从  $IC_{50}$  数据可知, 经胃消化和肠消化后的样品对 DPPH 自由基的清除能力显著高于未消化样品 ( $P<0.05$ )。结果表明, 体外消化能显著提高 DPPH 自由基的清除能力 ( $P<0.05$ )。其原因可能是, 随消化过程的进行, 花色苷降解成查尔酮或其他小分子酚类物质, 使得单位体积提取物中的酚羟基数目增加, 酚羟基作为主要的还原部位, 在氧化过程中, 酚羟基作为供氢体可以与氧化过程中产生的 DPPH 自由基发生反应, 自身形成的自由基可以通过分子内氢键、半醌式自由基等形式得以稳定, 从而中断自由基链的反应<sup>[19]</sup>。因此, 经胃、肠消化后所得提取物对 DPPH 自由基的清除能力显著增加。

由图 2 可知, 未消化、胃消化、肠消化的样品和对照品  $V_C$  对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除率的  $IC_{50}$  分别为 (24.13±1.18)、(14.30±0.85)、(8.82±0.61) 和 (56.17±1.03) mg/L。从  $IC_{50}$  数据可知,  $V_C$  的  $IC_{50}$  显著高于其他样品, 表明  $V_C$  对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除能力显著低于其他样品。经胃消化和肠消化样品的  $IC_{50}$  显著低于未消化的样品 ( $P<0.05$ )。结果表明, 体外消化能显著提高提取物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基的清除能力 ( $P<0.05$ )。其主要原因是在消化过程中总酚含量显著增加。这与 Huang<sup>[20]</sup> 等和 Tagliacozzi<sup>[21]</sup> 等的研究结果相似。

### 2.3 体外消化前后样品抗癌效果比较

体外消化前后, 蓝莓提取物抗癌效果结果如图 3 所示。



不同小写、大写字母分别表示不同样品间、不同剂量差异显著 ( $P<0.05$ )

I—HepG2 肝癌细胞; II—A549 肺癌细胞; III—Hela 人宫颈癌细胞  
图 3 体外胃肠消化前后蓝莓提取物对癌细胞生长抑制作用的剂量效应

Fig. 3 Effects of blueberry extracts before and after gastrointestinal digestion *in vitro* on the growth inhibition of cancer cells

由图 3 I 可知, HepG2 肝癌细胞存活率随蓝莓提取物质量浓度的增加呈现显著降低的趋势 ( $P<0.05$ )。当提取物质量浓度为 300 mg/L 时, 未消化、胃消化和肠消化样品对 HepG2 肝癌细胞存活率较提取物质量浓度为 100 mg/L 时, 分别降低了 29.20%、33.00% 和 34.56%。在相同蓝莓提取物质量浓度下, 未消化样品对 HepG2 肝癌细胞存活率显著高于胃消化和肠消化样品 ( $P<0.05$ ), 肠消化后样品对 HepG2 肝癌细胞存活率最低。结果表明, 蓝莓提取物质量浓度越大, 对 HepG2 肝癌细胞抑制率越强。体外消化可显著提高蓝莓提取物对 HepG2 肝癌细胞抑制率。发生抑制的原因可能是在体外消化过程中, 活性成分被释放, 或者是花色苷被降解产生阿魏酸、山奈醛、槲皮素和对香豆酸等<sup>[22]</sup>。Munoz-Espada<sup>[23]</sup> 和 Lee<sup>[24]</sup> 研究均发现以上几种酚类物质均具有良好的抗癌效果。因此推测本实验中, 消化前后蓝莓花色苷提取物的抗癌能力可能与其中的酚类物质有关。

由图 3 II 可知, A549 肺癌细胞存活率随蓝莓提取物质量浓度的增加呈现显著降低的趋势 ( $P<0.05$ )。当提取物质量浓度在 100~300 mg/L 内, 相同质量浓度下, 未消化、胃消化和肠消化样品对 A549 肺癌细胞存活率均存在显著差异, 且未消化样品对 A549 肺癌细胞存活率显著高于胃消化和肠消化样品 ( $P<0.05$ ), 肠消化后样品对 A549 肺癌细胞存活率最低。研究结果表明, 体外消化可显著提高蓝莓提取物对 A549 肺癌细胞抑制率。这与 Chen<sup>[25]</sup> 等和陈建杨<sup>[26]</sup> 研究桑葚和马铃薯花色苷对抑制 A549 肺癌细胞生长的结果相似。

由图 3 III 可知, 随蓝莓提取物质量浓度的增加 HeLa 人宫颈癌细胞存活率显著降低, 表现出显著的剂量效应 ( $P<0.05$ )。当提取物质量浓度为 100 mg/L

时, 未消化、胃消化和肠消化样品对 HeLa 人宫颈癌细胞存活率分别为 (90.00±1.60)%、(87.30±1.70)%、(82.20±1.40)%, 而当提取物质量浓度为 300 mg/L 时, 未消化、胃消化和肠消化样品对 HeLa 人宫颈癌细胞存活率分别为 (63.30±1.50)%、(57.50±1.50)%、(50.90±1.20)%, 后者较前者对 HeLa 人宫颈癌细胞存活率分别降低了 28.70%、29.80%和 31.30%。胃消化和肠消化样品对 HeLa 人宫颈癌细胞存活率均低于未消化的样品。研究结果表明, 体外消化可显著提高蓝莓提取物对 HeLa 人宫颈癌细胞抑制率。这与 Seeram<sup>[27]</sup>等研究浆果花色苷对抑制宫颈癌细胞生长结果相似。

2.4 体外消化前后样品花色苷组分的比较

对体外消化前后的蓝莓提取物中的花色苷进行 HPLC-ESI-MS 分析。花色苷组分是根据分子离子峰、碎片以及对照品的保留时间来确定, 结果如图 4 和表 1 所示。

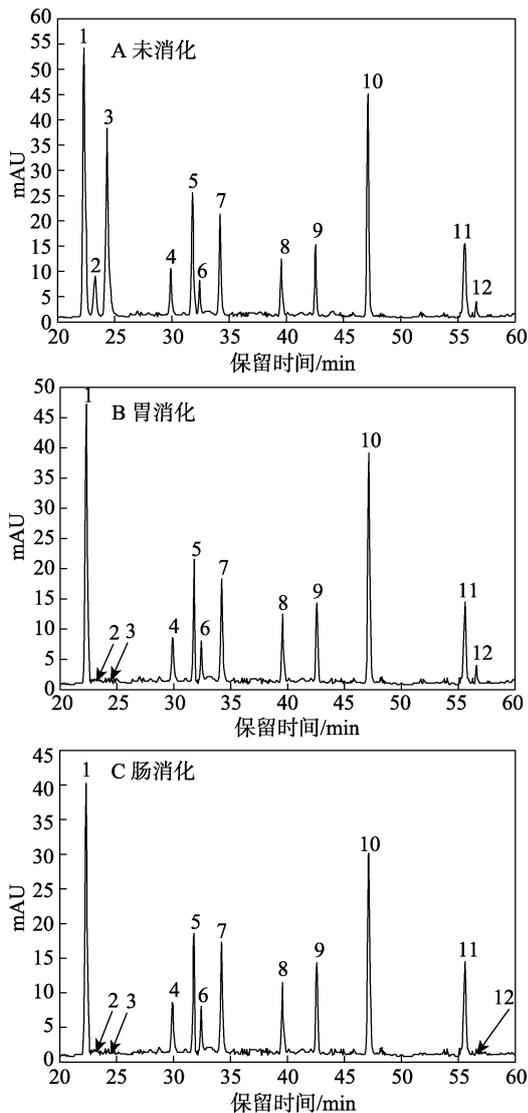


图 4 体外模拟胃肠消化前后蓝莓花色苷 HPLC 结果  
Fig. 4 HPLC chromatograms of blueberry extracts before and after *in vitro* gastrointestinal digestion

表 1 蓝莓花色苷 HPLC-ESI-MS 分离鉴定结果  
Table 1 HPLC-ESI-MS results of isolation and identification of anthocyanins from blueberry

峰号	保留时间 /min	分子离子 $M^+/(m/Z)$	分子碎片 $/(m/Z)$	丢失碎片 $/(m/Z)$	推测构成
1	22.3	465.0	303.1	162	飞燕草-3-半乳糖苷
2	23.3	465.1	303.1	162	飞燕草-3-葡萄糖苷
3	24.3	449.1	287.1	162	矢车菊-3-葡萄糖
4	29.9	435.1	303.1	132	飞燕草-3-阿拉伯糖苷
5	31.8	595.0	449.0	146	矢车菊-3-芸香糖苷
6	32.4	449.1	317.0	162	牵牛花-3-半乳糖苷
7	34.2	419.1	287.1	132	矢车菊-3-阿拉伯糖苷
8	39.6	479.1	317.1	162	牵牛花-3-葡萄糖苷
9	42.6	363.1	301.1	162	芍药-3-半乳糖苷
10	47.1	449.1	317.0	132	牵牛花-3-阿拉伯糖苷
11	55.6	463.1	301.1	162	芍药-3-葡萄糖苷
12	56.6	433.0	271.0	162	天竺葵-3-葡萄糖苷

由图 4 和表 1 可知, 通过 MS 分析, 峰 1、峰 2 和峰 4 的分子离子  $M^+$  分别为  $m/Z$  465.0、465.1 和 435.1, 碎片离子均为  $m/Z$  303.1,  $m/Z$  303.1, 为飞燕草的特征离子, 丢失碎片  $m/Z$  162 可能为葡萄糖苷和半乳糖苷,  $m/Z$  132 为阿拉伯糖苷, 结合资料分析<sup>[28]</sup>, 可以判断峰 1、峰 2 和峰 4 分别为飞燕草-3-半乳糖苷、飞燕草-3-葡萄糖苷和飞燕草-3-阿拉伯糖苷。

峰 3、峰 5 和峰 7 的分子离子  $M^+$  分别为  $m/Z$  449.1、595.0 和 419.1, 3 个峰的分子碎片分别为  $m/Z$  287.1、 $m/Z$  449.0 和  $m/Z$  287.1。  $m/Z$  287.1 为矢车菊的特征离子, 分子碎片  $m/Z$  449.0 也为矢车菊的特征碎片离子。丢失碎片为  $m/Z$  162、 $m/Z$  146 和  $m/Z$  132, 结合资料分析<sup>[2,29]</sup>, 可以判断峰 3、峰 5 和峰 7 分别为矢车菊-3-葡萄糖苷、矢车菊-3-芸香糖苷和矢车菊-3-阿拉伯糖苷。其他结果鉴定类似, 由此可以判定, 峰 6、峰 8 和峰 10 分别为牵牛花-3-半乳糖苷、牵牛花-3-葡萄糖苷和牵牛花-3-阿拉伯糖苷。峰 9 和峰 11 分别为芍药-3-半乳糖苷、芍药-3-葡萄糖苷, 峰 12 为天竺葵-3-半乳糖苷。此研究结果与 Liu<sup>[30]</sup>等的研究结果一致。

将图 4B 与 A 对比发现, 经胃消化后其中 2 和 3 号峰均消失 (蓝莓花色苷的组分飞燕草-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-葡萄糖苷消失), 其余组分保持不变, 但含量明显降低。图 4C 与 A 对比发现, 经肠消化后, 其中 2、3 和 12 号峰均消失 (飞燕草-3-葡萄糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷和天竺葵-3-半乳糖苷均消失), 其余组分保持不变, 但含量明显低于未消化样品。结果表明, 胃肠消化能显著降低花色苷组分含

量并减少花色苷组分类别。

### 2.5 体外胃肠消化花色苷降解过程推测

经胃消化后矢车菊-3-葡萄糖苷消失, 其可能的降解途径有两种: 矢车菊-3-葡萄糖苷首先进行脱糖反应生成矢车菊素, 然后水分子进攻 C 环中的 4 位碳原子产生羟基, 可能被进一步氧化生成槲皮素, 龚辉<sup>[31]</sup>等研究矢车菊-3-葡萄糖苷降解也同样检测出槲皮素的产生。另外一个途径是矢车菊-3-葡萄糖苷首先在 C 环中的 2 位碳原子发生开环, 生成查尔酮葡萄糖苷, 然后查尔酮葡萄糖苷在 C 环中的 3 位碳原子发生脱糖反应产生查尔酮, 查尔酮再进一步开裂产生 2,4,6-三羟基苯甲醛和原儿茶酸。这与 Furtado<sup>[32]</sup>等和 Seeram<sup>[27]</sup>等研究矢车菊-3-葡萄糖苷降解产物的结果一致。天竺葵素-3-葡萄糖苷降解过

程天竺葵素-3-葡萄糖苷首先进行脱糖反应生成天竺葵素, 然后水分子进攻 C 环中的 4 位碳原子产生羟基, 可能被进一步氧化生成山柰酚。龚辉<sup>[31]</sup>等研究天竺葵素-3-葡萄糖苷降解也同样检测出山柰酚的产生。通过对比底物和最终产物之间的结构, 可以推测矢车菊素-3-葡萄糖苷降解形成槲皮素与天竺葵素-3-葡萄糖苷降解成山柰酚过程的机制相同。通过质谱信息发现, 飞燕草素-3-葡萄糖苷中降解产生了阿魏酸, 其过程可能为低 pH 值和高 pH 下, 飞燕草素-3-葡萄糖苷转化成甲醇假碱, 在胃肠作用下 B 环和 C 环间发生断裂, 可能进一步生成中间产物转化为阿魏酸。Lopes<sup>[33]</sup>等在研究花色苷降解产物时阿魏酸同样被检测出。降解途径如图 5 所示。

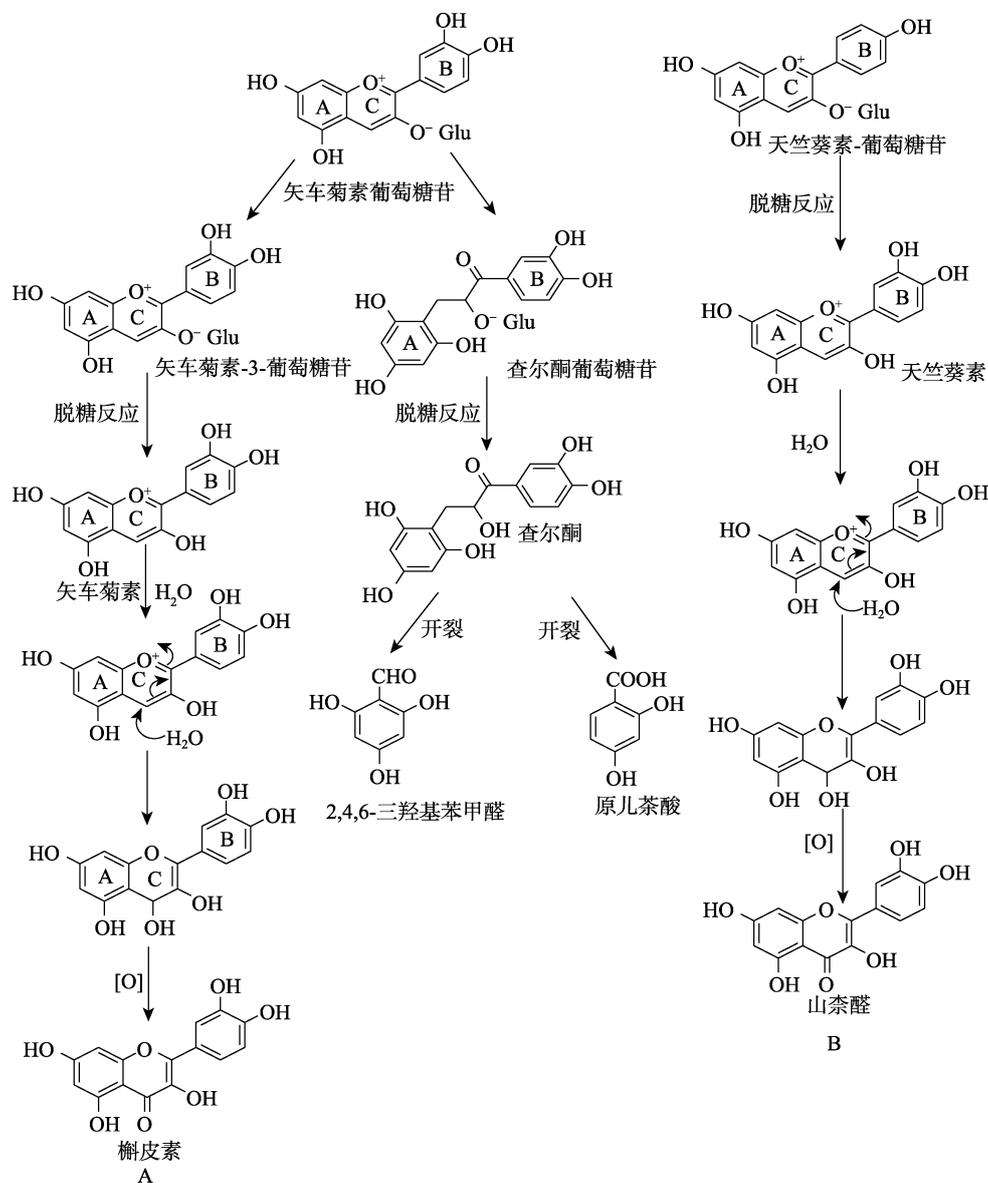


图5 降解途径(A: 矢车菊-3-葡萄糖苷; B: 天竺葵-3-葡萄糖苷)<sup>[28,30]</sup>

Fig. 5 Hypothetical schemes for the formation of degradation products (A: cyanidin 3-glucoside; B: pelargonidin 3-glucoside)<sup>[28,30]</sup>

### 3 结论

模拟体外消化可显著增加蓝莓提取物总酚含量,降低总花色苷含量。对比消化前后样品的抗氧化活性发现,胃肠消化能显著提高脂质体抑制率、DPPH 自由基清除率和 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率,且清除率均显著高于对照组 V<sub>C</sub>。对比消化前后不同质量浓度的样品对 HepG2 肝癌细胞、A549 肺癌细胞和 Hela 人宫颈癌细胞存活率发现,随质量浓度的增加,3 种癌细胞的存活率显著降低,经体外消化后 3 种癌细胞存活率明显低于未消化样品。结果表明,体外消化后样品对 3 种癌细胞的生长抑制作用显著增加,此抗癌功效可能与消化后降解产生的酚类物质有关。通过 HPLC-ESI-MS 分析发现,蓝莓提取物包含 12 种花色苷组分。经胃消化后,飞燕草-3-葡萄糖苷和矢车菊-3-葡萄糖苷消失;经肠消化后,飞燕草-3-葡萄糖苷、矢车菊-3-葡萄糖苷和天竺葵-3-半乳糖苷均消失。对胃肠消化花色苷的降解过程推测,发现矢车菊素-3-葡萄糖苷降解形成槲皮素与天竺葵素-3-葡萄糖苷降解成山柰酚过程的机制相同。花色苷更为详尽的降解过程仍需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Zhao Zidan (赵子丹), Ge Qian (葛谦), Niu Yan (牛艳), *et al.* Determination of anthocyanidins in *Lycium ruthenicum* Murr. by HPLC[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2017, 38(12): 123-129.
- [2] Pertuzatti P B, Barcia M T, Rebello L P G, *et al.* Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbit eye and high bush blueberries using HPLC-DAD-ESI-MS n, and multivariate analysis[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 26: 506-516.
- [3] Sarkis J R, Jaeschke D P, Tessaro I C, *et al.* Effects of ohmic and conventional heating on anthocyanin degradation during the processing of blueberry pulp[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51(1): 79-85.
- [4] Manach C, Williamson Gmorand C, Scalbert A, *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2005, 81: S230-S242.
- [5] Wang Yuehua (王月华), Li Bin (李斌), Meng Xianjun (孟宪军), *et al.* Effect of *in vitro* simulated digestion on anthocyanin composition and antioxidant activity of *Lonicera caerulea* berry Extracts[J]. Food Science (食品科学), 2016, 37(19): 100-105.
- [6] Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, *et al.* Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(9), 2043-2048.
- [7] Lv Chunmao (吕春茂), Bao Jing (包静), Meng Xianjun (孟宪军), *et al.* Separation of anthocyanins from wild bilberry by HPD-700 macroporous resin[J]. Food Science (食品科学), 2012, 33(10): 78-83.
- [8] Ryu D, Koh E. Stability of anthocyanins in bokbunja (*Rubus occidentalis* L.) under *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2018, 267, 157-162.
- [9] Koyu H, Kazan A, Demir S, *et al.* Optimization of microwave assisted extraction of *Morus nigra* L. fruits maximizing tyrosinase inhibitory activity with isolation of bioactive constituents[J]. Food Chemistry, 2018, 248: 183-191.
- [10] Yu Zeyuan (于泽源), Zhao Jianhui (赵剑辉), Li Xingguo (李兴国), *et al.* Isolation and purification of anthocyanin from blueberry by sequential medium pressure column chromatography on macroporous resin and Sephadex LH-20[J]. Food Science (食品科学), 2018, 39(1): 118-123.
- [11] Li Yingchang (李颖畅), Li Bingxin (李冰心), Meng Liangyu (孟良玉), *et al.* Antioxidant activity and stability of anthocyanins from St. Cloud blueberry[J]. Food Science (食品科学), 2012, 33(9): 105-109.
- [12] Feng Yan (封燕), Gong Xiaohui (贡小辉), Wei Dequn (韦德群), *et al.* Antioxidant activity and preliminary structure analysis of polysaccharides from *Cordyceps cicadas*[J]. Food Science (食品科学), 2016, 37(13): 19-24.
- [13] Li Nan (李楠), Shi Junling (师俊玲), Wang Kun (王昆). Composition and *in vitro* antioxidant activity of polyphenols extracted from crabapple[J]. Food Science (食品科学), 2014, 35(5): 53-58.
- [14] Guo Xiaoxuan (郭孝萱), Liu Jia (柳嘉), Lu Xuejiao (陆雪娇), *et al.* Comparing of ethanol extracts from three fungi fermented purple-fleshed potatoes on total phenolic content, flavonoids, anthocyanins, antioxidant activities and cytotoxicity on HepG2 cells[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2017, 17(3): 289-295.
- [15] Toydemir G, Capanoglu E, Kamiloglu S, *et al.* Changes in sour cherry (*Prunus cerasus*, L.) antioxidants during nectar processing and *in vitro*, gastrointestinal digestion[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(3): 1402-1413.
- [16] Lee J, Durst R W, Wrolstad R E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study[J]. Journal of Aoac International, 2005, 88(5): 1269-1278.
- [17] Bao J, Cai Y, Sun M, *et al.* Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(6): 2327-2332.
- [18] Sun D, Huang S, Cai S, *et al.* Digestion property and synergistic effect on biological activity of purple rice (*Oryza sativa* L.) anthocyanins subjected to a simulated gastrointestinal digestion *in vitro*[J]. Food Research International, 2015, 78: 114-123.
- [19] Yang Z D, Zhai W W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.)[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(1):169-176.
- [20] Huang H, Sun Y, Lou S, *et al.* *In vitro* digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods[J]. Food Chemistry, 2014, 146(146): 363-370.
- [21] Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, *et al.* *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 599-606.
- [22] Prasad N R, Karthikeyan S, Reddy B V. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2011, 349(1/2): 11-19.
- [23] Munoz-Espada A C, Watkins B A. Cyanidin attenuates PGE<sub>2</sub> production and cyclooxygenase-2 expression in LNCaP human prostate cancer cells[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2006, 17(9): 589-596.
- [24] Lee Y S. Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells[J]. Archives of Pharmacal Research, 2005, 28(10): 1183-1189.
- [25] Chen P N, Chu S C, Chiou H L, *et al.* Mulberry anthocyanins, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line[J]. Cancer Letters, 2006, 235(2): 248-259.
- [26] Chen Jianyang (陈建杨). Study on anti-cancer activity of anthocyanin-rich extracts from speciality potatoes *in vitro*[D]. Hangzhou: Zhejiang University (杭州: 浙江大学), 2013.
- [27] Seeram N P, Adams L S, Zhang Y, *et al.* Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2006, 54(25): 9329-9339.
- [28] Nicoué E E, Savard S, Belkacemi K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(14): 5626-5635.
- [29] Sun L Q, Ding X P, Qi J, *et al.* Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 759-765.
- [30] Liu Y, Song X, Han Y, *et al.* Identification of anthocyanin components of wild Chinese blueberries and amelioration of light-induced retinal damage in pigmented rabbit using whole berries[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(1): 356-363.
- [31] Gong Hui (龚辉), Fu Li (傅丽), Li Lanqi (李澜奇), *et al.* Effect of ultrasound treatment on anthocyanin stability and degradation kinetics[J]. Food Science (食品科学), 2018, 39(9): 67-75.
- [32] Furtado P, Figueiredo P, Neves H C D, *et al.* Photochemical and thermal degradation of anthocyaninidins[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology A Chemistry, 1993, 75(2): 113-118.
- [33] Lopes P, Richard T, Saucier C, *et al.* Anthocyanone A: A quinone methide derivative resulting from malvidin-3-O-glucoside degradation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(7): 2698-2704.