



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102086185 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 200910241691.3

(22) 申请日 2009.12.02

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号
申请人 丹东晨星越橘科技发展有限公司

(72) 发明人 董先智 孙波 陈少云 刘翠

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07D 311/62 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

C09K 15/08 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

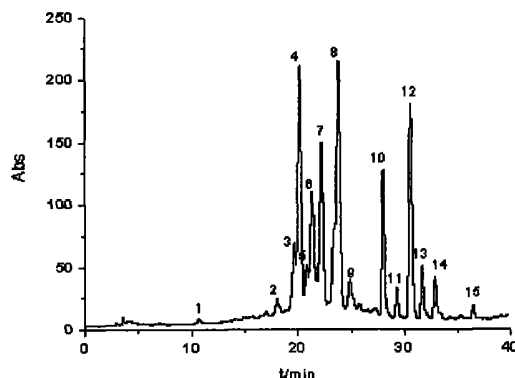
权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种低聚原花青素及其提取方法

(57) 摘要

本发明提供一种从含有 OPC 的植物原料中提取低聚原花青素的方法,所述方法的特征在于,在提纯过程中保持无氧或低氧以及低温条件,并且使用避光环境;本发明还提供由所述方法得到的原花青素,其特征为:富含原花青素低聚体,提取物置于自然条件下会发生自氧化现象;本发明还提供由上述方法得到的原花青素产品用于清除超氧阴离子自由基 O_2^- ,羟基自由基 $HO\cdot$ 的应用。



1. 一种从含有 OPC 植物原料中提取低聚原花青素的方法,所述方法特征在于在低温环境下进行,并且在提纯过程中保持无氧或低氧以及避光环境。

2. 权利要求 1 的方法,所述方法包括在低温环境下进行下列步骤:

(a) 萃取步骤:取含有 OPC 的植物原料用有机溶剂浸提,收集上清过滤、浓缩,将浓缩液加入非极性溶剂进行萃取;

(b) 提纯步骤:将步骤 (a) 中得到的浓缩萃取液通过大孔树脂进行纯化,并且保持该提纯过程中的无氧或低氧环境以及避光环境;

将纯化产物进行浓缩、冻干即得到所需产品。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述 (b) 步骤具体为:将步骤 (a) 中得到的浓缩萃取液上大孔树脂柱至大孔树脂吸附饱和,再用脱氧水冲洗所述树脂柱至冲洗液无明显颜色;接着将所述大孔树脂柱用洗脱溶剂进行冲洗,将洗脱产物进行浓缩,将浓缩液冻干后即得到成品,其中在将浓缩萃取液上柱前先将所述柱子用脱氧水处理以排除柱中氧气,形成无氧环境,并且在洗脱过程中,在洗脱溶剂中一直保持通入氮气以维持脱氧环境。

4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述含有 OPC 的植物原料是越橘果实、葡萄(籽)、银杏(叶)、黑加仑、黑豆、密蒙花(刺槐素)、高粱红素、萝卜红、红米素、玫瑰茄纤、桑椹红、可可壳、茶叶(酚),槟榔、石榴皮、或仙鹤草。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法,其中将 (b) 步骤中提纯用的柱层析通路用不透光的材料包裹或将所述步骤在暗室中操作,以形成避光环境。

6. 权利要求 2 的方法,其中所述 (a) 萃取步骤也在避光环境下进行。

7. 权利要求 1 或 2 的方法,所述提取低聚原花青素的过程在 0-25℃ 的环境温度下进行。

8. 权利要求 7 的方法,所述环境温度为 4-16℃。

9. 权利要求 2 的方法,其中所用的大孔树脂为甲基丙烯酸酯树脂。

10. 权利要求 9 的方法,其中所用的甲基丙烯酸酯树脂为 HP-2MG 树脂或 XAD 树脂。

11. 权利要求 2 的方法,其中在柱洗脱过程中保持酸性环境。

12. 权利要求 2 的方法,其中 (a) 步骤中所使用的浸提溶剂为 70% (v/v) 的丙酮。

13. 权利要求 2 的方法,其中 (a) 步骤中所述浸提溶剂与原料的比率为 3 : 1。

14. 权利要求 2 的方法,其中所述 (a) 步骤中的浸提时间是 1 小时。

15. 一种由权利要求 1-14 任一项方法得到的原花青素产品,其特征为,富含原花青素低聚体,提取物置于自然条件下会发生自氧化现象。

16. 权利要求 15 的原花青素产品,其中所述原花青素产品的主要成分均为 4 聚体以下的成分。

17. 权利要求 16 的原花青素产品,其中所述原花青素产品的花青素含量达 98% (w/w), 4 聚体以下的原花青素(含单体)含量高达 90% (w/w) 以上。

18. 权利要求 16-17 中任一项的原花青素产品用于清除超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot -}$, 羟基自由基 HO^{\cdot} 的应用。

一种低聚原花青素及其提取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种低聚原花青素及其提取的方法,特别涉及到在避光、脱氧及低温条件下,经溶剂提取和柱层析得到的高活力原花青素的方法以及由所述方法得到的低聚原花青素产品。

背景技术

[0002] 1、原花青素的功能

[0003] 原花青素是越橘、葡萄籽等果实中大量存在的一种黄烷醇类多酚类化合物。也是越橘中最重要的功能成分。其中主要呈色物质由飞燕草色素 (delphinidin ;De)、矢车菊色素 (cyanidin ;Cy)、牵牛花色素 (petunidin ;Pet)、芍药花色素 (peonidin ;Peo) 和锦葵色素 (malvidin ;Mal) 五种色素所衍生的众多花色素苷和乙酰化花色素苷所组成,花色素苷种类和含量视越橘品种而异。越橘原花青素结构上主要由黄烷醇中的单体 (+)-儿茶素 [(+)-catechin, C], (-)-表儿茶素 [(-)-epicatechin, EC] 和 (-)-表儿茶素没食子酸酯 [(-)-epicatechin-3-O-gallate, EC G] 聚合而成,其平均聚合度最高达十五聚体 [7]。通常将二至四聚体称为低聚体 (procyanidolic oligomers, OPC),将五聚体以上的称为高聚体 (procyanidolic polymers, PPC)。PC 各单元间连接主要有 C4-C6 和 C4-C8 二种方式,由于单体的构象或键合位置的不同,可有多种异构体,且各聚合体和同聚异构体之间极性相近,因此原花青素的拆分和结构表征一直比较困难 [1]。

[0004] 原花青素不仅是越橘的主要功能成分,其他多种重要的保健植物品种,如银杏(叶)、葡萄(子)、黑加仑、黑豆、密蒙花(刺槐素)、高粱红素、萝卜红、红米素、玫瑰茄红、桑椹红、可可壳、茶叶(酚),其主要功效成分也是 OPC 或其衍生物。1950 年, Masquelier 从松树皮中提取出大量的 OPC,并在法国将松树皮提取物(其中含有约 85% 的 OPC)注册为药物,其商品名为 Pycnogenol,用于提高血管的抵抗力,降低毛细血管的脆性和通透性 [2]。在随后的实际应用中,欧洲的医生们发现,OPC 对诸如花粉过敏、关节炎、胃溃疡等疾病同样也具有明显的疗效 [3]。在德国,用葡萄籽原花青素制成的专利产品已用于治疗微循环疾病,包括眼睛与外周毛细血管通透性疾病及静脉与淋巴功能不全 [4]。法国的 Bonaure 等发明了以原花青素低聚体或单体为活性物 (> 1%) 的治疗牙周病的制剂并获专利保护 [5]。法国利用葡萄籽原花青素制成了血管保护剂和抗炎剂 [6]。德国研制出用于治疗酒精中毒的原花青素制剂并获专利保护 [7]。在罗马尼亚,一种商品名为 Elldotelon 原花青素制剂已上市并用于治疗毛细血管疾病 [8]。法国、意大利也已将原花青素开发研制成化妆品,可较好地防护紫外线对皮肤的伤害作用 [9,10]。日本开发出用作药品、食品和化妆品抗氧化剂的原花青素,并获专利保护。1996 年日本厚生省批准把葡萄籽提取物列入《天然食品剂名单中》,并以商品“Gravinal”投入市场 [11]。在美国,葡萄籽原花青素作为健康食品的原料直接制成胶囊等剂型,成为天然植物药十大畅销品之一。由于葡萄籽原花青素具有极强的抗氧化性成分,因此在欧美被广泛用于各种普通食品如蛋糕、奶酪等,既可作为营养强化剂,又可作为天然防腐剂使用。越橘原花青素是各类花青素中品质较高的一种,据报道它具

有抗氧化、抗炎症、促进视紫红质合成、提高免疫力、抗癌等多种生理功能 [12,13]。

[0005] 原花青素发挥生物活性的主要机制包括以下 5 个方面：

[0006] 1) 抗氧化作用。1951 年,法国 Jacques Masquelier 首次发现了 OPC 的抗氧化性能。原花青素具有很强的抗氧化活性,原因在于原花青素分子中具有多电子的羟基,8 个酚羟基均与双键共轭,为氢原子的给予体,且芳环上的共轭双键使电子在分子中得到稳定。Maffei 等对葡萄籽提取物原花青素 (GSPE) 研究显示,高分子量成分儿茶素寡聚物在 0.1-10mmol/L 时能防止细胞膜中维生素 E 损失,显著减少膜脂质过氧化,明显推迟溶血的发生时间,能显著剂量依赖性地在羟基自由基诱导卵磷脂过氧化的自动氧化相中使维生素 E 再生,且延缓其消耗,是维生素 E 的生理再生剂。研究同时证明葡萄籽原花青素抑制卵磷脂 (PLC) 过氧化的作用明显强于对照儿茶素,IC₅₀ 分别为 2.5 μmol/L 和 50 μmol/L。抑制 PLC 诱导期和增殖期中 共轭双烯形成和增长活性 IC₅₀ 分别为 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L,明显强于阳性对照组 α-维生素 E,其 IC₅₀ (50% 自由基失活所需的浓度) 分别为 1.5 μmol/L 和 1.25 μmol/L,该原花青素还可非竞争性地抑制促进过氧离子形成的黄嘌呤氧化酶 IC₅₀ 为 2.4 μmol/L,强于对照的别嘌呤醇 [14]。Lotito 等以脂质体为模型研究原花青素的抗脂质过氧化作用,当脂质的氧化作用起始于水相时,原花青素的单体、二聚体、三聚体的抗氧化作用最大。当氧化发生在脂质区时,原花青素高分子量的多聚体抗氧能力最强,而 Cu 介导的低密度脂蛋白氧化中,不同分子量的原花青素的抗氧化能力却没有显著差异 [15]。Koga 等研究一次给予 CSPE (25m/kg) 对禁食大鼠血浆抗氧化水平影响时,发现摄 GSPE 可提高血浆对氧化应激的抵抗力 [16]。原花青素的抗氧化活性与其结构有密切相关性,不同聚合度和构型的原花青素的抗氧化能力也不同。

[0007] 2) 清除自由基。原花青素清除自由基的能力与其分子结构、聚合度以及与其与羧酸酯化的程度有关。而单从原花青素的分子结构来看 (以二聚体为例),每分子 ProcyanidinB-3 (有 8 个酚羟基) 最多可以捕获 8 个氧自由基,而分子 Ve (有 1 个酚羟基) 仅能捕获 1 个自由基,每分子 Vc (有 2 个共轭羟基) 能扑获 2 个氧自由基。所以原花青素不仅能够清除自由基,而且能帮助保存和再生 Vc, Ve, 同时它也能够通过制造弹性蛋白和胶原纤维加固毛细血管壁,从而进一步防御自由基的侵蚀。据文献报道:原花青素在体内的保留时间长达 72h。而 Vc 的保留时间仅 3h。这将大大增强其抗氧化清除自由基的能力。Bagchi 等 [17] 研究表明,原花青素具有很高的生物利用性,在抗自由基能力及保护因自由基引起的脂质过氧化和抗 DNA 损伤能力显著高于维生素 C、维生素 E 和 β 胡萝卜素。Castillo 等 [18] 研究表明:在清除自由基、抗氧化活性能力上,原花青素>芦丁>儿茶素>洋茛菪苷>抗坏血酸。Saint-Cricq De 等 [19] 用 3 种方法测定原花青素的清除自由基活性,证实其自由基清除能力依赖于其化学结构和立体结构。采用高压和低压液相色谱分离各寡聚体,即使浓度很低,仍有较高活性,能有效地清除自由基,发现这些多酚类化合物清除自由基的能力与它们的化学性质和立体化学结构密切相关。

[0008] 3) 抗致突变、抗癌作用。癌症及许多慢性退行性疾病是由多基因突变所致。而原花青素在抗突变方面有一定的作用。体外实验证明:原花青素对 Trp R2 (食品中致突变剂) 的抑制率达 94%,可抑制啤酒酵母线粒体自发性突变和细胞核由刀豆氨酸敏感到耐刀豆氨酸的自发性突变 [20]。而其抗放射线诱变能力依次为原花青素>芦丁>二甲基亚砷 (DMSO) >抗坏血酸>丙基硫氧嘧啶 (PTU) >洋茛菪苷 [18]。原花青具有抑制 TPA (一

种皮肤癌促进剂)活性,且抗癌变能力为三聚体>二聚体>单体。原花青素作用于人乳腺癌 MDA-MB468 的有丝分裂信号传导,细胞周期涌控及凋亡过程,引起肿瘤细胞生长抑制,程序性死亡或分化,在乳腺癌治疗上很有前景。Huynh 等 [21] 发现从松树皮中提取的原花青素能选择性诱导人类乳腺癌细胞凋亡,即用原花青素处理的人体乳腺癌细胞中测得的凋亡数,比未处理的同种细胞高得多;而在正常人乳腺细胞样品中,原花青素并不明显改变凋亡细胞的数量。Agarwal 等 [22] 研究了原花青素对人前列腺癌 DUI45 细胞的作用,他们发现用原花青素 (10⁻⁶/L) 处理的细胞与溶酶组比较,DUI45 细胞生长明显受到抑制,呈现出剂量和时间依赖性。并且 DUI45 能以剂量依赖性的方式诱导 G1 期的细胞静止。在其它的人体前列腺癌细胞系中,也可观察到原花青素抑制癌细胞生长及诱导癌细胞凋亡的作用。这些研究结果说明原花青素有很强的抗前列腺癌发生的作用,这可能与调节有丝分裂、细胞周期,诱导 G1 期的细胞静止、抑制细胞生长及诱导癌细胞凋亡等作用有关。综上所述,原花青素对多种癌细胞如皮肤癌细胞、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞等都具有不同程度的抑制作用。

[0009] 4) 心血管保护作用。原花青素具有保护血管的作用是因为其具有酶抑制活性,可对胶原酶、弹性酶、透明质酸酶和 β -葡萄糖醛酸甙酶等破坏胶原蛋白、弹性蛋白、透明质酸等构成血管内壁重要组成成分的酶产生强大的抑制作用,可通过捕获活性氧及调控上述酶的活性以防止它们对血管物质的破坏,也可通过抑制透明质酸酶和 β -葡萄糖醛酸甙酶的活性以保护透明质酸的完整,使之维持高聚体形成的大分子。Fitzpatrick 等研究证明:原花青素对血管具有舒张效应。Royer 等临床研究证实口服单次量 150mg 原花青素可使已曲张了的静脉提高张力。Maffei 等 [14] 研究了原花青素对缺血性心室挛缩和缺血性心律失常的预防。原花青素对微血管也有保护作用,所以它治疗眼科疾病方面也有一定疗效。Boissin 和 Corbe 等分别研究了原花青素对视觉的影响,结果表明,服原花青素者眼球在强光照射后的视觉性能比对照组有明显改善,表明原花青素可能使视网膜得到较好营养。

[0010] 5) 改善视力的功能。越橘原花青素被广泛用于改善近视、远视、视疲劳、夜盲症、白内障及视网膜炎等眼科疾病,是天然产物眼科用药中的主要品种。在第二次世界大战中,英法飞行员在夜间飞行前,常服用越橘以增强暗视能力。日本医师叶山隆一采用原花青素制品对 310 人进行临床观察,其中视疲劳 30 人,近视 100 人,远视 100 人,老花眼 50 人,黄斑变性症 30 人,每日服用原花青素(早、中、晚各服 25 毫克)连续三个月,效果明显:视疲劳、远视有效率为 100%;近视、老花眼为 70%;黄斑变性症为 99%(显效为 13%)。刘春民等将越橘花青素用于青少年近视和视觉疲劳症,取得了较好的效果。对深圳市 326 名~18 岁青少年进行一个月的双盲法试验,结果表明:1) 花青素能够有效缓解或消除因视觉疲劳而引起的视物模糊(77.2%)、眼球发胀(84.9%)、眼痛(93.1%)、畏光(50.6%)、眼干涩(87.3%)和眼球酸累感(81.9%)等症状。2) 花青素能够有效改善近视易感期、早期近视和轻度近视的远视力状况,有效率达 77.12%($P < 0.05$)。但这种改善一般介于 2~3 行(对数视力表)。这可能与患者存在视觉疲劳,服用花青素后可改善或缓解眼部疲劳有关。3) 花青素对治疗前后近视眼球屈光度的影响无显著性差异($P > 0.05$) [23]。

[0011] 原花青素改善视觉的机制包括多个方面,如提高黑暗适应性 [24]、促进视紫红质再生 [25,26]、改变瞬态折射 [27] 等。已有研究发现,花青素能够有效改善人眼黄斑恢复时间尤其是暗环境中的辨认能力,推测花青素能够增加眼底微循环的血流,加速物质代谢交换,增强对毛细血管的保护作用,进而改善黄斑恢复时间和夜间视觉。继 1968 年

Bastide P 等报道了 25% w/w 的花青素提取物对视紫红质合成的促进作用之后,2003 年 Hitoshi Matsumoto 利用青蛙视杆细胞外层 ROS 膜,检测了四种花青素对视紫红质再生的促进作用。结果表明,3-糖苷-矢车菊素能刺激再生作用,但花翠素却没有促进作用。同时在 ROS 膜中没有观察到上述花青素对 cGMP-磷酸二酯酶活力的明显影响,表明花青素在杆细胞光感受器中的主要作用是促进视紫红质的再生。最近研究表明即使在漂白后,视蛋白也保留了一定的激活光转导通路的能力,促使胞内 Ca^{2+} 浓度下降,从而减弱了视杆细胞的光敏感性。因此,对视紫红质再生的促进作用将加快视杆细胞光敏感性的恢复过程,这可以解释越橘对暗视能力的提升作用。

[0012] 2、原花青素的质量标准

[0013] 多酚含量是衡量花青素品质的重要指标,高品质的葡萄籽提取物要求其多酚含量 $\geq 95\%$ 。由于原花青素中低聚体(二、三、四聚体)的生物活性较好[28],因此 OPCs 的含量是产品质量的又一关键指标。以葡萄籽提取物为例,国际市场上优质产品的成分比例为多酚/原花青素/OPCs/单体 = 1/0.82/0.81/0.18,而目前国内最高的水平为多酚/原花青素/OPCs/单体 = 0.98/0.84/0.46/0.12。一般来说,OPCs/原花青素的比值越高,质量也越好。就检测手段而言,多酚含量的测定方法主要有 4 种,即对照品 UV 法,香草醛法、UV 经验值法和 GAE 法(Folin-Ciocalteu 法)。原花青素含量的测定方法主要有 3 种,差值法(用香草醛法测定总多酚含量,用 UV 法测定单体含量,取其差值)、Bates-Smith 法、波特法。OPCs 的测定方法主要是 HPLC 法,即以 OPCs 标准品为对照品,利用反相 HPLC 准确测定花青素样品中单体、二、三、四聚体的含量。随着多酚化合物市场的发展,成分标准化的必要性日益提高,美国已建立了花青素前体物标准化研究会和绿茶提取物中的 EGCg 标准。现在作为多酚化合物的分析方法,绿茶一般采用酒石酸铁比色法。其他多酚化合物常用福林丹尼斯法,该法是 AOAC(美国分析化学家协会)规定的方法。由于缺乏各酚化合物公定的分析方法,常用此法作为替代方法。为掌握个别成分含量,可用采用 HPLC 法。HPLC 法需要使用相当数量的标准品来测定每种成分,在操作上相对繁琐,但对于定量测定多酚化合物的分子量分布和对每种成分个别定量是必须的。

[0014] 3、越橘原花青素提取物的生产情况

[0015] 越橘是杜鹃花科越橘属植物,在不同的产地分别被称为蓝莓、蓝靛、山桑子等。越橘常年生长在冻土中,果实呈蓝色,并披一层白色果粉,果肉细腻,果味酸甜,风味独特。其果实营养成分丰富,营养价值极高,是罕见的珍稀野果,被誉为“浆果之王”[1]。

[0016] 目前国际市场上松树皮和葡萄籽原花青素产品中,总多酚的含量能达到 95% 水平,而 OPCs 的含量则相对较低。国内外越橘提取物产品中原花青素的含量一般在 5% -95% 范围,随产品的品质而有所不同。其中,使用制备型 HPLC 精制,能将原花青素单体的纯度提升到相当高的程度,但是其成本也非常昂贵,尚不能满足规模化生产的要求。国内规模化生产的越橘提取物中,花青素含量一般在 5-70% 之间,其质控指标主要为总多酚含量,尚不能对单体和低聚体的含量进行有效质控。

[0017] 根据国内外报道,越橘原花青素的提取工艺主要有:1) 水提取法:先用水将水溶性成分提取出来,再用有机溶剂进行萃取分离,最后蒸馏回收有机溶剂,得到原花青素提取物。2) 树脂吸附法:将花青素提取液用离子交换树脂除去糖类和有机酸。3) 膜分离法:利用各种类型的超滤膜和反渗透膜将色素以过滤的方式制得。4) 重结晶法。使用上述各种方

法得到的花青素含量可以达到 98% 左右,但是其中聚合度在 5 以下的低聚原花青素的含量通常不超过 50%,由于低聚原花青素在自然放置条件下不稳定,因此得到较高含量的低聚原花青素产品难度很大。

[0018] 我国越橘原花青素提取物的生产单位较多,集中在黑龙江大兴安岭、吉林、辽宁、四川、天津等区域,有的生产规模很大,并已经具备较好的设备基础。但是产品的研发相对薄弱,很多研究集中在探索色素的组成、结构特点、化学性质和生物学功能等,关于低聚体规模纯化工艺的研究成果相对较少。国内生产工艺以传统的溶剂提取法结合树脂柱吸附分离为主,有的结合了较新的超临界萃取法。其产品基本上只能控制总花青(色)素,由于概念和检测方法上的差异,不同公司宣传的产品纯度差异很大,从 25% 到 98% 的都有,但实际上都是越橘花青素粗提物,高品质的低聚原花青素产品仍然少见。

[0019] 本发明针对原花青素提取中存在的问题,提供了一种更优的从越橘中提取低聚原花青素的方法。研究表明,在黑暗、脱氧(及低温)条件下,采用甲基丙烯酸酯树脂层析能够得到高含量的小分子原花青素。该工艺为生产高品质越橘活性提取物,扩大我国越橘提取物在食品、化妆品、医药领域的发展空间提供了重要参考。对于其它多种含有 OPC 的天然植物,如葡萄(籽)、银杏(叶)、黑加仑、黑豆、密蒙花(刺槐素)、高粱红素、萝卜红、红米素、玫瑰茄红、桑椹红、可可壳、茶叶(酚),槟榔、石榴皮、仙鹤草等,通过使用此种方法均有助于提高低聚合度 OPC 的产量。

发明内容

[0020] 在本发明的一个方面中,提供一种从含有 OPC 的植物原料中提取低聚原花青素的方法,所述方法特征在于在低温环境下进行,并且在提纯过程中保持无氧或低氧以及避光环境。

[0021] 在本发明的一个方面中,提供一种从含有 OPC 的植物原料中提取低聚原花青素的方法,所述方法包括在低温环境下进行下列步骤:

[0022] (a) 萃取步骤:取含有 OPC 的植物原料用有机溶剂浸提,收集上清过滤、浓缩,将浓缩液加入非极性溶剂进行萃取;

[0023] (b) 提纯步骤:将步骤(a)中得到的浓缩萃取液通过大孔树脂进行纯化,并且保持该提纯过程中的无氧或低氧环境以及避光环境;

[0024] 将纯化产物进行浓缩、冻干即得到所需产品。

[0025] 在一个实施方案中,所述(b)步骤具体为:将步骤(a)中得到的浓缩萃取液上大孔树脂柱至大孔树脂吸附饱和,再用脱氧水冲洗所述树脂柱至冲洗液无明显颜色;接着将所述大孔树脂柱用洗脱溶剂进行冲洗,将洗脱产物进行浓缩,将浓缩液冻干后即得到成品,其中在将浓缩萃取液上柱前先将所述柱子用脱氧水处理以排除柱中氧气,形成无氧环境,并且在洗脱过程中,在洗脱溶剂中一直保持通入氮气以维持脱氧环境。

[0026] 在一个实施方案中,所述含有 OPC 的植物原料可以是但不限于越橘果实。对于其它多种含有 OPC 的天然植物,如葡萄(籽)、银杏(叶)、黑加仑、黑豆、密蒙花(刺槐素)、高粱红素、萝卜红、红米素、玫瑰茄红、桑椹红、可可壳、茶叶(酚),槟榔、石榴皮、仙鹤草等,通过使用此种方法均有助于提高低聚合度 OPC 的产量。

[0027] 在一个实施方案中,将(b)步骤中提纯用的柱层析通路用不透光的材料如锡箔纸

等包裹或将所述步骤在暗室中操作,以形成避光环境。

[0028] 在一个实施方案中,所述(a)萃取步骤也在避光环境下进行。

[0029] 在一个实施方案中,本发明提取低聚原花青素的过程在 0-25℃ 的环境温度下进行,优选在 4-16℃ 的环境温度下,更优选在 4℃ 的环境温度下进行。

[0030] 在一个实施方案中,本发明所使用的大孔树脂为甲基丙烯酸酯树脂,包括 HP-2MG 树脂或 XAD 树脂。

[0031] 在一个实施方案中,在柱洗脱过程中保持酸性环境。在一个实施方案中,使用 pH = 3-6 的洗脱溶剂对树脂柱进行洗脱。

[0032] 在一个实施方案中,本发明所使用的浸提溶剂可以为甲醇、乙醇或丙酮,尤其优选 70% (v/v) 的丙酮,并且优选预冷的丙酮。

[0033] 在一个实施方案中,本发明所使用的非极性溶剂为石油醚和氯仿。

[0034] 在一个实施方案中,本发明所使用的洗脱溶剂为乙醇。在一个实施方案中,本发明所使用的洗脱溶剂为 10% -50% -75% -95% 的乙醇。

[0035] 在一个实施方案中,本发明的上柱温度为 4-10℃,必要时可以使用室温,但不超过 30℃。

[0036] 在一个实施方案中,所述液料比(浸提溶剂与原料的比率)可以为 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 优选 1 : 1 到 3 : 1, 最优选液料比 3 : 1。

[0037] 在一个实施方案中,所述液料比为丙酮与越橘果渣的比率,优选为 70% 丙酮与越橘果渣的比率。

[0038] 在一个实施方案中,所述(a)步骤中的浸提时间是 1 小时。

[0039] 在一个实施方案中,所述脱氧水为 pH 3.0 的脱氧蒸馏水。

[0040] 在本发明另一个方面,提供由上述方法获得的原花青素产品,其特征为,富含原花青素低聚体,提取物置于自然条件下会发生自氧化现象。

[0041] 在一个实施方案中,其中所述原花青素产品的主要成分均为 4 聚体以下的成分。

[0042] 在一个实施方案中,其中所述原花青素产品的花青素含量达 98% (w/w), 4 聚体以下的原花青素(含单体)含量高达 90% (w/w) 以上。

[0043] 在本发明的另一个方面中,提供由上述方法得到的原花青素产品用于清除超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$, 羟基自由基 HO^{\cdot} 的应用。

[0044] 本发明优选实施方案详述

[0045] 特别地,本发明提供一种从越橘果实中提取低聚原花青素的方法,具体内容如下。

[0046] 以下操作过程均在 4-16℃ 的环境温度下进行,优选在 4℃ 下进行。取洗净的越橘果,用匀浆搅拌机将其打成浆,4000rpm 离心 30min,果汁留作他用,取果渣用预冷的有机溶剂(一般为 70% v/v 的丙酮)浸提 1 小时,果渣与浸提溶剂的重量比为 1 : 3,温度在室温下,4000rpm 离心 30min,收集上清过滤、真空浓缩至有机溶剂全部蒸出(回收的有机溶剂可重复利用),浓缩液加入体积比为 4 : 1 的混合非极性溶剂(石油醚和氯仿),等体积萃取 2 ~ 3 次。

[0047] 将甲基丙烯酸酯大孔树脂用湿法装柱,预处理后备用(预处理步骤见后)。在将上述浓缩萃取液上柱前,先将柱子用脱氧水(在蒸馏水中通入氮气 5-20 分钟可以除去溶液中的氧)走 1 ~ 2 个体积,以排除柱中氧气,形成无氧环境,同时将整个柱层析通路(蠕动泵,

乳胶管,玻璃钢柱等)用锡箔纸包裹,形成无光环境。将浓缩萃取液上柱至大孔树脂吸附饱和,再用酸性脱氧水洗脱至冲洗液无明显颜色(OPC 酸性条件下为红色,洗脱至无明显红色时说明 OPC 已经基本吸附在树脂柱上)。然后再分别用 10% -50% -75% -95% 的有机溶剂(乙醇)进行冲洗,将各浓度洗脱有机溶剂均调整 pH 为 3~6。在洗脱过程中,在洗脱溶剂(乙醇)中一直保持通入氮气,以维持脱氧环境。将洗脱溶剂以 0.5~4 个柱体积/小时的速度过柱。收集过柱后的液体。流出液颜色很浅时,停止洗脱溶剂过柱。记录各洗脱产物体积。将收集到的 10%、50%、75%、95% 的洗脱产物用旋转蒸发仪在 40~70℃ 进行浓缩,将得到的浓缩液冻干后得到成品。

[0048] 树脂的预处理步骤:

[0049] 本发明中使用的大孔树脂是甲基丙烯酸酯树脂,包括 XAD 树脂或 HP-2MG 树脂,树脂提前过 100-200 目筛,用 95% 乙醇浸泡过夜,再用水洗至无乳白色;用 4% 的盐酸溶液浸泡 4 小时,用水冲洗;用 4% 的碱溶液浸泡 4 小时,再用水冲洗;用 pH = 5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液洗,再用水冲洗至 pH 在 5-6 之间;装柱、压实备用。

附图说明:

[0050] 图 1:用本发明方法提取得到的越橘原花青素产品的 RP-HPLC 图。

[0051] 图 2:不同浸提溶剂对原花青素提取率的影响。

[0052] 图 3:不同丙酮浓度对原花青素提取效果的影响。

[0053] 图 4:不同环境温度对原花青素提取效果的影响。

[0054] 图 5:不同液料比对原花青素提取效果的影响。

[0055] 图 6:不同浸提时间对原花青素提取效果的影响。

[0056] 图 7:抗氧化剂种类及其浓度对超氧阴离子自由基清除率的影响。

[0057] 图 8:抗氧化剂种类及其浓度对羟基自由基清除率的影响。

[0058] 图 9:OPC 样品抗氧化活力随着时间的衰减。

[0059] 图 10:不同条件下得到的原花青素产品比较。

[0060] A 用本发明实施例 1 方法制备的越橘低聚原花青素产品。所述产品在自然光下呈现紫红色金属光泽,有结晶颗粒。

[0061] B. 未施加脱氧、避光、控温条件,用 HP-2MG 树脂制备的越橘原花青素产品,颜色紫黑。

[0062] C. 日本 KND 株式会社提纯的越橘原花青素产品(目前常见的市售产品),花青素含量 25%,呈粉末状。

具体实施方式

[0063] 实施例 1 提取越橘中的原花青素(4℃ 的环境温度)

[0064] 本实施例 1 中的操作过程均在 4℃ 的环境温度(采用空气调节器控温)下进行。

[0065] 将大兴安岭笃斯越橘压榨去汁后,称取果渣 100g,加入预冷(4℃)的 70% v/v 丙酮 300ml 提取 1h,4000rpm 离心 30min,收集上清过滤的滤液,真空浓缩,然后将浓缩液上柱(柱子填料选用 HP-2MG 树脂,4℃),其中在柱子上样前用通入氮气的脱氧水(蒸馏水)冲洗 1~2 个柱体积。将浓缩液上柱至 HP-2MG 树脂吸附饱和,上样完毕,再用 pH = 3.0 的脱氧

蒸馏水洗脱至冲洗液无明显红色 (OPC 在酸性条件下为红色, 洗脱至无明显红色时说明 OPC 已经基本吸附在树脂柱上)。然后用 pH = 3.0 的 10% -50% -75% -95% 乙醇分别进行冲洗所述层析柱, 将洗脱溶剂以 0.5 个柱体积 / 小时的速度过柱。洗脱期间在洗脱溶剂中一直通入氮气, 以保持体系的稳定性。收集过柱后的洗脱液体。当流出液颜色很浅时, 停止洗脱, 记录各洗脱产物体积。将收集到的 50% 和 75% 馏分用旋转蒸发仪 (RE-52A 旋转真空干燥仪, 上海亚荣生化仪器厂) 在 40℃ 进行真空浓缩。将浓缩液冻干得紫红色具有金属光泽的产品, 经检测, 所述产品中总多酚含量达 98%, 4 聚体以下的原花青素 (含单体) 含量高达 90%。

[0066] 在上述柱层析过程中, 通过在暗室中操作, 使样品在层析过程中处于避光状态。

[0067] 树脂的预处理步骤: 将所述 HP-2MG 树脂提前过 100-200 目筛, 用 95% 乙醇浸泡过夜, 再用水洗至无乳白色; 用 4% 的盐酸溶液浸泡 4 小时, 用水冲洗; 用 4% 的碱溶液浸泡 4 小时, 再用水冲洗; 用 pH = 5 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液洗, 再用水冲洗至 pH 在 5-6 之间; 装柱、压实备用。

[0068] A) HPLC 色谱分离结果:

[0069] HPLC 色谱条件

[0070] 采用 Alltima C₁₈ 反相色谱柱 (250mm × 4.6mm, 5 μm) 柱温: 25℃; 流动相为 2% 甲酸水溶液和 2% 甲酸甲醇溶液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后分 2 个梯度进行洗脱: 1 ~ 5min 时梯度变化为从 95 : 5 到 95 : 5, 而 5 ~ 50min 时从 95 : 5 到 0 : 100。流速: 1ml/min; 检测波长: 278nm; 进样量: 20 μl, 葡萄籽标准品进样量为 100 μl。

[0071] 质谱条件

[0072] 用注射器以 1 μl/min 的速度持续进样, 离子检测方式为单反应离子检测 (SRM); 离子极性为正离子 (positive); 离子化方式为电喷雾离子化 (ESI); 毛细管电压为 2.0kV; 离子源温度为 200℃; 扫描范围 m/z 75-2000; 碰撞能量 35.0V。

[0073] 由实施例 1 制备的越橘原花青素提取物经色谱柱分离后结果见图 1, 各峰出峰时间及相对含量见表 1, 以峰面积计算, 最主要的 8 个洗脱峰均为 4 聚体以下, 其面积积分含量达到 90%。与 95% 葡萄籽原花青素提取物相比, 出峰数量和出峰时间均存在较大差异, HPLC 分离结果表明二种产品在成分上明显不同。

[0074] 表 1 花青素洗脱峰的 HPLC 保留时间和质核比

[0075]

峰编号 No.	HPLC 保留时间 $t_R(\text{min})$	质谱核质比 m/z	聚合度
4	20.10	292.15	1
6	21.34	576.5	2
7	22.25	1046	3
8	23.82	281.4	1
10	27.99	575.5	2
12	30.55	388.2	1
13	31.68	1115	4
14	32.88	1144	4

[0076] B) 多酚含量测定

[0077] 用 10 毫升乙醇溶解 0.5000 克没食子酸, 定容 100 毫升, 分别移取 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0mL 到 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。加入福林-薛卡多试剂显色, 在 765nm 波长下测定吸光度。每个浓度做两个平行, 取平均值, 制作标准曲线, 其回归方程为: $Y = 9.4607X - 0.024$, $R^2 = 0.9993$

[0078] 取样品溶液 1mL, 按照上述标准曲线制作方法, 测定其吸光度 (每个样品做两个平行, 取平均值), 计算样品中多酚含量。

[0079] 多酚含量 = $(C \times V \times n / M) \times 100\%$ 其中 C: 没食子酸浓度 (mg/mL); V: 溶液体积 (mL); n: 稀释倍数; M: 取样量 (mg)。

[0080] 结果测得所述原花青素提取物中多酚含量为 90% (w/w)

[0081] C) 原花青素含量测定方法

[0082] 黄烷醇是花青素的基本骨架分子, 使用香草醛法可以测定样品中总黄烷醇的含量。将 1% 香草醛甲醇溶液 (称取 1.000g 香草醛溶于甲醇液中, 最后定容到 100mL) 和 8% 的盐酸甲醇液 (取 8mL 浓盐酸溶于甲醇中, 定容至 100mL) 以 1:1 的比例配制, 即可得到显色剂 (必须现用现配)。

[0083] 配制标准浓度的儿茶素甲醇溶液, 显色, 在 500nm 波长下, 测定其吸光度, 得到的标准曲线方程为, $Y = 0.0016x - 0.0197$, 其中 $R^2 = 0.9959$ 。

[0084] 准确称取由实施例 1 方法得到的冻干后原花青素粉 1.0g, 加入 10mL 甲醇, 旋涡震荡提取 20 分钟。将提取液 10000rpm 离心 15min。取上清液定容到一定体积 (根据样品原花青素含量而定), 再取 1mL 定容液, 加入 5mL 显色剂, 进行显色反应, 在 500nm 波长处测定吸光度, 计算原花青素含量。

[0085] 原花青素 (%) = $(m_1 / m) \times (V_2 / V_1) \times 10^{-6} \times 100\%$

[0086] m_1 为依据标准曲线计算出被测液中原花青素含量 (mg); m 为试样的质量 (g); V_1 为 1mL; V_2 为样品的定容体积 (mL)。

[0087] 结果测得所述原花青素提取物中原花青素含量为 98% (w/w)。

[0088] 为表明本专利发明点所带来的效果, 现展示三种不同条件下得到的产品的图片 (见图 10)。对比表明采用实施例 1 条件所得到的产品颜色为紫红, 自然光下呈现金属光泽,

有结晶颗粒（见图 10A），表明其中目标成分的纯度较高。而未进行脱氧、避光、控温（其余条件与实施例 1 所述相同）所得到的产品颜色紫黑，表明其中醌类含量增加，被氧化的程度较深（见图 10B）。日本提供的同类产品则呈现粉末状（见图 10C）。

[0089] **实施例 2 提取越橘中的原花青素**（16℃的环境温度）

[0090] 本实施例 2 中的操作过程均在 16℃的环境温度（采用空气调节器控温）下进行。其他条件及步骤和原料完全与实施例 1 一致。经检测，所得到的越橘原花青素产品与实施例 1 基本一致，原花青素含量为 95%（w/w），4 聚体以下的原花青素（含单体）含量达 90%（w/w）。

[0091] **实施例 3**

[0092] 本实施例中所用提取原花青素方法条件步骤以及原料、测定总多酚、原花青素和总黄烷醇的方法与实施例 1 一致。

[0093] 1.1 浸提溶剂的确定（除了采用的溶剂不同，其余方法条件以及原料均与实施例 1 相同）

[0094] 甲醇、乙醇、丙酮是三种常用的酚类物质提取剂。选用相同浓度的乙醇、甲醇、丙酮进行提取，确定最佳浸提溶剂，结果由图 2 可见，甲醇和丙酮对多酚的提取效果比乙醇好，且不易引入杂质。甲醇毒性较大。因此，本实验选择丙酮作为最佳的浸提溶剂。

[0095] 1.2 单因素实验

[0096] 选择浸提溶剂浓度、提取环境温度、料液比（原料如越橘果渣、葡萄籽干粉、银杏叶等）与浸提溶剂（如丙酮）的比率、浸提时间等因素考察对总酚提取率和原花青素提取率的影响，以确定相关因素及其范围（除了所述因素发生改变外，其余方法条件均与实施例 1 相同），结果如图 3-6。

[0097] 由图 3（变量为丙酮浓度由 40% -100%（v/v））可知，70%（v/v）丙酮的原花青素提取率最大。纯丙酮含有羰基，可以与原花青素分子产生氢键缔合。由于丙酮极性较小，对原花青素分子的溶解能力较低。通过加入极性较大的水可以调节丙酮溶剂的极性大小，随着丙酮溶液极性增加，原花青素提取率明显提高。当丙酮溶液浓度达到 70%时，原花青素的提取率最大。

[0098] 由图 4（变量为环境温度，分别为 0℃、4℃和 25℃）可知，4℃时（环境温度），越橘原花青素的提取率最高。因为原花青素含有多羟基，在光照和氧气存在下，其稳定性较差，易氧化、聚合，提取温度高，会使原花青素提取率下降。

[0099] 图 5 中，液料比（70% v/v 的丙酮与越橘果渣的比例）1 组 1：1，2 组 2：1，3 组 3：1，4 组 4：1，5 组 5：1，由图 5 可见，液料比为 1：1 到 3：1 时，原花青素质量分数显著增加，液料比 3：1 为原花青素质量分数最高点，继续增加液料比原花青素质量分数略有下降。

[0100] 由图 6 可见，随着浸提时间的延长，原花青素质量分数呈下降趋势，在 1h 时认为提取充分，故选择浸提时间为 1h。

[0101] 1.3 大孔吸附树脂的选择

[0102] 通过对 6 种大孔吸附树脂吸附越橘原花青素实验，由下面表 2 可见，中极性树脂对原花青素吸附率较高，极性树脂次之，非极性树脂最低；非极性和中极性树脂对原花青素解吸率较大，极性树脂较小。这可能与原花青素的结构（含有极性的羟基和非极性的苯环）

以及树脂的极性和结构有关,综合考虑吸附和解吸情况,选择甲基丙烯酸酯型树脂纯化越橘原花青素,定型为日本三菱公司生产的 HP-2MG 大孔吸附树脂。

[0103] 表 2 8 种大孔树脂对原花青素吸附量的比较

[0104]

	大孔树脂种类	极性类型	吸附量 (mg/mL)	吸附率(%)	解吸率 (%)
1	HP-2MG	中极性	8.00	91.3	96.0
2	X-5	非极性	7.09	81.6	96.4
3	AB-8	弱极性	7.50	83.5	95.6
4	D4020	非极性	6.90	72.7	93.5
5	NKA-II	极性	8.13	90.5	79.2
6	NKA-9	极性	7.90	88.6	82.0
7	LSA-10	中极性	6.80	86.7	93.0
8	LSA-30	中极性	7.80	86.9	92.0

[0105] 实施例 4

[0106] 越橘原花青素和葡萄籽原花青素对超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

[0107] 超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 在生物体内形成最早,是其它氧自由基的前身,它的毒性是机体发生氧中毒的主要原因。利用邻苯三酚-鲁米诺发光体系研究了越橘原花色素、葡萄籽原花青素对超氧阴离子的清除作用。在碱性条件下,邻苯三酚自氧化产生超氧阴离子自由基,该自由基激发发光剂鲁米诺使之处于激发态负离子,放出能量回到基态,发出波长 $\lambda = 430\text{nm}$ 的化学冷光,在一定的浓度范围内,发光强度与超氧阴离子自由基数量呈线性关系。可采用生物化学发光仪检测发光强度,进而考察体系中抗氧化剂对超氧阴离子自由基的清除能力 [16]。

[0108] 从图 7 可见,横坐标 1 代表 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$,2 代表 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$,3 代表 $80\text{ }\mu\text{g/mL}$,抗氧化剂清除超氧阴离子自由基的能力(即清除率)大小顺序为越橘原花青素>葡萄籽原花青素>Vc。而且对于同一种抗氧化剂来说,随着其浓度由 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 升高到 $80\text{ }\mu\text{g/mL}$,其清除超氧阴离子自由基的能力也相应提高。对超氧阴离子自由基的半抑制浓度 V_c 的约为 $47.08\text{ }\mu\text{g/mL}$,葡萄籽原花青素的约为 $37.55\text{ }\mu\text{g/mL}$,越橘原花青素的约为 $28.35\text{ }\mu\text{g/mL}$,半抑制浓度越小,其清除超氧阴离子自由基的能力越强。这表明越橘原花青素对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力显著强于葡萄籽原花青素和 Vc。

[0109] 越橘原花青素和葡萄籽原花青素对羟基自由基 $HO\cdot$ 的清除作用

[0110] 羟自由基是目前所知活性氧中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基。其反应性极强,寿命很短,几乎可以与所有细胞成分发生反应,对机体危害极大,但其作用半径小,仅能与邻近的分子反应。[9]

[0111] 由图 8 可见,横坐标 1 代表 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$,2 代表 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$,3 代表 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$,4 代表 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$,抗氧化剂清除羟自由基的能力大小顺序为越橘原花青素>Vc>葡萄籽原花青素。而且对于同一种抗氧化剂来说,随着浓度升高,其清除羟自由基的能力相应提高。计算

可知,对羟自由基的半抑制浓度 V_c 的约为 $12.70 \mu\text{g/mL}$,葡萄籽原花青素的约为 $14.03 \mu\text{g/mL}$,越橘原花青素的约为 $11.32 \mu\text{g/mL}$,半抑制浓度越小,其清除羟基自由基的能力越强。这表明越橘原花青素对羟自由基的清除能力强于葡萄籽原花青素和 V_c 。

[0112] OPC 样品抗氧化活力随着时间的衰减

[0113] 脱氧和黑暗条件下,所制备的 OPC 样品具有更好的抗氧化活力,在空气中静置时,抗氧化活力会逐渐衰减。与对照条件下的产品相比,其时间-活力曲线显著不同。如图 9 所示(X:小时;Y:760nm 的 OD 值):

[0114] 参考文献

[0115] [1]<http://www.blueberry.net.cn>

[0116] [2]Bagchi D, Krohn RL, Bagchi M, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed Proanthocyanidin extract invitro. Res Commun Mol Pathol Pharmacol[J]. 1997, 95, 179-189.

[0117] [3]Shantaram S. J., Charles A. K., et al. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cell. Toxicology[J]. 2000, 153(1-3), 83-90.

[0118] [4]Brasseur, T. Flavonoids as medicines (Medicaments renfermant des flavonoides). J. de Pharmacie de Belgique[J]. 1989, 44, 403-410.

[0119] [5]Bonnaure, Mallet, Martine, Andress. Monomeric and oligomeric procyanidines for the treatment of parodontal diseases. IPC A61K31/35. EP0301975. 1989.

[0120] [6]Bernhart claude (FR). Process for preparing pyrrole derivatives. Applicant: SANFI. IPC C07D207/327. KR8500431. 1985.

[0121] [7]Brekman, mudzhiri, et al. Alcoholic drinks with additive mixture to combat drunkenness. Applicant: INST Biolog Morya Dalnevostoch. IPC C12G1T1214054, 1990.

[0122] [8]Kontek Armand (RO), et al. Weakly alcoholic effervescent beverage obtaining process. Applicant: INST DE CERCETARI PENTRU VITIC (RO). RO100432. 1992.

[0123] [9]Sudheer K. M. and Santosh K. K. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV radiation induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. Free Radical Biology and Medicine[J]. Available online 26 January, 2006.

[0124] [10]Bombardelli Ezio (IT), Sabadie Michel (FR). Phospholipid complexes of extracts of vitis vinifera, their preparation process and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them. Applicant: INDENA SPA (IT), SANOFISA (FA). IPC A61K31/685. ECA61K8/55C. US4963527, 1990.

[0125] [11]Masquelier, J. Vinet atherosclerosis. Action protectrice des procyanidines. Compte rendu de Symposium Internationale L'alimentation et la consommation du vin, Verone, Italie, 1982, 147-155.

[0126] [12]Anna Rizzolo, Renato C Nani, Daniela Viscardi, et al. Modification

of glass transition temperature through carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 56(2-3): 229-231

[0127] [13] Sharma SD, Katiyar SK. Dietary grape-seed proanthocyanidin inhibition of ultraviolet B-induced immune suppression is associated with induction of IL-12[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(1): 95-102

[0128] [14] Maffei Facino R, Carini M, Aldini C et al. Sparing effect to procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E. *Planta Med*, 1998, 61(1): 343

[0129] [15] Lotito SB, Actis-Goretti L, Renart ML, et al. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Res Commun*, 2000, 276(3): 945-951

[0130] [16] Koga T., Moro K., Nakumori K, et al. Increase of antioxidant potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(5): 1892.

[0131] [17] Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 2000, 148(2-3): 187-197.

[0132] [18] Castiello J, Benavente-Garcia O, Corente J, et al. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols from grape seed: comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1738-1745.

[0133] [19] Saint-Cricq De Ganlejac N, Provoost, Vivas N. et al. Polyphenol profiles of French cider apple varieties. *J Agric Food Chem*, 1999, 7(2): 4255

[0134] [20] 国植, 徐莉. 原花青素: 具有广阔发展前景的植物药. 国外医药植物分册, 1996, 11(5): 196-204.

[0135] [21] Huynh TH, Teel RW. Selective induction of apoptosis in human mammary cancer cell [MCF7] by genistein. *Anticancer Res*. 2000, 20(4): 2417

[0136] [22] Agamali C, Sharma Y, Agarwal R. Studies of procyanidins on DU145 cells of human prostatic cancer. *Mol Carcinog*. 2000, 28(3): 129

[0137] [23] 刘春民, 周玲, 王抗美. 花青素对青少年近视视力及视觉疲劳症状的影响. 中国处方药, 2004, 8(29): 72-73.

[0138] [24] Scialdone, D. L'azione delle antocianine sul senso luminoso. *Ann. Oftalmol. Clin. Ocul.* 1966, 92, 43-51.

[0139] [25] Bastide, P.; Rouher, F.; Tronche, P. Rhodopsin et anthocyanosides. *Bull. Soc. D'ophtalmologie Fr.* 1968, 9, 801-807.

[0140] [26] Hitoshi Matsumoto, Yuko Nakamura, Shuji Tachibahaki, Satoru Kawamura, Masao Hirayama. Stimulatory Effect of Cyanidin 3-Glycosides on the Regeneration of Rhodopsin. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3560-3563.

[0141] [27] Nakaishi, H.; Matsumoto, H.; Tominaga, S.; Hirayama, M. Effects

of blackcurrant anthocyanosides intake on dark adaptation and VDTwork-induced transient refractive alternation in healthy humans. *Altern. Med. Rev.* 2000, 5, 553-562.

[0142] [28] packler L, rimbach g, virgili f. Antioxidant activity and biologic properties of a procyaniding-rich extract from pine bark, pycnogenol. *Free rad boilmol*, 1999 (27) : 704-724.

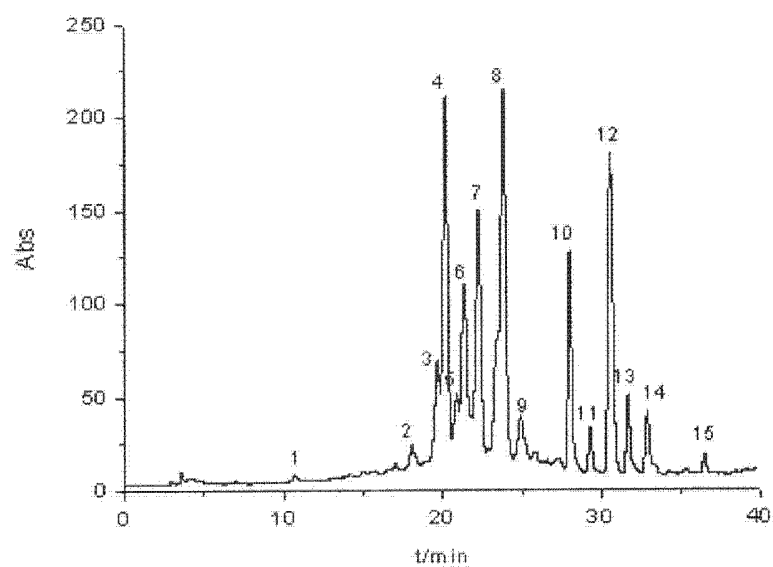


图 1

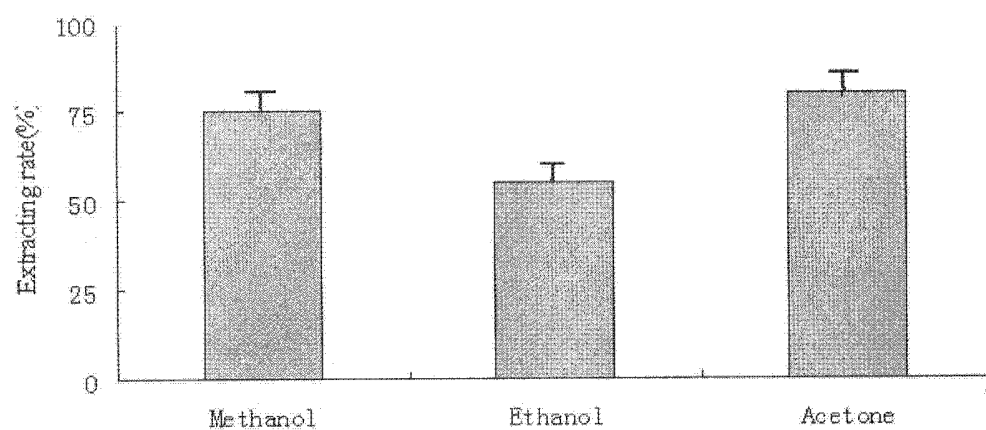


图 2

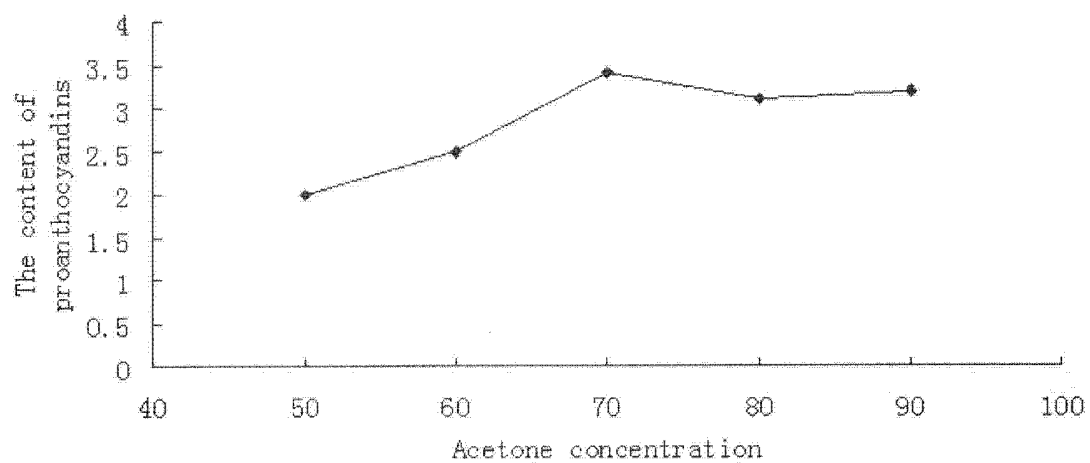


图 3

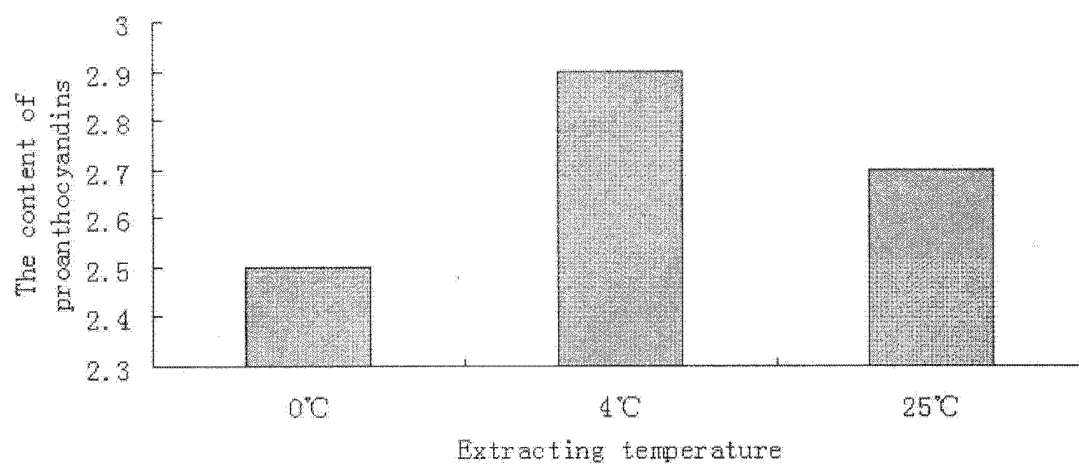


图 4

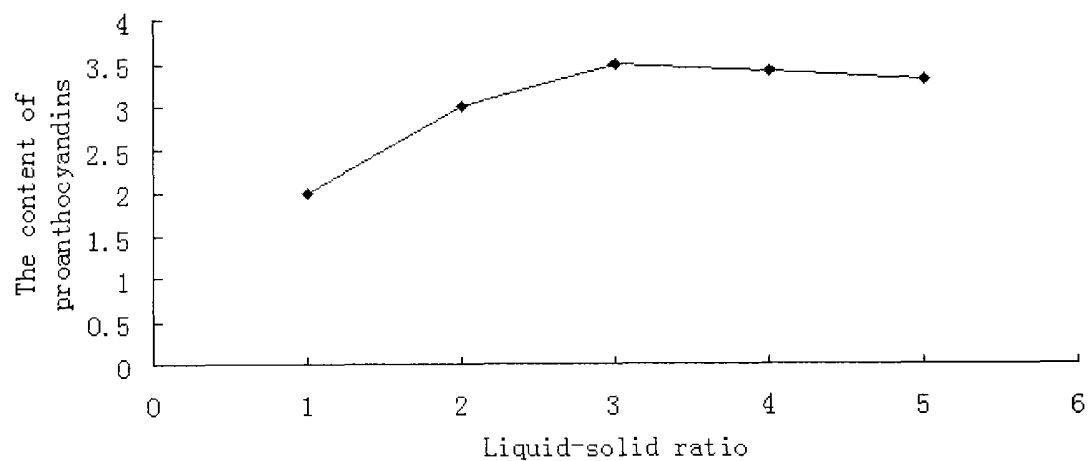


图 5

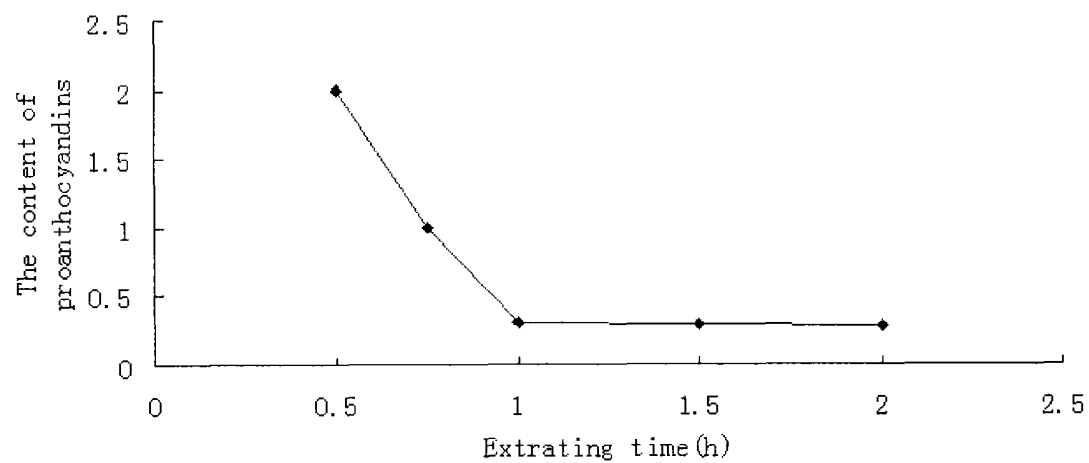


图 6

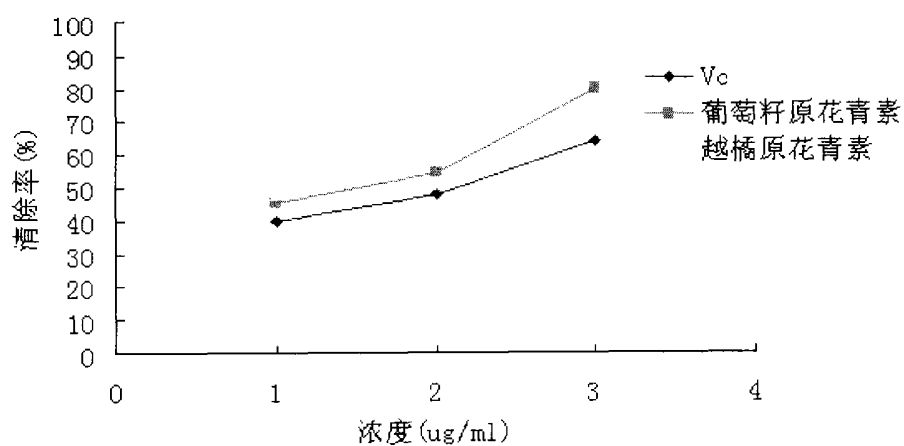


图 7

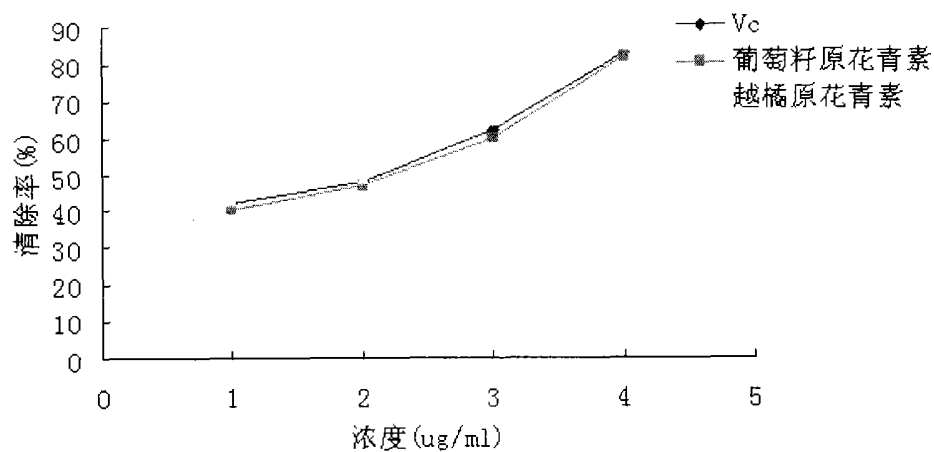


图 8

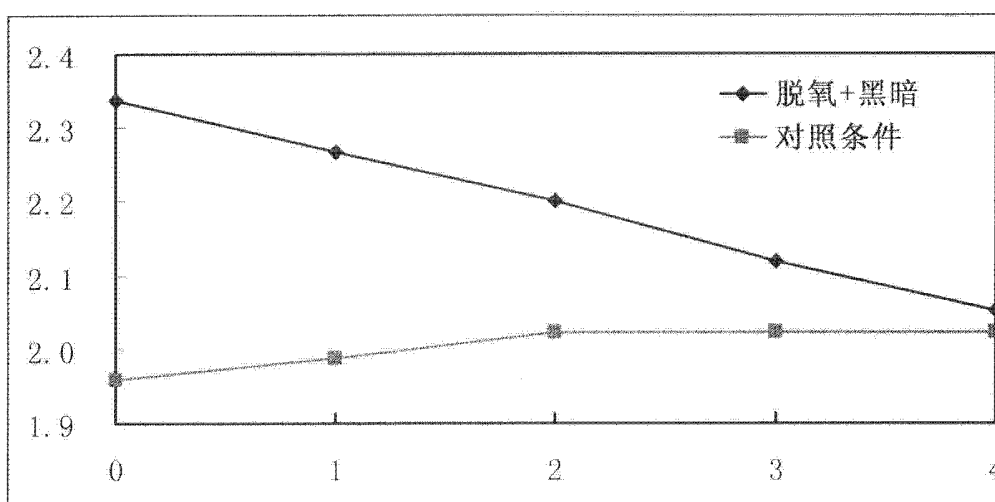


图 9

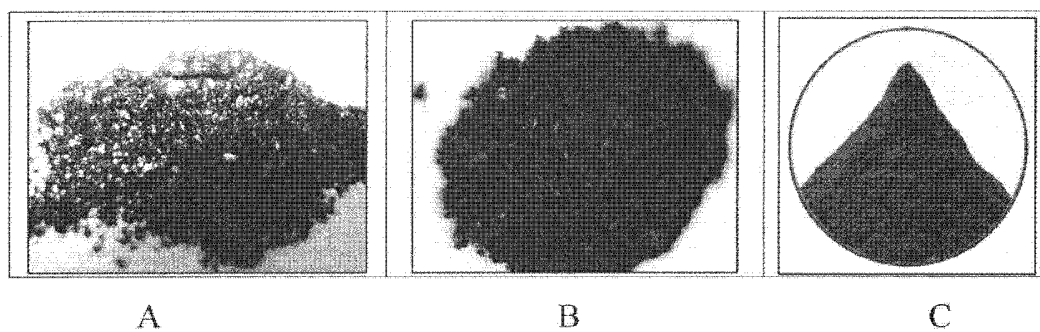


图 10