

# 蓬蘽悬钩子水杨酸提取工艺及含量变化研究

赵伟伟, 李爱民, 张正海, 张悦, 陈晓丹

(中国农业科学院 特产研究所, 吉林, 长春 130112)

**摘要:**以蓬蘽悬钩子为试材,通过正交实验,对蓬蘽悬钩子中游离态与结合态水杨酸的提取工艺条件进行了优化,并测定了蓬蘽悬钩子生长期各器官中水杨酸含量。结果表明:游离态水杨酸提取最佳工艺条件为以乙腈为提取溶剂,加入磷酸,超声 15 min;结合态水杨酸提取最佳工艺条件为以乙醚为提取溶剂,加入磷酸,超声 15 min。蓬蘽悬钩子新梢和果实中游离态与结合态水杨酸含量变化趋势相似( $r=0.868^{**}$  和  $0.986^{**}$ )。开花期前,新梢水杨酸含量较高(1.179 mg/g);开花期至果实发育期(青果期),新梢水杨酸含量呈下降趋势;果实着色期至充分成熟期,新梢水杨酸含量呈上升趋势;8 月上中旬果实采摘后,新梢水杨酸含量急剧上升(1.434 mg/g)。总之,果实水杨酸含量在整个发育期呈下降趋势,发育期(青果期)果实水杨酸含量比成熟期高。

**关键词:**蓬蘽悬钩子;水杨酸;提取工艺

**中图分类号:**S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)16-0127-04

蓬蘽悬钩子(*Rubus crataegi folius*)属蔷薇科(Rosa-ceae)悬钩子属(*Rubus*)树莓亚属(*Ideobatus*)多年生落叶

**第一作者简介:**赵伟伟(1987-),男,硕士,现主要从事药用植物资源等研究工作。E-mail:hkdzww@163.com.

**责任作者:**李爱民(1956-),男,硕士,研究员,现主要从事野生果树及药用植物的栽培和育种等工作。E-mail:zuojianglam@163.com.

**基金项目:**吉林省科技厅科技支撑资助项目(20130206070NY)。

**收稿日期:**2014-04-29

灌木型果树,果实也称为树莓(*Raspberries*),中医称为覆盆子。覆盆子(青果期果实)水杨酸含量较高,能抑制前列腺素  $H_2$  合成酶的转录,减少促炎性潜在肿瘤前列腺素的合成从而达到抗癌的作用,定期摄取含水杨酸的食物可以减少癌症等疾病的发生<sup>[1]</sup>。同时,覆盆子还可作为发汗剂,是治疗感冒、流感、咽喉炎的良药。我国东北拥有丰富的蓬蘽悬钩子资源,选取优化的提取工艺,研究悬钩子不同生育期水杨酸含量变化,对合理开发利用

[8] 金静,刘会香. 广玉兰黑斑病原菌的生物学特性研究[J]. 山东农业大学学报,2009,40(3):325-328.

[9] Luan Y S. First report of *Alternaria tenuissima* causing disease on blueberry in China[J]. Plant Dis,2007,91:464.

[10] Simmons E G. *Alternaria: An identification manual*[M]. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands,2007.

[11] Andrew M, Peever T L, Pryor B M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex[J]. Mycologia,2009,101(1):95-109.

[12] 曲文文,刘霞,杨克强,等. 山东省危害核桃的链格孢属真菌鉴定及其系统发育[J]. 植物保护学报,2012,39(2):121-128.

## Study on Identification and Biological Characteristics of Caused Agent of Leaf Perforation on Blueberry

YAN Xue-rui, ZHOU Yuan, ZHAO Rui-jie, DAI Han-ping, FU Jun-fan

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** Taking sample of leaf perforation identified in blueberry production areas as test material, based on Koch's postulates, morphological characters, rDNA-ITS and EF-1 $\alpha$  sequences blust and biological characters method, the pathogenic bacteria, classification status of pathogenic bacteria, pathogen mycelia growth and spore germination under different culture conditions were studied. The results showed that the pathogen was identified as *Alternaria alternata*, the mycelia grew best on PDA media, under 30°C, pH 5, dextrose and glycine were the best carbon and nitrogen source respectively. The spore germination condition was 30°C, pH 5, 2% glycine and 2% dextrose suspension, the mycelia died under 56°C for 10 min.

**Key words:** blueberry; leaf spot; *Alternaria alternata*; identification; ITS; biological characteristics

这一宝贵资源具有重要意义。

不同提取方法直接影响水杨酸的测定结果,对于结合态水杨酸提取方法有多种,Dini 等<sup>[2]</sup>采用乙腈:水:醋酸(25:75:5)超声 5 min,并用盐酸调节 pH 1~2 作为提取条件;徐幼平等<sup>[3]</sup>用甲醇超声 30 min,并用 DEAE 纤维素进行阴离子交换,再利用 Sep-Pak C<sub>18</sub> 短柱富集;李兆亮等<sup>[4]</sup>用乙醇、偏磷酸作为提取溶剂并用乙酸乙酯多次抽提;张玉等<sup>[5]</sup>采用乙醚和三氯乙酸作为提取溶剂并加入定量的盐酸,采用多次提取的方式,每次浸提 12 h;邓文红等<sup>[6]</sup>以五角枫叶片为试材,采用 90% 甲醇作为初提溶剂,并用盐酸水解结合态水杨酸,然后用三氯乙酸和乙酸乙酯:环己烷(1:1)再次提取;薛峰等<sup>[7]</sup>研究了采用甲醇、乙腈等有机试剂提取水杨酸,并加入乙酸、甲酸及磷酸等进行调节,初步的提取后,直接过滤即可进样,也可以采用固液提取小柱进一步的纯化,使得水杨酸更加富集,以减少样品基质的干扰。该试验在前人的研究基础上,对蓬蘽悬钩子叶片中游离态和结合态水杨酸的提取过程进行了优化,确定了水杨酸的最佳提取条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试蓬蘽悬钩子的新梢及果实于 2013 年 5~9 月,采集自中国农业科学院特产研究所左家实验基地。新梢经过自然晾干并粉碎,经 10 目筛网过滤后备用;果实采摘以后于 -18℃ 冷冻,使用时在 4℃ 条件下研磨。

水杨酸标准品,德国奥格斯堡市 Dr. Ehrenstorfer GmbH(纯度 99.5%);水(超纯水),甲醇、乙腈、磷酸、冰醋酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

仪器:FA2204B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-300E 型超声波发生装置(昆山市超声仪器有限公司);RE-2000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HWS24 型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司);Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(二极管阵列检测器)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 水杨酸提取 取 2.0 g 样品充分研磨后(果实取 5.0 g),置于 50 mL 的离心管中,加 5% 的酸 4.0 mL,加水至 20.0 mL 后再加入 30 mL 提取溶剂充分,摇匀,浸提 12 h,于下离心 5.0 min,取出上部有机相,再经溶剂重复提取 2 次,合并有机相,真空旋转蒸干后,加入 1.0 mL,50% 甲醇+乙酸缓冲液(pH 3.2)的混合液将其溶解,置于 Eppendorf 管中保存,即为游离态水杨酸样品。残渣加入 18.5% 的 HCl 至浓度为 3.2%,于 80℃ 水浴中加热 1 h,冷却后用同一有机相提取 3 次,合并有机相,蒸干后

加入 1.0 mL,50% 甲醇+50% 乙酸缓冲液(pH 3.2)的混合液溶解,置于 Eppendorf 管中保存,即为结合态水杨酸样品<sup>[2]</sup>。样品经 0.22 μm 的微孔过滤器过滤后,用超高效液相色谱(UPLC)进行检测。

1.2.2 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (1.7 μm, 2.1 mm×50 mm),柱温 35℃;流动相为 V(乙腈):V(pH 1.42 磷酸)=30:70,等梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min,进样体积 2 μL;检测波长 237 nm,光谱范围 190~400 nm。用 Waters 色谱工作站进行图谱分析,包括组分纯度测定和定量计算。

1.2.3 标准曲线的建立 精确称取水杨酸标准品,用 50% 甲醇+50% 乙酸缓冲液(pH 3.2)的混合液配制成 5 个不同质量浓度(浓度介于 0.24~2.40 μg/mL 之间)的标准溶液,按照上述色谱条件依次分析,得标准曲线方程  $Y=7.83 \times 10^6 X - 1.99 \times 10^2$  ( $R^2=0.9995$ ),根据标准曲线计算水杨酸含量。

1.2.4 游离态及结合态水杨酸提取工艺研究 试验采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计,设提取溶剂(A)、提取时间(B)和加酸(C)3 个因素,每个因素设 3 个水平,3 次重复,确定最佳的提取工艺(表 1)。

表 1 游离态及结合态水杨酸因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment of free and bound salicylic acid

水平	因素		
	A 提取溶剂	B 提取时间	C 酸
1	乙醇	浸提 12 h	三氯乙酸
2	乙醚	浸提 24 h	冰醋酸
3	乙腈	超声 15 min	磷酸

## 2 结果与分析

### 2.1 蓬蘽悬钩子游离态与结合态水杨酸提取工艺条件优化

试验结果表明,影响游离态水杨酸提取因素所起作用依次为:A>C>B,即提取溶剂的影响达到了显著水平,其次为加不同的酸,提取时间影响最小,其最佳的提取组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即用乙腈作为提取溶剂,加入磷酸,超声 15 min(表 2)。

表 2 游离态水杨酸方差分析

Table 2 Variance analysis for free salicylic acid

误差来源	SS	df	MS	F	P
A	101.29	2	50.65	19.54	<0.05
B	18.36	2	9.18	3.54	
C	31.75	2	15.87	6.12	
误差	5.18	2	2.59		

注:  $F_{0.05}(2,2)=19$ ,  $F_{0.01}(2,2)=99$ 。

经方差分析,影响结合态水杨酸提取因素所起作用

依次为: C>A>B, 提取的最佳组合为  $A_2B_3C_3$ , 即用乙醚作为提取溶剂, 加入磷酸, 超声 15 min(表 3)。由于乙醚具有特殊刺激气味, 极易挥发, 并且 3 种溶剂均未达到显著水平, 因此选取乙腈作为提取溶剂, 其它条件保持不变。

表 3 结合态水杨酸方差分析

Table 3 Variance analysis for bound salicylic acid

误差来源	SS	df	MS	F	P
A	2.27	2	1.14	0.25	
B	0.094	2	0.047	0.010	
C	19.71	2	9.86	2.15	
误差	9.17	2	4.59		

## 2.2 蓬蘽悬钩子新梢及果实不同生长时期水杨酸含量的变化

2.2.1 新梢水杨酸含量变化 蓬蘽悬钩子 5 月上旬萌芽, 5 月中旬进入新梢生长期, 5 月下旬至 6 月上旬为开花期, 7 月上旬进入着色期, 8 月上旬果实充分成熟。试验结果表明, 蓬蘽悬钩子新梢中游离态与结合态水杨酸含量变化趋势相似( $r=0.868^{**}$ ), 在新梢生长期, 新梢水杨酸含量较高约为 1.179 mg/g, 开花期至果实发育期(青果期)新梢水杨酸含量呈逐渐下降趋势, 果实着色期至充分成熟期新梢水杨酸含量呈逐渐上升趋势, 8 月上中旬, 果实采摘后新梢水杨酸含量急剧上升(图 1)。果实采后树体的营养水平直接影响第 2 年的产量, 水杨酸能够维持较高的水平将有助于增强植物的抗性, 延缓叶片的衰老, 从而积累更多的光合产物。

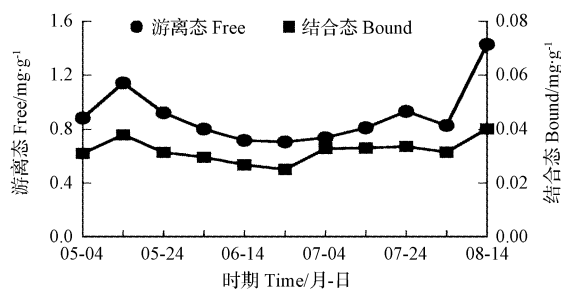


图 1 新梢中不同生长时期水杨酸含量变化

Fig. 1 Content change of salicylic acid in shoots at different growing periods

2.2.2 果实水杨酸含量变化 试验结果表明, 蓬蘽悬钩子果实中游离态与结合态水杨酸含量变化趋势相似( $r=0.986^{**}$ ), 果实水杨酸含量在整个发育期呈下降趋势, 果实发育期(青果期)水杨酸含量比成熟期高(图 2)。水杨酸也是一种乙烯生物合成的有效抑制剂, 而乙烯的大量生成是果实趋于成熟衰老的重要特征之一。果实成熟发育过程中, 水杨酸水平基本呈下降趋势。果实和

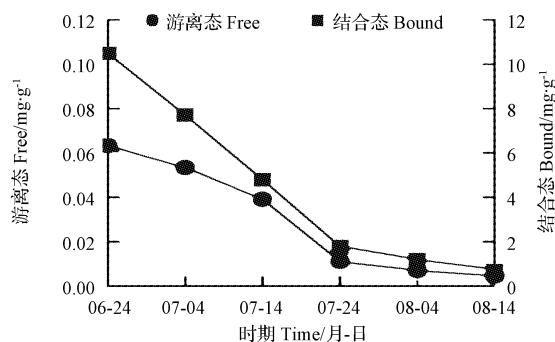


图 2 果实中不同生长时期水杨酸含量的变化

Fig. 2 Content changes of salicylic acid in fruit at different growing periods

新梢(主要是叶片)可能存在“库源”关系, 叶片是生产水杨酸的主要器官, 经由新梢转移到果实或根系。在开花前新梢可食用或药用; 青果期果实水杨酸含量高, 适宜加工药用; 成熟期果实水杨酸含量较低, 适宜鲜食或加工成果酒、果酱、果汁等。

## 2.3 方法的精密度

在上述色谱条件下, 对同一对照品溶液重复测定 5 次, 水杨酸在此测定方法下, 波峰保留时间波动小于 0.02 min, 测得水杨酸峰面积的相对标准偏差为 0.27%。

## 2.4 方法回收率

精确称取已测知水杨酸含量的果实样品 5.0 g, 准确加入水杨酸对照品溶液, 按供试品溶液的制备方法制备样品, 测得其回收率为 89.30%~98.66%(表 4、5)。

表 4 果实中游离态水杨酸的回收率

Table 4 Rate of recoveries of free salicylic acid in fruit

SA 加入量/ $\mu$ g	SA 测得量/ $\mu$ g	回收率/%	平均值/%	标准偏差/%
50	49.17	98.34		
50	49.33	98.66	97.87	1.10
50	48.31	96.62		

表 5 果实中结合态水杨酸的回收率

Table 5 Rate of recoveries of bound salicylic acid in fruit

SA 加入量/ $\mu$ g	SA 测得量/ $\mu$ g	回收率/%	平均值/%	标准偏差/%
10	8.96	89.60		
10	9.19	91.90	90.27	1.42
10	8.93	89.30		

## 3 结论与讨论

该试验结果表明, 影响游离态水杨酸提取因素所起作用依次为: A>C>B, 即提取溶剂的影响达到了显著水平, 其次为加不同的酸, 提取时间影响最小, 其最佳的提取组合为  $A_3B_3C_3$ , 即用乙腈作为提取溶剂, 加入磷酸, 超声 15 min; 影响结合态水杨酸提取因素所起作用依次

为:  $C > A > B$ , 提取的最佳组合为  $A_2B_3C_3$ , 即用乙醚作为提取溶剂, 加入磷酸, 超声 15 min(表 2)。由于乙醚具有特殊刺激气味, 极易挥发, 并且 3 种溶剂均未达到显著水平, 因此选取乙腈作为提取溶剂, 其它条件保持不变。

蓬蘽悬钩子新梢、果实中游离态与结合态水杨酸含量变化趋势相似。果实和新梢(主要是叶片)是“库源”关系, 新梢与果实水杨酸含量变化呈负相关。在新梢生长期, 新梢水杨酸含量较高, 开花期至果实发育期(青果期)新梢水杨酸含量呈下降趋势, 果实着色至充分成熟期新梢水杨酸含量呈上升趋势, 8 月中旬果实采摘后新梢水杨酸含量急剧上升。果实中的水杨酸在整个发育期呈下降趋势, 发育期(青果期)果实水杨酸含量比进入成熟期高。因此认为, 蓬蘽悬钩子在开花前可采集新梢利用; 青果期果实水杨酸含量高, 适宜加工药用; 成熟期果实水杨酸含量较低, 适宜鲜食或加工成果酒、果酱、果汁等。

目前, 对植物中水杨酸测定的方法较多, 由于分析方法和样品的原产地、加工、存储的不同造成测定结果有很大差异<sup>[8]</sup>, 而提取的过程、方法和不同取样时期等的差异也可能会导致所测的结果不同。水杨酸检测过程中, 荧光检测器比紫外检测器更具特异性, 而且能使检测结果更加准确<sup>[9]</sup>, 但是含有吸电子基的基团能使水

杨酸发生荧光猝灭, 提取过程中加入的盐酸、三氯乙酸、冰醋酸等使水杨酸的荧光减弱。可以利用超高效液相中的二极管阵列检测器, 避开其它物质的干扰, 达到准确检测的目的。

### 参考文献

- [1] Paterson J, Baxter G, Lawrence J, et al. Is there a role for dietary salicylates in health? [J]. Proceedings of the Nutrition Society, 2006, 65: 93-96.
- [2] Dini P V, Peter C H, Hollman J, et al. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using HPLC with fluorescence detection[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(7): 1762-1767.
- [3] 徐幼平, 马志超, 蔡新忠. 反相高效液相色谱测定番茄组织中的水杨酸[J]. 植物生理学通讯, 1997(1): 49-52.
- [4] 李兆亮, 原永兵, 李冬梅. 薄层层析和高效液相层析技术结合测定植物叶片水杨酸含量[J]. 植物生理学通讯, 1997(2): 130-132.
- [5] 张玉, 陈昆松, 张上隆. 猕猴桃果实中内源水杨酸的提取测定及其在采后研究中的应用[J]. 中国食品学报, 2004, 4(3): 6-9.
- [6] 邓文红, 张凤娟, 金幼菊. 反相高效液相色谱法测定植物组织中的水杨酸[J]. 北京林业大学学报, 2007(1): 151-154.
- [7] 薛峰, 林毅侃, 马跃龙, 等. 食品中水杨酸含量测定方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012(14): 429-431.
- [8] Swain A R, Dutton S P, Truswell A S, et al. Salicylates in food [J]. Nutrition Reviews, 1996, 54: 357-359.
- [9] Michael J S, Dominic P T R, Lesley A W, et al. Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 105: 273-279.

## Study on Extraction Process and Content of Salicylic Acid from *Rubus crataegi folius*

ZHAO Wei-wei, LI Ai-min, ZHANG Zheng-hai, ZHANG Yue, CHEN Xiao-dan

(Institute of Specialty, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112)

**Abstract:** Taking *Rubus crataegi folius* as material, the extraction conditions of the free and bound salicylic acid in *Rubus crataegi folius* were optimized by orthogonal test. The results showed that the best extraction conditions for free salicylic acid were: acetonitrile as the extraction solvent and adding phosphate, ultrasound 15 min; for bound salicylic acid were diethyl ether as the extraction solvent and adding phosphate, ultrasound 15 min. The free and bound salicylic acid displayed similar trends in *Rubus crataegi folius* shoots or fruits ( $r=0.868^{**}$  and  $0.986^{**}$ ); the salicylic acid content of new shoots shown a higher levels (1.179 mg/g) before flowering, and declined gradually from flowering period to fruit development period (Chinese white olive period), increased gradually from coloring to fully mature period, and a sharp rise after picking the fruit in mid-August (1.434 mg/g). In a word, the salicylic acid content of fruit decreased in the whole growth period, and showed higher level than mature period.

**Key words:** *Rubus crataegi folius*; salicylic acid; extraction process