

南果梨花色苷结构鉴定及稳定性研究

毕秋平, 刘延吉

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:利用高效液相色谱与二极管阵列检测器/电喷雾质谱联用技术分析研究了不同成熟期南果梨花色苷结构差异性,并对南果梨花色苷进行酰化处理、辅色处理等稳定性研究。结果表明:南果梨提取成分中含有 7 类花色苷,结构差异性主要表现为种子白色期的矢车菊素-3-半乳糖苷、牵牛花色素-3-葡萄糖苷和天竺葵色素-3-葡萄糖苷 3 种花色苷转变为种子褐色期的矢车菊素-3-乙酰半乳糖苷、牵牛花色素-3,5-二葡萄糖苷和天竺葵色素-3,5-二葡萄糖苷;影响南果梨花色苷稳定性顺序为:单宁>芦丁>肉桂酸>阿魏酸,最佳方案为:1.5 g/L 芦丁、0.1 g/L 单宁、1.5 g/L 肉桂酸和 0.5 g/L 阿魏酸,在 60℃、10 h 的条件下,花色苷相对含量较对照组提高 77.8%。

关键词:南果梨;花色苷;液质联用;稳定性

中图分类号:S 661.2;Q 946.83⁺6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0011-05

南果梨为秋子梨系统(*Pyrus ussuriensis* Maxim)中优质品种之一,盛产于辽宁鞍山、海城及辽阳等地,为辽宁特产优质品种。其果实色泽鲜艳,芳香味浓,深受人们的青睐。但在大田种植中发现,南果梨采收期通常为每年 9 月上旬及中旬,此时雨水天气颇多,如若遇雨水,南果梨果皮褪色严重,进而影响采收后及成熟后的外观品质。目前,对此现象研究尚无报道,课题组前期发现遇雨褪色严重时,南果梨种子颜色为白色,但当种子由白色变为褐色时,果皮不易褪色,雨水天气对颜色影响不大;并对南果梨花色苷代谢调控机理,以及利用复合诱导剂通过田间试验对此现象进行了探索^[1-2]。

该研究通过 HPLC-DAD-ESI-MS 液质联用技术,分析测定不同成熟期南果梨花色苷所含组分结构差异性,并利用酰化作用^[3],辅色及其它作用来提高花色苷稳定性,以期开发南果梨花色苷稳定复合剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

南果梨采于辽宁省鞍山市千山区南果梨国家示范园。

1.2 试验方法

第一作者简介:毕秋平(1984-),男,河北唐山人,在读硕士,研究方向为植物次生代谢。E-mail:150275062562@163.com。

责任作者:刘延吉(1959-),男,博士,副教授,研究方向为植物次生代谢与调控。E-mail:yanjiliu@yahoo.com.cn。

基金项目:辽宁省科技厅企业产学研联盟资助项目(2008204005)。

收稿日期:2011-05-09

1.2.1 南果梨花色苷提取及纯化 采集 2 个不同成熟期南果梨果实,并各取果皮 10 g,经充分研磨后,加入 250 mL 1% 盐酸乙醇溶液,在 400 W 超声波处理 30 min 后,放于 50℃ 恒温水浴锅 4 h,最后于 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液为花色苷粗提液,用 $\Delta A_{530} = A(pH_{1.0}) - A(pH_{5.0})$ ^[4]表示花色苷相对含量。粗提液减压浓缩后,经预处理的 D101 大孔吸附树脂纯化,用重蒸水洗脱去除糖、有机酸及蛋白质等杂质,后用 80% 乙醇洗脱,收集花色苷洗脱液,真空浓缩备用。

1.2.2 南果梨花色苷组分结构分析 色谱柱:CAPCELL PAK C18 MG II (2.0 mm ID × 150 mm, 5 μm);流动相:A 液为甲醇,B 液为 0.2% 甲酸水;线性梯度洗脱:0→15 min, B 液 95%→80%;15→30 min, B 液 80%→60%;进样量:5 μL;柱温:35℃;流速:0.2 mL/min;DAD 检测器,检测波长 530 nm;质谱条件:正离子扫描(ESI⁺, m/z 50~1 000);击碎电压(CE):1.0 V;气帘气:Nebalizer 30 psi;Drygas 15 L/min;Drytemp 350℃。

1.2.3 提高南果梨花色苷稳定性条件优化 单因素试验:取 5 份 10 mL 经纯化后的花色苷提取液,分别加入 3 mL 的浓度分别为 0、0.1、0.5、1、1.5 g/L 的芦丁溶液(单宁、肉桂酸、阿魏酸、蔗糖处理同此),在黑暗处平衡放置 30 min 后,放于 60℃ 恒温水浴锅中,每隔 2 h 测量 1 次 $\Delta A_{530} = A(pH_{1.0}) - A(pH_{5.0})$,测定 5 次,分析不同稳定剂对花色苷相对含量的影响。正交实验:依据单因素试验结果,以芦丁、单宁、肉桂酸及阿魏酸为 4 个因素,并分别选取 3 个水平做 $L_9(3^4)$ 正交实验,以确定提高花色苷稳定性的最佳复合条件。

2 结果与分析

2.1 不同成熟期南果梨花色苷组分结构差异性分析

图 1、2 为不同成熟期的南果梨花色苷提取物以 530 nm 为检测波长时的高效液相色谱图。分别检测到 7 个主要的色谱峰。结果表明,南果梨花色苷中含有 7 种类别的花色苷,成熟期的不同,未引起花色苷种类数量的变化。对不同成熟期 7 色谱峰进行质谱分析比较。

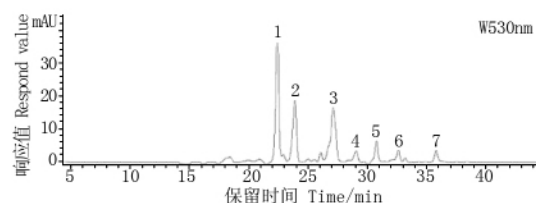


图 1 种子白色期花色苷高效液相色谱图

Fig. 1 HPLD spectrum of anthocyanin in white seed period

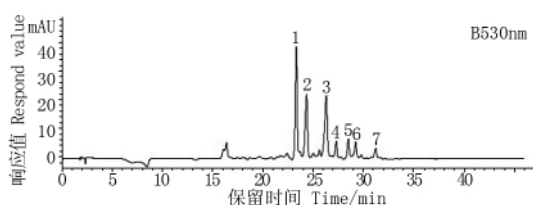


图 2 种子褐色期花色苷高效液相色谱图

Fig. 2 HPLD spectrum of anthocyanin in brown seed period

由图 3 可知,种子白色期峰 2(W2) $[M+H]^+$ m/z 为 449.2(449),碎片离子 m/z 287 表明 W2 为矢车菊色素,由 m/z 449.2 失去 1 个质量数为 162 的中性碎片所得。162 为脱水六碳糖分子量,考虑到分子极性大小,可初步确定为半乳糖,另据报道称^[5],糖基通常结合于花色苷的 3-羟基位上,由此可推断 W2 为矢车菊色素-3-半乳糖苷;种子褐色期峰 2(B2) $[M+H]^+$ m/z 为 491.1,碎片离子 m/z 287 表明 B2 为矢车菊色素,由 m/z 491.1 失去 1 个质量数为 204 的中性碎片所得,由此可推断 B2 为矢车菊色素-3-乙酰半乳糖苷。可得出酰化作用可以提供花色苷的稳定性,与相关研究报道^[6]相符。

由图 4 可知,种子白色期峰 4(W4) $[M+H]^+$ m/z 为 478.9(479),碎片离子 m/z 317 表明 W4 为牵牛花色素,由 m/z 479 失去 1 个质量数为 162 的中性碎片所得,由此推断, W4 为牵牛花色素-3-葡萄糖苷;种子褐色期峰 4(B4) $[M+H]^+$ m/z 为 641.1,碎片离子 m/z 为 479、317.2。 m/z 479 为 $[M+H]^+$ m/z 641.1 失去 1 个葡萄糖基(质量数 162)的中性碎片而得, m/z 479 与 m/z 317.2(317)之间也相差质量数为 162 的中性碎片,这表明 B4 峰为含有 2 个葡萄糖基的花色苷,由此可推断, B4 峰为牵牛花色素-3,5-二葡萄糖,与游离羟

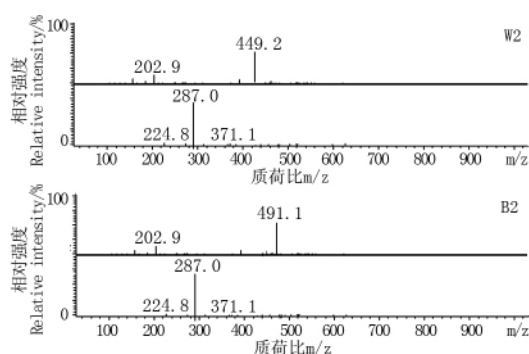


图 3 不同成熟期南果梨花色苷峰 2 质谱图

Fig. 3 $[MS]/[MS2]$ spectra of No. 2 peak in different periods

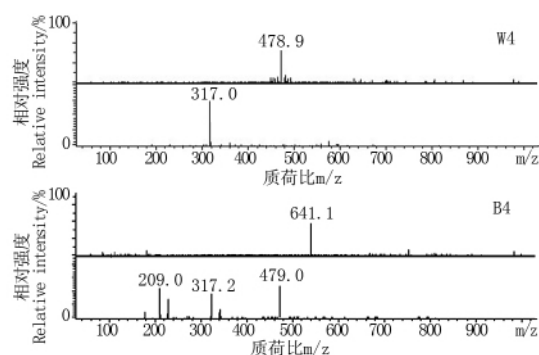


图 4 不同成熟期南果梨花色苷峰 4 质谱图

Fig. 4 $[MS]/[MS2]$ spectra of No. 4 peak in different periods

基的糖苷化增加花色苷的稳定性试验^[7]报道相符。

由图 5 可知,种子白色期峰 7(W7) $[M+H]^+$ m/z 为 433.2(433),碎片离子 m/z 271.2(271)表明 W7 为天竺葵色素,由 m/z 433 失去 1 个质量数为 162 的中性碎片所得,由此推断, W7 为天竺葵-3-葡萄糖苷;种子褐色期峰 7(B7) $[M+H]^+$ m/z 为 595.2(595),碎片离子 m/z 为 433.1,271.2,同 B4 峰分析推断出 B7 峰为天竺葵-3,5-二葡萄糖苷。

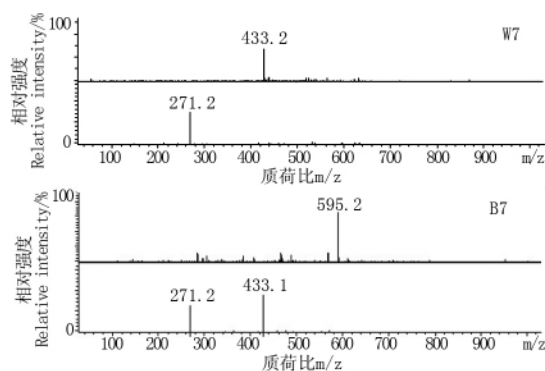


图 5 不同成熟期南果梨花色苷峰 7 质谱图

Fig. 5 $[MS]/[MS2]$ spectra of No. 7 peak in different periods

由表 1、2 可知,不同成熟期花色苷组分种类数量保持不变,但相对应的峰 2、峰 4 及峰 7 分别由于酰基化以及羟基化作用,组分结构发生了一定的变化,进而提高了花色苷的稳定性,以此为依据,进行稳定性试验研究。

表 1 种子白色期各峰质谱分析

Table 1 Mass spectra analysis of each peak in white seed period

色谱峰 Peak	质荷比 [M+H] ⁺ m/z	碎片离子 质荷比 m/z	花色苷类型 Anthocyanidins type
1	462.9	301.2	芍药色素-3-半乳糖苷
2*	449.2	287	矢车菊色素-3-半乳糖苷
3	449.2	287	矢车菊色素-3-葡萄糖苷
4*	478.9	317	牵牛花色素-3-葡萄糖苷
5	463.6	301.3	芍药色素-3-葡萄糖苷
6	463	331.1	锦葵花色色素-阿拉伯糖苷
7*	433.2	271.2	天竺葵色素-3-葡萄糖苷

注: * 为与种子褐色期花色苷组分不同。

Note: * means which element is different from anthocyanin in brown seed period.

表 2 种子褐色期各峰质谱分析

Table 2 Mass spectra analysis of each peak in brown seed period

色谱峰 Peak	质荷比 [M+H] ⁺ m/z	碎片离子 质荷比 m/z	花色苷类型 Anthocyanidins type
1	462.9	301.2	芍药色素-3-半乳糖苷
2*	491.1	287	矢车菊色素-3-乙酰半乳糖苷
3	449.1	287.1	矢车菊色素-3-葡萄糖苷
4*	641.1	479/317.2	牵牛花色素-3,5-二葡萄糖苷
5	463.6	301.3	芍药色素-3-葡萄糖苷
6	463.5	331.3	锦葵花色色素-阿拉伯糖苷
7*	595.2	433.1/271.3	天竺葵色素-3,5-二葡萄糖苷

注: * 为与种子白色期花色苷组分不同。

Note: * means which element is different from anthocyanin in white seed period.

2.2 提高南果梨花色苷稳定性单因素试验

2.2.1 不同浓度芦丁对南果梨花色苷稳定性的影响 由图 6 可知,随热处理时间的延长,花色苷的相对含量均有所下降,表明在 60℃ 温度下,花色苷发生降解,热稳定性较差。对照组花色苷相对含量下降比例为 36.9%,试验组下降幅度均显著小于对照组,表明芦丁作为辅色剂,能降低花色苷的热降解率,提高花色苷的稳定性,特别是 1.0 g/L 浓度芦丁溶液,效果最显著。

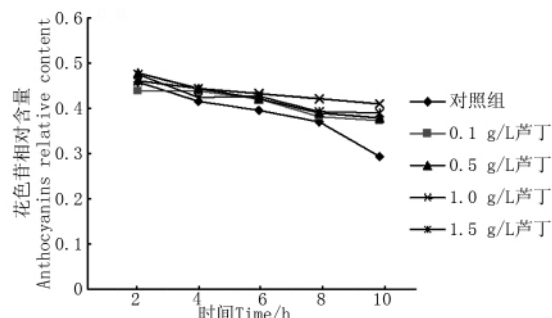


图 6 不同浓度芦丁对南果梨花色苷稳定性的影响

Fig. 6 Effect of different rutin density on stability of anthocyanin

2.2.2 不同浓度单宁对南果梨花色苷稳定性的影响 由图 7 可知,单宁作为另一种辅色剂,与芦丁一样提高花色苷的稳定性,与相关报道^[8],单宁可能通过保护花色苷第 2 位碳原子不被水攻击而提高花色苷稳定性相符。试验组中 0.5 g/L 单宁效果最显著。

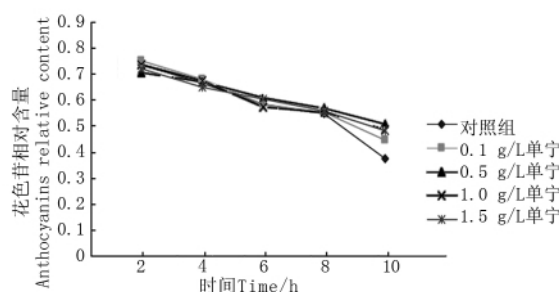


图 7 不同浓度单宁对南果梨花色苷稳定性的影响

Fig. 7 Effect of different tannin density on stability of anthocyanin

2.2.3 不同浓度肉桂酸对南果梨花色苷稳定性的影响 由图 8 可知,肉桂酸能降低花色苷的热降解率,使半衰期高于对照组,进而提高花色苷的稳定性,对照组经 10 h, 60℃ 热处理后,花色苷相对含量下降比例为 45.0%,试验组中,添加 1.0 g/L 浓度肉桂酸热处理 10 h,花色苷相对含量仅下降 23.9%,二者差异显著。

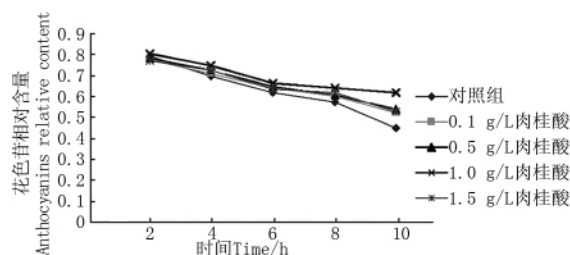


图 8 不同浓度肉桂酸对南果梨花色苷稳定性的影响

Fig. 8 Effect of different cinnamic acid density on stability of anthocyanin

2.2.4 不同浓度阿魏酸对南果梨花色苷稳定性的影响 由图 9 可知,随热处理时间的延长,花色苷相对含量均有所下降,但下降幅度,试验组处理较对照组试验差异达显著水平,0.5 g/L 阿魏酸处理效果最佳,由此证明阿魏酸对花色苷稳定性提高有一定影响。

2.2.5 不同浓度蔗糖对南果梨花色苷稳定性的影响 糖是植物体中影响花色苷合成和积累的重要因子之一^[9],蔗糖作为一种可溶性糖,参与了花色苷生物合成的调节。由图 10 可知,蔗糖能降低花色苷热降解率,进而提高了花色苷的稳定性。试验组处理与对照组试验差异均达显著水平,其中 1.0 g/L 蔗糖处理最显著。

2.3 提高南果梨花色苷稳定性的条件优化

依据单因素试验结果确定比较好的因素及水平,选择 L₉(3⁴) 进行正交实验,因素水平表见表 3,正交实验结果及极差分析见表 4。

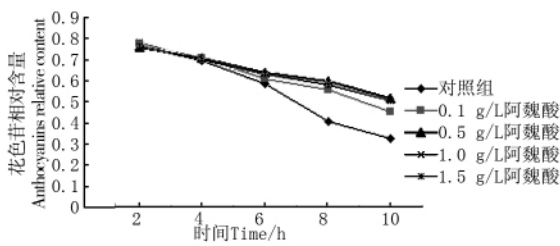


图9 不同浓度阿魏酸对南果梨花色苷稳定性的影响
Fig. 9 Effect of different ferulic acid density on stability of anthocyanin

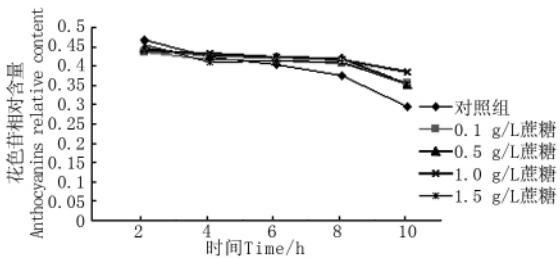


图10 不同浓度蔗糖对南果梨花色苷稳定性的影响
Fig. 10 Effect of different sucrose density on stability of anthocyanin

由表4可知,按照极差R的大小,影响花色苷稳定性因素的主次顺序为B>A>C>D,及单宁浓度>芦丁浓度>肉桂酸浓度>阿魏酸浓度;根据 ΔA_{530} 可得,4个因素最佳组合条件为A3B1C3D2,稳定复合剂最佳工艺配比为1.5 g/L 芦丁、0.1 g/L 单宁、1.5 g/L 肉桂酸和0.5 g/L 阿魏酸,在60℃、10 h的条件下,花色苷相对含量较对照组提高达77.8%。

表3 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平

Table 3 $L_9(3^4)$ levels and factors orthogonal experiment

水平	A	B	C	D
Level	芦丁 Rutin/g · L ⁻¹	单宁 Tannin/g · L ⁻¹	肉桂酸 Cinnamic acid/g · L ⁻¹	阿魏酸 Ferulic acid/g · L ⁻¹
1	0.5	0.1	0.5	0.1
2	1.0	0.5	1.0	0.5
3	1.5	1.0	1.5	1.0

表4 正交实验结果及极差分析

Table 4 Results of orthogonal experiment for the prescription and analysis of range

试验号	A	B	C	D	花色苷相对含量
No.	芦丁 Rutin	单宁 Tannin	肉桂酸 Cinnamic acid	阿魏酸 Ferulic acid	Anthocyanins relative content $\Delta A_{530} = A(pH_{1.0}) - A(pH_{5.0})$
1	1	1	1	1	0.714
2	1	2	2	2	0.534
3	1	3	3	3	0.664
4	2	1	2	3	0.743
5	2	2	3	1	0.670
6	2	3	1	2	0.719
7*	3	1	3	2	0.745
8	3	2	1	3	0.598
9	3	3	2	1	0.699
R	0.074	0.133	0.034	0.028	

注: *为最佳工艺试验号。

Note: * means which one is the best combination number.

3 讨论与结论

花色苷的结构母核是2-苯基苯并吡喃阳离子,属于类黄酮化合物。主要有六大类,即矢车菊素(Cyanidin, Cy)、天竺葵素(Pelargonidin, Pg)、飞燕草素(Delphinidin, Dp)、芍药素(Peonidin, Pn)、牵牛花素(Petunidin, Pt)和锦葵色素(Malvidin, Mv)。自然条件下游离的花色素(Anthocyanidins)极少见,常与1个或多个五碳糖或者六碳糖等通过糖苷键连接形成花色苷^[10]。该试验研究证明,南果梨花色苷中含有常见的飞燕草色素外的五大类花色苷,糖苷则以半乳糖、葡萄糖等六碳糖以及阿拉伯糖等五碳糖为主。

花色苷的结构对其本身稳定性影响很大,一般来说,2-苯基苯并吡喃阳离子结构中羟基数量增加则导致稳定性降低,而甲基化程度提供则有利于提高稳定性,游离羟基的糖苷化也将增加花色苷的稳定性^[11]。酰基化花色苷的芳香酸如咖啡酸、阿魏酸等也对花色苷的稳定性起到很大作用,酰基的空间位阻使花色苷不易受水的攻击,难以形成无色假碱和查尔酮结构。该研究发现,经酰基化和糖苷化的南果梨种子褐色期花色苷稳定性较种子白色期稳定性提高,并通过添加芦丁、单宁、肉桂酸及阿魏酸等辅色剂,降低了南果梨花色苷的热降解速率,进而较对照组南果梨花色苷相对含量提高达77.8%。

南果梨作为辽宁及东北地区的特色产品,提高其外观品质以及确保采收期的高产已成为当前亟待解决的问题,该研究以国家示范园南果梨为试验材料,从花色苷结构方面入手研究其稳定性,并得到了最佳配比复合稳定剂,为指导大田操作提供了理论依据,进而为提高南果梨外观品质及增收、增产奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 李跃,刘延吉.果实花青苷代谢机制及调控技术研究[J].安徽农业科学,2007,35(16):4755-4756,4759.
- [2] 刘延吉,王煜全,田晓艳,等.烯效唑对南果梨着色及品质的影响[J].中国果树,2008(4):17-20.
- [3] 钟瑞敬.花色苷结构与稳定性的关系及其应用研究[J].韶关学院学报(自然科学版),2001,22(12):79-83.
- [4] 庞学群,张昭其,段学武,等.pH值和温度对荔枝果皮花色素苷稳定性的影响[J].园艺学报,2001,28(1):25-30.
- [5] 王峰,邓洁红,谭兴和,等.花色苷及其共色作用研究进展[J].食品科学,2008,29(2):472-480.
- [6] 庞志申.花色苷研究概况[J].北京农业科学,2000,18(5):73-78.
- [7] 卢钰,董现义,杜景平,等.花色苷研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2004,35(2):315-320.
- [8] Bobbio F O. Effect of light and tannic acid on the stability of anthocyanin in DMSO and in water[J]. J Food Chem, 1994, 51: 183-185.
- [9] 李倩,张立军,张旭,等.糖对植物花色素苷合成和积累的调节[J].生命的化学,2009,29(2):218-222.
- [10] 孙建霞,张燕,胡小松,等.花色苷的结构稳定性与降解机制研究进展[J].中国农业科学,2009,42(3):996-1008.
- [11] Hrazdina G, Borzell A J, Robinson W B. Studies on the Stability of the Anthocyanidin-3,5-Digucosides[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1970, 21: 201-204.

梨不同品种果实硬度与果胶含量的相关性研究

岳 英¹, 鲁晓燕¹, 刘 艳², 杨玉琼², 马兵钢¹, 王 蕾¹

(1. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆农二师农科所, 新疆 库尔勒 841000)

摘 要:以 8 个梨品种和 3 个品系为试材, 采用 GY-B 型果实硬度计测定果实硬度, 酸性水解乙醇沉淀法制取果胶, 咔唑比色法测定其果胶含量, 研究不同品种(品系)果实硬度与果胶含量的变化, 并分析果实硬度与果胶含量的相关性。结果表明: 梨不同品种(品系)果实硬度在 5.94~10.89 kg/cm² 之间, 果胶含量在 1.49~3.37 mg/g。果胶含量与果实硬度呈显著正相关, 相关系数为 0.713。

关键词:梨; 果实硬度; 果胶; 相关性

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0015-03

梨为蔷薇科(Rosaceae)梨属(*Pyrus* L.)植物^[1]。果实肉质脆嫩, 酸甜可口, 汁多味美, 还具有许多保健功效, 是人们最喜爱的水果之一。我国梨的栽培面积和产量均居世界第一, 梨果产业成为近年来我国水果业中主要的出口创汇产品之一。尽管育种工作者利用我国丰富的梨资源, 积极选育适应不同气候条件下栽培的优良品种和各具特色的早、中、晚熟新品种^[2-4], 但我国梨果仍存在质量比较差、品种老化、品种结构不合理等问题^[5-6]。

不同国家梨出口价位指数分析表明, 中国出口梨主要为低档梨, 反映了中国梨在世界梨果市场上品质

较低, 并缺乏品牌知名度。可比净出口指数和出口梨果的价位指数联合表明, 中国梨国际竞争力的获得是以低市场销售价格获得的^[7]。我国的优质果率不足 50%, 精品果率仅为 10%, 果品质量与市场需求不相适应, 这严重削弱了梨果的市场竞争力。

果实硬度是果实品质构成要素之一, 与采后贮藏特性有密切关系。果胶是影响果实硬度的主要因素之一, 存在于植物的细胞壁和细胞内层, 在适度的酸性条件下稳定, 在强酸、强碱条件下均易解聚^[8]。随果实成熟度的提高, 不溶性果胶在果胶水解酶的作用下逐步水解转变为可溶性果胶, 果实硬度下降。过熟时, 进一步转变成果胶酸, 由于果胶酸不具粘性, 使果实硬度大大降低, 甚至成为软烂状态^[9]。

该试验以 8 个梨品种和 3 个品系为试材, 研究不同品种及品系梨果实硬度与果胶含量的变化, 并分析果实硬度与果胶含量的相关性, 以期对梨育种过程中正确选择和选配杂交亲本提供参考。

第一作者简介:岳英(1984-), 女, 新疆伊犁人, 在读硕士, 研究方向为果树生理学。E-mail: yueying1202@sina.com。

责任作者:鲁晓燕(1970-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事果树学教学与科研工作。E-mail: lxysz@126.com。

基金项目:新疆生产建设兵团博士基金资助项目(2010JC05)。

收稿日期:2011-04-28

Research of Structure and Stability about Nanguo Pear Anthocyanidin

BI Qiu-ping, LIU Yan-ji

(College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: By using HPLC-DAD-ESI-MS to analysis the structure differentia between different growth period, and analyzed its stability by acylation and auxiliary method. The results showed that Nanguo pear extracting ingredients included seven kinds of variety anthocyanins, cyanindin-3-galactoside, petunidin-3-glucoside and pelargonidin-3-glucoside in white seed period transform into cyanindin-3-acetyl galactoside, petunidin-3,5-two glucosides and pelargonidin-3,5-two glucosides in brown seed period showed the structure differences; Order of affecting Nanguo pear anthocyanins stability factors was: Tannin>Rutin>Cinnamic acid>Ferulic acid, the preferred plan was: 1.5 g/L Rutin, 0.1 g/L Tannin, 1.5 g/L Cinnamic acid and 0.5 g/L Ferulic acid, under 60℃, 10 h, anthocyanins relative content raised 77.8% as highly as control group.

Key words: Nanguo pear; anthocyanin; HPLC-DAD-ESI-MS; stability