

# 黑莓果实次生物质及花色苷组分的研究

李 倩, 刘 延 吉

(沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**以黑莓“三冠王”品种为试材,采用溶剂萃取法和质谱法对黑莓次生物质和花色苷结构进行鉴定,以期今后更好地开发和利用黑莓资源提供理论支持。结果表明:黑莓含有酚类、鞣质、多糖及其苷、黄酮及其苷、氨基酸、多肽、蛋白质、挥发油等次生物质。以质谱法分离鉴定花色苷结构,由矢车菊 3-O-阿拉伯糖苷、矢车菊 3-O-芸香糖苷、矢车菊 3-O-草酸酐酰葡萄糖花色苷、锦葵色素 3-O-葡萄糖苷、矢车菊 3-O-丙二酸酐酰葡萄糖花色苷、矢车菊 3-O-葡萄糖苷组成。

**关键词:**黑莓;次生物质提取;花色苷;质谱法

**中图分类号:**S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0026-05

黑莓(Blackberry)为蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus*)植物,原产北美,是近年来世界发展较为迅速的、集营养与保健为一身的新兴水果,为第4代功能性食品,符合人们“食疗代药疗,食补促治疗”的新概念。黑莓果实呈紫黑色,柔软多汁,且具有怡人的香气,富含Y-氨基丁酸、鞣华酸、能够清除生物体内超氧化物阴离子自由基的SOD、黄酮、水杨酸、花青素等抗衰老、抗癌物质<sup>[1]</sup>,被誉为“紫色生命果”<sup>[2]</sup>。它同时含有多种维生素、多种氨基酸和人体必需的微量元素,是很有发展前途的功能保健型食品源<sup>[3]</sup>。

花色苷(Anthocyanins)是一种天然色素,属酚类化合物中的类黄酮,是构成花瓣、果实等颜色的主要水溶性色素,自然界已知的花色素有22类<sup>[4]</sup>,水果、蔬菜及其它园艺作物均含有花色苷。随着人们对合成色素安全性的深入研究,发现很多合成色素对人体有害,甚至可以致癌。天然色素无毒无害,不受污染,符合绿色标准,因此天然色素的研究与开发,有着广阔前景。尽管如此,花色苷尚未能广泛用于食物染色,原因主要是其化学性能不稳定,且难以提取纯化,因此对花色苷的结构、提取和纯化等方面的内容做进一步研究,对黑莓的加工起着重要的作用。对于花色苷分离鉴定的方法早期如Bate-Smith<sup>[5]</sup>曾用纸层析法分离花色苷元,Harborne<sup>[6]</sup>在1958年提出了花色苷的光谱鉴定法。薄层层析法<sup>[7]</sup>、高效液相色谱(HPLC)<sup>[8]</sup>等也被用于鉴定花色苷。目前,对于黑莓花色苷结构鉴定的报道甚少,对黑莓次生物质的分析尚未见报道。该研究对功

能性水果黑莓“三冠王”品种的次生物质及花色苷结构进行了鉴定,为今后开发和利用黑莓资源提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料 黑莓“三冠王”,由辽宁省果树研究所提供,7月份采收。

1.1.2 试验仪器 数显恒温水浴锅 HH-6(国华电器有限公司);旋转蒸发仪 N1001 型(ELEY 德国制造);循环水真空泵 SHZD-(III)型(河南省巩义市英峪仪器厂);Agilent 1100 series-MSD Trap SL(安捷伦科技公司)等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 提取液的制备 取黑莓鲜果 5 g,加去离子水 50 mL,室温下超声提取 30 min,滤取 10 mL 冷水提取液;将滤后的余液、残渣,在水浴 55℃温浸 0.5 h,抽滤得热水提取液。取黑莓鲜果 5 g,加无水乙醇 50 mL,水浴回流 30 min,过滤,浓缩至约 20 mL 蒸干,用 2 倍稀盐酸溶解(有不溶物),过滤得酸性乙醇提取液。称黑莓鲜果 5 g,加乙醚 50 mL,水浴回流 20 min,过滤,滤液加活性炭脱色,浓缩,剩余约 5 mL,得乙醚提取液;将所得残渣加 20 mL 甲醇,水浴回流 10 min,趁热过滤得甲醇提取液。

1.2.2 各组分检测 FeCl<sub>3</sub> 反应:吸取酸性乙醇提取液、热水提取液各 1 mL 分别滴于 2 个试管中,加入 1~2 滴 FeCl<sub>3</sub> 醇溶液,若显绿、蓝绿或暗紫色则分别含有酚类、鞣质。泡沫试验:热水提取液 2 mL,加塞用力振摇 1 min,若产生多量蜂窝状泡沫,放置 10 min,且未见减少,表明含有皂苷。醋酸铅沉淀反应:甲醇提取液 2 mL,滴加醋酸铅饱和溶液,观察有无黄色沉淀。若有,加到再无沉淀时离心取其上清液,再用碱式醋酸铅试验,若有沉淀生成则表明含有黄酮及其苷类。碱性

第一作者简介:李倩(1985-),女,硕士,现从事细胞信号转导研究工作。E-mail:54780155@qq.com。

责任作者:刘延吉(1959-),男,博士,副教授,现从事植物生理学研究。E-mail:yanjiliu@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-05-04

试验:甲醇提取液 1 mL,加入 1 mL 1% 氢氧化钠溶液,产生红色,若酸化后红色又消失,表明含有蒽醌及其苷类。茚三酮试验:冷水提取液 1 mL,加入 0.2% 茚三酮溶液 2 滴,摇匀,在沸水浴中加热 5 min,冷却后溶液变为蓝或蓝紫色,表明有氨基酸、多肽和蛋白质。挥发油试验:1 mL 乙醚提取液,置玻璃皿上挥发溶剂后,有油状残渣并有香味,受热后,油状物消失或减少,表明有挥发油成分。

1.2.3 黑莓花色苷的提取纯化方法 提取条件:取 5 g 黑莓果,破碎,用 pH 3.0 的 60%乙醇溶剂按 1 g:15 mL 的比例混合均匀,浸提 120 min,在 40℃ 温度下真空抽滤,取 1 mL 提取液用缓冲液(0.2 mol/L KCl 与 0.2 mol/L HCl 之比为 25:67)定容至 25 mL 容量瓶,提取 2 次。纯化条件:用 AB-8 大孔树脂对花色苷进行多分子层吸附,吸附平衡时间为 4 h,解吸平衡时间为 2 h,吸附平衡质量浓度为 750 mg/L,温度为 30℃,用 pH 3.0 的 60%乙醇溶液作为解吸液。吸附流速为 1 mL/min,上样液浓度为 3.0 mg/mL,用 5 倍柱床体积的 60%酸性乙醇作为洗脱液,洗脱流速为 1 mL/min。液质联用条件:色谱柱:CAPCELLPAK C18 MG II (2.0 mm ID×150 mm,5 μm);流动相:甲醇溶液;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℃。

2 结果与分析

2.1 次生物质分析

采用溶剂萃取法对黑莓次生物质进行分析(表 1),由结果初步确定其含有酚类、鞣质、多糖及其苷、黄酮及其苷、氨基酸多肽蛋白质、挥发油等;不含蒽醌及其苷、皂苷成分。

2.2 黑莓花色苷质谱分析

如图 1 所示,用 HPLC 共分离出 6 个峰。为了进一步确定这些色素的化学结构,根据质谱图的保留时间和质谱数据,结合资料分析<sup>[9-10]</sup>,可以确定黑莓“三冠王”花色苷的单体种类,结果见表 2。

表 1 黑莓次生物质检测分析

Table 1 Detection of secondary metabolites Blackberry		
检测成分 Test components	试验内容及现象 Test content and the phenomenon	检测结果 Test results
酚类成分检测	FeCl <sub>3</sub> 反应:溶液变为蓝绿色	+
鞣质含量的检测	FeCl <sub>3</sub> 反应:加入 FeCl <sub>3</sub> 醇溶液后有暗紫色出现	+
皂苷检测	泡沫实验:没有泡沫产生	-
黄酮及其苷的检测	醋酸铅沉淀反应:有沉淀产生	++
蒽醌及其苷检测	碱性试验:产生红色,酸化后没消失	-
氨基酸多肽蛋白质检测	茚三酮试验:溶液呈蓝紫色	+
挥发油检测	挥发油试验:有油状物质,受热后减少	+

注: + 表示试验现象明显, - 表示试验现象不明显。  
Note: + said the test is obvious, - said the test is not obvious.

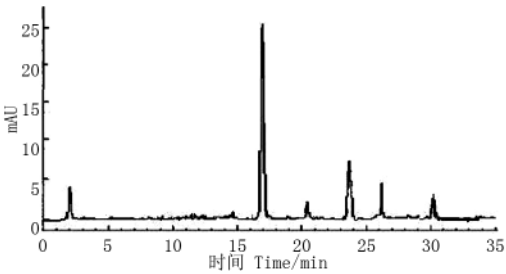
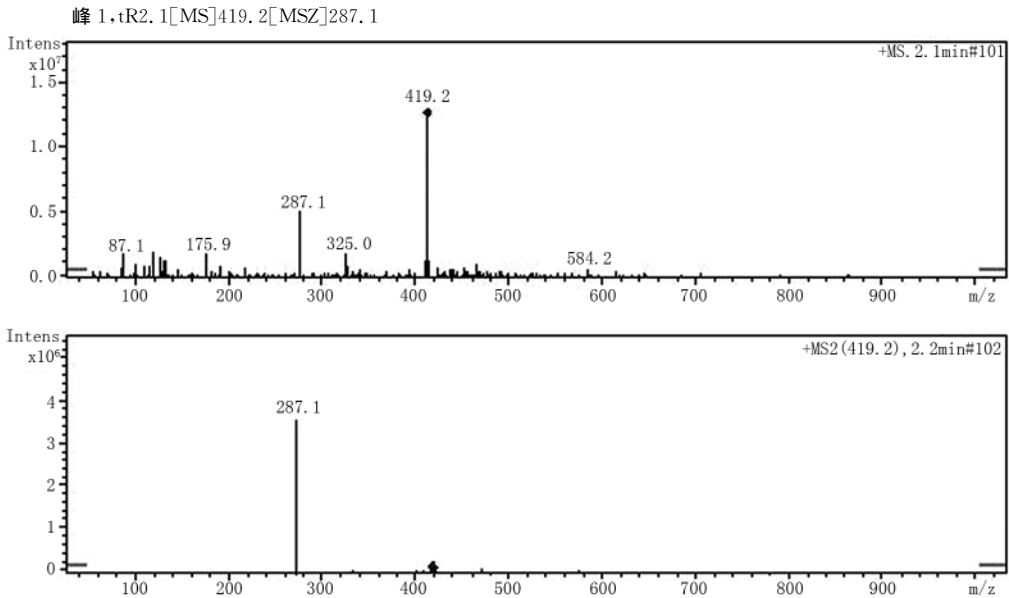


图 1 黑莓花色苷色谱

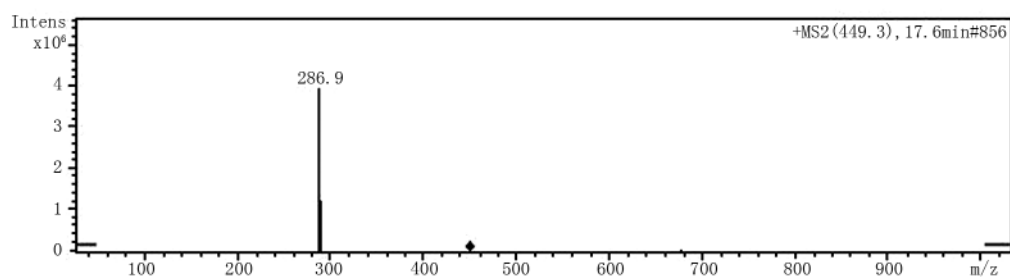
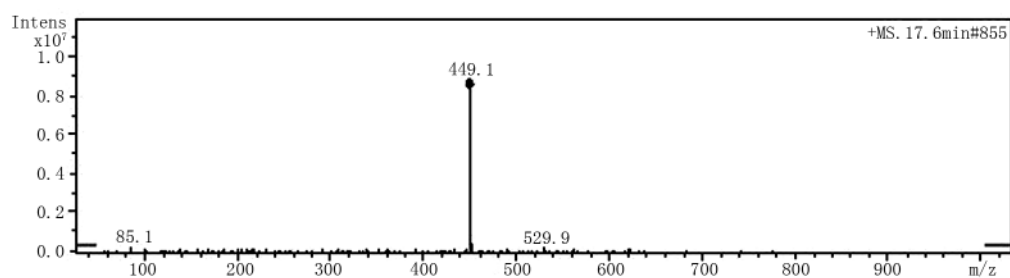
Fig. 1 HPLC chromatogram of blackberry anthocyanin extract

表 2 质谱测定黑莓花色苷单体组成

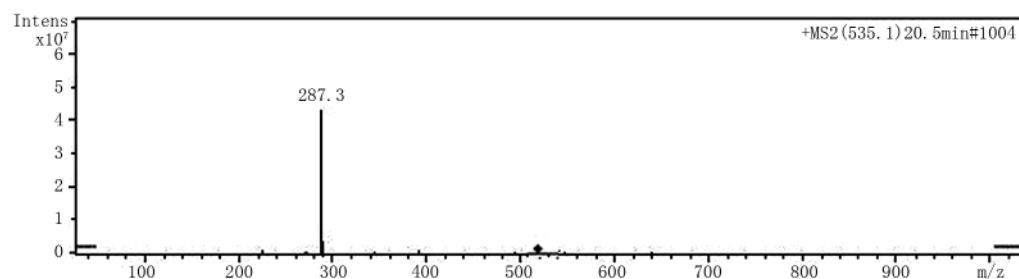
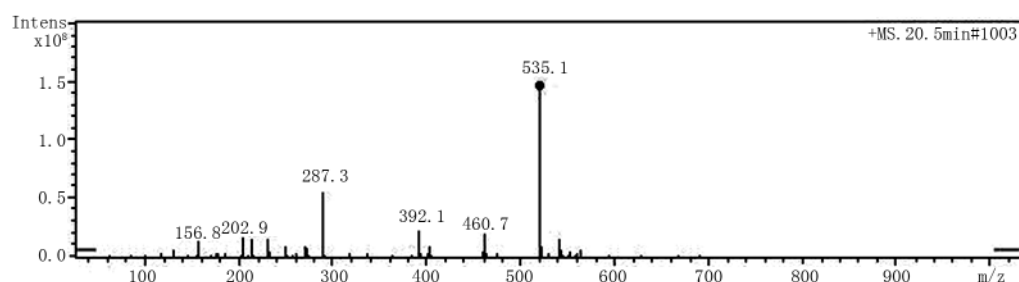
Table 2 Constituents of anthocyanins from blackberry by MS					
峰 Peak	tR/min	[M]+(m/z)	MS/MS(m/z)	花色苷 Anthocyanins	
1	2.1	419.2	287.1	矢车菊 3-O-阿拉伯糖苷	
2	17.6	449.1	286.9	矢车菊 3-O-葡萄糖苷	
3	20.5	535.1	287.3	矢车菊 3-O-丙二酸酐葡萄糖苷	
4	23.9	493.2	331.1	锦葵色素 3-O-葡萄糖苷	
5	26.2	593.4	286.9	矢车菊 3-O-草酸酐葡萄糖苷	
6	30.2	594.9	286.9	矢车菊 3-O-芸香糖苷	



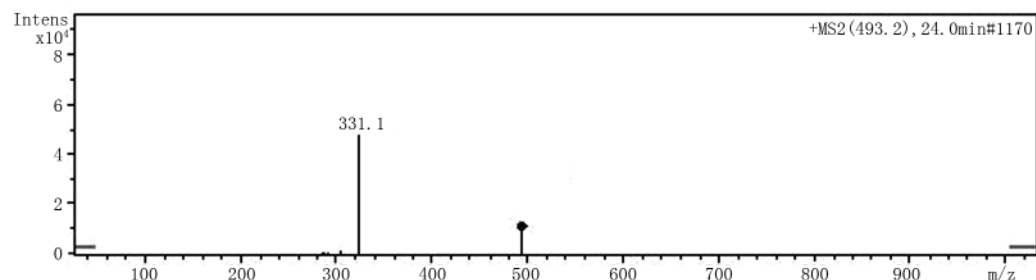
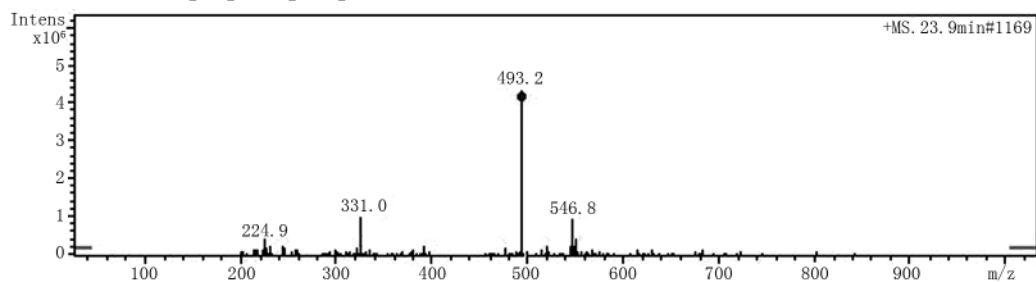
峰 2, tR17.6 [MS]449.1 [MSZ]286.9



峰 3, tR20.5 [MS]535.1 [MSZ]287.3



峰 4, tR23.9 [MS]493.2 [MSZ]331.1



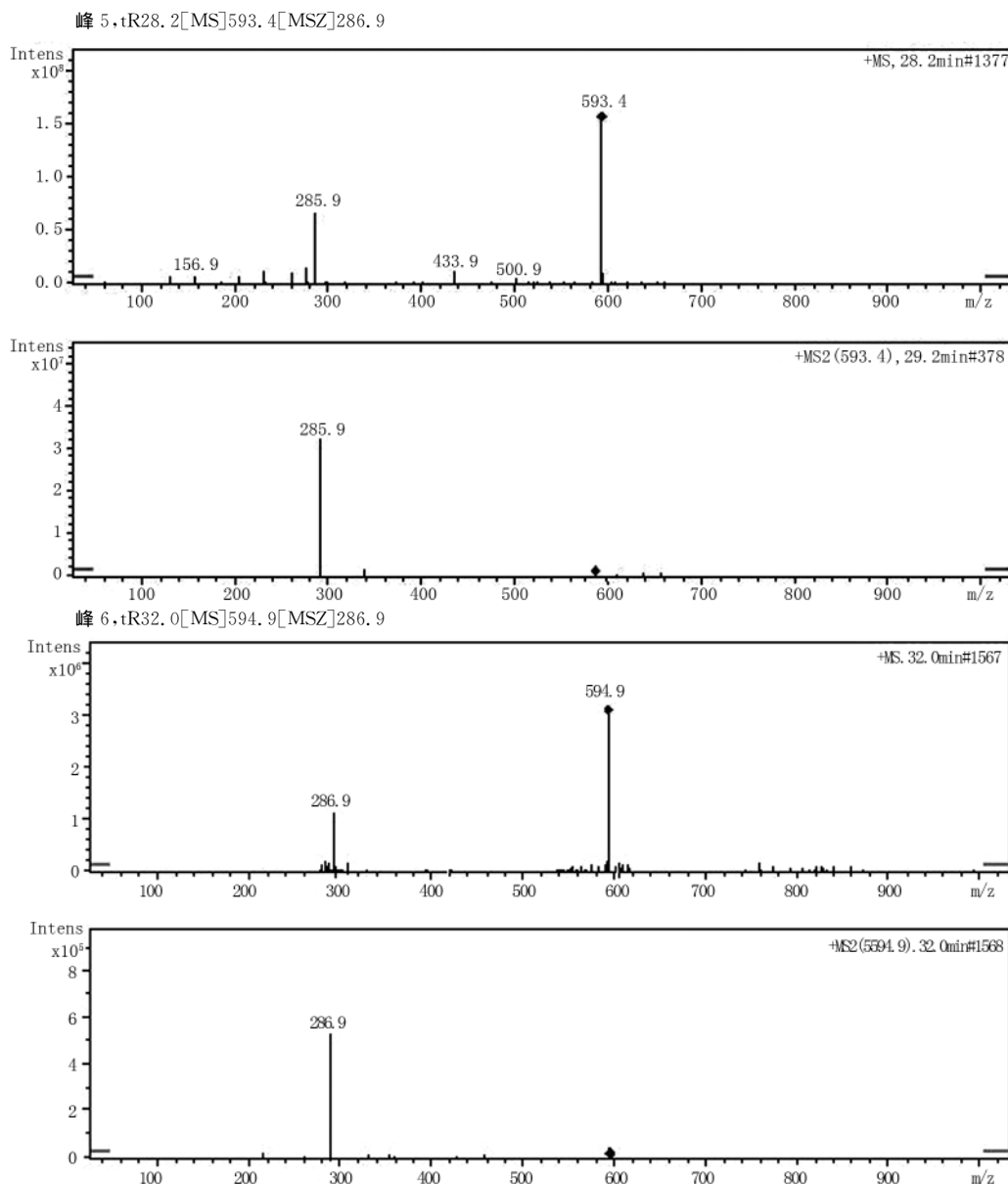


图2 质谱图(峰1~6)

### 3 结论

黑莓作为第4代水果以及功能性食品极具开发意义,该试验采用溶剂萃取法对黑莓次生物质进行了分析鉴定,为黑莓功能因子的确定打下基础。结果表明,黑莓含有酚类、鞣质、多糖及其苷、黄酮及其苷、氨基酸、多肽、蛋白质、挥发油等次生物质。而花色苷作为一种天然色素,安全、无毒并具有很好的着色力,在医药、化妆、食品等方面具有很好的应用潜力和研究价值。该研究通过液质联用对黑莓果实中花色苷的主要成分进行了分析,质谱具有灵敏度高,线性范围宽,稳定性好等优点。结果表明,黑莓中存在的花色苷为矢车菊 3-O-阿拉伯糖苷、矢车菊 3-O-芸香糖苷、矢车菊 3-O-草酸酐酰葡萄糖花色苷、锦葵色素 3-O-葡萄糖苷、矢车菊 3-O-丙二酸酐酰葡萄糖花色苷、矢车菊 3-O-葡萄糖苷。比王卫东等<sup>[9]</sup>的研究多鉴定出2种组分,对黑莓的开发将有着重要的意义。

### 参考文献

- [1] Elisia I, Hu C, Popovich D G, et al. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract[J]. Food Chemistry, 2007, 101(3): 1052-1058.
- [2] 王卫东. 黑莓清汁的制备[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [3] 何业华. 浙江省可食悬钩子的调查研究[J]. 植物分类学报, 1983, 21(1): 36-38.
- [4] Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins[D]. Helsinki: University of Helsinki, 2005.
- [5] Bate-Smith E C. Paper chromatography of anthocyanin and related substances in petal extracts[J]. Nature, 1948, 161: 535-538.
- [6] Harborne J B. The chromatographic identification of anthocyanin pigments[J]. Chromatography, 1958(1): 473-477.
- [7] Morton A D. Thin-layer chromatography of anthocyanins from blackcurrent juice[J]. Chromatography, 1967, 28: 480-481.
- [8] 游辉, 欧阳杰, 武彦文, 等. 萝卜红花色苷的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(3): 310-312.
- [9] 王卫东, 李超, 许时婴. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定黑莓花色苷[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 230-234.
- [10] 唐传核. 植物生物活性物质[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004(8): 218.

# 盐碱胁迫对两个葡萄品种 光合作用-光响应特性的影响

王艳杰, 薛达元, 彭羽

(中央民族大学 生命与环境科学学院, 北京 100081)

**摘要:**在3种不同盐碱胁迫:低度、中度、重度盐碱胁迫条件下,分析了葡萄品种“克瑞森”和“青提”2年生叶片的光合作用-光响应特性、叶绿素含量及长势情况。结果表明:“克瑞森”、“青提”光合作用-光响应曲线符合非直角双曲线模型。盐碱胁迫没有降低2个葡萄品种的光合能力,而是增强其光合能力,表观量子效率AQY值的上升表明盐碱胁迫下2个葡萄品种对光的响应敏感性较强,对弱光的利用能力较高。净光合速率(Pn)、暗呼吸速率(Rd)、叶绿素含量及长势情况说明“青提”较“克瑞森”具有更强的盐碱适应性能力。同时,2种葡萄在受到盐碱胁迫后其净光合速率的降低不是由于气孔的关闭引起CO<sub>2</sub>供应不足造成的,而是受强光下光抑制的加强等非气孔限制因素的影响,包括叶肉阻力增大、羧化酶活性和RuBP再生速率降低等。

**关键词:**葡萄;“克瑞森”;“青提”;盐碱胁迫;光响应特性

**中图分类号:**S 663.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0030-07

葡萄对多种土壤类型和气候条件有较强的适应性。葡萄的耐盐性(Salt-tolerance)是指葡萄植株对土壤盐渍环境的适应能力。葡萄属于对盐敏感的非盐生植物,但相对其它北方落叶果树而言,其耐盐极限度较大。葡萄耐盐碱能力依品种、砧木、树龄、生长期的不同而不同<sup>[1]</sup>。关于葡萄耐盐性研究,早在20世纪60年代以前就已开始,但主要集中在野生种和砧木品种方面研究,相关研究结果表明,葡萄的耐盐性较强。Gunning指出葡萄、柑桔、枣等19种果树都能在盐碱

条件下生长<sup>[2]</sup>。W·拉夏埃尔指出<sup>[3]</sup>,葡萄是特别耐盐的果树。营口市对其滨海盐碱地区的栽培果树考察后,得出抗盐碱能力,葡萄>梨>苹果。霍丽云等<sup>[4]</sup>在盐对葡萄愈伤组织生理变化的影响中指出,耐盐细胞系对逆境的忍受能力远高于对照系。在葡萄砧木方面,刘三军等<sup>[5]</sup>对国家种质资源圃保存的葡萄砧木品种进行耐盐试验后,筛选出近20个品种;周万海等<sup>[6]</sup>以NaCl为胁迫因子,综合评价了6个葡萄砧木的耐盐性,筛选出砧木品种供嫁接后的砧穗互作。徐海英等<sup>[7]</sup>研究了水培条件下葡萄的耐盐性,马跃<sup>[8]</sup>、陈继峰<sup>[9]</sup>、高扬<sup>[10]</sup>、郭修武<sup>[11]</sup>等人的研究,为后期的葡萄耐盐研究提供了较多的试材和可供筛选的研究方法。但是,在盐碱过高的土壤中种植葡萄,会导致其生长不良。赵秀梅等<sup>[12]</sup>对中国野生葡萄试管苗进行耐盐性研究,发现其受害指数、胁迫敏感指数随着盐浓度的升高而增大。

**第一作者简介:**王艳杰(1987-),女,在读硕士,现主要从事植物逆境生理生态方向研究工作。E-mail:yanjie2005@126.com。

**责任作者:**薛达元(1955-),男,教授,现主要从事生物科学和生物多样性保护的研究工作。

**基金项目:**高等学校学科创新引智计划资助项目(2008-B08044)。

**收稿日期:**2011-05-04

## Analysis of Secondary Metabolites Blackberry Fruit Composition of Anthocyanin

LI Qian, LIU Yan-ji

(College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** Blackberry ‘Triple Crown’ varieties were used as material, by the methods of solvent extraction and mass spectrometry blackberry secondary structure of the material and identification of anthocyanins, to better development in the future and use of resources to provide theoretical support for the Blackberry. The results showed that, it contained phenols, tannins, polysaccharides and their glycosides, flavonoids and their glycosides, amino acid peptide and protein, volatile oil etc. Isolated and identified the components of blackberry anthocyanins by using mass spectrometry, it formed by Cy3-O-arabioside, Mv-3-arabioside, Cy3-O-rutinoside, Cy 3-O-dioxalylglucoside, Mv3-O-glucoside and Cy3-O-malonylglucoside, Cy3-O-glucoside.

**Key words:** blackberry; extraction of secondary metabolites; anthocyanins; mass spectrometry