

文章编号:1003-8701(2013)01-0054-04

# 山葡萄果实发育过程中花色苷含量变化研究

赵 权

(吉林农业科技学院中药学院,吉林 132101)

摘 要:以山葡萄左红一果实为试材,应用 HPLC-MS/MS 技术,对山葡萄果实发育过程中花色苷种类及含量变化进行了研究。结果表明,转色期前果皮内没有花色苷积累,随着果实成熟,花色苷含量逐渐增加,成熟期含量最高;在山葡萄果实发育过程中检测出花色苷 13 种,其中双糖苷 6 种、单糖苷 7 种。

关键词:山葡萄;花色苷;含量

中图分类号:S663.1

文献标识码:A

## Changes of Anthocyanins Content in Fruit Development of *Vitis amurensis*

ZHAO Quan

(Department of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: Taking *Vitis amurensis* Rupr. Var. 'Zuohongyi' as test materials and applying HPLC-MS/MS technology, varieties and changes of anthocyanins content in fruit development were studied. The results showed that there was no anthocyanins accumulation in peel before turning color phase. As the fruit matured, anthocyanin content increased gradually and reached the most when fruit picked. 13 kinds of anthocyanins had been detected in fruit development of *Vitis amurensis*., in which 6 anthocyanins were diglucosides and 7 anthocyanins were monoglucosides.

Keywords: *Vitis amurensis*; Anthocyanins; Content

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr)为葡萄科葡萄属植物,其成熟果实呈紫黑色,果皮厚、汁少、籽多,与鲜食葡萄相比具有多酚含量高、糖低、出汁率低的特点,主要用于酿酒<sup>[1-3]</sup>。山葡萄在我国不仅有丰富的野生资源,而且我国也是世界上唯一大面积人工栽培山葡萄的国家,资源丰富且相对集中<sup>[4]</sup>。山葡萄是酿酒的主要原料,酿酒后产生的葡萄籽占皮渣的 65%,仅此每年我国生产葡萄酒后的废渣中就有 400 万~600 万 kg 的葡萄籽<sup>[5-6]</sup>。花色苷(Anthocyanins)是类黄酮化合物中的一类,也是人们所熟悉的天然色素,葡萄中的花色苷主要存在于葡萄浆果的果皮中。在红葡萄浆果中,花色苷在最靠近表皮的 3~4 层细胞的液泡里<sup>[7]</sup>;葡萄酒中的花色苷主要来自于葡萄果实,但其种类较

葡萄果实要复杂一些,与相应的葡萄果实花色苷组成有显著差异。葡萄中花色苷的种类很多,由于苯环中取代基、羟基和甲氧基数量和位置不同,衍生出 5 种主要的花色素苷元<sup>[8]</sup>。在欧亚种葡萄(*Vitis vinifera* L.)与葡萄酒中,有基本的 5 种花色苷。已经鉴定出的花色苷主要由以下 5 种花色素单体组成,分别为花翠素(Delphinidin)、花青素(Cyanidin)、甲基花翠素(Petunidin)、甲基花青素(Peonidin)和二甲基花翠素(Malvidin)<sup>[9]</sup>。在这些花色素 3 位上结合一个葡萄糖后形成单糖苷,在 3 位和 5 位(或 7 位)上分别结合一个葡萄糖形成双糖苷,糖基增加了花色素单体的化学稳定性和水溶性。对单糖苷而言,在葡萄糖的 6 位上还常发生乙酰化、p-香豆酰化和少量的咖啡酰化反应,形成相应的酰化花色苷。

本研究以山葡萄左红一果实为试材,利用 HPLC-MS/MS 技术对葡萄果实发育过程中果皮

收稿日期:2012-10-25

作者简介:赵权(1967-),男,副教授,博士,从事森林植物资源研究。

中花色苷种类及含量的变化进行了研究,探讨其变化规律,以期确定山葡萄果实最佳收获期、提高山葡萄与山葡萄酒质量奠定一定的基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

左红一,山-欧杂种,两性花,79-26-58 × 74-6-83('Zuohongyi', Hybrid of *Vitis amurensis* and *V. vinifera*, hermaphroditic, 79-26-58 × 74-6-83)。2011年6月~9月采自中国农业科学院左家特产研究所国家山葡萄种质资源圃。采样时期分别为花后2周(6月19日)、花后4周(7月3日)、花后6周(7月17日)、花后8周(7月31日)、转色期(8月12日)、20%着色(8月20日)、50%着色(8月26日)、100%着色(9月3日)、成熟(9月14日)。

### 1.2 试剂与标样

流动相甲醇(HPLC)、甲酸(HPLC)、乙腈(HPLC)、冰醋酸(HPLC)均购于Fisher公司(Fair-lawn, NJ, USA),采用Milli-Q(Milipore, Bedford, MA)系统制备的超纯水。标准样品二甲花翠素-3-葡萄糖苷(Malvidin-3-glucoside)由Sigma(Chemical Co., St.Louis, USA)公司购买。

### 1.3 仪器与设备

KG2200B型超声波清洗器;RE-52AA型旋转蒸发器;SHZ-III型循环水真空泵。Agilent1200系列LC/MSD离子阱液相色谱-质谱联用仪进行标准物质以及样品的LC-UV-MS分析,包括在线G1379A真空溶剂脱气机、G1311A四元高压梯度泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315A二极管阵列检测器(DAD),所有仪器均由Agilent 5.3版本的化学工作站控制。

## 2 方法

### 2.1 花色苷的提取

山葡萄皮冷冻干燥。称取2.000 g干葡萄皮粉,加入40 mL 1%的盐酸甲醇溶液,于30℃避光提取2 h,离心(4 000 rpm, 5 min),重复提取5次,合并提取液,35℃旋转蒸发至干,残留物用甲醇定容到5 mL, -40℃保存待测。

### 2.2 高效液相色谱-质谱(HPLC-MS/MS)分析方法

花色苷的色谱条件如下,色谱柱采用Zorbax Eclipse SB-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm 粒度色谱柱);流动相A:水:甲酸=90:10(V/V);流动相B:水:甲醇:甲酸=40:50:10(V/V)。洗脱程序为:0~4

min, 6%~15% B; 4~13 min, 15%~25% B; 13~20 min, 25%~50% B; 20~35 min, 50%~80% B; 35~40 min, 80%~100% B; 40~45 min, 100%~6% B; 流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:525 nm;进样量:10 μL。MSD参数:质谱采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式,粒子扫描范围:100~1500 m/z;雾化器压力为30 psi;干燥气流速为12 L/min;干燥气温度为300℃。样品0.45 μm膜过滤后直接进入样分析,每个样品重复2次。本研究花色苷定性建立在中国农业大学葡萄酒研究中心葡萄与葡萄酒花色苷HPLC-MS/MS指纹谱库的基础上,通过对样品HPLC-MS/MS图谱中质谱信息和保留时间与谱库比对分析,从而确定各样品中花色苷的种类与结构。标准品为二甲花翠素-3-葡萄糖苷(Malvidin-3-glucoside)。花色苷标准曲线为  $Area = 50.5674 * Amt(mg/L) + 6.3822$ , 相关系数达0.9998,表明标样在1~500 mg/L内有良好的线性关系,可以满足花色苷的定量检测,通过标准曲线计算果皮(干重)中花色苷含量,单位为mg/g。

## 3 结果与分析

左红一果实发育过程中果皮中共检测出花色苷13种,色谱信息见图1。其中,花翠素类(Dp)2种,分别为花翠素-3,5-双葡萄糖苷(峰1)和花翠素-3-葡萄糖苷(峰4);花青素类(Cy)2种,分别为花青素-3,5-双葡萄糖苷(峰2)和花青素-3-葡萄糖苷(峰7);甲基花青素类(Pn)3种,分别为甲基花青素-3-葡萄糖苷(峰10)、甲基花青素-3,5-双葡萄糖苷(峰6)和甲基花青素-3-葡萄糖苷-4-丙酮酸(峰13);甲基花翠素类(Pt)3种,甲基花翠素-3,5-双葡萄糖苷(峰3)、甲基花翠素-3-葡萄糖苷(峰9)和甲基花翠素香豆酰化葡萄糖苷-4-丙酮酸(峰12);二甲花翠素类(Mv)2种,分别为二甲花翠素-3,5-双葡萄糖苷(峰8)和二甲花翠素-3-葡萄糖苷(峰11);花葵素类(Pg)1种,为花葵素-3,5-双葡萄糖苷(峰5)。

由图2-A、B可以看出,果实转色前未检测出花色苷,转色期检测出花色苷3种,含量为0.0391 mg/g;20%着色时检测出花色苷5种,含量为0.0839 mg/g;50%着色时检测出花色苷8种,含量为0.2847 mg/g。由此可以看出,在葡萄浆果达到50%着色时,花色苷种类虽然达到8种,但是总含量却变化不大;由50%着色到100%着色花色苷种类增加了5种,含量增加到8.7675 mg/g;从100%着色到成熟期花色苷含量增加缓慢,成

熟时检测出花色苷 13 种 ,含量为 10.629 4 mg/g。花葵素 - 3,5- 双葡萄糖苷仅在果实 100%着色后被检测到 ,但是含量极少 ,微量 ;花青素 - 3- 葡萄糖苷从转色期至 20%着色含量呈增加趋势 ,50%着色至成熟含量又呈下降的变化趋势 ;甲基花青素 - 3- 葡萄糖苷含量从 100%着色至成熟表现出下降的变化

趋势。在 100%着色和成熟期检测到 2 种吡喃型花色苷 ,为甲基花葵素香豆酰化葡萄糖苷 - 4- 丙酮酸和甲基花青素 - 3- 葡萄糖苷 - 4- 丙酮酸 ,但是甲基花青素 - 3- 葡萄糖苷 - 4- 丙酮酸含量极低 ,微量。100%着色至成熟期花葵素类花色苷含量增加显著 ,成熟期二甲花葵素类花色苷含量最高。

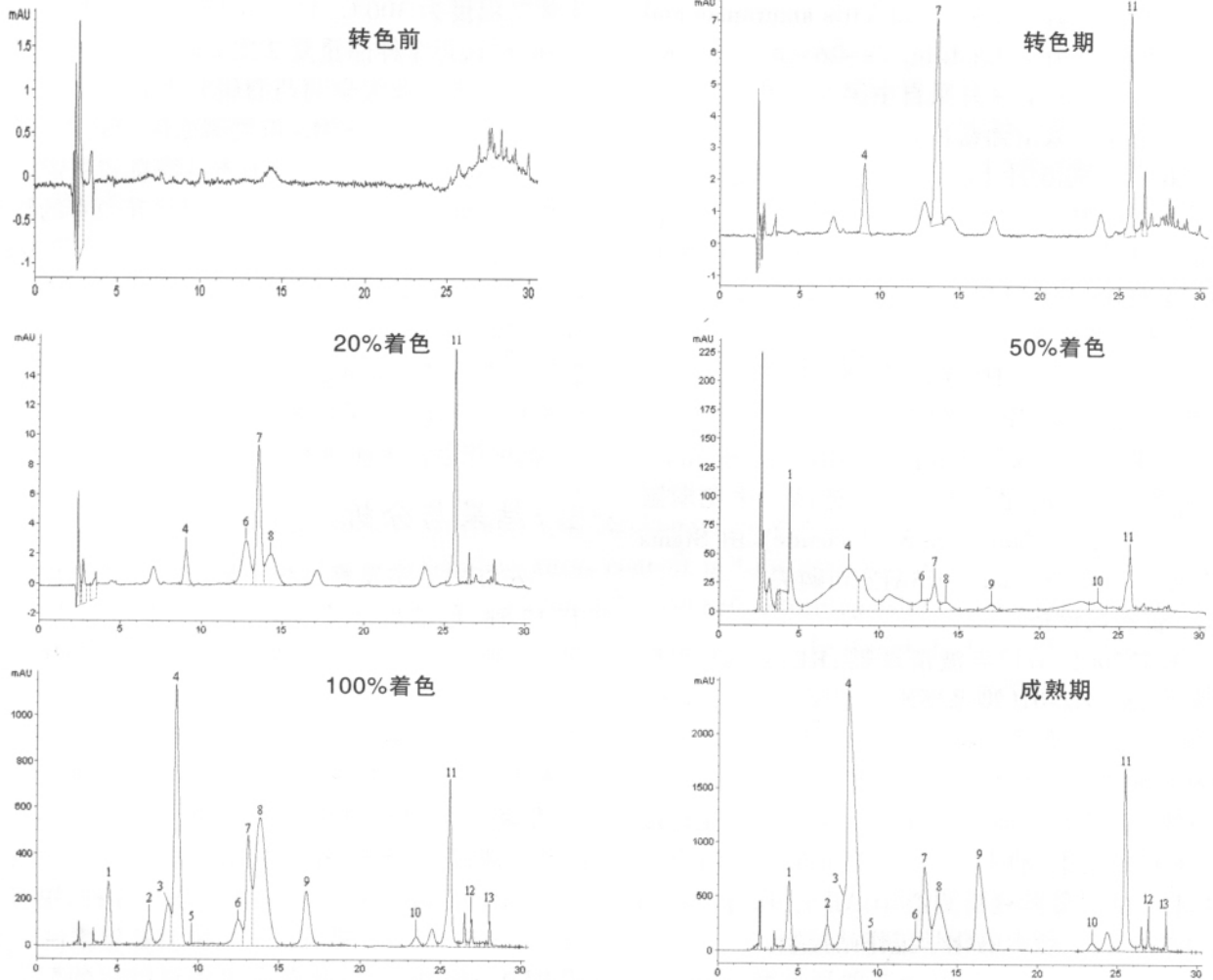


图 1 左红一果实发育过程中果皮中花色苷 HPLC 色谱图

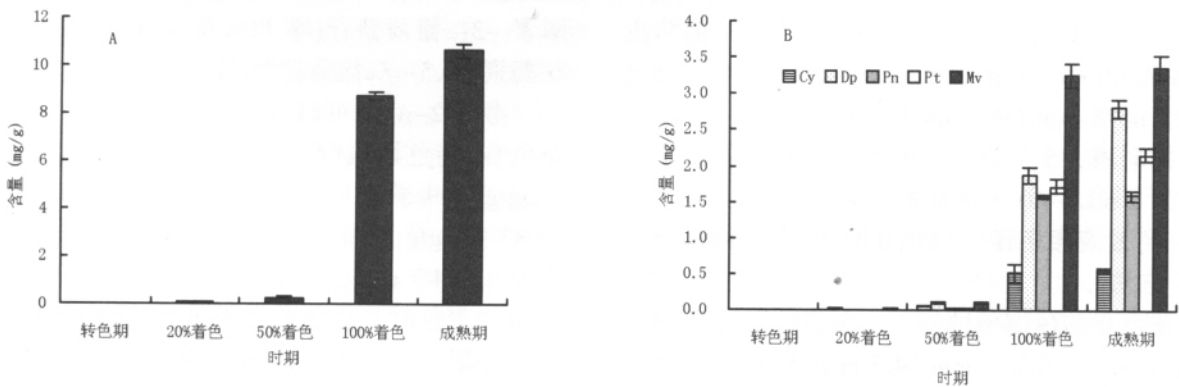


图 2 左红一果实发育过程中果皮中花色苷的变化

## 4 结论与讨论

花色苷在葡萄转色期开始合成并随浆果的成熟不断累积,含量上升,因葡萄品种、生态条件等因素影响,完全成熟时含量达最大值或有下降的趋势。野生葡萄及欧亚种葡萄赤霞珠成熟期间总花色苷含量持续上升,本研究与他人研究结果一致<sup>[10-11]</sup>。赤霞珠成熟过程中花色苷的变化为转色期后花色苷含量迅速积累到一定程度,随后其含量保持不变,甚至到后期略有下降,而且对不同的花色苷而言,这种变化趋势略有不同,花翠素-3-葡萄糖苷和甲基花翠素-3-葡萄糖苷含量到成熟后期有所降低,而其它花色苷特别是二甲花翠素在成熟过程中所占比例一直在升高<sup>[11]</sup>。本研究山葡萄花青素-3,5-葡萄糖苷在100%着色至成熟过程却呈下降趋势,这与赤霞珠的花色苷含量变化有所区别,这种变化趋势是否是山葡萄的品种特征,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 张金柱,戴永平,王万民. 山葡萄资源开发及利用[J]. 中国林副特产, 2002(5): 256-257.
- [2] 方志. 山葡萄与山葡萄酒[J]. 酿酒科技, 2003(6): 93-94.
- [3] 王军,葛玉香,包怡红. 东北山葡萄品种特性比较[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 29-31.
- [5] 王洪新,汤坚,吴晓燕,等. 葡萄籽中抗氧化剂的精制及抗氧化活性的测定[J]. 中国油脂, 1990, 15(14): 9-14.
- [6] 吕丽爽,曹栋. 葡萄籽中低聚原花青素的研制[J]. 中国油脂, 2001, 26(1): 38-39, 49.
- [7] 徐渊金,杜琪珍. 花色苷分离鉴定方法及其生物活性[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 67-72.
- [8] Wu X, Ronald L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common food in the United States: fruits and berries [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(7): 2589-2599.
- [9] 李华,王华,袁春龙,等. 葡萄酒化学[M]. 北京: 科技出版社, 2005: 106-110.
- [10] 段长青,贺普超,康靖全. 中国葡萄野生种花色素双糖苷的研究[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(5): 23-28.
- [11] José - Mari a R, Eugenio R. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tmpranillo grapes at different stages of ripening [J]. J Agric Food Chem, 2003 (51): 3372-3378.

(上接第 53 页)

为耐药性研究的开展奠定了基础。

参考文献:

- [1] 索勋,李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 149-318.
- [2] 索勋,汪明,吴文学,等. 强效艾美耳牌鸡球虫苗 I 型的田间实验[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(3): 265-269.
- [3] P. C. Allen, R. H. Fetterer. Recent Advances in Biology and Immunobiology of Eimeria Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(1): 58-65.
- [4] Martin W. Shirley, Adrian L. Smith, Damer P. Blake. Challenges in the successful control of the avian coccidia [J]. Vaccine, 2007(25): 5540-5547.
- [5] 安健,刘月繁,汪明,等. 肉鸡球虫病和球虫抗药性的调查[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(6): 29-31.
- [6] 沈杰,黄兵. 中国家畜家禽寄生虫名录[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 7-19.
- [7] S Fernandez, A.H.Pagotto, M.M.Furtado, et al. A multiplex

PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven Eimeria species that infect domestic fowl[J]. Parasitology, 2003(127): 317-325.

- [8] Yao-Chi Su, Andrew Chang-Young Fei, Fang-Mei Tsai. Differential diagnosis of five avian Eimeria species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence [J]. Veterinary Parasitology, 2003(117): 221-227.
- [9] 陶建平,符敖齐. 单卵囊感染的雏鸡日龄及某些生物学特性的研究[J]. 江苏农学院学报, 1997, 18(4): 77-78.
- [10] 吴昌标,郑文金,张灵玲,等. 福建三株柔嫩艾美耳球虫的分离、鉴定及致病性的初步研究[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2010, 17(3): 140-144.
- [11] 安健,汪明,王黎霞,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的建立[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(1): 5-6, 13.
- [12] 高英,郭莉,赵月兰,等. 艾美耳球虫单卵囊分离及 PCR 鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(12): 25-27.
- [13] YANG Gui-lian, LI Jian-hua, ZHANG Xi-chen, et al. Isolation of E. tenella JL Strain Single- oocyst and PCR Identification [J]. Agricultural Science and Technology, 2009, 10 (3): 55-57.