

夏黑葡萄藤放置过程中化学成分的变化及可能变化机制分析

严思恩^{1,2}, 赵康宏^{1,2}, 何英杰^{1,2}, 刘东波^{1,2,3}, 王 蕾^{1,2,4}, 谢红旗^{1,2,3*}¹ 湖南农业大学园艺园林学院; ² 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室;³ 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 长沙 410128; ⁴ 辽宁晟启昊天生物医药科技有限公司, 沈阳 110000

摘要:为分析夏黑葡萄藤在放置过程中化合物的种类、含量变化规律及机制。本研究应用超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪(UPLC-Q-TOF-MS)在负离子模式下对夏黑葡萄藤中主要化学成分进行定性分析;采用高效液相色谱仪(HPLC)分析夏黑葡萄藤在放置过程中化合物的含量变化趋势。通过液质联用分析方法初步鉴定出夏黑葡萄藤中的黄酮类化合物主要有儿茶素、表儿茶素、槲皮素、槲皮素-3-*O*-半乳糖苷、petunidin 3-*O*-glucoside、trans-scirpusin A;芪类化合物为反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素、vitisin B、miyabenol C;苯丙素类化合物为反式咖啡酸。葡萄藤在剪枝后放置过程中,反式白藜芦醇与 ϵ -葡萄素在 0~20 天左右期间,含量呈显著上升趋势,最高值分别为新鲜样品中的 250 倍和 190 倍,从第 20 天起含量开始降低;vitisin B 与 miyabenol C 为剪枝后放置过程中产生的新化合物,从第 10 天时含量开始上升,到第 50 天时含量开始下降。儿茶素、表儿茶素、槲皮素与反式咖啡酸的含量会随着葡萄藤放置时间的延长而持续降低。采用 UPLC-Q-TOF-MS 可以对葡萄藤中化合物进行快速分析鉴定;葡萄藤在放置过程中逆境胁迫会诱导芪类化合物(反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素、vitisin B、miyabenol C)含量上升,而芪类化合物合成前体物质(trans-scirpusin A)和白藜芦醇合成的竞争物质(儿茶素、表儿茶素、槲皮素)含量则呈下降趋势。

关键词:夏黑葡萄藤;芪类化合物;贮藏;变化机制;超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪(UHPLC-Q-TOF-MS)

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)12-2105-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.12.014

Changes of chemical constituents and possible mechanism of change of Summer Black grapevines during storage

YAN Si-en^{1,2}, ZHAO Kang-hong^{1,2},
HE Ying-jie^{1,2}, LIU Dong-bo^{1,2,3}, Wang Lei^{1,2,4}, XIE Hong-qi^{1,2,3*}¹ College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University;² State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology;³ Hunan Co-innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China;⁴ Liaoning Shengqi Heaven Biomedical Technology Co., Ltd., Liaoning 110000, China

Abstract: To analyze the variety and content of the compounds change rules during grapevines of Summer Black storage. The main chemical constituents in the grapevine of Summer Black were qualitatively analyzed by ultra high performance liquid chromatography(UPLC-Q-TOF-MS) under the negative ion mode, and the change trend of the chemical constituents in the grape vine of Summer Black during storage was analyzed by high performance liquid chromatography(HPLC). The main flavonoids in grape vine were identified by LC-MS as catechin, epicatechin, quercetin, quercetin-3-*O*-galactoside, petunidin 3-*O*-glucoside, trans-scirpusin A, stilbenes as trans-resveratrol, ϵ -viginiferin, vitisin B, miyabenol C, and phenylpropanoids as trans-caffeic acid. The contents of trans-resveratrol and ϵ -viginiferin increased from 0 to 20 days and began to decrease after 20 days. The highest values were 250 times and 190 times of fresh samples, respectively. Vitisin B and miyabenol C were the new com-

收稿日期:2019-06-27 接受日期:2019-09-24

基金项目:湖南省自然科学基金(2017JJ2119);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-21);湖南省科技重大专项(2017SK1020);沈阳科技计划(18-004-3-54)

* 通信作者 Tel:86-731-84617244; E-mail: xiehongqi2006@sohu.com

pounds created during the storage period, while the contents of vitisin B and miyabenol C began to increase on 10 days and decrease on 50 days. The contents of catechin, epicatechin, quercetin and trans-caffeic acid decreased with the storage time. UPLC-Q-TOF-MS can be used for rapid analysis and identification of compounds in grapevine. Stress in grape vine during storage could induce the content of stilbenes (trans-resveratrol, epsilon-grape, vitisin B, miyabenol C) to increase, while the content of trans-scirpusin A and competitive substances (catechin, epicatechin, quercetin) to synthesize stilbene compounds showed a downward trend.

Key words: grapevines of Summer Black; stilbenes; storage; mechanism of change; UPLC-Q-TOF-MS

葡萄品种夏黑 (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*, Summer Black) 属于欧美杂种, 抗逆性强、果实无核、果皮紫黑、具有独特香味, 已成为我国的鲜食葡萄品种之一^[1]。葡萄采收之后一般会对其进行修剪、整枝^[2], 以提高葡萄产量与品质, 修剪掉的葡萄枝蔓则被当做废弃物进行焚烧。然而, 研究发现葡萄藤中含有许多生物活性成分, 如反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素等芪类化合物以及儿茶素、表儿茶素等黄酮类化合物^[3,4]。其中, 芪类化合物不仅对老年痴呆与神经元细胞损伤具有良好的防治作用^[5,6], 而且对癌症与炎症也具有一定的疗效^[7,8]。芪类化合物是一类植物抗毒素, 当植物受到生物或非生物胁迫时能够大量产生^[9]。课题组前期研究发现葡萄藤枝蔓在整枝阴干过程中反式白藜芦醇与 ϵ -葡萄素含量会发生显著变化, 但机制尚不明确^[10]。本文采用 UPLC-Q-TOF-MS 方法对夏黑葡萄藤中的主要化学成分进行初步鉴定, 并通过 HPLC 法对夏黑葡萄藤在放置过程中化合物的含量变化进行分析, 以期揭示夏黑葡萄藤在放置过程中化合物的变化规律和化合物之间的转化机制, 为提高葡萄藤的综合利用及探索芪类化合物的生物来源提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

葡萄藤采收于国家中药材生产(湖南)技术中心核心基地, 经唐其副教授鉴定为夏黑葡萄 (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*, Summer Black)。

甲醇、乙腈, (色谱纯) 德国 Merck 试剂公司; 甲酸, (分析纯) 上海国药集团试剂有限公司; 去离子水由超纯水仪(四川优普超纯科技有限公司)制得。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(美国 Agilent 1260); 超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪(美国 Agilent 1290); KM-5200DV 超声仪(昆山超声仪器有限公司); XS205 分析天平(METTLER TOLEDO); GZ-800-GS II 智能人工气候箱; 优普超纯水机(UPR-10T)。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

将采收的新鲜葡萄藤枝蔓(35 cm 左右)放入温度为 20 °C、湿度为 45% 的恒温人工气候箱, 分别在第 0、2、5、10、15、20、48、80 天随机取样。样品烘干后粉碎过 2 号筛, 备用。

1.3.2 水分测定

参照《中国药典》2015 版通则下水分测定法中第二法(烘干法)测定供试品含水量。

1.3.3 供试品溶液的制备

样品制备参考 Xie^[11] 提取葡萄藤中化合物的方法, 并加以优化。具体操作如下, 将样品粉碎后, 准确称量 5.0 g, 置于 250 mL 磨口锥形瓶中, 按料液比为 1:20 加入 100 mL 甲醇, 连瓶一起称重记为 M; 再在锥形瓶外包裹上一层锡箔纸, 进行超声提取 1 h; 提取完成后取下锡箔纸, 擦干锥形瓶外的水, 待提取液冷却至室温时称重, 并用甲醇补足重量至 M, 8 000 rpm 离心 10 min, 取上清液过 0.45 μ m 微滤膜, 得 HPLC 检测用供试品溶液; 取上清液过 0.22 μ m 微滤膜, 得 UPLC-Q-TOF-MS 分析用供试品溶液。

1.3.4 色谱条件

色谱柱为: Agilent-ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水(A) ~ 乙腈(B), 梯度洗脱, 洗脱程序: 0 ~ 5 min, 15% B; 5 ~ 8 min, 15% ~ 18% B; 8 ~ 10 min, 18% B; 10 ~ 20 min, 18% ~ 23% B; 20 ~ 25 min, 23% ~ 30% B; 25 ~ 35 min, 30% ~ 40% B; 40 ~ 45 min, 15% B。流速 0.8 mL/min, 进样量 10 μ L, 检测波长 306 nm, 柱温 30 °C。

1.3.5 质谱条件

通过优化质谱条件, 采用负离子模式电喷雾电离离子源(ESI⁻), TOF 质量扫描范围 m/z 100 ~ 3 000; 载气温度 300 °C, 流速 8 L/min; 雾化压力 35 psi; 鞘气温度 350 °C, 流速 11 L/min; 毛细管电压 3 500 V; 碰撞诱导解离电压 175 V, 设置碰撞能量梯

度为 15、20、25、30 eV。

2 结果与分析

2.1 葡萄藤中主要成分的初步鉴定

采用 UPLC-Q-TOF-MS 对葡萄藤中主要成分进行定性分析,如图 1 所示,在负离子模式下总离子流图中检测出 11 个化合物。对这些主要成分进行 MS/MS 分析,详细离子信息如表 1 所示。

化合物 1 的精确分子量为 311.039 3, MS/MS 结果表明:该化合物含有 $[M-H]^- = 179.034 6$ 与 $[M-$

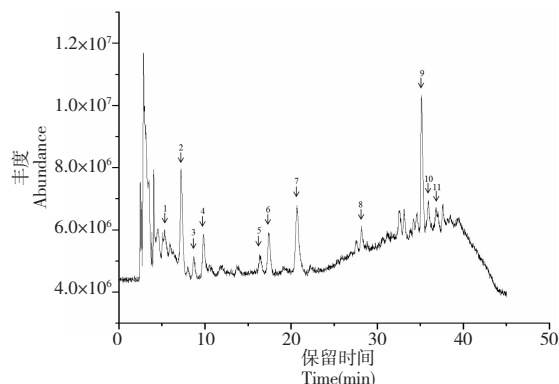


图 1 负离子模式下葡萄藤中化合物总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of compounds in grapevine under negative ion mode

$H]^- = 135.046 5$ 碎片离子,表明该化合物中可能含有一个咖啡酸分子,其中母离子与咖啡酸分子之间的差值为 132.358 4,可能是:2-羟基-3-甲基-4-氧代戊酸。再结合 Sánchez-Gómez 等^[12]的报道,推测出该化合物为 trans-caftaric acid,分子式为 $C_{13}H_{12}O_9$,化合物结构式如图 2 所示。

化合物 2 与 4 的母离子分子量相同且碎片离子相似,但保留时间上有所差异。推测这两种化合物互为同分异构体,该结果与 Sánchez-Gómez 等^[12]报道的葡萄藤中儿茶素与表儿茶素精确分子量相同,且与 Liu 等^[13]报道的儿茶素类化合物的质谱裂解规律相似,并且都含有 $[M-H]^- = 161.059 1$ 、 $[M-H]^- = 137.021 7$ 等特殊离子碎片,由此推测这两种化合物分别为儿茶素与表儿茶素,本试验使用的是反相色谱柱,因此先出峰的为极性大的化合物^[14],因此化合物 2 为儿茶素,化合物 4 为表儿茶素,分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$,结构式分别如图 2 所示。

化合物 3 的精确分子量为 465.091 4,在其碎片离子中含有 $[M-H]^- = 285.038 6$,推测可能为母离子损失掉一个单糖分子,结合 Na-Na Liang^[15]报道的葡萄皮中的化合物推测该化合物为:quercetin-3-O-galactoside,分子式为 $C_{21}H_{22}O_{12}$,结构式如图 2 所示。

表 1 葡萄藤中化合物的精确分子量及二级质谱碎片信息

Table 1 Precise molecular weight and secondary mass spectrometric fragment information of compounds in grapevines

序号 No.	t_R (min)	精确分子量 Exact mass	MS/MS 碎片离子 (ESI ⁻) MS/MS fragment ions
1	5.788	311.039 3	258.916 5;242.976 1;230.999 6;179.034 6;135.046 5
2	7.129	289.065 3	254.083 6;203.069 2;188.045 7;161.059 1;137.021 7;123.04 4
3	9.669	465.091 4	339.088 0;285.038 6;214.618 1;151.007 6
4	10.697	289.074 0	254.075 8;203.080 7;161.058 8;137.022 6;123.044 3;109.025 8
5	16.332	301.008 0	283.760 5;274.851 1;257.258 0;245.861 8;231.502 9;205.265 1
6	17.470	477.064 2	441.083 1;301.037 3;289.070 4;224.357 3
7	20.546	469.134 9	451.116 3;423.125 8;375.091 3;363.088 2;269.041 7;121.028 3
8	28.063	227.071 8	185.060 9;143.048 9;119.050 6
9	35.315	453.130 1	411.116 8;359.090 2;291.093 2;253.042 3;225.050 6;197.054 9;146.034 6
10	36.451	905.261 6	811.214 0;799.219 5;611.145 8;451.123 1;359.081 5;158.152 9
11	37.003	679.189 3	573.150 0;451.127 1;345.075 2;201.049 1

化合物 5 的精确分子量为 301.008 0,结合 En^[16]、Eduardo^[17]报道的文章推测该化合物可能为槲皮素,二级质谱裂解碎片离子与 Li^[18]报道的槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析中槲皮素在负离子模式下的裂解途径与碎片相似,由此可以推测该化合物为槲皮素,分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$,结构式如图 2 所示。

化合物 6 的母离子精确分子量为 477.068 3,该化合物的碎片离子中含有 $[M-H]^- = 301.032 1$,与 Lambert 等通过 UPLC-QqQ-MS 检测到的化合物 petunidin-3-O- β -glucopyranoside 相似^[19],推测该化合物为 petunidin-3-O- β -glucopyranoside,分子式为 $C_{22}H_{23}O_{12}$,结构式图 2 所示。

化合物 **8** 的母离子精确分子量为 227.071 8, 与反式白藜芦醇的精确分子量接近, 且该化合物的离子碎片 185.060 9 与母离子相差 42.010 9, 推测出该裂解过程中失去 1 个 C_2H_2O 分子, 同时碎片离子 185.060 9, 与碎片离子 143.048 9 之间也相差 42.012 0, 由此可见在该裂解过程中也失去一分子 C_2H_2O 。其裂解规律与 Liu^[20] 报道的白藜芦醇质谱裂解规律相同, 因此该化合物为反式白藜芦醇, 分子式为 $C_{14}H_{12}O_3$, 结构式如图 2 所示。

化合物 **9** 母离子精确分子量为 453.130 1, 与白藜芦醇母离子 227.071 8 相差 226.062 1, 并且在其离子碎片中含有 225.050 6、119.047 4 与化合物 **8** 中相同分子量的碎片, 由此推断此化合物为化合物 **8** 的二聚体, 并且在此聚合过程中失去两个氢。该化合物的碎片离子与 Hurtado-Gaitán^[21] 采用 UPLC-QQQ 检测到的 ϵ -葡萄糖素的离子碎片信息相似, 同时与 Yin 等^[22] 报道的白藜芦醇二聚体异构选择机理中 ϵ -葡萄糖素的离子碎片信息相似, 因此, 推测该化合物为 ϵ -葡萄糖素, 分子式为 $C_{28}H_{22}O_6$, 结构式如图 2 所示。

化合物 **7** 的母离子精确分子量为 469.134 9, 与化合物 **9** 的精确分子量相比相差 16.004 8, 推测可

能是该化合物上的一个 H 被羟基取代, 其次在其离子碎片中含有 451.116 3、375.091 3 等离子碎片, 与 Jia Yu 等报道的 trans-scirpusin A 的离子碎片相似^[23], 由此推测该化合物为 trans-scirpusin A, 分子式为 $C_{28}H_{22}O_7$, 结构式如图 2 所示。

化合物 **10** 与化合物 **11** 母离子分子量之间相差 226.072 3, 化合物 **11** 与化合物 **9** 母离子分子量之间相差 226.059 2, 而化合物 **9** 与化合物 **8** 的母离子分子量也相差 226.054 4, 这个规律正好与化合物 **9** 与化合物 **8** 之间的相同, 因此推测化合物 **11** 是白藜芦醇的三聚体, 而化合物 **10** 则是白藜芦醇的四聚体, 在此过程中发现白藜芦醇聚合物聚合时相邻两个聚合物之间相差 226, 而白藜芦醇分子量为 228.071 8, 也就意味着每聚合一个白藜芦醇分子就会失去两个氢。化合物 **10** 的离子碎片与 Sáez 等^[24] 报道的 vitisin B 的离子碎片相似, 由此推测化合物 **10** 为 vitisin B, 分子式为 $C_{56}H_{42}O_{12}$, 结构式如图 2(10) 所示; 化合物 **11** 则与 Keylor 等^[25] 报道的白藜芦醇三聚体 miyabenol C 合成过程中的离子碎片相似, 因此推测化合物 **11** 为 miyabenol C, 分子式为 $C_{42}H_{32}O_9$, 结构式如图 2 所示。

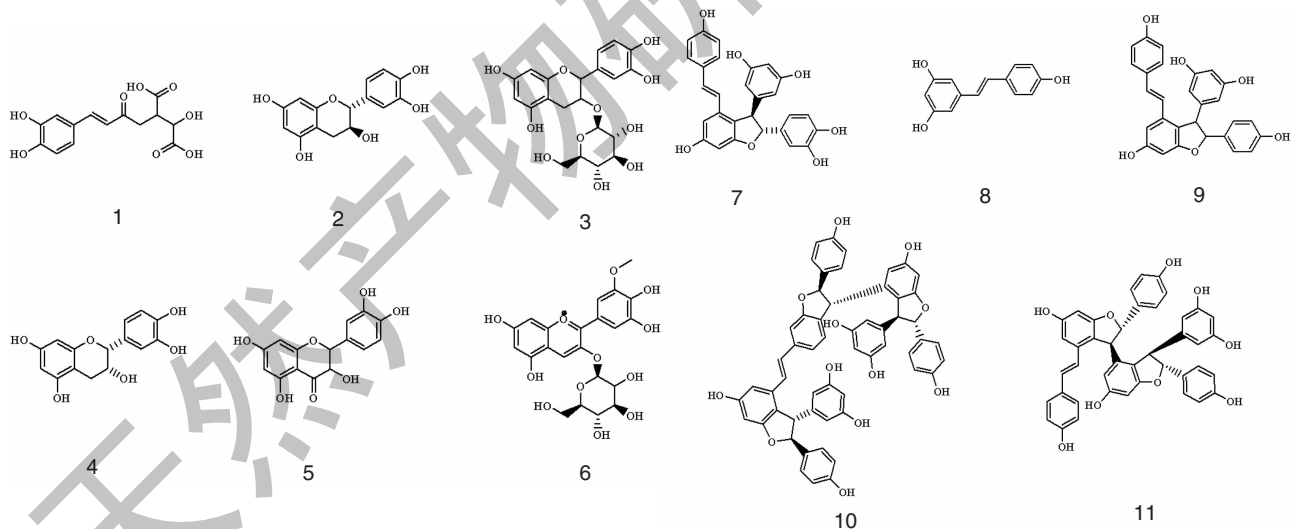


图 2 通过 UPLC-MS-Q-TOF 结果推测出的化合物结构

Fig. 2 The structures of the compounds inferred from UPLC-MS-Q-TOF results

注: 1. 反式咖啡酸; 2. 儿茶素; 3. 槲皮素-3-O-半乳糖苷; 4. 表儿茶素; 5. 槲皮素; 6. 矮牵牛素-3-O- β -吡喃葡萄糖苷 7. 反式三萜素 A; 8. 反式白藜芦醇; 9. ϵ -葡萄糖素; 10. 葡萄糖素 B; 11. 还须多酚。Note: 1. Trans-caftaric; 2. Catechin; 3. Quercetin-3-O-galactoside; 4. Epicatechin; 5. Quercetin;

6. Petunidin-3-O- β -glucopyranoside; 7. Trans-scirpusin A; 8. Trans-resveratrol; 9. ϵ -Viniferin; 10. Vitisin B; 11. Miyabenol C.

2.2 化合物变化规律及机制

通过 HPLC 对放置第 0、2、5、10、15、20、48、80 天的样品进行含量检测, 结果如图 3 所示, 在整个放

置过程中发现 8 个化合物的含量发生明显变化。结合图 1 中化合物的保留时间分析, 这 8 个化合物分别为反式咖啡酸 (trans-caftaric acid)、儿茶素 (cate-

chin)、表儿茶素(epicatechin)、槲皮素(querctin)、反式白藜芦醇(trans-resveratrol)、 ϵ -葡萄素(ϵ -viniferin)、葡萄素B(vitisin B)、还龄多酚(miyabenol C)。对于这8个化合物,通过计算单位质量葡萄藤(干重)各化合物对应的液相色谱图中的峰面积(S)来表示其相对含量,其中横坐标表示葡萄藤放置时间(天),纵坐标表示化合物相对含量(S/g),绘制各化合物含量随放置时间变化趋势图,结果如图4和5所示。

3 讨论

结果发现葡萄藤中8个化合物的含量随放置时间发生了明显变化,但变化规律不尽相同,变化规律可分为两种类型,第一类为反式咖啡酸、儿茶素、表儿茶素、槲皮素4种化合物,其中反式咖啡酸属于苯丙素类化合物,后三种属于黄酮类化合物。4种化合物含量随放置时间的增加都呈下降趋势,结果如图4所示;第二类为反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素、葡萄素B、还龄多酚4种化合物,这4种化合物均属于芪类化合物,为白藜芦醇及其低聚物,其含量变化规律为在放置前期,化合物含量显著上升,达到一定时期后含量开始下降,变化规律如图5所示。

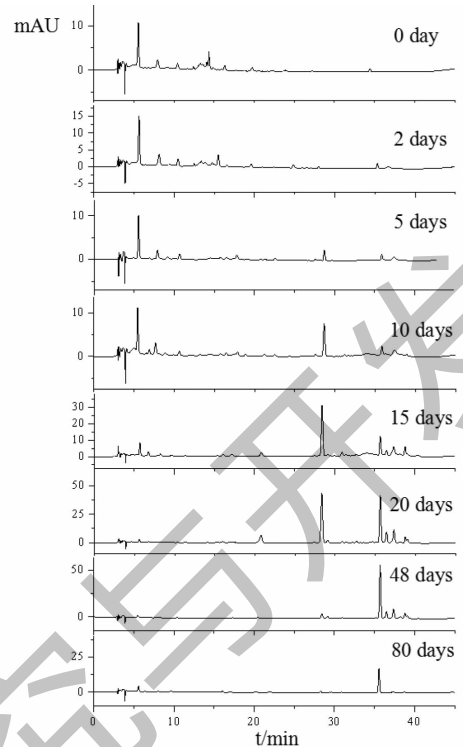


图3 葡萄藤放置不同天数时其中化合物的变化情况

Fig. 3 Changes of compounds in grapevines during different days of storage

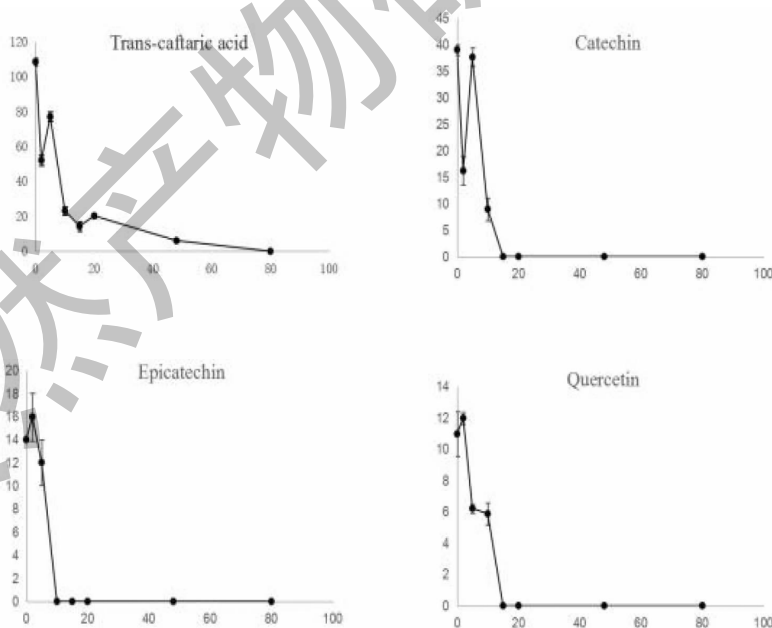


图4 葡萄藤放置过程中 trans-caftaric acid、catechin、epicatechin、quercetin 含量变化趋势图

Fig. 4 Trends of trans-caftaric acid, catechin, epicatechin and quercetin contents in grapevine during storage

在第一种现象中,反式咖啡酸含量随放置时间的增加呈下降趋势,反式咖啡酸属于苯丙素类化合物,

是葡萄植株中黄酮类化合物与芪类化合物的生物合成途径中的合成前体物质,黄酮类化合物与芪

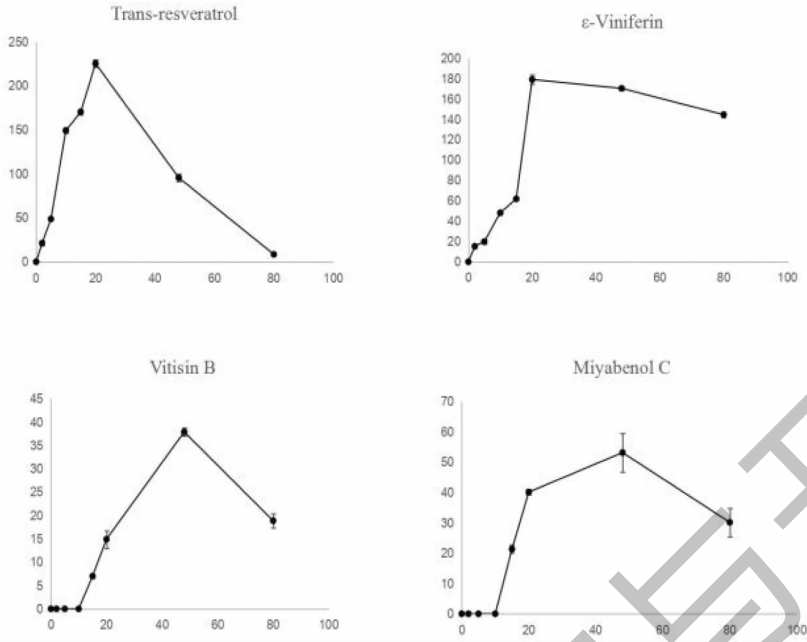


图5 葡萄藤放置过程中 trans-resveratrol、 ϵ -viniferin、vitisin B、miyabenol C 的含量变化趋势图

Fig. 5 Trends of trans-resveratrol, ϵ -viniferin, vitisin B and miyabenol C contents in grapevine during storage

类化合物生源合成途径如图6所示^[26]。葡萄藤的采收后,在一定时间内相当于对其造成机械损伤及生理干旱,都属于逆境胁迫过程,此时植物体内大量合成植物抗毒素来抵御逆境,而芪类化合物就属于植物抗毒素之一,因此葡萄藤中启动了芪类化合物的合成。反式咖啡酸作为芪类化合物的合成前体物质被大量消耗,导致反式咖啡酸含量急剧降低。在生源合成途径中, tetraketide intermediate 是葡萄植株中黄酮类化合物和芪类化合物生源合成的共同底

物,当调控底物的合成基因为 chalcone synthase (CHS)时合成黄酮类化合物,当调控底物的合成基因为 stilben synthase (STS)时合成芪类化合物^[27],并且 CHS 基因与 STS 基因之间存在竞争关系^[28]。STS 基因属于抗逆基因,当葡萄藤在逆境胁迫下,调控芪类化合物合成的 STS 基因表达量上升,因此调控黄酮类化合物合成的 CHS 基因表达量下降,使得黄酮类化合物无法继续合成,葡萄藤中原有的黄酮类化合物 (catechin、epicatechin、quercetin) 发生自然

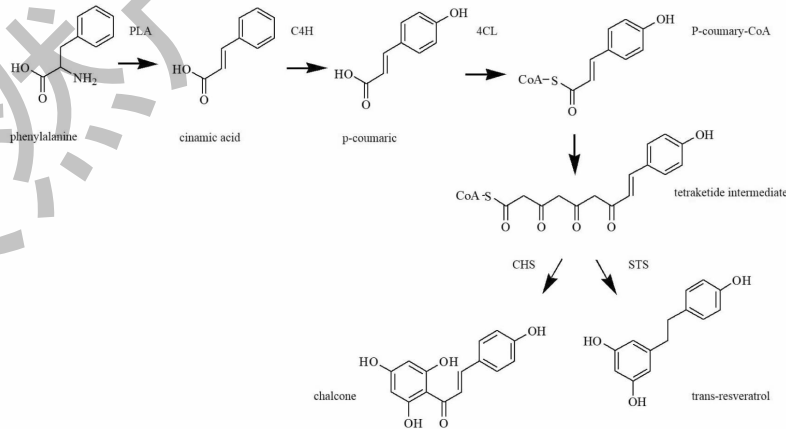


图6 葡萄中黄酮化合物与芪类化合物合成途径

Fig. 6 Synthetic pathways of flavonoids and stilbenes in grapes

注: PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸4-羟化酶; 4CL: 香豆酸辅酶 A 连接酶; CHS: 查尔酮合酶; STS: 二苯乙烯合酶。

Note: PAL: phenylalanine ammonia-lyase; C4H: cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate; CHS: chalcone synthase; STS: stilben synthase.

降解导致含量下降,因此 catechin、epicatechin、quercetin 在放置过程中含量逐渐降低,到第 15 天左右时基本完全降解,结果如图 4 所示。

对于第二种现象,在之前的研究中发现葡萄藤在放置过程中反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素含量表现出先上升再下降的现象,并且反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素在鲜样中含量极低,但是在第二天这两种化合物含量几乎上升了十几倍,白藜芦醇作为一种植物抗毒素在植物处于逆境时会大量产生用于保护自身。在葡萄藤的采收后前 20 天内的放置过程相当于对其造成机械损伤及生理干旱,并且此时葡萄藤生命并未完全终止,因此体内抗逆基因表达量上升引起白藜芦醇含量上升^[29];当放置到 20 天左右含量达到最高,分别约为鲜样的 250 倍与 190 倍。在本次研究中发现含量变化与之相类似的还有葡萄素 B、还龄多酚两种化合物,从结构上看这两种化合物也属于芪类化合物,都是以白藜芦醇分子为基本单位的不同聚合体,分别为白藜芦醇的三聚体和四聚体。两种化合物作为白藜芦醇的聚合体,在鲜样中含量几乎为零,如图 5 所示,在放置第 10 天时葡萄素 B、还龄多酚含量开始上升,白藜芦醇作为聚合体的合成底物,白藜芦醇含量上升为聚合物合成提供充足的底物。此时反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素在第 10~15 天期间含量上升速率不如前 10 天,由此可知从第 10 天开始反式白藜芦醇、 ϵ -葡萄素正在聚合为葡萄素 B、还龄多酚。在葡萄藤放置 20 天后白藜芦醇与 ϵ -葡萄素含量开始下降,在此期间葡萄藤生命还未完全终止,但是由于采收后的葡萄藤中合成白藜芦醇的前体物质消耗殆尽,无法再继续合成白藜芦醇和葡萄素导致白藜芦醇与 ϵ -viniferin 含量开始下降;而对于葡萄素 B、还龄多酚来说,此时葡萄藤中已经累积了大量白藜芦醇与 ϵ -葡萄素,白藜芦醇作为葡萄素 B、还龄多酚的聚合底物,在 20 天后仍可继续合成聚合物,葡萄素 B、还龄多酚含量继续上升,一直到 50 天左右后,此时的葡萄藤已经完全干枯,生命完全终止,因此葡萄素 B、还龄多酚的生物合成也已终止,葡萄素 B、还龄多酚含量开始下降。葡萄藤干枯后,各种化合物产生自然降解,由于物质的稳定性不同,每种化合物含量下降的速率也不尽相同,白藜芦醇作为其它三种化合物的合成底物,所以后期降解速率最快直到完全消失。

夏黑葡萄藤在放置过程中,苯丙素类化合物(trans-caftaric acid)与黄酮类化合物(catechin、epi-

catechin、quercetin)在第二天或第五天含量略有起伏,推测应该为植物体的应激反应。对于葡萄藤放置一段时间后其中芪类化合物含量显著上升的现象,主要是由于在葡萄藤采收后 20 天左右枝蔓生命并未完全终止,在此期间枝蔓受到机械损伤和干旱的环境胁迫,刺激到调控植物抗毒素即芪类化合物合成的的基因表达量上升,以至于芪类化合物含量上升。实验中发现白藜芦醇的三聚体(vitisin B)和四聚体(miyabenol C)在新鲜材料中基本不存在,是在放置过程中产生的新化合物,这为 vitisin B 和 miyabenol C 开发利用提供了新的途径。由于 8 个化合物的标准品不易制得,本研究没有采用标准品进行各化合物定量分析,在后续研究中将继续进行标准品的制备和绝对定量分析,同时将进行葡萄藤枝蔓放置过程中蛋白和芪类化合物关键控制基因的表达分析,进一步确定各类化合物的转化机制。

葡萄藤是葡萄酒工业及葡萄鲜食产业的废弃物,常规处理(焚烧堆肥)往往会造成资源浪费、利用率低下,葡萄藤中含有多种活性成分,活性成分种类及含量与葡萄的品种有关,白藜芦醇是葡萄植株中的一种特征化合物,具有较高的利用价值,通过将废弃的葡萄藤枝蔓放置后会引引起白藜芦醇及其低聚物含量升高,达到开发利用其活性成分的目的,是一种理想的生物综合利用方式。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 及 HPLC 两种现代分析方法从化学成分含量变化规律的角度,以白藜芦醇为考察重点,结合白藜芦醇的生源合成途径,揭示了葡萄藤剪枝放置过程中芪类化合物的变化规律和变化机制,为废弃葡萄藤枝蔓综合利用提供了理论依据。

参考文献

- 1 Zhang KK, Cheng CY, Xu WD, et al. Development and prospect of summer black in China[J]. Sino-overseas Grapevine & wine(中外葡萄与葡萄酒), 2017, 6:57-59.
- 2 Kong QS. Chinese grape flora(中国葡萄志)[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Publishing House, 2004.
- 3 Guerrero RFBB. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes[J]. Ind Crop Prod, 2016, 94:884-892.
- 4 Ji M, Li Q, Ji H, et al. Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC-DAD-MS/MS[J]. Food Chem, 2014, 142(3):61-65.
- 5 Caillaud M, Guillard J, Richard D, et al. Trans epsilon

- viniferin decreases amyloid deposits and inflammation in a mouse transgenic alzheimer model[J]. *PLoS One*, 2019, 14: e212663.
- 6 Chuang YC, Chen SD, Hsu CY, et al. Resveratrol promotes mitochondrial biogenesis and protects against seizure-induced neuronal cell damage in the hippocampus following status epilepticus by activation of the PGC-1 α signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:998-1014.
- 7 Kim DU, Nam J, Cha MD, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4D decreases the malignant properties of DLD-1 colorectal cancer cells by repressing the AKT/mTOR/Myc signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17:3589-3598.
- 8 Chalons P, Amor S, Courtaut F, et al. Study of potential anti-inflammatory effects of red Wine extract and resveratrol through a modulation of interleukin-1-beta in macrophages[J]. *Nutrients*, 2018, 10:1856-1873.
- 9 Lucini L, Baccolo G, Rouphael Y, et al. Chitosan treatment elicited defence mechanisms, pentacyclic triterpenoids and stilbene accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) bunches[J]. *Phytochemistry*, 2018, 156:1-8.
- 10 Xie HQ, Yang XX, Zeng JG. Influence of different pretreatment methods on stilbenoids in grapevine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2014, 45:3553-3558.
- 11 Xie HQ, Liu FB, Yang XX, et al. General law of dynamic accumulation of resveratrol and viniferin in grape[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2012, 24:1079-1083.
- 12 Sánchez-Gomez R, Zalacain A, Alonso GL, et al. Effect of toasting on non-volatile and volatile vine-shoots low molecular weight phenolic compounds[J]. *Food Chem*, 2016, 204:499-505.
- 13 Liu GQ, Dong J, Wang H, et al. ESI fragmentation studies of four tea catechins[J]. *Chem J Chin Univ(高等学校化学学报)*, 2009, 30:1566-1570.
- 14 Lei YP, Yin S. Simultaneous determination of catechin and epicatechin in kuiyangling tablets by RP- HPLC[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报)*, 2008, 14:108-109.
- 15 Liang NN, He F, Bi HQ, et al. Evolution of flavonols in berry skins of different grape cultivars during ripening and a comparison of two vintages[J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235:1187-1197.
- 16 En QX, Gui FD, Ya JG, et al. Biological activities of polyphenols from grapes[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11:622-646.
- 17 Eduardo PB, Akoh CC, Subramani S, et al. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes[J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51:5497-5503.
- 18 Li YH, Dai HX, Wang MM, et al. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry[J]. *J Chin Mass Spectr Soc(质谱学报)*, 2009, 30:374-378.
- 19 Lambert M, Meudec E, Verbaere A, et al. A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rose wines[J]. *Molecules*, 2015, 20:7890-7914.
- 20 Liu Y, Li Y, Zhao LB, et al. Study on the fragmentation pathways of 4 kinds of resveratrol compounds by ESI-MSN[J]. *Chin Pharm(中国药房)*, 2013, 1:33-36.
- 21 Hurtado-Gaitán E, Sellés-Marchart S, Martínez-Márquez A, et al. A focused multiple reaction monitoring(MRM) quantitative method for bioactive grapevine stilbenes by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ) [J]. *Molecules*, 2017, 22:418-433.
- 22 Yin X, Yu J, Kong Q, et al. Mechanism of isomers and analogues of resveratrol dimers selectively quenching singlet oxygen by UHPLC-ESI-MS2[J]. *Food Chem*, 2017, 237:1101-1111.
- 23 Jia Y, Jian RQ, Ling LZ, et al. Using the relative abundance of characteristic product ions in UHPLC-ESI-QTOF-MS² methods to identify isomers of resveratrol oligomers in extracts of XinJiang winegrape stems [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1096:88-94.
- 24 Sáez V, Pastene E, Vergara C, et al. Oligostilbenoids in vitis vinifera L. Pinot noir grape cane extract: isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells[J]. *Food Chem*, 2018, 265:101-110.
- 25 Keylor MH, Matsuura BS, Stephenson CR. Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products[J]. *Chem Rev*, 2015, 115:8976-9027.
- 26 Chong J, Poutaraud A, Huguency P. Metabolism and roles of stilbenes in plants[J]. *Plant Sci*, 2009, 177:143-155.
- 27 Tropf S, Kärcher B, Schröder G, et al. Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase(stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:7922-7928.
- 28 Billet K, Houillé B, Besseau S, et al. Mechanical stress rapidly induces *E*-resveratrol and *E*-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct[J]. *Food Chem*, 2018:1022-1027.
- 29 Kiselev KV, Dubrovina AS, Veselova MV, et al. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells[J]. *J Biotechnol*, 2007, 128:681-692.