

顶空固相微萃取-气相色谱质谱 分析蓝莓粗提物中的挥发性成分

陈燕¹,孙晓红^{1,*},孙国伟¹,任硕²,赵勇¹,Vivian C H Wu³,潘迎捷¹

(1.上海海洋大学食品学院,上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心,
农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海),上海 201306;

2.上海出入境检验检疫局,上海 200135;

3.美国缅因大学食品科学与人类营养系,美国缅因州 04469)

摘要:通过醇提法提取中国栽培蓝莓品种中的活性物质,采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱法(HS-SPME-GC-MS)分析了蓝莓粗提物中的挥发性成分,利用面积归一化法定量组分含量。检测出37个化学成分,鉴定了其中的33个化学成分。其中醇类化合物占24.15%,其次是烷烃类化合物,占17.05%,烯烃类化合物占13.61%,酯类化合物占11.97%,还有8.80%的苯和苯酚类化合物,醛、酸、酮类化合物分别为8.79%、8.21%与7.42%。

关键词:蓝莓,挥发性成分,固相微萃取,气相色谱,质谱

Analysis of the volatile chemical composition of blueberry (*Elliott*) extracts by HS-SPME-GC-MS method

CHEN Yan¹, SUN Xiao-hong^{1,*}, SUN Guo-wei¹, REN Shuo², ZHAO Yong¹, Vivian C H Wu³, PAN Ying-jie¹

(1.College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

2.Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China;

3.Department of Food Science and Human Nutrition, the University of Maine. 5735HitchnerHall, Orono, ME 04469, USA)

Abstract: The active substances of Chinese culture blueberry varieties (*Elliott*) were extracted by ethanol, and its volatile components were analyzed by Head Space Solid Phase Micro-extraction Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The peak area normalization method was used for quantitative analysis. 37 chemical composition were detected, and 33 chemical composition were identified. Alcohol (24.15%), alkane (17.05%), olefin (13.61%), ester (11.97%), benzene and phenol (8.80%), aldehydes (8.79%), acid (8.21%) and ketone (7.42%) were included in the 33 kinds of compound.

Key words: blueberry (*Elliott*); volatile compounds; solid phase microextraction; gas chromatogram; mass spectrum

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)20-0078-04

蓝莓为杜鹃花科越桔属多年生落叶或常绿灌木,果实呈蓝色,外披一层白色果粉,其果肉细腻,酸甜可口,营养丰富,具有独特的香气。研究表明,蓝莓中含有花青苷(花青素、酚配基与糖的结合体)、绿原酸、黄酮素、亚麻油酸、蝶二苯乙烯(紫檀芪)、白藜芦醇等生物活性成分^[1],其药用、经济价值远高于其他各类水果。目前,对于蓝莓天然活性物质的研究主要集中在花青素等酚酸类物质及挥发性香气成分方面。已有研究报道,采用静态顶空和气相色谱-质谱

联用技术,分别从高丛和半高丛越橘果实的香气成分中检测出了67种和39种挥发性成分^[2-3],但未对蓝莓醇提物中的挥发性成分进行分析。研究表明,多数植提物的挥发性物质具有生物活性功能,如唇形科植物罗勒(*ocimum*)能散发出强烈气味,在非洲被广泛用于驱赶蚊蝇^[4],且从罗勒提炼出来的原油可用于消灭昆虫^[5]。茛苳、大蒜的挥发物在特定的条件下可抑制微生物的生长^[6]。柠檬萜(limonene)、蒎萜(pinene)、樟脑(camphor)、长叶薄荷酮(pulegone)等还会对其他植物的生长产生抑制作用^[7]。因此,对于植提物中挥发性天然产物的研究已经逐渐成为国际上的研究热点。

目前,对蓝莓粗提物中化学组分的研究主要通过HPLC、电子吸收光谱法、质谱及核磁共振等方法。有研究报道,已从杜克蓝莓果实中鉴定出32种挥发

收稿日期:2013-04-09 * 通讯联系人

作者简介:陈燕(1988-),女,硕士研究生,研究方向:天然产物研究与开发。

基金项目:上海市科委部分地方院校能力建设项目(11310501100);上海市教育委员会科研创新项目(11YZ159)。

油成分^[9],而对蓝莓粗提取物中挥发性物质的相关研究在国内还鲜有报道。顶空固相微萃取是一种简单快速的提取技术,已被用于蔬菜、水果、中药和酒类等样品中挥发性成分的提取^[9]。此法样品消耗量少、测定结果可靠、方法便捷、不需溶剂且能实现自动化操作,因此常被用于药物挥发性成分的定性分析。本研究通过醇提法提取中国栽培蓝莓(Elliott)品种中的化学物质,采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱法(HS-SPME-GC-MS)分析蓝莓粗提取物中的挥发性成分,并利用面积归一化法定量其组分含量,以期对蓝莓粗提取物中各单一成分生物功能的研究及蓝莓资源的进一步开发利用提供重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物样品 中国栽培高丛蓝莓品种冻果Elliott,购于上海瑞沃农业科技有限公司;蒸馏水 MILLI-PURE;无水乙醇 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

6890N-5975B气质联用仪 美国Agilent公司;手动进样手柄 美国Supelco公司;萃取头 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS(二乙烯苯/聚乙二醇/聚二甲基硅氧烷)高度交联萃取头,金属合金1cm,美国Supelco公司;8010S组织匀浆机 Waring Commercial, USA; DF-10IS集热式恒温加热磁力搅拌器 河南省巩义市予华仪器有限责任公司;旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司;台式离心机 Eppendorf Centrifuge 5810R;超声波清洗机 上海科导超声仪器有限公司。

1.2 蓝莓粗提取物制备

准确称取蓝莓冻果20.0g,用微波炉快速解冻,倒入组织匀浆机中粉碎3min,加入75%乙醇200mL,用超声波清洗机30℃提取25min,用4000r/min室温离心30min,布氏漏斗过滤,收集滤液,45℃旋转蒸发40min至完全蒸干,加入20mL蒸馏水^[10]。浓度为1g/mL,存放于4℃冰箱备用。

1.3 GC-MS检测

1.3.1 不同萃取温度下蓝莓粗提取物的SPME萃取 取1.5mL处理后的蓝莓粗提取物入15mL顶空瓶中,室温下平衡20min,加入磁搅拌子,以SPME针管插入顶空瓶的硅橡胶瓶垫,伸出50/30 μ m DVB/CAR/PDMS萃取头,使之与蓝莓粗提取物液面保持1.5cm距离,同时打开磁力搅拌器,分别在45、50、55、60℃下吸附30min。待吸附完毕,取出插入GC-MS进样口,250℃解析5min,热脱附进行GC-MS检测。

1.3.2 GC-MS参数分析 色谱柱:DB-5ms柱(60.0 μ m $\times$ 320 μ m $\times$ 1.00 μ m)。

色谱条件:SPME萃取头解析5min,进样口温度250℃,载气为高纯氦气,不分流。

程序升温:起始温度50℃,保持2min;以10℃/min的速度升至140℃,保持2min;再以5℃/min的速度升至180℃,保持5min;随后以8℃/min的速度升至230℃,保持2min;最后以15℃/min的速度升至250℃,保持1min。

质谱条件:电子轰击(EI)离子源,电子能量为70eV,灯丝发射电流为200 μ A,离子源温度为200℃,接口温度为250℃,检测器电压为350V。

1.3.3 定性及定量方法 定性:质量扫描为全扫描模式,挥发性成分通过NIST MS Search 2.0谱库确认定性。定量:采用面积归一化法,计算每种物质的相对百分含量。

2 结果与分析

2.1 蓝莓粗提取物中的主要挥发性成分的总离子流图

由图1中,蓝莓粗提取物在45、50、55、60℃的SPME萃取温度条件下,经GC-MS检测得到的总离子流图表明,萃取温度不同,所得到的挥发性成分也不同。50℃萃取温度下所得的挥发性成分较45、55、60℃多。萃取温度对SPME的影响具有双重效应:通常升高温度,液体分子热运动加快,有利于分析物在基质中的扩散(提高分析物在顶空中的分配),缩短平衡时间、加快分析速度;但温度过高会使分析物在涂层与基质中的分配系数降低,涂层对分析物的吸附量减小,影响SPME法的灵敏度。因此50℃萃取温度最佳,可最大限度吸附挥发性成分。

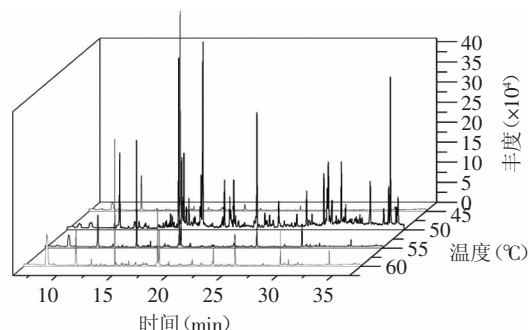


图1 蓝莓粗提取物在不同萃取温度下挥发性成分的总离子流色谱图

Fig.1 Total ion current chromatograms of the volatile compounds of blueberry extracts at different extraction temperature

2.2 蓝莓粗提取物的化学成分分析

采用质谱软件(Agilent MSD Configuration)和NIST MS Search 2.0谱库检索,结合人工谱图解析,并查对有关质谱资料和相关文献,确定了50℃的SPME萃取温度下,蓝莓粗提取物中挥发性物质的主要化学

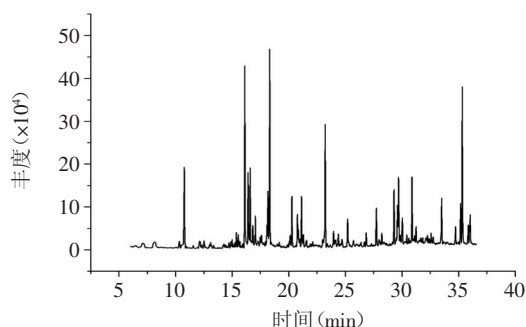


图2 蓝莓粗提取物在50℃下挥发性成分的总离子流色谱图

Fig.2 Total ion current chromatograms of the volatile compounds of blueberry extracts at 50℃

表1 50℃的SPEM萃取温度下蓝莓粗提取物中的主要挥发性成分
Table 1 Volatile constituents of blueberry extracts at the extraction temperature of 50℃

序号	化合物	保留时间(min)	峰宽	峰面积	匹配度(%)	相对含量(%)
1	氨基甲酰肼	4.285	0.132	4337263	62.2	3.76
2	N-甲基牛磺酸	4.681	0.137	4884862	21.2	4.24
3	乙醇	5.145	0.060	1597647	89.7	1.39
4	辛醛	15.537	0.055	1076010	82.0	0.93
5	2-乙基己醇	16.113	0.049	13835625	62.6	12.00
6	1,4-二氯苯	16.405	0.062	7078309	41.1	6.14
7	二戊烯	16.595	0.050	5963027	18.8	5.17
8	桉树醇	16.818	0.073	2636836	66.9	2.29
9	2,5-二甲基苯甲醛	17.051	0.055	2748319	61.4	2.38
10	(2,3,5,8)-四甲基癸烷	18.066	0.055	1620802	5.91	1.41
11	芳樟醇	18.160	0.049	4015863	45.9	3.48
12	正十一醛	20.121	0.059	1156675	8.01	1.00
13	1,7,7-三甲基-二环[2,2,1]庚-2-酮	20.276	0.056	4224758	32.9	3.66
14	硬脂酸	20.767	0.051	2565976	11.6	2.22
15	二十二烷基酸二十二烷基酯	20.844	0.060	1713504	7.50	1.49
16	癸醛	21.128	0.052	4106645	54.2	3.56
17	松油醇	21.300	0.055	1068383	19.9	0.93
18	十三烷	23.949	0.061	1454433	13.4	1.26
19	2-丁基辛醇	24.379	0.069	1347890	5.34	1.17
20	十二烷二酸	25.197	0.058	2022585	65.1	1.75
21	2,6,10-三甲基十二烷	26.848	0.064	1349745	20.7	1.17
22	十四烷	27.743	0.057	3199924	25.7	2.77
23	十二醛	28.224	0.059	1056126	7.95	0.92
24	长叶烯	29.609	0.061	3681130	17.7	3.19
25	柏木烯	29.704	0.058	6060168	37.9	5.25
26	十四烷	30.891	0.050	5191624	10.3	4.50
27	2,4-二叔丁基苯酚	31.252	0.057	1581681	33.5	1.37
28	十九烷	33.515	0.057	4158945	14.2	3.61
29	十九烷	34.736	0.059	1587317	8.28	1.38
30	柏木脑	35.183	0.055	3332312	59.3	2.89
31	癸酸癸酯	35.338	0.051	12088592	11.7	10.48
32	对仲丁基-2,6-二叔丁基苯酚	35.854	0.053	1493060	48.6	1.29
33	十九烷	35.966	0.042	1094972	7.53	0.95

成分(见图2),并按峰面积归一化法确定各组分在挥发性物质中的相对含量,结果见表1。

蓝莓粗提取物的挥发性成分中共检测到37种化合物,得出其中33种化学成分占化合物总数的89.19%,主要由醇、烷烃、酯、醛、酮等组成,其中醇类化合物含量最高,为24.15%,而醇类化合物中又以2-乙基己醇含量最高,为12.00%。其次是烷烃和烯烃类物质,分别为17.05%与13.61%。烷烃中含量较高的是十九烷与十四烷。酯类化合物含量为11.97%,苯和苯酚化合物含量为8.80%,还含有一定量的醛类(8.79%)、酸类(8.21%)和酮类化合物(7.42%)。

在检测出的33种化合物中,醇类、醛类和烯烃类的化合物中含有独特的香气成分。其中醇类中的桉树醇、芳樟醇、松油醇的含量较高,是天然香精香料

的成分。芳樟醇具有优美清甜的花香香气,是蓝莓重要的呈味物质^[11]。部分醇类物质虽不是蓝莓的主要香气成分,但对蓝莓香气的形成也起到重要作用,如具醇甜香的乙醇等。辛醛、癸醛、十一醛和十二醛具青香和果香味,与果实的成熟特征香气密切相关。十二醛具有紫罗兰的香气^[12],十一醛稀释后有玫瑰香、花香和甜橙香气,可用作花香香精抽变稠剂,用于化妆品、皂用香精中。烯烃类化合物中,长叶烯与柏木烯含量也较多,长叶烯是天然香料,而柏木烯具柏木和檀香香气,这使蓝莓具备了独特果香。

蓝莓粗提取物中还含有一些独特的挥发性成分,使其具有独特的化学性质。其中1,4-二氯苯具有樟脑气味,二氯苯是农药、医药、香料、工程塑料等的重要中间体,也是优良的杀菌、消毒、除臭剂,常被用作

杀虫剂和防腐剂^[13]。二十二烷基酸二十二烷基酯, 别称樟脑, 可用于杀虫止痒, 消肿止痛。而柏木脑则被大量用作消毒剂, 也是卫生用品增香剂, 这使蓝莓具有一定抑菌作用。现有研究表明, 矮丛蓝莓可抑制食源性致病菌的正常生长, 对益生菌则有保护作用^[14]。同时, 研究还发现越橘属植物的蓝莓对体外革兰氏阳性细菌、阴性细菌和酵母菌有抑制活性作用^[15]。挥发物中的2,4-二叔丁基苯酚, 常被用作抗氧化剂, 稳定剂, 是紫外线吸收剂的中间体。仲丁基-2,6-二叔丁基苯酚是抗氧化剂和抗氧化剂中间体, 使得蓝莓具有明显的抗氧化作用。

挥发性成分中的烷烃阈值较高, 因此烷烃对于蓝莓整体的风味贡献很小^[16]。化合物中还含有一些独特的物质, 共同构成了蓝莓的独有特点。苯甲醛是由苦杏仁苷、李苷在 β -糖苷酶作用下产生, 李苷、苦杏仁苷多存在于蔷薇科植物中, 有苦杏仁味。含量过高会影响蓝莓的甜香、果香味, 从而产生不利影响。酯类物质具有特殊的甜香、醚香, 对蓝莓香气成分的形成也起到关键作用。

3 讨论

小浆果类果实中的挥发性成分以醇类、酯类、萜类等化合物为主^[17]。对高丛越橘果实挥发性成分研究也显示, 这三类物质是高丛越橘果实中最主要的挥发性化合物, 并且高丛越橘品种多数都以醇类和酯类物质为主^[2]。本实验显示, 醇类和酯类也是蓝莓粗提物挥发性成分的重要组成成分。同时在蓝莓的粗提物中还存在着松油醇等萜类物质, 这些物质是广泛分布于生物界的一类天然产物, 具有较高的抗氧化活性, 可延缓衰老, 增强免疫力。植物的萜类物质通过甲羟戊酸(MVA)途径和2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径合成, 在萜类合酶的作用下合成萜类物质^[18]。蓝莓中含有的萜类物质, 也与蓝莓具有较高的抗氧化能力有关。

蓝莓果实中化学成分的生物功能, 尤其是保健功能, 现已引起了人们的广泛关注, 但由于其多酚类化合物的系统研究水平所限, 研究工作尚不够深入; 对于蓝莓果实中挥发性组分的研究也仅限于电子鼻、GC-MS等仪器分析水平之上, 使近年来对于挥发性组分的研究无法有较大突破。相信随着现代生物技术与医学研究手段的不断发展, 对蓝莓果实中酚酸类物质、挥发性组分的功能分析与生物学研究将会踏入一个全新的阶段。

4 结论

本文采用顶空固相微萃取与气质联用法分析蓝莓粗提物中的挥发性成分与含量, 具有快速、准确、可靠等特点。通过比较不同萃取温度下获得的挥发性组分的种类, 得出50℃为本研究的最佳萃取温度。在该萃取温度下可最大限度吸附挥发性成分, 有利于对蓝莓粗提物中挥发性组分作进一步分析。蓝莓粗提物中的挥发性物质主要为构成蓝莓独特香气成

分的物质, 以及一些含量较丰富的二氯苯、柏木脑和一些酚酸类物质等, 这些物质使蓝莓具有独特的功能特性, 如抗氧化活性和抑菌作用等。本研究为蓝莓的进一步开发利用提供了一定的参考依据。

参考文献

- [1] 陈介甫, 李亚东, 徐哲, 等. 蓝莓的主要化学成分及生物活性[J]. 药学学报, 2010, 45(4): 422-429.
- [2] 张春雨, 李亚东, 陈学森, 等. 高丛越橘果实香气成分的GC/MS分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 187-194.
- [3] 张春雨, 李亚东, 陈学森, 等. 半高丛越橘果实香气成分的GC-MS分析[J]. 果树学报, 2009, 26(2): 235-239.
- [4] Palsson K, Jaenson T G T. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa[J]. Acta Tropica, 1999, 72: 39-52.
- [5] Keita S M, Vincent C, Schmit J, et al. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) [J]. Journal of Stored Products Research, 2000, 15: 355-364.
- [6] Tirranen I L S, Borodina E V, Ushakova S A, et al. Effect of volatile metabolites of dill, radish and garlic on growth of Bacteria [J]. Acta Astronautica, 2001, 49(2): 105-108.
- [7] 谷文祥, 段舜山, 骆世明. 萜类化合物的生态特征及其对植物的化感作用[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19: 108-112.
- [8] 王健美, 冯蕾, 冀海伟, 等. 气相色谱-质谱法分析杜克蓝莓果实挥发油的化学成分[J]. 精细化工, 2008, 25(6): 580-582.
- [9] Luna G, Aparicio R, Garcia-Gonzalez D L. A tentative characterization of white dry-cured hams from Teruel (Spain) by SPME-GC[J]. Food Chemistry, 2006, 97(4): 621-630.
- [10] 谢庆超, 孙晓红, 沈潇, 等. 蓝莓提取物对溶血性弧菌的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 1094-1097, 1108.
- [11] 马永昆, 白洁, 魏本喜, 等. 基于SPME-GC-MS的超高压处理黑莓汁香气分析[J]. 农业机械学报, 2011, 42(7): 170-175.
- [12] 梁忠云, 李桂珍. 重质松节油中长叶烯的分离和提纯[J]. 香精香料化妆品, 2009, 12(6): 34-36.
- [13] 石瑛, 杜青平, 李砧. 1,4-二氯苯对小白菜种子萌发和幼苗的毒性[J]. 环境科学研究, 2011, 24(10): 1178-1184.
- [14] Alison L, Vivian C H, Seth T, et al. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010: 102-107.
- [15] Becker. Hank anticancer activity found in berry extracts[J]. Agricultural Research, 2001, 49(5): 22-28.
- [16] Toldra F, Flores M, Sanz Y. Dry-cured ham flavour: enzymatic generation and process influence[J]. Food Chemistry, 1997, 59(4): 523-530.
- [17] 郭琳, 于泽源, 李兴国. 几种小浆果挥发性成分研究概述[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 611-617.
- [18] 杨涛, 曾英. 植物萜类合酶研究进展[J]. 云南植物研究, 2005, 27(1): 1-10.