

# 枸杞果实发育阶段类胡萝卜素的变化

李浩霞<sup>1</sup>, 尹 跃<sup>2</sup>, 安 巍<sup>2</sup>, 赵建华<sup>2\*</sup>, 王亚军<sup>2</sup>

(1. 宁夏农林科学院 荒漠化治理研究所, 宁夏 银川 750002; 2. 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

**摘要:**以3种果实颜色不同品种宁杞1号、宁夏黄果和黑果枸杞为试验材料,采用高效液相色谱法测定枸杞果实类胡萝卜素的总含量,并对枸杞果实发育阶段的类胡萝卜素进行定性定量分析。结果表明:果实成熟时,‘宁杞1号’、‘宁夏黄果’、‘黑果枸杞’果实颜色存在明显差异,分别呈现红色、黄色和黑色。‘宁杞1号’和‘宁夏黄果’果实类胡萝卜素总量随着果实颜色加深逐渐增加,而‘黑果枸杞’则逐渐减低。枸杞果实5个发育阶段均含有类胡萝卜素5个主要成分,即新黄质、叶黄素、玉米黄素、β-胡萝卜素和β-隐黄质,其中‘宁杞1号’和‘宁夏黄果’以玉米黄素所占比例最大,而‘黑果枸杞’以新黄质所占比例最大。‘宁杞1号’和‘宁夏黄果’果实中玉米黄素、β-隐黄质和β-胡萝卜素随着果实发育逐渐增加,‘黑果枸杞’果实中新黄质随着果实发育逐渐增加。

**关键词:**枸杞;类胡萝卜素;发育阶段

**中图分类号:**S718.43      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2015)06-0139-04

Changes of Carotenoids Accumulation of *Lycium barbarum* during Fruit Development

LI Hao-xia<sup>1</sup>, YIN Yue<sup>2</sup>, AN Wei<sup>2</sup>, ZHAO Jian-hua<sup>2\*</sup>, WANG Ya-jun<sup>2</sup>

(1. Desertification Control Research Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002, China; 2. National Wolfberry Engineering Research Center, Yinchuan, Ningxia 75002, China)

**Abstract:** Taking 3 cultivars/species of *Lycium barbarum*, namely, Ningqi No. 1, *L. barbarum* var. *auranticarpum* and *L. ruthenicum* as materials, the contents of carotenoids in the fruit were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The qualitative and quantitative analyses were conducted on the carotenoids in the fruit at five developmental stages. Differences in color of matured fruit were significant among 3 cultivars, red for Ningqi No. 1, yellow for *L. barbarum* var. *auranticarpum* K. and black for *L. ruthenicum*. Along with the development of fruit, the contents of carotenoids gradually increased in Ningqi No. 1 and *L. barbarum* var. *auranticarpum*, however gradually decreased in *Lycium ruthenicum*. Five carotenoids were found in the fruit of 3 cultivars: neoxanthin, xanthophyll, zeaxanthine, β-cryptoxanthin and β-carotene. The contents of zeaxanthine, β-cryptoxanthin and β-carotene gradually increased in Ningqi No. 1 and *L. barbarum* var. *auranticarpum* during fruit development, and the content of neoxanthin in *L. ruthenicum* was higher than those of other two cultivars/species.

**Key words:***Lycicum barbarum*; carotenoid; fruit development stage

宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)是我国最重要的传统名贵药材之一,其果实富含丰富功能活性成分,如类胡萝卜素、类黄酮、甜菜碱和枸杞多糖等多种营养成分<sup>[1-3]</sup>,这些功能活性成分具有抗癌、抗衰老、提

高免疫系统、视觉保护及减少心血管疾病发生等在人类健康中起到重要作用<sup>[4-6]</sup>。枸杞类胡萝卜素的研究一致引起人们广泛关注,L. Q. Zhao<sup>[7]</sup>等研究来自不同地区30份中国枸杞玉米黄素含量表明,宁

收稿日期:2015-01-12 修回日期:2015-03-04

基金项目:宁夏自治区特色优势产业育种专项(2013NYYZ0101)。

作者简介:李浩霞,女,农艺师,研究方向:旱作农业栽培与生理。E-mail:lihaoxia0951@163.com

\*通信作者:赵建华,男,副研究员,研究方向:枸杞种质创新与遗传改良。E-mail:zhaojianhua0943@163.com

夏地区枸杞玉米黄素含量最高,其含量高于  $1\text{ 500 mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。然而,人体自身内不能合成类胡萝卜素,依靠获取外界食物获得。因此,从自然界需找天然高类胡萝卜素含量植物资源显得尤为重要。本研究将 3 种类型果实颜色 5 个发育阶段作为研究切入点,在前人对宁夏枸杞类胡萝卜素提取方法研究基础上<sup>[1,7]</sup>,采用 HPLC 法研究枸杞鲜果果实发育阶段类胡萝卜素变化,以进一步了解枸杞果实发育过程中类胡萝卜素变化特点,探索枸杞果实类胡萝卜素的积累与转化规律,为今后枸杞品质育种及产品深加工提供依据。

## 1 材料与方法

试验于 2013—2014 年在宁夏农林科学院国家枸杞工程技术研究中心贮藏保鲜加工实验室进行。

### 1.1 试验材料

材料均由国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃( $106^{\circ}09'10''\text{E}, 38^{\circ}38'49''\text{N}$ )提供。以枸杞果实 3 种典型的颜色“红、黄、黑”为代表的“宁杞 1 号”、“宁夏黄果”和“黑果枸杞”3 个品种为试材,分别采摘 3 个品种的 5 个不同发育时期:青果期(M1)、变色期(M2)、绿熟期(M3)、黄熟期(M4)、红熟期(M5)。将样品液氮冷冻后 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.2 主要仪器及试剂

所用的仪器有美国安捷伦公司生产的高效液相色谱仪 Agilent1260,天津科技发展公司生产的氮吹仪 HSB-12B,上海亚荣生化仪器厂生产的旋转蒸发仪 RE-52AA 和循环水真空泵 SHZ-Ⅲ,昆山市超声仪器有限公司生产的超声波清洗器 KQ32000E,上海一恒科学仪器有限公司生产的电热鼓风干燥箱 DHG-9240。试剂有:四氢呋喃、氯化钠、无水硫酸钠、石油醚、氢氧化钾和 BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)均为国产分析纯,购自银川伟博鑫生物科技有限公司;丙酮、甲醇、二氯甲烷和乙腈均为 HPLC 级别,购自美国的 MREDA 科技公司;标准品新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -隐黄质和  $\beta$ -胡萝卜素购自 Sigma 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的制备 精密称取一定量新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -隐黄质和  $\beta$ -胡萝卜素标准品。用二氯甲烷溶解标准品,配制以  $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混标溶液为标准储备溶液,制备  $0.002\text{--}0.005\text{--}0.01\text{--}0.05\text{--}0.1\text{--}0.2\text{--}0.4\text{--}0.5\text{--}0.7\text{--}0.8\text{--}1.0\text{--}2.0\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $5.0\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准使用液,过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  有机滤头,备用。

1.3.2 类胡萝卜素总量测定 采用紫外分光光度计法测定枸杞不同发育阶段鲜果类胡萝卜素总量测定方法和含量计算参考张志宁等的方法<sup>[8]</sup>。

1.3.3 枸杞类胡萝卜素制备与纯化 参考曹有龙等<sup>[9]</sup>方法略改进,具体步骤如下:称取枸杞鲜果  $10\text{ g}$  于液氮中研磨,加入  $150\text{ mL}$  的四氢呋喃(含  $0.01\%$  BHT),在超声功率为  $7\text{ W}$ ,频率为  $4\text{ Hz}$  条件下提取  $45\text{ min}$ ,重复 2 次;合并提取上清液,用滤纸过滤, $35^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发至  $30\text{ mL}$ ;再加入  $150\text{ mL}$  石油醚和  $2.5\text{ g}$  氯化钠倒入分液漏斗中,用纯净水洗有机溶液至中性( $\text{pH}=7$ )。有机相再用滤纸过滤, $35^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发至  $30\text{ mL}$ ,加入  $30\text{ mL}$   $10\%$  KOH-甲醇溶液至  $100\text{ mL}$  棕色容量瓶中,充入  $\text{N}_2$ ,避光皂化  $12\text{ h}$ ;皂化完倒入  $250\text{ mL}$  分液漏斗,并在加入  $50\text{ mL}$  石油醚和  $5\text{ g}$  氯化钠,再次用纯净水洗有机溶液中性( $\text{pH}=7$ ), $35^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸干,残渣用二氯甲烷溶解,最后定容于  $10\text{ mL}$  棕色瓶中,提取液过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  有机滤头,备用。每个样重复 3 次。

1.3.4 HPLC 分析 应用 Agilent1260 液相系统和 YMC-C30 类胡萝卜素分析柱,流动相由 A 相(75% 甲醇,25% 水和 0.1% 三乙胺)和 B 相(70% 丙酮,5% 二氯甲烷和 25% 甲醇)组成。洗脱程序为:  $0\text{--}4\text{ min}$  由  $100\%$  A 组成; $5\text{--}9\text{ min}$  梯度改变为  $75\%\text{A+25\%B}$ ; $10\text{--}11\text{ min}$  梯度改为  $50\%\text{A+50\%B}$ ; $12\text{--}14\text{ min}$  梯度改  $35\%\text{A+65\%B}$ ; $15\text{--}34\text{ min}$  梯度改变为  $15\%\text{A+85\%B}$ ; $35\text{--}45\text{ min}$  梯度改变为  $100\%\text{B}$ 。柱温恒定于  $25^{\circ}\text{C}$ ,流速为  $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量为  $25\text{ }\mu\text{L}$ ,检测波长为  $450\text{ nm}$ 。类胡萝卜素峰的鉴定通过标样保留时间确认。

### 1.4 数据分析

采用 Excel2013 和 SPSS21.0 进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准工作曲线

根据标准品的 HPLC 色谱图的峰面积的大小,在合适的标样浓度范围内制作标准曲线。标准曲线方程、检测限及相关系数结果(表 1)可知,新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -隐黄质和  $\beta$ -胡萝卜素线性相关系数依次为  $0.999\text{ 9}$ 、 $0.999\text{ 4}$ 、 $0.998\text{ 3}$ 、 $0.998\text{ 8}$  和  $0.996\text{ 0.5}$  种标准品在浓度范围内进样量与峰面积均呈良好线性关系。

### 2.1 类胡萝卜素组分测定

HPLC 测定结果(表 2)表明,新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -隐黄质和  $\beta$ -胡萝卜素等是枸杞果实类胡萝卜素的 5 个主要成分(图 1)。

表1 5种标准品的回归方程、检测限和相关系数

Table 1 Regression equation, limit of detection and  $R^2$  of five standard samples

类胡萝卜素	回归方程	线性范围/( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	最低检测限/( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	相关系数 $R^2$
新黄质	$Y = 0.7409 \times 10^{-5}X - 3.8945$	0.0099 ~ 0.0590	0.0020	0.9999
叶黄素	$Y = 1.6655 \times 10^{-5}X - 23.497$	0.0100 ~ 0.0600	0.0062	0.9994
玉米黄素	$Y = 0.4412 \times 10^{-5}X - 10.344$	0.0118 ~ 0.0708	0.0053	0.9983
$\beta$ -隐黄质	$Y = 1.0299 \times 10^{-5}X - 16.889$	0.0072 ~ 0.0432	0.0014	0.9988
$\beta$ -胡萝卜素	$Y = 0.7927 \times 10^{-5}X - 19.833$	0.0071 ~ 0.0426	0.0007	0.9960

表2 枸杞类胡萝卜素组分及保留时间

Table 2 Carotenoids composition and retention time of wolfberry fruit

峰号	类胡萝卜素	保留时间/min
1	新黄质	18.032
2	叶黄素	20.013
3	玉米黄素	20.881
4	$\beta$ -隐黄质	25.553
5	$\beta$ -胡萝卜素	31.641

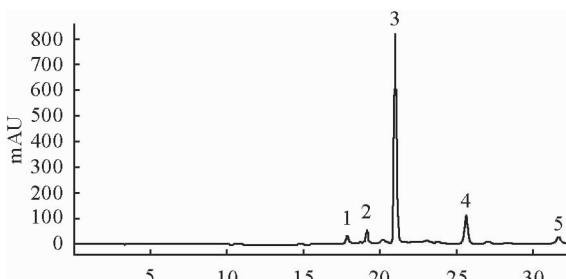
注:1~5分别为新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -隐黄质和 $\beta$ -胡萝卜素。

图1 宁杞1号果实成熟时期色谱图

Fig. 1 Chromatogram of Ningqi No. 1 matured fruit

### 2.3 类胡萝卜素总含量在发育阶段变化

枸杞果实类胡萝卜素总含量随着生长发育阶段不断变化,不同品种间差异变化较大。其中以黑果枸杞的果实在发育阶段类胡萝卜素总含量表现为逐渐降低,果实成熟时达到最小值;宁夏黄果和宁杞1号果实在整个发育时期类胡萝卜素总含量表现为逐渐增加,都在果实成熟时期达到最大值。果实成熟时,宁杞1号果实类胡萝卜素含量最高,为 $10528.03 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ,约是宁夏黄果和黑果枸杞之和的3倍。其次是宁杞黄果( $3427.26 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  FW),最低的为黑果枸杞( $320.41 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  FW)。宁夏黄果果实类胡萝卜素总含量约是黑果枸杞的10倍(图2)。

### 2.4 类胡萝卜素各组分在发育阶段变化

在枸杞果实生长发育过程中,其果实类胡萝卜素的主要成分含量因品种不同表现出差异性。3个枸杞品种的5种类胡萝卜素成分变化分成4种类型。

玉米黄素和 $\beta$ -隐黄质含量在宁杞1号和黄果枸杞中,随着果实的生长发育逐渐增加。成熟时期,宁

杞1号和黄果枸杞均以玉米黄素所占比例最大,宁杞1号、黄果枸杞果实的玉米黄素占5个类胡萝卜素成分总含量的比例分别为88.4%、89.7%。

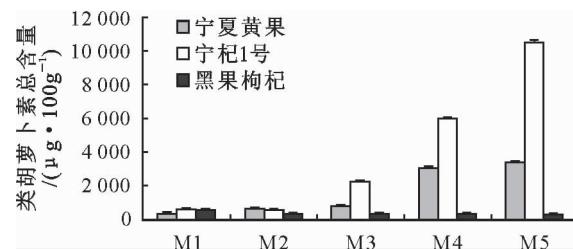


图2 枸杞果实类胡萝卜素总含量的比较

Fig. 2 Comparison of the carotenoids content in wolfberry fruit

新黄质含量在黑果枸杞中,随着果实的生长发育逐渐增加,而在宁杞1号和黄果枸杞中随着果实生长发育逐渐减低。成熟时期,黑果枸杞新黄质所占比例最大,新黄质占5个类胡萝卜素成分含量的比例为82.9%。

叶黄素含量在3个品种中随着果实生长发育总体呈现出下降趋势。在青果期,叶黄素含量最大,3个品种中宁杞1号含量最高为 $166.1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ,而成熟期含量最低,3个枸杞中黑果枸杞含量最低为 $10.47 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ 。(4) $\beta$ -胡萝卜素在3个品种变化表现不一,宁杞1号在5个发育时期变化趋势不明显,黄果枸杞在变色期含量最高为 $475.810.47 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ,而黑果枸杞在成熟期含量最低为 $18.81 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (表3、表4和表5)。

### 3 结论与讨论

宁杞1号和宁夏黄果果实中富含新黄质、叶黄素、玉米黄素、 $\beta$ -胡萝卜素和 $\beta$ -隐黄质5种类胡萝卜素成分;在果实逐渐成熟时期,类胡萝卜素总含量达到最大值,并且 $\beta$ -胡萝卜素所占比例最大,其中宁杞1号 $\beta$ -胡萝卜素含量约是宁夏黄果和黑果枸杞的之和2倍,说明枸杞果实颜色差异可能与 $\beta$ -胡萝卜素因子这种色素合成有关,与其他物种<sup>[10-13]</sup>研究结果相吻合,即随着果实发育至成熟时期类胡萝卜素总含量在不断增加,果实颜色由绿色变为黄色或红色。但是,黑果枸杞在果实发育过程中,类胡萝卜素含量



- in China[J]. Environmental Entomology, 2014, 43(3):605-611.
- [18] WANG Z, SU X M, WEN J, et al. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids[J]. Insect Science, 2014, 21(3):313-325.
- [19] 张洪勋,王晓谊,齐鸿雁.微生物生态学研究方法进展[J].生态学报,2003,23(5):988-995
- ZHANG H X, WANG X Y, QI H Y. Development in research methods of microbiology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(5):988-995. (in Chinese)
- [20] ZHANG G X, CHEN X L. Studies on the phylogeny and host plant association of Lachnidae (Homoptera: Aphidinea) [J]. Entomologia Sinica, 2008, 6(3):193-208.
- [21] 张翔,刘思源,徐小军,等.五种林木蚜虫的RAPD分析[J].西北林学院学报,2006,21(1):105-106.
- ZHANG X, LIU S Y, XU X J, et al. RAPD analysis of five forest aphid species[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(1):105-106. (in Chinese)
- [22] HE H, CHEN Y Y, ZHANG Y L, et al. Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr[J]. Environmental Entomology, 2011, 40(6):1405-1409.
- [23] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
- [24] CHEN D Q, MONTLLOR C B, PURCELL A H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* and the blue alfalfa aphid *A. kondoi*[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000, 95(3):315-323.
- [25] MONTLLOR C, MAXMEN A, PURCELL A H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress[J]. Ecological Entomology, 2002, 27(2):189-195.
- [26] RUSSELL J A, MORAN N A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2006, 273(1586):603-610.
- [27] OLIVER K M, MORAN N A, HUNTER M S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(36):12795-12800.
- [28] KOGA R, TSUCHIDA T, FUKATSU T. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2003, 270(1533):2543-2550.
- [29] KOGA R, TSUCHIDA T, SAKURAI M, et al. Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(2):229-239.
- [30] LAMELAS A, GOSALBES M J, MANZANO-MARÍN A, et al. *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont [J]. Plos Genetics, 2011, 7(11):e1002357.
- [31] BURKE G R, NORMARK B B, FAVRET C, et al. Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16):5328-5335.

## (上接第142页)

- [9] 曹有龙,刘兰英,李晓莺,等.枸杞鲜果类胡萝卜素超声提取工艺优化及光稳定性[J].食品研究与开发,2014,35(5):20-22.
- CAO Y L, LIU L Y, LI X Y, et al. Ultrasonic extraction technology and stability to light of carotenoids in wolfberry fruit[J]. Food Research and Development, 2014, 35(5):20-22. (in Chinese)
- [10] 戴雄泽,王利群,陈文超,等.辣椒果实发育过程中果色与类胡萝卜素的变化[J].中国农业科学,2009,42(11):4004-4011.
- DAI X Z, WANG L Q, CHEN W C et al. Changes of fruit colors and carotenoids contents during the development of pepper fruit[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2009, 42(11):4004-4011. (in Chinese)
- [11] 颜少宾,张好艳,马瑞娟,等.黄肉桃果实发育阶段类胡萝卜素的变化[J].果树学报,2013,30(2):260-266.
- YAN S B, ZHANG Y Y, MA R J et al. Changes of carotenoids composition of yellow peach during fruit development [J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(2):260-266. (in Chinese)
- [12] 杨祥燕,蔡元保,孙光明.菠萝果肉颜色的形成与类胡萝卜素组分变化的关系[J].果树学报,2010,27(1):135-139.
- YANG X Y, CAI Y B, SUN G M. Relationship between color formation and change in composition of carotenoids in flesh of pineapple fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(1):135-139. (in Chinese)
- [13] 陶俊,张上隆,张良诚,等.柑橘果皮颜色的形成与类胡萝卜素组分变化的关系[J].植物生理与分子生物学学报,2003,29(2):121-126.
- TAO J, ZHANG S L, ZHANG L C et al. Relationship between color formation and change in composition of carotenoids in peel of citrus fruit[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(12):121-126. (in Chinese)
- [14] 郑静,丁晶,王玲,等.野生**Lycium ruthenicum** Murr.中花青素的组成和抗氧化活性[J].食品化学,2011,126(3):859-865.
- ZHENG J, DING C, WANG L, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Chemistry, 2011, 126(3):859-865.
- [15] 郝峰鸽,杨立峰,周秀梅.4种彩叶植物生长期色素含量研究[J].西北林学院学报,2006,21(6):63-65.
- HAO F G, YANG L F, ZHOU X M. Studies on contents of pigments in the leaves of four color-leaved plants in their growth period [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(6):63-65. (in Chinese)