

覆盆子中指标成分时空分布特征及其加工工艺优化研究

李小白¹, 金水丰², 邵若玄³, 金亮¹, 罗来印⁴, 付顺华⁵, 王玉萍⁶, 姜玲^{6*}

1. 浙江省农业科学院, 浙江 杭州 310021
2. 杭州市农业技术推广中心(杭州市植保植检中心), 浙江 杭州 310020
3. 嵊州市农业技术推广中心, 浙江 绍兴 312400
4. 淳安县永印家庭农场, 浙江 杭州 311700
5. 浙江农林大学, 浙江 杭州 311300
6. 淳安县农业农村发展服务中心, 浙江 杭州 311700

摘要: 目的 探究覆盆子 *Rubus chingii* 中药用指标成分山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和鞣花酸的时空分布特征, 基于优化加工工艺提高其含量。方法 采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱成像(MALDI-TOF IMS)技术对覆盆子果实进行成像分析, 并用HPLC法测定覆盆子鲜果及日晒、烘干处理后药材的指标成分山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和鞣花酸含量。结果 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷主要分布于果实外层, 鞣花酸及其前体富集于果托, 两者均在青果中含量最高, 并随着果实成熟而逐渐下降。与烘干相比, 日晒工艺使鞣花酸含量显著增加68.71%, 但山柰酚-3-*O*-芸香糖苷含量降低41.30%。120℃蒸汽回润30min后干燥可有效提升鞣花酸含量, 且对山柰酚-3-*O*-芸香糖苷及药材品相无显著负面影响。结论 覆盆子指标成分的组织特异性分布是加工过程中含量变化的关键因素, 适时采收青果并优化加工工艺(短时蒸汽回润)可协同提升药材质量。

关键词: 覆盆子; 山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 鞣花酸; 加工工艺; 质谱成像

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3163-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.027

Study on spatiotemporal distribution characteristics of index components and processing technology optimization in *Rubus chingii*

LI Xiaobai¹, JIN Shuifeng², SHAO Ruoxuan³, JIN Liang¹, LUO Laiyin⁴, FU Shunhua⁵, WANG Yuping⁶, JIANG Ling⁶

1. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China
2. Hangzhou Agricultural Technology Extension Center (Hangzhou Plant Protection and Quarantine Center), Hangzhou 310020, China
3. Shengzhou Agricultural Technology Extension Center, Shaoxing 312400, China
4. Chun'an Yongyin Family Farm, Hangzhou 311700, China
5. Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China
6. Chun'an Agricultural and Rural Development Service Center, Hangzhou 311700, China

Abstract: Objective To investigate the spatiotemporal distribution characteristics of kaempferol-3-*O*-rutinoside and ellagic acid, the medicinal marker components of *Rubus chingii*, and optimize the processing technology to improve their contents based on the findings. **Methods** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight imaging mass spectrometry (MALDI-TOF IMS) was used for imaging analysis of *R. chingii* fruits, and high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed for quantitative determination of the marker components in fresh fruits and medicinal materials processed by different technologies. **Results** Kaempferol-3-*O*-rutinoside was mainly distributed in the outer layer of the fruit, while ellagic acid and its precursors were enriched in the receptacle. Both components exhibited the highest content in green fruits and gradually decreased with fruit ripening. Compared with oven-drying, the sun-drying process significantly increased ellagic acid content by 68.71% but reduced kaempferol-3-*O*-rutinoside content by 41.30%. Drying after

收稿日期: 2025-10-06

基金项目: 杭州市农业产业技术专家团队项目(202407TD17)

作者简介: 李小白, 男, 博士, 副研究员, 主要从事覆盆子和蓝莓等高价值保健水果的研究。E-mail: hufanfan1982815@outlook.com

*通信作者: 姜玲, 女, 高级经济师, 主要从事中药材技术推广。E-mail: 670613241@qq.com

steam moistening at 120 °C for 30 min followed by drying effectively improved ellagic acid content without significant negative impacts on kaempferol-3-*O*-rutinoside content or the appearance of medicinal materials. **Conclusion** The tissue-specific distribution of the marker components in *R. chingii* is a key factor affecting their content changes during processing. Timely harvesting of green fruits and optimization of processing technology (short-time steam moistening) can synergistically improve the quality of medicinal materials.

Key words: *Rubus chingii* Hu; kaempferol-3-*O*-rutinoside; ellagic acid; processing technology; mass spectrometry imaging

掌叶覆盆子 *Rubus chingii* Hu 作为一种药食同源的传统中药材,是悬钩子属 *Rubus* 中唯一被《中国药典》收录的品种^[1],在中医药理论中具有益肾固精缩尿^[2]、养肝明目之功效,常用于治疗肾虚遗尿、阳痿早泄等症^[3]。现代药理学研究表明,覆盆子富含萜类、黄酮类、酚酸类及多糖等多种生物活性成分,具有抗氧化、抗炎^[4]、抗肿瘤及免疫调节等多种药理活性^[5]。为确保临床用药的有效性和安全性,《中国药典》2025年版对覆盆子药材的质量控制提出了明确要求,规定了2种指标性成分的最低含量:鞣花酸(ellagic acid, EA)不得少于0.20%,山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(kaempferol-3-*O*-rutinoside, K3R)不得少于0.03%^[6]。EA及其前体鞣花酸(ellagitannins, ETs)具有显著的抗氧化、抗炎及抗癌活性^[7],而K3R作为一种黄酮苷,在抗炎、神经保护等方面也显示出巨大潜力^[7]。因此,这2种成分的含量是评价覆盆子药材质量的核心标准。

然而,在实际生产中,覆盆子药材的指标成分含量常因采收时期和加工方式的不同而产生巨大波动,尤其是EA含量,传统加工方法(如烘干)处理的商品药材常难以达到药典标准^[10]。尽管已有研究表明,蒸汽回润或发酵等后处理技术能够提升EA含量,但这些方法往往耗时较长,且可能导致药材色泽变黑、其他有效成分降解,甚至引发微生物污染,影响药材的整体质量和商品价值(即“品相”)。目前,对于如何高效、稳定地提升指标成分含量,同时保持药材优良外观的研究尚不深入。特别是,这些化学成分在果实内部的微观分布特征,及其如何影响加工过程中的转化与降解,这一关键科学问题仍未得到清晰的阐释。因此,本研究运用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱成像(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight imaging mass spectrometry, MALDI-TOF IMS)技术结合高效液相色谱(HPLC)定量分析,旨在探究EA和K3R在覆盆子果实不同发育阶段和组织部位的时空分布特征;系统比较不同初加工(日晒、烘干)与再加工(陈化、蒸汽回润)工艺对2种指标成分

含量的影响,并阐明成分分布特征影响加工效果的内在机制。研究最终目的在于建立一套兼顾成分提升与品相保持的优化加工方案,为覆盆子药材的标准化生产提供理论依据与技术支撑。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品于2023年采自浙江省金华义乌市凯诚农业科技基地,由任江剑研究员鉴定为覆盆子 *R. chingii* Hu 的鲜果。根据果实外观颜色和大小,分为4个典型成熟阶段:绿果期(mature green, MG)、绿黄期(green-yellow, GY)、黄果期(yellow, YE)和红熟期(red, RE)。各阶段采集样品均设置3个生物学重复,采后立即用液氮速冻,并于-70 °C超低温冰箱中保存备用。

1.2 试剂

对照品EA(批号B21073)、K3R(批号B21133)质量分数均大于98%,购自上海源叶生物科技有限公司。甲醇、乙腈、正丁醇、石油醚均为色谱纯(Merck KGaA),磷酸为分析纯,实验用水为Milli-Q超纯水。

1.3 仪器

CM1950型冷冻切片仪(徕卡显微系统,德国韦茨拉尔有限公司);timsTOF flex质谱成像系统原型机(德国布鲁克道尔顿公司);HPLC色谱仪(配备2695四元泵/2996二极管阵列检测器,Waters公司)。

2 方法

2.1 原位质谱分析

采用冷冻切片仪在-20 °C条件下,2%羧甲基纤维素(CMC)包埋冷冻果实,将冷冻果实切片至30 μm厚度,切片过程中滴加3滴蒸馏水。随后,将组织切片分组置于涂有氧化铟锡(ITO)的导电载玻片上,并将载有组织切片的载玻片置于真空干燥器中干燥30 min。

样本上机前-80 °C储存,上机前处理用干燥器抽真空脱水,然后用烤片机将玻片表面水分蒸干。将干燥后的组织切片置于ITO玻璃载玻片上,使

用基质喷涂仪喷涂质量浓度为 15 mg/mL 的 2,5-二羟基苯甲酸 (DHB) 溶液 (溶剂为 90%乙腈与 10%水的混合液)。喷涂仪温度设定为 60 °C, 体积流量为 0.1 mL/min, 压力为 68.95 kPa。对载玻片进行 25 次基质喷涂, 每次喷涂后干燥 5 s。

采用质谱成像系统进行 MALDI-TOF IMS 分析。该系统配备 10 kHz 智能光束 3D 激光器。激光功率设定为 85%, 并在整个实验过程中保持不变。质谱数据在正离子模式下采集, 质量范围设定为 m/z 50~1 300。组织成像的空间分辨率设定为 50 μm , 每个光谱包含 400 次激光照射。MALDI 质谱数据采用均方根法进行归一化处理, 各图像中的信号强度以归一化强度显示。

在 TimsTOF flex 质谱系统的 MS/MS 模式下进行 MS/MS 碎裂分析, 用于对已鉴定代谢物进行进一步详细结构确认。在质谱峰中, 选择强度较高的目标峰 (MS, 一级谱) 进行二次碎裂, 以获取二级谱 (MS/MS, 二级碎裂谱)。采集的二级谱用于通过自建数据库和公共数据库进行物质鉴定。若无法采集到二级谱, 则根据 MS 一级谱中物质的一级相对分子质量 (在 1×10^{-5} 误差范围内) 进行物质鉴定。

2.2 指标成分的测定

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液为 15:85, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm (EA), 344 nm (K3R), 柱温 30 °C。EA 和 K3R 的对照品和供试品 (MG 期果实) HPLC 色谱图, 见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 EA 和

K3R 的对照品适量, 加甲醇超声溶解并定容, 并用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 最终制得质量浓度 EA 为 0.228 4 mg/mL, K3R 为 0.105 0 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 供试品溶液 1 (测定 EA 使用): 取 0.5 g 果实粉末, 加入 70%甲醇 50 mL, 回流提取 60 min, 以 70%甲醇补足质量损失。滤过并适当稀释后, 取 20 μL 提取液注入 HPLC 系统检测。供试品溶液 2 (测定 K3R 使用): 取 1 g 果实粉末, 加入 50 mL 70%甲醇回流提取 60 min, 以 70%甲醇补足质量损失。滤过后, 将 25 mL 提取液蒸馏浓缩, 所得残渣用 20 mL 水重新溶解。用 20 mL 石油醚对水溶液进行 3 次萃取, 然后用 20 mL 水饱和正丁醇对上清液再进行 3 次萃取。将正丁醇蒸馏除去, 将剩余残渣重新溶解于 5 mL 甲醇中, 提取液注入 HPLC 系统检测。

2.2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液, 分别为 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 以峰面积为横坐标 (X), 对照品质量分数为纵坐标 (Y), 计算 EA 和 K3R 的线性回归方程。EA 的标准曲线为: $Y=14.258 1 X-177.671 6$, $R^2=0.999 2$, 线性范围为 0.011 4~0.228 4 mg/mL; K3R 标准曲线为: $Y=2.854 3 X-2.442 0$, $R^2=0.999 8$, 线性范围为 0.005 3~0.105 0 mg/mL。

2.2.5 精密度试验 分别取供试品溶液 1 和供试品溶液 2 (MG 期果实), 连续进样 6 次测定 EA 和 K3R 峰面积。结果 EA 峰面积的 RSD 为 1.2%, K3R 峰面积的 RSD 为 1.5%。

2.2.6 稳定性试验 分别取供试品溶液 1 和供试品溶液 2 (MG 期果实), 分别于 0、2、4、8、12、24 h

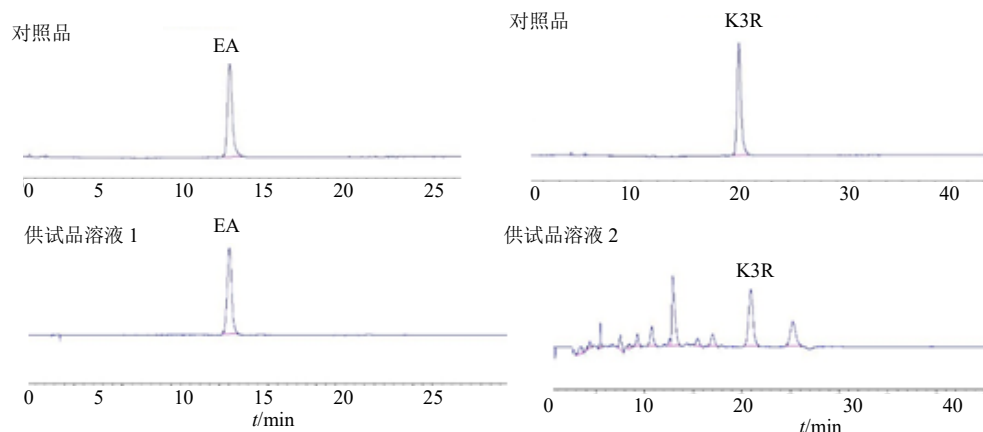


图 1 对照品 EA、K3R 溶液和供试品溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances EA, K3R solution and sample solution

进样测定。EA 和 K3R 峰面积的 RSD 分别为 1.8% 和 2.1%。

2.2.7 重复性试验 取同一批次的 MG 期果实粉末 6 份, 分别制备供试品溶液 1 和供试品溶液 2 并进行测定。EA 质量分数的 RSD 为 2.0%, K3R 质量分数的 RSD 为 2.3%, 表明该方法重复性良好, 符合定量分析要求。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定含量的同一批次果实粉末 6 份, 制备供试品溶液 1 和供试品溶液 2, 分别精密加入一定量的 EA 和 K3R 对照品(加入量约为样品含量的 100%), 分别制备供试品溶液 1 和供试品溶液 2 并进行测定。分别计算 EA 和 K3R 的加样回收率, EA 的平均回收率为 98.5%, RSD 为 2.1%; K3R 的平均回收率为 97.8%, RSD 为 2.5%。结果表明该方法准确度良好, 满足定量分析要求。

2.3 不同加工方式

2.3.1 不同干燥方式 (1) 日晒发酵: 日出时进行晾晒, 晚上堆垛阴干(相当于发酵), 重复 3 d 左右, 直至水分含量 < 12%。(2) 烘干方式: 前期烘干 65 °C、2 h; 50 °C、3 h; 40 °C、5 h; 35 °C、5 h; 60 °C、2 h, 直至水分含量 < 12%。

2.3.2 蒸汽回润与再干燥 将日晒干燥后的覆盆子置于容器中, 温度约为 120 °C, 快速回润, 持续 10~40 min, 使药材吸水湿润。(1) PP1 处理: 蒸 10 min; (2) PP2 处理: 蒸 20 min; (3) PP3 处理: 蒸 30 min; (4) PP4 处理: 蒸 40 min; (5) PP5 处理: 蒸 50 min。自封袋 50 °C、12 h。然后将覆盆子置于烘干设备中二次烘干, 烘干温度为 60 °C, 直至水分含量 < 12%, 得到加工后的覆盆子药材。

2.3.3 仓储陈化 将日晒干燥后的覆盆子, 参照《中国药典》2025 年版通则关于中药材的贮藏要求, 置于常温(15~25 °C)、避光、干燥的专用库房中(相对湿度控制在 35%~75%)进行仓储陈化。分别于第 1、2、3 年取样, 进行指标成分测定。

2.4 数据统计分析

所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义; 多重比较采用 LSD 方法进行统计学检验。

3 结果与分析

3.1 指标成分的时空分布特征

覆盆子为聚合果, 由多个小核果聚合着生于一个果托上构成。利用质谱成像(MALDI-TOF IMS)

技术, 成功地对覆盆子果实中的 K3R 和 EA/ETs 进行了原位可视化分析。在 IMS 中, 紫色、红色、黄色、绿色、蓝色到黑色, 按此顺序依次表示物质丰度的高低梯度。

在果实中鉴定出 3 种主要的山柰酚糖苷类物质, 分别为烟花苷(m/z : 471.090 3[M+Na]⁺)、紫云英苷(K3R)(m/z : 617.148 2[M+Na]⁺)和山柰酚-3-*P*-香豆酰基葡萄糖苷(银椴苷)(m/z : 594.137 4, [M+K]⁺) (图 2-A)。成像结果表明, 山柰酚糖苷物质在小核果的含量高于其在果托中的含量, 随着果实的成熟, 从 MG 期到 RE 期, 山柰酚苷类物质在整个果实中的含量呈现持续下降的趋势(图 2-B、C)。在整个果实成熟期, K3R 在小核果的丰度皆略高于果托。

IMS 清晰地显示, 这些山柰酚糖苷物质主要分布于果实的外层组织。无论是在小核果还是果托中, 其信号强度均在外表皮区域达到峰值, 并向内部组织迅速递减, 这一特征贯穿于整个果实发育周期(图 2-B)。例如, 在 MG 期, 小核果外层中 K3R 的相对丰度(160.67)是其内部(33.47)的近 5 倍(图 2-C), 其他时期的小核果外层也是类似特征。山柰酚糖苷物质也聚集于果托最外层(即小核果和果托交界处), 其他时期的果托外层也是类似特征(图 2-B)。例如, 在 MG 期, 果托外层 K3R 的相对丰度(154.16)是其内部(31.80)的近 5 倍(图 3-C)。从更小的维度观察, 山柰酚糖苷物质主要聚集于小核果和果托的最外层。

在 IMS 中还鉴定到了 EA(m/z : 340.970 0[M+K]⁺)及其前体物质—多种 ETs, 如木麻黄鞣亭(m/z : 959.076 7[M+Na]⁺)、甲基-(*S*)-黄酮醇没食子酸甲酯(m/z : 522.991 5[M+K]⁺)和木麻黄素(m/z : 823.042 2[M+K]⁺) (图 3-A)。与山柰酚苷的分布模式截然不同, EA/ETs 物质高度富集于果托中。在 MG 期, 果托中 EA 的相对丰度(15.94)是小核果(4.88)的 3 倍以上。在整个果实成熟过程中, 果托始终是 EA/ETs 积累的主要部位(图 3-B)。同样地, 这些成分的含量也随着果实的成熟而逐渐降低。

3.2 鲜果及药材中指标成分的定量分析

为验证 IMS 的半定量结果, 采用 HPLC 法对不同成熟期覆盆子鲜果的小核果和果托对其指标成分 K3R 和 EA 分别进行测定, 结果见图 4。果实成熟过程中, K3R 和 EA 2 种成分均在 MG 期含量最高, 随着果实的成熟, 其含量持续下降, 至 RE 期含量已下

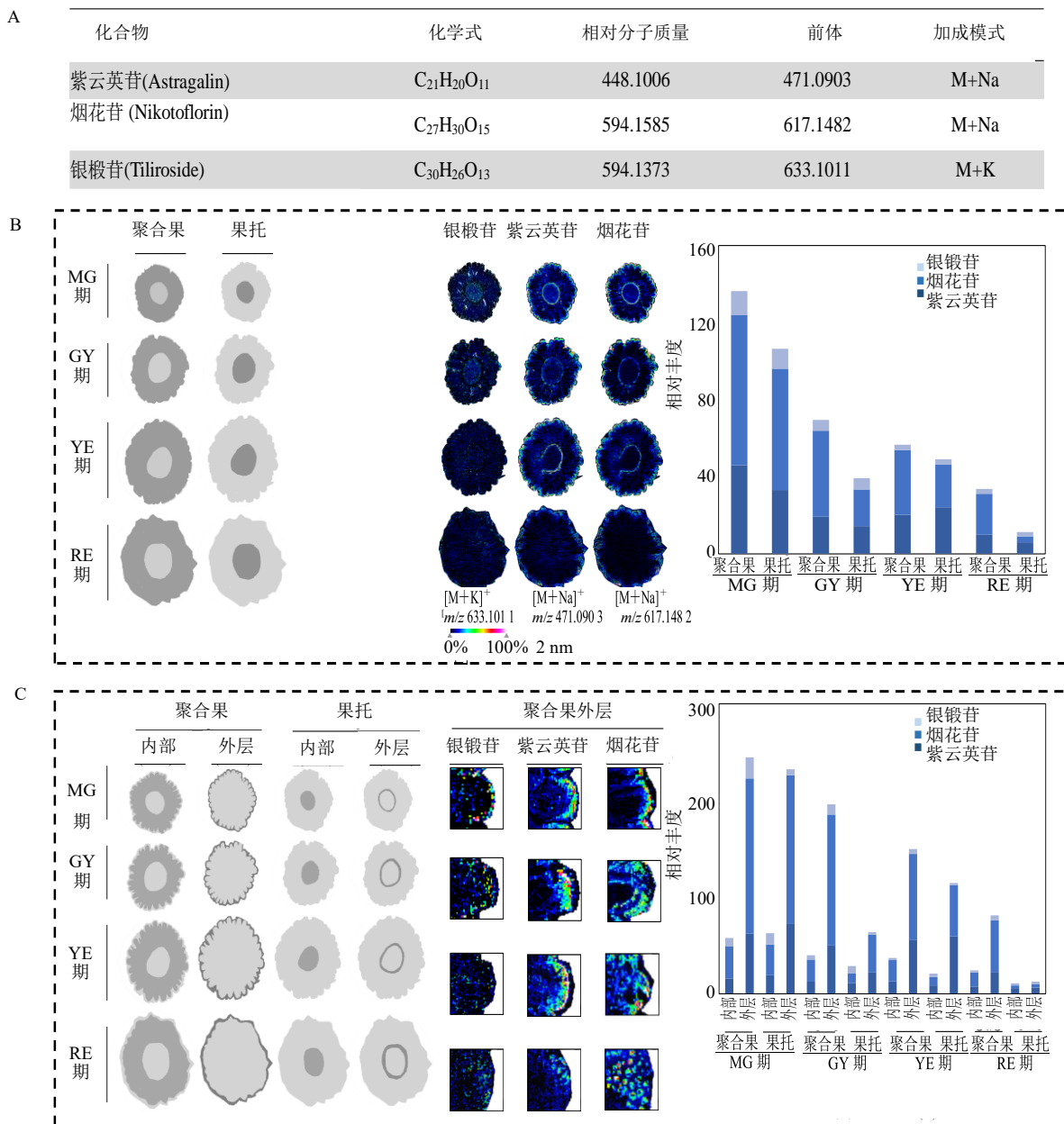
降至最低。从成分的空间分布而言，K3R 在小核果中的含量显著高于果托，而 EA 则在果托中含量显著高于小核果。此结果进一步证实了 K3R 和 EA 在果实中的分布特征。

对初加工后的药材（MG 期果实干燥而成）进行分析发现，其指标成分 K3R 和 EA 的分布也呈现出组织特异性（图 5）。与鲜果类似，药材中 EA 同样主要集中在果托部位，其含量显著高于小核果。然而，K3R 的分布却发生了变化，其在果

托中的含量反超了小核果，这可能与加工过程中的成分损耗或不同组织在干燥过程中的失水率差异有关。

3.3 加工工艺对指标成分含量及药材品相的影响

3.3.1 干燥方式的影响 对比日晒和烘干 2 种初加工方式，结果显示显著差异（图 6-A）。日晒处理的覆盆子药材中，EA 量比烘干处理的量显著提高 68.71% ($P < 0.05$)。然而，K3R 的含量则呈现相反趋

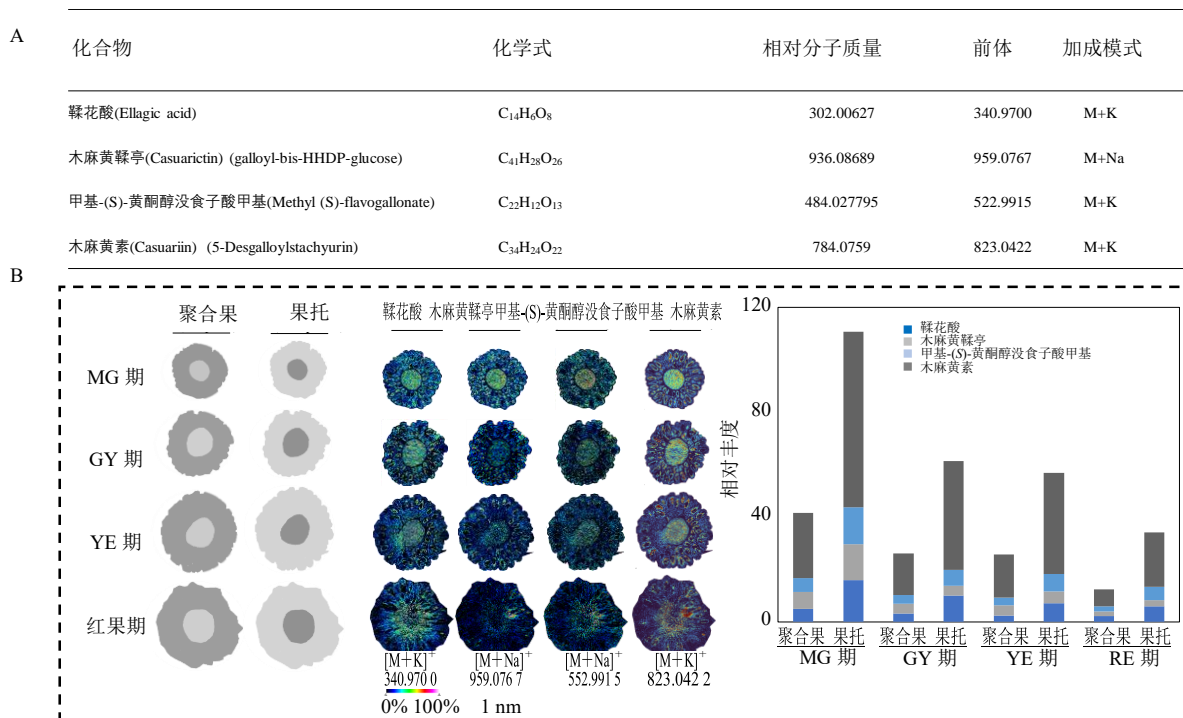


A-山奈酚糖苷的质谱信息；B, C-山奈酚糖苷的时空分布。

A-mass spectrometry information of kaempferol aglycones; B, C-spatiotemporal distribution of kaempferol aglycone derivatives.

图 2 MALDI-TOF-MS 检测覆盆子果实横截面中山奈酚糖苷的时空分布

Fig. 2 Spatiotemporal distribution of kaempferol aglycone in cross-section of *Rubi Fructus* detected by MALDI-TOF-MS

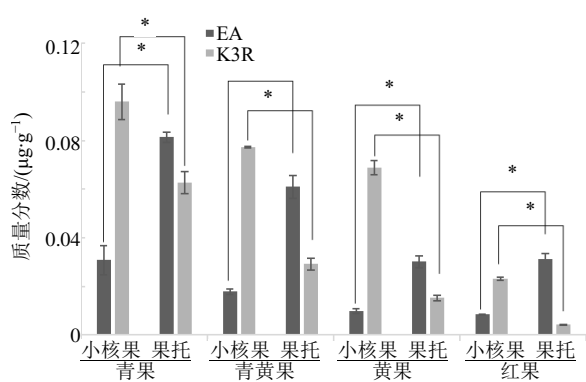


A-EA/ETs 的质谱信息, 包括 EA、木麻黄鞣亭、甲基-(S)-黄酮醇没食子酸甲基、木麻黄素; B-EA/ETs 的空间分布示意图。

A-Mass spectral information of ellagic acid/ellagitannins, including ellagic acid, casuarictin, methyl-(S)-flavonol gallate, and casuarinin. B-Schematic diagram of the spatial distribution of ellagic acid/ellagitannins.

图 3 MALDI-TOF-MS 分析覆盆子果截面中 EA/ETs 的时空分布

Fig. 3 MALDI-TOF-MS analysis of spatiotemporal distribution of EA/ETs in cross-section of *Rubi Fructus*



*P < 0.05, 下图同。

*P < 0.05, same as below Figs.

图 4 4 个成熟时期的小核果和果托中 EA 含量和 K3R 的含量

Fig. 4 Contents of EA and K3R in drupelets and receptacles at four ripening stages

势,日晒处理比烘干处理降低了 41.30%($P < 0.05$)。K3R 在日晒后尽管含量有所降低 (0.04%), 但仍高于药典规定的 0.03% 的下限。由此得出,日晒有助于 EA 含量的提升,但一定层度上降低了 K3R 的含量。相反,烘干则有助于保 K3R, 而降低了

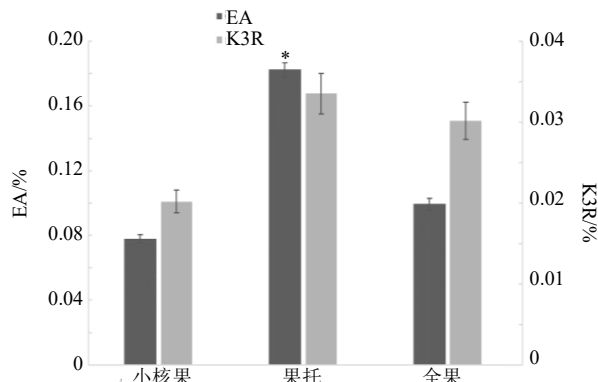


图 5 药果中小核果和果托中 EA 和 K3R 的含量
Fig. 5 Contents of EA and K3R in drupelets and receptacles of medicinal fruits

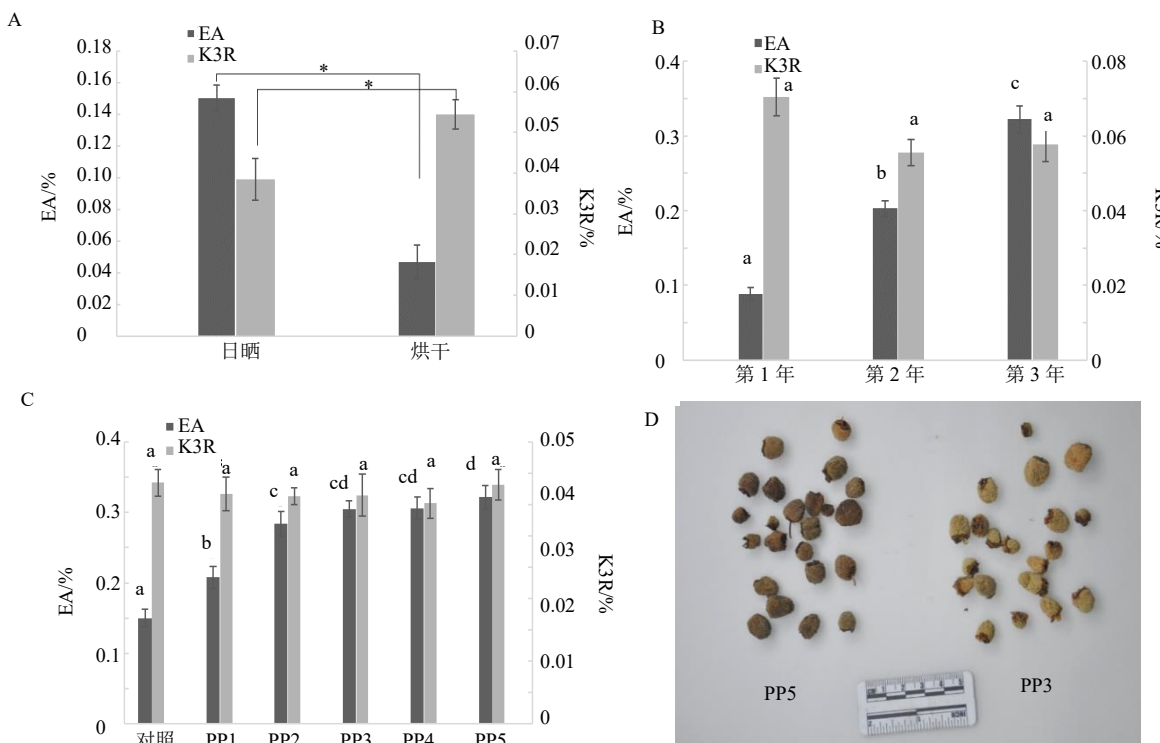
EA 含量。

3.3.2 陈化时间的影响 将日晒后的药材进行长达 3 年的仓储陈化, 考察其指标成分的变化 (图 6-B)。结果表明,陈化过程能显著促进 EA 的积累。多重比较发现,EA 的含量逐年显著增加,与第 1 年相比,第 2 年和第 3 年药材的 EA 含量分别提高了 128.57% 和 262.20%。相反,陈化对 K3R 含量有负

面影响,第2年和第3年其含量分别降低了21.16%和17.90%,然而第2年到第3年的含量下降则不显著。这结果说明,长时间的储存可提高EA含量,但同时降低了K3R的含量。

3.3.3 回润再干燥的影响 为开发一种快速提升EA含量的方法,本研究探索了蒸汽回润再干燥工艺(图6-C)。结果显示,随着蒸汽回润时间的增加(PP1~

PP4: 10~40 min), EA含量呈上升趋势,从PP1的0.15%上升至PP4的0.31%,相对于空白对照提高了38.48%~103.86%(图6-C)。其中,30 min(PP3)时达到一个平台期,继续延长至40 min(PP4),EA含量不再有显著增加。整个回润过程中,K3R的含量没有发生显著变化。结果表明,较短时间的回润处理,可快速增加EA的含量,且不影响K3R的含量。



A-日晒和烘干对指标成分的影响; B-陈化时间对指标成分的影响; C-不同的后加工工艺对指标成分的影响; D-蒸汽处理后马上烘干(PP3)与蒸汽处理后发酵(PP5)的果实品相比较; 不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

A-effects of sun-drying and oven-drying on index components; B-effects of aging time on index components; C-effects of different post-processing techniques on index components; D-comparison of fruit appearance between immediate oven-drying after steam treatment (PP3) and fermentation after steam treatment (PP5); Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

图6 不同加工方法对覆盆子药用指标成分的影响

Fig. 6 Effects of different processing methods on medicinal index components of *Rubi Fructus*

值得注意的是,采用蒸汽处理后密封发酵12 h(PP5)的处理,虽然是所有处理中EA含量最高的,但导致了药材表面有发黑的迹象,品相劣变(图6-D),失去了作为中药饮片商品价值。因此,短时蒸汽回润30 min后烘干处理(PP3)是兼顾成分提升与品相保持的理想方案。

4 讨论

4.1 指标成分时空分布的生理意义及对采收的指导

本研究首次将MALDI-TOF IMS技术应用于覆盆子药材,实现了对药典指标成分的原位可视化。研究结果清晰地揭示了主要生物活性物质K3R、EA

及EA前体(ETs)等在果实组织尺度上存在显著的空间分离(Spatial Segregation)(图2、3)。K3R主要富集于果实外层(表皮),而EA/ETs则高度集中于内部的果托。在传统加工工艺往往会导致2种成分含量的“此消彼长”,但其机制一直未明。本研究揭示的空间分布异质性,正是理解这一现象并调控加工过程的结构基础,为后续深入探讨加工机制提供了直接的证据。

本研究通过质谱成像的半定量和HPLC定量分析,证实了覆盆子药用指标成分在果实发育过程中含量动态变化且在组织间呈不均匀分布。K3R和

EA 均在未成熟的 MG 期含量最高,并随着果实的成熟含量下降,这与传统中医将覆盆子青果入药的实践经验相符^[11-12],为“适时采收”提供了现代科学证据。

这些物质的时空差异分布具有深层的生理生态学意义。K3R 作为一种黄酮类化合物,其高度富集于果实外层(小核果和果托的表皮),是植物形成化学防御屏障的关键策略。植物在幼果阶段面临强烈的紫外线辐射、病原菌侵染和虫害等胁迫^[13]。K3R 在表皮组织的积累,形成一个类似“防晒霜”的保护层,能够有效吸收紫外线(UV-B)^[14],清除活性氧自由基,从而保护内部娇嫩的组织和发育中的种子^[15-16]。同样,EA/ETs 也具有抗氧化和抗微生物活性,为脆弱的未成熟果实组织提供了额外的保护,抵御环境胁迫和病原体侵袭^[17]。另外,EA/ETs 通过与草食动物唾液中的富脯氨酸蛋白(PRPs)结合并沉淀,引起强烈的涩味^[18]。在幼果阶段,高浓度的 EA/ETs 以防止种子未成熟时被取食和破坏^[19]。然而在成熟果阶段,为了吸引果食性动物取食以助其散播种子,果实 EA/ETs 含量急剧下降,从而转变为“低防御、高适口性”的状态。因此,随着果实成熟,果实代谢重心转向糖分积累、色素合成以吸引动物传播种子,防御性化学物质的合成与积累相应减弱,这解释了 K3R 和 EA/ETs 含量下降的趋势。

4.2 加工过程中指标成分变化的机制分析

4.2.1 干燥方式差异性的化学机制 本研究发现,日晒和烘干对 2 种指标成分的影响截然相反(图 7-A):日晒显著提升 EA (68.71%),但显著降低 K3R (-41.30%)。这一看似矛盾的现象,是 2 种化合物因其不同的空间定位而对不同加工方式产生差异化响应的必然结果。

首先,对于 EA 的提升,关键在于日晒过程并非简单脱水,而是“日晒-夜堆”的循环。夜晚堆垛时,果实内部水汽平衡,形成一个局部湿热(moist-heat)微环境^[21]。IMS 结果显示,EA 的前体即为大量 ETs(如木麻黄鞣亭),深藏于内部果托(图 4-B)。这种缓慢的湿热条件,结合果实本身的微酸性环境,极大地促进了 ETs 中酯键的酸催化水解(acid-catalyzed Hydrolysis)^[22]。ETs 逐步分解,释放出大量游离 EA^[19, 21, 23]。相反,烘干在短时间内迅速脱水,水分快速散失,水解反应难以充分进行,因此 EA 含量增加不明显。

其次,K3R 的损失,则源于其特殊的空间定位。IMS 结果证实 K3R 高度定位于小核果实和果托外层(图 3-B)。在日晒长达数天的过程中,K3R 持续暴露于强烈的紫外光(UV-B)下。黄酮苷类化合物,特别是具有共轭结构的山柰酚类物质,对光照高度敏感,易发生光降解(photodegradation)反应^[24-25]。紫外线能量可激发分子,引发氧化、裂环或糖苷键断裂^[25],导致其结构破坏和含量下降^[26]。而烘干在避光的烘箱中进行,有效避免了光降解的发生,因此能更好地保留 K3R。综上,日晒过程中的内部水解增效(EA)与表层光解损失(K3R) 2 种机制并行,共同导致了 2 种指标成分含量的此消彼长。

4.2.2 蒸汽回润增效的靶向机制 传统提升 EA 的方法(如陈化)虽有效,但陈化则耗时数年,且 K3R 有一定的损失^[27](图 6-B)。本研究中通过“短时蒸汽回润”(PP3)工艺不仅在 30 min 内将 EA 含量提升了 103.13%%(相较于 CK),且 K3R 和药材品相保持稳定(图 6-C, D)。

IMS 结果(图 3-B)是理解此工艺的关键:目标反应物(ETs)富集于果托内部。任何有效的加工都必须将能量(热)和反应介质(水)高效递送至此“靶点”。回润工艺(120 °C)利用饱和蒸汽作为载体,其高焓值和强穿透力使其能迅速穿透干燥的多孔聚合果结构,直达内部果托。这使得果托内部的 ETs 在极短时间内(30 min)经历一个高温高湿的环境。根据化学反应动力学,高温高湿极大地加速了 ETs 的水解速率^[28]。这在 30 min 内完成的水解量,远超日晒数天的效果^[12, 27]。另一方面,该工艺在 30 min 的处理时间不足以引起位于表层的 K3R 发生显著的热降解(thermal degradation),因此 K3R 含量保持稳定(图 6-C)。

PP5 处理虽然获得了最高的 K3R 和 EA 含量,但与 PP4 和 PP3 相比,增加的含量并不显著。另外,药果的品相容易出现发黑的特点,这有可能与 50 °C、12 h 的湿热“发酵”中发生了美拉德反应有关,从而导致了焦糖化或多酚氧化^[29]。而 PP3 工艺在蒸汽处理后立即进行二次烘干,迅速降低水分活度,终止了这些导致品相劣变的副反应(图 6-D)。

因此,PP3 工艺的成功,是利用蒸汽实现了对目标反应(内部 ETs 水解)的时空精准调控(Spatio-temporal precise control),在最大化 EA 产率的同时,有效避免了对非目标物(表层 K3R)和药材品相的负面影响。

本研究系统阐明了覆盆子药用指标成分 K3R 和 EA 在果实中的时空分布规律: 前者主要分布于果实外层, 后者则富集于果托内部, 且两者均在未成熟青果期 (MG 期) 含量最高。这一分布特征是影响加工过程中成分变化的核心因素。基于此, 本研究揭示了不同加工工艺对指标成分影响的内在机制: 日晒通过湿热水解作用提升 EA 含量, 但其伴随的紫外光降解导致表层 K3R 损失; 而优化的短时蒸汽回润 (PP3) 工艺, 则能利用蒸汽的强穿透力, 靶向并极大加速果托内部鞣花酸的水解, 高效提升 EA 含量, 同时因其短时、避光特性, 最大限度地保留了 K3R 和药材的优良品相。研究结果为覆盆子药材的“适时采收”和“精准加工”提供了坚实的科学理论基础, 对推动覆盆子产业的标准化和现代化发展具有重要的实践指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 411-412.
- [2] Ding H Y. Extracts and constituents of *Rubus chingii* with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(6): 3941-3949.
- [3] Zhang T T, Lu C L, Jiang J G, *et al.* Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 130: 307-315.
- [4] Sun N, Wang Y, Liu Y, *et al.* A new ent-labdane diterpene saponin from the fruits of *Rubus chingii* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 49(1): 49-53.
- [5] Jantas D, Malarz J, Le T N, *et al.* Neuroprotective properties of kempferol derivatives from *Maesa membranacea* against oxidative stress-induced cell damage: An association with cathepsin D inhibition and PI3K/Akt activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10363.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1088.
- [7] Hering N A, Luettig J, Jebautzke B, *et al.* The punicalagin metabolites ellagic acid and urolithin A exert different strengthening and anti-inflammatory effects on tight junction-mediated intestinal barrier function *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 610164.
- [8] Chang S Y, Ko Y, Kim M J. Regulatory mechanisms of kaempferol on iNOS expression in RINm5F β -cells under exposure to interleukin-1 β [J]. *Heliyon*, 2023, 9(4): e14818.
- [9] Huwait E, Ayoub M, Karim S. Investigation of the molecular mechanisms underlying the antiatherogenic actions of kaempferol in human THP-1 macrophages [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7461.
- [10] 何佳, 周越美, 赵智慧, 等. 不同加工方法与贮存时间对覆盆子含量测定指标的影响 [J]. *医药导报*, 2022, 41(5): 693-697.
- [11] Li K Y, Zeng M L, Li Q L, *et al.* Identification of polyphenolic composition in the fruits of *Rubus chingii* Hu and its antioxidant and antiproliferative activity on human bladder cancer T24 cells [J]. *J Food Meas Charact*, 2019, 13(1): 51-60.
- [12] Li X B, Sun J, Chen Z, *et al.* Characterization of carotenoids and phenolics during fruit ripening of Chinese raspberry (*Rubus chingii* Hu) [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(18): 10804-10813.
- [13] Cid-Ortega S, Monroy-Rivera J A. Extraction of kaempferol and its glycosides using supercritical fluids from plant sources: A review [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2018, 56(4): 480-493.
- [14] de Alencar Filho José M T, Pedrita A S, Emanuella C V P, *et al.* Flavonoids as photoprotective agents: A systematic review [J]. *J Med Plants Res*, 2016, 10(47): 848-864.
- [15] Li X B, Jiang J Y, Chen Z, *et al.* Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of flavonoid biosynthesis during fruit maturation in *Rubus chingii* Hu [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 706667.
- [16] Lin Y, Jiang X C, Zhu S, *et al.* Multi-omics combined with MALDI mass spectroscopy imaging reveals the mechanisms of biosynthesis of characteristic compounds in *Tetragium hemsleyanum* Diels et Gilg [J]. *Front Plant Sci*, 2024, 14: 1294804.
- [17] Klewicka E, Sójka M, Klewicki R, *et al.* Ellagitannins from raspberry (*Rubus idaeus* L.) fruit as natural inhibitors of *Geotrichum candidum* [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 908.
- [18] Zhao W R, Zheng M Z, Li X, *et al.* Fruit astringency: Mechanisms, technologies, and future directions [J]. *Horticulturae*, 2025, 11(6): 45-56.
- [19] Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo C M S, *et al.* Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3848084.
- [20] Li X B, Wang Y, Jin L, *et al.* Development of fruit color in *Rubus chingii* Hu (Chinese raspberry): A story about novel offshoots of anthocyanin and carotenoid biosynthesis [J]. *Plant Sci*, 2021, 311: 110996.
- [21] Kähkönen M, Kylli P, Ollilainen V, *et al.* Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(5): 1167-

- 1174.
- [22] Raya-Morquecho E M, Aguilar-Zarate P, Sepúlveda L, *et al.* Ellagitannins and their derivatives: A review on the metabolization, absorption, and some benefits related to intestinal health [J]. *Microbiol Res*, 2025, 16(6): 78-86.
- [23] Larrosa M, Tomás-Barberán F A, Espín J C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(9): 611-625.
- [24] Dall'Acqua S, Miolo G, Innocenti G, *et al.* The photodegradation of quercetin: Relation to oxidation [J]. *Molecules*, 2012, 17(8): 8898-8907.
- [25] He B H, Dai L H, Jin L, *et al.* Bioactive components, pharmacological effects, and drug development of traditional herbal medicine *Rubus chingii* Hu (Fu-Pen-Zi) [J]. *Front Nutr*, 2023, 9: 1052504.
- [26] Dehghanian Z, Habibi K, Dehghanian M, *et al.* Reinforcing the bulwark: Unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses [J]. *Heliyon*, 2022, 8(3): e09094.
- [27] Qian C, Li H F, Hou Z N, *et al.* Effects of different drying methods on *Rubus chingii* Hu fruit during processing [J]. *Heliyon*, 2024, 10(2): e24512.
- [28] Teslić N, Santos F, Oliveira F, *et al.* Simultaneous hydrolysis of ellagitannins and extraction of ellagic acid from defatted raspberry seeds using natural deep eutectic solvents (NADES) [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 254.
- [29] Hu J X, Li X, Yu Q T, *et al.* Understanding the impact of pectin physicochemical variation on browning of simulated Maillard reaction system in thermal and storage processing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 240: 124347.

[责任编辑 时圣明]