

·实验简报·

一品红苞片花色素的分离及初步鉴定

王长泉^{1*} 魏小兵²

(1 山东理工大学生命科学院 淄博 255049) (2 山东理工大学分析测试中心 淄博 255049)

摘要 用紫外-可见分光光度计、高效液相色谱(HPLC)和质谱(MS)技术对一品红(*Euphorbia pulcherrima*)红色苞片中的花色素提取液进行了初步鉴定。一品红花色素的甲醇溶液分别在270、340和520 nm处有3个吸收峰;在440 nm吸光度与可见光最大吸收波长520 nm吸光度的比值为0.29;花色素的甲醇溶液中加入AlCl₃后发生红移,再加入HCl后发生蓝移;色素溶液在紫外光下无荧光;色素样品经液相色谱分离后在270 nm检测有5个比较明显的吸收峰;质谱中得到595、611、381、571和589等对应的分子离子峰;花色素酸解液高效液相色谱图谱和鼠李糖、葡萄糖的出峰时间一致。由这些结果可推断一品红花色素样品中主要含有5种组分:矢车菊花色苷、飞燕草花色苷、飞燕草花色苷苯甲酰基葡萄糖苷、矢车菊花色苷苯甲酰基葡萄糖苷和一种未知成分。

关键词 一品红, 花色素, 紫外-可见分光光度计, 液相色谱, 质谱

The Extraction and Primary Identification of Anthocyanidin in *Euphorbia pulcherrima*

Changquan Wang¹, Xiaobing Wei²

(1 College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

(2 Test and Analysis Center, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

Abstract Anthocyanidins in *Euphorbia pulcherrima* were extracted and identified by use of UV-vis spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). Anthocyanidin extract in methanol showed 3 absorption peaks, at 270, 340 and 520 nm, in the UV-vis spectrum, with bathochromic and hypsochromic shift with methanol+AlCl₃ and methanol+AlCl₃+HCl, respectively; the ratio of the absorbance at 440 nm to that at 520 nm was 0.29. No fluorescence occurred under UV irradiance, and 5 absorption peaks occurred at 270 nm after HPLC. Five molecular ion peaks (m/z) occurred on MS: 595, 381, 611, 587 and 571, respectively, and monosaccharides in the extract were identified as rhamuouse and glucose on HPLC. These results suggest that anthocyanidin in *E. pulcherrima* mainly include cyanidin 3-rutinoside, delphinidin 3-rutinoside, cyanidin 3-benzoylglucoside, delphinidin 3-benzoylglucoside and an unknown component.

Key words *Euphorbia pulcherrima*, anthocyanidins, UV-vis spectrophotometer, HPLC, MS

一品红(*Euphorbia pulcherrima*)属大戟科, 大戟属, 又名象牙红、圣诞红、猩猩木, 原产中美洲及墨西哥地区。一品红的花虽有完整

的生殖器官——雌蕊和雄蕊, 但却没有绚丽的花冠(即无花被)。虽然花本身并无多大观赏价值, 但在花序形成之前, 枝梢顶部先后长出10多

收稿日期: 2006-02-06; 接受日期: 2006-04-06

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: whitewater7006@163.com

枚鲜红似火的苞片,分外醒目,为北方地区圣诞节、元旦和春节的优良观赏花卉。在我国南方一品红还可以作为草坪点缀和庭园栽植,具有较高的经济价值。另外,一品红属典型的短日照植物,花色素含量的变化与光周期有关,可以通过人为控制光周期,使一品红根据需要提前或延迟“开花”,因而一品红是研究光调控花色素合成的良好材料。

花色素(anthocyanidin)是一类广泛存在于植物体中类黄酮类天然色素,一般以糖苷的形式积累于细胞的液泡内。近年来的研究表明:花色素不仅在植物受粉、种子散布和保护植物免受紫外线损伤、抗病、抗虫、进化等方面具有重要的生物功能,而且还可以体外清除自由基,具有很强的抗氧化能力,在医学上已证明对血液循环失调、肝机能障碍、心血管、癌症和艾滋病等疾病具有一定的疗效(Harborne and Williams, 2000; 方忠祥和倪元颖, 2001; Kong et al., 2003; Stingtzing and Carle, 2004)。花色素在同一种植物的不同发育时期、不同器官、甚至同一器官的不同部位的表达不同,具有明显的时间和空间特异性,而且花色素合成基因表达的改变还可以在花色或者叶色上直观反映出来。因此,植物花色素的合成系统是研究基因表达调控的最佳系统之一。

国内外对一品红的研究主要集中在栽培管理、工厂化生产和组织培养技术方面,对其花色素的研究鲜有报道(Ruiz-Sifre et al., 1997; Snipen et al., 1999; Hwang et al., 2002; 焦海华和周吉源, 2002; 张黎等, 2005)。金波和东惠茹(1994)的初步研究认为一品红花色素为天竺葵花色素(pelargonidin)及其衍生物。我们在对五色草花色素和盐地碱蓬甜菜红素深入研究的基础上(Wang et al., 2005, 2006),利用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术对一品红花色素进行了分离和鉴定,认为一品红中存在的花色素主要为矢车菊花色苷(cyanidin)和飞燕草花色苷(delphinidin)及其酰基化衍生物,这为进一步

研究一品红花色素的合成调控、生物功能及医学疗效等奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料及实验条件

实验材料为市售一品红(*Euphorbia pulcherrima*)一年生成品苗,放在智能温室中培养并诱导开花,光照时间为10小时/天,温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度为60%。

1.2 方法

1.2.1 一品红花色素的提取及纯化 按照Wang等(2005)的方法,取一品红的红色苞片2g,剪碎后于液氮下研磨,以80%的丙酮于4℃浸提过夜,浸提液以10 000 g (Heraeus Biofuge Stratos 高速冷冻离心机,德国)于4℃离心15分钟,弃去沉淀,上清液中加入2倍体积的氯仿于分液漏斗中混合振荡,去除脂类物质,水相部分用真空旋转蒸发仪(R201 型旋转蒸发仪,上海申科仪器厂)于40℃浓缩,直到丙酮完全蒸发。

浓缩的一品红花色素水溶液用预先经甲醇激活和0.01%(体积分数)的HCl溶液平衡过的ODS C-18固相萃取小柱进行分离纯化。加入一定量的色素浓缩液后,色素吸附在柱上,然后用2倍体积的0.01% HCl水溶液将糖、酸等水溶性物质洗下,再用2倍体积含0.01% HCl的甲醇溶液将色素洗脱,收集洗脱液,用真空旋转蒸发仪于40℃真空浓缩,得到一品红花色素浓缩纯化液或者红色膏状物, -70℃保存备用。

1.2.2 一品红花色素的分离与结构鉴定 用紫外-可见分光光度计(UV756PC, 上海光谱仪器厂)对花色素的甲醇、甲醇+ AlCl_3 和甲醇+ AlCl_3 +HCl溶液在220~700 nm进行扫描,分析一品红花色素的光谱特征,并确定液相色谱检测波长。

液相色谱条件 采用Agilent HP1100液相色谱仪, Agilent Eclipse XDB-C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm), 可变波长紫外检测器

(VWD)。流动相为 35% 的乙腈水溶液等梯度洗脱; 进样量 10 μL ; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 270 nm。

质谱条件 采用 Esquire2000TM (美国布鲁克道尔顿公司), ESI 喷雾源, 喷雾电压 41.5 kV; 正离子化模式; 毛细管电压 45 V; 鞘气(N_2)柱前压 6 MPa, 辅助气柱前压 0.55 MPa; 干燥气流量 7 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 设置每秒 300 个质谱扫描单位, 扫描范围 50 ~ 1 000(m/z); 液相色谱分离后的组分通过 1/10 分流进入紫外和质谱检测器。

1.2.3 糖基鉴定 取一品红红色膏状提取物 0.1 g, 加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 10 mL, 或者收集 HPLC 后的单一组分 0.2 mL, 加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL, 加热至 70 $^{\circ}\text{C}$ 水解 4 小时, 抽真空除酸, 制成进样液, 上柱进行高效液相色谱。流动相为乙腈:水 = 77/23, 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。由 RID-6A 示差折光仪检测, 以标准单糖为标样, 采用外标法。

2 结果分析

2.1 一品红花色素的提取和初步纯化

植物花色色素一般用含有少量酸的甲醇提取, 但有些花色色素遇酸会分解而影响鉴定, 因此我们采用 80% 丙酮提取。组织中可能存在的叶绿素等脂溶性物质会同时被提取, 用氯仿萃取可以去除大部分脂溶性物质。另外, 以含有水的丙酮浸提色素, 往往将其他多酚物质同时溶出, 得到含多酚、黄酮类化合物、糖类、酸类等水溶性物质的混合体系。因此, 在进行色谱分离前, 需要对提取混合液进行初步纯化。固相萃取是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附, 与干扰物分离, 再用洗脱液洗脱或加热脱附, 达到分离和富集目标化合物的目的。质谱与液相色谱相同, 只是所用的吸附剂在粒度上有所差别。我们用 ODS C-18 小柱进行反相固相萃取, 用不同溶剂分步洗脱, 有效地将提取混合组分进行初步纯化, 效果在下面的 HPLC-MS

中可以体现, 色谱和质谱分离清晰, 信噪较小。

2.2 一品红花色素光谱特性

一品红花色素甲醇溶液, 经过适当倍数稀释后, 用紫外-可见分光光度计在 220~700 nm 扫描, 得到吸收曲线(图 1)。由图 1 可见: (1) 一品红花色素甲醇溶液在 270、340 和 520 nm 附近有 3 个吸收峰(图 1A), 在 300 ~ 360 nm 附近有吸收峰说明色素中有酰基基团存在(Harborne, 1958a, 1958b; Francis, 1984); 在 440 nm 吸光度($A_{440}=0.121$)与可见光最大吸收波长 520 nm 吸光度($A_{520}=0.418$)的比值为 0.29, 说明该色素糖基化位置在 3-位(Andersen, 1987; Fossenhue and Andersen, 1998); 花色色素的甲醇溶液加入 AlCl_3 后, B 环存在游离羟基时可以和 AlCl_3 形成络合物, 引起吸收峰发生红移(向长波长方向移动, 图 1B), 邻羟基和 AlCl_3 形成不稳定络合物, 加入 HCl 后由于络合物分解又引起吸收峰蓝移(向短波长方向移动, 图 1C), 而单羟基和 AlCl_3 形成的稳定络合物不会发生分解, 也不会再发生蓝移(中国科学院上海药物研究所, 1981); 色素溶液在紫外光下无荧光, 也说明糖取代基不在 5-位上(卢钰等, 2004)。根据这些特性初步推断一品红花色素为具有邻羟基的矢车菊、飞药草或者牵牛花色色素在 3-位被糖基取代的色素苷及其酰化物。

2.3 一品红花色素分离与结构鉴定

由图 2A 可知经液相色谱分离后, 一品红花色素样品总离子流在 270 nm 检测中有 5 个比较明显的吸收峰, 因此推测一品红苞片中可能含有 5 种花色色素。每种组分在质谱正离子扫描方式下, 有不同的离子峰(图 2B1~B5)。通过与植物中 6 种基本花色色素的标准分子量比较, 可以对每个色谱峰进行初步推断和指认。

组分 1 质谱图中有 3 种比较明显的离子峰(m/z) 287、449 和 595, 为矢车菊花色素苷的典型离子峰, 和文献报道(da Costa et al., 2000; Mullen et al., 2002; Tian et al., 2005)花色色素苷的质谱图比较, 判断该色素苷可能为矢车菊花

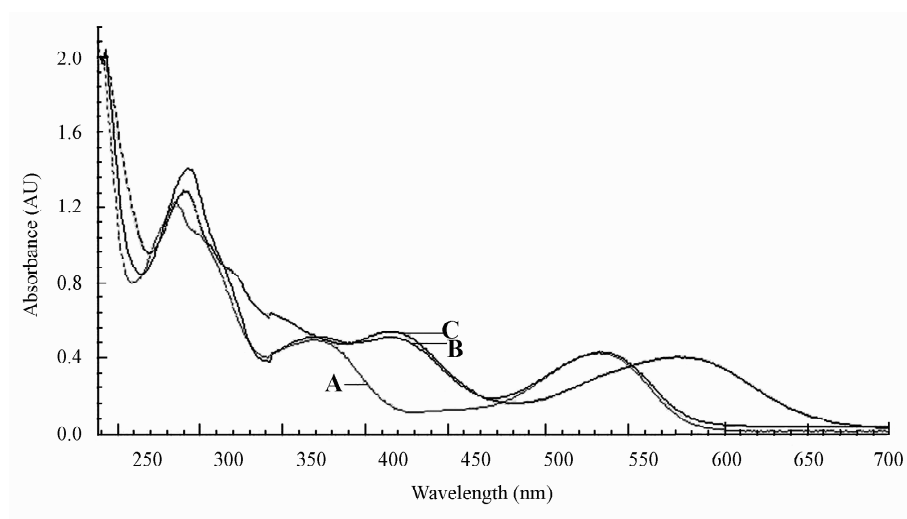


图1 一品红花色素在甲醇(A)、甲醇+AlCl₃(B)和甲醇+AlCl₃+HCl(C)中的紫外-可见光扫描光谱

Fig. 1 The UV-vis spectrum of anthocyanidin extract in MeOH(A), MeOH + AlCl₃(B) and MeOH + AlCl₃+HCl(C)

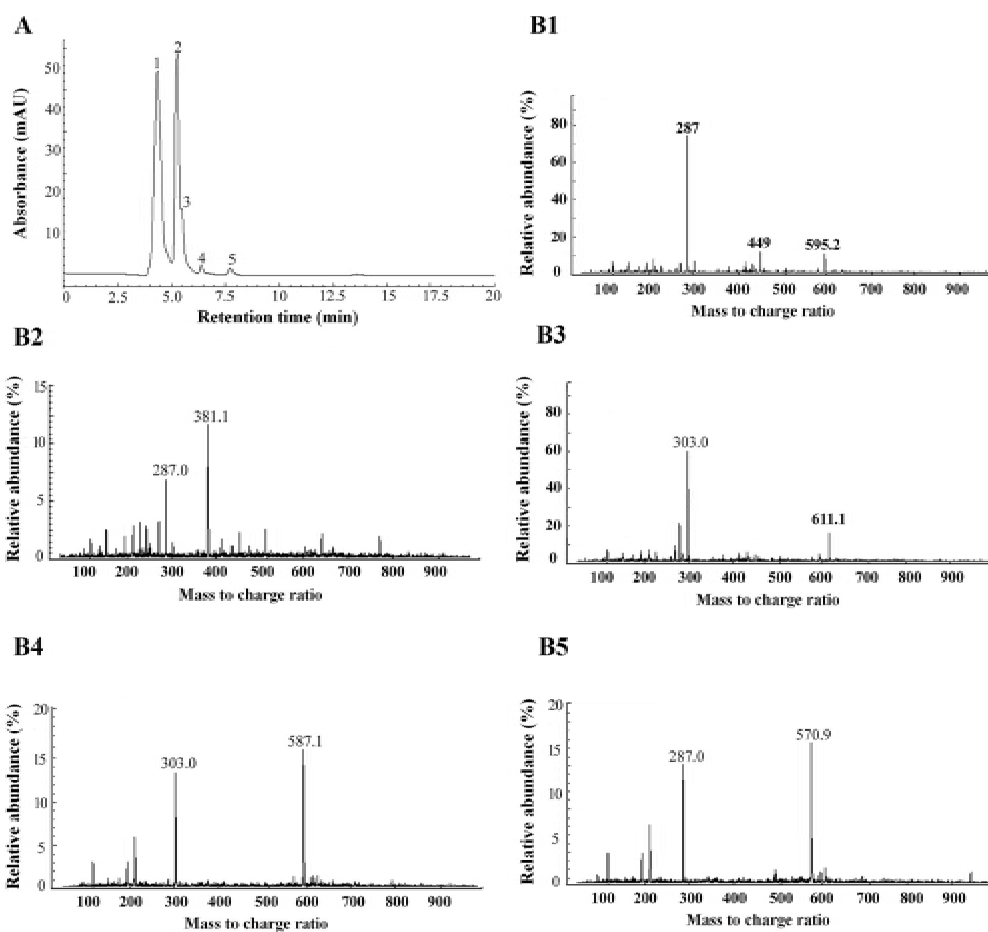


图2 一品红花色素各组分的液相色谱图(A)和质谱图(B1~B5)

Fig. 2 The HPLC (A) and MS (B1 - B5) spectrum of anthocyanidin extract in *Euphorbia pulcherrim*

色素芸香苷(287+180+164 - 36)。组分 2 质谱图中有 287 和 381 两个较强的离子峰,不符合一般色素苷的离子峰,可能是未知花色色素,也可能是矢车菊花色素与其分子碎片的复合物(287+94)。组分 3 质谱图中有 303 和 611 离子峰,和文献报道(da Costa et al., 2000; Mullen et al., 2002; Tian et al., 2005)相比较判断为飞药草花色色素芸香苷(303+180+164 - 36)。组分 4 有 303 和 587 两个离子峰,应该是飞药草花色色素单糖苷酰基化产物(303+180+122 - 18 - 1 或者 303+164+138 - 18 - 1)。组分 5 产生 287 和 571 两个离子峰,可能是矢车菊花色素单糖苷酰基化产物(287+180+122 - 18 - 1 或者 287+164+138 - 18 - 1)。

2.4 糖基的鉴定

为了确切判断一品红花色素中所含糖基种类,将花色色素提取物酸解为单糖后进行了 HPLC

分析。图 3 是标准单糖(图 3A)与一品红花色素酸解液的 HPLC 图谱(图 3B)。通过与标准单糖的出峰时间相比较,可以推知一品红花色素提取液中主要含有鼠李糖和葡萄糖 2 种单糖。这和 2.3 节判断组分中含有花色色素芸香糖苷的结论基本一致,1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖缩合脱水形成芸香糖(164+180 - 18)。

为了进一步确定组分 4 和组分 5 的糖基的种类,分别收集经 HPLC 分离后的组分 4 和组分 5,酸解后重新进行 HPLC 分析,示差折光仪检测,并和标准单糖的 HPLC 图谱比较(图 3C, D),由图 3 的 C 和 D 可知,组分 4 和组分 5 的糖基都是葡萄糖基,所以组分 4 是飞燕草花色色素苯甲酰基葡萄糖苷,组分 5 是矢车菊花色素苯甲酰基葡萄糖苷。综上所述,一品红花色素的主要成分及色谱和质谱性质可以概括为表 1。

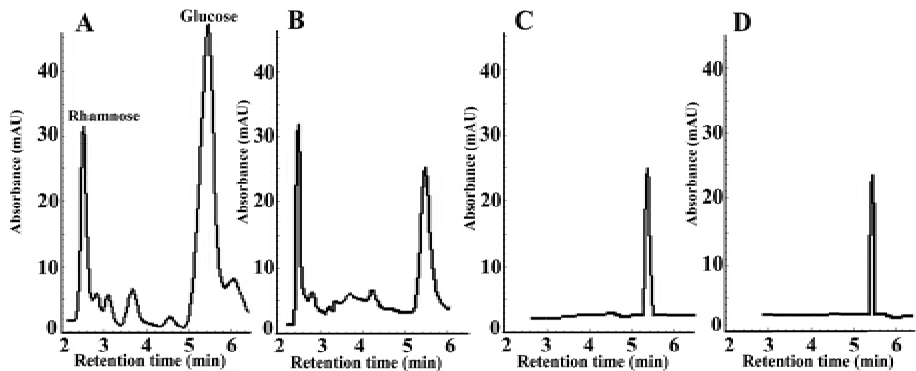


图 3 鼠李糖和葡萄糖(A)、一品红花色素提取物酸解液(B)、组分 4(C)和组分 5(D)的酸解液的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC spectrum of standard monosaccharides (A) and acid hydrolytic fluid of anthocyanidin extract (B), component 4 (C) and component 5 (D) in *Euphorbia pulcherrim*

表 1 一品红花色素的主要成分

Table 1 The composition of anthocyanidin in *Euphorbia pulcherrim*

No.	Anthocyanidin	Retention time (min)	Area (%)	Molecular weight	Molecular ion	Fragment ion
1	Cyanidin 3-rutinoside	4.36	54.3	595	595	287, 449
2	Unknown	5.28	34.2	381	381	287
3	Delphinidin 3-rutinoside	5.49	8.7	611	611	303
4	Delphinidin 3-benzoylglucoside	6.41	1.3	587	587	303
5	Cyanidin 3-benzoylglucoside	7.72	1.5	571	571	287

3 讨论

紫外-可见光谱很早就被人们应用于花色苷的结构鉴定(Harborne, 1958a, 1958b; 中国科学院上海药物研究所, 1981; Francis, 1984; 卢钰等, 2004)。该方法的鉴定要点如下。(1)花色苷最大吸收波长一个在可见光区的 500 ~ 540 nm 附近, 另一个在紫外光 270 nm 附近, 通过测定色素的最大吸收波长即可初步判断是否为花色苷类色素。(2)如果向花色苷的甲醇溶液中滴加 3 ~ 5 滴 AlCl_3 , 出现红移, 即最大吸收波长增加, 再加入盐酸后发生蓝移, 说明B-环有邻位酚羟基, 即可区分开B-环无邻位酚羟基的天竺葵色素、芍药色素、锦葵色素和B-环有邻位酚羟基的矢车菊色素、牵牛花色素、飞燕草花色素。(3)根据花色苷 440 nm 处的吸光度与可见光最大吸收波长处吸光度的比值 A_{440}/A_{max} , 可以判断糖苷的位置。(4)根据花色苷在 300 ~ 330 nm 间有无吸收峰可判断该色素分子是否有酰基。如果有吸收峰, 表明该色素有酰基存在。(5)根据花色苷在 440 nm 处是否有肩峰, 可以判断该色素 5 号位的羟基是否被取代。如果 5 号位的羟基没有被取代, 则该色素在 440 nm 处有肩峰。(6)根据花色苷在紫外光下是否有荧光, 可判断该色素是否在 5 号位有取代基。如果有荧光, 则表明该色素在 5 号位有取代基。

我们对一品红花色素的分析推断过程如下。(1)通过紫外-可见光谱特性和 AlCl_3/HCl 引起的红移/蓝移反应, 初步确定样品中含有在3-位糖基化的具有邻羟基或者酰基集团结构的花色素, 具有邻羟基结构的花色素有矢车菊色素、飞燕草(花翠素)花色素和牵牛花色素3种。(2)进一步通过 HPLC-MS 分析, 得知样品中可能含有 5 种成分, 质谱图中得到和花色素标准分子量 287 和 303 相吻合的离子峰, 基本可以确认样品中含有矢车菊色素苷、飞燕草(花翠素)花色素苷及其衍生物。(3)通过和文献报道的花色素的标准质谱图比较, 初步判断组分 1 是

矢车菊色素芸香苷(287+180+164-36), 组分 3 是飞燕草花色素芸香苷(303+180+164-36), 组分 2 可能是一种未知成分。(4)通过花色素酸解液 HPLC 图谱和标准单糖比较, 得知一品红花色素中含有鼠李糖和葡萄糖, 支持了上述的判断。由组分 4 和组分 5 中的糖基为葡萄糖进一步推知组分 4 是飞燕草花色素苯甲酰基葡萄糖苷, 组分 5 是矢车菊色素苯甲酰基葡萄糖苷。最后确认一品红花色素中含 5 种组分, 即矢车菊色素芸香苷(54.3%)、飞燕草花色素芸香苷(8.7%)、飞燕草花色素苯甲酰基葡萄糖苷(1.3%)、矢车菊色素苯甲酰基葡萄糖苷(1.5%)和一种含有矢车菊色素基团的未知成分(34.2%)。但是花色素苷的糖基构像、酰基的具体取代位置等细节问题还有待于用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术进行进一步分析, 另一种未知成分也需进一步鉴定。

参考文献

- 方忠祥, 倪元颖 (2001). 花青素生理功能研究进展. 广州食品工业科技 17, 60-62.
- 焦海华, 周吉源 (2002). 植物生长调节物质对一品红组织培养中器官分化的效应. 华中师范大学学报(自然科学版) 36, 225-228.
- 金波, 东惠茹 (1994). 一品红花色的探讨. 园艺学报 2, 87-90.
- 卢钰, 董现义, 杜景平, 李永强, 王明林 (2004). 花色苷研究进展. 山东农业大学学报 35, 315-320.
- 张黎, 李勇, 屈凤兰, 张咏静 (2005). 不同浓度肥料配施对一品红生长发育的影响. 农业科学研究 26(2), 90-92.
- 中国科学院上海药物研究所 (1981). 黄酮体化合物鉴定手册(北京: 科学出版社), pp. 407-408.
- Andersen, Ø.M. (1987). Anthocyanins in fruits of *Vaccinium uliginosum* L. (Bog whortleberry). J. Food Sci. 52, 665, 666, 680.
- da Costa, C.T., Horton, D., and Margolis, S.A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. J. Chromatogr.

- A 881, 403-410.
- Francis, F.J.** (1984). Anthocyanins as Food Colorants (New York: Academic Press), pp. 1-50.
- Fossen, T., and Andersen, Ø.M.** (1998). Cyanidin-3-O-(6"-Succinyl-β-glucopyranoside) and other anthocyanins from phragmites australis. *Phytochemistry* **49**, 1065-1068.
- Harborne, J.B.** (1958a). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatogr.* **1**, 473-488.
- Harborne, J.B.** (1958b). Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* **70**, 22-28.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Hwang, J., Chilton, W.S., and Benson, D.M.** (2002). Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia. *Biol. Control.* **25**, 56-63.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R.** (2003). Analysis and biological activity of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.
- Mullen, W., Lean, M.E.J., and Crozier, A.** (2002). Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **966**, 63-70.
- Ruiz-Sifre, G., Dole, J.M., Kahn, B.A., Richardson, P.E., and Ledford, J.** (1997). Correlation of poinsettia graft union development with transmission of the free-branching characteristic. *Sci. Hortic.* **69**, 135-143.
- Snipen, L.G., Moe, R., and Sørensen, J.** (1999). Influence of potential growth factors in predicting time to flowering in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). *Sci. Hortic.* **81**, 345-359.
- Stingtzing, F.C., and Carle, R.** (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trend Food Sci. Technol.* **15**, 19-38.
- Tian, Q., Giusti, M.M., Stoner, G.D., and Schwartz, S.J.** (2005). Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *J. Chromatogr. A* **1091**, 72-82.
- Wang, C.Q., Zhang, Y.F., and Liu, T.** (2005). ~~Activity changes of calmodulin and~~ Ca^{2+} -ATPase during low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Alternanthera bettzickiana*. *Physiol. Plantarum* **124**, 260-266.
- Wang, C.Q., Zhao, J.Q., Chen, M., and Wang, B. S.** (2006). Identification and effect of environmental factors on betacyanin accumulation in *Suaeda salsa*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* **32**, 195-201.

(责任编辑: 白羽红)

