

沈植国,程建明,李 宇,等. 猬实花瓣色素成分及含量的初步分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):313-315.

猬实花瓣色素成分及含量的初步分析

沈植国¹,程建明²,李 宇¹,崔家俊³

(1. 河南省林业科学研究院,河南郑州 450008; 2. 河南省格兰德园林科技有限公司,河南郑州 450000;

3. 河南省新郑市城乡规划和城市管理局,河南新郑 451100)

摘要:以猬实为材料,通过特征显色反应和紫外-可见光谱对其花瓣中的色素成分进行初步分析,并对其总类胡萝卜素、总黄酮和总花色苷的含量进行测定。结果表明:猬实花瓣的色素主要由类胡萝卜素、类黄酮和花青素组成。其中,类黄酮含有黄酮和黄酮醇类化合物,不含二氢黄酮类化合物、查耳酮、呋喃、儿茶素,色素分子中含有 3',4'-二羟基。白色花的类胡萝卜素和黄酮的含量比红色花高,而花色苷含量比红色花的低。

关键词:猬实;花色素;类黄酮;花色苷

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)12-0313-03

猬实(*Kolkwitzia amabilis* Graebn)是中国特有的单属植物,属忍冬科(Caprifoliaceae)猬实属(*Kolkwitzia*),因果实密被刺刚毛,状如刺猬而得名,属国家三级稀有保护植物,主要分布于我国中部及西北部的河南、甘肃、山西、陕西、湖北、安徽等省海拔 350~1 500 m 的山坡、路边和灌丛中。猬实作为驰名中外的珍贵观赏植物,长期以来颇受青睐,被誉为“美丽的灌木(beauty bush)”,欧美国家 20 世纪初就从中国引种栽培猬实^[1]。当前的研究主要集中在如何提高猬实的繁殖率和扩大猬实的生长区域,很少关注猬实花色的变化以及猬实花色素的构成。本研究初步分析了猬实 2 种不同花色花瓣的色素成分及含量,有助于探索猬实花色形成的生化机理,为猬实

色素化合物的分离和结构鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年 5 月 4 日,采集河南省郑州市郑东新区的绿化公园里事先选取的优株上的花朵,花色分粉白和粉红 2 种,摘取健康、完全开放的花朵,去蕊放进密封袋装好,一部分放在 -20 ℃ 的冰箱里保存,剩下的放入 55 ℃ 烘箱 24 h,取出烘干的花朵,研磨成粉,密封保存,备用。

1.2 猬实花色素的特征显色反应

1.2.1 石油醚、盐酸和氨水测试 分别取鲜花瓣 0.1 g 研磨,放入带有皮塞的干燥试管,分别加石油醚、10% 盐酸、30% 氨水 5 mL,振荡,过滤观察颜色,并记录^[2]。

1.2.2 类黄酮显色反应 取不同花色的花瓣粉末 0.1 g,分别用盐酸化甲醇 [$V(\text{HCl}):V(\text{MeOH})=1:99$,下同] 提取 15 h,过滤,定容至 25 mL,分别进行下列显色反应^[3-4]。

(1) 浓盐酸-镁粉反应:在 2 mL 提取液中加入少量镁

科学,2009,30(18):252-254.

[7] 姚 敏. 富硒灵芝中硒含量分布和赋存形态研究[J]. 上海大学学报:自然科学版,1997,3(5):15-21.

[8] 王未肖,段惠敏,李景印,等. 硒的分析方法[J]. 理化检验:化学分册,2006,42(6):505-508.

[9] 刘 黎. 阿拉伯树胶增溶增敏分光光度法测定微量硒(IV)的研究[J]. 化学研究与应用,2000,12(2):218-220.

[10] 杜春霖,吴瑶庆,孟昭荣,等. 丹东地区决明子中微量硒的富集分离与测定[J]. 湖北农业科学,2009,48(2):450-452.

[11] 吴瑶庆,孟昭荣,李 莉,等. 非完全硝化-石墨炉原子吸收光谱法测定野生软枣猕猴桃中微量锆的研究[J]. 江苏农业科学,2009(4):307-310.

[12] Gammelgaard B, Cornett C, Olsen J, et al. Combination of LC-ICP-MS, LC-MS and NMR for investigation of the oxidative degradation of selenomethionine[J]. Talanta,2003,59(6):1165-1171.

[13] 樊 静,吕辉雄,叶存玲,等. 硒形态流动注射催化光度法分析[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(2):263-265.

收稿日期:2013-06-22

基金项目:国家公益性行业(林业)科研专项(编号:200904024);河南省郑州市重点科技攻关项目(编号:121PZDGG303)。

作者简介:沈植国(1977—),男,河南辉县人,硕士,高级工程师,主要从事园林树木、能源树种等方面的研究。E-mail: smess123@sina.com。

度、时间及巯基棉的用量有关;巯基棉富集分离 GFAAS 测定硒形态具有定量选择性、灵敏度好等优点,适合生物样品体系中硒形态的分析,为 5 龄六排海刺参的金属组学的基础研究提供了借鉴。

参考文献:

[1] 裴俊瑞,王 铜,周令望,等. 硒和维生素 E 对甲状腺及其激素代谢的影响[J]. 营养学报,2009,31(4):407-408.

[2] 徐 刚,董文丽,李和平. 巯基棉富集分离-流动注射分光光度法测定水样中痕量硒[J]. 冶金分析,2007,27(10):43-46.

[3] 刘秀华,辉永庆,张豫川,等. 石墨炉原子吸收光谱法测定硒的条件研究[J]. 理化检验:化学分册,2006,42(2):133-134.

[4] 吴瑶庆,孟昭荣,李 莉,等. 蓝莓中蛋白硒形态的富集分离及测定方法[J]. 营养学报,2011,33(5):463-466,471.

[5] 铁 梅,臧树良,方禹之,等. SE-HPLC-ICP-MS 联用技术在富硒蛹虫草硒蛋白形态分析中的应用研究[J]. 高等学校化学学报,2006,27(7):1232-1236.

[6] 刘信平. 天然产遏蓝菜挥发性物质及硒赋存形态分析[J]. 食品

粉,随后加入浓盐酸 5 滴,摇匀静置 1 h。

(2) 醋酸铅反应: 在 2 mL 提取液中加入 1. 0% Pb(CH₃COO)₂ · 3H₂O 溶液 2mL,混匀后静置 2 h,观察颜色变化。

(3) 三氯化铝反应: 在 2 mL 提取液中加入 1% AlCl₃ · 6H₂O 甲醇溶液 1 mL,混匀后,观察颜色变化。

(4) 浓硫酸反应: 在 2 mL 提取液中加 1.5 mL 浓硫酸,摇匀,再沸水浴 5 min。

(5) Na₂CO₃ 反应: 在 2 mL 提取液中加 5% Na₂CO₃ 3 mL,摇匀,密闭静置 30 min,通空气 10 min。

(6) 氨性氯化锶反应: 取甲醇 10 mL,加氨水定容至 25 mL,成为被氨水饱和的甲醇溶液;向 2 mL 样品液中加 0.01 mol/L SrCl₂ · 6H₂O 甲醇液 10 滴,再加被氨水饱和的甲醇液 10 滴,摇匀,静置 1 h。

(7) 硼酸反应: 向 2 mL 提取液中加 1. 0% H₂O₄C₂ · 2H₂O 10 滴,再加 2. 0% H₃BO₃ 溶液 3 mL。

(8) 四氢硼钠反应: 向 2 mL 提取液中加 8 mg NaBH₄,再加 1. 0% 盐酸 2 mL,摇匀,静置 2 h。

1.3 紫外-可见光谱分析及含量测定

1.3.1 总类胡萝卜素含量的测定 取干燥花瓣粉末 0.1 g 放入具橡皮塞的试管中,加入提取剂丙酮-石油醚混合液(体积比为 1 : 4) 10 mL 浸提 48 h,过滤定容至合适的浓度后,用澳大利亚生产的 Cintra-404 双光束紫外-可见分光光度计在 400~500 nm 处扫描,扫描间隔为 2 nm,石英杯直径为 1.0 cm^[4]。记录各品种最大吸收峰处的光密度,根据总类胡萝卜素的消光系数,按照下式进行含量计算,并对所得数据取平均值^[5]:

$$D = E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times C \times d。$$

式中: *D* 为最大吸收峰的光密度; *C* 为类胡萝卜素浓度,单位为 g/mL; *d* 为光通过类胡萝卜素溶液的距离,即比色杯的内径,单位为 cm; *E*_{1 cm}^{1%} 为类胡萝卜素的消光系数,通常使其平均值为 2 500。

1.3.2 总黄酮含量的测定 取干燥花瓣粉末 0.1 g 放入具塞试管中,加入提取剂甲醇 10 mL 浸提 24 h,过滤,将浸提液定容至 10 mL,准确称取 20.3 mg 标样芸香苷,用少量甲醇溶解,用盐酸化甲醇溶液定容至 25 mL,配成 0.812 mg/mL 标准溶液。分别取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 标准溶液加盐酸化甲醇溶液至 4 mL,随后分别加入 1% AlCl₃ · 6H₂O 甲醇溶液 6 mL,平衡 10 min。在 200~700 nm 处慢速扫描,采样间隔 1 nm,发现在 270、405 nm 处各有一吸收峰,其中以 270 nm 处准确度最佳,所以以 270 nm 处吸光度(*D*_{270 nm}) 绘制标准曲线,求出线性回归方程^[4]。取 2 mL 提取液,加入 3 mL 1% AlCl₃ · 6H₂O 甲醇溶液,平衡 10 min,测定 *D*_{270 nm},利用标准曲线线性回归方程计算样品液浓度,得出样品的总黄酮含量。

1.3.3 色素中花色苷含量的检测 取干燥的花瓣粉末 0.3 g,用含 1. 0% 浓盐酸的甲醇溶液[*V*(浓盐酸) : *V*(甲醇) = 1 : 99] 提取 12 h,定容至 50 mL,设置紫外-可见分光光度计电压在 200 V,在波长 535 nm 处扫描^[6]。采用改进的 Fuleki 等的方法^[7] 计算花色苷的含量,公式为:

$$\text{花色苷含量}(\mu\text{g/g}) = (D_{535\text{ nm}} \times V \times n \times 10) / 98.2 \times m。$$

式中: *D*_{535 nm} 为色素在 535 nm 波长处的吸光度; *V* 为一定质量的果实提取色素时的定容体积(mL); *n* 为比色时稀释的倍数; 98.2 为花色苷色素在 535 nm 波长处的平均消光系数; *m* 为猬实花瓣的质量(g)。

2 结果与分析

2.1 色素特征显色反应

猬实的 2 种花色的色素定性、定量反应的结果十分相似,只是颜色深浅有些差异。由表 1 可知,猬实的白色花和红色花在石油醚试验中表现不同程度的淡黄色,说明它们都含有类胡萝卜素。在盐酸试验中,红花和白花均表现淡粉色,说明均含有花色苷,但含量较少。在氨水测试中,2 种花色均显示有较深的铁锈色,表明都含有黄酮醇类化合物或可能含有查耳酮。

表 1 不同猬实花色的色素类型测试的颜色反应

花色	石油醚试验	10% 盐酸试验	10% 氨水试验
白色	草黄色	极淡粉色	铁锈色
红色	淡黄色	淡粉色	铁锈色

2.2 类黄酮的显色反应

(1) 浓盐酸-镁粉反应。所选 2 种花色猬实均呈粉红色(表 2),说明猬实花瓣花色素中不含查耳酮、噢啉、儿茶素,而可能含有黄酮醇、二氢黄酮醇(即黄烷酮醇)、二氢黄酮(即黄烷酮)、花色苷及其苷元(即花色素),可能也含异黄酮。

(2) 醋酸铅反应。2 种花色均出现白色沉淀(表 2),表明含有黄酮类化合物,且具有邻二酚羟基或兼有 4-酮基、3-OH 或 4-酮基、5-OH 结构。

(3) 三氯化铝反应。2 种花色均表现淡橙色(表 2),表明色素中含有黄酮或可能含有查耳酮类和橙酮类。

(4) 浓硫酸反应。2 种花色均呈棕黄色,在沸水中 5 min 不变色(表 2),说明猬实花瓣色素中含有花色苷,且可能不含二氢黄酮。

(5) 碳酸钠反应。反应均呈现黄色,且通气后颜色没有变化(表 2),说明猬实花瓣花色素中含有黄酮类化合物且不含二氢黄酮、查耳酮、噢啉。

(6) 氨性氯化锶反应。2 种花色均出现淡黄色沉淀(表 2),说明其色素分子中含有 3',4'-二羟基。

(7) 硼酸反应。2 种花色均表现无色(表 2),表明其色素中不含有 5-羟基黄酮和 2'-羟基查耳酮类化合物。

(8) 四氢硼钠反应。2 种花色均呈现无色(表 2),该反应是二氢黄酮类化合物的专属反应,无色则说明花色素中不含二氢黄酮和二氢黄酮醇,可能含有查耳酮、黄酮、黄酮醇和异黄酮等。

2.3 不同花色素的含量分析

试验中类胡萝卜素在 448 nm 出现了最大吸收峰,根据公式分别得出 2 种花色色素的总类胡萝卜素含量,白花为 23.8 mg/g,红花为 8.8 mg/g(表 3),从而可知白色花和红色花间的类胡萝卜素含量差异较明显。

根据 2 种花色在 270 nm 的吸收值和由芸香苷而得到的标准曲线方程 *C* = 2.498 8*D*_{270 nm} - 0.211 9[*r*² = 0.996 7,式中 *C* 为芸香苷浓度(mg/mL), *D*_{270 nm} 为吸光度],得出了 2 种花色

表 2 猬实不同花色的类黄酮的显色反应

花色	浓盐酸－ 镁粉反应	醋酸铅反应	三氯化铝反应	浓硫酸反应	碳酸钠反应	氨性氯化锶反应	四氢硼钠反应	硼酸反应
白色	粉红色	白色沉淀	淡橙色	棕黄色	淡黄色	黄色沉淀	无色	无色
红色	粉红色	白色沉淀	淡橙色	棕褐色	淡黄色	黄色沉淀	无色	无色

色素的总黄酮含量,白花为 22.5 mg/g,红花为 16.5 mg/g(表 3),红花的总黄酮含量略低于白花。

根据 Fuleki 等的方法^[7]计算得出 2 种不同花色的猬实中花色苷含量分别为 144(白花)、163(红花) μg/g(表 3),说明红花的花色苷含量大于白花,但两者差异不大。

综上所述,白花总类胡萝卜素、总黄酮的含量比红花高,而花色苷含量低于红花,其结果与前面的显色反应结果基本一致。

表 3 猬实的不同花色的各类色素的含量(干重)

花色	总类胡萝卜素 (mg/g)	总黄酮 (mg/g)	花色苷 (μg/g)
白色	23.8	22.5	144
红色	8.8	16.5	163

3 结论与讨论

安田齐根据颜色将植物的花色素分为类胡萝卜素、类黄酮和花青素,类黄酮主要包括黄酮、黄酮醇、查耳酮^[8],而花青素应是花色素及其与糖相结合的苷(花色苷)^[9]。类胡萝卜素主要以结晶或沉淀存在于细胞的质粒中,多为 β-胡萝卜素和莖菜黄质,难溶于水,可以产生红色、橙色和黄色色素,是黄色的主要来源;类黄酮和花色苷可以产生从深红到红紫的全部颜色范围,易溶于水,主要存在于植物细胞的液泡中^[10]。

植物花色是多种因子协同作用的结果,但在根本上是花瓣细胞中存在色素的不同种类及其含量的时空组合最终决定花色,但花色与花瓣所含色素的颜色并不完全相同^[11]。本试验选取 2 种花色的猬实优株花瓣,特征显色反应结果表明:猬实花瓣的花色素主要含有类胡萝卜素、类黄酮和花色苷,其中类黄酮化合物含有黄酮和黄酮醇,不含二氢黄酮类化合物、查耳酮、噢啡、儿茶素,色素分子中含 3',4'-二羟基。随后,用紫外-可见光谱分析初步测定了 2 种花色花瓣中主要的色素含量,结果表明,2 种花色花瓣中总黄酮含量都较高,白色花中总类胡萝卜素含量和总黄酮含量十分接近,表明猬实的白花花色主要是由类胡萝卜素和黄酮类化合物共同作用产生。红色花中总类胡萝卜素含量、总黄酮含量比白色花的低,但花色苷含量比白花的高,表明花色苷是红色的主要呈色色素。

本试验中白色花和红色花之间花色苷含量略有差异,可

能是由 2 株猬实生长在相对独立的环境造成的。花色苷含量与生长环境有一定关系,花色苷是花青素与糖合成的,而花青素又是糖代谢的产物^[12],因此阳光充足的生长环境有利于花色苷的合成和积累,更有利于猬实红色花色的显示。

本试验中猬实花瓣色素的特征显色反应和紫外-可见光谱分析出现了相近的结果,特征反应更加便捷,在较短的时间内给人直观的结果,使人对试验有初步的轮廓和构想,而用紫外-可见光谱分析法在显色反应的基础上加以验证,能同时较为准确地计算出各色素的含量,便于进一步的分析。猬实花色素成分十分复杂,进行进一步分析需要借助更加精密的仪器,如核磁共振仪、高效液相色谱仪和质谱仪等。

参考文献:

[1] 沈植国,谭运德,薛茂盛,等. 我国稀有保护植物猬实研究进展[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):193-197.

[2] 马卡姆 K R. 黄酮类化合物结构鉴定技术[M]. 张宝琛,唐崇实,译. 北京:科学出版社,1990:19-57.

[3] 赵昶灵,郭维明,陈俊愉. 梅花花色色素种类和含量的初步研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(2):68-73.

[4] 陈建,吕长平. 不同花色非洲菊品种花色成分初步分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(增刊):73-76.

[5] Deubert K H. A rapid method for the extraction and quantitation of total anthocyanin of cranberry fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1978,26(6):1452-1453.

[6] 吴丽媛,罗向东,戴亮芳,等. 杜鹃花色素的分离与鉴定分析[J]. 食品科学,2011,32(13):19-22.

[7] Fuleki T,Francis F J. Quantitative methods for anthocyanins:1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries[J]. Journal of Food Science,1968,33(1):72-77.

[8] 安田齐. 花色的生理生物化学[M]. 傅玉兰,译. 北京:中国林业出版社,1989.

[9] 刘米达夫. 植物化学[M]. 杨本文,译. 北京:科学出版社,1985.

[10] 刘志祥,洪亚辉,莫爱华,等. 观赏植物花色分子遗传学及基因工程研究进展[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2002,28(6):531-534.

[11] 张剑亮,何琴,潘大仁,等. 观赏向日葵花瓣色素成分分析[J]. 广东农业科学,2011,38(8):125-129.

[12] 张元慧,关军锋,杨建民,等. 李果实发育过程中果皮色素、糖和总酚含量及多酚氧化酶活性的变化[J]. 果树学报,2004,21(1):17-20.