

紫叶矮樱叶片成色色素分析

包努恩都特, 李厚华, 刘小微, 唐豆豆, 袁柳祥, 黄文梅

(西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以紫叶矮樱叶片为试材,通过薄层层析色谱分析法(TLC)、紫外-可见分光光度法(UV)对其色素种类进行初步推断。通过高效液相色谱法对叶片色素进行进一步验证,并对鉴定出的色素种类进行定量分析。结果表明:紫叶矮樱叶片内含有叶绿素(主要是叶绿素 a)、类胡萝卜素,以及矢车菊素(Cyanidin)、天竺葵素、矢车菊素半乳糖苷(Cyanidin-galactoside)以及儿茶素、二氢杨梅酮等单体酚;定量分析发现紫叶矮樱叶片呈色的机制主要是叶绿素与矢车菊素半乳糖苷(Cyanidin-galactoside)和矢车菊素(Cyanidin)2种花青苷共同作用的结果,其相对含量在检测色素总含量中占 2.85%,类胡萝卜素、对香豆酸、儿茶素等辅助色素对呈色也起到了一定的辅助作用。

关键词:紫叶矮樱;花青苷;矢车菊素

中图分类号:S 687.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0046-04

随着社会经济的快速发展,人们越来越重视自身的健康。而日常生活中随处可见的合成色素的应用与研究成果使人们认识到合成色素不仅没有营养价值,而且有害于人体健康。与合成色素相比,天然植物色素具有无毒无副作用,着色自然,安全性高,增强人体功能、防病保健等优点而日益受到人们的青睐^[1-2]。因此,探索和开发利用天然植物色素资源有着非常重要的意义。花青素(又称花色素)属类黄酮化合物,是水溶性的天然色素,不仅色彩丰富,还具有一系列生物功能,如抗自由基抗突变,对心血管疾病、衰老的预防,对肥胖症、高血压的改善,对视力的提高等^[3]。

紫叶矮樱(*Prunus × cistena*)属蔷薇科李属(*Prunus*)落叶灌木或小乔木。其树形紧凑、枝叶稠密、植株色感非常好,是城市园林绿化中应用广泛的彩叶配置树种。目前有关紫叶矮樱的研究主要集中在光合特性^[4]、抗性^[5]和色素含量年变化^[6]等方面,对其叶片色素进行定性、定量分析的研究较少。该研究在前人的工作基础上,利用紫外-可见分光光度法、薄层层析色谱法、高效液相色谱法对紫叶矮樱叶片主要成色色素进行分析,旨在探明紫叶矮樱叶片主要成色色素、阐述其呈色机理,并为我

国食品、药品及保健行业筛选出更具潜力的天然色素。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为紫叶矮樱叶片,采自西北农林科技大学博览园,于 2014 年 6 月选择健康、长势一致的叶片,流水冲洗后再用蒸馏水洗净,使用吸水纸轻柔处理叶表面的水珠后置于-20℃冰箱冷藏备用。

供试试剂:标准品香豆酸、对香豆酸、二氢杨梅酮、芦丁、绿原酸、二氢槲皮素购自天津一方科技有限公司;木犀草素、表儿茶素购自天津金测分析技术有限公司;标准品矢车菊素、矢车菊素半乳糖苷、飞燕草素、山奈酚购自美国 Sigma 公司。色谱级甲醇、乙腈购自 Spectrum 公司。

供试仪器:日立 L-2000 高效液相色谱仪(检测器为 L-2490 DAD)、紫外-可见分光光度计(岛津 UV-2450)、旋转蒸发仪、冷冻干燥机。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的预处理 将-20℃冰箱冷藏备用的紫叶矮樱叶片材料,转至-80℃冰箱中预冻 24 h 后,真空冷冻干燥 48 h,取出研磨成粉末暗处保存待用。

1.2.2 色素萃取 叶绿素的萃取液:萃取方法参考文献[7]的方法并稍作修改,精确称取紫叶矮樱备用的粉末 0.25 g,加入 90%丙酮溶液[V(丙酮):V(乙醇)=9:1]并定容至 10 mL。类胡萝卜素萃取液:精确称取紫叶矮樱备用的粉末 0.25 g,加入[V(丙酮):V(石油醚)=1:1]溶液定容至 10 mL。2 种溶液都放在 4℃冰箱萃取 48 h。甲醇盐酸萃取液(用于检测花青苷):精确称取紫叶矮樱

第一作者简介:包努恩都特(1985-),女,硕士研究生,研究方向为园林植物色素分析。E-mail: mongolmusic@126.com.

责任作者:李厚华(1973-),男,博士,副教授,现主要从事转基因及类黄酮次生代谢等研究工作。E-mail: lihuhua73@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(K31570697);西北农林科技大学基本科研业务费资助项目(QN2013079)。

收稿日期:2015-12-16

备用的粉末 0.25 g, 参照 LI 等^[8] 的方法并稍作修改, 加入 10 mL 1% 的甲醇盐酸萃取(97 mL 甲醇+3 mL 36% 的盐酸), 超声提取 3 次, 合并萃取液并旋转蒸发浓缩定容至 10 mL。水解萃取液(用于检测花青素): 参照辛转霞等^[9] 的方法并稍作修改, 在 2 mL 离心管中量取 450 μ L 甲醇盐酸萃取液, 加入 900 μ L 2 mol/L 的盐酸, 并 95℃ 恒温加热 45 min, 随后冰上冷却, 加入 450 μ L 异戊醇萃取液的同时剧烈晃动。6 000 r/min, 4℃ 条件下离心 10 min。然后放入 4℃ 冰箱中待其分层, 上层液体含有花青苷水解后的花青素和其它类黄酮, 收集上层液体移入新离心管中, 并保存于 4℃ 冰箱中备用。甲醇萃取液(用于检测类黄酮): 精确称取紫叶矮樱备用的叶片粉末 0.25 g, 加入 10 mL 甲醇萃取, 超声提取 3 次, 合并萃取液并旋转蒸发浓缩定容至 10 mL。

1.2.3 紫外可见分光光度计检测 光谱鉴定: 利用紫外-可见分光光度计检测在 200~700 nm 波长范围内检测上述 5 种提取液的吸收波峰, 并初步判断所含色素种类。光度测定: 利用紫外-可见分光光度计检测叶绿素、类胡萝卜素萃取液依次在 663、645、470 nm 3 个吸收波长处的吸收值, 根据此数值计算紫叶矮樱叶片中的叶绿素、类胡萝卜素含量^[10]。测定总黄酮含量的方法参考文献^[11], 以芦丁作为样品, 配制梯度浓度标准液并测出其

应的标准曲线。

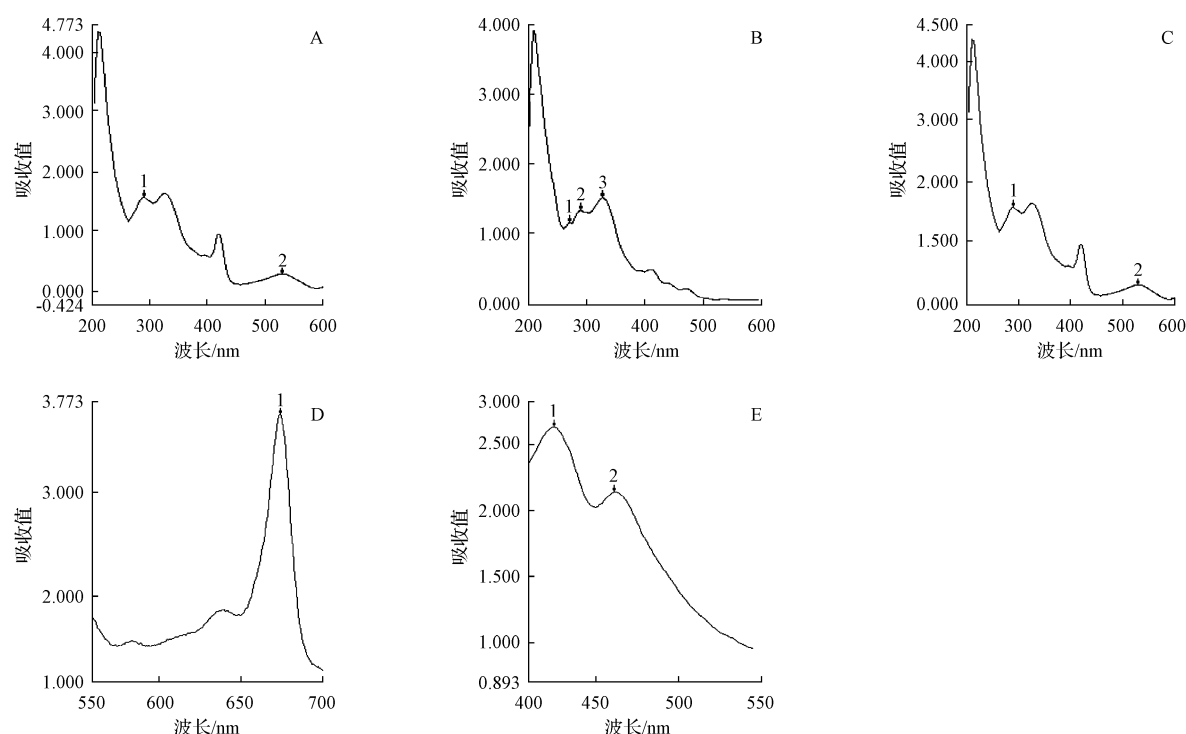
1.2.4 薄层色谱法鉴定色素 色素分离: 用玻璃毛细管将测试物质和标样线性点滴在纤维素层析板上, 并将层析板放置在配有流动相的层析缸中进行色谱分离。流动相 Formic V(浓盐酸): V(水): V(甲酸)=2:3:5。色素鉴定: 在正常光照条件下, 测出薄层纤维素板上色斑的 R_f 值(即色斑中心至原点的距离/溶剂前沿至原点的距离), 并与标样对照确定化合物种类^[12]。在紫外光照射下, 观察其颜色变化并参考 HARBORNE^[13] 的方法进行鉴定。用氨气熏蒸层析板, 观察其颜色变化, 通过与标样对比确定其化合物种类。

1.2.5 高效液相色谱法检测 检测参数: Lachrom-C18 色谱柱(Hitachi, Japan; 250 mm \times 4.6 mm; 5 μ m), 柱温 40℃, 流速 0.5 mL/min, 进样量 10 μ L。流动相参数: A 为 0.04% 的甲酸水溶液; B 为色谱级乙腈。采用梯度洗脱, 洗脱程序: 0~40 min, A 为 95%~0, B 为 5%~100%; 40~60 min, A 为 0, B 为 100%。

2 结果与分析

2.1 紫外-可见分光光度计检测

紫外-可见分光光度计光谱检测结果表明, 花青苷萃取液在紫外光区 288 nm(图 1-A, 峰 1)、可见光区 531 nm



注: A. 花青苷萃取液; B. 类黄酮萃取液; C. 水解萃取液; D. 叶绿素萃取液; E. 类胡萝卜素萃取液。

Note: A. anthocyanin extracts of *Prunus cistena* leaves; B. flavonoids extracts of *Prunus cistena* leaves; C. hydrolysis extracts of *Prunus cistena* leaves; D. chlorophyll extracts of *Prunus cistena* leaves; E. carotenoids extracts of *Prunus cistena* leaves.

图 1 紫叶矮樱叶片类黄酮化合物萃取液紫外图谱

Fig. 1 UV spectrum of flevonoid extracts of *Prunus cistena* leaves

(图 1-A,峰 2)波长附近有较强的吸收峰,初步推测紫叶矮樱叶片中可能含有花青苷和其它类黄酮物质^[14]。甲醇萃取液在 270(图 1-B,峰 1)、290(图 1-B,峰 2)、330 nm(图 1-B,峰 3)附近检测到较强的吸收峰,这与二氢黄酮醇(290 nm 左右)、黄烷酮(288 nm 左右)、黄酮类(320~380 nm)物质的特征吸收峰较相符,由此推测紫叶矮樱叶片中很有可能含有二氢黄酮醇、黄烷酮、黄酮醇类物质^[15]。花青苷水解萃取液在 285 nm(图 1-C,峰 1)、533 nm(图 1-C,峰 2)处有较高的特征吸收峰,说明紫叶矮樱叶片中很有可能含有花青苷中的矢车菊素、天竺葵素等母体色素。在 400~500 nm^[8](类胡萝卜素吸收峰区间,图 1-E,峰 1、峰 2)及 600~700 nm^[10](叶绿素吸收峰区间,图 1-D,峰 1)分别检测出类胡萝卜素与叶绿素的吸收峰,表明紫叶矮樱叶片中含有叶绿素与类胡萝卜素。通过类胡萝卜素及叶绿素定量方法计算出的类胡萝卜素、叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量依次为 460、2 510、600、3 110 mg/kg。

2.2 薄层层析色谱检测

从表 1 紫叶矮樱花青苷萃取液在 Formic 流动相中的展开结果可以看出,在可见光下显示的 2 个红色斑点(图 2-A), R_f 值依次为 0.57、0.22,这与 Cyanidin-galactoside(矢车菊素半乳糖苷)及 Cyanidin(矢车菊素)标准品的 R_f 值基本一致,由此可判断出红色斑点为 Cyanidin-galactoside(矢车菊素半乳糖苷)和 Cyanidin(矢车菊素)。通过显色反应鉴定肉眼看不到的类黄酮物质,可见光下显示红色的斑点在 UV 照射下显示出暗橙色,可判断出花青苷的存在。在紫外光下纤维素薄层板上显示亮黄绿色的条带,而这条带在可见光下呈现无色,推断出紫叶矮樱叶片中可能含有黄烷酮类物质。由此可知薄层层析色谱分析法及紫外-可见分光光度法检测出来的结果基本一致。

2.3 高效液相色谱检测

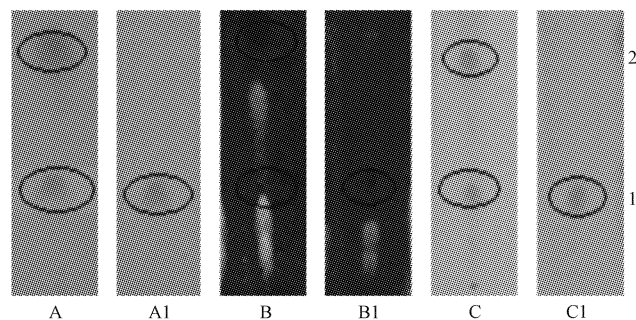
利用高效液相色谱仪对紫叶矮樱叶片花青苷水解萃取液进行检测,在 21.85、26.20 min 处有明显的信号峰,这与标准品矢车菊素、天竺葵素的出峰时间基本一致,验证紫叶矮樱叶片中存在矢车菊素、天竺葵素等 2 种母体色素。对花青苷的进一步检测结果表明在

18.25、19.03、19.67 min 处发现有较强的信号峰,这与标准品矢车菊素半乳糖苷、矢车菊素芸香苷、阿拉伯糖苷的信号峰基本一致,表明紫叶矮樱叶片中存在矢车菊素半乳糖苷、矢车菊素芸香苷、阿拉伯糖苷。结合紫外和薄层层析结果综合分析,证明紫叶矮樱叶片中存在的主要花青苷为矢车菊素及其衍生物。除这些花青苷,其它相对稳定的黄酮类物质可以直接检测其甲醇萃取液(类黄酮检测用)。检测结果表明,在保留时间为 23.29、26.22、28.45、30.87、32.07、34.80、38.51、45.31 min 处检测出信号峰。分别与儿茶素、绿原酸、二氢杨梅酮、芦丁、对香豆酸、二氢槲皮素、杨梅素、槲皮素的出峰时间基本一致。

表 1 紫叶矮樱叶片甲醇盐酸萃取液在 Formic 流动相中的 R_f 值

Table 1 R_f value of anthocyanin extract of *Prunus×cistena* leaves

流动相 Formic	R_f 值 R_f value	
	矢车菊素 Cyanidin	矢车菊素半乳糖苷 Cyanidin-galactoside
	0.22	0.57



注: A、B、C 及 A1、B1、C1 分别为花青苷萃取液及水解萃取液在 Formic 流动相中可见光、紫外、氨水处理前后的色谱图。1. 矢车菊素, 2. 矢车菊素半乳糖苷。

Note: Results of anthocyanin extract and hydrolysis extract in three different conditions (visible light, UV lamp, ammonia fumigating). 1. cyanidin, 2. cyanidin-galactoside.

图 2 紫叶矮樱叶片花青苷及水解萃取液薄层层析结果图

Fig. 2 Thin layer chromatography results of anthocyanin extract and hydrolysis extract

表 2 紫叶矮樱叶片单体酚种类及含量

Table 2 The mono-phenol species and contents in *Prunus×cistena* leaves

编号 No.	标准品 Standard	标准曲线方程 Standard curve	保留时间 Retention time/min	标准品质量分数 Mass fraction of standard/(mg·kg ⁻¹)
1	矢车菊素	$Y=7E-08X+0.0012, R^2=0.9993$	22.78	99.47±0.69
2	矢车菊素半乳糖苷	$Y=7E-08X+0.0009, R^2=0.9998$	18.56	590.13±8.82
3	矢车菊素芸香苷	$Y=7E-08X+0.0009, R^2=0.9998$	19.35	2066.89±2.87
4	阿拉伯糖苷	$Y=7E-08X+0.0009, R^2=0.9998$	19.87	1706.77±2.95
5	儿茶素	$Y=2E-07X-0.0095, R^2=0.9999$	23.73	5808.44±4.91
6	绿原酸	$Y=2E-07X+0.0017, R^2=0.9997$	24.33	370.37±3.76
7	表儿茶素	$Y=2E-07X-0.0141, R^2=0.9999$	26.76	5337.31±5.04
8	二氢杨梅酮	$Y=3E-08X-0.0003, R^2=0.9996$	28.71	75.86±1.41
9	芦丁	$Y=8E-07X-0.0326, R^2=0.9996$	30.99	2522.68±4.13
10	对香豆酸	$Y=1E-07X-0.0018, R^2=0.9997$	32.11	1059.49±7.33
11	二氢槲皮素	$Y=6E-08X+0.0033, R^2=0.9993$	34.80	504.72±6.31
12	杨梅素	$Y=6E-08X+0.0009, R^2=0.9995$	38.51	470.42±3.78

3 结论与讨论

花青苷类色素是植物组织呈色的主要色素^[16],该试验通过紫外分光光度计和薄层层析色谱法进行定性分析,鉴定出叶片所含的花青苷为矢车菊素(Cyanidin)及矢车菊素半乳糖苷(Cyanidin-galactoside),是紫叶矮樱叶片呈现红色的主要色素;并通过高效液相色谱仪进行定量分析,数据显示,矢车菊素和矢车菊素半乳糖苷含量分别为 99.47 mg/kg 和 590.13 mg/kg。

在植物中,花青苷和叶绿素的质量分数比会影响其所在组织器官的颜色^[17],经检测,紫叶矮樱叶片中总叶绿素含量为 3 110 mg/kg,其绿色与花青苷的红色为互补色,起着使叶片红色加深的作用^[18]。此外叶片的类黄酮萃取液还检测出儿茶素、绿原酸、表儿茶素、二氢杨梅酮、芦丁、对香豆酸、杨梅素、二氢槲皮素等单体酚,而这些辅助色素为紫叶矮樱叶色形成也起着一定的作用。

植物天然色素的筛选需考虑的因素较多^[19],其中原材料的来源、生产工艺难易程度、稳定性等是首要考虑的因素。该试验还发现,前期甲醇萃取液的检测效果不理想,可能原因是天然色素性质不稳定,故提取时可加少量盐酸来保证提取效果。

综上所述,紫叶矮樱作为常见的园林彩叶树种,具有叶片易获取、材料来源丰富、色素提取量较大等优点,是一种潜在的天然色素材料资源。

参考文献

- [1] 温广宇,朱文学.天然植物色素的提取与开发应用[J].河南科技大学学报,2003,23(2):68-74.
- [2] 孙胜男.天然植物色素的应用研究[J].黑龙江农业科学,2014(3):142-144.
- [3] 刘晓芬,李芳,殷学仁,等.花青苷生物合成转录调控研究进展[J].园艺学报,2013(11):2295-2306.
- [4] 王光全,黄勇,孟庆杰,等.紫叶稠李色素提取及测定研究[J].食品科

学,2007,28(7):178-181.

- [5] 李云飞,李彦慧,王中华,等.土壤干旱胁迫对紫叶矮樱叶片呈色的影响[J].生态学报,2009,29(7):3678-3674.
- [6] 朱书香,杨建民,王中华,等.4种李属彩叶植物色素含量与叶色参数关系的研究[J].西北植物学报,2009(8):1663-1669.
- [7] 高艳,李厚华,李玲,等.紫叶李叶片色素成分分析[J].浙江农林大学学报,2014,31(3):481-487.
- [8] LI H H, FLACHOWSKY H, FISCHER T C, et al. Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Planta, 2007, 226(5):1243-1254.
- [9] 辛转霞,李厚华,李玲,等.夏堇花成色色素分析[J].西北林学院学报,2011,26(6):107-109.
- [10] 高俊凤.植物生理学实验技术[M].西安:世界图书出版公司,2000:99-103.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2005年版一部[S].北京:化学工业出版社,2005:39.
- [12] 宋学英,杨华,张枫,等.用薄层层析法分离菠菜中的色素[J].首都医科大学学报,2002,23(1):78-79.
- [13] HARBORNE J B. Classes and functions of secondary products from plants[M]. London:Imperial College Press,1999:1-25.
- [14] 王爱晶,刘晓东,刘香环,等.芍药花红色素的分离与初步鉴定[J].东北林业大学学报,2009,37(5):74-76.
- [15] WINKEL-SHIRLEY B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiol, 2001,126(2):485-493.
- [16] 于晓南,张启翔.彩叶植物多彩形成的研究进展[J].园艺学报,2000,27(1):533-538.
- [17] MANETAS Y. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red[J]. Flora-Morphol Distrib Funct Ecol Plants, 2006, 201(3):163-177.
- [18] VOLK S L, BISHOP N I. Photosynthetic efficiency of a phycocyanin-less mutant of cyanidium[J]. Photochem-physiol, 1968(6):213-221.
- [19] 廖少霞,王鹏,徐渊金,等.植物源天然食用色素及其开发利用研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(7):211-216.

Cromogenic Pigments in *Prunus × cistena* Leaves

BAO Nuendute, LI Houhua, LIU Xiaowei, TANG Doudou, YUAN Liuxiang, HUANG Wenmei

(College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Pigments of *Prunus × cistena* leaves were qualitatively testified by using thin layer chromatography and UV photo spectrometer. Then quantitatively analyzed through HPLC (high performance liquid chromatography). The results showed that *Prunus × cistena* leaves contained chlorophyll (mainly chlorophyll a), carotenoids, cyanidin, pelargonidin, cyanidin-galactoside, catechin, dihydromyricetin and so on. The purple color of *Prunus × cistena* leaves was mainly caused by the interaction of cyanidin, cyanidin-galactoside and chlorophyll. The proportion of cyanidin and cyanidin-galactoside's relative content was 2.85% in total tested pigments. Other tested pigments played roles as co-pigments.

Keywords: *Prunus × cistena*; anthocyanin; cyanidin