

勿忘我花色素的分离与鉴定

来欣¹, 王慢想¹, 宋先亮², 李强¹

(1 北京林业大学理学院, 北京 100083 2 北京林业大学材料学院, 北京 100083)

摘要: 采用超声波强化溶剂法提取了蓝紫色勿忘我花色素, 提取溶剂为 55% ~ 60% 的酸性乙醇溶液。色素平均得率 15%, 色价 (540nm) 为 36.55。色素经纸色谱 (PC) 分离主要含有黄色和红色两种物质, 特别地对纸色谱分离出的这两种物质进行了显色反应、紫外可见光谱 (UV)、红外光谱 (IR) 的测定分析, 认为黄色物质为黄酮类化合物, 红色物质为花青素。色素经液相色谱 (HPLC) 分离, 主要含有 7 个组分, 相对含量分别为 63.45%、25.45%、0.59%、0.64%、4.27%、5.44%、0.21%。色素经液相色谱-质谱 (LC-MS) 联用仪的分离测定和结构分析, 结果表明蓝紫色勿忘我花色素中含有矢车菊及其葡萄糖苷、黄酮及其衍生物, 可能含有少量的飞燕草素和芍药定及其苷。

关键词: 勿忘我花; 色素; 分离; 鉴定

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1006-2513(2011)01-0148-08

Separation and identification of limonium sinuatum pigments

DING Lai-xin¹, WANG Man-xiang¹, SONG Xian-liang², LI Qiang¹

(1 College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2 College of Material Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract In this study, the pigments from violet-blue Forget-me-not flower (*Limonium sinuatum*) was obtained by ultrasonic enhancing solvent extraction. Extraction solvent was 55% ~ 60% acid ethanol. The average yield rate of the pigment was 15% and color scale (540nm) was 36.55. The pigment contained yellow and red two substances through Paper Chromatography (PC) separation. Color reaction, UV-visible spectroscopy (UV) and Infrared spectroscopy (IR) measuring and analysis were executed upon those two substances particularly. This indicated that the yellow substance was flavonoids and red substance was anthocyanin. Seven main components were obtained from the pigment via High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation. Their relative content ratios were 63.45%, 25.45%, 0.59%, 0.64%, 4.27%, 5.44%, 0.21%. The pigment was separated and structurally analyzed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). The results showed that the pigment of violet-blue Forget-me-not (*Limonium sinuatum*) contained cyanidin and its glucoside, flavone and its derivatives, it may contain delphinidin, peonidin and its glycosides.

Key words forget-me-not flower; pigment; separation; identification

勿忘我 (*Limonium sinuatum*) 花属于蓝雪科, 色丰富, 且花期长, 久不褪色不凋落^[1]。勿忘我补血草属, 为多年生草本植物, 花小而密集, 花 花中最艳丽的是蓝紫色花, 花可泡茶, 具有清热

收稿日期: 2010-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901139)。

作者简介: 丁来欣 (1957-), 女, 高级实验师, 从事化学实践教学和天然产物化学研究。

去火、平肝明目、消炎止痛的作用^[2]。勿忘我花色素是从蓝紫色勿忘我花中提取得到的紫红色固体色素,为花青素类色素^[3-4]。花青素在自然界中常和糖结合,形成花色苷。花色苷作为一种天然食用色素,具有安全、无毒、资源丰富的特点,并有一定的保健作用,能够起到抑制血小板凝固、预防血栓、心脏病、抗癌、延缓衰老等作用^[5-6],因此花色苷在食品、化妆品、医药领域的应用有着巨大潜力^[7-10]。

勿忘我花色素的分离与分析鉴定,对天然色素的开发和利用意义重大。为了充分有效地利用勿忘我花色素这一优质的天然资源,对提取的勿忘我花色素进行了初步的分离和结构鉴定,相关内容国内尚未见文献报道。本文首次从勿忘我花色素中分离鉴定出矢车菊素及其葡萄糖、黄酮及其衍生物,可能含有少量的飞燕草素和芍药色素及其葡萄糖苷,这为更好地对蓝紫色勿忘我花色素进行提取、开发和应用,提供了一定的表征条件和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蓝紫色勿忘我花(市售,自然风干后,剪下花瓣备用);所用试剂(提取试剂均为分析纯)。

FW-100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);AR2140电子天平(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司);UV-4802型紫外可见分光光度计(龙尼柯(上海)仪器有限公司);KQ-500B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);旋转薄膜蒸发器(上海);FD-1B-55冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);AVATAR330FT-R傅立叶红外光谱仪(美国安捷伦公司);waters 1525液相色谱仪(美国);LTQ型液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Fisher)。

1.2 实验方法

1.2.1 色素的提取

由实验得知勿忘我花色素溶液在酸性条件下稳定,颜色为桃红色,而在中性和碱性条件下不稳定,红色变淡并变为黄绿色至黄色^[3]。选择55%-60%的酸性乙醇溶液为提取剂,按下述工艺提取得到花色素:干花瓣粉碎→加入酸性乙醇

水溶液→超声提取→过滤→减压浓缩滤液→石油醚洗涤滤液→冷冻干燥滤液→紫红色固体色素。花色素平均得率15%,色价(540nm)为36.55^[4]。

1.2.2 色素的纸色谱(PC)分离

将色素用提取溶剂溶解,进行薄层色谱和纸色谱分离,发现色素在硅胶板上由红色变为黄绿色。用纸色谱分离色素,颜色不变。展开剂为正丁醇:醋酸:水=4:1:5。

1.2.3 色素的显色反应

做了大量纸色谱,将分离出的斑点剪下,分别用提取溶剂浸泡、分离,对色素溶液进行还原显色反应和金属盐类试剂以及碱性试剂的显色反应。

1.2.4 色素的紫外可见光谱(UV)测定

将纸色谱分离出的斑点剪下,分别用提取溶剂浸泡、分离。并将斑点的溶液分别做紫外可见光谱扫描。

1.2.5 色素的红外光谱(IR)测定

将纸色谱分离出的斑点剪下,分别用提取溶剂浸泡、分离,用冷风将溶剂吹干,样品用KBr压片,测定红外光谱。

1.2.6 色素的液相色谱(HPLC)测定

将干花瓣粉碎后加入酸性乙醇水溶液,在室温下超声提取,经过滤、浓缩、石油醚洗涤后,色素溶液做液相色谱和液相色谱-质谱测定并分析。

液相色谱条件:色谱柱为Symmetry C18(75mm×4.6mm×3.5μm);流动相A:为乙腈-甲醇(130:90)含0.1%甲酸;流动相B为:0.1%的甲酸水溶液,流速各为0.15mL/min,检测波长为340nm。

1.2.7 液相色谱-质谱(LC-MS)测定

液相色谱-质谱联用仪(LTQ型)配备电喷雾电离源(ESI),实验采用正、负离子检测模式,检测质量范围为50~1000u,色谱柱为TCC18(4.6mm×250mm,5μm,Agilent Technique),以甲醇-醋酸-水(60:10:30)为流动相^[11],流速1000μL/min。

2 结果与讨论

2.1 色素的纸色谱(PC)分析

花色素用纸色谱展开后主要有两个斑点,一

个为黄色斑点，比移值 $R_f = 0.68$ 另一个为红色斑点， $R_f = 0.33$ 。可得出色素主要由黄色物质和红色物质组成。将红色斑点和黄色斑点分别剪下，用提取色素的溶剂浸泡，分离后用做其他分析测定。

2.2 色素的显色反应^[12]

盐酸镁粉反应：将黄色斑点溶液加入少量镁粉，滴加浓盐酸，产生大量气泡，溶液由浅黄色变为橙红色，为黄酮类正反应。红色斑点溶液同上述反应后，溶液颜色由桃红变为淡红，为花青素类正反应。

金属盐类试剂反应：向黄色斑点溶液中滴加 1% 三氯化铝乙醇液，溶液颜色不变，说明该物质分子中没有 5-羟基、4-羰基，或 3-羟基、4-羰基，或邻二酚羟基的黄酮类化合物。向黄色斑点溶液中加入等量的 2% 硼氢化钠甲醇溶液，1min 后，滴加浓盐酸，溶液颜色不发生变化，所以该物质不是二氢黄酮类物质。

碱性试剂反应：向黄色斑点溶液滴加 10% 氢氧化钠溶液，立即由浅黄色变为深黄色，为黄酮类正反应。红色斑点溶液滴加碱溶液后，立即由红色变为黄绿色，为花青素类反应。

2.3 色素的紫外可见光谱 (UV)测定

将黄色和红色斑点的溶液分别做紫外可见光谱，测定结果见图 1。红色斑点组分 a 在 274、353、544nm 处有吸收峰，和花青素苷的紫外吸收光谱最大吸收峰位置^[13]相一致，黄色斑点组分 b 在 275、358nm 处有吸收峰，与黄酮的吸收峰位置一致^[12]。

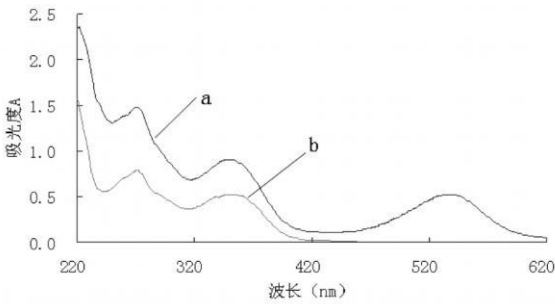


图 1 花色素中红色斑点 a 和黄色斑点 b 的紫外吸收光谱图
Fig 1 UV absorption spectrum of the red (a) and yellow (b) spot of pigments

2.4 色素的红外光谱 (IR)测定

红外光谱测定结果：黄色斑点物质的红外吸收光谱中 1624cm^{-1} 处有强吸收峰，为杂环中 $\text{C}=\text{O}$ 基， 1402cm^{-1} 的峰为 $=\text{C}-\text{H}$ ， $\text{C}-\text{H}$ 键产生， 1266cm^{-1} 的峰为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 键产生， 1075cm^{-1} 为 $\text{O}-\text{C}$ 和 $\text{O}-\text{H}$ 基产生的峰，体现了黄酮类结构中存在的基团特征^[13-14]。

红色斑点物质的红外吸收光谱中在 3404cm^{-1} 有强吸收峰，是缔合 $\text{O}-\text{H}$ 产生， 1752cm^{-1} (弱)，为 $\text{C}=\text{O}$ ， 1683cm^{-1} 、 1623cm^{-1} ，为 $\text{C}=\text{C}$ ， 1402cm^{-1} 为 $=\text{C}-\text{H}$ 或 $\text{O}-\text{H}$ ， 1306cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ 或 $\text{C}-\text{O}$ ， 1188cm^{-1} 和 1143cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}$ 或 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ， 917cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ ， 755cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{H}$ (芳烃)，体现了花青素类结构中存在的基团特征^[13-14]。

2.5 色素的液相色谱 (HPLC)测定

花色素的液相色谱测定结果见图 2 共含有 7 个组分，按照保留时间由小到大的顺序。

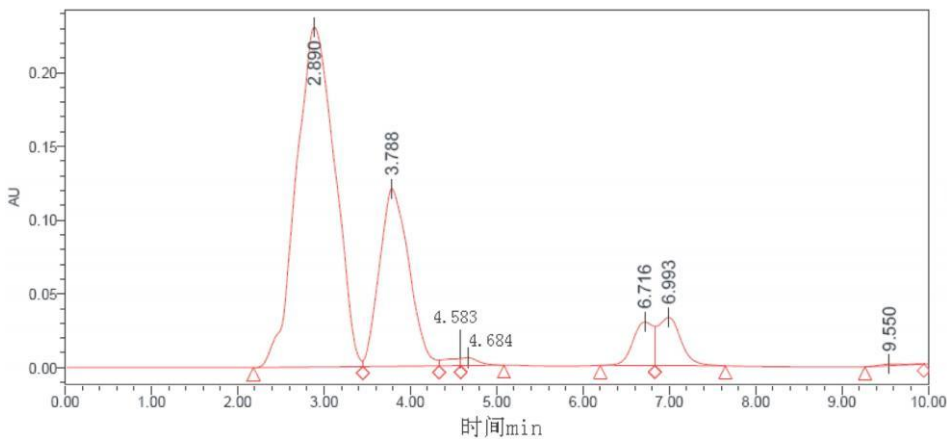


图 2 花色素高效液相色谱图
Fig 2 HPLC chromatogram of pigments

各组分的相对含量分别为：63.45%、25.45%、0.59%、0.64%、4.27%、5.44%、0.21%。由于没有标准样，不能给每个组分定性，所以又采用液相色谱-质谱测定分析色素样品。

2.6 色素的液相色谱-质谱 (LC-MS) 测定

花色素样品经过液相色谱-质谱联用仪分离

后，同时进行正离子和负离子检测。正离子和负离子检测的总离子流色谱图示于图 3。其中，在正离子检测模式下共检测到 5 种主要组分，根据质谱信号特征认为其中 3 种为花青素类组分，其质谱图示于图 4 图 5 图 6

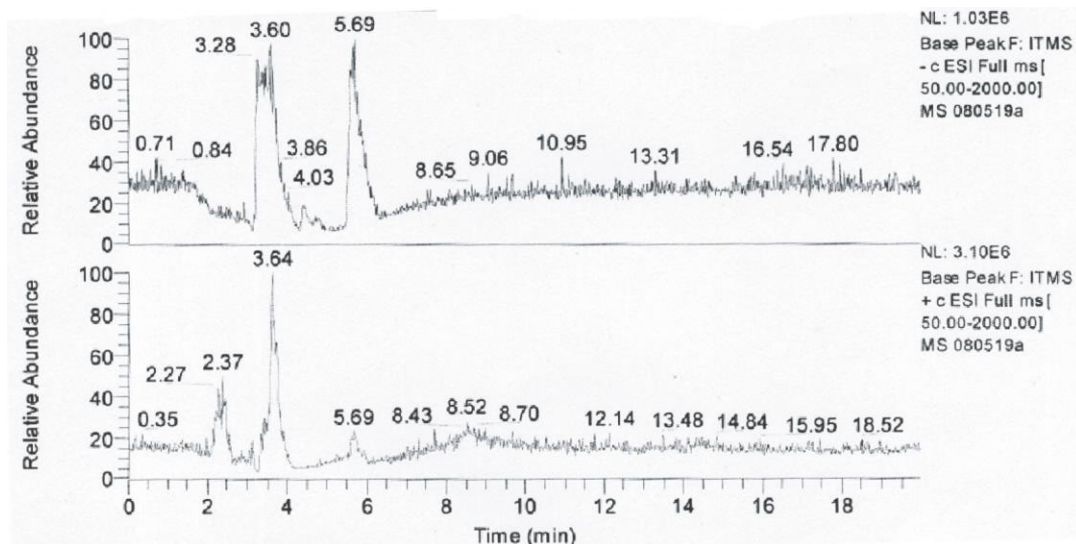


图 3 花色素正、负总离子流色谱图

Fig 3 positive and negative total ion chromatogram of pigments

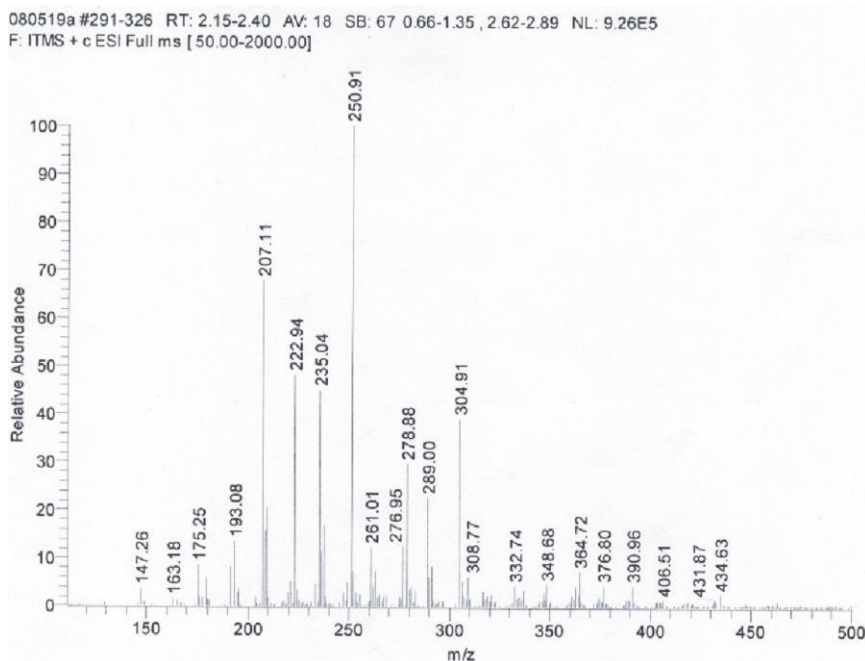


图 4 保留时间 2.15~2.40 min 的正离子扫描质谱图

Fig 4 positive ion scan mass spectrum of the retention time at 2.15-2.40 min

080519a #487-504 RT: 3.59-3.71 AV: 9 SB: 42 3.47, 4.16-4.78 NL: 2.28E6
F: ITMS + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

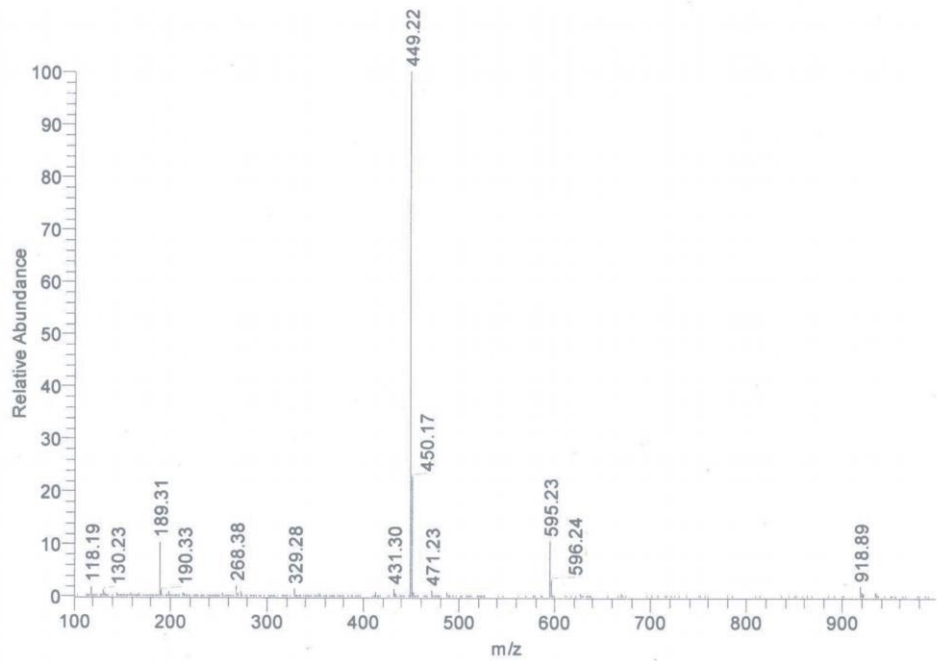
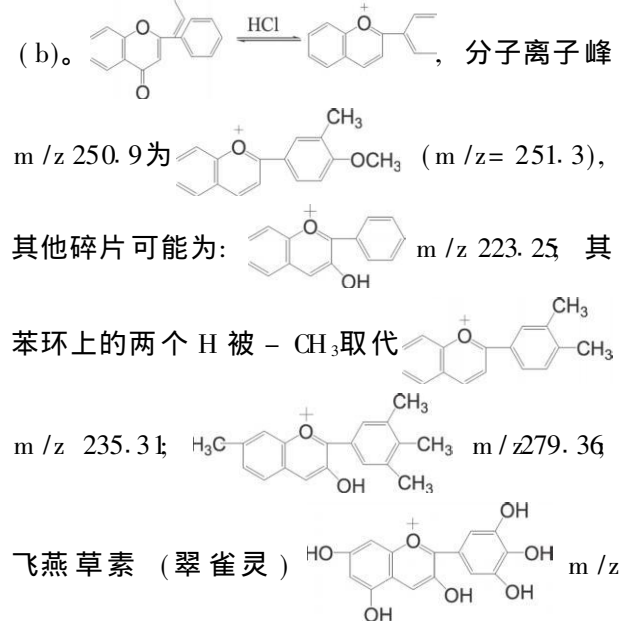


图 5 保留时间 3.59~3.71 min 的正离子扫描质谱图
Fig 5 positive ion scan mass spectrum of the retention

图 4 为保留时间 2.15~2.40 min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 250.9 (100%), 207.1 (70%), 222.9 (50%), 235.0 (48%), 278.9 (30%), 304.9 (40%); 结合显色反应结论, 考虑到花色苷为黄酮类化合物, 分子离子峰 m/z (222.4) 为黄酮 (a), 亦称为 2-苯基色原酮, 分子离子峰 m/z (207.25) 为 (a) 在盐酸溶液中形成的伴盐^[10]



303.25
从质谱图 4 分析可见, 保留时间为 2.15~2.40 min 附近的组分为混合物, 包含 2-苯基色原酮及其衍生物, 以及飞燕草素 (翠雀灵)。

图 5 为保留时间 3.59~3.71 min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 449.2 (100%), 595.2 (12%), 189.3 (12%); 其分子离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 449.2 可以推测为矢车菊素 (花青定) 和葡萄糖 (鼠李) 糖形成的苷, m/z 449.4。

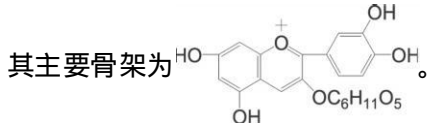
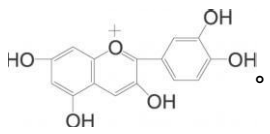


图 6 为保留时间 5.69 min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 287.3 (100%), 因为矢车菊素的分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 287.3 可以推测该组分为矢车菊素 (花青定)



在负离子检测模式下共检测到 4 种主要组分, 根据质谱信号特征认为其中 3 种为花青素类组分,

其质谱图示于图 7 图 8 图 9

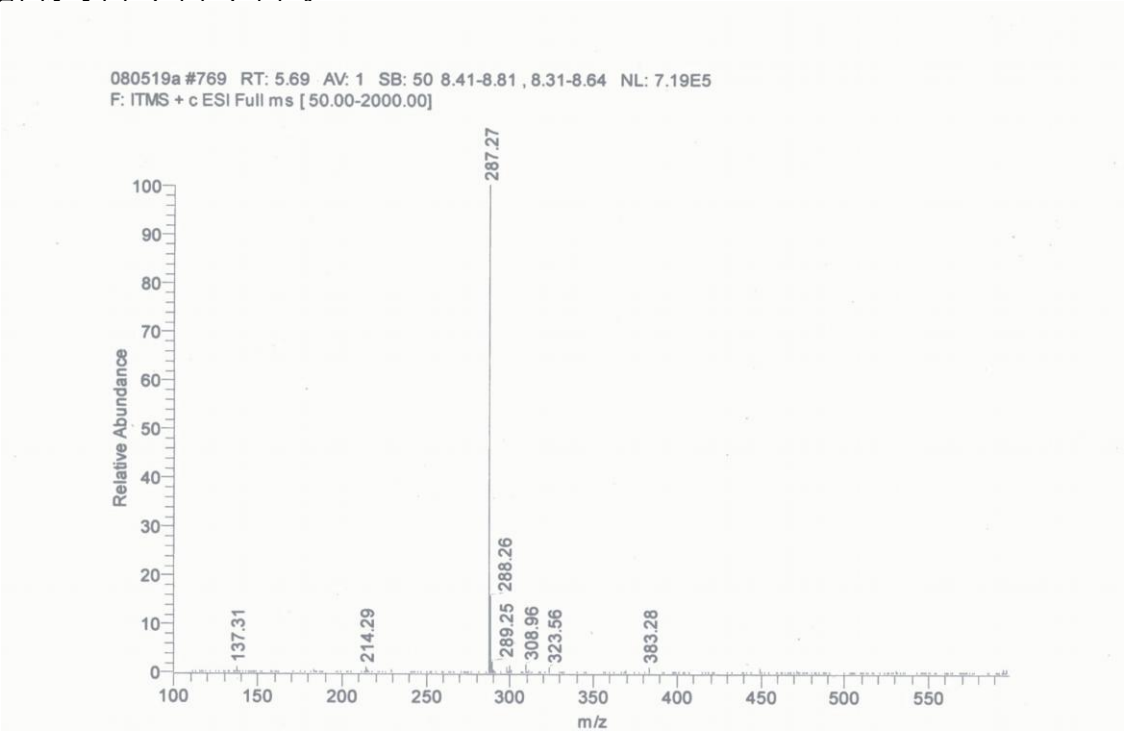


图 6 保留时间 5.69min 的正离子扫描质谱图

Fig 6 positive ion scan mass spectrum of the retention time at 5.69 min

080519a #458-484 RT: 3.38-3.57 AV: 14 SB: 42 1.33-1.73, 3.95-4.14 NL: 7.73E5
F: ITMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

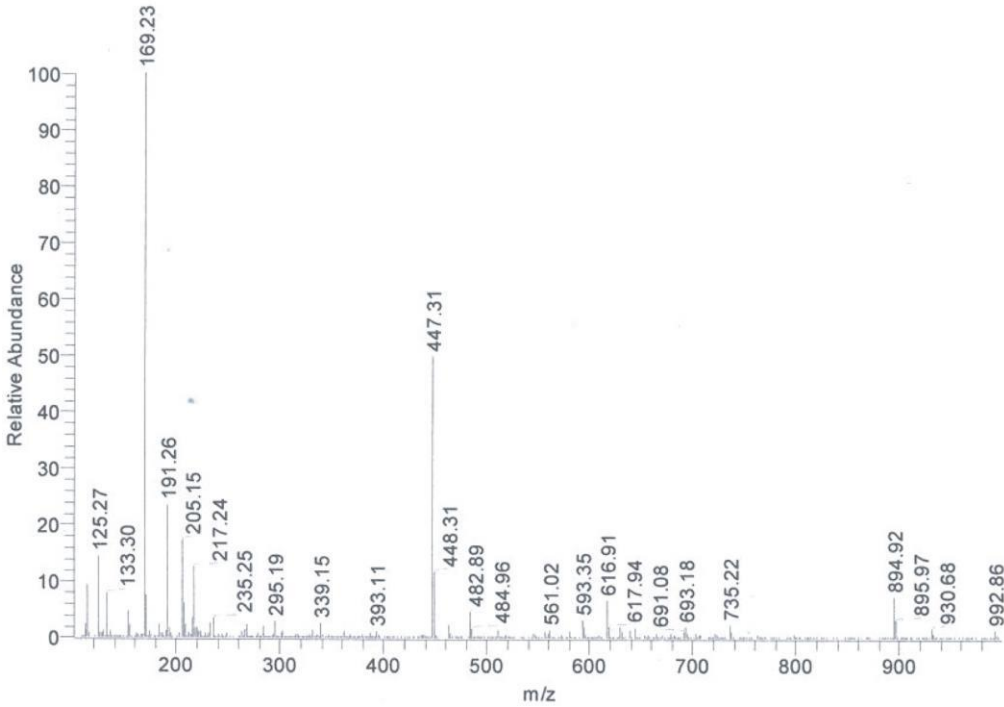


图 7 保留时间 3.38~ 3.57min 附近的负离子扫描质谱图

Fig 7 negative ion scan mass spectrum of the retention time at 3.38~ 3.57 min

080519a #635-655 RT: 4.70-4.83 AV: 10 SB: 31 4.35-4.48 , 4.94-5.26 NL: 6.63E4
F: ITMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

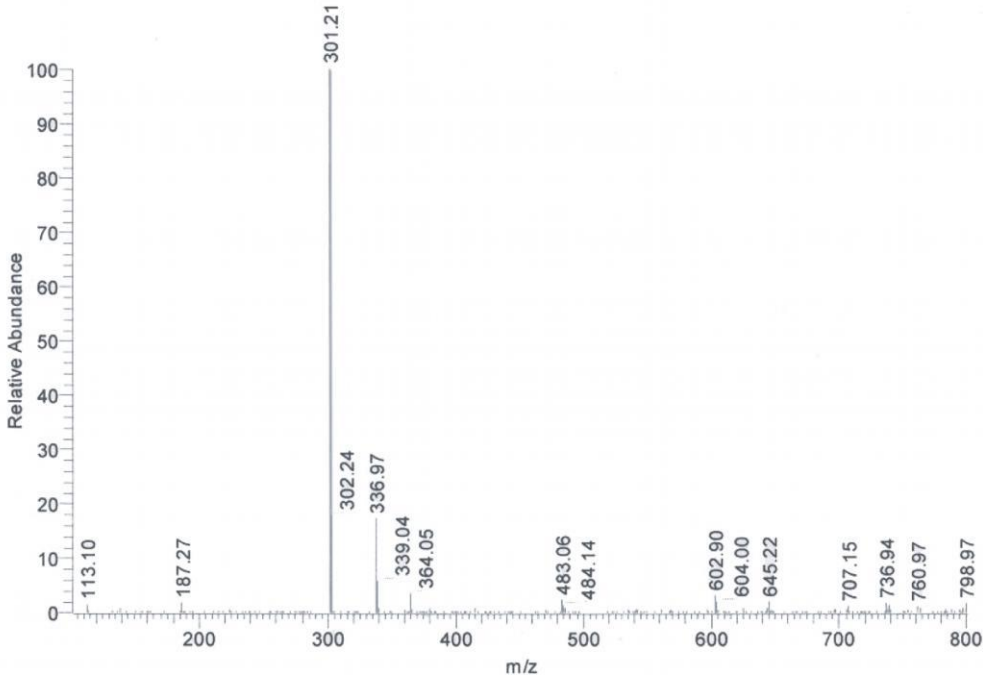


图 8 保留时间 4.70~ 4.83min 的负离子扫描质谱图

Fig 8 negative ion scan mass spectrum of the retention time at 4.70- 4.83min

080519a #770 RT: 5.69 AV: 1 SB: 64 4.94-5.26 , 6.51-7.12 NL: 9.92E5
F: ITMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

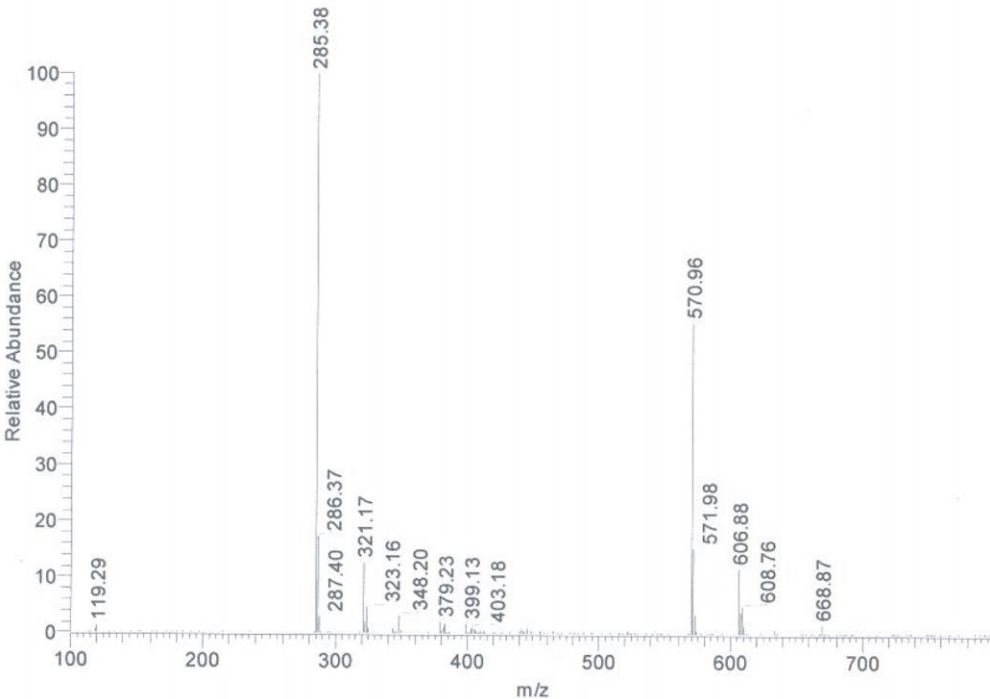


图 9 保留时间 5.69min 附近的负离子扫描质谱图

Fig 9 negative ion scan mass spectrum of the retention time at 5.69min

图 7 为保留时间 3.38~ 3.57min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 169.2 (100%)、447.3 (50%)。矢车菊素 (花青定) 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 286.3 结合正离子检测模式下的结果 (图 5), 完全可以推断 m/z 447.3 为矢车菊素 (花青定) 和葡萄糖结合成的苷

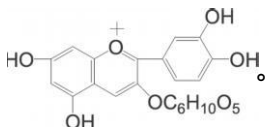


图 8 为保留时间 4.70~ 4.83min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 301.2 (100%), 芍药定的分子离子峰 $[M]^+$ 为 m/z 301.3, 所以可以推测为芍药定

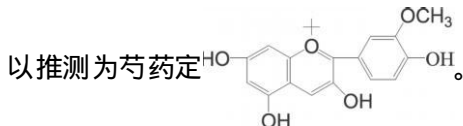


图 9 为保留时间 5.69min 附近的组分, 丰度较大的质谱信号为 m/z 285.4 (100%)、571.0 (60%), 可以推测为矢车菊素。结合正离子检测模式下的结果 (图 6) 保留时间 5.69min 附近的组分, 确定为矢车菊素。

根据 LC-MS 分析结果, 花色素样品中主要含有黄酮及其衍生物、矢车菊素及其葡萄糖苷, 可能含有少量的飞燕草素和芍药定及其苷。矢车菊、飞燕草素、芍药定均属于花青素。

3 结论

3.1 由 1.2.1 的提取方法得到的蓝紫色勿忘我花色素为紫红色固体, 色素平均得率 15%, 色价 (540nm) 为 36.55。色素经纸色谱分离主要含有黄色和红色两种物质, 由这两种物质的显色反应、紫外可见光谱、红外光谱的测定分析, 认为黄色物质为黄酮及其衍生物, 红色物质为花青素。

3.2 色素经液相色谱分离, 主要含有 7 个组分, 相对含量分别为 63.43%、25.43%、0.59%、0.64%、4.27%、5.44%、0.21%。

3.3 色素经液相色谱-质谱联用仪的分离鉴定, 色素主要含有矢车菊及其葡萄糖苷, 黄酮及其衍生物, 可能还有少量的飞燕草素、芍药定。

因此勿忘我花色素主要含有花青素及其花色苷和黄酮及其衍生物, 花青素属于黄酮类物质, 黄酮类物质是药用植物中的主要活性成分之一, 具有多种生物活性且毒性低, 成为研究和开发利用的热点。因此勿忘我花色素具有安全、无毒, 气味清香、具有保健功效的特点, 花色素提取方法简单, 得率高, 且抗氧化性强易保存, 适合在酸性条件下使用, 是值得研究开发的食品、化妆品、药品的色素添加剂。

参考文献:

- [1] 周昆华. 易栽培、久不凋的花卉“勿忘我”[J]. 云南农业科技, 1993 (6): 36.
- [2] 刘长岗, 张成菊, 邵云霞, 等. 传统茶和新兴茶保健功效的研究[J]. 中国西部科技, 2003 (2): 50-52.
- [3] 白逾, 丁来欣. “勿忘我”花色素的提取及稳定性研究[J]. 食品科技, 2009 34 (3): 180-184.
- [4] 丁来欣, 宋先亮, 白逾. 超声波强化溶剂法提取勿忘我花色素的工艺研究[J]. 生物质化学工程, 2010 44 (3): 17-21.
- [5] MAZZA G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol[J]. J Food Sci, 2003, 68 (1): 240-248.
- [6] BRIDLE P, TIMBERLAKE C E. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects[J]. Food Chem, 1997 58 (1): 103-109.
- [7] 卢钰, 董现义, 杜锦平, 等. 花色苷研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2004 35 (2): 315-320.
- [8] 张秀丽, 李劲涛, 杨军, 等. 植物花色苷定性定量研究方法[J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2006 27 (3): 300-303.
- [9] 凌关庭, 主编. 天然食品添加剂手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 214.
- [10] 张春红, 主编. 食品着色剂手册[M]. 中国计量出版社, 2006: 111.
- [11] 刘玲, 李霞, 金同铭. 高压液相色谱法在花色素苷分析中的应用[J]. 北京农业科学, 1998, 16 (2): 30-33.
- [12] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 163-164.
- [13] 罗金岳, 安鑫南, 主编. 植物精油和天然色素加工工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 212-220.
- [14] 吴信子, 朴京一, 张小勇, 等. 蓝靛果花青素的分离与鉴定[J]. 延边大学学报 (自然科学版), 2001, 27 (3): 191-194.