

新疆药桑和黑桑花色苷类成分的分析

陈燕, 吕婷婷, 郭欣荣, 杨玲*

塔里木大学科学生命学院, 阿拉尔 843300

摘要: 桑是含有丰富花色苷类物质的新疆特色药食两用植物。本文以新疆地产药桑和黑桑为实验材料, 采用有机溶剂提取法结合大孔吸附树脂法分别提取桑椹中的花色苷色素, 借助纸层析、高效液相色谱等色谱方法, 结合光谱分析, 对花色苷进行结构鉴定。实验结果表明: 药桑中主要的花色苷元为矢车菊色素和天竺葵色素, 黑桑主要含有矢车菊色素, 两种桑葚花色苷的糖基均含有葡萄糖和半乳糖。

关键词: 桑葚; 花色苷; 纸层析; 高效液相色谱

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

Isolation and Identification of Anthocyanins of Mulberry in Xinjiang

CHEN Yan, LV Ting-ting, GUO Xin-rong, YANG Ling*

College of Life -Science, Tarim University, Alar, Xinjiang, 843300, China

Abstract: Mulberry fruit. Which is both of medicinal and edible plant in Xinjiang. Are riched in anthocyanins. In this paper, Mulberry (black and yaosang) were used as experimental materials, the anothcyanins were extracted and purified by organic solvent and Macro-porous. Followed structural identification by mean of PC, HPLC and Uv-Vis. The results show the mainly anthocyanins in mulberry (yaosang) are cyanidin and pelargonidin, the mainly anthocyanins in mulberry (black) are cyanidin. The sugar groups in both of two mulberry are glucose and galactose.

Key words: Mulberry; Anthocyanins; paper Chromatography (PC); HPLC

花色苷又称花青素, 是植物体内一种水溶性色素, 常与一个或多个单糖、二糖等通过糖苷键结合形成多酚类化合物, 称为花色苷 (Anthocyanin)^[1]。由于合成色素对人类具有潜在的危险性, 而花色苷是一种天然的食用色素, 因此花色苷的结构分析对于人们充分认识其结构和生物功能, 进而指导新资源的开发有重要的意义^[2]。结构鉴定方法目前主要集中在色谱法结合光谱、质谱进行分离和结构鉴定: 叶兴乾等^[3]采用纸层析与光谱鉴定相结合的方法鉴定了荸荠种杨梅的花色苷的苷元分别为矢车菊素、天竺葵素、飞燕草素、芍药色素; 钦传光等^[4]提取蛇莓红色素, 进行了纸色谱分离, 并根据色素的吸收光谱特性及其在各种展开系统中的 R_f 值, 初步鉴定了蛇莓红色素只含一种花色苷, 其结构为天竺葵素-3-葡萄糖苷; 赵晶、杨玲^[5]用纸层析测得新疆三种小檗果实花色苷糖基为葡萄糖和半乳糖; 刘超等^[6]采用 HPLC 分析不同品种紫甘薯中花青素组分

及其含量; S. Eichhorn 等^[7]采用 HPLC 法分析了四种不同品种的彩色甘薯中花色苷的种类和含量; 王卫东等^[8]采用 HPLC-DAD-ESI-MS 联用技术从黑莓中分离鉴定出四种花色苷。

黑桑和药桑 (*Morus nigra* L.), 是含有丰富花色苷类物质的新疆特色药食两用植物, 可成为天然色素的理想资源, 尤其黄酮类化合物的含量较高^[9], 其作为维吾尔族的民间药材, 具有消炎、补血、镇静等医疗功效, 因此对其药物价值和作用机理等方面进行了大量的研究^[10, 11]。

本研究以新疆地产药桑和黑桑为实验材料, 采用有机溶剂提取法结合大孔吸附树脂法分别对其桑果中的花色苷进行粗提与纯化, 借助纸层析、高效液相色谱等色谱方法, 结合光谱分析, 对花色苷进行结构鉴定。旨在进一步明确新疆主要桑属色素资源特征、开发和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

药桑和黑桑: 采集于新疆库车县, 经植物科技学院教师邱爱军副教授鉴定为药桑和黑桑。冷冻保存

收稿日期: 2013-10-21 接受日期: 2014-03-18

基金项目: 国家大学生创新创业项目 (TDGCX201247)

* 通讯作者 E-mail: yanglingzj@sina.com.

备用。

1.2 仪器与设备

超声清洗机:SK3200H,上海科超超声仪器公司;旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司;

Waters 2695 高效液相色谱(含 2996 DAD 和 2487 检测器):美国 Waters 公司;

玻璃色谱柱($\Phi 1.8 \times 30$ cm、 $\Phi 2.0 \times 60$ cm):天津市北方天医玻璃仪器制造厂;

DZF-6050 型真空干燥箱:上海博讯实业有限公司;

1.3 实验试剂

矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷标品,葡萄糖、半乳糖、木糖、鼠李糖标品,成都曼思特生物科技有限公司;D-101 型大孔吸附树脂,天津市海光有限公司;新华 No3 层析滤纸,杭州新华纸业业有限公司

7 种展开剂:(1)BUAA-2(正丁醇:冰醋酸:蒸馏水=4:1:5/V);(2)BUA(正丁醇:2 N HCl=1:1/V);(3)BUAA-1(正丁醇:冰醋酸:蒸馏水=4:1:2/V);(4)BuPrH(正丁醇:吡啶:蒸馏水=6:3:1/V(加一滴冰醋酸));(5)AAH-1(冰醋酸:浓盐酸:蒸馏水=5:1:5/V);(6)AAH-2(冰醋酸:浓盐酸:蒸馏水=15:3:83/V);(7)FAH-2(80% 甲酸:浓盐酸:蒸馏水=5:2:3/V)

1.4 方法:

1.4.1 药桑和黑桑果实花色苷的制备

取药桑、黑桑果实,匀浆,加入 80% 乙醇(含 0.1% 盐酸),浸提 3 次,超声 15 min,过滤,40 °C 真空旋蒸得药桑、黑桑果实的花色苷粗提物,冷藏备用。

1.4.2 药桑和黑桑果实花色苷的分离纯化

将经过预处理的 D-101 大孔树脂湿法装柱,分别取上述药桑、黑桑果实花色苷粗提物,上样,超纯水洗脱,用斐林试剂和双缩脲试剂分别检测流出液,当液体未生成砖红色沉淀和没有变紫时,再用 95% 的乙醇洗脱,洗脱液旋蒸浓缩,冷冻干燥,得纯化样品。

1.5 样品花色苷分离鉴定

1.5.1 纸色谱法:

按参考文献^[12]方法,有一定变动,酸的水解时

间由 15 min 延长到 30 min,使糖苷水解彻底。

1.5.1.1 花色苷元的鉴定

将纯化的样品放入圆底烧瓶,分别加入 2 mL 甲醇和 2 mL 2 mol/L HCl 溶液,混匀后放入恒温水浴锅回流,30 min 后取出烧瓶,冷却,将烧瓶内溶液转入分液漏斗加入异戊醇萃取 2~3 次,取上层置于表面皿上常温干燥,干燥物用少量甲醇溶解,即为层析用样液。

制作 39 × 6 (cm) 的层析纸,毛细点样管点样,样品为已制备好的层析用样液,在五组展开剂(1)(2)(5)(6)(7)中分别展开,5 h 后取出层析纸避光晾干。由于桑椹花色苷本身有颜色,可直接看到独立的色谱带,测量其 R_f 值,并与文献中的 R_f 值比较,得到花色苷元类型。

1.5.1.2 糖配基的鉴定

将纯化的样品放入圆底烧瓶,分别加入 2 mL 甲醇和 2 mL 2 mol/L 的 HCl 溶液,混匀后放入恒温水浴锅回流,沸水浴 8 h 后取出圆底烧瓶冷却,再将烧瓶内溶液转入分液漏斗,加入正丁醇萃取 2~3 次,至水层无色,取下层置于表面皿,与标准糖溶液一起在 39 × 6 (cm) 的层析纸上点样,在四组展开剂(1)(2)(3)(4)中分别展开 5 h,完毕后将层析纸取出自然晾干,均匀喷洒联苯胺显色剂,放入烘箱(温度为 100 °C)加热 10 min,观察色斑,测量其 R_f 值,与标准糖 R_f 值比较,得到糖类型。

1.5.2 HPLC 分离药桑和黑桑中的花色苷

1.5.2.1 标准品矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷的光谱图:大量资料表明^[13],矢车菊色素是植物中较普遍存在且含量较高的花色苷,故本实验配制矢车菊-3-*O*-葡萄糖苷标准品溶液,测定其紫外-可见光谱图。

1.5.2.2 分别取药桑和黑桑样品,流动相溶解,过 0.45 μ m 有机滤膜,自动进样,得到药桑和黑桑的色谱图。

色谱条件:大连依利特 C₁₈ 5 μ m,4.6 × 250 mm, $\lambda = 520$ nm(DAD200 ~ 600 nm); 10 μ L,1 mL/min, A:乙腈 B:1% 乙酸钠

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 The gradient elution condition

时间 (min)	流速 (mL/min)	% A (乙腈)	% B (1% 乙酸钠)	线性
0.01	1.00	15.0	85.0	6

15.00	1.00	30.0	70.0	6
20.00	1.00	15.0	85.0	6

2 结果与分析

2.1 纸色谱法

表 2 药桑花色苷元 R_f 值

Table 2 R_f values of anthocyanins aglycone of Mulberry (yaosang)

展开剂	BUAA-2		BuA		AAH-1		AAH-2		FAH-2	
	斑点	红橙 紫红	红	红橙	红橙	红	紫红	红	红	红
实测 R _f 值	0.79	0.32	0.75	0.21	0.61	0.40	0.30	0.11	0.60	0.24
文献 R _f 值	0.80 天竺葵	-	0.72 芍药	-	0.590 天竺葵	-	0.32 飞燕草	-	-	0.22 矢车菊

表 3 黑桑苷元 R_f 值

Table 3 R_f values of anthocyanins aglycone of Mulberry (black sang)

展开剂	BUAA-2		BuA		AAH-1		AAH-2		FAH-2	
	斑点	红橙 红	红	紫红	红橙	红	红橙	红	红橙	红
实测 R _f 值	0.80	0.29	0.74	0.19	0.62	0.40	0.23	0.09	0.59	0.25
文献 R _f 值	0.80 天竺葵	-	0.72 芍药	-	0.59 天竺葵	-	-	-	-	0.22 矢车菊

以上分析可初步推断,药桑可能含有芍药色素、天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素;黑桑可能含有芍药色素、天竺葵色素、矢车菊色素。

表 4 药桑糖基 R_f 值

Table 4 R_f values of sugar aglycone of Mulberry (yaosang)

展开剂	BUAA-2			BuAA-1			BuPrH		
	点样	药桑糖基	葡萄糖	半乳糖	黑桑糖基	木糖	鼠李糖	黑桑糖基	木糖
药桑糖基	0.17	0.24	0.21	0.17	0.22	0.22	0.17	0.21	0.19
葡萄糖	0.17	0.22	0.22	0.17	0.22	0.22	0.17	0.22	0.22
半乳糖	0.17	0.21	0.19	0.17	0.21	0.19	0.17	0.21	0.19
黑桑糖基	0.16	0.22	0.21	0.16	0.22	0.21	0.16	0.22	0.21
木糖	0.29	0.31	0.39	0.29	0.31	0.39	0.29	0.31	0.39
鼠李糖	0.39	0.37	0.58	0.39	0.37	0.58	0.39	0.37	0.58

以上分析得,药桑含有葡萄糖、半乳糖,不含木糖、鼠李糖

表 5 黑桑糖配基纸层析 R_f 值

Table 5 R_f values of sugar aglycone of Mulberry (black sang)

展开剂	BUAA-2			BuAA-1			BuPrH		
	点样	黑桑糖基	葡萄糖	黑桑糖基	葡萄糖	鼠李糖	黑桑糖基	葡萄糖	鼠李糖
黑桑糖基	0.16	0.22	0.21	0.16	0.22	0.21	0.16	0.22	0.21
葡萄糖	0.18	0.23	0.24	0.18	0.23	0.24	0.18	0.23	0.24

展开剂	BUAA-2			BuAA-1			BuPrH		
	点样	半乳糖 <td>0.18</td> <td>0.22</td> <td>0.18</td>	0.18	0.22	0.18				
黑桑糖基	0.16	0.22	0.21						
木糖	0.29	0.31	0.39						
鼠李糖	0.39	0.37	0.58						

以上分析得,黑桑含有葡萄糖、半乳糖、可能不

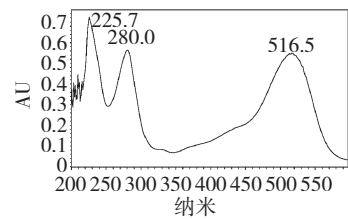


图 1 矢车菊-3-O-葡萄糖苷的紫外可见光谱

Fig. 1 UV-Vis spectra of Cyanidin-3-O-glucoside

含木糖,不含鼠李糖。

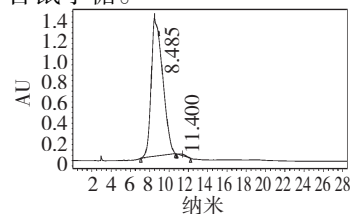


图 2 药桑花色苷峰 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC of anthocyanins of Mulberry (yaosang)

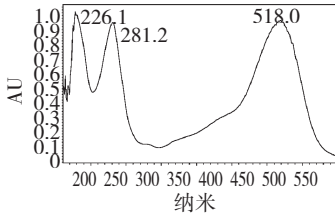


图3 药桑花色苷峰1紫外可见光谱图

Fig. 3 UV-Vis spectra (peak 1) of Mulberry (yaosang)

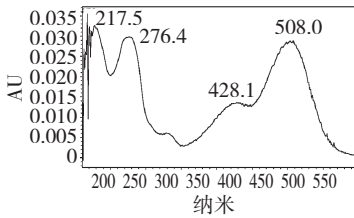


图4 药桑花色苷峰2紫外可见光谱图

Fig. 4 UV-Vis spectra (peak 2) of Mulberry (yaosang)

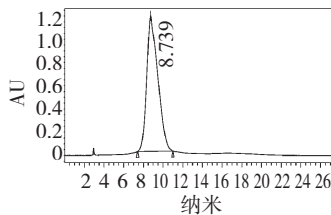


图5 黑桑花色苷色谱图

Fig. 5 HPLC of anthocyanins of Mulberry (black sang)

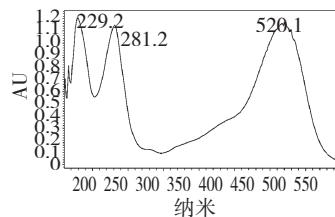


图6 黑桑紫外可见光谱图

Fig. 6 UV-Vis spectra of Mulberry (black sang)

2.2 HPLC 法

由图2可知,药桑的色谱图中有两个峰,分别在8.485 min、11.217 min,其中保留时间8.750 min时,峰面积最大,含量为99.48%。保留时间在11.217 min出现的峰较小,其含量为0.52%。花色苷由苷元和糖构成,能在 C_{18} 柱有保留的应为花色苷元部分,从药桑色谱图中有两个峰可推测至少存在两种类型的花色苷元,通过与标准品矢车菊-3-O-葡萄糖苷的光谱图(图1)比对,保留时间为8.485 min的峰应为矢车菊色素,通过参考文献^[14],保留时间

为11.2 min的峰应为天竺葵色素。

由图5可知,黑桑的色谱图只有一个峰,保留时间为8.7 min。通过与标准品矢车菊-3-O-葡萄糖苷的光谱图(图1)比对,应为矢车菊色素。

3 结论

3.1 本实验分别采用纸色谱和HPLC法对两种桑椹花色苷分离和结构推断,结果都表明两种桑椹均含有矢车菊色素,但纸色谱实验还推断出了其他的色素苷元,可能本次实验的HPLC条件还需进一步探索,以期得到更理想的色谱峰。

3.2 本次实验也说明,针对花色苷类的水溶性物质,可能有更适合的分离技术如HSCCC^[15];同时进一步结构表征还需结合其他技术如HPLC-MS等。

3.3 由本次实验结果可能推断出,药桑花色苷类含有矢车菊色素和天竺葵色素,黑桑花色苷含有矢车菊色素,两种桑椹花色苷均含有葡萄糖和半乳糖,黑桑可能还含有木糖。本次实验结果对新疆桑椹的开发利用有一定的借鉴意义。

参考文献

- 1 Tianjin College of Light Industry, Wuxi Institute of Light Industry (天津轻工业学院, 无锡轻工业学). Food Biochemistry (First Edition) (食品生物化学(第一版)). Beijing: Light Industry Press, 1981. 405-409
- 2 Ren YL (任玉林), Li H (李华), Bing GD (邴贵德), et al. Natural edible pigment-Anthocyanins. *Food Sci* (食品科学), 1995, 16(7): 22-27.
- 3 Ye XQ (叶兴乾), Chen JC (陈健初), Su P (苏平). Identification of the constituent of Anthocyanin in Yang-Mei. *J Zhejiang Agric Univ* (浙江农业大学学报), 1994, 20(2): 188-190.
- 4 Qin CG (钦传光), Ma L (马丽), Ding Y (丁焰), et al. Component Identification of the Red Pigment from Mock-strawberry Fruit by PLC. *J Hubei Polytechnic Univ* (湖北工学院学报), 1998, 13(3): 5-8.
- 5 Zhao J (赵晶), Yang L (杨玲). Preliminary Identification of anthocyanins from berry fruit in Xinjiang. *China Food Additives* (中国食品添加剂), 2011, 23: 121-124.
- 6 Liu C (刘超), Wang Z (王征), Li X (李鑫), et al. Analysis of composition and content of Anthocyanin in purple sweet potato by HPLC. *Food Nut China* (中国食品与营养), 2008, 8: 19-20.