

葡萄风信子花青素苷分析方法建立及成分鉴定

王琳, 刘雅莉*, 娄倩, 刘红利

(西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西杨陵 712100)

摘要: 采用高效液相色谱(HPLC)技术, 以葡萄风信子‘拉特夫拉姆’(*Muscari latifolium*)为材料, 建立葡萄风信子花青素苷分析方法, 研究了流动相配置、有机相初始及最高比例、流速等对葡萄风信子花青素苷洗脱效果的影响, 并对该优化体系进行了可行性验证; 采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术进一步对其成分进行结构鉴定。结果显示: (1) 以 0.1% 甲酸水溶液-80% 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, Tosoh C₁₈ 色谱柱柱温 35 °C 为条件, 可获得良好的洗脱效果。(2) 在质量浓度为 0.001~1 mg/mL 范围内线性良好, 相关系数 0.999 8; 采用该技术方法对标准品矢车菊素的最低检出限为 0.1 µg/mL, 加样回收率在 94.4%~99.8% 之间, 相对标准偏差 1.42%。(3) 葡萄风信子花瓣中共鉴定出 6 种花青素苷, 分别是飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷、锦葵素-3-O-葡萄糖苷、天竺葵素-3-O-咖啡酰槐糖苷-5-O-阿拉伯糖苷、矢车菊素、矢车菊素-3-O-对香豆酰葡萄糖苷-5-O-丙二酰葡萄糖苷。

关键词: 葡萄风信子; 花青素苷; 高效液相色谱; 分析方法

中图分类号: Q503; Q501

文献标志码: A

Method Development for the Identification of Anthocyanins in *Muscari latifolium* Flower

WANG Lin, LIU Yali*, LOU Qian, LIU Hongli

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Horticultural Plant Biology and Germplasm Innovation in Northwest China, College of Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The method for profiling and identification of anthocyanins in flowers was established by using high performance liquid chromatography (HPLC) technique with grape hyacinth (*Muscari latifolium*) as the material. The influence of configuration of mobile phase, initial and maximum percentage of organic phase, flow rate, on separation effect was studied and the feasibility of the method was verified. The structure of the components was further identified by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) to study the flower color mechanism. The results showed that: (1) the extracts were separated on a Tosoh C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 µm) with 0.1% methanoic acid-80% acetonitrile as mobile phases by gradient elution. The flow rates was 0.8 mL/min and the column temperature was 35 °C. (2) Anthocyanins showed a good linear relationship at a range of 0.001–1 mg/mL with correlation coefficient of 0.999 8. The limit of detection was 0.1 µg/mL. The recovery rate was between 94.4%–99.8% with the relative standard deviation 1.42%. (3) The results showed that six anthocyanin

收稿日期: 2016-11-20; 修改稿收到日期: 2017-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(31471905)

作者简介: 王琳(1991–), 女, 在读硕士研究生, 主要从事分子育种的研究。E-mail: 692723633@qq.com

* 通信作者: 刘雅莉, 硕士, 教授, 博士生导师, 主要从事园林植物遗传育种研究。E-mail: lyl6151@126.com

components were detected in petals of *M. latifolium*, including delphinidin 3-*O*-glucoside, petunidin 3-*O*-glucoside, malvidin 3-*O*-glucoside, pelargonidin-3-*O*-caffeoylsophoroside-5-*O*-arabinoside, cyanidin and cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-malonylglucoside.

Key words: *Muscari latifolium*; anthocyanin; HPLC; analysis method

花色是衡量观赏植物品质的因素之一,蓝色花因其稀少的数量和独特的魅力,一直备受科学界和育种工作者的关注。葡萄风信子是一种以蓝色著称的春季观赏球根花卉,已知的 40 多个种和栽培品种,几乎都为不同的蓝色^[1],为研究蓝色花着色机理提供了理想的模式材料。葡萄风信子‘拉特夫拉姆’(*Muscari latifolium*)蓝色调特殊性异于其他品种,盛花期上部花为浅蓝色,下部花则呈现出蓝紫色,对于研究不同蓝色调的葡萄风信子呈色机理具有参考价值。花青素苷是植物花色形成的重要物质基础,如何有效地研究和利用这些特异蓝色种质资源,必须对其花色形成物质基础进行深入研究。然而,关于葡萄风信子的研究主要集中在组织培养^[2-4]和生理生化方面^[5],涉及蓝色形成物质基础方面的信息只局限在花青素苷类型,Mori 等^[6]测定 13 种不同的葡萄风信子,证明蓝色花中主要的色素成分为飞燕草素(delphinidin),Yoshida 等^[7]发现葡萄风信子中存在酰基化的花青素苷,Qi 等^[8]鉴定出蓝紫色葡萄风信子中除了存在飞燕草素和矢车菊素(cyanidin),还存在辅色素,如山奈酚(kaempferol)、杨梅素(myricetin)和二氢杨梅素(dihydromyricetin)等。对理解葡萄风信子蓝色花青素复杂的次生代谢网络和呈色机制来说,目前对葡萄风信子‘拉特夫拉姆’掌握的信息还远远不足。

本研究以葡萄风信子‘拉特夫拉姆’为材料,通过不同洗脱程序选择最佳方案,建立了使用高效液相色谱(HPLC)技术检测葡萄风信子花青素苷的分析方法,进一步采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术,为判断花青素苷结构类型提供依据,为深入研究葡萄风信子色素类型和代谢机理提供启示。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 实验于 2015 年在西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室进行。材料为进口的葡萄风信子‘拉特夫拉姆’种球,购于浙江虹越花卉有限公司。2015 年 3 月取完全开放的花蕾,于液氮中速冻后置于-80℃冰箱中备用。

1.1.2 仪器 高效液相色谱仪 Waters HPLC 600E,0-2000Psi 2487 双通道紫外检测器,Rheodyne 7725i 手动进样器,Azbil SDC15 柱温箱,Empower Build 1154-C 工作站,色谱柱为 C₁₈ TSK gel ODS-80Ts QA (250 mm×4.6 mm i. d., 5 μm, Tosoh)。Acquity UPLC™超高效液相色谱仪(Waters);Xevo G2-XS QTOF 质谱仪,色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)。上海尤尼柯 UV2600 型紫外可见分光光度计。
1.1.3 试剂 标准品氯化矢车菊素(cyanidin chloride)购于美国 Sigma 公司。有机溶剂包括分析纯甲醇、乙腈,购于美国 Tedia 公司。色谱级甲酸、三氟乙酸购于天津科密欧化学试剂有限公司;纯净水为 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 方法

1.2.1 花青素苷的提取 采集葡萄风信子新鲜花蕾,将上部花和下部花分别用液氮研磨后加入提取液甲醇:水:甲酸:三氟乙酸(70:27:2:1),隔 12 h 震荡 1 次,置于 4℃冰箱中避光浸提 24 h。离心后取上清液用滤纸粗滤后,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,并将萃取液置于-20℃冰箱中保存。

1.2.2 标准溶液的制备 采用逐级稀释的方法,以甲醇:水:甲酸:三氟乙酸(70:27:2:1)为提取液配置不同浓度梯度的氯化矢车菊素标准品溶液,分别为 1、0.5、0.1、0.05、0.025、0.005、0.001 mg/mL。按上述色谱条件进行测定,以峰面积(*y*)对质量浓度(*x*,mg/mL)绘制标准曲线,计算回归方程和相关系数。

1.2.3 花青素苷成分的分析方法建立 采用紫外可见分光光度计在 200~700 nm 波段进行全波长扫描,根据花青素在可见光区域最大吸收波长处有特征吸收峰,确定试验检测波长。影响花青素苷成分分离效果的因素有流动相配比、有机相初始及最高比例、流速等。在色谱柱柱温 35℃条件下,该试验针对以上要素设置 5 种洗脱条件(表 1),比较不同处理的分离效果及分离峰个数,得到葡萄风信子花青素苷分析的最佳洗脱条件。

1.2.4 花青素苷成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定分析 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用

表 1 葡萄风信子中花青素苷分析的 HPLC 洗脱条件

Table 1 The analysis of anthocyanins in *M. latifolium* by different HPLC elutions

处理 Treatment	流动相配置 Mobile phase configuration	洗脱程序 Program	流速 Flow rate (mL/min)	时间 Time/min
1	A:0.1%甲酸;B:纯乙腈 A:0.1%Formic acid;B:Acetonitrile	5%B,0 min;100%B,40 min; 100%B,60 min;5%B,70~80 min	0.6	80
2	A:0.1%甲酸;B:纯乙腈 A:0.1%Formic acid;B:Acetonitrile	0 min,0%B;50 min,100%B; 60~70 min,0%B	0.6	70
3	A:0.1%甲酸;B:纯乙腈 A:0.1%Formic acid;B:Acetonitrile	0 min,15%B;32 min,38%B; 40 min,38%B;45~50 min,15%B	0.6	50
4	A:0.1%甲酸;B:纯乙腈 A:0.1%Formic acid;B:Acetonitrile	0 min,12%B;15 min,25%B;32 min,38%B; 40 min,38%B;45~50 min,12%B	0.6	50
5	A:0.1%甲酸;B:80%乙腈 A:0.1%Formic acid;B:80%Acetonitrile	0 min,12%B;15 min,25%B;32 min,38%B; 40 min,38%B;45~50 min,12%B	0.8	50

仪(UPLC-Q-TOF-MS, Waters), Acquity UPLC™超高效液相色谱仪(Waters); Xevo G2-XS QTOF质谱仪, 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 对花瓣花青素苷结构进行分析。将优选程序按比例缩减为 20 min, 洗脱程序为: 12%B, 0 min; 25%B, 6 min; 38%B, 13 min; 38%B, 16 min; 12%B, 18 min; 12%B, 20 min。速度为 0.3 mL/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 530 nm。质谱分析条件: 电喷雾离子源, 正离子检测模式, 扫描范围为 100~1 000 m/z; 毛细管电压 3 000 V, 锥孔电压 45 V, 提取锥电压 4 V; 脱溶剂氮气流量 40 L/h; 离子源温度 100 ℃, 干燥温度 350 ℃。使用色谱工作站 Masslynx V4.1 软件进行数据分析。

1.2.5 花青素苷成分的定量分析 以标准品氯化矢车菊素作为外标对花青素苷各个组分进行半定量分析, 重复 3 次, 单位为每克新鲜花瓣中含有的相对于矢车菊素的含量。同时计算花青素苷各个组分的相对百分含量, 比较色素组成差异^[9]。

2 结果与分析

2.1 花青素苷分析方法的建立

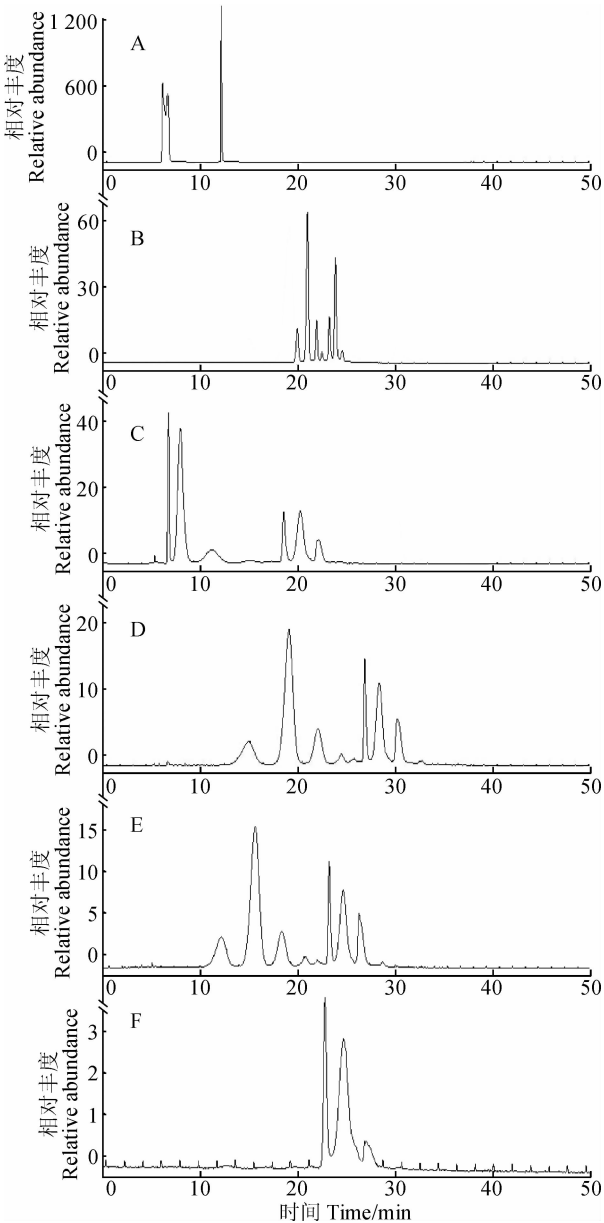
2.1.1 波长的选择 采用紫外分光光度计法对葡萄风信子中的色素类别进行初步鉴定, 全波长扫描结果显示, 花蕾萃取液在 530 nm 有典型的特征吸收峰。文献记载, 花青素苷化合物在含甲醇的溶液中吸收波长为 500~550 nm^[10], 则后期选择 530 nm 为检测波长进行花青素苷测定。

2.1.2 高效液相色谱体系建立 花青素苷结构复杂, 类型多样且极性差异小, 所以经常采用梯度洗脱方式进行分离。本实验采用不同梯度洗脱方式分离葡萄风信子花瓣混合萃取液中的花青素苷, 处理 1 为梯度洗脱初始实验^[11], 无法分离样品中的花青素

苷(图 1,A)。处理 2 为线性梯度不变的初始程序, 结果显示分离出 7 个色谱峰(图 1,B)。处理 3 改善有机相的初始比例和最高比例, 出峰提前至 7 min, 但峰型较差(图 1,C)。处理 4 针对处理 3 进行改进, 分离效果优化为 9 个色谱峰, 整体梯度曲线改为折线形, 有效提高了洗脱效率^[12](图 1,D)。处理 5 在前期基础上, 再次对程序速度和有机相比例进行调整, 使整体出峰时间提前, 分离效果不变, 同时预留足够柱平衡时间, 是分离葡萄风信子花青素苷的最佳洗脱条件(图 1,E)。通过比较流流动相配比、有机相初始及最高比例、流速, 发现这些因素都会影响梯度洗脱的效果及出峰时间, 这与已有文献报道相符^[12]。试验证明处理 5 是分离葡萄风信子花青素苷的最佳洗脱条件, 采用该方法分别对葡萄风信子上部花和下部花的花青素苷物质进行检测, 结果表明, 蓝紫色下部花萃取液可分离出 9 个色谱峰(图 1,E), 浅蓝色上部花萃取液分离出 3 个峰(图 1,F)。对比 2 种萃取液色谱图, 发现这 3 个峰的保留时间基本吻合, 初步确定上部花萃取液中分离出的 3 种物质为二者共有的花青素苷。

2.1.3 线性关系与检出限 经对照标准品表明氯化矢车菊素保留时间为 24.3 min。配置矢车菊素标准液并稀释成质量浓度范围为 0.001~1 mg/mL, 以峰面积(y)对质量浓度(x, mg/mL)绘制标准曲线, 得到回归方程 $y = 59\,669\,478x - 194\,683$ ($r^2 = 0.999\,8$), 线性关系良好。以 3 倍信噪比(S/N=3)计算检出限, 本实验最低方法检出限为 0.000 1 mg/mL, 方法定量下限为 0.000 33 mg/mL, 证明本实验方法满足分析要求。

2.1.4 精密度与回收率 在所选定的优化色谱条件下, 对一定浓度的溶液重复测定 10 次, 相对标准偏差(RSD)为 1.42%(表 2), 证明精密度良好。



A~F. 表示 5 种 HPLC 洗脱条件(同表 1 处理 1~5)的色谱图；
A~E. 上部花萃取液；F. 下部花萃取液
图 1 葡萄风信子中花青素苷成分的 HPLC 优化
A—F show chromatogram maps of 5 HPLC elutions (same as the treatments in Table 1)；A—E. Upper flowers extraction；
F. Lower flowers extraction

Fig. 1 HPLC chromatograms of anthocyanins from *M. latifolium*

为了进一步验证方法的准确可靠性,进行加样回收率实验。在样品溶液中,分别加入已知物质期望值的 80%、100%、120%,按照操作步骤进行,每个浓度进行重复 3 次,得到加样回收率(表 3)。样品加标的回收率在 94.4%~99.8%之间,RSD 值分别为 1.07%,0.97%,0.90%,说明该分析方法准确度较高,符合后期实验要求。

2.2 花青素苷成分的结构鉴定

2.2.1 花青素苷组分分析 在 UPLC-Q-TOF-MS 正离子模式下,葡萄风信子蓝紫色下部花萃取液中分离出 7 种花青素苷,如表 4 所示,组分 1 含分子离子峰 m/z 465 $[M]^+$,其裂解产生苷元离子 m/z 303 $[Y_0]^+$ (飞燕草素苷元,delphinidin)和 1 个己糖分子 m/z 162。由于绝大多数花青素苷中 3-位羟基更容易发生糖苷化^[13-14],因此推测组分 1 为飞燕草素-3-O-葡萄糖苷(Delphinidin-3-O-glucoside)^[15]。组分 2 分子离子峰为 m/z 479 $[M]^+$,去除 1 个 m/z 162u 得到矮牵牛素苷元离子峰 m/z 317 $[Y_0]^+$,推定为矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷(Petunidin-3-O-glucoside)^[15]。组分 3 分子离子峰为 m/z 493 $[M]^+$ 丢失 1 个 m/z 162 得到锦葵素(malvidin)苷元离子峰 331 $[Y_0]^+$,推定为锦葵素-3-O-葡萄糖苷(malvidin-3-O-glucoside)^[15]。组分 5 分子离子峰为 m/z 889 $[M]^+$ 丢失 1 个 m/z 132(戊糖分子),得到碎片离子峰 m/z 757 $[M-132]^+$ 。因风信子科植物花青苷多糖基修饰位于 3-位和 5-位,再丢失 1 个 m/z 162,判断为咖啡酰分子,得到碎片离子峰 m/z 595 $[M-(132+146)]^+$,最终丢失 2 个 m/z 162 得到天竺葵素(pelargonidin)的苷元离子峰 m/z 271 $[Y_0]^+$,因此推定组分 5 为天竺葵素-3-O-咖啡酰槐糖苷-5-O-阿拉

表 3 葡萄风信子中矢车菊素的添加回收率

Table 3 Recoveries for Cyanidin in <i>M. latifolium</i> (n=3)				
矢车菊素添加水平 Cyanidin adding level /(mg/mL)	回收率 Recovery/%			RSD/%
	1	2	3	
0.004 8	95.3	98.9	94.4	1.07
0.006 0	98.9	98.8	97.2	0.97
0.007 2	99.8	97.3	94.4	0.90

表 2 方法的精密度

Table 2 Analysis precision test of the method

组分 Component	浓度 Concentration/(mg/mL)										RSD /%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
矢车菊素 Cyanidin	0.009 1	0.009 2	0.009 1	0.009 3	0.009 2	0.009 3	0.009 5	0.009 2	0.009 4	0.009 4	1.42

表 4 葡萄风信子中花青素苷质谱特征及推定

Table 4 The UPLC-MS properties and tentative identification of *M. latifolium*

组分 Peak	保留时间 Retention time/min	分子及碎片离子 Molecular and fragment ion/(m/z)	暂定结构 Tentative identification	参考文献 Reference
1	1.93	465,303	飞燕草素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	[15]
2	3.11	479,317	矮牵牛素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	[15]
3	4.12	493,331	锦葵素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	[15]
4	5.01	—	—	
5	6.40	889,757,595,271	天竺葵素-3- <i>O</i> -咖啡酰槐糖苷-5- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 Pelargonidin-3- <i>O</i> -caffeoylsphoroside-5- <i>O</i> -arabinoside	[16]
6	8.54	287	矢车菊素 Cyanidin	[15]
7	8.90	843,757,287	矢车菊素-3- <i>O</i> -对香豆酰葡萄糖苷-5- <i>O</i> -丙二酰葡萄糖苷 Cyanidin-3- <i>O</i> -(<i>p</i> -coumaroyl)glucoside-5- <i>O</i> -malonylglucoside	[18]

注:—, 未得到数据
Note:—, Data were not available

表 5 葡萄风信子中花青素苷含量

Table 5 Anthocyanin contents of *M. latifolium*

花蕾类型 Type of flower	花青素苷含量 Anthocyanin/(mg/g)						
	Dp3G	Pt3G	Mv3G	Unknown	Pg3CaSop5Ara	Cy	Cy3pCG5MaG
上部花 Upper flowers	—	—	—	—	0.82±0.06	1.76±0.01	0.26±0.01
下部花 Lower flowers	0.31±0.01	3.50±0.12	1.53±0.08	0.32±0.01	0.16±0.01	0.34±0.01	0.13±0.00

注:Dp3G, 飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷;Pt3G, 矮牵牛素-3-*O*-葡萄糖苷;Mv3G, 锦葵素-3-*O*-葡萄糖苷;Pg3CaSop5Ara, 天竺葵素-3-*O*-咖啡酰槐糖苷-5-*O*-阿拉伯糖苷;Cy, 矢车菊素;Cy3pCG5MaG, 矢车菊素-3-*O*-对香豆酰葡萄糖苷-5-*O*-丙二酰葡萄糖苷;Uknown, 未知组分
Note: Dp3G, Delphinidin 3-*O*-glucoside;Pt3G, Petunidin 3-*O*-glucoside;Mv3G, Malvidin 3-*O*-glucoside;Pg3CaSop5Ara, Pelargonidin-3-*O*-caffeoylsphoroside-5-*O*-arabinoside;Cy, Cyanidin;Cy3pCG5MaG, Cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-malonylglucoside;Uknown, Unknown compound

伯糖苷 (pelargonidin-3-*O*-caffeoylsphoroside-5-*O*-arabinoside)^[16]。组分 6 检测到丰度明显的矢车菊素 (cyanidin) 特征分子峰 m/z 287[M]⁺。组分 7 的分子离子峰为 m/z 887[M]⁺, 丢失 1 个 m/z 86 (丙二酰分子), 得到碎片离子峰 m/z 757[M-86]⁺, 最终苷元离子峰 m/z 287[Y₀]⁺, 根据“同类优先, 相似遵循”原则^[17], 参考近缘物种风信子科植物已知的花青素苷成分^[18], 推断其为矢车菊素-3-*O*-对香豆酰葡萄糖苷-5-*O*-丙二酰葡萄糖苷 (cyanidin-3-*O*-(*p*-coumaroyl)glucoside-5-*O*-malonylglucoside)。淡蓝色上部花萃取液中所对应的物质为组分 5、6、7。组分 4 未在后期质谱检测中分离出来, 可能是由于花青素苷未能充分离子化。另有 2 种组分在后期高效液相色谱及液质联用条件下均未能检测出, 推测目标物质不稳定, 受外界温度、pH、光、金属离子、氧等影响而分解^[19-20]。

2.2.2 花青素苷含量分析 本研究以葡萄风信子‘拉特夫拉姆’上部花和下部花为材料, 分别对其花

青素苷含量进行定量分析 (表 5)。矮牵牛素-3-*O*-葡萄糖苷和锦葵素-3-*O*-葡萄糖苷为下部花瓣中的主要色素成分, 分别占花青素苷总量的 55.6% 和 24.3%。其他 5 种为微量成分, 占总花青素苷含量的 20.1%。上部花花蕾中含有 3 种花青素苷, 可分为矢车菊型和天竺葵型色素, 分别占花青素苷总量的 71.1% 和 28.9%。

3 讨 论

本研究建立了有效分离鉴定葡萄风信子花青苷的 HPLC 方法, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, B 为 80% 乙腈。洗脱程序如下: 12% B, 0 min; 25% B, 15 min; 38% B, 32 min; 38% B, 40 min; 12% B, 45~50 min。采用 UPLC-Q-TOF-MS 进一步分析花青素苷结构, 鉴定出 6 种花青苷, 即飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷, 矮牵牛素-3-*O*-葡萄糖苷, 锦葵素-3-*O*-葡萄糖苷, 天竺葵素-3-*O*-咖啡酰槐糖苷-5-*O*-阿拉伯糖苷, 矢车菊素, 矢车菊素-3-*O*-对香豆酰葡萄糖苷-5-*O*-丙

二酰葡萄糖苷。本研究为后期葡萄风信子花色物质鉴定和相关基因功能研究提供了理论基础,也为建立优化 HPLC 条件和鉴定植物花青素苷成分提供了参考方法。

花的颜色与花青素苷种类及含量密切相关。在本研究中,下部花蕾中总花青素苷含量高于上部花蕾中含量。相应的,下部花呈现出较深蓝紫色,上部花则表现浅蓝色,并且后者花青素苷成分类型少,也会使花色产生显著差异。这与蝴蝶石斛兰中的研究结果相似^[21]。天竺葵素通常呈现橙红色,矢车菊素通常呈现粉色,飞燕草则呈现蓝色^[22],甲基化、糖苷化、酰基化等修饰会一定程度上影响花色调变化。相应的,‘拉特夫拉姆’下部花呈现蓝紫色。本研究中,上部花蕾中并未检测到飞燕草素及其衍生物,但是颜色呈浅蓝色,推测可能与辅助色素、液泡 pH 值有关,尤其分子内辅助色素效应一般发生在多糖苷及多酸酰化的花青苷内部,这种分子堆积效应已在

天堂蓝牵牛(*Ipomoea purpurea*)和裂叶牵牛(*Ipomoea nil*)中确定^[23-24],葡萄风信子花色呈现的具体原因还需要进一步研究。

高效液相色谱(HPLC)和高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术是未知物质分析鉴定的重要方法之一,被广泛应用于蔬菜、果实、花瓣等植物材料的花青素苷成分检测^[25-26]。但由于物种特异性,仪器性能差异,尤其是色谱柱固定相性质不同而发生变化等情况,如何针对目标材料建立或调整物质分离方法仍然十分困难。本研究参考其他近缘植物风信子(*Hyacinthus orientalis* L.)^[27],蕙兰(*Cymbidium hybrida*)^[28],百子莲(*Agapanthus africanus*)^[29]的花青素苷分析方法,建立了葡萄风信子 HPLC 和质谱鉴定方法。色谱、质谱的数据只能运用于花青素苷结构的初步判定,对未知化合物进行准确的组成分析,还需要通过复杂的提取、分离与纯化过程,结合核磁共振技术确定结构^[30]。

参考文献:

[1] DOUSSI M A, THANOS C A. Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. *Muscari* spp[J]. *Seed Science Research*, 2002, **12**(3):193-201.

[2] KARAMIAN R, RANJBAR M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Muscari neglectum* Guss[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, **10**(22):4 602-4 607.

[3] WANG S, YANG F, JIU L, *et al.* Plant regeneration via somatic embryogenesis from leaf explants of *Muscari armeniacum* [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013, **27**(6):4 243-4 247.

[4] YÜCESAN BB, CICEK F, GÜREL E. Somatic embryogenesis and encapsulation of immature bulblets of an ornamental species, grape hyacinths (*Muscari armeniacum* Leichtlin ex Baker) [J]. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 2014, **38**(5):716-722.

[5] DO ĞU, SÜLEYMAN, AND MUHITTIN DINÇ. Anatomical characteristics of *Muscari vuralii* Y. BA ğcı & Do Ğu (Hyacinthaceae)[J]. *Modern Phytomorphology*, 2013, **3**:29-33

[6] MORI S, ASANO S, KOBAYASHI H. Analyses of anthocyanidins and anthocyanins in flowers of *Muscari* spp. [J]. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Niigata University*, 2002, **55**:13-18.

[7] YOSHIDA K, AOKI H, KAMEDA K, KONDO T. Structure of muscarinin A, an acylated anthocyanin, from purplish blue spicate flower petals of *Muscari armeniacum* [J]. *Itte Letters on Batteries New Technologies & Medicine*, 2002; **3**:C13-C16.

[8] QI Y, QIAN L, LI H, *et al.* Anatomical and biochemical studies of bicolored flower development in *Muscari latifolium* [J]. *Protoplasma*, 2013, **250**(6):1 273-1 281.

[9] YUAN Y, MA X, SHI Y, *et al.* Isolation and expression analysis of six putative structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Tulipa fosteriana* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, **153**(3):93-102.

[10] HARBORNE J B. Spectral methods of characterizing anthocyanins[J]. *Biochemical Journal*, 1958, **70**(1):22.

[11] LI H. Metabolic engineering of flavonoid biosynthesis in apple by genetic transformation[D]. Hannover:Gottfried Wilhelm Leibniz Universitat Hannover, 2008.

[12] 张玉奎, 王 杰, 张维冰. 实用高效液相色谱法的建立[M]. 北京: 华文出版社, 2001:392-398.

[13] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 等. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(7): 1 496-1 506.

JIA Z D, MA P Y, BIAN X F, *et al.* Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin[J]. *Acta Bot. Boreal-Occident. Sin.*, 2014, **34**(7):1 496-1 506.

[14] 戴思兰, 洪 艳. 基于花青素苷合成和呈色机理的观赏植物花色改良分子育种[J]. 中国农业科学, 2016, **49**(3): 529-542.

DAI S L, HONG Y. Molecular breeding for flower colors

modification on ornamental plants based on the mechanism of anthocyanins biosynthesis and coloration[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, **49**(3): 529-542.

[15] MORI S. Fundamental studies on the molecular breeding for flower color modification in *Liliaceous ornamentals*[D]. Bulletin of the Faculty of Agriculture-Niigata University (Japan), 2006.

[16] HOSOKAWA K, FUKUNAGA Y, FUKUSHI E, *et al.* Five acylated pelargonidin glucosides in the red flowers of *Hyacinthus orientalis*[J]. *Phytochemistry*, 1995, **40**(2):567-571.

[17] 张 洁, 李崇晖, 王亮生, 等. 植物花青苷液质联用方法的分析鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, **3**:760-768.

ZHANG J, LI C H, WANG L S, *et al.* Golden rules of separation and characterization of plant anthocyanins by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2013, **3**:760-768.

[18] MULHOLLAND D A, SCHWIKKARD S L, CROUCH N R. The chemistry and biological activity of the hyacinthaceae [J]. *Natural Product Reports*, 2013, **30**(9): 1 165-1 210.

[19] JANNA O A, KHAIRUL A K, MAZIAH M. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L [J]. *Food Chemistry*, 2007, **101**(4): 1 640-1 646.

[20] 唐东芹, 徐怡倩, 袁 媛, 等. 理化因素对风信子花色苷稳定性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2016, **40**(4): 69-73.

TANG D Q, XU Y Q, YUAN Y, *et al.* Effects of physical and chemical factors on anthocyanin stability in *Hyacinthus* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University* (Natural Science Edition), 2016, **40**(4): 69-73.

[21] 李崇晖, 任 羽, 黄素荣, 等. 蝴蝶石斛兰花色表型及类黄酮成分分析[J]. 园艺学报, 2013, **40**(1):107-116.

LI C H, REN Y, HUANG S R, *et al.* Floral colors of Phalaenopsis type dendrobium and their flavonoid composition [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, **40**(1):107-116.

[22] 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: 19-26.

[23] BROUILLARD R, MAZZA G, SAAD Z, *et al.* The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**(7):2 604-2 610.

[24] 杨少勇, 安银岭, 樊国盛, 等. 蓝色花植物花色素的着色机理 [J]. 北京林业大学学报, 2003, **25**(5):68-75.

YANG S Y, AN Y L, FANG G S, *et al.* Pigmentation mechanisms of anthocyanins of blue flowers[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2003, **25**(5):68-75.

[25] 刘仁道, 张 猛, 李新贤. 草莓和蓝莓果实花青素提取及定量方法的比较[J]. 园艺学报, 2008, **35**(5):655-660.

LIU R D, ZHANG M, LI X X. Comparisons of extraction solvents and quantitative-methods for analysis of anthocyanins in strawberry and blueberry fruits[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, **35**(5):655-660.

[26] 孙 卫, 李崇晖, 王亮生, 等. 蓝色瓜叶菊花青苷在花发育过程中的积累和变化规律[J]. 北京林业大学学报, 2010, **32**(3):128-134.

SUN W, LI C H, WANG L S, *et al.* Accumulation and variation of anthocyanins in blue flowers of *Senecio cruentus* at different flowering stages[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, **32**(3):128-134.

[27] 陶秀花, 袁 媛, 徐怡倩, 等. 风信子花瓣花色苷组成分析 [J]. 园艺学报, 2015, **42**(2):301-310.

TAO X H, YUAN Y, XU Y Q, *et al.* Anthocyanin profiles in petals of different *Hyacinthus orientalis* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, **42**(2): 301-310.

[28] WANG L, ALBERT N W, ZHANG H, *et al.* Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium orchid* [J]. *Planta*, 2014, **240**(5): 983-1 002.

[29] MIYAHARA T, TAKAHASHI M, OZEKI Y, *et al.* Isolation of an acyl-glucose-dependent anthocyanin 7-O-glucosyltransferase from the monocot *Agapanthus africanus* [J]. *Journal of plant physiology*, 2012, **169**(13): 1 321-1 326.

[30] PAN Q F, *et al.* Investigation of the chemomarkers correlated with flower colour in different organs of *Catharanthus roseus* using NMR-based metabolomics[J]. *Phytochemical Analysis*, 2004, **25**(1): 66-74.

(编辑:潘新社)