

花烟草中黄酮类化合物种类及含量的分析

崔亚静¹, 张延龙^{1*}, 牛立新², 刘亚婷², 汪晓谦², 王润丰¹, 孙安妮¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要: 将加拿大引进的花烟草按花色分为九个大类, 用潘通色卡进行花色标定, 并采用分光光度计、光谱扫描和高效液相色谱仪对黄酮(醇)类物质的组成及含量进行分析以此推测花色素成分。结果表明, 各色花烟草中均不含有类胡萝卜素、C₃-OH 氢游离的黄酮醇、查儿酮, 都含有橙酮, 且除白色花外, 均含有花青苷, 紫色系的花青苷含量最高, 可知花青苷是影响花色的主要因素。

关键词: 花烟草; 花色素; 黄酮类物质; 高效液相色谱; 光谱扫描

中图分类号: S681.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7461(2012)01-0150-05

Analysis of the Flavonoids in *Nicotiana alata*

CUI Ya-jing¹, ZHANG Yan-long^{1*}, NIU Li-xin², LIU Ya-ting²,
WANG Xiao-qian², WANG Run-feng¹, SUN An-ni¹

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The *Nicotiana alata* which was introduced from Canada was divided into groups according to their colors, measured by Pantone Colour Chart. The composition and contents of flavonoids were determined by using spectrophotometer, spectral scanning and high performance liquid chromatography (HPLC) to speculate the pigments composition. No carotenoids, 3-flavonols and chalcones were found in different groups. Aurones were detected from all groups. Except for white flower groups, others all contained anthocyanins. The purple group had the highest content of anthocyanins, indicating that it was the key factor controlling the flower color.

Key words: *Nicotiana alata*; pigment composition; flavonoids; HPLC; spectral scanning

花烟草(*Nicotiana alata*)为茄科烟草属, 是一年生草本花卉, 花色丰富, 结种量大, 有烟草属植物特有的香气, 具有较好的观赏特性和园林应用前景。国内外对花烟草的主要研究方向集中在自交不亲和机理的研究^[1-4], 关于花色方面的研究甚少。

色素的种类和含量是花卉呈现不同的花色的根本原因, 不同花色栽培品种的选育是近几年的研究热点^[5]。除了叶绿素, 还有 3 种重要的植物色素, 即呈现红色和蓝色的黄酮类化合物, 呈现桔黄和黄色的类胡萝卜素和呈现紫色和黄色的花青素。黄酮类化合物是植物产生的一种重要的次生代谢物, 它与一系列

的生理机能都有关系, 如叶表面毛状体的黄酮醇使植物能吸收较短波长的紫外线^[6]从而使叶子免受紫外线的伤害, 黄酮类化合物还能形成和改变花色^[7]。已有文献提出黄酮醇可能与雄性植株的育性有关, 如调节玉米和矮牵牛花粉的萌发和花粉管的生长, 但在洋桔梗中不具备这样的作用^[8-11]。芦丁是黄酮醇的一种, 它对蝗虫有诱食剂的作用^[12]。芦丁还是柑橘和荞麦中含有的主要黄酮醇类物质, 它能有效清除一氧化氮, 并能防止由一氧化氮导致的组织损伤^[13]。花青素在植物的花瓣、叶、茎、根、块茎、果实和种子中都存在^[14], 有关报道证明它可以使器官表现出粉色, 红

收稿日期: 2011-01-01 修回日期: 2011-03-11

基金项目: 国家林业局重点攻关项目: 秦岭野生花卉资源保护与利用研究(2006-73)

作者简介: 崔亚静, 女, 在读硕士, 主要从事园林植物育种研究。E-mail: candice_shirley@126.com

* 通讯作者: 张延龙, 女, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事园林植物研究。E-mail: zll22@126.com

色,橘黄色,猩红色,紫色,蓝色和黄色^[15],而组织的颜色及其深度大部分取决于羟基化和糖基化结构。基因水平上研究黄酮类花青素类物质的合成是一种重要的方法。通过生物化学、分子生物学和基因学,人们已经克隆出了控制花青素合成途径的大部分基因^[16-17],反义基因方法已经成功的应用在了花色改变上^[18]。类胡萝卜素使果实和花呈现出黄色到红色,而且它还在光合作用中担当重要组成成分^[19]。测定花烟草中所含色素的种类是进行花色研究和花色选育的前提步骤。据已有文献得知,花烟草中含有槲皮素苷类、山奈酚苷类^[20]。

本文用高效液相色谱方法对花烟草中的类胡萝卜素、花青素、类黄酮进行定性分析,并对芦丁、山奈酚和槲皮素这三种黄酮醇类化合物进行了定量分析鉴定,分析出现不同花色性状的原因和花烟草抗一氧化氮损害的功能,且建立了系统科学的黄酮醇类成分的定性定量分析方法,步骤包括:目测—初步测定色素种类—色素定性测定—色素定量测定,最终得出所含色素的种类和几种黄酮类物质的浓度,为观赏花卉的色素和抗性的分析程序提供参考并为花烟草花色的育种研究提供了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料采集与处理

花烟草是 2006 年 9 月从加拿大温哥华布查特花园引进,2007 年到 2010 年种植于陕西杨陵西北农林科技大学园艺场。肉眼观察,将其按花色分为三大系九小类,三大类为白色系、红色系、紫色系,将九种花色用潘通色卡标记。

在晴天上午采集盛花期柱头分泌粘液时期的花朵,按花色分别装入塑料自封袋内,用冰盒带回实验室。在花筒与花瓣结合凸起部位将花筒与雌蕊雄蕊剪掉,只留下有颜色的花瓣部分进行定性定量实验。

1.2 花瓣色素初步定性

参照安田齐^[21]的方法,取各色新鲜花瓣 0.1 g 分别加入石油醚、10% 的盐酸和 25% 氨水 5 mL,研磨至匀浆,过滤到玻璃试管中观察滤液颜色,并用潘通色卡记录颜色编号。初步鉴定花瓣中是否含有类黄酮或类胡萝卜素。

1.3 花色素定性测定

花色素苷含量测定采用盐酸甲醇法^[22]。量取 37% 的盐酸 0.1 mL,用甲醇定容至 100 mL,制成 0.1% 的盐酸甲醇溶液作提取液备用。各个花色称 0.1 g 新鲜花瓣,分别加入 5 mL 提取液研磨至匀浆,转移到小药剂瓶中,再在研钵中加入 5 mL 提取

液润洗一遍,二者混合,4℃ 下提取 16~20 h。用 3802 UV/VZS 紫外可见分光光度计测 530 nm (黄酮类物质吸收峰)和 350 nm (花青苷吸收峰)下的吸光度,参比液为 0.1% 的盐酸甲醇溶液。并在 220~600 nm 下进行光谱扫描,间隔为 1 nm。通过吸光度值可以初步测定是否含有花青苷和黄酮类物质,并可进行含量比较,得出影响花色的主要色素种类。通过光谱曲线可以初步测定其是否含有 C₃-OH 氢游离的黄酮醇、查耳酮、橙酮和花青苷。

1.4 黄酮醇类的高效液相色谱定性定量分析

称新鲜花瓣各 1 g,用液氮研磨至粉末状,加入 5 mL 色素提取液(甲醇:水:甲酸:三氟乙酸=70:27:2:1)^[23-24],转入小药剂瓶中,再加入 5 mL 提取液将研钵润洗一遍,再转入小药剂瓶中,将二者混合均匀,放入 4℃ 冰箱中低温避光提取 24 h,水为超纯水,其他 3 种药品均为分析纯。用滤纸和 0.22 μm 的滤纸依次过滤,滤液保存于-20℃ 冰箱中备用。流动相 A 液为水:磷酸=98.5:1.5,B 液为水:乙腈:磷酸:甲酸=53.5:25:1.5:20,流动相为 A 和 B 的混合液,A:B=80:20~40:60^[25],乙腈为色谱级,水为超纯水,其他药品为分析纯。A 液、B 液用 0.22 μm 滤膜过滤后置于-20℃ 冰箱中保存备用。

标准品:山奈酚、槲皮素、芦丁均购买于天津一方科技有限公司

色谱仪的型号:岛津-2010,紫外检测器,色谱柱为 C18 柱,泵为 LC-10AD,LC solution 工作站。

分析条件:柱温 30℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样体积 10 μL,3 种黄酮醇的检测波长为 360 nm^[26]。线性梯度洗脱,程序如下:0 min,40% B;60 min,60% B;70 min,40% B。

2 结果与分析

2.1 1~9 号花色色卡标记

按花色将花烟草分为 3 个色系,即白色系、红色系和紫色系(表 1)。白色系花和红色系中的 212C 花的花瓣无任何杂色,属于纯色类,其他几类均混有规则花纹,沿星状或脉状分布的颜色条纹,形状规则。

2.2 色素简易定性试验中颜色记录

分析方法参照安田齐^[21]。应用石油醚、盐酸、氨水测试(表 2)。石油醚测试中均为无色,证明不含有类胡萝卜素。

盐酸测定均出现不同程度的黄色红色的混合颜色,黄色代表可能含有黄酮类化合物,出现红色说明可能含有花青苷,黄红色则代表可能同时含有黄酮类和花青苷。

表 1 花色标记
Tabel 1 Marking of color number

花色标号	花色描述	系列
1	白色	白色系
2	白底色 浅粉色星状条纹	红色系
3	2365C 底色 略深脉状条纹	红色系
4	223C 底色 略深脉状条纹	红色系
5	212C	红色系
6	210C 底色 略深脉状条纹	红色系
7	257C 底色 略深脉状条纹	紫色系
8	白底色 蓝紫色星状条纹	紫色系
9	250C 底色 略深脉状条纹	紫色系

表 2 颜色记录
Tabel 2 Color test of flavonoids

反应试剂	石油醚	10%盐酸	25%氨水
1	透明无色	浅绿 7485C	黄绿 379C
2	透明无色	黄红 7401C	黄绿 396C
3	透明无色	黄红 7401C	黄棕 7407C
4	透明无色	黄红 7401C	黄棕 7407C
5	透明无色	暗红 694C	黄棕 611C
6	透明无色	黄红 7513C	黄棕 611C
7	透明无色	黄红 489C	黄绿 609C
8	透明无色	桔黄 726C	黄绿 610C
9	透明无色	黄红 488C	黄棕 7407C

氨水测试中出现黄色,证明含有类黄酮,白色系白底色、浅粉色星状条纹品种和紫色系浅色品种均出现黄绿色,是由花青苷呈现的蓝色与类黄酮呈现的黄色混合而成^[27-28],证明白色系、浅粉色星状条纹品种和紫色系浅色品种含有花青苷和类黄酮两种;红色系和 250C 底色具有深脉状条纹品种出现黄棕色表明可能还含有黄酮醇类化合物。

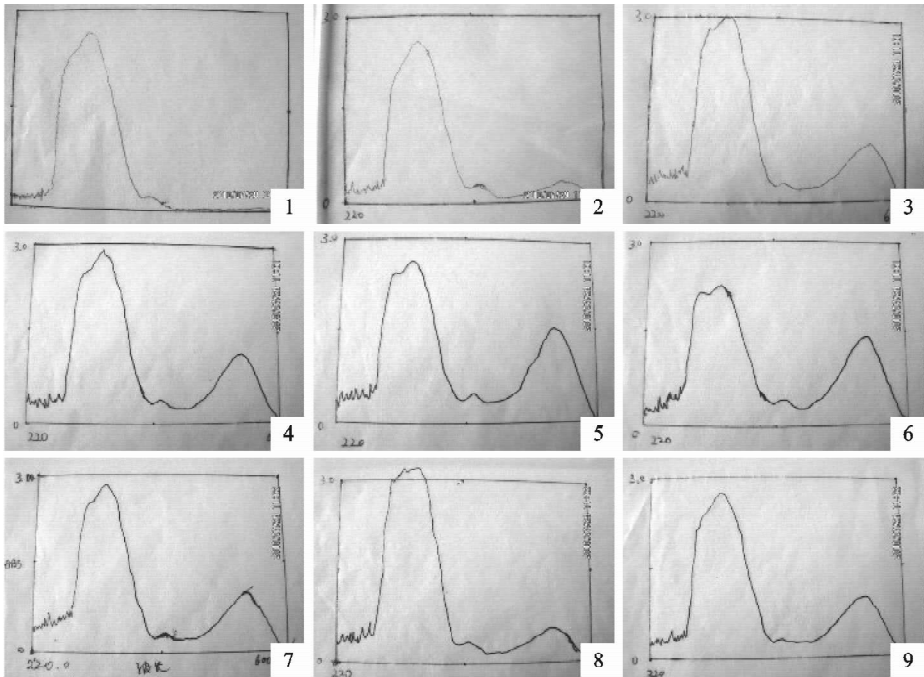


图 2 1~9 号的色谱扫描图(微机植字)
Fig.2 1—9 color chromatogram map

综上所述,花烟草花瓣中不含有类胡萝卜素,含有花青苷和类黄酮两种色素,其中红色系和 250C 底色具有深脉状条纹品种中可能还含有黄酮醇类化合物。

2.3 花色素定性

2.3.1 吸光度测定结果 吸光度值越高,说明对应物质的含量越高^[22]。图 1 为两个波长下各花色测得的吸光度值,8 号含黄酮醇类物质最多,250C 底色具有深脉状条纹品种含花青苷最多,白色系不含有花青苷,只含有黄酮类物质。红色品种中花青苷含量呈现规律变化,与其花朵颜色渐变规律相同,说明花青苷是影响花朵红色程度的主要因素,250C 底色具有深脉状条纹品种出现例外,推测与其花色为紫色粉色的杂合色有关系。

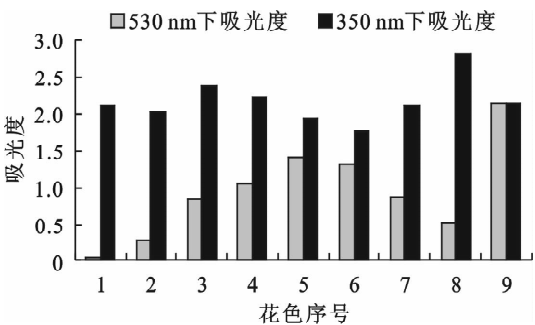


图 1 各花色吸光度测定

Fig.1 Absorption determination of each color

2.3.2 色谱扫描后测定结果 图 2 横坐标代表吸收波长,均为 220~600 nm。纵坐标代表吸光度值,均为 0~3.0,为花色色谱扫描结果。

通过不同类黄酮化合物的紫外光谱吸收值分布范围,分析其所含色素种类^[29]。带Ⅰ主要吸收峰有 539 nm,415~417 nm,300~340 nm;带Ⅱ主要吸收峰有 220~280 nm;320~340 nm 吸收峰证明花烟草花瓣中不含有 C₃-OH 氢游离的黄酮醇、也不含有查儿酮;415~417 nm 吸收峰证明花烟草花瓣可能含有橙酮;539 nm 吸收峰证明花烟草花瓣含有花青素及苷,白色品种花瓣中不含有花青素及苷。

小结:白色品种中不含有 C₃-OH 氢游离的黄酮醇、查儿酮、花青素及苷;红色系紫色系中均不含有 C₃-OH 氢游离的黄酮醇、查儿酮。

2.4 高效液相色谱测定结果

经过高效液相色谱分析,在检测波长为 360nm 时,未检测到槲皮素和芦丁,说明花烟草中不含有槲皮素和芦丁两种黄酮醇成分,只含有山奈酚,各个花色的山奈酚含量如图 3,紫色系中 257C 底色具深脉状条纹品种的山奈酚含量最高,红色系 212C 品种的山奈酚含量最低。红色系普遍含量偏低,紫色系和白色系含量偏高。

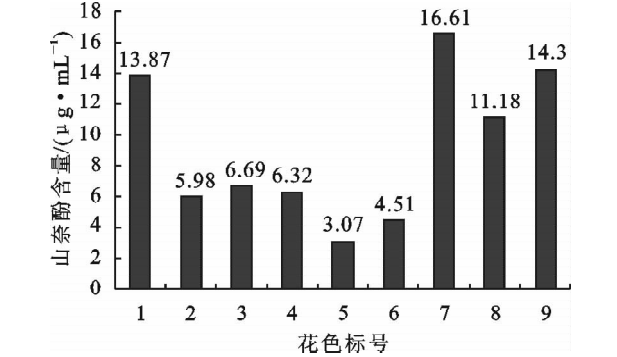


图 3 各个花色的山奈酚含量

Fig. 3 Kaempferol content of each color group

3 结论与讨论

由实验知,花烟草中不含有类胡萝卜素、C₃-OH 氢游离的黄酮醇及查儿酮,各花色均含有山奈酚这种黄酮醇成分。高效液相色谱分析得知,花瓣提取液均不含有槲皮素和芦丁,这不同于前人的分析结果^[3]。因其不含有芦丁,故在传统的黄酮醇类物质总含量测定方法中,不能用芦丁作为标品,且推测花烟草可能对一氧化氮无抵抗能力。

植物花色是一个复杂的性状,它主要由三大类色素决定,即类黄酮、类胡萝卜素和生物碱^[30-31],花烟草中不含有类胡萝卜素,这就解释了没有黄色系花色的原因,其含有的类黄酮和生物碱类型有待进一步测定。花色还受到 pH 值^[32]、花瓣细胞性状^[33]的影响。所以,花烟草花色需进行下一步的研究。通常花青素都与糖苷结合,据已有文献可知,烟草中

含有矢车菊苷,Nakatsuka 等^[34]用 RNAi 方式抑制烟草内源 F3'H 单个基因表达,使得矢车菊苷在花瓣中的积累减少,最终导致花色明显变淡,但是色调没有改变,推测烟草本身 DFR 不能催化 DHK 转化成花葵素。烟草中不含有 F3'5'H 基因^[30],因而不能产生飞燕草色素,所以烟草中没有蓝色花。利用转基因技术,将 F3'5'H 基因转入烟草品种中,就能使其积累飞燕草色素^[35-37],但花朵呈现出的是紫红或淡紫色,并非蓝色,对蓝色花基因水平的研究有待进一步加深。

花色的种类和深浅还与羟基化和糖基化程度有关,带糖苷的花青素种类和含量还有待进一步研究。

参考文献:

[1] AHMED K P, SCOTT B. B, THOMAS R. I, *et al.* Sequence diversity of pistil S-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. Sexual Plant Reproduction, 1990, 3: 88-97.

[2] BREDEMEIJER G M M, BLAAS J I W. S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca* [J]. Tag Theoretical and Applied Genetics, 1981, 59: 185-190.

[3] JAROSLAV T. Investigation of free amino-acids in cross-, self- and non-pollinated pistils of *Nicotiana glauca* [J]. Biologia Plantarum (Praha), 1961, 3(1): 47-64.

[4] 李凤霞 杨爱国 王卫锋, 等. 花烟草自交不亲和及其机理[J]. 生命的化学, 2009, 29 (1): 76-79.

LI F X, YANG A G, WANG W F, *et al.* Progress of study on self-incompatibility of *Nicotiana glauca* and its mechanism [J]. Chemistry of Life, 2009, 29(1): 76-79.

[5] GERT F. Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering [J]. Plant Breeding, 1991, 106: 1-26.

[6] HARBORNE J B, WILLIAMS C A. Advances in flavonoid research since 1992 [J]. Phytochemistry, 2000, 55: 481-504.

[7] BRENDA W S. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiol, 2001, 126: 485-493.

[8] MO Y, NAGEL C, TYLER L P. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 1992, 89: 7213-7217.

[9] VANDERMEER I M, STAM M E, VANTUNEN A J, *et al.* Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility [J]. Plant Cell, 1992, 4: 253-262.

[10] BURBULIS I E, IACOBUCI M, SHIRLEY B W. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1996, 8: 1013-1025.

[11] NIELSEN K M, DEROLE S C, MARKHAM K R, *et al.* Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus [J]. Molecular Breeding, 2002, 9: 217-229.

[12] BERNAYS E A, HOWARD J J, CHAMPAGNE D, *et al.*

Rutin;a phagostimulant for the polyphagous acridid *Schistocerca americana*[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*,1994,60;19-28.

[13] GUIDORM M H, JOSB G P, RONALD E M, *et al.* Peroxynitrite scavenging by flavonoids[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,1997,236;591-593.

[14] WILLIAMS C A, GRAYER R J. Anthocyanins and other flavonoids[J]. *Natural Product Reports*. 2004,21;539-573.

[15] KEVIN M D, KATHY E S, SIMON C D, *et al.* Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase [J]. *Euphytica* ,2003,131;259-268.

[16] DIXON R A, STEELE C L. Flavonoids and isoflavonoids - a goldmine for metabolic engineering[J]. *Trends Plant Sci* , 1999,4;394-400.

[17] GERT F, STEFAN M. Metabolic engineering and applications of flavonoids[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001,12;155-160.

[18] MOL J N M, VANDERKROL A R, VANTUNEN A J, *et al.* Regulation of plant gene expression by antisense RNA [J]. *FEBS Letters*,1990,268;427-430.

[19] KRISHNA K N. Safety valves for photosynthesis[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2000,3;455-560.

[20] MAURICE E S, ORESTES T C, VERNE A S, *et al.* The flower flavonols of *Nicotiana* species[J]. *Phytochemistry*, 1992,31(5);1639-1647.

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

[22] 金波, 东葱茹. 一品红花色的探讨[J]. *园艺学报*,1994,21 (1);87-89.

JIN B,DONG C R. Studies on the colour of *Euphorbia pulcherrima*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*,1994,21(1);87-89.

[23] ZHANG J J, WANG L S, SHU Q Y, *et al.* Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of Xibei tree peony[J]. *Scientia Horticulturae*,2007, 114: 104 - 111.

[24] FUMIO H, MIKA T, HIROKO M, *et al.* Characterization of cyanic flower color of *Delphinium* cultivars[J]. *Japan. Soc. Hort. Sci.* , 2000,69;428-434.

[25] WANG L S, AYA S, FUMIO H, *et al.* Analysis of petal anthocyanins to investigate flower coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) tree peony cultivars [J]. *Journal of Plant Research*, 2001,114: 33-43.

[26] 高媛媛,汤道荃,印小星,等. 高效液相色谱法同时测定银杏叶中提取物中 5 种黄酮类成分[J]. *徐州医学院学报*,2008,28 (5);307-310.

GAO Y Y, TANG D Q, YIN X X, *et al.* Simultaneous determination of five flavonols in extract of *Ginkgo biloba* by high performance liquid chromatography [J]. *Acta Academiae Medicinae XUZHOU*,2008,28(5);307-310.

[27] X H 波钦诺克. 植物生物化学分析方法[M]. 北京:科学出版社, 1981.

[28] 李钧敏,陈永辉,今则新,等. 大血藤黄酮类化合物的提取与分析[J]. *武汉植物学研究*,2002,20(2);157-161.

LI J M, CHEN Y H, JIN Z X, *et al.* Extraction and Analysis of flavonoids from *Sargentodoxa cuneata* [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*,2002,20(2);157-161.

[29] 高锦明. 植物化学[M]. 北京:科学出版社,2003.

[30] 哈本. 黄酮类化合物[M]. 北京:科学出版社,1983.

[31] 何小玲,王金发. 观赏花卉的品质基因及其基因工程问题[J]. *植物生理学通讯*, 1998,34(6);462-466.

[32] ROBERT N S, KARL H N, SAM A. Microspectrophotometric measurement of pH and pH effect on color of petal epidermal cells[J]. *Phytochemistry*, 1975,14 ;837-942.

[33] YABUYA Y, AIKO Y, ADACHI T. Factors affecting the velvety ort perianthus of Japanese garden iris (*Iris ensata* Thunb.) [J]. *Cytologia*, 1993, 58;48-51.

[34] NAKATSUKA T, ABE Y, KAKIZAKI Y, *et al.* Production of Red-flowered Plants by Genetic Engineering of Multiple Flavonoid Biosynthetic genes[J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 26;1951-1959.

[35] SHIMADA Y, NAKANNO-SHIMADA R, OHBAYASHI M, *et al.* Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants[J]. *FEBS Letters*,1999,461(3);241-245.

[36] SHIMADA Y, OHBAYASHI M, NAKANO-SHIMADA R, *et al.* Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase; specific switching of the pathway in petunia[J]. *Plant Cell Rep*,2001,20;456-462.

[37] OKINAKA Y, SHIMADA Y, NAKANO-SHIMADA R, *et al.* Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative F3'5'H cDNA from *Campanula medium* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem.* ,2003,67(1);161-165.