

黄瑞木果实红色素的分离及其化学结构研究

黄芯婷^{1,2}, 刘剑秋^{1,①}, 彭奇³

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007; 2. 福州第三中学, 福建 福州 350003;
3. 中国科学院福建物质结构研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 采用纸层析、紫外-可见光谱、红外光谱和液-质联用等技术对福建野生黄瑞木 [*Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth.] 果实红色素进行了分析研究。结果表明, 该红色素主要含有矢车菊素-3-芸香糖苷 (cyanidin-3-rutinoside) 和矢车菊素-3-葡萄糖苷 (cyanidin-3-glucoside) 2 种花色苷, 呈鲜艳的红色, 可作为天然保健食品的色素添加剂加以推广应用。

关键词: 黄瑞木; 红色素; 花色苷; 结构鉴定

中图分类号: Q946.83 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2007)01-0031-04

Studies on separation and chemical structure identification of red pigment of *Adinandra millettii* fruit HUANG Xin-ting^{1,2}, LIU Jian-qiu^{1,①}, PENG Qi³ (1. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China; 2. Fuzhou No. 3 Senior High School, Fuzhou 350003, China; 3. Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, the Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(1): 31-34

Abstract: Paper chromatography (PC), ultraviolet-visual spectrum (UV), infrared spectrum (IR) and high pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) were used to separate and identify the red pigment from wild *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth. fruit in Fujian Province. The results showed that the red pigment is composed of two anthocyanins which are cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-glucoside in bright red color and it can be used as an additive in natural health food.

Key words: *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth.; red pigment; anthocyanin; structure identification

黄瑞木 [*Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth.] 为山茶科 (Theaceae) 黄瑞木属 (*Adinandra* Jack.) 植物^[1], 多生于海拔 1 200 m 以下的山地路旁灌丛、次生疏林及阳坡沟谷疏林下, 喜生于气候温暖、阳光充足、土层深厚且肥沃的酸性土壤中, 是福建省常绿阔叶林中的主要林下灌木树种之一, 其果可食, 味稍苦, 含有多种氨基酸成分^[2]。

黄瑞木浆果呈亮黑色, 含有丰富的水溶性天然色素, 其色素属于黄酮类花色苷化合物, 具有亮丽的玫瑰红色, 适用于一些食品的着色, 具有十分广阔的开发利用前景。

作者对黄瑞木果实红色素进行分离纯化, 并利用多种方法对该红色素中所含的花色苷成分进行结构鉴定, 为黄瑞木果实红色素的进一步开发和利用提供科学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 黄瑞木 [*Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth.] 成熟果实于 2005 年 8 月采自福建省福州市鼓山风景区。由福建师范大学生命科学学院刘剑秋教授鉴定。果实采收后洗净, 自然晾干, 粉碎备用。

1.1.2 仪器与设备 CARY 50BIO 型紫外-可见分光光度计; AVATAR 360 FT-IR 傅立叶红外光谱

收稿日期: 2006-05-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40476051)

作者简介: 黄芯婷 (1980-), 女, 福建福州人, 硕士研究生, 主要从事植物资源学研究。

① 通讯作者 E-mail: jqliu@fjnu.edu.cn

仪;FINNIGAN LCQ DECA XP MAX 液质联用仪;2695 高效液相色谱仪-2414 示差检测器;旋转蒸发器;水循环式真空泵;层析筒;新华 No. 3 层析滤纸;所用试剂为分析纯和色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 黄瑞木成熟果实粉末过 20 目筛,室温下按 1:50 (W/V) 的比例用提取液 [$V(1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}):V(95\% \text{ 乙醇})=15:85$] 浸提 24 h, 过滤除去果肉残渣,上清液用旋转蒸发器于 50 °C 以下真空浓缩,将浓缩液离心以除去沉淀。所得浓缩液可用纸层析法进行进一步的分离及纯化,置于 4 °C 冰箱中备用。

1.2.2 红色素的分离与纯化 采用纸层析法^[3] 进行红色素的分离纯化,层析液选用甲酸溶液 [$V(\text{浓盐酸}):V(\text{甲酸}):V(\text{水})=2:5:3$],层析时间 10 h。

1.2.3 紫外-可见光光谱分析 对分离纯化得到的红色素 0.1% HCl-甲醇液进行紫外光谱扫描,红色素浓度的高低以扫描图中可见光区最高峰的位置适宜为准,用 0.1% HCl-甲醇液作参比,扫描范围 190~800 nm。为确定最大吸收峰无红移现象,在比色皿中再加入 2~3 滴 5% AlCl_3 甲醇液,搅匀静置 10 min 后,按上述条件作紫外光谱扫描。

1.2.4 纸层析分析 取 4 个层析筒,分别加入 BAW [$V(\text{正丁醇}):V(\text{醋酸}):V(\text{水})=4:1:5$]、 BuHCl [$V(\text{正丁醇}):V(2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl})=1:1$]、1% HCl 和 HAc-HCl [$V(\text{醋酸}):V(\text{浓盐酸}):V(\text{水})=15:3:8$] 作展开剂,将 4 张点有样品的层析滤纸 (30×20 cm) 放入层析筒中,于 (30±1) °C 下预先平衡 15 min,再上行展开,当展开剂前沿达约 16 cm 处时,终止纸层析,将层析纸晾干后观察色斑,测量 R_f 值,并与文献^[4] 中的 R_f 值进行比较。

1.2.5 红色素的水解及糖的鉴定 将纯化的色素浓缩至干,加入 5 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$,于 100 °C 处理 1 h,冷却至室温,用正丁醇萃取,每次 1 mL,将配基与糖溶液分离。正丁醇部分为花色苷配基,水溶液部分则为糖溶液。用高效液相色谱法进行糖的分离和鉴定,标准品为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 葡萄糖、半乳糖和鼠李糖。

高效液相色谱条件:色谱柱为 Waters 氨基柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温 35 °C;检测器为示差折光检测器;流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=75:25$;流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 20 μL 。

1.2.6 红外光谱分析 将已分离纯化的红色素样品干燥并用 KBr 压片,采用美国 Nicolet 公司 AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪作傅立叶红外光谱扫描,获得样品的红外光谱图。

1.2.7 液-质联用分析 将干燥的红色素样品溶解于甲醇(色谱纯)中,配制成浓度为 0.01% 的红色素溶液,然后进行 HPLC-ESI-MS 分析。

HPLC 条件:ODS C_{18} 色谱分析柱 (3.9 mm×250 mm, 5 μm);流动相由不同比例的溶剂 A (10% 甲酸水溶液) 和溶剂 B (10% 甲酸-50% 甲醇的水溶液) 组成。按下列程序进行色谱分离:0~1 min 65% 溶剂 A,1~10 min 65%~85% 溶剂 A,10~20 min 85%~65% 溶剂 A;流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量 20 μL ;二级管阵列检测器 (DAD);UV 检测,波长 525 nm。

质谱条件:ESI-MS 正离子检测,采用选择离子扫描方式,选择离子质量是 $[M+H]^+$ 离子,电离电压 32.00 psi;离子源温度 350 °C;电喷雾接口干燥气为 N_2 ,流速 $10.00 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2 结果和讨论

2.1 黄瑞木果实红色素成分的分离

初步提取分离的黄瑞木果实红色素提取液经甲酸溶液进行上行纸层析分离后,能明显分辨出 2 条色谱带,由上而下编号为 1 号和 2 号,经甲酸溶液第 2 次层析后均可得到单一的色带,表明经过纸层析后获得的色素样品较纯。观察发现,1 号色谱带呈桔红色,2 号色谱带呈红色。前人的研究结果表明,食品中 6 种主要红色素衍生物的颜色从桔红到紫红按结构顺序排列为天竺葵素、矢车菊素、芍药色素、锦葵素、牵牛花素和飞燕草素^[5]。因此,从色带颜色看,1 号和 2 号色素带可能是天竺葵素、矢车菊素或芍药色素的衍生物。

2.2 紫外-可见光光谱数据比较

根据紫外-可见光光谱分析结果(见表 1)发现,黄瑞木果实红色素所含的 2 种花色苷的性质极为相似,最大吸收峰均在加入 5% AlCl_3 后发生波长红移现象,表明这 2 种花色苷均在 B 环上有相邻的羟基存在,且波长位移的程度也一致,均为 18 nm。根据 2 种花色苷的色带颜色、最大吸收峰的波长及 E_{440}/E_{max} 值并与相关文献^[4] 对照的结果,可初步确

定黄瑞木果实红色素所含的2种花色苷均为矢车菊素,并在3位上有取代。

表1 黄瑞木果实红色素中2种花色苷的紫外-可见光光谱数据
Table 1 Ultraviolet-visible spectral data of two kinds of anthocyanins in red pigment of *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth. fruit

花色苷编号 No. of anthocyanin	λ_{\max}/nm	E_{440}/E_{\max}	$\Delta\lambda_{\max}/\text{nm}$
1	530	26	18
2	529	25	18

2.3 纸层析鉴定结果

对黄瑞木果实红色素所含的2种花色苷进行紫外-可见光光谱分析后,再用纸层析法进行进一步分析,其 R_f 值见表2。由表2可以看出,2种花色苷的 R_f 值十分接近,差别很小。前人的研究结果表明^[4],矢车菊-3-芸香糖苷在BAW、BuHCl、1% HCl和HAc-HCl展开剂中的 R_f 值分别为0.37、0.25、0.19和0.43;矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3-半乳糖苷在上述4种展开剂中的 R_f 值分别为0.38、0.25、0.17、0.26和0.37、0.24、0.07、0.26,相比较后可以发现,黄瑞木果实红色素所含的1号花色苷在各种展开剂中的 R_f 值与矢车菊素-3-芸香糖苷相似,2号花色苷在不同展开剂中的 R_f 值与矢车菊素-3-半乳糖苷或矢车菊素-3-葡萄糖苷相似,由此推测1号花色苷可能为矢车菊素-3-芸香糖苷;2号花色苷可能为矢车菊素-3-半乳糖苷或矢车菊素-3-葡萄糖苷。

表2 黄瑞木果实红色素中2种花色苷成分纸层析的 R_f 值比较
Table 2 The comparison of R_f values with paper chromatography of two kinds of anthocyanin in red pigment of *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth. fruit

花色苷编号 No. of anthocyanin	在不同展开剂中的 R_f 值 R_f value in different developing solvent			
	BAW	BuHCl	1% HCl	HAc-HCl
1	0.38	0.27	0.15	0.44
2	0.36	0.26	0.11	0.24

2.4 糖基鉴定结果

将黄瑞木果实红色素所含的2种花色苷用HCl进行水解,所得糖基采用高效液相色谱法进行鉴定。结果表明,1号花色苷水解后含2种糖基,出峰时间分别为4.80和6.82 min;2号花色苷水解后含1种糖基,出峰时间为6.83 min。根据标准糖的出峰时间(鼠李糖4.70 min、半乳糖7.12 min、葡萄糖6.78 min)可以判断,1号花色苷水解后所得到的糖

基为鼠李糖和葡萄糖,2号花色苷水解后所得到的糖基为葡萄糖。

2.5 红外光谱分析结果

黄瑞木果实红色素所含的2种花色苷的红外光谱图见图1和图2。由图1和图2可知,2种花色苷的结构极为相似,其中 $3\ 500\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 间均有宽的强吸收峰,对应于矢车菊素结构中的糖基及芳香环上酚型结构中大量的—OH的伸缩振动,由于羟基间形成氢键使吸收峰波数下降且波形变宽;在 $1\ 085\sim 1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ 间的伸缩振动吸收峰与醇羟基的C—OH相对应; $1\ 870\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 范围的吸收峰说明存在羰基的伸缩振动,对应于直接连接在环上的 α -羰基或醌式结构;在谱图中存在的 $1\ 650\sim 1\ 500$ 、 $2\ 920$ 和 $2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ 峰对应为苯环—CH的伸缩振动,在 $900\sim 650\ \text{cm}^{-1}$ 之间也存在几个与苯环取代有关的C—H振动吸收。由于芳香环上的取代度较大或为芳香杂环时,芳香性一般有所下降,因此, $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 峰对应为芳香环上共轭的C=C伸缩振动峰^[6],说明矢车菊素结构中存在不同类型取代的芳香环。由此推断,黄瑞木果实红色素所含

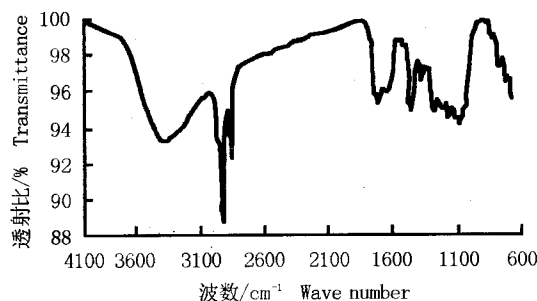


图1 黄瑞木果实红色素1号花色苷的红外光谱图
Fig. 1 FT-IR spectroscopy of No. 1 anthocyanin in red pigment of *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth. fruit

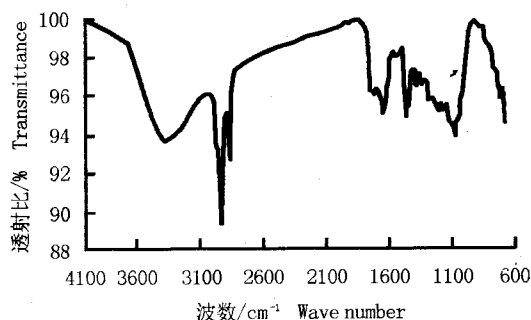


图2 黄瑞木果实红色素2号花色苷的红外光谱图
Fig. 2 FT-IR spectroscopy of No. 2 anthocyanin in red pigment of *Adinandra millettii* (Hook. et Arn.) Benth. fruit

的2种花色苷均具有矢车菊素的基本结构。

2.6 液-质联用分析结果

利用 HPLC 方法对黄瑞木果实红色素所含的2种花色苷进行分离,发现相同条件下两者在出峰时间上有所区别。1号花色苷的保留时间为6.52 min,2号花色苷的保留时间为9.46 min。

用 ESI-MS 正离子检测对1号花色苷峰进行质谱扫描,结果显示,1号花色苷出现 $[M+H]^+$ 为 $596.2\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的分子离子峰和 $278.5\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的碎片峰。采用二级质谱进行确认,即以 $596.2\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的离子峰作母离子扫描,出现449和 $287\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的碎片峰,其中 $287\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的碎片峰是矢车菊素的母核形成的离子峰。对照相关文献中的数据资料^[7]及上述的实验结果,可以推断,1号花色苷是矢车菊素-3-芸香糖苷(cyanidin-3-rutinoside),其分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_{16}$ 。

用 ESI-MS 正离子检测对2号花色苷进行质谱扫描,结果显示,出现 $[M+H]^+$ 为 $450\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的分子离子峰和 $288\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的碎片峰。以 $450\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 的离子峰作母离子扫描,出现与1号花色苷相同的 $287\text{ m}\cdot\text{z}^{-1}$ 碎片峰,进一步验证了2种花色苷的相似性,即2种花色苷具有相同的花色苷母核结构,仅在连接的糖基上有所区别。对照相关文献^[7]及上述各实验结果,推断2号花色苷为矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyanidin-3-glucoside),分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$ 。

3 结 论

应用纸层析、紫外-可见光谱分析、红外光谱分析及液-质联用技术等方法,对黄瑞木果实红色素进行分离、纯化及结构分析,基本可以确定黄瑞木果实红色素由2种花色苷成分组成,即矢车菊素-3-芸香糖苷和矢车菊素-3-葡萄糖苷。黄瑞木果实红色素主要成分的鉴定对黄瑞木的化学分类及其果实红色素在食品工业中的综合开发利用具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 林来官. 福建植物志(第三卷)[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1987. 492.
- [2] 刘小芬, 刘剑秋. 天然食用色素新秀毛茛红淡[J]. 植物杂志, 2003(6): 23.
- [3] 石冬梅, 林友文, 李柱来. 地苣果实红色素的分离及组成初步鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(3): 235-238.
- [4] 马自超, 庞业珍. 天然食用色素化学及生产工艺学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1994. 74.
- [5] 江南生, 严曰仁, 唐本珺. 玫瑰茄红色素的鉴定[J]. 食品与发酵工业, 1990(3): 18-23.
- [6] 诸培奋, 高剑英, 苏克曼. 防紫外线伞 ART-OMNI 采样器的 FTIR 分析[J]. 光谱实验室, 2002, 19(2): 198-200.
- [7] Adamovics J, Stermitz F R. High performance liquid chromatography of some anthocyanidins and flavonoids [J]. Chromatography, 1976, 129: 464-465.

2006 年审稿专家名单

《植物资源与环境学报》2006 年审稿专家名单如下(按姓氏的汉语拼音排序):

安树青 包维楷 陈国祥 陈树元 陈重明 崔红 邓懋彬 邓小江 丁家宜 丁小余 丁志遵 方升佐 方炎明
冯煦 高山林 高绪评 郭巧生 郭维明 杭悦宇 郝日明 何冬兰 何开跃 胡美英 黄苏珍 黄在康 李建宏
李维林 李先琨 李晓储 李新华 李亚 林思祖 刘建秀 刘启新 龙春林 陆长梅 罗达 罗万春 马翠兰
潘泽惠 彭方仁 彭峰 强胜 秦慧贞 秦民坚 任冰如 阮宏华 上官铁梁 沈晋良 施国新 苏鸿雁
孙醉君 唐世蓉 王广印 王家福 王强 王献溥 吴承祯 吴竞仑 邢福武 徐进 杨永华 姚淦 殷云龙
袁晓 张光富 张小平 张修国 张益民 周永红 诸葛强 朱月林

本刊对各位审稿专家的支持表示诚挚的感谢。