

天然红心蛋中三条红色色带成分的比较分析

刘良忠^{1,2}, 彭光华¹, 石嘉悻³, 王海滨¹, 任丹丹³, 张声华¹

(1.华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2.武汉工业学院食品学院, 湖北 武汉 430023; 3.长江大学生命技术学院, 湖北 荆州 434103)

摘 要: 采用硅胶薄层分离的方法, 将天然红心蛋中的红色色素成分物质在硅胶薄层上分离出三条色带。进一步对三条红色带采用化学反应定性, 薄层色谱, HPLC-MS-MS 分析方法鉴定。结果表明三个红色带物质均为类胡萝卜素, 红色物质具有与类胡萝卜素双键呈共轭状态的羰基。薄层色谱、HPLC、DAD 扫描光谱、MS1 及 MS2 鉴定结果表明三个红色带 R1、R2、R3 是分子量为 562 的紫杉红素类胡萝卜素的顺式异构体。

关键词: 天然红心蛋; 红色素; 鉴定

The Red Pigments Identification of Natural Red Yolk by TLC

LIU Liang-zhong^{1,2}, PEN Guan-hua¹, SHI Jia-yi³, WANG Hai-bing¹, REN Dan-dan³, ZHANG Sheng-hua¹

(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Food College, Wuhan Institute of Industry, Wuhan 430023, China;

3.College of Life Science and Technology, Changjiang University, Jingzhou 434103, China)

Abstract: The red pigments of nature red yolkin eggs were divided into three strap R1, R2 and R3 on TLC of silica gel. The components of three red straps were identified by chemical reaction on TLC, HPLC-MS-MS. The results indicated that all of the three straps R1, R2 and R3 were Carotenoids, and had conjugate keto. R1, R2 and R3 had same molecular weight 562 and were all isomers of Rhodoxanthin.

Key words: nature red yolk; red pigments; identify

中图分类号: TS203

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0175-05

天然红心蛋产自湖区蛋鸭, 红心蛋蛋黄呈绚丽的天然红色, 色度可达 RCF(Roche Yolk Color Fan)值 15 以上, 在国内和国际市场上普遍受到人们的喜爱^[1,2]。据报道禽蛋蛋黄的色泽与饲料中的类胡萝卜素有关^[3~7]。类胡萝卜素不仅是重要的天然色素, 而且具有广泛的生物学活性, 在预防肿瘤、免疫调节、抗氧化、清除自由基、预防眼病和心血管疾病及抑制杂环胺类物质的形成等方面具有非常重要的作用^[7~10], 具有保健和着色功能类胡萝卜素的研究和开发越来越受到人们的重视^{[1,2][4~7][11,12]}。随着人们对合成色素安全性的担忧及对天然绿色食品认识的提高, 很多国家禁止使用合成色素添加到饲料中生产含人工合成色素的红心蛋^[5]。因而天然红心蛋中的红色素的研究具有重要的意义。目前有关天然红心蛋红色物质的组成、结构、性质等均未见报道。本实验采用薄层色谱分离, 化学反应定性, HPLC-MS-MS 的方法对天然红心蛋中的三条红色色带成分作了分析鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

天然红心鸭蛋: 湖北仙桃食品公司提供, 购于仙桃、监利、洪湖等地湖区蛋鸭所产的红心蛋, 色度在 RCF 值 15 以上。

紫杉红素(Rhodoxanthin): 本实验室制备。采用紫杉浆果(曼地亚豆杉Taxus-media, Hicksii)提取纯化红色素, 经鉴定为紫杉红素。

1.2 实验仪器和药品

HPLC-MS-MS 仪: Agilent 1100series LC/MS。

虾青素(Astaxanthin, Sigma)、角黄素(Canthaxanthin, Sigma)标样及硅藻土(95%SiO₂, Sigma)购于 Sigma 公司。

硅胶 G 60 型, CP, 中国青岛海洋化工公司; MgO、石油醚、正己烷、无水乙醚、丙酮、无水乙醇、甲醇、氯化钠、无水硫酸钠、无水碳酸钠、硫

收稿日期: 2003-12-16

基金项目: 国家博士点基金资助项目(20020504008)

作者简介: 刘良忠(1963-)男, 副教授, 博士, 研究方向为功能食品与分子生物学基础。

酸、盐酸、硼氢化钠 均为国产分析纯, 其中无水乙醚加适量还原铁粉过夜、再重蒸去过氧化物; 异抗坏血酸钠 食品添加剂。

1.3 实验方法

1.3.1 天然红心蛋中红色成分的提取及脱脂纯化

取罗氏色度在 15° 以上的新鲜天然红心鸭蛋, 蛋黄与蛋白分开, 蛋黄冻干。取 50g 冻干蛋黄加少量碳酸钠和异抗坏血酸钠, 用 450ml 石油醚-丙酮(2:1, V/V)分三次搅拌提取(室温), 每次提取时间在 60min 左右。将提取液抽滤合并转入 1000ml 分液漏斗中, 加入 250ml 石油醚萃取, 缓慢加入约 150ml 饱和食盐水, 避光静置分层, 弃去下层水相。反复用食盐水洗 3 次去杂, 在上层有机相中加适量无水硫酸钠, 避光静置干燥 1h 脱水, 过滤。滤液 40℃ 以下真空浓缩, 得到红心蛋色素粗提物。充 N₂ 密封避光低温下保存。

用 MgO+ 硅藻土(1:2, W/W)作柱填料, 湿法装柱, 层析柱直径 20mm, 装柱高 20cm。红心蛋色素粗提取物上柱脱脂, 先用石油醚:丙酮(96:4, V/V)洗脱中性油脂及胆固醇, 洗脱过程用薄层检查脱脂情况。然后用丙酮洗脱收集红色和黄色组分。收集物真空浓缩, N₂ 吹干, 得到柱层析脱脂天然红心蛋混合色素, 充 N₂ 密封避光低温下保存备用。

1.3.2 天然红心蛋中红色成分的薄层分离

用薄层层析硅胶制备 0.75mm 的薄层层析薄板, 120℃ 活化 1h, 置冷却缸中冷却。用提取后脱脂纯化红心蛋混合色素的浓缩物点样, 在展层缸中展开。展层剂为正己烷:乙酸乙酯:丙酮:甲醇(27:4:2:2, V/V)。收集各红色带 R1、R2、R3, 用石油醚:丙酮(2:1, V/V)洗脱, 过滤, 加水萃取分离石油醚与丙酮, 石油醚层用无水硫酸钠脱水, 抽真空浓缩, 得红心蛋薄层分离红色素。低温、充 N₂ 避光保藏。

1.3.3 天然红心蛋中红色成分的薄层比较

用薄层层析硅胶制备 0.25mm 的薄层层析薄板, 120℃ 活化 1h, 置冷却缸中冷却。用柱层析脱脂红心蛋混合色素与虾青素(Astaxanthin)、角黄素(Canthaxanthin)及紫杉红素分别点样展开。展层剂同 1.3.2。

1.3.4 天然红心蛋中各红色成分的溶解性质和显色反应

将硅胶薄层上分离制备的红心蛋分离红色素, 分别用不同的试剂溶解, 观察其溶解性。将红心蛋红色组分分别溶于氯仿后与三氯化锑的氯仿溶液反应; 溶于乙醚后分别加入浓硫酸反应; 溶于乙醇后分别加入硼氢化钠进行还原反应; 溶于石油醚后分别加入 40% 皂化液(10%NaOH- 甲醇)皂化处理 12h。

1.3.5 天然红心蛋中红色成分的 HPLC-MS-MS 分析

采用 Agilent 1100series 液质联用仪, 离子源: ESI, Positive, Nebulizer 12.0psi, Dry Gas 6.0 l/min, Dry Temp. 200℃, Scan 100-700m/z, MS/MS Frag. Ampl.

1.0V。色谱柱: Zorbax SB-C18(2.1 × 50mm) P/W 860975-902, 柱温: 30℃, 流动相: 甲醇(含乙酸铵 0.02mol/L), 流速: 0.3ml/min, 进样量 5 μl。

2 结果与分析

2.1 天然红心蛋中红色成分的薄层鉴定

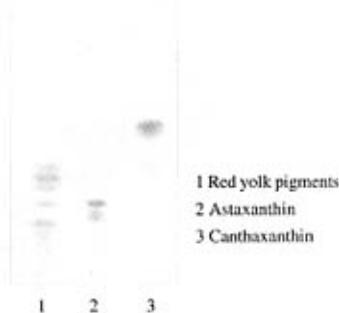


图1 红心鸭蛋色素与虾青素、角黄素的薄层图谱

Fig.1 The TLC of pigments of red yolk, astaxanthin and canthaxanthin

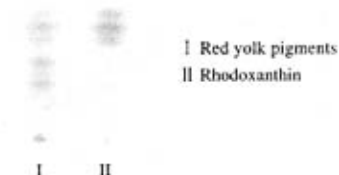


图2 天然红心蛋与紫杉红素的薄层图谱

Fig.2 The TLC of pigments of red yolk and Rhodoxanthin

天然红心蛋红色素在硅胶薄层上展开后, 形成三条红色带, 按 R 值从小到大的顺序, 将红色带表示为 R1, R2 和 R3。由图 1 可以看出, 红心蛋中的三条主要红色带不是虾青素和角黄素。虾青素可来源于河中的虾、蟹, 故放养于河中或沟渠的蛋鸭, 可在其所产的蛋中可能发现有虾青素的存在。蛋鸭配合饲料中常用人工合成角黄素的色素添加剂^{[9][11]}。由图 1 可以看出, 虾青素和角黄素与天然红心蛋中三条红色带没有对应关系。这三条色带的极性强度角黄素, 低于虾青素。

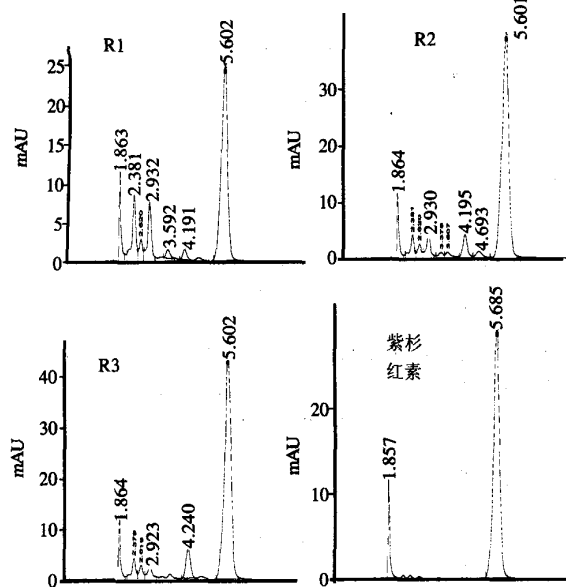
由图 2 可见, 天然红心蛋红色素与紫杉红素之间有很好的对应关系, 并且二者都能被分离出三条红色带。表明二者在薄层板上的性质相同。

2.2 天然红心蛋中红色成分理化性质与定性反应^{[7][13]}

天然红心蛋三条红色带 R1、R2 和 R3 的红色素在氯仿、乙醚、丙酮、乙醇和甲醇中有良好的溶解性，在石油醚、正己烷中的溶解性较差，表明其极性较大，这与薄层的结果相同。R1、R2 和 R3 红色素的乙醚溶液加浓硫酸后呈蓝绿色，其氯仿溶液与三氯化锑-氯仿溶液反应呈蓝色。两项反应为多烯烃类胡萝卜素的特征反应，表明 R1、R2 和 R3 三条红色带物质为类胡萝卜素物质。三条红色带物质的乙醇溶液各与硼氢化钠反应，R1、R2 和 R3 均具有相同的反应，在短时间内失去红色变为黄色。表明三条红色带物质具有可被加氢还原的双键结构。三条红色带物质的石油醚溶液加入 40% 皂化液 (10% 氢氧化钠的甲醇溶液) 处理，紫外-可见吸收没有变化，表明红色物质不是脂肪酸的酯类物质。

2.3 天然红心蛋中红色成分的 HPLC-MS-MS 分析

2.3.1 天然红心蛋中红色成分的 HPLC 保留时间



Agilent 1100series, chromatogram column: Zorbax SB-C18(2.1 × 50mm)
P/W 860975-902, 30℃.

图3 天然红心蛋红色素 R1、R2、R3 及紫杉红素的 HPLC 图谱

Fig.3 The HPLC of R1, R2, R3 of natural red yolk and rhodoxanthin

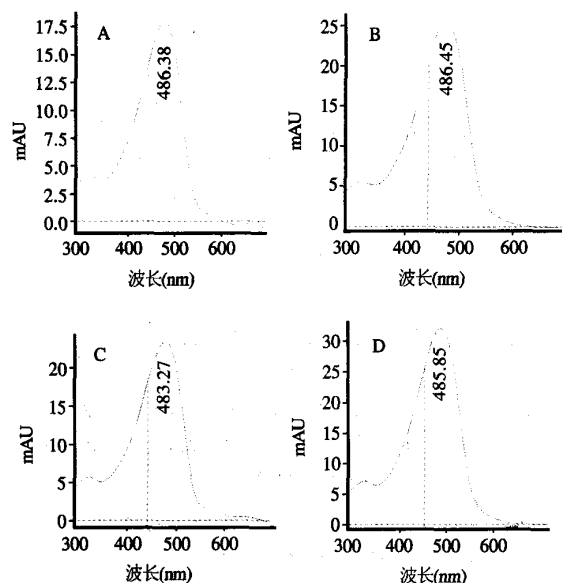
由图 3，三条红色带成分的保留时间分别是 R1 为 5.602min，R2 为 5.601min，R3 为 5.602min，紫杉红素的保留时间为 5.593 min。三条红色带成分 R1、R2、R3 与紫杉红素有较好的时间对应关系，表明三条红色带成分 R1、R2、R3 与紫杉红素具有相同的性质。

2.3.2 天然红心蛋中红色成分的 DAD 扫描图谱特征

三条红色带色素成分及紫杉红素的 DAD 扫描光谱

具有相似的扫描图谱 (见图 4)。R1、R2、R3 与紫杉红素的 DAD 扫描图谱均具有相似的扫描图形，呈单峰，为具有与长烯烃双键形成共轭状态羰基的类胡萝卜素的特征吸收峰，表明三条红色带物质具有相似的与双键共轭的羰基^[13]，红外光谱也显示各条红色带成分含有羰基，不含羟基 (另文发表)。三条红色带在甲醇中的最大吸收分别为 R1-486.38nm，R2-486.45nm，R3-485.27nm，紫杉红素的最高吸收峰为 485.85nm。三条红色带物质 R1、R2、R3 和紫杉红素的最高吸收基本一致。各个峰在靠近紫外区 320~340nm 有一个副峰，表明该物质为全反式类胡萝卜素的顺式异构体^[13,14]。

2.3.3 天然红心蛋中红色成分的 MS 分析



A-R1, B-带 R2, C-R3, D-rhodoxanthin

图4 天然红心蛋红色素 R1、R2、R3 及紫杉红素的 DAD 扫描图谱

Fig.4 The DAD of R1, R2, R3 of natural red yolk and rhodoxanthin

红心蛋红色素的三条红色带 R1、R2、R3 具有相同的 m/z (见图 5)，563 为样品分子加一个氢 $[M+H]^+$ ，585 为 $[M+Na]^+$ ，与紫杉红素的 m/z 一致。因此，三条红色带 R1、R2、R3 均具有与紫杉红素相同的分子量，即 562。

由图 6，在三条色带 R1、R2、R3 及紫杉红素的二级质谱中，都含有几个主要的特征碎片 m/z ，包括 545、507、479、425、359 等，表明红心蛋红色素 R1、R2、R3 与紫杉红素不仅分子量相同，而且基本结构相同^[13]。结果表明红心蛋红色素 R1、R2、R3 为紫杉红素顺式异构体。红心蛋中红色素的分子结构、碎片结构见图 7。各顺式异构体的具体结构有待进一步研究。

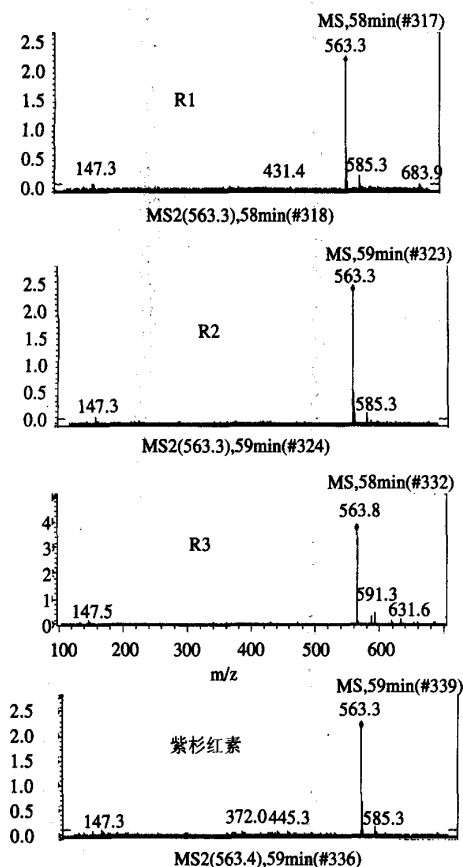
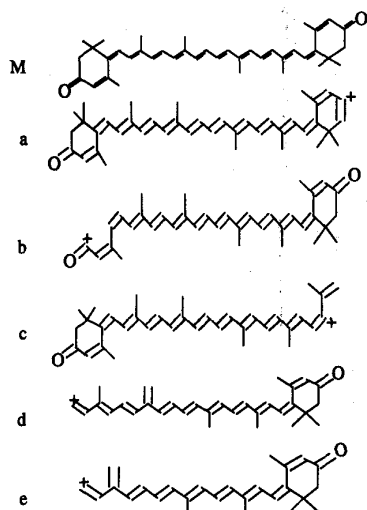


图5 红色带R1、R2、R3及紫杉红素的MS1图谱

Fig.5 The MS1 of R1, R2, R3 of natural red yolk and rhodoxanthin



M: rhodoxanthin, molecular weight 562.

a: 545 [M-18]⁺, b: 507 [M-56]⁺, c: 479 [M-84]⁺, d: 425 [M-138]⁺, e: 359 [M-204]⁺.

图7 不同碎片结构示意图

Fig.7 The configuration of molecular and fragments of red yolk pigments

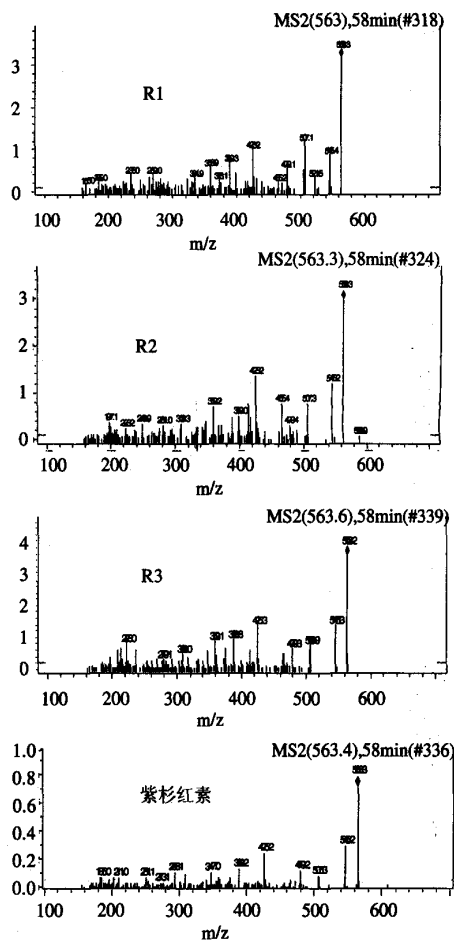


图6 红色带R1、R2、R3及紫杉红素的MS2图谱。

Fig.6 The MS/MS of R1, R2, R3 of natural red yolk and rhodoxanthin

3 结论

首次将天然红心蛋中的红色素成分在硅胶薄层上分离出三条色带。进一步对三条红色带采用化学反应定性, DAD 鉴定发现, 三个红色带物质为含有与双键呈共轭状态羰基的类胡萝卜素。薄层色谱、HPLC、MS1 及 MS2 与紫杉红素的对比鉴定结果表明三个红色带 R1、R2、R3 是分子量为 562 的紫杉红素类胡萝卜素的顺式异构体。

参考文献:

- [1] 博礼敦, Srinonknotes. 饲用类胡萝卜素对鸭蛋着色效率的比较[J]. Feed Abroad, 2000, (14): 18-21.
- [2] W D Williams. Origin and impact on consumer performance for food[J]. Poultry Sci, 1992, 71(3): 744-746.
- [3] Bailey C A, Chen B H. Chromatographic analyses of xanthophylls in egg yolks from laying hens fed turf bermudagrass (Cynodon dactylon) meal[J]. J Food Sci, 1989, 54(3): 584-586, 592.

用 HPLC 测定酶解玉米蛋白氨基酸的组成

周大寨¹, 黄国清², 唐巧玉¹

(1.湖北民族学院生物技术研究所, 湖北 恩施 445000;

2华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 利用高效液相色谱对玉米黄粉蛋白的酶解产物进行氨基酸组成测定, 发现酶解产物中含有大量的 Pro 和 Phe、Leu 等必需氨基酸, 因此可以用作保健食品来补充必须氨基酸和降低高血压患者的血压, 具有广阔的应用前景。

关键词: 玉米黄粉蛋白; 氨基酸; 组成

Study on Amino Acid Constituents in the Enzymatic Hydrolyzates of Corn Gluten Meal by HPLC

ZHOU Da-zhai¹, HUANG Guo-qing², TANG Qiao-yu¹

(1.Research Institute of Bio-technology, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China;

2.College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640,China)

Abstract: With the RP-HPLC, the enzymatic hydrolyzates of corn gluten meal were found to be rich in Pro, Phe and Leu etc. Which were thought to be suitable as healthy food additives to supplement essential AA for easing hypertension.

Key words: corn gluten meal; amino acid; composition

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0179-03

玉米蛋白粉是玉米加工中的副产物, 它是从淀粉乳分离蛋白质时得到的黄浆水, 过滤后得到的不溶于水的蛋白质, 俗称黄粉子。玉米蛋白粉含蛋白质 60% 以上,

有的达到 70%, 其余是 20% 淀粉和 13% 纤维。玉米蛋白粉中主要为玉米醇溶蛋白(zein, 20%)、谷蛋白、球蛋白和白蛋白。由于玉米蛋白粉组成复杂, 口感粗糙, 水溶性特别差, 严重影响了其在食品工业中的应用, 当今国内主要将玉米黄粉用于饲料或者自然排放^[1]。我国每年随废液排走的玉米蛋白质高达 8 万多吨, 既浪费了宝贵的粮食资源, 又造成对环境的污染, 因此, 提高

收稿日期: 2003-11-08

作者简介: 周大寨(1976-), 男, 硕士, 主要从事天然产物研究与开发。

- [4] H Hencken. Chemical and physiological behavior of carotenoids and their effects on pigmentation[J]. Poultry Sci, 1992, 71(3): 711-717.
- [5] 程忠刚, 林映才. 肉鸡皮脂和鸡蛋蛋黄的着色研究进展[J]. 中国饲料, 2001, (4): 5-7.
- [6] A Blanch. International Poultry Production. 1999, 7 (2): 23-25.
- [7] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [8] 李忠. 枸杞子类胡萝卜素化学及抗氧化作用研究[D]. 华中农业大学 1998 届博士学位论文.
- [9] 彭光华. 类胡萝卜素及其抗乳腺癌机理研究—细胞凋亡、细胞间隙连接通讯、基因表达及基因芯片检测[D]. 华中农业大学 2002 届博士学位论文.
- [10] Paola Vitaglione, Simona Monti, Patrizia Ambrosino, et al. Carotenoids from tomatoes inhibit heterocyclic amine formation[J]. European Food Research and Technology, 2002, 215, (2): 108-113.
- [11] 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.
- [12] Britton G. "General Carotenoids Methods" in "Methods in Enzymology (Vol 111) Steroids and Isoprenoids (Part B)" [J]. Academic Press, New York, 1985.
- [13] G Britton, S Liaen-Jensen, H Pfander. Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy[M]. Birkhauser Verlag Basel, 1995. 32-38, 20-26, 290-300.
- [14] Tan B, Soderstrom D N. J Chem Educ, 1989, 66(3): 258.