

黑葵花籽壳中主要花色苷类物质的结构分析

张海悦, 张守媛, 韩升廷

(长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘要: 为确定黑葵花籽壳中主要花色苷类物质的结构, 采用高效液相色谱(HPLC)和高效液相色谱串联四极杆质谱研究黑葵花籽壳中的花色苷类物质, 结果表明: 纯化后的黑葵花籽壳花色苷主要有两种单体, 之后采用纸层析对两种物质进行分离, 再用红外光谱、紫外-可见光谱、Francis的研究结论等方法对两种单体结构初步推测。最后采用高效液相色谱串联四极杆质谱对两种花色苷结构确认为: 花青素-3-*O*-单葡萄糖苷和甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷两种单体。

关键词: 黑葵花籽壳; 色素; 花色苷; 光谱分析; 结构鉴定

Structural Analysis of Major Anthocyanins in Black Sunflower Seed Shell

ZHANG Hai-yue, ZHANG Shou-yuan, HAN Sheng-ting

(College of Chemical and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: The structures of major anthocyanins purified from black sunflower seed shell were analyzed by HPLC and HPLC-tandem quadrupole mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Two major monomers were observed in purified anthocyanins. Both monomers were further separated by paper chromatography (PC). They were identified as cyanidin-3-*O*-monoglucoside and peonidin-3-*O*-monoglucoside, respectively according to the results of infrared spectroscopy (IR), ultraviolet spectroscopy (UV) and Francis studies and HPLC-MS/MS analysis.

Key words: black sunflower seed shell; pigment; anthocyanins; spectroscopic analysis; structure identification

中图分类号: Q946.836

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0118-04

黑葵花籽壳花色苷含量丰富并能够表现出不同的颜色, 且安全无毒, 可被用作天然的食用色素。由于花色苷具有多种生物活性, 因此花色苷可被用作功能食品的基础原料。我国黑葵花籽资源十分丰富, 加工的葵花籽壳废弃物的产量很大。国外文献[1]报道仅限于葵花籽壳色素类物质的提取及稳定性研究, 而对葵花籽壳花色苷类物质的分离纯化及结构鉴定还没有深入的研究。国内对黑葵花籽壳的研究报道少见, 本实验拟采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和高效液相色谱串联四极杆质谱对黑葵花籽壳中主要花色苷结构进行分析, 为今后将其应用到保健食品中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑葵花籽购于吉林省长春市, 品种为“黑老鸽

嘴”, 手工剥皮, 每千克平均籽粒数为7500个, 瓜子壳占总质量的50%, 烘干, 粉碎, 备用。

乙醇、盐酸、甲醇、三氯化铝、三氯化铁、醋酸、正丁醇、异丁醇(分析纯) 天津盛通泰化工有限公司; 乙腈、甲醇(色谱纯)、溴化钾(光谱纯) 山东禹王实业有限公司; AB-8大孔吸附树脂 上海摩速科学器材有限公司; 新华3号滤纸 广州市荔湾区瑞阳化玻仪器经营部。

1.2 仪器与设备

RE52-98旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; FW100高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司; JY3002电子天平 北京赛多利斯仪器有限公司; PC-1000数显式电热恒温水浴锅 上海跃进医疗器械厂; DHG-9070A鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; GL-21LM离心机、Lambda 25紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; ARATVA-360傅里叶红外光谱仪 美国Perkin Elmer

收稿日期: 2012-04-14

作者简介: 张海悦(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品深加工及天然产物提取。E-mail: zhhaiyue@163.com

公司; Agilent1100 高效液相色谱 美国 Agilent 公司; Acquity UPLC/Quattro Premier XE 高效液相色谱串联四极杆质谱 美国 Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备

准确称取 100g 黑葵花籽壳, 先用石油醚脱脂, 之后用 3 倍体积的 50% 乙醇溶液在 60℃ 条件下回流提取 1h, 提取 2 次, 合并滤液, 过滤浓缩。浓缩液经 2 倍体积的无水乙醇萃取, 得萃取液 700mL。后经 AB-8 大孔吸附树脂纯化, 原料液 pH 值为 3, 吸附流速为 3mL/min; 洗脱剂乙醇体积分数为 70%, 洗脱流速为 1.5mL/min, 洗脱量为 300mL, 得到 20g 花色苷纯品^[2]。

1.3.2 HPLC 分析

色谱条件: Hypersil ODS C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5 μm); 流动相: A 为乙腈; B 为 4% 磷酸水溶液, 以体积比为 85:15 等梯度洗脱 7min; 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 530nm; 进样量: 5 μL; 柱温: 25℃。样品经甲醇溶解用 0.45 μm 滤膜过滤。

1.3.3 纸层析

称取纯化后花色苷样品 1g 溶于 1mol/L 盐酸-乙醇溶液, 毛细管分别点样于滤纸条上, 然后置于不同展开剂(异丁醇、醋酸、水体积比 4:1:5(BAW); 醋酸、浓盐酸、水体积比 15:3:82(AHW); 正丁醇、盐酸体积比 1:1(BH))的层析缸中按上行法展开 5h。取出纸条、晾干、观察色斑。根据色斑分离情况, 选择最佳展开剂, 并测定各展开剂系统中的色带在色谱上的 R_f 值与相关文献[3]对照确定物质类型。选择展开效果最佳滤纸条, 剪取带有红色色斑滤纸, 置于 0.1mol/L 盐酸-乙醇溶液溶解 12h, 充分冲洗直至无色, 将得到溶液经 3000r/min 离心 10min, 取上清液经鼓风干燥箱 50℃ 烘干得到分离纯品。

1.3.4 显色反应

取纸层析纯化后黑葵花籽壳花色苷分别进行盐酸-镁粉、三氯化铁、莫立许实验, 初步判断化合物成分^[4-5]。

1.3.5 红外光谱检测

先将溴化钾研成粉末, 称取 200mg 溴化钾粉末与 2mg 纸层析分离后的黑葵花籽壳花色苷样品研细, 使二者充分混匀进行压片, 在 0~4000cm⁻¹ 范围内测其红外吸收光谱^[6-9]。

1.3.6 紫外-可见光谱检测

将纸层析中分离后花色苷样品用 0.1mol/L 盐酸-甲醇液溶解, 在 200~800nm 波长范围内进行扫描, 扫描完之后, 再向比色皿中加入两滴 5mol/L 三氯化铝-甲醇溶液, 搅匀静置 10min, 在相同条件下再次进行扫描,

观察扫描后的吸收峰是否发生变化^[10-11]。

1.3.7 Francis 法测 A_{440nm}/A_{max}

通过测定 A_{440nm}/A_{max} 值来判断其为单一糖苷还是双糖苷, 在 0.1mol/L 盐酸-甲醇溶液中, 单一花色苷(3 位)其 A_{440nm}/A_{max} 值一般大于 20, 而双取代的花色苷(3、5 位)A_{440nm}/A_{max} 值一般为十几, 因此, 通过 A_{440nm}/A_{max} 值可以推断物质在 3 位和 5 位是否带有糖苷键^[12]。

1.3.8 超高效液相串联四极杆质谱检测

1.3.8.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C₁₈(4.6mm × 250mm, 5 μm); 柱温: 30℃; 样品室温: 5℃; 流速: 1.5mL/min; 进样量: 10 μL; 紫外检测波长: 280、520nm。流动相 A、B 分别为乙腈和 5mol/L 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0min 为: 50% A 与 50% B, 3min 内线性变化至 90% A 与 10% B, 保持 2min, 5min 回到 50% A 与 50% B, 平衡 3min。

1.3.8.2 质谱条件

正离子扫描(ESI⁺, m/z100~1000); 干燥气流流速 10L/min, 喷雾器压力 50Pa; 干燥气温 325℃。样品经甲醇溶解, 质量浓度为 50mg/L, 0.45 μm 滤膜过滤后, 上柱检测^[13]。

2 结果与分析

2.1 HPLC 分析

精确称取 0.5mg 纯化后的黑葵花籽壳花色苷样品, 用甲醇溶解并定容至 50mL 容量瓶中, 得待测样品溶液, 浓度为 10mg/L。测得黑葵花籽壳花色苷的高效液相色谱图, 结果如图 1 所示。

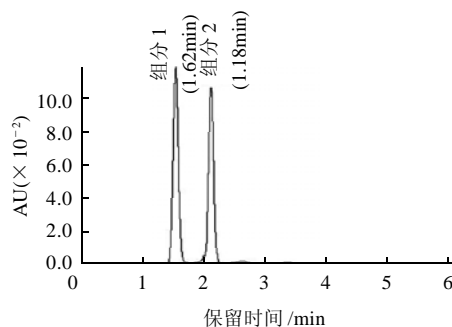


图1 黑葵花籽壳花色苷的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of anthocyanins purified from black sunflower seed shell

由图 1 可以看出, 有两个明显的峰, 可以判定黑葵花籽壳花色苷主要有两种组分, 暂定为组分 1 和组分 2。

2.2 纸层析分析

表1 纯化后的花色苷样品纸层析效果图结果

Table 1 Results obtained for paper chromatographic separation of anthocyanins purified from black sunflower seed shell

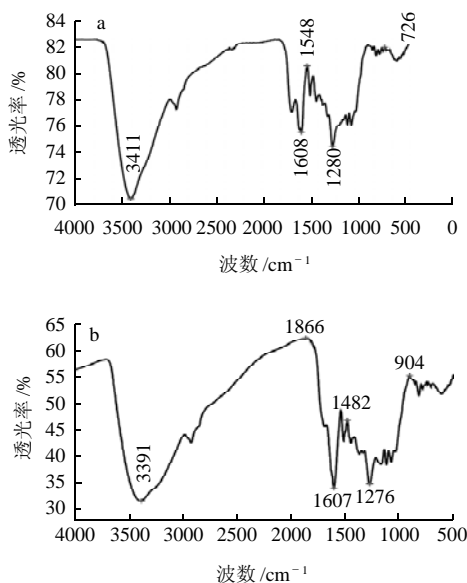
展开剂	展开效果	不同花色苷标准 Rf 值				
		天竺葵色素	矢车菊色素	芍药色素	飞燕草色素	锦葵色素
BAW	出现两个较明显粉红色斑点 (Rf=0.456; Rf=0.468)	0.46	0.48	0.46	—	0.41
AHW	出现一个模糊斑点					
BH	无法展开					

由表1可知,BAW即异丁醇、醋酸、水体积比4:1:5为最佳的展开剂,展开后得到的黑葵花籽壳花色苷为混合物,可能含有两种花色苷单体。分别剪下两个斑点置于0.1mol/L盐酸-乙醇溶液溶解后离心取上清液经鼓风干燥箱烘干得到分离纯品分别为0.3g和0.4g。

2.3 显色反应分析

将纸层析纯化后黑葵花籽壳花色苷样品分别溶于50%乙醇,加入少许镁粉后振荡,加入几滴浓盐酸,溶液产生泡沫,颜色变深;不加镁粉,只加盐酸,无泡沫,表明该物质属黄酮类化合物。加入1mol/L三氯化铁溶液后立即发生褐变^[14],加入几滴奈酚乙醇溶液,混合均匀后,再向溶液中加入少许浓硫酸,静置片刻,溶液中和浓硫酸交界处有紫色的环,溶液层为红色,而浓硫酸层呈现出淡绿色,表明黑葵花籽壳提取物含有糖基与花色苷的显色特征一致。

2.4 红外光谱检测分析



a. 组分1; b. 组分2。

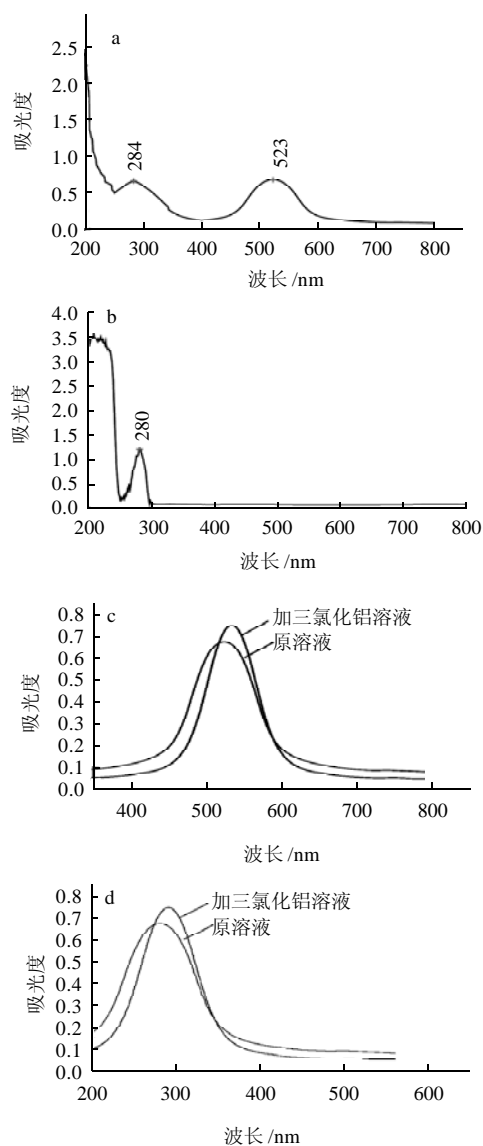
图2 黑葵花籽壳花色苷红外吸收光谱

Fig.2 IR spectra of two anthocyanin fractions

图2a为黑葵花籽壳花色苷组分1的红外光谱,组分1

的主要波数为3411、1608、1548、1280、726 cm^{-1} 。其中3411 cm^{-1} 可能是羟基伸缩振动吸收峰;1608、1548 cm^{-1} 可能是杂环中羰基的振动吸收峰;1280 cm^{-1} 可能是羟基C—O伸缩振动吸收峰,综上所述,组分1主要吸收为苯环、羟基和含氧杂环,可推测为花色苷类物质^[9-10]。图2b为黑葵花籽壳花色苷组分2的红外光谱,组分2的主要波数为3391、1866、1607、1482、1276、904 cm^{-1} 。其中3391 cm^{-1} 可能是羟基伸缩振动吸收峰,1276 cm^{-1} 可能是C—O伸缩振动吸收峰;1607、1482 cm^{-1} 可能是苯环吸收峰,综上所述,组分2主要吸收为苯环、羟基的特征吸收峰^[11]。

2.5 紫外-可见光谱检测分析



a. 组分1; b. 组分2; c. 加入三氯化铝后的组分1; d. 加入三氯化铝后的组分2。

图3 黑葵花籽壳花色苷紫外-可见光谱全波长扫描图

Fig.3 UV-visible spectra of two anthocyanin fractions in the presence and absence of AlCl_3

准确称取纸层析分离后的黑葵花籽壳花色苷样品 0.1g 分别溶于 0.1mol/L 盐酸-甲醇溶液中, 进行紫外全波长扫描, 结果如图 3 所示, 图 3a 为黑葵花籽壳花色苷组分 1 的紫外-可见光谱, 组分 1 在 523nm 处有特征吸收峰, 图 3b 为黑葵花籽壳花色苷组分 2 的紫外-可见光谱, 组分 2 在 280nm 处有特征吸收峰, 可判断两组分均为花色苷类物质。分别向组分 1 和组分 2 溶液中加入 3~5 滴 5mol/L 的三氯化铝-甲醇溶液后, 可见两个组分光区的最大吸收波长均发生移动, 出现红移现象, 说明两个组分花色苷 B 环上均含有两个相邻的羟基。

2.6 Francis 法对 A_{440nm}/A_{max} 分析

根据 Francis 的结论, 对花色苷测其可见光区最大吸收波长的吸光度和波长 440nm 处的吸光度, 再求两个吸光度的比值, 结果见表 2, 黑葵花壳花色苷两种组分的 A_{440nm}/A_{max} 均为 51, 可以判定两种物质均为苯环 3 位糖苷的花色苷衍生物。

表 2 黑葵花籽壳花色苷的 A_{440nm}/A_{max}
Table 2 A_{440nm}/A_{max} of two anthocyanin fractions

项目	组分 1	组分 2
λ_{max}/nm	530	280
A_{max}	1.121	0.302
A_{440nm}	0.567	0.154
A_{440nm}/A_{max}	51	51

2.7 高效液相色谱串联四级杆质谱检测分析

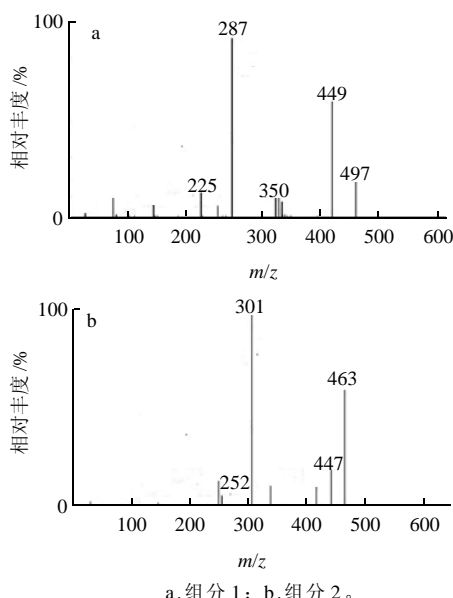


图 4 黑葵花籽壳花色苷的 ESI⁺ 质谱图
Fig.4 Mass spectra of two anthocyanin fractions

将两种物质的具体结构根据质谱的检测进行分析, 质谱图见图 4, 可以看出图 4a 中分子离子峰 $[M]^+$ 为 449, 碎片离子为 m/z 287。 m/z 287 为 $[M]^+ m/z$ 449 失去一个葡萄糖基即葡萄糖的碎片峰 $[M162]^+$, 即矢车菊色素的配基离子峰, 这表明组分 1 为含一个葡萄糖的花青素单葡萄

糖苷^[15]。图 4b 中的分子离子峰 $[M]^+$ 为 463, 碎片离子为 m/z 301。而 m/z 301 表明组分 2 为甲基花青素单葡萄糖苷, 是由 m/z 失去一个质量数为 162 葡萄糖的中性碎片所得, 又根据 Francis 法测糖组成的测定, 为 3 位糖苷的花色苷衍生物^[16]。所以综合以上的检测结果, 组分 1 为花青素-3-*O*-单葡萄糖苷(cyanidin-3-*O*-monoglucoside), 组分 2 为甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷(peonidin-3-*O*-monoglucoside)。

3 结 论

实验采用了高效液相色谱、纸层析、红外光谱、紫外-可见光谱、高效液相色谱串联四级杆质谱等方法对黑葵花籽壳花色苷进行了结构分析, 高效液相色谱证明纯化后的花色苷含有两个组分, 纸层析将两个组分分开得到两种单体, 红外光谱结果显示组分 1 主要波数为 3411、1608、1548、1280、726 cm^{-1} , 组分 2 主要波数为 3391、1866、607、1482、1276、904 cm^{-1} 可判断其为花色苷类物质。紫外-可见光谱扫描结果显示组分一甲醇溶液的最大吸收峰为 523nm, 组分 2 甲醇溶液的最大吸收峰为 280nm, 加入 5mol/L 的三氯化铝甲醇液后两个组分均出现红移现象, 说明花色苷 B 环上含有两个相邻的羟基, 根据 Francis 法的测定, 两个组分的 A_{440nm}/A_{max} 的值均为 51, 因此可以判定该物质为 3 位糖苷的花色苷衍生物。根据超高效液相色谱串联四级杆质谱的检测可以判定这两种花色苷为花青素-3-*O*-单葡萄糖苷和甲基花青素-3-*O*-单葡萄糖苷。实验结果将为黑葵花籽壳花色苷的研究提供理论依据。为黑葵花籽的实际应用开阔了更广阔的前景。

参考文献:

- [1] WANG H, NAIR M, STRASBURG G M, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from tart cherries[J]. J Nar Prod, 1999, 62: 294-296.
- [2] 张海悦, 徐鹤, 王蕾. 黑葵花籽壳红色素的纯化及主要成分结构鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 36-40.
- [3] 李颖物, 马勇, 孟先军. 圣云蓝莓花色苷的组成分析[J]. 分析与检测, 2009, 35(8): 129-131.
- [4] 余华. 玫瑰茄红色素的结构定性研究[J]. 食品添加剂, 2004(7): 55-60.
- [5] 崔倩. 紫马铃薯花色苷的提取纯化和结构鉴定[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [6] 于东, 陈桂星. 花色苷提取、分离纯化及鉴定的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(3): 127-133.
- [7] 王爱晶, 刘晓东. 芍药花色苷的分离及结构初步鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(5): 74-76.
- [8] 李蕊, 王萍, 王振宁, 等. 野生红树莓花色苷的提取分离及成分鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 203-207.
- [9] 姜平, 吕晓玲, 朱惠丽. 花色苷类物质分离鉴定方法[J]. 中国食品添加剂, 2003(4): 108-111.
- [10] 王金亭, 吴广庆, 鞠秀萍. 紫荆花红色素化学结构的初步鉴定[J]. 中国食品添加剂, 2010(2): 97-100.
- [11] 王本晓, 彭向前. 玫瑰花中花色苷的分析方法研究[J]. 食品与药品, 2009, 11(11): 42-44.
- [12] 周艳华, 文赤夫, 马美湖. 樟树果实红色素各单体的定性分析[J]. 食品科技, 2008(8): 161-164.
- [13] 郭红辉, 王庆, 秦玉, 等. 液质联用分析黑米皮提取物中花色苷化合物[J]. 韶关学院学报, 2007(9): 77-80.
- [14] 李蕊. 野生浆果花色苷提取纯化、结构鉴定及体外抗氧化活性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [15] 杜琪珍, 姜华. 杨梅中主要花色苷的组成与结构[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(8): 38-51.
- [16] 樊金玲, 朱文学, 沈君卫. 高效液相色谱-电喷雾质谱法分析牡丹花中花色苷类化合物[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 367-371.