

圣云蓝莓果中锦葵色素-3-半乳糖苷的结构鉴定

李颖畅¹, 吕春茂², 孟宪军², 马 勇¹, 冯彦博¹

(1.渤海大学生物与食品科学学院, 辽宁 锦州 121000; 2.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 采用体积分数 60% (pH 3.0) 的乙醇在恒温水浴(40℃)条件下提取圣云蓝莓花色苷, 将所得浓缩液经 AB-8 大孔树脂纯化, 40℃减压浓缩, 真空干燥得到紫黑色粉末, 再经过制备型高效液相色谱分离获得单体化合物。经紫外光谱、红外光谱、质谱、¹H 和 ¹³C 核磁共振、薄层色谱对单体化合物进行结构鉴定, 确定此化合物为锦葵色素-3-半乳糖苷。

关键词: 圣云蓝莓果; 结构鉴定; 锦葵色素-3-半乳糖苷

Structural Identification of Malvidin-3-galactoside from St. Cloud Blueberry Fruits

LI Ying-chang¹, LÜ Chun-mao², MENG Xian-jun², MA Yong¹, FENG Yan-bo¹

(1.College of Biology and Food Science, Bohai University, Jinzhou 121000, China;

2.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The anthocyanins in St. cloud blueberry fruits were extracted with 60% ethanol (pH 3.0) at 40 °C and the extract was concentrated, followed by purification with AB-8 macroporous resin and vacuum drying, to obtain a dark purple powder. A monomeric compound was isolated from the powder by preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) and identified as malvidin-3-arabinoside by ultraviolet-visible, infrared, mass and nuclear magnetic resource spectroscopy as well as thin layer chromatography. This indicates that St. cloud blueberry fruits are exploitable for further development.

Key words: St. cloud blueberry fruits; structural identification; malvidin-3-galactoside

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)23-0014-04

蓝莓属于杜鹃花科(Ericaceae)越橘属(*Vaccinium*. SPP)多年生落叶或常绿灌木^[1]。圣云蓝莓属于半高丛品种, 果实扁圆形, 呈蓝色, 过熟时呈蓝黑色, 果粉较少, 果肉细腻, 种子极小, 果实可溶性固形物含量 12.4%。蓝莓果中含有丰富花色苷类物质, 花色苷对人体健康有益, 具有多种生物活性, 如抗氧化及清除自由基作用、抗突变活性、抗癌活性、抗炎及抗病毒效果, 具有广阔的应用前景^[1-4]。花色苷单体种类很多, 但应用在食品中的主要有天竺葵色素、矢车菊色素、飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色苷和锦葵色素与葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖各自结合形成的花色苷, 且多为单糖和双糖苷。人们对不同植物所含花色苷的种类、结构的研究报道较多, 其分离鉴定的方法也有许多种, 如纸层析法分离花色苷元^[5]、花色苷的光谱鉴定法^[6]。高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)在目前花色苷鉴定中应用最为广泛^[7], Zhang 等^[8]利用 HPLC-MS 联用的方法鉴定了荔枝皮中的花色苷, 此法克服了 HPLC 法缺少标准品的缺陷, 大大

提高了花色苷鉴定的准确性。有关圣云蓝莓花色苷单体的化学结构研究国内外尚未见报道, 为了进一步开发利用圣云蓝莓, 本实验对圣云蓝莓的主要花色苷单体进行分离和结构鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

圣云蓝莓果由沈阳市双翼果业生产示范基地提供。

无水乙醇、柠檬酸、柠檬酸钠、甲酸、三氯化铝(均为分析纯)、甲醇(色谱纯) 迪马公司; AB-8 大孔树脂 天津南开大学化工厂; 自制超纯水。

1.2 仪器与设备

UV-1600 型紫外-可见分光光度计 北京瑞利分析仪器有限公司; PHS-25 型酸度计 上海理达仪器厂; 电热恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; RE-52 型旋转蒸发器 上海博通经贸有限公司; SHZ-IIIB 型循环水真空泵 上海华琦科学仪器有限公司; 玻璃层析柱(1cm × 30cm)

收稿日期: 2010-01-19

基金项目: 沈阳市青年人才计划项目(1081240-1-02)

作者简介: 李颖畅(1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物功效成分。E-mail: liyingchangsy@126.com

上海青浦沪西仪器厂; DZF-6050 型真空干燥箱 上海精宏仪器设备有限公司; 制备型高效液相色谱仪、质谱仪 美国 Agilent 公司; 红外光谱仪 日本岛津公司; 电子分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; Avatar330 型核磁共振仪 美国 Nicolet 公司。

1.3 方法

1.3.1 圣云蓝莓样品的制备

将一定量圣云蓝莓果, 破碎, 用 pH3.0 的 60% 乙醇溶液按 1:15(m/V) 的比例混合均匀, 于 40℃ 下浸提 2h 后抽滤, 收集滤液, 40℃ 减压浓缩得到红色黏稠粗提液。经 AB-8 大孔树脂纯化, 40℃ 减压浓缩得到纯化的蓝莓花色苷浓缩液, 真空干燥得到紫黑色粉末。

1.3.2 圣云蓝莓花色苷单体制备

通过制备型反相高效液相色谱对圣云蓝莓样品分离, 流动相为 30% 甲醇水溶液(含 2.0% 的甲酸), 梯度洗脱, 流速为 10 mL/min, 制备单体化合物。

1.3.3 圣云蓝莓花色苷单体化合物结构鉴定

1.3.3.1 紫外-可见光谱分析

把蓝莓花色苷单体化合物样品用 0.1% 盐酸甲醇溶液溶解, 并用 0.1% 盐酸甲醇溶液做参比, 用 UV1600 紫外-可见分光光度计从 250~700 nm 扫描, 得到蓝莓花色苷的紫外-可见光谱图。在蓝莓花色苷甲醇溶液中加入 AlCl_3 , 观察最大吸收波长是否发生位移。

1.3.3.2 红外光谱分析

取少量蓝莓花色苷单体化合物样品置于玛瑙研钵中, 再加适量 KBr 粉末作为载体, 研磨后, 放入压片模具中, 加压, 3 min 后取出样品, 放入仪器的样品槽中, 用红外光谱仪扫描, 得到单体化合物的红外光谱图。

1.3.3.3 高效液相色谱-质谱法

(1) 样品处理

将真空干燥的圣云蓝莓样品, 用含 0.1% 盐酸的 50% 甲醇溶液溶解, 配制成质量浓度为 2.5 mg/mL 的溶液, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 收集滤液。

(2) 分析条件

Agilent1100 型高效液相色谱仪, 紫外检测器, 波长: 520 nm; 流动相: A 甲醇, B 2.5% 甲酸水溶液; 分离柱: C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)。流速为 1 mL/min, 温度 30℃, 梯度洗脱程序为: 0~8 min, 5%~20% A, 95%~80% B; 8~15 min, 20%~50% A, 80%~50% B; 15~20 min, 50% A, 50% B; 20~20.01 min, 50%~5% A, 50%~95% B; 20.01~25 min, 5% A, 95% B。

(3) 质谱分析

质谱条件为毛细管电流: 55 nA, 电压: 3200 V; 雾化压力: $2.76 \times 10^5 \text{ Pa}$; 离子稳定强度 100%, N_2 流

速 9.0 mL/min, 扫描范围为 50~1000 u。

1.3.3.4 核磁共振分析

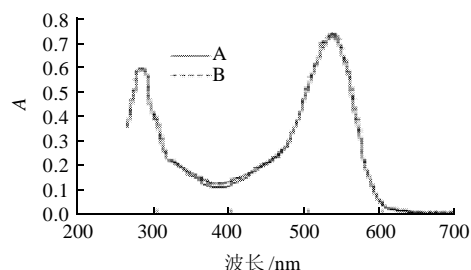
分别将样品用氘代甲醇溶解, 采用核磁共振仪作氢谱和碳谱分析, 以氘代甲醇为内标。

1.3.3.5 蓝莓花色苷的糖组成测定^[9]

将纯化的圣云蓝莓花色苷单体溶于 3 mol/L 的 HCl 中, 在 100℃ 条件下回流水解 4~5 h, 得到棕色溶液, 用正戊醇萃取至水层无色, 将水层浓缩, 得到糖的浓缩液, 用薄层层析鉴定糖的组成。配制木糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、果糖标准溶液, 质量浓度为 1 mg/mL, 配制一定质量浓度的花色苷单体水解后的糖溶液, 在距活化过的薄层板下端 1.5 cm 点样, 点间距 1.5~2 cm。将点好样品的薄层层析板置于盛有展开剂的层析缸中, 密封式展开, 展开剂距薄层上端 1 cm 时取出, 展开剂为氯仿:冰乙酸:水体积比为 30:35:5。将展开过的薄层层析板以吹风机吹干, 将显色剂(苯胺-二苯胺-磷酸)均匀喷洒在薄层层析板上, 此板在 100℃ 烘烤 10 min 即可显色, 薄层显色后, 将样品图谱与标准图谱比较, 确定样品中糖的组成。

2 结果与分析

2.1 紫外-可见吸收光谱



A. 加入 AlCl_3 前吸收光谱图; B. 加入 AlCl_3 后吸收光谱图。

图1 圣云蓝莓花色苷单体化合物的紫外-可见光谱图

Fig.1 Ultraviolet-visible spectrum of monomeric compound

根据花色苷结构的不同, 在可见区最大吸收峰的位置有很大差异。由图1可知, 圣云蓝莓花色苷单体化合物在甲醇溶液的特征吸收波长分别在 279、535 nm 左右; 在 300~330 nm 间没有吸收峰, 说明花色苷分子内没有酰基; 向其甲醇溶液中加入 AlCl_3 , 可见区的最大吸收峰未向长波方向移动, 说明此花色苷 B- 环无邻位酚羟基, 因此单体化合物不可能是矢车菊素、牵牛花色素或飞燕草色素。这一表现与锦葵类花色素的特征吸收相一致^[10]。由此可初步推断其成分可能属于锦葵类化合物。

2.2 红外光谱图分析

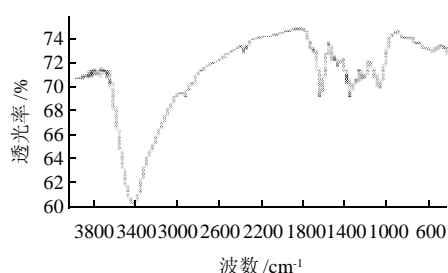


图2 圣云蓝莓花色苷单体化合物的红外光谱图
Fig.2 Infrared spectrum of monomeric compound

由图2可知, 圣云蓝莓花色苷单体化合物的主要吸收峰有3425.273、2928.325、1637.583、1595.046、1515.056、1460.647、1383.8051、1346.255、1205.691、1111.701、1068.425 cm^{-1} 。根据图2峰的位置和形状, 并结合参考文献[10-12]分析确定, 3425.273 cm^{-1} 是一OH伸缩振动吸收峰, 2928.325 cm^{-1} 是甲氧基C—H伸缩振动吸收峰, 1383.805、1346.255 cm^{-1} , 可能是甲氧基C—H面内弯曲振动吸收峰, 1637.583 cm^{-1} 可能是C=O键伸缩振动吸收峰, 1595.046、1515.056、1460.647 cm^{-1} 可能是芳烃骨架C=C键伸缩振动吸收峰; 1205.691 cm^{-1} 可能是羟基上的C—O伸缩振动吸收峰; 1111.701、1068.425 cm^{-1} 可能是C—O—C伸缩振动吸收峰。以上这些都是花色苷的特征吸收峰, 可见此花色苷单体中有苯环、羟基、含氧杂环和甲氧基的特征基团, 这些基团也是黄酮类化合物的特征基团, 可见此花色苷单体化合物属于黄酮类物质。

2.3 高效液相色谱-质谱分析

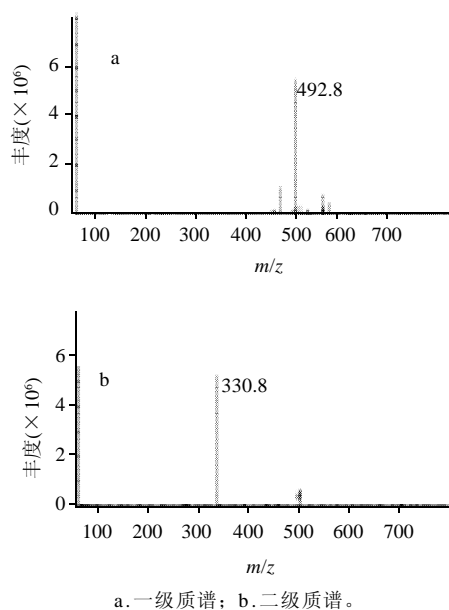


图3 圣云蓝莓花色苷单体化合物的一级、二级质谱图
Fig.3 [MS]/[MS²] spectrum of monomeric compound

由图3可知, 圣云蓝莓花色苷单体化合物的保留时

间为7.5min, 峰面积百分比为96.23%。可以看出此物质已经达到所需的纯度要求。由分子离子峰为492.8(即493)和子离子峰330.8(331)可知, [MS/MS²] m/z 331.0为花色苷脱掉糖残基后的碎片峰, 即锦葵色素配基离子峰, 493与331相差162, 正好是一个半乳糖或葡萄糖去掉一个 H_2O 之后的相对分子质量, 确定连接的糖为半乳糖或葡萄糖, 因此, 此花色苷单体为锦葵色素的半乳糖苷或葡萄糖苷。

2.4 核磁共振谱图分析

¹H-NMR: 8.9056(s, 4H)、7.5506(d, 6H)、7.8960(d, 8H)、6.9052(d, 2'H)、6.8386(d, 5'H)、3.9758(s, CH_3)、6.6116(d, 1'H)、3.8508(d, 2''H)、3.6637(m, 3''H)、3.5716(t, 4''H)。

¹³C-NMR: 163.24(C2)、145.61(C3)、157.47(C5)、168.67(C7)、159.00(C9)、122.95(C1')、149.49(C3', C5')、110.41(C2', C6')、136.60(C4')、56.43($-\text{CH}_3$)、110.41(C1'')、75.01(C2'')、77.77(C3'')、71.33(C4'')、78.80(C5'')、62.30(C6'')。

2.5 糖的组成分析

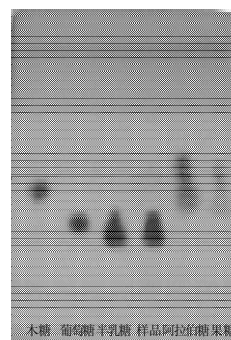


图4 圣云蓝莓花色苷单体化合物糖组成薄层色谱图
Fig.4 Thin-layer chromatographic pattern showing the soluble sugar composition of monomeric compound

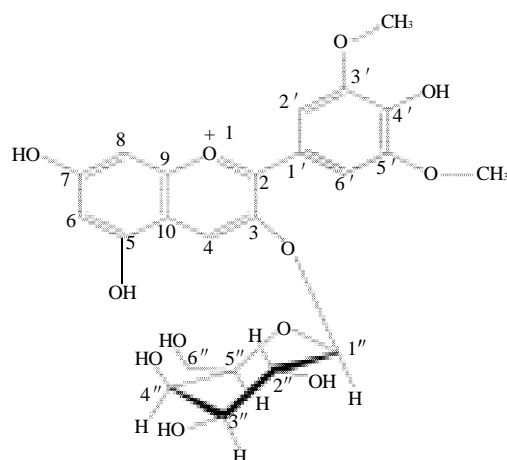


图5 锦葵色素-3-半乳糖苷结构图
Fig.5 Chemical structure of monomeric compound malvidin-3-galactoside

由图4可知,薄层色谱中从左到右各单糖依次为木糖、葡萄糖、半乳糖、样品、阿拉伯糖、果糖。通过样品和其他单糖标准品对比可以看出,圣云蓝莓花色苷单体化合物中主要是半乳糖。

综合紫外-可见光谱、红外光谱、质谱、核磁共振、糖薄层色谱分析,推断单体化合物的主要成分为锦葵色素-3-半乳糖苷,结构见图5。

3 结 论

采用制备型高效液相色谱对大孔树脂纯化后的圣云蓝莓花色苷进行分离,获得圣云蓝莓花色苷单体化合物。通过紫外-可见光谱、红外光谱、高效液相色谱-质谱、核磁共振、薄层色谱等方法对圣云蓝莓花色苷单体进行鉴定,确定此圣云蓝莓花色苷单体为锦葵色素-3-半乳糖苷。圣云蓝莓果实红色素主要成分的鉴定对圣云蓝莓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] 凌美庭. 可供开发食品添加剂(IX): 兰莓提取物及其抗氧化作用[J].

粮食与油脂, 2003(6): 45-48.

- [2] 刘海广, 李亚东, 张志东, 等. 抗寒蓝莓品种“圣云”引种试栽研究[J]. 北方园艺, 2006(3): 123-125.
- [3] LAU F C, HALE S B, JOAEPH J A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging[J]. *Neuro Aging*, 2005, 26(1): 128-132.
- [4] YI Weiguang, FISHER J, KREWER G, et al. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and apoptosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(18): 7320-7329.
- [5] 赵昶灵, 郭维明, 陈俊愉. 梅花“南京红须”花色色素花色苷的分离与结构鉴定[J]. 林业科学, 2006, 42(1): 29-36.
- [6] 徐渊金, 杜琪珍. 花色苷分离鉴定方法及其生物活性[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 67-72.
- [7] TERASAWA N, SAOTOME A, TACHIMURA Y, et al. Identification and some properties of anthocyanin isolated from Zuiki, Stalk of *Colocasia esculenta*[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(10): 4154-4159.
- [8] ZHANG Zhaoqi, QUN Pang xue, YANG Chong, et al. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp[J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(4): 601-604.
- [9] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 102-105.
- [10] 姜平平, 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.
- [11] 朱明华. 仪器分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 294-303.
- [12] 黄蕊婷, 刘剑秋, 彭奇. 黄瑞木果实红色素的分离及其化学结构研究[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(1): 31-34.