

柚皮色素中活性物质的分离及鉴定

李巧玲¹, 李琳²

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 华南理工大学食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 对初提柚皮色素用聚酰胺柱层析和吉尔森制备型高效液相色谱进行分离和纯化, 再通过紫外光谱、红外光谱和 GC/MS 鉴定。结果表明, 着色力最好的物质是 5-羟基-3-羧基吲哚, 它为红褐色颗粒状结晶。这是从柚皮中分离得到的一种新天然食用色素成分, 可能具有一定的生理活性。

关键词: 柚皮色素; 活性物质; 分离; 鉴定

中图分类号: O 657 **文献标识码:** A

文章编号: 0367-6358(2004)08-0410-03

Isolation and Structure Identification of Active Substance in Pomeelo Peel Pigment

L IQ iao-ling¹, L IL in²

(1. College of Biology Science & Engineering, Hebei University of Science & Technology, Hebei Shijiazhuang 050018, China;

2. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangdong Guangzhou 510640, China)

Abstract: The raw extracted product of pomeelo peel pigment (PPP) contains many impurities, and is easily degraded. Therefore, it was isolated and purified by polyamide column chromatography using a Gilson auto-preparative HPLC system. The results showed substance B is the best in tinting strength for food. The structure of substance B was identified by GC/MS technique, IR and UV spectroscopy. It was found that B is a new compound from pomeelo peel 5-hydroxy-3-carboxy-1H-indole. It forms red-brown crystallines. The compound is good in coloring and might have some physiological activities.

Key words: peel pigment; active substance; isolation; structure identification

柚树属于芸香科, 柑桔属, 柑桔类中的柚种类。我国是柚树的故乡, 不仅品种多, 资源丰富, 而且亚热带地域辽阔, 气候温和, 雨量适中, 特别适合柚树的生长。柚皮约占整个柚子重量的 40% 左右。它不仅色泽鲜艳, 而且还是一种珍贵中药材, 可加工制成蜜饯, 即所谓药食同源, 安全性高, 从柚皮中提取高附加值物质引起了世界各国的重视。但是, 从柚皮中提取色素的文献并不多见, 且提取效率低, 产物易发霉、变质。本文通过微波辐射使果皮细胞改性的方法, 从柚皮中提取色素的新工艺, 目的是变废为宝, 综合利用现有的植物资源。

笔者在研究中发现, 柚皮色素的粗提物着色力好, 性质较稳定; 微波浸取与传统加热提取的柚皮色素相比, 纯度较高, 保持期有所延长, 但由于粗提物中仍含杂质, 还是容易发霉变质。因此, 本文对水提柚皮色素进行了分离、纯化, 其目的是从中筛选出着色力强的活性成分, 今后为其在食品工业中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料: 水提柚皮色素的粗提物;

仪器设备: RE52 型旋转蒸发仪, HL-5 型恒流

收稿日期: 2004-01-19; 修回日期: 2004-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29876013)

作者简介: 李巧玲(1973~), 女, 河北省阜城县人, 博士, 副教授, 主要从事微波加热技术及生物活性成分的提取。

泵, 聚酰胺层析柱($\phi 5\text{ mm} \times 600\text{ mm}$), 硅胶薄层层析板, 722 型分光光度计, HP 6890/5973 型 GC/MS 联用仪, 吉尔森制备型高效液相色谱 (Gilson auto-preparative HPLC system), 756MC 型紫外可见分光光度计, M A GNA -760 型付里叶变换红外光谱仪。

1.2 实验方法

将水提柚皮色素的粗提物在 45℃ 以下真空浓缩后, 缓缓加入到聚酰胺层析柱中, 以不同比例的水-乙醇溶液洗脱后, 再用 0.1 mol/L 的氢氧化钠进行洗脱, 得到各洗脱物; 通过比色法和硅胶薄层层析检测并合并这些洗脱物, 得到不同的组分; 用 722 型分光光度计测得不同组分的吸光度, 从中筛选出着色力最强的组分; 对着色力最强的组分用制备色谱进一步分离得到较纯净的化合物, 从中筛选出着色力最好的物质; 通过紫外光谱、红外光谱并结合 GC/MS 联用, 鉴定出这种物质的化学结构; 结合与其结构相似的物质对这种物质的应用及生理活性进行推测。

2 结果与讨论

2.1 柚皮色素的初步分离与合并

初提柚皮色素经聚酰胺层析柱初步分离后, 得到 31 个洗脱物。取适量柱层析后的各洗脱物, 稀释后在不同波长下测其吸光度值, 通过比较其光谱图的特征, 并结合硅胶薄层层析的情况, 对各洗脱物进行合并, 得到 5 个组分, 对合并后的 5 个组分, 在 410nm 下^[1], 测其吸光度, 结果如表 1 所示。由表 1 可以看出, 组分 3 的着色力最强。

表 1 洗脱物合并后与组分的吸光度

组分号	吸光度
1	0.112
2	0.081
3	0.375
4	0.235
5	0.072

2.2 气质联用 (GC/MS) 对组分 3 的分析

图 1 是组分 3 的 GC/MS 图, 利用仪器所配制的谱库进行检索, 并结合人工解析, 以质谱图中各组分的分子离子峰、基峰以及碎片离子峰的 m/z 值及其丰度作为判据, 共鉴定出 6 个成分, 其相对含量用计算机峰面积归一化法测得如表 2 所列, 其中在保留时间为 7.200 min 处有一相对含量最高的物质, 这种物质是 5-羟基-3-羧基吲哚。

从发色团和助色团的角度来看, 表 2 中保留时间为 5.322、7.200 和 7.810 min 的三种物质都可能

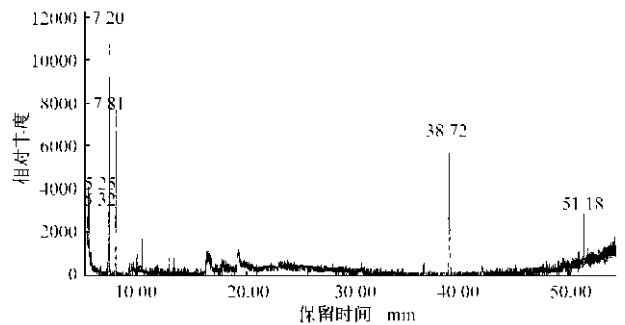


图 1 组分 3 的 GC/MS 谱图

表 2 3 中物质的组成及相对含量

化合物(相对分子质量)	保留时间 /min	面积	含量/%	相对含量/%
3-羧基丁酸丙酯(144)	5.253	67569	5.647	16.258
2,3-吡嗪吡啶(131)	5.322	98626	8.242	23.731
5-羟基-3-羧基吲哚(177)	7.200	415606	34.731	100.000
2-硫羧基-4-羧基-3-噻唑乙酸(191)	7.810	239954	20.052	57.736
邻苯二甲酸丁酯(278)	38.720	288304	24.093	69.370
邻苯二甲酸异辛酯(390)	51.180	86579	7.235	20.832

是有颜色的, 应该是主要物质。为了找出色素中起主要作用的物质, 有必要对组分 3 中的成份进一步进行分离鉴定。

2.3 制备色谱对组分 3 的分离和测定

用制备色谱对组分 3 进一步进行分离, 得到 6 种物质, 由于有一种物质几乎没有颜色, 因此对其没有进一步研究。取有颜色的 5 种物质 (A、B、C、D、E) 进行比色分析, 其结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出, B 的吸光度在这五种物质中是最大的, 最大吸收波长是 410 nm, 这说明柚皮色素中着色力最强的应该是此种物质。

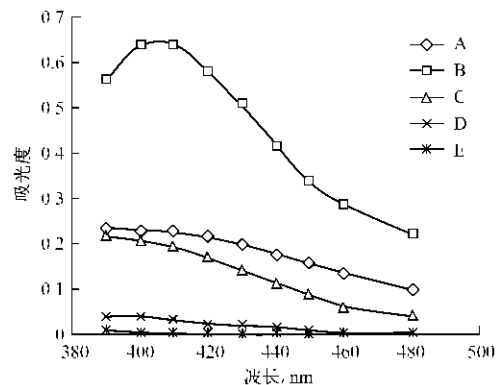


图 2 5 种物质的吸光度值与波长的关系

2.4 紫外光谱和红外光谱对 B 物质化学结构的鉴定

2.4.1 紫外光谱测定

取浓缩后的样品 B 用甲醇进行稀释, 使样品浓度在 10^{-5} mol/L 左右。在 200~ 800 nm 范围内扫

描。其光谱图如图 3 所示。

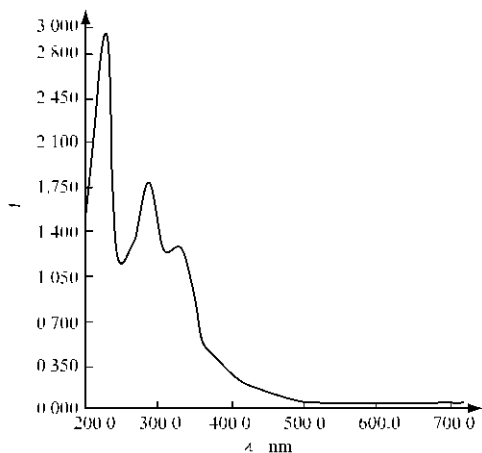


图 3 化合物 B 的紫外光谱

由图 3 可看出, B 物质的紫外光谱在 225 nm、287 nm 和 328 nm 处有最大吸收。一些文献证明, 吲哚生物碱的光谱特征比较显著, 并随取代基而改变, 因此对鉴定吲哚类结构极为有用^[2]。无取代的吲哚环通常呈现三个吸收带, $\lambda_{max} \sim 226, \sim 280$ 及 ~ 290 nm, 后者一般呈肩峰, 但很有鉴别作用, 芳环取代能使长波带向长波移动, 移动的程度决定于取代基的数目及位置, 衍生吲哚环的生色体系, 能使吸收带向长波移动^[3]。例如 2-酰基吲哚生物碱, 其紫外光谱呈现两个特征吸收带, $\lambda_{max} 237 \sim 240$ nm 及 $312 \sim 320$ nm。在这类生物碱中, 如吲哚 N 原子甲基化, 紫外光谱基本不变, 但芳环被甲基取代后, 影响吸收带的位置, 影响的程度决定于取代基的位置^[3]。综合以上信息可以判定, B 物质很可能是吲哚类型的衍生物。

2.4.2 红外光谱测定

取真空浓缩过的样品 B, 加入已在 120 °C 烘箱中烘干的溴化钾粉末中, 充分磨细、混匀、装模, 将装好样品粉末的模具置于压片机上抽真空 2 min, 然后加压至 900 MPa, 受压 10 min, 把样品压制成 0.1~1.0 mm 厚的晶片, 然后将晶片置于红外光谱仪的样品光路中, 记录其红外吸收光谱(如图 4 所示)。

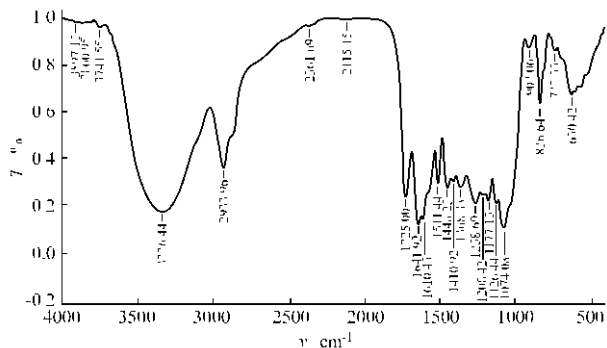


图 4 化合物 B 的红外光谱

从 IR 谱来看, 化合物 B 应该具有以下结构

(1) 含有-OH 和-NH 结构

红外光谱图显示, 样品在 2900~ 3350 cm^{-1} 附近都存在较强的共振吸收峰, 是由 O-H 和吲哚的 N-H 伸缩振动引起的。一些文献证明, 虽然 ν_{OH} 峰波数比 ν_{NH} 峰稍高, 但是缔合羟基峰移向低波数, 易与 N-H 峰重叠, 不过峰形变宽^[4], 所以初步判断此化合物中可能存在羟基氢键的缔合形式。

(2) 含有-COOH 结构

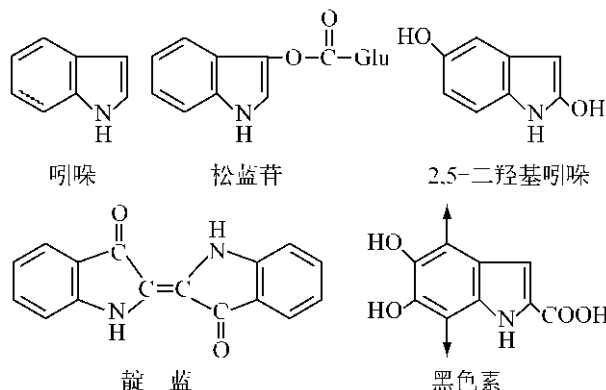
在 1725 cm^{-1} 处有羧酸中 $\nu_{C=O}$ 的伸缩振动较强吸收峰, 同时在 2933 cm^{-1} 处有一个羧基借助氢键形成的 ν_{OH} 的伸缩振动吸收峰, 在 1410 cm^{-1} 处附近有 δ_{OH} 面内弯曲振动峰, 在 908 cm^{-1} 处有 ν_{OH} 面外弯曲振动峰和 1258 cm^{-1} 处的羧基 C-O 单键的伸缩振动峰, 由以上数据推断出, B 化合物中含有 -COOH 结构。

综合紫外光谱和红外光谱以及前面的 GC/MS 联用等谱图可以推断出, B 物质是 5-羟基-3-羧基吲哚, 它在柚皮色素中含量是最高的。此物质为红褐色颗粒状结晶。

2.5 5-羟基-3-羧基吲哚的应用及生理活性推断

吲哚类生物碱是由生物体内色氨酸经脱羧、缩合或环化而形成的活性物质, 这一类生物碱已超过 1000 多种, 并具有多种多样的生理活性。它们有的结构非常复杂, 但有些却很简单, 如松蓝苷。而靛蓝相对来说结构较复杂。这两种物质都是很好的染料。

在医药方面, 也已经发现了一些与本结构相似的吲哚类生物碱。李彬^[5]等曾首次从板蓝根中提出一种棕色颗粒状结晶, 2, 5-二羟基吲哚; 王岩^[6]等通过对香蕉皮黑色素、葵花籽皮黑色素及黑芝麻色素进行红外光谱分析表明, 它们中都含有一种吲哚型的物质, 这种物质在动植物体内具有防御、保护功能, 在人体中亦参与许多生理、病理活动, 如它具有滋补、养生、抗衰老等方面的功效。以上提到的几种物质的化学结构如下:



(下转第 409 页)

第一振荡周期的反应级数为 2.7793, 即 $\frac{1}{t_{p,1}} = k$

$c_0^{2.7793}$; 第二振荡周期的反应级数 3.665, 即 $\frac{1}{t_{p,2}} = k$

$c_0^{3.665}$ ($k = kc_1^a c_2^b c_3^c c_4^d$)。

2.3 不同温度对含穿心莲溶液的振荡体系的影响

从表 2 中可以看出, 浓度相同的条件下, 随着温度的升高, 各体系的诱导期缩短, 周期变短, 振幅与寿命也相应变短。

根据表 2 中的数据, 以 $\ln \frac{1}{t}$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图, 可以由计算机拟合计算得到穿心莲溶液振荡反应的表现活化能, 结果为: 诱导期的表现活化能 $E_m = 86.507$ kJ/mol, $r = 0.9975$ 即 $\ln \frac{1}{t_m} = \frac{-10405}{T}$; 第一振荡周期的表现活化能 $E_{p,1} = 97.191$ kJ/mol, $r = 0.9976$, 即 $\ln \frac{1}{t_{p,1}} = \frac{-11690}{T}$; 第二振荡周期的表现活化能 $E_{p,2} = 81.869$ kJ/mol, $r = 0.9942$, 即 $\ln \frac{1}{t_{p,2}} = \frac{-9847.1}{T}$ 。

由上述结果可以得到在不同浓度、不同温度下, 穿心莲振荡反应体系的诱导期和振荡周期与浓度和表现活化能的关系如下:

$$\frac{1}{t_m} = c_0^{3.0786} \cdot \exp\left(\frac{-10405}{T}\right); \frac{1}{t_{p,1}} = c_0^{2.7793} \cdot \exp\left(\frac{-11690}{T}\right);$$

$$\frac{1}{t_{p,2}} = c_0^{3.6650} \cdot \exp\left(\frac{-9847.1}{T}\right)$$

(上接第 412 页)

由于作者所提出的物质的结构和以上物质的结构比较接近, 并且着色力较强, 因此可以推断它是一种着色力较好的天然色素成分, 它在生理活性方面的作用, 有待于进一步探索。

参考文献

- [1] 李巧玲. 微波辐射下柚皮中天然食用色素的浸取[博士学位论文][D]. 广州: 华南理工大学, 2001.
- [2] 黄量, 于德泉. 紫外光谱在有机化学中的应用(上册)

3 结论

由图 1~ 图 4 及表 1, 表 2, 可以看出, 温度、穿心莲浓度直接影响着振荡体系。在相同温度下, 一定的浓度范围内, 随着草药浓度的增加, 各振荡体系均呈现良好的振荡行为, 浓度高, 振荡周期短, 浓度低, 振荡周期长。在低温时振荡寿命长, 高温时, 振荡寿命短。

以上结果可以为中药的开发和应用提供一定的依据。

参考文献

- [1] 孙尔康, 徐维清, 邱金恒. 物理化学实验[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [2] 原春兰, 李宗孝, 王见朝. 氨基酸-BiO₃·Mn²⁺·H₂SO₄-丙酮体系的振荡反应[J]. 物理化学学报, 1994, 10(1): 87-91.
- [3] 陶庭先, 吴之传, 王胜, 等. 氨基乙酸-溴酸钾-硫酸锰-硫酸-丙酮的 B-Z 振荡反应[J]. 安徽电机学院学报, 2002, 17(1): 49-53.
- [4] Zhang H L, Yu X F, Lu C X, et al. Microcalorimetric study on the oscillating system of two-phase reaction of aqueous acid with primary amine in chloroform [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2003, 21(1): 36-39.
- [5] Zhang H L, Yu X F, Lu X Y, et al. Microcalorimetric study of the oscillating extraction system [J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2002, 68: 931-936.
- [6] 李宗孝, 原春兰. 七种草药振荡反应研究[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2000, 20(2): 110-113.

[M]. 北京: 科学出版社, 1988, 192.

- [3] 黄量, 于德泉. 紫外光谱在有机化学中的应用(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1988, 132-149.
- [4] 谢昌曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 82.
- [5] 李彬, 陈万生, 郑水庆, 等. 四倍体板蓝根中的两个新生物碱[J]. 药学学报, 2000, 35(7): 508-510.
- [6] 王岩, 刘学惠, 陆懋荪, 等. 几种天然黑色素分子结构的红外光谱表征研究[J]. 分析试验室, 1996, 15(6): 63-65.