

玉米紫色植株色素主要成分的结构鉴定

周波^{1*}, 李新华², 王晓红¹, 郭连营¹, 张卓¹, 徐超¹

¹沈阳医学院预防医学系, 沈阳 110034; ²沈阳农业大学食品学院, 沈阳 110161

摘要:玉米紫色植株色素是从新品种玉米的紫色植株中提取的红色素。高效液相色谱分析该色素含6种成分,经硅胶柱分离出两种主要成分,经紫外可见光谱、红外光谱法、核磁共振波谱法确定该两种主要成分分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷和3,4-二羟基花色苷-3-葡萄糖苷,其含量分别占总量的45.96%和12.99%。玉米紫色植株色素是花色苷类色素。

关键词:玉米;色素;花色苷;结构

中图分类号: R284.1; Q946.91

文献标识码: A

Identification of Main Compositions in Maize Purple Plant Pigment

ZHOU Bo^{1*}, LI Xin-hua², WANG Xiao-hong¹, GUO Lian-ying¹, ZHANG Zhuo¹, XU Chao¹

¹Department of Prevent Medicine in Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China;

²Food College in Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China

Abstract: The maize purple plant pigment was red color pigment that was extracted from maize purple plant of new kind maize as raw material. Six components in the pigment were found by HPLC. Two components were separated by silica gel. The two components were cyanidin-3-glucoside and 3,4-dihydroxy anthocyanin-3-glucoside using ultraviolet-vis, infrared, ¹H NMR and ¹³C NMR spectrums and the constituted in maize purple plant pigment were 45.96% and 12.99%, respectively. Maize purple plant pigment is the anthocyanin compounds.

Key words: maize; pigment; anthocyanin; structure

国内外大量研究表明紫红色花色苷类色素具有抗氧化、抗衰老、增强免疫和预防肿瘤等保健功能^[1]。但由于可提取花色苷色素的黑紫色植物产量有限,制约了其大规模生产。辽宁东亚种业有限公司培育出一玉米新品种,其子粒为黄色,植株均为紫黑色,从紫色植株中可提取红色花色苷类色素,提取率约10%。分析研究该色素结构有助于其保健功研究,可为开发和利用该色素奠定理论基础。本文采用紫外可见光谱、红外光谱、核磁共振波谱法等对玉米紫色植株色素的结构进行分析,鉴定了主要花色苷的结构。

1 材料与仪器

1.1 材料

玉米紫色植株色素制备:干燥后的紫色玉米杆和苞叶用60%~70%的乙醇酸性溶液,在温度50~

60℃,浸泡4h,经分离、浓缩、精制、喷雾干燥制成粉状物。

1.2 主要试剂

AlCl₃、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、乙晴为色谱纯。硅胶(80~100目,上海化学试剂公司)。

1.3 主要仪器

SPECTRA MAX PLUS 384全光谱酶标仪(美国);Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国);PE 983G红外光谱仪(美国);VARIAN 300型核磁共振仪(美国)。

2 实验方法

2.1 紫外可见光谱分析

将样品配成0.2%水溶液,从200~900nm扫描,得化合物的紫外可见图谱。另将样品配成0.2%的0.01%盐酸-甲醇溶液,在可见光区内扫描后加入5%AlCl₃乙醇溶液3~5滴观察可见光区最大吸收波长变化。

2.2 高效液相色谱(HPLC)法

取一定量色素水溶液,用高效液相色谱法

收稿日期:2007-04-10 接受日期:2008-07-18

基金项目:沈阳市科委社会发展基金(1032043-1-0107)

*通讯作者 Tel: 86-24-62215717; E-mail: zhoub63@hotmail.com

(HPLC)进行分析。分析条件:Agilent 1100型高效液相色谱仪,紫外检测器;波长:515 nm;流动相:乙腈:水(乙酸调 pH 2)=40:60;流速:0.8 mL/min;分离柱:waters 3.9 \times 150 mm, 5 μ m;柱温:室温。

2.3 单体花色苷色谱分析

2.3.1 单体分离

硅胶经活化后用乙酸乙酯搅匀装开放柱(2.0 cm \times 4.0 cm),取一定量色素用酸性乙醇溶解,待溶剂挥发后,与少量硅胶搅匀上柱。不同极性乙酸乙酯-乙醇梯度洗脱,自动部分收集器收集,流速 0.5 mL/min,每管收集 25 mL,通过 HPLC 验证分离出纯样,同一成分合并为本 1 份,并反复过柱 2~3 次,分别收集其中有效成分,减压浓缩干燥。

2.3.2 紫外可见光谱分析

将分离纯化的单体成分分别配成 0.01% 盐酸-甲醇溶液,从 200~900 nm 扫描,得化合物的紫外可见图谱。加入 5% $AlCl_3$ 乙醇溶液 3~5 滴观察可见光区最大吸收波长变化。

2.3.3 红外光谱(IR)分析

KBr 压片法:分别取干燥样品,加入 KBr 研磨压片,400~4000 cm^{-1} 扫描,得化合物的红外光谱图。

2.3.4 核磁共振分析

分别将样品用氘代甲醇溶解,在室温(298 K)下,以氘代甲醇为内标。温度 25 $^{\circ}C$, cone voltage (90 eV), N_2 气流速 25 L/h。

3 结果与分析

3.1 玉米紫色植株色素吸收光谱曲线

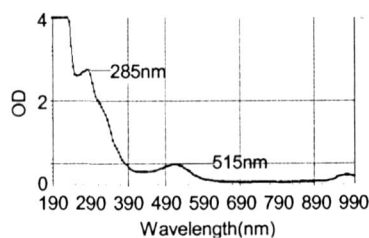


图 1 玉米紫色植株色素吸收光谱

Fig. 1 The absorption spectrum of maize purple plant pigment

由图 1 可知,玉米紫色植株色素分别在 285 和 515 nm 有吸收峰。花色苷类色素的特征吸收光谱带在 278 nm 附近和 507~536 nm 范围内^[2],由此可以判断玉米紫色植株色素属于花色苷类色素。

3.2 高效液相色谱分析

经 HPLC 检测该色素混合物中分有六个峰(如

图 2),比例为:1.25 (12.99%), 1.37 (7.96%), 1.58 (23.03%), 1.706 (45.96%), 1.947 (7.52%), 2.588 (2.52%)。

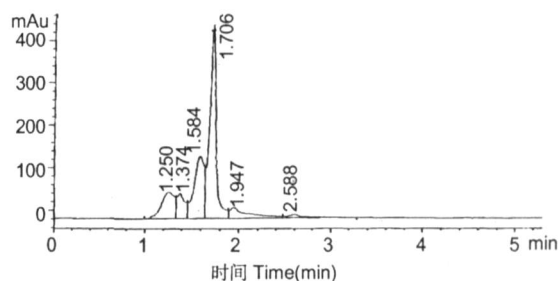


图 2 玉米紫色植株色素的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC spectrum of maize purple plant pigment

3.3 单体分离结果

经硅胶柱分离得到 2 种主要成分,分别为成分 1 和成分 2,经高效液相色谱分析,1 是保留时间为 1.706 的组分,而 2 为保留时间为 1.25 的组分。

3.4 成分 1 的结构鉴定

3.4.1 紫外可见图谱分析

成分 1 在紫外区和可见区各有 1 个特征峰,特征波长分别为 278 和 525 nm,添加 $AlCl_3$ 后特征波长 λ_{max} 为 15 nm,说明结构中有相邻羟基^[3]。

3.4.2 红外光谱分析

成分 1 在 3400~3600、1630~1620、1140~1120、1480~1400 cm^{-1} 处表现特征吸收,分别表明结构式中有明显 -OH、苯环、CH 和 C-O-C 伸缩振动以及苯环的骨架变形振动,而且 600~700 cm^{-1} 处有葡萄糖的特征吸收峰^[4]。由此可以推断成分 1 属于苯环上有 -OH 基的花青素。

3.4.3 核磁共振分析

成分 1 的 ^{13}C NMR 波谱中化学位移为:糖苷配基:177.0 (C-6), 171.3 (C-8), 162.3 (C-3), 161.7 (C-2), 163.3 (C-10), 162.8 (C-4), 122.1 (C-1), 118.3 (C-2, C-6), 114.4 (C-1, C-3), 110.6 (C-5), 98.4 (C-7, C-9), 96.3 (C-5)。葡萄糖基:98.5 (C-1), 76.1 (C-5), 73.2 (C-3), 72.5 (C-2), 68.1 (C-4), 61.2 (C-6)。成分 1 的 1H NMR 波谱中化学位移为:糖苷配基:9.26 (s, 1H), 6.60 (d, 7H), 7.09 (d, 5H), 7.83 (d, 2H), 7.23 (d, 5H), 7.93 (d, 6H), 2.22 (s, CH_3)。葡萄糖基:5.20 (d, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.52 (m, 3H), 3.28 (t, 4H), 3.58 (m, 5H), 3.50 (m, 6aH), 3.85 (m, 6bH)。

综合紫外可见光谱、红外光谱和核磁共振分析,

推断出成分 1 为矢车菊素-3-葡萄糖苷, 结构如图 3。

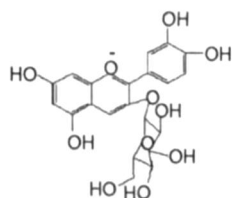


图 3 成分 1 的结构 (矢车菊素-3-葡萄糖苷)

Fig. 3 Structure of constituent 1 (cyanidin-3-glucoside)

3.5 成分 2 的结构鉴定

3.5.1 紫外可见图谱分析

紫外可见图谱分析表明:成分 2 在紫外区和可见区各有 1 个特征峰,特征波长分别为 275 和 530 nm,添加 $AlCl_3$ 后特征波长增加 12 nm,该物质结构中可能有相邻羟基。

3.5.2 红外光谱分析

成分 2 的红外光谱图与成分 1 的信息基本相同,表明成分 2 有较明显的 -OH 伸缩振动、苯环骨架变形振动、苯环 OH 伸缩振动和 C-O-C 伸缩振动,600~700 cm^{-1} 处有葡萄糖的特征吸收峰,由此可以推断成分 2 属于苯环上有 -OH 的花色苷结构。

3.5.3 核磁共振分析

成分 2 的 ^{13}C NMR 波谱中化学位移为:糖苷配基:176.8 (C-3), 163.2 (C-2), 121.9 (C-1), 97.2 (C-8), 98.2 (C-7), 110.4 (C-6), 96.1 (C-5), 171.1 (C-10), 101.7 (C-9), 114.2 (C-1, C-3), 118.1 (C-2, C-6), 171.1 (C-4), 110.4 (C-5)。葡萄糖基:98.2 (C-1), 75.6 (C-5), 74.2 (C-3), 72.9 (C-2), 67.8 (C-4), 60.8 (C-6)。成分 2 在 1H NMR 波谱中化学位移为:糖苷配基:9.34 (s, 1H), 7.12 (d, 8H), 6.85 (m, 7H), 6.80 (m, 6H), 7.09 (d, 5H), 7.82 (d, 2H), 7.22 (d, 5H), 7.93 (d, 6H)。葡萄糖:5.15 (d, 1H), 3.72 (m, 2H), 3.58 (m, 3H), 3.30 (t, 4H), 3.64 (m, 5H), 3.52 (m, 6aH), 3.86 (m, 6bH)。

综合紫外可见光谱、红外光谱和核磁共振光谱分析,推断出成分 2 结构如图 4。

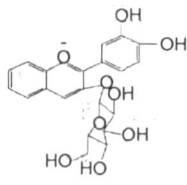


图 4 成分 2 的结构 (3,4-二羟基花色素-3-葡萄糖苷)

Fig. 4 The structure of constituent 2 (3,4-dihydroxy anthocyanidin-3-glucoside)

4 讨论

花色苷的结构是其生物活性的基础,不同花色苷的化学结构是由苯环中取代羟基和甲氧基数量及位置不同而定,花色苷上的羟基与糖以糖苷键形式结合为花色苷,糖苷化可发生在 3,5,7,3' 羟基的位置,多见于 3,5 位碳。由于糖与羟基结合的位置、数量和种类不同,使花色苷的种类繁多。不同种类的花色苷稳定性不同,在食品加工中对食品品质的影响差别较大,而且不同种类的花色苷由于羟基数量和糖的种类不同其生理功能也有较大差别,因此了解花色苷结构有助于构效关系的研究,对开发和利用花色苷类色素非常重要。目前花色苷的结构分析最有效的方法为高效液相色谱法、红外吸收光谱法、质谱法、核磁共振波谱法等联合应用的方法^[5,6]。

本文提取色素的原料为一种新杂交玉米品种的紫色植株,其父本为秘鲁紫玉米。Hiromi 等^[7]对秘鲁紫玉米种子提取的色素进行了成分分析,经 HPLC 在 515 nm 下秘鲁黑玉米花色苷出现 8 个峰,本文玉米紫色植株色素出现 6 个峰。主要成分含量秘鲁紫玉米色素:矢车菊素-3-葡萄糖苷为:44.2%、矢车菊素-3-葡萄糖丙二酸为 23.2%、芍药素-3-葡萄糖苷为 11.5%等,本文玉米紫色植株色素主要成分为矢车菊素-3-葡萄糖苷为 45.96%、3,4-二羟基花色素-3-葡萄糖苷为 12.99%。由于实验条件所限,本文用硅胶柱层析仅分离纯化出色素中含量 45.96% 的矢车菊素-3-葡萄糖苷,和 12.99% 的另一种 3,4-二羟基花色素-3-葡萄糖苷,而含量 23.2% 的成分没有分离出来。

在反相 HPLC 上花色苷的洗脱顺序为:飞燕草素、矢车菊素、牵牛花素、天竺葵素、芍药素、锦葵色素^[8]。Hiromi 等^[7]对秘鲁紫玉米种子色素反相 HPLC 分析图谱中矢车菊素的保留时间最小,而芍药素保留时间较大。本文中含量 12.99% 的花色苷保留时间小于矢车菊素,两文中的 HPLC 条件相同,可见玉米紫色植株色素中含量 12.99% 的成分 2 不是芍药素,在相关资料中没有发现与其结构相同的花色苷,故暂将成分 2 称为 3,4-二羟基花色素-3-葡萄糖苷,尚需对其进行深入研究。本文玉米紫色植株色素中与秘鲁紫玉米种子色素中主要花色苷的不同,一方面可能是由于原料不同,本文原料已

是杂交后的新品种,另外一方面,可能是提取分离方法不同。由于玉米紫色植株色素中尚有 4 种成分未确定,所以应继续研究。

5 结论

玉米紫色植株色素属花色苷类色素,其水溶液在 285 和 515 nm 有吸收峰,经高效液相色谱测定,有 6 种成分,经硅胶柱分离出两种主要成分,通过红外光谱和核磁共振分析,两种主要成分分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷和 3,4-二羟基花色苷-3-葡萄糖苷,其含量分别占总量的 45.96% 和 12.99%。

参考文献

- Ling GT (凌关庭). Multipurpose food additive (I): Purple maize pigment and its physiologic function *Cereal & Oils* (粮食与油脂), 2002, 21: 46-49.
- Tang CH (唐传核). Bioactive Components from Plants Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 242.
- Wang YJ (王彦吉), Ning ZF (宁增福). Assay in Spectrum and Chromatogram. Beijing: Beijing University Publishing House, 1995. 146-148.
- Yao XS (姚新生). Understanding the Spectrum of Organic Compound Beijing: China Medicine Science and Technology Publishing House, 2004. 49-64.
- Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, et al Determination of anthocyanins from canu-canu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *J Agric and Food Chem*, 2005, 53: 9531-9535.
- Zhang MW (张名位), Guo BJ (郭爆江), Zhang RF (张瑞芬), et al Separation, purification and identification of antioxidant compositions in black rice *Scientia Agric Sinica* (中国农业科学), 2006, 39: 153-160.
- Aoki H, Kuze N, Kato Y. Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays L.*). *Food and Food Ingredients J Jap*, 2002, 199: 41-45.
- Liu L (刘玲), Li X (李霞), Jin TM (金同铭). Determine anthocyanins by HPLC. *Beijing Agric Sci* (北京农业科学), 1998, 16 (2): 30-33.
- Zhang LH, Zhang XT, Ye WC, et al Chemical constituents from *Euphorbia latifolia* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 58-60.
- Si JY, Chen DH, Pan RL, et al Chemical constituents of *Hedyotis diffusa* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 942-944.
- Singh AK, Pathak V, Agrawal PK. Annphenone, a phenolic acetophenone from *artemisia annua* *Phytochemistry*, 1997, 44: 555-557.
- Muñoz O, Piovano M, Garbarino J, et al Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis* *Phytochemistry*, 1996, 43: 709-713.
- Matsushita H, Miyase T, Akira U. Lignan and terpene glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*, 1991, 30: 2025-2027.
- Shu SH, Zhang L, Du GH, et al Study on chemical constituents of *Caesalpinia sappan* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 63-66.
- Nakano K, Murakami K, Takaishi Y, et al Feruloyl sucrose derivatives from *Heloniopsis orientalis* *Chem Pharm Bull*, 1986, 34: 5005-5010.

(上接第 820 页)

- Zhang LH, Zhang XT, Ye WC, et al Chemical constituents from *Euphorbia latifolia* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 58-60.
- Si JY, Chen DH, Pan RL, et al Chemical constituents of *Hedyotis diffusa* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 942-944.
- Singh AK, Pathak V, Agrawal PK. Annphenone, a phenolic acetophenone from *artemisia annua* *Phytochemistry*, 1997, 44: 555-557.
- Muñoz O, Piovano M, Garbarino J, et al Tropane alkaloids from *Schizanthus litoralis* *Phytochemistry*, 1996, 43: 709-713.
- Matsushita H, Miyase T, Akira U. Lignan and terpene glycosides from *Epimedium sagittatum*. *Phytochemistry*, 1991, 30: 2025-2027.
- Shu SH, Zhang L, Du GH, et al Study on chemical constituents of *Caesalpinia sappan* *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 63-66.
- Nakano K, Murakami K, Takaishi Y, et al Feruloyl sucrose derivatives from *Heloniopsis orientalis* *Chem Pharm Bull*, 1986, 34: 5005-5010.