

萝卜花色苷的结构研究

李平凡, 姚勇芳

(广东轻工职业技术学院, 广东高校特色调味品工程技术开发中心, 广东广州 510300)

摘要: 红皮白心萝卜的色素提取物经大孔树脂 XAD-7HP 和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 纯化后, 结合半制备色谱制备花色苷单体, 最后通过 LC-MSn 和 NMR 技术手段对萝卜花色苷单体的结构进行分析。通过 LC-MSn 鉴定出萝卜皮中主要存在四种主要的花色苷, 都是以天竺葵色素为苷元, 带一个单糖和一个二糖的花色苷衍生物, 即以天竺葵-3-槐糖苷-5-葡萄糖苷为基本结构, 带有一个或是两个酰基化的基团, 如丙二酸、阿魏酸或香豆酸。经由 ^1H NMR 方法, 其中三种花色苷的具体结构鉴定为: 3-[6-(对香豆酰)-L-葡萄糖苷(2 \rightarrow 1)-葡萄糖苷]-5-D-吡喃葡萄糖苷天竺葵素、3-[6-(阿魏酰)-L-葡萄糖苷(2 \rightarrow 1)-葡萄糖苷]-5-D-吡喃葡萄糖苷天竺葵素、3-[6-(对香豆酰)-L-葡萄糖苷(2 \rightarrow 1)-葡萄糖苷]-5-[(6-丙二酰)-D-吡喃葡萄糖苷]天竺葵素。通过质谱信息和文献报道, 第四种花色苷的结构应为 3-[6-(阿魏酰)-L-葡萄糖苷(2 \rightarrow 1)-葡萄糖苷]-5-[(6-丙二酰)-D-吡喃葡萄糖苷]天竺葵素。

关键词: 萝卜; 花色苷; 分离; 质谱; 核磁共振

文章编号: 1673-9078(2014)4-40-43

Chemical Structures of Anthocyanins in Red Radishes

LI Ping-fan, YAO Yong-fang

(Guangdong Industry Technical College, Center of Guangdong Higher Education for Engineering and Technological Development of Speciality Condiments, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Radish anthocyanins were isolated from pigment-riched extracts of red radish by using XAD-7HP and Sephadex LH-20 for purification, and half prepared liquid chromatograph (HPLC) for preparation of anthocyanin monomer. The anthocyanin structures were analyzed using LC-MSn and NMR. Four anthocyanins in red radishes were identified as pelargonidin derivatives with one or two sugar moieties and some with acylation. By ^1H NMR analysis, three anthocyanins were identified as pelargonidin-3-(6-coumaroyl)-sophoroside-5-D-pyranoglucoside, pelargonidin-3-(6-feruloyl)-sophoroside-5-D-pyranoglucoside, and pelargonidin-3-(6-coumaroyl)-sophoroside-5-(6-malonyl)-pyranoglucoside. In addition, pelargonidin-3-(6-feruloyl)-sophoroside-5-(6-malonyl)-D-pyranoglucoside as the fourth anthocyanin has been found in red radishes by mass spectrum data.

Key words: radish; anthocyanin; isolation; mass spectrometry; nuclear magnetic resonance

天然色素代替合成色素的趋势是食品色素发展的主要方向。在我国食品添加剂生产积极倡导“天然、营养、多功能”的方针指导下, 低廉、安全、健康、具有生物活性的花青素色素的研究和开发将会产生巨大的社会效益和经济效益。花色苷是一大类植物性天然色素, 广泛分布于花卉以及果蔬的花、果实、根茎等部位, 使其呈现出鲜艳夺目的红、橙、紫、蓝等色彩。近年研究发现, 花色苷对促进身体健康、预防慢性疾病具有显著的功效。例如花色苷是有效的自由基清除剂, 对心血管疾病、肥胖、糖尿病以及癌症具有预防和改善的作用。目前在亚洲、日本、欧洲的部分

收稿日期: 2013-11-29

基金项目: “广东高校特色调味品工程技术开发中心” 开放课题资金资助 (GCZX-B1103)

作者简介: 李平凡 (1973-), 副教授, 主要从事食品生物技术教学与科研

通讯作者: 姚勇芳, 副教授

国家里, 萝卜红色素作为天然食用色素, 并且已经开始应用于食品工业中, 例如着色于糖果、饮料等食品中。萝卜红色素作为以花色苷为主的天然色素不仅安全无毒, 而且具有很多生物活性。因此有关萝卜花色苷的结构研究和精加工日益引起世界各国研究者的关注。

中国有上千年的萝卜栽培历史, 萝卜品种繁多。中国农业科学院作物科学研究所的种质库收录了 7 份中国红皮白心萝卜、红皮红心萝卜、绿皮红心萝卜, 分布在四川、云南、内蒙、宁夏、天津、辽宁等地。红皮白心萝卜属于十字花科 (Cruciferae) 一年或二年生草本植物, 有肥大而多汁的肉质根, 为我国主要蔬菜之一。因含有丰富的花色苷等类黄酮物质, 具有很高的营养保健价值^[1-2]。花色苷的分离纯化和单体制备一直是研究的热点。本试验采用大孔树脂 XAD-7HP 和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20, 并且结合半制备色谱

对萝卜和茄子中的花色苷进行分离纯化和单体制备,最后采用 LC-MSn 和 NMR 对花色苷单体结构进行了鉴定,获得高纯度的花色苷单体。该研究结果为更好的开发利用红萝卜资源提供了花色苷结构方面的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红皮白心萝卜(以下简称红萝卜)市售。其他化学试剂均为分析纯。

Avanti J-25 冷冻干燥机,美国贝克曼公司;LC-20AM型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Thermo LXQ型液相质谱联用仪,美国热电公司;Eyela N-1100 旋转蒸发仪,日本东京理化器械株式会社;层析柱($\text{O}50\times 600\text{ mm}$, $\text{O}15\times 300\text{ mm}$,北京欣维尔玻璃仪器有限公司;核磁共振波谱仪 AVANCE II (400MHz),瑞士Bruker公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品色素的提取

新鲜红萝卜20斤左右,洗净,将皮和心分离,收集萝卜皮,进行冷冻干燥,获得冷冻干燥粉。采用70%丙酮水溶液(含0.01% HCl)进行提取。得到的花色苷提取液,用乙酸乙酯萃取,以除去一些多酚类物质。乙酸乙酯用量为花色苷提取液用量的2倍,静置,分层,萃取三次后,合并收集到的水相,保存在-20℃的冰箱中,待进一步纯化用。

1.2.2 纯化

花色苷将提取的花色苷粗提液适量,加入大孔树脂层析柱中,先用0.01% HCl水溶液冲洗,缓慢将柱壁上的样品冲洗干净;用0.01% HCl-甲醇溶液洗脱,收集花色苷洗脱液,40℃旋转蒸发,浓缩洗脱液。保存待进一步纯化用。选用 $15\times 300\text{ mm}$ 的层析柱,缓慢加入预处理好的凝胶,先用蒸馏水冲洗平衡,取适量的经过大孔树脂纯化的样品上样,后用50%甲醇-水(含0.01% HCl)在适当的流速下进行洗脱,按照每管(30 ml) 15 min收集洗脱液,将收集的样品旋转蒸发浓缩后,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜,保存,待HPLC检测。

1.2.3 单体制备

结合半制备色谱制备花色苷单体。半制备色谱条件:色谱柱:Aligen Eclipse XDB-C18柱子($250\times 9.4\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流速:3 mL/min;进样量:100 μL ;检测波长:520 nm;流动相、检测波长和梯度洗脱条件针对不同的样品按如下进行:流动相:A相(4%磷酸水溶液);

B相(100%乙腈);梯度洗脱条件:0~30 min:5~30% B相,30~50 min:30% B相。得到化合物1、2、3、4。

1.2.4 HPLC 分析

经过半制备色谱接取的样品,经旋转蒸发浓缩后,刮刀刮出,一部分用0.01% HCl水溶液溶解,进行HPLC分析。剩下部分留作质谱和核磁检测。色谱条件:色谱柱:Aligen Eclipse XDB-C18柱子($250\times 4\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流速:1 mL/min;进样量:10 μL ;检测波长:520 nm;流动相、检测波长和梯度洗脱条件针对不同的样品按如下进行:流动相:A相(4%磷酸水溶液);B相(100%乙腈);梯度洗脱条件:0~30 min:5~30% B相;30~50 min:30% B相。

1.2.5 质谱结构分析

质谱条件:Thermo LXQ型离子阱质谱联用仪,质谱为ESI正离子模式电喷雾接口;离子源温度100℃;针电压:4.5 kV;毛细管电压:20 V;毛细管温度300℃;离子阱质量分析器,且扫描质量范围200~2000。

1.2.6 核磁结构分析

将制备好的花色苷固体,用氘代三氟乙酸-氘代甲醇(V/V=1:9)溶解,在核磁共振波谱仪(400 MHz)鉴定分析,包括 ^1H 谱和 ^{13}C 谱。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 检测

红皮白心萝卜中主要有4种花色苷,分别记为组分I、II、III、IV。其HPLC检测结果如图1。4种花色苷组分经过大孔树脂和葡聚糖凝胶纯化后,制备单体,做质谱和NMR鉴定。

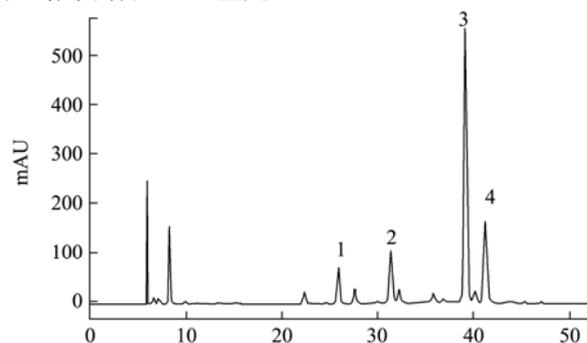


图1 红萝卜花色苷的HPLC图

Fig.1 HPLC profiles of red radish anthocyanins

2.2 HPLC-MS

化合物1,图1和表1是红萝卜花色苷组分1质谱鉴定结果。其中, m/z 902.91是分子离子峰,741.00,433.11

接上页			
5'	7.07	7.09	7.10
6'	8.58	8.62	8.58

G2			
1	5.54	5.62	5.63
2	4.10	4.13	4.13
3	3.83	3.80	3.87
4	3.62	3.67	3.63
5	3.77	3.70	3.96
6	4.51	4.39	4.46
	4.52	4.55	4.54

G3			
1	4.78	4.87	4.80
2	3.24	3.28	3.26
3	3.33	3.34	3.37
4	3.28	3.28	3.28
5	3.15	3.15	3.13
6	3.49	3.49	3.52
	3.60	3.59	3.63

G1			
1	5.19	5.21	5.24
2	3.77	3.70	3.81
3	3.58	3.56	3.61
4	3.49	3.41	3.48
5	3.62	3.67	3.81
6	3.77	3.70	4.31
	3.97	4.55	4.58

Acyl group			
2	7.28	6.85	7.20
3	6.79	-	6.75
5	6.77	6.79	6.73
6	7.26	6.81	7.22
7	7.38	7.35	7.37
8	6.18	6.17	6.18

Malonyl			
2			3.48

从表2和图2可知, 化合物1的¹H-NMR中, 化学位移δ9.02, 为C环的H-4质子; δ8.60和8.58, 为B环上H-2'和H-6'质子; δ7.10和7.07, 为B环上H-3'和H-5'质子; δ6.96和δ7.01为A环上H-6和H-8的质子。G1糖上1位碳上的H的化学位移为δ5.29, 表明3位上接的是β-O-D型糖; G3糖上1位碳上的H的化学位移为δ4.78, 2位碳上H的化学位移从高场化学位移4.10向低场3.24移动, 表明两个糖的连接点为2→1; 6位上H的化学位移从高场4.51向低场3.49移动, 表明在6位上连接酰基化基团;

δ7.28和7.26为酰基化基团苯环上的H-2和H-6质子; 化学位移δ6.79和6.77为酰基化基团上H-3和H-5质子; 化学位移δ7.38和δ6.18分别是双键7位和8位上H质子。结合其他位上的化学位移, HPLC-MS分析结果和参考文献^[3-5], 可以确定化合物1为3-[6-(对香豆酰)-L-葡萄糖苷(2→1)-葡萄糖苷]-5-D-吡喃葡萄糖苷天竺葵素。

化合物2的¹H-NMR(表2和图3)中, 同化合物1相比较, 最大的差别在酰基化基团上, 化学位移δ6.85为酰基化基团苯环上的H-2质子; 化学位移δ6.79和6.81为酰基化基团上H-5和H-6质子; 化学位移δ7.35和δ6.17分别是双键7位和8位上H质子。结合其他位上的化学位移, HPLC-MS分析结果和参考文献^[3-5], 可以确定化合物2为3-[6-(阿魏酰)-L-葡萄糖苷(2→1)-葡萄糖苷]-5-D-吡喃葡萄糖苷天竺葵素。

化合物3的¹H-NMR(表2和图4)中, 同化合物1相比较, 最大的差别是在低场出现3.48信号峰, 为酰基化基团malonyl上2位H质子; G1糖上6位上H的化学位移由低场区3.77向高场区4.31移动, 表明酰基化基团连接在6位H上。结合其他位上的化学位移, HPLC-MS分析结果和参考文献^[3-5], 可以确定化合物3为3-[6-(对香豆酰)-L-葡萄糖苷(2→1)-葡萄糖苷]-5-[(6-丙二酰)-D-吡喃葡萄糖苷]天竺葵素。

对化合物4, 在NMR中没有检测出。通过HPLC-MS分析, 结合参考文献^[3-4, 6-7], 可知化合物4为3-[6-(阿魏酰)-L-葡萄糖苷(2→1)-葡萄糖苷]-5-[(6-丙二酰)-D-吡喃葡萄糖苷]天竺葵素。红萝卜花色苷4个化合物的分子结构见图5。

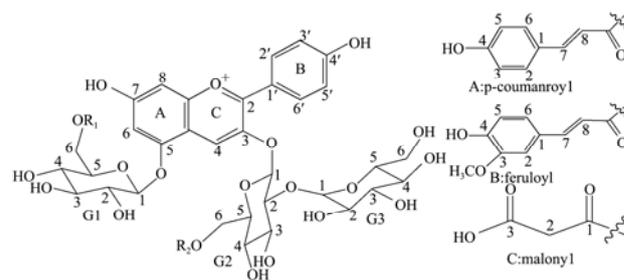


图5 红萝卜花色苷的结构

Fig.5 Structure of anthocyanin in red radish

注: 化合物1: R₁=H, R₂=A; 化合物2: R₁=H, R₂=B; 化合物3: R₁=C, R₂=A; 化合物4: R₁=C, R₂=B。

3 结论

本研究发现红皮白心萝卜皮中主要存在四种主要的花色苷, 都是以带一个单糖和一个二糖的天竺葵衍生物, 即以天竺葵-3-槐糖苷-5-葡萄糖苷为基本结构, 带有一个或是两个酰基化的基团, 如丙二酸、阿魏酸或香豆酸。具体经过NMR进一步分析和文献分析, 确定

了该四种花色苷结构。

参考文献

- [1] Zafra-Stone S, Bagchi M, Bagchi D. Health Benefits of Edible Berry Anthocyanins: Novel Antioxidant and Anti-Angiogenic Properties [M]. In Antioxidant Measurement and Applications, Fereidoon Shahidi; Chi-Tang Ho (Eds). American Chemical Society, 2007
- [2] Jing P, Giusti MM. Contribution of berry anthocyanins to their chemopreventive properties [M]. Berries and cancer prevention, Stoner, Gary D; Navindra Seeram (Eds.). Springer Publisher, 2011
- [3] Record I R, Dreosti I E, Mcinerney J K. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture [J]. British Journal of Nutrition, 2001, 85(4): 459-464
- [4] Takashi Otsuki, Hiroshi Matsufuji, Mitsuharu Takeda, et al. Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. phytochemistry, 2002, 60: 79-87
- [5] Satoru Tamura, Kouji Tsuji, Piao Yongzhen, et.al. Six new acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus*) [J]. Chem. Pharm. Bull., 2010, 58(9): 1259-1262
- [6] Yoshida K, Sato Y, Okuno R, et al. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of Vigna, Phaseolus, and Glycine Legumes [J]. Bioscience, Biotechnical and Biochemistry, 1998, 60(4): 589-593
- [7] Giusti M M, Wrolstad R E. Characterization of red radish anthocyanins [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(2): 322-326
- [8] Giusti M M, Rodriguez-Saona L E, Griffin D, et. al. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47, 4657-4664