

文章编号 :1009 - 038X(2003)03 - 0062 - 05

火龙果色素的基本性质及结构鉴定

刘小玲, 许时婴, 王璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用液质联用(HPLC/MS)的方法,将色素的不同组分分离,并对分离组分进行结构鉴定。结果表明:火龙果果肉、果皮色素同为甜菜苷类色素,从果肉中分离出 4 种甜菜苷色素为 betanin, 2-descarboxy-betanin, phylloactin, 2-descarboxy-phylloactin;果皮中分离出 2 种甜菜苷色素为 betanin, phylloactin。火龙果中甜菜苷红色素的质量分数分别为 676.9 mg/kg(以鲜果肉计),97.7 mg/kg(以鲜果皮计)。

关键词:火龙果,色素,甜菜苷,液质联用,固相萃取

中图分类号: S 66

文献标识码: A

HPLC/MS Analysis of the Pigments from Red-Purple Pitaya (*Hylocereus undatus*)

LIU Xiao-ling, XU Shi-ying, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The pigments of *Hylocereus* were isolated and identified quickly by HPLC/MS. It is concluded that the pigment of the pulp and the peel in *Hylocereus* are betalain. Four components, betanin, 2-descarboxy-betanin, phylloactin and 2-descarboxy-phylloactin in pulp and two components, betanin and phylloactin in the peel were isolated, respectively. The extraction yields of betalains from *Hylocereus* are 676.9 mg of monomeric betalains/kg fresh pulp and 97.7 mg/kg fresh peel.

Key words: *Hylocereus undatus*; pigment; betalain; HPLC/MS; solid-phase extraction(SPE)

天然色素是食品中的固有组分,能赋予食品丰富的色彩,并促进食欲。研究发现,某些合成色素在体内可能形成致癌物质,对人体健康有害,而许多天然的食用色素却有特殊的生物活性功能,如花色素具有抗氧化、降血脂、抗肿瘤等作用^[1],因此,天然色素的研究与开发受到人们的极大关注。

火龙果(*Hylocereus undatus* cv. *vietnam*)是仙人掌科(Cacataceae)三角柱属多浆植物,属附生类型,俗名“量天尺”,又称红龙果等^[2],原产巴西、墨西哥等

中美洲至南美洲地区,我国早于 1645 年就开始引种,并作为观赏园艺品种栽培。火龙果在台湾、越南等地区商品化种植已有十几年的栽培史,目前在我国的海南、福建、广东、广西等地均有种植,并且市场上已有国产的火龙果销售。火龙果的品种按其果皮果肉的颜色分为红皮白肉、红皮红肉、黄皮白肉等 3 种。红皮红肉品种是一种新的改良品种,其果实呈近圆形,棱片粗短,反卷似“莲花座”,是近十年内火龙果的主要栽培品种。火龙果果实富含大量的天

收稿日期: 2002-12-24; 修回日期: 2003-01-28.

作者简介: 刘小玲(1972-),女(壮族),广西凌云人,食品科学与工程博士研究生。

万方数据

然色素,从皮到肉的颜色呈玫瑰红到紫红色,是天然色素提取加工的良好来源.目前国内外有关火龙果色素的研究还未见报道.对火龙果色素的组成、结构及含量的研究,有助于火龙果的综合利用及火龙果天然色素的应用与开发.

1 材料与方法

1.1 材料

火龙果 红皮红肉品种,产于广西百色市.

1.2 仪器与设备

UV 1100 型紫外可见分光光度计,北京瑞利公司产品;ZX98-1 真空旋转蒸发器;Agilent 1100 液相色谱仪;Waters 2690 液相色谱仪;Waters platform ZMD 4000 液质联用仪;Waters 996 光电二极管阵列检测器(PDA);LGJ-10 冷冻干燥机;离心沉淀机.

1.3 方法

1.3.1 火龙果色素的定性分析 根据火龙果色素在不同溶剂中的溶解性、光谱特征及 pH 变化对色泽的影响等确定火龙果色素的类型.

1.3.2 火龙果色素的提取 果皮果肉剥离,液氮冻融,分别于高速组织捣碎机捣碎,精确称取一定量的果皮、果肉组织,于 4 °C 条件下浸泡过夜^[3],提取液以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,沉淀物再用体积分数为 70% 的丙酮溶液浸提几次,直至无色素溶出;合并离心上清液,加入等体积的氯仿混合震荡,以 3 000 r/min 离心 20 min,去除脂类物质.吸取上清液,经 P3 砂芯漏斗抽滤,滤液于 35 °C 下经真空旋转蒸发浓缩除去丙酮,浓缩液收集后复溶于 0.01% 的 HCl 溶液,得到色素提取液.

1.3.3 火龙果色素的初步纯化 色素提取液用预先经甲醇激活 0.01% (体积分数) 的 HCl 溶液平衡过的 ODS C-18 固相萃取小柱进行分离纯化,加入一定量的色素提取液,使色素吸附在柱上,然后用 5 倍体积的 0.01% HCl 溶液将糖、酸等水溶性物质洗下,再用 5 倍体积的乙酸乙酯洗下多酚类、黄酮类物质,最后以含 0.01% HCl 的甲醇溶液将色素洗脱,收集洗脱液,35 °C 下真空浓缩,除尽甲醇,浓缩液以 0.01% 的 HCl 溶液稀释定容,得火龙果色素纯化液^[4-6].

1.3.4 火龙果色素的分离与结构鉴定 色素纯化液先经反相高效液相色谱(HPLC)分离,再进行液质联用(HPLC/MS).通过质谱确定液相分离组分的分子和分子碎片的荷质比,以确定组分的结构.PDA 在 200~600 nm 波长范围扫描,并定于 535 nm 检测其吸光值^[7].

1.3.5 火龙果色素的定量测定 精确称取一定量的果皮、果肉组织,提取纯化的方法如上所述,纯化液于 200~600 nm 条件下扫描及测定最大吸收波长的吸光度.标准甜菜苷(betainin)的摩尔吸光系数 ϵ 为 61 600,相对分子质量为 550.46^[7],结果可转换为相应的甜菜苷色素质量分数.

2 结果与讨论

2.1 火龙果色素的定性分析

2.1.1 pH 对火龙果色素色泽变化的影响 火龙果色素在不同 pH 条件下,产生颜色反应,在酸性介质中呈深紫红至紫红色(见表 1),并随 pH 的增大,亮度增加.在酸性 pH 值范围,色泽具有相对的稳定性.在碱性介质中,火龙果色素呈黄色,溶液透明澄清,并未出现花色苷在碱性条件下的蓝色反应.

表 1 火龙果色素色泽随 pH 变化

pH	1	4	7	9	12
色泽	深紫红	紫红	亮红	橙黄	淡黄

2.1.2 火龙果色素的光谱特征 火龙果色素提取纯化液,经过适当倍数稀释后,于紫外-可见分光光度计不同波长下扫描,得到吸收曲线,见图 1.果皮色素与果肉色素具有相同的光谱特征.在可见光区,火龙果色素的最大吸收波长是 538 nm.

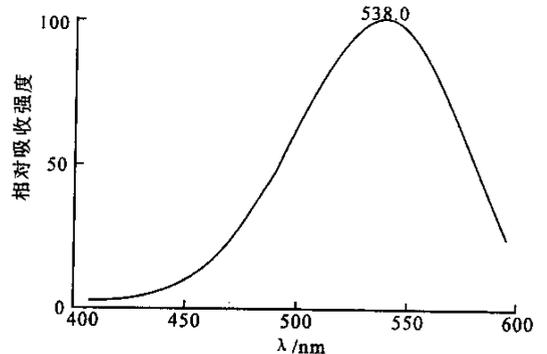


图 1 火龙果果肉色素的紫外-可见光谱

Fig.1 UV-Vis spectrum of the pigment extracted from *Hylocereus* pulp

2.1.3 火龙果色素在不同溶剂中的溶解性 火龙果色素可溶于水,以及甲醇、乙醇、乙腈、丙酮等与水的混合液,不溶于乙酸乙酯、乙醚、氯仿、石油醚、苯等非极性有机溶剂.

仙人掌科植物的色素以甜菜苷类色素为主^[8],综合实验结果可知:火龙果色素为水溶性色素,可

溶于甲醇、乙醇、丙酮等与水互溶的溶剂;具有甜菜苷色素的 pH 颜色反应性,即在碱性 pH 范围,呈透明的亮黄色,而且火龙果在可见光区的最大吸收波长为 538 nm.由此可见,火龙果色素属于甜菜苷类色素,色素的化学结构见图 2,共振结构见图 3.

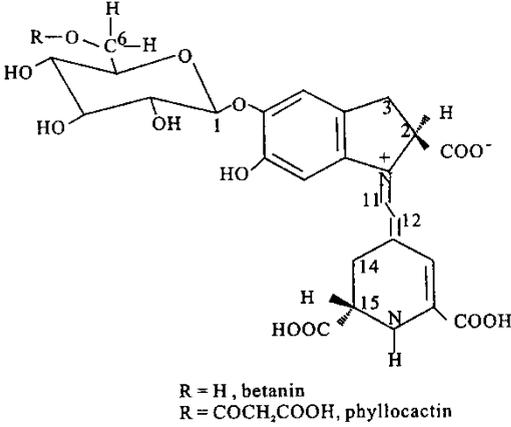


图 2 火龙果甜菜苷色素的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of analyzed betacyanins in *Hylocereus undatus*

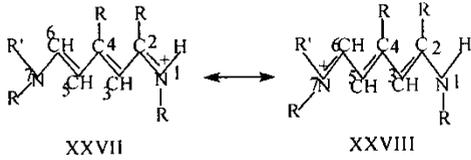


图 3 甜菜苷的共振结构

Fig. 3 Sympathetic vibration structure of betacyanin

2.2 色素的提取和初步纯化

火龙果色素为水溶性色素,可以用水或甲醇、乙醇、丙酮等极性有机溶剂提取.采用不同方式提取色素,结果见表 2.直接水提法不易将果皮色素完全提取,且浓缩需要较高的温度,不利于色素结构的保留.以丙酮-水抽提色素,提取容易,但往往将其它多酚物质同时溶出,得到含单宁、多酚、黄酮类化合物、糖类、酸类等水溶性物质的混合体系^[9].因此,在进行色谱分离前,需要对提取混合液进行初步纯化.根据各物质在不同溶剂中的溶解性差异,进行分步萃取,可以将含杂质的色素溶液进一步纯化.固相萃取(SPE)是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附,与干扰物分离,再用洗脱液洗脱或加热脱附,达到分离和富集目标化合物的目的.其实质与液相色谱相同,只是所用的吸附剂在粒度上有所差别^[10].作者用 ODS C-18 小柱进行反相固相萃取,用不同溶剂分步洗脱,有效地将提取混合组分进行初步纯化,结果见图 4. ODS C-18 柱

的固定相填充剂是一种非键合相的固体填料,适用于分离水溶液中弱极性、极性的小分子物质.经萃取小柱的吸附、洗脱,甜菜红素得到初步纯化.

表 2 不同条件对火龙果色素提取效果的比较

Tab. 2 Comparison of extracting effect on *Hylocereus* pigment under different condition

原料状态	提取溶剂	结果
新鲜	水	提取不完全,浓缩温度较高
新鲜	1% (体积分数) 盐酸-甲醇溶液	可溶性糖溶出,冻干时粘度过大,无法干燥
冻干	0.1% (体积分数) 盐酸-甲醇溶液	色素难溶出
液氮冻融	丙酮-水溶液	提取完全,伴随多种成分溶出

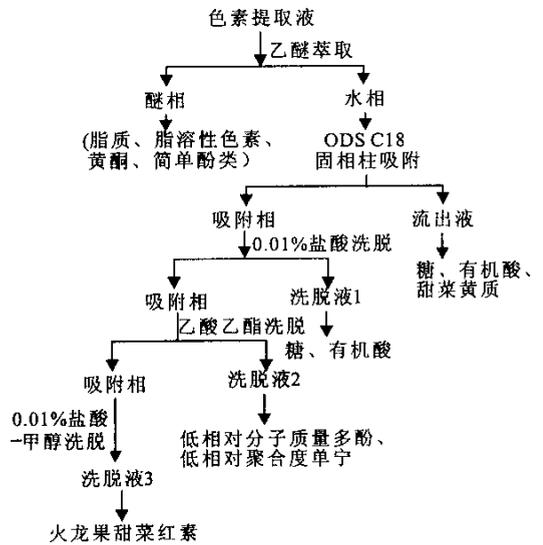


图 4 固相萃取纯化火龙果甜菜红素

Fig. 4 Purification of *Hylocereus* betacyanin by Solid-Phase Extraction

2.3 火龙果色素分离与结构鉴定

通过初步定性可知,火龙果色素为甜菜苷类色素(betalain),甜菜苷类色素最初是从甜菜中获得,是食品天然红色素的优良来源,它属于吡啶类衍生物,基本发色基团是 1,7-二偶氮庚甲碱. R 和 R' 可以是氢或芳香族取代基,它们的颜色由 1,7-二偶氮庚甲碱的共振结构所产生.如果 R' 与 1,7-二偶氮庚甲碱不共振,化合物颜色为黄色,称甜菜黄质(betaxanthin).如果 R' 与 1,7-二偶氮庚甲碱共振,化合物颜色则为红色,称甜菜红素(betacyanin),它们分别在 480 nm 和 538 nm 处有最大吸收^[11,12].甜菜红素在自然条件下与葡萄糖或葡萄糖醛酸成苷,称甜菜红苷(betanin).甜菜苷的糖苷基上还可以连接丙二酸,庚

二酸等有机酸成为酰化物. 甜菜红素分子中的 C_2 与 C_{15} 位为不对称碳原子, 因此还存在差向异构体. 甜菜红素在碱性条件下可以转化为甜菜黄质, 这是甜菜红素在碱性条件下转为黄色的原因. 甜菜苷色素为弱极性物质, 利用液相色谱分离甜菜苷色素时, 采用 ODS C-18 色谱柱. 非极性烷基键合相的表面烷基与待分离组分分子发生可逆缔合, 再利用流动相的极性溶剂将不同极性的组分洗脱. 报道的流动相多采用甲醇-甲酸-水, 乙腈-三氟乙酸-水等^[13-15]. 在流动相条件试验中发现, 在流动相中加入一定量的磷酸可提高峰的分辨率. 但由于在利用质谱定性时, 磷酸电离后不能很好的汽化, 对质谱设备有一定的损害. 因此, 在 HPLC 分离时, 对流动相进行了加磷酸和不加磷酸的对比, 结果显示, 采用这两种流动相分离, 得到的出峰数是一致的, 但分辨率和保留时间有一定差异. 经液相分离及液质联用分析, 从果皮、果肉中分别得到 2 个和 4 个组分. 它们的相对含量及在液相中的保留时间见图 5 和图 6. 从表 3 和表 4 中看到, 果皮中为 betanin [M + H]⁺ 为 551, phylloactin [M + H]⁺ 为 637. 果肉中除了这两个组分外, 还得到二者的 C_2 脱羧产物, 分别为 2-descarboxy-betanin [M + H]⁺ 为 507(551 - 44) 和 2-descarboxy-phylloactin [M + H]⁺ 为 593(637 - 44), 见图 7 (a ~ b) 和图 8 (a ~ d). 不同组分的甜菜苷在果皮、果肉中的质量分数不同, 果肉中甜菜苷(betanin) 占 36%, 而果皮中仅占 9%, 这种色素组成与含量的差异可能是造成火龙果果皮、果肉色泽不同的原因.

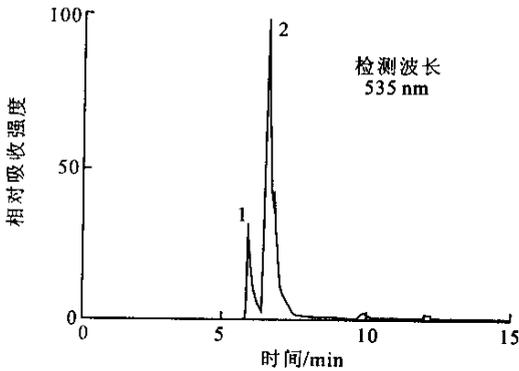


图 5 火龙果果皮色素 HPLC 谱图

Fig.5 HPLC chromatogram(535 nm) of pigments from peel of *Hylocereus*

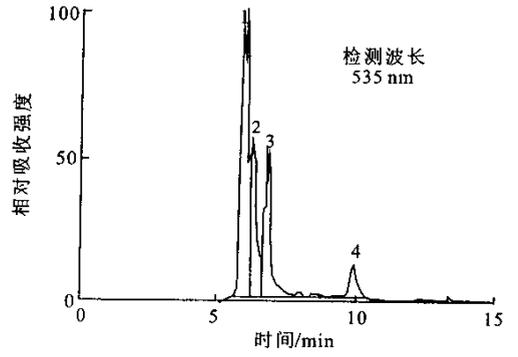


图 6 火龙果果肉色素 HPLC 图

Fig.6 HPLC chromatogram(535nm) of pigments from pulp of *Hylocereus*

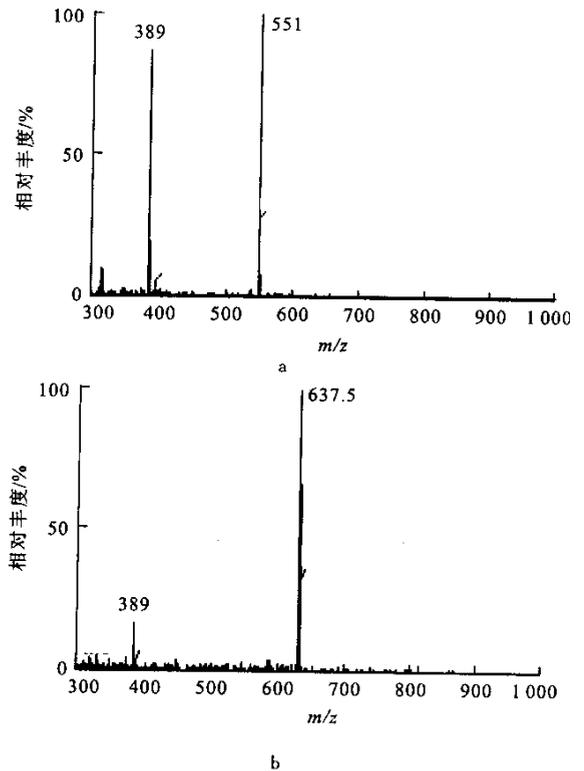


图 7 火龙果果皮色素 MS 谱图

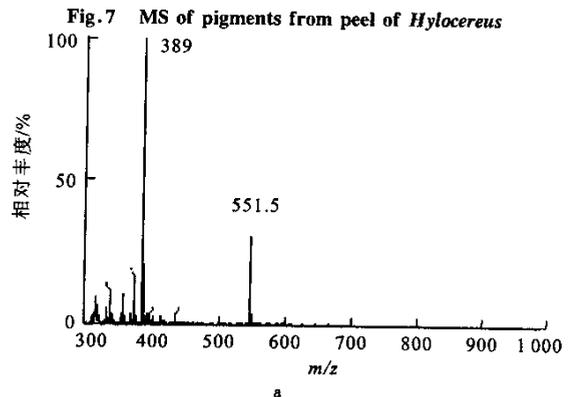


Fig.7 MS of pigments from peel of *Hylocereus*

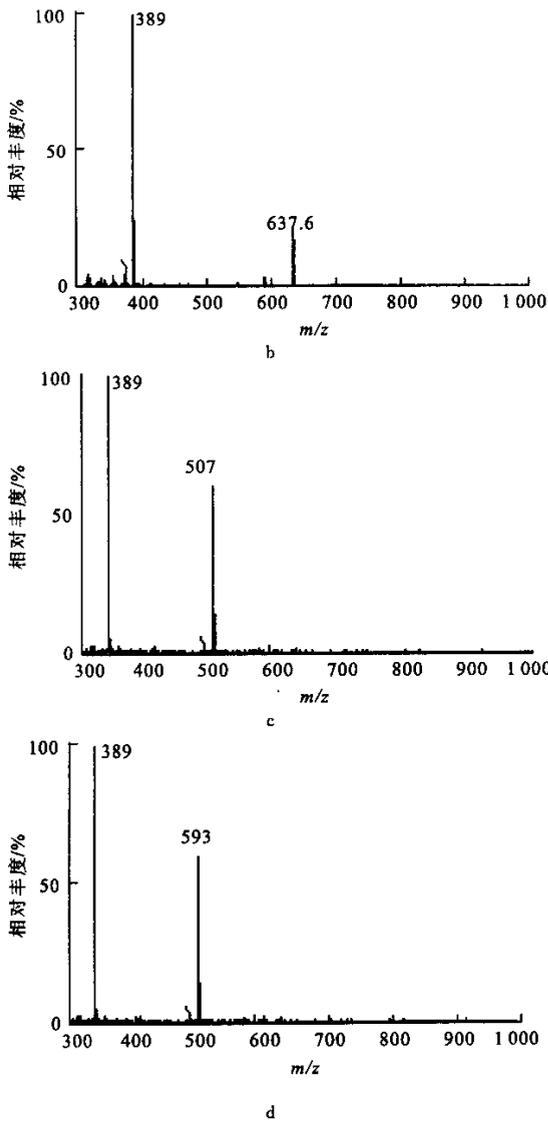


图8 火龙果果肉色素 MS 谱图

Fig.8 MS of pigments from pulp of *Hylocereus*

表3 火龙果果皮色素的 HPLC-PDA-ESI/MS 数据

Tab.3 Chromatographic and spectroscopic characteristics of betacyanin from peel of *Hylocereus*

出峰序号	保留时间/min	质量分数/%	HPLC-PDA λ_{\max} /nm	ESI/MS 分子碎片 $[M+H]^+$ (m/z)	甜菜苷色素类型
1	5.97	9.85	542	551	Betainin
2	6.24	85.77	540	637	Phyllocactin

表4 火龙果果肉色素的 HPLC-PDA-ESI/MS 数据

Tab.4 Chromatographic and spectroscopic characteristics of betacyanin from pulp of *Hylocereus*

出峰序号	保留时间/min	质量分数/%	HPLC-PDA λ_{\max} /nm	ESI/MS 分子碎片 $[M+H]^+$ (m/z)	甜菜苷色素类型
1	5.98	36.31	539	551	Betainin
2	6.25	26.18	541	637	Phyllocactin
3	6.85	24.89	537	507	2-Deoxybetainin
4	10.05	7.02	541	593	2-Decarboxyphyllocactin

2.4 火龙果色素的定量

火龙果中总甜菜红素的质量分数折算为甜菜苷质量分数分别为 676.9 mg/kg(以鲜果肉计), 97.7 mg/kg(以鲜果皮计), 转换为干物质质量分数为 5.179 g/kg 和 1.211 g/kg. 果肉中的甜菜红质量分数甚高, 比红卷心菜(250 mg/kg)、红洋葱(90~210 mg/kg)^[16]等植物中的花色苷类色素含量都高, 且甜菜苷的摩尔吸光系数也比花色苷类色素高, 相比之下, 火龙果色素具有更好的应用潜力。

参考文献:

- [1] 庞志申. 花色苷研究概况[J]. 北京农业科学, 2000, 18(5): 37-42.
- [2] 曾建飞编. 中国植物志(第五十二卷 第一分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 282.
- [3] Oradaz-Galindo A, Wesche-Ebeling P. Purification and identification of Capulir(*Prunus serotina ehrh*) anthocyanins[J]. *Food Chemistry*, 1999, 65: 201-206.
- [4] Alexandra E P, Monica M. Anthocyanins from banana bracts(*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants[J]. *Food Chemistry*, 2001, 73: 327-332.
- [5] Hyoung S. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange(*Citrus sinensis*)[J]. *J Agric Food Chem* 2002, 50: 1243-1246.

(下转第75页)

3 小 结

1) 当 β -胡萝卜素在 600 °C 以前裂解时, 其主要产物为 1, 2, 3, 4-四氢萘、甲苯、对甲苯和 2, 7-二甲基萘, 其中 1, 2, 3, 4-四氢萘的相对质量分数都在 25% 以上, 但其它 3 种产物的含量随着裂解温度的增加而有所降低。

2) 当 β -胡萝卜素在 600 °C 以前裂解时, 形成的芳香物质的种类比较多, 而且其含量也比较高, 随着裂解温度的升高, 这些芳香物质的含量逐渐减

少, 到 600 °C, β -紫罗兰酮和二氢猕猴桃内酯已完全消失, 取而代之的是, 萘、蒽和菲等稠环化合物的含量迅速增加; 到 800 °C, 产物基本上是苯、甲苯、二甲苯、乙基苯等芳环化合物以及萘、蒽和菲等稠环化合物。

3) 裂解的温度越高, 由于提供的能量非常充足, 超过了一些反应所需的活化能, 裂解时所形成的碳氢化合物可以进一步反应, 从而形成更为稳定的芳香烃, 而这些芳香烃则进一步发生聚合和缩合, 形成更为稳定的稠环化合物。

参考文献:

- [1] Van Dort, Johannes M, De Heij, *et al.* Processing for preparing flavorings and perfumes based on one or more carotenoids as starting materia[P]. 美国专利 :USP 5084292, 1992-01-28.
- [2] 张成敏, 缪明明, 胡群. 从提取的天然类的胡萝卜素制备烟用香料的方法[P]. 中国专利 :CN98115875, 2000.
- [3] 张槐苓. 类胡萝卜素化学降解产物在卷烟加香中的应用[J]. 烟草科技, 1996, (5):30.
- [4] 张岩磊, 谢文浩, 戴亚. 卷烟降焦工程[M]. 北京 :中国轻工业出版社, 2000. 68-69.
- [5] 金文薄, 戴亚. 烟草化学[M]. 北京 :清华大学出版社, 1994. 138-140.

(责任编辑 朱明)

(上接第 66 页)

- [6] Alessandro Baldi, Annalisa Romani. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43:2104-2109.
- [7] Yizhong CAI, Mei SUN. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49:1971-1976.
- [8] [日] 刈米达夫. 植物化学[M]. 北京 :科学出版社, 1985. 132.
- [9] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京 :科学出版社, 2000. 30.
- [10] 王立, 汪正范. 色谱分析样品处理[M]. 北京 :化学工业出版社, 2001. 84.
- [11] [台] 张为惠. 高等食品化学[M]. 台北 :华香园出版社, 1973. 168.
- [12] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京 :中国轻工业出版社, 1999. 294.
- [13] Naoko Kobayashi, Jurgen Schmidt, Victor Wray, *et al.* Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins[J]. *Phytochemistry*, 2001, 56:429-436.
- [14] Naoko Kobayashi, Jurgen Schmidt, Victor Wray, *et al.* Betalains from christmas catus[J]. *Phytochemistry*, 2000, 54:419-426.
- [15] Slawomir Wybraniec, Itzhak Platzner, Shimona Geresh, *et al.* Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58:1209-1212.
- [16] WANG Hong. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanin[J]. *J Agr Food Chem*, 1997, 45:304-309.

(责任编辑 朱明)