

文章编号:1673-1689(2008)02-0025-05

黑米色素的组成与结构分析

孔令瑶, 汪云*, 曹玉华, 龚文君, 曹蕊, 李楠

(江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:采用液质联用技术(LC-MS)与毛细管电泳电化学检测(CE-ED)对黑米色素进行定性分析。结果表明,黑米色素主要含有两种花青苷色素,分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷和芍药素-3-葡萄糖苷。

关键词:黑米色素;花青苷;液质联用;毛细管电泳

中图分类号:O 657.7

文献标识码:A

Analysis of Components and Structures of Black Rice Pigment

KONG Ling-yao, WANG Yun*, CAO Yu-hua, GONG Wen-jun, CAO Rui, LI Nan

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and capillary electrophoresis with electrochemical detection (CE-ED) were applied to determine the components and structures of black rice pigment. The result showed that there were two major anthocyanins in black rice pigment: cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside.

Key words: black rice pigment; anthocyanin; liquid chromatography-mass spectrometry; capillary electrophoresis

黑米在我国有着悠久的种植史,它不仅含有丰富的蛋白质、人体必需的多种氨基酸以及锰、锌、铁及其它微量元素^[1],而且在米糠中还含有大量的黑米色素。研究表明,黑米色素属花青苷类色素,是类黄酮化合物,有较强的清除自由基和抗氧化的能力^[2-4],是一种具有药用价值的天然食用色素资源。

目前对于黑米色素提取方法的研究较多^[5,6],但对色素组成及结构分析的报道较少,主要是由于黑米色素成分复杂、不稳定等特性及相应标准样品的缺乏,给研究工作带来了一定的困难。黑米色素分子结构分析主要包括两方面:一是花青苷分子结

构的确定,二是与花青素成苷的糖的种类的确定。对前者的分析采用的方法目前主要有高效液相色谱法^[7]、分光光度法^[8]及核磁共振法^[9]。对后者的分析采用的方法主要有薄层层析法^[6]、气相色谱法^[8]和高效液相法^[10],但层析法的误差较大,而气相色谱法需对样品进行衍生化,水解后还需将糖与其他物质分离,处理较复杂。作者采用液质联用技术(LC-MS)对色素的组成和色素分子的结构框架进行了分析,并首次运用毛细管电泳-电化学检测技术对其糖苷的糖进行了确定。

收稿日期:2007-01-19.

基金项目:国家自然科学基金项目(20676052).

作者简介:孔令瑶(1982-),女,吉林省吉林人,分析化学硕士研究生.

*通讯作者:汪云(1964-),女,浙江绍兴人,工学硕士,副教授,主要从事分析化学研究. Email:wangyun813@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

黑米;江苏常熟产;石油醚、乙酸乙酯、半乳糖、葡萄糖;均为分析纯;乙腈;色谱纯。

WATERS Platform ZMD4000 液质联用仪;Waters;毛细管电泳-电化学检测系统(CE-ED);自行组装;BAS LC-3D 安培检测器;Bioanalytical Systems 公司产品;HW-2000 色谱软件;上海千谱软件有限公司产品;熔融石英毛细管(长 65cm, 内径 25 μ m);河北永年光导纤维厂产品;RE-52AA 型旋转蒸发器;无锡星海王生化设备有限公司产品;TV-1901 双光束紫外可见分光光度仪;北京普析通用仪器有限责任公司产品;碾米机;无锡秦良商贸有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 黑米色素的脱脂 用碾米机将黑米皮层碾剥下来,加入石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)用超声提取法提取,脱去黑米糠中的脂肪,然后用乙酸乙酯超声提取,除去黑米糠中的弱极性杂质(胡萝卜素、叶绿素等)。

1.2.2 黑米色素的提取及纯化 称取处理后的黑米糠 2 g 于锥形瓶中,加入 100 mL 含体积分数 0.25% 的盐酸体积分数为 80% 的乙醇溶液,超声提取 30 min,旋转蒸发除去乙醇。将浓缩后的色素加到已处理的弱酸性阳离子交换树脂柱中,先用去离子水洗涤,将米糠中的杂质除去,再用体积分数 80% 乙醇将色素洗脱下来,旋转蒸发除去乙醇,得到色素浓缩液。

1.2.3 黑米色素的紫外可见光谱分析 用移液管吸取黑米色素浓缩液 0.2 mL,移入 10.00 mL 容量瓶中,用乙醇稀释至刻度,进行紫外-可见吸收光谱扫描。

1.2.4 黑米色素的液质联用分析 色谱分析条件:分析柱;purospher STAR C-18 4.6 mm \times 250 mm;检测器:二极管阵列;流动相:乙腈溶液(含体积分数 1% 的甲酸),梯度洗脱;柱温 35 $^{\circ}$ C;体积流量 0.3 mL/min;进样量 5 μ L。

质谱分析条件:离子源温度 120 $^{\circ}$ C;脱溶剂温度 300 $^{\circ}$ C;锥孔电压 30 V;MS 相对分子质量范围 200—1 000;光电倍增器 700 V;气体体积流量:4.2 L/h;离子方式 EIS⁻,毛细管电压 3.88 kV;EIS⁺,毛细管电压 3.87 V。

1.2.5 花青苷中糖毛细管电泳-电化学检测 标准溶液:葡萄糖、半乳糖储备液:1.0 mg/mL,用去

离子水配制,再用运行缓冲液稀释至所需质量浓度。样品溶液:在浓缩液中加入少量乙醇将色素溶解,取 0.3 mL 色素溶液加入 5 mL 2 mol/L HCl 溶液在 105 $^{\circ}$ C 烘箱中水解 3 h,得到水解液待用。所有溶液使用前均用 0.25 μ m 聚丙烯滤膜过滤。

毛细管电泳:使用自组装 CE-ED 装置,电化学检测为三电极体系(直径为 140 μ m 的铜圆盘电极为检测电极、铂丝为辅助电极、饱和甘汞电极为参比电极)。铜电极通过三维定位调节器,使之与毛细管出口在一条直线上,并尽可能靠近毛细管的末端。采用电动进样,检测池为阴极电泳槽,运行液为 50 mmol/L 的氢氧化钠溶液。

2 结果与讨论

2.1 花青苷的化学结构

黑米色素属于黄酮花青苷类化合物。花青苷是由花青素和糖成苷而成。花青素的基本结构是 2-苯基苯并吡喃,即花色基元(图 1),具有 C₆-C₃-C₆ 的分子结构。花青素是花色基元的羟基取代衍生物,通常在 3-,5-,7-碳位上有取代羟基,由于 B 环各碳位的取代基(羟基或甲氧基)不同,形成了多种的花青素,现已知的有 20 种。在自然状态下,游离的花青素极少见,大多以糖苷的形式存在,成苷的糖已知有 5 种,根据其在各种花青苷中的丰富程度,排列如下:葡萄糖>鼠李糖>半乳糖>木糖>阿拉伯糖,除单糖外还有可能是由这 5 种单糖结合形成的二糖。如果是单糖苷,成苷位置通常在 3-碳位。

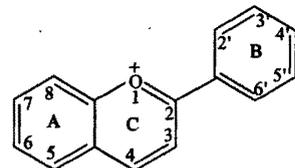


图 1 花色基元的结构

Fig. 1 The chemical structure of flavylum

2.2 黑米色素的紫外可见光谱分析

花青苷类化合物分别在 265~275 nm 和 465~560 nm 处有两个特征吸收峰。将黑米色素用乙醇溶解,进行紫外-可见光吸收光谱扫描,可以发现黑米色素在紫外区和可见光区处各有一个较强的吸收峰,其波长分别为 270 nm 和 520 nm,可推断黑米色素为花青苷类物质。

2.3 黑米色素的液相色谱图分析

由于黑米中大部分的花青苷集中在质量分数 10% 左右的黑米糠中,所以采用黑米糠作为提取黑米花青苷的原料。将黑米糠经过石油醚和乙酸乙

酯的脱脂处理,除去糠中的油脂及弱极性物质,用体积分数 80% 的乙醇溶液提取黑米色素,最后将色素通过弱酸性阳离子树脂纯化。将纯化前后的黑米色素分别进行高效液相色谱法分析对比,可以发现在提纯后样品的色谱图中,出峰数量减少,几乎没有杂质峰,说明提纯后黑米色素中杂质显著减少。图 2 为纯化后色素样品的高效液相色谱图,从图中可以看出黑米色素中主要含有两个组分,其中 9.8 min 出峰的组分为主要组分,质量分数为 90.63%; 12.8 min 出峰的组分为少量组分,质量分数达 6.36%。

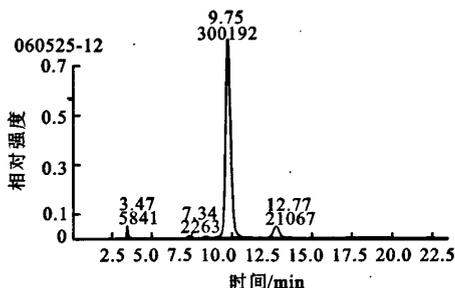


图 2 黑米色素的色谱图

Fig. 2 The liquid chromatographic of black rice pigment

2.4 黑米色素的质谱图分析

由于花青苷的对照品不易获得,所以仅采用高效液相色谱法无法对两种色素组分进行定性分析。

质谱法具有灵敏度高,定性能力强等特点,与液相色谱法结合,既发挥了色谱法的高分离能力,又发挥了质谱法的高鉴别能力,最适用于做多组分混合物中未知组分的定性鉴定。图 3 是 9.8 min 出峰组分的质谱图,从图中可知,9.8 min 出峰的色素的相对分子质量为 448。由于已知色素分子为花青苷,所以可推知其分子式为 $C_{21}H_{21}O_{11}$,该色素的结构是矢车菊花青苷,其中相对分子质量为 449 和 287 的分子离子峰($M+1$)相差 162,正好是一个六碳糖去掉一个 H_2O 之后的相对分子质量,与花青素成苷的糖的 5 种糖中,只有葡萄糖和半乳糖是六碳糖,所以成苷的糖只可能是葡萄糖或半乳糖。

图 4 是 12.8 min 出峰组分的质谱图,从谱图中可知,12.8 min 出峰的色素的相对分子质量为 462,可推知其分子式为 $C_{22}H_{23}O_{11}$,该色素的结构框架是芍药花青苷,其中相对分子质量为 463 和 301 的分子离子峰($M+1$)相差 162,也正好是一个六碳糖去掉一个 H_2O 之后的相对分子质量,所以取代基也可能是葡萄糖或半乳糖。矢车菊花青苷和芍药花青苷的结构如图 5。要确定两种色素中六碳糖的种类,首先要将糖从糖苷上水解下来,然后再分析。作者采用酸法完全水解法,用这种方法,可以将糖苷上的糖完全水解下来,成为单糖,无需分离,直接采用毛细管电泳电化学检测方法,作进一步分析。

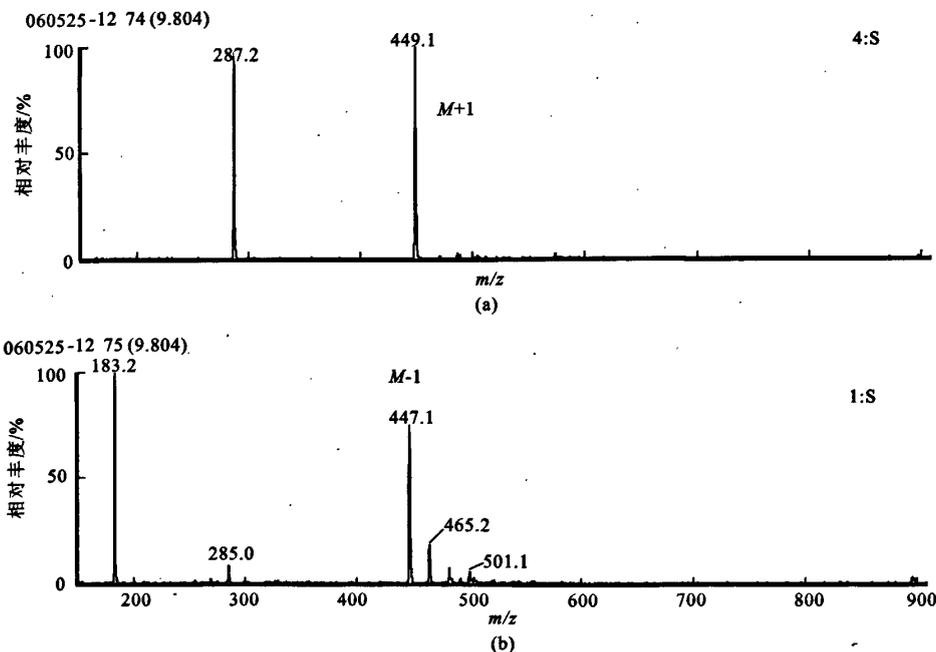


图 3 9.8 min 出峰组分的 MS 图

Fig. 3 The mass chromatographic of the component at 9.8 min

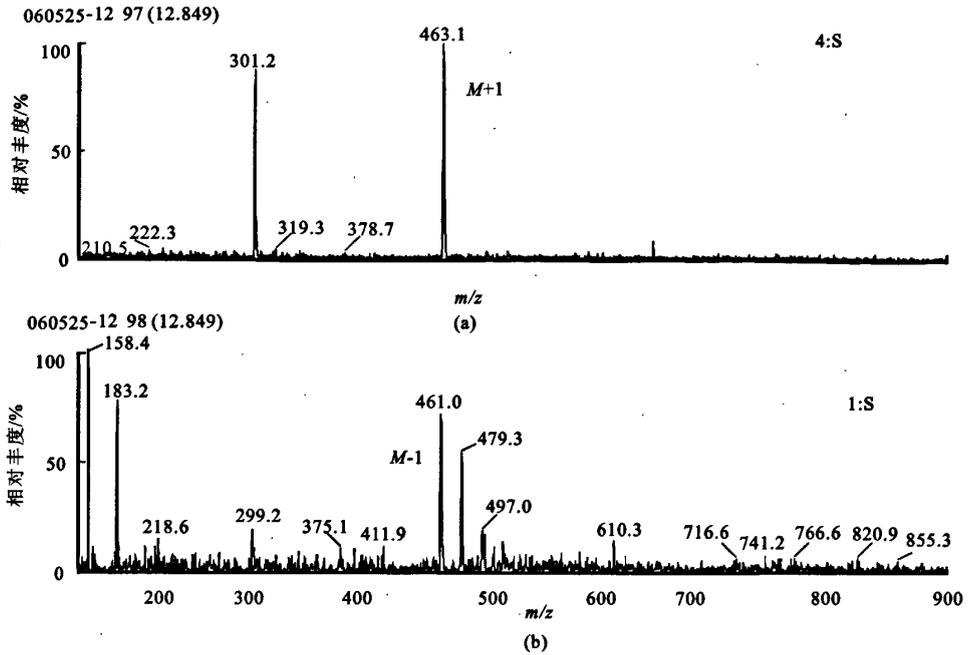


图 4 12.8 min 出峰组分的 MS 图

Fig. 4 The mass chromatographic of the component at 12.8 min

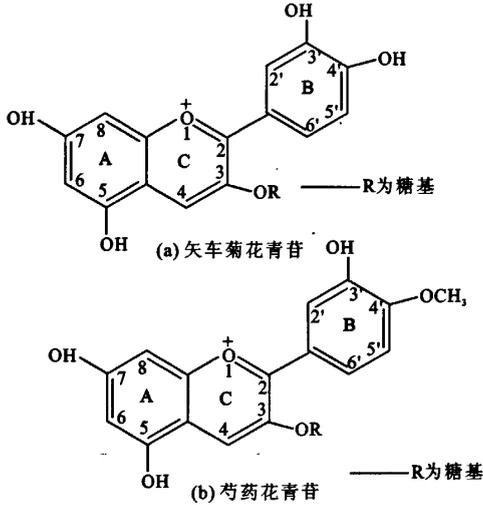


图 5 两种花青苷结构图

Fig. 5 The chemical structures of two anthocynsins

2.5 电泳条件的选择

2.5.1 半乳糖、葡萄糖的流体伏安图 图 6 为半乳糖和葡萄糖的流体动力学伏安图,由图可知,半乳糖和葡萄糖两种被分析物,从 0.45 V 开始,随检测电位的变大,峰电流迅速变大。但是对于该检测系统,随检测电位的增大,基体电流也迅速增加,当检测电位高于 0.65 V 时基线极其不稳定,信噪比

变小。综合灵敏度和稳定性的因素,选择检测电位为 0.65 V。

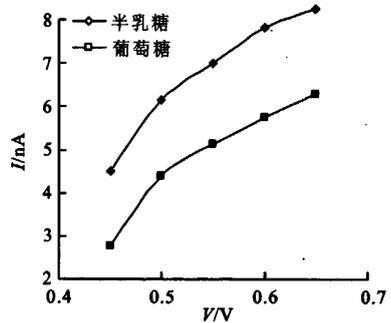


图 6 葡萄糖和半乳糖的流体动力学伏安图

Fig. 6 Hydrodynamic voltammogram (HDV) of galactose and glucose

2.5.2 运行缓冲液浓度的影响 运行缓冲液的种类和浓度影响分析时间及样品的分离度。由于被分离物质半乳糖、葡萄糖结构上的多羟基特性,在碱性条件下易发生氧化还原反应。因此,实验采用氢氧化钠为电介质溶液。实验研究了不同氢氧化钠浓度对迁移时间的影响,结果如图 7 示。随氢氧化钠浓度的增加,相应样品的分离度略有增大,迁移时间也增加,当氢氧化钠浓度较大时,由电泳电流增加而引起的电泳峰展宽较为严重,最终选择浓度为 50 mmol/L 的 NaOH 溶液作为运行缓冲液。

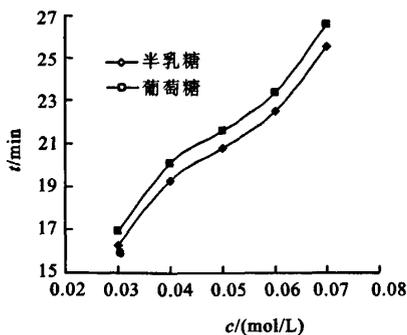


图7 氢氧化钠浓度对迁移时间的影响

Fig. 7 Effect on migration time with different concentration of NaOH

2.5.3 分离电压与进样时间的选择 分离电压是影响电渗流速和迁移时间的重要因素。分别考察了分离电压为10、12、14、16 kV时对迁移时间的影响。结果表明,加大分离电压能缩短分离时间,但电压过大,由于焦耳热等问题,基线噪音增大,并且两个峰有重叠,所以选择14 kV为分离电压。

在分离电压14 kV时,研究进样时间为4、5、6、

7、8 s时对峰电流的影响。结果显示,进样时间超过6 s,峰电流增加不明显,却引起峰展宽和拖尾等负面影响,因此选用6 s为进样时间,此时峰形较好,分析灵敏度高。

在优化条件下得到混合标准溶液的电泳谱图取200 μ L水解液,加运行液定容到1.00 mL,混匀后立即进样,测定了黑米色素水解液的毛细管电泳图。水解样品的图谱中在相应位置只出现一个峰,通过保留时间对比及加入对照品实验,确定水解产物中只有葡萄糖,因而可知黑米色素中两种成苷的糖均为葡萄糖。

3 结 语

采用液质联用技术(LC-MS)与毛细管电泳电化学检测法(CE-ED)对黑米色素的组成及结构进行分析,该方法准确、简单易行,尤其是将CE-ED技术引入此类化合物的鉴定尚未见有文献报道。结果表明,黑米色素主要含有两种花青苷色素,分别是矢车菊素-3-葡萄糖苷和芍药素-3-葡萄糖苷。

参考文献(References):

- [1] 黎杰强,朱碧岩,陈敏清. 特种稻米营养分析[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2005,1:95-98.
LI Jie-qiang, ZHU Bi-yan, CHEN Min-qing. Nutrient analysis of special rice[J]. *Journal of South China Normal University: Natural Science Edition*, 2005, 1:95-98. (in Chinese)
- [2] Seok H N, Sun P C, Mi Y K, et al. Antioxidative activities of bran extracts from twenty one pigmented rice cultivars[J]. *Food Chemistry*, 2006, 94: 613-620.
- [3] 李春阳,许时婴,王璋. DPPH法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(2):108-112.
LI Chun-yang, XU Shi-ying, WANG Zhang. Measuring the antiradical efficiency of proanthocyanidin from grape seed by the DPPH assay [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(2):108-112. (in Chinese)
- [4] 李春阳,许时婴,王璋. 葡萄籽原花青素结构单元的红外光谱分析[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(4):47-51.
LI Chun-yang, XU Shi-ying, WANG Zhang. The analysis of the infrared spectra of grape seed proanthocyanidins [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(4):47-51. (in Chinese)
- [5] 马银海,彭永芳,张永丽,等. AB-8树脂吸附和分离黑糯米黑色素[J]. 食品科学,2000,21(12):93-94.
MA Yin-hai, PENG Yong-fang, ZHANG Yong-li, et al. Adsorption and separation black sticky rice pigment with AB-8resin[J]. *Food Science*, 2000, 21(12):93-94. (in Chinese)
- [6] 金苏为. 黑米色素的提取和组分分析[J]. 福建农业大学学报,1999,28(2):233-237.
JIN Su-wei. Extraction and components analysis of black rice pigment [J]. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1999, 28(2):233-237. (in Chinese)
- [7] 夏效东,凌文华,郑琳,等. HPLC法测定黑米皮提取物中花色苷成分及含量[J]. 食品科学,2006,27(2):206-208.
XIA Xiao-dong, LING Wen-hua, ZHENG Lin, et al. Determination of anthocyanin component and content in black rice extract by HPLC [J]. *Food Science*, 2006, 27(2):206-208. (in Chinese)
- [8] 钟丽玉,胡秋林. 黑米色素分子结构解析[J]. 中国粮油学报,1996,11(6):26-35.
ZHONG Li-yu, HU Qiu-lin. Analysis of molecular structure of black rice pigment[J]. *Journal of Chinese Cereals and Oils Association*, 1996, 11(6):26-35. (in Chinese)
- [9] 张名位,郭宝江,张瑞芬,等. 黑米抗氧化活性成分的分纯化与结构鉴定[J]. 中国农业科学,2006,39(1):153-160.
ZHANG Ming-wei, GUO Bao-jiang, ZHANG Rui-fen, et al. Separation, Purification and identification of antioxidant compositions in black rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(1):153-160. (in Chinese)
- [10] 徐杰,林正眉. 贵州黑糯米稻米种皮成分的分纯化与结构鉴定[J]. 中国粮油学报,2003,18(2):9-13.
XU Jie, LIN ZHEN-mei. Purification and structure identification of skin components in guizhou black glutinous rice grains [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2003, 18(2):9-13. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)