

黑米色素分子结构解析

钟丽玉 胡秋林

(食品学院)

摘要 用纸层析、紫外-可见扫描及气相色谱结合的方法,对黑米色素的分子结构进行鉴定结果表明样品 91-53 黑米色素为水溶性花色苷类化合物,由矢车菊花色苷-3-鼠李糖苷和芍药花色苷-3-阿拉伯糖苷等 5 种色素化合物组成,其颜色呈玫瑰红色,可以作为一种具有天然保健功能的色素添加剂。

主题词 色素;色谱仪;食品/黑色素

中图分类号 TS210.1

0 前言

近几年黑色食品风靡世界,其主要原因:1) 黑色食品营养价值高,以黑米为例,其必需氨基酸比普通米高 25%,矿物元素比普通米高 5~7 倍,维生素含量高 1.5~24 倍^[1]。2) 黑色植物中普遍存在黑色素(Black Pigment)属于黄酮类化合物,有滋阴、补肾等保健功能。3) 食物中黑色素是一种水溶性的天然色素,能促进人们的食欲。

粮油产品中的黑色植物有充足的资源。为了进一步开发黑色食品,作者主要对黑米黑色素结构进行剖析,其他植物黑色素亦可以借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

全黑梗 91-53 上海农科院提供。皮为深黑色,胚乳浅黑色。

1.2 方法

糖的定性定量分析 衍生化气相色谱法^[2] 黑米色素含量的测定 单 pH 比色法
色素框架扫描图 UV-Visible Recording 色素的分离纯化 离子交换柱层析法

2 结果与讨论

2.1 黑米色素的一般性质

2.1.1 pH 对黑米色素颜色变化的影响 黑米色素在中性介质中为紫红色,碱性条件下为蓝色,酸性条件下为玫瑰红色,随 pH 的降低,颜色越趋鲜亮。

收稿日期:1995-05-18

2.1.2 黑米色素的光谱特征 如图1. 黑米色素在 $\lambda_{\text{max}} = 525$, 随 pH 值的改变, λ_{max} 基本不变, 而峰高随之改变, pH 值低, 峰高增高, 说明溶液的颜色加深。

2.1.3 黑米色素的颜色反应 将黑米色素经物理或化学处理, 观察其颜色变化, 结果如表1. 将表1与植物色素标准颜色反应比较^[4], 可以初步得出定性的结果, 黑米色素属于黄酮类花色苷化合物, 其结构通式如下:

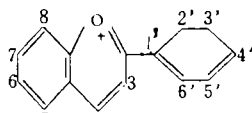


表1 黑米色素的重要颜色反应

处理方法	颜色反应
可见光下	紫红色
紫外光下	暗红色
氨薰蒸后可见光下	蓝色
在 Na_2CO_3 介质中	蓝色
浓 H_2SO_4 介质中	红橙色
Mg^{2+} 的盐酸溶液中	粉红色
Na-Hg 的盐酸溶液中	黄橙色
FeCl_3 的溶液中	浅蓝色
中性醋酸铅溶液中	浅蓝色沉淀

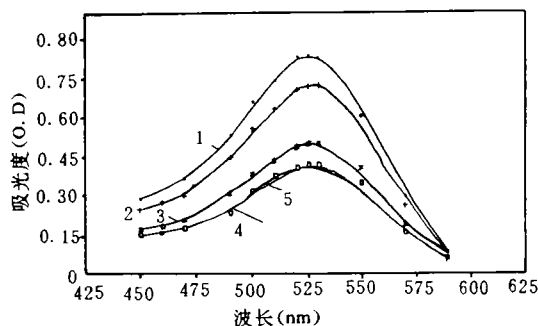


图1 不同 pH 条件下黑米色素的光谱图

1 pH=1 2 pH=2 3 pH=3 4 pH=4 pH=4.6

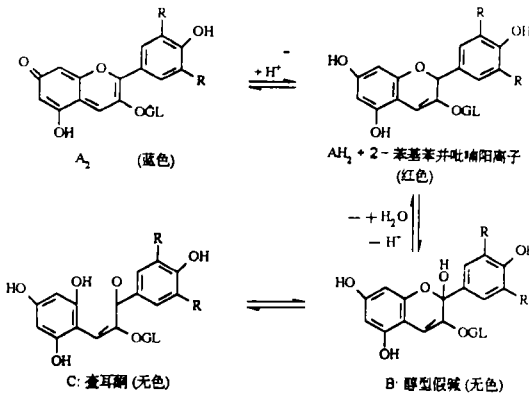


图2 花色苷构型随 pH 变化图

花色苷的苯基并吡喃环上缺电子, 在不同的 pH 值条件下, 有多种型态存在, 如图2.

这是花色苷类化合物颜色随 pH 变化的规律的原因。

2.2 黑米色素分子结构解析

黑米色素是花色苷类化合物, 但依照环上取代基的不同, 又分为许多种, 并通过不断研究, 也有新的发现。黑米色素究竟属什么样的取代情况, 这是本研究的重点。对物质分子结构的解析, 一般要分为三个步骤: 提取; 分离或纯化; 结构鉴定。

2.2.1 提取 工艺见图3.

2.2.2 分离与纯化 分别拿硅胶柱色谱、纸层析及薄层层析作对照实验, 经分析比较选择以纸层析(PC)的方法最为简便、可行。

取 Whatman No. 3 层析纸(30×30cm), 选择一边, 在离边 2cm 处画一点样线, 然后用微量注射器把黑米色素粗品点样, 晾干后折成环形, 放入层析筒中, 层析时间为 12h. 将纸筒取出在背光处晾干, 由于黑米色素本身具有颜色, 所以不需要显色处理。经过 BAW 层析, 成 5 种谱带, 其中 1[#]、2[#] 谱带较宽, 二者合起来占总量的 96% 以上, 见表2.

由于处于 3[#]、4[#]、5[#] 位置的谱带的色素含量较低, 很难富集, 所以实验中主要分析 1[#]、2[#] 两种色素。将 1[#]、2[#] 谱带分别剪下, 用水: 甲醇: 醋酸(25: 70: 50, V/V) 浸泡 12h, 然后过滤, 在旋转蒸发器中于 45℃ 下浓缩至原体积的 1/4, 按上述的方法点样, 放入正丁醇 2mol/L 盐酸(1: 1, V/V) 溶液中层析 10h, 取出背光晾干, 然后用同样的方法, 以水: 醋酸(85: 15, V/V) 为展开剂, 重复上述实验, 进一步纯化, 可以得到纯的花色苷单体, 用纸层

析鉴定;纯化后的花色苷在不同展开剂中层析,始终只有一个斑点;在 $\lambda=250\sim600\text{nm}$ 范围中的光谱扫描,具有特征吸收峰。经过上述三个层析过程处理后的若干张图,将各自的谱带剪下,放入 0.01HCl 甲醇溶液中浸泡 12h,过滤后于 45℃ 下于旋转蒸发器中浓

表 2 正丁醇-2mol/L 盐酸层析数据分析

位 置	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]
R_f	0.41	0.39	0.37	0.33	0.29
斑点颜色	桃红	大红	蓝紫	紫红	土红
相对含量*(%)	21.0	76.1	1.4	1.0	0.5

* 以谱带的面积计算

缩至原体积的 1/3,即得 1[#]、2[#]样色素的纯化单体富集品,供以下分析使用。

2.2.3 分子结构解析 对花色苷类化合物分子结构鉴定,六七十年代,国外曾经有过大量的研究和报道^[3~5]。归纳起来是以下三个步骤进行:

1) 配基分子结构框架的确定 花色苷化合物的所有结构类型汇于图 4 中,不同类型

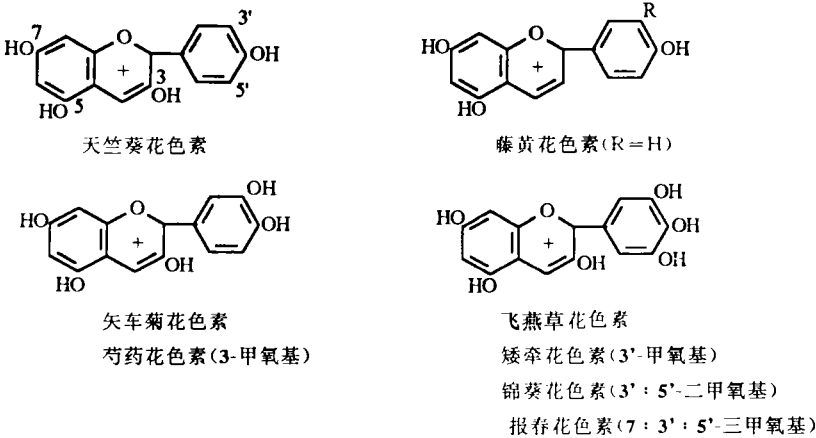


图 4 花色苷类化合物的结构类型

的结构的化合物表现出的紫外可见光光谱图也有很大的差异^[4],利用这种差异进行鉴定已经成为一种经典的分析方法。光谱图中最主要的特征是在可见光区($\lambda=400\sim600\text{nm}$),有强的吸收峰,依据各自结构的不同,最大吸收峰的位置 λ_{max} 有差异,又由于取代基在配基上位置及数量的不同,也会引起谱带曲线有规律的变化,其中 $E_{440}/E_{\lambda_{\text{max}}}$ 的比值最重要,它能准确地反映出取代基的位置。另外,花色苷中有些化合物在滴加 AlCl_3 后,曲线有位移现象,而有些没有。这样就可以依据光谱图中 λ_{max} 、 $E_{440}/E_{\lambda_{\text{max}}}$ 后 $\Delta\lambda_{\text{max}}$ 的变化情况,对花色苷化合物分析确定其结构框架,见表3及表4。

对1[#]、2[#]富集品进行光谱扫描,纯的1[#]、2[#]富集品,用0.01% HCl 甲醇溶液进行稀释,浓度的高低以扫描图中可见光区最大峰的位置适当为准。用含0.01% 盐酸的甲醇溶液作参比,扫描范围190~700nm。为确定最大吸收峰在加入 AlCl_3 后有无位移,在比色皿中加入2~3滴含5%(W/V) AlCl_3 甲醇溶液,用洁净的细玻棒搅匀,静置5min后,立即测定得图5及图6,分析数据列于表5。

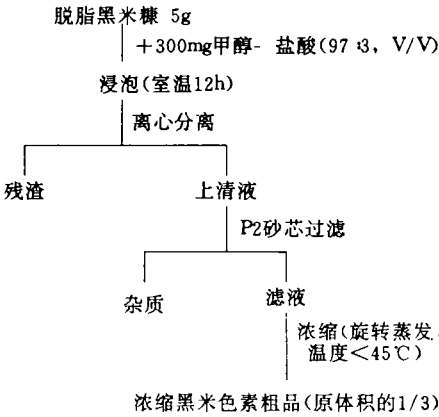


图 3 甲醇-盐酸溶剂提取黑米色素工艺图

表3 花色素化合物光谱特征		
名 称	甲醇-盐酸溶液中 $\lambda_{\max}$ (nm)	AlCl_3 位移 $\Delta\lambda_{\max}$ (nm)
天竺葵花色素	546	23
锦葵花色素	542	0
矮牵牛花色素	543	24
飞燕草花色素	546	23
玫瑰花色素	524	0
芍药花色素	532	0
矢车菊花色素	535	18
藤黄花色素	493	52
芹菜花色素	476	0

通过以上的分析,可以确定1[#]样品为芍药花色素,在3位有取代;2[#]样品为矢车菊花色素,也是在3位有取代。

2) 取代基类型的确定 在所确定的配基结构上,其中 R_1 、 R_2 有待进一步确定,但 R_1 、 R_2 是糖类物质的概率极大^[6],并且以葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖为最多,有时也有二糖或三糖的形式存在。要鉴定 R_1 、 R_2 的类型,首先要将糖从配基上水解分离出来,

表4 花色素及其衍生物光谱特征			
名 称	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\text{E}_{440}/\text{E}_{\max}$ (%)	平均 (%)
天竺葵花色素	520	39	39
天竺葵花色素3-成苷	506	38	
5 矢车菊花色素	535 *	19	23
矢车菊花色素3-成苷	525 *	22	
芍药花色素	532	25	
芍药花色素3-成苷	523	26	18
飞燕草花色素	544 *	16	
飞燕草花色素3-成苷	535 *	18	
矮牵牛花色素	543 *	17	
矮牵牛花色素3-成苷	535 *	18	
锦葵花色素	542	19	
锦葵花色素3-成苷	535	18	17
天竺葵花色素3-未成苷	513	15	
天竺葵花色素3.5成苷	504 *	21	12
矢车菊花色素3.5成苷	522	13	
芍药花色素3.5成苷	523	12	10
芍药花色素3-未成苷	523	12	
飞燕草花色素3.5成苷	534 *	11	10
矮牵牛花色素3.5成苷	533 *	10	
锦葵花色素3.5成苷	533	9	

* 表示加入 AlCl_3 后 $\lambda_{\max}$ 有位移发生。
介质为0.01% HCl 的甲醇溶液,实验误差为 $\pm 2\%$ 。

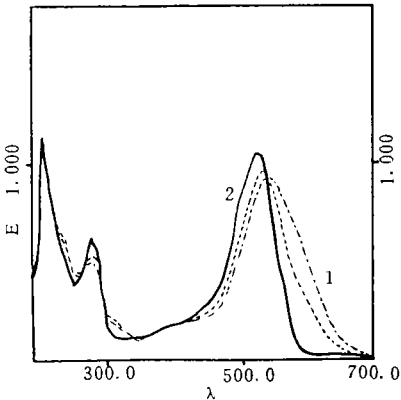


图5 2[#]样品 UV 扫描图

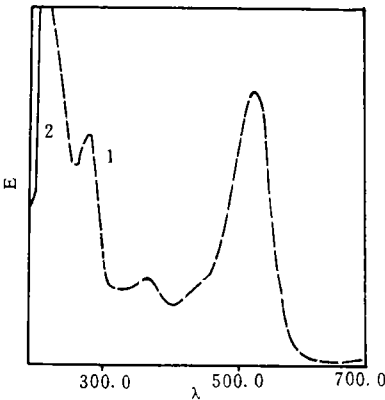


图6 1[#]样品 UV 扫描图

1 加 AlCl_3 2 未加 AlCl_3

然后再进行分析鉴定。作者用酸法完全水解法,可以将配基上的糖完全水解下来,成为单糖分子。具体方法见图7所示。

过去对单糖的鉴定通常是采用纸层

表5 1[#]、2[#]样品 UV 扫描图数据分析

名 称	1 [#] 样品	2 [#] 样品
$\lambda_{\max}$	526	528
$\text{E}_{440}/\text{E}_{\lambda_{\max}}$	28	24
$\Delta\lambda_{\max}$	0	19
花色苷 框架结构 推断图		

析(PC)或薄层层析(TLC)法^[7],其缺点是不敏锐,性质相近的单糖不易分开,定量分析的误差较大。作者采用气相色谱法(GC)对单糖进行定性定量分析。

糖本身为多元醇,分子量高,挥发性小,稳定性差,在气相色谱分析中不能直接进样分析,需要对样品进行衍生化处理。作者采用酰基衍生法,具体方法是:分别称取葡萄糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、阿拉伯糖及木糖的标准样各10mg,放入试管中,加上1[#]、2[#]水解产物,

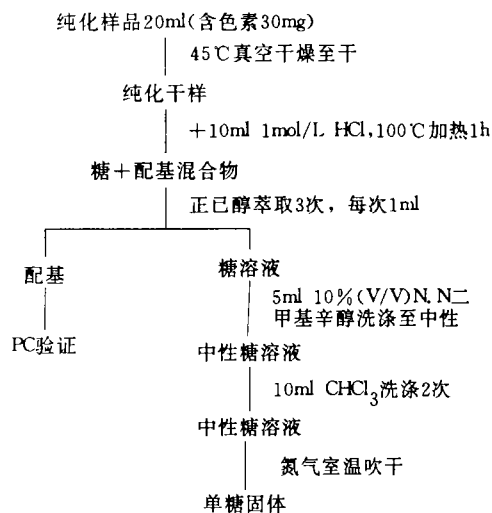


图7 糖基完全水解流程图

共8个样。每个样中加入8mg的盐酸羟胺及0.5ml吡啶,放入90℃的水浴锅内反应10min并振荡,取出冷却后,再加入0.3ml乙酸酐,在90℃下继续加热20min,使之进行乙酰化反应,取出后冷却至室温,用氮气吹干,在每只试管中分别加入0.5CHCl₃,然后直接进样分析,GC图谱见图8,色谱分析条件为:

柱子 OV1701,石英玻璃毛细管柱,25m×Φ0.33mm

检测器 FID,分流比100:1,190 240℃ 2'

温度 INJ=270℃,DEF=250℃,COL=3' 3℃/min

灵敏度=10' ATTE=3(1/8)

N₂=1ml/min, H₂=45ml/min, Air=450ml/min

由表6可以看出1[#]样中的取代物为阿拉伯糖,2[#]样为鼠李糖取代,并且糖与配基的摩尔比分别为0.93:1与0.95:1,近似于1:1,其中有实验误差。说明两种糖都是以单糖的方式连接,只可能有一种排列方式,不需要用部分水解法来确定糖的排列顺序了,所以可以推断两种色素的分子结构的可能形式为图9。

即1[#]样品黑米色素为芍药花素-3-阿拉伯糖苷,2[#]为矢车菊花色素-3-鼠李糖苷。

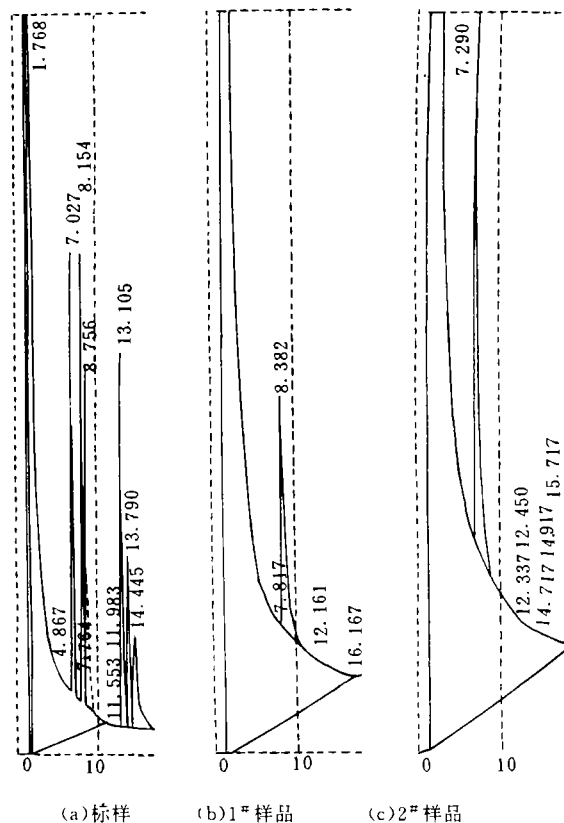


图8 单糖气相色谱分析图谱

表6 气相色谱数据分析

样 品 号	1 [#] 样品	2 [#] 样品
进样量 (μl)	0.2	1.0
保留时间 (min)	8.382	7.290
峰面积	0.4009	2.3643
糖名称	阿拉伯糖	鼠李糖
糖含量 (mg)	10.13	10.16
糖:配基(摩尔比)	0.93:1	0.95:1

糖类型定性用保留时间推出^[8]

糖含量采用“峰面积计算法”

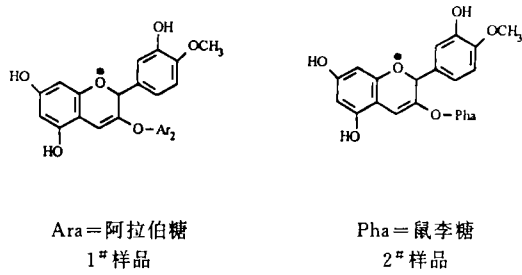


图9 1[#]、2[#]样品分子结构推断图

3 结 语

- 1) 由定性分析(重要颜色反应),得知黑米色素主要是花色苷类化合物,它在溶液中以4种结构存在,这些结构的相对比例,依据 pH 值变的变化而变化,其中以2- 苯基苯并吡喃阳离子最稳定,而醇型假碱型最不稳定。
- 2) 纸层析(PC)技术用于花色素类化合物的分离与提纯,效果理想,分析出黑米色素是由5种花色苷化合物组成。
- 3) 实验证明,采用纸层析、紫外可见光扫描及气相色谱对花色苷类化合物的结构进行解析,结果表明1[#]样品为 Cyanidin-3-鼠李糖苷、2[#]样品为 Peonidin-3-阿拉伯糖苷,这种分析方法方便、易行、准确,尤其是将 GC 技术引入此类化合物的鉴定是具有先进性的。
- 4) 其他黑色植物黑色素的分析可借鉴本分析方法。

Anlyse the Molecule Structure of the Black-rice Pigment

Zhong Liyu Hu Qioulin
(Shool of Food Science & Technology)

Abstract Black-Food is famous for rich in nutrition. In oder to develop the utilization of the natural black-pigment had been studies. The methods, including PC, GC, UV-Rpectrophotograph et. al, were adopted to analyse the molecule structure of the pigment. The results are that five water-soluble anthocyanines were found in the pigment of 91-53 black-rice, in which the two main anthocyanines are eyanidin -3-rhamnoside and peonidin - 3-arbinoside. The pigment is purple-redand. It can be used as a natural helathy pigment-ad-ditive.

Subject-words Pigments; Chromatographs; Food / Black-Pigments