

杨梅中主要花色苷的组成与结构*

杜琪珍, 姜 华, 徐渊金

(浙江工商大学食品与生物工程研究所, 浙江 杭州, 310035)

摘 要 采用 $V(\text{甲醇}):V(\text{甲酸})=19:1$ 溶液提取杨梅中的花色苷,并用阳离子交换树脂初步纯化得到杨梅花色苷提取物,然后以水-正丁醇-甲基叔丁基醚(TBME)-乙腈-三氟乙酸(TFA)(体积比 $5:2:1.5:1:0.001$)为溶剂系统,用高速逆流色谱对杨梅花色苷进行分离。再由 C_{18} 柱色谱纯化后,得到 2 种主要的花色苷单体 I 和 II。经 ESI-MS 和 NMR 鉴定为矢车菊素-3- β -吡喃型葡萄糖苷(I)和飞燕草素-3-葡萄糖苷(II)。另外,文中对 3 个杨梅品种的花色苷组成进行了分析,结果表明,矢车菊素-3- β -吡喃型葡萄糖苷是杨梅花色苷的主要组成成分,占花色苷总量的 90% 以上。

关键词 杨梅,花色苷,结构鉴定,组成分析

杨梅是我国人民喜爱的水果,在浙江、湖南、福建等省份有较大面积的种植。杨梅中的花色苷^[1]具有抗氧化^[2,3]、抗癌^[4,5]、抗炎^[6]、抗衰老^[6]、促进视红细胞再生、改善夜间视觉和防止视觉疲劳等作用^[7]。花色苷在日本、美国、欧洲等国家已广泛应用于医药和保健食品行业。因此,研究杨梅中的花色苷组成对了解杨梅中的生物活性成分,并进一步开发杨梅资源具有十分重要的意义。

由于杨梅花色苷的分离制备比较困难,故其所含的花色苷成分的化学结构仅有间接的实验研究^[8]。本实验采用高速逆流色谱技术对杨梅中的花色苷进行分离制备,取得了良好的分离效果。同时,采用电喷雾离子化质谱(ESI-MS)、 ^1H -和 ^{13}C -核磁共振(NMR)对分离获得的两种花色苷结构进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

新鲜余姚杨梅,市售;乙酸乙酯(分析纯(AR))、正丁醇(AR)、甲基叔丁基醚(AR)、乙腈(AR)、盐酸(AR)、甲酸(AR)、甲醇(AR)、乙腈(色谱级),均购自华东医药股份有限公司。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(Waters2695 HPLC-996 PDA),美国 Waters;高速逆流色谱仪(HSCCC-D1000),浙江工商大学;紫外(UV)检测器,大连依利特;色谱数据工作站(E-3000);分部收集器(B-684),

瑞士步琪(Büchi)公司;泵(K-1800),德国诺尔(Knauer)公司;LC-MS 仪(Esquire 3000),德国布鲁克(Bruker)公司;NMR 仪(AVANCE DMX 500),德国 Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 杨梅花色苷的提取

将 10 kg 新鲜余姚杨梅以 5 倍体积(50 L)的 0.1% $V(\text{HCl}):V(\text{甲醇})=1:9$ 溶液避光浸提,且每隔 12 h 间隔搅拌 1 次。48 h 后,用纱布过滤,得深红色甲醇浸提液和滤渣。滤渣用 20 L 同一溶剂浸提 48 h,过滤得甲醇浸提液。将 2 次甲醇浸提液合并,并在 38℃ 下减压浓缩成浆状。再将得到的浆状物溶于适量的去离子水后,用乙酸乙酯萃取,以除去脂溶性杂质。

将水相减压浓缩后,过阳离子交换柱(DIAION HP2MGL)。先用 0.1% 的盐酸-水溶液淋洗至洗脱液无色,以除去非离子型杂质。再用含 5% 甲酸的甲醇溶液洗脱,收集洗脱液。所得洗脱液减压浓缩后冷冻干燥,即得杨梅花色苷提取物(TAW)53 g。

1.3.2 杨梅花色苷的 HSCCC 分离

采用高速逆流色谱仪分离杨梅花色苷提取物中的花色苷。溶剂系统:水-正丁醇-甲基叔丁基醚-乙腈-三氟乙酸(体积比 $5:2:1.5:1:0.001$),上相为固定相,下相为流动相。转速 700 r/min。流速 3 mL/min。样品溶液:取粗提物 3 g 溶于 50 mL 流动相中,在流动相的带动下注入高速逆流色谱仪。当流动相从检测器流出时记录色谱,并用部分收集器收集。

1.3.3 杨梅花色苷的 HPLC 分析^[9]

第一作者:博士,研究员。

*教育部重点科技项目(204062)

收稿日期:2008-01-16,改回日期:2008-06-24

HPLC 条件: 色谱柱, YMC-Pack ODS-AQ (3 μm , 150 mm \times 4.6 mm i. d.); 流动相, A: V(水): V(甲酸)=97:3, B: V(乙腈): V(甲酸)=97:3。

洗脱梯度: 0~15 min, 95% A~85% A; 15~20 min 85% A; 20~27 min, 85% A~60% A; 27~35 min, 60% A~95% A。流速 0.8 mL/min。检测波长 280、520 nm。

1.3.4 C_{18} 柱层析纯化

将逆流色谱分离获得的花色苷组分通过 C_{18} (15~25 μm , 日本富士通公司) 柱层析进一步纯化, 以获得高纯度的单体。柱层析条件: 组分 I 用甲醇-水-甲酸(体积比 33:64:3)进行洗脱; 组分 II 用甲醇-水-甲酸(体积比 25:72:3)进行洗脱。流速 2 mL/min。

1.3.5 波谱分析

采用 ESI-MS 和 NMR 对组分 I 和组分 II 进行波谱分析。 ^1H -NMR 记录的频率为 500.13 Hz, ^{13}C -NMR 记录的频率为 125.75 Hz。样品以氘代试剂

$\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (体积比 9:1) 溶解。

2 结果与分析

2.1 杨梅花色苷 HSCCC 分离结果

杨梅花色苷粗提物经高速逆流色谱分离后, 获得 2 个色谱峰 1 和峰 2 (见图 1)。分别冷冻干燥后, 得到组分 A 和组分 B, 并将组分 A 和 B 用 HPLC 分析, 结果如图 2 所示。从图 2 中可看出, 不论是在 280 nm 还是 520 nm 提取的色谱图, 组分 A、B 中都基本上只

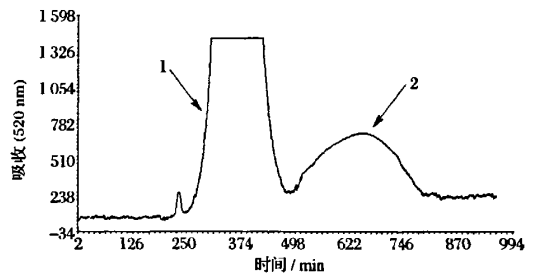


图 1 杨梅花色苷的 HSCCC 分离结果

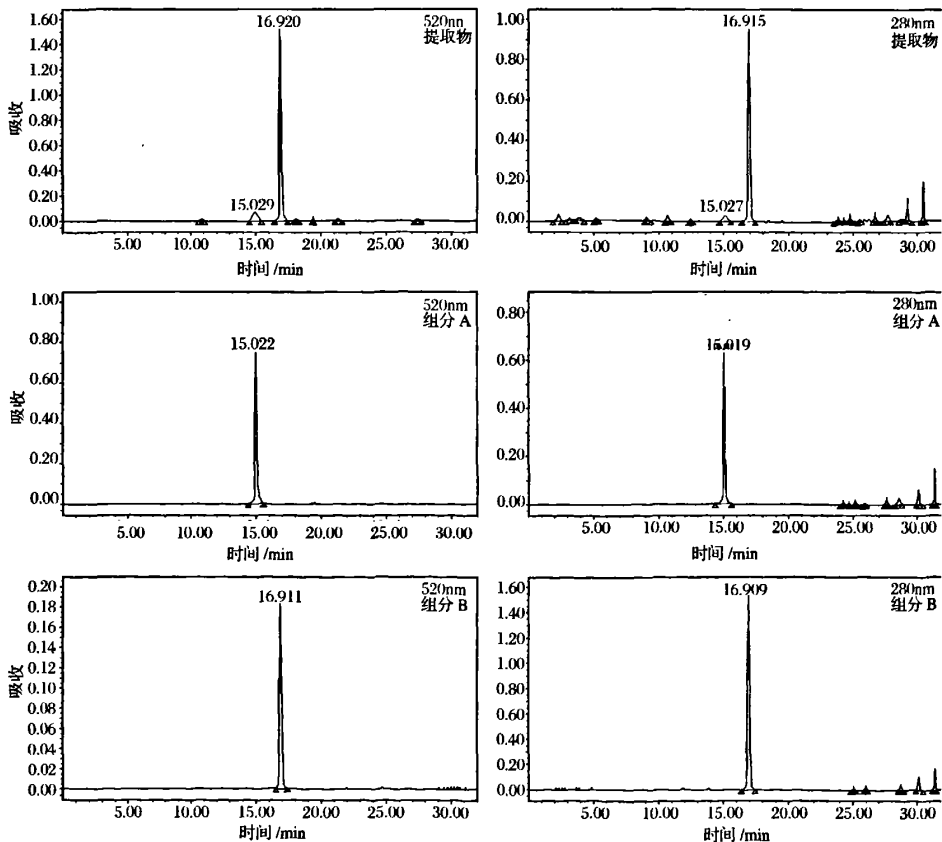


图 2 杨梅花色苷提取物及 HSCCC 分离组分的 HPLC 分析图谱(520 nm, 280 nm)

含有1种花色苷。而从520 nm提取的色谱图可以看出,杨梅花色苷粗提物花色苷组成较为简单。按峰面积计算,1种花色苷的含量占91%,另1种占6%,而其他花色苷含量均非常低。从280 nm提取的色谱图来看,杨梅花色苷粗提物还含有一些极性较高和极性较低的杂质,有待进一步分离纯化。又由于杨梅花色苷组分A和B所含的杂质的极性较小,可用C₁₈柱层析对其进行纯化。

2.2 组分A和组分B的C₁₈柱层析纯化

组分A和组分B经过C₁₈柱层析纯化后得到2个杨梅花色苷单体——花色苷单体I和花色苷单体II。纯化后的2个杨梅花色苷单体I和II的杂质已基本去除,其纯度均达到98%以上。

2.3 结构鉴定

花色苷单体I:ESI-MS; m/z 449,为分子离子峰[M]⁺;m/z 287为脱去一个葡萄糖的碎片峰[M-162]⁺,即矢车菊色素配基离子峰。¹H-NMR和¹³C-NMR信号峰指认见表1。综合分析,花色苷单体I可鉴定为矢车菊色素-3-β-吡喃型葡萄糖苷(Cyanidin-

3-O-β-D-Glucopyranoside, Cy3G)(图3)。NMR数据与文献报道一致^[10]。

花色苷单体II:ESI-MS; m/z 465,为分子离子峰[M]⁺;m/z 303为脱去1个葡萄糖的碎片峰[M-162]⁺,即飞燕草色素配基离子峰。¹H-NMR和¹³C-NMR信号峰指认见表1。综合分析,花色苷单体II可鉴定为飞燕草色素-3-葡萄糖苷(delphinidin-3-O-β-D-Glucopyranoside, Dp3G)(图3)。NMR数据与文献报道一致^[11,12]。

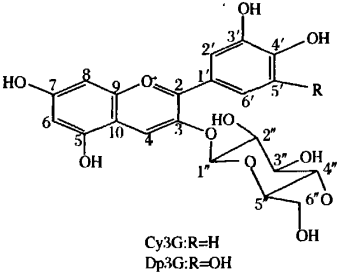


图3 杨梅中2种花色苷的结构

表1 花色苷单体I和II的核磁共振信号峰归属

碳位置	花色苷单体 I		花色苷单体 II	
	¹³ C-NMR(δ ppm)	¹ H-NMR(δ ppm) J(Hz)	¹³ C-NMR(δ ppm)	¹ H-NMR(δ ppm) J(Hz)
2	162.98		164.52	
3	144.65		146.28	
4	135.76	8.98, s	136.37	8.93, s
5	158.94		157.72	
6	102.49	6.64, d, 2.0	102.89	6.62, d, 2.0
7	169.61		169.98	
8	94.24	6.85 d, 1.5	95.33	6.84, d, 1.5
9	158.32		158.66	
10	112.39		112.96	
1'	120.23		119.82	
2'	117.45	7.98 d, 2.5	112.78	7.74, s
3'	146.43		147.71	
4'	154.84		145.03	
5'	116.50	6.98 d, 9.5	147.71	
6'	127.35	8.20 dd, 8.5, 2.0	112.96	7.74, s
	3-O-Glu		3-O-Glu	
1''	102.79	5.31 d, 8.0	103.70	5.32, d, 7.5
2''	73.88	3.62, m	74.61	3.63, m
3''	77.23	3.59, m	78.17	3.59, m
4''	70.17	3.50, t	70.88	3.50, t
5''	77.86	3.78, m	79.03	3.79, m
6''	61.45	3.98 dd, 12.0, 2.5	62.69	3.95, dd, 12.0, 2.0

2.4 不同品种杨梅花色苷组成

不同品种杨梅花色苷的 RP-HPLC-DAD(反相高效液相色谱-二极管阵列检测器)测定结果如表2。

结果表明,颜色较为一致的余姚碳梅(黑红)和仙居仙梅(黑红)的花色苷总含量接近,为8.52和8.67 mg/g干重;而颜色较浅的东魁杨梅(深红)的花色苷总含

量要低得多,为 5.81 mg/g 干重。3 种杨梅的花色苷组成差异相对较少,矢车菊色素-3-葡萄糖苷(Cy3G)的含量均在 90% 以上,而飞燕草色素-3-葡萄糖苷(Dp3G)及其他一些未知化合物的含量不到 10%。值得一提的是,余姚碳梅比其他 2 个品种含有相对较高的 Dp3G。

表 2 不同品种杨梅花色苷含量与组成

保留时间 /min	花色苷单体 名称及含量 /%	花色苷总量/mg·g ⁻¹ (干重)		
		8.52	8.67	5.81
		余姚碳梅 (黑红)/%	仙居仙梅 (黑红)/%	东魁杨梅 (深红)/%
10.3	UN1	0.31	0.38	0.39
14.8	Dp3G	6.04	0.85	1.02
16.7	Cy3G	91.31	97.28	97.46
18.8	UN2	0.35	0.22	—
20.6	UN3	1.48	1.04	0.82
25.7	UN4	0.51	0.23	0.31

UN: 未知成分。

3 结 论

本研究通过高速逆流色谱等技术从杨梅中分离出矢车菊色素-3-葡萄糖苷和飞燕草色素-3-葡萄糖苷,并通过 MS、NMR 等现代技术对这 2 种花色苷结构进行了鉴定,从而确证了杨梅中的主要花色苷组成。而杨梅中主要花色苷组成的化学结构的确认,对研究杨梅花色苷的稳定性、定量测定杨梅及杨梅制品的花色苷含量均具有一定的指导意义。

以往,有关杨梅花色苷的研究主要集中在其稳定性方面,杨梅花色苷组成与杨梅颜色之间的关系也未有报道。本试验比较分析了 3 个品种花色苷组成,得出了花色苷含量对色泽的贡献。即花色苷含量低于 6% 的杨梅表现为深红,大于 8% 则表现为黑红。

本研究发现杨梅花色苷的 90% 为矢车菊色素-3-葡萄糖苷,该种花色苷的生物活性已得到较多的研究结果支持^[14],可望开发成功能性食品或药品。而本研究采用的高速逆流色谱分离方法可放大为工业化的制备技术^[15]。因此,以杨梅为资源,辅以逆流色谱技术,可望较大规模制备高纯度的矢车菊色素-3-葡萄糖苷。

参 考 文 献

- 1 马银海,彭永芳,庞 敏,等. 杨梅红色素的提取研究[J]. 食品科学,2004,25(7):112~113
- 2 Russo A, Bonina F, Acquaviva R, et al. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of a red orange extract [J]. Food Science, 2002, (67):2 814~2 818

- 3 Amorini A M, Fazzina G, Lazzarino G, et al. Activity and mechanism of the antioxidant properties of cyanidin-3-O- β -glucopyranoside [J]. Free Radical Research, 2001, (35):953~966
- 4 Hagiwarara A, Miyashita K, Nakanishi T, et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1, 2-dimethylhydrazine [J]. Cancer Letters, 2001, (171):17~25
- 5 Wang J, Mazza G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN γ -activated RAW 264.7 macrophages [J]. Agricultural Food Chemistry, 2002, (50):4 183~4 189
- 6 Wang H, Muraleedharan G N. Antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries [J]. Journal of Natural Products, 1999, 62(2): 294~296
- 7 Galuano F, Fauci L La, Lazzarino G, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2004, 15(1):2~11
- 8 叶兴乾,陈健初,苏 平. 荸荠种杨梅的花色苷组分鉴定[J]. 浙江农业大学学报,1994,20(2):188~190
- 9 Du Q, Jerz G, Winterhalter P. Isolation of two anthocyanins sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045:59~63
- 10 Slimestad R, Andersen Φ M. Cyanidin-(2- glucosylgalactoside) and other anthocyanins from fruits of *Cornus suecica* [J], Phytochemistry, 1998, 49: 2 163~2 166
- 11 Nickavar B, Amin G. Anthocyanins from *Vaccinium arctostaphylos* Berries [J]. Pharmaceutical Biology, 2004, 42:289~291
- 12 Lu Y, Yeap Foo L. Polyphenolic constituents of black-currant seed residue [J]. Food Chemistry, 2003, 80:71~76
- 13 林 璇. 杨梅红色素的提取、纯化及其理化性质[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版),2002,15(3):99~101
- 14 Kong J M, Chia L S, Goh N K, et al. analysis and biological activities of anthocyanins [J]. Phytochemistry, 2003, 64(5):923~933
- 15 Du Q, Jerz G, He Y, et al. mi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 074:43~46

(下转第 55 页)

作用是一个主要的限制因素。采用优化的培养条件并结合多次补料分批培养和原位产物抽提技术有望进一步提高 2-苯乙醇产量。

参考文献

- 1 Etschmann M M W, Bluemke W, Sell D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59: 1~8
- 2 杨 霄, 崔志峰. 酵母生物转化生产 2-苯乙醇的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 140~144
- 3 Stark D, Münch T, Sonnleitner B, et al. Extractive bio-conversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnol Prog, 2002, 18: 514~523
- 4 Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm[J]. Journal of Molecular Catalysis B, 2004, 29: 187~193
- 5 梅建凤, 闵 航. 生物转化法合成 2-苯乙醇菌种的诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 22~24
- 6 董函竹, 刘沛溢, 谭天伟. 发酵生产 S-腺苷-L-蛋氨酸培养条件的优化研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 110~113
- 7 崔志峰, 杨 霄, 汪 琨, 等. 酿酒酵母 CWY132 及其在微生物发酵制备 2-苯乙醇中的应用. 2007, CN 101016517 A.

Optimization of the Medium and Conditions for the Production of 2-phenylethanol by Yeast

Cui Zhifeng, Shen Qingjia, Yang Xiao, Che Zhibo, Wang Kun

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT The medium and fermentation conditions for the production of 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* CWY132 were studied with the single factor test and uniform design experiments. The optimized culture medium contains: glucose 30.1 g, KH_2PO_4 5 g, L-phenylalanine 5.8 g, MgSO_4 0.5 g, YNB 0.17 g per liter; initial pH 5~6, and 1.21×10^7 /mL inoculation. The yeast grown at 28~30℃ and 200 r/min for 36 h. Under this condition, the yield of 2-phenylethanol reached up to 3.98 g/L, increased by 109 % compared with the original 1.9 g/L. The molar conversion rate of L-phenylalanine to 2-phenylethanol rises to 92.7 % from the original 51.4 %.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, 2-phenylethanol, medium optimization, uniform design

(上接第 51 页)

The Structure Composition Analysis and Elucidation of Anthocyanins in Waxberry

Du Qizhen, Jiang Hua, Xu Yuanjin

(Institute of Food and Biological Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

ABSTRACT The anthocyanins in waxberry were extracted by the mixture solvent composed of methanol-formic acid (9 : 1, v/v) and pre-purified by cation exchange resin column chromatography. The waxberry was then separated by countercurrent chromatography with a solvent system composed of water-n-butanol-tert butyl methyl ester-acetonitrile-trifluoroacetic acid (5 : 2 : 1.5 : 1 : 0.001, v/v), and purified with C_{18} column chromatography to yield cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside (I) and delphinidin-3-O- β -D-glucopyranoside (II). The chemical structure was elucidated by ESI-MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. The composition analysis of anthocyanins in three waxberries showed that cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside was the main anthocyanin monomer, more than 90% of the total anthocyanins.

Key words waxberry, anthocyanin, structure elucidation, composition analysis.