

新疆药桑椹中花色苷的分离与鉴定

杨 玲¹, 苏亚丽¹, 陈 敏^{2,*}

(1.塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;

2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 采用高速逆流色谱分离制备药桑花色苷。以甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(2:2:1:5:0.01, V/V)为溶剂体系, 进样量50mg, 分离得到纯度分别为99.24%、88.5%、99.9%和96%的4个花色苷单体。通过高速逆流色谱(HSCCC)、紫外-可见光谱、质谱进行结构鉴定, 初步确定馏分1为矢车菊-3-O-芸香糖苷, 馏分2为天竺葵-3-O-芸香糖苷, 馏分3为矢车菊-3-O-葡萄糖苷, 馏分4为天竺葵-3-O-葡萄糖苷。此法高效、稳定、简捷易行。

关键词: 药桑; 花色苷; 高速逆流色谱; 紫外-可见光谱; 质谱; 分离鉴定

Isolation and Identification of Anthocyanins from *Morus nigra* Linn. Fruits Grown in Xinjiang

YANG Ling¹, SU Ya-li¹, CHEN Min^{2,*}

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production and Construction Groups, Tarim University, Alar 843300, China; 2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: This study dealt with the isolation of anthocyanins from *Morus nigra* Linn. fruits grown in Xinjiang by high-speed countercurrent chromatography (HSCCC). The solvent system used consisted of methyl tert-butyl ether, butanol, acetonitrile, water and trifluoroacetic acid (2:2:1:5:0.01, V/V). Fifty-gram sample was injected. As a result, 4 individual anthocyanins with purities of 99.24%, 88.5%, 99.9% and 96%, respectively, were obtained. They were identified by HSCCC, UV-vis spectroscopy and LC-MS as cyanidin-3-O-rutinoside, pelargonidin-3-O-rutinoside, cyanidin-3-O-glucoside and pelargonidin-3-O-glucoside, respectively. The HSCCC method was efficient, stable, simple and easy.

Key words: *Morus nigra* L.; anthocyanins; high-speed countercurrent chromatography (HSCCC); ultraviolet visible spectroscopy; mass; isolation and identification

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0145-04

药桑在植物分类学上属桑科(Moraceae)、桑属(*Morus* L.)、黑桑种(*Morus nigra* L.), 因长期生长于极端干旱且极冷极热的新疆沙漠地区, 导致其产生特殊22倍体染色体倍数类型, 成为我国唯一的黑桑种桑树品种^[1], 其桑果为紫黑色, 含有丰富的水溶性花色苷色素, 花色苷不仅是无毒天然着色剂, 而且对于人体有诸多的保健功能如具有清除自由基^[2-3]、抗癌^[4]、预防血栓^[5]等多种生理功能, 是理想的功能性天然色素。周静等^[6]对新疆库车县3种桑葚的营养成分进行了对比分析, 结果表明: 3种桑葚中, VC、硫胺素、尼克酸、黄酮化合物含量均以药桑椹最高, 黑桑椹次之, 白桑椹较低。研究表明不同种类花色苷结构与其生物活性密切相关^[7-8], 因此, 分离并鉴定不同种类花色苷结构成为研究的热点, 近年来, 逆流色谱技术在花色苷的分离上得到了应用; Qizhen等^[9]用

HSCCC分离了越橘中的花色苷; 李佳银等^[10]采用高速逆流色谱分离紫菊花色苷, 一次分离得到2种花色苷单体化合物。王卫东等^[11]采用HPLC-DAD-ESI-MS联用技术从黑莓中分离鉴定出4种花色苷; Bakowska-Barczak等^[12]采用HPLC-DAD-ESI-MS/MS质谱串联技术分离鉴定了14种产自加拿大的浆果类植物花色苷, 结果表明, 不同来源的品种, 其花色苷的组成及含量明显不同; Dugo^[13]采用HPLC-MS分离黑桑葚花色苷, 分离鉴定出两种色素苷元(矢车菊色素和天竺葵色素)组成的5种成分; 傅大煦^[14]对新疆的3种桑葚品种(药桑、白桑及其变种鞑靼桑)进行了降血压活性实验, 结果显示药桑具有更好的活性, 且其有效部位为花色苷等黄酮类成分, 指纹图谱也显示不同品种的桑葚所含花色苷成分差异明显。

本实验采用高速逆流色谱技术(HSCCC)对药桑葚中

收稿日期: 2012-06-28

作者简介: 杨玲(1965—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: yanglingzj@sina.com

*通信作者: 陈敏(1956—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: minc@163.com

花色苷进行分离制备, 并采用高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-DAD-ESI-MS)对药桑花色苷物质进行结构定性检测, 以期明确其中花色苷的主要成分, 为药桑花色苷的生物活性的构效关系的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

药桑于2011年7月采于新疆库车县, 经塔里木大学邱爱军教师鉴定为药桑(*Morus nigra* L.)。采摘的新鲜桑葚冷冻贮藏。

乙腈(色谱纯) 德国Merck公司; 甲基叔丁基醚、正丁醇、乙腈、三氟乙酸、盐酸、乙酸乙酯、乙醇(均为分析纯) 天津市光复科技发展有限公司; 矢车菊-3-O-葡萄糖苷标品 成都曼思特生物科技有限公司; D101大孔树脂 天津南开大学化工厂。

1.2 仪器与设备

TBE-300B高速逆流色谱仪 上海同田生物技术有限公司; UV20可变波长紫外-可见分光检测器 杭州天钊科技有限公司; HX-1050恒温循环器 北京博医康实验仪器有限公司; Water2695高效液相色谱仪(配有2996PAD和2487双波长吸收检测器) 美国Waters公司; 1200LC-6410B/QQQ/MS 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 HSCCC分离制备过程

1.3.1.1 样品的准备

参考文献[15], 称取药桑果若干, 按1:10的料液比(m/V)用70%乙醇(含0.1% HCl)超声提取3次, 每次20min, 合并滤液旋转浓缩除去乙醇, 用乙酸乙酯萃取数次至有机相无色为止, 以除去黄酮类和多酚类成分, 水相减压除去残余乙酸乙酯后, 过D101大孔树脂柱, 用蒸馏水洗脱以除去糖、氨基酸等物质, 再用80%乙醇(含0.1% HCl)洗脱, 收集洗脱液, 减压浓缩后得药桑花色苷精制品, 冷藏备用。

1.3.1.2 HSCCC的分离条件优化

参考文献[16], 并进行适当优化, 通过对4种不同比例的溶剂体系的分离效果和分配系数 K 的测定, 确定HSCCC分离药桑花色苷的适宜溶剂体系为: 甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(2:2:1:5:0.01, V/V), 上相为固定相; 在此溶剂体系条件下, 通过比较不同流速和转数时, 花色苷的分离效果, 得出分离条件: 流速2.0mL/min, 主机转速850r/min, 柱温25℃, 检测波长510nm。

称1.3.1.1节制备的样品50mg溶于5mL的下相中进行。根据峰形手动收集不同时间段的流出液, 减压浓缩冷藏备用。

1.3.2 色谱条件

Symmetry C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相: 乙腈(A)-1%乙酸水(B) 梯度: 0~20min, 10%~20%

A; 流速: 1mL/min; DAD检测(波长200~600nm), 提取波长520nm; 进样量: 10μL; 柱温: 25℃。

1.3.3 质谱条件

正离子模式, 离子源ESI; 干燥气: 350℃; 气流: 13L/min; 雾化压力: 45psi; 电压: 4000V; 碎裂电压: 135 V; 碰撞能量: 5V和20V。

2 结果与分析

2.1 药桑的HSCCC分离结果

采用甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(2:2:1:5:0.01, V/V)为溶剂体系, 固定相保留率为57%。可得到6个峰, 峰1与峰2没有达到分离, 其他4个峰均基本达到较好的分离效果。馏分按图1中所示的分割线和颜色收集, 分别得到4个纯度较高的组分: 馏分1~4。

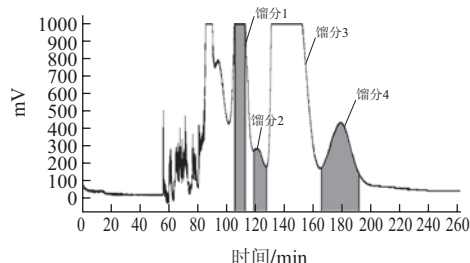
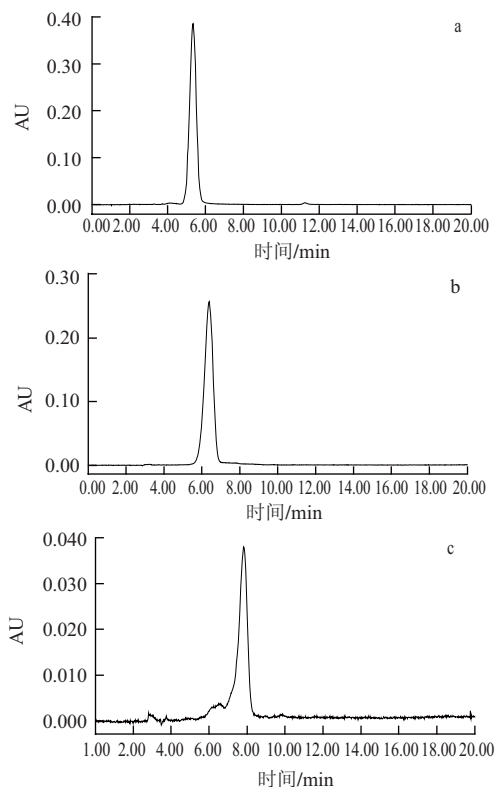
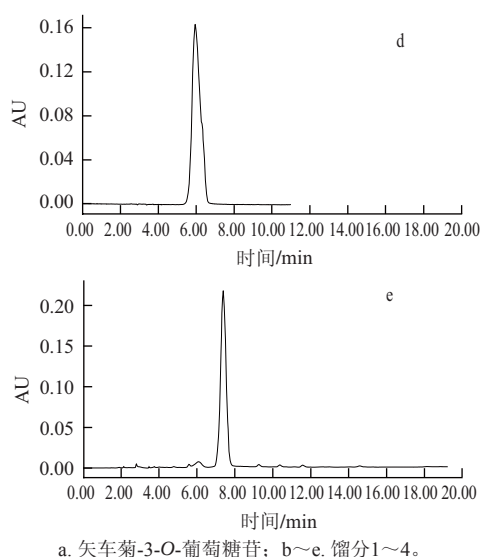


图1 药桑花色苷的HSCCC图

Fig.1 HSCCC chromatogram of anthocyanins from *Morus nigra* L.

2.2 高效液相色谱(HPLC)图分析





a. 矢车菊-3-O-葡萄糖苷; b~e. 馏分1~4。

图2 矢车菊-3-O-葡萄糖苷和药桑花色苷各馏分的HPLC图

Fig.2 HPLC chromatograms of different anthocyanin fractions from *Morus nigra* L.

由图2可知, 由HPLC图谱按峰面积归一化法计算, 其中馏分1和馏分4的相对含量为99.24%和96%; 馏分3为99.9%, 馏分2相对含量较低为88.5%, 可能原因是收集范围偏宽所致。从保留时间分析, 馏分1和馏分3的保留时间较接近, 对比标准品的色谱图, 可推测可能为矢车菊色素, 其保留时间微小差异可能与所连接的糖种类与数目有关; 馏分2和馏分4的保留时间较接近, 推测二者可能为同一色素苷元。

2.3 紫外-可见光谱图分析

2.3.1 标准品矢车菊-3-O-葡萄糖苷的紫外-可见光谱图

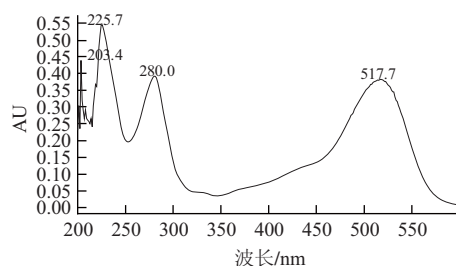


图3 标准品矢车菊-3-O-葡萄糖苷的紫外-可见吸收光谱图

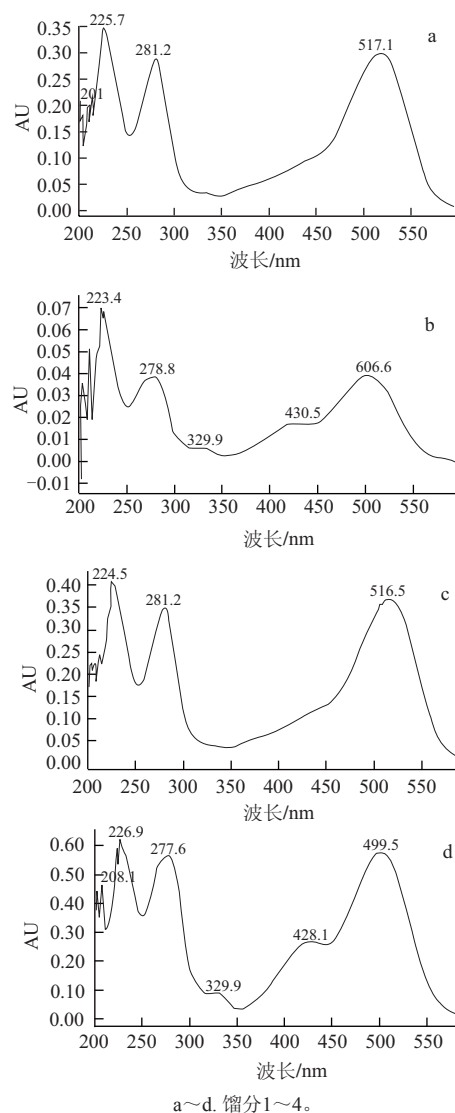
Fig.3 UV-Vis spectrum of cyanidin-3-O-glucoside

花色苷是黄酮类化合物, 在280nm与520nm左右有特征吸收峰, 而其他类黄酮化合物, 如黄酮、黄酮醇、黄烷酮等在300~400nm和240~280nm的紫外区有吸收^[11], 因此可将520nm左右有无吸收作为判断是否为花色苷类物质的依据。由图3可知, 矢车菊-3-O-葡萄糖苷在517nm有花色苷的特征吸收峰。

2.3.2 药桑不同馏分的紫外-可见光谱图比较

由图4可知, 4个馏分均在500~520nm范围内有最大吸收, 表明是花色苷类物质, 其中馏分1和馏分3的光谱

图很类似, 和标准品光谱图(图3)比较, 可推测为矢车菊色素苷元; 馏分2与馏分4图谱类似, 结合二者色谱图数据, 可推测为同一花色苷元, 二者在330nm和430nm左右有明显的吸收, 而其他2个馏分没有, 330nm波长处的吸收表明是馏分2与馏分4的花色苷分子结构在某个部位已酰基化, 这对该花色苷的稳定能起到一定的作用^[17]。430nm左右的吸收表明在5位的羟基没有被取代, 可推测酰基化部位在花色苷分子的3位或7位。



a~d. 馏分1~4。

图4 药桑花色苷各馏分的紫外-可见吸收光谱图

Fig.4 UV-Vis spectra of different anthocyanin fractions from *Morus nigra* L.

2.4 药桑花色苷的质谱分析及可能结构

由图5馏分1的ESI-MS可知, m/z 595为分子离子峰 $[M]^+$, m/z 287是脱去芸香二糖即鼠李糖和葡萄糖的碎片峰 $[M-308]^+$, 即矢车菊素的配基离子峰。结合色谱与光谱分析^[12,18], 判断馏分1为矢车菊-3-O-芸香糖苷(cyanidin-3-O-rutinoside)。

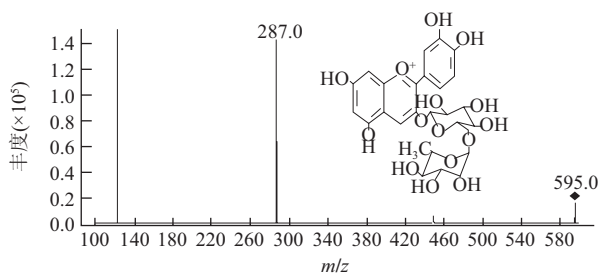


图5 馏分1 ESI-MS图及结构

Fig.5 ESI-MS spectrum and structure of fraction 1

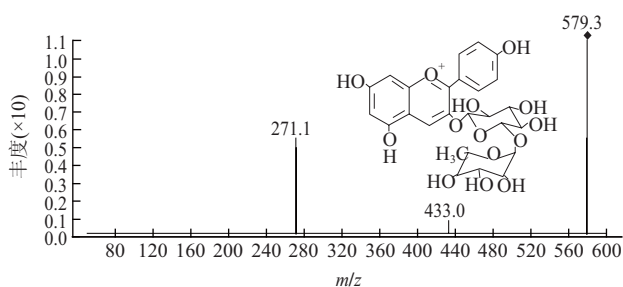


图6 馏分2 ESI-MS图及结构

Fig.6 ESI-MS spectrum and structure of fraction 2

由图6馏分2的ESI-MS可知, m/z 579为分子离子峰 $[M]^+$, m/z 271是脱去芸香二糖即鼠李糖和葡萄糖的碎片峰 $[M-308]^+$, 即天竺葵素的配基离子峰, m/z 433是脱去1个葡萄糖的碎片峰 $[M-146]^+$ 。结合色谱与光谱分析^[12,18], 馏分2为天竺葵-3-O-芸香糖苷(pelargonidin-3-O-rutinoside)。

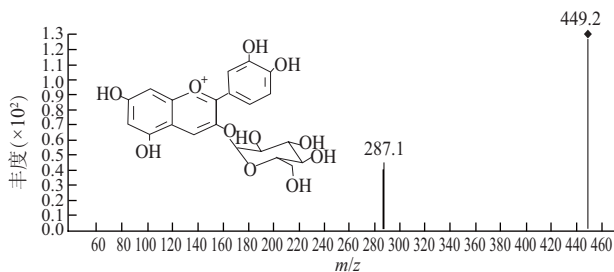


图7 馏分3 ESI-MS图及结构

Fig.7 ESI-MS spectrum and structure of fraction 3

由图7馏分3的ESI-MS可知, m/z 449为分子离子峰 $[M]^+$, m/z 287为脱去1个葡萄糖的碎片离子峰 $[M-162]^+$, 即矢车菊素的配基离子峰。结合色谱与光谱分析^[12,18], 馏分3为矢车菊-3-O-葡萄糖苷(cyanidin-3-O-glucoside)。

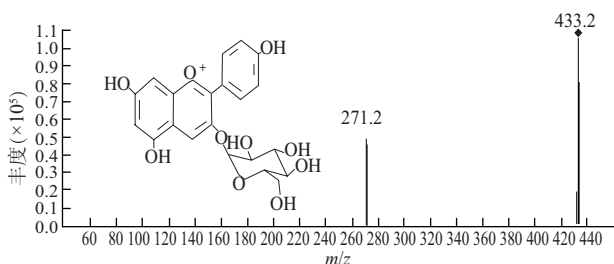


图8 馏分4 ESI-MS图及结构

Fig.8 ESI-MS spectrum and structure of different fraction 4

由图8馏分4的ESI-MS可知, m/z 433为分子离子峰 $[M]^+$, m/z 271是脱去1个葡萄糖的碎片峰 $[M-162]^+$, 即天竺葵素的配基离子峰, 结合色谱与光谱分析^[12,18], 馏分4为天竺葵-3-O-葡萄糖苷(pelargonidin-3-O-glucoside)。

3 结论

高速逆流色谱可以有效分离药桑花色苷, 控制收集区间可以得到纯度接近或大于90%的单体化合物, 以备结构鉴定。从不同馏分HPLC图的保留时间、光谱和质谱数据, 以及标准品矢车菊-3-O-葡萄糖苷的分析结果, 结合参考文献^[13], 可以说明: 药桑花色苷的主要4个单体分别为矢车菊-3-O-芸香糖苷、天竺葵-3-O-芸香糖苷、矢车菊-3-O-葡萄糖苷和天竺葵-3-O-葡萄糖苷。

参考文献:

- [1] 新疆植物志: 第一卷[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 218-220.
- [2] SOLOMON A, GOLUBOWICZ S, YABLOWICZ Z, et al. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.)[J]. J Agric Food Chem, 2008, 54(20): 7717-7722.
- [3] KONG J M, CHIA L S, GOH N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64: 923-933.
- [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] CACACE J E, MAZZA G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol[J]. Food Sci, 2003, 68(1): 240-248.
- [6] 周静, 严栋林. 新疆三种桑葚的营养成分的分析 and 评价[J]. 食品科学, 2004, 25(增刊1): 155-158.
- [7] HEIM K E, TAGLIAFERRO A R, BOBILYA D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships[J]. Nutr Biochem, 2002, 13: 572-584.
- [8] CAO G, SOFIC E, PRIOR R L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships[J]. Free Rad Biol Med, 1997, 22: 749-760.
- [9] QIZHEN D, GEROLD J, WINTERHALTER P. Isolation of two anthocyanins sambubiosides from bilberry by HSCCC[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045: 59-63.
- [10] 李佳银, 罗晋, 李冕路, 等. 高速逆流色谱分离紫锥菊花色苷及其抗氧化性研究[J]. 分析测试学报, 2012, 31(1): 45-50.
- [11] 王卫东, 李超, 许时婴. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定黑莓花色苷[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 230-234.
- [12] BAKOWSKA-BARCZAK A M, MARIANCHUK M, KOLODZIEJCZYK P. Survey of bioactive components in Western Canadian berries[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2007, 85: 1139-1150.
- [13] DUGO P. Analysis of anthocyanins in berries by narrow bore high performance liquid chromatography with ESI-MS[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 3987-3992.
- [14] 傅大煦. 新疆桑属植物种质资源与药效成分研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [15] 陆英, 李佳银, 罗晋, 等. 高速逆流色谱制备分离紫甘薯花色苷[J]. 分析化学, 2011, 39(6): 851-856.
- [16] VALLS J, MILLÁN S, MARTÍ M P, et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 7143-7172.
- [17] 刘栋, 钱建亚, 周晓辉. 花青素酰基化作用研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(4): 101-104.
- [18] DOWNEY M O, ROCHFORD S. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1201: 43-47.