

黑米抗氧化活性成分的分离纯化和结构鉴定

张名位¹, 郭宝江², 张瑞芬¹, 池建伟¹, 魏振承¹, 徐志宏¹, 张雁¹

(¹广东省农业科学院生物技术研究所/农业部功能食品重点开放实验室, 广州 510640; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510630)

摘要: 【目的】分离、纯化和鉴定黑米抗氧化的主要活性成分。【方法】以体外总抗氧化能力为活性跟踪指标, 对黑米抗氧化提取物用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇等不同极性溶剂萃取分部后得到抗氧化能力最强的部分, 再用 Sephadex LH-20 分离得到抗氧化主活性成分, 采用紫外-可见光谱、红外光谱、ESI-MS 质谱和核磁共振 (¹H-NMR 和 ¹³C-NMR) 波谱法对其进行结构解析。【结果】黑米抗氧化提取物的 5 种溶剂萃取物以水部和正丁醇部的抗氧化能力最强, 其总抗氧化能力分别为 383 和 392 ku·g⁻¹, 其中, 从水部可得到 4 种抗氧化主活性成分, 总抗氧化能力分别为 976、878、1 134 和 1 087 ku·g⁻¹。波谱结构解析表明, 4 种成分均为花色苷类化合物, 分别是锦葵素、天竺葵素-3, 5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3, 5-二葡萄糖苷。【结论】花色苷类化合物是黑米抗氧化作用的主要物质基础。

关键词: 黑米; 抗氧化活性成分; 结构鉴定

Separation, Purification and Identification of Antioxidant Compositions in Black Rice

ZHANG Ming-wei¹, GUO Bao-jiang², ZHANG Rui-fen¹, CHI Jian-wei¹,
WEI Zhen-cheng¹, XU Zhi-hong¹, ZHANG Yan¹

(¹Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture/ Bio-tech. Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640; ²College of Life Science, Huanan Normal University, Guangzhou 510630)

Abstract: 【Objective】To separate, purify and identify the antioxidant compositions of black rice. 【Method】Using total antioxidative capacity (TAC) as an activity monitoring parameter, different fractions of black rice antioxidative extracts were obtained with different polarities of solvents such as petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and normal butyl alcohol. The main antioxidative components from the strongest antioxidative fractions were separated by using Sephadex LH-20 resin and the structures were analyzed by ultraviolet-vis, infra-red, ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectrums. 【Result】The water fraction and normal-butyl alcohol fraction of antioxidative extracts of black rice of had the strongest antioxidative capacities and their TACs reached 383 ku·g⁻¹ and 392 ku·g⁻¹, respectively. Four main antioxidative components were separated from the water fraction and their TACs reached 976 ku·g⁻¹, 878 ku·g⁻¹, 1 134 ku·g⁻¹ and 1 087 ku·g⁻¹, respectively. The spectroscopy analysis indicated that the 4 active components of the antioxidative extract of black rice were 4 anthocyanin compounds of malvidin, pelargonidin-3, 5-diglucoside, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3, 5-diglucoside. 【Conclusion】It is concluded that the anthocyanin compounds are the most important substance basis for antioxidation.

Key words: Black rice; Antioxidative composition; Structure identification

0 引言

【本研究的重要意义】黑米作为重要的优异稻种资源, 因其糙米(颖果)的果皮和种皮内富集有天然

花色苷类化合物而得名。长期以来, 黑米的保健作用主要停留在传统中医推论上, 缺乏科学依据。分离、纯化和鉴定黑米抗氧化的主要活性成分对揭示黑米保健作用的物质基础和作用机制具有重要意义。【前人研

收稿日期: 2005-04-15; 接受日期: 2005-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(39870537)和广东省自然科学基金(990519)资助项目

作者简介: 张名位(1967-), 男, 湖北荆州人, 研究员, 博士, 研究方向为植物活性物质。Tel: 020-87237412; Email: mwzh@163.net

【研究进展】已有研究表明,黑米具有较强的清除自由基和抗氧化作用^[1~5],是开发天然抗氧化剂的重要来源。黑米抗氧化物质的提取受到溶剂、温度、时间、物料比等多种因素的影响,而且其成分复杂,性质各异。

【本研究切入点】在优化黑米抗氧化提取物制备条件的基础上^[6,7],以体外总抗氧化能力为活性跟踪指标,按极性大小对黑米抗氧化提取物进行两相萃取分部,比较各部分的体外抗氧化效果,并以抗氧化性最强的分部为材料,用 Sephadex LH-20 凝胶柱分离、纯化制备黑米抗氧化作用主活性成分,并用波谱法解析其结构。【拟解决的关键问题】本研究旨在为揭示黑米抗氧化作用的物质基础提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黑米 黑米品种为新鲜的龙锦 1 号黑米,由广东省农业科学院生物技术研究所提供。用砵谷机碾取占全黑米重 10% 的黑米皮作为试验材料。

1.1.2 试剂 凝胶树脂 Sephadex LH-20 为 Fluka 公司产品,总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

2003 年 3~9 月,试验在华南农业大学、中国科学院广州化学所、南方医科大学和广东省农业科学院生物技术研究所农业部功能食品重点开放实验室分别进行。

1.2.1 黑米抗氧化提取物的制备 称取一定量的黑米皮,按料液比 1:4 在 60% 乙醇溶剂中 60℃ 温度浸提 4 h,过滤,滤渣按上述条件重复提取 2 次,过滤,合并 3 次滤液,在 60℃ 下减压浓缩,得到深红色糖浆状物即为黑米抗氧化提取物粗品。

1.2.2 黑米抗氧化提取物的极性分部试验 称取一定量黑米抗氧化提取物粗品,溶入蒸馏水中,得到浑浊的水悬浮液,摇匀,转入分液漏斗中,加入一定量石油醚,振摇,静置,待溶液完全分层后,放出下层的水溶液,保留上层石油醚部,下层水溶液用同法再萃取 2 次,将 3 次的石油醚萃取液合并,在 50℃ 下减压回收石油醚,得到棕色粘稠油状物,为黑米抗氧化提取物石油醚部。石油醚萃取后的剩余水溶液按上述同样的方法用氯仿萃取 3 次,将 3 次下层的氯仿萃取液合并,在 50℃ 下减压回收氯仿,得到棕色粘稠油状物,为黑米抗氧化提取物氯仿部。氯仿萃取后的剩余

水溶液按上述同样的方法用乙酸乙酯萃取 3 次,将上层的乙酸乙酯萃取液合并,在 50℃ 下减压浓缩,得到深红色糖浆状物,为黑米抗氧化提取物乙酸乙酯部。乙酸乙酯萃取后的剩余水溶液,按上述同样的方法用正丁醇萃取 3 次,将上层的正丁醇萃取液合并,在 65℃ 下减压回收正丁醇,得到深红色结晶状物,为黑米抗氧化提取物正丁醇部。正丁醇萃取后的剩余水溶液,直接在 65℃ 下减压浓缩,得到深红色结晶状物,为黑米抗氧化提取物水部。

1.2.3 各极性分部的体外抗氧化试验^[8]

(1) 各样品溶液的制备。准确称取黑米抗氧化提取物石油醚部、氯仿部、乙酸乙酯部、正丁醇部和水部 5 个部分的样品,溶于 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸-95% 乙醇(v/v, 15/85) 中,避光保存备用。

(2) TAC 测定。分别取一定量的样品液,按南京建成生物工程研究所 TAC 测定试剂盒说明书测定各极性分部黑米提取物样品的 TAC。定义在 37℃ 时,每分钟每毫升样品液使反应体系的吸光度(OD)值增加 0.01 为 1 个 TAC 单位(u),即表示为 u·ml⁻¹。取样及测定均重复 3 次。

1.2.4 主活性部分(水部)的凝胶柱层析分离 准确称取黑米抗氧化提取物水部的样品,同上法制备样品液,上葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离,用水-甲醇梯度洗脱,根据红颜色深浅得到 C₁、C₂、C₃ 和 C₄ 4 种组分,低温减压浓缩,得组分 C₁、C₂、C₃ 和 C₄ 红色晶体,用 TAC 作指标,评价抗氧化活性,筛选活性强的主组分。

1.2.5 主活性组分 C₁ 和 C₂ 样品的凝胶柱层析分离

C₁ 和 C₂ 样品同上法制备样品液后,上葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析分离,从 C₁ 中得到红色和深橘红色的 2 种成分 P₁ 和 P₂,从 C₂ 中得到深红色的组分 2 种成分 P₃ 和 P₄。低温减压浓缩,真空干燥,得到成分 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 4 种晶体。密封低温保存备用。

1.2.6 主活性成分的纯度鉴定

(1) 薄层色谱(TLC)法。取适量薄层层析用硅胶 G,加 0.2% 羟甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液,搅拌均匀成糊状,取适量该糊状物置于玻璃板(100×20 mm)上,使硅胶均匀分布于玻璃板上,置于水平台面上放置,晾干。使用前在 105℃ 下烘 30 min 活化,在干燥器中保存备用。P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品分别用 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸-95% 乙醇(v/v, 15/85) 溶解后,用微量进样器点样,样点直径 0.5~1mm 之间。分别用盐酸/乙酸/水=7/70/23/(v/v/v) 和正丁醇/乙酸/水

=40/10/50/ (v/v/v) 作展开剂, 在层析槽中展开后, 挥干溶剂后, 观察斑点分离情况。

(2) 高效液相色谱 (HPLC) 法。P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品分别同上法溶解后, 作 HPLC 分析, 色谱柱为 ODS Hypersil (5 μm, 250 mm×4 mm) 进样量为 20 μl, 分别选择甲酸/水/甲醇=5/55/40/ (v/v/v) 和水/乙腈=80/20 (v/v) 作流动相, 观察各样品的出峰情况。

1.2.7 活性成分的结构鉴定

(1) 紫外可见光谱分析。分别把化合物 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品用 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸-95%乙醇 (v/v, 15/85) 溶解, 并用 1.5 mol·L⁻¹ 盐酸-95%乙醇 (v/v, 15/85) 作参比, 在 Shimadzu UZ-2201 UV-vis 紫外-可见分光光谱仪上从 200~600 nm 扫描, 得化合物的紫外可见图谱。

(2) 红外光谱分析。分别把化合物 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品用 KBr 压片, 在美国 Analect 公司 RFX-6A 型红外光谱仪上作傅立叶变换红外光谱扫描, 得化合物的红外光谱图。

(3) 质谱分析。化合物 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品分别用色谱纯甲醇溶解, 在美国 Applied Biosystem 公司产电喷雾电离源 API200 质谱仪上作+Q₁和-Q₁扫描, 同时选取分子离子基峰进行子离子扫描, 分别获得分子离子峰和子离子峰图谱。

(4) 核磁共振分析。分别将化合物 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品用氘代甲醇溶解, 在室温 (298K) 下用德国 BRUKER 公司的 DRX-400 型超导核磁共振谱仪做氢谱和碳谱分析, 以氘代甲醇为内标。

2 结果与分析

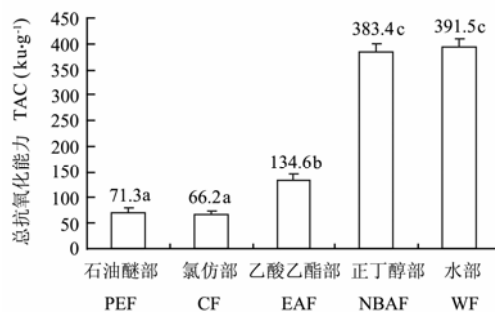
2.1 黑米抗氧化提取物的极性分部及其体外抗氧化作用

黑米抗氧化提取物的石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水 5 个部分的 TAC 结果见图 1。

由图 1 可知, 5 个部分均具有较强抗氧化作用, 但各部分之间也存在较明显差异, 正丁醇部和水部的 TAC 最强, 二者之间差异不显著, 乙酸乙酯部的居中, 显著强于石油醚部和氯仿部的 ($P<0.05$), 但显著低于正丁醇部和水部的 ($P<0.05$), 石油醚部和氯仿部的最低, 二者之间差异不显著。即 5 个部分强弱顺序为: 水部=正丁醇部>乙酸乙酯部>氯仿部=石油醚部。

2.2 黑米抗氧化提取物活性成分的分离与纯度鉴定

2.2.1 活性成分的分离与总抗氧化能力比较 黑米抗氧化提取物水部用 Sephadex LH-20 柱层析分离后, 根据红颜色的深浅, 明显分成 4 段, 分别收集得到 C₁、



PEF= Petroleum ether fraction; CF= Chloroform fraction; EAF=Ethyl acetate fraction; NBAF=Normal butyl alcohol fraction;WF=Water fraction

图 1 黑米抗氧化提取物各极性分部的 TAC

Fig. 1 TAC of various polar fractions of black rice extract

C₂、C₃ 和 C₄ 4 种组分, 比较其 TAC 结果见图 2。由图 2 可知, 组分 C₁ 和 C₂ 的抗氧化能力较强, 组分 C₃ 和 C₄ 稍差, C₁ 和 C₂ 的差异不显著, 而与 C₃ 和 C₄ 的差异达显著水平 ($P<0.05$)。

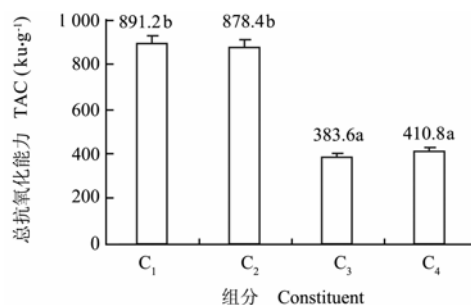


图 2 黑米抗氧化提取物不同活性组分的总抗氧化能力

Fig. 2 TAC of different constituents of black rice extract

为了找到抗氧化最强的活性成分, 又以 C₁ 和 C₂ 为材料, 进一步用 Sephadex LH-20 柱层析分离纯化, 从 C₁ 中得到红色的成分 P₁ 和深橘红色的成分 P₂, 从 C₂ 中得到深红色的成分 P₃ 和成分 P₄。比较其抗氧化作用 (图 3)。由图 3 可知, P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 4 种成分均具有较强的抗氧化能力。

2.2.2 活性成分的纯度鉴定 从 4 种活性成分样品的 TLC 图谱 (图略) 可知, P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 4 种成分, 分别经盐酸/乙酸/水=7/70/23 和正丁醇/乙酸/水=4/1/5 两种不同的展开剂在 G60 硅胶薄板上展开后, 均只一个斑点, 表明其纯度较高。

同样, HPLC 图谱分析结果 (图 4) 表明, 4 个样品经乙酸/异丙醇/水和水/乙腈 2 种不同的流动相洗脱

均只出现一个尖峰,溶剂峰很小甚至消失。由此证明,分离制备的 P₁、P₂、P₃ 和 P₄ 样品已达到色谱纯的要求,为叙述方便,分别称为化合物 P₁、P₂、P₃ 和 P₄。

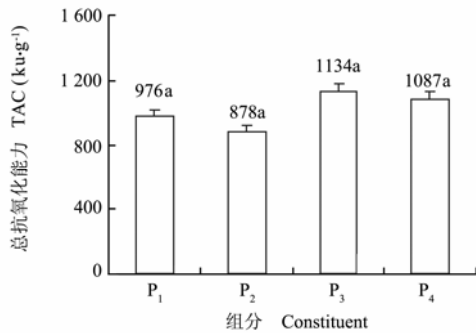


图 3 不同组分的总抗氧化能力

Fig. 3 TAC of different main active constituents

2.3 黑米抗氧化提取物中不同活性成分的结构分析

2.3.1 化合物 P₁ 的结构鉴定

(1) 紫外可见图谱分析。紫外可见图谱(图略)分析表明,化合物 P₁ 在紫外区和可见区各有 1 个特征峰,特征波长分别为 272 nm 和 542 nm,添加 AlCl₃ 后,特征波长没有位移,与花色素的特征吸收相一致^[9]。由此可初步推断其成分可能属于花色素类化合物。

(2) 红外光谱图分析。由红外光谱图(图略)可知,化合物 P₁ 在 3400 cm⁻¹、2900 cm⁻¹、1090 cm⁻¹、2730 cm⁻¹ 和 1600 cm⁻¹ 处表现特征吸收,分别表明其结构式中有 -OH、苯环 CH、C-O-C 和 -O-CH₃ 的伸缩振动以及苯环的骨架变形振动^[9]。由此可以推断 P₁ 化合物属于苯环上有 -OH 基和 -OCH₃ 基团的花青素结构。

(3) 质谱图分析。由电喷雾电离源质谱(图略)可知,+O₁ 扫描后,得到分子量为 331 的分子离子峰,与 C₆-C₃-C₆ 结构的化合物 C₁₇H₁₅O₇ 的分子量相吻合。以分子量为 331 的分子离子基峰进行子离子扫描后得到分子量分别为 315、299、285、287、273、269 和 242 的碎片峰。其中,331 峰与 315 峰、315 峰与 299 峰相差 16,正好是一个 -OH 的分子量,315 峰与 285 峰以及 272 峰与 242 峰相差 30,是 -OCH₃ 的分子量,表明化合物 P₁ 中有 2 个以上的 -OH 和 -OCH₃ 存在。

(4) 核磁共振谱图分析。化合物 P₁ 有 11 个质子峰,即 11 个氢,相应的化学位移见表 1。P₁ 有 17 个碳峰,即有 17 个碳原子,这进一步验证了质谱分析的

结果(图略)。

综合紫外、红外、质谱和核磁共振分析,推断化合物 P₁ 为锦葵素(malvidin),结构式如图 5。

2.3.2 化合物 P₂ 的结构鉴定

(1) 紫外可见图谱分析。紫外可见图谱(图略)表明,化合物 P₂ 在紫外区和可见区各有一个特征峰,波长分别为 268 nm 和 504 nm,添加 AlCl₃ 后,Δλ_{max} 为 23 nm,这一特征与天竺葵素-3,5-二糖苷的特征吸收相一致^[9],由此,可初步推断 P₂ 可能为天竺葵素的二糖苷类化合物。

(2) 红外光谱分析。P₂ 的红外光谱图(图略)与 P₁ 提供的信息基本相同,表明化合物 P₂ 有较明显的 -OH 伸缩振动、苯环骨架变形振动、苯环 OH 伸缩振动和 C-O-C 伸缩振动,但未见 -OCH₃ 的伸缩振动^[9],表明 P₂ 中有 -OH 基而不含 -OCH₃ 基,具有天竺葵素糖苷的基本结构。

(3) 质谱分析。由电喷雾电离源质谱(图略)可知,+O₁ 扫描后,得到分子量为 595 的分子离子峰,以该峰为基峰进行子离子扫描后得到分子量为 433 和 277 的碎片峰,595 与 433、433 与 271 均相差 162,正好是一个葡萄糖去掉一个 H₂O 之后的分子量,同样以分子量为 433 的基峰作子离子扫描也得到了分子量为 271 的碎片峰,也表明该碎片是经 433 的碎片去掉一个葡萄糖形成。由此表明,化合物 P₂ 有 2 个葡萄糖,结合紫外、红外及分子量分析,可能是天竺葵素与 2 个葡萄糖成苷的化合物,其分子式为 C₂₇H₃₁O₁₅。

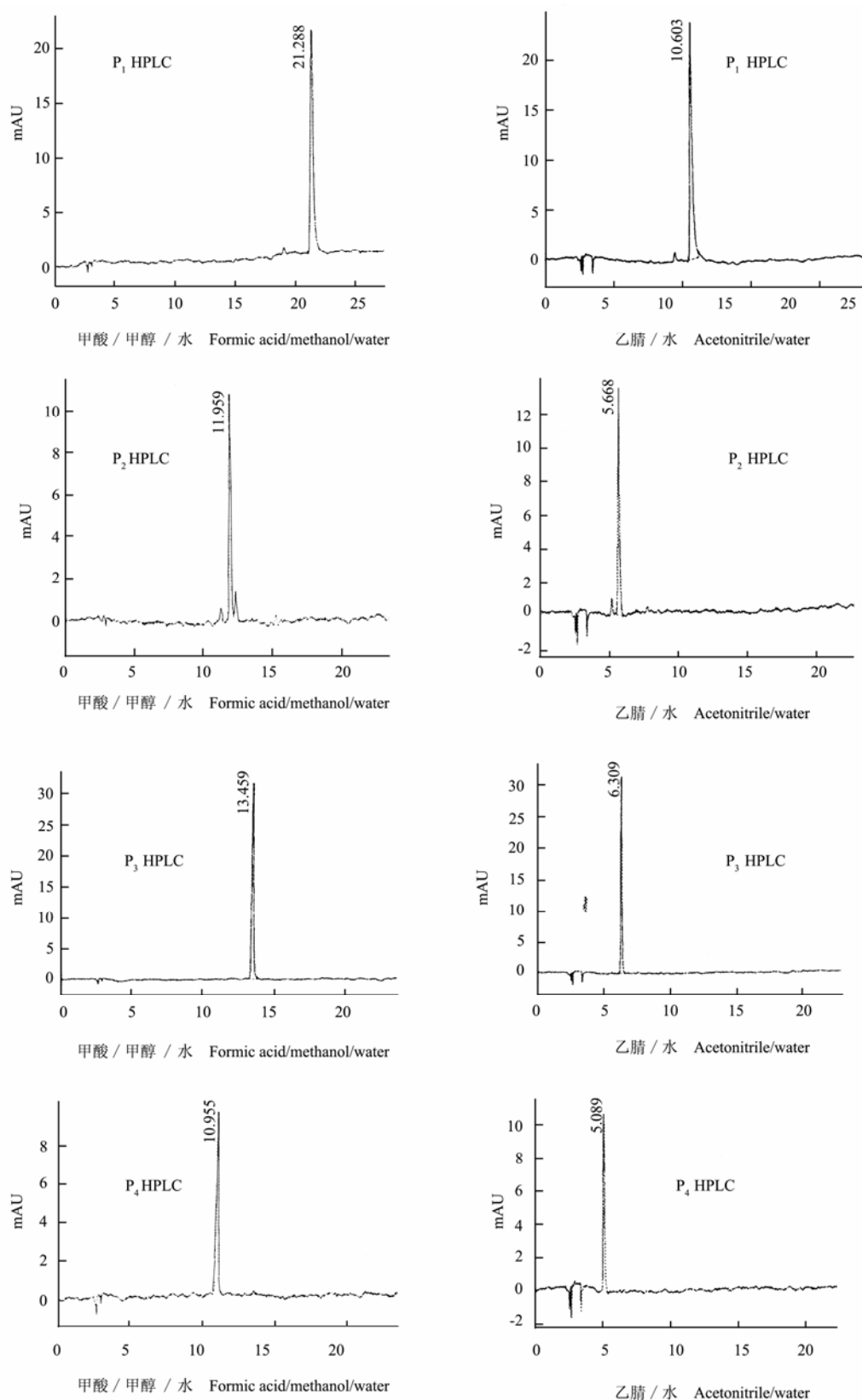
(4) 核磁共振分析。化合物 P₂ 有 7 个芳环质子讯号,即 7 个 H,连同 2 个葡萄糖的 12 个质子峰,共有 19 个质子峰,其中 7 个芳环质子峰相应的化学位移见表 2。由表 2 可知,葡萄糖与天竺葵素的成苷部位可能在 3 和 5 位。P₂ 有 27 个碳峰,即有 27 个碳原子,这与质谱分析得出的 C₂₇H₃₁O₁₅ 的分子式相吻合(图略)。

综合紫外、红外、质谱和核磁共振分析,推断出化合物 P₂ 为天竺葵素-3,5-二葡萄糖苷(pelargonidin-3,5-diglucoside),结构式如图 6。

2.3.3 化合物 P₃ 的结构鉴定

(1) 紫外光谱分析。紫外可见图谱(图略)表明,化合物 P₃ 在紫外区 278 nm 和可见区 525 nm 处有特征吸收,添加 AlCl₃ 后 Δλ_{max} 为 18 nm,与矢车菊素-3-糖苷的特征吸收相一致^[9]。由此可初步推断 P₃ 可能为矢车菊素的糖苷类化合物。

(2) 红外光谱分析。化合物 P₃ 的红外光谱图(图

图 4 P₁、P₂、P₃和P₄样品的HPLC图Fig. 4 Elution of P₁, P₂, P₃ and P₄ on HPLC

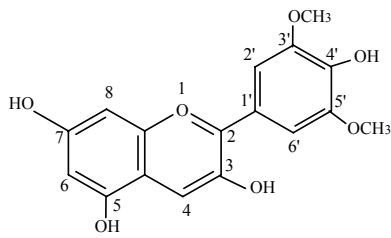


图 5 锦葵素

Fig. 5 Malvidin

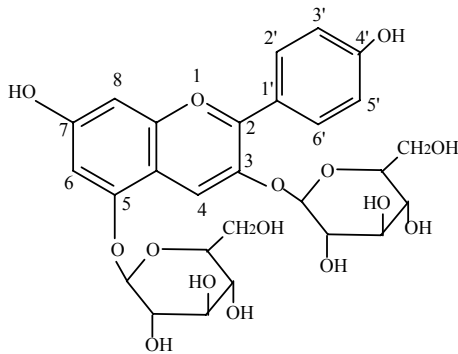


图 6 天竺葵素-3,5-二葡萄糖苷

Fig. 6 Pelargonidin-3,5-diglucoside

表 1 化合物 P₁ 的核磁共振氢谱数据Table 1 ¹HNMR spectral data for compound P₁

Proton No.	¹ HNMR data (ppm)	Proton No.	¹ HNMR data (ppm)
H-4	8.62 (S)	H-3'	3.99 (br)
H-6	6.95 (d)	H-5'	3.99 (br)
H-8	6.63 (d)	H-6'	8.02 (s)
H-2'	8.02 (s)		

表 2 化合物 P₂ 的核磁共振氢谱数据Table 2 ¹HNMR spectral data for compound P₂

Proton No.	¹ HNMR data (ppm)	Proton No.	¹ HNMR data (ppm)
H-4	9.21 (S)	H-3'	8.68 (d)
H-6	7.12 (d)	H-5'	8.68 (d)
H-8	7.06 (d)	H-6'	7.05(d)
H-2'	7.05 (d)		

略)提供的信息与 P₂ 基本相同。

(3) 质谱分析。由化合物 P₃ 的 ESI-MS 图谱(图略)可见,经+O₁扫描后,出现分子量为 449 和 287 的 2 个分子离子峰,两峰的分子量相差 162,正好是一个葡萄糖去掉一个 H₂O 之后的分子量,结合紫外、

红外光谱分析结果表明, P₃ 可能是矢车菊素和葡萄糖苷去掉一个葡萄糖后形成。以分子量为 287 峰进一步作子离子扫描出现分子量为 137 和 109 的碎片峰,其中,109 峰可能是矢车菊素的邻二苯酚的碎片,结合分子量 449 可知, P₃ 的分子式可能为 C₂₁H₂₁O₁₁,即可能是矢车菊素的葡萄糖苷。

(4) 核磁共振分析。图谱分析结果表明(图略),化合物 P₃ 共有 12 个质子峰,其相应位移见表 3。由表 3 可知, P₃ 中的葡萄糖成苷部位为 C-3 位。 P₃ 有 21 个 C 峰,即 21 个 C 原子,与质谱分析得出的 C₂₁H₂₁O₁₁ 的分子式相吻合。综合紫外、红外、质谱和核磁共振分析,确定化合物 P₃ 为矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyanidin-3-glucoside),结构式如图 7。

2.3.4 化合物 P₄ 的结构鉴定

(1) 紫外光谱分析。紫外可见光谱(图略)表明,化合物 P₄ 在波长为 273 nm 和 525 nm 处有 2 个特征吸收峰,添加 AlCl₃ 后 Δλ_{max} 为 18 nm,与矢车菊素-3,5-成苷的特征吸收一致^[9]。由此可初步推断 P₄ 可能为矢车菊素的二糖苷类化合物。

表 3 化合物 P₃ 核磁共振氢谱数据Table 3 ¹HNMR spectral data for compound P₃

Proton No.	¹ HNMR data (ppm)	Proton No.	¹ HNMR data (ppm)
H-4	8.99 (S)	H-2'	6.88 (d)
H-6	8.00 (d)	H-5'	6.64 (d)
H-8	6.98 (d)	H-6'	8.23(dd)

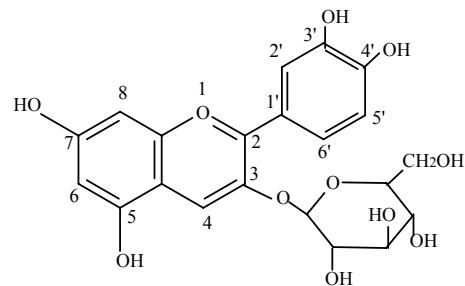


图 7 矢车菊素-3-葡萄糖苷

Fig. 7 Cyanidin-3- glucoside

(2) 红外光谱分析。化合物 P₄ 的红外光谱图(图略)提供信息与 P₃ 多数一致,证明 P₄ 和 P₃ 的结构比较接近。

(3) 质谱分析。由化合物 P₄ 的 ESI-MS 图谱(图略)可见,经+O₁扫描后,出现分子量为 611、449 和

287 的 3 个分子离子峰。与 P_2 的情况相同, 611 与 449、449 与 287 均相差 162, P_4 可能是矢车菊素与葡萄糖成苷 2 种形式共成, 以 611 基峰作子离子扫描, 同样得到分子量为 287 和 449 的 2 个碎片峰, 可能是矢车菊素二葡萄糖苷分别去掉一个葡萄糖后形成的。由此可以推断 P_4 是矢车菊素的二葡萄糖苷, 分子式为 $C_{27}H_{31}O_{16}$ 。

(4) 核磁共振分析。图谱分析结果表明(图略), P_4 共有 18 个质子峰, 其中, 有 6 个芳环质子峰, 其相应位移见表 4。由表 4 可知, P_4 中的葡萄糖成苷部位在 C-3 和 C-5 位。 P_4 有 27 个 C 峰, 即 27 个 C 原子, 由此可印证质谱分析推断的分子式 $C_{27}H_{31}O_{16}$ 。

综合上述分析, 确定化合物 P_4 为矢车菊素-3, 5-二葡萄糖苷(cyanidin-3,5-diglucoside), 结构式如图 8。

表 4 化合物 P_4 核磁共振氢谱数据

Table 4 ^1H NMR spectral data for compound P_4

Proton No.	^1H NMR data (ppm)	Proton No.	^1H NMR data (ppm)
H-4	9.14 (S)	H-2'	7.06 (d)
H-6	8.07 (d)	H-5'	7.04 (d)
H-8	7.07 (d)	H-6'	8.36(dd)

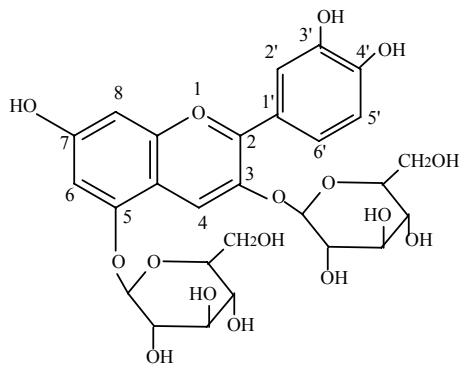
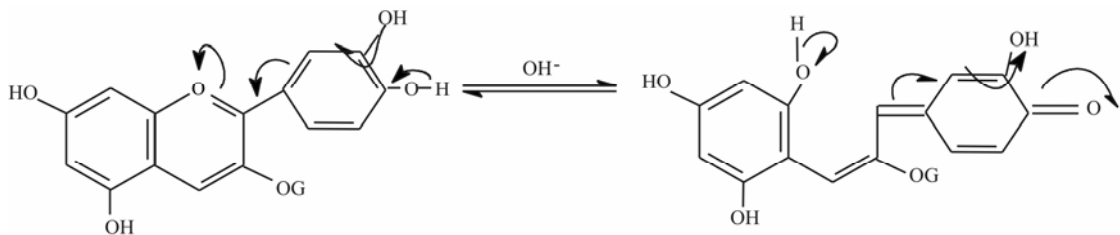


图 8 车菊素-3, 5 二葡萄糖苷

Fig.8 Cyanidin-3,5- diglucoside

3 讨论



3.1 黑米抗氧化作用的主要活性成分

关于植物抗氧化的物质基础研究报道较多, 但结果不尽相同。由于黑米的成分复杂, 既含有丰富的花色苷类化合物, 又含有丰富的不饱和脂肪酸、维生素及微量元素等活性成分, 这些物质都有可能表现出清除自由基和抗氧化的功能。徐杰等^[10]报道黑米中脂溶性成分还含有叶绿素 A、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素等。孙玲等^[3]和张名位等^[4]提出黑米抗氧化作用与花色苷化合物关系密切。本研究结果表明, 黑米抗氧化提取物的石油醚部分和氯仿部分表现出一定的抗氧化能力。分析这两部分的成分主要为亚油酸、油酸等不饱和脂肪酸^[7], 证明黑米中的不饱和脂肪酸在其抗氧化中发挥了作用, 但与乙酸乙酯部分、正丁醇部分和水部分相比, 石油醚和氯仿部分的总抗氧化能力较低, 即黑米中花色苷类化合物的抗氧化能力明显强于其中所含的不饱和脂肪酸类, 表明黑米中花色苷类化合物是其抗氧化作用最重要的物质基础。

本研究从黑米中分离到锦葵素、天竺葵素-3, 5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3, 5-二葡萄糖苷 4 种花色苷类化合物, 与钟丽玉^[11]报道黑米色素的成分为芍药花色苷-3-阿拉伯糖苷和矢车菊素-3 鼠李糖苷结果明显不同。一方面可能在于黑米材料不同, 另一方面可能在于本研究以获得黑米抗氧化提取物为目标, 提取分离方法也与之不同所致。

3.2 黑米花色苷类化合物抗氧化作用的机理

花色苷一方面由于共轭效应, 氧上的不成对电子并不固定于氧原子, 而是靠近苯环, 从而削弱氢氧键, 使羟基上氢原子活性提高, 易于脱去而成为氢供体^[12,13]。黑米花色苷的抗氧化作用与其母核——2-苯并吡喃的多羟基取代结构有关。其机理可归为酚醌平衡与稳定的自由基形成, 脱氢反应的主要形式如下图^[12,13]。

以黑米抗氧化成分矢车菊素-3-葡萄糖苷为例, 其具有多酚类物质形成酚醌平衡的稳定特性, 又有邻位的羟基且数目较多。一方面有多次提供氢原子的能力, 另一方面其邻位羟基苯衍生物生成的苯氧基自由

基可在分子内部生成氢键而得到稳定, 还可以通过电子转移, 形成稳定的化合物(醌), 从而提高其活性。由此可推测, 矢车菊素-3-葡萄糖苷作为供氢体抗氧化剂(AH₄), 可以通过4次提供氢原子以干扰脂质自动氧化链式反应:(AH₄)向脂自由基(R[·])提供氢使R[·]还原到原来的脂肪状(RH), 从而中止脂肪的继续氧化。

4 结 论

分离、纯化和鉴定黑米抗氧化作用的主要活性成分为锦葵素、天竺葵素-3, 5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-葡萄糖苷和矢车菊素-3, 5-二葡萄糖苷等4种花色苷类化合物, 其总抗氧化能力分别为976、878、1 134和1 087 ku·g⁻¹。提出花色苷类化合物是黑米抗氧化作用的主要物质基础。

References

- [1] 赵则胜, 赖来展, 郑金贵. 中国特种稻. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 34-36.
Zhao Z S, Lai L Z, Zheng J G. *Special Rice in China*. Shanghai: Shanghai Sciencetech Press, 1995: 34-36. (in Chinese)
- [2] 张名位. 特种稻米及其加工技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, 34-89.
Zhang M W. *Specialty Rice and Its Processing*. Beijing: China Light Industry Press, 2000: 34-89. (in Chinese)
- [3] 孙 玲, 张名位, 池建伟. 黑米的抗氧化性及其与黄酮和种皮色素的关系. 营养学报, 2000, 22: 246-249.
Sun L, Zhang M W, Chi J W. The antioxidation activity of black rice and its correlation with flavonoids and pigment. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2000, 22: 246-249. (in Chinese)
- [4] 张名位, 郭宝江, 池建伟. 不同黑米品种的抗氧化作用与总黄酮和花色苷含量的关系. 中国农业科学, 2005, 38: 1324-1331.
Zhang M W, Guo B J, Chi J W. Antioxidations and their correlations with total flavonid and anthocyanin contents in different black rice varieties. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 1324-1331. (in Chinese)
- [5] Ling W H, Wang L L, Ma J. Supplementation of the black rice outer fraction to rabbits decrease atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. *Journal of Nutrition*, 2002, 132(1): 20-26.
- [6] 张名位, 郭宝江, 池建伟. 黑米皮抗氧化活性物质的提取与分离工艺研究. 农业工程学报, 2005, 21(6): 135-139.
Zhang M W, Guo B J, Chi J W. Extraction and purification technology of antioxidative extract from black rice. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2005, 21(6): 135-139. (in Chinese)
- [7] 张名位. 黑米抗氧化与降血脂的活性成分与作用机理研究. 博士学位论文. 广州: 华南师范大学, 2003: 57-68.
Zhang M W. Antioxidation and hypolipidemic effect mechanisms and their active components in black rice. Ph. D. Dissertation. Guangzhou: South China Normal University, 2003: 57-68. (in Chinese)
- [8] 庞战军, 周 玫, 陈 瑗. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 23-115.
Pang Z J, Zhou M, Chen Y. *The Methods of Researches of Radical Medicine*. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 23-115. (in Chinese)
- [9] 王彦吉, 宁增福. 光谱分析与色谱分析. 北京: 北京大学出版社, 1995: 146-148.
Wang Y J, Nin Z F. *Spectrum and Chromatogram Analysis*. Beijing: Peking University Press. 1995: 146-148. (in Chinese)
- [10] 徐 杰, 林正眉. 贵州黑糯米稻米种皮成分的分离纯化与结构鉴定. 中国粮油学报, 2003, 18(2): 9-13.
Xu J, Lin Z M. Purification and structure identification of skin components in Guizhou black glutinous rice grains. *Journal of Chinese Cereals and Oils Association*, 2003, 18(2): 9-13. (in Chinese)
- [11] 钟丽玉. 黑米色素分子结构解析. 中国粮油学报, 1996, 11(6): 26-35.
Zhong L Y. Analysis of molecular structure of black rice pigment. *Journal of Chinese Cereals and Oils Association*, 1996, 11(6): 26-35. (in Chinese)
- [12] Zhang H Y, Chen D Z. Theoretical elucidation on activity differences of ten flavonoid antioxidants. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2000, 32(9): 317-321.
- [13] Zhang H Y, Wang L F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *Journal of Molecular Structure*, 2004, 673: 199-202.

(责任编辑 张淑兰)