菹草红色类胡萝卜素的拉曼光谱特性研究

王海滨[1,2] 任丹丹[1] 刘良忠[1] 石嘉怿[1] 张声华[1]
(1. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070; 2. 武汉工业学院食品科学与工程学院, 武汉 430023)

摘要: 用 MgO-硅藻土(1∶2, w/w)柱层析和硅胶 G 薄层层析(TLC)从菹草中分离纯化了三种红色素 r1、r2 和 r3, 其极性大小排序依次为: 虾青素> r1> r2> r3> 角黄素> β-胡萝卜素。以虾青素和β-胡萝卜素为对照, 运用显微拉曼技术对它们作了测试分析研究。在拉曼光谱的"指纹区"(< 1800cm^{-1}), r1、r2 和 r3 都在 1527cm^{-1}处有最强的特征谱线, 对应的是 c= c 伸缩振动(υc= c), r1 在 1162cm^{-1}、r2 和 r3 在 1157cm^{-1}有较强的特征谱线, 对应的是 c-c 伸缩振动(υc-c), r1、r2 和 r3 在 1007cm^{-1}有较强的特征谱线, 对应的主要是甲基与碳链之间的摇摆振动; r1、r2 和 r3 与虾青素及β-胡萝卜素在 2000—4000cm^{-1}区也有很好的对应关系。实验结果充分证明菹草红色素 r1、r2 和 r3 属于类胡萝卜素化合物, r1、r2 和 r3 之间及与虾青素和β-胡萝卜素的拉曼光谱都存在差异, 说明它们的细微结构不同, 其具体结构有待进一步研究。

关键词: 菹草; 红色素; 类胡萝卜素; 显微拉曼光谱
中图分类号: Q949.71 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)04-0385-05

菹草(*Potamogeton crispus* L.)是眼子菜科多年生沉水维管束植物, 它分布于世界各地, 广泛生长于湖沼、水库、渠沟、池塘等处[1—2], 由于它幼嫩多汁、营养成分丰富, 因此是畜、禽和鱼类的优质饲料[3]。在湖北的仙桃、洪湖等蛋鸭饲养地区, 很早就发现蛋鸭采食菹草后能产下优质的红心鸭蛋, 这种红心蛋蛋黄因呈现独特绚丽的天然红色而备受国内外消费者青睐。作者经过多种色谱及光谱分析研究表明: 菹草中含有一类特殊的红色类胡萝卜素, 且这种红色类胡萝卜素及其他黄色类胡萝卜素与红心蛋色素有很好的对应关系[4]; 动物实验表明这种天然红心蛋中类胡萝卜素对 S_{180}肿瘤有显著的抑制作用[5]。类胡萝卜素不仅是重要的天然色素, 可广泛用作食品及畜、禽和鱼类饲料着色剂[6,7], 而且在清除自由基、预防肿瘤、免疫调节、预防眼病和心血管疾病等方面具有非常重要的作用[5,7,8], 因此作为红心蛋鸭饲料的菹草具有很高的经济价值和开发前景, 对菹草类胡萝卜素开展系统研究也具有重要的理论和应用价值。

拉曼光谱属于分子振动光谱, 它最适合研究同原子的非极性键、对称分子的振动、有机化合物的骨架结构等[9]。近年来发展起来的显微拉曼技术采用了低功率激光器、全息滤光片衍射光栅、二维 CCD 探测器, 具有检测灵敏度和分辨率高、操作快速简便、所需样品量小、可在常温常压下作无损检测等特点, 因而受到材料、化学、生物等研究领域的广泛重视[9,10]。类胡萝卜素化合物在基本的碳架结构上具有一定的共同性, 其拉曼光谱具有特殊性, 可作为结构鉴定的重要依据之一[11—13]。本文报道从菹草中分离纯化的三种红色类胡萝卜素的显微拉曼光谱特性, 为其结构鉴定及特性研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 鲜菹草采于湖北仙桃(仙桃市食品总公司提供), 经中国科学院武汉植物研究所鉴定为眼子菜科植物菹草 *Potamogeton crispus* L.。

菹草红色类胡萝卜素的分离纯化和制备: 取鲜菹草适量, 加少量碳酸钠和 BHT, 在组织捣碎机中用石油醚-丙酮(1∶1, v/v)提取, 将提取液转入分液漏斗并加蒸馏水洗涤去掉丙酮层, 将石油醚层用无水

收稿日期: 2003-06-03; 修订日期: 2003-07-06
基金项目: 教育部 2002 年度博士点基金资助项目(No. 20020504008)
作者简介: 王海滨(1964—), 男, 湖北麻城市人; 硕士, 在职博士生, 副教授; 主要从事功能食品与分子生物学基础研究

硫酸钠干燥、过滤, 滤液在 40℃以下减压浓缩蒸发至干, 即得菹草色素提取物, 用适量石油醚溶解, 加 40% 氢氧化钾-甲醇溶液充氮并置暗处于室温下皂化 12h, 将皂化液转于分液漏斗用蒸馏水洗涤, 弃去下层, 将上层(石油醚层) 用蒸馏水洗至中性, 并用无水硫酸钠干燥, 过滤、滤液在 40℃以下减压浓缩蒸发至干, 即得菹草总类胡萝卜素, 用少量丙酮溶解于棕色瓶中, 将菹草总类胡萝卜素用 MgO-硅藻土(1∶2, w/w) 柱层析作初步分离得到红色类胡萝卜素混合物, 再用硅胶 G 薄层层析(0.75mm 厚, 120℃活化 1h) 作精细分离和纯化得到 3 个红色类胡萝卜素级份, 展开剂为正己烷-乙酸乙酯-丙酮-甲醇= 27∶4∶2∶2(v/v/v/v), 依 R_f 从小到大分别编号为 r1、r2 和 r3。

1.2　主要化学试剂　虾青素标准品、硅藻土(Diatomaceous Earth, D-3877): 美国 Sigma 公司; 角黄素标准品: 瑞士 F. Hoffmann-La Roche 公司; 硅胶 G(60 型) CP: 中国青岛海洋化工公司; 氧化镁、无水硫酸钠、碳酸钠、正己烷、石油醚、丙酮、甲醇: 均为国产分析纯; BHT: 国产化学纯。

1.3　拉曼光谱测试仪器和方法　测试分析仪器为英国 Renishaw 公司生产的 RM-1000 型显微共聚焦拉曼光谱仪。仪器由氩离子(Ar^+) 激光器、全息滤光片衍射光栅、二维 CCD 探测器、显微镜、计算机数据处理系统几个部分构成。在室温环境中, 分别将菹草红色类胡萝卜素 r1、r2、r3 和虾青素标准品直接放在显微镜下, 光点聚焦在样品表面上。激发光波长 514.5nm, 狭缝宽度 50μm, 物镜 50 倍, 目镜 10 倍, 控制样品表面上的激光功率为 2—3mW 左右, 拉曼散射信号采集时间 10—15s, 累积次数 3 次, 光谱范围 150—4000cm^{-1}, 空间分辨率 1μm, 仪器分辨率 2cm^{-1}。

1.4　其他主要仪器和设备　紫外-可见记录光谱仪 UV-265FW(Shimadzu Co. Japan), 控温多用高速组织捣碎机(300w, 江苏江阴科研器械厂), RE52-3 旋转蒸发器及 SHZ-3 循环水多用真空泵(上海沪西分析仪器厂)。

2　结果

2.1　菹草红色类胡萝卜素与虾青素及角黄素的薄层层析图谱比较

图 1 分别列出了虾青素(Astaxanthin)、β-胡萝卜素(β-Carotene) 和角黄素(Canthaxanthin) 的结构图, 它们都具有类胡萝卜素特有的共轭多烯链。

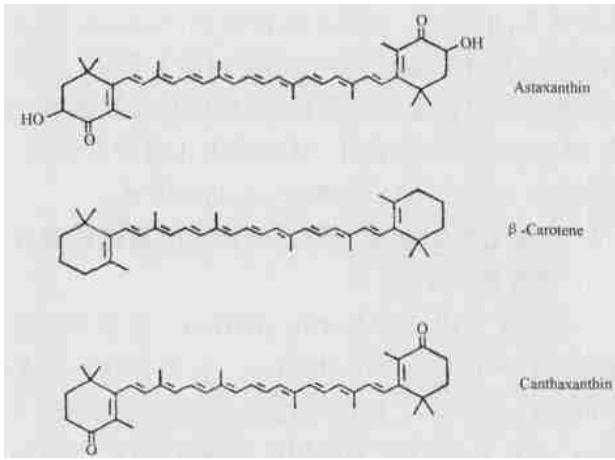


图 1　虾青素、β-胡萝卜素和角黄素的化学结构

Fig. 1　Chemical structure of Astaxanthin, β-Carotene and Canthaxanthin

图 2 是菹草红色类胡萝卜素 r1、r2 和 r3 与虾青素及角黄素的薄层层析图谱比较, 由图 2 可见, 用硅胶 G 薄层层析可清晰地将过柱层析后的菹草红色素混合物分成三个级份, 逐一经过两种不同流动相的 HPLC 检验都得到单峰, 证明它们都是单一化合物, 分离纯化效果很好, 分别收集制备样品后可用于光谱和理化特性研究。依 R_f 从小到大分别编号为 r1(R_f= 0.32)、r2(R_f= 0.34) 和 r3(R_f= 0.38), 它们的 R_f 介于虾青素(R_f= 0.22) 和角黄素(R_f= 0.47) 之间, 远小于 β-胡萝卜素(R_f= 0.98, 未显示)。类胡萝卜素在硅胶 G 薄层上的分离和吸附状况在一定程度上反映了其结构特点和分子极性大小[3], 在本实

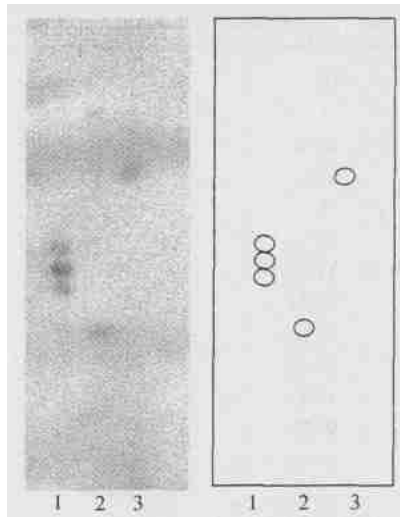


图 2　菹草红色类胡萝卜素 r1、r2、r3 与虾青素及角黄素的薄层层析比较

1. 菹草红色类胡萝卜素 r1、r2、r3; 2. 虾青素; 3. 角黄素

Fig. 2　Comparison of TLC between the red carotenoids(r1, r2, r3) from *P. crispus* and astaxanthin and canthaxanthin　1. Red carotenoids r1, r2 and r3 from *P. crispus*; 2. Astaxanthin; 3. Canthaxanthin

验条件下, R_f 越小, 表明其极性越大, 反之, R_f 越大则其极性越小, 因此菹草红色类胡萝卜素 r1、r2 和 r3 的极性比β-胡萝卜素大得多, 也比角黄素的极性大, 而比虾青素的极性小, 其极性大小排序依次为: 虾青素> r1> r2> r3> 角黄素> β-胡萝卜素。

2.2 菹草红色类胡萝卜素与虾青素的显微拉曼光谱特性比较(图 3)

测定了不同样品在 150—4000cm^{-1}范围的拉曼光谱, 重点比较了 800—1800cm^{-1}区("指纹区") 的图谱(图 3 及表 1)。由图 3 可见, 菹草红色类胡萝卜素 r1、r2 和 r3 具有非常相似的拉曼光谱图, 而且与虾青素及β-胡萝卜素[11] 的拉曼光谱图很相似, 在"指纹区", r1、r2 和 r3 在 1527cm^{-1}处有强度最大的谱线, 虾青素在 1519cm^{-1}处有强度最大的谱线, β-胡萝卜素在 1517—1528cm^{-1}处有强度最大的谱线 (Ar^+ 514.5nm), 这些对应的主要是 c=c 伸缩振动 (υc=c), 这是多烯链(polyene chain) 最重要的特征之一[11—13]; r1 在 1162cm^{-1}、r2 和 r3 在 1157cm^{-1}处有很强的特征谱线, 对应的主要是 c-c 伸缩振动(υc-c); r1、r2 和 r3 在 1007cm^{-1}有较强的特征谱线, 对应的主要是甲基与碳链之间的摇摆振动。经比较, r1、r2 和 r3 与虾青素及β-胡萝卜素在 2000—4000cm^{-1}区也有很好的对应关系。这些说明 r1、r2 和 r3 具有类胡萝卜素的基本碳架结构特点, 这是证明 r1、r2 和 r3 属于类胡萝卜素化合物的最有力的证据之一。r1、r2 和 r3 的拉曼光谱与虾青素及β-胡萝卜素的拉曼光谱有不同的之处, 说明它们的细微结构不同, 其具体结构有待进一步研究。

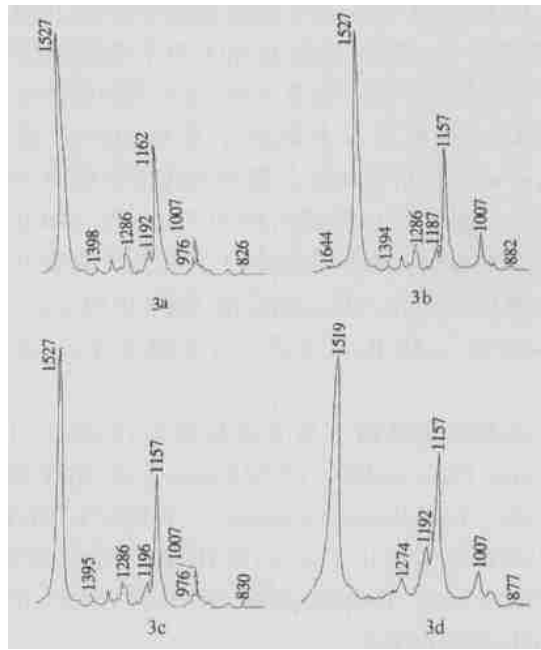


图 3 菹草红色类胡萝卜素 r1(3a)、r2(3b)、r3(3c) 和虾青素 (3d) 的拉曼光谱图(横坐标-拉曼位移 cm^{-1}, 纵坐标-强度)

Fig. 3 Raman spectra of red carotenoids r1(a), r2(b), r3(c) from *P. crispus* and astaxanthin (x-Raman shift/cm^{-1}, y-Intensity)

表 **1** 菹草红色素 **r1、r2、r3** 与虾青素及β-胡萝卜素的拉曼振动模式的比较

Tab. 1 Comparison and assignment of Raman modes of red carotenoids r1, r2, r3 from *P. crispus* with astaxanthin and β-carotene

r1[a]	r2[a]	r3[a]	虾青素[a] astaxanthin[a]	β-胡萝卜素[ab] β-carotene[ab]	振动模式[c] Vibration modes[c]
826vw	—	830ww	—	824vw	opw(CH)
882w	882w	886w	877w	872w	—
955w	951w	955w	955m	955vw	t(C=C)
976vw	—	976ww	—	965vw	
1007s	1007s	1007s	1007s	1008s	r(CH_3)
1162vs	1157vs	1157vs	1157vs	1157vs	υ(C-C)
1192s	1187s	1196s	1192s	1190m	υ(C-C)
—	1230w	1235w	—	—	—
1286s	1286s	1286s	1274s	1280w	ipb(CH)
1342m	1338m	1338m	—	—	ipb(CH)
1398w	1394w	1395w	—	1391w	sd(CH_3)
1454w	1450w	1459w	—	1442m	ad(CH_3)
1527vs	1527vs	1527vs	1519vs	1516vs	υ(C=C)
1652vw	1644ww	—	—	—	υ(C=O)

注: a: 拉曼强度(Raman Intesity): vs(very strong, 很强), s(strong, 强), m(medium, 中), w(weak, 弱), vw(very weak, 很弱);

b: β-胡萝卜素的数据见文献[11];

c: opw(CH) [out-of-plane wagging of the C-H bond, C-H 键面外摇摆振动], t(C=C) [torsion about the C=C bond, C=C 键扭转振动], r(CH_3) [rocking of methyl group bond, 甲基的摇摆振动], υ(C-C) [stretching of the C-C bond, C-C 键伸缩振动], ipb(CH) [in-plane bending of C-H bond, C-H 键面内弯曲振动], ad(CH_3) [asymmetric deformations of methyl group bond, 甲基的不对称变形振动], υ(C=C) [stretching of the C=C bond, C=C 键伸缩振动], υ(C=O) [stretching of the C=O bond, C=O 键伸缩振动].

3 讨论

蛋鸭采食菹草后为什么能产下优质的红心鸭蛋? 作者通过对菹草和红心蛋蛋黄色素进行分离纯化、TLC、HPLC-MS、UV-Vis 及 IR 等对比研究表明: 菹草和红心蛋蛋黄中含有同样的一类特殊的红色素, 经初步定性分析确定该红色素属于类胡萝卜素, 且这种红色类胡萝卜素及其他黄色类胡萝卜素与红心蛋色素有很好的对应关系, 采食菹草的蛋鸭所产红心蛋的红色素来源于菹草[4]。

拉曼光谱和红外光谱同属分子振动光谱, 但拉曼光谱是分子对激发光的散射, 它最适合研究同原子的非极性键和对称分子的振动、有机化合物的骨架结构等, 从拉曼光谱可得到这些结构特点的丰富信息, 而且它受极性基团及端基的影响很小[9]。

类胡萝卜素具有较多的碳-碳共轭双键和碳-碳单键[13], 其拉曼光谱具有特殊性。本文用 TLC 分析显示菹草红色素 r1、r2 和 r3 的极性范围由大到小排序依次为: 虾青素> r1> r2> r3> 角黄素> β-胡萝卜素, 作者用多种质谱研究表明 r1、r2 和 r3 具有相同的分子量 562(另文发表), 说明它们应为同分异构体。大量研究表明[11—13], β-胡萝卜素(烃类胡萝卜素、不含氧) 及叶黄素类(含氧、如羰基或羟基等) 的不同顺反异构体(如 all-trans、7-cis、9-cis、13-cis、15-cis、9-13-cis、9-15-cis、13-15-cis 等)的拉曼光谱主要在"指纹区"存在差别, 而且共轭双键的长度和数量也与 c= c 伸缩振动的频率有关。本文研究结果表明菹草红色素 r1、r2 和 r3 具有非常相似的拉曼光谱图, 而且与虾青素及 β-胡萝卜素的拉曼光谱图很相似, 强度较大的谱线及归属分别是: 1517—1528cm^{-1}区主要是 c= c 伸缩振动, 1157—1162cm^{-1}区主要是 c-c 伸缩振动, 1007cm^{-1}区主要是甲基与碳链之间的摇摆振动。实验结果充分证明菹草红色素 r1、r2 和 r3 属于类胡萝卜素化合物, r1、r2 和 r3 之间及与虾青素和 β-胡萝卜素的细微结构存在差异, 其具体结构有待结合其他研究结果表征。

参考文献:

[1] Li W, Cheng Y. The quantitative analysis of main aquatic plant community in the HongHu in China Ⅲ. Ceratophyllum demersum+ Potamogeton crispus+ Myriophyllum spicatum Community[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(1): 30—34. [李伟, 程玉. 洪湖主要沉水植物群落的定量分析Ⅲ. 金鱼藻+ 菹草+ 穗花狐尾藻群落. 水生生物学报, 2000, **24**(1): 30—34]

[2] Jian Y X, Wang J B, He G Q *et al*. A comparative study on aquatic plant diversity and its long-term changes in the three lakes of Dong TingHu district in China[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(2): 160—167. [简永兴, 王建波, 何国庆, 等. 洞庭湖区三个湖泊水生植物多样性的比较研究. 水生生物学报, 2002, **26**(2): 160—167]

[3] Yang F Y. Economic value and techniques for artificial cultivation and fish culture of *Potamogeton crispus*[J]. *Resource Development & Market*, 1996, **12**(5): 195—197. [杨富亿. 菹草的经济价值及其栽培与养鱼技术. 资源开发与市场, 1996, **12**(5): 195—197]

[4] Wang H B, Peng G H, Liu L Z, *et al*. Studies on the carotenoids in *Potamogeton crispus* ——Comparisons on the characteristics of carotenoids between *Potamogeton crispus* and red-yolk duck eggs[J]. *Food Science*, 2003, **24**(11): 41—45. [王海滨, 彭光华, 刘良忠, 等. 菹草类胡萝卜素的研究——菹草与红心鸭蛋类胡萝卜素特性的初步比较. 食品科学, 2003, **24**(11): 41—45]

[5] Liu L Z, Zhang M, Wang H B, *et al*. Fringe study on carotenoids extraction of natural red yolk and its inhibition on S_{180} tumour. [J]. *Food Science*, 2003, **24**(11): 133—136. [刘良忠, 张民, 王海滨, 石嘉怿, 张声华. 天然红心鸭蛋中类胡萝卜素对S_{180}肿瘤抑制作用的初步研究. 食品科学, 2003, **24**(11): 133—136]

[6] Zhu Y F and Mai K S. A review of carotenoid of pigmentation additives in fish feeds[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(2): 196—200. [朱艺峰, 麦康森. 鱼饲料着色剂类胡萝卜素研究进展. 水生生物学报, 2003, **27**(2): 196—200]

[7] Wang Y Q, Li Q S. Natural Carotenoids——Research Progress, Prodution and Application[M]. Beijing: Chinese Medicine Science & Technology Press, 1997. [王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用. 北京: 中国医药科技出版社, 1997]

[8] Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, *et al*. Cancer prevention by carotenoids[J]. *Pure Appl. Chem*. 1999, **71**(12): 2273—2278

[9] Chen P R, Deng B. Modern Instrumental Analysis Experiment and Technology[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 1999, 120—132. [陈培榕, 邓勃. 现代仪器分析实验与技术. 北京: 清华大学出版社, 1999, 120—132]

[10] Zhao J T, Zhang P X, Chen D P, *et al*. Studies of narcotics by micro Raman spectroscopy[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 1999, **19**(6): 837—840. [赵金涛, 张鹏翔, 陈大鹏, 等. 显微拉曼技术对毒品检测分析的研究. 光谱与光谱分析, 1999, **19**(6): 837—840]

[11] Saito S, Tasumi M, Eugster C H. Resonance Raman spectra(5800–40cm^{-1}) of all-*trans* and 15-*cis* isomer of β-carotene in the solid state and in solution measurements with various laser lines from ultraviolet to red[J]. *J. Raman Spectrosc.*, 1983, **14**(5): 299—300

[12] Fujii R, Chen C H, Mizoguchi T, *et al*. ^{1}H NMR, electronic absorption and resonance-Raman spectra of isomeric okenone as compared with those of isomeric β-carotene, canthaxanthin, β-apo-8′-carotenal and spheroidene[J]. *Spectrochimica Acta* Part A, 1998, **54**. 727—743

[13] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. *Carotenoids Vol*. 1*B*: *Spectroscopy*[*M*]. Basel: Birkhauser Verlag, 1995: 135—146

RAMAN MICRO-SPECTROSCOPY OF RED CAROTENOIDS FROM *POTAMOGETON CRISPUS* L.

WANG Hai-Bin[1,2], REN Dan-Dan[1], LIU Liang-Zhong[1], SHI Jia-Yi[1], and ZHANG Sheng-Hua[1]

(1. *College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070;
2. *College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan* 430023)

Abstract: *Potamogeton crispus* L. is a kind of nature aquatic plant and widely dispersed over the world with important value in ecology and economy, it was reported that there were many nutritious elements such as proteins, fats, amino acids, fibres, Ca, P, vitamins etc. in it, and the utilizable value of feedstuffs has been understood preliminarily. The appearance that ducks fed with *Potamogeton crispus* could produce natural red-yolk eggs with good quality and price had been known long ago in Xiantao and Honghu area, Hubei province, the P. R. China, we have preliminarily found a high contents of carotenoids (especially a kind of red pigments) in *Potamogeton crispus*, the egg yolks color values could increase greatly when ducks were fed with it, and the red and some yellow pigments of the red-yolk eggs were in correspondence with the pigments in *Potamogeton crispus* by thin-layer chromatography, IR, and LC-MS, etc. Many researches showed that carotenoids not only was a kind of important natural pigments, but also possessed important biological functions including antioxidant activity, enhancing the immune system and the cell gap junctional communication, inducing cellular apoptosis, and regulating gene expression, so it is hot-point to find the biological resources abundant in carotenoids, we must make systematic studies on carotenoids of *Potamogeton crispus* so as to exploit this natural resources well.

Three red pigments r1, r2 and r3 were extracted and separated by means of MgO-Diatomaceous Earth(1∶2, W/W) column and silica-gel G TLC from *Potamogeton crispus* L., the good separating solvent mixtures on the silica G TLC were: hexane-ethyl acetate-acetone-methanol= 27∶4∶2∶2 (v/v/v/v), the R_f of r1, r2 and r3 on the TLC were 0.32, 0.34 and 0.38, respectively, the arrangement in accordance with the polarity were astaxanthin> r1> r2> r3> canthaxanthin> β-carotene. Raman spectroscopy can provide detailed information on molecular vibrations, among naturally occurring chromophores, carotenoids have proved to be very suitable for studies in Raman spectroscopy, vibrational spectra can be obtained at very low concentration (until 10^{-8} M). The Raman spectra of r1, r2 and r3 were recorded by micro Raman and compared with as taxanthin and β-carotene. Raman measurements were performed directly on the dry sample with a RM-1000 Confocal Laser Raman Micro-spectroscopy (Made in Renishaw Co., England), Ar^+ Laser (514.5nm), Objective (×50), Silt 50μm, Time 10s, Range from 150—4000 cm^{-1}, Resolution at 2cm^{-1}. The Raman spectra in the "finger print region" (< 1800cm^{-1}) of r1, r2 and r3 have strong characteristic bands at 1527cm^{-1} assigned to υc=c, the second characteristic bands were r1 at 1162cm^{-1}, r2 and r3 at 1157cm^{-1} assigned to υc-c, the third characteristic bands were r1, r2 and r3 at 1007cm^{-1} mainly assigned to rocking modes of methyl group bond. r1, r2 and r3 have very similar Raman spectra in the region of 2000—4000cm^{-1} as well. It were important evidence of r1, r2 and r3 as carotenoids based on these characteristic Raman spectra. Compared with astaxanthin and β-carotene, there were small difference in the Raman spectra of r1, r2 and r3, it suggested that r1, r2 and r3 might have different fine structure.

Key words: *Potamogeton crispus* L.; Red pigments; Carotenoids; Raman micro-spectroscopy