

壹、中文摘要

花色素 係為重要之植物色素，廣泛存於植物體當中，為各種植物顏色（紅、紫、紫紅）之主要來源，因對人體無害，所以具有良好的開發潛力。但因結構複雜，安定性容易受到 pH、高溫、氧氣、光和維生素丙之影響。因此，針對紫蕪所存在的花色素 進行結構鑑定。

利用高效率液相層析(HPLC)分離純化，分離得到三種花色素，將主要三帶花色素 經光譜吸收分析、質譜分析、濾紙層析及降解產物分析結果，推論其結構為：

化合物一： sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

化合物二： feruloyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

化合物三： feruloyl, sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

此三化合物結構亦存在於紅高麗菜中，藉此可鑑別兩種作物間的種源關係。

貳、英文摘要

Anthocyanins are water-soluble and among the most important group of plant pigment. Because of its safety for human consumption they are highly desirable substitute for synthetic red colorants which have been banned by regulatory action. The study was conducted to identify the anthocyanins in Purple vienna (*Brassica Oleracea*).

three anthocyanins from Purple vienna were separated by HPLC. Based on absorption spectral analysis, mass spectrometry analysis, paper chromatography and instrumental analysis of the degraded products analysis, the structure of anthocyanins from Purple vienna were tentatively concluded to be:

compound : sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside.

compound : feruloyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside.

compound : feruloyl, sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside.

These three band also found in red cabbage. The results has been compared with those anthocyanins from red cabbage published to find the relationship between them.

參、研究動機

花色素 係自然存在的水溶性色素，被認為比合成紅色素安全，並具有抗氧化的作用。Flavonoid 被認為可以抑制 low-density lipoprotein(LDL)的氧化作用，因此可以降低心血管疾病及其致命率，因此具有開發研究的潛力。花色素 對熱的安定性遠大於甜菜 ，但因呈色隨著 pH 而改變，限制其在食品上的用途；雖然如此，仍希望運用加工而開發安定性優良的花色素 。

由紅高麗菜之花色素 粉末及溶液，可運用在飲料、口香糖、糖果、冰凍類果子露 (sherbets) 之添加上；而紅高麗菜花色素 有良好的熱安定性，因此將紅高麗菜之花色素 ，加以廣泛應用在加工色素添加，將可取代人工色素所帶來安全之虞。

本研究在於鑑定紫色蕪菁內所含主要之花色素 的化學結構；其推論與紅高麗菜之間的化學結構相似，因此利用各種不同分析方法及分析儀器，針對紫蕪花色素 進行其花色素 之分離純化、構造鑑定；並與紅高麗菜花色素 相比較，希望藉此解析其間的相關性，並可做為食品色素之分析開發。

肆、文獻整理

一、紫蕪簡介

紫蕪屬於十字花科蕪薹屬，學名 *Brassica oleracea* var *caulorepa*。別稱大頭菜頭、結頭菜、圓頭菜、菜鵠；一年生草本植物，原產歐洲已有 2000 年歷史，本省於光復初期自日本引進栽培。其根莖圓球肥大，其形狀與結球甘藍大不同，係甘藍突變種。本省栽培品種依球莖肉質的顏色，可分為白色、綠色與紫色三種。紫色外皮者稱之紫蕪(*purple vienna*)市場上並不常見。(薛，1997)。

本省紫蕪產期以 12 月到 2 月之冬季為主，適合栽培於高冷水分多的地區，本省栽植面積不廣其中多以集中於彰化鹿港、福興、芳苑、伸港等地。球莖於幼嫩時，肉質細嫩而清脆，適合切成薄片涼拌、煮湯及炒食；且富含豐富水分、纖維質、蛋白質、醣、鈣、鉀、磷以及維生素 A、C 等營養物質，因具有低卡路里及低鈉含量，常作為減肥者避免膽固醇過多之膳食蔬菜。且因外皮呈紫紅色，色彩鮮豔、質地細嫩有甜味，亦被用來作為過年時應景的年菜。



圖一、紫燕之外觀

Fig.1. appearance of purple vienna

二、花色素 (anthocyanin)之簡介

(一) 花色素 之結構

花色素 屬於類黃酮素之一部份，亦是花色素(anthocyanidin)的糖 (glycoside)及 flavylum 陽離子之衍生物和糖的化合物(如圖二)。花色素是一種紅色的 polyhydroxylated salt，由於性質不安定，所以在植物組織中很少以此形態出現(Harborne,1967)。在花和水果中及其他植物組織顏色僅以糖 的形態出現，具有吸光性而表現出黃色、藍色、紫色、紅色及黑色等 (Asen,1976;Strack and Wray,1989;Stevenson,1991;Bridle and Timberlake,1997)。

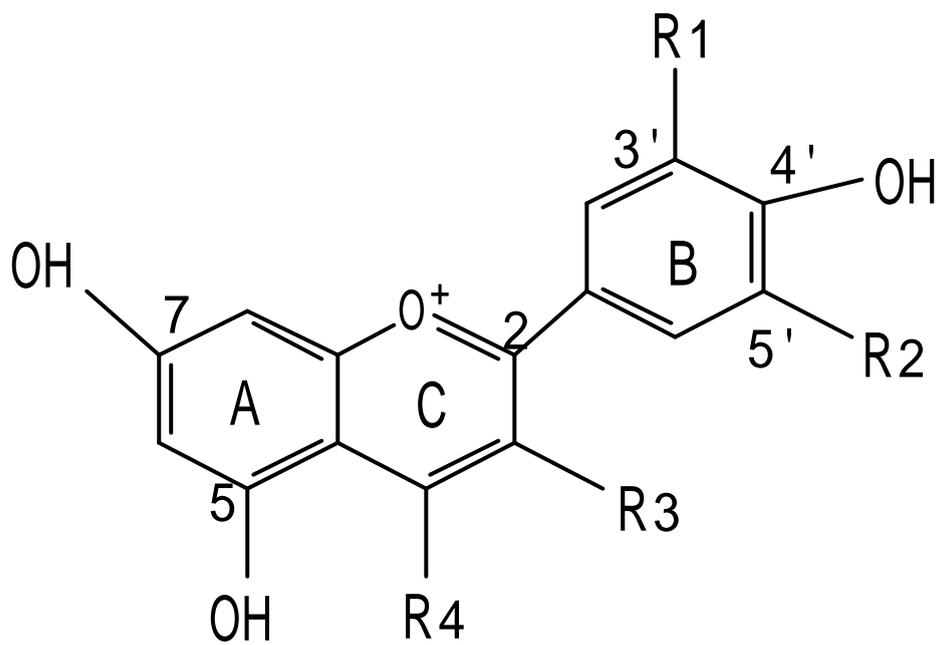
自然界廣泛分布的花色素 之間的差異受到分子中氫氧基的數目，氫氧基甲基化(methylation)的程度，鍵結在分子上糖的種類、數目和鍵結位置及鍵結在糖上有機酸的個數和種類。分別以天竺葵色素(pelargonidin)、矢車菊素(cyanidin)、及花翠素(delphinidin)、勺藥花配基(petunidin) 矮牽牛花 配基(petunidin)及錦葵色素(malvidin)等六種花色素衍生物普遍存在於不同植物體中 (Chen and Harzdina,1981;Mazza and Miniati,1993;Foessen *et al.*,1996)，(表一)。每一種花色素 都有可能被不同的糖或酸，加以糖化(glycosylation)或醯化(acylation)在不同位置上。

一般而言，最常見的糖基為 glucose galactose xylose rhamnose 和 arabinose 以及雙糖或三糖的取代，而大部分則是以這五種單糖所組成。通常在 C-3 的位置最易發生糖取代，其次是 C-5。C-7、C-3' 和 C-5' 的糖取代，但 C-5' 的糖取代一般來說較為少見；其中以 5,3'，

5' 和 3, 7, 3' triglucoside(Yoshitama 和 Abe,1977)兩種最為特殊。鍵結數目愈多其顏色亦相對愈深，如 3,5-diglucoside 就比 3-glucoside 顏色藍一點(Strack and Wray,1989;Mazza and Miniati, 1993)。

而醯基通常是醯化於糖化花色素 上，醯基總共可區分為兩大類，一類為 aromatic acid 如 quinic acid、vanillic acid、syringic acid、protocatechuic acid、gallic acid、salicylic acid、coumaric acid、caffeic acid、ferulic acid 和 sinapinic acid 等。另一類則為 carboxylic aliphatic acid，如 malonic acid、succinic acid、oxalic acid、malic acid 和 acetic acid 等。這些醯基通常會醯化在花色素 C-3 的糖基上，大部份與糖基 C-6 上之 基以酯鍵鍵結，僅有少數與糖 C-4 上之 基鍵結。

醯化作用能穩定花色素 的色澤，當在酸性環境下，花色素 上的糖基容易產生醯化作用而穩定其色澤(Strack and Wray,1989;Mazza and Miniati,1993)。



圖二、Flavylium 的基本構造

Fig.2. Fundamental structure of flavylium.

表一、自然界存在之花色素 配基之結構

Table1. Structure of naturally occurring anthocyanidins.

| Name | Substitution pattern | | | | | | | Color |
|--------------------------|----------------------|----|---|----|-----|----|-----|------------|
| | 3 | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' | |
| <i>Common structures</i> | | | | | | | | |
| Pelargonidin | OH | OH | H | OH | H | OH | H | Orange |
| Cyanidin | OH | OH | H | OH | OH | OH | H | Orange-red |
| Peonidin | OH | OH | H | OH | OMe | OH | H | Orange-red |
| Delphinidin | OH | OH | H | OH | OH | OH | OH | Blue-red |
| Petunidin | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OH | Blue-red |
| Malvidin | OH | OH | H | OH | OMe | OH | OMe | Blue-red |

From Strack and Wray (1989) and Mazza and Miniati (1993).

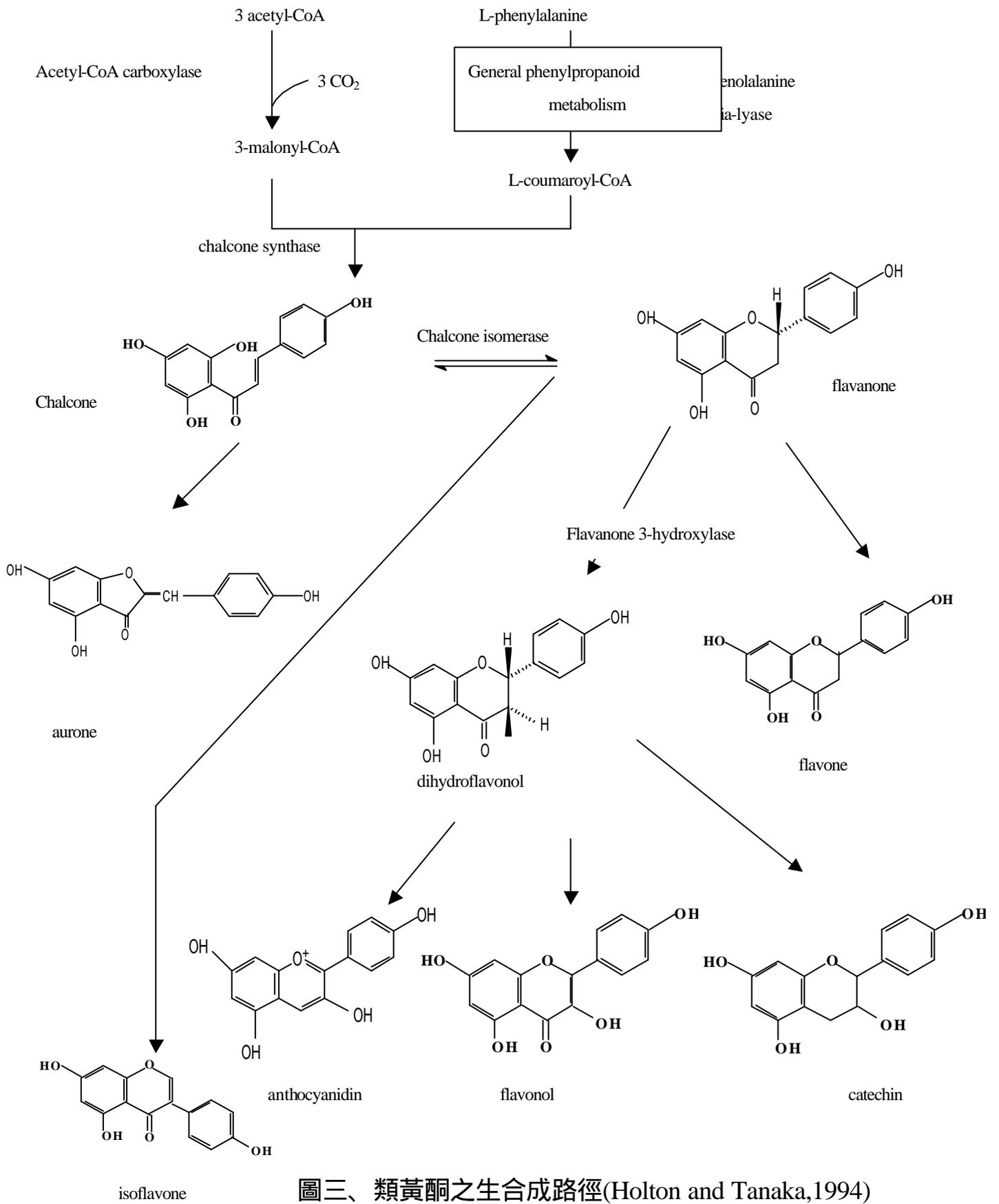
(二) 花色素 之合成

花色素 屬於類黃酮家族，而類黃酮一般是經由苯基丙酸類路徑 (phenylpropanoid pathway)，即所謂的類黃酮生合成路徑所生成(圖三) (Holton and Tanaka,1994)。植物體中苯丙胺酸(phenylalanine) 經 phenylpropanoid pathway 而產生 4-coumaroyl CoA, 其關鍵酵素為 PAL (phenylalanine ammonia-lyase); acetyl-CoA 與 CO₂ 經由 carboxylase 之作用而形成 malonyl-CoA。一分子 4-coumaroyl CoA 與三分子 malonyl-CoA 經由 chalcone synthase(GSH)作用合成 chalcone, chalcone 是植物體內許多類黃酮生成的關鍵中間產物。Chalcone 經 chalcone isomerase 作用後可生成 flavanone, flavanone 經 flavone-3-hydroxylase 作用產生 dihydroflavonol 後再形成花色素(anthocyanidin)、類黃酮 (flavonol)及兒茶素(catechin)。

三、花色素 之結構鑑定

早在 1960 年代就有很多的文獻提及花色素 之分離、純化和鑑定。曾利用傳統的分析方法來鑑定花色素 ；如層析法，將花色素分離，並以適當的溶劑展開測 Rf 值(Harbone,1958)，以 UV-Visible 分光光度計記錄花色素 在 0.01 % 含酸甲醇中之吸收光譜(Harbone,1967)，添加氯化鋁溶液來推測 B 環上是否有兩個相鄰的基或以部份水解來推測花色素 之組成架構(Abe 和 Hayashi,1956)。但這些分析方法只能對分子量較小，分子結構較單純之花色素 進行比較。對於一些較複雜的糖化和醯化花色素 則難以利用這些古典的分析方法定出完整結構。

隨著分析儀器的開發及分析技巧的進步，高效能液相層析儀(HPLC)已被用來純化和分析花色素 (Manley 和 Shubiak,1975)，而氣相層析儀(GC)則用來分析花色素 鍵結之糖基(Englyst *et.al.*;1982)、快速原子撞擊質譜(FAB-Mass)則用來測定花色素 之分子量(Saito 等人,1983)、而核磁共振光譜儀($^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$)則被用來測定花色素 之氫譜碳譜，以了解花色素 內部構造之各種鍵結。



圖三、類黃酮之生合成路徑(Holton and Tanaka,1994)

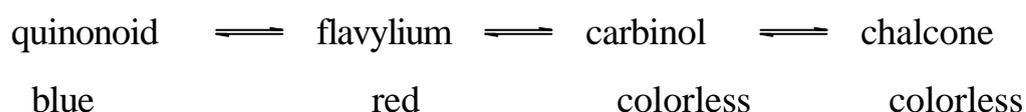
Fig.3. Flavonoids biosynthetic pathway(Holton and Tanaka,1994)

同一種花色素 依 pH 值、濃度、共呈色物質的存在和其他因子，可能會呈現不同的顏色。當氫氧基增加，顏色則由粉紅色變成藍色，甲氧基取代氫氧基時，顏色由藍變粉紅色。

而分離自 *Senecio cruentas* 和紅鳳菜(*Gynura bicolor*)之花色素 具有 3,7,3' triglucoside 結構 (蔡等人, 1995), 這些花色素 在弱酸或中性溶液中有良好的顏色安定性，這種安定性主要是由兩個醯基存在所組成，一個醯基位於 flavylum 環上方，另一個醯基位於環的下方，三者呈一個三明治結構，如此可避免水合反應的產生以及 pseudo base 和 chalcone 之形成。(Yoshitama,1981,1992;Mazza and Miniati,1993)。

B.溫度：

溫度對於花色素 在模擬系統中之影響，所有的研究顯示，在高溫下花色素 會快速減少及破壞，Timberlake(1980)則認為加熱降解有利於下列右邊產物的生成(Palamidis and Markakis,1975)：



由碳酸飲料中萃取葡萄花色素，此花色素 在 3.5 暗室，儲藏半衰期為 1536 天，而在 38 儲藏，半衰期銳減為 80 天(Fossen *et al*1998)。

Hazdima(1971)指出 Coumarin 衍生物是 anthocyanidin 3,5 di-glucoside 這些色素在 pH3-7 之裂解產物。因此提出了一個機制，即 flavylium 經 anhydro base 和數個其他中間產物，裂解成 coumarin 衍生物和一個花色素 B 環的中間產物。此反應不受氧氣存在所影響，但是，加熱會明顯促進反應的進行。根據 Sapers (1981)對花色素 熱安定性所作之試驗報告指出，發現紅高麗菜具有良好的熱安定性，其對熱的安定性大於紅甜菜及蔓越橘。(圖五)

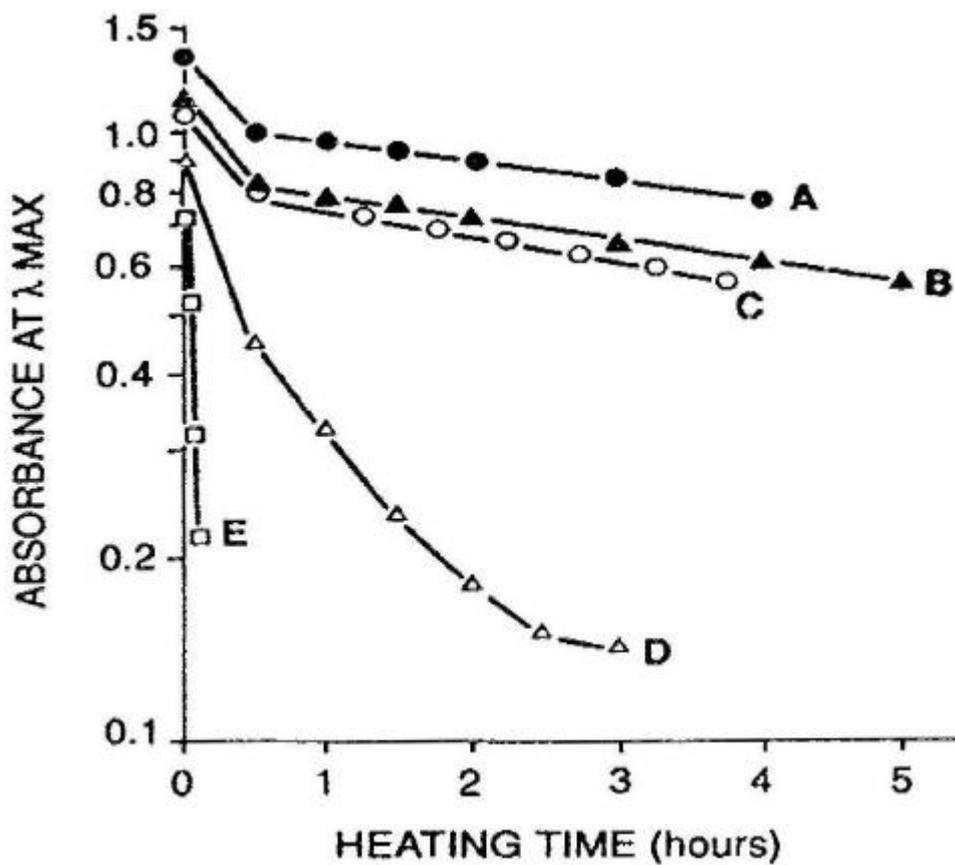
C.光：

光具有促進花色素 之合成與破壞兩種相反效果，根據蔡和葉(1993)，蔡和楊(1995)針對紅皮甘藷所作之研究證實，光照對紅皮甘藷之花色素 具有促進破壞之作用。根據 Van Buren 等人(1968)的報告指出，在葡萄酒中具有醯基-甲氧基的雙糖花色素 ，其對光的穩定性最佳，不含醯基的雙糖花色素 次之，單糖花色素 最差。

Sweeny 等人(1981)指出 polyhydroxylated flavone, isoflavone 和 aurone sulfonates 等共呈色物質，會引起向紅效應(bathochromic effect)，因此可以增加部份花色素 對光之穩定性。即帶負電荷的 sulfonates 和缺電子的 flavylium 間，藉著環 - 鍵之交互作用、氫鍵和離子鍵結合形成一個復合物。

蔡和陳(1992)亦提出紅鳳菜中分離出花色素 含有兩個以上的醯基與三個醯基在室溫下可儲存 16 天，光線對其破壞並不明顯，顯然醯基與糖基能增加花色素 對光之安定性。據 Sapers (1981)的報告指

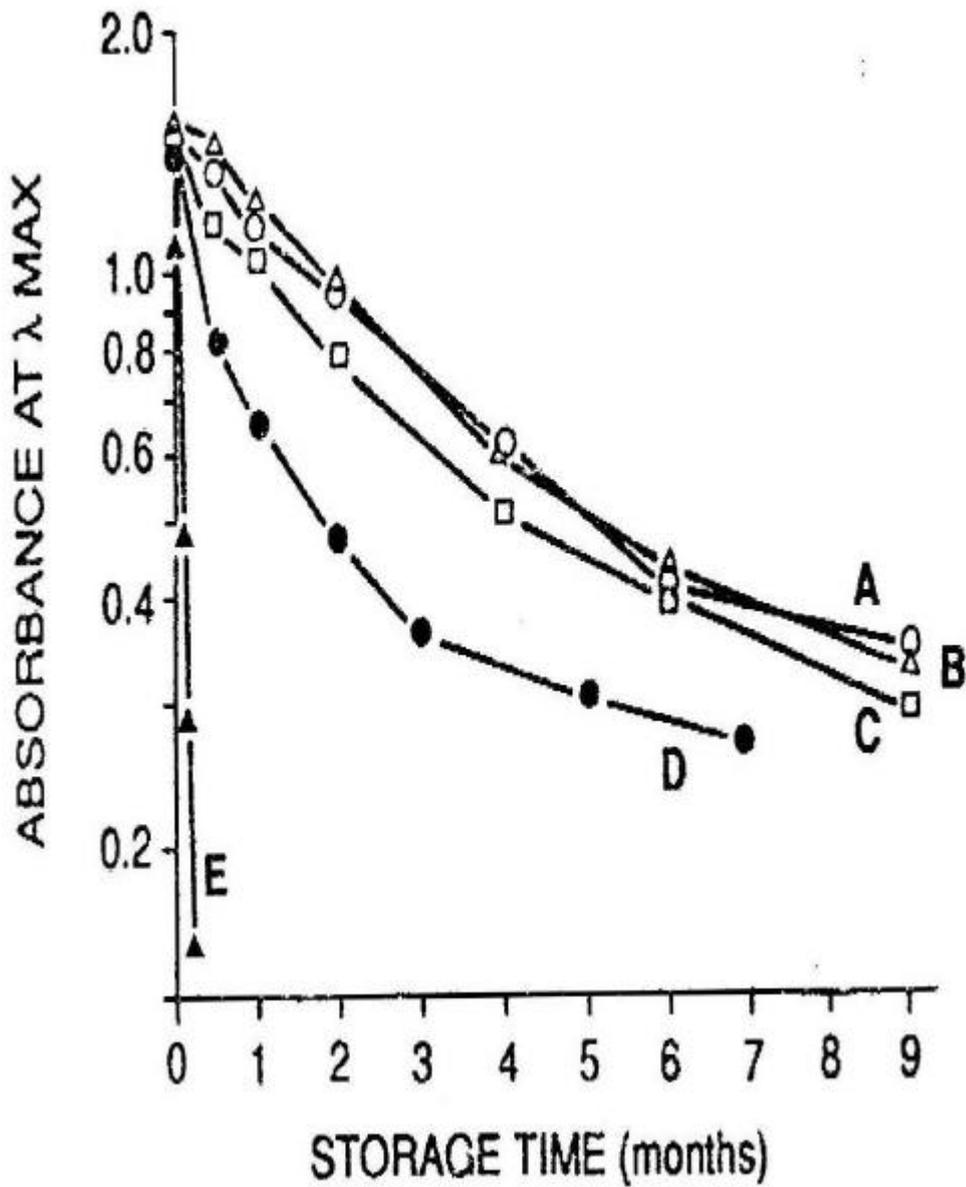
出紅高麗菜在 25 光照的安定性大於紅甜菜及蔓越橘，顯示紅高麗菜對光具有良好的儲存期。(圖六)



圖五、加熱 100 下對色素吸光值的影響

Fig.5. Effect of heating at 100 on the absorbance of colorants.

(A) 'Meteor' cabbage; (B) 'Resistant red Acre' cabbage;
 (C) 'Red Head' cabbage; (D) cranberry concentrate; and
 (E) red beet. (from Sapers, G. M. *et al.* Food Sci., 1981)



圖六、在 25 光照下對色素吸光值的影響

Fig.6. Effect of storage in light at 25 on the absorbance of colorants.

(A) ' Meteor ' cabbage; (B) ' Resistant red Acre ' cabbage;
 (C) ' Red Head ' cabbage; (D) cranberry concentrate; and
 (E) red beet. (from Sapers, G. M. *et al.* Food Sci.,1981)

D. 氧氣：

氧氣對花色素 安定性有不好的影響。在相同的 pH 值下，氧氣的存在，明顯的會降低花色素 的安定性。Adams(1972)指出 cyanidin 3-glucoside 和 cyanidin 在厭氧情況下進行熱加工試驗，結果發現在 pH2 至 pH4，花色素 並無明顯的破壞率。所以，他指出氧氣確實會加速花色素 在相同 pH 值下的裂解。

所以，在果汁包裝時減低氧氣存在的比例，確實能達到安定花色素 顏色之目的。

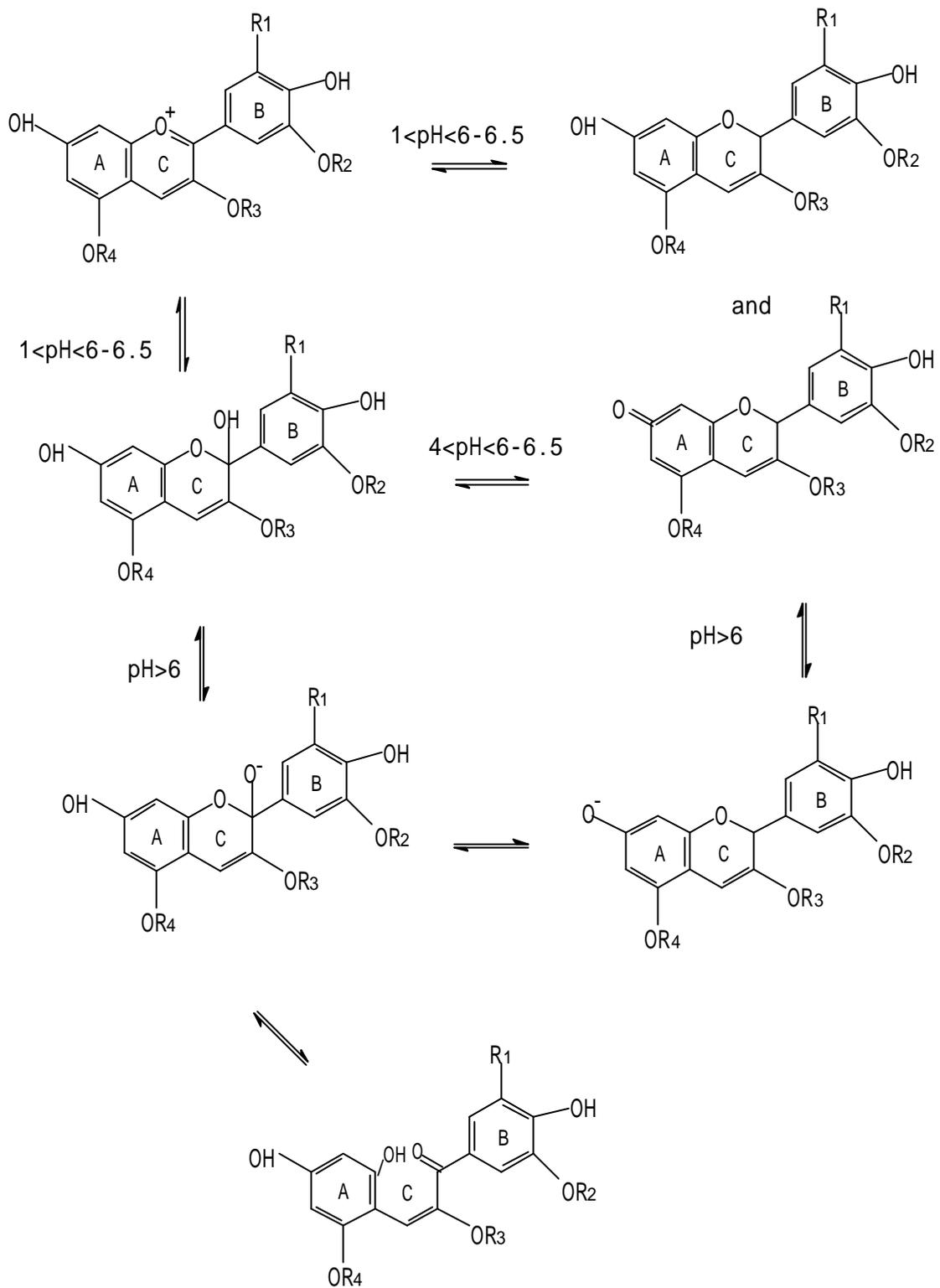
E. pH：

pH 對花色素 的影響，不只對其顏色有影響，對安定性亦有相當大的影響(Mazza and Brouillald,1990;Yoshida *et al*1991.,Cabrita *et al.*,2000)。

當 pH = 1 ~ 4 時，花色素 以紅色的 flavylum salt 與無色之 carbinol base 同時存在。當 pH=4~6.5 時，flavylum salt 立刻轉變成兩個紫色的 anhydro base 異構物，而後緩慢水合成無色之 inoized anhydro base，當 pH 超過 6.5 時，anhydro base 離子化成深藍色之 ionizes carbinol base，最後生成黃色的 chalcone。其變色機制如(圖七)(Hrazdina,1981)。

花色素 在不同 pH 值下呈色變化可分為兩大類，第一類花色素 在不同 pH 值中，只呈現一個吸收峰；這類花色素 在低 pH 值呈現紅色，隨著 pH 值提高其呈色變化由紅色轉變為淡紅色在轉為黃色；此類花色素 的醯基與 flavylum 環之間並無交互作用，因此顏

色的變化並無受到所含醯基的影響。第二類花色素 在低 pH 值出現一個吸收峰，隨著 pH 值的提高會呈現兩個吸收峰，其顏色變化由紅色轉為紫色。這類的花色素 顏色變化多，色澤強度變化小；此類花色素 會有兩個以上的醯基，且此醯基接在適當的位置，因此能上下將 flavylum cation 環夾在中間(即呈三明治夾心式(sandwich))，形成分子內共呈色，因此具有立體障礙，當 pH 提高時不易進行水合反應，而使得花色素 對 pH 較安定 (Yoshitama,1981,1992;Mazza and Miniati,1993)。由於醯基與 flavylum cation 間的 π -電子之交互作用，吸收峰的位置向長波長移動，而導致向紅效應(bathochromic effect)及增色效應(hyperchromatic effect)的產生。



圖七、花色素 在不同 pH 值下轉化反應(Hrazdina et. al,1981)
 Fig.7. Transformation reactions of anthocyanins at different pH.

F. 維生素 C

雖然果汁中含有維生素 C 在營養上很重要，但是它對花色素卻有不利的影響。Beattiw 等人(1943)首先注意到儲存的果汁中維生素 C 和花色素 同時消失。當維生素 C 和花色素 同時存在時，發現銅會加速維生素 C 的自氧化，結果導致花色素 也快速消失。

Tannenbaum 等人(1985)提出在有氧下，維生素 C 裂解產生過氧化氫。在氧氣和 Cu^{2+} 存在下，維生素 C 氧化生成 H_2O_2 而使花色素脫色，因此維生素 C 會因 H_2O_2 的關係而間接破壞花色素 。（圖八）

Debicki-Plstisil 等人 (1983) 也發現在無氧下則產生糠醛 (furfural)。糠醛的存在會促進 cyanidin 3-glucoside 的褪色，而使花色素 的顏色慢慢消失。所以，維生素 C 對花色素 安定性之重要性，可見一般。

G. 金屬：

多種多價金屬離子能與花色素 B 環之兩相鄰氫氧基反應形成複合物，使得色素的顏色朝向光譜的藍光移動。因此可藉著添加 AlCl_3 所引起的向紅效應(bathochromic effect)來鑑定糖 配基是否含有兩個相鄰的氫氧基。

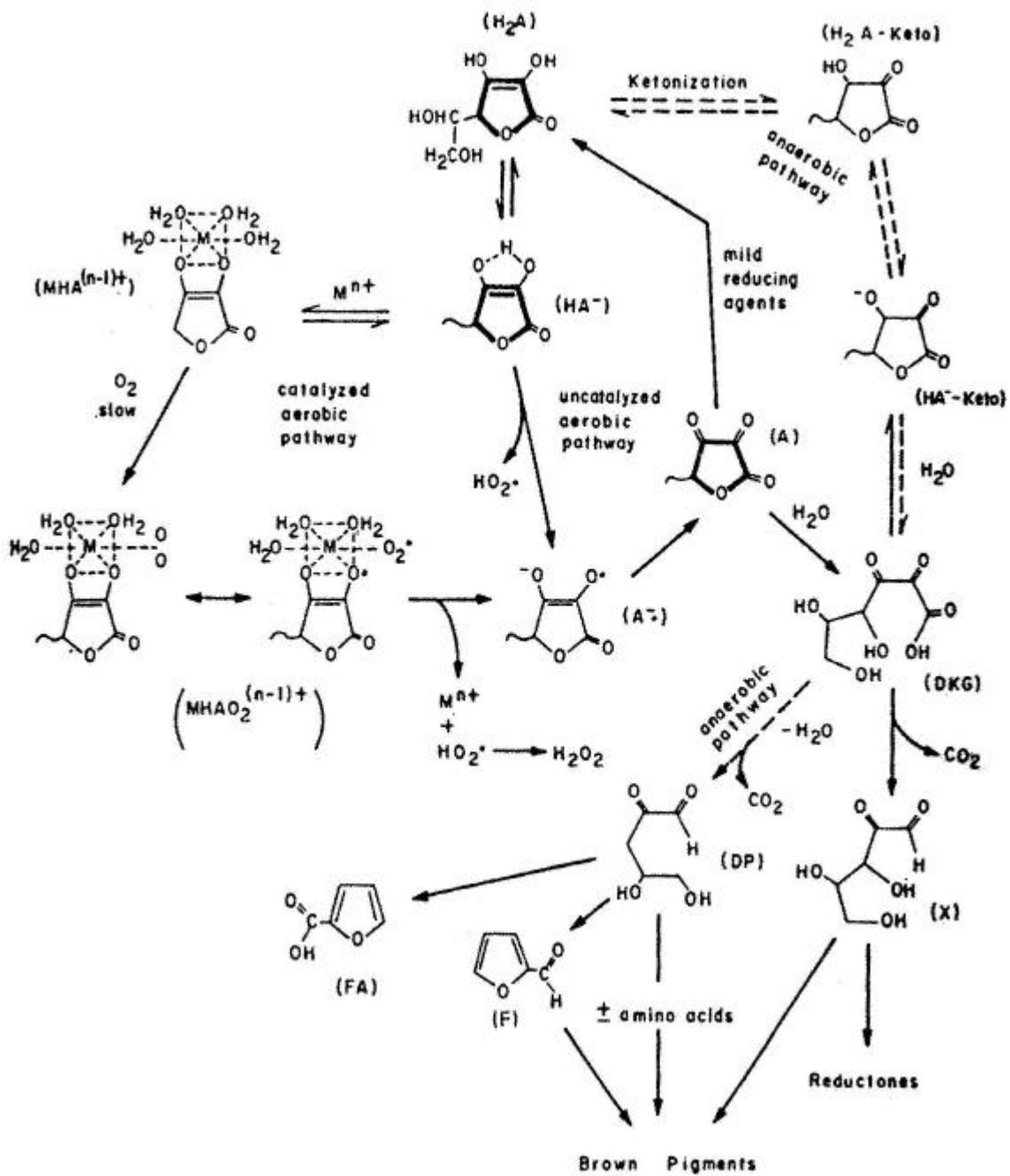
花色素 與 Fe^{3+} 和 Sn^{2+} 也會形成錯合物而影響顏色。另外，重金屬銅和鐵在維生素 C 的氧化和損失過程中當作催化劑(Sondheimer and Kertesz,1953)。在一些報告中指出形成金屬-單寧複合物的形成，顏色會變暗。

H.共呈色物質(copigment):

植物的花、葉、果實和地下莖所呈現的紅色、紫色和藍色大部分係由花色素 存在之故。而這些不同的顏色變化除了 pH 作用之外、係由於其他物質存在與花色素 起共呈色作用(copigment)。

能與花色素 引起共呈色作用的物質包括 基酸、類黃酮素、苯甲酸、生物鹼、香豆素、肉桂酸、核 酸和許多 flavylum 化合物等。(Mazza and Brouillard,1990;Mazza and Miniati,1993)。

共呈色反應隨著花色素 濃度與共呈色物質對花色素 的莫耳比增加而增加(Asen 等人, 1972; Timberlake, 1980); 另外, 在相同環境下共呈色效應也會隨花色素 甲基化程度的增加而增加(邱和范, 1998)。



圖八、維生素 C 之裂解機制(摘自 Tannenbaum 等人, 1985)

Fig.8.Degradation of ascorbic acid. Bold lines-major forms with vitamin activity.

五、花色素 作為食品著色劑

顏色是食品重要性質之一，可提高食品本身的商業價值，並當作品質判斷標準。因食品的顏色變化極大不易控制，因此若要控制食品顏色之外觀須添加一些色素。在過去三十年中，人工色素因毒性試驗而被禁用，如：紅色素二號已被禁止使用。在一項調查報告中指出在 1968-1995 年間食用色素的專利有 356 件，而天然食用色素只有 71 件(Francis , 1996)，其餘皆為人工合成之人工色素。

花色素 可能是較廣為人知之天然色素，因為它賦予許多蔬菜和水果紅色、紫色與藍色。儘管如此，仍未被廣泛的應用在食用色素上，其原因為花色 並不十分穩定，在酸性 pH 值才顯現顏色，也因不易純化、製造技術困難、經濟和安全性等考量，因而限制它應用為食品色素；在食品加工或儲藏過程中常遇到一些重要因素如：氧氣、光線照射和維生素丙，若能進行花色素 在這些因素存在下的安定性研究，將有助於這些花色素 的開發與推廣。表二 (Timberlake and Bridle , 1980) 歸納運用於食品中當做著色劑的一些花色素 及其來源。

表二、作為食品著色劑花色素 來源(Timberlake and
Bridle , 1980)

Table 2.The sources of anthocyanins used as food colorant

| 種類 | 主要花色素 | 提供顏色 |
|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| Grape skin (vitis vinifera) | Cy,Pn,Mv monosides | Purple-red |
| Roselle calyces | Cy,Dp mono-and biosides | Red |
| Red cabbage | Cy glucosides free and acylated | Purple-red |
| Blueberry | Cy, Pn, Dp,Mv monoglucoside | Blue-red |
| Cherry, plum | Cy, Pn, mono-and biosides | Red |

六、天然色素的發展概況

天然色素從古老的年代就已開始利用在許多用途上，例如可做為食品著色劑、化妝品和布料染色之用途，因此具有高價值產品，儼然已成為許多貿易國家往來的經濟基礎；但由於近年來，人工合成色素蓬勃發展，因其具有價格便宜、不易變色，而使得天然色素沈寂了許久。

越來越多人以天然色素為訴求的意識日漸高漲，使得越來越多學者以及製造者希望可以開發天然色素之新產品；目前常被應用的天然色素有婀娜多(Annatto)-應用在乳製品的染色上；薑黃色素(Turmeric)-作為醬料的調色(劉，1999)，以及紅甘藍菜、胡蘿蔔素、番茄紅素、葉綠素及紅麴等色素皆常應用在食品加工之染色。

由於對天然色素的需求仍會增加，在農業和生物的原料上，也將會衍生許多新的色素，因此極具有研究開發之潛力而成為高經濟價值之商品。

七、花色素 之生理療效

花色素 (anthocyanins), 乃為一群對心血管具有良好作用之生物黃酮類 (bioflavonols) 的還原體；其抗氧化能力為維生素 C 或維生素 E 之十倍強(Wilhelmina. *et al.*,1999), 因此為一良好之天然抗氧化劑之來源。

人體之代謝過程，即為氧化作用，故抗氧化即可抗老防癌，已漸漸成為在預防老化上得到醫學界之認同。生物黃酮類，又稱維生素 P，為一種強力的抗氧化劑。常見的有芸香 (rutin)以及懈皮黃素 (quercetin)，其具有改變毛細管韌度，減緩血管硬化(低密度脂蛋白的氧化結果，容易沈積在血管壁上)，防止動脈粥腫樣硬化症具有相當療效；因此，在預防心血管疾病方面頗富盛名(Meyer,A.S.*et al.*,1998)。

表三歸納出花色素 各項生理功能 (Sab Choong, 1999)

表三、花色素 之生理功能

Table.3. Physiology functional of anthocyanins (Sab Choong,1999)

| | |
|----|--|
| 腦部 | <ul style="list-style-type: none">● 通過腦血管壁，提供及加強腦內抗氧化的功能，預防腦細胞病變及老化。 |
| 血管 | <ul style="list-style-type: none">● 增強血管壁中之膠原纖維使血管強韌，富有彈性，有助於改善靜脈曲張。● 防止 LDL 膽固醇囤積在血管壁上，減少心臟血管疾病之風險。● 減少血小板凝集，預防血管栓塞，降低動脈粥狀現象。 |
| 皮膚 | <ul style="list-style-type: none">● 促進皮膚代謝良好，預防黑色素囤積。● 保護皮膚免於紫外線的傷害並預防膠原纖維及彈性纖維的退化。 |

八、花色素之抗氧化性

Polyphenol 具有抗氧化作用，Pratt and Miller(1984) 與 Fukuda(1985) 等人發現棉花籽、大豆與米糠等之製油種籽皆含有 polyphenol 構造的抗氧化物，其中包括了 quercetin (flavonoid)。而花色素 亦為 flavonoid 之一種，亦具有抗氧化之功能。

在 pH2 之緩衝溶液下，pelargonidin、cyanidin 和 delphinidin 可能依相同的模式裂解成 *P*-hydroxybenzoic acid、3,4 di hydroxybenzoic acid 與 3,4,5 tri hydroxybenzoic acid。而此三個裂解產物提供了花色素在 pH2 緩衝液中之抗氧化性。因此、當花色素 B 環上的 基越多時，花色素的抗氧化能力越強(楊,1995)。

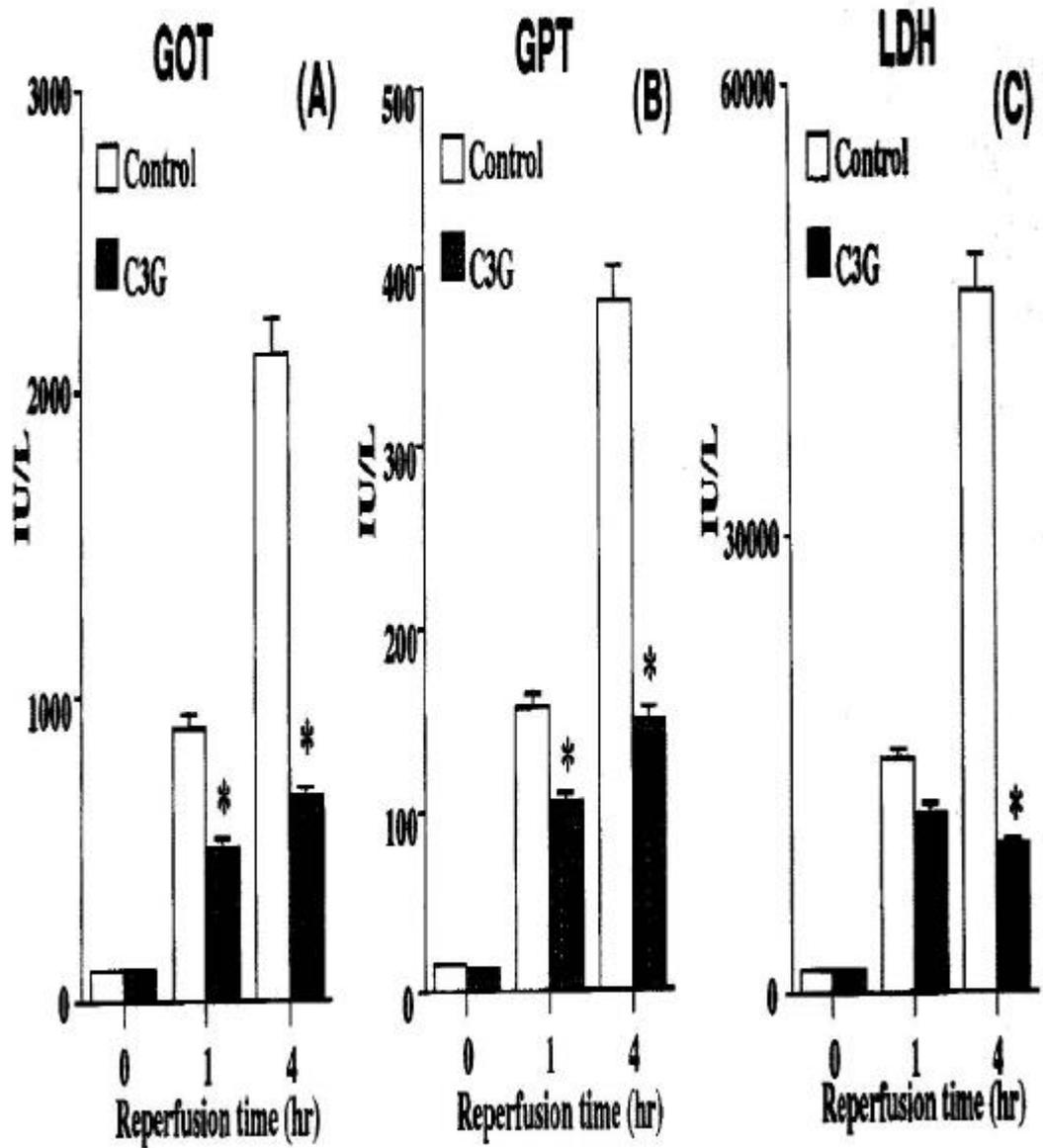
Igarashi 等人於 1989,1993 亦曾探討葡萄皮、茄子皮花色素 與花色素之抗氧化性。Tamura(1994) 等人發現葡萄皮花色素 具有抗氧化性，且花色素 可作為天然食品色素，因此花色素 在天然抗氧化劑的開發具有更高的研究價值。

根據一項動物試驗，發現攝取 Cy-3-glucoside 可降低老鼠血漿中血脂肪之濃度，因此可避免脂肪過氧化之傷害；當肝臟的功能降低時，血液中 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)、GPT (glutamic pyruvic transaminase)、LDH (lactate dehydrogenase)之濃度隨即上升，若添加 Cy-3-glucoside 可抑制肝臟中之酵素上升(圖九) (Takanori, 1999)。當餵飼 2g/kg 之 Cy-3-glucoside 偵測大白鼠血清中的酵素濃度，確實有降低血脂氧化效果，避免肝臟受到損害。

氧化活性常因 OH 自由基、超氧陰離子、以及單氧狀態之自由基所引起的細胞破壞，而引起癌症、突變、老化、動脈硬化等病變 (Packer and Mori.,1995)。

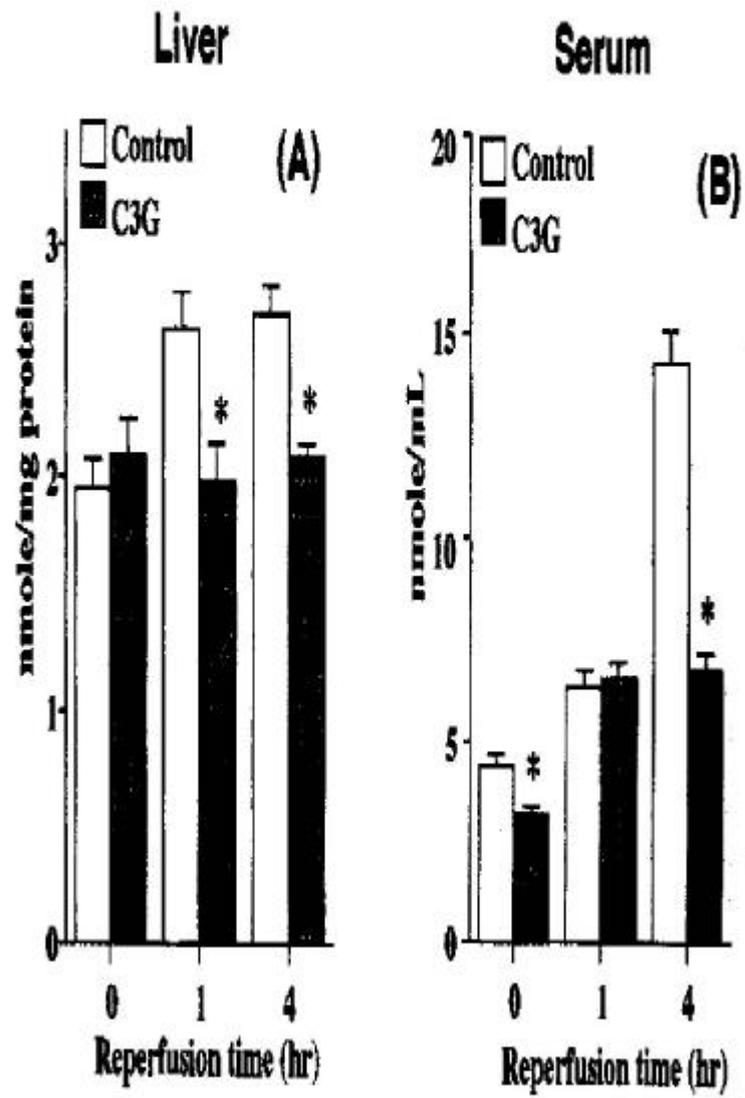
目前已確知由紅豆及黑豆所分離出的花色素 確實具有抗氧化之能力(Tsuda *et.al.*,1996)。其中由色素中所分離出的 Cy-3-glucoside 顯示有其重要的抗氧化能力。

同時證明 Cy-3-glucoside 具有清除自由基的能力(OH 及超氧化)，同時亦可降低血清中 TBARs 的濃度(圖十)，增加抵抗血液中因脂肪過氧化所造成之傷害。Cy-3-glucoside 同時具有像 α -tocopherol 或抗壞血酸之特性，可防止肝臟中血液的脂肪受過氧化損害。(Ozaki *et.al.*, 1995)。



圖九、添加 Cy-3-g 與未添加 Cy-3-g(control)對老鼠肝臟受損所產生三種酵素活性濃度指標(GOT,GPT,LDH)。

Fig.9. The serum activities of marker enzymes(GOT,GPT,LDH) for liver injury rats in the control and C3G. (Takanori,1999)



圖十、添加 Cy-3-g 與未添加 Cy-3-g(control)對老鼠肝臟(A)及血清(B)中的 TBARs 濃度速率的影響。

Fig.10.The liver(A)and serum(B)TBARs concentrations of rats in the control and C3G. (Takanori, 1999)

伍、材料與方法

實驗材料：

1. 紫蕪(purple vienna)：購自台中西屯路黃昏市場。
2. 花色素(anthocyanidin)之標準品
Cyanidin：由紅薯花色素 製備而得。
Delphinidin：由茄子花花色素 製備而得。
3. 酸標準品
Caffeic acid、p-coumaric acid、sinapic acid、ferulic acid
由美國 Sigma 化學公司購得。
4. 糖標準品
Glucose、galactose、arabinox、xylose、rhamnose 等皆由美國
Sigma 化學公司購得。
5. 紅甘藍菜粉末：由日本 SAN-EI 化學公司贈送。
6. 分析用的其他藥品購自台灣 Merck、美國 Sigma、Aldrich 及瑞典 Fluka 公司。

實驗方法

一、紫蕪花色素 之萃取及分離：

- 1、購自市場之紫蕪球莖(*Brassica oleracea* var *caulorapa*)，經洗淨、削取球莖表皮，浸泡於 0.1%鹽酸之甲醇中，於 4℃ 下靜置隔夜後經紗布過濾，濾液在 30℃ 下濃縮去甲醇，再以 Amberlite XAD-7 管柱進一步濃縮並去除甲醇。
- 2、花色素 經減壓濃縮後，溶於適當的水中，以 Bio-Gel P-2(2.5 × 45cm) 管柱分離，以含酸水(pH2.0)沖提，花色素 將依分子量大小而區分，洗脫之花色素 以分液收集器(Fraction collector)分別收集，利用分光光度計於波長 535nm 測其吸光值。

二、花色素 之分離及純化：

- 1、收集的花色素 混合物用 0.45 μm Millioper 膜過濾，注入 HPLC 作進一步的分離純化，HPLC 所使用的條件如下表四：
- 2、將分離純化所得之花色素 ，於減壓濃縮除去 acetonitrile，通入 Amberlite XAD-7 管柱吸附，以 0.01% 鹽酸蒸餾水洗除磷酸鹽；再以 0.01% 鹽酸-甲醇自管柱將色素洗下收集，予以減壓濃縮乾燥，儲存於-60℃ 冷凍櫃中以備各項分析。

表四、紫蕪花色素 之 HPLC 分析條件

Table.4. HPLC separation condition for purple vienna

| | |
|---------------------|---|
| Pump | Model 760 pump (Alcott) |
| Detector | Variable wavelength UV-Vis detector (Soma) S-3720 |
| Recorder | Recorder (Bio-Rad) |
| Column | Semi-preparative Nucleosil C8 column (10 × 250 mm) (Merck) |
| Detector wavelength | 535 nm |
| Mobile phase | CH ₃ CN: 1% phosphate buffer (20:80, V/V pH=2) |
| Flow rate | 2.0 ml/min |

三、 花色素 之光譜分析

1、花色素 之紫外光-可見光光譜掃描

將 HPLC 所純化之樣品溶於 0.01% 鹽酸甲醇中，正確測出樣品在甲醇溶液中之極大吸收波長。滴數滴含有 5% AlCl_3 之 95% 酒精溶液於樣品溶液中，觀察可見光最大吸收光譜有無移動情形發生。此反應主要是測定花色素 B 環是否有二個相鄰的氫氧基存在。

2、不同 pH 下之可見光光譜分析

將純化出各帶紫蕪花色素 分別溶於 pH2 pH8 之等體積檸檬酸-磷酸緩衝溶液中，以可見光吸收光譜掃描其在不同 pH 值下各波長吸光值之變化情形。

檸檬酸-磷酸緩衝溶液的製備：

A=0.1 M 檸檬酸 B=0.2 M 磷酸氫二鈉

pH=2 A:B=50:0 (v/v) , pH=3 A:B=39.8:10.2 (v/v)

pH=4 A:B=30.7:19.3 (v/v) , pH=5 A:B=24.3:25.7(v/v)

pH=6 A:B=17.9:32.1(v/v) , pH=7 A:B=6.5:43.6 (v/v)

pH=8 A:B=1:49 (v/v)

由以上 A 與 B 的各種比例，將 A 和 B 混合稀釋至 100ml 即可。

3、紫蕪花色素 去醯化 (deacylation) 產物之光譜分析

去醯化作用乃將純化後之花色素 經減壓濃縮乾燥，加入甲醇，於充滿氮氣下加入 2 N NaOH 均勻混合，在室溫下放置兩小時、然後以 2N HCl 酸化，再以乙醚萃取醯化合物(acyl compound) (Imbert 等人，1968)。

再將所得去醯花色素 以 Bio-Rad P-2(2.5 × 45cm)管柱進一步分離，得到高純度之去醯花色素，然後再予以減壓濃縮乾燥，以全光譜掃描看其在 330nm 之吸收峰是否消失。

四、花色素 之濾紙層析性質

將純化出各帶花色素 以 Advantec Toyo 50 濾紙和 TLC 片 (Merck cellulose F plastic sheet) 予以展開，測其 R_f 值(Harbone, 1958)。所用之展開液為:BAW、AWH、1% HCl、BuHCl。(表四)

五、花色素(Anthocyanidin)的測定

將純化後的花色素 添加 2 ml 2N HCl，於 100 水浴中以冷凝迴流加熱水解一小時，冷卻後，用 1ml 的戊醇(amy alcohol) 萃取其花色素。經減壓濃縮乾燥除去戊醇，以 0.45 μ m millipore 過濾後進行 HPLC 及 TLC 之分析。

1、以 HPLC 分析花色素，所使用的 HPLC 條件和裝置如下：

Pump: model 760 pump (Alcott)

Detector: Variable Wavelength Uv-Vis detector (Soma) S-3720

Recorder: recoder (Bio-Rad)

Column: Lichrosper RP-18(4.6mm × 250mm) (Merck)

Detector wavelength: 535nm

Mobile phase: MeOH-AcOH-H₂O (29:10:61)Flow rate: 1.0ml/min

2、分析花色素所用的 TLC (Merck cellulose F plastic sheet)，以 forestal (Acetic acid-HCl-H₂O, 30:3:10 v/v/v)、formic acid (Formic acid-HCl-H₂O 5:2:3 v/v/v) 為展開劑(伍和孫, 1980) 和花色素標準品一起展開比較。所用標準品有 cyanidin、delphinidin。

表五、用於各種層析之溶劑系統 (Francis, 1966)

Table 5. selected solvents for chromatphies of anthocyanins

| | Composition | Proportion(v/v) |
|----------|---|--------------------|
| BAW | n-butanol-acetic acid-water | 4:1:5(upper phase) |
| AWH | Acetic acid- Water-Conc.hydrochloric acid | 15:82:3 |
| 1% HCl | Conc.hydrochloric acid-Water | 3:97 |
| BuHCl | n-butanol-2N hydrochloric acid | 1:1 |
| Formic | Formic acid-HCl-Water | 5:2:3 |
| Forestal | Acetic acid-HCl-Water | 30:3:10 |

六、acyl compound 的測定

將純化後之花色素 減壓濃縮乾燥後，加入甲醇，於充滿氮氣下加入 2 N NaOH 均勻混合進行水解，在室溫下放置兩小時、然後以 2N HCl 予以酸化，再以乙醚萃取 acyl compound (Imbert 等人,1968)，取出乙醚層（上層）經減壓濃縮乾燥後，以甲醇溶解，經 0.45 μ m Millipore 過濾後，進行 HPLC 及毛細管電泳之分析。

毛細管電泳分析，用於本實驗的毛細管電泳係由零件組合而成，裝置如圖十一，組件包括 Model MJ 309400 直流電供應器(Glassman High Voltage, Inc. NJ. USA)，Linear 206 偵測器(Linear Instruments Corporation, Nevada, USA) (波長設在 210 nm) 和 60cm \times 75 μ m I.D. fused silica capillary tube (polymicro Technologies, phoenix AZ, USA) 視窗設於 55cm 處，使用的電壓為 -20kV。所用之標準品溶液濃度為 0.1mg/ml H₂O-MeOH (1:1 v/v)，注射量採用電動注射(electrokinetic injection) 2 秒鐘。條件如表六。

七、糖(sugar)之鑑定:

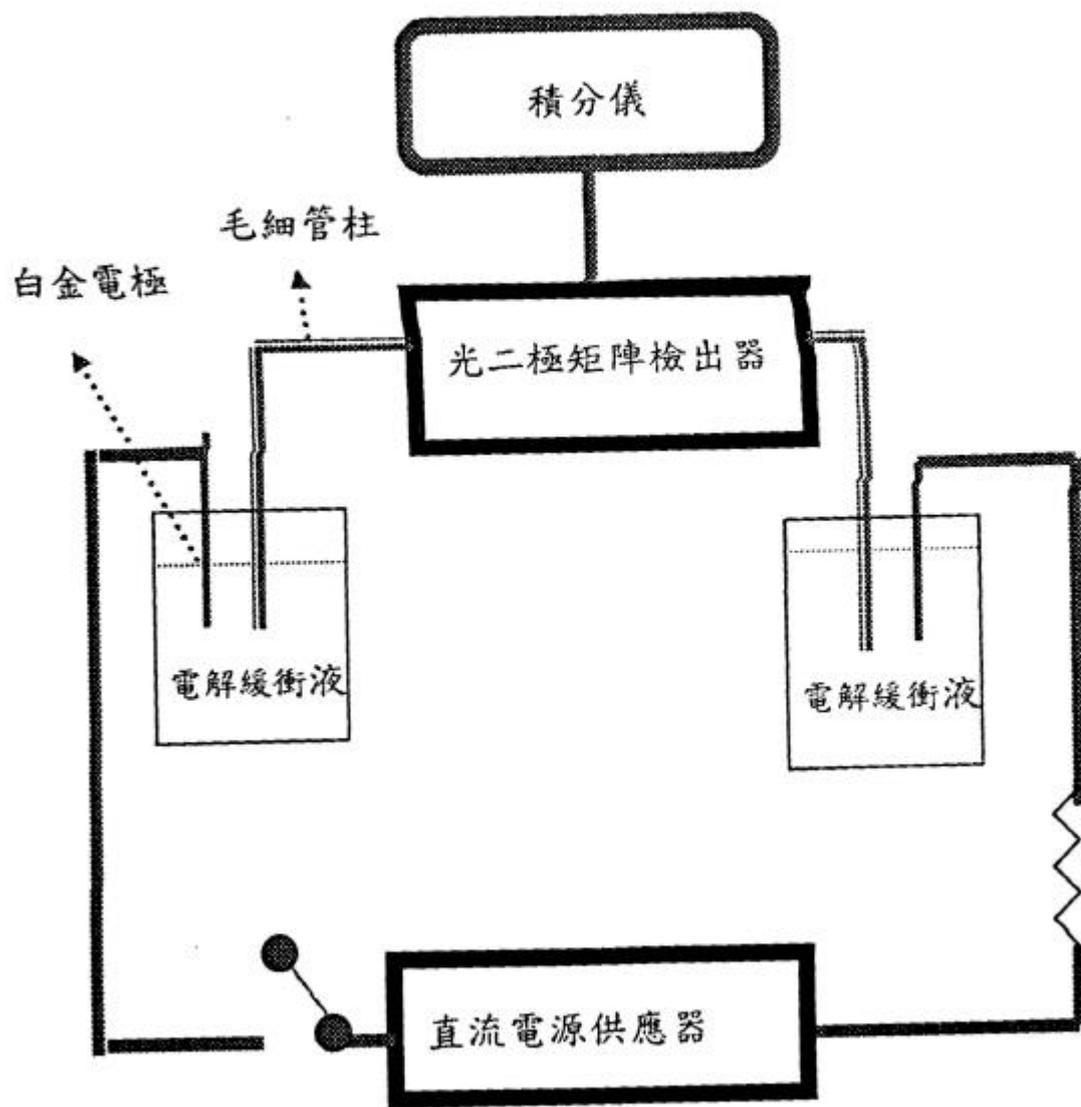
純化後的花色素 加入 1ml 2N HCl, 置於加熱包中, 以冷凝迴流的加熱方式加熱使其水解一小時(Yoshitama and Abb,1977), 取出快速冷卻, 花色素 之酸水解物分別以戊醇 (amyl alcohol)及乙醚分別將花色素和 acyl compound 萃取除去, 殘留的水溶液以 10% di-n-octylmethyamine (in chloroform)洗滌數次以除去其中的鹽酸, 再用數毫升氯仿洗滌除去殘留的胺, 再將此溶液乾燥之。加入 3 毫升水以溶解乾燥殘留的糖, 利用 HPX-87P(300 × 7.8mm) (Bio-Rad) 管柱分離, 以 80 水為移動相, 以 RI-detector 偵測來鑑定糖的種類。

根據 Englyst 等人(1982)的方法製備成 alditol acetate, 利用氣相層析(GC)方法鑑定之, 並以標準品相比較。alditol acetate 的製備:

a. 還原 (reduction)- 上述 3ml 之糖溶液, 添加 0.2ml 3M 氨水(含有 sodium tetrahydroborate() 100mg/ml) 混合均勻, 並放置於室溫至少 2 小時。添加 0.5ml 甲醇和 0.2ml 的冰醋酸, 於 40 蒸發至乾燥。添加 3 ml 甲醇清洗殘留物並蒸發至乾燥。重複此洗滌步驟兩次。

b. 乙酯化 (acetylation) - 將還原步驟乾燥的殘留物, 加入 0.5 ml acetic anhydride 混合均勻, 加蓋, 於 120 加熱 2 小時, 在前 10 分鐘必須經常搖動, 再取 1-2 μ l 上清液做氣相層析(gas chromatography)分析。

所使用之氣相層析條件如表七:



圖十一、毛細管電泳檢測裝置圖

Fig.11 Instrumental set-up of a capillary electroporesis system.

表六、紫蕪醯基之毛細管電泳分析條件

Table 6. Capillary zone electrophoresis separation condition for
purple vienna

| | |
|-------------|--|
| Column | 60cm × 75 μ m I.D.fused silica capillary tube (window at 55cm) |
| Inject | 2 sec |
| Buffer | (6mM HTAB-8mM Na ₂ B ₄ O ₇ -2mM NaH ₂ P ₄ O ₇ , pH=9.63) -CH ₃ CN(7:3) |
| Chart speed | 5cm/min |
| Wavelength | 210 nm |
| Voltage | -20 kv |
| Detector | Linear UV-vis photodiode array detector |
| Integrator | Hitachi D-2500 chromatographic integrator |

表七、分析糖基所用之 GC 條件

Table 7. GC separation condition for sugar groups of anthocyanins

| | |
|--------------------|---|
| Instrument | Shimadzu GC-14A |
| Detector | FID |
| Integrater | Shimadzu C-R6A integrater |
| Column | Supelco SP-2330 column (nonbonded;80 % biscyanopropyl / 20% cyanopropyl phenyl polysiloxane;0.25mm × 30m) |
| Carries gas | N ₂ |
| FID tempature | 240 |
| Injector tempature | 240 |
| Column tempature | 225 |

八、花色素 分子量測定

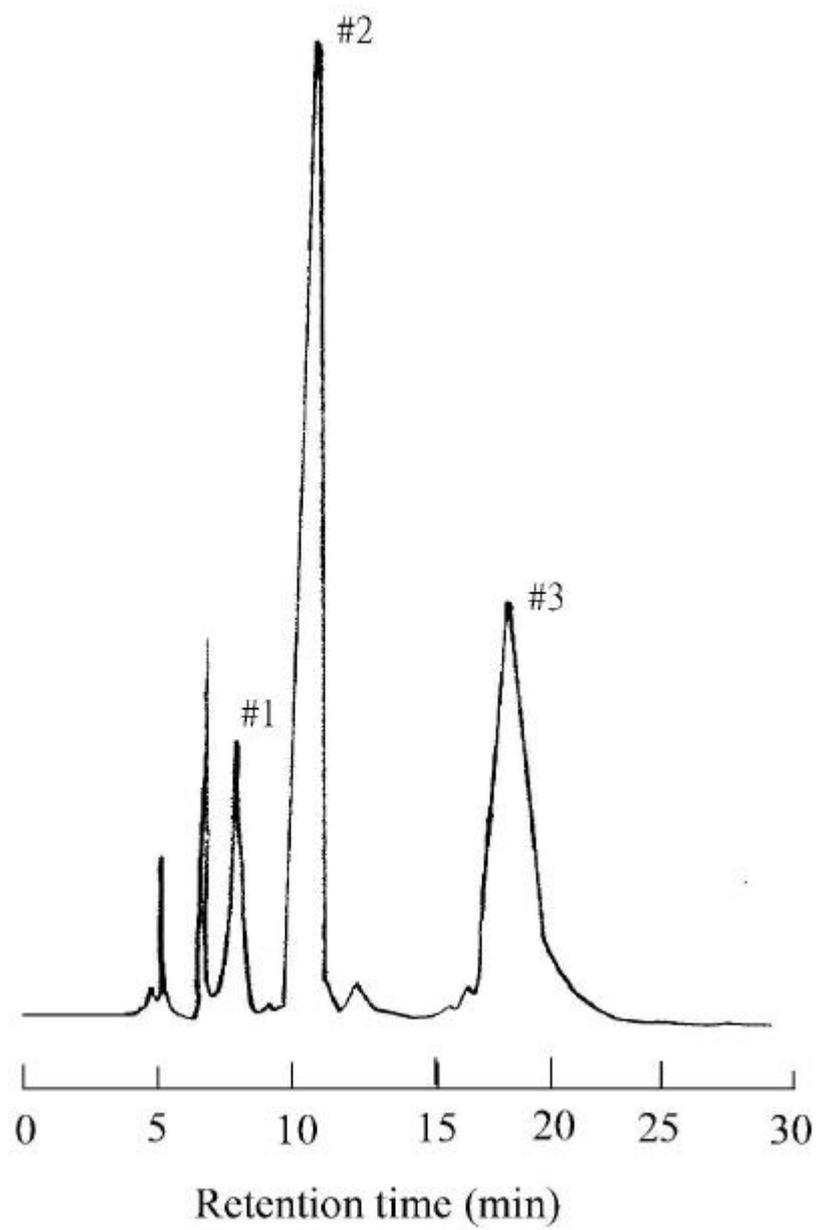
花色素 分子量將用快速原子撞擊游離法質譜 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry , FAB-MS) 法測定 (Saito 等人 , 1983 , 1988)。快速原子撞擊游離法質譜(FAB-MS)由 VG-Quattro 質譜儀獲得。利用硫代甘油(thioglycerol)與甘油(glycerol)混合液作介質(matrix) , 以中性的原子束為主要游離源 , 高速運動之原子衝擊樣品。

經過 Bio-gel P2 管柱純化花色素 以氮氣吹乾 , 取些許 0.01% 鹽酸甲醇溶解 , 並加入介質混合液 , 沾在載體靶上送入游離室 , 由 M^+ 來判定分子量。

陸、結果與討論

一、紫蕪花色素 之分離與純化

利用 Amberlite XAD-7 液相管柱層析，以 0.01% 鹽酸-甲醇將花色素 液予以沖提下來。花色素 溶液經濃縮後，以 0.45 μ m millpore 膜過濾，注入 HPLC 予以進一步純化而得到三個主要花色素 化合物，將之予以收集純化(圖十二)。再將純化過的花色素 溶液，經減壓濃縮除去 CH_3CN ，通入 Amberlite XAD-7 管柱吸附，以 pH=2.0 鹽酸之蒸餾水洗除磷酸鹽，再以 0.01% 鹽酸-甲醇將色素予以洗下收集。利用 HPLC 個別收集到 # 1、# 2、# 3 之各帶純花色素，其滯留時間(retention time)分別為 7.71、10.88 及 19.27 分鐘 (圖十二、附圖五)；所收集的各色素純度皆可達 90% 以上。接著利用降解作用測定各帶花色素之各化學結構組成。



圖十二、紫蕪花色素 之 HPLC 分析圖

Fig.12. HPLC separation of anthocyanin from Purple Vienna.

二、紫蕪花色素 之吸收光譜分析

花色素 重要的一些結構特性、可由吸收光譜數據分析獲得 (Harborne,1958)。包括糖 配基(花色素)的特性、糖分子鍵結的位置以及是否被芳香族有機酸醯化。

1、經 HPLC 純化過的花色素 ，以 UV-Vis 光譜掃描，此三個花色素 化合物的光譜用 0.01% 鹽酸-甲醇加以測定，如 表八及附圖一 所示結果發現在波長 330nm 左右有極大的吸收峰；因此由附圖一顯示此三個花色素 化合物 皆含有 acyl compound。由 acyl group 與糖 配基之比值 ($E_{acyl} / E_{Vis\ max}$) 可推測出一分子花色素 含有幾分子的 acyl compound (Harborne , 1964)。 #1、 #2、 #3 花色素 之 $E_{acyl} / E_{Vis\ max}$ 分別為 65%、74.6%、109%；由 $E_{acyl} / E_{Vis\ max}$ 之比值可推測第#1、 #2 花色素 各含一個 acyl compound，而#3 含有兩個 acyl compound。

各個花色素 compound 的吸收光譜峰的位置都很類似，添加 $AlCl_3$ (Al^{3+}) 花色素 甲醇溶液顏色由紅色變成紫色，而且都會導致向紅效應(bathochromic effect)，由此可判定花色素 的 B 環含有兩相鄰的氫氧基，即 3', 4'位置並不含糖基。Harborne (1958)報告指出 Cyanidin, Petunidin 和 Delphinidin 之 B 環有兩個以上相鄰的 OH 基，而 Pelargonidin, Peonidin 和 Malvidin 則無此現象。因此利用此性質可進一步的將花色素 的花色素(anthocyanidin)做進一步的歸類。

2、去酸花色素 經 Bio-Rad P-2 (2.5 × 45cm) 純化，經 UV- Vis 光譜掃描如(表八、附圖二)所示，結果發現在波長 330nm 左右的吸收峰消失。

鹼水解除酸後，各去醯花色素 光譜非常類似，在紫外燈下照射顯示為螢光，表示各去醯花色素 的 3,5 位置含有糖；而 $E_{440}/E_{vis\ max}$ 之三化合物花色素 分別為 14.1 14.1 13.2；根據文獻指出(Harborne, 1964)，當 $E_{acyl}/E_{vis\ max}$ 約 13-15 時，表示 cyanidin 在 C5 位置上有糖取代。所以我們可以推論此三個花色素 化合物在 C5 位置上有糖取代。再依據所做的各個去醯花色素 ，在紫外燈下照射顯示螢光，因此可證實花色素 的 C5 位置確實含有糖 (Chandler and Harper,1961)。

由去醯花色素 在四種不同溶劑系統(BAW、Bu-HCl、1%HCl 和 AAH)中所呈現的濾紙層析和吸收光譜，與已發表的文獻 (Yoshitama and Abe,1977) 相比較，此三化合物去醯花色素 之 Rf 值及光譜分析數據，與分離自紅高麗菜之 Cyanidin - 3 - sophoroside - 5 - glucoside 一起展開比較，以及經 reversed phase HPLC (C8 管柱) 分析 (圖十三) 光譜分析，根據其滯留時間、Rf 值和光譜數據之結果，推論其結構與紅高麗菜非常相似。

綜合各帶紫蕪去醯花色素 光譜，以及於四種不同展開劑之濾紙層析性質及 HPLC 與去醯紅高麗菜相比較，可進一步推論此三個化合物去醯花色素 ，同為紅高麗菜去醯後之結構 cyanidin - 3 - sophoroside - 5 - glucoside。利用 HPLC 分析皆經樣品與 cyanidin-3-sophoroside - 5 - glucoside (紅高麗菜去醯後) 混合後共同注射而確定其結果。

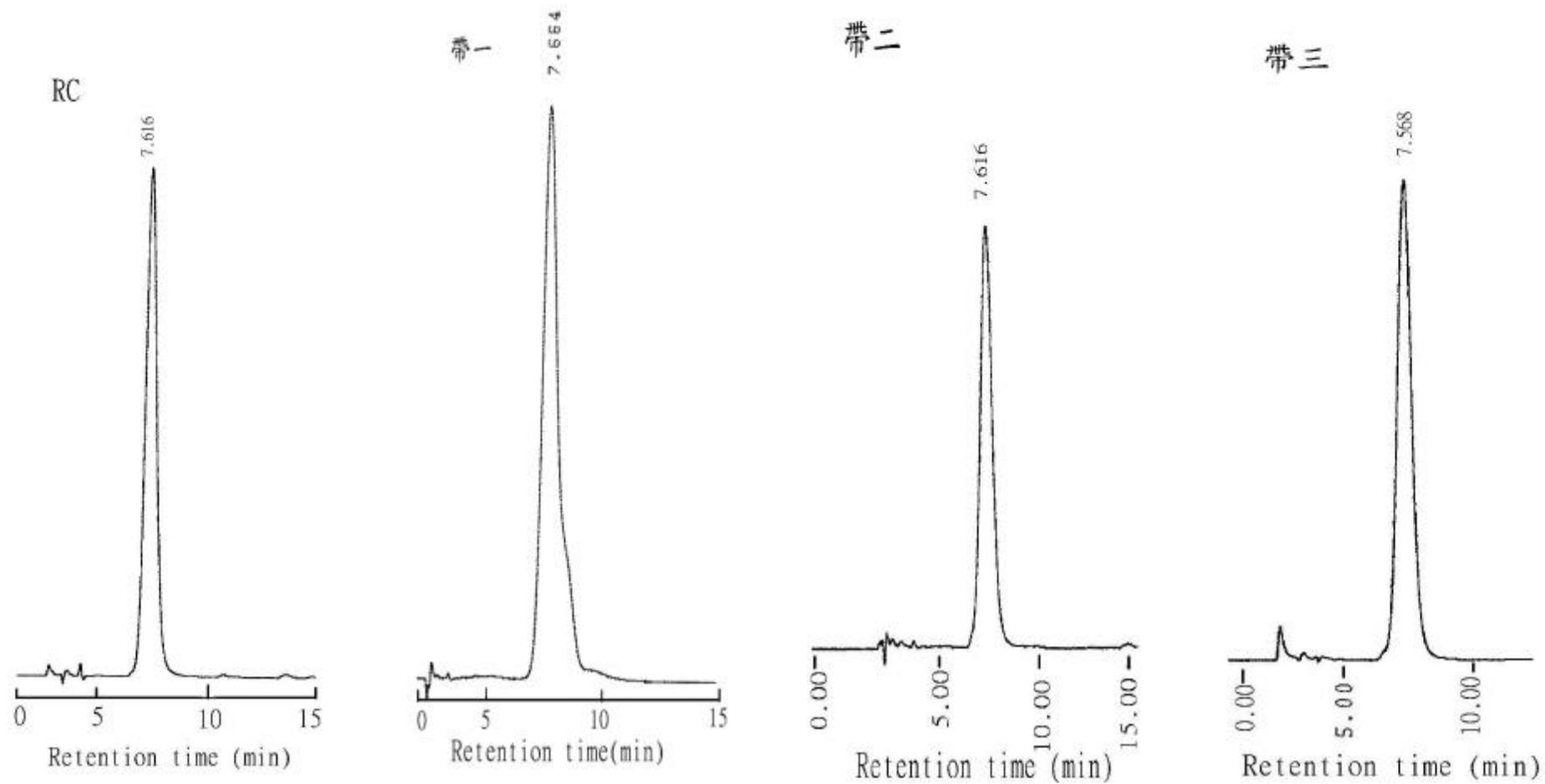
3、經 HPLC 純化出三化合物主要花色素，將每個花色素 化合物溶於於各種不同 pH 值的磷酸緩衝溶液中，用色差儀測定其 L.a.b 值之色澤變化(表九)，並且分別掃描其吸收光譜；於圖十四中可發現，紫蕪各花色素 化合物在不同 pH 值的磷酸緩衝溶液中，只有一吸收峰，其顏色在 pH 2 時呈紅色，隨著 pH 之提高，紅色隨即消褪而呈無色。

當 pH 提高時，由於帶正電的的氧離子被破壞及發生水合反應，因而破壞原有的共軛結構；而使得花色素 之顏色逐漸消失褪色，而呈淡藍色。

將每個花色素 compound 溶於不同 pH 值之磷酸鹽緩衝溶液，並分別掃描其 700 至 200 nm 之吸收光譜，可發現可見光最大吸收光峰隨著 pH 值不同而移動。紫蕪 #1、#2 花色素 分別在 pH 1.75 及 pH 1.80 時，呈現最大吸光值(圖十四)，隨著 pH 值的增加而吸光值逐漸降低，在 pH 5.83 及 5.86 時降至最低，又隨著 pH 的增加而吸收峰向右移動。其顏色由紅紫 (RP) 紫 (P) 藍 (B)，色澤強度隨著 pH 之增加而下降。

紫蕪花色素 #3 在 pH 1.76 時呈現最大吸光值，在 pH 5.84 時降至最低(圖十四)；其顏色變化與#1 #2大致相同，顏色變化由紅紫 (RP) 紫 (P) 藍 (B)，色澤強度隨著 pH 之增加而下降。

根據文獻的報告(Mazza and Miniati,1993)醯基的多寡會影響花色素的呈色。蔡和陳 (1992) 也曾以紅鳳菜花色素 做試驗，在不同酸鹼度下其吸收光譜與 Zebrina 花色素 類似(Brouillard,1981) ，其顏色由紅變成紫色，相當穩定。其認為此種特異的吸收光譜變化與其結構有關,可能是花色素 之 A B 兩環各含醯基、此二醯基與 flavylium 核上下重疊（即成三明治式 (sandwich) ）而呈分子內共呈色 (intramolecular copigmentation) ，因此具有立體障礙，在 pH 提高時不易進行水合反應。但由光譜得知(圖十四) 紫蕪花色素 並不與 flavylium 核形成三明治夾心式構像，因此紫蕪花色素 並不成分子內共呈色現象與立體障礙；也因此無法避免水合反應，而無法穩定其顏色。(Brouillard,1982)。



圖十三、紫蕪去醯花色素 之 HPLC 圖

Fig13. The HPLC chromatograms of deacylated anthocyanins from purple vienna.

表八、紫蕪花色素 與去醯花色素 的光譜性質及濾紙層析特性

Table 8 .Absorption spectra and Rf values of paper chromatography of anthocyanins and deacylated anthocyanins from purple vienna

| band | max | $\frac{E_{440}}{E_{vi\ max}}$ $\frac{E_{acyl}}{E_{vis\ max}}$ | | shift | Rf × 100 | | | | Fluorescence under UV | HPLC Retention time (min) |
|------|------------------------|---|----------------|---------------------|----------|--------|--------|------|--------------------------|---------------------------------|
| | (0.01% HCl in MeOH) | $E_{vi\ max}$ | $E_{vis\ max}$ | by Al^{3+} add | BAW | Bu-HCl | 1% HCl | AAH | | |
| #1 | 327.0 527.0 | 12.9% | 65% | +47.5 | 45.1 | 31 | 57.3 | 69.5 | - | 5.71 |
| #2 | 326.0 528.0 | 11.1% | 74.6% | +47 | 45.5 | 36.1 | 58.3 | 65.5 | - | 9.88 |
| #3 | 328.5 531.5 | 12.6% | 109% | +44.5 | 48.6 | 47.2 | 57.4 | 62.1 | - | 19.27 |
| #1' | 525.5 | 14.1% | / | +38 | 21 | 10.7 | 63.3 | 74.3 | + | 7.50 |
| #2' | 524.5 | 14.1% | / | +53.5 | 22 | 11.5 | 64.1 | 77.8 | + | 7.61 |
| #3' | 525.0 | 13.2% | / | +49 | 23.2 | 10.4 | 63.7 | 76.9 | + | 7.56 |
| RC' | 524.5 | 12.5% | / | +48 | 24 | 10.4 | 63.4 | 75 | + | 7.61 |

RC : 紅高麗菜花色素

RC' : 紅高麗菜去醯花色素

#1' : compound 去醯花色素

#2' : compound 去醯花色素

#3' : compound 去醯花色素

- : none

+ : positive reaction

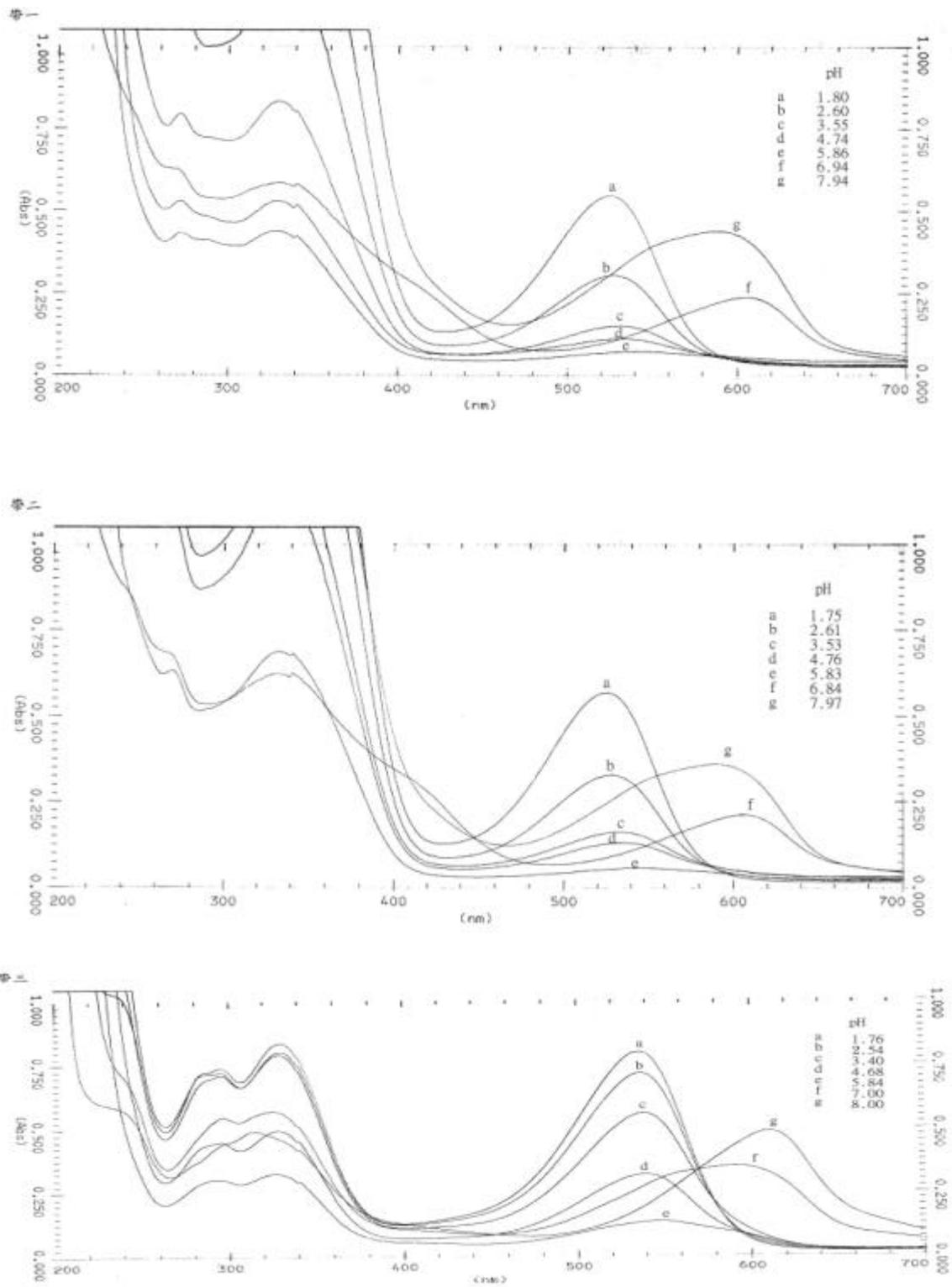
/ : none

表九、紫蕪花色素 在不同 pH 值下 L.a.b、彩度及色相值之變化
 Table.9.Change of the L.a.b.,Chroma and hue data of anthocyanins
 from Purple vienna

| # 1 | pH | L | a | b | Chr. | Hue |
|-----|------|-------|------|-------|------|------|
| a | 1.80 | 92.69 | 25.4 | -6.7 | 26.2 | -3.8 |
| b | 2.60 | 95.24 | 20.7 | -10.8 | 23.3 | -1.9 |
| c | 3.55 | 97.14 | 17.5 | -12.4 | 21.5 | -1.4 |
| d | 4.74 | 98.48 | 13.8 | -15.4 | 20.7 | -0.9 |
| e | 5.86 | 99.23 | 10.6 | -18.9 | 21.6 | -0.6 |
| f | 6.94 | 97.72 | 8.5 | -20.3 | 22 | -0.4 |
| g | 7.94 | 94.7 | 2.9 | -18.6 | 18.9 | 0.2 |

| # 2 | PH | L | a | b | Chr. | Hue |
|-----|------|-------|------|-------|------|------|
| a | 1.75 | 77.45 | 28.7 | -6.4 | 29.5 | -4.5 |
| b | 2.61 | 70.36 | 26 | -8.4 | 27.3 | -3.1 |
| c | 3.53 | 88.98 | 16.9 | -15.7 | 23.1 | -1.1 |
| d | 4.76 | 91.18 | 6.6 | -17.8 | 18.9 | -0.4 |
| e | 5.83 | 98.89 | 4.3 | -18.1 | 18.5 | -0.2 |
| f | 6.84 | 92.83 | 2.1 | -20.2 | 20.1 | -0.1 |
| g | 7.97 | 73.11 | 1.2 | -24.1 | 24.0 | -0.1 |

| # 3 | pH | L | a | b | Chr. | Hue |
|-----|------|-------|------|-------|-------|------|
| a | 1.76 | 65.79 | 34.3 | -6.7 | 24.9 | -5.1 |
| b | 2.54 | 56.99 | 28.4 | -7.5 | 29.4 | -3.8 |
| c | 3.40 | 56.52 | 20.7 | -17.4 | 27.04 | -1.2 |
| d | 4.68 | 57.25 | 14.6 | -19.8 | 24.6 | -0.7 |
| e | 5.84 | 61.99 | 10.7 | -25 | 27.2 | -0.4 |
| f | 7.00 | 49.94 | 7.3 | -28 | 28.9 | -0.3 |
| g | 8.00 | 55.94 | 1.8 | -31 | 31.1 | -0.1 |



圖十四、紫蕪花色素 在不同 pH 之紫外光-可見光吸收光譜
 Fig.14 .UV-visible absorption spectra from purple vienna at different pH.

三、紫蕪花色素 化學結構式鑑定

1、花色素(anthocyanidin)之 TLC 及 HPLC 分析：

6 種最常見的花色素分別為 Pelargonidin , Peonidin , delphinidin , Cyanidin , Malvidin , Petunidin。純化之花色素 經酸水解後的花色素 與標準品比較之 TLC 和 HPLC 實驗結果如表十。

根據光譜分析(附圖一)，當加入 $AlCl_3$ 時，花色素 甲醇溶液顏色由紅色變成紫色；發現其吸收波長有產生向紅效應(Huperchromic effect)向長波長位移 47nm，因此我們判斷 B 環上應該有兩個相鄰 OH 基(Harborne et al,1975)；根據文獻指出(Harborne,1958)只有 cyanidin 和 delphinidin 及 petunidin 之 B 環有兩個相鄰的 OH 基，而 pelargonidin , peonidin 和 malvidin 則無此現象；因此利用此性質可將花色素 的花色素(anthocyanidin)做進一步的歸類。由於 petunidin 之標準品無法獲得且在自然界出現機率低；所以我們將水解而得的花色素 與 cyanidin 和 delphinidin 之標準品做比較；而可進一步確定屬於何種花色素。

依據其 R_f 值及 HPLC 所滯留時間 (retention time) 可確知紫蕪各 compound 花色素 的花色素皆為 cyanidin (附圖四)；再綜合之前所測得之光譜分析，更確定各花色素 compound 之花色素為 cyanidin。

表十、紫蕪花色素 之花色素在 HPLC 滯留時間與 TLC 之 Rf 值

Table 10. The HPLC retention time and TLC Rf values of anthocyanidin from purple vienna anthocyanins

| band | HPLC retention time (min) | TLC solvent system (Rf × 100) | |
|-----------|---------------------------|-------------------------------|----------|
| | | formic | forestal |
| #1 | 5.33 | 14.4 | 26.3 |
| #2 | 5.94 | 13.1 | 27.8 |
| #3 | 5.97 | 14.3 | 26.2 |
| standard | | | |
| cyanidin | 5.86 | 14.4 | 27.5 |
| delphidin | 3.95 | 5 | 10 |

2、 acyl compound 之分析

花色素 廣泛存於植物的花、莖、葉、果實中，較複雜的花色素 鍵結 cinamic acid 衍生物，其能夠增強花色素 之安定性並提高其 抗氧化作用，常見的四種鍵接的 cinnamic acid 衍生物為 caffeic acid , *p*-coumaric acid , ferulic acid 與 sinapic acid , 但在此次實驗中利用 HPLC 來分析醯化合物，結果發現 ferulic acid (11.4min)與 sinapic acid (11.6 min)的滯留時間(retention time)很接近而導致重疊現象的發生 (圖十五、 A)，因此利用 HPLC 無法達到有效的分離，故將採用毛細管電泳(capillary electrophoresis)來分離 acyl compound (蔡等人,1998)，結果發現利用毛細管電泳大約在 6 分鐘即可將 ferulic acid 與 sinapic acid 兩種酸達到有效的分離(圖十五、 B)。

首先將四種酸之標準品注入毛細管電泳分離，其結果如(圖十五、 B)所示，再將#1、 #2、 #3 之 acyl compound 同樣注入毛細管電泳分析，其結果如(圖十六(A)、 (B)、 (C))所示。

綜合以上所作毛細管電泳所得 migration time 之分析結果：

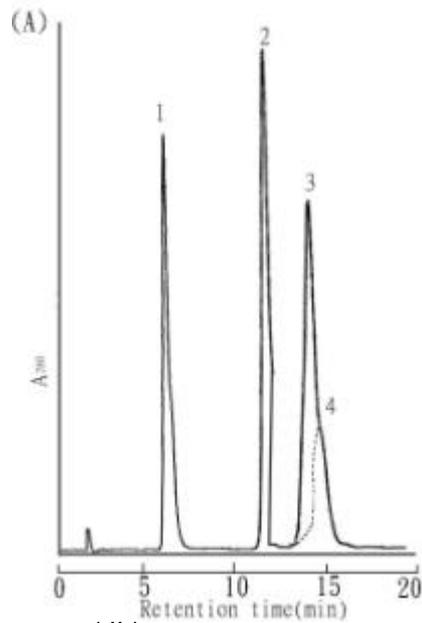
#1 acyl compound 為 sinapic acid

#2 acyl compound 為 ferulic acid

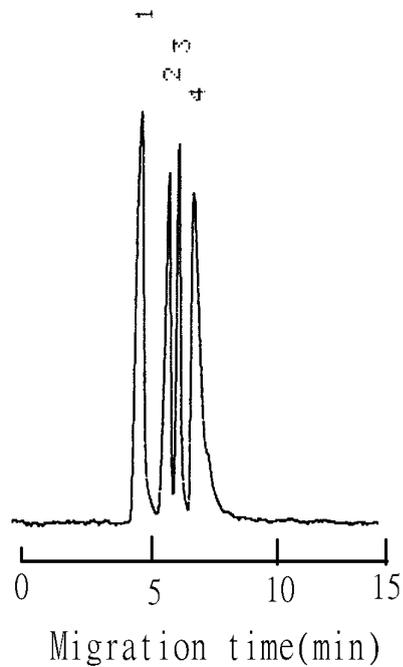
#3 acyl compound 為 sinapic acid 和 ferulic acid。

根據實驗結果分析，compound 之 acyl compound 之 sinapinic acid 因為含有 OCH_3 ，在 RP-C8 管柱分離下，其極性大，故在 HPLC 層析下帶動較快，所以雖然其分子量大於 ferulic acid，但因其極性大的關係，所以會比 ferulic acid 先予以層析出來，這與我們所作的 HPLC、毛細管電泳所得到結果相吻合(圖十二、十六(A)、(B)、(C))。

第 一、 acyl compound 與所發表的紅高麗菜之 acyl compound 鑑定之文獻結果相同(Nakatani and Ikeda,1987)；而第 二 acyl compound 與 Nakatani and Ikeda 於 1987 年所做紅高麗菜之 acyl compound 鑑定結果略有不同，其原因可能由於品種之間差異性的不同，導致花色素 的種類亦不同，因此綜合以上分析結果可得知紫蕪花色素 之 acyl compound 結構大致與紅高麗菜 acyl compound 結構相似。



(B)



圖十五 (A) 四種酸標準品之 HPLC。1 = caffeic acid,7.3min;

2=*p*-coumaric acid,12.2min; 3=ferulic acid,13.9min;

4=sinapinic acid,14.08min

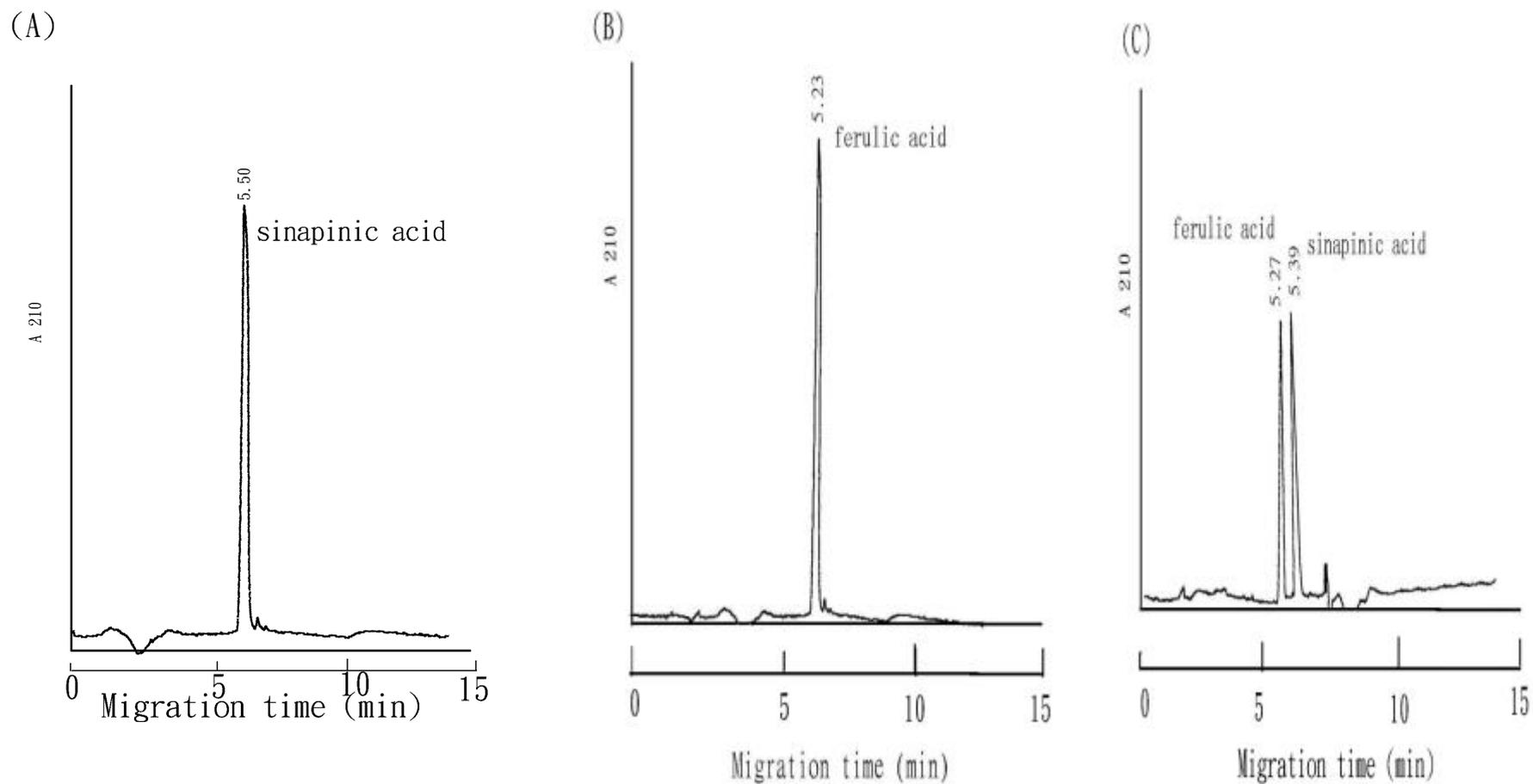
(B)四種酸標準品之毛細管電泳圖 1= caffeic acid,4.94min;

2=*p*-coumaric acid,5.14min;3=ferulic acid,5.20min;

4=sinapinic acid,5.30min

Fig.15. (A) HPLC chromatogram of four standard cinnamic acid derivatives.

(B) Four cinnamic acid derivatives separated by standard CZE method



圖十六、紫蕪(A) #1(B) #2(C) #3 acyl compound 毛細管電泳圖

Fig.16. Capillary electropherogram of the purple vienna (A) #1 acyl compound (B) #2 acyl compound (C) #3 acyl compound.

3.糖組成份之分析

將純化後之花色素 經酸水解、還原(reduction)，乙酯化(acetylation) 等步驟，形成 alditol sugar 之衍生物，並以氣液層析(GLC) 分析，分析結果列於表十一與附圖六。

由 GLC 結果得知，根據其滯留時間與標準品比較結果為 、 、 和 compound 花色素 之組成糖類皆為 glucose。

以上花色素、醯化物和糖組成份利用 HPLC、毛細管電泳及 GLC 分析的之三部份，皆經樣品與標準品混合後共注射而確定其結果。將以上各項所得結果可將紫蕪之花色素 之糖組成歸納成表十二。

根據(Harbon, 1970 ; Hrazdina, 1977 ; Ikeda, 1987) 於紅高麗菜(*Brassica oleracea* var.) 所作的各項化學組成測定，發現其結構組成特性與本實驗之各項化學組成份有極大相似性，也因同屬十字花科之一種，將紅高麗菜去醯與紫蕪花色素 去醯相似；因此我們推測其總體結構與紅高麗菜之結構組成相類似。

表十一、紫蕪花色素 以 GC 分析糖分之酯化物滯留間分析表
 Table 11 . The GC retention time of alditol acetates of sugar residues of purple vienna anthocyanins

| | GC Retention time (min) | | | | |
|----------|-------------------------|------------|---------|------------|----------|
| | Rhamnose* | Arabinose* | Xylose* | Galactose* | Glucose* |
| Standard | 4.86 | 6.42 | 9.58 | 14.61 | 17.32 |
| #1 | - | - | - | - | 18.17 |
| #2 | - | - | - | - | 17.38 |
| #3 | - | - | - | - | 17.69 |

* : alditol acetates of rhamnose , arabinose , xylose , galactose and glucose

- : no signal

表十二、紫蕪花色素 之各組成份

Table 12. The composition of major anthocyanins from purple vienna

| Band | Aglycone | Sugar | Acyl compound |
|----------|----------|---------|------------------------------|
| compound | cyanidin | glucose | sinapinic acid |
| compound | cyanidin | glucose | ferulic acid |
| compound | cyanidin | glucose | Ferulic acid, sinapinic acid |

四、快速原子撞擊游離法質譜 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry , FAB-MS)分析

Saito 等人(1983 , 1988)曾以快速原子撞擊游離法 (FAB) 應用在花色素 子和糖與 phenolic acid residues 之間鍵結模式的測定。其以分子離子(molecular ion) $[M]^+$ 直接當作分子量。由(附圖七 A) 之質譜圖顯示紫蕪 compound 之分子離子峰 $[M]^+$ m/z 為 979 , 斷裂峰 $[M\text{-glucose}]^+$ m/z 為 817 和 cyanidin m/z 為 287 ; 所以 compound 其分子量為 979 ; (附圖七 B) 之質譜圖顯示紫蕪 compound 之分子離子峰 $[M]^+$ m/z 為 949 , 斷裂峰 $[M\text{-glucose}]^+$ m/z 為 787 和 cyanidin m/z 為 287 ; 其分子量為 949。紫蕪 compound 之分子離子峰 $[M]^+$ m/z 為 1155 斷裂峰 (附圖七 C) , $[M\text{-glucose}]^+$ m/z 為 993 和 cyanidin m/z 為 287 ; compound 其分子量為 1155。由表十三歸納紫蕪各帶花色素 之離子峰訊號及分子量。

表十三、紫蕪花色素 之 FAB-mass 訊號表
 Table 13. FAB-mass spectrometry data of Purple vienna anthocyanins

| | 離子峰訊號 | 分子量 (m /z) |
|----|---|--------------|
| #1 | [M] ⁺ | 979 |
| | [M - glucose residue] | 817 |
| | [M – sinapinic acid residue – 2 glucose] | 449 |
| | [M – sinapinic acid residue – 3 glucose] | 287 |
| #2 | [M] ⁺ | 949 |
| | [M - glucose residue] | 787 |
| | [M – ferulic acid residue – 2 glucose] | 449 |
| | [M – ferulic acid residue – 3 glucose] | 287 |
| #3 | [M] ⁺ | 1155 |
| | [M - glucose residue] | 993 |
| | [M – ferulic acid - sinapinic acid residue – 2 glucose residue] | 449 |
| | [M – ferulic acid - sinapinic acid residue – 3 glucose residue] | 287 |

柒、結論

此實驗總結可歸納如下：

- 1、紫蕪花色素 之萃取液經 HPLC 純化，得到三個花色素 化合物，經吸收光譜分析、質譜分析、濾紙層析與降解物分析而推論其結構為：

compound : sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

compound : feruloyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

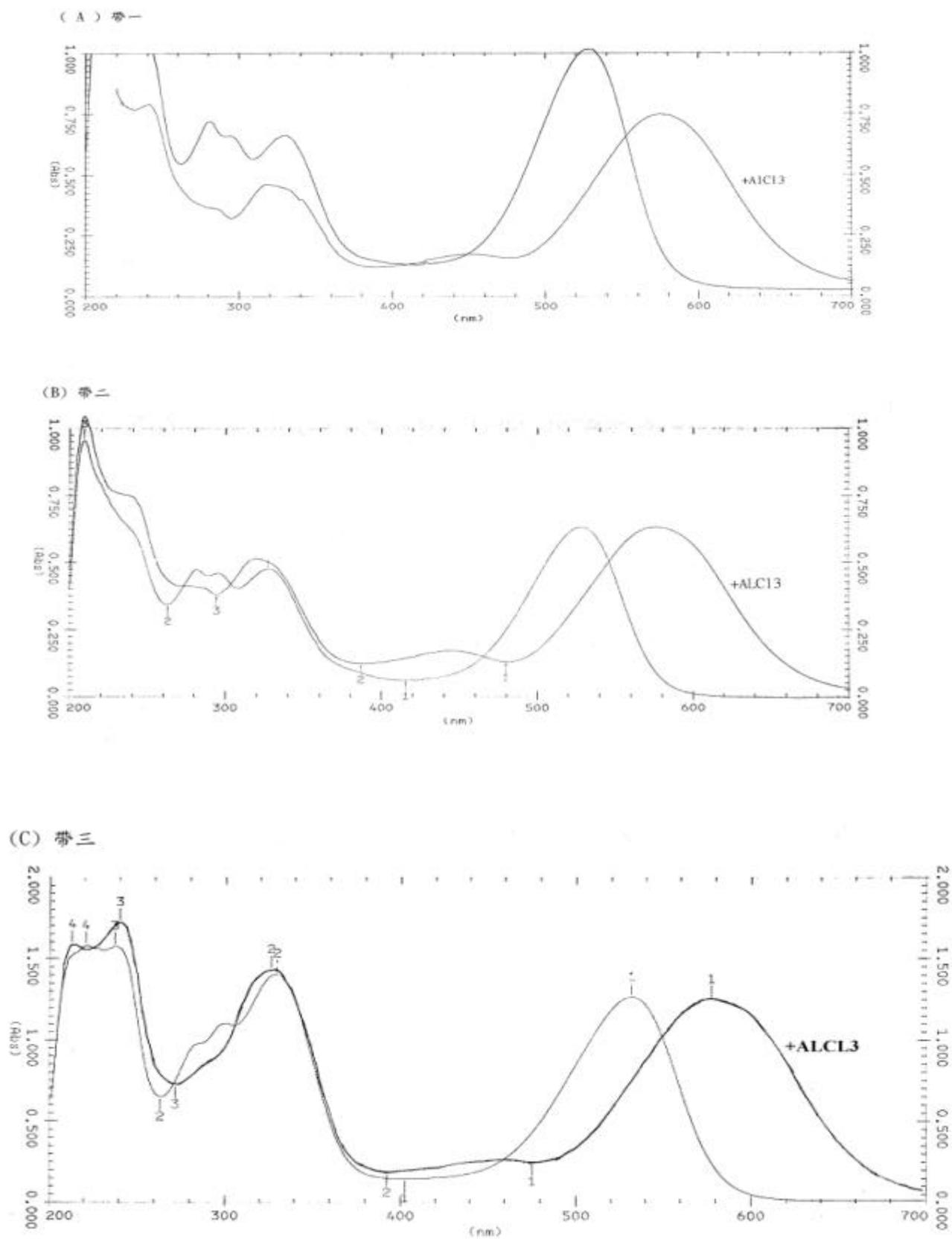
compound : feruloyl, sinapyl cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside

- 2、紫蕪花色素 的結構證實與紅高麗菜之結構相同，兩者共同皆為 cyanidin 3-sophoroside 5-glucoside.之結構，但因品種的相異內部結構組成亦隨品種而略有不同。

- 3、紫蕪花色素 在不同酸鹼度下之吸收光譜，都只呈現單一吸收峰，其顏色由紅紫變藍（藍綠）色。Compound 雖然含有兩個 acyl compound，但由其吸收光譜判斷，此二 acyl compound 並不和 flavylum 核形成三明治夾心式構像之立體障礙。

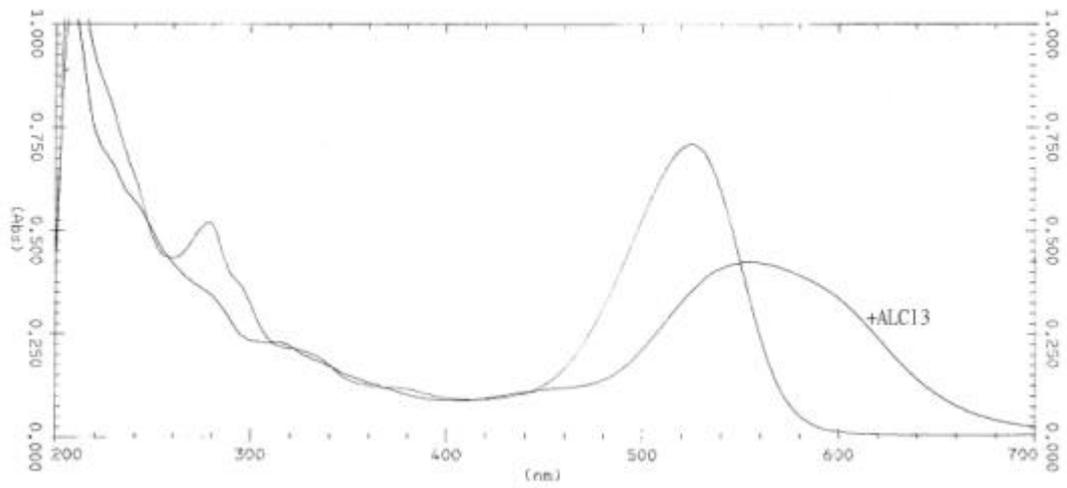


捌、附録

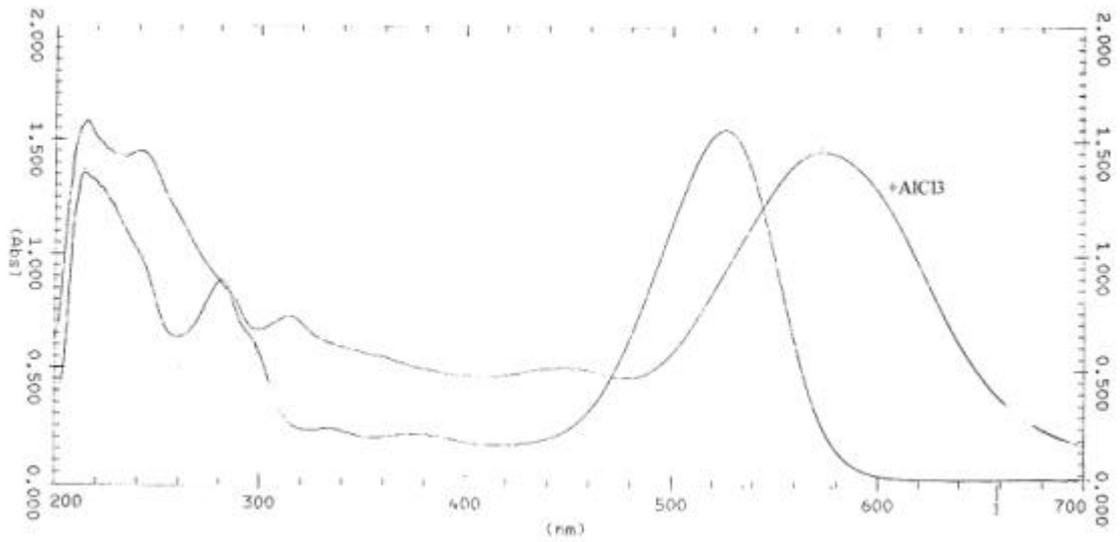


附圖一、紫無花色素 之吸收光譜圖

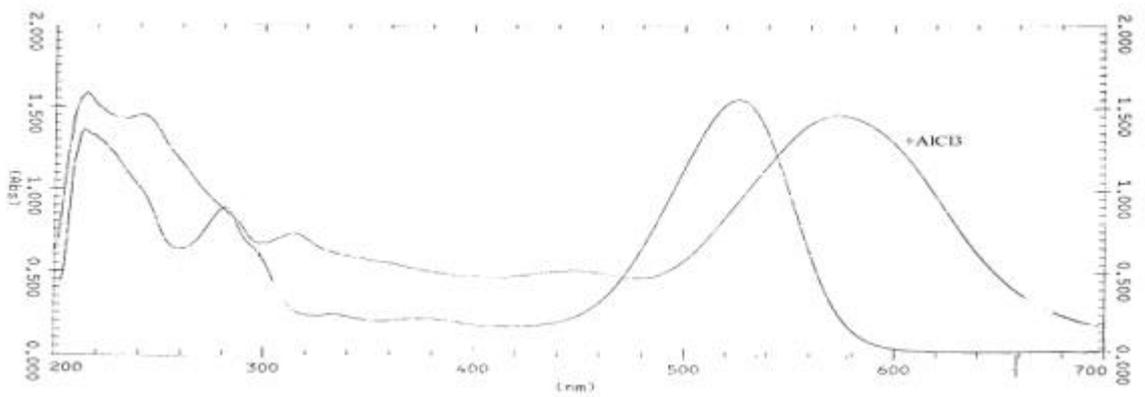
(A) 帶一



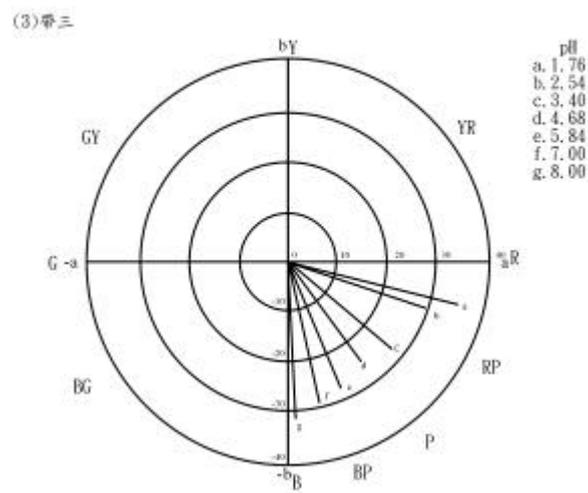
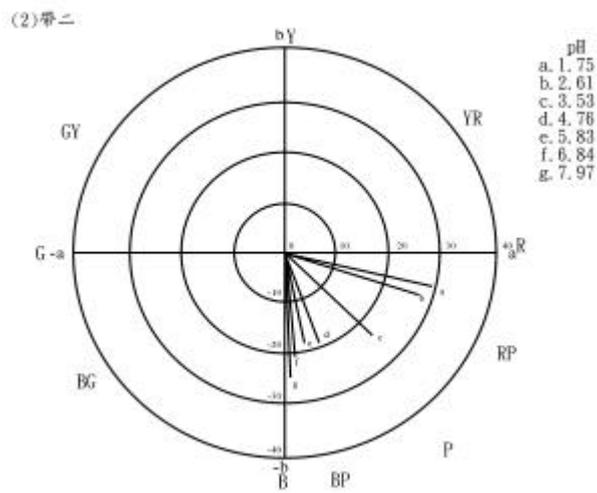
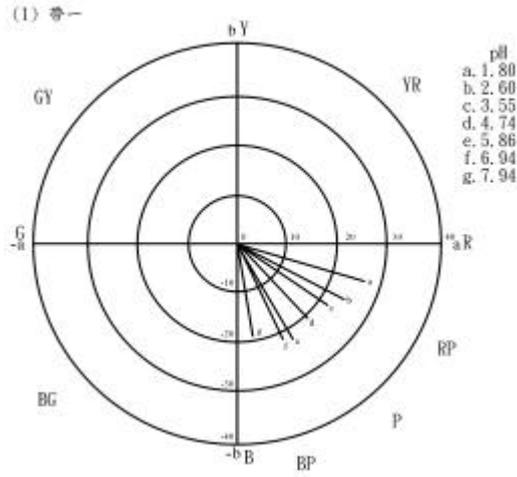
(B) 帶二



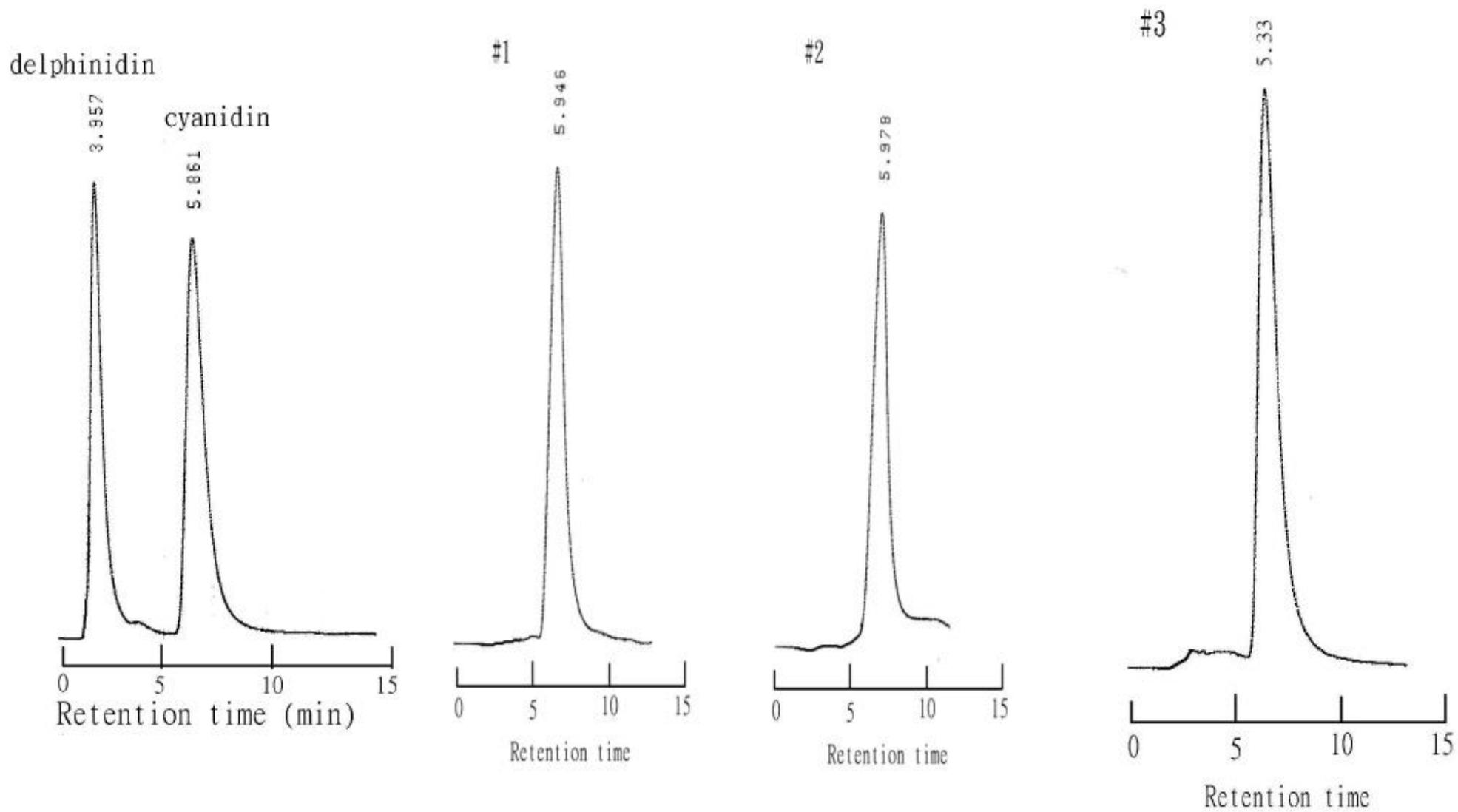
(C) 帶三



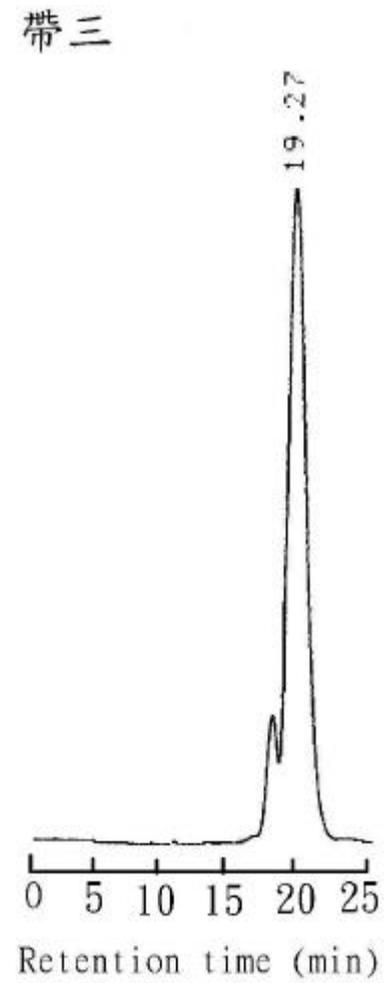
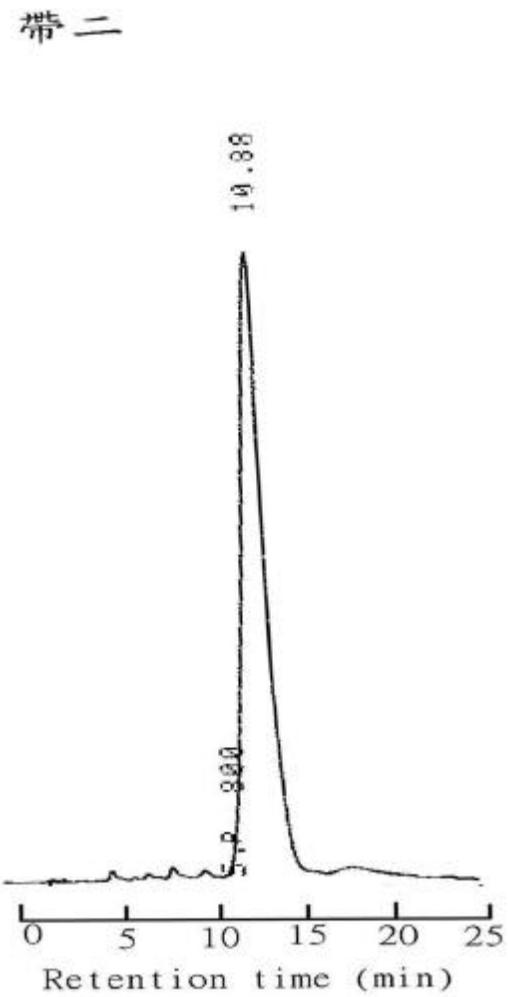
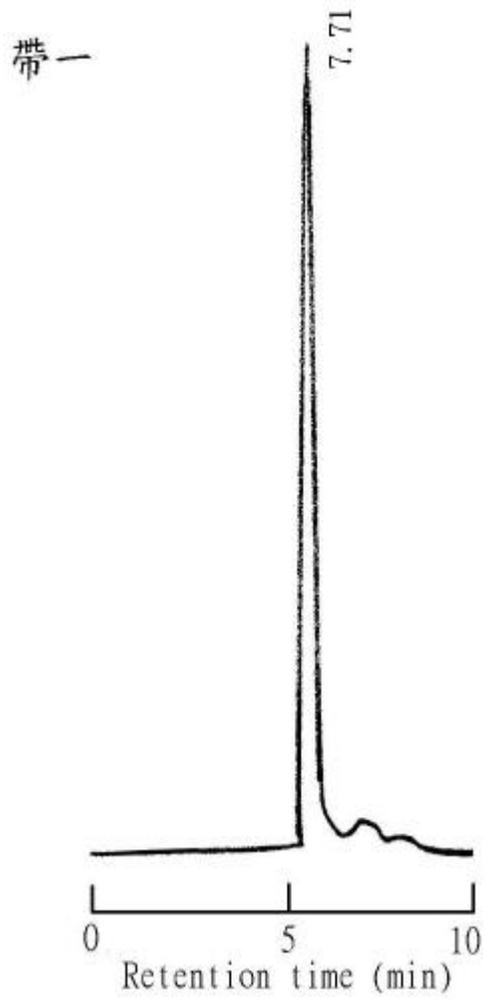
附圖二、紫蕪去醯花色素 之吸收光譜圖



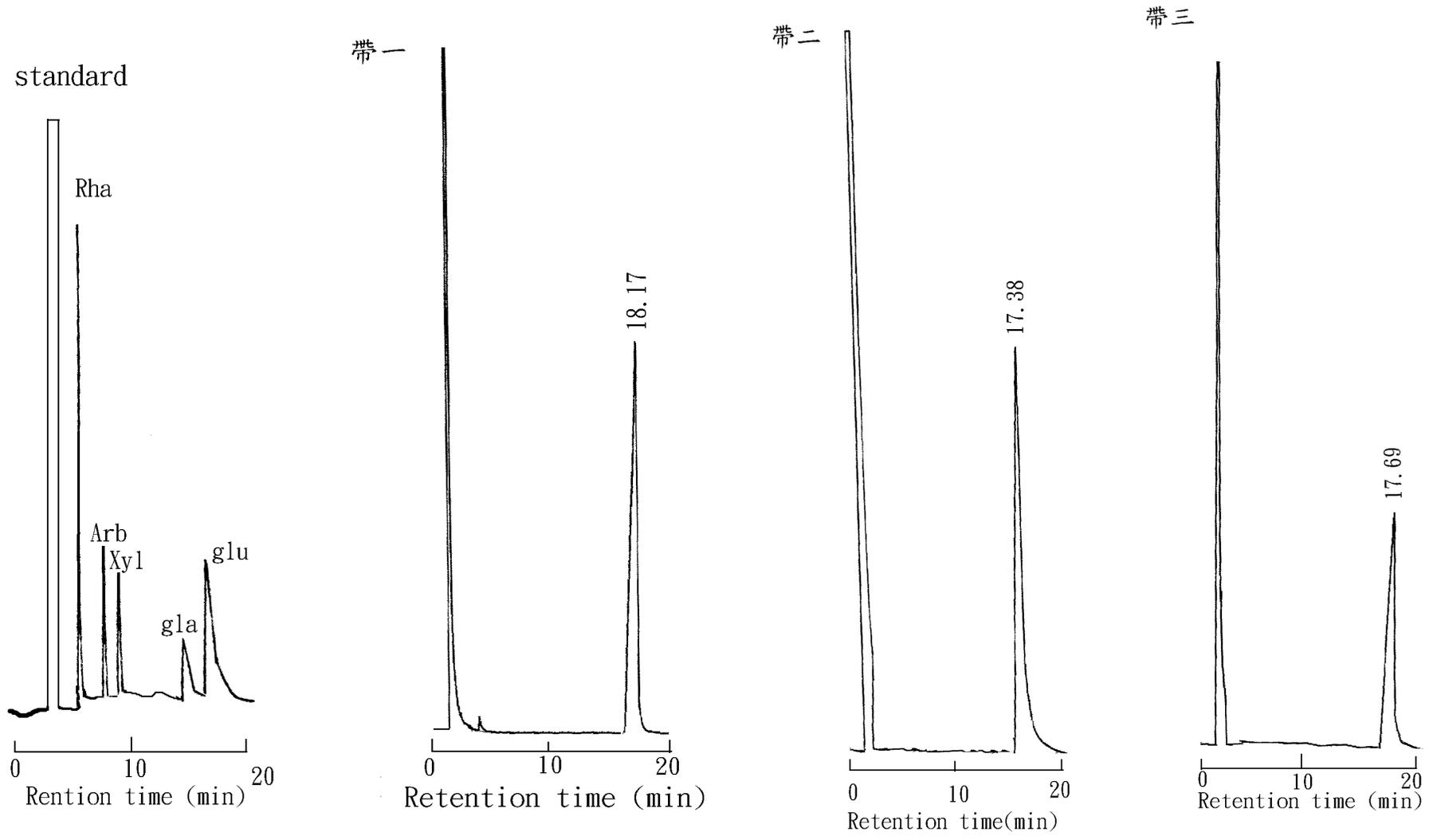
附圖三、紫蕪花色素 在不同 pH 值下色澤之變化



附圖四、紫蕪花色素 之花色素之 HPLC 圖



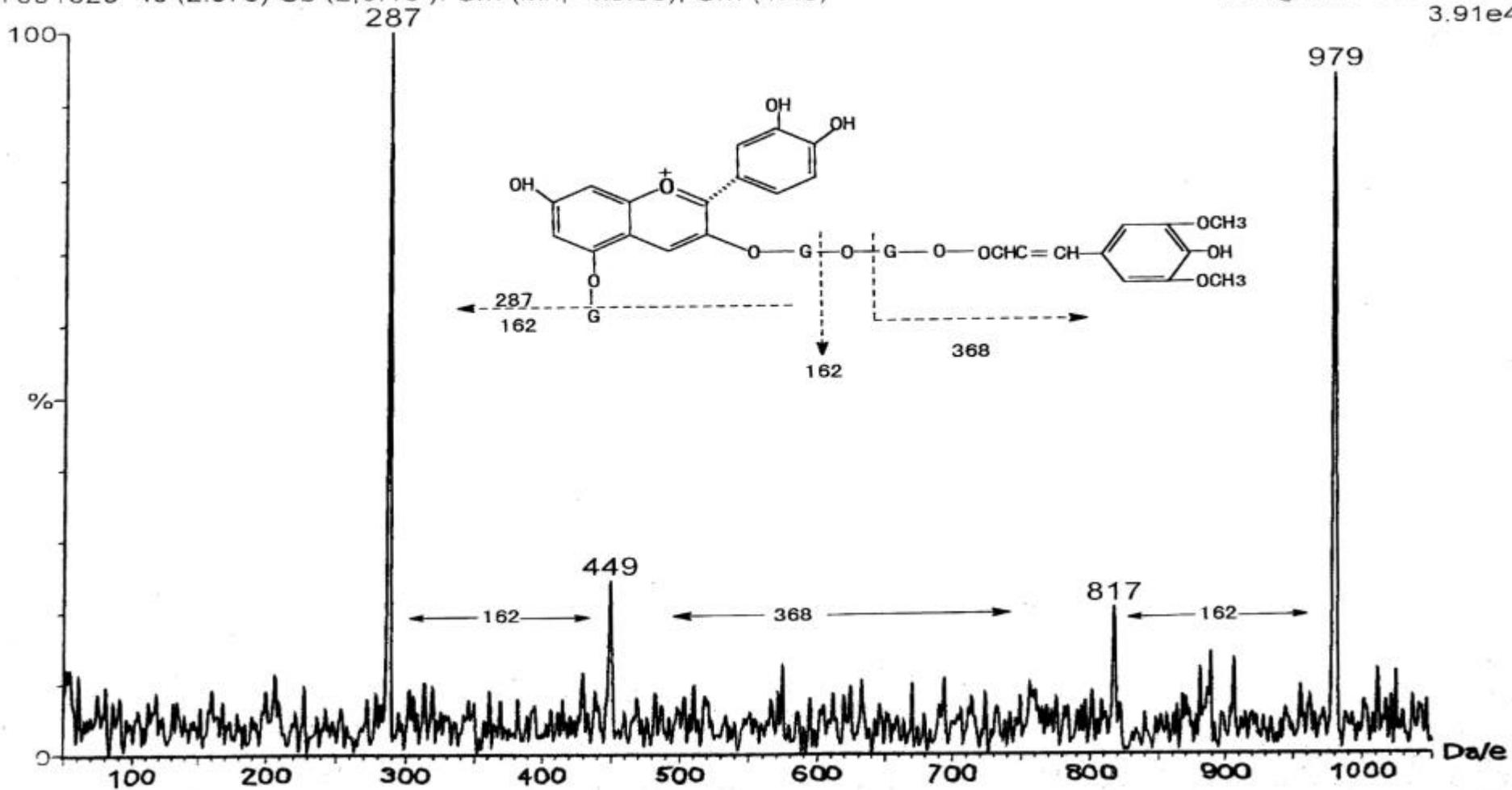
附圖五、紫蕪各帶花色素 之 HPLC 圖



附圖六、紫蕪花色素 之糖基部份之 GLC 分析圖

T051823 45 (2.575) Sb (2,0.10): Sm (Mn, 4x3.00); Cm (1.45)

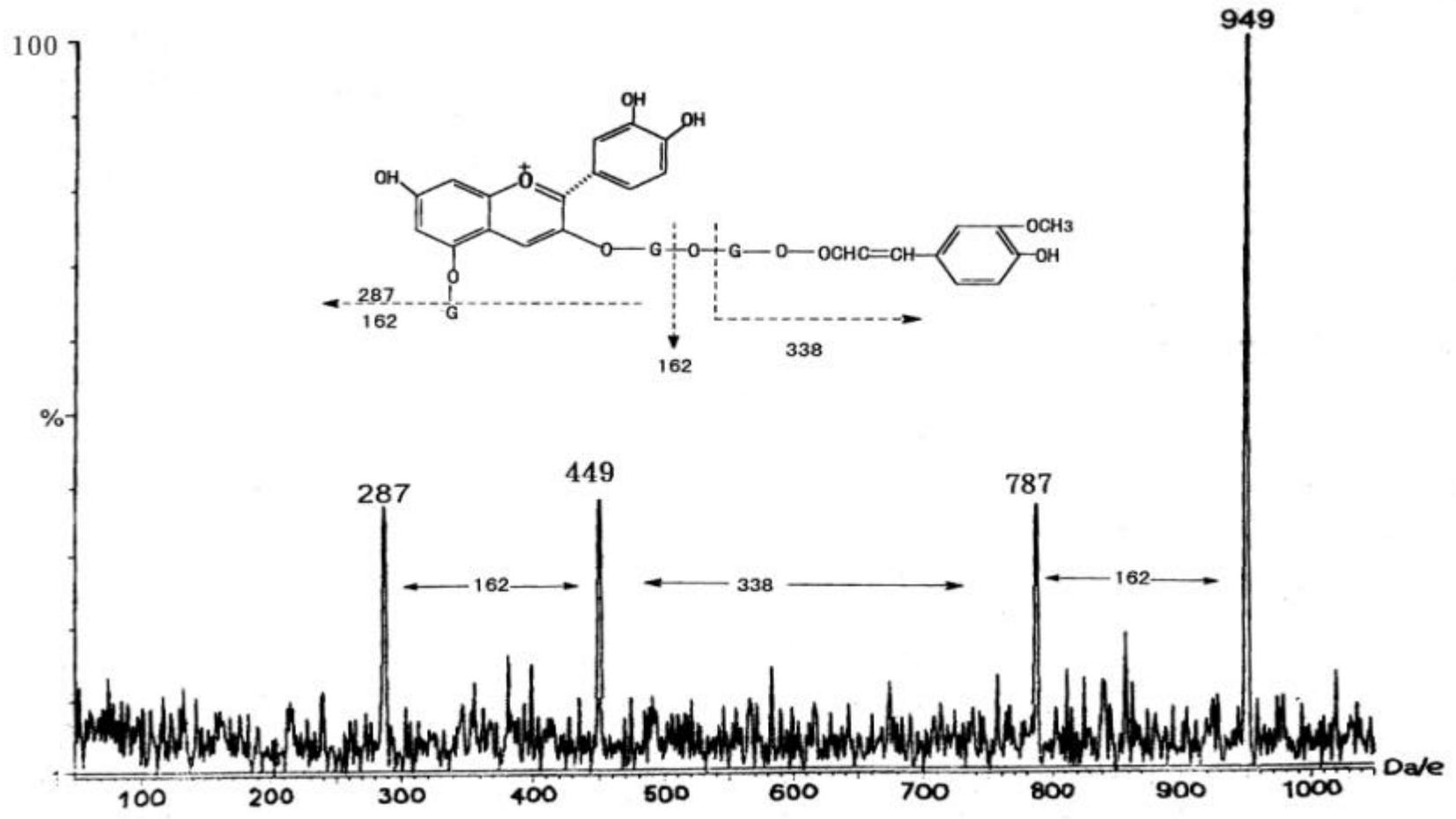
Daughters of 980FB+
3.91e4



附圖七 (A)、紫蕪第一帶花色素 FAB-mass 圖

051828 87(4.811) Sb(2, 1.000) Sb(2, 10.00); Sm (Mn, 42.00):cm(19:91)

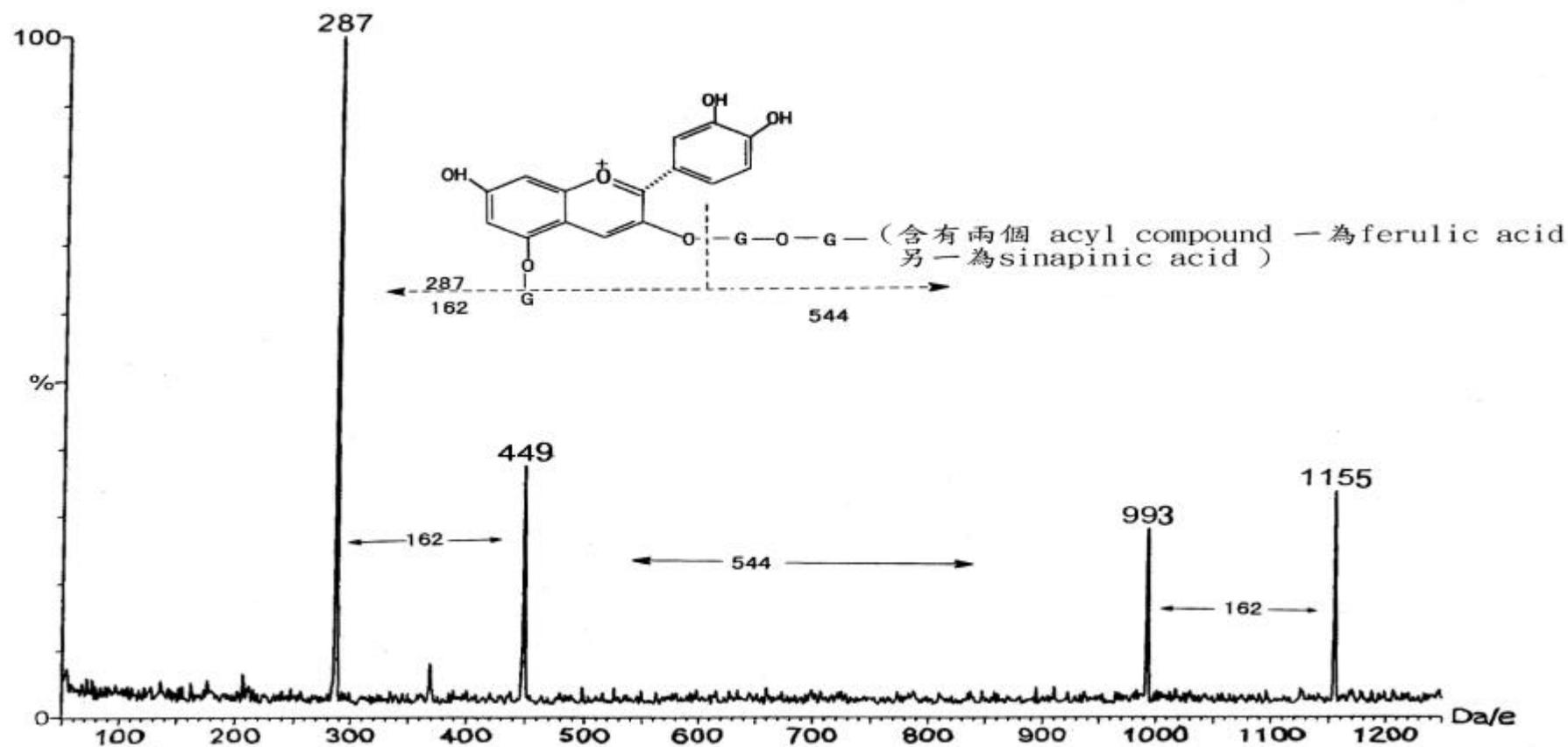
daughters of 950 FB+
2.6e4



附圖七 (B)、紫蕪第二帶花色素 FAB-mass 圖
82

T051816 25 (1.775) Sm (Mn, 4 × 2.00); cm (2:26)

Daughters of 1155 FB+
2.39e5



附圖七(C) 紫無第三帶花色素 FAB-mass 圖

玖、參考文獻

- 薛聰賢 (1997) 書香果樂。台灣普綠有限公司。
- 劉心綺 (1999) 天然色素資源簡介。 食品資訊。
- 葉碧櫻 (1993) 甘藷花色素 之鑑定和三種天然花色素 萃取物安定性之比較研究。 東海大學碩士論文。
- 楊正憲 (1995) 桑葚、紅皮甘藷花色素 之研究與花色素之氧化和抗氧化之探討。 東海大學碩士論文。
- 蔡正宗、王昭君、謝淑惠 (1998) 反轉電滲流毛細管電泳高效率液相層析分離四種 Cinnamic acid 衍生物之比較。 食品科學 25 (6) : 758-764
- 蔡正宗、陳淑凰 (1996) 黑糯米中兩種主要花色素 之結構鑑定。 食品科學 23(3) : 444-452。
- 蔡正宗、陳中文、楊正憲 (1995) 紅鳳菜(*Gynura bicolor*) 所含兩種主要花色素 之研究。
- Alessandro, B ., Annalisa, R ., Nadia M. and Bruno, C. (1995) HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. J. Agric. Food Chem. 43: 2104-2109.
- Bridle, P., Garcia, C. (1996) Analysis of anthocyanins by capillary zone electrophoresis. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 19 (4) : 537-545.
- Bridle, P., Tomberlake, C. F. (1997) Anthocyanins as natural food colours –selected aspects. Food Chemistry. 58: 103-109.
- Christine, E.L., John, R.L. and Jane, E. L. (1995) Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. Food Chemistry. 54: 315-319.

- Crisina Garcia-Viguera, Peter Bridle. (1999) Influence of structure on color stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Coccinea*. *Phytochem.* 49: 875-880.
- Daka, E., Yamakita, I., Ogawa, H., Kondo, T. T., Yamamoto, M., and Goto T. (1987) Structure of three diacylated anthocyanins isolated from red cabbage *Brassica oleracea*. *Chemistry Letters* . 1213-1216.
- Davies, A.J., and Mazza, G. (1993) Copigment of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 41: 716-720.
- Eiichi, I., Kaneyoshi, S., Hiroshi, Y., Toshihiko, O., Tadao, k. and Toshio G.(1987) Structure of monoacylated anthocyanins isolated from red cabbage, *Brassica Oleracea* .*Chemistry Letters*. 145-148.
- Englyst, H., Wiggins, H. S., and Cummings, J.H. (1982) Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by Gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 107: 307-318.
- Esterbauer, H., Gebicki, and Jiirgens ,G., (1992) The role of lipid peroxidation and anthocyanins in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Bio Med.* 13: 341-390 .
- Fast atombombardment mass spectrometry of the anthocyanins *violandin* and *platyconin*. *Phytochem.* 22: 1002.
- Fiorini, M. (1995) Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *Journal of*

Chromatography. 213-215.

- Francis, F. J.(1986) Handbook of Food Colorant Patents 1969-1985
- Gao, L., and Mazza, G. (1994) Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by HPLC and capillary LC. J. Agric. Food Chem. 42: P 118-125.
- Goto, T., Kondo, T., Imagawa, H., Takase, S., Atobe, M., and Miura, I. (1981) Structure confirmation of tris- deacyl Heavenly blue anthocyanins, An alkaline hydrolysis product of heavenly blue anthocyanin obtained from of *Morning Glory* “Heavenly blue”. Chemistry Letters. 883-886 .
- Harborne, J. B. (1958) Spectral methods of characterizing anthocyanins. J. Biochemistry. 70: 22.
- Harborne, J. B. (1967) Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press. London and New York.
- Harborne, T.B. (1964) Plant Polyphenols-XI the structure of acylated anthocyanins. Phytochem. 3:151.
- Hebrero, E., Garcia-Rodriguez, C., Santos-Buelga, C. and Rives-Gonzalo, J. C. (1989) Analysis of anthocyanins by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array spectroscopy in a Hybrid grape variety cvitis uinifera and vitis berlandieri 41B. Am.J. Enol. Vitic. 40: (4).
- Helen, M. I., Franck L.,and Lydia, M. (1999) Analysis of polysaccharides and monosaccharides in the root mucilage of maize (*Zma. Maysl.*) by gas chromatography. Journal of Chromatography. 831:267-276.

- Hideo Yamasaki., Hirotaka Vefuji., and Yasuko Sakihama. (1996)
Blanching the red anthocyanun induced by superoxide redical.
Archives of Biochemistry and Biophysics. 332: (1) 183-186.
- Hosokawa, K., Chihaur, F., and Tamamura, S. (1995) Three acylated
cyaniding glucosides in pink flowers of gentiana. Phytochemistry. 40:
941-947.
- Hrazdina, G., Iredale, H., and Mattick, I. R. (1977) Anthocyanin
composition of *Brassica oleracea cv.red Danish*. Phytochemistry. 16:
297-299.
- Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M., and Yasui, Y., (1989)
Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild
Grapes(*Vitis oignetiae*) Nippon Shokuhin Kogyo Gakaishi. 36:
8525-8562.
- Ikeda, K., Kihuzaki, H., Nakatani,N. (1987) Structure of two acylated
anthocyanins from red cabbage(*Brassica oleracea*). Chem.Express 2:
563-566.
- Imbert, M.P., and Seaforth, C. (1968) Anthocyanins in *Diosorea alata. L.*
Experientia. 24: 417.
- John, I. and Bertford, H. (1958) Spectral methods of characterizing
anthocyanins. Journal Biochemistry. 70: 23-27.
- Jose, A. F., Luis, A., Jose, A. M., Venancio, H., and Juan, C., (1998)
Dependance between color and individual anthocyanin content in
ripening grapes. Food Research International. 31: (9) 667-672.

- Kunijiro Yoshitama and Kenzo. (1996) Chromatographic and spectral characterized of 3' -glycosylation in anthocyanins. *Phytochemistry*.
- Liu-Y. M., and S-J. Sheu (1994) Separation of aromatic acids by reversed electroosmotic flow capillary . *Journal Chromatogr* 663: 239.
- Luis, C., Torgils, F. and Yvind M., (2000) Color and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*. 68: 101-107.
- Markakis, P. (1982) Stability of anthocyanins in food. In *Anthocyanins as food colors*. Markakis . P. Academic Press. N.Y.NY.
- Mazza, G. and Miniati, M.(1993) *Anthocyanins in fruits, vegetables, and Grains*. P.1 CRC Press, Inc., Florida.
- Murai, K., and Wilkins, D. (1990) Natural red color derived from red cabbage. *Food Technology*. June 131.
- Nakatani,N., Ikeda, K., Nakamura, M. and Kikuzaki, H. (1987) Structure of diacylated anthocyanins from red cabbage. *Chem.Express*.2: 555-562.
- Nobji,N.,Kayo, N., Mikio, N. and Hiroe K. (1987) Structure of diacylated anthocyanins from red cabbage, *Brassica Oleracea* . *Chemistry Express*. 2: (9) 555-588.
- Petter Bride & Cristrina Garcia-viguera. (1997) Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparision of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chemistry*. 59: 299-304.
- Regina, D., Barbara Pliszka., and Teresa Olszewska. (1999) Fluorescence

- properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica Oleracea L.* extracts. *Journal of Photochemistry*. 50: P 53-58.
- Saito, N., Tatsuzawa, F., Kasahara, K., Iida S. and Honda, T. (1998) Acylated cyanidin 3-sophorosides in the brownish-red flowers of *Ipomoea purpurea*. *Phytochem* 49: P 875-880.
- Sapers, G.M., Taffer, I., Ross, L.R. (1981) Functional properties of a Food colorant prepared from red cabbage. *J. Food. Sci* 46(1): 105-109.
- Saskia A.B.E., Vanacker., Michel, N.T.L. Tromp., Guido, R.M.M. Haenen., Wim, J.F van der vijgh and Aalt Bast. (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 214: (3).212-215
- Shewfelt, R. L., Ahmed, E. M.(1977) Anthocyanin extracted from red cabbage shows promise as coloring for dry beverage mixed. *Food Chemistry*. 45:265-277.
- Takanori, T., Fumihika, H., Tunzoh, K. and Toshihiko, O. (1999) Protective effects of dietary cyaniding 3-O- -D-glucoside on liver ischemia –reperfusion injury in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 368: (4) 361-366.
- Tanchev, S.S. and Timberlake C.F. (1969) The anthocyanins of red cabbage (*Brassica Oleracea*) . *Phytochemistry*. 8: 1825-1827.

- Tatsuzawa, F., Saito, N., Yokio , M., Shigihara, A. and Honda T. (1998)
 Torgil Fossen., Luis Cabrita., and Oyvind M. Andersen. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*. 63: (4) 435-440.
- Toshiro, Watanabe and Shigeru Terabe. (2000) Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography*. 311-322.
- Totsuka-ku, and Yokohama. (1993) Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*. 34(1):119-124.
- Tsuda, T., Ohshima, K., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative pigments isolate from the seeds of *Phaseolus vulgaris* . L. J . *Agric. Food Chem*. 42: 248.
- Victor, H., Ronald, E. and Wrolstad. (1990) Use of HPLC separation /photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem*. 38: 708-715.
- Watanabe, S., Sakamura, S. and Obata, Y. (1966) The structures of acylated anthocyanins in eggplant and perilla and the position of acylation. *Agriculture Chem*. 30: 420-422.
- Wesche-Ebeling, P., Argaiz-Jamet, A., Hernandez-Porrás, L.G. and Lopez-Malo, A. (1996) Preservation factors and processing effects on anthocyanin pigments in plums. *Food Chemistry*. 57:(3) 399-403.
- Wilhelmina, Lalt., Charles, F., Forney., Antonio, M. and Ronald, L. P. (1999) Antioxidant capacity , Vitamin C , Phenolics , and

Anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1638-4644.

Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K., Kawakishi, S., Lubag, A.M., Mendoza, A. M. T. and Goto, T. (1991) Structure of alatanin A,B and C isolated from edible purple yam *Dioscorea alata*. *Tetrahedron Letters* 32: 5575-5578.

Yoshida, K. Kondo, T. and Goto, T. (1991) Usually stable monoacylated anthocyanin from purple yam *dioscorea alata*. *Tetrahdron Letters*. 32: (40) 5579-5580.

Yoshitama, K. and Abe, K. (1977) Chromatographic and spectral characterization of 3'-glucosylation in anthocyanins. *Phytochem* 16: 591.

Yukihide, Abe. and Kczo, H. (1995) Further studies on paper chromatography of anthocyanins, Involving an examination of glycoside types by partial hydrolysis. *Bot. Mag. Tokyo.* 69: 579-585.