

青蛇果原花青素分离和低聚体纯品的制备

肖俊松¹, 曹雁平¹, 龚玉石², 谢笔钧^{2,*}

(1. 北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037; 2. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 青蛇果中含有丰富的原花青素, 从青蛇果中提取和制备原花青素低聚体, 对于原花青素结构和活性的研究具有重要的意义。青蛇果中的原花青素经过水浸提, ADS-17 大孔树脂纯化, TSK HW-40s 树脂层析分级后, 经过高效液相-电喷雾离子化质谱联用(LC-ESI-MS)分析, 再通过圆二色谱(CD)和核磁共振(NMR)进行鉴定。青蛇果原花青素最终按聚合度分成了9个组分, 分别含有槲皮素和根皮素及其糖苷, 儿茶素和表儿茶素, 二聚体、三聚体、四聚体、五聚体等。选择性的收集级份, 可以得到纯度较高的原花青素二聚体 B₂(epicatechin-(4β-8)-epicatechin)和三聚体 C₁(epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin)。

关键词: 青蛇果; 原花青素; 低聚体; LC-ESI-MS

Fractionation of Procyanidins from Granny Smith Apples According to Degree of Polymerization and Preparation of Pure Procyanidin Oligomers

XIAO Jun-song¹, CAO Yan-ping¹, GONG Yu-shi², XIE Bi-jun^{2,*}

(1. School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Procyanidins are a class of condensed tannins widely present in natural plants with various bio-activities, which are closely related to their degree of polymerization. The preparation of oligomeric procyanidins from Granny Smith apple, which are believed to contain ample procyanidins, will facilitate the study of procyanidins structures and bio-activities. Procyanidins in Granny Smith apples were extracted with water, purified by ADS-17 macroporous resin and fractionated by TSK HW-40s resin and 9 fractions were obtained. High performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) analysis indicated that these fractions were composed of quercetin and phloridzin, catechin and epicatechin, and dimers, trimers, tetramers and pentamers in. Procyanidins B₂ (epicatechin-(4β-8)-epicatechin) and C₁ (epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin) with relatively high purity were prepared by selective collection of fractions, and were further identified by circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR).

Key words: Granny Smith apple; procyanidins; oligomer; LC-ESI-MS

中图分类号: TS255.36

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)17-0113-07

原花青素是一类广泛分布于植物王国中的缩合单宁类物质。原花青素的单体为(+)-儿茶素和(-)-表儿茶素, 单体之间经过 C4 - C8 或 C4 - C6 键连接形成多聚体。一个结构单元上的 C2 和另一个结构单元上的 C7 可以形成 C - O - C 键的环状结构, 称为 A 型原花青素。C3 位上的羟基还可以和羧酸发生反应成酯。最常见的原花青素二聚体有 B₂(epicatechin-(4β-8)-epicatechin), 三聚体 C₁(epicatechin-(4β-8)-epicatechin-(4β-8)-epicatechin)。以上涉及到的结构见图 1。原花色素的生理、化学活性

和它的聚合度、单体的组成、单体间连接方式和酯化有密切的关系^[1-3]。因此, 分离并且制备不同结构的原花青素, 对于研究其生理活性, 分析食物中广泛存在的原花青素的组成和结构具有很重要的意义。

原花青素的分离和制备可以采用反相和正相色谱。反相色谱的优点是可以将相同聚合度的原花青素分开, 但是最高只能分到五聚体^[4], 因而比较适用于原花青素低聚体的分析和半制备; 正相色谱可以分离高聚合度的原花青素, 有应用于大规模制备的潜力, 如采用硅胶

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270938); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B08)

作者简介: 肖俊松(1980 -), 男, 讲师, 博士, 研究方向为植物多酚。E-mail: xiaojs@th.btbu.edu.cn

* 通讯作者: 谢笔钧(1943 -), 女, 教授, 研究方向为天然产物化学。E-mail: bijunxie@sina.com

填充的色谱柱, 已经用于可可豆和巧克力^[5], 葡萄皮和籽^[6]以及苹果中原花青素^[7]的分离和制备。但是正相色谱常需要用到环境不友好的有机溶剂(如氯仿等), 限制了其应用范围。Sephadex LH-20 以及 Toyopearl TSK HW-40 这两种树脂, 也常应用到原花青素的分离中^[8-9]。原花青素的分离和制备技术虽然有了很大的进展, 然而, 原花青素低聚体因其异构体繁多, 仍然需要采用制备型的高效液相色谱进行制备, 耗时, 成本高。因此, 低聚体的制备, 尤其是简单, 快速, 经济的制备方法, 对于推动原花青素领域的研究是十分关键的。

青蛇果(*Malus domestica* Borkh., Granny Smith)是一种高酸度的苹果, 富含原花青素, 并且以低聚体的形式居多^[6, 10]。本研究过拟从青蛇果中提取原花青素, 并采用 TSK HW-40s 树脂分离其中的低聚原花青素, 以 LC-ESI-MS 分析分析青蛇果中原花青素的组成, 并尝试制备原花青素 B₂ 和 C₁ 的纯品。

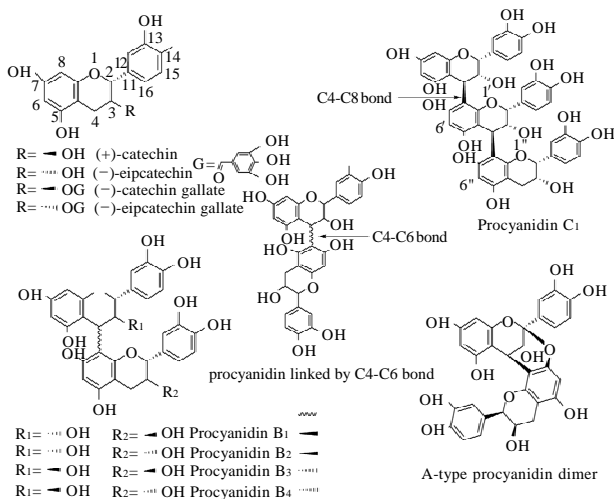


图1 原花青素的基本结构

Fig.1 Chemical structures of procyanidins

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青蛇果购自当地市场。

乙腈(色谱纯) 美国 Fisher 公司。(+) - 儿茶素 (HPLC 纯)、(-) - 表儿茶素 (HPLC 纯)、间苯三酚(分析纯) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 原花青素 B₂ 标准品(97% HPLC 纯) 日本 Nakahara Science 公司; 原花青素 B₁、B₃、C₁ 由葡萄牙波尔图大学 Victor A.P. Freitas 教授馈赠; 其他的化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-1000 液相泵 日本岛津公司; TSK HW-40s 树脂装填的色谱柱 日本 Toyopearl 公司; HD-3 紫外检测器

(280nm 检测)、XWT-S 记录仪、BSZ-100 部分收集器 上海沪西仪器厂。以上仪器经过硅橡胶软管连接而成柱层析系统。

安捷伦 1100 液相色谱 - 质谱联用仪配有电喷雾离子源(ESI), 双通道紫外检测器; UV-1700 紫外可见分光光度计 日本岛津公司; Jasco-810 型圆二色谱仪 日本 Jasco 公司; Varian AS 600(600MHZ)核磁共振仪 美国瓦里安公司; ADS-17 色谱柱 天津南开和成科技有限公司; UV-1700 分光光度计 日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 青蛇果原花青素的提取

500g 青蛇果切块, 除核, 浸泡于 0.1% 的硫酸氢钠水溶液中, 放入组织捣碎机中捣碎, 然后放入 1500ml 沸水中, 保持沸腾 5min。然后冰浴冷却到室温, 通过 200 目滤布过滤。滤液 4000r/min 离心 10min, 上清液载于一根 ADS-17 色谱柱(300mm × 42mm I.D.)。ADS-17 大孔树脂具有中极性表面, 兼具表面吸附和氢键吸附双重作用。上样完成后, 色谱柱用 2500ml 蒸馏水快速冲洗, 除去糖和低分子质量的物质, 然后用 100ml 70%(V/V) 的乙醇溶液洗脱, 流速为 10ml/min。洗脱液在不高于 40℃ 下减压浓缩, 然后真空冷冻干燥, 获得青蛇果提取物(granny smith apple extract, GSE)。

1.3.2 多酚含量的测定

总酚的含量采用 Folin-Ciocalteu 法^[11]。取 0.1ml 样品和 6ml 蒸馏水及 0.5ml Folin-Ciocalteu 试剂于 25ml 具塞刻度试管中, 混匀, 然后在 8min 内加入 1.5ml 20%(m/V) 的碳酸钠溶液, 最后添加蒸馏水至 10ml, 在室温下放置 2h 并出现蓝色。采用 UV-1700 分光光度计测定 765nm 处的吸光度, 以鞣酸作为标准品, 即可以得到样品中多酚含量的相对值。此方法用于检测色谱柱分离的流出液中多酚的含量。

1.3.3 青蛇果提取物(GSE)的分级

GSE 的分级采用 Pharmacia XK16 柱 (250mm × 16mm I.D.), 填充 Toyopearl TSK HW-40s 树脂。取 50mg 的 GSE 溶解于 2ml 的甲醇中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 除去不溶性杂质。滤液上柱, 立即开始洗脱, 洗脱液为甲醇, 流速为 1.0ml/min。洗脱液由 HD-3 紫外检测器在 280nm 波长处检测, 相对吸收强度由台式记录仪记录。洗脱液洗脱 1h 后开始收集, 由自动部分收集器每 5min 收集一管。采用 1.3.2 节方法测定每管中多酚的相对含量。

1.3.4 原花青素的高效液相色谱 - 电喷雾电离质谱(LC-ESI-MS)分析

LC-ESI-MS 分析在安捷伦 1100 LC-MS 系统上进行。

LC 条件: 色谱柱为 Zobax SB-C₁₈(2.1mm × 150mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.2% 乙酸水溶液, 流动相 B 为乙

睛。洗脱梯度如下：5%~15% B 10min, 15%~20% B 5min, 20% B~40% B 20min, 40%~50% B 10min, 50% B~5% B 5min, 5% B 平衡 5min, 直到下次进样。流速为 0.2ml/min, 280nm 双通道紫外 - 可见检测器检测。

ESI-MS 条件：采用 ESI 负离子模式，碎片电压 100V, 毛细管电压 2500V, 雾化压力 30psi, 干燥气体温度 300℃, 质谱离子范围 m/z 100~2200, 收集一级质谱和二级质谱信息。

1.3.5 原花青素的圆二色谱分析

原花青素 B₂ 和 C₁ 分别用去离子水溶解成 1.0mg/ml, 在 CD 光谱仪上测定。石英样品池的光程为 0.1cm, 灵敏度为 2mdeg/cm, 扫描测定波长范围为 200~400nm, 扫描时间 0.5s, 扫描速度 3.3nm/s, 分辨率为 0.1nm, 在室温下进行测定。所有圆二色数据经 4 次扫描取平均值。

1.3.6 原花青素的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 分析

原花青素 B₂ 和 C₁ 溶解于 CD₃OD 中, 浓度为 2mg/ml。于室温下, 在核磁共振仪(600MHz)上测定 ¹H 和 ¹³C-NMR 谱。

2 结果与分析

2.1 青蛇果提取物的 LC-ESI-MS 分析

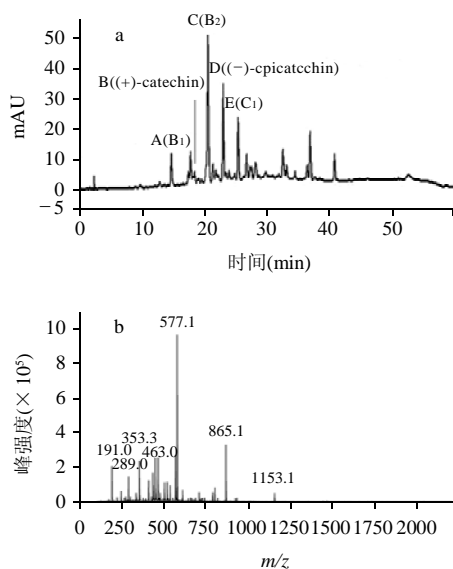


图2 青蛇果原花青素的高效液相色谱图谱(a)和质谱图(b)。
Fig.2 HPLC chromatogram and MS spectrum of Granny Smith apple procyanidin extract

青蛇果提取物采用 LC-ESI-MS 分析, 结果如图 2 所示, LC 图谱上的各个峰对应的质荷比分别为 A(577.2), B(289.0), C(577.2), D(289.0), E(865.5)。通过和标准品共进样说明, A 峰为 B₁, B 峰为 (+)- 儿茶素, C 峰为 B₂, D 峰为 (-)- 表儿茶素, E 峰为三聚体 C₁。从图

2(b)可以看出, 可能存在绿原酸(353.3), 槲皮素六碳糖苷(463.0), 根皮素葡萄糖苷(435.4), 原花青素四聚体(1153.1)。这些数据说明, 青蛇果提取物含有大量的原花青素低聚体和少量的槲皮素糖苷, 根皮素糖苷, 绿原酸等黄酮类物质, 适合用于制备原花青素的低聚体。

2.2 青蛇果原花青素的分级

青蛇果提取物经过 Toyopearl TSK HW-40s 色谱柱分级, 由紫外检测器在线检测洗脱液在 280nm 的吸收, 由部分收集器收集洗脱液组分, 同时用 Folin-Ciocalteu 法检测每管洗脱液多酚含量。根据紫外检测器检测的结果和 Folin-Ciocalteu 法测定的结果, 绘制出青蛇果提取物洗脱图(图 3)。比较图 3a 和 3b 可以发现两图吻合比较好(峰 VIII 和峰 IX 没有经过 Folin-Ciocalteu 法测定), 在以后的实验中, 均只需要采用紫外检测器监测洗脱即可。根据紫外监测的结果, 合并相同峰的试管, 最后分为 9 个组分, 分别被命名为 F₁~F₉(分别对应图 3a 中的峰 I~IX)。这 9 个组分随后通过 LC-MS 分析。

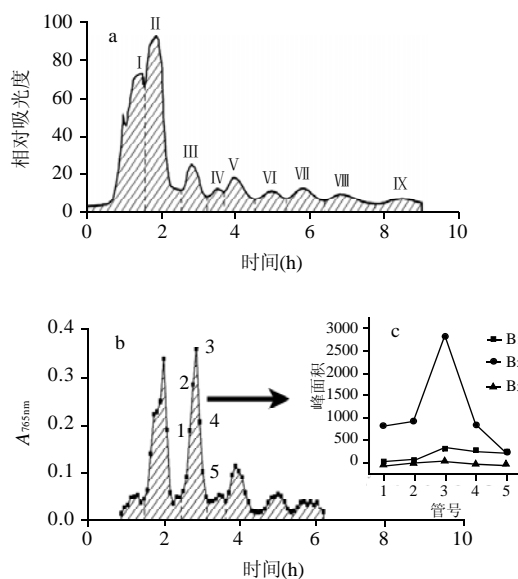


图3 通过紫外检测器(a)和Folin-Ciocalteu法检测(b)得到的洗脱图
Fig.3 Elution profiles of Granny Smith apple procyanidin extract monitored by UV detector at 280 nm (a) and Folin-Ciocalteu method (b)

2.3 各洗脱组分的 LC-MS 分析

F₁ 和 F₂ 合并后再进行 LC-ESI-MS 和二级质谱(MS²)检测, 参照文献[12]初步鉴定了其中的化合物, 发现其中大部分都是槲皮素和根皮素以及它们的糖苷形式, 主要包括如下化合物: 根皮素(phloretin), m/z =273.1; 槲皮素(querctetin), m/z =300.8; 槲皮素葡萄糖苷(querctetin glucoside), m/z =463.1; 槲皮素半乳糖苷(querctetin galactoside), m/z =463.0; 根皮素木糖葡萄糖苷(phloretin xyloglucoside), m/z =567.3; 槲皮素阿拉伯糖苷(querctetin arabinoside), m/z =433.4 或槲皮素木糖苷

表1 F₁~F₉化合物的保留时间、最大吸收波长、质谱和二级质谱数据
Table 1 Retention time, λ_{max} , MS and MS² data, and tentative compounds in F₁~F₉

| 组分 | 保留时间 (min) | λ_{max} (nm) | [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) | MS ² [<i>m/z</i> (相对丰度, %)] | 可能的化合物 |
|--------------------------------|------------|----------------------|-----------------------------------|--|--|
| F ₁ +F ₂ | 16.4 | 280 | 577.0 | 424.9(100),406.9(41), 288.9(23),451.0(22),559.0(20) | 二聚体 B ₂ |
| | 17.5 | 280 | 289.1 | 244.9(100),204.9(34), | (-)-epicatechin |
| | 22.9 | 355 | 463.1 | 300.8 (100) | Quercetin galactoside |
| | 23.1 | 355 | 463.0 | 300.8(100) | Quercetin glucoside |
| | 24.4 | 354 | 433.4 | 300.7 (100) | Quercetin arabinoside 或 Quercetin xyloside |
| | 25.0 | 284 | 567.3 | 273.0(100), | Phloretin xyloglucoside* |
| | 25.4 | 350 | 447.1 | 300.8(100) | Quercetin rhamnoside* |
| | 27.3 | 284 | 435.2 | 272.9(100) | Phloridzin |
| | 27.5 | 286 | 273.1 | 166.8(100) | Phloretin |
| F ₃ | 13.1 | 280 | 577.2 | 425.1(100),407.1(93), 289.0(59), 451.1(52), 559.1(21) | 二聚体 B ₁ |
| | 16.5 | 280 | 577.2 | 425.0(100),407.0(49),451.1(39),289.0(24), 559.0(12) | 二聚体 B ₂ * |
| F ₄ | 18.6 | 280 | 865.1 | 695.0(100),576.9(91),739.2(74),713.0(44),287.2(11) | 三聚体 Y ₁ |
| | 19.1 | 280 | 865.0 | ND | 三聚体 C ₁ |
| | 22.0 | 280 | 577.1 | 406.9(100), 424.9(99), 451.0(72),288.9(64), 559.0(21) | 二聚体 X* |
| F ₅ | 15.1 | 280 | 865.5 | 695.2(100),577.0(87),739.2(81),575.3(56),713.2(42), 407.1(20),287.1(24),847.3(23), 451.1(23) | 三聚体 Y ₂ |
| | 19.1 | 280 | 865.5 | 695.2(100),577.1(77),739.3(50),575.3(44),713.2(34),451.1(23), 587.0(21),407.1(21),287.1(21),847.3(19),425.1(15) | 三聚体 C ₁ * |
| | 15.2 | 280 | 865.5 | 695.2(100),577.0(77),739.3(63),713.2(36),575.3(33),847.3(29), 587.0(21),287.1(13), 451.1(13) | 三聚体 X ₂ |
| | 16.2 | 280 | 865.2 | 577.0(100),739.3(93),695.1(91),713.2(51),575.3(58),847.3(28), 587.1(34),286.8(30), 451.1(30) | 三聚体 Y ₃ * |
| F ₆ | 18.6 | 280 | 865.5 | 577.1(100),739.2(72), 695.2(97),713.2(72), 847.3(23) | 三聚体 Y ₁ |
| | 19.8 | 280 | 865.1 | 713.1(100),575.3(100),577.1(87),739.3(91),695.1(97), 847.1(25),286.9(62), 450.9(27),424.8(56),407.0(41) | 三聚体 Y ₄ |
| | 20.5 | 280 | 865.5 | ND | 三聚体 Y ₅ |
| | 15.4 | 280 | 1153.4 | 864.9(100),1027.2(58),983.1(53),1001.1(35),1135.2(46),575.2(27),739.0(19) | 四聚体 Z ₁ |
| F ₇ | 16.9 | 280 | 865.1 | 695.0(100),577.0(88),739.1(71),713.1(48),450.9(39), 406.9(33),286.9(28), 424.9(23)847.1(21), | 三聚体 Y ₆ |
| | 17.8 | 280 | 1153.2 | ND | 四聚体 Z ₂ |
| | 19.7 | 280 | 1153.3 | 694.9(100),983.1(83),575.1(71),577.0(41),1027.2(57), 739.0(34),1001.1(34),1135.2(28), 424.9(23),407.0(20) | 四聚体 Z ₃ * |
| | 24.5 | 280 | 1153.1 | ND | 四聚体 Z ₄ |
| | 13.2 | 280 | 1153.2 | 1027.2(100),865.0(97),574.9(95),863.2(89)576.9(83),983.2(78), 1135.3(62),738.9(47),1001.1(42),406.8(40),448.9(31) | 四聚体 Z ₅ |
| F ₈ | 16.9 | 280 | 1153.3 | 865.0(100),863.3(70),983.2(70),575.0(68),576.9(40),1027.2(48), 1135.3(40),1001.1(34),738.9(22),448.9(20) | 四聚体 Z ₆ * |
| | 17.3 | 280 | 1153.5 | 983.1(100),863.1(95),1027.2(64),865.1(60),575.0(51),1135.1(36), 449.1(34),577.3(26),739.1(26),1001.0(22) | 四聚体 Z ₇ * |
| | 20.5 | 280 | 1153.2 | 863.2(100),576.9(57),575.5(57),864.9(56),983.1(34), 1027.2(27),1001.1(24),739(22), 1135.1(16),448.9(15) | 四聚体 Z ₈ |
| F ₉ | 14.8 | 280 | 1153.3 | 863.4(100),864.7(36),1027.2(35),1001(24),1135.2(24),577.3(14) | 四聚体 Z ₉ |
| | 17.1 | 280 | 865.1 | ND | 三聚体 Y ₇ |
| | 20.8 | 280 | 1441.5 | 865.0(100),864.3(70),1153.1(64),863.4(55),1271.3(38),1152.3(32), 1027.0(26),575.0(18),1423.0(16),1315.3(17), 577.3(14),1289.2(14) | 五聚体 |

注: *.主要成分; ND.MS²未检测到。

(quercetin xyloside), $m/z=433.4$; 根皮苷(phloridzin), $m/z=435.2$ 。槲皮素及其糖苷的含量相对较高。但并没有发现图 3b 中表明大量存在的绿原酸(chlorogenic, $m/z=353.0$), 可能的原因是, 绿原酸在 F₁ 和 F₂ 开始收集之前, 就已经被洗脱出来了。

通过与标准品共进样表明, F₃ 主要有二聚体, 包

括 B₁(epi-(4 β -8)-cat, $m/z=577.2$, 其中 epi 代表(-)-表儿茶素单元, cat 代表(+)-儿茶素单元, 下同), B₂(epi-(4 β -8)-epi, $m/z=577.2$), 和极少量的 B₃(cat-(4 β -8)-cat, $m/z=577.1$)。F₃ 上的 5 管(对应图 2b 中 5 个序号)洗脱液, 经过 HPLC 分析, 由于 B₁、B₂、B₃ 的响应系数基本一样, 所以通过峰面积估算了这 3 种二聚体在 F₃ 中含量的变化

情况(图 3c)。B₂ 的含量在 160min 到 175min(1~3 管)含量达到高峰。将这部分洗脱液加入少量蒸馏水浓缩, 冷冻干燥, 得到微黄色无定型粉末。LC-ESI-MS 分析表明, 所得到的化合物中含有 6.4% B₁ 和 92.5% 的 B₂。如果所有的 5 管都被收集, 那么得到的化合物将含有 22.0% 的 B₁ 和 75.5% 的 B₂。

F₄ 为各种构型原花青素的混合物。但主要是一种二聚体 X ($m/z=577.5$)和三聚体($m/z=865.9$), 但是其构型还未知。

F₅ 主要含有三聚体 C1(epi-(4β-8)-epi-(4β-8)-epi), 并且通过与 C₁ 标准品共进样 HPLC 分析得到验证。F₅ 的洗脱时间范围为 225min 到 255min, 收集这部分的组分, 减压浓缩除去甲醇, 并且冷冻干燥, 最后得到浅棕色的无定形粉末。HPLC 分析表明 C₁ 纯度为 90.3%。

F₆ 含有 5 种三聚体异构体, 其中 Y₃ 是主要的成分。F₇ 中含有 4 种四聚体(tetramer)异构体($m/z=1153.5$), Z₃ 是其主要成分, 还含有少量的二聚体和三聚体。F₈ 中含有 4 种四聚体异构体, 其中 Z₆ 和 Z₇ 是主要的成分, 此外, 还含有一部分二聚体和三聚体。F₉ 中主要含有二到五聚体(五聚体 pentamer, $m/z=1441.0$)。

每个组分原花青素低聚体的保留时间、λ_{max}、MS、MS² 数据见表 1。通过 LC-MS 的分析, 最终总共得到了 1 种单体, 3 种二聚体, 8 种三聚体, 9 种四聚体和一种五聚体。其中没有发现鞣酸酯化的原花青素, 也没有发现原雀翠素系列的化合物。从原花青素洗脱的顺序可以看出, 基本上是按照聚合度从小到大的顺序洗脱下来, 其中单体有一个峰(F₂), 接下来二聚体 2 个峰(F₃、F₄), 三聚体 2 个峰(F₅、F₆), 四聚体 2 个峰(F₇、F₈), 五聚体 1 个峰(F₉)。各个峰分离度较高, 易于收集得到高纯度的不同聚合度的原花青素, 方便研究聚合度对原花青素生理活性影响。同时选择性地收集洗脱液, 也可以制备比较高纯度的二聚体和三聚体标准品, 用于分析水果, 粮食, 花卉中大量存在的原花青素成分。

在本方法中, 青蛇果提取物的得率为 0.135%, 而从青蛇果提取物中得到 B₂ 的得率为 16.7%, C₁ 的得率为 22.0%, 四聚体的得率为 5.4%。GSE 通过 TSK HW40s 柱分离 12 次后, 柱效无明显下降, 适合于连续分离。由于仅仅采用可以回收的甲醇作为溶剂, 故有可能实现工业化大规模的生产。为了优化分离条件, 尝试向甲醇流动相中加入 1% 的乙酸, 但分离效果无明显改善。

2.4 原花青素 B₂ 和 C₁ 的鉴定

2.4.1 二级质谱分析

在原花青素的结构中, 只有 C4 键和其他基团相连的称为 T-Unit, 既有 C4, 也有 C6 或者 C8 与其他相连的被称为 M-Unit, 而只有 C6, 或者 C8 与其他相连的,

被称为 B-Unit。文献报道的原花青素二聚体和三聚体主要的降解方式包括: (1) 黄酮间连接键的断裂; (2) RDA 反应, 即逆迪尔斯-阿德尔反应, 发生在 C2 和 O, C3 和 C4 键的断裂; (3) C 环开环后, 失去一个间苯三酚单元^[13-14]。原花青素二聚体裂解原理见图 4。

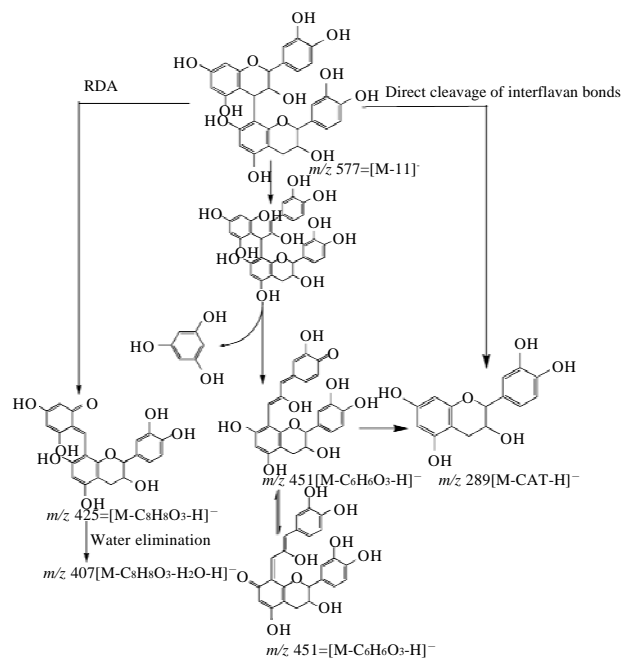


图 4 原花青素二级质谱碎片示意图

Fig.4 Main fragmentation pathways of procyanidins as an example

B₂ 的 MS² 图谱见图 5。对照图 4 可知, [M-H₂O-H]⁻ ($m/z=559$), 为 B₂ 脱水产物, [M-C₆H₆O₃-H]⁻ ($m/z=451$), 为 B₂ 脱去 A 环一个间苯三酚单元后的产物, [M-C₈H₈O₃-H]⁻ ($m/z=425.1$) 是 B₂ 发生 RDA 反应, 失去部分 C 环和全部 B 环后的产物, 它进一步脱水, 即得到 [M-C₈H₈O₃-H₂O-H]⁻ ($m/z=407$), [M-Cat-H]⁻ ($m/z=289$) 为 C4-C8 键断裂, 失去一个儿茶素单元(Cat)后的产物。二级质谱和 B₂ 理论推导的质谱图吻合, 进一步验证了此化合物为二聚体, 但是否为 B₂, 需要 NMR 检测才能得出结论。为了方便, 将 B₂ 的二级质谱归属归纳于表 2。

表 2 原花青素 B₂ 的二级质谱图各碎片峰的归属和说明
Table 2 Fragment peak assignment and comment in MS² spectrum of procyanidin B₂

| m/z | 碎片离子 | 备注 |
|-------|---|-----------------------------|
| 577 | [M-H] ⁻ | 脱去一个质子, -1* |
| 559 | [M-H ₂ O-H] ⁻ | 脱水, -18-1 |
| 451 | [M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ | 脱去间苯三酚单元, -126-1 |
| 425 | [M-C ₈ H ₈ O ₃ -H] ⁻ | 发生 RDA 反应, -152-1 |
| 407 | [M-C ₈ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ | 发生 RDA 反应, 进一步脱水, -152-18-1 |
| 289 | [M-Cat-H] ⁻ | 脱去一个儿茶素单元, -288-1 |

注: *. 碎片离子的质荷比减少的量。

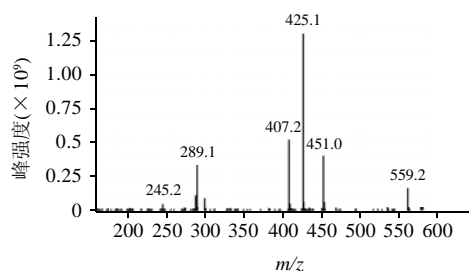


图5 B₂的二级质谱图
Fig.5 MS² spectrum of procyanidin B₂

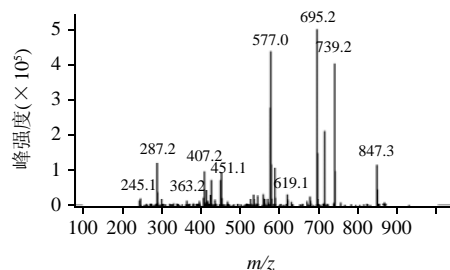


图6 原花青素C₁的二级质谱图
Fig.6 MS² spectrum of procyanidin C₁

表3 原花青素C₁的二级质谱图各碎片峰的归属和说明
Table 3 Fragment peak assignment and comment in MS² spectrum of procyanidin C₁

| m/z | 碎片离子 | 备注 |
|-------|--|--|
| 865.5 | [M-H] ⁻ | 脱去一个质子, -1* |
| 847.3 | [M-H ₂ O-H] ⁻ | 脱去一个水, -18-1 |
| 739.2 | [M-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ | 脱去一个间苯三酚单元, -126-1 |
| 713.2 | [M-C ₈ H ₈ O ₃ -H] ⁻ | 发生RDA反应, -152-1 |
| 695.2 | [M-C ₈ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ | 发生RDA反应, 并脱去一分子水, -152-18-1 |
| 587.0 | [M-C ₆ H ₆ O ₃ -C ₈ H ₈ O ₃ -H] ⁻ | 发生RDA反应, 并脱去一个间苯三酚单元, -126-152-1 |
| 577.0 | [M-Cat-H] ⁻ | 脱去一个儿茶素单元, -288-1 |
| 451.1 | [M-Cat-C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻ | 脱去一个儿茶素单元和一个间苯三酚单元, -288-126-1 |
| 425.1 | [M-Cat-C ₈ H ₈ O ₃ -H] ⁻ | 脱去一个儿茶素单元, 发生RDA反应, -288-152-1 |
| 407.1 | [M-Cat-C ₈ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ | 脱去一个儿茶素单元, 发生RDA反应, 并脱去一分子水, -288-152-18-1 |
| 287.2 | [M-Cat-Cat-H] ⁻ | 脱去2个儿茶素单元, -289-289-1 |

注: *.碎片离子的质荷比减少的量。

C₁的二级质谱图见图6。参照B₂二级质谱图解析情况, 对C₁的二级质谱碎片峰进行归属(表3), 由于碎片太多, 仅对相对丰度较高的碎片进行了归属。C₁的碎片离子和理论推导的完全吻合。

2.4.2 圆二色谱分析

圆二色谱可以确定原花色素C₄的构型。当为4β构型时, 在210~240nm有正科顿效应峰, 当为4α构型时, 有负科顿效应峰^[15]。本实验采用JASCO-810圆二

色谱仪, 测定了原花青素B₂和C₁在200~300nm之间的圆二色谱, 浓度为1mg/ml(图14)。从图中可以看出, B₂、C₁在210~240nm之间的吸收为正值, 具备正科顿效应峰, C₄位均为4β构型。

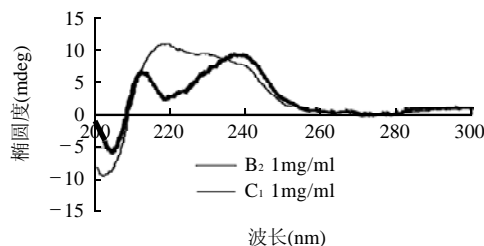


图7 原花青素B₂和C₁的圆二色谱图
Fig.7 Circular dichroism spectra of procyanidins B₂ and C₁

2.4.3 ¹H-NMR和¹³C-NMR分析

表4 原花青素B₂和C₁的¹H-NMR和¹³C-NMR归属
Table 4 ¹H and ¹³C chemical shift assignment of procyanidins B₂ and C₁

| 编号 | B ₂ * | | C ₁ * | | 编号 | B ₂ * | | C ₁ * | |
|----|------------------|----------------|------------------|----------------|------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| | δ _H | δ _C | δ _H | δ _C | | δ _H | δ _C | δ _H | δ _C |
| 2 | 4.90 | 77.08 | 4.97 | 76.90 | 10' | - | 100.43 | - | 108.40 |
| 3 | 4.55 | 73.55 | 4.97 | 73.29 | 11' | - | 132.10 | - | 132.56 |
| 4 | 3.78 | 37.11 | 4.23 | 37.16 | 12' | 6.79 | 115.90 | 6.66 | 115.25 |
| 5 | - | 156.56 | - | 157.58 | 13' | - | 145.87 | - | 145.43 |
| 6 | 5.87 | 96.08 | 5.83 | 96.09 | 14' | - | 145.61 | - | 145.43 |
| 7 | - | 157.90 | - | 157.58 | 15' | 6.57 | 115.23 | 6.71 | 116.35 |
| 8 | 5.90 | 97.33 | 5.91 | 96.09 | 16' | 6.76 | 119.23 | 6.82 | 119.39 |
| 9 | - | 158.38 | - | 155.91 | 2'' | - | - | 4.83 | 79.51 |
| 10 | - | 101.40 | - | 108.40 | 3'' | - | - | 3.91 | 66.65 |
| 11 | - | 132.57 | - | 132.16 | 4'' | - | - | 2.73, 2.84 | 29.55 |
| 12 | 6.79 | 115.90 | 6.72 | 115.25 | 5'' | - | - | - | 156.66 |
| 13 | - | 145.87 | - | 145.43 | 6'' | - | - | 5.82 | 96.09 |
| 14 | - | 145.61 | - | 145.43 | 7'' | - | - | - | 156.66 |
| 15 | 6.60 | 115.90 | 6.92 | 116.35 | 8'' | - | - | - | 108.40 |
| 16 | 6.76 | 119.23 | 7.04 | 119.39 | 9'' | - | - | - | 154.73 |
| 2' | 4.82 | 79.69 | 5.13 | 76.90 | 10'' | - | - | - | 102.31 |
| 3' | 4.19 | 66.99 | 4.62 | 73.29 | 11'' | - | - | - | 132.16 |
| 4' | 2.72, 2.77 | 29.76 | 4.56 | 37.16 | 12'' | - | - | 6.82 | 115.25 |
| 5' | - | 156.56 | - | 156.66 | 13'' | - | - | - | 145.43 |
| 6' | 5.79 | 96.22 | 5.94 | 97.33 | 14'' | - | - | - | 145.43 |
| 7' | - | 157.90 | - | 156.66 | 15'' | - | - | 6.64 | 116.35 |
| 8' | - | 107.27 | - | 108.40 | 16'' | - | - | 6.88 | 119.39 |
| 9' | - | 158.38 | - | 154.73 | | | | | |

注: *.¹H和¹³C的化学位移在CD₃OD中测定。

为了进一步确定B₂和C₁的结构, 对其进行了¹H-NMR和¹³C-NMR分析。参考Khan等^[16]的研究, 对B₂和C₁的NMR谱进行了归属。H原子和C原子编号见图

1, 归属结果见表4。结果进一步确认了分离得到的是原花青素 B₂ 和 C₁。

3 讨论

TSK HW-40 为乙烯乙二醇和甲基丙烯酸酯型聚合体聚合成的半刚性小球, 由于含有羧基而具有亲水性表面, 表面大量的羧基使其对其他官能团和配合基具有结合点, 广泛用于分离多酚, 比如葡萄籽原花青素^[18,17], 沙棘原花青素^[18], 苹果原花青素^[7,9]。TSK HW-40 和 Sephadex LH-20 对原花青素的分离很难说是哪一种机理, 可能是几种分离机制的综合。原花青素含有较多的酚羟基, 一般认为是氢键相互作用是主要的分离机制。对原花青素进行酯化(乙酰化)后, 可以用凝胶色谱对原花青素按聚合度进行分离, 并可用于其分子量的测定, 分离的机制主要是分子筛效应, 但此方法比较繁琐。

Yanagida 等^[9]不对原花青素衍生化, 而是采用对流动相进行修饰的办法, 以丙酮-8M 尿素(6:4, pH 值用 HCl 调到 2)作为流动相, 用 TSK HW-40 树脂将原花青素按分子量由大到小的顺序洗脱出来, 最高可以达到 12 聚体。丙酮-8M 尿素作为流动相, 可以避免原花青素和 TSK HW-40 发生氢键相互作用, 从而使原花青素按照分子筛的原理, 从分子量大到小的顺序洗脱出来。

本研究中, 流动相未经过修饰, 直接采用纯甲醇进行洗脱, 将青蛇果原花青素按照聚合度从小到大的顺序洗脱下来, 和 Yanagida 研究中的流出顺序正好相反。在本研究中, 分离的机制可能仍然以原花青素和 TSK HW-40 的氢键相互作用为主, 聚合度越高, 则羟基越多, 和柱材料形成氢键的作用应该越强。这两种色谱都是低压色谱, 易于操作, 仅需要简单仪器, 而不需要昂贵的制备型色谱柱。制备原花青素快速, 简单而且得率高。柱子重复性好, 不需要平衡, 适合实验室制备, 并潜在适用于工业化的大规模生产。最终获得了纯度较高的原花青素 B₂ 和 C₁, 并经过二级质谱, 圆二色谱和核磁共振进行鉴定。若采用更高柱效的 TSK 树脂柱, 有望取得更好的分离效果, 得到纯度更高的原花青素 B₂ 和 C₁。

参考文献:

- [1] de BRUYNE T, PIETERS L, DEELSTRA H, et al. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities[J]. *Biochem Systemat Ecol*, 1999, 27: 445-459.
- [2] LOTITO S B, ACTIS-GORETTA L, RENART M L, et al. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins[J].

- Biophys Res Commun, 2000, 276: 945-951.
- [3] OSAKABE N, YASUDA A, NATSUME M, et al. Catechins and their oligomers linked by C4 → C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation *in vitro*[J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227: 51-56.
- [4] WILSON E L. High-pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds[J]. *J Sci Food Agric*, 1981, 32: 257-264.
- [5] ADAMSON G E, LAZARUS S A, MITCHELL A E, et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 4184-4188.
- [6] GU L, KELM M, HAMMERSTONE J, et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption[J]. *J Nutr*, 2004, 134: 613-617.
- [7] YANAGIDA A, KANDA T, TAKAHASHI T, et al. Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 890: 251-259.
- [8] FREITAS V A P, GLORIES Y, BOUGEOIS G, et al. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry[J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 1435-1441.
- [9] YANAGIDA A, KANDA T, OHNISHI M. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1999, 855: 181-190.
- [10] HAMMERSTONE J, LAZARUS S, SCHMITZ H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods[J]. *J Nutr*, 2000, 130: 2086-2092.
- [11] VRHOSEK U, RIGO A, TONON D, et al. Quantitation of polyphenols in different apple varieties[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 6532-6538.
- [12] KAHLE K, KRAUS M, RICHLING E. Polyphenol profiles of apple juices[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49: 797-806.
- [13] FRIEDRICH W, EBERHARDT A, GALENSA R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Euro Food Res Technol*, 2000, 211: 56-64.
- [14] WOLLGAST J, PALLARONI L, AGAZZI M W, et al. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 926(1): 211-220.
- [15] BOTHA J J, YOUNG D A, FERREIRA D, et al. Synthesis of condensed tannins. part 1. stereoselective and stereospecific syntheses of optically pure 4-arylflavan-3-ols, and assessment of their absolute stereochemistry at C-4 by means of circular dichroism[J]. *J Chem Soc Perkin Transactions*, 1981, 1: 1213-1219.
- [16] KHAN M L, HASLAM E, WILLIAMSON M P. Structure and conformation of procyanidin B-2 [J]. *Magn Reson Chem*, 1997, 35: 854-858.
- [17] SUN B S, LEANDRO M C, SILVA J M, et al. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization[J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(4): 1390-1396.
- [18] OSZMIANSKI J, BOURZEIX M. Preparation of catechin and procyanidin standards from hawthorn (*Crataegus Azarolus* L.) and pine (*Pinus mesogeensis* Fieschi) barks[J]. *Polish J Food Nutr Sci*, 1995, 4: 89-96.