

## 葡萄籽中原花青素类成分的制备及其止泻活性评价

王红敏<sup>1</sup>, 单淇<sup>2,3</sup>, 郝春华<sup>2,4</sup>, 王维亭<sup>2,4</sup>, 郑义静<sup>5</sup>, 侯文彬<sup>1,2,3\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 天津药物研究院, 天津 300193
3. 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193
4. 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193
5. 天津医科大学, 天津 300193

**摘要:** **目的** 研究特定聚合度原花青素为主要成分的葡萄籽提取物在腹泻治疗中的新用途。**方法** 将葡萄籽进行粉碎、粗提、精制并分级沉淀后得到6个部位, 以大鼠腹泻模型评价葡萄籽原花青素提取物各部位的止泻活性, 并对有效部位的总原花青素含量、平均聚合度和主要单体组成等特性进行分析。**结果** 来源于葡萄籽的多聚原花青素部位F4对应激性腹泻模型有显著活性, 而其他纯化部位和总提物并无此作用。**结论** F4部位在主要原花青素单体组成和含量上与总原花青素及其他部位相比并无差异, 但在平均聚合度上差异明显, 表明F4部位的止泻活性与其特定的聚合度密切相关。

**关键词:** 葡萄籽; 原花青素; 腹泻; 平均聚合度

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 10-1955-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.007

## Preparation of proanthocyanidins from grape seeds and evaluation of its antidiarrheal activity

WANG Hongmin<sup>1</sup>, SHAN Qi<sup>2,3</sup>, HAO Chunhua<sup>2,4</sup>, WANG Weiting<sup>2,4</sup>, ZHENG Yijing<sup>5</sup>, HOU Wenbin<sup>1,2,3</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
3. Tianjin Traditional Chinese Medicine Quality Control Technology Engineering Laboratory, Tianjin 300193, China
4. Tianjin New Drug Safety Evaluation and Research Center, Tianjin 300193, China
5. Tianjin Medical University, Tianjin, 300193, China

**Abstract: Objective** The procyanidins was researched as the main component of grape seed extract in the treatment of diarrhea. **Methods** Grape seeds were crushed, roughly extracted, refined and then six parts were obtained after fractionation. Subsequently, a diarrhea model was used to study the antidiarrheal effectiveness of all parts of the extract. In addition, the characteristics of the total proanthocyanidin contents of active fractions, the mean degrees of polymerization, and the monomer composition were analyzed. **Results** The polymeric procyanidins site F4 derived from grape seeds on stress diarrhea model had significant activity, while other parts of the purification and the total extract did not have such effect. **Conclusion** F4 is nothing special compared with the total proanthocyanidins and other parts on the monomer composition and the content of procyanidins, but in significantly difference on the mean degree of polymerization. The results suggest that F4 shows antidiarrheal activity, and its specific was closely related to the degree of polymerization.

**Key words:** grape seeds; proanthocyanidins; diarrhea; mean degree of polymerization

原花青素(proanthocyanidins)是黄烷-3-醇类衍生物及其聚合物的总称,天然来源的原花青素通常是多种黄烷醇单体缩合成不同聚合度的混合物,广泛存在于各种植物中。因其表现出多方面的药理

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 天津科技计划项目(12JCQNJC08700)

第一作者: 王红敏,女,在读硕士,研究方向为中药学。Tel: 18822183313 E-mail: 18822183313@163.com

\*通信作者: 侯文彬, Tel: 13802027519 E-mail: houwb@tjipr.com

活性,原花青素作为功能性添加剂被大量应用于保健食品和化妆品中。天然原花青素也是新药发现的重要来源,在抗尿路感染<sup>[1-2]</sup>、降低心血管发病风险<sup>[3-4]</sup>等方面均表现出良好的临床应用前景。FDA于2012年批准上市的第一个口服天然药物就是以原花青素类为主要活性成分,用于HIV相关腹泻的治疗<sup>[5]</sup>。

原花青素在自然界储量丰富,像葡萄籽等食品加工废弃物就可作为原花青素的廉价来源。尽管如此,开发以原花青素为活性成分的新药,仍然面临适应症定位、质量研究方法不成熟等诸多问题。由于不同植物来源的原花青素在单体结构和聚合程度上存在一定相似性,通过对已上市和临床在研品种的分析,可以为其他类似新药的开发提供思路。本研究拟以葡萄籽原花青素为天然来源,探讨其在止泻方面的应用前景,由于不同聚合度原花青素缩合物可以表现出不同的药理活性<sup>[6-7]</sup>,因此本研究在活性评价之前对葡萄籽总原花青素进行了聚合度分级。分析原花青素平均聚合度(mDP)的方法很多,目前主要采用凝胶排阻层析或酸催化下的亲核试剂解聚法,计算平均聚合度。通过文献调研<sup>[8]</sup>,本研究采用间苯三酚作为解聚试剂,在优化经典实验方法<sup>[9]</sup>的基础上,完成了各部位平均聚合度和单体组成等数据的测定。

## 1 实验材料

### 1.1 仪器与设备

UV-1601紫外分光光度计(日本岛津公司);Agilent-1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);LCMS-IT-TOF(LC-30AD超高压泵,SIL-30AC自动进样器,CTO-20A柱温箱,SPD-M20A PDA检测器,日本岛津公司)。

### 1.2 材料与试剂

葡萄籽药材(河北安国市永泰中药材有限公司,产地新疆);葡萄籽提取物(天津市尖峰天然药物研究开发有限公司,批号002-1412069-03,总原花青素质量分数95.0%);儿茶素(批号110877-201203,质量分数97.2%)、表儿茶素(批号110878-200102,质量分数99.7%)、表儿茶素没食子酸酯(批号111987-201501,质量分数98.1%)均购自中国食品药品检定研究院;醋酸奥曲肽注射液(诺华制药有限公司,批号S0340);间苯三酚(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);香草醛、抗坏血酸(分析纯,天津光复精细化工研究所);AB-8大孔树脂(南开大学化工厂);色谱甲醇(ThermoFisher);

丙酮、醋酸乙酯、甲苯、氯仿、盐酸等均为分析纯,天津康科德科技有限公司。

### 1.3 动物

SD大鼠,SPF级,体质量300g左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 葡萄籽总原花青素粗提物的制备和含量测定

药材粉碎至中微粒度(80目),采用20倍量70%丙酮为溶剂<sup>[10]</sup>对葡萄籽粉末进行提取,搅拌提取获得总原花青素粗品。总原花青素的含量采用香草醛-盐酸法测定<sup>[11]</sup>。由于该方法对儿茶素、表儿茶素等原花青素单体的显色反应灵敏度较低,造成以上述成分为定量标准时测定结果常常偏高,因此试验中采用尖峰公司葡萄籽提取物(总花青素质量分数为95%)作为对照品。将其用甲醇配制成质量浓度为0.6 mg/mL的储备液,参考文献中方法<sup>[11]</sup>制作标准曲线。待测供试品以甲醇制成适当浓度溶液,依照上述方法测定吸光度,根据标准曲线计算总花青素含量约为59.9%,提取收率为9.09%。

### 2.2 葡萄籽总原花青素粗提物的精制

溶剂提取得到粗提物后,采用AB-8大孔树脂进行精制<sup>[12]</sup>,以1:100的水溶解粗提物,上样进行吸附,水洗至无色。以40%的乙醇为洗脱剂,洗脱4倍柱体积。收集该部位洗脱液,减压浓缩、干燥,得到葡萄籽总原花青素精制品,其总原花青素质量分数提高至91.70%,纯化收率为41.6%。

### 2.3 平均聚合度的测定及方法优化

**2.3.1 解聚反应及HPLC检测条件** 利用间苯三酚降解反应测定原花青素的平均聚合度,在酸催化下,多聚原花青素被间苯三酚降解为游离原花青素单体和单体-间苯三酚加成物。试验中参照Kennedy的方法<sup>[9]</sup>,以甲醇稀释浓盐酸制成0.1 mol/L的盐酸甲醇溶液,以此溶液配制含50 mg/mL间苯三酚和10 mg/mL抗坏血酸的裂解溶液。精密量取4 mL裂解溶液至微量具盖反应瓶中,加入20 mg待测样品(纯化精制后的原花青素),置50 °C水浴中搅拌反应20 min。

反应产物采用HPLC法检测<sup>[9]</sup>,色谱柱为ReproSil-Pur Basic C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为溶液A(1%冰醋酸水溶液)、溶液B(甲醇)二元溶剂,梯度条件为0~10 min, 2~5% B; 10~40 min, 5~20% B; 40~65 min, 20~40% B; 65~70 min, 90% B; 体积流量1 mL/min; 波长280 nm; 柱温30 °C。

液相色谱峰的指认通过飞行时间质谱给出的精确分子量、相应原花青素单体的对照溶液比对及参考文献数据完成。LC-TOF-MS的UPLC色谱条件<sup>[9]</sup>: 色谱柱为Water Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为1% 乙酸水溶液(A)-甲醇(B), 梯度条件为0~15 min, 0~15% B; 15~18 min, 15%~95% B。进样量2 μL, 体积流量0.2 mL/min, 柱温40 °C, PDA检测器: 190~400 nm。质谱条件为ESI离子源(正离子模式), 喷雾电压为4.5 kV, 雾化气为氮气, 体积流量为1.5 L/min, 加热模块(BH)温度为200 °C, 曲形脱溶剂管(CDL)温度为200 °C, 一、二级离子扫描范围为*m/z* 100~1 000, 离子累计时间10 ms, 采用自动采集模式, 每一级质谱自动选择基峰离子作为下一级质谱的母离子进行碎裂, 高纯氩气作为CID碰撞气及冷却气, 二级碰撞能量为50%, 准确质量数用三氟甲酸钠校正。解聚反应产物的图谱和主要色谱峰的归属情况见图1和表1。mDP由下列公式计算:

$$mDP = \sum (\text{间苯三酚加成物峰面积} \times \text{相对物质的量校正因子}) / \sum (\text{原花青素单体峰面积} \times \text{相对物质的量校正因子}) + 1$$

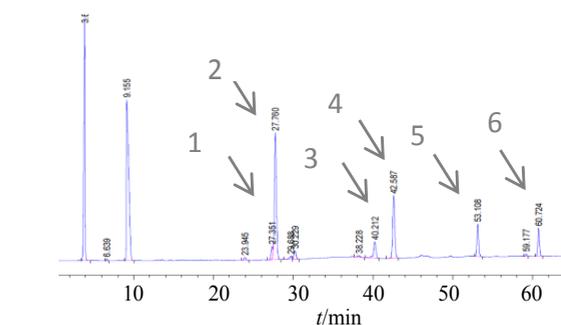


图1 间苯三酚解聚反应产物的HPLC图谱  
Fig.1 HPLC of phloroglucinol depolymerization reaction product

间苯三酚加成物及原花青素单体的相对物质的量校正因子采用文献报道值<sup>[9]</sup>, 见表2。

由于表儿茶素与儿茶素的间苯三酚加成物相对校正因子相同, 因此尽管两化合物在“2.3.1”项的HPLC条件下难以基线分离, 但合并统计峰面积不影响聚合度的计算。

表1 主要色谱峰的归属

Table 1 Ascription of major peaks

峰号	精确 <i>m/z</i>		分子式	化合物归属
	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H]		
1	415.1021	413.0879	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	儿茶素-间苯三酚
2	415.1016	413.0871	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	表儿茶素-间苯三酚
3	291.0842	289.0715	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	儿茶素
4	567.1131	565.0983	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	表儿茶素没食子酸酯-间苯三酚
5	291.0844	289.0711	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	表儿茶素
6	443.0965	441.0809	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	表儿茶素没食子酸酯

表2 间苯三酚加成物及原花青素单体的相对校正因子表

Table 2 Relative correction factor of phloroglucinol procyanidin products and monomers

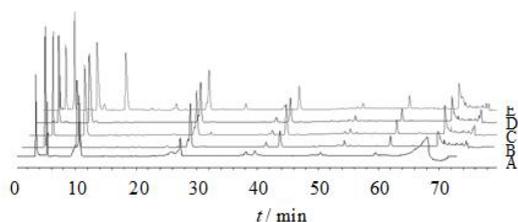
化合物	相对物质的量校正因子λ=280 nm	相对质量校正因子λ=280 nm
(+)-儿茶素	1.00	1.00
(-)-表儿茶素	1.00	1.00
(-)-表儿茶素没食子酸酯	0.32	0.48
(+)-儿茶素-间苯三酚	0.94	0.94
(-)-表儿茶素-间苯三酚	0.94	0.94
(-)-表儿茶素没食子酸酯-间苯三酚	0.27	0.41

### 2.3.2 解聚反应淬灭条件优化

试验中发现解聚反应的淬灭条件对HPLC检测结果有较大影响, 因此有必要对淬灭条件进行优化。试验中以纯化精制后的原花青素为研究对象, 分别通过40 mmol 醋酸钠溶液、稀氨水和纯水中止

反应, 并与不加淬灭试剂直接液相检测进行比较, 优选对测定干扰小, 供试溶液稳定性好的方式。具体结果见图2.3。

图2显示, 以醋酸钠溶液中止反应, 供试品溶液色谱峰对称性和分离均较差, 不适合进行聚合度分



A- 40 mmol 醋酸钠水溶液稀释5倍(进样量10  $\mu$ L); B-纯水稀释5倍(进样量10  $\mu$ L); C-反应后直接进样(进样量2  $\mu$ L); D- 0.1% 氨水稀释5倍(进样量10  $\mu$ L, 0 h); E- 0.1% 氨水稀释5倍(进样量10  $\mu$ L, 6 h)

A- diluted five times with 40 mmol sodium acetate solution (injected 10  $\mu$ L); B- diluted five times with water (injected 10  $\mu$ L); C- direct injection (injected 2  $\mu$ L); D- diluted five times with 0.1% ammonia (injected 10  $\mu$ L, 0 h); E- diluted five times with 0.1% ammonia (injected 10  $\mu$ L, 6 h)

图2 不同淬灭条件对液相分离的影响

Fig.2 Effects of different quenched conditions on the separation of products

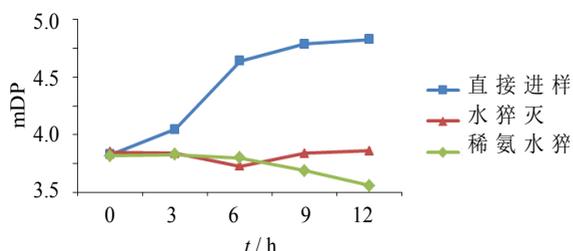


图3 解聚反应不同淬灭方式对mDP的影响

Fig.3 Influence of different quenched conditions on mDP

析;采用其他淬灭方式得到的液相色谱图基本一致。图3显示,若不进行溶剂淬灭,计算出的平均聚合度随供试溶液放置时间的延长而明显增大;以纯水和稀氨水稀释淬灭后,平均聚合度均可在一定时间内基本保持不变,但稀氨水淬灭的不足之处是,供试溶液放置时间延长后(6 h后)有多个副产物生成,对待测成分的有效分离产生一定影响,因此平均聚合度测定工艺确定用水稀释法中止反应。

#### 2.4 葡萄籽总花青素分级沉淀

采用不同溶剂组合对树脂纯化后的葡萄籽总原花青素进行分级沉淀处理<sup>[6,13]</sup>,按以下步骤进行操作,将100 g总原花青素精制品,以水溶解制成40 g/L溶液,等体积醋酸乙酯萃取3次,有机层合并后蒸干,以3 L水复溶后,再以等体积甲苯-醋酸乙酯混合溶剂(1:1)萃取,水层蒸干得到F1部位;将总花青素溶液醋酸乙酯萃取后的水层蒸干,以2 L甲醇复溶,弃去少量不溶物(F7部位),加入2 L氯仿,使氯仿比例达到50%,滤过得F2部位(沉淀);将滤液蒸干后,再以甲醇复溶成饱和溶液,重复上述氯仿沉淀操作,使氯仿的比例分别达到60%、70%和80%,各比例得到沉淀依次为F3、F4和F5部位,最后的滤

液蒸干,得F6部位。各部位相对于总原花青素精制品的收率见表3。

表3 葡萄籽提取物溶剂分级沉淀各部位的收率

Table 3 Yield of various parts of grape seeds extract through solvent fractionation

部位	收率/%	部位	收率/%
F1	19.26	F5	6.62
F2	19.30	F6	3.71
F3	14.40	F7	6.62
F4	18.08		

#### 2.5 止泻活性的评价

2.5.1 方法 采用应激性腹泻模型评价树脂精制后的总原花青素及F1~F7部位的止泻活性,并与醋酸奥曲肽注射液进行比较,以期为其临床应用提供实验依据。

选取SD大鼠,体质量300 g左右。动物随机分为11组,每组5只,即对照组、模型组、总原花青素组、各聚合度部位组(F1~F7)和阳性对照(醋酸奥曲肽)组。总花青素组、各聚合度部位组临用前以0.5% CMC溶解配制,供动物ig给药用;醋酸奥曲肽临用前以生理盐水溶解并稀释至所需浓度供动物sc给药用。

按10 mL/kg ig 0.2 kg/L番泻叶浸出液,4 h后按10 mL/kg ig相应药物。对照组、模型组ig 0.5% CMC,总花青素组、各聚合度部位组给药剂量均为4 g生药/kg,阳性对照组sc醋酸奥曲肽注射液,剂量为30  $\mu$ g/kg。

#### 2.5.2 观察指标

(1)体质量增长率 称取实验大鼠体质量作为初始体质量,实验期间观测每日体质量,求得体质量增长率。

体质量增长率=(当日体质量-初始体质量)/初始体质量

(2)腹泻指数的计算 计数每天稀便次数及大便总次数,计算腹泻指数,并根据污迹范围判定稀便级。稀便级:1级——污迹直径<1 cm;2级——污迹直径在1~2 cm;3级——污迹直径在2~3 cm;4级——污迹直径>3 cm。

稀便率=稀便数/大便总次数

腹泻指数=稀便率×稀便级

2.5.3 统计学处理 应用统计软件SAS9.0进行统计分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有定量数据进行正态性和方差齐性检验,采用单因素方差分析统计,两组间比较采用LSD法。

### 2.5.4 结果

(1)对体质量增长率的影响 对照组体质量持续增长,模型组动物体质量锐减呈持续负增长趋势。ig给予葡萄籽提取物F4能显著增加体质量,与醋酸奥曲肽注射液作用相似;总原花青素组于ig 3 d左右动物出现腹胀死亡,无法进行后续实验观察;其他提取物未见明显效果。结果见表4。

(2)对稀便率的影响 对照组大鼠粪便呈干燥、颗粒状。模型组大鼠粪便呈不规则形状,夹有黏液。葡萄籽提取物F4能显著降低腹泻指数,第1、2、3、4天降低幅度分别为33.6%、61.6% ( $P<0.01$ )、78.1% ( $P<0.01$ )、74.6% ( $P<0.001$ ),效果与醋酸奥曲肽注射液相当;F6治疗第3、4天使腹泻指数降低

55.6% ( $P<0.05$ )、38.2% ( $P<0.05$ );总原花青素组于灌药3天左右动物出现腹胀死亡,无法进行后续实验观察;其他提取物未见明显效果。结果见表5。

### 2.6 F1~F7平均聚合度的测定及单体组成分析

**2.6.1 平均聚合度测定** 采用上述优化后的条件对葡萄籽原花青素的不同部位及各提取物进行mDP测定,结果见表6。

**2.6.2 原花青素单体组成分析** 降解反应产物的定量测定结果可以反映多(寡)聚原花青素中儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯3种单体组成情况。计算公式为:

各单体在纯化部位中含量= $\Sigma$ (供试溶液某原花青素单体或其间苯三酚加成物峰面积 $\times$ 质量校正因子)/儿茶素对照溶液峰面积 $\times$ (对照溶液浓度 $\times$ 供试液稀释倍数)/降解前供试品浓度

表4 葡萄籽提取物对体质量增长率的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 4 Influence of grape seeds extract on growth of body mass ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	体质量增长率/%			
	第1天	第2天	第3天	第4天
对照	3.60 $\pm$ 1.09	4.60 $\pm$ 0.98	5.27 $\pm$ 1.22	7.15 $\pm$ 2.12
模型	-1.42 $\pm$ 4.11 <sup>#</sup>	-2.29 $\pm$ 3.16 <sup>##</sup>	-2.55 $\pm$ 3.56 <sup>###</sup>	-2.69 $\pm$ 2.9 <sup>###</sup>
F1	2.06 $\pm$ 5.02	3.41 $\pm$ 4.63	2.47 $\pm$ 6.85	1.70 $\pm$ 6.73
F2	1.14 $\pm$ 3.35	1.62 $\pm$ 3.4	1.23 $\pm$ 5.88	2.54 $\pm$ 5.31
F3	1.95 $\pm$ 3.95	2.00 $\pm$ 3.66	3.48 $\pm$ 5.31	3.23 $\pm$ 5.36
F4	2.13 $\pm$ 2.05	3.53 $\pm$ 1.82 <sup>**</sup>	4.33 $\pm$ 2.82 <sup>**</sup>	4.87 $\pm$ 3.14 <sup>**</sup>
F5	2.75 $\pm$ 3.32	2.44 $\pm$ 3.58	2.92 $\pm$ 4.51	2.99 $\pm$ 5.03
F6	2.25 $\pm$ 2.14	0.92 $\pm$ 3.31	2.43 $\pm$ 3.33	2.19 $\pm$ 4.17
F7	3.24 $\pm$ 3.72	1.64 $\pm$ 4.68	2.59 $\pm$ 4.27	2.47 $\pm$ 4.15
醋酸奥曲肽	3.35 $\pm$ 1.84 <sup>*</sup>	4.42 $\pm$ 2.19 <sup>**</sup>	4.64 $\pm$ 3.03 <sup>**</sup>	5.30 $\pm$ 3.99 <sup>**</sup>

与对照组比较:<sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$  <sup>###</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$   
<sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$  <sup>###</sup> $P<0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group

表5 葡萄籽提取物对腹泻指数的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 5 Influence of grape seeds extract on diarrhea index ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	腹泻指数			
	第1天	第2天	第3天	第4天
对照	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
模型	3.04 $\pm$ 0.80 <sup>###</sup>	2.60 $\pm$ 0.52 <sup>###</sup>	2.42 $\pm$ 1.01 <sup>###</sup>	2.05 $\pm$ 0.56 <sup>###</sup>
F1	3.17 $\pm$ 0.72	2.22 $\pm$ 0.18	1.66 $\pm$ 0.93	1.61 $\pm$ 0.64
F2	2.83 $\pm$ 0.98	2.46 $\pm$ 0.97	1.72 $\pm$ 1.06	1.55 $\pm$ 0.62
F3	2.91 $\pm$ 1.05	2.55 $\pm$ 1.22	1.56 $\pm$ 0.79	1.46 $\pm$ 0.60
F4	2.02 $\pm$ 1.12	1.00 $\pm$ 0.51 <sup>**</sup>	0.53 $\pm$ 0.41 <sup>**</sup>	0.52 $\pm$ 0.30 <sup>***</sup>
F5	2.66 $\pm$ 0.56	2.13 $\pm$ 0.50	1.54 $\pm$ 0.36	1.34 $\pm$ 0.75
F6	2.84 $\pm$ 0.44	1.98 $\pm$ 0.40	1.07 $\pm$ 0.34 <sup>*</sup>	1.27 $\pm$ 0.37 <sup>*</sup>
F7	1.98 $\pm$ 0.79	2.00 $\pm$ 0.86	1.43 $\pm$ 0.75	1.37 $\pm$ 0.70
醋酸奥曲肽	1.87 $\pm$ 1.14	1.00 $\pm$ 0.87 <sup>**</sup>	0.45 $\pm$ 0.28 <sup>**</sup>	0.51 $\pm$ 0.31 <sup>***</sup>

与对照组比较:<sup>###</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$   
<sup>###</sup> $P<0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$  vs model group

表6 不同部位和各提取物的mDP  
Table 6 mDP of different parts and each step extract

样品	mDP	样品	mDP
F1	1.59	F6	2.13
F2	7.67	F7	7.76
F3	6.41	总原花青素粗提物	3.90
F4	5.13	总原花青素精制品	3.83
F5	3.23		

儿茶素对照溶液的制备:取儿茶素对照品适

量,精密称定,以水溶解、稀释定容为0.2 mg/mL的溶液。供试溶液的制备:采用2.5.1项下条件建立裂解反应体系,精密吸取反应后的溶液2 mL,以水稀释定容至10 mL,即得。间苯三酚加成物及原花青素单体的相对质量校正因子采用文献报道值<sup>[9]</sup>。各单体含量等见表7。由于F7不溶于甲醇,无法用盐酸-香草醛法测得总花青素含量,另外降解时F7因溶解度低,只有小部分与间苯三酚进行反应,反应产物少,无法准确反映单体组成情况。

表7 不同部位和各步提取物的单体组成情况

Table 7 Monomer composition on different parts and each step extract

样品	儿茶素/%	表儿茶素/%	表儿茶素没食子酸酯/%	总量/%	总原花青素/%
F1	21.5	34.5	9.9	65.9	103.8
F2	9.8	18.9	1.8	30.5	37.3
F3	12.4	34.0	5.1	51.5	95.8
F4	9.7	35.1	6.8	51.6	94.7
F5	8.3	31.5	6.3	46.1	89.5
F6	5.9	25.9	5.3	37.1	65.2
总原花青素粗提物	4.9	24.0	3.9	32.8	59.9
总原花青素精制品	10.6	32.2	7.4	50.2	91.7

### 3 讨论

初步止泻药效评价显示,来源于葡萄籽的多聚原花青素部位F4对应激性腹泻模型有显著活性,而其他纯化部位和总提物并无此作用。F4部位在主要原花青素单体组成和含量上与总原花青素及其他部位相比并无差异,但在平均聚合度上差异明显,表明F4部位的止泻活性与其特定的聚合度密切相关。大量研究证实,来源于大戟科南美药用植物秘鲁巴豆 *Croton lechleri* 树皮中的原花青素提取物(Crofelemer)对多种因素引起的非感染性腹泻具有抑制作用<sup>[14-15]</sup>。与葡萄籽中的原花青素相比,两者在单体组成上差异明显,前者以没食子儿茶素和表没食子儿茶素为主<sup>[5]</sup>,而后者主要含儿茶素、表儿茶素和表儿茶素-3-O-没食子酸酯;另一方面,两者缩合成键(B型键)的方式类似,Crofelemer以C4-C8连接为主,葡萄籽原花青素既有C4-C8又有C4-C6连接。上述结构异同提示,原花青素止泻活性受单体组成的影响较小,而受结构单元连接形式和链长度影响的可能性更大。

本试验采用间苯三酚解聚法测定的平均聚合度,相对于使用巯乙胺和苄硫醇等其他常用亲核试剂,本法在反应转化率、产物差向异构化和试剂安全性上有明显优势<sup>[8]</sup>,但这类酸催化解聚反应本身

受实验条件影响很大,例如儿茶素、表儿茶素在酸性条件下热稳定性差,加热时间延长或反应没有淬灭中止,可造成测定结果偏高。因此,在对反应参数进行严格控制的同时,后续研究还需采用凝胶渗透层析或凝胶排阻层析等方法对平均聚合度的测定数值加以确证。

药理研究表明,多聚原花青素可作为小肠氯离子通道(CFTR和CaCC)的抑制剂发挥作用<sup>[16]</sup>。由此推测,葡萄籽特定聚合度的原花青素可能对多种成因引起的腹泻都有治疗作用,因此可采用多种腹泻模型综合评价其止泻活性,以增加临床适用范围。

目前,葡萄籽原花青素的药理活性研究更多集中在抗氧化、抗肿瘤等方面,涉及不同聚合度组分间差异的研究较少,本试验可为葡萄籽原花青素及其他来源的原花青素的进一步开发提供新的思路。

### 参考文献

- [1] Afshar K, Stothers L, Scott H, et al. Cranberry juice for the prevention of pediatric urinary tract infection: a randomized controlled trial [J]. *J Urol*, 2012, 188(4): 1584-1587.
- [2] Ferrara P, Romaniello L, Vitelli O, et al. Cranberry juice for the prevention of recurrent urinary tract infections: a

- randomized controlled trial in children [J]. *Scand J Urol Nephrol*, 2009, 43(5): 369-372..
- [3] Feringa H H H, Laskey D A, Dickson J E, et al. The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Am Diet Assoc*, 2011, 111(8): 1173-1181.
- [4] Kar P, Laight D, Rooprai H K, et al. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity [J]. *Diab Med*, 2009, 26(5): 526-531.
- [5] Frampton J E. Crofelemer: a review of its use in the management of non-infectious diarrhoea in adult patients with HIV/AIDS on antiretroviral therapy [J]. *Drugs*, 2013, 73(10): 1121-1129.
- [6] 孙芸, 徐宝才, 谷文英, 等. 葡萄籽原花青素的聚合度与抗氧化活性关系 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(10): 41-46.
- [7] 孙芸, 徐宝才, 谷文英, 等. 葡萄籽原花青素聚合度与自由基清除能力关系的研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(12): 423-428.
- [8] Souquet J M, Mazaauric J P, Meudec E, et al. Comparison on different methods of depolymerization to the characterization and quantification of proanthocyanidins in grape seed, grape skin and wine [C]//XXII International conference on polyphenols. Helsinki, Finland. 2004: 693-694.
- [9] Kennedy J A, Jones G P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol [J]. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(4): 1740-1746.
- [10] 吕国红, 傅星. 葡萄籽中原花青素提取方法优化处理 [J]. *生态学杂志*, 2004, 23(5): 241-244.
- [11] Hagerman A E. *The Tannin Handbook* [M/OL]. 2002. <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>
- [12] 范明霞, 刘新桥, 陈莹, 等. 大孔树脂吸附纯化葡萄籽原花青素的研究 [J]. *应用化工*, 2009, 38(6): 864-867.
- [13] Saucier C, Mirabel M, Daviaud F, et al. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins [J]. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(12): 5732-5735.
- [14] Cottreau J, Tucker A, Crutchley R, et al. Crofelemer for the treatment of secretory diarrhea [J]. *Exp Rev Gastr Hepatol*, 2012, 6(1): 17-23.
- [15] Teixeira A G V, Stephens L, Divers T J, et al. Effect of crofelemer extract on severity and consistency of experimentally induced enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in newborn Holstein calves [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(11): 8035-8043.
- [16] Tradtrantip L, Namkung W, Verkman A S. Crofelemer, an antisecretory antidiarrheal proanthocyanidin oligomer extracted from *Croton lechleri*, targets two distinct intestinal chloride channels [J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 77(1): 69-78.