

葡萄籽原花青素的反相液相色谱-质谱分析

孙 芸¹,陶冠军²,谷文英^{1*}

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214036 2. 江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036)

摘要:目的 用反相液相色谱-电喷雾质谱(RP-HPLC/ESI-MS)分析葡萄籽粗提物中低聚原花青素的组成。方法 根据质谱的准分子离子 $[M-H]^{-}(m/z)$ 检测其单体及低聚体。结果 初步检测出 3个单体、7个二聚体及 3个三聚体。结论 表明 RP-HPLC/ESI-MS联用可以分析葡萄籽原花青素低聚体的基本组成。

关键词:葡萄籽;原花青素;液相色谱;电喷雾质谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0493-04

Analysis of procyanidins in grape seeds by RP-HPLC/ESI-MS

SUN Yun¹, TAO Guan-jun², GU Wen-ying³

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;

2. Analysis and Testing Center, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract **Object** The analysis of oligomeric procyanidins in crude grape seed extracts was performed by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (RP-HPLC/ESI-MS). **Methods** Procyanidin monomer and oligomers were identified according to the mass of the charged pseudomolecular ion $[M-H]^{-}$. **Results** Three monomers, seven dimers and three trimers were tentatively identified. **Conclusion** This study demonstrates the capability of the combination of RP-HPLC with ESI-MS to analyze the composition of oligomeric procyanidins in grape seed extracts.

Key words grape seeds; procyanidins; HPLC; ESI-MS

现代研究表明,葡萄籽原花青素是迄今为止所发现的最有效的自由基清除剂之一^[1]。葡萄籽原花青素主要由(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表儿茶素没食子酸酯及其二聚、三聚、四聚……最高平均聚合度达十五聚体组成^[2]。各单体之间主要通过4→6或4→8键相连,葡萄籽中的原花青素由于聚合度、单体及连接键的不同,结构非常复杂。因此,原花青素的分析分离及结构表征比较困难。目前从葡萄籽中鉴定了3种单体、14种二聚体(其中6种为没食子酸酯形式)、11种三聚体(其中3种为没食子酸酯形式)及1种四聚体^[3]。

原花青素各低聚体及各同聚异构体之间极性相近,一般较难分开。其分离分析除了薄层色谱(TLC)及毛细管电泳法以外,最常用的是HPLC(紫外或荧光检测)。正相液相色谱法可以按原花青素相对分子质量(聚合度)的不同将其分离,甚至可以检测七聚体^[4],但不能区分同聚体中各异构体。反相色谱则可以较好地分离单体及二、三聚体的某些异构

体^[5]。原花青素的结构鉴定可用硫解法、质谱及NMR。硫解法可以鉴定粗提物中原花青素的平均聚合度及大致组成(儿茶素、表儿茶素比例)^[6],质谱法可以提供各化合物的结构信息,特别是与HPLC的联用,成为复杂化合物在线分析及检测的强有力的工具。电喷雾质谱是一种大气压电离技术,易于与液相色谱联用,作为一种软离子化技术,主要产生准分子离子,碎片少,可以直接根据分子离子定性,特别适用于多酚类物质的检测。Hammerstone等用正相液相色谱-电喷雾质谱联用成功地分离和定性分析了可可及巧克力、苹果、花生等食品中原花青素单体及低聚体的组成^[7]。Fulcrand等则用反相色谱-电喷雾质谱分析了葡萄酒中的低聚原花青素^[8]。在用反相液相色谱分析葡萄籽中低聚原花青素的组成时,一般需要较长时间(90~100 min)才能基本分离,各成分的定性需要相应的对照品鉴定,而且由于原花青素异构体数目繁多,一般液相很难分开,能得到的异构体也仅有限的几种,命名葡萄籽中原花青

* 收稿日期: 2002-09-23

作者简介: 孙 芸(1974-),女,山东莱芜人,博士研究生,研究方向为天然药食科学。

* 通讯作者 Tel: (0510) 5879957 E-mail: Wytg@sytu.edu.cn

素的分析十分烦琐。而反相色谱-电喷雾质谱联用作为一种简便适用的方法在分析葡萄籽原花青素低聚体方面的研究还很少,本实验采用 RP-HPLC-MS 分析了葡萄籽粗提物中的低聚原花青素,直接根据各物质的分子离子或 ESI 质谱信息定性,更简便地对其低聚原花青素的组成作了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 仪器 试剂与样品: Waters Platform ZMD 4000 液质联用仪, Waters 2690 液相色谱仪(包括梯度泵、自动进样器等), Waters 966 二极管阵列检测器。甲酸(分析纯), 甲醇(色谱纯), 重蒸水。市售原花青素产品(纯度 $\geq 95\%$), 甲醇溶解, 0.45 μm 膜过滤后 HPLC 分析; 葡萄籽提取液为干葡萄籽粉碎后室温依次用甲醇 80% 甲醇 70% 丙酮提取, 提取液过滤, 各滤液合并后 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发除去溶剂, 剩余水溶液用石油醚除去脂溶性成分, 分离后蒸干水溶液, 固形物溶于甲醇, 过 0.45 μm 膜后用 HPLC-MS 分析。

1.2 色谱及质谱条件

1.2.1 色谱条件: 色谱柱 Zorbax XDB (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相 A 1% 甲酸, B 80% 甲醇-1% 甲酸, 梯度洗脱: 0~5 min, 100% A; 5~50 min, 100% A \rightarrow 20% A+80% B, 流速 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL , 检测分流比 5:1

1.2.2 质谱条件: 扫描方式: 负离子扫描 (ESI, m/z 260~1500), 毛细管电压 4.2 kV, 锥孔电压 50 V, 光电倍增器电压 650 V, 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度 300 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

葡萄籽中的原花青素含 3 种单体: (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素及(-)-表儿茶素没食子酸酯, 相对分子质量分别为 290, 290, 442, 相应的 ES 准分子离子 $[M-H]^{-}$ m/z 分别为 289, 289, 441 各单位之间通过黄酮间键 C-C(4 \rightarrow 6 或 4 \rightarrow 8) 键相连, 形成原花青素的二聚、三聚、四聚等各聚合体, 相对分子质量分别为 578(二聚), 730(二聚单酯), 882(二聚二酯), 866(三聚), 1018(三聚单酯), 1154(四聚)等, 准分子离子 (ESI) m/z 分别为 577, 729, 881, 865, 1017, 1153...。本实验以负离子为选择离子检测原花青素各低聚体。

由于葡萄籽提取液中杂质含量较高, 干扰较大, 而且原花青素各成分之间极性相近, 本实验采用的液相色谱条件仅能较好地分离 3 种单体及少数几种二、三聚体(图 1), 但电喷雾质谱的选择离子则能将

几种低聚体区分开。以下是根据各聚合体相对分子质量进行选择离子的结果。

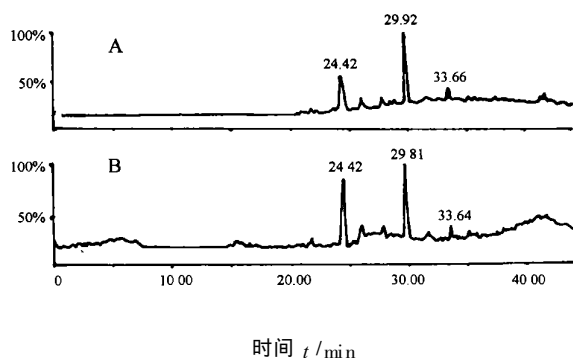


图 1 葡萄籽提取液的液相色谱 (A) 及总负离子流色谱 (B) 图谱

Fig. 1 HPLC (A) and total negative ion current chromatography (B) of grape seed extract

单体的选择离子色谱检测出 3 种单体(峰 M1 M2 M3, 出峰时间分别为 24.42, 29.92, 33.66 min) 研究表明^[3], 葡萄籽中除 (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素及(-)-表儿茶素没食子酸酯之外并没有其他的单体结构。峰 M1 M2 (m/z 289, 儿茶素或表儿茶素) 的紫外吸收光谱 (λ_{max} 278 nm) 和 ESI 质谱信息是一致的。提取液及 95% 纯度样品的单体质谱图中除分子离子外, 均存在 m/z 579.8 的片段, 属于偶合离子 $[M+ (M-H)]^{-}$ 。根据报道, 反相 HPLC 中 (+)-儿茶素在 (-)-表儿茶素之前出峰, 可以推测 M1 为 (+)-儿茶素, M2 为 (-)-表儿茶素。峰 M3 (m/z 441) 为 (-)-表儿茶素没食子酸酯, 其紫外吸收也在 278 nm 产生最大吸收。质谱中主要包括分子离子 (m/z 441.6) 及由 (-)-表儿茶素没食子酸酯失去没食子酰基形成的离子 (m/z 289.5), 由此可以断定峰 M3 为 (-)-表儿茶素没食子酸酯。各峰的 ESI 质谱图也表明, 电喷雾质谱主要产生分子离子, 碎片很少。

反相 HPLC 对异构体的分离能力较强, 从 m/z 577 选择离子色谱图和各峰的 ESI 质谱信息可以较清楚地检出 6 种非酯二聚体(峰 D1~D6, 出峰时间分别为 20.34, 21.18, 21.78, 23.58, 25.97, 26.45 min, 见图 2-A), m/z 577 峰的 ESI 质谱图除了准分子离子外, 还提供了某些碎片信息(图 2-a) 根据报道, 二、三聚体原花青素的碎片断裂方式主要包括 RDA 反应 (retro Diels-Alder 反应) 及黄酮间连接键的断裂, 在黄酮骨架结构的 C 环上发生 RDA 反应后可能失去一个中性的 $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ 结构 (相对分子质量 152), 形成的离子片段还可以进一步失去一分

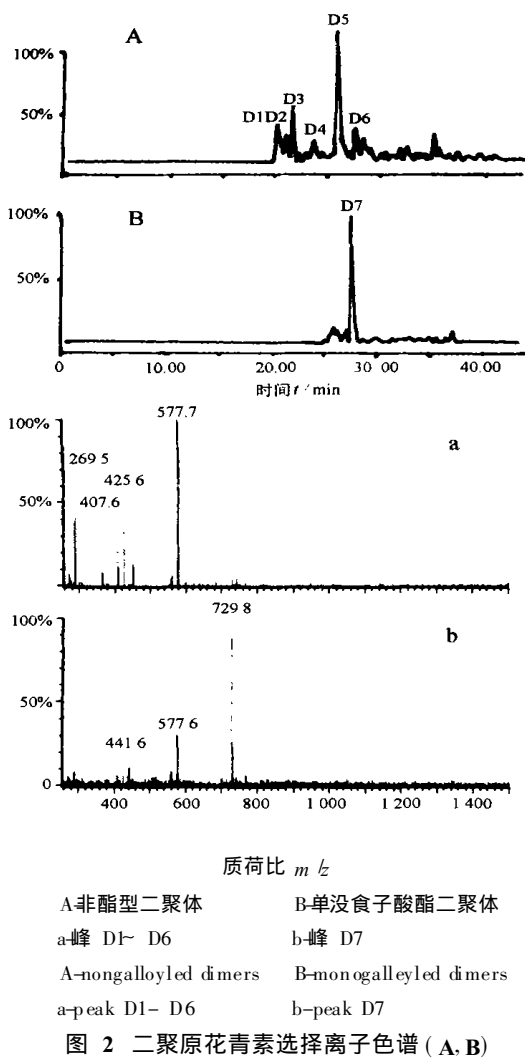


图 2 二聚原花青素选择离子色谱 (A, B)

及其 ESI质谱图 (a, b)

Fig. 2 Selected ion chromatography (A, B) and ESI-MS (a, b) of procyanidin dimers

子 He Q Wollgast 等^[9]在用 CID-MS-MS研究巧克力原花青素及直接进样研究原花青素 B2(表儿茶素 \rightarrow 8表儿茶素)质谱图的结果肯定了此反应的存在。本实验中 m/z 577 的碎片, m/z 425.6 及 m/z 407 也验证了这一点。另外为了区分原花青素聚合物中各个位置的黄烷醇结构, Porter^[9]根据各单体连接的键位置提出了一种命名法,将原花青素分子分为 T-unit (top), M-unit (middle) 及 B-unit (base), T-unit 仅以 C₄ 键与其他单位相连, M-unit 除 C₄ 键,还存在 C₆ 或 C₈ 键, B-unit 则以 C₆ 或 C₈ 键与上端基团相连。据此,以失去一个单体单位为例,原花青素各单位体之间键的断裂有两种可能:一种是失去 T-unit (C₅ H₂ O₆) 中性碎片,形成 m/z 为 [M- 288- H] 的离子。还可失去 B-unit (C₁₅ H₄ O₆) 中性碎片,形成 m/z 为 [M- 290- H] 的离子。显

然,图 2-a 中 m/z 289.5 为二聚体失去 T-unit 的结果 另外选择离子 m/z 729 仅检测出一种二聚体单没食子酸酯 (出峰时间 27.77 min, 见图 2-B), 其 ESI 质谱图中 m/z 729 为准分子离子峰 (图 2-b), 进而失去没食子酰基 (相对分子质量 152), 形成二聚体负离子 m/z 577.6, 或失去一个 T-unit 形成 (-) - 表儿茶素没食子酸酯负离子 m/z 441.6

选择离子检测三聚体的结果由于杂质的干扰及异构体数目增加,使化合物难以分开,仅几种含量较高的三聚体较明显地表现出来 (T1, T2, T3, 出峰时间分别为 22.26, 26.45, 28.37 min, 图 3-A), 其 ESI 质谱碎片也主要是失去一个 T-unit 形成的 (m/z 577.8, 图 3-a)

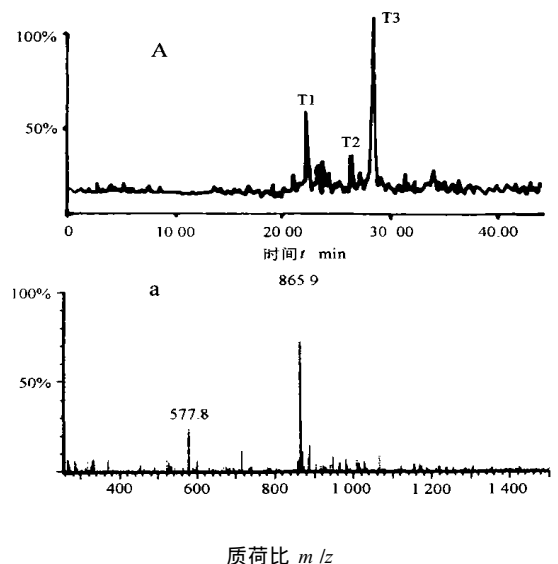


图 3 原花青素非酯型三聚体选择离子色谱图 (A) 及其 ESI质谱图 (a)

Fig. 3 Selected ion chromatography of nongalloyled trimers of procyanidin (A) and its ESI-MS (a)

本实验采用的 HPLC-MS 方法在分析葡萄籽粗提液时检测了 3 个单体、7 个二聚体、3 个三聚体及 1 个四聚体。而分析纯度 > 98% 的市售产品,可以检测出 3 个单体、11 个二聚体 (包括 3 个二聚体没食子酸酯结构) 及 8 个三聚体 (非没食子酸酯结构) (图略),这与杂质的干扰有关。葡萄籽提取液在 HPLC-MS 分析前能进一步纯化可以得到更好的结果

另外从各聚合体的出峰时间来看,出峰时间与聚合度之间没有必然的联系,单体结构和连接方式的不同对原花青素各聚合物及异构体极性的影响更大,使各成分的出峰次序相互交叉。更高聚合度的原花青素,异构体数目更多,极性分布更复杂,在反相色谱上无法分开。

3 结论

本实验采用的 RP-HPLC/ESI-MS可以更简便地分析葡萄籽低聚原花青素 (DP1-3)的基本组成,但由于各聚合体异构体数目繁多,其 ESI质谱行为也很相近,除单体外,还未能对各异构体的结构作出准确的鉴定

References

- [1] Ricardo do silva J M, Darmon N, Fernandez Y, *et al.* Oxygen free radical scavenger capacity of different procyanidins from grape seeds [J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 39: 1549-1552.
- [2] Prieur C, Rigaud J, Cheyner V, *et al.* Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 781-784.
- [3] Fuleki T, Ricardo da silva J M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivate grown in ontario [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1156-1160.
- [4] Wilson E L. High pressure liquid chromatography of apple juice phenolic compounds [J]. *J Sci Food Agric*, 1981, 32: 257-264.
- [5] Santos-Buelga C E, Francia A M, Esribano-Bailon M T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties [J]. *Food Chem*, 1995, 53: 197-201.
- [6] Matthews S, Mila I, Scalbert A, *et al.* Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1195-1201.
- [7] Hammerstone J F, Lazarus S A, Mitchell A E, *et al.* Identification of procyanidins in cocoa and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 490-496.
- [8] Fulcrand H, Remy S, Souguet J M, *et al.* Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 1023-1026.
- [9] Wollgast J, Pallaroni L, Agazzi M E, *et al.* Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 926: 211-220.

虎杖的水溶性成分研究

肖 凯,宣利江,徐亚明,白东鲁

(中国科学院上海生命科学研究院上海药物研究所,上海 200433)

摘要:目的 研究虎杖的水溶性活性成分。方法 利用反相色谱的方法分离纯化,根据化合物的化学性质与光谱数据鉴定其结构,并测试其生物活性。结果 虎杖根茎的 60% 丙酮提取物中分得 6 个化合物,确定其结构分别为白藜芦醇 (I),云杉新苷(白藜芦醇-3-O β -D-吡喃葡萄糖苷)(II),2,3-二氢-2-(4'-O β -D-吡喃葡萄糖基-3'-甲氧基-苯基)-3-羟甲基-5-(3-羟基丙基)-7-甲氧基苯唑喹啉(III),2,6-二甲氧基-*p*-苯-1-O β -D-吡喃葡萄糖苷(IV),5,7-二羟基-异苯唑喹啉(V),5,7-二羟基-异苯唑喹啉-7-O β -D-吡喃葡萄糖苷(VI)。结论 化合物 III~VI 为首次从该植物中分得,化合物 I~VI 没有显示出 DNA 裂解活性,化合物 II 对 KB 和 MCF-7 细胞表现出较弱的细胞毒活性。

关键词:虎杖;水溶性成分;生物活性

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0496-03

Studies on water-soluble constituents in rhizome of *Polygonum cuspidatum*

XIAO Kai, XUAN Li-jiang, XU Ya-ming, BAI Dong-lu

(Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institute for Biological Sciences, CAS, Shanghai 200031, China)

Abstract Object To study the chemical structures and bioactivity of the water-soluble constituents from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. **Methods** To isolate the constituents by reverse phase methods, and characterize their structures by the analysis of chemical property and spectral data. **Results** Six compounds were isolated from the 60% aqueous acetone extract from the rhizome of *P. cuspidatum*. Their structures were elucidated as reveratrol (I); piceid (II); 2, 3-dihydro-2-(4'-O β -D-glucopyranosyl-3'-methoxy-phenyl)-3-hydroxymethyl-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxybenzofuran (III); 2, 6-dimethoxy-*p*-hydroquinone-1-O β -D-glucopyranoside (IV); 5, 7-dihydroxy-isobenzofuran (V) and 5, 7-dihydroxy-isobenzofuran-7-O β -D-glucopyranoside (VI), respectively. **Conclusion** Compounds III - VI are isolated