

葡萄籽原花青素二聚体的提取分离与结构鉴定

徐德平, 孙 芸, 谷文英, 丁霄霖

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

20世纪80年代以来,人们对原花青素的单聚体、二聚体、三聚体、四聚体和高聚体进行生化、药理活性的研究,发现其具有抗氧化、抗致突变、抗心血管疾病等活性,其中二聚体和三聚体活性最强^[1]。葡萄籽原花青素单体主要由(+)-儿茶素(catechin)、(-)-表儿茶素(epicatechin)、(-)-表儿茶素没食子酸酯组成,各单体通过4→6或4→8键相连,形成二聚、三聚、四聚等多聚体。葡萄籽中的原花青素由于聚合度、单体及连接键的不同,各聚合度可能的异构体数目为 $2^{n-1} \times 3^n$ (n =聚合度),单二聚体就有18种可能的异构体,结构非常复杂,各低聚体及各同聚异构体之间极性相近,由于原花青素异构体数目繁多,一般液相色谱仪也很难分开,能得到的异构体也仅仅有有限的几种,使葡萄籽中原花青素的分析、分离十分困难^[2~4]。目前国外对葡萄籽原花青素的研究非常多,国内的研究报道也有很多,但主要集中在生理活性研究和生产开发方面,对低聚体的化学组成和结构研究很少。本研究利用RP-HPLC分析了葡萄籽粗提物中的二聚体原花青素的构成,并采用反相色谱柱分离得到2个二聚体化合物,并对其结构进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料:葡萄籽由中国长城葡萄酒公司提供;HPLC用甲醇为色谱纯,甲醇、石油醚(30~60℃)、醋酸乙酯等皆为AR级(上海化学试剂采购供应站);GF₂₅₄硅胶板(山东烟台芝罘化工厂);色谱柱:聚酰胺(60目,浙江台州化工厂),Sephadex LH-20、HW-40为进口分装。

1.2 仪器:Waters Platform ZMD 4000液质联用仪;Bruker AV 500核磁共振仪(中国科学院上海有机化学研究所)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件:色谱柱 Zorbax XDB(250 mm×4.6 mm, 5 μm);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→20% A+80% B。质量流量 1 mL/min,柱

温 30℃,进样量 20 μL。检测分流比 5:1, 280 nm 检测。质谱条件:负离子扫描(ESI⁻, m/z 260~1 500),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℃,脱溶剂气温度 300℃,结果用 MassLynx 软件分析^[5,6]。

1.3.2 葡萄籽提取物:葡萄籽 5 kg 粉碎后室温用甲醇(料液比 1:7)提取 3 次,提取液滤过,除去溶剂,石油醚脱脂,将脱脂后的物质用 3 倍体积的醋酸乙酯萃取,反复多次,直到醋酸乙酯相无色为止,合并醋酸乙酯相,蒸干,蒸发温度≤40℃,得醋酸乙酯提取物(用于分离单聚体化合物)。将醋酸乙酯提取后的剩余物蒸干,取少量固体物溶于甲醇,过 0.45 μm 膜后用 HPLC-MS 分析,余下用于二聚体化合物的分离。

1.3.3 二聚体化合物的分离:将醋酸乙酯提取后的剩余物蒸干用适量水溶解,上聚酰胺柱(600 mm×60 mm),先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱(20%、40%、60%),分步收集。40%甲醇溶液洗脱得流份 A,60%甲醇溶液洗脱得流份 B,将流份 A 部分浓缩至一定体积后上 Sephadex LH-20 柱(500 mm×35 mm),先用去离子水洗脱,再用甲醇梯度洗脱,15 mL 收集一管,可得到 C、D、E、F 4 个组分,每组分主要含 1 个化合物,将 C、D 每个组分反复上 HW-40 柱(500 mm×35 mm),并用甲醇梯度洗脱,可得 2 个纯化合物,分别为 I、II。

1.3.4 二聚体化合物的结构鉴定:将所得 I、II 两个化合物用 DMSO-d₆ 溶解后,进行 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等分析。

2 结果与分析

2.1 反相 HPLC 分离结果:从葡萄籽提取液选择离子色谱图(图 1)及各峰的 ESI 质谱信息可以较清楚地检出 6 种非酯二聚体(m/z 为 577),出峰时间分别为 20.34、21.18、21.78、23.58、25.97、26.45 min,和 2 种二聚体没食子酸酯(m/z 为 729)出峰时间分别为 27.77、28.49 min。可见从本研究所用的葡萄籽中可检出的二聚体数量为 8 种,LC-MS 只能

分辨相对分子质量,不能进一步给出结构信息。

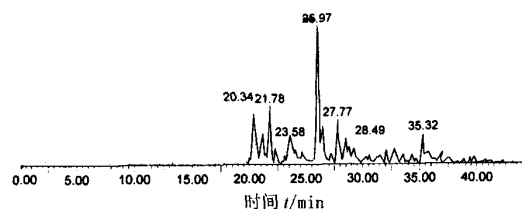


图 1 葡萄籽中原花青素二聚体 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of procyanidin dimer from grape seed

2.2 鉴定

化合物 I: 浅黄色粉末, 极易溶于水、乙醇、甲醇等溶剂, 不溶于丙酮、醋酸乙酯等小极性溶剂。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 上部 (catechin) δ: 2.99 (1H, H-4), 4.05 (1H, m, H-3), 4.73 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-2), 5.85 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 6.12 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.74 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-5'), 7.03 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-2'). 下部 (epicatechin) δ: 2.64 (1H, H-4β), 2.89 (1H, H-4α), 4.43 (1H, m, H-3), 4.63 (1H, s, H-2), 6.02 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.17 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 6.84 (2H, H-6', H-5'), 6.98 (1H, s, H-2'). 从 ¹H-NMR 数据可见, 4.73, 4.63 处各有一个 H, 4.73 为双峰, 是 catechin 上的 H-2, 4.63 为单峰, 应是 epicatechin 上的 H-2, epicatechin 上的 H-2 一般在 4.8 左右, 而此处小于 4.8, 表明 epicatechin、epicatechin 上的 H-2 受到其他基团的影响而向高场移动。在 δ 小于 3 的高场区只有 3 个 H, 说明 H-4 成键。

二聚体是由 (+)-儿茶素 (catechin)、(-)-表儿茶素 (epicatechin)、(-)-表儿茶素没食子酸酯通过 4→6 或 4→8 键相连形成, 化合物 I 没有没食子酸酯的信号, 排除了 (-)-表儿茶素没食子酸酯成键的可能。catechin、epicatechin 的 C-4 一般在 26~29, 从 ¹³C-NMR 光谱中可见 δ37.2 处有一碳信号, 这一碳信号表明 C-4 位成键; C-3 的碳信号 catechin 一般在 68 左右, epicatechin 的 C-3 的信号在 67 左右, 从 ¹³C-NMR 光谱中可见 δ67.3, 72.8 处各有一碳信号, 而 68 左右未见碳信号, 表明 epicatechin 的 C-4 未成键, 从 DEPT 谱中也可证实, catechin 的 C-4 成键使 C-3 向低场移动到 72.8, 可以判断 epicatechin 在下, catechin 在上。epicatechin 的 C-6 的信号大于 96, C-8 的信号小于 96, 从 ¹³C-NMR 光谱中可见 δ96.2, 96.9 处各有一碳信号, 而 95.8 处仅有一碳

信号, δ96.2, 96.9 处的碳信号分别为 catechin、epicatechin 的 C-6, 95.8 处的碳信号应为 catechin 的 C-8, 表明 epicatechin 的 C-8 成键并向低场移动。通过以上分析并参考文献得化合物 I 为 catechin 4→8 epicatechin^[7-9]。¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 上部 (catechin) C-4-37.2, C-3-72.8, C-2-82.2, C-8-95.8, C-6-96.2, C-4a-101.7, C-5'-116.0, C-2'-116.2, C-6'-120.7, C-1'-131.3, C-3'-144.1, C-4'-144.7, C-8a-153.2, C-5-154.9, C-7-155.5; 下部 (epicatechin) C-4-27.4, C-3-67.3, C-2-80.7, C-8-109.3, C-6-96.9, C-4a-100.2, C-5'-115.3, C-2'-116.5, C-6'-120.15, C-1'-131.17, C-3'-143.9, C-4'-144.2, C-8a-153.4, C-5-155.3, C-7-157.1。化合物 I 结构见图 2。

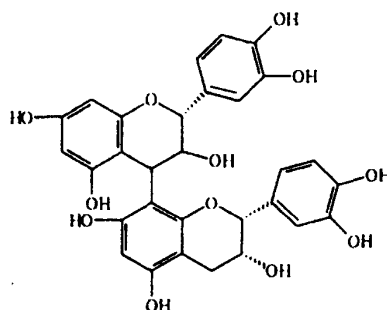


图 2 化合物 I 的结构

Fig. 2 Structure of compound I

化合物 II: 浅褐色粉末, 极易溶于水、乙醇、甲醇等溶液, 不溶于丙酮、醋酸乙酯等小极性溶剂。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 上部 (catechin) δ: 2.85 (1H, H-4), 4.01 (1H, m, H-3), 4.57 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-2), 5.94 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.18 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.75 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6'), 6.82 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.02 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-2'). 下部 (epicatechin) δ: 2.63 (1H, H-4β), 2.87 (1H, H-4α), 5.34 (1H, m, H-3), 5.04 (1H, s, H-2), 5.78 (1H, d, J = 2 Hz, H-6), 6.07 (1H, d, J = 2 Hz, H-8), 6.79 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-5'), 6.84 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-6'), 6.92 (1H, s, H-2'), 6.86 (2H, s, 2'', 6''). 从 ¹H-NMR 数据可见, δ4.57 处有一个 H, 为双峰, 是 catechin 上的 H-2, δ5.04 为单峰, 应是 epicatechin 上的 H-2, epicatechin 上的 H-2 一般在 4.8 左右, 而此处大于 4.8, 表明 epicatechin 上的 H-2 受到其他基团的影响而向低场移动。δ5.34 处的 H 可能为 epicatechin 上的 H-3 受其他基团影响而向低场移动。δ6.86 处有 2 个单峰 H, 提示有没食子酸酯的存在, 在 δ 小于 3 的高场区只

有3个H,说明H-4成键。

在化合物Ⅱ的 ^{13}C -NMR谱中, $\delta 166.7$ 碳信号为羰基碳,提示有没食子酸酯的可能, $\delta 143.2\sim 157.3$ 有13个连氧碳,而catechin,epicatechin各有5个连氧碳,另3个连氧碳一定为没食子酸的,根据文献资料介绍,二聚体中只有(-)-表儿茶素没食子酸酯的存在。没食子酸在3位与(-)-表儿茶素连接,C-3向低场移动,由于空间位阻,(-)-表儿茶素4位成键可能较小,由于 $\delta 96.1, 96.9$ 处各有一碳信号,而95.3处仅有一碳信号,说明C-8位参与成键。通过以上分析并参照文献确定化合物Ⅱ为catechin4 $\rightarrow$ 8epicatechin galate^[7~9]。 ^{13}C -NMR(400 MHz,DMSO- d_6):上部(catechin)C-4-37.1,C-3-76.2,C-2-82.2,C-8-95.3,C-6-96.1,C-4a-101.6,C-5'-115.3,C-2'-115.3,C-6'-120.1,C-1'-131.9,C-3'-144.7,C-4'-144.8,C-8a-155.6,C-5-155.8,C-7-157.3;下部(epicatechin galate)C-4-26.8,C-3-70.6,C-2-77.7,C-8-96.1,C-6-96.9,C-4a-100.1,C-5'-115.4,C-2'-115.4,C-6'-118.6,C-1'-130.7,C-3'-145.6,C-4'-145.7,C-8a-156.2,C-5-157,C-7-156.2。羰基 166.7,C-1"-124.8,C-2"-106.1,C-3"-153.1,C-4"-143.2,C-5"-151.3,C-6"-109.9。化合物Ⅱ结构见图3。

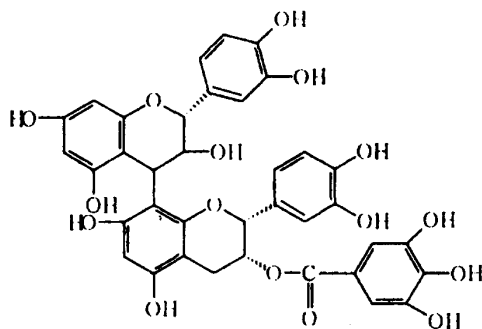


图3 化合物Ⅱ结构

Fig. 3 Structure of compound II

3 讨论

苹果、可可原花青素其聚合体一般由表儿茶素通过C4-C8键聚合而成,各聚合体的异构体数目一般只有2~3个,很容易分离分析。而葡萄籽原花青素则复杂得多,二聚体理论上有18种(其中6种为没食子酸酯形式),三聚体理论上有108种,要获得如此多的相应对照品非常困难。本研究采用反相色谱结合电喷雾质谱分析葡萄籽粗提物中二聚体的组成,可以为葡萄籽原花青素的原料选择及质量评价提供一种方法,在没有相应对照品的情况下借助质谱在线检测比较、分析不同来源原花青素低聚体的相对含量。

References:

- [1] Guo I, Xu L. Procyanidin: A plant medicine with many uses [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 1996, 11(5): 196-204.
- [2] Prieur C, Rigaud J, Cheynier V. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36: 781-784.
- [3] Oszmianski J, Sapis J C. Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics [J]. *J Agric Food Chem*, 1989, 37(5): 1293-1297.
- [4] Waterhouse A L, Price S F, McCord J D. Reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for analysis of wine polyphenols [J]. *Metho Enzymol*, 1998, 299: 113-121.
- [5] Jaworski A W, Lee C Y. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics [J]. *J Agric Food Chem*, 1986, 34: 966-970.
- [6] de Freitas V A P, Glories Y, Bourgeois G. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(5): 1435-1441.
- [7] de Bruyne T, Pieters L A C, Vlietinck A J. Unambiguous assignments for tree dimeric proanthocyanidin phenols from 2D NMR [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(1): 265-272.
- [8] Fuleki T, Ricardo da Silva J M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1156-1160.
- [9] Yeap F L, Yinrong L. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace [J]. *Food Chem*, 1999, 64(4): 511-518.

过山藤的化学成分研究(I)

李 宁¹, 吴永军², 李 锐^{1*}, 王金辉¹, 王 楠¹

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁恒仁药业股份有限公司, 辽宁 桓仁 117201)

过山藤又名马蹬草、还阳草、过桥草,为铁角蕨

科植物过山藤 *Camptosorus sibiricus* Rupr. 的全草,

收稿日期: 2004-05-18

作者简介: 李 宁(1979—),女,河北保定人,在读研究生,2001年毕业于沈阳药科大学中药学院,同年考取本校天然药物化学专业研究生。

* 通讯作者 Tel: (024)23902286 E-mail: lixian@mail-sy.ln.cn.