

木瓜多聚原花青素降解产物的液相色谱-电喷雾质谱分析

姜力¹ 朱宏涛² 王军民¹ 张颖君² 华燕¹ 赵平^{1*}

(1. 西南林业大学林学院, 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要 [目的]分析以茶多酚为亲核剂的木瓜原花青素降解反应产物。[方法]采用液相色谱-电喷雾质谱联用技术(LC-ESI-MS)分析主要降解反应产物。[结果]3个新产物的结构分别推测为(表)儿茶素-(4-8)-(表)没食子儿茶素、(表)儿茶素-(4-8)-(表)没食子儿茶素3-O-没食子酸酯和(表)儿茶素-(4-8)-(表)儿茶素3-O-没食子酸酯。[结论]该研究为木瓜原花青素降解产物进一步在医药品、保健食品、食品添加剂和化妆品等领域上的应用奠定基础。

关键词 木瓜多聚原花青素; 降解产物; LC-ESI-MS

中图分类号 S661.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2012)31-15095-02

LC-ESI-MS Analysis of Degradative Products of Quince Polymeric Proanthocyanidins

JIANG Li et al (Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in Southwest Mountains of China, Ministry of Education, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract [Objective] The study aimed to analyze the degradative products that was from the degradative reaction of quince polymeric proanthocyanidins with tea polyphenols as a nucleophile. [Method] LC-ESI-MS technique was adopted to analyze the structures of the main degradative products. [Result] Three new products were deduced as (epi) catechin-(4-8)-(epi) gallo catechin, (epi) catechin-(4-8)-(epi) gallo catechin 3-O-gallate, and (epi) catechin-(4-8)-(epi) catechin 3-O-gallate. [Conclusion] The results could provide scientific basis and support for the further application of the new type antioxidant oligomeric proanthocyanidins in the fields of pharmaceuticals, health foods, food supplement and additives, and costmetics etc.

Key words Quince polymeric proanthocyanidins; Degradative products; LC-ESI-MS

原花青素(Proanthocyanidins, PC)是植物中由不同数目的黄烷3-醇单元(儿茶素或表儿茶素)等通过不同键合方式聚合而成的一大类多酚类聚合物的总称^[1]。按照聚合度,通常将2~4聚体称为低聚原花青素(Oligomeric proanthocyanidins, OPC);五聚体以上的称为多聚原花青素(Polymeric proanthocyanidins, PPC)。以往研究表明,聚合度对PC抗氧化活性的影响较大,随着PC聚合度的增加其抗氧化作用明显降低^[2-3]。与PPC相比,OPC在抗氧化、清除自由基、酶抑制、抗突变、防治心血管疾病、抗癌、抗衰老、增强免疫调节、抗糖尿病等方面具有显著的生物活性,能防止多种因自由基引起的疾病,以高效、低毒、高生物利用度而著称^[4-5]。

酸催化降解是PC最重要的化学反应之一。在适当的酸性条件下,黄烷3-醇单元之间的连接键易发生断裂,在末端的结构单元被释放出来的同时,其延伸单元中C环4位形成的碳正离子易被适当的亲核剂所捕捉,形成亲核剂附加产物^[6]。基于这一化学特性,使用苯硫醇的硫醇降解法和间苯三酚降解法作为经典的分析手段在各种植物来源PC的结构分析及其平均聚合度评价上一直应用至今。近年来,国外学者研究发现半胱氨酸、半胱胺、谷胱甘肽等可作为亲核剂应用于葡萄籽、松树皮和荔枝PPC的降解反应中,且发现得到的附加产物具有良好的抗氧化、抗肿瘤、免疫调节和神经保护等活性^[7-12]。

木瓜为蔷薇科(Rosaceae)木瓜属(*Chaenomeles*)植物,全世界共有5种,我国全产。作为重要观赏植物和果品,在世

界各地均有栽培。木瓜在我国栽培历史悠久,是常用的中药材品种之一,也是重要的药食同源资源之一^[13]。木瓜中的PC含量较高,且主要以PPC的形式存在,占木瓜PC的90%以上^[14-15]。虽然木瓜PPC含量高,但是其生物利用度低。因此,若能将木瓜PPC有效地降解为OPC,则可为木瓜新型OPC类抗氧化剂的研发提供充足的原料来源。为此,笔者尝试以食品来源的茶多酚为亲核剂对木瓜PPC进行酸催化降解反应,并采用LC-ESI-MS技术分析其降解产物,根据质谱信息对新形成反应产物的化学结构进行推导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 供试木瓜PPC为实验室自光皮木瓜新鲜果实的浓度80%丙酮水提取物经柱层析制备而得;供试茶多酚购自云南省红河唐人生物科技发展有限公司。EYELA N-1100旋转蒸发仪(东京理化器械,日本);Agilent Technologies 1200高效液相色谱仪(美国);BRUKER HCT Esquire 3000液相色谱/质谱联用仪(美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 降解反应和反应产物制备。分别称取木瓜PPC和茶多酚10 mg,充分溶解于10 ml含有10 mmol/L Vc的浓度1% HCl水溶液中,在70℃下反应1 h后冷却并终止反应。反应溶液经Diaion HP-20大孔吸附树脂柱吸附,经30 ml蒸馏水脱酸,再用50 ml甲醇解吸。将解吸液经旋转蒸发仪减压浓缩、干燥后得到的反应产物配制成浓度为1 mg/ml的反应产物甲醇溶液,过滤后供HPLC和LC-ESI-MS分析。

1.2.2 HPLC和LC-ESI-MS条件。HPLC条件为:流动相, A: H₂O/浓度0.34% H₃PO₄; B: CH₃CN/浓度0.34% H₃PO₄; 洗脱梯度 0~15 min (4%~25% B), 15~18 min (25%~90% B), 18~20 min (90%~95% B), 20~24 min (95%

基金项目 云南省教育厅科学研究基金重大专项(ZD2010006)。

作者简介 姜力(1989-),男,安徽蚌埠人,硕士研究生,研究方向:天然产物化学。* 通讯作者,研究员,博士,硕士生导师,从事天然产物化学方面的研究, E-mail: hypzhao@yahoo.com。

收稿日期 2012-07-23

B); 流速 1 ml/min; 柱温 30 °C; 检测波长 280 nm; Agilent Analytical Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 进样量 5 μl。

LC-ESI-MS 条件为: 流动相 A: H₂O/浓度 0.1% HCl, B: CH₃CN/浓度 0.1% HCl; 流速 0.3 ml/min; 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈(50 mm × 4.6 mm, 5 μm); 正负离子扫描(ESI⁺/ESI⁻, m/z 100 ~ 1 500) 毛细管电压 4 kV; 毛细管柱温 400 °C。

2 结果与分析

对木瓜 PPC 原料、茶多酚原料和降解反应产物进行 HPLC 分析比较。从图 1 可以看出, 以茶多酚为亲核剂的木瓜 PPC 降解反应新形成 3 种反应产物 1~3, 它们的紫外吸收光谱与儿茶素类物质极为相似, 推测为茶多酚亲核剂的附加产物。

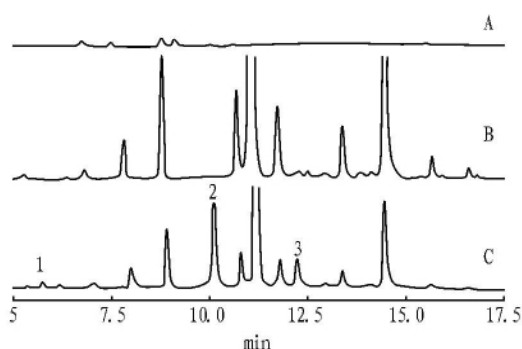
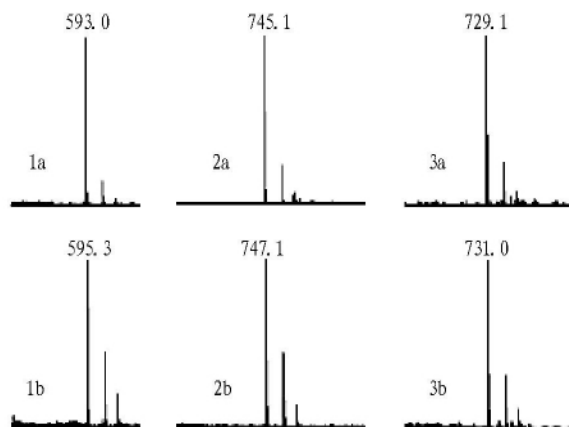


图 1 木瓜原花青素原料(A)、茶多酚原料(B)和降解反应产物(C)的高效液相色谱

对基于茶多酚的木瓜 PPC 降解产物进行了 HPLC-ESI-MS 分析, 新形成的 3 种反应产物 1~3 的质谱图见图 2。从图 2 可以看出, 反应产物 1 的正、负离子准分子离子峰的质量数分别为 m/z 595.3 [M+H]⁺ 和 m/z 593.0 [M-H]⁻, 表明反应产物 1 的分子量为 594; 反应产物 2 的正、负离子准分子离子峰的质量数分别为 m/z 747.1 [M+H]⁺ 和 m/z 745.1 [M-H]⁻, 表明反应产物 2 的分子量为 746; 反应产物 3 的正、负离子准分子离子峰的质量数分别为 m/z 731.0 [M+H]⁺ 和 m/z 729.1 [M-H]⁻, 表明反应产物 3 的分子量为 730。

[M+H]⁺ 和 m/z 729.1 [M-H]⁻, 表明反应产物 3 的分子量为 730。



注: a. 负离子; b. 正离子。

图 2 降解反应产物 1~3 的正负离子准分子离子峰谱图

该研究所使用的茶多酚主要由(-)-表没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(-)-epigallocatechin 3-O-gallate, EGCG]、(-)-表儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(-)-epicatechin 3-O-gallate, ECG]、(+)-儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(+)-catechin 3-O-gallate, CG]、(+)-没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(+)-gallocatechin 3-O-gallate, GCG]、(-)-表儿茶素 [(-)-epicatechin, EC]、(+)-儿茶素 [(+)-catechin, C]、(-)-表没食子儿茶素 [(-)-epigallocatechin, EGC] 和 (+)-没食子儿茶素 [(+)-gallocatechin, GC] 等儿茶素类化合物构成。依据原花青素酸催化降解反应机理, 并结合上述获得的分子量信息, 推测出化合物 1~3 的结构分别为(表)儿茶素-(4-8)-(表)没食子儿茶素 [(epi) catechin-(4-8)-(epi) gallocatechin, 1]、(表)儿茶素-(4-8)-(表)没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(epi) catechin-(4-8)-(epi) gallocatechin 3-O-gallate, 2] 和(表)儿茶素-(4-8)-(表)儿茶素 3-O-没食子酸酯 [(epi) catechin-(4-8)-(epi) catechin 3-O-gallate, 3] (图 3)。它们是由茶多酚中的 EGC/GC、EGCG/GCG、ECG/CG 分别附加在黄烷 3-

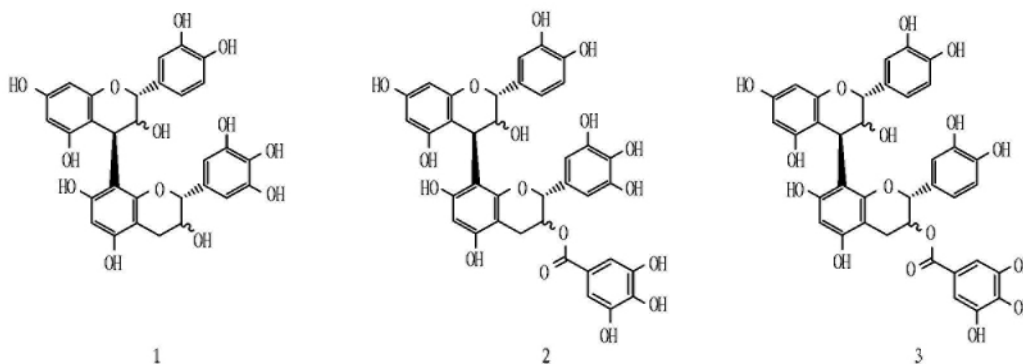


图 3 降解反应产物 1~3 的化学结构

醇延伸单元(表)儿茶素上形成而来。

3 结论

采用 LC-ESI-MS 技术分析了基于茶多酚的木瓜 PPC 酸催化降解产物。通过降解反应, 形成 3 个新的产物。根据分子量信息, 推测它们的化学结构。研究表明, 食品来源的茶

多酚类物质可应用于木瓜多聚原花青素的降解。这为木瓜多聚原花青素降解产物进一步在医药品、保健食品、食品添加剂和化妆品等领域上的应用奠定基础。

(下转第 15099 页)

- [7] 陈健,倪绍祥,李青梅.基于神经网络方法的芦苇叶面积指数遥感反演[J].国土资源遥感 2008 76(2):62-67.
- [8] BOLSTAD P V, GOWER S T. Estimation of leaf area index in fourteen southern Wisconsin forest stand using a portable radiometer[J]. Tree Physiology 1990 7: 115-124.
- [9] DUFRENE E, BREDA N. Estimation of deciduous forest leaf area index using direct and indirect methods[J]. Oecologia 1995 104: 156-162.
- [10] 姚延娟,范闻捷,刘强,等.玉米全生长期叶面积指数收获测量法的改进[J].农业工程学报 2010 26(8):189-194.
- [11] 方秀琴,张万昌.叶面积指数(LAI)的遥感定量方法综述[J].国土资源遥感 2003 57(3):58-62.
- [12] 陈艳华,张万昌,雍斌.基于TM的辐射传输模型反演叶面积指数可行性研究[J].国土资源遥感 2007 72(2):44-49.
- [13] WILSON J W. Inclined point quadrats[J]. New Phytology 1960 59: 1-8.
- [14] GOWER S T, NORMAN J M. Rapid estimation of leaf area index in conifer and broadleaf plantations[J]. Ecology 1991 72: 1896-1900.
- [15] BARTELIN K H. Allometric relationships for biomass and leaf area of beech (*Fagus sylvatica*) [J]. Ann Sci Forest 1997 54: 39-50.
- [16] 王蕾,张宏,哈斯,等.基于冠幅直径和植株高度的灌木地上生物量估测方法研究[J].北京师范大学学报:自然科学版 2004 40(5):700-704.
- [17] BONHOMME E R, VARLET G C, CHARTIER P. The use of photographs for determining the leaf area index of young crops [J]. Photosynthesis, 1974 8: 299-301.
- [18] 李迅.叶面积指数测定方法综述[J].现代园艺 2011(7):8-9.
- [19] 任海,彭少麟,鼎湖山森林群落的几种叶面积指数测定方法的比较[J].生态学报 1997 17(2):220-223.
- [20] 常学向,赵文智,赵爱芬.黑河中游二白杨叶面积指数动态变化及其与耗水量的关系[J].冰川冻土 2006 28(1):85-90.
- [21] 陈厦,桑卫国.暖温带地区3种森林群落叶面积指数和林冠开阔度的季节动态植物[J].植物生态学报 2007 31(3):431-436.
- [22] 吴伟斌,洪添胜,王锡平等.叶面积指数地面测量方法的研究进展[J].华中农业大学学报 2007 26(2):270-275.
- [23] CHASON J W, BALDOCCHI D D, HUSTON M A. A comparison of direct and indirect methods for estimating forest canopy leaf area[J]. Agric For Meteorol 1991 57: 107-128.
- [24] VOES J M, JULLIVAN N H, CLINTON B D et al. Vertical leaf area distribution, light transmittance and application of the Beer Lambert law in four mature hardwood stands in the southern Appalachian [J]. Canadian Journal of Forest Resource 1995 25: 1036-1043.
- [25] CHEN J M, BLACK T A. Measuring leaf area index of plant canopies with branch architecture[J]. Agricultural and Forest Meteorology 1991 57: 1-12.
- [26] DEBLONDE G, PENNER M, ROYER A. Measuring leaf area index with the LI-COR LAI 2000 in pine stands [J]. Ecology 1994 75(5): 1507-1511.
- [27] LANG A R G, XIAN Y Q. Estimation of leaf area index from transmission of direct sunlight in discontinuous canopies [J]. Agricultural and Forest Meteorology 1986 37: 229-243.
- [28] WILHELM W W, RUWE K, SCHLEMMER R. Comparison of three leaf area index meters in a corn canopy [J]. Crop Science 2000 40: 1179-1183.
- [29] 刘立鑫,李凤日.两种测定天然次生林叶面积指数方法的比较[J].森林工程 2009 25(3):43-47.
- [30] LEBLANC S G, FEMANDES R, CHEN J M. Recent advancements in optical field leaf area index, foliage heterogeneity and foliage angular distribution measurements [C]//Proceedings of IGARSS, Ottawa, Ont., Canada: Canada Centre for Remote Sensing, Natural Resources Canada 2002: 24-28.
- [31] CHEN J M, RICH P M, GOWER S T et al. Leaf area index of boreal forests: theory, techniques and measurements [J]. Geophys Res Atmos 1997, 102: 29429-29443.
- [32] 马泽清,刘琪璟,曾慧卿,等.南方人工林叶面积指数的摄影测量[J].生态学报 2008 28(5):1971-1980.
- [33] 蒙继华,吴炳方,李强子.全国农作物叶面积指数遥感估算方法[J].农业工程学报 2007 23(2):160-167.
- [34] ZHU H G, ZHAO J L, WEN Y G et al. Leaf area calculation model of *E. urophylla* and *E. grandis* × *E. urophylla* [J]. Agricultural Science & Technology 2010 11(8):4-6, 9.
- [35] 赵春燕,赵春晓,方子森,等.马铃薯叶面积速测方法的研讨[J].湖南农业科学 2010(13):49-51.

(上接第15096页)

参考文献

- [1] COS P, DE BRUYNE T, HERMANS N et al. Proanthocyanidins in health care: current and new trends [J]. Curr Med Chem 2004 11(10): 1345-1359.
- [2] LOTITO S B, ACTIS-GOZZETTI L, RENART M L et al. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins [J]. Biochem Biophys Res Commun 2000 276(3):945-951.
- [3] 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.
- [4] ERLEJMAN A G, VERSTRAETEN S V, FRAGA C G et al. The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects [J]. Free Radic Res 2004 38(12): 1311-1320.
- [5] 张迪,赵文军,马丽娟,等.原花青素的性质、功能、纯化与应用[J].安徽农学通报 2009 15(1):35-39.
- [6] HEMINGWAY R W. Reactions at the interflavonoid bond of proanthocyanidins [M]//HEMINGWAY R W, KARCHESY J J. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum Press, 1989: 265.
- [7] TORRES J L, LOZANO C, JULIÀ L et al. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins: antioxidant and antiproliferative properties [J]. Bioor Med Chem 2002 10(8): 2497-2509.
- [8] SELGA A, TORRES J L. Efficient preparation of catechin thio conjugates by one step extraction/depolymerization of pine (*Pinus pinaster*) bark procyanidins [J]. J Agric Food Chem 2005 53(20): 7760-7765.
- [9] NONAKA G I, SUN B X, YUAN L et al. Sulfur-containing proanthocyanidin oligomer composition and process for producing the same: USA: 2004/103988 A1 [P]. 2004-05-25.
- [10] MITJANS M, DEL CAMPO J, ABAJO C et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols [J]. J Agric Food Chem 2004 52(24): 7297-7299.
- [11] TORRES J L, LOZANO C, MAHER P. Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity [J]. Phytochemistry 2005 66(17): 2032-2037.
- [12] TOMOBE K, FUJII H, SUN B X et al. Modulation of infection-induced inflammation and locomotive deficit and longevity in senescence-accelerated mice-prone (SAMP8) model by the oligomerized polyphenol oligonol [J]. Biomed Pharmacother 2007 61(7): 427-434.
- [13] 高富,裴盛基,杨立新,等.云南木瓜属 (*Chaenomeles* Lindl.) 植物的民族植物学初步研究[J].安徽农业科学 2011 39(7): 3950-3954.
- [14] GU L W, KELM M A, HAMMERSTONE J F et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption [J]. J Nutri 2004 134(3): 613-617.
- [15] HAMAUZU Y, YASUI H, INNO T et al. Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.) quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits [J]. J Agric Food Chem 2005 53(4): 928-934.
- [16] LIU X, HAN Q, XU J. Ultrasonic extraction of proanthocyanidins from *Litchi chinensis* Sonn. [J]. Medicinal Plant 2010 1(11): 96-99.
- [17] 张华,曾桥.原花青素药用研究进展[J].畜牧与饲料科学 2011 32(2):53-54.
- [18] WANG G J, LI Z H, HUANG H L et al. Antioxidative activity of anthocyanins from northland [J]. Medicinal Plant 2011 2(1): 19-21.
- [19] 李晓静,赵国欣.原花青素的分析方法概述[J].安徽农业科学 2011, 39(1): 125-126.