

凝胶色谱分离高粱外种皮中低聚体原花青素

李莹¹, 张晓攀², 叶汉英¹

(1. 武汉软件工程职业学院环境与生化工程系, 湖北 武汉 430205;

2. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 建立高粱原花青素分离及其组成分析的方法。采用乙醇溶液提取高粱外种皮中原花青素, 通过 ADS-17 大孔树脂初步纯化, 得到高粱原花青素, 进而用 Toyopearl HW-40 凝胶色谱对高粱原花青素分离, 并用紫外光谱分析及高效液相色谱-二极管阵列检测法初步分析鉴定。结果表明: Toyopearl HW-40 凝胶色谱分离得到 A、B、C、D、E、F 六个部分。经过紫外光谱分析初步鉴定出级分 A、C、D、E、F 均为原花青素, B 为黄酮; 经高效液相色谱-二极管阵列检测法分析可知, 级分 C 和 D 分别为原花青素的二聚体 B₁ 和单体儿茶素, 级分 F 为原花青素的低聚体。建立的高粱原花青素的分离分析方法效果良好。

关键词: 高粱外种皮; 原花青素; 凝胶色谱; 高效液相色谱; 分离鉴定

GPC Separation of Procyanidin Oligomers from Sorghum Episperm

LI Ying¹, ZHANG Xiao-pan², YE Han-ying¹

(1. Department of Environmental and Biochemical Engineering, Wuhan Vocational College of Software and Engineering, Wuhan 430205, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A method for the separation and composition analysis of procyanidins from sorghum episperm was established in this study. Sorghum episperm procyanidins (SPCs) were extracted with aqueous ethanol, primarily purified by ADS-17 macroporous resin adsorption, fractionated by Toyopearl HW-40 gel chromatography, and preliminarily identified by UV spectroscopy and HPLC with diode array detection (DAD). Fractions A, B, C, D, E and F were obtained as a result of Toyopearl HW-40 gel chromatographic separation. According to the results of UV spectroscopic analysis, fraction B was flavonoid, and all other fractions were procyanidin. Fractions C, D and F were identified by HPLC-DAD as procyanidin dimer B₁, individual catechin and procyanidin oligomer, respectively. The method allowed good separation and analysis of procyanidins from sorghum episperm.

Key words: sorghum episperm; procyanidins; gel chromatography; high performance liquid chromatography (HPLC); isolation

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0248-04

原花青素(procyanidins, PC)是植物多酚中以儿茶素(和/或)表儿茶素为结构单元聚合而成的黄烷醇类聚合物, 具有极强的清除自由基和抗氧化能力以及较强的药理活性, 如抗癌、抗炎、抗诱变等^[1]。已有研究证明原花青素广泛存在于水果、蔬菜、谷物和中草药中^[2]。我国高粱的栽培面积居世界第5位, 产量居世界第3位, 分布在全国21个省、市、自治区。近年来已有研究发现, 高粱外种皮中原花青素的含量超过5%, 且不同产地和品种高粱中原花青素含量和组成有较大差异。高粱作为食用和饲用时都要经过碾白去掉外种皮(糠), 而碾

白时出糠率为20%左右, 这一富含原花青素资源未被有效利用。

目前原花青素的纯化应用最多的是大孔吸附树脂, 大孔吸附树脂属于功能高分子材料, 是近30余年来发展起来的一类有机高聚物吸附剂, 文献报道常用的大孔树脂有 AB-8^[3-4]、聚酰胺^[5-6]、Amberlite XAD-16^[7]、ADS-17^[8-9]等, 进一步分离通常采用 Sephadex LH-20^[10]和 Toyopearl-HW-40^[11]。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)也是目前比较常用的原花青素分离和分析的方法, 它通常与质谱联用来分析原花

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 武汉市教育局市属高校科学研究项目(2009168)

作者简介: 李莹(1971—), 女, 高级工程师, 学士, 研究方向为农产品加工及活性物质。E-mail: liying200411@163.com

青素, Jan^[12]、Falleh^[13]和 Maarit^[14]等采用正相和反相高效液相以及质谱联用等技术分离鉴定了天然产物中的原花青素。

本研究采用乙醇溶液进行提取, 通过 ADS-17 大孔树脂初步纯化得高粱原花青素(sorghum procyanidins, SPC), 通过 Toyopearl HW-40 凝胶色谱进行分离, 结合紫外光谱分析(ultraviolet spectrophotometry)、HPLC 进行分离鉴定, 为研究高粱原花青素的组成及其分离提供研究方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高粱产于中国东北, 干燥保存。

95% 乙醇、盐酸、偏磷酸、亚硫酸氢钠、甲醇(皆为 AR 级) 国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(HPLC 级) 美国 Fisher 公司; 冰乙酸(HPLC 级) 天津化学试剂有限公司; Toyopearl HW-40(S)凝胶 日本 Tosoh 公司; ADS-17 大孔树脂 天津南开和成科技有限公司。

1.2 仪器与设备

JNMJ6 检验碾米机 浙江台州市粮仪厂; AL204 电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; RE52CS-1 旋转蒸发器 上海亚荣有限公司; BETA2-8LD 真空冷冻干燥机 美国 Christ 公司; BSZ-100 自动部分收集器、HL-2S 恒流泵 上海沪西分析仪器厂; 紫外-可见分光光度计、LC-6A 高效液相色谱仪 日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 SPC 的提取与纯化

一定质量的东北高粱经碾磨过筛后得到高粱外种皮粉末, 提取条件为料液比 1:12(g/mL)、70% 乙醇溶液(体积分数)、80、90min, 然后真空浓缩得到 SPC 提取液^[15]。原花青素纯化采用 ADS-17 大孔树脂柱层析^[7-8], 流动相为 40% 乙醇溶液, 流速为 3mL/min, 最后对接收到的洗脱液进行真空浓缩, 冷冻干燥得到 SPC 粉末。

1.3.2 SPC 凝胶色谱分离

将 0.1g SPC 粉末溶于约 1mL 甲醇, 0.45 μ m 滤膜过滤, 滤液上样至 Toyopearl HW-40 凝胶柱(42cm $\times$ 2cm), 以甲醇为流动相, 洗脱流速为 0.6mL/min, 采用部分收集器收集, 收集时间为 10min/瓶, 洗脱时间保持在 14~15h(约 84~90 管), 最后用甲醇平衡色谱柱。

1.3.3 SPC 的紫外光谱分析

将每管接收液在紫外光谱仪上进行紫外扫描(200~600nm)以确定每管接受液所含物质类型, 并记录每管接受液在 280、350nm 处的吸光度。以管数为横坐标、吸光度为纵坐标作图, 然后根据图形, 合并每个峰并做

出标记。重复以上操作过程, 根据洗脱曲线, 将每个重复操作中相应部分合并、浓缩、冻干, 得到各个级别的冻干粉末。

1.3.4 SPC 的 HPLC 分析

将凝胶色谱分离得到的各级分中吸光度最高峰管接收液通过 0.45 μ m 滤膜过滤, 待进样。HPLC 分析条件: 色谱柱为 Symmetry C₁₈(4.6mm $\times$ 150mm); 进样量: 10 μ L; 扫描范围: 200~600nm。流动相 A 为 0.5% 冰乙酸, B 为乙腈; 流量: 1mL/min, 采用梯度洗脱: 0 $\rightarrow$ 20min, B 液为 5% $\rightarrow$ 15%; 20 $\rightarrow$ 40min, B 液 15% $\rightarrow$ 25%; 40 $\rightarrow$ 45min, B 液 25% $\rightarrow$ 35%; 45 $\rightarrow$ 50min, B 液 35% $\rightarrow$ 50%; 50 $\rightarrow$ 55min, B 液 50% $\rightarrow$ 5%; 55 $\rightarrow$ 60min, B 液 5% $\rightarrow$ 50%。

2 结果与分析

2.1 SPC 的紫外光谱分析与凝胶色谱的分离

大多数黄酮类化合物的紫外吸收由两个主要的吸收峰组成, 其中之一出现在 240~280nm 范围内, 称为带 1, 是由 A 环的苯酰系统引起的; 另一个在 300~400nm 内, 称为带 2, 是由 B 环的肉桂酰系统引起的。原花青素等黄烷醇类多酚的紫外吸收与 4 位为羰基的黄酮明显不同, 主要出现 A 环、B 环中苯环的 B 带吸收, 因此除了 200nm 附近苯环的 E 带吸收外, 在紫外区往往只是以一个单峰的形式出现, 典型的黄烷醇通常在甲醇溶液中的 $\lambda_{\max}$ 均在 280nm 附近。其鞣酸酯类化合物在紫外区的吸收也为一单峰, 在 278nm 左右^[1]。

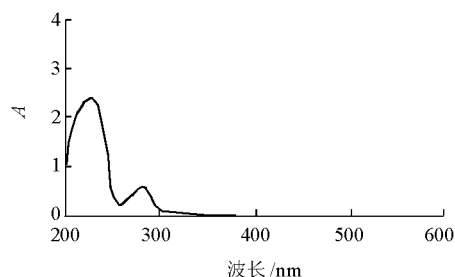


图1 高粱中原花青素的紫外光谱图

Fig.1 UV spectrum of procyanidins from sorghum episperm

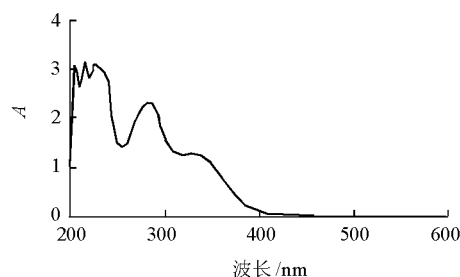


图2 高粱中黄酮的紫外光谱图

Fig.2 UV spectrum of flavonoids from sorghum episperm

图1、2为SPC经凝胶色谱分离后所含原花青素、黄酮部分经紫外检测的特征吸收光谱图。通过其特征光谱图可以初步判断物质类型。部分收集每管在280nm和350nm的吸光度得到的Toyopearl HW-40凝胶色谱图见图3,可知分离后可以分为两个部分——黄酮类物质和SPC混合物。

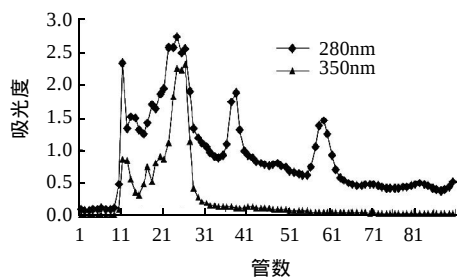


图3 SPC经Toyopearl HW-40凝胶色谱分离后色谱图

Fig.3 SPC chromatograms of procyanidins from sorghum epidermis separated by Toyopearl HW-40

由图3可以看出,在10~32管左右,接收液在350nm波长处有很高的吸光度,即表明接收液中黄酮类物质含量较高。32管之后,接收液在350nm波长处的吸光度趋近于0,而在280nm波长处有吸收,因此可以推断32管以后的接收液中黄酮类物质的含量极少,此时所接收到的洗脱液可初步判断为不同聚合度的原花青素。由图4可以得出,SPC经凝胶色谱分离后可以得到A、B、C、D、E、F六个部分,其中A为平衡柱子后残留的SPC溶液,B疑为黄酮类化合物,C、D、E、F疑为不同聚合度的原花青素。从连续3次结果可以看出,实验有很好的重现性。

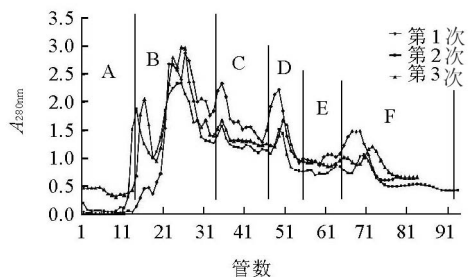
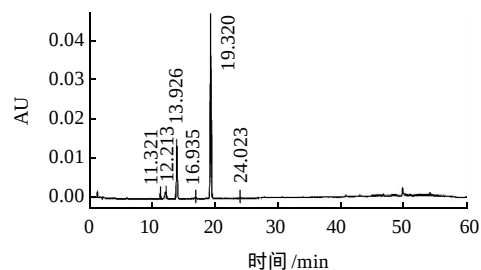


图4 SPC三次Toyopearl HW-40凝胶色谱分离色谱图

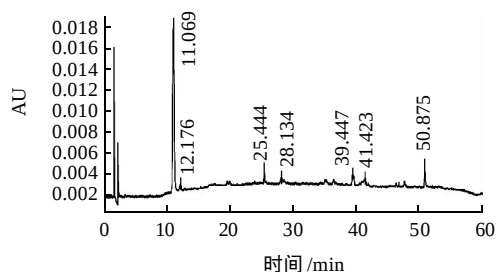
Fig.4 SPC chromatograms of procyanidins from sorghum epidermis separated by triple Toyopearl HW-40 for three consecutive times

2.2 SPC凝胶色谱分离级分的HPLC分析

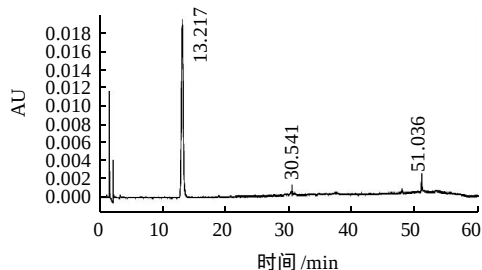
由图5A可知,各成分在图谱上出现的时间顺序依次为B₁、B₃、儿茶素、B₂、表儿茶素、EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯),其保留时间依次为11.321、12.213、13.926、16.935、19.320、24.023min。



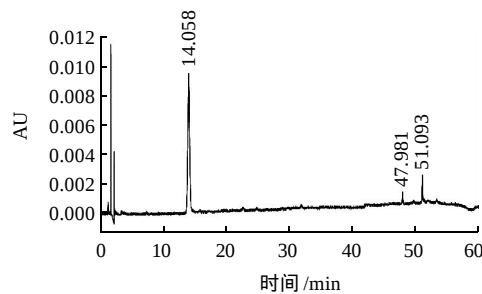
A. SPC标准样品



B. SPC-1



C. SPC-2



D. SPC-3

图5 SPC标准品、SPC-1、SPC-2和SPC-3的HPLC分析图
Fig.5 HPLC chromatograms of SPC standard and fractions C, D and F

将凝胶色谱分离过的C、D、F级分中280nm波长处吸光度最高的峰顶接收液分别命名为SPC-1、SPC-2、SPC-3。分别取C、D、F中吸光度最高的接收液,经过0.45 μm滤膜过滤后进样至HPLC分析,确定经过Toyopearl HW-40凝胶色谱分离后C、D、F物质类型,判断Toyopearl HW-40凝胶色谱对SPC的分离效果。

由图5B可以看出,SPC-1的保留时间为11.069min。

与图 5A 原花青素混合标准样品中 B_1 的保留时间较吻合, 因此可以推断 SPC-1 可能为 B_1 。

由图 5C 可以看出, SPC-2 的保留时间为 13.217min。与图 5A 原花青素混合标准样品中儿茶素的保留时间较吻合, 因此可以推断 SPC-2 可能为儿茶素单体。

由图 5D 可以看出, SPC-3 的保留时间为 14.058min。紫外检测结果显示 SPC-3 的光谱图符合原花青素的特征吸收, 但是与图 5A 中原花青素混合标样所含各物质的保留时间不吻合。因此判断 SPC-3 可能为原花青素的其他聚合体。

通过对 SPC 连续 3 次凝胶色谱分离结果的 HPLC 分析, 发现其结果在保留时间和出峰顺序上都有很好的重复性。因此确定, 通过 Toyopearl HW-40 凝胶色谱分离, SPC 中不同聚合度和分子质量可以很好地进行分离。这为以后对不同分子质量的 SPC 的功能和结构研究提供了一定的研究基础。李春阳等^[16]利用交联葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 将经大孔树脂 HP-2MGL 纯化的葡萄籽花青素粗提物进一步纯化得到 SPC-1 和 SPC-2 两个原花青素级分。通过结果比较可以得出, Toyopearl HW-40 凝胶树脂较其他树脂分离原花青素的效果更好。

3 结 论

本实验结果表明: 以纯甲醇作为流动相, 流速为 0.6mL/min 时, 经 Toyopearl HW-40 凝胶色谱, 高粱原花青素混合物能够得到比较好地分离, 共分为 A、B、C、D、E、F 六个部分; 经过紫外光谱分析和检测, 其中的级分 A、C、D、E、F 均为原花青素, B 为黄酮; 经过 HPLC 分析, 并与原花青素标准样品色谱图比较, 发现级分 C 可能为原花青素的二聚体 B_1 、级分 D 可能为儿茶素单体、级分 F 为原花青素的其他低聚体。

本研究可以提供很好的高粱原花青素的分离分析方法, 为进一步研究原花青素单个组分与功效关系提供参考。

参 考 文 献 :

- [1] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 丁阳平, 董华荣. 原花青素的药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2007, 5(2): 161-163.
- [3] 孙芸, 徐宝才, 谷文英, 等. AB-8 树脂对葡萄籽原花青素按聚合度分离特性的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(6): 60-64.
- [4] 张峻, 吉伟之, 陈晓云, 等. 吸附层析法制备低聚原花青素[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 31-33.
- [5] 樊丽华. 葡萄籽中原花青素提取方法的进一步研究[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2004, 21(1): 102-104.
- [6] 徐德平, 孙芸, 谷文英, 等. 葡萄籽原花青素二聚体的提取分离与结构鉴定[J]. 中草药, 2005, 3(2): 180-182.
- [7] 王文雅, 李军矿, 岳海燕, 等. 3 种大孔吸附树脂对葡萄酒下脚料中原花青素分离性能的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(6): 146-149.
- [8] 崔莹, 朱清华, 杨义听, 等. 树脂法分离纯化苦荞麦壳中原花青素的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(4): 46-50.
- [9] 李涛. 苦荞麦壳中原花青素及其预防龋齿和抗氧化作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [10] 樊金玲, 武涛, 陶冠军. 沙棘籽原花色素寡聚体和多聚体的研究[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1292-1298.
- [11] LIU Liang, XIE Bijun, CAO Shaoqian, et al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1446-1451.
- [12] JAN W, LEA P, MARIE E A, 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]. Journal of Chromatography A, 2001, 926(1): 211-220.
- [13] FALLEH H, OUESLATI S, GUYOT S, et al. LC/ESI-MS/MS characterization of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1732-1738.
- [14] MAARIT K, JYRKI L, VLADIMIT O, et al. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 522(1): 105-112.
- [15] 刘睿, 段玉清, 谢笔均, 等. 高粱外种皮中原花青素的提取工艺及其组分鉴定[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 242-245.
- [16] 李春阳, 张红城, 王乃富, 等. 葡萄籽原花青素的单元结构[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 1070-1077.