

高粱原花青素的 ESI-MS 分析及其低聚体的 RP-HPLC-MS/MS 法分离鉴定

徐丽嫚, 黄曼, 涂世, 陈静, 刘睿*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 以高粱加工后的副产物——高粱外种皮为原料, 采用电子喷雾离子化质谱(electrospray ionization-mass spectroscopy, ESI-MS)对 ADS-17 大孔树脂纯化的高纯度高粱原花青素(sorghum procyanidins, SPC)的组成进行分析, 并通过反相高效液相色谱(reverse phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)-质谱(RP-HPLC-MS/MS)联用对 Toyopearl HW-40 凝胶色谱分离的 SPC-5 级分进行分离鉴定。结果显示: SPC 为低聚体原花青素, 包含有儿茶素/表儿茶素单体、原花青素二~六聚体; SPC-5 由 8 种三聚体和 1 种二聚体组成。

关键词: 高粱原花青素; 凝胶色谱; 电子喷雾离子化质谱(ESI-MS); 反相高效液相色谱-质谱联用(RP-HPLC-ESI-MS/MS); 鉴定

ESI-MS Analysis of Procyanidins from Sorghum Episperm and RP-HPLC-ESI-MS/MS Separation and Identification of Its Oligomers

XU Li-man, HUANG Man, TU Shi, CHEN Jing, LIU Rui*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The composition of high-purity procyanidins purified by ADS-17 macroporous resin chromatography from sorghum episperm as a byproduct of sorghum processing was analyzed by electrospray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS). Fraction SPC-5 separated from the procyanidins by Toyopearl HW-40 resin chromatography was identified by RP-HPLC-ESI-MS/MS. The high-purity procyanidins were found to be procyanidolic oligomers, including catechin/epicatechin monomers, dimers, trimers, tetramers, pentamers and hexamers. SPC-5 consisted of 8 trimers and 1 dimer.

Key words: sorghum procyanidins; gel chromatography; electrospray ionization-mass spectroscopy (ESI-MS); reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy/mass spectroscopy (RP-HPLC-ESI-MS/MS); identification

中图分类号: TS210.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)20-0221-05

原花青素(proanthocyanidins, PC)是植物中广泛存在的一类属于双黄酮衍生物的天然多酚化合物, 这类物质在酸性介质中加热, 可降解和氧化产生红色花青素(cyanidins), 故称为原花青素^[1]。原花青素由不同数量的儿茶素或表儿茶素结合而成, 平均聚合度(degree of polymerization, DP)范围为 2~15, 平均分子质量为 578~>5000u, 最简单的是儿茶素、表儿茶素或儿茶

素与表儿茶素形成的二聚体, 此外还有三聚体、四聚体等直至十聚体。根据聚合度的大小, 通常将二~四聚体称为低聚体(proanthocyanidolic oligomers, OPC), 将五聚体以上的称为高聚体(proanthocyanidolic polymers, PPC)。

随着原花青素与蛋白质、微生物、酶的反应活性及抗氧化、清除自由基等一系列化学反应机理被不断揭

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 华中农业大学优硕博项目/中央高校基本科研业务费专项(201010)

作者简介: 徐丽嫚(1987—), 女, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: 19870906manman@sina.com

* 通信作者: 刘睿(1969—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为功能食品及农副产品深加工。

E-mail: liurui@mail.hzau.edu.cn

示,该类天然产物应用前景逐渐广阔,其中原花青素预防龋齿的作用引起越来越多的关注^[2],但研究还处于起步阶段,现有研究主要是采用提取液(混合物)或简单分级的级分进行,因此原花青素的分离和鉴定成为研究重点。原花青素的分离、纯化方法包括膜过滤或超滤、反渗透、溶剂萃取及色谱法等,其中色谱法是目前采用最多的方法。原花青素的柱色谱分离在色谱填料的选择上主要有 NKA^[3]、ADS-17^[4]、Toyopearl HW-40^[5]、Sephadex LH-20^[6-7]、PVP、HPLC-C₁₈^[4]、硅胶柱及聚酰胺等。原花青素的定性定量分析包括比色法和色谱法,结构表征主要采用 HPLC-MS^[8-10]、圆二色谱(circular dichroism, CD)^[11]、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)^[11-12]等。

我国高粱的栽培面积居世界第 5 位,产量居世界第 3 位,高粱外种皮中富含原花青素,这一富含原花青素资源未被有效利用。本研究拟采用乙醇溶液进行提取,通过 ADS-17 大孔树脂进行纯化获得目标产物高粱原花青素,通过 Toyopearl HW-40 凝胶色谱进行分离,结合质谱(mass spectroscopy, MS)和反相高效液相色谱(reverse phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)-质谱联用(RP-HPLC-MS/MS)对高粱原花青素(sorghum procyanidins, SPC)和凝胶色谱分离的级分进行分离鉴定,为进一步探讨高粱原花青素分子质量大小及其组成与预防龋齿功效的关系建立研究方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高粱产于东北地区,干燥保存。

95% 乙醇、盐酸、偏磷酸、亚硫酸氢钠、甲醇皆为 AR 级;乙腈、冰乙酸皆为 HPLC 级;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

检验碾米机 浙江台州市粮仪厂;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 上海沪西分析仪器厂;1100 液相色谱-质谱联用仪 美国 Agilent 公司;紫外-可见分光光度计 日本 Shimadzu 公司。

1.3 方法

1.3.1 高粱外种皮原花青素的提取^[13]

取一定质量的高粱,用检验碾米机碾磨和过筛(40 目)后,得到高粱外种皮粉末。将粉末置于 1000mL 烧杯中,按照 1:12(m/V)的料液比加入 70% 乙醇溶液、0.1g/100mL 偏磷酸溶液、0.5g/100mL 亚硫酸氢钠溶液,混匀,然后用薄膜封口后,放入 80℃ 的水浴锅中直接

加热 90min,最后经过减压抽滤得到上清液。提取 3 次,将 3 次提取的上清液合并,真空浓缩得到 SPC 提取液。

1.3.2 SPC 提取物的纯化

将预处理好的 ADS-17 大孔树脂装于玻璃层析柱(32cm × 5cm)中,装柱过程中避免气泡产生。加入一定量的 SPC 提取液,先用 10 倍柱床体积的蒸馏水冲洗,直至流出液基本无色,去除水溶性的杂质。然后用 40% 乙醇溶液进行洗脱,从洗出颜色开始接收,至无色停止接收,最后用蒸馏水洗出乙醇。接收洗脱液真空浓缩,冷冻干燥得到 SPC 粉末,并计算得率。

测量 SPC 粉末纯度的方法采用盐酸-正丁醇法(Porter's 方法)^[14]。按下列经验公式计算原花青素纯度。

$$PC \text{ 纯度} / \% = A \div (C \times 0.366 \div 7.2)$$

式中: C 为原花青素质量浓度/(mg/mL); A 为波长 546nm 处的吸光度。

1.3.3 SPC 的 ESI-MS 分析

称取冻干 SPC 粉末 5mg,溶于 5mL 甲醇中,通过 0.45 μm 滤膜过滤。将滤液通过直接进样模式进行 MS 分析。

MS 分析条件:负离子模式,离子化方式为 ESI⁻;扫描范围为 50 ~ 2000 m/z;干燥气温度为 350℃,干燥气流速为 10L/min;喷雾压力为 40psi;毛细管电压为 3500V。

1.3.4 SPC 凝胶色谱分离

称取 0.1g SPC 粉末,溶解于 1mL 甲醇中,经 0.45 μm 滤膜过滤。将滤液上样至 Toyopearl HW-40 凝胶柱(42cm × 2cm)。以甲醇为流动相进行洗脱,流速为 0.8mL/min,并用部分收集器进行收集,每 10min 收集一管,洗脱时间 12h 左右。最后用甲醇平衡色谱柱。每管接收液通过紫外扫描判定其物质类型,并记录每管在 280nm 波长处的吸光度,以管数为横坐标、吸光度为纵坐标作图。根据洗脱曲线,将相应部分合并、浓缩、冻干,得到各个级分的冻干粉末。

1.3.5 SPC-5 级分的 HPLC-MS/MS 分析

称取冻干后凝胶色谱分离的 SPC-5 级分粉末 5mg,溶于 5mL 甲醇中,通过 0.45 μm 滤膜过滤,待进样。

HPLC-MS/MS 分析条件:色谱柱为 Symmetry C₁₈(4.6mm × 150mm);质谱进样分流比为 1:3;进样量为 20 μL;负离子模式,离子化方式为 ESI⁻;扫描范围为 50 ~ 2200 m/z;干燥气温度为 350℃,干燥气流速为 10L/min;喷雾压力为 40psi;毛细管电压为 3000V;PDA 检测波长为 280nm;柱温为 35℃。流动相 A 为 0.5% 冰乙酸、B 为乙腈;流速为 1mL/min;梯度洗脱程序为: B 在 0min 18min 由 6% 增大到 25%, 18min ~ 20min 由 25% 增大

到60%，20min 25min为60%，25min 27min由60%减小到6%，27min 30min为6%。

2 结果与分析

2.1 SPC的提取及纯化

采用乙醇溶液提取高粱外种皮中的原花青素，ADS-17大孔树脂纯化后产物的得率为2.2%，经正丁醇-盐酸法测得纯化后原花青素的纯度为97.4%。

2.2 SPC的MS分析

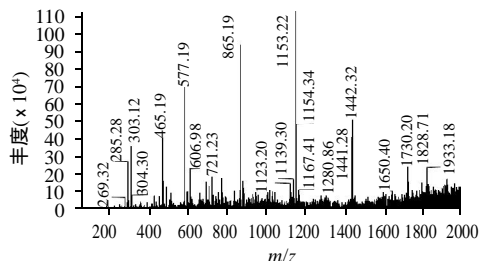


图1 SPC全范围扫描质谱图

Fig.1 Full scan negative ionisation mass spectrum of procyanidins extracted from sorghum epispem

ESI是一种软电离方式，它通常没有碎片离子峰，只有整体的分子离子峰，易于得到样品的分子质量信息。图1显示了含有 m/z 577.19、865.19、1153.22、1441.28、1730.20的分子离子，它们分别对应原花青素的二聚体(相对分子质量:578)、三聚体(相对分子质量:866)、四聚体(相对分子质量:1154)、五聚体(相对分子质量:1442)和六聚体(相对分子质量:1731)的分子离子峰($M-H$)⁻，同时也含有 m/z 285.28，它是由相对分子质量为289的儿茶素或表儿茶素脱去4个H⁺得到的。Jan等^[15]在用反相高效液相色谱及电子喷雾离子化质谱研究巧克力中原花青素时，得到了 m/z 289.3、577.3、865.3、1153.2、1441.2、1729.1等原花青素准分子离子峰。Christian等^[16]也曾证明了高粱中含有原花青素的四~九聚体，与本研究结果相似，因此可以初步判断纯化后SPC成分为二~六聚体的原花青素。

2.3 SPC凝胶色谱分离

由图2可知，部分收集接受每管可以通过紫外扫描初步判断其物质类型。原花青素的特征吸收光谱除了200nm附近苯环的E带吸收外，在紫外区主要以一个单峰的形式出现，其 λ_{max} 在280nm附近；而黄酮类物质除上述特征外，其在350nm左右有个吸收峰。根据图2凝胶色谱分离结果可以将接收溶液分为1、2、3、4、5五个部分，依次标记为SPC-1、SPC-2、SPC-3、SPC-4、SPC-5，通过紫外扫描后可判断出SPC-1为平衡柱子

后残留的溶液，SPC-2疑为黄酮类化合物，SPC-3、SPC-4和SPC-5为凝胶色谱分离SPC的3个原花青素级分。

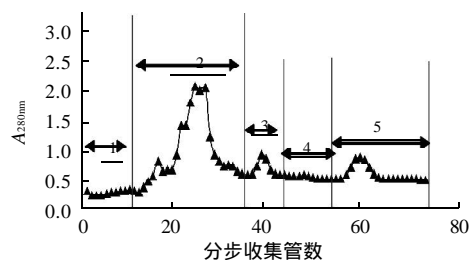


图2 SPC的Toyopearl HW-40凝胶色谱分离图

Fig.2 Chromatogram of SPC on Toyopearl HW-40 resin column

2.4 SPC-5级分的HPLC-MS/MS分析

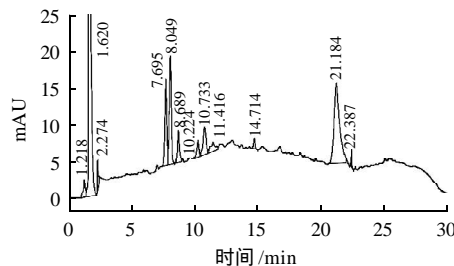
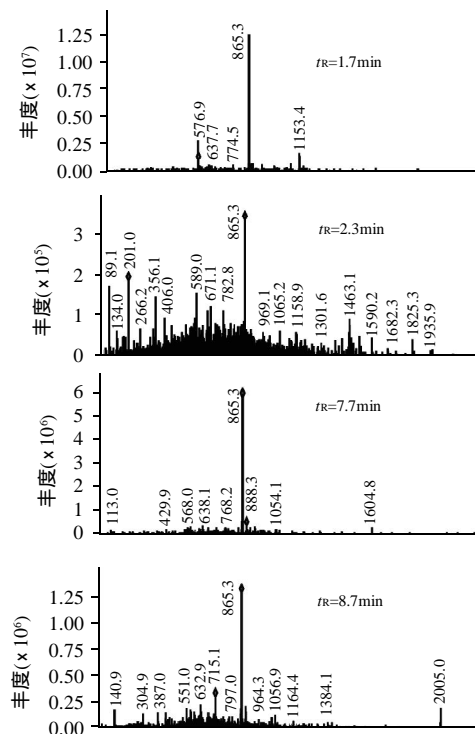
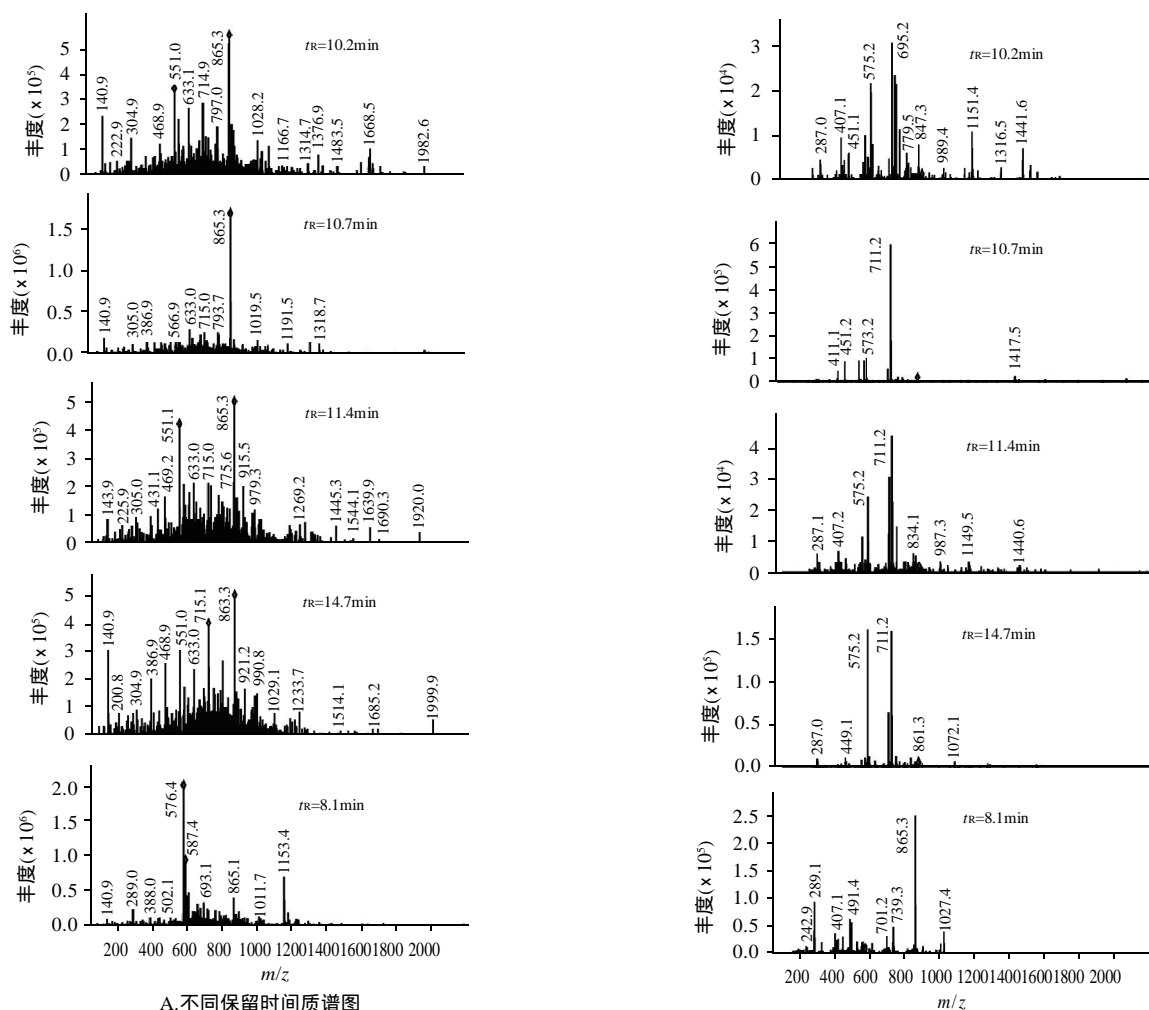


图3 SPC-5的HPLC-MS分析中的色谱图

Fig.3 HPLC-MS chromatogram of SPC-5

从图3可以看出，在所采用的色谱条件梯度洗脱下，SPC-5中的主要物质能够分开。





A.不同保留时间质谱图

B.主要分子离子的二级质谱图

图4 不同保留时间的质谱图(A)及主要分子离子的二级质谱图(B)
Fig.4 Mass and MS-MS spectra at each retention time

从图4可以看出,当保留时间为1.7、2.3、7.7、8.7、10.2、10.7、11.4、14.7min时出现的分子离子均为 m/z 865.2,其主要的碎片离子是 m/z 847.3(M - 18)、739.2(M - 126)、711.2(M - 152-2H)、695.2(M - 152 - 18)、577.2(M - 288)、575.2(M - 288 - 2H)、451.2(M - 288 - 126 - 2H)、407.1(M - 288 - 152 - 18)、289.1(M - 576)、287(M - 577 - 2H)。

由表1可知, m/z 575.2、289.1、287.0均由QM cleavage分子间的断裂产生; m/z 847.3是通过失去一分子水产生的; m/z 2739.2、451.1是通过HRF反应失去一分子间苯三酚得到的; m/z 695.2和 m/z 407.1由RDA反应产生, m/z 695.2为发生RDA反应后失去一分子水产生。此结果与Falleh等^[17]研究松叶菊属的植物中原花青素三聚体碎片离子(m/z 847、695、739、577、425、289)及Karonen等^[10]的研究结果相符合,说明SPC-5主要是原花青素的三聚体,可见在所采用的凝胶色谱分离

条件下,将原花青素三聚体从SPC混合物中有效分离出来。HPLC-MS/MS分析结果显示,所采用的梯度洗脱条件能有效的将原花青素三聚体的8个异构体分离。

表1 原花青素三聚体(m/z 865,即[M - H]⁻)在二级质谱中的主要分子离子

Table 1 Major molecular ions of procyanidin trimer (m/z 865 [M - CH]⁻) in MS-MS spectra

分子离子(m/z)	裂解途径	得到方式
847.3	[M - H ₂ O - H] ⁻	失去水
739.2	[M - C ₆ H ₆ O ₃ - H] ⁻	失去间苯三酚
711.2	[M - C ₈ H ₆ O ₃ - 2H - H] ⁻	发生逆-狄尔斯-阿尔德反应 (the retro-Diels-Alder reaction RDA)
695.2	[M - C ₈ H ₆ O ₃ - H ₂ O - H] ⁻	发生RDA反应后失去水
577.2	[M - C ₁₅ H ₁₂ O ₆ - H] ⁻	分子间断裂(1个单位)
575.2	[M - C ₁₅ H ₁₂ O ₆ - 2H - H] ⁻	分子间断裂(1个单位)
451.1	[M - C ₁₅ H ₁₂ O ₆ - C ₆ H ₆ O ₃ - H] ⁻	分子间断裂再失去间苯三酚
407.1	[M - C ₁₅ H ₁₂ O ₆ - C ₆ H ₆ O ₃ - H ₂ O - H] ⁻	分子间断裂后发生RDA反应再失去水
289.1	[M - C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂ - H] ⁻	分子间断裂(2个单位)
287	[M - C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂ - 2H - H] ⁻	分子间断裂(2个单位)

此外,图4中保留时间为8.1min的MS中的分子离子 m/z 576.4为原花青素二聚体以及MS/MS中的主要碎片离子 m/z 407.1(M - 152 - 18)、289.1(M - 288)。其中 m/z 407.1是通过HRF反应失去一分子间苯三酚,进一步脱水形成, m/z 289.1是通过分子间裂解得到的。Karonen等^[10]曾研究得出松树皮中原花青素二聚体的碎片离子为 m/z 286.9、289.0、407.2、425.2、451.0,樊金玲等^[18]研究沙棘籽原花色素发现二聚体的主要碎片离子为 m/z 425、407、287、289、451、441、423等,研究的结果皆与本研究得到的结果相似,证实SPC-5中的1种二聚体被分开。

3 结论

3.1 采用乙醇溶液提取高粱外种皮中的原花青素,ADS-17大孔树脂纯化后产物的得率为2.2%,经正丁醇-盐酸法测得纯化后原花青素的纯度为97.4%。

3.2 通过MS分析SPC含有儿茶素/表儿茶素单体、原花青素二~六聚体。说明通过ADS-17大孔树脂纯化的目标产物是由聚合度小于6的低聚体组成。证明高粱外种皮可以作为制备高活性低聚原花青素的原料,不仅提高了高粱的经济价值,同时也可以得到大量原花青素广泛用于医疗、食品以及日用化学品行业,也为后期原花青素结构与功效的研究提供理论依据。

3.3 通过Toyopearl HW-40凝胶色谱,纯甲醇作为流动相,流速为0.8mL/min时,SPC混合物能够得到很好的分离,被分为SPC-1、SPC-2、SPC-3、SPC-4、SPC-5五个部分。HPLC-MS/MS分析结果显示SPC-5主要是

由8种原花青素三聚体和1种二聚体组成,且级分中的不同异构体得到分离。这为进一步研究原花青素分子质量大小及组成与预防龋齿效果的关系提供参考。

参考文献:

- 王辉宪,姜晖霞,王仁才,等. 葡萄子油及原花青素研究与开发利用[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 542-547.
- XU Liman, LIU Rui, LI Duandan, et al. An in vitro study on the dental caries preventing effect of oligomeric procyanidins in sorghum epispem[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 911-916.
- 韩泽梅,李晓波,张玉平,等. 树莓种子原花青素的提取分离工艺研究[J]. 天然产物研究与利用, 2006, 18(1): 108-111.
- 石翠芳. 沙枣果肉原花青素的分离、鉴定与抗氧化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- STREK M, GORLACH S, PODSEDEK A, et al. Procyanidin oligomers from Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) fruit inhibit activity of mmp-2 and mmp-9 metalloproteinases[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6447-6452.
- WEI Shudong, ZHOU Haichao, LIN Yiming. Antioxidant activities of fractions of polymeric procyanidins from stem bark of *Acacia confusa*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(2): 1146-1160.
- WALLACE T C, GIUSTI M M. Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(8): 690-696.
- 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]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(2): 490-496.
- FULCRAND H, REMY S, SOUGUET J M, et al. Study of wine tannin oligomers by online liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(3): 1023-1026.
- KARONEN M, LOPONEN J. 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.
- 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.
- GABETTA B, FUZZATI N, GNIFFINI A, et al. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds[J]. Fitoterapia, 2000, 71(2): 162-175.
- 刘睿,段玉清,谢笔钧. 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.
- PROTOR L J, HRSTICH L N, CHAN B G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin[J]. Phytochemistry, 1986, 25(1): 223-230.
- 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.
- CHRISTIAN G K, MARTHA M V, JESS D R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench][J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(3): 538-543.
- FALLEH H, OUESLATI S, GUYOT S, et al. LC/ESI-MS/MS characterization of procyanidins and propylarganidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L.[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1732-1738.
- 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.