

高效液相色谱二极管阵列检测法分析 原花青素降解产物及副产物

张亮亮 林益明*

(厦门大学生命科学学院生物学系, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 利用高效液相色谱二极管阵列检测法 (HPLC/DAD) 研究了不同含水量、不同样品浓度及不同反应时间对原花青素降解 (正丁醇/HCl 法) 产物花青定及反应副产物的影响。木榄花样品经 70% 丙酮溶液提取, 利用 Sephadex LH20 柱纯化后得到原花青素样品。配制不同含水量和不同样品浓度的反应溶液, 充分震荡后进行正丁醇/HCl 法降解。用 HPLC/DAD 分析不同实验条件下得到的反应产物及副产物。结果表明, 反应体系在含水量 9% ~ 13% 的条件下, 转化产物随着反应体系含水量的增加, 花青定的转化率也随之增加, 副产物的转化率却随之减少, 总转化率 (即花青定加上副产物的总转化量) 呈增加趋势; 在反应体系含水量大于 13% 时, 随含水量的增加, 转化产物含量呈现下降的趋势; 增加反应体系中样品含量并没有明显增加转化产物的转化率, 副产物的转化率相对稳定; 不同反应时间处理得到的转化产物经 HPLC/DAD 分析并未发现转化产物花青定和副产物表现出明显的变化规律, 总转化率相对稳定。

关键词 高效液相色谱二极管阵列检测法, 原花青素, 正丁醇/HCl 法, 缩合单宁

1 引言

原花青素 (Proanthocyanidin, PA) 是一类由黄烷-3-醇结构单元 (图 1) 通过 4y-8(或 4y-6)C-C 键缩合而形成的寡聚或多聚物, 其在热的醇酸溶液中能酸解生成花色素 (anthocyanidin)^[1]。原花青素具有多种生理活性^[2], 在医药上止血愈伤, 抑菌抗过敏, 尤其具有抗氧化、抗癌变、防止心脑血管疾病的功效, 成为近年来植物多酚类研究的热点之一。

植物样品中原花青素含量及结构的检测分析方法较多。传统的 Folin-Ciocalteu (FC) 法只能测定总酚类物质; 纸层析 (PC)、薄层层析 (TLC) 在分离效果、速度、定量准确度方面存在缺陷。核磁共振 (NMR) 和质谱 (MS) 技术已被应用于原花青素结构的分析鉴定^[3,4]。但 NMR 和 MALDI/TOF MS 只能对原花青素的结构进行测定, 尚无法



图 1 原花青素的基本结构单元

Fig 1 Structure unit of proanthocyanidin

对其含量进行准确测定。正丁醇/HCl 法是目前采用较广的测定原花青素含量的方法。但该方法仍然存在不足^[5]: 植物样品中的原花青素并未完全转化为花青素, 且生成的花青素的颜色取决于转化产物花青素的结构和尚未完全转化的原花青素的聚合物的共同作用; 该反应往往伴随着副反应, 且副反应同样会有红棕色的聚合物产生。这些都显著影响了正丁醇/HCl 法在测定原花青素含量方面的准确性和适用范围。研究发现, 该方法受反应副产物影响较大, 且至今未见关于该方法中反应副产物的报道。高效液相色谱 (HPLC) 配备二极管阵列检测器 (DAD) 技术, 具有易操作、灵敏度高和稳定性好等特点, 可以快速、准确地对花色素及其配糖基衍生物进行定性和定量分析^[6]。HPLC/DAD 法是研究原花青素的转化产物及其转化机制的准确便捷方法。本研究用 HPLC/DAD 法分析了原花青素降解 (正丁醇/HCl 法) 产物花青定及副产物的变化规律, 并采用 LC/MS 对该副产物进一步定性、确定其相对分子质量。

2007211227 收稿; 2008204210 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 40376026, 30671646) 和教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET20720725) 资助

* E-mail: linyim@xmu.edu.cn

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 Series 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Esquire 23000 电喷雾离子阱质谱仪 (德国布鲁克道尔顿仪器公司), 检验范围至 m/z 6 000 旋转蒸发仪 (上海申生); 冷冻干燥机 (北京德天佑)。氯化氰定 (Cyanidin chloride) 对照品由本实验室分离制备得到; 三氟乙酸 (TFA, 色谱纯)、盐酸 (分析纯)、乙腈 (色谱纯)、正丁醇 (分析纯), 水为 MilliQ 高纯水。

2.2 色谱质谱条件

色谱条件: Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm @ 4.6 mm, 5 Lm); 流动相: A 为乙腈 (0.05% TFA)、B 为水 (0.05% TFA); 流速: 1 mL/min; 梯度设置: 0~6 min, 15% A; 6~20 min, 15%~22% A; 20~35 min, 22%~30% A; 35~60 min, 30%~48% A; 60~75 min, 48%~100% A。检测: DAD, 280, 512, 524 和 530 nm。进样量: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 电喷雾 (ESI) 正离子电离模式。干燥气 (N_2) 温度 325 $^{\circ}$ C, 雾化气 (N_2) 压力 48.23 kPa, 干燥气 (N_2) 流量 4.00 L/min, 电喷雾电压 4 kV, 毛细管温度 270 $^{\circ}$ C, 扫描范围 m/z 100~600, 质谱分析结果借助仪器附带的 BRUKER DataAnalysis 软件进行处理。

2.3 样品前处理

2.3.1 不同含水量实验 木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 花采自福建九龙江口红树林自然保护区。原花青素样品制备方法见文献 [6]。取 10 mL 试管 5 支, 将原花青素样品分别配制成每管样品含量为 0.1 mg。反应体系含水量依次为 5%、10%、15%、20% 及 22%, 补加正丁醇/HCl (95/5) 溶液使总反应体积为 7 mL, 各梯度均做 3 组重复^[7]。将配好的溶液放入 100 $^{\circ}$ C 水浴中反应 45 min。将反应后的溶液加水充分萃取洗去溶液中的 HCl, 于 40 $^{\circ}$ C 减压浓缩蒸干样品, 用 15% 的乙腈水溶液溶解制样, 经 0.22 μ m 有机膜过滤后即可上样分析。

2.3.2 不同样品浓度实验 取 10 mL 试管 6 支, 分别配置成含水量 20%, 每管含原花青素样品量依次为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 和 1.6 mg。补加正丁醇/HCl (95/5) 溶液使反应总体积为 7 mL, 按照 2.3.1 所述方法进行反应和样品处理。

2.3.3 不同反应时间实验 取 10 mL 试管 7 支, 分别配置成含水量 20%, 每管含原花青素样品 0.1 mg。补加正丁醇/HCl (95/5) 溶液使总体积为 7 mL 的反应溶液。将配好的溶液放入 100 $^{\circ}$ C 水浴中依次反应 15, 30, 45, 60, 75, 90 及 120 min。反应产物按照 2.3.1 所述方法进行样品处理后上样分析。

3 结果与讨论

3.1 降解产物 HPLC 图谱分析

木榄花原花青素结构单元组成主要为儿茶素/表儿茶素 (C/EC)^[7], 经对照品分析确定其降解产物主要为花青定。早在 1959 年 Roux 和 Bill^[8] 用异丙醇/HCl (5/1) 降解无色花色素 (leucoanthocyanidin) 时, 就发现了在反应体系含水量较低的情况下, 转化产物中除发现少量的花色素以外, 还发现一种含量很高的副产物, 并认为该副产物的结构与花色素的结构相比只是在杂环的 C23 (或 C24) 上有差别, 即在 C23 (或 C24) 上接了其它基团的花色素衍生物, 并认为其中 C23 取代基团应为异丙基。本实验用 HPLC-DAD 检测分析木榄花原花青素转化产物发现, 当在反应体系含水量很低 (5% 的含水量) 的情况下, 530 nm 检测波长下分别在 22.3 和 44.1 min 处检测到两个吸收峰 (图 2), 经对照品及文献 [7] 分析确定 A 峰为花青定。实验发现 B 峰变化规律与文献 [8] 报道的副产物变化规律一致。由光谱图对照可以看出, 转化产物花青定 (A) 和副产物 (B) 全波长吸收情况一致 (图 3)。

3.2 反应产物及副产物的 HPLC-DAD 分析

由 HPLC-DAD 谱图分析 (280 nm 检测) 可以看出, 在反应体系含水量 5%~15% 的条件下, 转化产物随着反应体系含水量的增加, 花青定的转化率也随之增加, 副产物的转化率却随之减少, 总转化率 (即花青定加上副产物的总转化量) 呈增加趋势; 当反应体系含水量大于 15% 时, 随含水量的增加, 转化

产物含量呈现下降的趋势(图 4a); 样品含量的增加, 同时会增加转化产物的绝对生成量, 而转化产物花青定和副产物的相对生成量(即转化率)并未表现出明显的增加趋势(图 4b), 而是表现出在一定范围内的上下波动, 表明增加反应体系中样品含量并未明显增加转化产物的转化率, 且副产物的转化率相对稳定; 经不同反应时间处理实验得到的转化产物经 HPLC/DAD 检测分析并未发现转化产物花青定和副产物表现出明显的变化规律, 总转化率相对稳定(图 4c), 其原因可能是由于长时间加热反而使生成的花青定受热分解。这与 Andersen 报道的花青定对温度很敏感, 长时间的加热会使花青定褪色, 生成了无色的查尔酮式结构这一描述相一致^[9]。也有人认为花青定分解的最高温度约 110 e, 建议在花青定的生产加工过程中, 温度应低于 60 e。

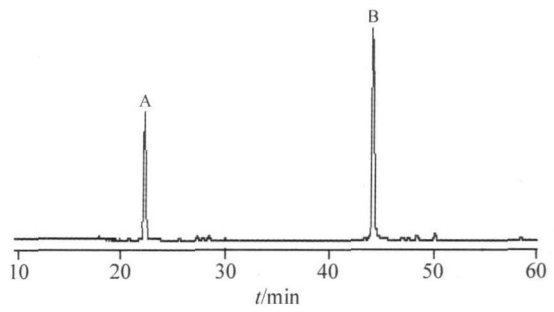


图 2 木榄花原花青素转化产物的 HPLC 谱图分析 (530 nm 紫外检测)

Fig 2 HPLC chromatogram of anthocyanidin from *B. gymnorhiza* (detected at 530 nm)

A 花青定 (cyanidin), B 副产物 (side products).

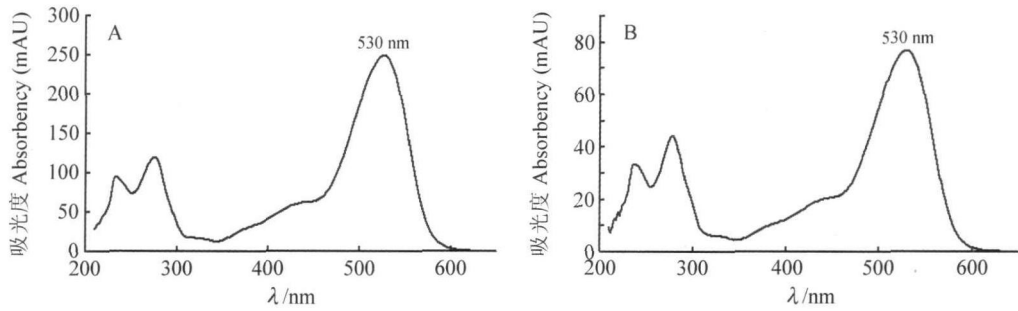


图 3 转化产物花青定(A)和副产物(B)的光谱图

Fig 3 Spectrum corresponding to cyanidin (A) and side products (B)

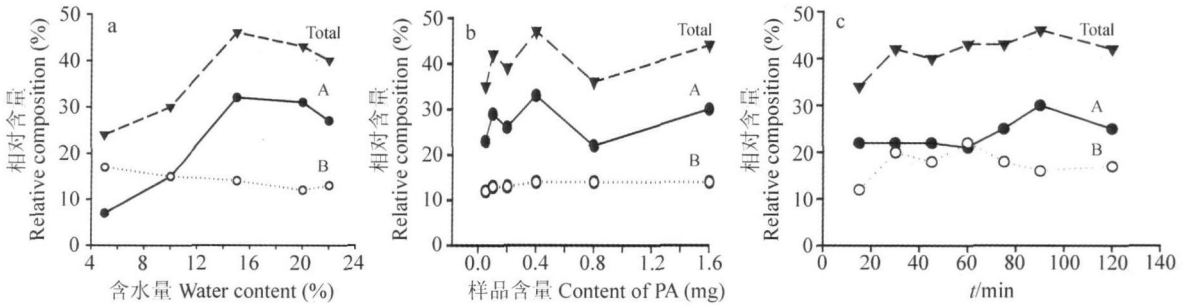


图 4 含水量 (a)、样品含量 (b) 和反应时间 (c) 对反应产物 (A) 及副产物 (B) 的影响

Fig 4 Effect of water content (a), proanthocyanidin content (b) and reaction time (c) on the yield of cyanidin (A) and side products (B)

实验同时用传统的紫外分光光度法^[10]对木榄花的原花青素降解(正丁醇/HCl法)产物紫外吸光值变化规律进行了对比研究。紫外分光光度法实验结果与本实验采用的 HPLC/DAD 检测分析得出的原花青素转化率变化规律并不一致。分析其原因是转化产物的紫外吸光值受转化产物花青定的影响较大, 而受副产物的影响并不明显。这也是人们尚未注意到原花青素降解产物中副产物的原因之一。因此以传统的紫外分光光度法来讨论植物中原花青素的转化率及含量显然是值得

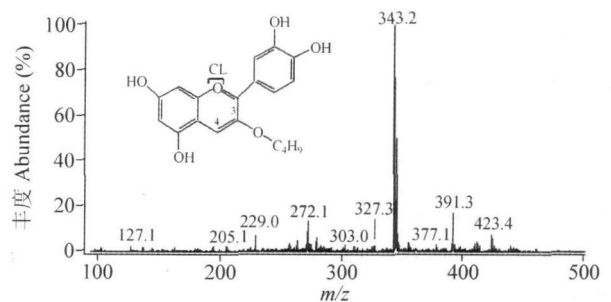


图 5 副产物的质谱图

Fig 5 MS spectra of side product

商榷的。经过反复实验发现较低的含水量能够促进副产物的产生,而随着反应体系含水量的增加,副产物在转化产物中所占的比例也越来越小,这与 Roux 等^[8]发现的规律相一致。

3.3 LCMS 分析结果

为了对该副产物进一步定性,确定其相对分子质量,采用 LCMS 进行了分析。实验在 ESI 的正离子模式下得到了强的 MS 信号,其正离子 $[M]^+$ 为 343.2 (图 5)。结合文献 [8-9] 进一步确定该化合物结构式中 C23 取代基团为异丁基。可以判断该取代基团应为反应体系中正丁醇溶剂所引入的。结果表明, HPLC-DAD 可准确分析测定原花青素降解产物类型及转化率。

References

- 1 Shi Bi (石碧), Di Ying (狄莹). Plant Polyphenols (植物多酚). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2000: 5
- 2 Zdunczyk Z, Frejzagel S, Wroblewska M, Juszkiewicz J, Osznianski J, Estrella I. Food Res. Inter., 2002, 35: 183~186
- 3 EsSafi N E, Guyot S, Ducrot P H. J. Agric. Food Chem., 2006, 54: 6969~6977
- 4 Fan Jinling (樊金玲), Ding Xiaoling (丁霄霖), Tao Guanjun (陶冠军). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2006, 34(2): 251~254
- 5 Scalbert A. Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance (Hemingway R W, Laks P E, eds). New York: Plenum Press, 1992: 259~280
- 6 van de Castele K, Geiger H, de Loose R, van Sumere C F. J. Chromatogr., 1983, 259: 291~300
- 7 Xiang Ping (向平), Lin Yiming (林益明), Lin Peng (林鹏), Xiang Cheng (向成). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2006, 34(7): 1019~1022
- 8 Roux D G, Bill M C. Nature, 1959, 183: 42
- 9 Andersen Y M. Chemical Studies of Anthocyanins in Plants: Isolation, Qualitative and Quantitative Determination. Department of Chemistry, University of Bergen, 1988
- 10 Porter L J, Hrstich L N, Chan B G. Phytochemistry, 1986, 25: 223~230

Analysis of Products of Degradation and Side Reactions of Proanthocyanidin by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection

ZHANG Liangliang, LIN Yiming*

(Key Lab of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The effect of different water content, sample concentration and reaction time on anthocyanidin from degradation of proanthocyanidin and side products was studied by high performance liquid chromatography diode array detector (HPLC-DAD). Proanthocyanidin was extracted from calyces of *Bruguiera gymnorhiza* by 70% acetone solvent, purified by Sephadex LH20 column chromatography and was prepared to reaction solvents with different water content and sample concentration, then was analyzed with the butanol/HCl method. In addition, the products and side products were characterized by HPLC-DAD. The yield of anthocyanidin was increased with the increasing the water content (from 5% to 15%) of reaction solvents, but the yield of side products was declined. When the water content was above 15%, the yield of anthocyanidin and side products was decreased with the increasing the water content. However, there is no great effect of sample concentration and reaction time on the yield of anthocyanidin and side products. HPLC-DAD is a powerful method for the analysis of the content and structure unit of proanthocyanidin.

Keywords High performance liquid chromatography-diode array detection, proanthocyanidin, butanol/hydrochloric acid, condensed tannins

(Received 27 November 2007; accepted 10 April 2008)