

反相高效液相色谱-电喷雾质谱法鉴定葡萄籽低聚原花青素

任其龙 魏冠红 金米聪 苏宝根 黄 梅

(浙江大学二次资源化工国家专业实验室,杭州,310027)

摘 要 建立了采用 LC-ESI-MS 对葡萄籽提取物中的多种低聚原花青素进行分析鉴定的方法。原花青素用体积分数 60% 乙醇水溶液从葡萄籽中提取并用聚酰胺柱层析精制后,以乙腈-1% 醋酸水溶液为流动相在 ZORBAX SB-C₁₈ 柱上进行梯度洗脱分离,在电喷雾电离负离子模式下采用选择离子监测模式 (SIM) 将几种低聚体进行了选择性的分离。结果所检葡萄籽提取物中共含有 (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素和 (-)-表儿茶素没食子酸酯 3 种单体、8 种非酯型和 4 种没食子酸酯型共 12 种二聚体及 4 种非酯型三聚体等。建立的方法可以较好地解决葡萄籽中各种低聚原花青素的定性检测,了解提取物中原花青素的成分。同时文中还对原花青素二聚体的质谱碎裂途径进行了讨论。

关键词 原花青素,反相高效液相色谱,电喷雾质谱,葡萄籽

原花青素 (Proanthocyanidin, 简称 PC) 也称缩合单宁,是一类由黄烷-3-醇缩合而成的聚多酚类极性化合物,由于其具有显著的抗氧化活性和抗肿瘤、抗突变等功能,在医药、食品、保健品和化妆品领域具有广泛的用途^[1]。

葡萄籽原花青素主要由黄烷醇中的单体 (+)-儿茶素 [(+)-catechin, C]、(-)-表儿茶素 [(-)-epi-catechin, EC] 和 (-)-表儿茶素没食子酸酯 [(-)-epi-catechin-3-O-gallate, ECG] 聚合而成,其最高平均聚合度达十五聚体^[2]。通常将二~四聚体称为低聚体 (简称 OPC),将五聚体以上的称为高聚体 (简称 PPC)^[3],各聚合体中二聚体抗氧化活性最高,三聚体,单体次之^[4]。PC 各单元间连接主要由 C₄→C₆ 和 C₄→C₈ 2 种方式,由于单体的构象或键合位置的不同,可有多种异构体,且各聚合体和同聚异构体之间极性相近,因此原花青素的分离分析和结构表征非常困难。目前其分离主要局限于 sephadex LH-20^[5]、G25^[6]、聚酰胺柱层析^[7]、薄层层析 (TLC)^[8],最常用的是正相 HPLC^[9]。但这些方法并不能将各异构体分离,且往往产生不可逆吸附或者耗费较长时间。而反相-HPLC 能分离单体及二、三聚体的某些异构体^[10],但是各成分的定性需要相应的对照品鉴定,且由于异构体繁多复杂,一般液相很难分开,得到的异构体仅有限的几种。电喷雾质谱 (ESI-MS) 可以提供化合物的结构信息,可与液相色谱联用,作为一种软电离技术,可以根据产生的准分子离子直接定性。目前国内对原花青素研究主要集中在生理活性和生产

开发上,对低聚体的化学组成和分离较少,孙芸等人^[11]曾用反相高效液相色谱-质谱联用分离得到 3 个单体,7 个二聚体和 3 个三聚体。本文欲采用反相高效液相色谱-电喷雾质谱法 (RP-HPLC 与 ESI-MS) 联用,分离得到更多的异构体,明确低聚体的化学组成。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1100 series LC/MSD Trap SL 型高效液相色谱-质谱联用仪,包括四元泵、在线真空脱气机、DAD 检测器、柱温箱、自动进样器和 ESI 源 (美国 Agilent 公司);标样, (+)-儿茶素 (99%, 化学对照品, TOKYO KASEI); (-)-表儿茶素 (99%, 中国药品生物制品检定所), 分别用无水甲醇溶解制成标准溶液;聚酰胺 (AR, 100~200 目, 浙江台州市路桥四青生化材料厂);丙酮、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、石油醚均为分析纯,乙腈、冰醋酸为 HPLC 级 (Merck 公司);实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

1.2 试样制备

50 g 干葡萄籽粉碎过筛后用 150 mL 石油醚脱脂 48 h, 风干后用体积分数 60% 乙醇 30℃ 下提取 3 次, 过滤, 合并滤液, 减压蒸馏, 浓缩液分别用 5 倍体积乙醇沉淀, 3 倍体积乙酸乙酯萃取, 萃取相浓缩后用蒸馏水重新溶解过聚酰胺柱, 依次用不同浓度丙酮洗脱, 收集体积分数 40% 丙酮洗脱组分 F 后浓缩得纯度为 92.3% 的原花青素, 用乙酸乙酯溶解, 4 倍体积石油醚沉淀 2 次, 干燥后得纯度为 98.1% 的原花青素, 用无水甲醇溶解, 过 0.45 μm 膜过滤后用 RP-HPLC/ESI-MS 分析。

第一作者: 博士, 教授。

收稿日期: 2005-11-11, 改回日期: 2006-01-21

1.3 色谱及质谱条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈柱 (2.1 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙腈, B: 质量分数 1% 冰醋酸水溶液; 梯度洗脱: 0~8 min, 5% A, 8~15 min, 5% A→20% A, 15~30 min, 20% A→50% A, 30~40 min, 50% A→70% A, 40~45 min, 100% A; 柱温 35℃, 流速 0.2 mL/min, 进样量 10 μL, 检测波长 280 nm。

1.3.2 质谱条件

离子源: ESI(-); 扫描范围 (m/z): 50~1 500; 雾化气温度: 350℃; 雾化气流速: 9.0 L/min; 雾化气压力: 35.0 psi; 毛细管电压: 4 000 V; 锥孔电压: -40.0 V; 毛细管出口电压: -135 V。

2 结果与讨论

葡萄籽原花青素各低聚体分子质量和负离子模式下形成的准分子离子 [M-H]⁻ 质荷比 m/z 分别如下表所示。

表 1 原花青素各单体和聚合物分子量和质荷比¹⁾

PC	C	EC	ECG	PC ₂	PC ₂ G	PC ₂ G ₂	PC ₃	PC ₃ G
相对分子质量	290	290	442	578	730	882	866	1 018
[M-H] ⁻ (m/z)	289	289	441	577	729	881	865	1 017

1) C、EC、ECG、PC₂、PC₂G、PC₂G₂、PC₃、PC₃G 分别为 (+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、(-)-表儿茶素没食子酸酯、二聚体、二聚单酯、二聚二酯、三聚体、三聚单酯。

由于受到葡萄籽提取物中杂质的干扰, 且原花青素各成分极性相近, 单独采用液相色谱仅能分离 3 种单体和少数几种二、三聚体。图 1 是葡萄籽提取物在紫外 280 nm 检测时的色谱图, 可以看到一个大包峰, 其中包含多种成分, 除原花青素外, 还含有酚酸、黄酮、黄烷酮等物质。而采用 ESI-MS 的选择离子监测模式 (SIM) 则能将几种低聚体进行选择性的分离检测, 图 2(a) 是葡萄籽提取物的 3 种单体 C、EC、ECG (m/z 289, 441) 的选择离子色谱图, 3 个色谱峰 M₁、M₂、M₃ 的保留时间分别为 17.0、21.1、24.2 min。其中峰 M₁、M₂ (m/z = 289.0) 应为 (+)-儿茶素或 (-)-表儿茶素, 其对应的 ESI 质谱图 2(b, c) 显示两者的质谱信息相似, 除 m/z 289.0 的准分子离子 [M-H]⁻ 外, 均有 m/z 579 的偶合离子 [2M-H]⁻。对照标样 (+)-儿茶素和 (-)-表儿茶素的保留时间和质谱碎片离子信息, 可以确定 M₁ 为 (+)-儿茶素, M₂ 为 (-)-表儿茶素。峰 M₃ 如图 2(d) 推测为 (-)-表儿茶素没食子酸酯, 因为葡萄籽中原花青素除 ECG

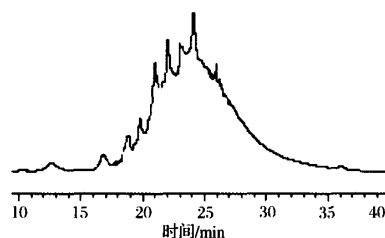
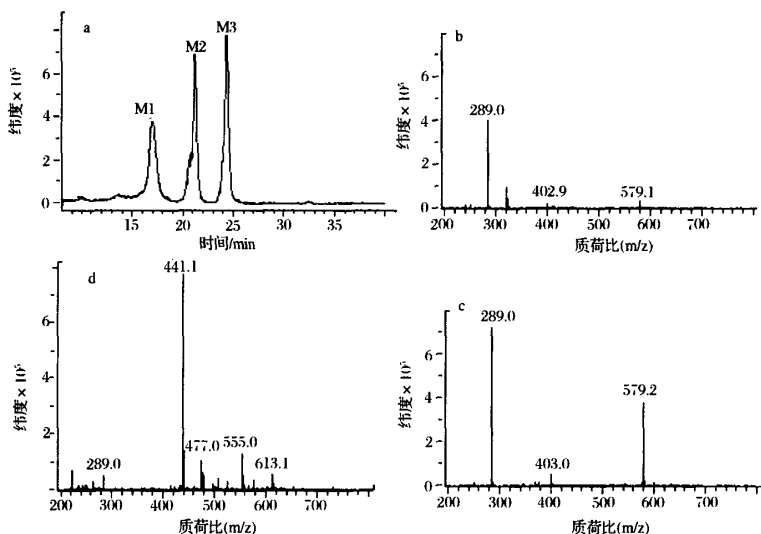


图 1 葡萄籽提取物 UV 图



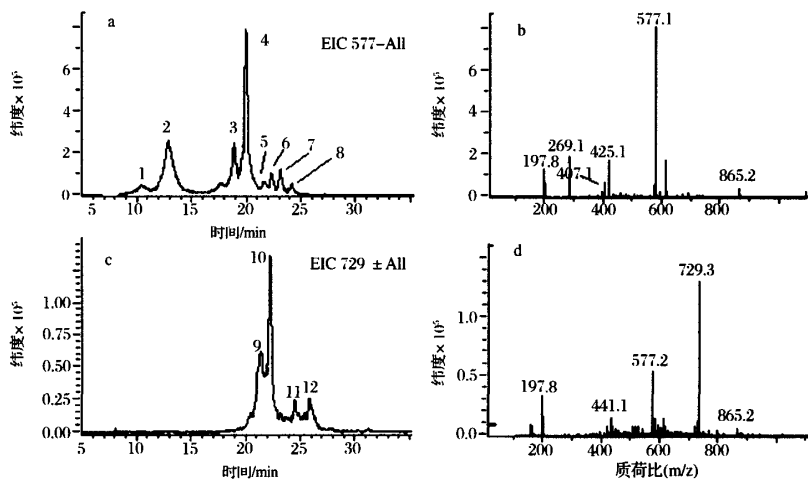
a: 单体选择离子色谱图; b: 峰 M₁ 的 ESI-MS 质谱图; c: 峰 M₂ 的 ESI-MS 质谱图; d: 峰 M₃ 的 ESI-MS 质谱图

图 2 原花青素单体选择离子图(a)及其 ESI-MS 质谱图(b, c, d)

外并没有其他的酯型单体,其 ESI 质谱信息包括其准分子离子($m/z = 441.1$)、失去没食子酰基形成的离子($m/z = 289.0$)和其他一些碎片离子信息。从图 2 可见,单体的 ESI 质谱图主要产生准分子离子,碎片离子相对较少。

相对于单体来说,二聚体的分离比较困难,其对应的质谱图也较复杂,除产生准分子离子外,还提供

了一系列碎片离子信息。对非酯型二聚体的准分子离子 $[M-H]^-$ m/z 577 进行选择离子检测,共出现 8 个色谱峰,如图 3(a)所示(峰 1~8)。其保留时间分别为 10.4、12.8、18.8、19.9、21.6、22.3、23.1、24.1 min。对二聚单酯的准分子离子 $[M-H]^-$ m/z 729 进行选择离子检测,共出现 4 个色谱峰,如图 3(c)(峰 9~12),其保留时间分别为 21.7、22.2、24.5、26.0 min。



a:二聚体选择离子色谱图;b:峰 4 的 ESI-MS 质谱图;c:二聚单酯的选择离子色谱图,
d:峰 10 的 ESI-MS 质谱图

图 3 原花青素二聚体及二聚单酯的选择离子图与 ESI-MS 质谱图

原花青素聚合体的碎裂方式主要包括黄烷醇间连接键的断裂和 retro-diels-alder(RDA) 反应^[12]。黄烷醇 C-环上发生 RDA 反应,失去分子质量为 152 的中性结构($C_8H_8O_3$),形成的碎片还可进一步失去一份子 H_2O 。而黄烷醇间断裂有 2 种可能,一种是失去

仅以 C_4 键与其它单元相连的顶部单元 top-unit 中性碎片,形成 m/z 为 $[M-288-H]$ 的离子,另一种可能是失去以 C_6 或 C_8 键与其他单元相连的底部单元 base-unit,形成 m/z 为 $[M-290-H]$ 的碎片片断。如图 4 所示是以二聚体 B_2 ($m/z = 577$)为例的断裂过程。图 3

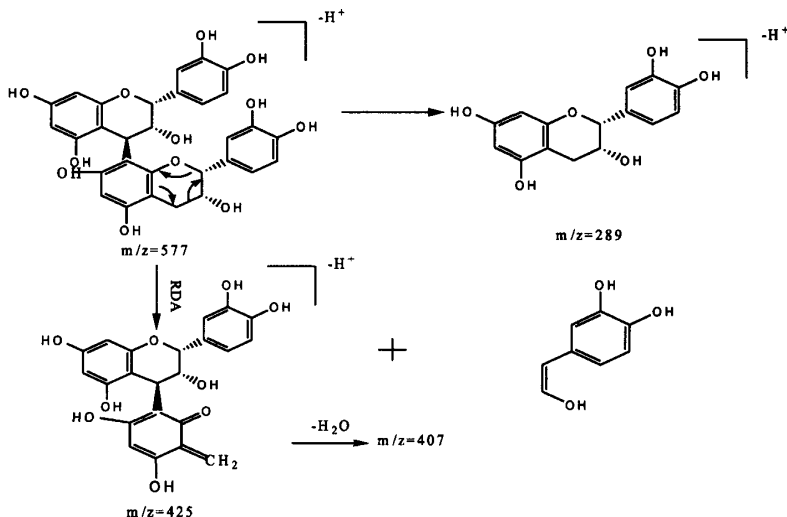


图 4 原花青素二聚体的可能断裂途径

(b)即为二聚体峰4的相对应的ESI质谱图,除 m/z 577.1的主峰外, m/z 289.1为二聚体失去 top-unit 形成的碎片, m/z 425.1、407.1为二聚体发生 RDA 反应形成的碎片。二聚单没食子酸酯的断裂也有2种可能,一种失去分子质量为152的没食子酰基形成二聚体负离子,另一种失去 top-unit,形成单体没食子酸酯负离子,如图3(d)为图3(c)二聚单酯峰10的ESI质谱图, m/z 729.3为准分子离子峰, m/z 577.2为失去没食子酰基形成的碎片离子, m/z 441.1为失去 top-unit 形成的单体没食子酸酯碎片离子。

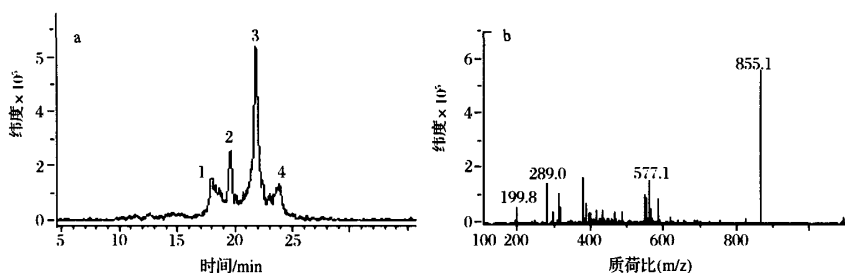


图5 原花青素三聚体的选择离子色谱图(a)及峰3的ESI-MS质谱图(b)

4 结 论

采用 RP-HPLC 与 ESI-MS 联用,能够检测出葡萄籽提取物中的3种单体、12种二聚体(其中4种为二聚单酯)、4种三聚体。随着聚合度的提高,原花青素的异构体数目增多,分离难度逐步提高,碎片离子也随之变得复杂。从出峰时间看出,聚合度与保留时间之间没有必然关系,各聚合体的异构体交叉出现,仅用液相色谱柱难以将这些复杂的组分有效分离。当采用液质联用,则可以较好地解决该体系中各组分的定性检测和大致鉴别,了解提取物中原花青素的成分。

参 考 文 献

- 1 Pekic B, Kovac V, Alonso E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds [J]. Food Chem, 1998, 61(12): 201~206
- 2 Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, et al. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds [J]. Phytochemistry, 1994, 36: 781~784
- 3 国植,徐莉. 原花青素:具有广阔发展前景的植物药[J]. 国外医药-植物药分册, 1996, 11(5): 196~204
- 4 Ariga, Toshiaki. Antioxidant comprising Proanthocyanidins principal componet[P]. U S Patent, 4797421, 1989-01-

原花青素三聚体提取离子图检测到4种三聚体,如图5(a),其保留时间分别为18.0、19.5、21.7、23.8 min。如图5(b)为峰3的ESI-MS图, m/z 865.1为准分子离子峰,其断裂可能之一是失去一个 top-unit,形成 m/z 577.1二聚体负离子碎片,此碎片离子可进一步失去一个 top-unit,形成 m/z 289.0的单体负离子碎片。由三聚体的ESI-MS图可见,三聚体产生的碎片离子更多更复杂,这是由于杂质的干扰和异构体数目的增多,并使三聚体的分离难度进一步提高。

- 10
- 5 Teresa E B, Yolanda G F. Characterization of proanthocyanidins of Vitis vinifera variety tinta del Pais graoe seeds [J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 1794~1799
- 6 McMurrough I, McDowell J. Chromatographic separation and automated analysis of flavanols [J]. Anal Biochem, 1978, 91, 92~100
- 7 Ulla S, Heikki V, Risto K, et al. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from Crataegus leaves and flowers [J]. Phytochemistry, 2002, 60: 821~825
- 8 Jorge M, Ricardo D S. Procyanidin dimmers and trimers from grape seeds [J]. Phytochemistry, 1991, 30(4): 1259~1264
- 9 Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, et al. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds [J]. Phytochemistry, 1994, 3: 781~784
- 10 Tibor F, Jorge M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1156~1160
- 11 孙芸,陶冠军,谷文英. 葡萄籽原花青素的反相液相色谱-质谱分析[J]. 中草药, 2003, 34(6): 493~496
- 12 Qingli Wu, Mingfu Wang, James E. Determination of proanthocyanidins in grape products by liquid chromatography/mass spectrometric detection under low collision energy [J]. Anal Chem, 2003, 75: 2440~2444

(下转第85页)

Determination of Pleuromutilin in Fermentation Broth by HPLC

Zou Xiang

(School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT A RP-HPLC method for the determination of pleuromutilin fermentation broth was developed. The fermentation broth was extracted by methanol and the extraction was analysed by HPLC. The sample was separated at temperature 25°C on a Shim-pack VP-ODSC18(5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm) eluted at a flow rate of 1.00 mL/min with mobile phase of methanol-0.1 mol/L KH_2PO_4 (50:50, V/V), pleuromutilin was detected and quantified by the absorbance at 205 nm. The linearity was obtained over the range of 106.25~2500 μ g/mL for pleuromutilin with the coefficient being 0.9996 and the regression equation being $y = 1790.3x + 145405$. The average recovery was 96.5% and the detective limit was 3.28 ng. This method is simple, accurate, highly specific and reliable for the determination of pleuromutilin.

Key words pleuromutilin, HPLC, fermentation broth

(上接第 82 页)

Determination of Oligomeric Proanthocyanidins in Grape Seeds by RP-HPLC/ESI-MS

Ren Qilong Wei Guanhong Jin Micong Su Baogen Huang Mei

(National Laboratory of Secondary Resources Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT A method has been established for the identification of oligomeric proanthocyanidins in grape seeds using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography /Electrospray Ionization Mass Spectrometry. The purified proanthocyanidins, which were extracted from grape seeds by 60% ethanol in water, were eluted by gradient CH_3CN -1% CH_3COOH in H_2O from ZORBAX SB-C₁₈ column. Mass detection was performed in the negative ion mode. According to the mass of charged quasi-molecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$, Three monomers, eight dimers, four monogalloylated dimers and four trimers were identified. At the same time, we have discussed the proposed ESI-MS fragmentation pathways of proanthocyanidins.

Key words proanthocyanidins, RP-HPLC, ESI-MS, grape seeds

行业动态

彪拉克(PVRAC)公司在泰国兴建亚洲最大的乳酸厂

世界上最大的乳酸厂荷兰彪拉克公司目前正在泰国兴建亚洲最大的乳酸厂。因为可利用泰国廉价而丰富的木薯等原料,故预期市场竞争力极强,初期投资为 130 亿日元,2008 年初完成年产 10 万 t 的生产能力。原先该公司的荷兰本部加上西班牙、法国、美国(与嘉吉公司合资)的分厂,届时总产量可达 20 万 t 之多,将是目前产量的 1.5 倍。而首先进入亚洲(中国)的日本武藏野化学研究所、比利时加拉古特与中国 BBKA 公司合资的 B.G 公司则分别次之。

乳酸及其衍生物的应用领域很广,世界市场正以每年 10% 的速度增长,估计需求量达 25~28 万 t/年。因美国农业部等对付里斯特菌而推行在畜肉制品中添加乳酸钠,致使市场需求急增,再因从环保需要的角度考虑,利用植物性塑料(聚乳酸)原料制作的器具将会额外引人注目,特别是精制乳酸,在亚洲中国、印度等发展中国家,在食品加工,营养强化食品领域以及医药中间体,半导体工业等的市场发展潜力很大。该公司选择在泰国开设第 5 个生产基地,正是瞄准亚洲经济增长的全球战略的重要一环。