

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2013.04.022

松树皮原花青素片段化产物的 LC-ESI-MS 分析



JIANG Yong-xin

姜永新¹, 朱宏涛², 王军民¹, 张颖君², 张加研³, 华燕¹, 赵平^{1*}

(1. 西南林业大学 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; 3. 西南林业大学 材料工程学院, 云南 昆明 650224)

摘 要: 采用茶多酚与松树皮原花青素进行片段化反应, 形成了 3 个新的片段化产物, 通过 LC-ESI-MS 联用技术分析获得了它们的相对分子质量信息, 并推测出它们的化学结构分别为 (表) 儿茶素-(4 β -8)-(-)-表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯、(表) 儿茶素-(4 β -8)-(-)-表儿茶素-3-O-没食子酸酯和 (表) 儿茶素-(4 β -8)-(+)-没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯。

关键词: 松树皮原花青素; 片段化产物; LC-ESI-MS

中图分类号: TQ35
文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2013)04-0117-04

LC-ESI-MS Analysis of Fragmentive Products of Pine Bark Proanthocyanidins

JIANG Yong-xin¹, ZHU Hong-tao², WANG Jun-min¹, ZHANG Ying-jun²,
ZHANG Jia-yan³, HUA Yan¹, ZHAO Ping¹

(1. Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; 3. College of Material Engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The fragmentive products of pine bark proanthocyanidins were analyzed by LC-ESI-MS technique. Three new products were formed from the fragmentive reaction with tea polyphenols as a nucleophile. Their structures were deduced as (epi) catechin-(4 β -8)-(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (**2**), (epi) catechin-(4 β -8)-(-)-epicatechin-3-O-gallate (**1**), and (epi) catechin-(4 β -8)-(+)-gallo catechin-3-O-gallate (**3**).

Key words: pine bark proanthocyanidins; fragmentive products; LC-ESI-MS

原花青素(PC)是植物中的一大类多酚类聚合物的总称,由不同数目的黄烷3-醇如儿茶素(C)、表儿茶素(EC)等结构单元通过不同键合方式聚合而成^[1]。根据聚合度的大小,PC可分为低聚原花青素(OPC)和多聚原花青素(PPC),其抗氧化活性随着聚合度的增加而明显下降^[2-3], OPC则在抗氧化、防治心血管疾病、抗癌等方面具有显著的生物活性,享有“皮肤维生素”和“口服化妆品”等美誉^[4-5]。酸催化降解是PC重要的化学反应之一,在适当的酸性条件下其结构单元之间的连接键容易发生裂解,形成下部末端单元分子和上部延伸单元的碳正离子,该碳正离子易与具亲核性的试剂结合形成附加产物^[6]。该反应又称为片段化反应,并成功应用于多种植物来源 PPC 的片段化中,并将 PPC 有效地转化为 OPC^[7]。半个世纪以来,基于此原理的分析手段在 PC 结构分析及其平均聚合度的评价上发挥了重要作用。近年来,研究学者在亲核性片段化剂选择上进行了一些尝试,发现半胱氨酸、半胱胺等可应用

收稿日期: 2012-07-04

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金重大专项(ZD2010006); 国家自然科学基金资助项目(31260163)

作者简介: 姜永新(1988 -), 男, 河北石家庄人, 硕士生, 主要从事天然产物化学研究

* 通讯作者: 赵平, 研究员, 博士, 硕士生导师, 研究领域为天然产物化学; E-mail: hypzhao@ yahoo. com。

于葡萄籽 PPC 等的片段化中,其片段化产物具有良好的抗氧化、抗肿瘤和神经保护等活性^[8-13]。基于原花青素的性质、功能及其今后在食品、保健食品等领域上的应用,本研究组最近发现食品来源的茶多酚也可作为片段化剂应用于光皮木瓜果实 PPC 的片段化中^[14]。然而由于不同植物来源 PPC 在化学组成和其结构单元键合方式上存在较大差异,茶多酚是否适于其他植物来源 PPC 的片段化,需要进一步加以研究。马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)树皮在我国具有丰富的资源,PC 含量高,但主要以 PPC 的形式存在,其平均相对分子质量约为 2 800,平均聚合度为 9~10,由 C 或 EC 通过单元间 C₄—C₈ 连接为主“直链型”结构所构成^[15]。由于其聚合度高,存在溶解性差、生物利用度低等不足。因此,本实验进行了基于茶多酚的马尾松树皮原花青素片段化反应,并利用 LC-ESI-MS 技术分析所得的相对分子质量信息对新形成的片段化产物进行了结构推导。

1 实验

1.1 材料与仪器

马尾松树皮原花青素,桂林莱茵生物科技有限公司;茶多酚,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,日本),Agilent Technologies 1200 HPLC 仪,BRUKER HCT Esquire 3000 LC/MS 联用仪(美国)。

1.2 片段化反应和产物制备

在配制好的含有 10 mmol/L Vc 的 1 % HCl 水溶液 10 mL 中,置入马尾松树皮原花青素和茶多酚各 10 mg 充分溶解,在 70 °C 水浴中反应 1 h 后置于室温冷却以终止反应。反应液通过 Diaion HP-20 树脂小柱吸附,经 30 mL 蒸馏水除去 Vc 和 HCl 后用 50 mL 甲醇洗脱,甲醇洗脱液经浓缩、干燥后得反应产物。配制质量浓度为 1 g/L 的反应产物甲醇溶液,0.45 μm 过滤后供 HPLC 和 LC-ESI-MS 分析用。

1.3 HPLC 和 LC-ESI-MS 条件

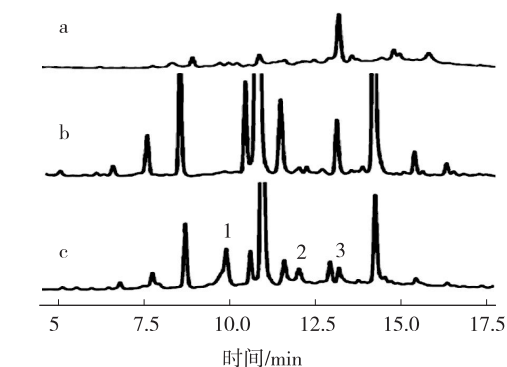
1.3.1 HPLC 条件 流动相,A: H₂O - 0.34 % H₃PO₄, B: CH₃CN - 0.34 % H₃PO₄;洗脱梯度,0~15 min (4 %~25 % B), 15~18 min (25 %~90 % B), 18~20 min (90 %~95 % B), 20~24 min (95 % B);流速,1 mL/min;柱温 30 °C;检测波长,280 nm;色谱柱,Agilent Analytical Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);进样量,5 μL。

1.3.2 LC-ESI-MS 条件 流动相,A: H₂O - 0.1 % HCl, B: CH₃CN - 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

对马尾松树皮原花青素、茶多酚和片段化反应产物进行了 HPLC 比较分析,色谱图见图 1。通过分析比较,从图 1 可知片段化产物中存在 3 种新的反应产物 1~3,它们与儿茶素类物质具有类似的紫外吸收(图略),推测可能为附加了茶多酚分子官能团的片段化产物。

进一步对马尾松树皮原花青素片段化产物进行了 LC-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 可知,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* 747.1 [M + H]⁺ 和 *m/z* 745.1 [M - H]⁻,表明产物 1 的相对分子质量为 746;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* 731.1 [M + H]⁺ 和 *m/z* 729.0 [M - H]⁻,表明 2 的相对分子质



a. 原花青素 proanthocyanidins; b. 茶多酚 tea polyphenols; c. 片段化产物 fragmentive products

图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC

量为 730;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 747.0 $[M+H]^+$ 和 m/z 744.9 $[M-H]^-$,表明 **3** 的相对分子质量为 746。

茶多酚主要由(-)-表没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯(EGCG)、(-)-表儿茶素 3-O-没食子酸酯(ECG)、(+)-没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯(GCG)、(-)-表儿茶素(EC)、(+)-儿茶素(C)、(-)-表没食子儿茶素(EGC)和(+)-没食子儿茶素(GC)等儿茶素类化合物组成。根据原花青素片段化反应机理,并结合图 2 获得的相对分子质量信息,推测出化合物 **1~3** 的化学结构分别为(表)儿茶素-(4 β -8)-(-)-表没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯(**1**), (表)儿茶素-(4 β -8)-(-)-表儿茶素-3-O-没食子酸酯(**2**)和(表)儿茶素-(4 β -8)-(+)-没食子儿茶素-3-O-没食子酸酯(**3**)(图 3),它们分别是由 EGCG、ECG 和 GCG 附加在黄烷-3-醇延伸单元(表)儿茶素上而形成的。

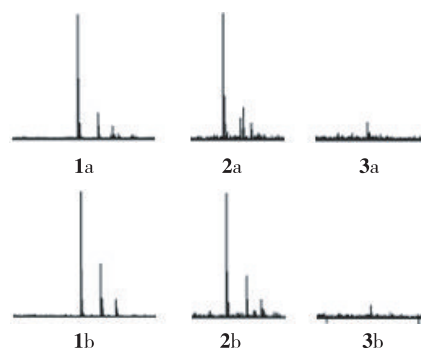


图 2 片段化产物 **1~3** 的 ESI⁻ (a) 和 ESI⁺ (b) 准分子离子峰谱图

Fig. 2 Quasi-molecular ion profiles of fragmentive products **1-3** in ESI⁻ (a)/ESI⁺ (b)-MS

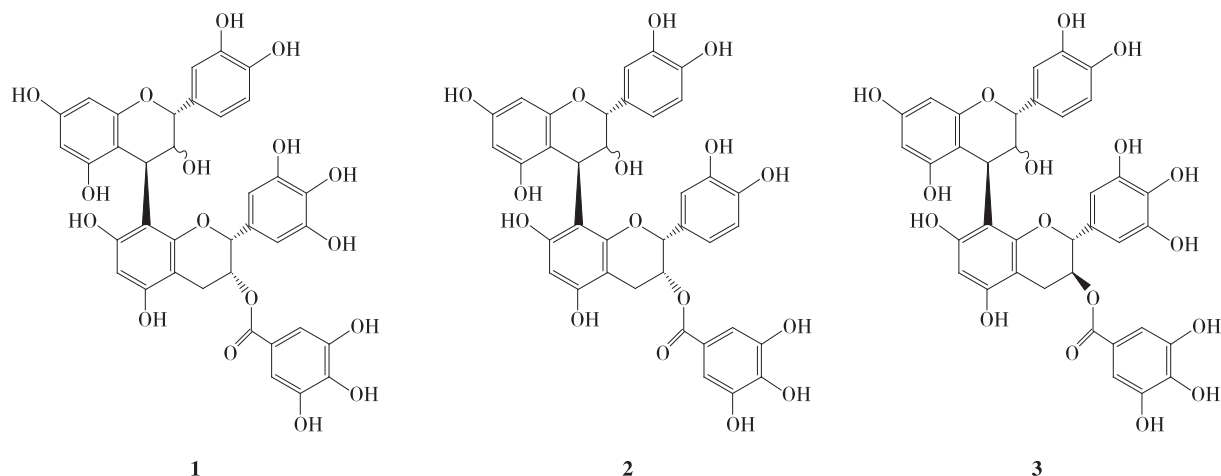


图 3 片段化产物 **1~3** 的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of fragmentive products **1-3**

3 结论

采用茶多酚与松树皮原花青素进行片段化反应,形成了 3 个新的片段化产物,通过 LC-ESI-MS 联用技术分析获得了它们的相对分子质量信息,并推测出它们的化学结构分别为(表)儿茶素-(4 β -8)-(-)-表没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯、(表)儿茶素-(4 β -8)-(-)-表儿茶素 3-O-没食子酸酯和(表)儿茶素-(4 β -8)-(+)-没食子儿茶素 3-O-没食子酸酯。结果表明食品来源的茶多酚可应用于马尾松树皮原花青素的片段化反应,具有良好的应用开发前景。

参考文献:

- [1] COS P, DE BRUYNE T, HERMANS N, et al. Proanthocyanidins in health care: Current and new trends[J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11 (10): 1345-1359.
- [2] LOTITO S B, ACTIS-GORETTA L, RENART M L, et al. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 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] ERLJMAN A G, VERSTRAETEN S V, FRAGA C G, et al. The interaction of flavonoids with membranes: Potential determinant of flavonoid

- antioxidant effects[J]. Free Radical Research, 2004, 38(12): 1311-1320.
- [5] 张迪, 赵文军, 马丽娟, 等. 原花青素的性质、功能、纯化和利用[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(1): 35-39, 49.
- [6] HEMINGWAY R W. Reactions at the interflavonoid bond of proanthocyanidins[M]//HEMINGWAY R W, KARCHESY J. Chemistry and Significance of Condensed Tannins. New York: Plenum Press, 1989: 265.
- [7] TANAKA T, YOSHITAKE N, ZHAO Ping, et al. Production of oligomeric proanthocyanidins by fragmentation of polymers[J]. Japanese Journal of Food Chemistry, 2007, 14(3): 134-139.
- [8] TORRES J L, LOZANO C, JULIÀ L, et al. Cysteinyl-flavan-3-ol conjugates from grape procyanidins: Antioxidant and antiproliferative properties[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10(8): 2497-2509.
- [9] SELGA A, TORRES J L. Efficient preparation of catechin thio conjugates by one step extraction/depolymerization of pine (*Pinus pinaster*) bark procyanidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7760-7765.
- [10] NONAKA G I, SUN B X, YUAN L, et al. Sulfur-containing proanthocyanidin oligomer composition and process for producing the same: WO, PCT WO 2004/103988 A1[P], 2004.
- [11] MITJANS M, Del CAMPO J, ABAJO C, et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(24): 7297-7299.
- [12] 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.
- [13] TOMOBE K, FUJII H, SUN Bu-xiang, 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]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2007, 61(7): 427-434.
- [14] 姜力, 朱宏涛, 王军民, 等. 木瓜多聚原花青素降解产物的液相色谱——电喷雾质谱分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(31): 15095-15096, 15099.
- [15] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 149.

欢迎订阅 2014 年下列期刊

《贵州化工》是贵州赤天化集团有限责任公司和贵阳中化开磷化肥有限公司主办, 多家单位参办, 经国家新闻出版署和国家科技部批准出版的国内外公开发行的化工科技期刊, 被《中国学术期刊(光盘版)》、《中国化学化工文摘》、《中文科技期刊数据库》及《万方数字化群数据库》等多家大型刊库收录。

主要报道有关磷化工、煤化工和精细化工的科技论文, 也发表与化学工业相关的其他科技论文。辟有专论与综述、科研与设计、分析与测试、环境保护、生产经验交流、企业管理、化工物流、化工医药、行业信息等栏目。内容新颖, 信息量大, 是全国石油、化工行业优秀期刊。适宜从事化学工业生产、经营、管理、科研、设计、教学的人员阅读和参考; 也可供相关行业如环保、医药、冶金、食品工业、饲料工业的人员参考。

双月刊, 国内刊号为 CN 52-1090/TQ, 国际刊号为 ISSN 1008-9411, 广告经营许可证为黔工商 0099 号, 大 16 开, 64 页。订阅价格(含邮资以人民币计): 8.0 元/期, 48 元/年。可随时订阅, 订户可通过邮局汇款至贵州省贵阳市新添大道 310 号(贵州赤天化孵化中心院内)《贵州化工》编辑部, 邮编: 550018。

地址: 550018 贵州省贵阳市新添大道 310 号(贵州赤天化孵化中心院内); 联系人: 税小波, 余 玲; 电话: 0851-6317518; <http://gzhg.chiajournal.net.cn>; [E-mail: gzhgbjb@sohu.com](mailto:gzhgbjb@sohu.com)。

《国际造纸》(刊号 CN11-3573/TS, ISSN 1006-2599, 双月刊)由中国造纸学会、中国制浆造纸研究院主办, 主要报道现代全球造纸工业先进生产技术、浆纸装备、环保技术、造纸化学品的应用与研究、全球最新造纸动态等, 是国内外公开发行的连续出版物。特设前沿·热点栏目, 就当前造纸工业关心的问题论述及报道。《国际造纸》连续多年入选“中国期刊全文数据库”、“中国核心期刊(遴选)数据库”和“中国学术期刊综合评价数据库”。已与多家造纸机构、企业、团体建立了广泛的联系, 是沟通中外纸业技术、信息、贸易的桥梁与纽带, 是了解世界纸业的窗口。适合造纸企业的经理、科研院所技术人员以及印刷、机械、化工、环保等相关行业的经营管理及技术人员阅读。

可到当地邮局订阅, 10 元/册, 全年 60 元; 国外及港澳台地区, 10 美元/册, 全年 60 美元; 如错过邮局订阅, 可直接与该刊发行部联系。开户名称: 中国制浆造纸研究院; 开户账号: 802009444208091001; 开户行: 中行北京光华路支行; 电话: 010-64778173(发行部), 64778162(编辑部); 传真: 010-64778174; [E-mail: wpp@vip.163.com](mailto:wpp@vip.163.com); 地址: 100102 北京市朝阳区启阳路 4 号院 2 号楼 607 室。