

高粱外种皮中原花青素的提取工艺及其组分鉴定

刘 睿, 段玉清, 谢笔钧, 潘思轶, 刘卫兵

(华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘 要: 本研究旨在提取黑龙江产高粱外种皮中的原花青素并鉴定其组成。通过正交试验对提取工艺进行优化, 采用柱层析、葡聚糖(Sephadex LH-20)凝胶色谱进行纯化和分离, 纯化和分离的原花青素产物用 ESI-MS 鉴定其组成。在影响提取率的 4 个因素温度、料液比、时间和 pH 值中, 温度对提取率的影响最为显著, 料液比也有一定影响。研究得到最佳提取工艺为: 温度 80 ℃, 时间 1.5 h, pH 值为 4, 料液比为 1:20; 通过 ESI-MS 鉴定出了原花青素的组成成分的分子量, 黑龙江产高粱外种皮中的原花青素以聚合度小于 5 的低聚体为主。

关键词: 原花青素; 提取; 分离; ESI-MS; 鉴定; 低聚体

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)01-0242-04

0 引 言

原花青素(procyanidins, 简称 PC)是广泛存在于植物界和食品中的一大类多酚类化合物。自 20 世纪 60 年代 PC 的结构被阐明以后, 人们不断在大自然中发现新的富含原花青素的资源, 并对其中的原花青素的组成和原花青素的结构进行鉴定。现在已发现多种富含原花青素的资源, 其中尤以对葡萄皮、籽中的原花青素的研究最深入、最广泛、最成功, 取得了突破性的进展^[1-4]。而对高粱外种皮中的原花青素的研究少有文献报道。

我国幅员辽阔, 高粱的种植面积和产量都居世界前列^[5], 高粱外种皮中的原花青素(缩合单宁)过去一直被认为是一种抗营养因子, 其存在不利于动物和人的消化, 甚至鸟类都不食用^[6]。但现代生物学和药理学研究表明, 原花青素具有很多生理活性和药理活性。如原花青素具有很强的抗氧化能力、能清除各种自由基和抗肿瘤、延缓衰老、抗炎症等多种药理活性, 现已在临床医学和日用化工领域得到应用, 同时毒理学研究表明原花青素没有任何毒副作用^[1]。

通常研究认为原花青素活性较高的是低聚体(聚合度<5)^[7], 本文旨在提取高粱外种皮中的原花青素, 并通过葡聚糖凝胶柱色谱和大气压电喷雾电离质谱(ESI-MS)的方法, 对柱层析法纯化得到的黑龙江产高粱外种皮中原花青素(SPC)进行分离和鉴定, 为提高高粱外种皮中的原花青素的应用价值提供科学依据。这有利于提高高粱这种农作物的附加值, 为原花青素的进一步研究和应用提供原料, 因而具有广泛的经济效益和社会效益。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2003-07-16 修订日期: 2003-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(30270938)

作者简介: 刘 睿(1969-)男, 讲师, 博士生, 研究方向为天然产物化学。湖北武汉 华中农业大学食品科技学院, 430070。

Email: liurui@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 谢笔钧, 教授, 博士生导师, 研究方向为食品化学及天然产物化学。湖北武汉 华中农业大学食品科技学院, 430070

原料: 黑龙江产高粱

葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20: Sigma 公司

质谱仪: Agilent 1100 LC/MSD Trap

1.2 研究方法

1.2.1 SPC 的提取、纯化

高粱种子 → 碾磨 → 外种皮 → 提取 → 提取液 → 真空浓缩 → 浓缩液
柱层析 → 洗脱液 → 真空浓缩/冷冻干燥 → SPC 粉末 → Porter 法测定 → SPC 含量

表 1 正交实验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiments

水平	因 素			
	A 温度/℃	B 时间/min	C pH 值	D 料液比
1	50	30	4	1:10
2	60	60	5	1:15
3	70	90	6	1:20
4	80	120	7	1:25

表 2 L₁₆(4⁵) 正交实验设计

Table 2 Layout of the orthogonal experiments L₁₆(4⁵)

实验	因 素				
	A 温度/℃	B 时间/min	C pH 值	D 料液比	E 空闲列
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

准确称取一定量的高粱外种皮, 采用 50% 乙醇/水(mL/mL)作为提取剂, 分别对提取的温度, 提取的时

间, 料液比, 提取剂的 pH 值进行单因素试验。在单因素实验的基础上, 以提取温度、时间、料液比、pH 值设计 $L_{16}(4^5)$ 正交实验(见表 1、2), 探讨最佳提取工艺。

原花青素的纯化, 采用大孔树脂作柱层析的填料, 提取液浓缩后上柱, 不同体积比的乙醇/水(0/100、10/90、30/70、50/50、70/30 mL/mL)作洗脱剂, 分别收集洗脱液, 将洗脱液真空浓缩($< 40^\circ\text{C}$), 冷冻干燥, 按 Porter 法测定原花青素含量。

1.2.2 SPC 的葡聚糖凝胶色谱柱分离

SPC 粉末(少量乙醇溶解) $\xrightarrow[\text{分级分离}]{\text{Sephadex LH-20}}$ 收集不同级分 $\xrightarrow[\text{冷冻干燥}]{\text{真空浓缩}}$ 不同级分。

称取 0.40 g SPC 粉末, 用少量乙醇溶解, 上葡聚糖凝胶柱(Sephadex LH-20, $2 \times 60\text{ cm}$), 流动相分别采用不同体积比的乙醇/水(30/70 和 70/30 mL/mL)作阶梯梯度洗脱, 最后采用丙酮/水(70/30 mL/mL)进行洗脱, 分部收集; 流速为 0.50 mL/min; 检测波长为 280 nm。测定分部收集的每一管洗脱液在 280 nm 的吸光度值(Abs), 作 Abs-管数曲线, 将相应部分合并, 真空浓缩、冷冻干燥, 得到不同级分。

1.3 检测方法

1.3.1 原花青素的含量测定方法

采用 Porter 法分析^[8]。

1.3.2 SPC 组分鉴定方法

直接采用 ESI-MS 进行鉴定。

分别取葡聚糖凝胶柱分离的不同级分 SPC 用甲醇溶解, 加入离子化试剂, 直接通过质谱(MS)仪用进样器进样, 采用 ESI-MS 分析。条件如下: 采用负离子模式, 雾化压力为 $2.33 \times 10^5\text{ Pa}$, 干燥气体的流速为 9.00 mL/min, 温度为 350 $^\circ\text{C}$, 毛细管电压为 4 kV。

2 结果与讨论

2.1 SPC 的提取、纯化

2.1.1 原花青素的提取工艺的优化

正交实验方差分析结果分别见表 3。

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

来源	离均差平方和	自由度	均方	F	显著性
A	0.01811	3	0.00604	13.70	**
B	0.00062	3	0.00021	0.47	
C	0.00179	3	0.00060	1.35	
D	0.00646	3	0.00215	4.89	*

注: $F_{0.01}(3, 12) = 5.95$, $F_{0.05}(3, 12) = 3.49$; ** 表示在 $P = 0.01$ 水平显著, * 表示在 $P = 0.05$ 水平显著。

由表 3 所示方差分析的结果表明: 温度对提取率的影响最为显著, 料液比也有一定影响。综合考虑, 选定: 温度 80 $^\circ\text{C}$, 时间 1.5 h, pH 值为 4, 料液比为 1:20 为最适提取工艺。研究认为 60%~70% 丙酮/水体系能最大限度提取植物原料中的原花青素^[9]。以此工艺提取率能达到丙酮最大提取率的 90%。说明采用此工艺提取高粱外种皮中的原花青素是可行的。

2.1.2 原花青素的纯化

原花青素纯化的结果见图 1 和图 2。

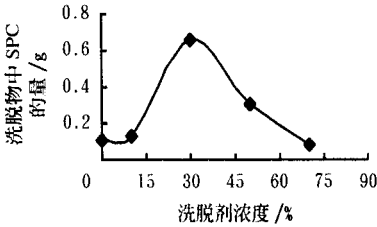


图 1 洗脱剂对洗脱物中 SPC 的质量的影响

Fig. 1 Effects of different eluants on quality of SPC in elutant

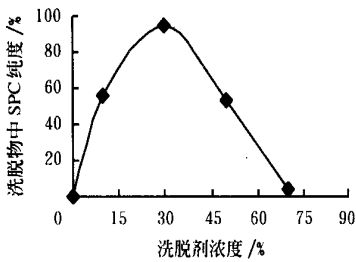


图 2 洗脱剂对洗脱物中 SPC 纯度的影响

Fig. 2 Effects of different eluants on purity of SPC in elutant

图 1、2 所示结果表明: 30:70 乙醇/水(mL/mL)作为柱层析纯化原花青素的洗脱剂时, 能得到纯度大于 95% 的原花青素产物, 而且这一部分得率最高, 说明采用 30:70 醇/水(mL/mL)体系, 通过柱层析方法纯化原花青素是可行的。

原花青素的提取多采用有机溶剂(甲醇、丙酮)作提取剂进行; 也有采用脱氧水作提取剂, 在加压条件下, 提取原花青素^[10]。这些方法或容易产生有机物残留, 对环境不友好, 或存在投资成本太高等不足。而对原花青素的纯化多采用有机溶剂液相萃取(如乙酸乙酯、二氯甲烷等), 此类方法也存在容易产生有机物残留、环境污染等问题。还有采用发酵的方法将原料中的糖类通过发酵的方法除去, 以达到纯化原花青素的目的, 但产物的纯度不高^[11]。

本研究采用食用级乙醇作提取剂, 提取高粱外种皮中原花青素, 利用柱层析方法, 以乙醇作流动相纯化, 能得到纯度达到 95.01% 的产物, 整个提取纯化过程中, 乙醇回收循环使用, 能节约成本, 且对环境友好。产品中也不存在有毒有机物残留。得到的产物水溶性和醇溶性都很好。

2.2 葡聚糖凝胶柱色谱方法分离 SPC

通过柱层析纯化得到的产物是由不同聚合度组成的混合物, 通常采用凝胶柱色谱方法进一步进行分离, 得到不同分子量范围的级分, 目前多采用 Sephadex LH-20 进行分离。Sephadex LH-20 分离 PC 的机理除了凝胶的分子筛效应外, 还通过氢键作用和疏水相互作用影响分离, 同时还可能存在分配效应和离子效应影响分离效果^[12, 13]。凝胶分离一般以甲醇水溶液和丙酮水溶液作流动相, 而且丙酮的水溶液的洗脱能力最好, 但

丙酮或甲醇都有毒。本研究主要采用不同体积比的乙醇/水作流动相,通过阶梯梯度洗脱,分部收集洗脱液,合并相应部分,真空浓缩、冷冻干燥。

通过 Porter 法对不同级分进行检测,结果显示,不同级分的原花青素的含量不同。乙醇/水(30/70, mL/mL)溶液洗脱部分的原花青素含量很低,主要为单体儿茶素和表儿茶素以及其他水溶性成分。而主要的原花青素组成部分由乙醇/水(70/30, mL/mL)溶液洗脱下来,其中原花青素的含量大于 95%。最后用丙酮/水(70/30, mL/mL)进行洗脱,其洗脱物中只含有少量的原花青素。说明通过葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)分离,以乙醇/水溶液作流动相将本研究方法提取、纯化的原花青素的混合物进行进一步的纯化,并将不同组成的原花青素进行分离是可行的。

2 3 ESI-MS 鉴定 SPC

对原花青素的组成和结构鉴定,MS 是行之有效的方法。可以直接通过 MS 的方法进行鉴定原花青素的组成。本研究对柱层析纯化的原花青素通过葡聚糖凝胶分离后的不同级分采用 ESI-MS 进行鉴定,如图 3、4、5 所示。结果表明,乙醇/水(30/70, mL/mL)溶液洗脱部分主要为单体,其分子离子峰(M-H)⁻为 m/z 289.1)见图 3,而乙醇/水(70/30, mL/mL)溶液洗脱部分主要为原花青素,其分子离子峰分别有 m/z 289.5, m/z 577.4⁻, m/z 865.1, m/z 1153.2, m/z 1441, 结果见图 4;丙酮/水(70/30, mL/mL)洗脱部分为少量单体和低聚合度原花青素,其分子离子分别为 m/z 289.0, m/z 577.0, m/z 865.1, 结果见图 5。不同聚合度原花青素低聚体的分子离子(M-H)对应的质荷(m/z)比见表 4。

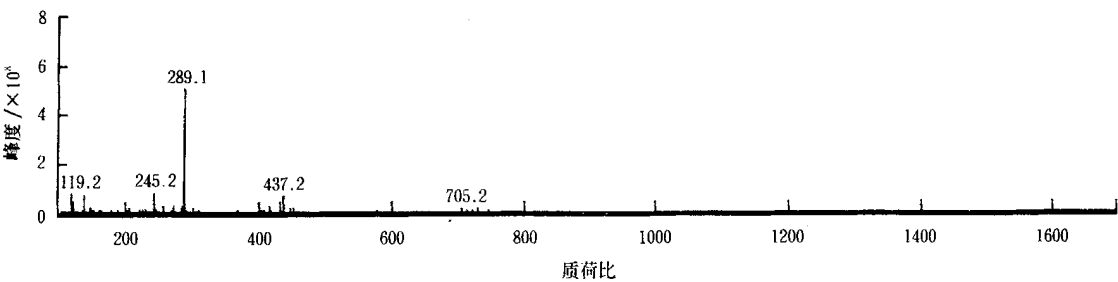


图 3 30% 乙醇洗脱级分 ESI-MS 图(m/z)

Fig 3 ESI-MS spectrogram of eluting fractions with 30% ethanol

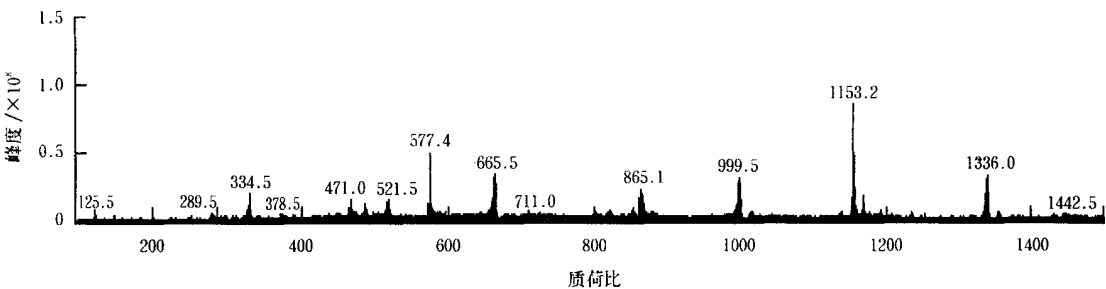


图 4 70% 乙醇洗脱级分 ESI-MS 图(m/z)

Fig 4 ESI-MS spectrogram of eluting fractions with 70% ethanol

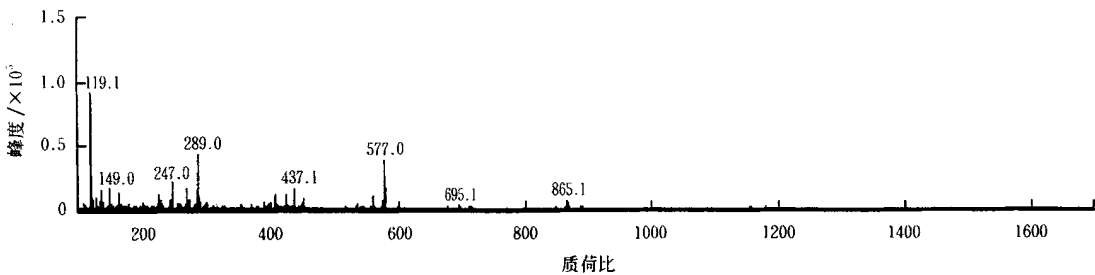


图 5 70% 丙酮洗脱级分 ESI-MS 图(m/z)

Fig 5 ESI-MS spectrogram of eluting fractions with 70% acetone

表 4 原花青素对应的质荷比
Table 4 M/Z corresponding to molecular ion
of different polymeric SPC

原花青素低聚物	质荷比(M—H) ⁺
单体	289
二聚体	577
三聚体	865
四聚体	1153
五聚体	1441

由此可见, 通过本研究得到的原花青素主要是聚合度< 5 的低聚体。这与国外有关文献报道的在成熟的高粱种子中不含有原花青素的低聚物不同^[14]。可能是由于高粱的品种、产地、成熟度不同, 以及提取剂的不同所致。研究认为低聚体的原花青素的活性较强, 具有广泛的药理活性和抗氧化活性及清除自由基活性^[1]。本研究结果证实我国黑龙江产高粱是一种富含高活性低聚体原花青素的植物资源。这一研究结果未见国内外文献报道。

3 结 论

- 1) 黑龙江产高粱外种皮中的原花青素的最佳提取工艺为: 采用 50% 乙醇/水(mL /mL) 溶液作提取剂, 提取温度 80 , 时间 1. 5 h, pH 值为 4, 料液比为 1 20。
- 2) 通过柱层析方法纯化得到的产物, 以乙醇/水溶液作流动相, 采用阶梯梯度洗脱, 通过葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20) 柱色谱分离和 ESI/MS 方法鉴定可知, 其组分主要是聚合度< 5 的高活性低聚体。

[参 考 文 献]

[1] 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(1): 196- 204

[2] Ian M M., David M. Semipreparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from Barley[J] J Agric Food Chem, 1996, 44: 1731- 1735

[3] Adamson G E, Lazarus S A, Mitchell A E, et al HPLC

method for the quantification of procyanidins in Cocoa and Chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity[J] J Agric Food Chem, 1999, 47: 4184- 4188

[4] Ricard J M, Rosec J P, Bourzeix M, et al Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography[J] J Sci Food Agric, 1990, 53: 85- 92

[5] 卢庆善, 王呈祥, 孙 毅, 等 高粱学(第 1 版)[M] 北京: 中国农业出版社, 1999 , 246- 274

[6] McGrath R M, Kaluza W Z, Daiber K H, et al Polyphenols of sorghum grain, their changes during malting, and their inhibitory nature[J] J Agric Food Chem, 1982, 30: 450- 456

[7] 邵云东, 胡光祥 葡萄籽提取物的质量标准[J] 中草药, 2001, 32(11): 1044- 1046

[8] Porter L J, Hrstich L N, Chan B G The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin[J] Phytochemistry, 1986, 25(1): 223- 230

[9] Madigan D M, Synth M R. Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by HPLC with dual-electrode electrochemical detection [J] Analyst, 1994, 19: 409- 416

[10] Karin N M, Thomas T S, William A. Method for extraction of proanthocyanidins from plant material patent number[P] 1999, 1 US: 5910363

[11] Toshiaki A, Hiroshi H, Katsumi Y. Process for the preparation of proanthocyanidins [P] 1998, 6 US: 5773262

[12] 施良和 凝胶色谱法[M] 北京: 科学出版社, 1980, 161- 163

[13] 彭 悦, 聂基兰 交联葡聚糖凝胶吸附性能及应用[J] 江西化工, 2001, (2): 20- 24

[14] William G C, W Z, Kaluza, et al High performance liquid Chromatography of procyanidins in developing Sorghum grain[J] J Agric Food Chem, 1981, 29: 965- 96

Extraction technology and identification of procyanidins
from Episperm of Sorghum seed

Liu Rui, Duan Yuqing, Xie Bijun , Pan Siyi, Liu Weibing

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

Abstract In this study, procyanidins were extracted and determined from the episperm of Sorghum seed harvested in Heilongjiang Province. Extraction conditions were optimized by orthorhombic analysis. Column chromatography and gel (Sephadex LH-20) chromatography were conducted for further separation and purification. The resulting purified and separated extracts were identified by using ESI/MS. Among the four extraction factors concerned, including temperature, ratio of material/solution, extraction time and pH value, temperature was the most significant that affected the extraction rate, followed by the ratio of material/solution. Molecular weights of various procyanidins extracted were measured by ESI/MS. The optimized extraction condition was to extract at temperature 80 for 1. 5 h at pH 4, and with a 1 20 material/solution ratio. In the material studied, oligomers, no larger than pentamers, were the major procyanidins presented in the Episperm of Sorghum seed.

Key words: procyanidins; extraction; separation; ESI/MS; identification; oligomers