

研究报告

木榄花萼缩合单宁制备花青定及抗氧化能力研究

张亮亮^{1,2}, 林益明^{1,2*}(1. 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;
2. 厦门大学 生命科学学院 生物学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 MALDI-TOFMS 分析了红树植物木榄花萼缩合单宁的结构单元组成类型、平均聚合度和平均分子质量。并以木榄花萼缩合单宁为原料, 通过 HCl-正丁醇法酸解反应制备了花青定粗产品, 同时测定了花青定粗产品对二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 的清除能力及铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP)。结果表明: 木榄花萼缩合单宁结构单元组成类型主要为儿茶素或表儿茶素, 平均聚合度为 7.5, 平均分子质量为 2 081.60 u; 花青定粗产品具有较强的清除自由基能力, DPPH· 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 43.889 mg/L, 并具有较高的 FRAP ($(7.718 \pm 0.109) \text{ mmol/g}$)。

关键词: MALDI-TOFMS; 木榄花萼; 缩合单宁; 花青定; 抗氧化活性

中图分类号: TQ351.5; TQ943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2008)06-0001-05

Preparation and Antioxidant Activity of Cyanidin from Condensed Tannins
Extracted from Calyx of *B. nuguiera gymnorhiza*ZHANG Liang-liang^{1,2}, LIN Yi-ming^{1,2}(1. Key Lab of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, Xiamen 361005, China;
2. Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Type of structural units, degree of polymerization and mean molecular weight of condensed tannins extracted from calyx of large red mangrove (*B. nuguiera gymnorhiza*) were characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS). Crude cyanidin products were prepared from condensed tannins of *B. gymnorhiza* by means of butanol/HCl reaction. In addition, the free radical-scavenging activity and antioxidant ability of crude cyanidin products were determined by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·) and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) model systems respectively. The results showed that catechin/epicatechin were the structural units occurring in condensed tannins of *B. gymnorhiza*. Average degree of polymerization was 7.5, and mean molecular mass was 2 081.60 u. Crude cyanidin products showed a very good DPPH radical scavenging activity (IC_{50} of 43.889 mg/L) and ferric reducing/antioxidant ability ($(7.718 \pm 0.109) \text{ mmol/g}$).

Key words: MALDI-TOFMS; calyx of *B. nuguiera gymnorhiza*; condensed tannins; cyanidin; antioxidant activity

花色素类及其糖苷——花色素苷类在化学上属于类黄酮,自然界中它们常以糖苷形式存在,是植物的主要显色物质,包括花青定、翠雀定和天竺葵定等及其糖苷类。花色素具有明显的保健作用,具有很强的抗氧化能力,可以清除自由基,降低氧化酶的活性,抑制胆固醇吸收,降低低密度脂蛋白胆固醇含量;此外,还具有抗变异、抗肿瘤、抗过敏、保护胃黏膜等多种疗效^[1-2]。因此,花色素合成及调控是目前

收稿日期: 2007-11-13

基金项目: 国家自然科学基金 (30671646); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-07-0725)

作者简介: 张亮亮 (1981-), 男, 江苏沐阳人, 博士生, 主要从事植物单宁化学研究工作

*通讯作者: 林益明, 男, 教授, 博士生导师, 研究领域: 植物生态学; E-mail: linyim@xmu.edu.cn

非常活跃的研究领域。花色素的制备方法主要是通过从植物材料中分离对应的花色素苷并对花色素苷进行酸化水解来获得各种花色素。该方法的生产工序复杂,并且用于生产花色素的高纯度花色素原料的产量也相对有限和价格高昂,导致该方法所生产的花色素的价格极高,难于在市场上大量供应。若能利用资源量巨大的原花色素(即缩合单宁)通过酸解转化制备花青定等花色素,可有望最大限度地降低花色素的生产成本。本研究利用 MALDI-TOFMS 分析了红树植物木榄花萼缩合单宁的结构单元组成类型,并以木榄花萼缩合单宁为原料,通过 HCl-正丁醇法降解反应制备了花青定粗产品,研究了酸解转化产物对二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·) 的清除作用和铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP)。

1 材料与方法

1.1 原理

原花色素的 4-8 键很不稳定,易在酸的作用下打开。下部单元形成 (+)-儿茶素,上部单元成为正碳离子 (A),A 失去一个质子成为黄-3-烯-3-醇 (B)。在有氧条件下 B 失去杂环上的氢负离子,被氧化为花青定,反应过程如图 1 所示。

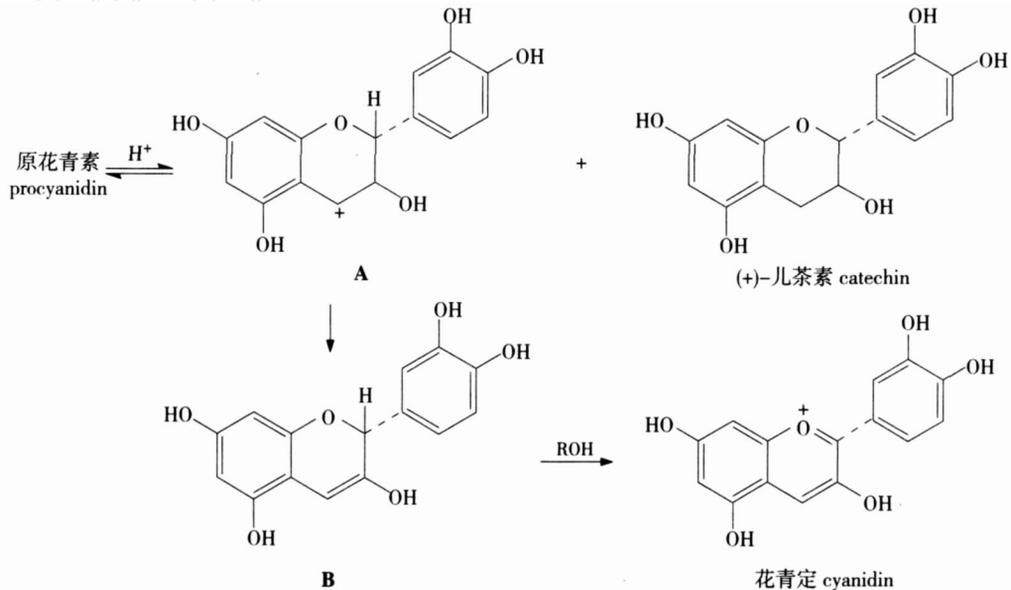


图 1 原花青素酸解转化反应示意图

Fig 1 Acid conversion of procyanidin

1.2 原料、试剂及主要仪器

原料:红树植物木榄 (*Buguiera gymnorhiza* (Linn.) Lam.) 花萼,采自福建九龙江口红树林自然保护区。样品采集后迅速用 70% 丙酮溶液提取 3 次,收集提取液在 30℃ 旋转减压蒸发除去丙酮,将含有缩合单宁的水相冷冻干燥以得到缩合单宁样品粗提物。粗提物用少量 50% 甲醇溶液溶解后上 Sephadex LH-20 纯化以获得缩合单宁纯化物^[3]。

试剂:甲醇、丙酮、三氟乙酸 (TFA) 等均为国产分析纯试剂,乙腈为色谱纯。氯化铯纯度 99%, Fluka 公司;Dowex 50 ×8~400 强酸性阳离子交换树脂、二苯基苦基苯肼自由基 (DPPH·)、Fe³⁺-三吡啶三吡嗪 (TPTZ)、丁基羟基茴香醚 (BHA)、(+)-儿茶素及抗坏血酸 (AA), Sigma 公司产品;样品纯化所用色谱填料为 Sephadex LH-20, Amersham 公司;实验用水为二次去离子水。

仪器:高效液相色谱仪 1100 Series, 美国 Agilent 公司;二极管阵列 (DAD) 检测器;UV-2000 紫外可见分光光度计, 尤尼柯;FD-1 冷冻干燥机, 北京;Bruker Reflex 基质辅助激光解吸附飞行时间质谱仪, 德国。

1.3 实验方法

1.3.1 MALDI-TOFMS 分析 参考向平等^[4]的研究方法,对木榄花萼单宁进行 MALDI-TOF 质谱分

析。选用氯化铯 (3.80 g/L 的水溶液) 为离子化试剂。

1.3.2 HCl-正丁醇法酸解转化反应 取木榄花萼缩合单宁 100 mg,溶于 12.2 mL 水中,补加 HCl-正丁醇 (体积比 95:5) 溶剂系统至总体积 70 mL,充分混匀,置于 100 ℃ 水浴充分反应 75 min。反应完全后取出冷却,加水萃取除去 HCl,于 40 ℃ 减压浓缩蒸干,得缩合单宁酸解转化产物即花青定粗产品约 81 mg,得率约为 81%,HPLC 分析其纯度。

1.3.3 HPLC 分析花青定粗产品 取花青定粗产品少量加 1 mL 25% 的乙腈水溶液溶解制样,所有流动相和样品溶液均用 0.22 μm 的滤膜过滤。用反相液相色谱 (RP-HPLC) 结合 DAD 分析缩合单宁降解产物组成成分。色谱柱用 Hypersil ODS 5 μm, 4.6 mm × 250 mm; 流动相:乙腈 + 0.1% TFA (), 水 + 0.1% TFA (); 流速:1 mL/min; 梯度设置:0~6 min, 15% ; 6~20 min, 15%~22% ; 20~35 min, 22%~30% ; 35~60 min, 30%~48% ; 60~75 min, 48%~100% ; 75~80 min, 100% 。检测:DAD, 280、512、524 和 530 nm。进样量 30 μL; 柱温 30 ℃。

1.3.4 测定 DPPH·清除能力 参考文献 [5] 的方法,测定了花青定粗产品的 DPPH·清除能力。实验结果用达到 50% DPPH·清除率所需的样品质量浓度来表示。

1.3.5 测定总抗氧化活性 参照 Benzie 等^[6]采用铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP) 分析法测定了花青定粗产品的总抗氧化能力。结果用达到每克待测样品干质量抗氧化能力所需抗坏血酸的量 (mmol/g) 表示。对所有样品均采用 3 个平行样按上述方法进行测定,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 木榄花萼缩合单宁及花青定粗产品

2.1.1 木榄花萼缩合单宁 MALDI-TOFMS 分析 MALDI-TOF 是质谱分析中最常用的确定植物单宁结构单元的方法,能对植物缩合单宁进行快速、简便且准确的结构分析。本研究利用 MALDI-TOFMS 技术对木榄花萼缩合单宁结构单元组成类型进行了快速测定。

对木榄花萼缩合单宁在高浓度的离子化试剂 Cs⁺ 条件下进行 MALDI-TOF 质谱分析,得到该单宁的 MALDI-TOF 质谱图 (图 2)。在木榄花萼缩合单宁的 MALDI-TOF 质谱图中,最主要的离子峰系列是: m/z 998.6, 1286.7, 1574.7, 1862.7, 2151.7, 2439.6, 2727.5, 3015.3, 3303.2, 3591.9, 3879.7, 4167.5, 4455.3, 4744.0。该离子峰系列各相邻离子峰之间的等距间隔为 m/z 288, 该等距间隔显示了构成木榄花萼缩合单宁的黄烷三醇结构单元 (U288) 的质量数。这一主要系列的离子峰是由不同数量的结构单元 U288 构成的均聚物在 MALDI 过程中产生的分子离子峰 $[M + Cs]^+$, 通过计算各聚合物中结构单元 U288 的个数就能得出各聚合物的聚合度。在该条件下, MALDI-TOF 质谱能检测到木榄花萼缩合单宁中从三聚到十六聚体均聚物的存在, 更高聚合度的聚合物没有被检测到。通过研究揭示, 木榄花萼缩合单宁中黄烷三醇聚合物的主要类型是原花青定, 在构成上主要是由儿茶素和表儿茶素结构单元通过 C—C 聚合而成。木榄花萼缩合单宁的平均聚合度由 MALDI-TOF 质谱测定的值为 7.5, 平均分子质量为 2081.60 u。

2.1.2 花青定粗产品的 HPLC 图谱分析 利用 HCl-正丁醇法对木榄花萼缩合单宁进行了酸解转化得到花青定粗产品, HPLC 分析实验结果见图 3。由 HPLC 图谱分析可知, 木榄花萼缩合单宁结构单元主要是儿茶素/表儿茶素 (C/EC), 其降解产物主要为花青定, 与 MALDI-TOF 质谱分析结果相一致。

2.2 木榄花萼缩合单宁制备花青定粗产品的条件研究

不同的反应时间、含水量及反应物质量浓度对花青定粗产品中花青定纯度的影响见图 4。由图 4 可以看出, 转化产物中花青定纯度与酸解转化反应时间之间关系复杂。当反应时间为 30 和 75 min 时花青定纯度较高 (分别为 49.00% 和 49.69%); 反应体系含水量对花青定纯度影响较大, 是该反应中必须严格控制的关键因素。较低的反应体系含水量会抑制花青定的生成, 并增加副产物的生成量, 因此在采用该方法制备花青定时务必要保证反应系统较高的含水量, 从而减少副产物的生成, 来增大目标产物花青定的纯度; 当缩合单宁样品质量浓度大于 0.2 g/L 时, 缩合单宁样品质量浓度对花青定纯度影响

不大,均能保持较高的花青定纯度(大于 40%)。当缩合单宁样品质量浓度较低时(小于 0.2 g/L)则会抑制花青定的生成,在实际制备过程中应注意控制反应物缩合单宁质量浓度不能太低。将花青定粗产品利用大孔吸附树脂技术进一步纯化,有望将转化产物花青定粗产品中花青定纯度提高到 80% 以上,利用该方法制备花青定,制备工艺简单快捷、原料廉价丰富,得到花青定粗产品中花青定纯度较高。

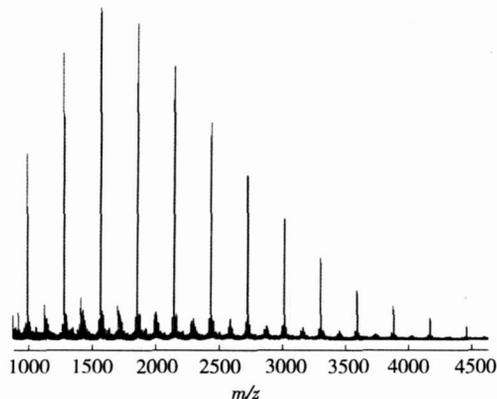


图 2 木榄花萼缩合单宁的 MALDI-TOF 质谱图
[M + Cs]⁺

Fig. 2 MALDI-TOF MS [M + Cs]⁺ of condensed tannins extracted from calyx of *B. gymnorrhiza*

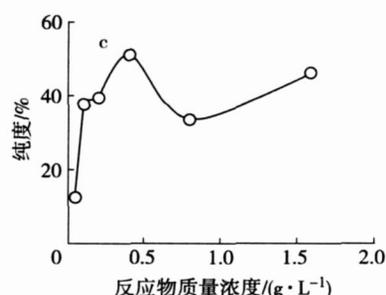
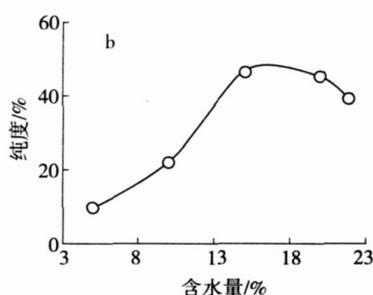
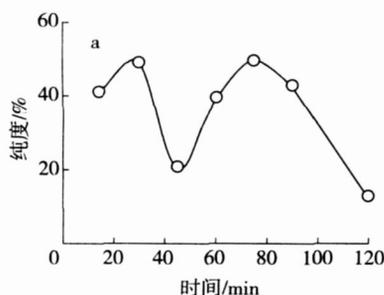


图 4 HPLC 法分析不同因素对转化产物中花青定纯度的影响

Fig. 4 Effects of different factors on purity of cyanidin by HPLC method

2.3 花青定粗产品的抗氧化能力研究

2.3.1 花青定粗产品的自由基清除作用 DPPH·分光测定法,在国内外广泛用于清除自由基物质性质的研究与天然抗氧化剂的筛选^[7-8]。按 1.3.4 节自由基清除率测试方法,对花青定粗产品的自由基清除率进行测定,并以木榄花萼缩合单宁、(+)-儿茶素、抗坏血酸及常用抗氧化剂丁基羟基茴香醚作为对照(表 1)。

较低的自由基半数抑制浓度 (IC₅₀) 值表示更高的自由基清除能力,实验结果如表 1 所示,各样品的 DPPH·清除能力依次为:花青定粗产品 > BHA > (+)-儿茶素 > 抗坏血酸 > 木榄花萼缩合单宁。统计分析发现,花青定粗产品相对于木榄花萼缩

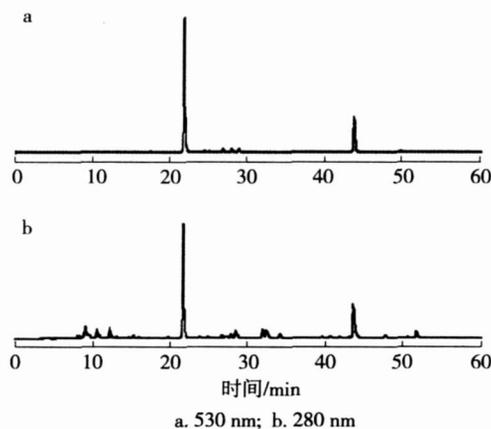


图 3 花青定粗产品的 HPLC 图谱分析

Fig. 3 HPLC chromatograms of crude cyanidin products

表 1 花青定粗产品抗氧化能力测定¹⁾

Table 1 Antioxidant activities of crude cyanidin products

样品名称 samples	IC _{50,DPPH} / (mg·L ⁻¹)	FRAP / (mmol·g ⁻¹)
花青定粗产品 crude cyanidin products	43.889 ± 0.390d	7.718 ± 0.109a
木榄花萼缩合单宁 <i>B. gymnorrhiza</i> condensed tannins	132.627 ± 1.864a	1.827 ± 0.032d
(+)-儿茶素 (+)-catechin	75.433 ± 2.050b	4.343 ± 0.066c
抗坏血酸 ascorbic acid	78.254 ± 1.407b	
丁基羟基茴香醚 butylated hydroxyanisole	57.464 ± 0.974c	7.425 ± 0.137b

1) 同一列中不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$) Different letters show significant differences from each other ($P < 0.05$).

合单宁、(+)-儿茶素、抗坏血酸及人工合成抗氧化剂 BHA 均表现出明显更高的 DPPH·清除能力 ($P < 0.05$)。表明花青定粗产品具有较高的自由基清除能力。

2.3.2 花青定粗产品的 FRAP 测定 结果见表 1。花青定粗产品表现出较高的 FRAP ((7.718 ± 0.109) mmol/g), 是木榄花萼缩合单宁 FRAP ((1.827 ± 0.032) mmol/g) 的 4 倍多, 且明显高于缩合单宁的单体 (+)-儿茶素 ((4.343 ± 0.066) mmol/g), 比人工合成的抗氧化剂 BHA ((7.425 ± 0.137) mmol/g) 表现出更高的抗氧化能力。

花青定粗产品较高的抗氧化和自由基清除能力主要来自花青定。大量研究显示花色素有强的抗氧化活性^[9-10]。首先如同其他植物多酚类物质一样, 花色素被理解为多羟基苯基化合物的抗氧化作用和清除自由基的作用。Kahkonen 等^[9]对植物中普遍存在的 6 种花色素及其糖苷在亚油酸甲酯中的抗氧化活性作过比较。并且, 对于这些化合物对 DPPH·的清除能力也作了研究。发现大多数花色素及其糖苷在这种亚油酸甲酯中显示出强的抗氧化性能。

由 Benzie 等建立的 FRAP 法原理明确, 操作简便, 不需特殊仪器, 易于标准化, 已用于测定不同抗氧化物质、食物与生物样品的抗氧化活性, 但是它所测结果反映的不是样品针对某一种自由基的清除活性, 而是样品总的还原能力, 一些学者因此认为该法测定结果可用来反映样品的总抗氧化活性^[6]。

3 结论

3.1 根据对木榄花萼缩合单宁进行 MALDI-TOF 质谱分析结果, 得到该缩合单宁的化学结构主要为原花青素类型; 在聚合物组成上, 主要是由各聚合程度不同的原花青素的均聚物组成, 构成该缩合单宁的黄烷-3-醇结构单元主要是儿茶素和表儿茶素。木榄花萼缩合单宁的平均聚合度为 7.5, 平均分子质量为 2081.60 u。

3.2 以木榄花萼缩合单宁为原料进行 HCl-正丁醇法酸解转化, 通过控制反应时间 (75 min)、反应体系含水量 (22%) 及反应物缩合单宁质量浓度 (大于 0.2 g/L) 可使所得花青定粗产品中花青定纯度高于 40%。

3.3 花青定粗产品具有较强的自由基清除能力及较高的铁离子还原/抗氧化能力 (FRAP)。

参考文献:

- [1] HARBORNE J B, WILLIAMS C A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(6): 481-504.
- [2] KONG J M, CHAI L S, GOH N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 923-933.
- [3] MA I E N, BEHRENS A, KNICKER H, et al. Changes in the structure and protein binding ability of condensed tannins during decomposition of fresh needles and leaves[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(4): 577-589.
- [4] 向平, 林益明, 林鹏, 等. 基质辅助激光解吸飞行时间质谱分析缩合单宁的阳离子化问题[J]. *分析化学*, 2006, 34(7): 1019-1022.
- [5] BRACA A, TOMMASIN D, BARIL D, et al. Antioxidant principles from *Bauhinia variegata*[J]. *Journal of Natural Products*, 2001, 64(7): 892-895.
- [6] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1): 70-76.
- [7] 陈丛瑾, 黄克瀛, 李德良, 等. 香椿叶提取物清除 DPPH 自由基能力的测定方法[J]. *林产化学与工业*, 2006, 26(3): 69-72.
- [8] 刘夏睿, 王飞. 黑荆树皮原花色素生物活性的研究(英文)[J]. *林产化学与工业*, 2007, 27(3): 43-48.
- [9] KAHKONEN M P, HENONEN M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(3): 628-633.
- [10] BARZAGHIN, GATTI G, CREMA F, et al. Protective effect of cyanidin (KB 1027) against aspirin-induced fall in gastric transmucosal potential difference in normal subjects[J]. *Italian Journal of Gastroenterology*, 1991, 23(5): 249-252.