

文章编号:1673-1689(2005)04-0047-05

葡萄籽原花青素结构单元的红外光谱分析

李春阳, 许时婴, 王璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:对葡萄籽原花青素粗提物及其纯化物的红外光谱分析发现,在 $1\,520\sim 1\,540\text{ cm}^{-1}$ 有一个峰,从而推断其基本结构单元主要为原花青定(即B环为邻苯二酚)。由于采用体积分数30%乙醇洗脱纯化物除原花青素外还含有一定量的酚酸,而体积分数50%和70%乙醇洗脱纯化物以原花青素(结构单元主要为花青定)为主,因此乙醇洗脱纯化物的红外光谱图在 $1\,380\sim 1\,100\text{ cm}^{-1}$ 和 $750\sim 850\text{ cm}^{-1}$ 有一定差别,而体积分数70%和50%的乙醇洗脱纯化物红外光谱图比较相近,仅在 $1\,000\sim 1\,200\text{ cm}^{-1}$ 处有细微差别。将葡萄籽原花青素在热酸条件下进行醇解,用LC-MS测定其醇解后的基本结构单元,结果表明葡萄籽原花青素醇解产物为矢车菊素,从而证明葡萄籽原花青素基本结构单元为花青定,这与其红外光谱图特征峰的推断相吻合。

关键词:葡萄籽;原花青素;红外光谱;原翠雀定;原花青定

中图分类号:S 663.1

文献标识码:A

The Analysis of the Infrared Spectra of Grape Seed Proanthocyanidins

LI Chun-yang, XU Shi-ying, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: By analysis of the Infrared Spectra of crude proanthocyanidin and purified proanthocyanidin extracted from grape seed, a single peak at $1\,520\sim 1\,540\text{ cm}^{-1}$ region was observed, which could be used to verify the fact that, the basic structural unit of grape seed proanthocyanidin mainly contains two hydroxyls on B ring. Meanwhile, there are some difference between purified extract No. 1 (the elutes in big hole resin by 30% ethanol) and the purified extract No. 2 (the elutes in big hole resin by 50% ethanol) or No. 3 (the elutes in big hole resin by 70% ethanol) in the Infrared Spectra of $1\,380\sim 1\,100\text{ cm}^{-1}$ and $750\sim 850\text{ cm}^{-1}$. The purified extracts No. 1 possessed some phenolic acid, which has different structure from proanthocyanidin, the purified extracts No. 2 and No. 3 are all proanthocyanidin with the basic structural unit of procyanidin. The infrared spectra of purified extract No. 2 and No. 3 is very similar except little difference in the $1\,000\sim 1\,200\text{ cm}^{-1}$ region. The result of depolymerization of the grape seed proanthocyanidin under hot acidic alcohol and analysis with LC-MS, showed that they are all cyanidins. The result verified that the basic structural unit of grape seed proanthocyanidin is cyanidin. That is consistent with the conclusion deduced from the infrared characteristic peaks.

收稿日期:2004-11-06; 修回日期:2005-03-02.

作者简介:李春阳(1966-),男,河北秦皇岛人,食品科学与工程博士研究生。

Key words: grape seed; infrared spectra; procyanidin; prodelphinidin

原花青素(proanthocyanidin)是指从植物中分离出来,广泛存在于自然界的黄烷-3-醇类化合物及其聚合物,其结构通式见图1.植物中原花青素常常是聚合度不同的混合物^[1],含有多种同分异构体,各组分间性质接近^[2],不易分离.葡萄籽原花青素主要以花青定和翠雀定两种基本结构单元为主,经聚合而成多聚物.花青定和翠雀定的区别在于其B环分别为邻苯二酚和连苯三酚结构,其含量和比例变化会使葡萄籽原花青素的性质产生一定差异^[3].定性研究葡萄籽原花青素结构单元花青定和翠雀定的红外特征光谱图,可以初步判断两者在原花青素中的比例以及原花青素的性质和特征^[4].

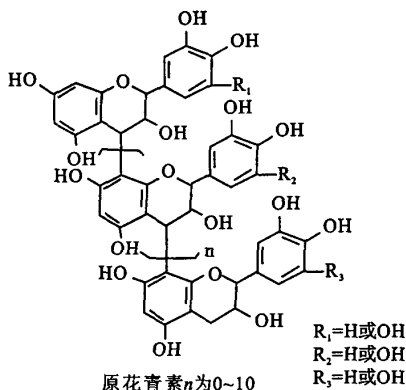


图1 原花青素结构通式

Fig.1 Proanthocyanidins structural formula

20世纪40年代,马斯魁勒博士最先从花生仁的包衣中提取出原花青素,后又发现法国海岸的树皮中也含有大量的原花青素^[5].20世纪70年代,一些学者将研究目光投向葡萄籽,发现葡萄籽含有丰富的原花青素,并对其提取工艺、结构、性质和功能进行了研究.据报道,低聚原花青素(oligomeric proanthocyanidins)具有强大的抗氧化性,在体内抗氧化、清除自由基的能力分别是VE的50倍和VC的20倍^[6],一般将葡萄籽原花青素作为功能性成分添加于药品或保健食品中.目前,国外利用色谱法对原花青素的提取、分离、纯化,以及单体结构研究较多,而用红外光谱法对原花青素进行定量和定性研究较少,国内尚未见报道.由于葡萄籽原花青素的结构复杂,仅发现的原花青素二聚体就有8种同分异构体,且其性质十分接近,因此很难通过分离纯化获得单一结构的原花青素,得到的只能是具有相对分子质量分布范围的原花青素聚合体.对于聚合度差异较大、同分异构体较多的原花青素

来说,人们很难通过分离纯化获得聚合度、单元结构以及单元键合方式相同的原花青素,因此需采用简便易行的方法测定和判断原花青素的基本单元结构.国外利用红外光谱法对基本结构单元不同的聚原花青素进行了一定的研究^[4],根据原花青素基本结构单元中花青定和翠雀定所占比例多少,将其红外谱图划分为5种类型,用于原花青素所含单元结构类型的定性判断.作者对红外光谱法分析葡萄籽原花青素结构单元的组成进行了初步探讨和研究.该方法操作过程简单,有一定的应用价值.

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄籽:秦皇岛华城葡萄酒有限公司提供;原花青素标样:天津尖峰天然产物研究开发公司提供;HP-2MGL大孔吸附树脂:日本三菱公司产品;化学试剂:甲醇、乙醇、盐酸、香草醛均为分析纯.

富立叶变换红外光谱仪 Nicolet Nexus FT-IR spectrometer Thermo Electron Corporation

1.2 方法

1.2.1 葡萄籽原花青素的提取 称取100 g真空干燥葡萄籽,用中药粉碎机粉碎后,加入体积分数70%乙醇进行提取,浓缩后即得原花青素粗提液,再经喷雾干燥可得原花青素粗粉(也有人称之为葡萄籽提取物、葡多酚).

1.2.2 葡萄籽原花青素的纯化 将HP-2MGL大孔吸附树脂用乙醇浸泡、酸洗、碱洗,再用去离子水洗至中性,然后装柱(26 mm×800 mm).控制流速1.0 mL/min,用去离子水将大孔树脂柱平衡后,将一定浓度的葡萄籽提取物水溶液加入柱中.待大孔树脂吸附达到饱和后,分别用去离子水,体积分数30%、50%、70%的乙醇洗脱.分别收集不同体积分数的乙醇洗脱物,真空浓缩、冻干,得到葡萄籽原花青素纯化物1、纯化物2、纯化物3,备用.

1.2.3 葡萄籽原花青素的红外扫描光谱分析 取1~2 mg葡萄籽原花青素,加入200 mg KBr混匀,在玛瑙研钵中研磨、压片.在红外光谱仪中先对纯KBr薄片进行背景扫描,然后再对含有样品的KBr薄片进行扫描,得到葡萄籽原花青素的红外光谱图.

1.2.4 葡萄籽原花青素醇解产物的LC-MS分析 葡萄籽原花青素醇解产物的测定:用体积分数50%的甲醇盐酸溶液(浓盐酸体积分数17%),在超

声波作用下溶解葡萄籽粗提粉 20 min,离心,微孔膜($0.45\ \mu\text{m}$)过滤。将滤液在 $(100\pm 2)\ ^\circ\text{C}$ 醇解 60 min,迅速冷至室温,微孔过滤,然后进行 LC-MS 分析测定。

色谱柱: Lichrospher C_{18} $4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$; 流动相: 甲醇-水-0.1%乙酸,梯度洗脱;柱温: $30\ ^\circ\text{C}$; 流量: $0.3\ \text{mL/min}$; 进样量: $10\ \mu\text{L}$ 。二极管阵列检测器,扫描波长 $200\sim 800\ \text{nm}$ 。质谱条件: 离子方式 EIS-;毛细管电压: $3.88\ \text{kV}$ (EIS+);堆孔电压: $38\ \text{V}$;离子源温度: $120\ ^\circ\text{C}$;脱溶温度: $250\ ^\circ\text{C}$; m/z $200\sim 1500$;光电倍增电压: 650 ;载气体积流量: $4.2\ \text{L/h}$ 。

2 结果与讨论

2.1 葡萄籽原花青素粗提物和纯化物的红外光谱分析

葡萄籽原花青素粗提物经大孔吸附树脂吸附后,依次用体积分数 30%、50%、70% 的乙醇洗脱,分别得到葡萄籽原花青素纯化物 1、纯化物 2、纯化物 3,用富立叶变换红外光谱仪对葡萄籽原花青素粗提物和上述 3 种原花青素纯化物的红外光谱进行分析。

由图 2 可以看到,葡萄籽原花青素的特征骨架振动主要集中在 $1\ 000\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 和 $700\sim 850\ \text{cm}^{-1}$ 区域,纯化物 2 和纯化物 3 的红外谱图比较接近,其主要原因是由于纯化物 2 和纯化物 3 的原花青素含量较高,两者的原花青素基本结构单元构成相似,其特征骨架振动的红外图谱差异较小。

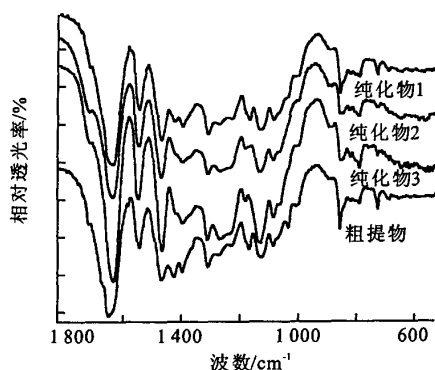


图 2 葡萄籽原花青素粗提物和纯化物的红外光谱图

Fig. 2 The IR spectra of crude and purified proanthocyanidin extracted from grape seed

将葡萄籽原花青素纯化物 1 与纯化物 2 和纯化物 3 的红外光谱图进行比较发现,纯化物 1 在 $1\ 100\sim 1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 和 $750\sim 850\ \text{cm}^{-1}$ 骨架特征振动区域,出现峰的数量和峰的形状与纯化物 2 和纯化物 3 有

万方数据

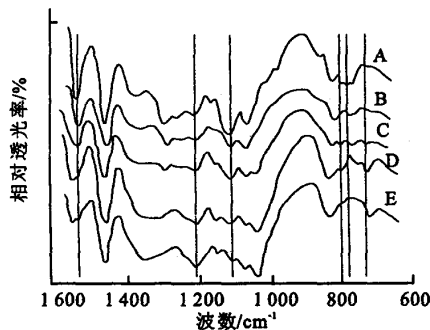
所不同。其主要原因是,葡萄籽原花青素含有较多的羟基,与大孔树脂结合较为紧密,体积分数为 30% 的乙醇洗脱能力较弱,洗脱物中含有酚酸、儿茶素、表儿茶素及低聚原花青素,而体积分数为 50% 和 70% 的乙醇洗脱能力较强,可以将大部分原花青素洗脱出来,因此纯化物 2 和纯化物 3 主要是原花青素类物质。由于香豆酸、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸等酚酸物质不含有 B 环,其特征骨架振动与原花青素有所不同,因此纯化物 1 与纯化物 2 和纯化物 3 的红外图谱有一定差别。而 50% 和 70% 乙醇洗脱物的差别主要在于其原花青素构成和聚合度的不同,由于两者的结构单元都是以原花青定为主,所以纯化物 2 和纯化物 3 的红外图谱十分相似。

2.2 葡萄籽原花青素粗提物和纯化物红外图谱的理论解释

原花青素在红外光谱特征振动频率与其结构相关,其 B 环羟基的数量变化对原花青素的红外光谱有直接影响。在芳环骨架伸缩振动特征区域, B 环含有 3 个羟基的翠雀定(如从 *Ribes nigra*, *R. sanguineum* 和 *Lotus pedunculatus* 分离出的以翠雀定为主的聚原花青素),在 $1\ 540\sim 1\ 520\ \text{cm}^{-1}$ 强振动频率区有两个峰,而含有两个羟基的花青定(如从 *Vaccinium oxycoccos* 和 *Cydonia oblonga* 分离出的以花青定为主的聚原花青素),在 $1\ 520\sim 1\ 535\ \text{cm}^{-1}$ 区域只有一个峰。通过对 26 种聚原花青素红外光谱与其结构的相关性研究表明^[4],当原花青素聚合体中翠雀定结构单元含量超过 60% 时,在其红外光谱 $1\ 520\ \text{cm}^{-1}$ 处有两个峰;当聚合体中翠雀定结构单元质量分数(如来自 *Pinus radiata* phloem 含 48% 翠雀定结构单元)低于花青定的质量分数,则其红外光谱在 $1\ 520\ \text{cm}^{-1}$ 处只有一个峰。B 环的羟基变化也反映在 $780\sim 730\ \text{cm}^{-1}$ 低频指纹区即芳香环的不饱和 C—H 面外变形振动产生的吸收,以花青定为主的聚原花青素面外变形振动频率较高,在 $780\sim 770\ \text{cm}^{-1}$ 区域有显著的强吸收谱带,而以翠雀定为主的聚原花青素面外变形振动频率较低,在 $730\ \text{cm}^{-1}$ 附近有显著的强吸收谱带。

根据对 26 种聚原花青素的研究,可将其红外吸收光谱分为 5 类(即 A、B、C、D、E),见图 3(原花青素类别参考)。A 类是以原花青定为主的聚原花青素,结构单元为顺式(主要是表儿茶素);B 是以原花青定为主的聚原花青素,结构单元有顺式和反式(主要为等量的儿茶素和表儿茶素);C 是由原花青定和翠雀定混合的聚原花青素,结构单元有顺式和反式(主要为表儿茶素、表儿茶素与一定比例的

儿茶素、槲儿茶素);D是以翠雀定为主的原花青素,结构单元为顺式(主要为表槲儿茶素);E是以翠雀定为主的原花青素,结构单元为反式(主要为槲儿茶素)。



A和B:以原花青定为主
C:原翠雀定和原花青定各约占50%
D和E:以原翠雀定为主

图3 原花青素红外图谱类别参考

Fig. 3 The IR spectra of different kind of proanthocyanidin polymer

将葡萄籽原花青素粗提物、纯化物与5类(A、B、C、D、E)聚原花青素的红外光谱进行比较,可以发现:葡萄籽花青素粗提物、纯化物的红外谱图与原花青素A类红外图谱较为相似,在 $1520\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ 处有一个单峰,在 $780\sim 770\text{ cm}^{-1}$ 处有较多的显著特征峰,由此推断:葡萄籽提取纯化物是以原花青定为主要结构单元的原花青素(主要为顺式表儿茶素),原翠雀定含量较少。在葡萄籽原花青素提取和纯化过程中,其原花青定、原翠雀定的比例变化不大,没有翠雀定的大幅增减,只是以花青定基本结构单元的聚原花青素含量提高。同时,也说明葡萄籽原花青素B环(芳香环)及其羟基在骨架伸缩振动区域 $1500\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 处和低频指纹区域 $730\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 处有很强的吸收,具有显著的特征峰。在此区域原花青素的红外光谱受杂质的影响和干扰较小,即使葡萄籽原花青素粗提物(原花青素质量分数 $>40\%$)也可以看到明显的红外特征吸收。

2.3 葡萄籽原花青素醇解产物 LC—MS 的分析和测定

为进一步验证葡萄籽原花青素的主要结构单元为原花青定即B—环含有两个羟基,将其进行醇解使之完全转化为花色素(反应式见图4),然后在 525 nm 波长下对醇解后的产物进行HPLC检测分析。由图5可见,醇解产物的色谱图只有1个主要的峰,其面积约占总面积的95%以上,说明原花青素醇解产物只含有一种主要的花色素。

万方数据

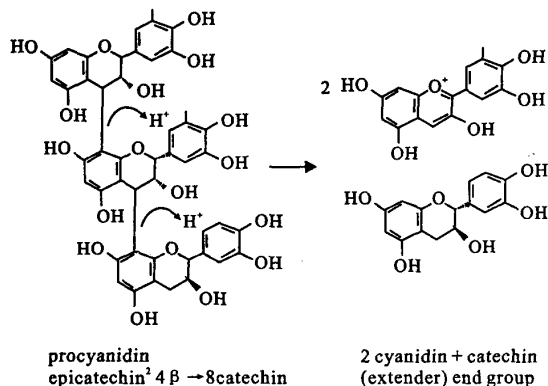


图4 原花色素在热酸醇处理下产生花色素的反应

Fig. 4 The cyanidin reaction of proanthocyanidin under acidic alcohol depolymerization

为了对该花色素进一步定性、确定其相对分子质量,采用LC—MS进行了分析。由图6(a)可见, 11.95 min 出现一主要的峰;对该峰进行波长扫描,发现其在 $227, 277, 536\text{ nm}$ 波长处有最大吸收,见图6(b);其正离子(M^+)为 287 ,负离子(M^-)为 285 ,见图6(c)和图6(d);通过选择分子离子峰,发现 M^+ 287 出峰时间为 12.10 min , M^- 285 出峰时间为 12.07 min 。根据以上分析和判断,可以确定该产物为矢车菊素,相对分子质量为 286 ,也就是说葡萄籽原花青素水解产物主要为矢车菊素(cyanidin,见图4和图6),其B—环上含有两个羟基,从而证明葡萄籽原花青素主要结构单元为原花青定,正好与葡萄籽原花青素红外光谱图特征峰的推断结果相吻合。

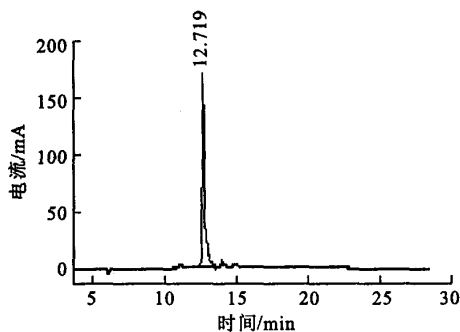


图5 葡萄籽原花青素醇解产物色谱分析

Fig. 5 LC of depolymerized products of grape seed proanthocyanidin under acidic alcohol

3 结论

原花青素B环上羟基的数量变化对原花青素的红外光谱有直接影响。当B环上有3个羟基时(即原花青素为槲儿茶素类物质或原翠雀定类化合

物),其红外光谱在 $1\ 520\sim 1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 处有两个峰; 当

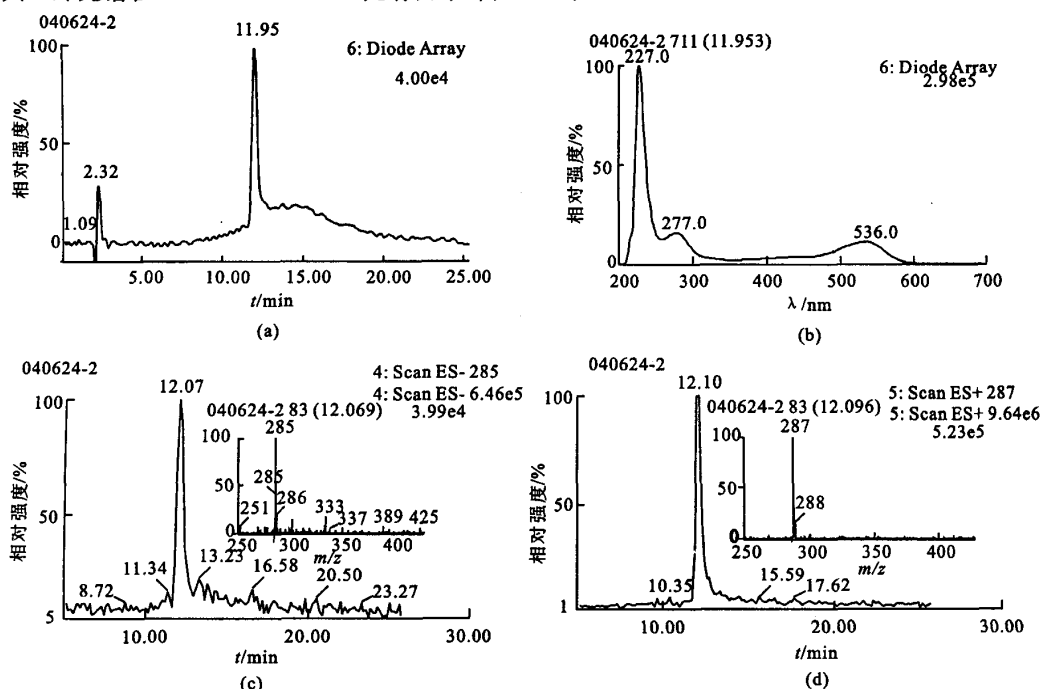


图6 葡萄籽原花青素水解产物的 LC—MS 图(正、负离子选择离子峰)

Fig. 6 LC—MS of depolymerized products of grape seed proanthocyanidin under acidic alcohol

B 环上有两个羟基时(即原花青素为儿茶素类物质或原花青定类化合物),则有一个单峰。葡萄籽原花青素粗提物(原花青素质量分数 $>40\%$)和纯化物在 $1\ 520\sim 1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 处有一个峰,因此可以推测葡萄籽原花青素基本结构单元主要为原花青定,其原翠雀定的含量较少。

葡萄籽原花青素大孔树脂纯化物 1(即体积分数为 30% 乙醇洗脱物)与纯化物 2、3(即体积分数为 50% 、 70% 乙醇洗脱物)的红外谱图有一定差别,纯化物 2、3 的红外谱图差别较小。其主要原因:体

积分数为 30% 乙醇洗脱物中含有一定量的酚酸,其结构与原花青素结构有较大差异,体现在 $1\ 380\sim 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ 和 $750\sim 850\ \text{cm}^{-1}$ 区域的红外光谱特征峰与纯化物 2、3 有所不同;体积分数为 50% 和 70% 乙醇洗脱物主要为原花青素。由于纯化物 2 和 3 的结构单元以原花青定为主,所以两者的红外图谱比较相似。

葡萄籽原花青素在热酸条件下水解产生花色素,利用 LC—MS 对花色素进行分析测定,确定为矢车菊素,从而证明葡萄籽原花青素主要结构单元为花青定即其 B-环上含有两个羟基。

参考文献:

- [1] Harborne J B, Mabry T J. The Flavonoids; advances in research since 1986[M]. London: Chapman and Hall, 1993.
- [2] Lunte S M, Blankenship K D, Read S A. Detection and identification of procyanidins and flavonols in wine by dual-electrode liquid chromatography-electrochemistry[J]. *Analyst*, 1988, 113: 99—102.
- [3] Fool Y, Porter L. Some recent advances in the chemistry of condensed tannins(proanthocyanidin polymers) relevant to their use as industrial[J]. *Appita*, 1986, 39(6): 477—480.
- [4] L Y Fool. Proanthocyanidins: Gross chemical structures by infrared spectra[J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(6): 1397—1402.
- [5] Masquelier J, Michaud J, Laparra J, et al. Flavonoids and pycnogenols[J]. *Internat J Vit Nutr Res*, 1970, 49, 307—311.
- [6] Wood Jacqueline E, Senthilmohan Senti T, Peskin Alexander V. Antioxidant activity of procyanidin — containing plant extracts at different pH[J]. *Food Chemistry*, 2002, 77(2): 155—161.
- [7] Jaworski A W, Lee C Y. Fractionation and HPLC determination of grape phenolics[J]. *J Agric Food Chem*, 1987.
- [8] BATE-Smith E C, Swain T. Flavonoid Compounds, in Comparative Biochemistry[M]. San Diego: Academic Press, 1962.
- [9] L Lawence, L Hrstich, B Chan. The conversion of procyanidins and prodelpindins to cyanidin and dephinidin[J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(1): 223—230.

(责任编辑:朱明)