

文章编号:1001-6880(2015)1-0011-07

# C18 硅胶制备荔枝果皮原花青素低聚体的组成分析及单体分离

李书艺<sup>1,2</sup>,吴茜<sup>2</sup>,隋勇<sup>2</sup>,孙智达<sup>2\*</sup><sup>1</sup>武汉轻工大学食品科学与工程学院,武汉 430023;<sup>2</sup>华中农业大学食品科学技术学院 环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

**摘要:**为更快速地从荔枝果皮中分离制备纯度更高的A型原花青素低聚体,本研究在传统大孔树脂富集纯化的基础上,利用C18硅胶填料对制备方法进行了优化。通过组分分析和HPLC、LC-MS鉴定可知,新法制得的荔枝果皮原花青素低聚体(Litchi pericarp oligomeric procyanidins,LPOPC)总酚含量高达 $940 \pm 123 \text{ mg/g}$ ,且主要为(-)-表儿茶素、A型原花青素二聚体和三聚体,相对含量分别占44.86%、36.02%和9.86%,平均聚合度约为1.62。因此,当再次通过Toyopearl HW-40s凝胶对提取物进行柱层析分级时,可得到纯度较高的已知A型原花青素二聚体和三聚体。等辐射分析法(Isobologram)结果显示,该A型二聚体和三聚体均可清除自由基,并呈现出协同抗氧化性。

**关键词:**荔枝果皮;A型原花青素低聚体;C18硅胶;抗氧化

中图分类号:TS264.4

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.002

## Purification and Analysis of Litchi Pericarp Oligomeric Procyanidins

LI Shu-yi<sup>1,2</sup>, WU Qian<sup>2</sup>, SUI Yong<sup>2</sup>, SUN Zhi-da<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;<sup>2</sup>Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** In order to obtain A-type oligomeric procyanidins from litchi pericarp with higher purity, C18 silica gel column was used to optimize the traditional preparation process, which was purified and enriched by using AB-8 macroporous resin. According to the component analysis, HPLC and LC-MS identification of litchi pericarp oligomeric procyanidins (LPOPC) prepared by C18 silica gel, the total phenol content of LPOPC was up to  $940 \pm 123 \text{ mg/g}$ , in which (-)-epicatechin monomer, A-type procyanidin dimer and trimer played an important role, occupying 44.86%, 36.02% and 9.86%, respectively. The average polymerization degree of the new LPOPC was about 1.62. Consequently, the known A-type procyanidin oligomers, such as procyanidin A2 and trimer, epicatechin-(4 $\beta$ - $\rightarrow$ 8, 2 $\beta$ - $\rightarrow$ O- $\rightarrow$ 7)-epicatechin-(4 $\beta$ - $\rightarrow$ 8)-epicatechin, can be isolated from the LPOPC more efficiently by Toyopearl HW-40s column. In addition, the isobogram analysis suggested that the purified A-type procyanidin dimer and trimer all possessed strong radical scavenging capacities, and showed synergistic antioxidant effect.

**Key words:** litchi pericarp; A-type procyanidin oligomer; C18 silica gel; antioxidant

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.),为无患子科常绿乔木,也是我国南方重要的水果农作物。研究表明,除了味美可口的果肉,荔枝的花、果皮和果核均具有抗氧化活性<sup>[1-3]</sup>;特别是荔枝果皮,其色泽鲜艳,占果肉鲜重15%,产量颇为丰富。课题组前期研究发现<sup>[4,5]</sup>,荔枝果皮经过醇提、浓缩、AB-8大孔树脂富集和乙酸乙酯萃取后可得到纯度较高的原花青素低聚体(Litchi pericarp oligomeric procyanidins,

LPOPC)。LPOPC中同时含有A-和B型原花青素,延伸单元和末端单元为表儿茶素,通过4 $\rightarrow$ 8, 2 $\beta$ - $\rightarrow$ O- $\rightarrow$ 7或4 $\rightarrow$ 6, 4 $\rightarrow$ 8连接而成,以A型原花青素低聚体为主<sup>[2]</sup>。然而,当利用上述纯化方法结合Toyopearl柱层析分级制备典型的A型原花青素二聚体{表儿茶素-(4 $\beta$ - $\rightarrow$ 8, 2 $\beta$ - $\rightarrow$ O- $\rightarrow$ 7)-表儿茶素}和三聚体{表儿茶素-(4 $\beta$ - $\rightarrow$ 8, 2 $\beta$ - $\rightarrow$ O- $\rightarrow$ 7)-表儿茶素-(4 $\beta$ - $\rightarrow$ 8)-表儿茶素}时,周期较长,费时费力。且提取物中含有的少量B型原花青素与同等聚合度的A型原花青素相比,仅单元连接键之间少了一个C-O-C键,分子量差距为2,难以通过凝胶色谱分离。为

此,本文将对原有的纯化方法进行优化改进:用 C18 硅胶柱材料替代原来的 AB-8 大孔树脂纯化,甲醇洗脱取代乙醇洗脱分离,其他步骤仍保持不变。这样,既可使 A- 和 B-型原花青素达到完全分离的目的,又可快速制备纯度更高、聚合度更低的 A-型原花青素低聚体。在此基础上,通过等辐射分析法(即 Isobogram 法)评价了所得 A-型原花青素二聚体和三聚体的协同抗氧化能力,对探究原花青素的结构与抗氧化活性之间的构效关系具有特殊意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

荔枝品种为妃子笑(*Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao),2012 年 6 月采自广州。选取色泽鲜艳,果形匀称,未受机械损伤的果实,取其皮于-20℃下保存。

### 1.2 主要试剂与仪器

试剂:(-)-表儿茶素、(+)-儿茶素、DPPH(美国 Sigma 公司);福林酚试剂(美国 Sigma 公司分装);甲醇,乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);High Techsil-C18 硅胶填料(苏州汇通色谱分离纯化有限公司分装);Toyopearl HW-40s 凝胶填料(日本 Tosoh 公司);其他化学试剂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。仪器:UV-2100 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);LC-MS<sup>n</sup> 1100 series 液质联用仪(美国 Agilent 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 荔枝果皮原花青素粗提物的制备

称取 100±0.5 g 粉碎后的荔枝果皮,在 70% 的乙醇溶液中(料液比 1:15, W/V)50 ℃水浴避光浸提 90 min。提取结束后抽滤除去壳渣,滤液于旋转蒸发仪内 40 ℃减压回收乙醇,残留的水溶液为荔枝果皮原花青素的粗提物。

#### 1.3.2 荔枝果皮原花青素的纯化

将上述粗提液 100 mL 用滴管缓慢加入 C18 硅胶层析柱(3×2.5 cm, 5 μm)中,给予泵压力,控制洗脱液流速约 50 mL/min。待吸附完全后,采用 5 倍柱体积的蒸馏水和等体积的 90% 甲醇分步洗脱处理,前者以去可溶性糖和其它小分子化合物,后者通过下接锥形瓶予以收集。然后,40 ℃减压旋蒸除去收集液中的甲醇,余下水溶液用 3 倍体积乙酸乙酯萃取。再合并有机相,旋蒸除去有机溶剂,残留液复溶于蒸馏水后冷冻干燥即为优化制备的荔枝果皮

原花青素低聚体(以下简称 LPOPC)。

#### 1.3.3 LPOPC 总酚含量的测定

##### 1.3.3.1 标准曲线绘制

采用 Folin-Ciocalteu 法测定上述 LPOPC 中的总酚含量<sup>[6]</sup>。以没食子酸溶液为标准品绘制标准曲线:分别取浓度为 0、0.05、0.1、0.125、0.25、0.5 mg/mL 的标准溶液 0.1 mL 加至 6 mL 蒸馏水中,混合后加入 1 mL 福林酚试剂,均匀混合 30 s 后静置 8 min,然后加入 1.5 mL 20% 碳酸钠溶液,定容至 10 mL。室温下避光放置 2 h 后,765 nm 下比色。以标准溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为  $Y = 0.0013X + 0.0189, R^2 = 0.9909$ 。

##### 1.3.3.2 样品测定

配制 0.3 mg/mL 样品溶液,按标曲制作步骤进行操作,根据标曲回归方程计算出样品中的总酚含量(mg/g),平行操作三次,取平均值。

#### 1.3.4 LPOPC 的低聚体组成成分分析

取一定量冻干样品溶于甲醇配成 0.5 mg/mL 溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤后进行组分分析。使用 Agilent 1100 Series LC/MSD Trap 液质联用仪,配有二元梯度泵,二极管阵列(DAD)检测器,柱温箱和自动进样器。

色谱条件:色谱柱为 VP-ODS C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 28 ℃;流动相:A 为 0.4% 的醋酸水溶液,B 为乙腈;洗脱梯度:0~40 min, 5%~35% B;40~45 min, 35%~50% B;45~50 min, 50%~80% B;50~55 min, 80%~5% B,然后柱平衡 10 min;流速 1 mL/min;检测波长 280 nm;进样量 20 μL。

质谱条件:离子源,电喷雾(ESI);压力,30 psi;干燥气,N<sub>2</sub>;载气温度,325 ℃;载气流速,12 mL/min;监测模式,MRM,负离子模式;离子扫描范围,100~1200 m/z;关注分子量,500 m/z;同步进行二级破碎。

#### 1.3.5 LPOPC 平均聚合度的计算

根据 LPOPC 中主要低聚体的聚合度和其相对含量,可推算出 LPOPC 的近似平均聚合度,公式如下:

$$\frac{mDP}{A_{Catechin} + A_{Epicatechin} + A_2 \times 2 + A_3 \times 3 + A_4 \times 4} = \frac{A_{Catechin} + A_{Epicatechin} + A_2 + A_3 + A_4}{A_{Catechin} + A_{Epicatechin} + A_2 + A_3 + A_4} \quad (1)$$

式中: A<sub>Catechin</sub> 为儿茶素的百分含量(%);

$A_{\text{Epicatechin}}$  为表儿茶素的百分含量(%) ;  $A_2$  为原花青素二聚体的百分含量(%) ;  $A_3$  为原花青素三聚体的百分含量(%) ;  $A_4$  为原花青素四聚体的百分含量(%)。

### 1.3.6 A-型原花青素二聚体和三聚体的制备

采用 Toyopearl HW-40s 凝胶柱(200 mm × 16 mm, 30 μm, 适用分子量范围 100 ~ 1000), 对 C18 纯化工艺所得的 LPOPC 进行了分级。将 100 mg LPOPC 溶于 3 mL 甲醇中, 上样前先经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。洗脱液为甲醇, 流速为 0.8 mL/min, 上样后每 6 min 收集一管。洗脱液经紫外检测仪 280 nm 处比色后将吸光度值记录在对应的仪器上。合并相同出峰位置的试管, 减压除去甲醇, 冷冻干燥, 得到不同聚合度的黄烷醇组分<sup>[7]</sup>。对各组分进行质谱解析确定其种类后(方法同 1.3.4), 可通过归一化法计算目标化合物的纯度。

### 1.3.7 Isobogram 法分析 A-型原花青素二聚体、三聚体的相互作用

#### 1.3.7.1 二聚体、三聚体清除 DPPH 自由基的能力

DPPH<sup>·</sup> 是一种稳定的大分子自由基, 在乙醇中呈紫色。当抗氧化剂与 DPPH<sup>·</sup> 反应时, 紫色逐渐消失, 通过测定吸光值可计算清除率。清除率反映了抗氧化剂对 DPPH<sup>·</sup> 的清除能力, 通常表示为半数抑制率浓度  $IC_{50}$ , 即清除率为 50% 时抗氧化剂的浓度。 $IC_{50}$  值越小, 提取物清除自由基的能力越强<sup>[8]</sup>。

准确配制 1 mg/mL 上述 A-型原花青素二聚体和三聚体水溶液, 将母液分别稀释 10 倍和 100 倍得到 100 μg/mL 和 10 μg/mL 样品溶液。再取不同体积样液定容至 2 mL, 加入 DPPH 乙醇溶液后, 混匀, 在室温下避光反应 30 min, 于 515 nm 处比色。空白组以等体积无水乙醇代替 DPPH<sup>·</sup>, 对照组以等体积蒸馏水代替样品, 平行测定 3 次, 计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_0$  为对照组吸光值;  $A_i$  为样品组吸光值;  $A_j$  为空白组吸光值。

#### 1.3.7.2 二聚体、三聚体复配物清除 DPPH 自由基的能力

选择 3 组浓度, 即将 A-型原花青素二聚体和三聚体的浓度比固定为 1:4、1:1.5、1:0.5, 且每组确定固定比例浓度设计使各自计算出的清除率在 10% ~ 100% 范围内均匀分布。化合物按固定比例

混合后, 以 1.3.7.1 的方法测定复合抗氧化剂对 DPPH<sup>·</sup> 的清除作用, 计算复配组的  $IC_{50}$  值。

### 1.3.7.3 构建二聚体、三聚体复配后的 Isobogram 分析图

等辐射分析法(Isobogram) 常用于研究药物相互作用, 选取两种能产生类似效应的药物, 用等辐射图分析之间的相互作用<sup>[9]</sup>。将 DPPH<sup>·</sup> 清除实验中得到的二聚体  $IC_{50}$  值和 95% 可信限标绘在横轴上, 三聚体的  $IC_{50}$  值和 95% 可信限标绘在纵轴上, 连接横纵轴两  $IC_{50}$  值构成相加线, 连接两可信限构成相加线 95% 可信限。如果复配组的效应点落在相加线上或可信限内, 则表示两种抗氧化剂的相互作用为相加, 如果落在相加线及可信限下方则表示相互作用为协同作用, 如果落在相加线及可信限上方则表示相互作用为拮抗作用<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荔枝果皮原花青素低聚体 LPOPC 的组成分析

Folin-Ciocalteu 法测定的结果显示, C18 硅胶替代 AB-8 大孔树脂纯化荔枝果皮原花青素提取物后, 所制得的 LPOPC 中总酚含量显著提升, 达到 940 ± 123 mg/g<sup>[4]</sup>。表明此法确实可以达到优化提取的效果, 故通过 HPLC 和 LC-MS 联合对 LPOPC 的组成成分进行了进一步的验证和分析。

图 1 为 LPOPC 在波长 280 nm 处的液相色谱图, 从图中不难看出, 提取物主要由 12 个不同极性的组分构成。表 1 中罗列了几种 A- 和 B-型原花青素低聚体的典型结构碎片信息, 可作为对 LPOPC 中各组分结构解析的依据。如表 1 所示, (+)-儿茶素和(-)-表儿茶素的分子离子 [M-H]<sup>-</sup> 为 289 m/z, 结合标准品的保留时间信息, 分别对应为图 1 中的峰 1、峰 2。B-型原花青素二聚体, 分子离子 [M-H]<sup>-</sup> 为 577 m/z, 对应二级碎片 451、425、407 和 289 m/z, 通过杂环裂解脱去间苯三酚(heterocyclic ring fission, HRF)、逆狄尔斯-阿德耳(retro-Diels-Alder, RDA) 或同时脱水、醌甲基裂解(quinone methide, QM) 类黄酮连接键等反应产生<sup>[11]</sup>, 故可同时存在多种同分异构体。而 A-型原花青素二聚体与 B-型原花青素二聚体相比, 因连接单元之间增加了一个 C-O-C 酚键, 分子量少 2, 故 [M-H]<sup>-</sup> 为 575 m/z<sup>[12]</sup>; 相应的, 当发生以上相同的裂解反应时, 分别产生质荷比 449、423、289 和 285 m/z 的二级碎片<sup>[13,14]</sup>。A- 和 B-型三聚体的碎片断裂方式同二聚体类似, 不同的是 A-型

原花青素三聚体的裂解通常发生在没有 C-O-C 酯键连接的两个单元之间,  $m/z$  711 和 693 为其 RDA 碎片,  $m/z$  573 和 289 为 QM 裂解产生。基于以上结构特征,结合 LC-MS 分析的结果可知, LPOPC 的每个组分中同时包含了一种或多种黄烷醇化合物(表 2)。其中,共鉴定出 9 种 A-型二聚体、4 种 A-型三聚体和 2 种 B-型二聚体(表 2)。

以色谱图中该组分的峰面积表示其所占的比例,以对应质谱图中各物质的相对丰度表示该物质在该组分中的相对含量,可以对 LPOPC 中各黄烷醇类物质的种类和分布进行初步表征(表 2)。经过比对和计算发现,C18 硅胶制备的 LPOPC 中黄烷醇类物质的含量高达 93.12%,其中 A-型原花青素约占 41.98%,而 B-型仅占 2.31%,主要由 A-型二聚体、三聚体和 B-型二聚体组成。(-)-表儿茶素、A-型二聚体和三聚体的相对含量分别为 44.86%、36.02% 和 9.86%。与 AB-8 纯化法相比较,前者纯化产物中(-)-表儿茶素含量远高于后者,提取物中 B-型原花青素的含量显著降低。这是因为 C18 柱材料为疏水性最强的硅胶基体吸附剂,对非极性的化合物

具有极好的强保留效果<sup>[15]</sup>。A-型原花青素相对于 B-型而言极性更弱,与 C18 表面会结合得更为紧密,故洗脱时较晚被分离。加上实验操作中吸附洗脱的过程应用的是反相色谱分离的原理,只要控制好实验条件,就可以达到除去 B-型,富集 A-型原花青素的目的。同时,根据公式(1),可计算得到 LPOPC 中原花青素的近似平均聚合度仅为 1.62。由此证明,使用 C18 纯化工艺虽然增加了实验操作的价格成本,但在科学的研究中,可以用来快速地制备聚合度更低、组分更简单的 A-型原花青素低聚体,同时也可近乎完全地避免 B-型化合物对分级制备带来的不利影响。

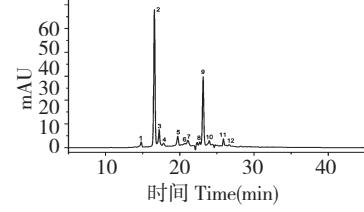


图 1 荔枝果皮原花青素低聚体 LPOPC 的 RP-HPLC 图

Fig. 1 RP-HPLC chromatogram of litchi pericarp oligomeric procyanidins (LPOPC)

表 1 A-和 B-型原花青素低聚体的典型结构碎片

Table 1 Typical structure fragments of A-and B-type procyanidin oligomers

化合物 Compound	分子量 Molecular weight	一级碎片 Parent ion ( $m/z$ )	二级碎片 Product ion ( $m/z$ )
(+)-儿茶素	290	289	245,205
(-)-表儿茶素	290	289	245,205
A-型原花青素二聚体	576	575	449,423,289,285
A-型原花青素三聚体	864	863	711,693,573,423,289
A-型原花青素四聚体	1152	1151	863,711,573,451
B-型原花青素二聚体	578	577	451,425,407,289
B-型原花青素三聚体	866	865	713,695,577,451,407
B-型原花青素四聚体	1154	1153	865,713,577,289

表 2 LPOPC 的组成成分分析(LC-MS 法)

Table 2 Composition of LPOPC by LC-MS analysis

组分 Fraction	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Peak area (%)	主要物质 Main compound	相对丰度 Relative abundance (%)	A-型 A-type (%)	B-型 B-type (%)
P1	14.8	1.15	B-2	100		1.08
			Cat	6.09		
P2	16.6	46.26	Epi	100		
			A-3	3.12	1.4	

P3	17.4	4.41	A - 3	100	4.41	
P4	18	0.69	A - 2	86.99	0.69	
P5	19.7	2.87	A - 2	45.13	1.03	
			A - 3	80.53	1.84	
P6	21	0.9	A - 2	100	0.9	
P7	21.6	1.45	A - 2	100	1.45	
P8	22.8	2.11	A - 2	100	2.11	
P9	23.2	24.93	A - 2	100	23.7	
			B - 2	5.19		1.23
P10	23.9	3.25	A - 2	46.73	1.04	
			A - 3	100	2.21	
P11	26.3	1.93	A - 2	100	1.93	
P12	26.7	3.17	A - 2	100	3.17	
Total		93.12		45.88	2.31	

注:“Cat”为(+) - 儿茶素,“Epi”为(-) - 表儿茶素,“A-2”、“A-3”和“B-2”分别表示 A - 型原花青素二聚体、三聚体和 B - 型原花青素二聚体。

Note: “Cat” and “Epi” were the abbreviations of (+)-catechin and (-)-epicatechin; “A-2”, “A-3” and “B-2” represented A-type procyanidin dimer, A-type procyanidin trimer and B-type procyanidin dimer, respectively.

## 2.2 荔枝果皮中 A - 型原花青素二聚体和三聚体的制备

利用 C18 纯化的 LPOPC 制备 A - 型原花青素二聚体和三聚体。经过凝胶色谱分级后,LPOPC 混合物被分成了 7 个组分,如图 2 所示。样品收集从出峰处开始,合并后进行 HPLC 和 LC-MS 分析。通过与原样的比对,确定后出峰的 5 个组分,即图中标注的 F3 ~ F7 为 LPOPC 中的主要黄烷醇类物质。经质谱鉴定和色谱归一化分析(色谱图均未显示):F3 为(-) - 表儿茶素,纯度 90%;F4 为(+) - 儿茶素,纯度 92%;F6 为原花青素 A2,表儿茶素-(4β → 8,2β → O → 7) - 表儿茶素,纯度 93%;F7 为原花青素 A - 型三聚体,表儿茶素-(4β → 8,2β → O → 7) - 表儿茶素-(4β → 8) - 表儿茶素,纯度 85%。F5 为一种未知的 A - 型原花青素二聚体,纯度 82%。由于在本实验条件下无法得到足够量高纯度的该化合物,故没有对它们进行进一步的结构鉴定。多次重复上样和富集后,回收有机溶剂甲醇,可得到足量的上述已知结构的

A - 型原花青素二聚体和三聚体化合物,以进行后续实验和分析。

## 2.3 A - 型原花青素二聚体和三聚体的抗氧化相互作用

根据公式(2)可计算 A - 型原花青素二聚体和三聚体对 DPPH · 清除率。数据显示,以上二者均具有较强的 DPPH · 清除能力,且在一定范围内,随着浓度的增加,清除率逐渐上升,最大时分别达到 87.7% 和 86.7%,半数抑制率浓度  $IC_{50}$  值依次为 9.34 和 12.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以 A - 型二聚体和三聚体清除自由基的  $IC_{50}$  值为依据,将两者按几组固定比例混合进行复配实验,包括两种抗氧化剂效强含量相当及两种抗氧化剂分别占主导地位的情况,即选择 3 组固定浓度比,分别使其抗氧化效应表现为 1:3、1:1、3:1,以确定新的量效曲线和  $IC_{50}$  值,从而进行统计学分析。由于二聚体和三聚体的  $IC_{50}$  比值为 1:1.4,因此近似选定二聚体和三聚体的复配浓度比为 1:4、1:1.5 和 1:0.5。再将三种固定浓度比例各设计 6 组浓度梯度,分别测定不同比例的复配物对 DPPH · 的清除率,计算相应的  $IC_{50}$  值,结果如表 3 所示。

在表 3 中,每组浓度梯度的复配物对 DPPH · 的清除率均匀地分布在 10% ~ 100% 以内。二聚体和三聚体以 1:4、1:1.5 和 1:0.5 复配后的  $IC_{50,\text{mix}}$  值分别为 10.15、11.01 和 10.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,数据结果符合分析要求,故可利用 Isobogram 分析法确定二者

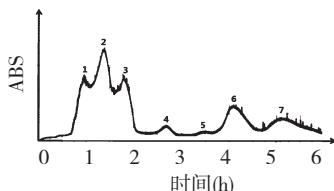


图 2 LPOPC 经 Toyopearl HW-40 s 的分级洗脱图谱

Fig. 2 Elution profile of LPOPC applied to Toyopearl HW-40 s column

之间的相互作用类型。根据 1.3.7.3 中描述的方法构建 Isobogram 分析图(图 3), 横纵坐标分别表示三聚体和三聚体的反应浓度。当二聚体与三聚体的浓度比为 1:4 时,  $IC_{50,A-2}$  值为 2.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $IC_{50,A-3}$  为 8.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 浓度比为 1:1.5 时,  $IC_{50,A-2}$  值为 4.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $IC_{50,A-3}$  为 6.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 浓度比为 1:0.5 时,  $IC_{50,A-2}$  值为 6.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $IC_{50,A-3}$  为 3.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 3)。不难看出, 三个效应点均落在相加线和 95% 可信限下方, 表明 A-型原花青素二聚体和三聚体复配后具有显著的协同抗氧化作用。

研究 A-型原花青素二聚体和三聚体的协同抗

氧化作用, 一方面可以证明抗氧化活性与酚类化合物的羟基数目之间的关系: 即羟基数量越多, 抗氧化能力越强; 另一方面, 可以协助我们了解荔枝果皮 A-型原花青素混合物是如何发挥抗氧化作用的。实验结果证明, 三聚体的抗氧化活性虽仅略高于二聚体, 但二聚体和三聚体之间却存在着显著的协同抗氧化关系, 提示 LPOPC 的高活性极有可能来源于不同聚合度原花青素的相互作用<sup>[16,17]</sup>。同时, 我们还可能利用这种协同效应重组得到一种抗氧化活性远高于原提取物的复配物。在此, Isobogram 分析法为新型复合抗氧化剂的开发提供了重要参考依据<sup>[18]</sup>。

表 3 A-型原花青素二聚体和三聚体复配后清除 DPPH<sup>·</sup>的能力

Table 3 DPPH radical scavenging activities of A-type procyanidin dimer and trimer mixture

比例 Ratio	浓度 Concentration( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		清除率 Scavenging rate (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	二聚体 Dimer	三聚体 Trimer		IC <sub>50,A-2</sub>	IC <sub>50,A-3</sub>	IC <sub>50,mix</sub>
1:4	1.0	4.0	23.55			
	1.5	6.0	25.13			
	2.0	8.0	44.50	2.03	8.12	10.15
	2.5	10.0	58.37			
	3.0	12.0	77.50			
	3.5	14.0	78.55			
1:1.5	2.0	3.0	33.29			
	3.0	4.5	39.08			
	4.0	6.0	48.95	4.36	6.65	11.01
	5.0	7.5	52.37			
	6.0	8.0	65.79			
	7.0	10.5	73.29			
1:0.5	3.0	1.5	25.66			
	5.0	2.5	39.08			
	7.0	3.5	53.39			
	9.0	4.5	57.11	6.55	3.34	10.19
	11.0	5.5	81.97			
	13.0	6.5	83.82			

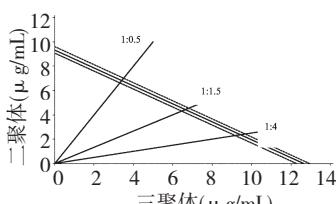


图 3 二聚体和三聚体复配的 Isobogram 分析图

Fig. 3 Isobogram analysis graph of interaction with procyanidin dimer and trimer

### 3 结论

本文在传统 AB-8 分离纯化荔枝原花青素的基础上, 通过 C18 硅胶柱层析优化制备了聚合度更低、A-型原花青素纯度更高的荔枝果皮原花青素低聚体(LPOPC)。组分分析结果显示, C18 硅胶制备的 LPOPC 中总酚含量达到  $940 \pm 123 \text{ mg/g}$ , 且 B-型原花青素近乎完全地被分离。其中, (-)-表儿茶素、

A型原花青素二聚体和三聚体为提取物中最主要的单体和低聚体,相对含量分别为44.86%、36.02%和9.86%;提取物平均聚合度为1.62。因此,可高效利用C18制备的LPOPC通过凝胶色谱分级获得已知结构的A型原花青素二聚体和三聚体。抗氧化评价结果显示,A型原花青素二聚体和三聚体均具有较强的自由基清除能力;等辐射分析法证明两者之间呈现一定的协同抗氧化效应,为新型复合抗氧化剂的开发提供了新的研究思路。

## 参考文献

- 1 Liu SC, Lin JT, Wang CK, et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chem.*, 2009, 114: 577-581.
- 2 Liu L, Xie BJ, Cao SQ, et al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity. *Food Chem.*, 2007, 105: 1446-1451.
- 3 Nagendra Prasad K, Yang B, Yang S, et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and anti-rosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. *Food Chem.*, 2009, 116: 1-7.
- 4 Zhou WJ (周玮婧). Extraction, purification and antioxidation of procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), MSc. 2010.
- 5 Li SY, Xiao J, Chen L, et al. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. *Food Chem.*, 2012, 135: 31-38.
- 6 Scallbert A. Quantitative Methods for the Estimation of Tannins in Plant Tissues. In R. W. Hemingway, Laks, P. E. (Ed.), *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. New York: Plenum Press, 1992. Vol. 59, 259-280.
- 7 Zhou WJ (周玮婧), Sui Y (隋勇), Sun ZD (孙智达), et al. Qualitative analysis of oligomeric procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp. *Food Sci (食品科学)*, 2012, 33(17): 40-43.
- 8 Ningappa MB, Dinesha R, Srinivas L, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf (*Murraya koenigii* L.) extracts. *Food Chem.*, 2008, 106: 720-728.
- 9 Zhang L (张凌), Zhang MZ (张马忠), Hang YN (杭燕南). Drug interaction analysis with isobolograms. *Int J Anest Res (国际麻醉学与复苏杂志)*, 2007, 28: 472-476.
- 10 Xiao LB (肖黎波). Study of hypnotic interactions and bispectral index between propofol and midazolam. Hunan: Zhongnan University (中南大学), MSc. 2007.
- 11 Karonen M, Loponen J, Ossipov V, et al. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2004, 522: 105-112.
- 12 Vivas N, Glories Y, Pianet I, et al. A complete structural and conformational investigation of procyanidin A2 dimer. *Tetrahedron Lett*, 1996, 37: 2015-2018.
- 13 Friedrich W, Eberhardt A, Galensa R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *Eur Food Res Tech*, 2000, 211: 56-64.
- 14 Shui G, Leong LP. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, 1022: 67-75.
- 15 Sander LC, Wise SA. A new standard reference material for column evaluation in reversed-phase liquid chromatography. *J Sep Sci*, 2003, 26: 283-294.
- 16 Li SY (李书艺), Zhou WJ (周玮婧), Sun ZD (孙智达), et al. Antioxidant activity and DNA damage preventing effect of procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp. *Food Sci (食品科学)*, 2010, 31: 14-18.
- 17 Zhou WJ (周玮婧), Si GH (倪国涵), Sun ZD (孙智达), et al. Antimicrobial activity and mechanism of flavonoids from Litchi pericarp. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2011, 23: 332-336.
- 18 Romano CS, Abadi K, Repetto V, et al. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem.*, 2009, 115: 456-461.