

原花青素的化学结构及其分析技术研究进展

倪芹^{1#}, 李娜^{1#}, 朱宏涛¹, 赵平², 张颖君^{1*}

¹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, 昆明 650201;

²西南林业大学 西南地区林业生物质资源高效利用国家林业局重点实验室, 昆明 650233

摘要:原花青素是在自然界分布最广泛的一类天然酚类化合物之一, 在各种林木、药用植物和果蔬中广泛存在。原花青素具有多方面的保健功能, 广泛用于日常饮食和疾病防治, 具有较大的开发价值和应用前景。然而该类成分结构较复杂, 分子量较大, 提取过程中存在溶解性不好等问题, 使其化学研究具有较大的挑战性。现有的原花青素分析方法大多是非选择性的, 目前国际上尚无统一标准。本文从化学结构类型、分析方法、分离纯化和结构鉴定方法等角度出发, 对原花青素的研究进展进行了综述, 并分析了各种方法的优缺点, 为原花青素的化学结构研究提供参考。

关键词:原花青素; 分析方法; 分离纯化; 结构类型; 结构鉴定

中图分类号: Q946.84

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0151-15

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.018

Review on the structures of proanthocyanidins and their analytical method

NI Qin^{1#}, LI Na^{1#}, ZHU Hong-tao¹, ZHAO Ping², ZHANG Ying-jun^{1*}

¹State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on

Highly-Efficient Utilization of Forestry Biomass Resources in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650233, China

Abstract: Proanthocyanidins (PAC) are the most widely distributed plant secondary metabolites in medicinal plants, fruits, and vegetables. Because of their broad spectrum of bioactivities and health benefits, PAC have been widely used in daily diet, and for preventing and curing diseases. Thus, they are worthy of further development and application. However, chemical studies on PAC present a great challenge due to their complex structures, higher molecular weights, and some problems during the extraction process, such as insolubility in water and organic solvents. So far, many techniques have been applied to the studies of PAC, without any specificity. Moreover, there is no standard method for the analysis of PAC. Herein, the research progress on analytical method of PAC is summarized, from the views of their chemical structures, methods of analysis, separation, purification, and structure determination, together with the assessment of advantages and disadvantages of each method, in order to provide a reference and promote the study of PAC.

Key words: proanthocyanidins; analytical method; isolation and purification; chemical structure; structural elucidation

植物酚类化合物是广泛分布于植物界的一大类芳香族类次生代谢产物, 从分子量小于 100 Da 的简单酚类化合物到大于 30 000 Da 的高度聚合物, 已报道的该类成分有 8 000 多个。根据化学结构特点, 又可进一步分为酚酸、黄烷酮、黄酮、黄酮醇、花

青素、黄烷-3-醇和原花青素, 等^[1]。其中, 原花青素 (proanthocyanidins, PAC) 又称缩合单宁 (condensed tannin, CT), 因在酸性介质中加热可氧化解聚产生红色的花青素而得名, 是除木质素 (lignin) 外, 在自然界分布最广泛的一类天然植物酚类化合物, 在柿子 (*Diospyros kaki* L.)^[2]、松树 (*Pinus massoniana* Lamb.)^[3]、苹果 (*Malus domestica* Mill.)^[4]、可可 (*Theobroma cacao* L.)^[5]、荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.)^[6]、沙棘 (*Hippophae rhamnoides* Linn.)^[7]、茶 (*Camellia* spp. L.)^[8]、高粱 (*Sorghum bicolor* (L.)

收稿日期: 2020-09-08 接受日期: 2020-11-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21672223); 国家重点研发计划 (2017YFD0600205)

* 通信作者 Tel: 86-871-65223235; E-mail: zhangyj@mail.kib.ac.cn, hypzhao@yahoo.com

共同第一作者

Moench)^[9]、葡萄(*Vitis vinifera* L.)籽^[10]、山楂(*Crataegus grayana* Eggl.)^[11]等多种林木、果蔬和药用植物中广泛存在。

研究表明,原花青素 PAC 具有广泛的生物活性。例如,茶叶中儿茶素类与抗氧化活性和降低小鼠的肿瘤多样性有关^[9];葡萄籽提取物中的 PAC 具有清除自由基,并降低健康细胞对有毒和致癌物质敏感性的能力^[12];葡萄汁和红酒中的 PAC 可调节二十碳烯酸合成和抑制低密度脂蛋白氧化^[13,14],有助于保护心血管,降低慢性病的风险^[15,16]。作为一种天然绿色添加剂,PAC 能够拮抗有毒物质对动物机体的损伤,提高畜禽抗病和抗氧化能力,增强动物机体免疫力,在畜牧生产中被广泛应用^[17]。此外,PAC 在抗菌、抗病毒、免疫调节、抗诱变等多方面亦具有显著的活性^[18-20]。

由于分布广、活性强,并兼具食源性和低毒性等特征,原花青素被广泛用于药品、食品、化妆品等多个领域^[21]。同时,根据聚合度不同,其应用亦有较大差别。聚合度较高的 PAC 常作为粘合剂,制革合成鞣剂、金属络合剂和高分子材料等,广泛运用于工业生产;低聚和单体 PAC 则主要应用于食品及医药方面,例如被用作食品色素、调味添加剂,以及液体食品中的稳定剂等^[18]。此外,PAC 也是影响果蔬及其加工产品风味和品质的重要因素。例如,在红酒中涉及苦味、涩味和保质期等多方面的质量标准^[21];不同的聚合度对果蔬的苦涩味影响显著^[22],其中原花青素四聚体表现出最强的苦味,而涩味随着聚合程度的提高而增加。

PAC 单元中存在多个手型中心,随着分子量的增加,PAC 潜在异构体的数量呈指数增长,同时吸附性增强、溶解性降低,给 PAC 的分析和分离纯化带来很大的挑战性^[3]。目前已有多种方法被用于原花青素的分析分离的研究,本文对原花青素 PAC

的化学结构类型及其分析、分离和结构确定方法等方面的研究进展进行综述,以期为相关研究提供参考。

1 原花青素的化学结构

原花青素主要由不同个数和结构类型的黄烷-3-醇(flavan-3-ols)单元聚合而成,迄今已被阐明结构的原花青素类化合物不多,均为低聚体,并以二聚体和三聚体为主。原花青素结构的复杂性主要取决于以下五个方面^[13]。

1.1 黄烷-3-醇单元的结构类型

黄烷-3-醇是最常见的组成原花青素的单元,主要包括多种儿茶素类化合物,例如:儿茶素(catechin, C, **1**)、表儿茶素(epicatechin, EC, **2**)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC, **3**)、表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC, **4**)、表儿茶素没食子酰酯(epicatechingallate, ECG, **5**)、没食子儿茶素没食子酰酯(gallocatechingallate, GCG, **6**)、表没食子儿茶素没食子酰酯(epigallocatechingallate, EGCG, **7**)等^[19](图 1)。由于黄烷-3-醇 B 环羟基数目以及 C 环 C-3 位取代基的不同,而形成不同结构的原花青素。

1.2 黄烷-3-醇单元之间的连接方式

PAC 组成单元(常见为黄烷-3-醇)之间最常见的连接方式是:一个黄烷-3-醇单元的 C4 与另一单元的 C8 或 C6 相连。仅有此连接方式的原花青素被称为 B 型 PAC,该类型在植物组织中最为常见。而在 C4→C8 或 C4→C6 连接的基础上,一个黄烷-3-醇单元的 C2 与另一单元的 C5 或 C7 同时又形成醚键连接的原花青素,被称为 A 型 PAC(图 2),主要存在于樟科(Lauraceae)和七叶树科(Hippocastanaceae)等少数植物中,如肉桂(*Cinnamomum austrosinense* Hung T. Chang)、七叶树(*Aesculus chinensis* Bunge)等^[1]。

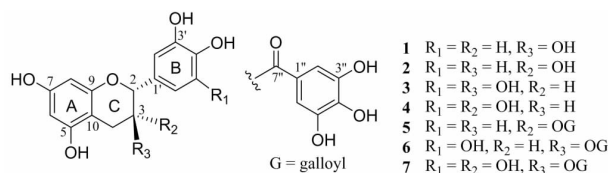


图 1 原花青素的主要组成单元(1-7)及其化学结构

Fig. 1 The main composing units (1-7) of PAC and their chemical structures

1.3 原花青素的分类

根据组成 PAC 的黄烷-3-醇单元结构中羟基化

的数目和模式,PAC 又可分为六个亚类:procyanidins、prodelphinidins、profisetinidins、propelargonidins、

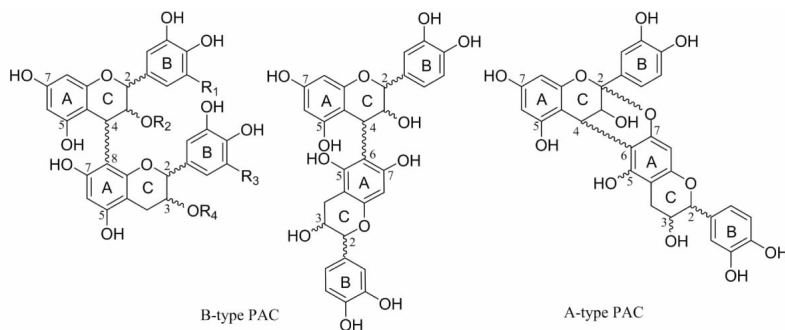


图2 B型和A型原花青素的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of A-and B-type proanthocyanidins

prorobinetinidins 和 proguibourtinidins (图3)。完全由儿茶素 (catechin) 或表儿茶素 (epicatechin) 单元组成的 PAC 被称为原矢车菊素 (procyanidins, PC), 是植物中最常见、含量最丰富的 PAC 类型^[24]。

1.4 聚合度

根据原花青素的聚合度(组成单元的数量, degree of polymerization, DP_m) 可将 PAC 分为单倍体 (monomer)、低聚体 (oligomer) 和多聚体 (polymer)。其中,单倍体是基本结构单元,二聚体、三聚体至十聚体被统称为低聚原花青素 (oligomeric proanthocyanidins, OPC) ($n=0 \sim 8$) (图3), 而更高聚合(链长)的 PAC 通常称为高聚原花青素 (polymeric proanthocyanidins, PPC) (DP_m > 10)^[23]。在低聚或高聚原花青素的结构中,处于聚合长链最下方 C-4 位未有其他单元取代的单元,称为下层单元 (lower unit) 或末端单元 (terminal unit); 长链最上方 C-4 位被其他单元取代、而 C-6 或 C-8 未有其他单元连接的单元,称为上层单元 (upper unit); 在聚合长链中,在末端单元之上、C-4 位连接有其他单元的单元,包括上层单元,被统称为延伸单元 (extension unit) (图3)。

1.5 空间构型

在 PAC 的结构中,由于组成单元——黄烷-3-醇的 C 环饱和,其化学结构在空间上是非平面的, C-2 和 C-3 位两个手性中心为每个组成单元的 C-2 位 B 环和 C-3 位羟基共产生了四种异构体,同时,聚合原花青素在每个上层 (upper) 或延伸 (extension) 黄烷-3-醇单元 (unit) 的 C-4 产生一个手性中心^[18]。因此不同聚合度的原花青素具有 2^{n+1} 个异构体 (n 为聚合度 DP_m), 如 PC 二聚体具有 $2^{2+1} = 8$ 个异构体, 分别被命名为原矢车菊素 (procyanidin) B1 ~ B8。

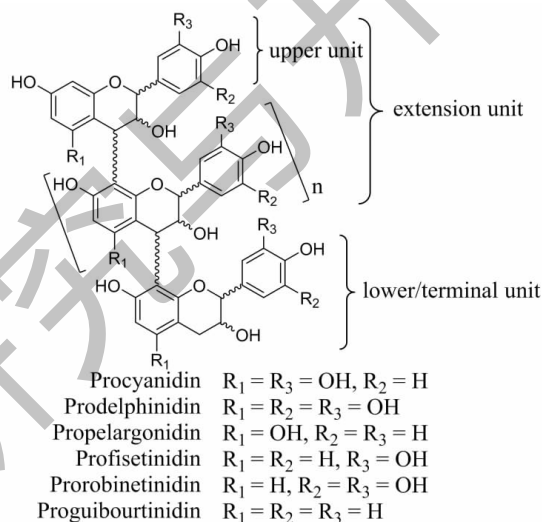


图3 原花青素的分类

Fig. 3 Classification of proanthocyanidins

2 原花青素的分析方法

原花青素的结构较为复杂,要单独测定每一类成分的含量都极为困难^[25]。目前关于原花青素的测定方法国际上尚无统一标准,许多已有的分析方法被用来定性或定量分析植物及其产品中的原花青素,但大多数分析方法是非选择性的,几乎可同时分析测定所有的酚类物质^[1],主要有以下几类方法:

2.1 分光光度法

分光光度法操作简便,是实际应用中常见的分析方法。然而,本方法对原花青素类成分缺乏特异性,常受到非 PAC 类物质的干扰,并且因样品种类和操作人员的不同而重现性不高^[26,27]。

2.1.1 正丁醇-盐酸法

在正丁醇-盐酸反应中, PAC 被裂解成碳阳离子单元和黄烷-3-醇单元,碳阳离子单元又被进一步氧化为红色的花青素 (anthocyanidins) (图4)。黄烷-

3-醇单体(如儿茶素, catechin)则不会发生该反应^[23]。本方法反应剧烈,通过酸性条件解聚 PAC,最有效地释放形成单体花青素,再通过与相应的标准品对照,计算生成的花青素含量,最后计算出样品中 PAC 的相对含量^[1,28]。

本方法也存在一些问题:第一,花青素 A 环或 B 环中酚羟基的数目会影响其最大值吸光度和消光系数。例如, cyanidin 和 delphinidin 的 λ_{\max} 分别为 545 和 557 nm^[29],并且花青素的显色率不与原花青素 PAC 含量呈线性关系^[26]。第二, PAC 的化学结构影响花青素的产率和反应动力学^[25,30,31]。例如, Bate-Smith^[32]观察到 A 型 PAC 的花青素产率高于 B 型 PAC, C4→C8 键比 C4→C6 键更容易被裂解; PAC 延伸单元为 2,3-顺式构型转化为花青素的速度比

其 2,3-反式类似物快; A 环的羟基也会对花青素的产量产生影响。为了提高花青素的重现性和产量, Porter^[26]对其进行了改进,主要是在试剂中添加 Fe^{3+} 以提高反应速率和产物的稳定性。第三,由于一些 PAC 并不溶于普通溶剂,因此很可能低估了样品中的 PAC 含量。Reed^[33]首先指出该方法通常用于可溶性 PAC 的定量。据报道,在用 70% 丙酮-水萃取 PAC 后,不溶性部分占总 PAC 的 6% ~ 20%^[34]。此外,在正丁醇-盐酸测定的反应中,并非所有的 PAC 都发生此反应,因此 PAC 的含量极有可能被低估^[35]。

但正丁醇-盐酸测定法最大的优点是可以确认 PAC 结构的存在,尽管尚存在上述缺点,目前,仍然是测定植物样品中 PAC 的最常用方法。

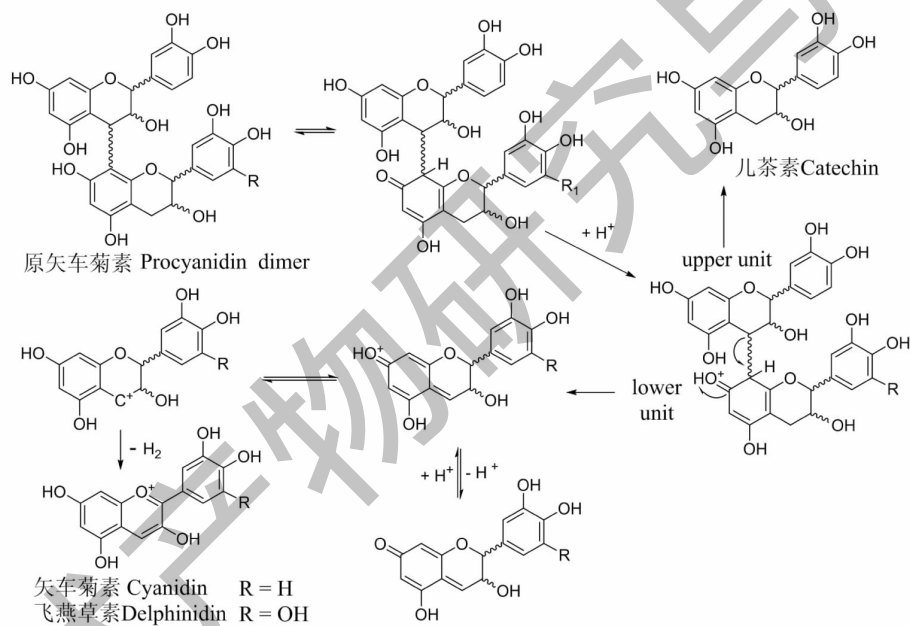


图4 由原矢车菊素转变成矢车菊素、飞燕草素和儿茶素的形成途径

Fig. 4 Formation pathway of red-colored cyanidin, delphinidin and catechin from procyanidin

2.1.2 对二甲氨基肉桂醛法

对二甲氨基肉桂醛(dimethyl amine cinnamic aldehyde, DMACA)测定的基本原理是:在强酸性条件下,对二甲氨基肉桂醛与黄烷-3-醇 A 环的间苯三酚或间苯二酚结构的亲核位点缩合,形成在 640 nm 处有最大吸收的蓝色产物,且其颜色与浓度呈正向关系^[26,36]。如图 5 所示,DMACA 只与末端单元(terminal unit)反应,且更倾向与 A 环 C-8 位发生缩合^[1]。DMACA 最佳反应条件为:2% (W/V) DMACA, 6 M HCl, 稀释倍数为 2:1 (V/V) 的低相甲

醇^[27](HCl 产生的背景比 H₂SO₄ 低,甲醇比乙醇或正丁醇具有更好的溶解度)。此外,DMACA 法产物的摩尔消光值,比用 4-二甲氨基苯甲醛的摩尔消光高约 1 000 倍^[31]。

DMACA 对大多黄酮类化合物,例如:根皮昔(phloridzin, **8**)、橙皮昔(hesperidin, **9**)和二氢槲皮素(taxifolin, **10**)(图 6)等均不发生反应^[36,37]。该方法重复性较高,测定简单。与香草醛测定法相比,DMACA 法灵敏度高出 5 倍,花青素对其干扰也较低^[27]。DMACA 试剂也可用于薄层层析对微量单体

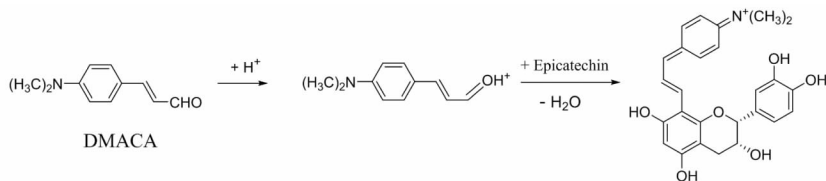


图5 DMACA 与 PAC 的反应机制

Fig. 5 Reaction mechanism of DMACA with PAC

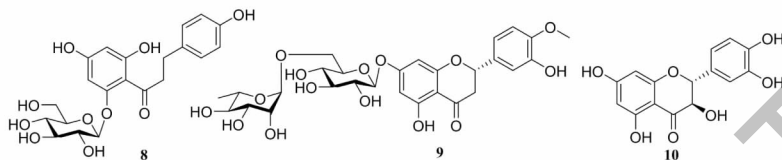


图6 根皮苷(8)、橙皮苷(9)和二氢槲皮素(10)的化学结构

Fig. 6 Chemical structures of phloridzin (8), hesperidin (9) and taxifolin (10)

和聚合黄烷醇类的检测。然而,对于 PAC 含量较高的样品,该方法的显色不太稳定。目前,该检测方法也在 HPLC 分析应用中受到较大的关注^[36]。

2.1.3 香草醛测定法

香草醛法(vanillin assay)与 DMACA 法类似,其原理是在强酸性条件下,香草醛(vanillin, 11)与黄

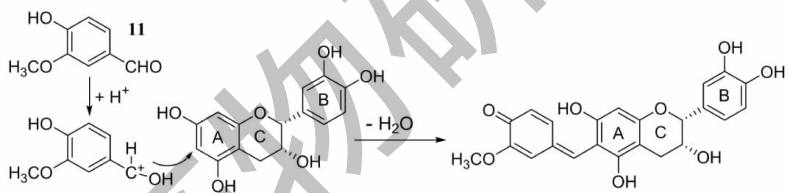


图7 香草醛与 PAC 反应机制

Fig. 7 Reaction mechanism of vanillin and PAC

香草醛测定法存在的问题主要包括以下几个方面:首先,在正常反应条件下,最常用的标准品儿茶素的反应速率与相关 PAC 聚合物的不同^[25];其次,缺乏对 PAC 的特异性。任何有相似化学结构的黄酮类成分在分析中都会发生反应^[25],例如:香草醛与二氢查尔酮[如:根皮苷(8)和根皮素(phloretin)]反应显著,与黄烷酮[如:橙皮素(9)]和黄烷醇[如:二氢槲皮素(10)]反应较弱^[27];再次,香草醛与 PAC 的反应产物具有较低的最大吸光度值(λ_{\max} 500 ~ 510 nm),与酸化甲醇中花青素的最大吸光度重叠,因此,花青素会对香草醛测定法造成严重的干扰^[27],同时叶绿素也可能对显色产生影响^[25];另外,由于该反应不会在所有黄烷-3-醇延伸单元上发生,也不仅在末端单元上发生,导致 PAC 的吸光

度值会比黄烷-3-醇单体的高。冰醋酸作为溶剂时,仅在末端单元发生反应^[25,38],但冰醋酸又不是 PAC 的良好溶剂,而当使用盐酸和硫酸作为溶剂时,儿茶素每摩尔的显色率略大于 PAC 每摩尔的显色率^[25,39]。

此外,可用于原花青素分析检测的分光光度法还包括:普鲁士蓝分析法(Prussian Blue assay)^[40]和 Folin-Ciocalteu 法。普鲁士蓝分析法简单、快速,并且受非酚类化合物的干扰小^[41,42]。然而,该方法有两个主要缺点^[41]:(1)快速反应后会形成沉淀;(2)颜色密度会随时间增加,温度和 pH 值也会影响颜色密度^[30,41],且试剂的加入顺序会严重影响分析物的形成。Folin-Ciocalteu 法利用氧化/还原原理,在碱性条件下反应产生在 760 nm 处有最大吸收的蓝

色化合物,但是在反应过程中会形成干扰分光光度测定的沉淀物^[25]。这两种方法主要是用来量化植物提取物中酚羟基总含量的分析方法,都不具有特异性^[25]。

采用不同试剂的分光光度法的共同特点是:只可用于测定 PAC 的相对含量。选用固定的标准品做含量测定标准曲线时,必将引入一定的系统误差,且分析结果常会受到非 PAC 类成分的干扰^[20]。

2.2 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法(HPLC)因分离度高、精密度高、重现性好、分析时间相对较短,通常是 PAC 分析的首选方法。采用高效液相色谱法分析原花青素时,可与多种检测器联用,如光电二极管阵列检测(UV-DAD)、荧光检测(FLD)和质谱(MS)等,可以多样性地组合及开发出更多便利快捷的检测方法,为测定原花青素带了更多的探索前景。然而,该方法的问题是缺乏用于测定 PAC 含量的标准品^[4]。

2.2.1 光电二极管阵列检测(UV-DAD)

UV-DAD 的运用使酚类化合物的 HPLC 分析有了很大的改进,该方法可同时使用保留时间和紫外光谱来对化合物进行鉴定,并且这些参数不受进样量的影响^[43],是原花青素最常见的检测手段。

PAC 在紫外光谱中有两个最大吸收值:200 ~ 220 和 278 nm 处。若有芳香族取代基与 PAC 共轭,如没食子酰基(galloyl),则在这两个最大值之间会产生第三个吸收带^[1]。取代基对紫外光谱的影响更多地取决于它们的连接位置和相互作用,而不是它们的化学性质^[43]。例如,邻位和间位取代使 K 带蓝移、B 带红移,而对位取代则与间位和邻位取代的作用相反,即对 K 带的红移效应和对 B 带的蓝移效应。然而,由于取代基之间可能存在相互作用,取代基的作用并不是叠加的^[43]。此外,278 nm 处最大吸收值对称,是均相原花青素聚合物紫外光谱的特征^[44],非单一均相原花青素聚合物的对称性则会受到破坏。

对单个原花青素的紫外检测显示化合物的摩尔吸光度取决于其化学结构,儿茶素、PAC 二聚体和三聚体在紫外检测中,其摩尔吸光度是依次增加的。采用 UV-DAD 检测对原花青素进行分析的缺点是:黄烷-3-醇单体、原花青素低聚物以及它们的一些降解产物的 UV 光谱没有明显差异,同时也无法正确的区分非对映异构体,如(2*R*,3*R*)-表儿茶素和(2*R*,3*S*)-儿茶素^[1]。

2.2.2 荧光检测(fluorescence detection, FLD)

由于许多酚类化合物的紫外吸收范围狭窄,很难对原花青素进行特异性检测。Lazarus^[4]发现低浓度的原花青素会与许多其他有紫外吸收的化学成分重叠,使紫外图谱较难辨认,而荧光检测(FLD)谱图则较清晰。研究表明,在原花青素浓度较低、成分较复杂的样品中,荧光检测优于紫外检测。因此,FLD 被认为是一种提高原花青素检测选择性的替代检测系统。例如:将荧光检测器设定为 276 nm 的激发波长和 316 nm 的发射波长,可检测 PC 和 profisetinidin。Gu^[45]观察到荧光检测器的检测限在 23 ~ 64 pg(柱上)的范围内,也就是比紫外检测的检测限低近一千倍。Donovan^[46]也指出 FLD 检测是最灵敏的 HPLC 检测方法。

2.2.3 质谱检测(MS detection)

质谱(MS)是表征酚类物质中低聚物分子量分布的有效方法,被广泛应用的有:快原子轰击质谱(fast-atom bombardment mass spectrometry, FAB-MS)^[47,48]、液体二次离子质谱(liquid secondary ion mass spectrometry, LSI-MS)^[49]、电喷雾电离质谱(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)^[50]和基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)^[47,51]。虽然原花青素是非挥发性的极性化合物,采用 FAB-MS、LSI-MS、MALDI-TOF-MS 和 ESI-MS 等软电离技术的质谱仍然可以直接分析测定这些化学成分的分子量。在早期的研究中,原花青素低聚物的分子量是通过 FAB-MS^[47]和 ESI-MS^[52]从单个降解的分子离子中得到的,这些质谱数据证明了原花青素结构中黄烷-3-醇单元的聚合。

2.2.3.1 液相色谱-质谱联用(LC-MS)

液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术是目前研究多酚类物质最佳的分析方法,也是研究原花青素结构最有效的工具。ESI 是一种温和而敏感且最常用的方法,可使用多级质谱串联技术^[53],以获得更高的灵敏度,产生特定的反应产物来进行结构表征^[54]。但在 LC-MS 分析之前,大多数样品需要去除糖的干扰。LC-MS 是分离原花青素低聚物和鉴定单体单元的有力技术,分析 PAC 时应注意:不同种类的 PAC 有时可能具有相同的质量^[4],且电离效率随着聚合度的增加而降低,因此容易造成混淆^[24]。此时,需要采用 LC-MS/MS 技术,以期获得共聚物出

现时的特征碎片数据,最后通过比较低聚物和标准品的保留时间来确证结构,但该方法有的时候也还是无法明确的区分碎片离子和多电荷离子^[55]。

迄今,采用质谱分析尚未直接观察到 DP_m 大于 30 的原花青素聚合物的存在。然而,根据疏解特性的判断,具有高 DP_m 值的聚合物确实存在于植物和食品材料中。在实际应用中,质谱法检测混合样品中聚合度大于 DP_m 15 的聚合物仍然是十分困难的,需要改进电离技术加以解决^[56]。

2.2.3.2 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS 是大分子化合物,包括多肽、蛋白质、多糖、多酚等聚合物分子量解析行之有效的技术和方法^[57]。该方法具有很高的灵敏度和选择性,可以直接对含有一定杂质的粗提物和含盐或缓冲液的色谱洗脱液进行分析,已被成功应用于寡聚原花青素的分析。例如:Ohnishi-Kameyama^[47] 确定了苹果中 PAC 的聚合范围从二聚体到 15 聚体;Takahata^[58] 检测到褐色大豆种皮中 DP_m 高达 30 的聚合物。在 MALDI-TOF-MS 分析中,基质主要有两方面的作用:一是从脉冲激光中吸收能量;二是将能量传递给被分析物,使被分析物离子化。第一个作用要求基质对激光光源有很强的吸收,因此基质多为含苯环的化合物;第二个作用则要求基质和被分析物具有很好的相容性,同时又不能发生分子间的相互作用^[57]。应用 MALDI-TOF-MS 分析聚合物时,二羟基苯甲酸 (DHB)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 和反式-3-吡啶乙酸 (IAA) 是最常用的基质^[56]。与很多生物分子相比,聚合物单体单元的多样性使得对其分析基质的选择较为困难。换言之,由于基质有限,许多聚合物尚未能找到合适的基质来进行 MALDI-TOF-MS 分析^[57]。

DHB 是最适合反射模式下原花青素分析的基质,与其他常用的基质体系相比,DHB 提供了最宽的质量范围和最小的背景噪声。尽管 IAA 基质(线性模式)提供了与 DHB 类似的质量范围,但即使施加较低的激光功率,它在低于 500 的质量范围内会产生非常高的背景噪声,会干扰来自单体和二聚体的信号。CHCA 无需很高的激光强度就容易离子化,但是如果激光强度过高会出现 CHCA 低聚体的谱峰,有时会达到 1 000 Da 以上,使得 2 000 Da 以下分子量的样品和基质分辨困难^[47,59]。此时,可以适当运用基质抑制效应(matrix suppression effect)来

降低基质峰及其影响。此外,当要分析的样品不容易被质子化时,将阳离子化剂(如三氟乙酸铯或氯化钠等)加入基质/样品溶液中,可以促进单一离子加合物的形成,并提高检测灵敏度^[60]。

MALDI-TOF-MS 是一种强有力的表征合成和天然聚合物的方法。它能够区分由结构类型不同(PC 与 prodelphinidin)、C-3 位是否被没食子酰基取代以及末端单元不同(黄烷-3-醇、黄烷酮或黄酮)引起的分子量差异。此外,MALDI-TOF-MS 还被用于确认单体间连接键的性质^[2]。然而,MALDI-TOF-MS 分析的一个固有问题是:低分子量的低聚物会使检测器先到达饱和,从而难以检测到较高聚合度的聚合物^[2]。另外,与高分子聚合物本身行为相关的一些因素,如抑制电离、减少吸附和导致形成非共价离子簇的不均匀碎裂等,也会影响 MALDI-TOF-MS 检测高分子量聚合物^[2,57],并且不同组成的低聚物也可能产生相同的信号。

荧光检测器具有高灵敏度和选择性,在含有低浓度原花青素的复杂样品中,荧光检测优于紫外检测。在 MS 检测方法中,MALDI-TOF-MS 是适用于定性分析样品中的原花青素而无需大量制备的有效工具,但需要样品中原花青素的浓度较高。ESI 作为最灵敏的电离方法,与 MS/MS 组合时适用于化合物结构的阐明,但高聚合度的原花青素较难电离,因而仅可测定低分子量的原花青素。上述高效液相法结合各种检测器后都有其优、缺点,在实际应用中,可以根据聚合度先分离单一低聚物,结合使用各种检测方法,确定含有高分子量样品混合物中的低聚物组成。

2004 年,美国 Waters 公司在 HPLC 基础上,通过使用较小粒径的色谱柱填充颗粒,开发出了超高效液相色谱仪(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC)。与 HPLC 相比,UPLC 可以提供更快、更高效、更稳定的分离,在食品安全、代谢组学、药物开发等领域得到了广泛的应用^[61]。通过与不同的分析技术(如 QTOF-MS、IM-HRMS、TQ-MS/MS 等)联用,UPLC 也被越来越多的应用于 PAC 分析^[62-65],但由于价格昂贵、色谱柱不与 HPLC 通用等原因导致其市场占有率不是很高。

2.3 凝胶渗透色谱法(GPC)

凝胶渗透色谱(gel-permeation chromatography, GPC)技术可用于估算原花青素聚合物的平均分子量^[66,67]。然而,由于原花青素聚合物极性太强,

无法在典型的 GPC 柱上进行分离,因此,对 PAC 聚合物的 GPC 分析通常是采用聚苯乙烯标准品或原花青素低聚物的乙酸酯对 GPC 体系进行标定,在具有四氢呋喃等有机流动相或 PAC 乙酰化衍生物上进行,并根据标准曲线估算样品中 PAC 分子量的平均值^[56]。

GPC 方法可以方便地估算聚合多酚的平均分子量,已应用于柿子^[68]、松树 (*Pinus massoniana* Lamb.) 皮^[66]、粉芭蕉 (*Musa sapientum* L.)、长角豆 (*Ceratonia siliqua* L.)、木瓜 (*Chaenomeles sinensis* Koehne) 等果实^[67] 以及其他 32 种植物组织^[69] 中原花青素的测定。但是,由于样品中低聚物的分离不完全,不能回收得到天然低聚物;同时,采用聚苯乙烯标准品进行平均分子量标定也不准确。此外,当以水溶剂为流动相时,大多数多酚类化合物会在通用 GPC 柱的固定相上被强吸附,对 GPC 柱的损害较大^[56]。

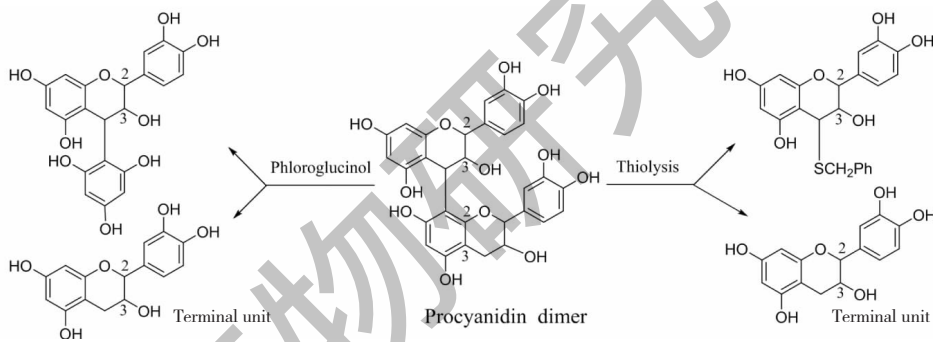


图 8 PAC 与间苯三酚及硫醇解反应机制

Fig. 8 Reaction mechanism of PAC with phloroglucinol and its thiolysis

常见的两种裂解衍生化方法^[1,29],一是在硫醇(苄硫醇^[65]或2-巯基乙醇^[72])存在下原花青素的裂解,另一种是采用间苯三酚作为亲核试剂。Matthews^[29]曾建议以苄硫醇作为亲核试剂而不是间苯三酚,因为它提供更高的解聚产率,且硫解产物的稳定性也高于间苯三酚裂解的产物^[28]。Karonen^[22]报道了硫解方法的局限性,一些聚合 PAC 对硫醇的降解具有抗性(特别是当 PAC 源自老化组织,例如外层树皮时)。此外,单体亚基的硫醚衍生物产率较低^[66]。还有一种观点^[73]认为,采用间苯三酚代替硫醇作为亲核试剂具有多方面的优点,其中,最重要的是间苯三酚无味。此外,从 2,3-反式原花青素形成 3,4-反式加合物的选择性,比采用硫醇要高许多,并通过二维纤维素薄层色谱或柱色谱能够很好地实现产物的分离^[28]。

2.4 衍生化法

衍生化法可分为柱前和柱后衍生化两种。Thies^[70]首次报道了 4-二甲氨基肉桂醛 (DMACA) 与儿茶素反应后产生深蓝色产物,之后又开发了几种用于饮料中黄烷-3-醇柱后检测的 DMACA 方法^[27,36,37],但由于需要特定设备,柱后衍生化法在实际运用中并不常见^[1]。

目前,柱前衍生化法的使用更为广泛。在酸性条件下,通过加热来解聚 PAC^[71],组成单元间连接键被裂解释放延伸单元作为碳阳离子,然后与亲核试剂反应形成稳定的加合物,末端单元则解聚为相应的黄烷-3-醇(图 8)^[29]。据此,可通过估计加合物与游离黄烷-3-醇的比例来计算样品中 PAC 的平均聚合度^[12]。在不同亲核试剂存在下,PAC 在弱酸条件下发生反应是重要的分析方法,因为延伸单元中 C-2 和 C-3 键的立体化学结构得到了保留^[29]。

值得注意的是,proflisetinidins 和 prorobinetinidins 类型的 PAC 在所有的酸裂解(包括正丁醇-盐酸)反应中都很难被裂解,因为在没有 C-5 位羟基的情况下,单体间连接键对酸的稳定性比在常见 PAC 的更高^[25]。硫醇裂解 PAC 单体间连接键的裂解速率取决于键的位置和延伸单元的立体化学结构,该裂解速率与末端单元中的立体化学无关^[74]。具有 C4→C8 连接键的化合物比 C4→C6 连接的异构体更快地裂解,相对裂解速率约为 2.6:1^[74]。裂解速率常数遵循阿伦尼乌斯 (Arrhenius) 方程,2,3-顺式 PAC 中的 C4→C8 连接键在 20 °C, pH = 3.6 ~ 5.4 范围内不稳定,很容易被裂解^[74]。因此,在解释部分硫解的 C4→C6 和 C4→C8 连接产物的比例时必须谨慎。这些结果与在乙酸溶液中长时间重排后在原花青素聚合物中获得的 C4→C8 和 C4→C6

键的平衡比(1.3:1)结合,估计得出 C4→C8 和 C4→C6 键的相对缩合速率为 3.3:1,与从各种植物分离得到的低聚和高聚原花青素中发现的 C4→C8 和 C4→C6 的比例非常相似^[29]。

2.5 重量分析法

Reed^[75]在研究稀土元素对天然聚合物亲和力的实验中,发现稀土离子在中性 pH 下沉淀出与单宁和木质素相关的酚类物质。原子数较高的稀土离子具有较小的半径并更容易形成离散的疏水沉淀物。镱(Yb)比其他稀土元素便宜,且容易获得。通过紫外吸收和 Folin-Ciocalteu 法测定镱沉淀酚类物质(Yb-ppt)的含量,发现镱能沉淀包括原花青素在内的多种酚类物质,原花青素含量高的组分在相同的 Yb-ppt 用量下有较大的蛋白质沉淀能力和纤维素酶抑制能力,且 Yb 沉淀的酚类溶液可用于研究其他比色测定和性质的研究,例如:酶抑制和蛋白质沉淀。用镱沉淀酚类物质的优点是可以通过重量测量直接表明 PAC 的蛋白质沉淀能力。此外,也可利用人工聚合物(如水溶性聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone,PVP)、水不溶性聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl polypyrrolidone,PVPP)和水溶性聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG))中的氧原子与 PAC 中的酚基团形成氢键,将它们从溶液中沉淀出来^[76]。Makkar^[77]开发了基于 PVP 测量 PAC 的重量分析方法。该方法基于 PVP 处理前(PAC 提取物)与 PVP 处理后(PVP 会与 PAC 结合)的重量变化,重量差异是由 PAC 引起,PVP 可通过离心去除,但该测定法仅适用于溶剂可提取 PAC 的测定。

重量分析法的一个主要优点是不需要标准物,但这些方法的灵敏度通常低于比色法。重量分析方法与其他方法组合可更好地了解 PAC 对生物系统的影响^[76]。

2.6 基于生物学效应的蛋白质沉淀法

PAC 能与蛋白质形成沉淀物,因此可被应用于它们在不同植物提取物中的检测^[76]。这种沉淀反应取决于植物酚类物质与相关蛋白质的浓度和结构(分子量、三级结构、等电点和结合位点的相容性;如对于构象松散的蛋白质,其亲和力高于紧密卷曲的球状蛋白质;在 pH 值接近其等电点(isoelectric points,pI)时,PAC 能够最有效地沉淀蛋白质)。基于其强大的氢键受体能力,富含脯氨酸(proline)的蛋白质对 PAC 具有较高的亲和力^[1,78],因此,牛血清白蛋白(BSA)和含胶原的真皮粉是沉淀法中最常

用的蛋白质。然而,该方法未考虑 PAC 在基本结构和还原能力上的差异,并且不适用于红葡萄酒和葡萄汁等有色溶液的 PAC 分析。Sarneckis^[79]建立了一种新的 PAC 含量测定法,根据甲基纤维素可以选择性地沉淀原花青素,通过测定沉淀前后 280 nm 处原花青素的吸光度,可选择性测定红酒、50% 乙醇葡萄提取物和水溶液中原花青素的含量,研究表明该方法对 PAC 含量测定稳定性高、特异性强,且不受其他酚类物质吸光度的干扰。

3 原花青素的分离纯化方法

对原花青素进行分离纯化是使其得到精细化利用的基础。采用反相-高效液相色谱法可以轻松完成黄烷-3-醇的分离和测定。然而,植物中相当一部分酚类化合物是由高聚原花青素组成的。高聚原花青素是强极性化合物,疏水性随着 DP_m 的增加而降低,不同 DP_m 的异构体数量呈指数增加,使这些物质的分离纯化变得十分困难。

3.1 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱(size-exclusion chromatography, SEC)通常用于以制备方式分离 PAC。该方法测定原花青素分子量与 GPC 相同,采用聚苯乙烯标准品或原花青素低聚物的乙酸酯校准品进行标定^[1]。Yanagida^[80]发现使用含有尿素的丙酮-水溶液作为流动相,在 Toyopearl 色谱柱上可产生分子筛作用,而氢键和多酚与凝胶基质之间没有疏水吸附作用。采用 TSK 凝胶 Toyopearl HW-40F 分离苹果中的原花青素,以丙酮-8 M 尿素(6:4)为流动相的分离效果最佳。在这种分子筛模式下,聚合物的分离是不完全的,但提取物中所有组分都从柱中完全洗脱,没有非特异性吸附。因此,SEC 法可用于在制备规模上的预分离原花青素,但不适合作为 PAC 的定量分析方法^[1]。

Lopez-Serrano^[81]报道了一种更快速 RP-HPLC 和 HPSEC 联用的方法,由过氧化物酶介导的儿茶素低聚产物在 10 min 内可以直接被分析和分离。

3.2 正相-高效液相色谱法(NP-HPLC)

OPC 的正相分离与极性差异密切相关,极性差异由疏水性洗脱液与亲水性二氧化硅表面的分配系数决定。与 SEC 结果相反,正相-高效液相色谱法(normal phase high performance liquid chromatography,NP-HPLC)分离的低聚物在硅胶柱层析上以极性增加(分子质量增加)的顺序被洗脱^[56]。Rigaud^[82]报道的 NP-HPLC 体系中,采用二氯甲烷-

甲醇-甲酸-水梯度洗脱硅胶柱色谱,可基于聚合度将可可和葡萄籽中的原花青素进行分离,无需衍生化。对于 OPC 的大规模分离,还可采用其它 NP-HPLC 溶剂体系,例如包含正己烷^[83](正己烷-甲醇-乙酸乙酯,正己烷-丙酮)的流动相体系,分离得到的苹果原花青素低聚物达到五聚体。

基于 DP_m 的原花青素的分离纯化方法,最有效的是正相硅胶色谱^[84]。然而,由于 PAC 在有机流动相中的溶解度较低,以及二氧化硅固定相对 PAC 的强吸附性,具有高 DP_m 的低聚物几乎不能从二氧化硅为固定相的柱层析中洗脱出来^[56]。同时,如果使用高浓度的有机酸或含氯流动相,易导致酸裂解等问题的发生。Kelm^[84]报道了一种显著有效的方法,实现了在二醇固定相上原花青素 DP_m 高达 14 的分离,并且 PAC 不会被不可逆地吸附到该固定相上,在酸浓度较低的情况下仍有较高的分离能力^[1]。但一般用 NP-HPLC 可分析的原花青素聚合物仅限于大约十聚体,并且聚合多酚类物质的正相色谱图不能反映真实的分子质量分布^[56]。

3.3 反相-高效液相色谱法(RP-HPLC)

反相-高效液相色谱法(reversed phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)是分离植物多酚最常用的方法。RP-HPLC 的分配作用取决于吸附和解吸,原花青素的酚羟基可以与固定相上的硅烷醇基形成氢键(亲硅烷作用, silanophilic interaction),芳环可以与固定相的烷基链相互作用(疏溶剂作用, solvophobic interaction),从而实现原花青素与固定相的紧密结合;解吸则是通过增加流动相中有机溶剂的比例来实现的^[85]。通常, C₁₈ 柱无法分离 DP_m 高于四聚的 PAC, 尽管 C₁₈ 色谱柱能够将相同分子量的低聚物完全分离,但随着聚合度的增加,异构体的数量也会增加^[86]。此外,在复杂样品中固定相的峰容量降低,常出现驼峰或基线漂移,这是高聚合物在 RP-HPLC 中的典型特征^[1,87]。

低分子量 PAC 在 C₁₈ 柱层析材料上可分离为单个的色谱峰而得到色谱分离,与 NP-HPLC 的原理相反,它们不是根据聚合度洗脱的,影响它们在 C₁₈ 柱层析上保留时间的主要因素是立体化学构型和总极性^[88]。例如,表儿茶素及其低聚物比由儿茶素单元组成的 PAC 出峰时间晚^[88,89];具有 C4→C6 连接键的 PAC 以及 A 型原花青素,在具有 C4→C8 连接键的 PAC 之后洗脱出来^[87]。通常,二聚体以及三聚体 procyanidin C₁ 和 C₂ 的洗脱顺序几乎保持恒定,

不随流动相、酸和固定相的类型而改变,但 procyanidin B₁ 和 B₄ 的保留时间则受色谱条件的变化轻微变化。原花青素在 C₁₈ 上的色谱行为也受进样量的影响,随着原花青素含量的增加,色谱峰向较低的保留时间移动^[1]。Putman^[85]认为痕量金属杂质会引起柱上反应,因此建议添加螯合剂。

反相高效液相色谱法是一种除高聚体外,快速有效的多酚分离方法。通过反相高效液相色谱法,可实现黄烷-3-醇单体、二聚体、三聚体 PAC 及其异构体的完全分离。

3.4 高速逆流色谱法

逆流色谱(countercurrent chromatography, CCC)是一种液-液色谱分离技术,它可以避免使用固体载体时产生的一些问题。其中,高速逆流色谱法(high speed countercurrent chromatography, HSCCC)应用最广泛,在分离效率和分离时间方面占有优势,已用于多种天然产物的分离和纯化。

Putman^[90]首次大规模利用 CCC 从高粱籽中分离得到大量缩合单宁,但样品中低聚 PAC 的分离是不完全的。Esatbeyoglu^[91]使用不同的逆流色谱法,如 HSCCC、低速旋转逆流色谱法(low-speed rotary countercurrent chromatography, LSRCCC)和螺旋线圈低速旋转逆流色谱法(spiral-coil LSRCCC)首次从未烘焙的可可豆中分离得到了 DP_m 2~5 的 PAC。根据 CCC 分离理论,样品在两个溶剂相中的分配系数决定了分离效率和洗脱顺序,聚合多酚可以根据疏水性(分子大小)进行分离^[56]。采用 MALDI-TOF-MS 分析法测定各 CCC 组分中的低聚物分子量,证明 CCC 可根据聚合度对原花青素低聚物进行部分分离。

与传统的分离纯化方法相比,CCC 分离没有不可逆吸附,具有样品无损失、无污染、高效和大制备量等优点。此外,如果开发出更适合分离这些化合物的两相溶剂体系,CCC 的分离效率将会得到很大提高。

4 结构确定

核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)是阐明分子结构的成熟技术,圆二色谱(circular dichroism, CD)则可用于绝对构型的研究。

4.1 核磁共振谱

NMR 是有机化合物结构研究的有力工具,其基本原理是原子核自旋和磁场中能级的分裂,所有含

奇数质子或中子的原子核都有固定的磁矩和固有的自旋运动特性。核的自旋角动量由自旋量子数 I 确定,最常见的 ^1H 、 ^{13}C 核的自旋量子数为 $I = 1/2$ 。具有这种自旋量子数的核在外加磁场中只能存在两种能级状态,即低能态和高能态,这些状态之间的转换可以通过电磁波的辐射或发射引起和被检测到,磁场和分子结构决定共振频率,进一步的结构数据可以通过观察自旋-自旋耦合来阐明,自旋-自旋耦合是核的进动频率受附近核的磁化转移影响的过程^[1]。

该技术在有机化学中已经非常成熟。然而,通过 NMR 技术仍然难以确定原花青素的结构,尤其是黄烷单元间连接键(C4→C8 或 C4→C6)的位置。其中一个主要原因是在室温下原花青素所显示的 ^1H 信号都非常宽,而这又是由于黄烷单元间连接键附近的空间相互作用引起单体单元几乎可以完全自由旋转所导致的^[92],通过 ^1H -NMR 谱观察到的两种旋转对映异构体的比例可高达 55:45^[93]。可采用一些方法来克服这种情况的发生,Ferreira^[94]将 PAC 衍生化为酚类二甲醚或 3-乙酸酯后,该产物在高温下较为稳定,可以克服旋转对映异构现象并产生清晰的一阶光谱;也可通过硫解^[95]或与间苯三酚^[73]反应裂解单元间的连接键,通过比较每个裂解单元的 ^{13}C -NMR 化学位移,确定单元间连接键的位置。Nonaka^[96]提出了判断未衍生化 PAC 中单元间连接键位置的方法:根据具有 2,3-反式构型二聚 PAC 末端单元的 H-2 化学位移,在 C4→C6 连接的情况下,该质子的化学位移为 4.58 ppm,而 C4→C8 连接时,其化学位移为 4.91~4.97 ppm。然而,该方法在实际应用中,如果 ^1H 信号不裂分,则较难归属。相比之下,Shoji^[92]发现与室温下的波谱相比,低温能产生更尖锐的 ^1H -NMR 信号。该方法成功地对原花青素低聚物进行了 NMR 信号归属,并发现末端单元的结构类型(儿茶素或表儿茶素)以及单元间连接键的位置对 NMR 谱有影响。

利用 NMR 技术也可以估计 PAC 的聚合度。Ossipova^[97]根据 ^{13}C NMR 谱观察到山桦(*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii*)叶中 PAC 的平均聚合度接近 10。通过整合末端和延伸单元 C-3 的核磁共振信号,可确定样品的聚合度平均值。然而,由于这些信号彼此非常接近,更可行的方法是选择分辨更好的 C-4 信号。最早没有使用 C-4 信号是由于如果样品采用 $\text{acetone-}d_6$ (+ D_2O)测定时,氘代丙酮溶剂峰会与末端单元的 C-4 信号重叠,而采用氘代二甲亚

砷($\text{DMSO-}d_6$)作溶剂时,溶剂碳信号会与来自延伸单元的 C-4 信号重叠。如果样品可溶于纯水或甲醇等溶剂,碳谱则不包含来自氘代溶剂的干扰信号。 $\delta_{\text{C}} 37 \sim 40$ 信号归属于延伸单元的 C-4,来自末端单元的 C-4 信号在 $\delta_{\text{C}} 28 \sim 30$ 左右,以此可估计平均聚合度^[98]。

4.2 圆二色谱

圆二色谱(CD spectroscopy)是用于推断非对称光学活性分子绝对构型的有力工具。其基本原理是当被光学活性分子吸收时,平面偏振光以一定角度(α)旋转。由于光学活性物质对组成平面偏振光的左旋和右旋圆偏振光的吸收系数(ϵ)不相等,透射光不再是平面偏振光,而是椭圆偏振光。以不同波长的平面偏振光的波长(λ)为横坐标,以吸收系数之差为纵坐标作图,得到的图谱即是圆二色谱。CD 谱有呈峰的正圆二色谱(正的 Cotton 效应)和呈谷的负圆二色谱(负的 Cotton 效应)。任何光学活性化合物都表现出旋光色散曲线,并给出波长函数(λ, nm)的旋光性(φ)。如果化合物在所使用的波长范围内没有相应吸收的发色团,则其曲线是平的,没有任何极值。可以用获得的 CD 光谱结合 NMR 波谱确定分子的绝对构型和构象^[1]。

CD 谱是测定黄烷-3-醇单体和低聚体绝对构型的有力工具,被用于二氢黄烷醇、黄烷-3-醇和二聚原花青素绝对构型的研究。由于存在手性 O-杂环(B 环)和取代基(C 环)的发色团,导致在 200~240 nm($^1\text{L}_a$)和 260~280 nm($^1\text{L}_b$)处可观察到 Cotton 效应。Van Rensburg^[99]观察到,在 $^1\text{L}_a$ 跃迁中,Cotton 正效应和负效应分别表明为 3S 和 3R 的绝对构型。但原花青素的复杂性随着链长的增加而增加,确定每个手性 C 原子的绝对构型仍然是一个挑战。

5 结语与展望

原花青素作为自然来源广泛、活性强、食源性和低毒性的一类化合物,在食品、药品、畜牧业等多个领域有广泛的应用前景。到目前为止,许多原花青素的结构并不明确,目前被研究报道的仅是其中一部分。但随着分子量的增加,其异构体的数量呈指数增长,同时吸附性强和不易溶解等特点,使其在分离和结构鉴定等过程中具有很大的挑战性。因此,建立便捷、快速、精准、低消耗量、费用低廉而高效的检测方法对于阐明低聚甚至高聚原花青素的结构,减少人工分离成本的消耗具有十分重要的意义。在过去几十年中,已有多种方法被用于原花青素的研究,但不同分析方法都或多或少存在一些缺点,因此

还需进一步地探索与研究。本文对已建立的用于原花青素分析、分离及其结构确定方法等方面的研究进展进行了综述,并概述了每种方法的优缺点,有助于研究者在对原花青素进行的过程中选择恰当的方法。虽然仍有诸多问题亟待解决,但随着研究的不断深入、分析技术和鉴定手段的提高,这类天然产物多聚物的结构有希望得到进一步明确,并能发挥更好的医疗保健等作用。

参考文献

- Hümmer W, et al. Analysis of proanthocyanidins [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52:1381-1398.
- Li C, et al. High molecular weight persimmon (*Diospyros kaki* L.) proanthocyanidin: a highly galloylated, A-linked tannin with an unusual flavonol terminal unit, myricetin [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58:9033-9042.
- Zhou B, et al. Rare A-type, spiro-type, and highly oligomeric proanthocyanidins from *Pinus massoniana* [J]. *Org Lett*, 2020, 22:5304-5308.
- Lazarus SA, et al. High-performance liquid chromatography mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages [J]. *J Agr Food Chem*, 1999, 47:3693-3701.
- Porter LJ, et al. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30:1657-1663.
- Ding L, et al. Identification of flavan-3-ol and extraction of procyanidins from *Litchi chinensis* Sonn [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2006, 127(7):67-69.
- Xu XY. Studies on the separation, structure identification and bioactivities of procyanidins from sea buckthorn [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), 2007.
- Meng XH, et al. Plant resources, chemical constituents and bioactivities of tea plants from the genus *Camellia* section *Thea* [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67:5318-5349.
- Liu R, et al. Extraction technology and identification of procyanidins from epispem of sorghum seed [J]. *Trans Chin Soc Agr Eng* (农业工程学报), 2004, 20(1):242-245.
- Silva Jorge MRD, et al. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30:1259-1264.
- Liu PZ, et al. Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruit ripening [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59:11141-11149.
- Zhang RQ. Studies on the bioactivities of procyanidins [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2006, 27(10):181-184.
- Frankel EN, et al. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins [J]. *J Agr Food Chem*, 1995, 43:890-894.
- Schramm DD, et al. Differential effects of small and large molecular weight wine phytochemicals on endothelial cell eicosanoid release [J]. *J Agr Food Chem*, 1998, 46:1900-1905.
- Blade C, et al. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54:37-59.
- Ahn HS, et al. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nutr Res*, 2002, 22:1265-1273.
- Zhang HW, et al. Progress in procyanidins research [J]. *Food Sci* (食品科学), 2015, 36(5):296-302.
- Kang XH. Study on the chromatographic retention behaviour and recovery rate of thiolytic of hawthorn procyanidins [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei (河北农业大学), 2014.
- Wu WW, et al. Biological activity of proanthocyanidins and its application in livestock production [J]. *China Feed* (中国饲料), 2019, 23(4):14-17.
- Duan GP, et al. Advances in the pharmacology research of grape seed proanthocyanidin [J]. *Global Tradit Chin Med* (环球中医药), 2014, 7:313-316.
- Guyot S, et al. Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states [J]. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(1):14-20.
- Lea AG, et al. The phenolics of ciders: bitterness and astringency [J]. *J Sci Food Agr*, 1978, 29:478-483.
- Jiang XL. Accumulation profile and condensation mechanism of proanthocyanidins in the tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [D]. Anhui: Anhui Agricultural University (安徽农业大学), 2015.
- Karonen M, et al. Reversed-phase HPLC-ESI/MS analysis of birch leaf proanthocyanidins after their acidic degradation in the presence of nucleophiles [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18:378-386.
- Schofield P, et al. Analysis of condensed tannins: a review [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2001, 91:21-40.
- Porter LJ, et al. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(1):223-230.
- Li YG, et al. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes [J]. *J Sci Food Agr*, 1996, 70:89-101.
- Perez-Jimenez J, et al. Analysis of monextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59:12713-12724.
- Hemingway RW. Reactions at the interflavanoid bond of proanthocyanidins [C]. *Proceedings of the Chemistry and Signif-*

- ificance of Condensed Tannins, 1989.
- 30 Scalbert A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissue [C]. Proceedings of the Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance, 1992.
 - 31 Cheynier V, et al. Estimation of procyanidin chain length [J]. Methods Enzymol, 2001, 335(7): 82-94.
 - 32 Bate-Smith EC. Phytochemistry of proanthocyanidins [J]. Phytochemistry, 1975, 14: 1107-1113.
 - 33 Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes [J]. J Anim Sci, 1995, 73: 1516-1528.
 - 34 Giner-Chavez BI, et al. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium [J]. J Sci Food Agr, 1997, 74: 359-368.
 - 35 Makkara HPS, et al. Limitation of the butanol-hydrochloric acid-iron assay for bound condensed tannins [J]. Food Chem, 1999, 66: 129-133.
 - 36 Mcmurrough I, et al. Chromatographic separation and automated analysis of flavanoids [J]. Anal Biochem, 1978, 91: 92-100.
 - 37 Treutter D. Hemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde [J]. J Chromatogr A, 1989, 467: 185-193.
 - 38 Butler LG, et al. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins); Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization [J]. J Agr Food Chem, 1982, 30: 1087-1089.
 - 39 Sun B, et al. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins [J]. J Agr Food Chem, 1998, 46: 4267-4274.
 - 40 Price ML, et al. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain [J]. J Agr Food Chem, 1977, 25: 1268-1273.
 - 41 Graham HD. Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenols [J]. J Agr Food Chem, 1992, 40: 801-805.
 - 42 Hagerman AE, et al. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins [C]. Antinutrients and Phytochemicals in Food, 1997.
 - 43 Bartolome B, et al. Photodiode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds [J]. J Chromatogr A, 1993, 655: 119-125.
 - 44 Vennat B, et al. Proandins from the roots of *Fragaria vesca* [J]. Phytochemistry, 1987, 26(1): 261-263.
 - 45 Gu L, et al. Fractionation of polymeric procyanidins from low-bush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method [J]. J Agr Food Chem, 2002, 50: 4852-4860.
 - 46 Donovan JL, et al. Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'-and 4'-O-methylated analogs A comparison of sensitive methods [J]. J Chromatogr B, 1999, 726: 277-283.
 - 47 Ohnishi-Kameyama M, et al. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997, 11: 31-36.
 - 48 Karchesy JJ, et al. Sequencing procyanidin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry [J]. Anal Chem, 1986, 58: 2563-2567.
 - 49 Freitas VP, et al. Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry [J]. Phytochemistry, 1998, 49: 1435-1441.
 - 50 Friedrich W, et al. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Eur Food Res Technol, 2000, 211: 56-64.
 - 51 Chen H, et al. Identification of antioxidant and anti- α -amylase components in lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn.) seed epicarp [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187: 677-690.
 - 52 Foo LY, et al. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus* [J]. Phytochemistry, 1996, 41: 617-624.
 - 53 Mateus N, et al. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry [J]. J Agr Food Chem, 2002, 50: 2110-2116.
 - 54 Flamini R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols [J]. Mass Spectrom Rev, 2003, 22: 218-250.
 - 55 Gu L, et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods [J]. J Mass Spectrom, 2003, 38: 1272-1280.
 - 56 Yanagida A, et al. Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques [J]. J Biochem Biophys Methods, 2003, 56: 311-322.
 - 57 Sun C. Review of matrices of MALDI-TOF MS analysis for polymers [J]. Mod Sci Instrum (现代科学仪器), 2015, 5(5): 90-92.
 - 58 Takahata Y, et al. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity [J]. J Agr Food Chem, 2001, 49: 5843-5847.
 - 59 Yang Y, et al. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. J Agr Food Chem, 2000, 48: 3990-3996.
 - 60 Monagas M, et al. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins [J]. J Pharmaceut Biomed, 2010, 51: 358-372.

- 61 Nováková L, et al. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis[J]. *Talanta*,2006,68:908-918.
- 62 Yan T, et al. Characterisation of proanthocyanidins from *Schisandra chinensis* seed coats by UPLC-QTOF/MS[J]. *Nat Prod Res*,2014,28:1834-1842.
- 63 Wang Y, et al. Analysis of cranberry proanthocyanidins using UPLC-ion mobility-high-resolution mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*,2020,412:3653-3662.
- 64 Dooren IV, et al. Advantages of a validated UPLC-MS/MS standard addition method for the quantification of A-type dimeric and trimeric proanthocyanidins in cranberry extracts in comparison with well-known quantification methods [J]. *J Pharmaceut Biomed*,2018,148:32-41.
- 65 Rubert-Nason KF, et al. Analysis of condensed tannins in *Populus* spp. using reversed phase UPLC-PDA-(-)-ESI-MS following thiolytic depolymerization [J]. *Phytochem Anal*, 2019,30:257-267.
- 66 Karchesy JJ, et al. Loblolly pine bark polyflavanoids [J]. *J Agr Food Chem*,1980,28:222-228.
- 67 Mastsuo T, et al. Comparative studies of condensed tannins from several young fruits[J]. *J Jpn Soc Hortic Sci*,1981,50:262-269.
- 68 Mastsuo T, et al. The chemical structure of Kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.) [J]. *Agric Biol Chem*,2014,42:1637-1643.
- 69 Williams VM, et al. Molecular weight profiles of proanthocyanidin polymers[J]. *Phytochemistry*,1983,22:569-572.
- 70 Thies M, et al. New color reaction for the microchemical detection and the quantitative determination of catechins [J]. *Microchim Acta*,1971,1:9-13.
- 71 Thompson RS, et al. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction;the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins [J]. *J Chem Soc Perkin T 1*,1972,11:1387-1399.
- 72 Kusano R, et al. Polymer-Like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities [J]. *Chem Pharm Bull*,2008,56:266-272.
- 73 Kennedy JA, et al. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol [J]. *J Agr Food Chem*,2001,49:1740-1746.
- 74 Hemingway RW, et al. Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins [J]. *J Wood Chem Technol*,2007,3:421-435.
- 75 Reed JD, et al. Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium [J]. *J Sci Food Agr*,1985,36:255-261.
- 76 Silanikovea NS, et al. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants [J]. *Anim Feed Sci Technol*,2001,91:69-81.
- 77 Makkar HPS, et al. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods [J]. *J Sci Food Agr*,1993,61:161-165.
- 78 Hagerman AE, et al. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions [J]. *J Biol Chem*,1981,256:4495-4497.
- 79 Sarneckis CJ, et al. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis [J]. *Aust J Grape Wine Res*,2006,12:39-49.
- 80 Yanagida A, et al. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography [J]. *J Chromatogr A*,1999,855:181-190.
- 81 Lopez-Serrano M, et al. Reversed-phase and size-exclusion chromatography as useful tools in the resolution of peroxidase-mediated(+) -catechin oxidation products [J]. *J Chromatogr A*,2001,919:267-273.
- 82 Rigaud J, et al. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans grape seeds [J]. *J Chromatogr A*,1993,654:255-260.
- 83 Yanagida A, et al. Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*,2000,890:251-259.
- 84 Kelm MA, et al. High-performance liquid chromatography separation and purification of Cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase [J]. *J Agr Food Chem*,2006,54:1571-1576.
- 85 Putman LJ, et al. Separation of high molecular weight sorghum procyanidins by high-performance liquid chromatography [J]. *J Agr Food Chem*,1989,37:943-946.
- 86 Ito C, et al. Characterisation of proanthocyanidins from black soybeans: Isolation and characterisation of proanthocyanidin oligomers from black soybean seed coats [J]. *Food Chem*,2013,141:2507-2512.
- 87 Kallithraka S, et al. Survey of solvents for the extraction of grape seed phenolics [J]. *Phytochem Anal*,1995,6:265-267.
- 88 Koupai-Abyazani MR, et al. Identification of the constituent flavanoid units in sainfoin proanthocyanidins by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*,1992,594:117-123.
- 89 Kahle K, et al. Polyphenol profiles of apple juices [J]. *Mol Nutr Food Res*,2005,49:797-806.
- 90 Putman LJ, et al. Fractionation of condensed tannins by counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr*,1985,318:85-93.
- 91 Esatbeyoglu T, et al. Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using countercurrent chromatography [J]. *Food Chem*,2015,179:278-289.