

谢翀, 林琳, 吴戈仪, 等. 荔枝生理落果中 A 型原花青素提取纯化鉴定及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 81–87. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050048

XIE Chong, LIN Lin, WU Geyi, et al. Extraction, Purification, Identification of A-type Procyanidine from Litchi Fruitlet and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 81–87. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050048

· 研究与探讨 ·

荔枝生理落果中 A 型原花青素提取纯化鉴定及抗氧化活性研究

谢 翀, 林 琳, 吴戈仪, 王 凯, 胡卓炎, 赵 雷*
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘 要: 本文以荔枝生理落果为原料, 采用乙醇提取、AB-8 大孔树脂纯化和 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离得到多酚组分, 采用 DPPH·、ABTS·清除法及 FRAP 法测定各多酚组分体外抗氧化活性后, 使用电喷雾液质联用四级杆飞行时间质谱 (LC-ESI-Q-TOF) 对多酚进行鉴定。结果表明, 荔枝生理落果总酚及总原花青素含量分别为 (49.96±2.66) mg GAE/g DW 和 (27.25±0.44) mg EPE/g DW; 而体外抗氧化活性结果表明, 第 4 个多酚组分 (P4) 具有较强 ABTS·和 DPPH·清除能力, 当 100 μg/mL 时, 清除率分别为 92.52% 和 46.98%, 总抗氧化能力显著高于抗坏血酸 ($P<0.05$); 经 LC-ESI-Q-TOF 分析发现, 荔枝生理落果多酚纯化物含有 10 种 A 型原花青素, 其中 P4 组分由纯 A 型原花青素组成, 分别为原花青素 A₄、原花青素 A₂ 及 A 型原花青素二聚体和四聚体。从荔枝生理落果中分离纯化的 A 型原花青素具有优秀的抗氧化活性, 可作为新的 A 型原花青素来源。

关键词: 荔枝, A 型原花青素, 抗氧化活性, 分离纯化, 结构鉴定

中图分类号: O657.63; TS209

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)03-0081-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021050048

本文网刊:



Extraction, Purification, Identification of A-type Procyanidine from Litchi Fruitlet and Its Antioxidant Activity

XIE Chong, LIN Lin, WU Geyi, WANG Kai, HU Zhuoyan, ZHAO Lei*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, polyphenol fractions were extracted from litchi fruitlet which drop naturally, then purified by AB-8 macroporous resin and separated by Sephadex LH-20. After comparing the antioxidant activities of each sample *in vitro*, the polyphenol components were identified by LC-ESI-Q-TOF. The results showed that the content of total phenols and total procyanidines in litchi fruitlet were (49.96±2.66) mg GAE/g DW and (27.25±0.44) mg EPE/g DW, respectively. *In vitro* antioxidant activity test indicated that the fourth polyphenol component (P4) had strong ABTS· and DPPH· scavenging ability, and its free radical scavenging rate could reach 92.52% and 46.98% in 100 μg/mL respectively. According to LC-ESI-Q-TOF analysis, PLFE contained 10 types of A procyanidines, which were much more than B procyanidines. P4 was composed of pure A-type procyanidine, which were procyanidine A₄, procyanidine A₂, A-type procyanidine dimer and tetramer. Therefore, A-type procyanidine isolated and purified from litchi fruitlet have remarkable antioxidant activity, which can be used as an excellent source of new A-type procyanidine.

Key words: litchi; A-type procyanidine; antioxidant activity; isolation and purification; structure identification

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是一种产于东南热带带到亚热带的作物, 为常绿乔木植物的果实, 属无患

收稿日期: 2021-05-10

基金项目: 国家自然科学基金 (31771980); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-32); 广州市对外科技合作计划项目 (201807010113)。

作者简介: 谢翀 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: sgxiechong1@163.com。

* 通信作者: 赵雷 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物绿色修饰及热带水果加工综合利用, E-mail: scauzl@scau.edu.cn。

子科荔枝属^[1-2]。研究发现,荔枝多酚在荔枝果皮、果肉和果核中都有分布,其中果皮中含量最高,是荔枝中主要功能性成分之一^[3-4]。大量研究表明,荔枝多酚具有多种生物活性,如抗氧化、抗癌、降血糖等^[5-9]。而原花青素是由黄烷3醇单体构成的多酚化合物,根据不同连接键可分为A型原花青素(C-O-C)及B型原花青素(C-C),根据分子量大小又可分为单体、低聚体和高聚体,广泛分布于各种植物的皮和核^[10-11]。在植物中,A型原花青素远不如B型原花青素常见,荔枝则是少数以A型原花青素为主的植物之一^[12]。同时,荔枝自开花结果到成熟过程中,因品种、气象条件等因素,会有3~4次的落果高峰^[13]。为了提高荔枝的产量和品质,人们会进行人工疏果,获得大量的小果实。而这些荔枝生理落果不可食用,应用范围较窄,常作为农业废弃物丢弃。KAUR等^[14]研究发现,荔枝从坐果到成熟过程中原花青素含量呈下降趋势,因此荔枝生理落果可作为原花青素的良好来源之一。如今,荔枝中已被鉴定出含有12种二聚体及6种三聚体,其中原花青素A₁、原花青素A₂及表儿茶素-(4 β →8,2 β →O→7)-表儿茶素-(4 β →8)-表儿茶素等A型低聚原花青素结构已明晰,但随着聚合度的增加,同分异构体数量也随之增加,增加了对聚合度在3以上的原花青素结构的鉴定难度^[15-16]。同时,A型低聚原花青素也通过动物实验进一步明确了其抗动脉粥样硬化及抗糖尿病等生物活性^[17-18]。

目前,对荔枝生理落果的研究主要集中在果实自然脱落的预防及机制和生长过程中一些基本成分的变化,尚未见有研究对荔枝生理落果中生物活性成分进行提取鉴定并发掘其潜在的利用价值。为深入探究荔枝生理落果中酚类化合物的组成并寻找具有活性的多酚组分,本文用乙醇作为提取溶剂对荔枝生理落果中酚类物质进行提取,采用大孔树脂及葡聚糖凝胶对提取物进行分离纯化,采用体外抗氧化对不同的多酚组分进行评价,并利用HPLC及LC-Q-TOF对多酚组分进行物质鉴定,以期对荔枝生理落果的废物利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2020年新鲜荔枝落果(品种:白糖罂)取自茂名当地果园,整果经40℃热风干燥54h,打粉后储存于干燥皿中备用;AB-8大孔树脂、Sephadex LH-20、福林酚(分析纯)、没食子酸(标准品)、表儿茶素(标准品)、原花青素A₂(标准品)、原花青素A₄(标准品)、芦丁(标准品)上海源叶生物科技有限公司;香草醛(分析纯)上海麦克林生化科技有限公司;甲酸(色谱纯)天津科密欧化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯)德国默克公司。

Lab-1C-50型真空冷冻干燥机北京博医康实验仪器有限公司;1260 Infinity型高效液相色谱仪、Agilent6540UHD Q-TOF, Zorbox SB-C₁₈柱

(4.6 mm×250 mm 5-Micron) 安捷伦科技有限公司;Uvmini-1240型紫外分光光度计日本岛津公司;TD5-II低速离心机长沙平凡仪器仪表有限公司;H01-1D恒温磁力搅拌器梅颖浦仪器仪表制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荔枝生理落果粗多酚化合物提取 参考LI等^[15]的方法并稍作修改。荔枝生理落果粉末用正己烷按1:10(mg/mL)的料液比混合后静置过夜,3500 r/min离心15 min除去正己烷后,按1:10(mg/mL)的料液比与70%乙醇混合后在室温下300 r/min磁力搅拌提取,重复提取至溶液基本无色,合并提取液,浓缩后冻干为荔枝生理落果多酚粗提物(Litchi Fruitlet Extract, LFE),测定提取液及LFE中多酚及原花青素含量。

1.2.2 AB-8大孔树脂纯化 参考LI等^[15]的方法并稍作修改。LFE溶解后上样AB-8大孔树脂柱(2.5 cm×60 cm),随后用蒸馏水洗去糖和蛋白质,再用乙醇洗脱吸附的多酚,分管收集(10 mL/管),每管测定多酚含量,根据洗脱曲线合并洗脱液,冻干得荔枝生理落果多酚纯化物(Purity Litchi Fruitlet Extract, PLFE),测定多酚及原花青素含量。

1.2.3 Sephadex LH-20葡聚糖凝胶分离 参考ZHOU等^[19]的方法并稍作修改。PLFE配制成高浓度的多酚溶液(50 mg/mL),采用20%、40%、60%、80%甲醇溶液进行梯度洗脱,洗脱液分管收集,每管10 mL,于280 nm处测定吸光值,绘制洗脱曲线,根据洗脱曲线收集不同组分,合并后于旋转蒸发仪40℃减压浓缩备用。

1.2.4 电喷雾液质联用四级杆飞行时间质谱(LC-ESI-Q-TOF) 参考何婷等^[20]的方法并稍作修改。使用高效液相色谱(HPLC)系统分析酚类化合物,使用安捷伦Zorbox SB-C₁₈柱,紫外分光光度检测器。进样量为10 μ L,柱温维持在30℃,流速0.7 mL/min,检测波长280 nm。流动相为0.4%(v/v)甲酸水溶液(溶液A)和甲醇(溶液B)。洗脱条件如下:0~10 min(15%~35% B);10~25 min(35%~45% B);25~40 min(45%~60% B);40~45 min(20% B)。

为进行物质鉴定,所选样品在Agilent 6540UHD Q-TOF进行ESI负离子分析上进行分析,流动相和洗脱条件与高效液相色谱分析相同。质谱使用ESI离子源收集条件:孔板电压-30 V;雾化压力45 Psi;热毛细管温度275℃;质量范围m/z 100~1200;干燥气为氮气。

根据LC-ESI-Q-TOF得到相应出峰时间物质的分子量、碎片离子峰,并通过与标准品保留时间的比较,对表儿茶素、原花青素及芦丁的峰进行定性分析,标准品包括表儿茶素、原花青素A₂、原花青素A₄、芦丁。

1.2.5 酚类物质含量及体外活性测定

1.2.5.1 总酚及总原花青素含量测定 参考 RAN-GKADLLOK 等^[21]的方法对总酚含量进行测定。取 0.1 mL 稀释后的样品液于 10 mL 棕色容量瓶并加少量的水和 0.5 mL 福林酚溶液,摇匀完静置 3~4 min,在 8 min 内加入 1.5 mL 20% Na_2CO_3 溶液,用蒸馏水定容至刻度,室温下避光反应 2 h,在 765 nm 下测吸光值,以蒸馏水为空白,重复测定 3 次。以没食子酸为标准品所绘制的标准曲线为:

$$Y = 0.0012X + 0.0195, R^2 = 0.9994 \quad \text{式 (1)}$$

参考 ZHANG 等^[22]的方法对总原花青素含量进行测定。取 1 mL 稀释后的样品液与 2.5 mL 1% (w/v) 香草醛-甲醇溶液和 2.5 mL 20% (v/v) H_2SO_4 -甲醇溶液混合。溶液在 30℃ 的条件下避光水浴反应 20 min。测定样品在 500 nm 处的吸光度,以甲醇为空白,重复测定 3 次。以表儿茶素为标准品所绘制的标准曲线为:

$$Y = 0.0057X + 0.0188, R^2 = 0.9994 \quad \text{式 (2)}$$

测定结果根据如下公式计算荔枝生理落果及提取物(LFE、PLFE)的总酚、总原花青素含量。

$$\text{含量} = \frac{m}{M} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: m 为计算所得总酚、原花青素的质量, mg; M 为提取所用荔枝生理落果的质量或测定所用提取物(LFE、PLFE)的质量, mg。

1.2.5.2 体外抗氧化活性测定 以铁还原/抗氧化能力(FRAP)和清除 DPPH $\cdot$ 、ABTS $\cdot$ 活性评价其体外抗氧化活性,参考 ZHOU 等^[19]的方法进行测定,并稍作改动。取 0.1 mL 样品液加 3.9 mL 自由基反应液,避光反应,记为 A_1 。两者均用 95% 乙醇代替样品液作为对照组,记为 A_0 ,以蒸馏水为空白参比,以抗坏血酸作为阳性对照,分别于 517 nm 和 734 nm 测吸光值。按以下公式计算自由基清除率,并计算 IC_{50} 值。

$$\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

FRAP 总抗氧化能力:取 0.1 mL 样品液与 5 mL 现配的 FRAP 试剂混合,避光 37℃ 下水浴反应 10 min,以蒸馏水为空白,以抗坏血酸为阳性对照,在 593 nm 处测定吸光值。将测量结果与 Trolox 标准曲线比较,将样品达到相同吸光度所需 Trolox 的毫摩尔数,用来表示其抗氧化活性(FRAP 值)。

1.3 数据分析

采用 Origin2018 软件处理数据并作图,每个样品测定 3 个平行并所有实验均重复 3 次,通过 SPSS 20.0 软件对数据进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 荔枝生理落果多酚提取、纯化结果

经测定,荔枝生理落果中总酚及总原花青素含

量分别为 (49.96 ± 2.66) mg GAE/g DW 和 (27.25 ± 0.44) mg EPE/g DW,提取液经浓缩冻干后得到 LFE,其多酚含量为 (202.46 ± 1.94) mg/g,原花青素含量为 (106.75 ± 1.34) mg/g。有研究表明,成熟荔枝中多酚总量为 264.36~662.51 mg/kg,原花青素总量为 7.09~22.76 mg/g,并且荔枝中总酚含量高于菠萝、香蕉等 4 种热带水果,仅次于百香果,原花青素含量则远高于大部分市售水果^[4,23-25]。可见荔枝生理落果富含多酚及原花青素,可作为新的酚类物质来源。

为提高 LFE 中酚类物质的纯度,将 LFE 上样大孔树脂 AB-8 进行动态吸附洗脱,洗脱曲线如图 1 所示,根据洗脱曲线合并第 17~35 管洗脱液,浓缩冻干得 PLFE。经测定,纯化后 PLFE 多酚含量可达到 (545.85 ± 7.84) mg/g,原花青素含量可达到 (205.92 ± 3.224) mg/g。AB-8 大孔树脂属于低极性树脂,可从溶剂中吸附小分子的低极性物质,常用于植物多酚的分离纯化^[26]。由数据可见,经大孔树脂纯化后,LFE 中大部分的糖和蛋白质等杂质被除去,并有效保留了大部分酚类物质于 PLFE 中。

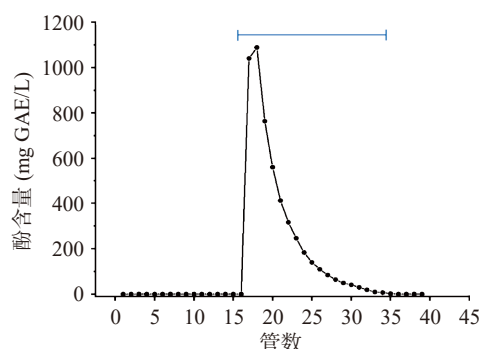


图 1 大孔树脂 AB-8 洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of AB-8 macroporous resin

为进一步对 PLFE 中复杂的酚类物质分离,将 PLFE 上样 Sephadex LH-20 凝胶色谱(1.6 cm×45 cm)。Sephadex LH-20 分离植物成分的原理与分子排阻色谱原理相似,根据目标分离产物分子量的不同可达到进一步分离纯化的目的^[27]。经不同浓度甲醇溶液洗脱,根据样品在 280 nm 下的吸光值,将样品分为 P1、P2、P3 和 P4 四个组分,洗脱曲线如图 2 所示。

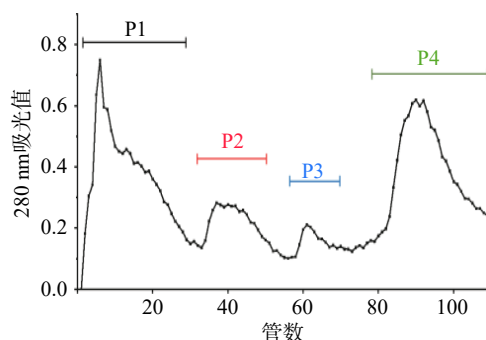


图 2 Sephadex LH-20 洗脱曲线

Fig.2 Sephadex LH-20 elution curve

2.2 不同组分多酚体外抗氧化活性及组成

2.2.1 体外抗氧化活性 荔枝果皮中含有大量的花青素和类黄酮,这些化合物能够通过螯合金属离子,形成金属配合物,直接清除超氧阴离子^[28]。

P1~P4 组分、PLFE 及抗坏血酸对 ABTS^+ 、DPPH·清除能力及总抗氧化能力如图 3~5 所示。由图可知各样品体外抗氧化活性均表现出剂量依赖性。P1~P4 组分和 PLFE 的 ABTS^+ 清除能力均显著高于抗坏血酸($P<0.05$),其中 P4 组分自由基清除能力最强,其在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时 ABTS^+ 清除能力是抗坏血酸的 1.5 倍。各样品 DPPH·清除能力表现出与 ABTS^+ 相似的趋势,P1~P3 组分自由基清除能力较低,当浓度在 20~60 $\mu\text{g/mL}$ 时,P4 组分对 DPPH·清除能力显著高于抗坏血酸($P<0.05$),而 PLFE 则与抗坏血酸相当,而浓度在 80~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,P4 组分自由基清除能力与抗坏血酸相似。各组分 ABTS^+ 及 DPPH·清除能力 IC_{50} 值大小排序分别为:P4 (38.21 $\mu\text{g/mL}$)>PLFE(47.03 $\mu\text{g/mL}$)>P2(55.11 $\mu\text{g/mL}$)>P3 (56.90 $\mu\text{g/mL}$)>P1 (57.17 $\mu\text{g/mL}$)>抗坏血酸 (81.24 $\mu\text{g/mL}$)和抗坏血酸 (100.73 $\mu\text{g/mL}$)>P4 (102.50 $\mu\text{g/mL}$)>PLFE(111.70 $\mu\text{g/mL}$)>P3(144.98 $\mu\text{g/mL}$)>P2(166.85 $\mu\text{g/mL}$)>P1(285.29 $\mu\text{g/mL}$),两者趋势相似,说明 P4 组分能够有效清除自由基离

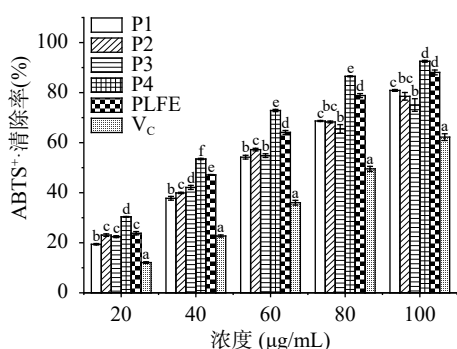


图3 各组分及抗坏血酸 ABTS^+ 清除能力

Fig.3 ABTS^+ free radical scavenging ability of each component and ascorbic acid

注:不同小写字母表示组内的显著性差异分析($P<0.05$),字母由 a~e 代表数据从小到大;图 4~图 5 同。

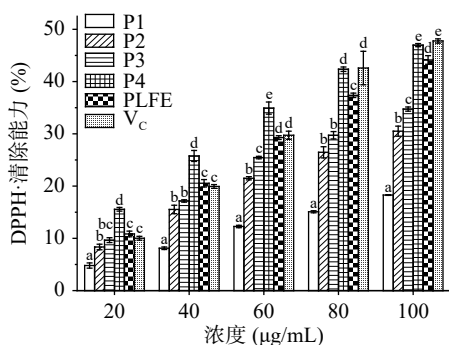


图4 各组分及抗坏血酸 DPPH·清除能力

Fig.4 DPPH· free radical scavenging ability of each component and ascorbic acid

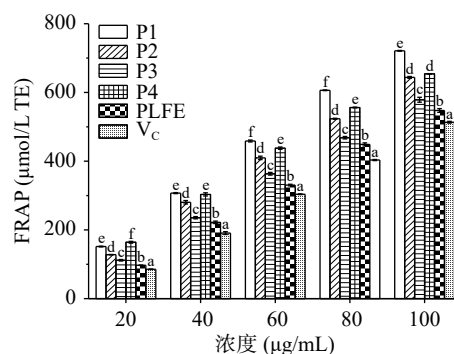


图5 各组分及抗坏血酸总抗氧化能力

Fig.5 Total antioxidant capacity of each component and ascorbic acid

子,具有较强的抗氧化活性。而在总抗氧化能力测定结果中,P1 组分表现出最强的抗氧化活性,在高浓度下显著高于其他多酚样品及抗坏血酸($P<0.05$),而 P4 和 P2 组分总抗氧化能力相当,在 100 $\mu\text{g/mL}$ 时约是抗坏血酸的 1.06 倍。P3 和 PLFE 抗氧化能力虽较弱,但也显著高于抗坏血酸($P<0.05$)。

荔枝中富含多酚类物质,不同品种的荔枝及不同提取方式得到的产品其结构和活性均不相同。研究发现不同溶剂提取的荔枝果皮粗多酚活性弱于抗坏血酸,大孔树脂纯化后 DPPH·清除能力与抗坏血酸相当,而进一步分离得到的多酚化合物抗氧化活性差别较大,个别显著强于抗坏血酸及对照丁基羟基甲苯(BHT)^[9,29-31]。可见荔枝中的多酚类化合物具有一定的抗氧化活性,但由于多酚种类及结构上的不同,其抗氧化活性存在一定的差异。综合 3 个体外抗氧化测定结果考虑,P4 组分表现出较强的抗氧化能力,说明通过 AB-8 大孔树脂及 LH-20 分离纯化后得到的 P4 组分中含有强抗氧化活性的物质。为进一步探究 P4 中的活性成分,对 P4 组分中多酚化合物组成进行 LC-ESI-Q-TOF 分析。

2.2.2 物质鉴定 图 6 为 PLFE 的 HPLC 图。为了进一步明确其物质组成,采用 LC-Q-TOF 进行 ESI 负离子分析,对其中主要的化合物进行鉴定。PLFE 组成如表 1 所示,经质谱分析可鉴定出 15 种物质,除去编号 10 的芦丁外,其余均为原花青素的低聚物。其中编号 6 为表儿茶素,编号 3-2、4、5-2、7-3、8、9 为原花青素二聚体,编号 1、2、3-1、5-1、5-3、7-1、7-2 为原花青素三聚体。在原花青素的低聚物中,A 型占了 10 种,B 型仅有 3 种。这表明荔枝落果中原花青素多数以 A 型的低聚物形式存在。荔枝也已被证实是为数不多以 A 型原花青素为主的水果之一。LI 等^[32]通过 LC-ESI-MS 分析发现 A 型原花青素约占荔枝果皮低聚原花青素提取物 41.7%,而 B 型约占 24.1%。MA 等^[29]及 GONG 等^[33]通过多重色谱分离方法从荔枝果皮中分离得到了原花青素 A_1 、原花青素 A_2 、表儿茶素及芦丁。MAN 等^[18]用乙醇提取荔枝核,D101 大孔树脂纯化,经 UPLC-MS 鉴定出表儿茶素、原花青素 A_1 及芦丁。刘梦等^[34]

将荔枝核乙醇提取物经多种色谱方法分离,得到 15 种化合物,其中也包含芦丁和原花青素 A₂。

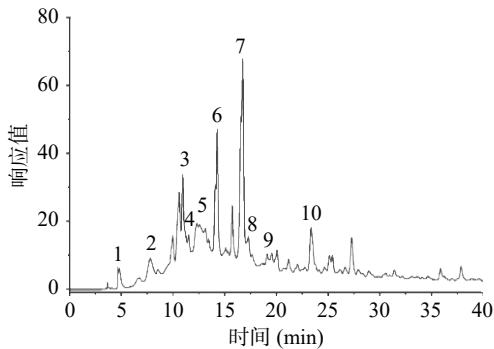


图 6 PLFE 的 HPLC 图
Fig.6 The liquid chromatogram of PLFE

图 7 为 P4 组分的 HPLC 图, P4 多酚组成如表 2 所示,一共鉴定出 4 个物质,出峰时间主要集中在 15~25 min,其中保留时间为 16.102、20.122 和 23.959 min 的物质经 Q-TOF 鉴定,其 m/z 均为 575.1,其二级质谱包含 449.0、423.0 及 285.03 的碎片离子峰,符合 A 型原花青素二聚体的裂解途径^[35]。而保留时间在 20.122 min 的另一个物质 m/z 为 1151.2,其二级质谱包含 575.1、423.0 及 285.0 的碎片离子峰,说明该物质是含有一个 C-O-C 键连接的原花青素四聚体。经过与原花青素标准品进行内标和外标法对照,鉴定出保留时间在 16.102 min 和

20.122 min 的两个原花青素二聚体分别是原花青素 A₄ 和原花青素 A₂。已有研究表明从荔枝中提取分离出荔枝单宁 A₁、荔枝单宁 A₂、原花青素 A₂ 和 A 型三聚体均具有较强的自由基清除能力^[32,36]。根据 2.2 体外抗氧化的数据结果, P4 组分的 DPPH· 和 ABTS⁺ 清除能力均显著高于抗坏血酸($P<0.05$),这与文献中的研究结果相似,说明 A 型原花青素具备很好的体外抗氧化特性。

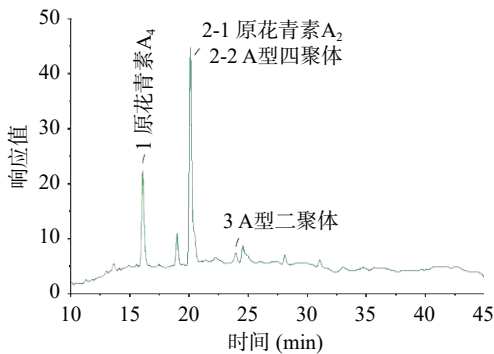


图 7 P4 组分的 HPLC 图
Fig.7 The liquid chromatogram of P4

由此可见,荔枝生理落果中富含 A 型原花青素,通过 AB-8 大孔树脂纯化、Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶分离后可富集得到纯 A 型原花青素的提取物,具有作为 A 型原花青素优秀来源的潜力。

表 1 PLFE 多酚组成成分分析
Table 1 The polyphenols composition analysis of PLFE

编号	保留时间(min)	质荷比(m/z)	分子式	化合物名称
1	4.826	863.1834	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
2	7.796	863.1815	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
3-1	10.943	863.1834	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
3-2	10.943	575.1195	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	A型原花青素二聚体
4	11.516	577.1356	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	B型原花青素二聚体
5-1	12.313	865.1968	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	B型原花青素三聚体
5-2	12.313	575.0647	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	A型原花青素二聚体
5-3	12.313	863.1826	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
6	14.273	289.0725	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素
7-1	16.743	863.1828	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
7-2	16.743	863.6838	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素三聚体
7-3	16.743	575.1206	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	A型原花青素二聚体
8	17.289	577.1358	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	B型原花青素二聚体
9	19.099	575.1197	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	A型原花青素二聚体
10	23.343	609.1475	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁

表 2 P4 组分多酚组成成分分析
Table 2 The polyphenols composition analysis of P4

编号	保留时间(min)	质荷比(m/z)	分子式	化合物名称
1	16.102	575.1203	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	原花青素 A ₄
2-1	20.122	575.1204	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	原花青素 A ₂
2-2	20.122	1151.2437	C ₆₀ H ₄₈ O ₂₄	A型原花青素四聚体
3	23.959	575.1197	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	A型原花青素二聚体

3 结论

荔枝生理落果富含多酚及原花青素,含量分别为 (49.96 ± 2.66) mg GAE/g DW 和 (27.25 ± 0.44) mg EPE/g DW;提取物经 AB-8 大孔树脂纯化, LH-20 葡聚糖分离得到 4 个多酚组分,经对比体外抗氧化活性, P4 组分具有较强的 ABTS⁺ 和 DPPH·清除能力,在 100 μ g/mL 时,清除率可分别达到 92.52% 和 46.98%,总抗氧化能力显著高于抗坏血酸($P < 0.05$);采用 LC-ESI-Q-TOF 对多酚组分鉴定发现,荔枝生理落果多酚纯化物中含有大量低聚原花青素,包含 10 种 A 型原花青素及 3 种 B 型原花青素,而 P4 组分主要由原花青素 A₄、原花青素 A₂ 及 A 型原花青素二聚体和四聚体组成。可见,荔枝生理落果中的 A 型原花青素具有优秀的生物活性,有进一步开发利用成保健品的潜力。而市售 A 型原花青素远没有 B 型原花青素普遍,来源较为单一,本文结果表明荔枝生理落果中富含大量 A 型原花青素,说明荔枝生理落果可作为一种新的 A 型原花青素植物原料。

参考文献

- [1] ZHAO L, WANG K, WANG K, et al. Nutrient components, health benefits, and safety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 2139–2163.
- [2] CHEN H, WANG K, XIAO H, et al. Structural characterization and pro-inflammatory activity of a thaumatin-like protein from the pulp tissues of *Litchi chinensis* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(23): 6439–6447.
- [3] 周秋艳, 唐方华, 饶日昌, 等. 荔枝及荔枝多酚物质的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(29): 77–79. [ZHOU Q Y, TANG F H, RAO R C, et al. Research advance of litchi and litchi polyphenols[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2017, 45(29): 77–79.]
- [4] 王敏, 陈磊, 黄雪松. 荔枝中多酚含量的测定[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(2): 172–175. [WANG M, CHENG L, HAUNG X S. Determination of polyphenols in litchi[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(2): 172–175.]
- [5] PRASAD K N, YANG B, YANG S, et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds[J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 1–7.
- [6] WANG L, LOU G, MA Z, et al. Chemical constituents with antioxidant activities from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 1081–1087.
- [7] LI J, JIANG Y. Litchi flavonoids: Isolation, identification and biological activity[J]. *Molecules*, 2007, 12(4): 745–758.
- [8] MAN S, MA J, WANG C, et al. Chemical composition and hypoglycaemic effect of polyphenol extracts from *Litchi chinensis* seeds[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 22: 313–324.
- [9] CHEN Y, LI H, ZHANG S, et al. Anti-myocardial ischemia effect and components of litchi pericarp extracts[J]. *Phytotherapy Research*, 2017, 31(9): 1384–1391.
- [10] 郑红梅, 王少英, 史新城. 植物多酚的抗氧化作用及其改善肉质的机制[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(5): 2037–2045. [ZHENG H M, WANG S Y, SHI X E. Antioxidative effects of plant polyphenols and its mechanism of improving meat quality[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(5): 2037–2045.]
- [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[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 522(1): 105–112.
- [12] LI S, LIU Y, LIU G, et al. Effect of the A-type linkage on the pharmacokinetics and intestinal metabolism of litchi pericarp oligomeric procyanidins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(9): 1893–1899.
- [13] 蔡小林, 潘介春, 周煜棉, 等. 荔枝落果研究进展[J]. *江西农业学报*, 2017, 29(1): 26–31. [CAI X L, PAN J C, ZHOU Y M, et al. Research progress in fruit drop of litchi[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2017, 29(1): 26–31.]
- [14] KAUR C, SHARMA S, NAVPREM S. Phenolics and enzymes of phenol metabolism in ‘Seedless’ and ‘Calcuttia’ cultivars of litchi grown in North India[J]. *Acta Alimentaria*, 2018, 47(4): 453–461.
- [15] SUI Y, LI X, LI S, et al. Characterization and preparation of oligomeric procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp[J]. *Fitoterapia*, 2016, 112: 168–174.
- [16] LIU L, XIE B, CAO S, et al. A-type procyanidins from *Litchi chinensis* pericarp with antioxidant activity[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4): 1446–1451.
- [17] RONG S, HU X, ZHAO S, et al. Procyanidins extracted from the litchi pericarp ameliorate atherosclerosis in ApoE knockout mice: Their effects on nitric oxide bioavailability and oxidative stress[J]. *Food & Function*, 2017, 8(11): 4210–4216.
- [18] MAN S, MA J, YAO J, et al. Systemic perturbations of key metabolites in type 2 diabetic rats treated by polyphenol extracts from *Litchi chinensis* seeds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(35): 7698–7704.
- [19] ZHOU H C, LIN Y M, LI Y Y, et al. Antioxidant properties of polymeric proanthocyanidins from fruit stones and pericarps of *Litchi chinensis* Sonn[J]. *Food Research International*, 2011, 44(2): 613–620.
- [20] 何婷, 王凯, 赵雷, 等. 大孔树脂纯化龙眼核多酚及其组分分析[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16): 1–6, 13. [HE T, WANG K, ZHAO L, et al. Macroporous resin purification and component analysis of longan seed polyphenols[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(16): 1–6, 13.]
- [21] RANGKADILOK N, WORASUTTAYANGKURN L, BENNETT R N, et al. Identification and quantification of polyphenolic compounds in longan (*Euphoria longana* Lam.) fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(5): 1387–1392.
- [22] ZHANG Y, ZHOU X, TAO W, et al. Antioxidant and anti-proliferative activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 645–654.
- [23] AXELLE S M, GIOVÉDIE S, ELISABETH D, et al. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits

- banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Réunion French Island[J]. *Food Chemistry*, 2016, 212: 225–233.
- [24] 李沙. 荔枝壳中原花青素的分离纯化及活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013. [LI S. Study on the purification and activity of proanthocyanidins from litchi pericarp[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.]
- [25] 刘洪, 李森, 冯静, 等. 成都地区市售水果中原花青素含量的分析比较[J]. *陕西农业科学*, 2011, 57(4): 35–7. [LIU H, LI M, FENG J, et al. Analysis and comparison of proanthocyanidin content in fruits which sold in Chengdu area[J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 57(4): 35–7.]
- [26] 马乐, 韩军歧, 张润光, 等. 大孔吸附树脂在植物多酚分离纯化中的应用现状[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(12): 364–367, 374. [MA L, HAN J Q, ZHANG R G, et al. Application progress of macroporous adsorption resin in separation and purification of plant polyphenols[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(12): 364–367, 374.]
- [27] 时双千. 石榴皮多酚超声影响和抗氧化性及与卵清蛋白作用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017. [SHI S Q. Studies in ultrasonic effect and antioxidant and combination with ovalbumin of pomegranate peel polyphenols[D]. Zhenjiang Jiangsu University, 2017.]
- [28] ZHU X R, WANG H, SUN J, et al. Pericarp and seed of litchi and longan fruits: Constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2019, 20(6): 503–512.
- [29] MA Q, XIE H, LI S, et al. Flavonoids from the pericarps of *Litchi chinensis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(5): 1073–1078.
- [30] JIANG G, LIN S, WEN L, et al. Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 563–568.
- [31] KANLAYAVATTANAKUL M, OSPOND PANT D, RUK-TANONCHAI U, et al. Biological activity assessment and phenolic compounds characterization from the fruit pericarp of *Litchi chinensis* for cosmetic applications[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2012, 50(11): 1384.
- [32] LI S, XIAO J, CHEN L, et al. Identification of a-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(1): 31–38.
- [33] GONG Y, FANG F, ZHANG X, et al. B type and complex A/B type epicatechin trimers isolated from litchi pericarp aqueous extract show high antioxidant and anticancer activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 301.
- [34] 刘梦, 李志峰, 冯宇, 等. 荔枝核化学成分的分离与鉴定[J]. *中草药*, 2019, 50(15): 12. [LIU M, LI Z F, FENG Y, et al. Isolation and identification of chemical constituents from seeds of *Litchi chinensis*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(15): 12.]
- [35] 李绮丽. 莲子皮低聚原花青素分级分离, 组分鉴定与抗氧化机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013. [LI Q L. Studies on isolation, identification and antioxidant activity of oligomeric proanthocyanidins from lotus seed peel[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013.]
- [36] XU X, XIE H, WANG Y, et al. A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(22): 11667–11672.