

花生红衣原花青素纯化工艺及其对乳糜泻细胞模型的影响

王娜^{1,3,4,5}, 郑玉茹^{2,5}, 徐超^{2,5}, 李军伟^{2,5}, 任红涛^{2,5}, 余秋颖^{2,3,4,5*}

¹河南农业大学动物医学院 郑州 450046

²河南农业大学食品科学技术学院 郑州 450002

³龙湖现代免疫实验室 郑州 450046

⁴河南农业大学动物免疫学国际联合研究中心 郑州 450046

⁵郑州市营养与健康食品重点实验室 郑州 450002)

摘要 目的:优化 AB-8 型大孔树脂对花生红衣原花青素的纯化工艺并对纯化物组分进行表征鉴定。采用乳糜泻模型评价其对细胞毒性的抑制作用。研究方法:选用 AB-8 型大孔树脂,通过静态、动态吸附-解吸试验对纯化条件进行优化,用紫外-可见光谱、傅里叶红外和高效液相色谱串联质谱(UPLC-QTOF-MS/MS)对纯化物鉴定。基于乳糜泻细胞模型评价纯化物对细胞毒性的抑制作用。结果表明:纯化条件:上样质量浓度 1.2 mg/mL,上样液 pH 值 3.0,上样流速 1.0 mg/mL,上样量 360 mL,吸附时间 180 min,解吸液为 120 mL 的 40%乙醇溶液,解吸时间 40 min,解吸流速 1.0 mg/mL,此时测得该纯化物纯度达 95%。紫外-可见光谱分析表明该纯化物属于原花青素类;傅里叶红外分析表明纯化物是以原花青素为主要结构单元,与标准品特征吸收峰趋势相符;UPLC-QTOF-MS/MS 分析表明 Pspc 纯化物以 A 型原花青素为主要成分;细胞试验结果表明该纯化物在一定程度上可明显抑制乳糜泻模型的毒性作用。研究结果可为花生红衣资源综合开发提供理论参考。

关键词 花生红衣原花青素; AB-8 大孔树脂; 高效液相色谱串联质谱(UPLC-QTOF-MS/MS); 细胞毒性

文章编号 1009-7848(2023)12-0167-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.12.018

花生是中国重要的油料作物之一,种植面积广泛。其种皮即花生红衣,作为主要副产物,在我国每年产出量可达近千吨^[1]。通常其被用作牛饲料或者作为废弃物丢弃。花生红衣中含有丰富的酚类化合物,包括原花青素、单宁酸、白藜芦醇等,具有抗炎、抗氧化活性、降血脂、抑菌等功效^[2-3]。本实验室前期研究发现花生红衣原花青素(Peanut skin procyanidins, Pspc)的含量可高达 128 g/kg^[4],与抗坏血酸相比,具有更强的抗氧化活性和清除自由基能力^[5]。目前关于原花青素的提取工艺已有大量研究,对其提取方法主要包括乙醇提取法、超声辅助浸提法、微波辅助浸提法及超声微波协同作用法^[6-9],然而其粗提物成分纯度不高,需进一步的分离纯化,以满足实际应用需要。Musdzalifah 等^[10]研究发现 AB-8 型树脂是一种吸附量大、解吸率高、经济环保的树脂,在火龙果皮、肉桂等多种原料中均用于多酚的分离纯化^[11-13]。

目前评价多酚抗氧化活性的方法主要包括动物实验和细胞试验,相比于动物实验,细胞试验具有准确性高、成本低、用时少的优点^[14]。现有大量研究表明多酚对细胞毒性有明显的抑制作用,主要包括对 TM4 细胞、HEpG2 细胞、Caco-2 细胞等^[15-16]。其中 Caco-2 细胞被广泛应用于乳糜泻相关研究中。乳糜泻是一种由于摄入麸质蛋白后引起肠内氧化应激反应,炎症细胞过多表达的自身免疫性肠病,在全球的发病率高达 1.4%,唯一有效的治疗方法是无麸质饮食,而麸质蛋白应用广泛,很难完全避免,需寻找新的辅助疗法^[17-18]。Pspc 作为一种天然无毒、安全高效的强抗氧化活性成分,其缓解氧化应激的作用值得深入研究。本文选用 AB-8 型大孔树脂,通过静态、动态吸附-解吸试验对 Pspc 纯化条件进行优化,用紫外-可见光谱、红外变换光谱和高效液相色谱串联质谱(UPLC-QTOF-MS/MS)对纯化物鉴定。通过麦醇溶蛋白诱导 Caco-2 细胞产生毒性作用,评价该纯化物对乳糜泻模型细胞毒性的抑制作用,为花生红衣资源综合深度开发利用提供新思路。

收稿日期: 2022-12-25

基金项目: 河南省创新生态支撑专项(HARS-22-05-Z1)

第一作者: 王娜,女,博士,教授

通信作者: 余秋颖 E-mail: yuqiuyingzf@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

花生红衣、麦醇溶蛋白,实验室自制;AB-8型大孔树脂、原花青素标准品、氢氧化钠、香草醛、DMEM培养基等,均购于索莱宝;胃蛋白酶、胰蛋白酶,购于中国新赛美公司;Caco-2细胞,中国科学院昆明细胞库供;CCK-8试剂盒,碧云天;无水乙醇、甲醇等试剂均为分析纯,购于天津富宇精细化工有限公司。

微波光波超声波萃取仪(Scientz-IIDM型),宁波新芝生物科技股份有限公司;自动液相色谱分离层析仪(ME00-2A型),上海沪西分析仪器有限公司;紫外分光光度计(UV2000型),尤尼柯仪器公司;双光束紫外可见分光光度计(TU-1901型),北京普析通用仪器有限责任公司;傅立叶变换红外光谱(Tensor II型),美国BRUKER公司;旋转蒸发仪(RE-52AA型),上海亚荣生化仪器厂;高效液相色谱仪(UltiMate 3000 U),美国Thermo Scientific公司,色谱柱Kinetex C18(150 mm×4.6 mm),美国Phenomenex公司;高效液相色谱(1290型)、质谱(6550型)、色谱柱waters BEH C18(2.1 mm×100 mm 1.7 μm),美国安捷伦公司;二氧化碳培养箱(JC-CHP-80S),德国Mettler公司;荧光显微镜(DMi8),德国Leica公司。

1.2 试验方法

1.2.1 P_{spc}标准曲线及含量测定 以香草醛-盐酸法测定P_{spc}相对含量。标准曲线以甲醇为空白样品,以P_{spc}质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得出: $y=16.65x+0.0107$, $R^2=0.9991$ 。

1.2.2 AB-8型树脂的预处理 取适量树脂于2倍体积无水乙醇中浸泡过夜,用去离子水反复清洗至无浑浊且无醇味,将其浸泡于5%的盐酸溶液中2~5 h,清洗至pH值中性,浸泡于4%的氢氧化钠溶液2~5 h,清洗至中性备用。

1.2.3 P_{spc}提取液的制备及纯化工艺 P_{spc}样液的提取参考实验室前期研究方法^[4],而粗提液中除了含有主成分原花青素外,还含有蛋白质、多糖和悬浮物颗粒等杂质,因此需将粗提液离心、弃沉淀,并选用微孔滤膜($d=0.45\ \mu\text{m}$)过滤,初步除杂,再通过大孔树脂对其进行纯化。

1.2.4 大孔树脂静态吸附-解吸动力学曲线 准

确称取2.0 g AB-8型活化树脂到100 mL锥形瓶中,加入20 mL 1.0 mg/mL的P_{spc}提取液,固定于25 ℃、100 r/min的水浴摇床中振荡吸附,每隔20 min取样1次,以吸附时间为x轴,吸附率为y轴,测定样液中原花青素含量,绘制其吸附动力学曲线图。将锥形瓶中充分吸附饱和的树脂先用蒸馏水反复清洗至液体澄清、无浑浊状态,然后用滤纸吸收表面残留的水分,随后加入20 mL 40%的乙醇,固定于25 ℃、100 r/min的水浴摇床中,每隔10 min取样1次,以解吸时间为x轴,解吸率为y轴,测定样液中原花青素含量,绘制其解吸动力学曲线图。

树脂对P_{spc}吸附率与吸附量见公式(1)、(2):

$$A = \frac{(C_0 - C_1)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$B = \frac{(C_0 - C_1) \times V}{m} \quad (2)$$

式中:A——大孔树脂的吸附率,%; C_0 ——吸附前P_{spc}质量浓度,mg/mL; C_1 ——吸附后P_{spc}质量浓度,mg/mL。 B ——大孔树脂的吸附量,mg/g; V ——样液体积,mL; m ——大孔树脂的质量,g。

树脂对P_{spc}解吸率见公式(3):

$$C = \frac{C_2 V_2}{(C_0 - C_1) V_1} \times 100 \quad (3)$$

式中:C——大孔树脂解吸率,%; C_0 、 C_1 同上; V_1 ——样品溶液的体积,mL; C_2 ——解吸液中原花青素的质量浓度,mg/mL; V_2 ——解吸液的体积,mL。

1.2.5 大孔树脂动态吸附-解吸条件优化试验 参考纪秀凤等^[19]文献,将活化后的AB-8大孔树脂湿法装于层析柱中,用蒸馏水将其冲洗压实,随后以吸附率、解吸率、P_{spc}质量浓度为测定指标,对样液浓度、pH值、上样流速、上样量、解吸流速、解吸液体积进行条件优化。

1.2.6 成分鉴定

1.2.6.1 紫外-可见光谱扫描 准确称取一定量的P_{spc}冻干粉和标准品,用甲醇溶液将其配制成0.2 mg/mL的样液及标液。空白溶液为甲醇,于200~600 nm进行紫外光谱扫描^[20]。

1.2.6.2 红外光谱扫描 在衰减全反射模式(ATR)下,称取一定量的P_{spc}冻干粉和标准品,对其

特征吸收峰进行表征。波数范围为 $500\sim 4\,500\text{ cm}^{-1}$ 。

1.2.6.3 超高效液相色谱串联质谱分析 液质参数为色谱柱:waters BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相 A:0.1%甲酸水溶液;流动相 B:乙腈溶液,梯度洗脱:0~30 min:95%~10%A、5%~90%B;30~50 min:10%~0%A、90%~100%B;50~60 min:0%~95%A、100%~5%B。流速 0.3 mL/min,进样量 5 μL,质谱扫描范围:一级 50~1 200 m/z, sheath gas temp 350 °C, sheath gas flow 12 L/min,ESI-模式,电压 3 200 V。

1.2.7 纯化物对乳糜泻模型细胞毒性的抑制作用

1.2.7.1 麦醇溶蛋白的消化 参考王娜等^[21]的方法提取麦醇溶蛋白,消化方案参考 Federico 等^[22]的研究。将麦醇溶蛋白与胃蛋白酶(比活性:3 260 U/mg)混合加入至 pH 2.0 的盐酸溶液中,于 37 °C 振荡 4 h;随后将 pH 值调为 7.8,加入胰蛋白酶(比活性:3 800 U/mg),继续振荡 4 h;结束后在沸水中放置 10 min,终止消化反应。测量蛋白浓度,将其冻干于 -20 °C 保存。

1.2.7.2 乳糜泻细胞模型的建立 将冻存的 Caco-2 细胞复苏处理,当细胞融合率为 80% 左右时传代。随机将 Caco-2 细胞分成 6 组:正常对照组,CK;乳糜泻模型组,CD;阳性对照组,VC;低浓度 Pspc (50 μmol/L) 组,L-Pspc;中浓度 Pspc (75 μmol/L) 组,M-Pspc;高浓度 Pspc (100 μmol/L) 组,

H-Pspc。将消化后的醇溶蛋白溶于 PBS 中作为母液 (10 mg/mL),并用 0.22 μmol/L 的无菌滤膜过滤,用 DMEM 稀释到 1,1.5,2 mg/mL 和 4 mg/mL,并选择合适的浓度建立细胞模型。

1.2.7.3 乳糜泻模型细胞活性的测定 根据试验要求,在细胞培养完成后,补入含有 10% (体积分数) CCK-8 溶液的完全培养基,培养于细胞培养箱 2 h,450 nm 处读值计算细胞活性。

1.3 数据分析

试验重复 3 次取平均值,结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 SPSS 26.0 进行数据分析,采用 GraphPad Prism 8 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 AB-8 大孔树脂对花生红衣原花青素静态吸附-解吸的影响

由图 1a 可知,大孔树脂对原花青素的吸附率随着时间的推移呈现出先增加后稳定的趋势。当到达 180 min 左右时渐渐平缓,说明此时大孔树脂已吸附平衡,故选用 180 min 为最佳吸附平衡时间。由图 1b 可知,大孔树脂对原花青素的解吸率呈增加的趋势,当到达 40 min 时解吸率达到最高,继续延长解吸时间,解吸率也已逐渐稳定,故选用 40 min 为最佳解吸时间。

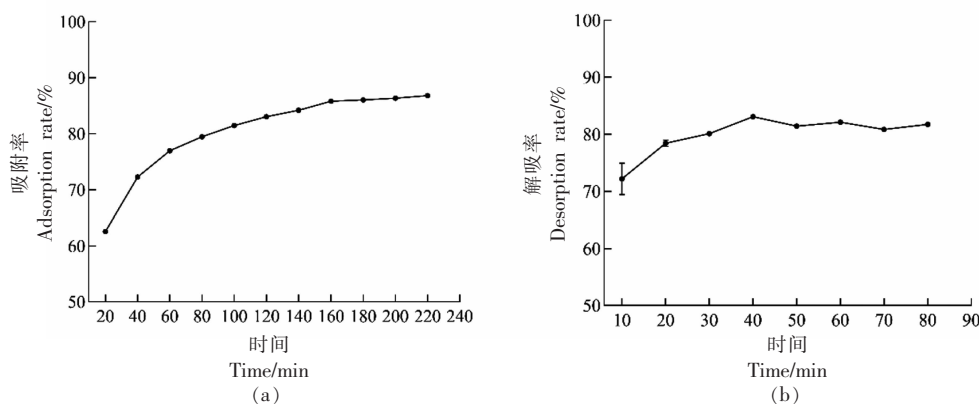


图 1 静态吸附动力学曲线和解吸动力学曲线

Fig.1 Static adsorption kinetic curves and analytical kinetic curves

2.2 AB-8 大孔树脂对花生红衣原花青素动态吸附-解吸的影响

2.2.1 样液浓度、pH 值、上样流速和上样量对树脂吸附效果的影响 由图 2a 可知,随样液浓度的

增大,大孔树脂对 Pspc 的吸附量表现为先上升后下降的趋势。当质量浓度达到 1.2 mg/mL 时,树脂对 Pspc 吸附量达到最大值。样品溶液浓度继续增加,吸附量会下降;这是由于样液浓度较大时,树

脂容易达到饱和状态,而多余的样液会堵塞树脂,因此导致吸附量下降,故选用 1.2 mg/mL 为最佳样液浓度。由图 2b 可知,树脂对 Pspc 吸附量随样液 pH 值的增加而缓慢下降。当 pH 值为 2 和 3 时,树脂的吸附量差别不大,这是因为原花青素在酸性条件下更容易被吸附,为便于后续试验的开展,选用 3 为最佳样液 pH 值。由图 2c 可知,原花青素的吸附率随着流速的增加而急剧下降,因为流速快

意味着树脂的吸附没有完全饱和,故使得吸附率下降。当流速为 0.5 mL/min 时,吸附率达到最高,结合试验具体情况,故选用 1.0 mL/min 为最佳上样流速。由图 2d 可知,原花青素的质量浓度随着泄露量的增加而趋于增加。当泄露液体积到达 360 mL 时,原花青素质量浓度达到上样液的十分之一,说明此时大孔树脂吸附饱和,已达到泄漏点^[23],故选用 360 mL 为最佳上样量。

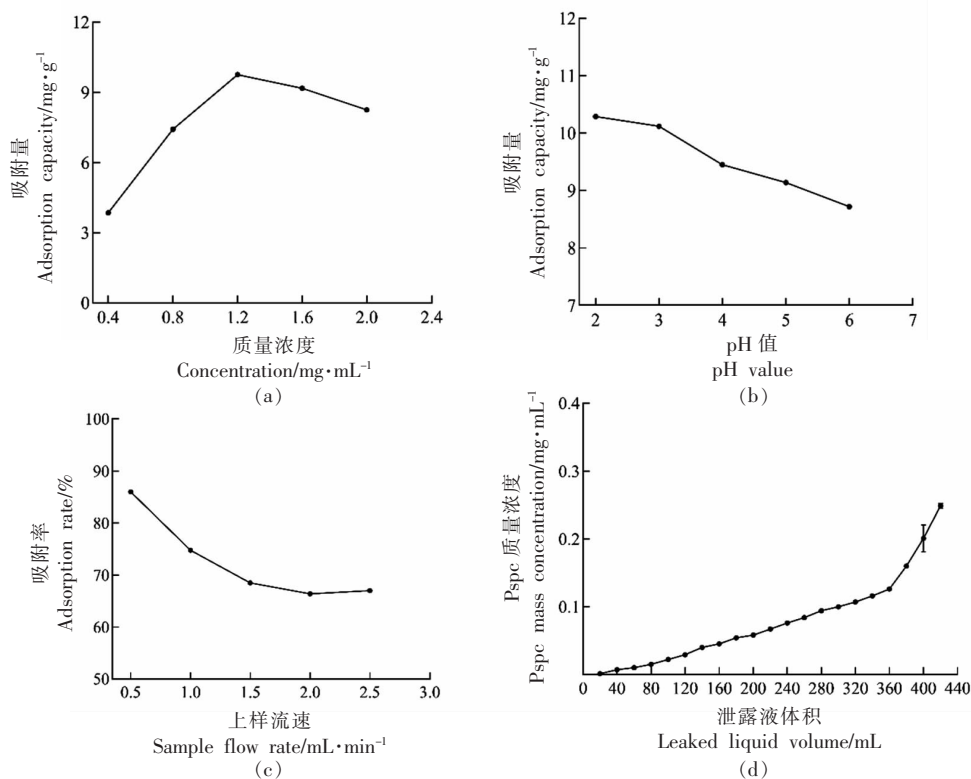


图 2 样液浓度、pH 值、上样流速和上样量对树脂吸附效果的影响

Fig.2 Effect of concentration of sample solution and pH value on resin adsorption

2.2.2 解吸流速、解吸液体积对树脂吸附效果的影响 由图 3a 可知,随着解吸流速的增大,原花青素的解吸率呈现下降趋势。适当增大流速可以提高解吸效率,但过快则会导致解吸率下降。结合试验具体情况,选用 1.0 mL/min 为最佳解吸流速。由图 3b 可知,解吸时原花青素质量浓度呈现出一种先急剧升高后急剧下降趋于平缓的状态。当解吸液体积为 60 mL 时,洗脱液中 Pspc 质量浓度为最大值,随后逐渐降低至平缓。为提高纯化效率,故选用 120 mL 为最佳解吸液体积。

2.3 花生红衣原花青素纯化物的分析与鉴定

2.3.1 紫外/可见光谱扫描 Pspc 纯化物的紫外可见光谱扫描结果如图 4 所示。由图可知,纯化物在波长 230 nm 和 280 nm 处均有明显特征吸收峰,其中 230 nm 波处的吸收峰是由苯环的 3 个共轭双键引起的;而 280 nm 波处则是由原花青素 A 环和 B 环两者的共轭结构引起的^[24]。此外,Pspc 纯化物与标准品的特征吸收峰趋势相符,说明该提取物属于原花青素类物质;参考纪秀凤等^[19]纯度的测定方法,得出该纯化物的纯度为 95%。

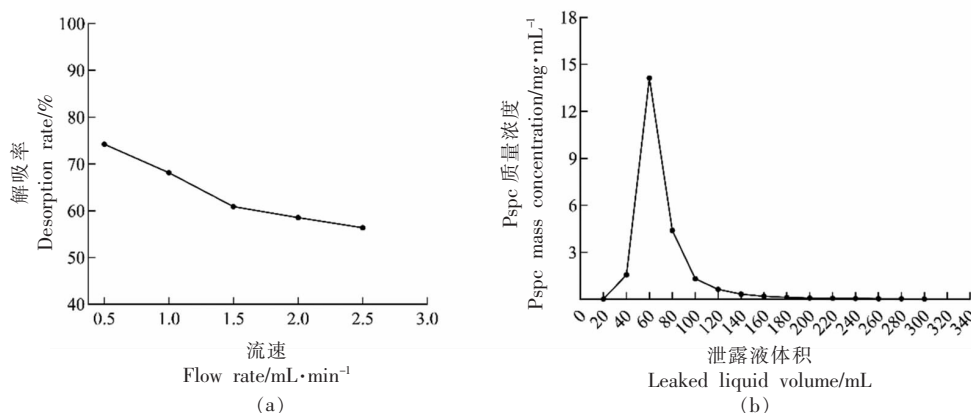


图 3 解吸流速和解吸液体积对树脂吸附效果的影响

Fig.3 Effect of loading velocity, loading volume, analytical velocity and analytical volume on resin adsorption

2.3.2 红外光谱扫描 纯化物的傅里叶红外扫描结果如图 5 所示。由图可知,纯化物的主要吸收峰有 3 325, 1 609, 1 519, 1 440, 1 280, 1 201, 1 103, 1 010, 872, 819, 781 cm^{-1} 。3 325 cm^{-1} 的强吸收峰是由于分子中羟基的拉伸振动; 1 609, 1 519 和 1 440 cm^{-1} 的吸收峰是由于苯环骨架中 C=C 之间的拉伸振动; 1 280, 1 201, 1 103 和 1 010 cm^{-1} 的吸收峰可能是 C-O-C 分子的伸缩振动带; 而在低指纹区 872, 819, 781 cm^{-1} 位置的吸收峰, 是由苯环上 3 个相邻的 H, 以及芳环骨架中的不饱和 C-H 面变形振动所引起。苏云霞等^[24]研究发现原花青素结构不同, 产生的振动频率亦会不同, 其中 B 环上的

羟基变化非常显著。根据羟基数量可分为原雀啟定(3 羟基)和原花青定(2 羟基)。含 3 羟基的原雀啟定在 1 540~1 520 cm^{-1} 强振动频率区有两个吸收峰, 并在 730 cm^{-1} 处有强吸收峰; 含 2 羟基的原花青定在强振动频率区 1 540~1 520 cm^{-1} 有一个吸收峰, 在低频率指纹区 780~770 cm^{-1} 有一个强吸收峰。图 10 表明纯化物在 1 540~1 520 cm^{-1} 处有一个吸收峰, 在 780~770 cm^{-1} 也只有一个吸收峰, 而在 730 cm^{-1} 附近处无明显谱带。由此推测, 该纯化物是以原花青定为主要结构单元, 且与葡萄籽原花青素标准品的主要特征官能团趋势相符。

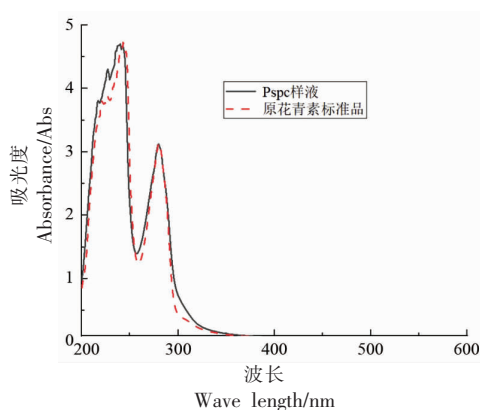


图 4 花生红衣原花青素纯化物紫外可见光谱扫描图
Fig.4 UV-Vis scan of peanut red-coated proanthocyanidins purified

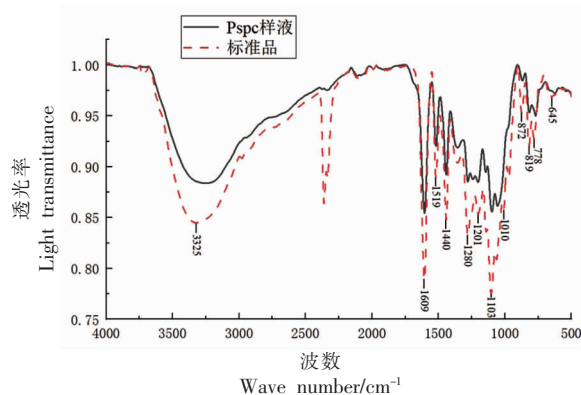


图 5 花生红衣原花青素纯化物傅里叶红外扫描图
Fig.5 FTIR scan of peanut red-coated proanthocyanidins purified

2.3.3 高效液相色谱串联质谱(UPLC-QTOF-MS/MS)鉴定分析

2.3.3.1 Pspc 总离子流图分析 通过采用高效液

相色谱-串联质谱(UPLC-QTOF)法, 再根据原花青素不同的裂解方式, 结合准分子离子 $[M-H]^{-}$ (m/z)和相对应的碎片离子信息, 对提取纯化后的花

生红衣原花青素组成进行分析。Pspc 纯化物的总离子流图如图 6 所示,共鉴定出 9 种化学成分,主要以 A 型原花青素为主。原花青素是由黄烷-3-醇结构单元组成的多酚类物质,单体主要包括儿茶素(Cat)、表儿茶素(EC)、儿茶素没食子酸酯(CG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)以及表没食子儿茶素没食子酸(EGCG)等^[25]。根据单体聚合程度,可分为二聚体、三聚体等,直至十聚体。聚合度在 2~4 的原花青素被称为低聚原花青素,聚合度大于 4 的原花青素被称为高聚原花青素。然而,原花青素的生物活性与聚合度成反比;聚合度越低,生物活性越高^[26]。原花青素裂解主要包括链间黄烷醇的断裂(QM)、RDA 反应和杂环裂解(HRF)^[27]。根据原花青素各单体连接键位置不同,可分为 T-unit、M-unit 和 B-unit 3 种。原花青素可根据单体之间的连接位置分为 A 型原花青素和 B 型原花青素。后者是单体儿茶素或/和表儿茶素在 C4-C8 或 C4-C6 位置连接时形成的,在植物中分布较广;A 型原花青素是单体间除了在 C4-C8 或 C4-C6 位连接外,还存在 C2-O-C7 或 C2-O-C5 位相连接,主要存在于花生、蔓越莓中。张睿等^[28]发现花生红衣中是以 A 型原花青素为主,且 A 型更稳定、具有更高的生物利用度。

2.3.3.2 Pspc 纯化物二级质谱图分析 Pspc 纯化物中各化合物二级质谱图分析如下:

化合物 1 的分子离子[M-H]⁻*m/z* 为 153,其结构可能为原儿茶酸。吴学峰等^[29]研究发现它的碎片离子 *m/z* 109.03 是母离子通过脱去 CO₂ 产生的碎片离子峰。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为原儿茶酸。

化合物 2 的分子离子[M-H]⁻*m/z* 为 577,可能是 B 型原花青素结构,这是 B 型原花青素二聚体在 ESI-条件下失去 H 而形成的典型质荷比。纪秀凤^[30]研究发现其碎片离子包括 *m/z* 125、*m/z* 287、*m/z* 289、*m/z* 407、*m/z* 425 和 *m/z* 451。母离子在 *m/z* 125 和 *m/z* 451 处通过 HRF (Heterocyclic ring fission) 反应裂解为一分子的间苯三酚;*m/z* 287 和 *m/z* 289 是由于裂解母离子的 QM cleavage 分子之间的单一裂变导致 C₁₅H₁₂O₆ 的损失;*m/z* 407 是母离子发生 RDA (Retro diels-alder reactions) 反应后失去 H₂O 的结果;*m/z* 425 是母

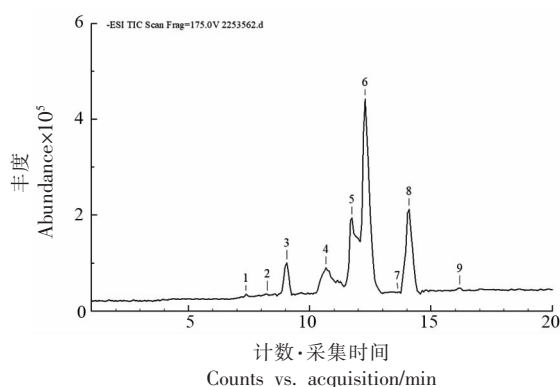


图 6 原花青素总负离子色谱图

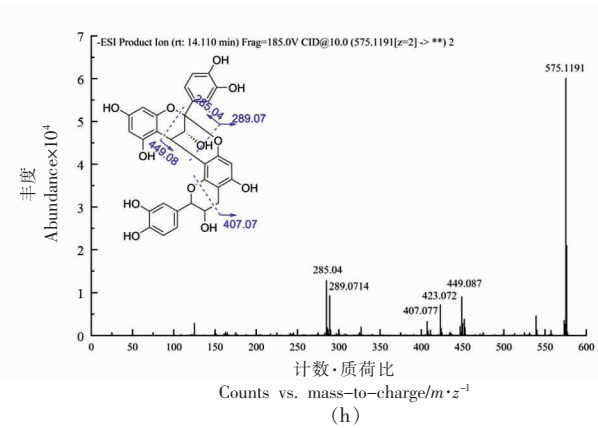
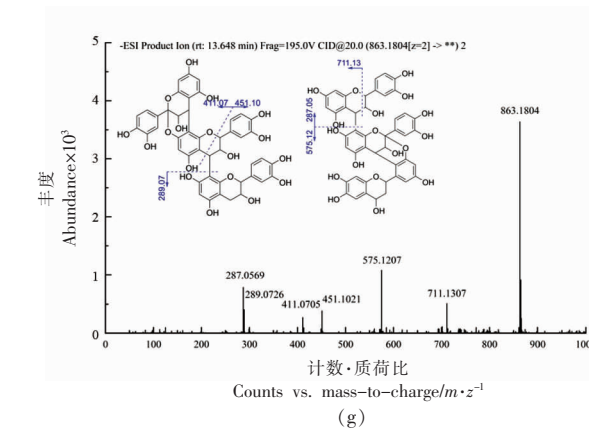
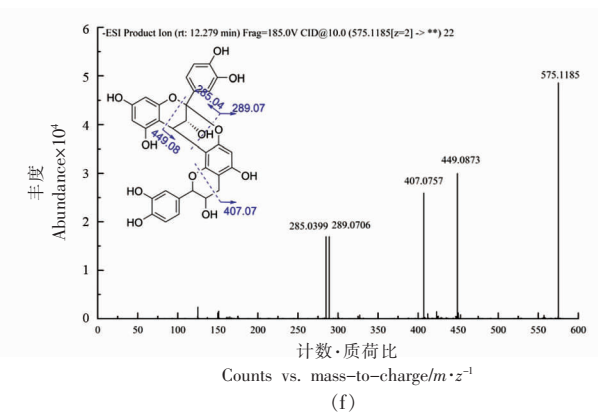
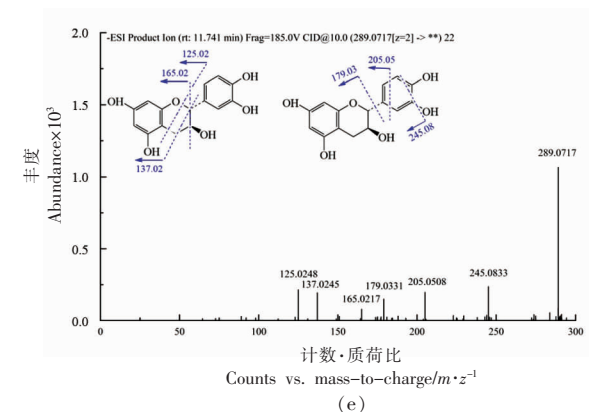
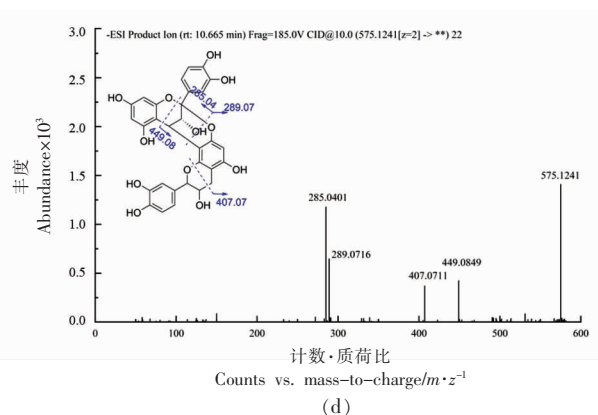
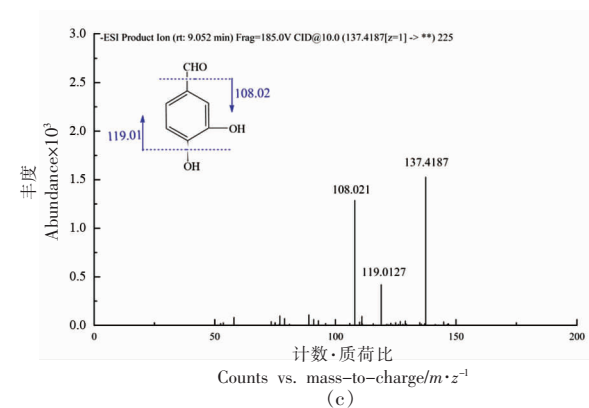
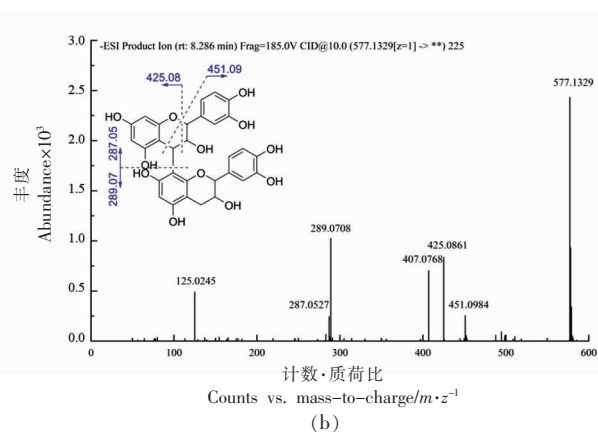
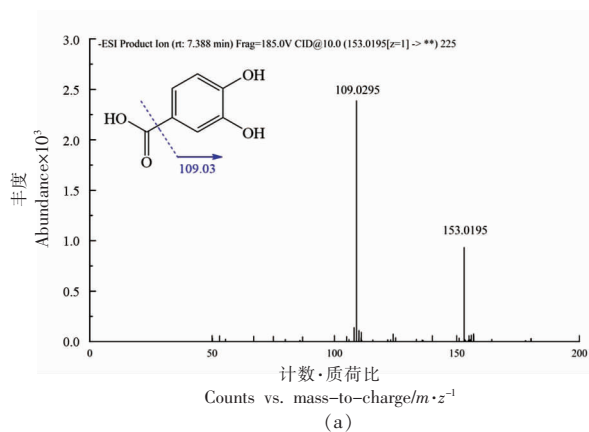
Fig.6 Total negative ion chromatogram of proanthocyanidins

离子发生 RDA 反应形成的。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为 B 型原花青素。

化合物 3 的分子离子[M-H]⁻*m/z* 为 137,其结构可能为原儿茶醛。Lin 等^[31]发现其碎片离子有 *m/z* 108.02 和 *m/z* 119.01。它们分别是 *m/z* 137.4 脱去一个醛基基团 (CHO) 和脱去一分子水的碎片所产生的。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为原儿茶醛。

化合物 5 的分子离子[M-H]⁻*m/z* 为 289,其结构可能为儿茶素。黄雪薇等^[32]研究发现其碎片离子包括 *m/z* 125.02、*m/z* 137.02、*m/z* 165.02、*m/z* 179.03、*m/z* 205.05 和 *m/z* 245.08。其中母离子 C 环 1,2 键、1,3 键和 1,4 键断裂后 A 环会产生 *m/z* 165.02、*m/z* 137.02 和 *m/z* 125.02 离子;*m/z* 179.03 是由于母离子失去 B 环所产生;*m/z* 205.05 是由母离子的 B 环失去 2 分子的 C₂H₂O 形成的;*m/z* 245.08 是由母离子失去 1 分子 CO₂ 形成的离子。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为儿茶素。

化合物 4、化合物 6、化合物 8 的分子离子[M-H]⁻*m/z* 均为 575,其结构可能为 A 型原花青素二聚体。纪秀凤^[30]研究发现其碎片离子包括 *m/z* 285.04、*m/z* 289.07、*m/z* 407.07、*m/z* 423.07 和 *m/z* 449.08。*m/z* 285 和 *m/z* 289 是由于 QM 碎裂失去 B-unit 和 T-unit 中性碎片所形成的;二聚体发生 RDA 反应形成 *m/z* 407 和 *m/z* 423 碎片离子;*m/z* 449 是分子离子在 T-unit 发生 HRF 裂解后,失去一个间苯三酚分子 (C₆H₆O₃) 而产生的。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为 A 型原花青素二



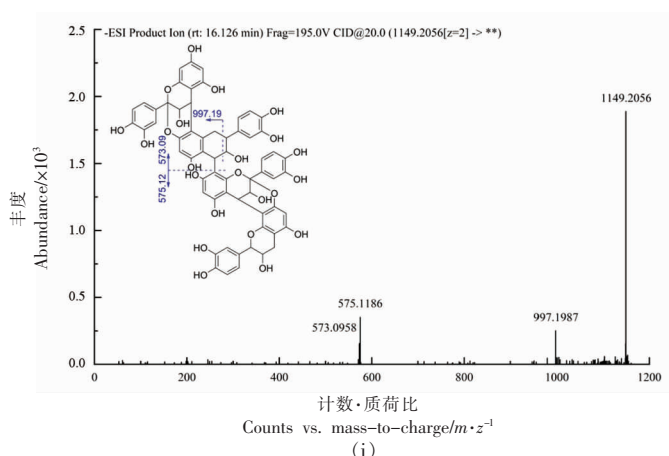


图7 Pspc 纯化物二级质谱图分析

Fig.7 Analysis of secondary mass spectra of Pspc purified material

聚体。

化合物7的分子离子 $[M-H]^-$ m/z 为863,其结构可能为A型原花青素三聚体。姬娜等^[33]发现其碎片离子包括 m/z 287、 m/z 289、 m/z 411、 m/z 451、 m/z 575 和 m/z 711。其中 m/z 287 和 m/z 289 是分子离子黄烷醇间连接键的断裂(QM)发生在 M-unit 连接键位置时形成的; m/z 411 和 m/z 451 是 M-unit 上发生 HRF 裂解产生; m/z 575 是分子离子黄烷醇间连接键的断裂(QM)发生在 T-unit 连接键位置时形成的; m/z 711 是在 T-unit 位置发生 RDA 和 HRF 断裂产生的离子。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为 A 型原花青素三聚体。

化合物9的分子离子 $[M-H]^-$ m/z 为1149,其结构可能为A型原花青素四聚体。白欢欢^[34]发现其碎片离子包括 m/z 573、 m/z 575 和 m/z 997。在负离子模式下,黄烷醇之间的B键容易断裂,产生 m/z 573 和 m/z 575 的碎片离子,经过 RDA 断裂,失去相对分子质量为152的中性结构,然后经过 RDA 重排,产生 m/z 997 的碎片离子。二级质谱图信息与该文献相符,推测其为 A 型原花青素四聚体。

2.3.3.3 花生红衣原花青素纯化物组分汇总 依照二级质谱图对主要化合物进行分析鉴定,结果详见表1。

表1 花生红衣原花青素中主要化合物的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of the main compounds in proanthocyanidins

化合物	名称	物质	Rt/min	$[M-H]^-$	碎片离子
1	Protocatechuic acid	原儿茶酸	7.388	153	109.03
2	B-type proanthocyanidins	B型原花青素	8.286	577	125.02, 287.05, 289.07, 407.07, 425.08, 451.10
3	Protocatechualdehyde	原儿茶醛	9.052	137	119.01, 108.02
4	A-type proanthocyanidin dimer	A型原花青素二聚体	10.665	575	285.04, 289.07, 407.07, 449.08
5	Catechins	儿茶素	11.741	289	125.02, 137.02, 165.02, 179.03, 205.05, 245.08
6	A-type proanthocyanidin dimer	A型原花青素二聚体	12.279	575	285.04, 289.07, 407.07, 449.08
7	A-type proanthocyanidin trimer	A型原花青素三聚体	13.648	863	287.05, 289.07, 411.07, 451.07, 575.12, 711.13
8	A-type proanthocyanidin dimer	A型原花青素二聚体	14.110	575	285.04, 289.07, 407.07, 423.07, 449.08
9	A-type proanthocyanidin tetramer	A型原花青素四聚体	16.126	1149	573.10, 575.12, 997.17

2.4 Pspc 纯化物对乳糜泻细胞模型毒性抑制作用

2.4.1 乳糜泻细胞模型的建立 取不同浓度麦醇溶蛋白消化产物作用于 Caco-2 细胞, 用 CCK-8 测定法检测细胞存活率, 以确定麦醇溶蛋白消化产物对乳糜泻细胞模型的最佳浓度。结果如图 8 所示, 与正常对照组相比, 麦醇溶蛋白消化产物浓度的提高, 使得细胞活力呈现出下降趋势 ($P < 0.05$)。当麦醇溶蛋白消化物质量浓度为 2 g/L 时, 可以抑制 Caco-2 细胞活力, 活性降至 81%, 因此选用该浓度作为建立体外乳糜泻细胞模型的最佳浓度。

2.4.2 Pspc 纯化物浓度对乳糜泻细胞模型的影响

Pspc 纯化物浓度对乳糜泻细胞模型的影响如图 9 所示, 可知与正常对照组相比, 125, 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pspc 纯化物作用于细胞时, 会对乳糜泻模型细胞产生毒性作用, 细胞活力降低; 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pspc 纯化物作用于细胞时, 对乳糜泻模型无毒性作用。因此, 确定 PSPc 纯化物对乳糜泻细胞模型的有效浓度为 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4.3 Pspc 纯化物对乳糜泻模型细胞毒性的抑制作用 Pspc 纯化物对乳糜泻模型细胞毒性的抑制作用如图 10 所示。与 CD 模型相比, Pspc 纯化物在 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 有效浓度范围内均可增加细胞活力, 抑制细胞毒性作用; 当 Pspc 纯化物浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 治疗效果显著优于 VC 组, 乳糜泻模型细胞活力升高, 与郭培培等^[35]研究中原花青素抑制 H9c2 细胞毒性结果一致, 由此可知 Pspc 纯化物可在一定程度上明显抑制乳糜泻模型的细胞毒性作用。

3 结论

采用 AB-8 大孔树脂对花生红衣中原花青素进行纯化, 得出最佳纯化工艺条件为上样质量浓度为 1.2 mg/mL、上样 pH 值为 3、上样流速为 1.0 mg/mL、上样量为 360 mL、吸附时间为 180 min、解吸时间为 40 min、解吸流速为 1.0 mg/mL、解吸液体积为 120 mL, 测得该纯化物纯度可达 95%。在此条件下通过紫外光谱扫描、傅里叶红外分析和高效液相色谱串联质谱分析鉴定, 紫外/可见光谱分析表明纯化物属于原花青素类; 傅里叶红外分析表明该纯化物以原花青素为主要结构单元, 且与标准品特征吸收峰趋势相符; UPLC-QTOF-MS/

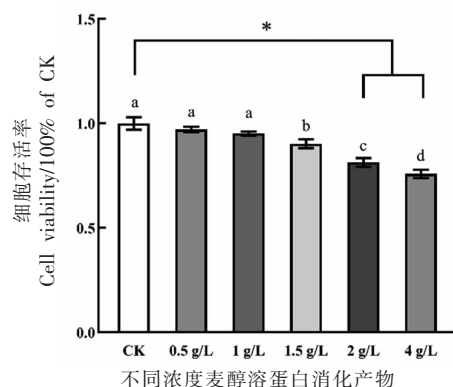


Figure 8: Cytotoxic effects of digested products of gliadin on celiac disease model. Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); * indicates significant differences between groups ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant differences ($P < 0.05$).下同。

图 8 麦醇溶蛋白消化产物对乳糜泻模型细胞毒性作用
Fig.8 Cytotoxic effects of digested products of gliadin on celiac disease model

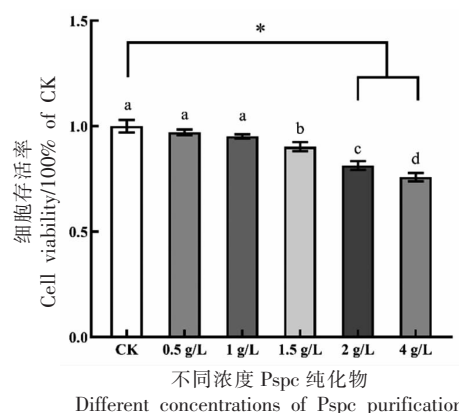


Figure 9: Effect of purified Pspc concentration on celiac disease cell model. Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); * indicates significant differences between groups ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant differences ($P < 0.05$).下同。

图 9 Pspc 纯化物浓度对乳糜泻细胞模型的影响
Fig.9 Effect of purified Pspc concentration on celiac disease cell model

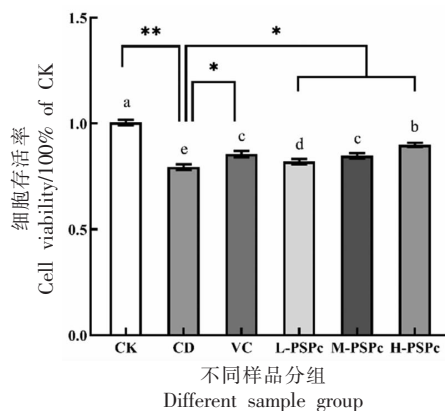


Figure 10: Inhibition of cytotoxicity of purified Pspc in celiac disease model. Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); * indicates significant differences between groups ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant differences ($P < 0.05$).下同。

图 10 Pspc 纯化物对乳糜泻模型细胞毒性的抑制作用
Fig.10 Inhibition of cytotoxicity of purified Pspc in celiac disease model

MS分析表明纯化物以A型原花青素为主要构成;细胞试验结果表明该纯化物可在一定程度上抑制乳糜泻细胞模型的毒性作用。本研究结果对花生红衣的开发应用及原花青素的基础研究提供较高的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 王翠莲, 武晓炜, 阳嘉, 等. 花生红衣多酚-锌配合物的制备及其抗氧化性质[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 6-10.
WANG C L, WU X W, YANG J, et al. Preparation and antioxidant properties of peanut red polyphenol-zinc complex[J]. Food Industry, 2020, 41(4): 6-10.
- [2] 贾聪, 芦鑫, 高锦鸿, 等. 基于代谢组学分析不同颜色花生红衣的组成差异[J]. 食品科学, 2019, 40(19): 46-51.
JIA C, LU X, GAO J H, et al. Analysis of the composition of red coats in peanut based on metabolomics[J]. Food Science, 2019, 40(19): 46-51.
- [3] 刘翠, 石爱民, 刘红芝, 等. 超声辅助法制备花生红衣的多酚类物质[J]. 中国食品学报, 2016, 16(12): 141-150.
LIU C, SHI A M, LIU H Z, et al. Preparation of polyphenols in peanut red by ultrasonic-assisted method[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(12): 141-150.
- [4] 王娜, 崔晨旭, 郑玉茹, 等. 超声-微波协同优化花生红衣原花青素提取工艺及抗氧化研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(16): 135-143.
WANG N, CUI C X, ZHENG Y R, et al. Optimization of extraction technology and antioxidant capacity of red procyanidins from peanut by ultrasonic-microwave synergistic optimization[J]. Food Research and Development, 2021, 42(16): 135-143.
- [5] BANSODE R R, RANDOLPH P, AHMEDNA M, et al. Bioavailability of polyphenols from peanut skin extract associated with plasma lipid lowering function[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 24-29.
- [6] 周玮婧, 孙智达, 谢笔钧, 等. 荔枝皮原花青素提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2009, 25(S1): 175-179.
ZHOU W J, SUN Z D, XIE B J, et al. Optimization of extraction technology of procyanidins from litchi peel[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2009, 25(S1): 175-179.
- [7] KHAN K M, ABERT-VIAN M, FABIANO-TIXIER A, et al. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel[J]. Food Chemistry, 2009, 119(2): 851-858.
- [8] VARADHARAJAN V, SHANMUGAM S, RAMASWAMY A. Model generation and process optimization of microwave-assisted aqueous extraction of anthocyanins from grape juice waste[J]. Journal of Food Process Engineering, 2017, 40(3): e12486.
- [9] OTTAVIANI J I, HEISS C, SPENCER J P E, et al. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Revisited[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2018, 61: 63-75.
- [10] MUSDZALIFAH M, FAHRURROZI M, SEDIWAN W B, et al. Separation of proanthocyanidin from red sorghum seed extract using macroporous resin[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2022, 963(1): 012043.
- [11] XI L, MU T, SUN H. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 166-174.
- [12] 杨志娟, 曾真, 吴晓萍. 火龙果皮原花青素提取纯化及定性分析[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 75-79.
YANG Z J, ZENG Z, WU X P. Extraction, purification and qualitative analysis of proanthocyanidins from huarong peel[J]. Food Science, 2015, 36(2): 75-79.
- [13] 姜倩, 张加研, 雷福厚, 等. 大孔吸附树脂 AB-8 分离肉桂原花青素的研究[J]. 生物质化学工程, 2015, 49(1): 26-32.
JIANG Q, ZHANG J Y, LEI F H, et al. Separation of proanthocyanidins from cinnamomum cinnamomum by macroporous adsorption resin ab-8[J]. Bce, 2015, 49(1): 26-32.
- [14] LÓPEZ-ALARCÓN C, DENICOLA A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 763: 1-10.
- [15] MAURYA A K, VINAYAK M. Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC)

- via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line[J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, 42(9): 1419–1429.
- [16] 王晶波, 杨倬, 秦文, 等. 牛肝菌多酚细胞抗氧化活性评价模型研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 273–279.
- WANG J B, YANG Z, QIN W, et al. Evaluation model of antioxidant activity of polyphenol cells from *Porcini hepatica*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 273–279.
- [17] CAPUTO I, SECONDO A, LEPRETTI M, et al. Gliadin peptides induce tissue transglutaminase activation and ER-stress through Ca^{2+} mobilization in Caco-2 cells[J]. *PLoS ONE*, 2017, 7(9): e45209.
- [18] SINGH P, ARORA A, STRAND A T, et al. Global prevalence of celiac disease: Systematic review and meta-analysis[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 16(6): 823–836.
- [19] 纪秀凤, 芦宇, 刘海春, 等. 大孔树脂-聚酰胺分离纯化红树莓籽低聚原花青素及其体外模拟胃、肠消化[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(6): 173–180.
- JI X F, LU Y, LIU H C, et al. Isolation and purification of oligomeric procyanidins from Red raspberry seed by macroporous resin and polyamide and its simulated digestion *in vitro*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(6): 173–180.
- [20] FU C, YANG X, LAI S, et al. Structure, antioxidant and alpha-amylase inhibitory activities of longan pericarp proanthocyanidins[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 23–32.
- [21] 王娜, 孟利军, 黄忠民, 等. 加工方式对发酵面团中小麦醇溶蛋白抗原性的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(3): 138–145.
- WANG N, MENG L J, HUANG Z M, et al. Effects of processing methods on antigenicity of wheat gliadin in fermented dough [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(3): 138–145.
- [22] MANAI F, AZZALIN A, MORANDI M, et al. Trehalose modulates autophagy process to counteract gliadin cytotoxicity in an *in vitro* celiac disease model[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 348–348.
- [23] 李侠, 臧学丽, 徐祎博, 等. AB-8大孔树脂纯化绿豆皮黄酮工艺优化及纯化前后抗氧化能力比较[J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 283–290.
- LI X, ZANG X L, XU Y B, et al. Purification of flavonoids from Mung bean peel by AB-8 macroporous resin and comparison of antioxidant capacity before and after purification[J]. *Food Science*, 2018, 39(10): 283–290.
- [24] 苏云霞, 张丛兰, 邬学勤, 等. 板栗壳原花青素提取工艺优化及结构鉴定[J]. *食品科技*, 2017, 42(12): 196–203.
- SU Y X, ZHANG C L, WU X Q, et al. Optimization extraction of procyanidins from chestnut shell and structural identification [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(12): 196–203.
- [25] FU C, YANG X, LAI S, et al. Structure, antioxidant and alpha-amylase inhibitory activities of longan pericarp proanthocyanidins[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 14: 23–32.
- [26] SILVA D R M J, DARMON N, FERNANDEZ Y, et al. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 39(9): 1549–1552.
- [27] GU L, KELM M A, HAMMERSTONE J F, et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 38(12): 1272–1280.
- [28] 张睿, 宋璇, 于建丽, 等. 花生红衣中原花青素的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(12): 202–210.
- ZHANG R, SONG X, YU J L, et al. Research progress of red anthocyanins from peanut[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(12): 202–210.
- [29] 吴学峰, 谢斌, 黄晓兰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS技术快速鉴定蒸制广佛手化学成分[J]. *质谱学报*, 2021, 42(3): 207–217.
- WU X F, XIE B, HUANG X L, et al. Rapid identification of chemical constituents of Steamed *Fructus auriculata* by UPLC-Q-TOF MS[J]. *Chinese Journal of Mass Spectrometry*, 2021, 42(3): 207–217.
- [30] 纪秀凤. 红树莓籽中低聚原花青素纯化鉴定及其微胶囊化研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
- JI X F. Purification, identification and microencapsulation of oligomeric procyanidins from red raspberry seeds[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [31] LIN L, YANG Q, ZHAO K, et al. Identification of the free phenolic profile of Adlay bran by UPLC-

- QTOF-MS/MS and inhibitory mechanisms of phenolic acids against xanthine oxidase[J]. *Food Chemistry*, 2018, 253: 108–118.
- [32] 黄雪薇, 雷嗣超, 涂芬, 等. 板栗壳黄酮结构分析及其对胰脂肪酶活力的抑制作用[J]. *食品科学*, 2021, 42(21): 111–118.
- HUANG X W, LEI S C, TU F, et al. Structure analysis of flavonoids in Chestnut shell and its inhibitory effect on pancreatic lipase activity[J]. *Food Science*, 2021, 42(21): 111–118.
- [33] 姬娜, 张磊, 熊柳, 等. 花生种皮原花青素结构的初步鉴定[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(4): 119–124.
- JI N, ZHANG L, XIONG L, et al. Preliminary identification of proanthocyanidins structure in seed coat of peanut[J]. *Chinese Journal of Cereals and Oils*, 2015, 30(4): 119–124.
- [34] 白欢欢. 花生红衣原花青素的纯化工艺及性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- BAI H H. Study on purification technology and properties of peanut red procyanidins [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [35] 郭培培, 郭卓雨, 赵艳萌, 等. 葡萄籽原花青素对顺铂导致 H9c2 细胞毒性的保护作用[J]. *食品科学*, 2014, 35(3): 213–216.
- GUO P P, GUO Z Y, ZHAO Y M, et al. Protective effects of grape seed procyanidins on cisplatin induced H9c2 cell toxicity[J]. *Food Science*, 2014, 35(3): 213–216.

Purification Technology of Peanut Red Procyanidins and Its Effect on Celiac Disease Cell Model

Wang Na^{1,3,4,5}, Zheng Yuru^{2,5}, Xu Chao^{2,5}, Li Junwei^{2,5}, Ren Hongtao^{2,5}, Yu Qiuying^{2,3,4,5*}

¹College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046

²College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002

³Longhu Laboratory, Zhengzhou 450046

⁴International Joint Research Center of Animal Immunology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046

⁵Zhengzhou Key Laboratory of Nutrition and Health Food, Zhengzhou 450002)

Abstract Objective: To optimize the purification process of AB-8 macroporous resin for peanut red procyanidins and to characterize and identify the components of the purified product, and to evaluate its inhibitory effect on cytotoxicity in celiac disease model. Methods: AB-8 macroporous resin was selected, and the purification conditions were optimized by static and dynamic adsorption-desorption indexes. The purified material was analyzed and identified by Ultraviolet/visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). The inhibitory effect of purified material on cytotoxicity was evaluated based on celiac disease cell model. Results: Purification conditions: The adsorption time was 180 min. The desorption solution was 120 mL 40% ethanol solution. The desorption time was 40 min. The desorption flow rate was 1.0 mg/mL. Ultraviolet/visible spectrum analysis showed that the purified substance belonged to proanthocyanidins. Fourier infrared analysis showed that procyanin was the main structural unit of the purified product, which was consistent with the characteristic absorption peak trend of the standard product. UPLC-QTOF-MS/MS analysis showed that type A procyanidins were the main component of Pspc purified products. The results of cell test showed that the purified substance could significantly inhibit the toxicity of celiac disease model to some extent. This study can provide some theoretical reference for comprehensive development of peanut red resources.

Keywords peanut red procyanidins; Ab-8 macroporous resin; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS); cytotoxicity