

RP-HPLC 法同时测定原花青素中儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原花青素 B₂ 的含量

张璐,潘佩佩,陈赛贞^{*}

(台州市中心医院药剂科,台州 318000)

摘要 建立同时测定原花青素中儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、没食子酸(GA)、原花青素 B₂(PCB₂)含量的方法,比较不同厂家的原花青素中这4种物质含量的差异。采用RP-HPLC法,利用Waters高效液相色谱仪,色谱柱为Hypersil ODS2(4.0 mm×200 mm,5 μm),以2%冰醋酸溶液和甲醇为流动相,梯度洗脱,检测波长280 nm。结果显示:C、EC、GA和PCB₂的质量浓度分别在0.1~50 μg/mL($r=0.9986$),0.1~50 μg/mL($r=0.9945$),0.05~50 μg/mL($r=0.9999$)和0.1~50 μg/mL($r=0.9922$)范围内与峰面积呈良好的线性关系;C、EC、GA、PCB₂的平均加样回收率(%)分别为98.36%、98.21%、89.60%、98.47%,RSD(%)分别为1.39%、0.84%、2.12%、2.46%。该方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定原花青素中C、EC、GA、PCB₂的含量,不同厂家不同批号的原花青素中这4种物质的含量差异较显著。

关键词 原花青素;儿茶素;表儿茶素;没食子酸;原花青素 B₂;RP-HPLC;含量测定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)01-0054-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160107

引用本文 张璐,潘佩佩,陈赛贞. RP-HPLC 法同时测定原花青素中儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原花青素 B₂ 的含量[J]. 中国药科大学学报,2016,47(1):54-57.

Cite this article as: ZHANG Lu, PAN Peipei, CHEN Saizhen. Determination of catechin, epicatechin, gallic acid and procyanidin B₂ in procyanidins by RP-HPLC[J]. J China Pharm Univ, 2016,47(1):54-57.

Determination of catechin, epicatechin, gallic acid and procyanidin B₂ in procyanidins by RP-HPLC

ZHANG Lu, PAN Peipei, CHEN Saizhen^{*}

Department of Pharmacy, Taizhou Central Hospital, Taizhou 318000, China

Abstract To determine catechin (C), epicatechin (EC), gallic acid (GA) and procyanidin B₂ (PCB₂) in procyanidins and compare their contents in procyanidins from different manufacturers, an A RP-HPLC method was developed. The determination was carried out on a Hypersil ODS2 column (4.0 mm×200 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol and 2% acetic acid with gradient elution and the detection wave-length at 280 nm. There was a good linear relationship between concentration and the peak area in the range of 0.1-50 μg/mL ($r=0.9986$) for catechin, 0.1-50 μg/mL ($r=0.9945$) for epicatechin, 0.05-50 μg/mL ($r=0.9999$) for gallic acid and 0.1-50 μg/mL ($r=0.9922$) for procyanidin B₂, respectively. The average recoveries of catechin, epicatechin, gallic acid and PCB₂ were 98.36%, 98.21%, 89.60% and 98.47%, respectively and the RSDs were 1.39%, 0.84%, 2.12% and 2.46%, respectively. The method is simple, accurate, reproducible and can be used for assay of C, EC, GA, PCB₂ in procyanidins. There was a great difference in the content of four substance in procyanidins from different manufacturers.

Key words procyanidins; catechin; epicatechin; gallic acid; procyanidin B₂; RP-HPLC; content determination

This study was supported by the Research Project of Zhejiang Provincial Association of Chinese Integrative Medicine (No. 2013LYED013); and Science and Technology Project of Taizhou (No. 1401ky11)

原花青素 (procyanidins, PC) 是植物中一类由多羟基黄烷-3-醇单元构成的天然多酚化合物的总称^[1], 其广泛存在于葡萄、蓝莓、樱桃、李子和松树皮等, 其中葡萄籽是其重要来源。原花青素是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂, 其结构上含有大量羟基, 是其抗氧化和清除自由基的物质基础, 已成为抗氧化、抗衰老和预防氧化相关疾病的研究热点。原花青素是由儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和没食子酸等单体, 以及这些单体通过 C4→C8 或 C4→C6 键结合而成的低聚体和高聚体等组成的混合物^[2]。通常将二~四聚体称为低聚原花青素 (OPC), 将四聚体以上的称为高聚原花青素 (PPC)^[3]。其中二聚体在各类原花青素中分布最广, 抗氧化活性最强, 是最重要的一类。目前, 国外以葡萄籽提取物中的原花青素为主要活性成分的药品、食品及营养保健品已广泛应用, 我国的一些厂家也开始研发和生产^[4]。

本研究通过 RP-HPLC 对原花青素中的儿茶素、表儿茶素、没食子酸和原花青素 B₂ 这 4 种物质进行含量测定。儿茶素 (catechin, C), 又名 (+)-儿茶素, 和咖啡因同属茶叶中的两大重要功能性组分, 具有防治心血管疾病、预防肿瘤等多种功能^[5]。表儿茶素 (L-epicatechin, EC), 又名 (-)-表儿茶素, 对心脑血管也有防治作用, 同时能预防肿瘤, 具有抗氧化作用。没食子酸 (gallic acid, GA), 亦称五倍子酸或棓酸, 具有抗炎、抗突变、抗氧化、抗自由基等多种生物学活性^[6]。原花青素 B₂ (procyanidin B₂, PCB₂), 在已鉴定的 8 种二聚体异构体中活性最强^[7], 具有抗高血压、抗肿瘤等活性。其化学结构式见图 1。

由于目前市场上生产原花青素的厂家较多, 质量参差不齐, 本文采用 RP-HPLC 法对不同厂家的原花青素进行检测对比, 为原花青素质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂与样品

原花青素样品 1~3 (A 公司批号: 002-1310147-17 和 002-1410055-13; B 公司批号: S0208A); 儿茶素对照品 (纯度 ≥ 98%, 批号: D1415030)、表儿茶素对照品 (纯度 ≥ 98%, 批号: B-018-140727-4)、没食子酸对照品 (纯度 ≥ 98%,

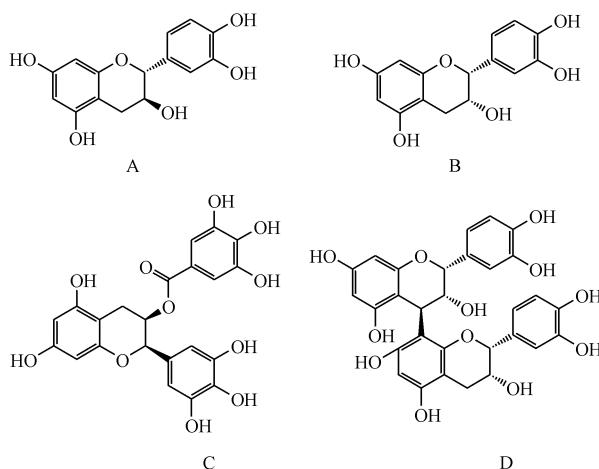


Figure 1 Chemical structures of catechin (A), epicatechin (B), gallic acid (C) and procyanidin B₂ (D)

批号:1405107) 均为上海创赛科学仪器有限公司产品; 原花青素 B₂ 对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 纯度 ≥ 98%, 批号: PJ0610RB14); 甲醇 (分析纯, 上海润捷化学试剂有限公司出品); 水为自制双蒸水; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AE200 电子天平 (浙江省科学器材进出口有限责任公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS2 (4.0 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A)-体积分数为 2% 冰醋酸 (B); 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

Table 1 Time program of linear gradient elution

t/min	Methanol (A) /%	2% Acetic acid (B) /%
0	10	90
3	10	90
6	15	85
8	20	80
11	20	80
11.5	10	90
14	10	90

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照储备溶液 精密称取 C、EC、GA、PCB₂ 对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加无水甲醇溶解稀释至刻度, 制成 1 mg/mL 的 C、EC、GA、

PCB₂的混合标准储备溶液。

2.2.2 供試溶液 精密稱取原花青素100.0 mg,置於10 mL量瓶中,加超純水稀釋至刻度,超聲促溶。配製成10 mg/mL原花青素水溶液,現配現用。

2.3 系統適用性

取“2.2.2”項中的供試溶液,在“2.1”項色譜條件下進樣,理論塔板數以C、EC、GA、PCB₂計算均不低於5 000,分離度應大於1.5。色譜圖見圖2。

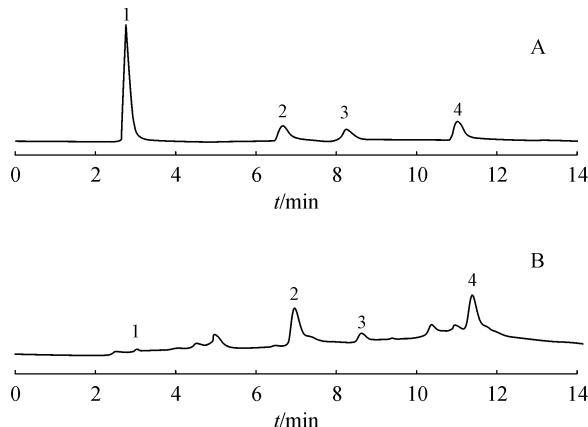


Figure 2 HPLC of hybrid control solution (A) and the sample solution (B)

1: Gallic acid; 2: Catechlin; 3: Procyanidin B₂; 4: Epicatechin

2.4 線性關係

精密吸取“2.2.1”項配製的混合標準品溶液100 μ L,甲醇稀釋至1 mL,為100 μ g/mL的混合標準品溶液。分別精密吸取“2.2.1”配製的混合標準儲備溶液50,25,10,5 μ L和100 μ g/mL的混合標準品溶液25,10,5,2.5,1 μ L於2 mL EP管中,超純水稀釋至1 mL,配製成質量濃度為50,25,10,5,2.5,1,0.5,0.25,0.1,0.05 μ g/mL的C、EC、GA、PCB₂混合溶液,20 μ L進樣。採用外標法,以峰面積(y)為縱坐標,標準品濃度(x)為橫坐標,得到4種物質的回歸方程和相關係數。

2.5 精密度

按照“2.2.2”項下方法配製供試溶液,配製成質量濃度分別為25,5,0.5 μ g/mL供試液直接進樣20 μ L,按照“2.1”項色譜條件下進行測定,分別通過測定日內精密度和日間精密度來表示,考察其日內精密度時,1 d連續測定5次,3個不同濃度的樣品,1 d中測完。考察日間精密度時,連續5 d測定,每天進樣1針,5 d測完。精密度測定的結果通

過RSD表示。

2.6 穩穩定性

取“2.5”項下配製的C、EC、GA、PCB₂供試溶液高、中、低3種濃度,室溫放置,分別各自於2,4,8,12,24 h進行分析,對峰面積進行考察。穩定性測定的結果通過RSD表示。

2.7 回收率

回收率測定方法採用加樣回收法。已經測得原花青素樣品1中C、EC、GA、PCB₂這4種物質的質量濃度分別為44.265,31.258,0.629,10.047 μ g/mL,取原花青素樣品1,按“2.2.2”項方法平行配製供試溶液,分別置於15個EP管中,分別編號。編號為1,2,3,4,5的EP管中加入10 mg/mL原花青素供試溶液100 μ L,質量濃度為50 μ g/mL的混合標準品溶液400 μ L,加入水至1 mL,混勻;編號為6,7,8,9,10的EP管中加入10 mg/mL原花青素供試溶液100 μ L,質量濃度為50 μ g/mL混合標準品溶液的200 μ L,再加入水至1 mL,混勻;編號為11,12,13,14,15的EP管中加入10 mg/mL原花青素供試溶液100 μ L,質量濃度為50 μ g/mL的混合標準品溶液100 μ L,加入水至1 mL,混勻。利用RP-HPLC檢測得到測得量。回收率(%) = 測得量/(原有量 + 加入量) \times 100。

2.8 含量測定

分別取3批不同廠家的原花青素樣品,按“2.2.2”項配製相應的供試品溶液,按“2.1”項下色譜條件進樣,記錄峰面積計算各個成分的含量。

3 實驗結果

3.1 标準曲線

兒茶素(C)的標準曲線為 $y = 5584.8x - 454.66, R^2 = 0.9986$,在0.1~50 μ g/mL範圍內,對照品質量濃度與峰面積呈良好線性關係;表兒茶素(EC)的標準曲線為 $y = 6877.2x - 4105.3, R^2 = 0.9945$,在0.1~50 μ g/mL範圍內,對照品質量濃度與峰面積呈良好線性關係;沒食子酸(GA)的標準曲線為 $y = 25501x - 3360.9, R^2 = 0.9999$,在0.05~50 μ g/mL範圍內,對照品質量濃度與峰面積呈良好線性關係;原花青素B₂(PCB₂)的標準曲線為 $y = 5157x - 4552.3, R^2 = 0.9922$,在0.1~50 μ g/mL範圍內,對照品質量濃度與峰面積呈良好線性關係。

C、EC、PCB₂ 最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GA 最低检测限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.2 精密度

C、EC、GA、PCB₂ 这 4 种物质的日内变异系数均小于 5%, 日间变异系数均小于 10%, 结果表明仪器精密度良好。

3.3 稳定性

每种物质的 RSD 小于 10%, 结果表明供试溶

液室温放置 24 h 内稳定。

3.4 回收率

C、EC、GA、PCB₂ 的平均回收率(%)分别为 98.36、98.21、89.60、98.47, RSD(%)分别为 1.39、0.84、2.12、2.46。

3.5 含量测定

不同生产厂家不同批号的原花青素中所含的 C、EC、GA 和 PAB₂ 的含量差异较大, 结果见表 2。

Table 2 Content (%) of catechin, epicatechin, gallic acid and procyanidin B₂ in procyanidins purchased from different manufacturers ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Manufacturer	Batch No.	Catechin	L-epicatechin	Gallic acid	Procyanidin B ₂
A	002-1310147-17	4.927 \pm 0.521	2.980 \pm 0.309	0.048 \pm 0.001	1.104 \pm 0.133
A	002-1410055-13	1.071 \pm 0.016	0.196 \pm 0.011	0.030 \pm 0.001	0.134 \pm 0.004
B	S0208A	7.718 \pm 0.075	4.795 \pm 0.203	0.055 \pm 0.002	2.025 \pm 0.096

4 讨论

原花青素属多酚类物质, 大多数葡萄籽提取物中的原花青素总量差别不大, 但由于葡萄籽原料来源和提取方法的不同导致原花青素中的成分差异较大, 因此本研究通过 RP-HPLC 法对不同厂家不同批号的原花青素的主要成分进行了检测。由于儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原花青素 B₂ 在波长 280 nm 均有最大吸收^[8], 因此本研究选择 280 nm 为检测波长。在选择流动相时曾尝试过甲醇-水、乙腈-水和甲醇-乙腈-水, 结果显示甲醇-水分离效果较好。又由于这几个检测成分均显弱酸性, 为了抑制电离, 故在水中加入了体积分数为 2% 的冰醋酸, 峰形较好。经方法学考察, 该方法线性关系、精密度和稳定性均良好, 回收率和 3 批不同原花青素的含量测定结果表明该方法确实可行, 杂质干扰小, 专属性较高。

3 批不同厂家不同批号原花青素中的含量测定结果显示, 不同的原花青素中儿茶素的含量变化为 1.071% ~ 4.927%, 表儿茶素的含量变化为 0.196% ~ 4.795%, 原花青素 B₂ 的含量变化为 0.134% ~ 2.025%, 而没食子酸的含量本来就较低, 其含量变化不显著, 为 0.030% ~ 0.055%。此外, 从实验结果可得知虽然不同厂家的原花青素中成分含量不同, 但是所含有的儿茶素均最多、没食子酸均最少, 说明不同原花青素中成分的含量比例大致是相同的。因此有必要规范原花青素的提取

流程, 最大限度提高有效成分的含量, 杂质降至最低。同时应该对原花青素中不同成分的药理作用进行进一步研究, 并将研究结果运用到药品和保健食品开发中。

参考文献

- [1] Kong JM, Chia LS, Goh NK, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2003, **64**(5): 923 ~ 933.
- [2] Bilia AR, Morelli I, Hamburger M, et al. A-type proanthocyanidins from *Prunus prostrata* [J]. *Phytochemistry*, 1996, **43**(4): 887 ~ 892.
- [3] Zhang XJ, Xia CT, Wu JM, et al. The research of proanthocyanidin resources [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2009, **32**(7): 1154 ~ 1160.
- [4] Bao JZ, Chen YK, Xu GH. Primary study on the determination methods of proanthocyanidin content of grape seed extract [J]. *J Agri Sci* (农业科学), 2005, **26**(1): 43 ~ 45.
- [5] Zheng C, Li L, Pang H, et al. Glycosylation modification on the natural active components [J]. *J Cellulose Sci Technol* (纤维素科学与技术), 2012, **20**(1): 62 ~ 71.
- [6] Li XL, Cui L, Zhu DQ. Research progress of the biological effects of the gallic acid [J]. *China Pharm* (中国药师), 2004, **7**(10): 767 ~ 769.
- [7] Butterweck V, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H, et al. Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats [J]. *Planta Med*, 2003, **69**(3): 189 ~ 192.
- [8] Lou H, Yamazaki Y, Sasaki T, et al. A-type proanthocyanidins from peanut skins [J]. *Phytochemistry*, 1999, **51**(2): 297 ~ 308.