

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)

收稿日期 2015-08-14 ***通信作者** Tel:0576-88551679 E-mail:tzcsz@126.com

基金项目 浙江省中西医结合学会科研项目资助(No. 2013LYED013), 台州市科技计划项目资助(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), 亦称五倍子酸或鞣酸,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 (procyandin 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%,

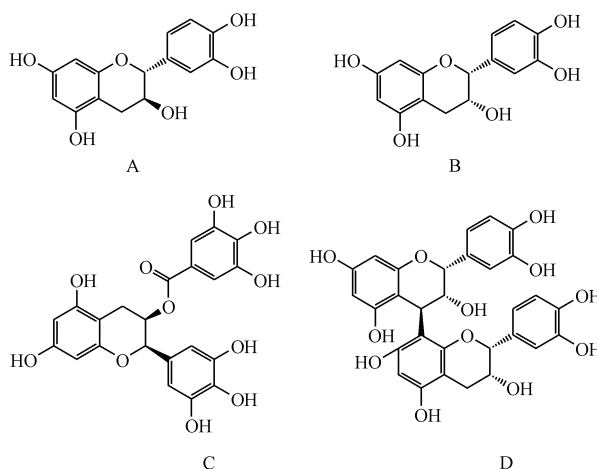


Figure 1 Chemical structures of catechin (A), epicatechin (B), gallic acid (C) and procyanidin B₂ (D)

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 供试溶液 精密称取原花青素 100.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加超纯水稀释至刻度, 超声促溶。配制成 10 mg/mL 原花青素水溶液, 现配现用。

2.3 系统适用性

取“2.2.2”项中的供试溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 理论塔板数以 C、EC、GA、PCB₂ 计算均不低于 5 000, 分离度应大于 1.5。色谱图见图 2。

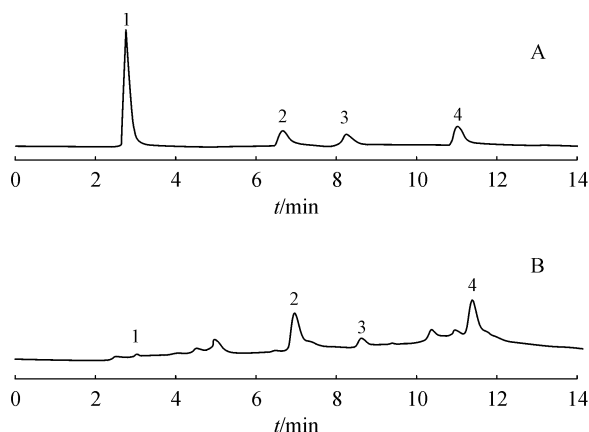


Figure 2 HPLC of hybrid control solution (A) and the sample solution (B)

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

2.4 线性关系

精密吸取“2.2.1”项配制的混合标准品溶液 100 μ L, 甲醇稀释至 1 mL, 为 100 μ g/mL 的混合标准品溶液。分别精密吸取“2.2.1”配制的混合标准储备溶液 50, 25, 10, 5 μ L 和 100 μ g/mL 的混合标准品溶液 25, 10, 5, 2.5, 1 μ L 于 2 mL EP 管中, 超纯水稀释至 1 mL, 配制成质量浓度为 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 进样。采用外标法, 以峰面积(y)为纵坐标, 标准品浓度(x)为横坐标, 得到 4 种物质的回归方程和相关系数。

2.5 精密度

按照“2.2.2”项下方法制备供试溶液, 配制成质量浓度分别为 25, 5, 0.5 μ g/mL 供试液直接进样 20 μ L, 按照“2.1”项色谱条件下进行测定, 分别通过测定日内精密度和日间精密度的表示, 考察其日内精密度时, 1 d 连续测定 5 次, 3 个不同浓度的样品, 1 d 中测完。考察日间精密度时, 连续 5 d 测定, 每天进样 1 针, 5 d 测完。精密度测定的结果通

过 RSD 表示。

2.6 稳定性

取“2.5”项下制备的 C、EC、GA、PCB₂ 供试溶液高、中、低 3 种浓度, 室温放置, 分别各自于 2, 4, 8, 12, 24 h 进行分析, 对峰面积进行考察。稳定性测定的结果通过 RSD 表示。

2.7 回收率

回收率测定方法采用加样回收法。已经测得原花青素样品 1 中 C、EC、GA、PCB₂ 这 4 种物质的质量浓度分别为 44.265, 31.258, 0.629, 10.047 μ g/mL, 取原花青素样品 1, 按“2.2.2”项方法平行制备供试溶液, 分别置于 15 个 EP 管中, 分别编号。编号为 1、2、3、4、5 的 EP 管中加入 10 mg/mL 原花青素供试溶液 100 μ L, 质量浓度为 50 μ g/mL 的混合标准品溶液 400 μ L, 加入水至 1 mL, 混匀; 编号为 6、7、8、9、10 的 EP 管中加入 10 mg/mL 原花青素供试溶液 100 μ L, 质量浓度为 50 μ g/mL 混合标准品溶液的 200 μ L, 再加入水至 1 mL, 混匀; 编号为 11、12、13、14、15 的 EP 管中加入 10 mg/mL 原花青素供试溶液 100 μ L, 质量浓度为 50 μ g/mL 的混合标准品溶液 100 μ L, 加入水至 1 mL, 混匀。利用 RP-HPLC 检测得到测得量。回收率(%) = 测得量 / (原有量 + 加入量) \times 100。

2.8 含量测定

分别取 3 批不同厂家的原花青素样品, 按“2.2.2”项配制相应的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积计算各个成分的含量。

3 实验结果

3.1 标准曲线

儿茶素(C)的标准曲线为 $y = 5\,584.8x - 454.66$, $R^2 = 0.998\,6$, 在 0.1 ~ 50 μ g/mL 范围内, 对照品质量浓度与峰面积呈良好线性关系; 表儿茶素(EC)的标准曲线为 $y = 6\,877.2x - 4\,105.3$, $R^2 = 0.994\,5$, 在 0.1 ~ 50 μ g/mL 范围内, 对照品质量浓度与峰面积呈良好线性关系; 没食子酸(GA)的标准曲线为 $y = 25\,501x - 3\,360.9$, $R^2 = 0.999\,9$, 在 0.05 ~ 50 μ g/mL 范围内, 对照品质量浓度与峰面积呈良好线性关系; 原花青素 B₂(PCB₂)的标准曲线为 $y = 5\,157x - 4\,552.3$, $R^2 = 0.992\,2$, 在 0.1 ~ 50 μ g/mL 范围内, 对照品质量浓度与峰面积呈良好线性关系。

C、EC、PCB₂ 最低检测限为 0.1 μg/mL,GA 最低检测限为 0.05 μg/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 ± 0.521	2.980 ± 0.309	0.048 ± 0.001	1.104 ± 0.133
A	002-1410055-13	1.071 ± 0.016	0.196 ± 0.011	0.030 ± 0.001	0.134 ± 0.004
B	S0208A	7.718 ± 0.075	4.795 ± 0.203	0.055 ± 0.002	2.025 ± 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,故在水中加入为体积分数为 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 prostrat* [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* (中草药), 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* (农业科学研究), 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.