

毛细管区带电泳法测定葡萄籽中儿茶素类化合物

李 奕¹, 高军涛², 张志玲¹, 刘虎威¹, 赵保路²

(1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871; 2. 中国科学院生物物理所, 北京 100101)

摘要 采用毛细管区带电泳法测定了 10 种中国产葡萄籽中的 4 个主要儿茶素类化合物 (+) 儿茶素、(-) 表儿茶素、(±) 表没食子儿茶素、(±) 表儿茶素没食子酸酯的含量。在 0.02 mol/L 硼砂和 0.005 mol/L 磷酸盐的混合缓冲体系 (pH 10.0) 的背景缓冲液中, 4 个化合物在 10 min 内取得了令人满意的分离。迁移时间的重现性 (RSD) 小于 2%, 峰面积的重现性 (RSD) 小于 5%。在质量浓度为 0.005 g/L~0.5 g/L 时, 线性相关系数大于 0.995。检测限为 3 mg/L~10 mg/L。该方法简单、快速、准确, 可作为葡萄籽分析和药用开发过程中分析儿茶素类化合物的有效方法推广使用。

关键词 毛细管区带电泳, 葡萄籽, 儿茶素, 表儿茶素, 表没食子儿茶素, 表儿茶素没食子酸酯

中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2000)06-0491-04

1 前言

儿茶素类物质是一种多酚类化合物, 它们结构非常相似, 一般是植物中共存的有效成分。儿茶素类化合物具有多种药理活性, 如抗氧化、清除自由基、护肝解毒、抗菌及抗癌等功能, 现已得到广泛的重视和研究^[1-4]。葡萄籽和绿茶是天然食品中儿茶素类化合物的重要来源。葡萄籽中含有 (+) 儿茶素 (C)、(-) 表儿茶素 (EC)、(±) 表没食子儿茶素 (EGC)、(±) 表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 以及它们的多聚体等多种多酚类物质^[5,6]。这些化合物的存在决定了红葡萄酒和葡萄汁中的儿茶素类化合物的含量, 并影响这些饮料的颜色、口感和稳定性^[7]。因此, 建立一种有效的儿茶素类化合物含量的测定方法是十分必要的。近几年曾有一些用毛细管电泳分

离分析绿茶中儿茶素类化合物的报道。Horie 等^[8]和 Arce 等^[9]分别使用 pH 8.0 和 pH 8.5 的硼砂缓冲体系, 测定了不同茶叶中 4 个主要儿茶素类化合物的含量。Larger 等^[10]、Nelson 等^[11]和 Horie 等^[12]则利用胶束电动毛细管色谱 (MEKC) 模式, 用含 50 mmol/L SDS 的硼砂缓冲液, 在相对较低的 pH 值 (6.0~8.4) 的条件下对绿茶中儿茶素类化合物进行了分离研究。然而据我们了解, 目前对葡萄籽中儿茶素类化合物的分析仍然多采用传统的高效液相色谱法^[13-16]。这些方法分离时间长, 溶剂用量大, 而且常需要梯度洗脱, 有很多不足之处。我们用简单、快速的毛细管区带电泳的方法, 对葡萄籽中的 4 个儿茶素类化合物 (结构式见图 1) 进行了分离, 并测定了它们在 10 种中国产葡萄籽中的含量。

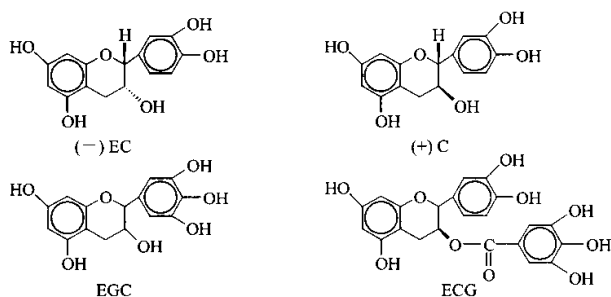


图 1 4 个儿茶素类化合物的结构式

Fig. 1 Chemical structures of four catechins

收稿日期 2000-01-24, 修回日期 2000-04-11

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (批准号 29875001)

作者简介 李 奕 (1973-), 女, 硕士。

通讯联系人 刘虎威, 男, 博士, 副教授, 电话 (010) 62754976, E-mail hwlui@chemms.chem.pku.edu.cn.

2 实验部分

2.1 仪器与实验条件

HP3DCE 高效毛细管电泳仪(美国惠普公司),配有二极管阵列检测器。熔融石英毛细管 $50 \mu\text{m}$ i.d. \times $375 \mu\text{m}$ o.d., 总长度为 50 cm , 有效长度为 41.5 cm (河北省永年光导纤维厂)。pHs-3C 型 pH 计与 E-201-C 型电极相连(上海 Rex 仪器厂)。

电泳条件:背景缓冲液为 0.02 mol/L 硼砂和 0.005 mol/L 磷酸盐的混合缓冲体系($\text{pH } 10.0$)。进样条件: $5 \text{ kPa} \times 10 \text{ s}$; 分析电压: 25 kV ; 检测波长: 210 nm ; 温度: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在每次分析之间,用 0.1 mol/L NaOH 冲洗毛细管 1 min 、二次去离子水洗 2 min 、分析缓冲液洗 3 min 。

2.2 材料与试剂

本实验测定的 10 种葡萄籽: *V. niunai*, *V. kyoho*, *V. muscat hamburg*, *V. jingxiu*, *V. wase takasumi*, *V. koncord*, *V. beiquan*, *V. beimei*, *V. beichun*, *V. beihong* 由中国科学院植物所提供。4 个儿茶素类化合物标准品: C, EC, EGC, ECG 由中国科学院生物物理所提供。磷酸氢二钠、硼砂、磷酸、氢氧化钠均为分析纯(北京化工厂)。水为二次去离子水。

2.3 样品溶液的制备

精确称取干燥葡萄籽粉末 1.0 g , 用 10 mL 甲醇冷浸 1 h , 超声提取 0.5 h , 以 1500 r/min 离心 10 min 将上清液移入 25 mL 容量瓶, 加 7 mL 甲醇重复提取两次, 定容。用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 滤液用超声脱气后直接进样。

2.4 定性方法

电泳图上峰的定性采用了 3 种方法, 一是与标准化合物的迁移时间对照, 二是对照 DAD 检测器所得到的 UV 光谱图, 三是在未知样品中加入标准化合物后观察峰是否增高。

3 结果与讨论

3.1 分离条件的优化

儿茶素类化合物具有弱酸性, 当 $\text{pH} > 7.5$ 时带负电。据文献报道, 它们可以在 $\text{pH } 8.5$ 的硼砂缓冲体系中得以分离^[10]。但在我们的实验中, C 和 EC 在该条件下只能部分分离。这可能是由于使用的毛细管不同, 电渗流的差异造成了对儿茶素类化合物分离度的影响。我们所用毛细管的长度比文献报道

所用的短, 因而分析时间也短。为了获得快速而有效的分离, 我们在缓冲液的 pH 值为 $8.0 \sim 11.0$ 时对分离条件进行优化。由于单一缓冲体系的工作范围 ($\text{pK}_a \pm 1$) 不能满足该 pH 范围的需要, 我们用 0.02 mol/L 硼砂和 0.005 mol/L 磷酸盐的混合缓冲体系进行 pH 优化。

图 2 为缓冲液的 pH 值对儿茶素类化合物分离的影响。由图 2 可见 4 个化合物的分离度随 pH 的增加而增加, 当 pH 达到 10.0 时, 它们可以基线分离。由于在更高 pH 下的分离能引起严重峰拖尾现象, 我们选择 pH 值为 10.0 。其他仪器参数的优化结果表明, 分析电压 25 kV , 温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 为最佳条件。根据待测物标准品的紫外-可见吸收图, 选择最大吸收波长 210 nm 下检测。图 3 为 4 个儿茶素类化合物标准品混合物的电泳图谱。*V. niunai* 葡萄籽样品的电泳图谱见图 4。

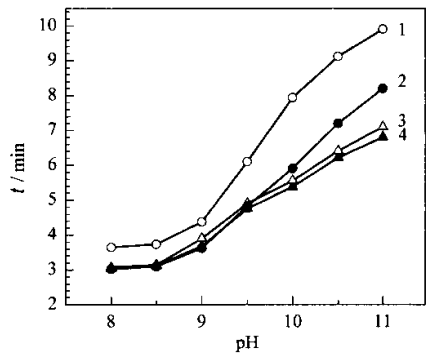


图 2 缓冲液 pH 值对 4 个儿茶素类化合物迁移时间的影响

Fig. 2 The effect of buffer pH on the migration time of the four standards

条件: 毛细管的总长度 50 cm , 有效长度 41.5 cm , $50 \mu\text{m}$ i.d. \times $375 \mu\text{m}$ o.d. 缓冲液为 0.02 mol/L 硼砂和 0.005 mol/L 磷酸盐的混合液; 分析电压为 25 kV ; 检测波长为 210 nm ; 压力进样 $5 \text{ kPa} \times 10 \text{ s}$; 毛细管温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

Conditions: capillary, total length 50 cm and 41.5 cm to detector, $50 \mu\text{m}$ i. d., $375 \mu\text{m}$ o. d.; buffer, mixture of 0.02 mol/L borate and 0.005 mol/L phosphate; applied voltage 25 kV ; detection at 210 nm ; injection 5 kPa for 10 s ; capillary temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

1. ECG; 2. EGC; 3. C; 4. EC.

3.2 标准曲线的建立

配制一系列质量浓度范围为 $0.005 \text{ g/L} \sim 0.5 \text{ g/L}$ 的 4 个儿茶素类化合物标准溶液。工作曲线、相关系数及检测限结果见表 1 ($n = 4$)。

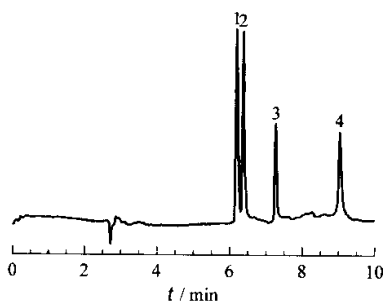


图 3 4 个儿茶素类化合物标准品混合物的电泳图谱

Fig.3 Electropherogram of the mixture of the four standards

缓冲液为 0.02 mol/L 硼砂和 0.005 mol/L 磷酸盐的混合液, pH 为 10.0 ;其他分析条件同图 2。

Buffer: mixture of 0.02 mol/L borate and 0.005 mol/L phosphate at pH 10.0 ; other conditions are the same as in Fig. 2.

1. EC ; 2. C ; 3. EGC ; 4. ECG.

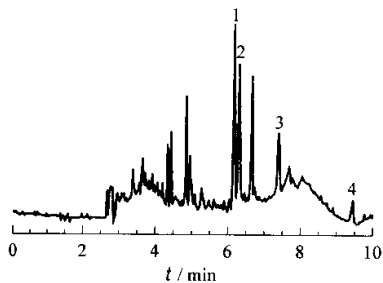


图 4 葡萄籽样品(V. niunai)的电泳图

Fig.4 Electropherogram of the extract of the grape seed of V. niunai

分析条件和峰序同图 3。

Conditions and peaks are the same as in Fig. 3.

表 1 线性回归方程、相关系数、重现性及检出限(n = 4)

Table 1 Data from the evaluation of the method proposed(n = 4)

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	r	RSD_t (%)	RSD_A (%)	DL (mg/L)
EC	$Y = 1\ 837X + 5.274$	0.999	0.46	2.9	2.8
C	$Y = 2\ 161X - 7.214$	0.997	0.89	3.5	3.1
EGC	$Y = 1\ 237X + 5.358$	0.996	1.54	4.6	9.7
ECG	$Y = 2\ 957X - 70.65$	0.995	2.10	4.8	6.6

Y 为峰面积 ; X 为样品的质量浓度 ; r 为相关系数 ; RSD_t 为迁移时间的 RSD ; RSD_A 为峰面积的 RSD ; DL 为由 3 倍信噪比计算求得的检测限。

Y : peak area ; X : sample concentration ; r : correlation coefficient ; RSD_t : RSD for migration time ; RSD_A : RSD for peak area ; DL : detection limit , calculated based on three times of the ratio of signal to noise.

3.3 精密度的试验

在选定的测定条件下 ,将质量浓度为 0.05 g/L 的标准溶液连续 6 次进样 ,计算重现性。迁移时间和峰面积的 RSD 值见表 1。

3.4 加标回收率试验

精确称取一定量的 4 种标准品 ,分别加到已知含量的葡萄籽(V. niunai)粉末中 ,按样品制备方法进行提取、测定。回收率结果 :C 为 96% , EC 为 95% , EGC 为 93% , ECG 为 102%。

3.5 样品分析

用选定的方法对 10 种中国产葡萄籽中的 4 个儿茶素类化合物进行测定 ,并代入回归方程计算其含量 ,结果见表 2。结果表明 ,10 种葡萄籽中的 4 个儿茶素类化合物总含量从 2.241 mg/g ~ 21.53 mg/g ,有很大差别。其中(+)儿茶素(C)和(-)表儿茶素(EC)存在于所有测定的葡萄籽样品中 ,并且为含量最高的化合物。

表 2 样品测定结果

Table 2 The determination results of catechins in ten species of grape seeds

样品 Sample	EC	C	EGC	ECG	Total mg/g
V. niunai	0.693	0.670	0.235	0.643	2.241
V. kyoho	8.52	10.9	-	2.11	21.53
V. muscat hamburg	8.75	6.07	-	1.39	16.21
V. jingxiu	8.50	5.43	0.397	1.21	15.54
V. wase takasumi	5.33	5.25	1.91	-	12.49
V. koncord	3.95	2.32	0.437	0.851	7.558
V. beiquan	6.36	3.73	1.82	-	11.91
V. beimei	3.03	2.03	0.54	0.817	6.417
V. beichun	1.29	0.693	0.282	0.761	3.026
V. beihong	3.90	3.81	1.29	2.19	11.19

" - "表示质量浓度低于检测限。

" - " means the mass concentration below DL.

4 结论

用毛细管电泳方法对葡萄籽中的 4 种结构非常相似并具有多种药理活性的儿茶素类化合物(+)儿茶素、(-)表儿茶素、(±)表没食子儿茶素及(±)表儿茶素没食子酸酯进行了分离及含量测定。该方法与传统的 HPLC 方法相比 ,具有简单、快速、无需使用有机溶剂等优点 ,其分离过程仅需 10 min ,可以作为葡萄籽分析和药用开发过程中分析儿茶素类化合物的有效方法 ,并且有可能被用于红酒或葡萄饮

料的分析。

致谢 安捷伦科技公司提供实验用毛细管电泳仪,中国科学院植物所提供了 10 种葡萄籽,特致谢忱。另外感谢本实验室刘跃女士在实验方面的帮助。

参考文献:

- [1] Teresa E B , Yolanda G F , Rivas-Gonzalo J C , et al. J Agric Food Chem ,1992 40 :1 794-1 798
- [2] Lacaille-Dubois M A , Wangner H. Proc Group Polyphenols ,1992 ,16 217-222
- [3] Liu L , Castonguay A. Carcinogenesis ,1991 ,12 :1 203-1 208
- [4] Plumb G W , Pascual-Teresa S D , Santos-Buelga C , et al. Free Rad Res , 1998 29 351-358
- [5] Prieur C ,Rigaud J ,Cheynier V ,et al. Phytochemistry , 1994 36 :781-784
- [6] Saito M , Hosoyama H , Ariga T , et al. J Agric Food Chem ,1998 46 :1 460-1 464
- [7] Souquet J M , Cheynier V , Brossaud F , et al. Phytochemistry ,1996 43 :509-512
- [8] Horie H , Mukai T , Kohata K. J Chromatogr A , 1997 , 758 332-335
- [9] Arce L , Rios A , Valcarcel M. J Chromatogr A , 1998 , 827 :113-120
- [10] Larger P J , Jones A D , Dacombe C. J Chromatogr A , 1998 799 309-320
- [11] Nelson B C , Thomas J B , Wise S A , et al. J Microcol Sep , 1998 ,10(8) :671-679
- [12] Horie H , Kohata K. J Chromatogr A ,1998 802 219-223
- [13] Fuleki T , Ricardo da Silva J M. J Agric Food Chem , 1997 45 :1 156-1 160
- [14] Bourzeix M ,Weyland D. Bull O I V ,1986b 59 :1 171-1 254
- [15] Ricardo da Silva J M ,Rossec J P , Bourzeix M. J Sci Food Agric , 1990 53 85-92
- [16] Mohammed R K A , Alister D M , Bruce A B , et al. Phytochemistry ,1993 34 :113-117

Determination of Catechins in Grape Seeds by Capillary Electrophoresis

LI Yi¹ , GAO Jun-tao² , ZHANG Zhi-ling¹ , LIU Hu-wei¹ , ZHAO Bao-lu²

(1. College of Chemistry & Molecular Engineering , Peking University , Beijing 100871 , China ;

2. Institute of Biophysics , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

Abstract : A capillary zone electrophoresis (CZE) method has been developed for the determination of four pharmacologically active catechins in grape seed. The components analyzed were (+)-catechin , (-)-epicatechin , epigallocatechin and epicatechin gallate. Separation was achieved by using a mixed buffer of 0.02 mol/L borate and 0.005 mol/L phosphate at pH 10.0 as background electrolyte and an uncoated fused silica capillary with 50 μm i.d. \times 375 μm o.d. (effective length 41.5 cm) maintained at 25 $^{\circ}\text{C}$. The applied voltage was 25 kV , and detection was performed by DAD at wavelength of 210 nm. By using proposed CZE method , four catechins were well separated within only 10 minutes with the repeatability of < 1% RSD for migration time and < 5% RSD for peak area. Correlation coefficients better than 0.995 were obtained within the concentration range from 0.005 g/L to 0.5 g/L for the four analytes studied with the detection limit of 3 mg/L-10 mg/L. The contents of these compounds in ten species of grape seeds cultivated in China were successfully determined.

Key words : capillary zone electrophoresis ; grape seed (+)-catechin ; (-)-epicatechin ; epigallocatechin ; epicatechin gallate