

文章编号: 1673-1689(2006)05-0001-04

## 葡萄籽提取物(GSE)有效成分的分析

李华, 袁春龙, 王蔚新

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:**葡萄籽提取物(GSE)的多酚化合物包括原花青素和单体多酚,因此,采用Folin-Ciocalteu法测定葡萄籽提取物总多酚的质量分数,高效液相色谱法测定单体多酚质量分数,以总多酚质量分数减去单体多酚质量分数,即可代表样品中原花青素的质量分数。测定结果表明,自制GSE总多酚质量分数稍高于对照样品(天津尖峰天然产物研究开发公司产品),分别为90.5%和88.3%;没食子酸、儿茶素质量分数明显高于对照样品,而表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的质量分数稍低于对照样品。自制样品与对照样品的原花青素质量分数无显著差异,分别为74.6%和75.8%。

**关键词:** GSE; Folin-Ciocalteu法; HPLC; 多酚; 原花青素

中图分类号: TS 207.3

文献标识码: A

## Analysis of Active Compounds in Grape Seeds Extracts (GSE)

LI Hua, YUAN Chun-long, WANG Wei-xin

(College of Enology, Northwest Agricultural and Forest University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** As the polyphenols of the Grape Seeds Extracts (GSE) contains proanthocyanidins and monomeric phenols, the difference between total amount of polyphenols (TAPP) and monomeric phenols (TAMP) could represent the content of proanthocyanidins (CP) in GSE. In this manuscript, TAPP of GSE was determined by the Folin-Ciocalteu method, expressed as Gallic Acid Equivalents, and TAMP determined by HPLC. The concentration of TAPP in GSE sample which made by this study was 90.5%, was higher 2.4% than that of the control (88.3%, Jianfeng GSE, Tianjin). For the TAMP case, the content of gallic acid and catechin were higher, but the content of epicatechin and epicatechin gallate were lower than that of the control. For CP, no significant difference between the two GSEs sample was detected, was 74.6% and 75.8%, respectively.

**Key words:** GSE; Folin-Ciocalteu; HPLC; polyphenols; proanthocyanidins

葡萄籽提取物(Grape Seed Extract, GSE)是从酿酒葡萄的种子中提取出来的一种多酚物质混合物<sup>[1]</sup>,其中的原花青素具有极强的抗氧化性<sup>[3-5]</sup>,是一种极强的体内活性功能因子。但由于GSE产品成分复杂,对其原花青素质量分数,目前尚无统

一的检测方法。而GSE包含单体多酚和聚合多酚。GSE中单体多酚的质量分数一般在10.0%左右,主要包括没食子酸、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯,这4种单体的质量分数占到了GSE中单体多酚总量的90.0%以上<sup>[2]</sup>。聚合多酚则包括由

收稿日期: 2006-06-22; 修回日期: 2006-07-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571281).

作者简介: 李华(1959-),男,重庆梁平人,留法博士,教授,博士生导师.

以上单体聚合而成的原花青素。原花青素是葡萄籽中最主要的多酚类物质,质量分数一般为75%~85%<sup>[11]</sup>。因此,可用测定GSE总多酚和以没食子酸、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素及没食子酸酯质量分数之和的方法来间接测定GSE中原花青素的质量分数。

作者以市售GES为对照,用改良的Folin-Ciocalteu法定量测定以没食子酸计的总多酚的质量分数,HPLC法定量测定包括没食子酸、儿茶素、表儿茶素及表儿茶素没食子酸酯在内的单体多酚的总量,GSE中原花色素质量分数即为用改良的Folin-Ciocalteu法测定的总多酚质量分数与用HPLC法测定的单体多酚总量之差的方法,测定了采用优化工艺制备、冷冻干燥、真空包装的GSE中原花青素的质量分数。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

Shimadzu 高效液相色谱仪,色谱柱 C<sub>18</sub>(VP-ODS)(250 mm×4.6 mm,5 μm),H(VP-ODS)C<sub>18</sub>保护柱,紫外分光光度计。

自制葡萄籽提取物干粉,对照葡萄籽提取物干粉(天津尖峰天然产物研究开发公司产品)。没食子酸、(+)-儿茶素、(+)-表儿茶素及(-)-表儿茶素没食子酸酯标准样品均购自美国Sigma公司。

稳定液:取0.25 g抗坏血酸置于1 L容量瓶中,加约500 mL水,混合,溶解抗坏血酸。加入100 mL乙腈,用水稀释至刻度。标准工作液:精确称取15 mg没食子酸、15 mg儿茶素、20 mg表儿茶素、10 mg表儿茶素没食子酸酯,置于50 mL容量瓶中,加入40 mL稳定液。超声波降解直至完全溶解。用稳定液稀释至刻度,得到标准贮备液。标准贮备液用稳定液稀释1:2,1:5,1:10,1:25,1:50倍,得到标准工作液。样品溶液和空白溶液:称取0.5 g GSE于50 mL容量瓶中。加入约25 mL 55~60℃的热水,超声溶解30 min。冷却至室温,加5 mL乙腈,用水稀释至刻度。移液管吸取2 mL,移至10 mL容量瓶中。用稳定液稀释至刻度。0.45 μm膜过滤,待用。除不加入提取物样品外,空白溶液的制备步骤与样品制备相同。

### 1.2 实验方法

1.2.1 Folin-Ciocalteu 法测定 GSE 中的总多酚  
称取0.500 g没食子酸,用水溶解,定容至100 mL,以此母液配制质量浓度为0.50,100,150,250,500 mg/L的溶液。取6支容量瓶,分别吸取上述溶液1

mL,各加水20 mL,福林-肖卡试剂5 mL,混匀,30 s~8 min内各加入20%碳酸钠溶液15 mL,混合后用水定容。上述溶液在20℃下放置2 h,然后用分光光度计测定各溶液在765 nm下吸光值<sup>[6]</sup>。处理数据,建立标准曲线。

称取0.2 g样品,置于50 mL容量瓶中,加入约25 mL蒸馏水,超声溶解5 min,加水稀释至刻度, Folin-Ciocalteu 法测定吸光度,并计算多酚纯度。

1.2.2 HPLC 法测定 GSE 中的 4 种单体 色谱条件:UV 检测器波长 280 nm,流速 1 mL/min,上样量 10 μL,柱温 30℃。流动相:A-2%乙酸、9%乙腈水溶液,B-80%乙腈水溶液;梯度模式:0 min→10.0 min→25.0 min→35.0 min→40.0 min→60.0 min,溶液 A 相应浓度梯度为 100%→100%→68%→68%→100%→100%。

注入空白溶液及标准样品溶液,根据数据建立没食子酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的线性曲线。

注入样品溶液,并根据各自的线性曲线,用下式进行计算。

$$\text{单体质量分数}(\%) = \frac{c \times V \times d}{w} \times 100\%$$

式中  $c$  为通过线性回归分析测定的单体质量浓度(mg/mL); $V$ 为样品制备液的终体积(mL); $d$ 为样品的稀释倍数; $w$ 为样品的质量(mg)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GSE 总多酚的质量分数

标准曲线为  $y = 714.690x$ (其中  $y$  为浓度,  $x$  为吸光度,  $R^2 = 0.995$ )。经 Folin-Ciocalteu 法测定,自制葡萄籽提取物干粉中总多酚质量分数为 90.5%(以没食子酸计),对照葡萄籽提取物干粉为 88.3%(以没食子酸计)。

### 2.2 GSE 中的 4 种单体及原花青素的质量分数

参考 INA(Institute for Nutraceutical Advancement)提供的出峰顺序的相关信息及空白实验结果(见图1),可判断图2中保留时间为3.296 min的第一个锐峰为配制样品的稳定剂中的成分(抗坏血酸),后面4个锐峰依次为没食子酸、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯。它们的保留时间依次为4.786,12.755,21.576,27.112 min。以浓度  $c$  对峰面积  $A$  进行回归,所得4种单体的标准曲线见表1。4种单体的进样量分别在0.06~1.4 μg、0.06~1.3 μg、0.07~1.7 μg、0.04~0.8 μg范围内线性关系良好。自制GSE与对照的HPLC图谱见图3,

图 4。

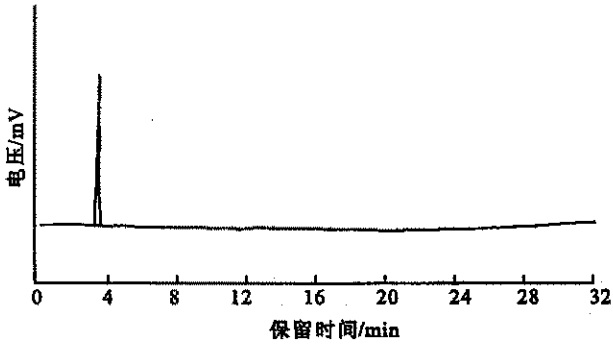
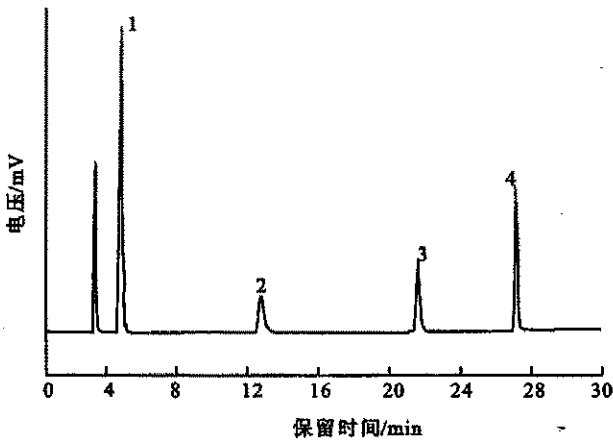


图 1 空白实验液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of the blank



1. 没食子酸 2. 儿茶素 3. 表儿茶素 4. 表儿茶素没食子酸酯

图 2 4 种单体标样液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of the four standard samples

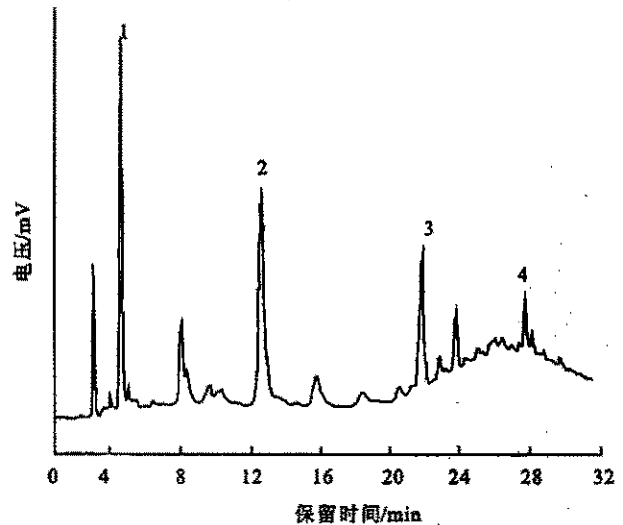
表 1 4 种单体标样的回归方程

Tab. 1 Regression equations of the four standard monomeric phenols samples

单体标样	回归方程
没食子酸	$A = 7165.6c + 6549.9 \quad r^2 = 0.9999$
儿茶素	$A = 2118.1c + 1031.6 \quad r^2 = 0.9999$
表儿茶素	$A = 2066c + 1255.9 \quad r^2 = 0.9999$
表儿茶素没食子酸酯	$A = 6584.3c + 1523.3 \quad r^2 = 0.9999$

由图 3、图 4 和表 2 可以看出,自制 GSE 中总多酚质量分数为 90.5%, 稍高于对照的 88.3%。没食子酸、儿茶素质量分数明显高于对照,特别是没食子酸质量分数是对照的 200 多倍;而表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的质量分数稍低于对照。以总多酚质量分数减去 4 种单体质量分数差即样品中

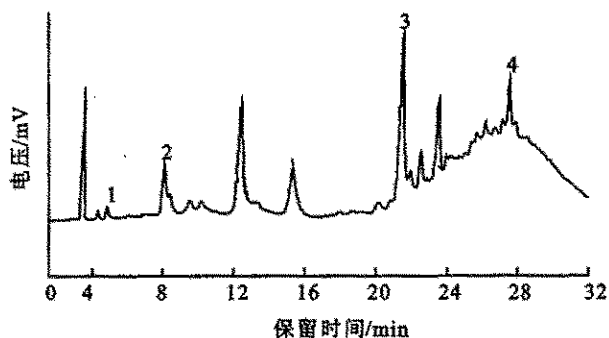
原花青素的质量分数,自制 GSE 与对照的原花青素质量分数相差不大,并稍低于对照。出现这样的结果原因可能是提取或纯化工艺不同造成的,也有可能是因为采用的葡萄籽原料不同引起的。天然植物有效成分的测定通常采用 HPLC 法,此法具有准确、灵敏、应用范围广等优点,但该方法必须具备所有被测组分的标准品才能定性定量。葡萄籽多酚由于有效成分复杂,结构间差异小,异构现象多,因而分离困难,目前市场上只有少数几种成分有标准品供应。液相色谱-质谱(LC-MS)联用技术产生于 20 世纪 70 年代,现已开始应用于各种天然产物有效成分的检测,在一定程度上可通过质谱检测器对该物质进行定性,但是要进行定量分析则必须使用标准品。另外该设备价格昂贵,在实际生产中不便应用。紫外可见分光光度法操作简便,设备要求不高,准确性好,灵敏度高,广泛应用于实验室和工厂,在天然产物研究领域占有重要的地位,特别是检测某一类物质总量的首选方法。葡萄籽中有效成分为多酚类物质,紫外可见分光光度法测定多酚的方法有多种,如 Folin-Ciocalteu 法、香兰素检测法等。作者以 Folin-Ciocalteu 法测定 GSE 中的总多酚质量分数。同时,由于 GSE 主要的单体多酚(儿茶素、表儿茶素、没食子酸和表儿茶素没食子酸酯)占到了其单体多酚总量的 90.0% 以上,通过 HPLC 法可测定出 GSE 中主要的单体多酚质量分数。因此,GSE 的另一指标原花青素的质量分数即为用 Folin-Ciocalteu 法测定的总多酚质量分数与用 HPLC 法测定的单体多酚总量之差。



1. 没食子酸 2. 儿茶素 3. 表儿茶素 4. 表儿茶素没食子酸酯

图 3 自制葡萄籽提取物产品液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of GSE sample



1. 没食子酸 2. 儿茶素 3. 表儿茶素 4. 表儿茶素没食子酸酯

图4 对照葡萄籽提取物液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of GSE control

表2 两种葡萄籽提取物各成分质量分数

Tab.2 Composition content of these two grape seed extracts

葡萄籽 提取物	总多酚 质量 分数	没食 子酸 质量 分数	儿茶素 质量 分数	表儿 茶素 质量 分数	表儿茶 素没食 子酸酯 质量 分数	原花 青素 质量 分数
精制 样品	90.5	1.8	8.0	5.3	0.79	74.6
对照 样品	88.3	0.0066	4.9	6.2	1.4	75.8

### 3 结论

自制 GSE 中总多酚质量分数为 90.5% ,稍高于对照的 88.3% 。没食子酸质量分数是对照的 200

多倍,儿茶素质量分数明显高于对照,而表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯的质量分数稍低于对照;原花青素的质量分数,自制 GSE 与对照的原花青素质量分数相差不多,分别为 74.6% 和 75.8% 。

### 参考文献:

- [1] 邵云东,胡光祥,於洪建,等.葡萄籽的质量评价[J].中草药,2001,32(11):1044-1046.
- [2] 冯建光.葡萄籽提取物的质量评定[J].中国食品添加剂,2004,2:49-51.
- [3] Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts [J]. **Bioresource Technology**, 2003, 87(1):41-44.
- [4] 凌智群,张晓辉,谢笔钧,等.原花青素的药理学研究进展[J].中国药理学通报,2002,18(1):9-12.
- [5] Pierre L Teissedre, Edwin N Frankel, Andrew L Waterhouse, et al. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines [J]. **J Sci Food Agric**, 1996, 70:55-61.
- [6] 王华.葡萄与葡萄酒实验室技术操作规范[M].西安:西安地图出版社,1999.

(责任编辑:李春丽)

· 简讯 ·

## 本刊应邀参加热电公司新闻发布会

2006年9月19-21日,第三届慕尼黑上海分析生化展(Aalytica China 2006)在上海浦东新国际博览中心举行。世界领先的分析仪器研发和制造商热电公司(Thermo Electron China)展出了用于生命科学与食品安全的分析仪器。

热电公司在会展期间专门举办了小型新闻发布会,本刊以及国内近20家专业学术刊物等媒体应邀出席了这一活动。