

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/02 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025187.X

[43] 公开日 2007 年 6 月 27 日

[11] 公开号 CN 1989407A

[22] 申请日 2005.7.27

[21] 申请号 200580025187.X

[30] 优先权

[32] 2004.7.29 [33] JP [31] 222255/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/014153 2005.7.27

[87] 国际公布 WO2006/011640 英 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.25

[71] 申请人 三得利株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 福井祐子 中原光一

[74] 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司

代理人 薛俊英 王维玉

权利要求书 5 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称

低聚原花青素(OPC)的分析方法

[57] 摘要

本发明提供一种用于分析天然物质、食品和饮料、医药品和/或化妆品中含有的低聚原花青素(OPC)的新方法。本发明为一种分析 OPC 的新方法,该方法通过分析水解 OPC 得到的花青素以测定 OPC 的总量,并用高效液相色谱法(HPLC)分析 OPC 聚合度的比例以测定 OPC 中各种聚合物的含量。

1. 一种测定预定重量分析物中含有的黄烷-3-醇的 n -聚体($n \geq 2$)混合物(下文将所述混合物称为低聚原花青素或 OPC)的总重量的方法,

所述方法包括基于水解一个 n -聚体产生的花青素量为 $n/2$, 而与 n 的大小无关的事实,

测量通过水解所述分析物中的 OPC 产生的花青素的重量, 以及
将所测得的花青素的重量乘以系数 2, 得到所述分析物中 OPC 的总重量。

2. 一种测定预定重量分析物中含有的低聚原花青素(OPC)总重量的方法,

所述方法包括基于水解 OPC 产生的花青素量与 OPC 的总量成比例, 而与 OPC 中含有的 n -聚体的量比和聚合度 n 的大小不同无关的事实,

测量通过水解所述分析物中的 OPC 产生的花青素重量,

单独测量通过水解已知重量的 OPC 标准物质产生的花青素量, 以及

通过校正曲线或下述公式测量所述分析物中 OPC 总重量和/或所述分析物中 OPC 的重量比(a%):

$$\text{OPC 总重量(mg)} = (\text{样品的测量值} / \text{标准物质的测量值}) \times \text{标准物质的重量} \quad (\text{公式 1})$$

$$\text{分析物中 OPC 的重量比(a\%)} = (\text{OPC 总重量(mg)} / \text{分析物的重量}) \times 100 \quad (\text{公式 2}).$$

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中所述标准物质为原花青素 B1。

4. 根据权利要求 1-3 任意一项所述的方法, 其中所述的水解通过在酸性条件下的热分解进行。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中所述酸性条件是酸和低级醇的混合物。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中所述酸为盐酸、硫酸或硝酸。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法, 其中所述低级醇为丙醇、丁醇、戊醇和/或异戊醇。

8. 根据权利要求 4-7 任意一项所述的方法, 其中所述的热分解在温度 50-100°C, 优选 80-100°C, 更优选 85-95°C 下进行, 反应时间为 30 分钟或更长, 优选 1 小时或更长。

9. 根据权利要求 1-8 任意一项所述的方法, 其中花青素量通过高效液相色谱法和/或吸光度法测量。

10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其中所述吸光度法通过测量 550-552nm 的吸光度进行, 在此波长范围内花青素在可见吸收光谱图中显示出最大吸收。

11. 一种测定分析物中含有的低聚原花青素(OPC)的方法, 所述分析物中黄烷-3-醇的 n -聚体的聚合度 n 不同, 所述方法包括如下步骤:

a)根据权利要求 1-10 任意一项的方法测定预定重量的分析物中含有的 OPC 总重量;

b)独立于步骤 a), 通过高效液相色谱法(HPLC)分析所述分析物以分离 OPC 中含有的具有不同聚合度 n 的 n -聚体, 并测定各种 n -聚体占有 n -聚体即 OPC 量的定量比例; 以及

c)根据 a)和 b)的结果测定所述分析物中每种 n -聚体的重量。

12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中高效液相色谱法中使用的柱为正相柱。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述正相柱中填充的树脂为硅胶基树脂。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法, 其中高效液相色谱法中, 洗脱液是己烷、甲醇、四氢呋喃和甲酸的混合物, 所述混合物的混合比为己烷/甲醇/四氢呋喃/甲酸=40-60: 30-50: 10-20: 0.1-5, 优选比例为 45: 40: 14: 1, 进行等度洗脱, 柱温为 10-60°C, 优选 40°C, 并测量 280nm 的吸光度。

15. 根据权利要求 11-14 任意一项所述的方法, 其中基于高效液相色谱法得到的峰面积, 根据下述公式计算每种 n-聚体的定量比例(b%):

$$b\% = \{\text{峰面积(每种 n-聚体)}\} / \{\text{总峰面积(所有聚合物)}\} \times 100 \quad (\text{公式 3}).$$

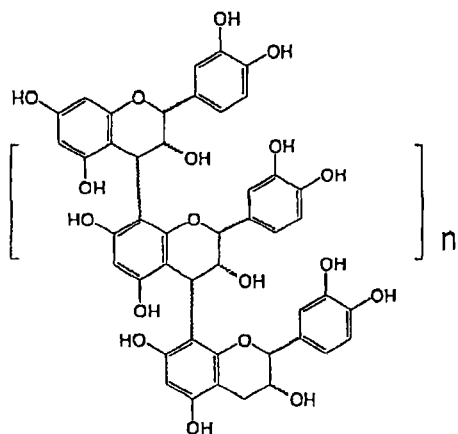
16. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中基于(a)测定的 OPC 重量和(b)测定的每种 n-聚体的比例, 在步骤(c)中, 根据下述公式测定每种 n-聚体的重量:

$$\text{n-聚体的量(mg)} = \text{OPC 的总量(mg)} \times \text{n-聚体的比例(b\%)} / 100 \quad (\text{公式 4}).$$

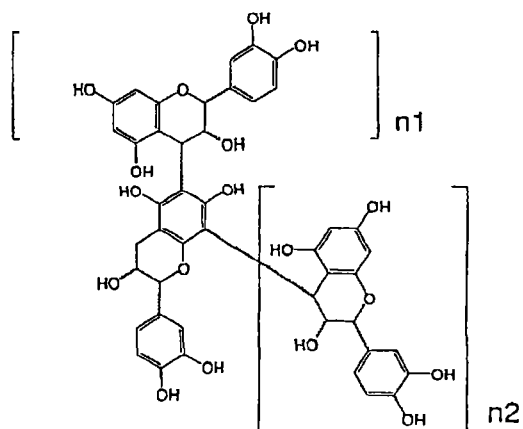
17. 根据权利要求 1-16 任意一项所述的方法, 其中待分析的低聚原花青素包括至少一种如下通式表示的化合物:

[化学式 1]

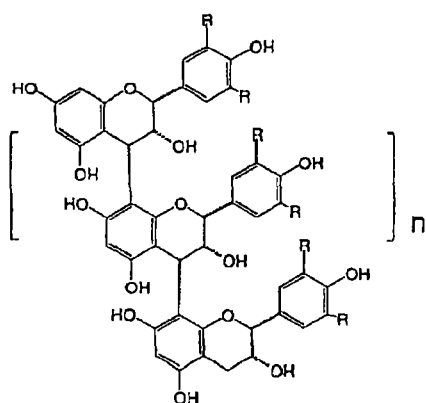
结构式 1



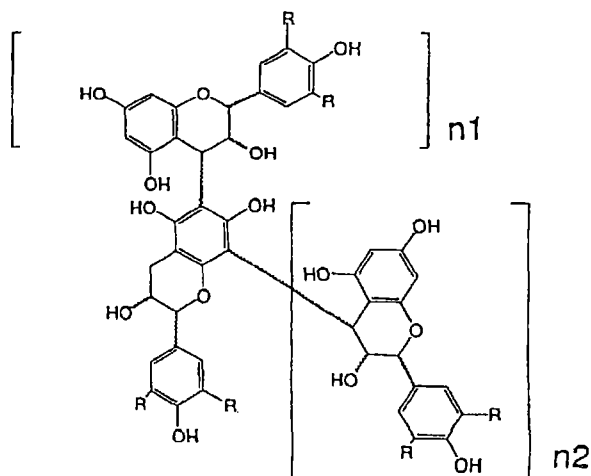
结构式 2



结构式 3



结构式 4



$n=0-18$ 的整数;
 $n1=1-18$ 的整数;
 $n2=0-18$ 的整数;
 $R=H$ 或 OH 。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述的低聚原花青素为包括至少一种下述原花青素类的低聚原花青素: 结构式 1 的原花青素 B1、B2、B3 和 B4, 其中 $n=0$; 结构式 2 的原花青素 B5、B6、B7 和 B8, 其中 $n1=0$ 和 $n2=0$; 以及结构式 1 的原花青素 C1、C2 和 C4, 其中 $n=1$ 。

19. 根据权利要求 1-18 任意一项所述的方法, 其中所述分析物为天

然物质(葡萄籽、罗望子果、苹果、树皮、松树皮衍生的多酚、茶叶、可可等,和/或它们的处理产品(提取物等))、食品或饮料、医药品和/或化妆品。

20. 一种通过高效液相色谱法(HPLC)测定分析物中含有的低聚原花青素(OPC)的不同聚合度的 n-聚体比例的方法。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中高效液相色谱法中使用的柱为正相柱。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法,其中正相柱中填充的树脂为硅胶基树脂。

23. 根据权利要求 20-22 任意一项所述的方法,其中高效液相色谱法中,洗脱液是己烷、甲醇、四氢呋喃和甲酸的混合物,所述混合物的混合比为己烷/甲醇/四氢呋喃/甲酸=40-60: 30-50: 10-20: 0.1-5,优选比例为 45: 40: 14: 1,进行等度洗脱,柱温为 10-60°C,优选 40°C,并测量 280nm 的吸光度。

24. 根据权利要求 20-23 任意一项所述的方法,其中基于高效液相色谱法得到的峰面积,根据下面的公式计算每种 n-聚体的比例(b%):

$$b\% = \{\text{峰面积(每种 n-聚体)}\} / \{\text{总峰面积(所有聚合物)}\} \times 100 \quad (\text{公式 3}).$$

25. 根据权利要求 1-24 任意一项所述的方法,如果所述分析物为包括软饮料或提神饮料、茶饮料、或酒精饮料的液体时,所述方法还包括冻干所述分析物或在减压条件下固化所述分析物至干燥,然后粉末化的步骤。

低聚原花青素(OPC)的分析方法

技术领域

本发明涉及一种用于测定分析物或待分析样品中含有的低聚原花青素(黄烷-3-醇的 n -聚体混合物的总称, $n \geq 2$)的方法, 所述的分析物或待分析样品例如是天然物质、食品和饮料、医药品和/或化妆品等。

背景技术

原花青素(OPC)据称是“法兰西悖论”的有效成分之一, 因为在酒中也含有该物质(1995, Clin. Chim. Acta. 235, 207-219)。原花青素已知的医学效果有抗氧化活性、末梢循环改善活性、血液流动改善作用、肝功能改善作用(2004, Japan Food Science, 403, 一月刊, 40-45)以及血小板凝集抑制作用(官方出版的专利公报 2003-527418)。因此, 需要开发方便的定性和定量测定 OPC 这种活性成分的方法。

分析原花青素的已知方法包括高效液相色谱-质谱法(LC-MS)的反相 HPLC 法(2003, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, (5), 1140-1142)和 LC-MS 的梯度洗脱的正相 HPLC (2003, J. Agric. Food Chem., 51, 7513-7521)。然而, 这两种方法都需要质谱检测器, 没有一种方法被认为是方便的。此外, 由于原花青素的组分黄烷-3-醇类的立体异构化, 原花青素以许多立体异构体形式存在。可用作标准物质的化合物存在局限性。因此, 除了一些已知化合物, 不可能对原花青素进行定量分析。此外, 自然界中的原花青素以从单体的黄烷-3-醇到二聚体、三聚体、进一步到更高聚合度的 n -聚体形式存在。反相 HPLC 分析显示黄烷-3-醇(单体)、其二聚体以及三聚体的峰重叠。

如上所述, 没有定性和定量测定 OPC 的简便方法。

发明内容

在这种情况下, 本发明者着重于开发一种新的分析方法, 该方法可测定天然物质、食品、饮料和药品中所含的 n -聚体的含量以及丰度, 而

不受来自于黄烷-3-醇单体的干扰。因此，本发明的目的是提供一种用于测定分析物如天然物质、食品和饮料中含有的 OPC 的新方法。

附图说明

图 1 显示儿茶素、黄烷-3-醇二聚体和三聚体的正相 HPLC 分析结果。

图 2 显示混合了儿茶素和原花青素的分析物的正相 HPLC 分析结果。

发明效果

本发明者进行了各种研究试图解决前述问题。结果从实验和分子量的角度阐明了：(a)水解低聚原花青素(OPC)产生的花青素量总是 $n/2$ ，而与 OPC 中含有的黄烷-3-醇的聚合度 n 的大小无关。该结论使得他们研究出 OPC 测定的简便方法。本发明者进一步发现了意想不到的事实(b)：使用正相柱高效液相色谱法可容易地实现迄今为止使用色谱法很难分离的不同聚合度 n 的黄烷-3-醇聚合物的分离。

本发明的方法利用上述事实(a)和/或事实(b)以简便的方式分析天然物质、食品和饮料、医药品和/或化妆品中的低聚原花青素(OPC)的量，以及分析 OPC 中 n -聚体的比例和/或含量。

根据本发明的方法，可以分析低聚原花青素(OPC)而不受低聚原花青素中经常含有的黄烷-3-醇单体的干扰。

此外，本发明的方法可以测定分析物中低聚原花青素的各种聚合物的黄烷-3-醇聚合物而不需要质谱仪。因此，本发明的方法非常适宜分析天然物质、食品和饮料、医药品和/或化妆品中的低聚原花青素。

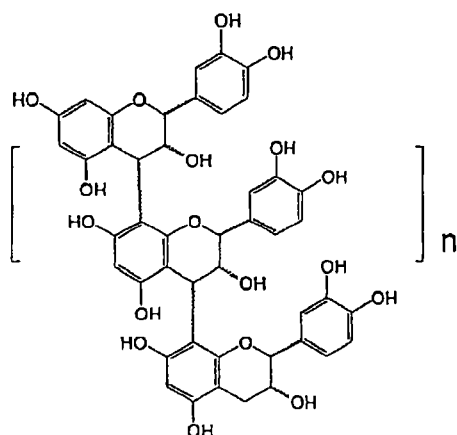
最佳实施方式

本发明的方法适用的分析物是可能含有黄烷-3-醇的 n -聚体($n \geq 2$)的混合物(下文称为低聚原花青素或 OPC)的任意样品，如天然物质(葡萄籽、罗望子果、苹果、树皮、松树皮衍生的多酚、茶叶、可可等，和/或它们的处理产品(提取物等))、食品和饮料、医药品和/或化妆品。

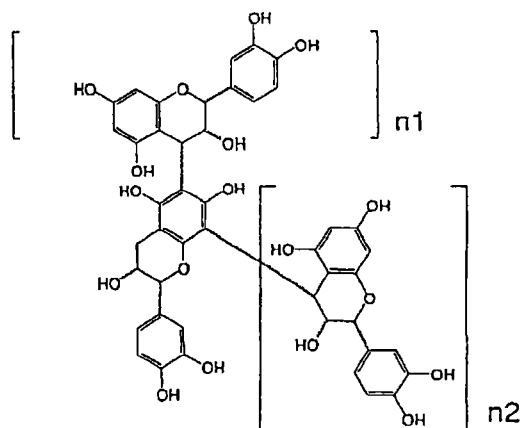
低聚原花青素通常包括至少一种如下通式表示的化合物：

[化学式 1]

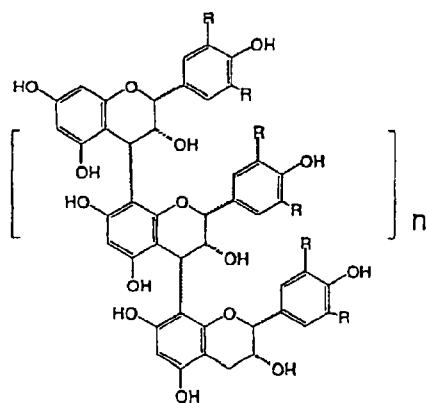
结构式 1



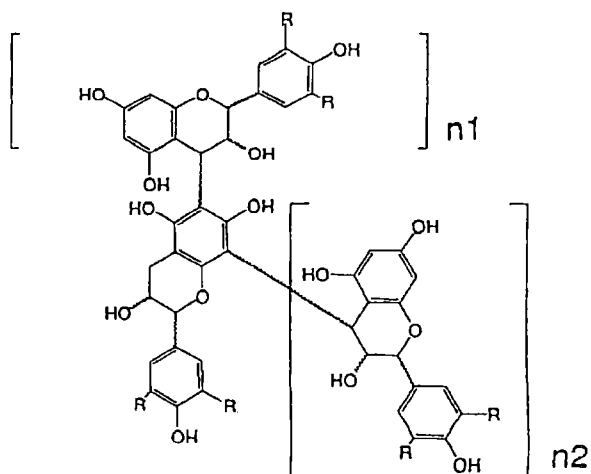
结构式 2



结构式 3



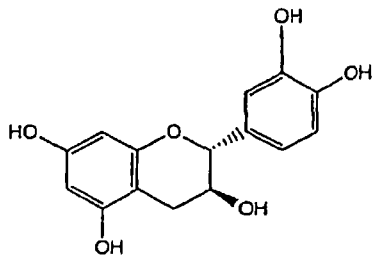
结构式 4



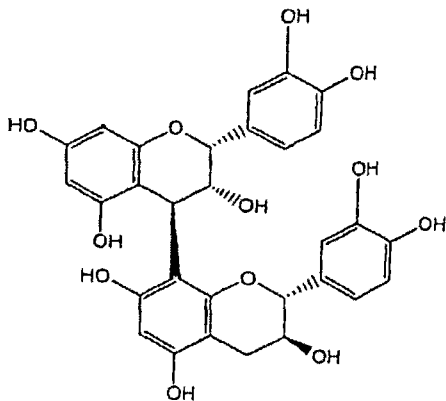
$n=0-18$ 的整数，
 $n_1=1-18$ 的整数，
 $n_2=0-18$ 的整数，以及
 $R=H$ 或 OH 。

本发明尤其适用于包括至少一种下述原花青素类的上述低聚原花青素：结构式 1 的原花青素 B1、B2、B3 和 B4，其中 $n=0$ ；结构式 2 的原花青素 B5、B6、B7 和 B8，其中 $n_1=0$ 和 $n_2=0$ ；以及结构式 1 的原花青素 C1、C2 和 C4，其中 $n=1$ 。上述 B1、B2……、C1、C2……是各个化合物的立体异构体。主要的原花青素、OPC 和儿茶素的结构如下所示。

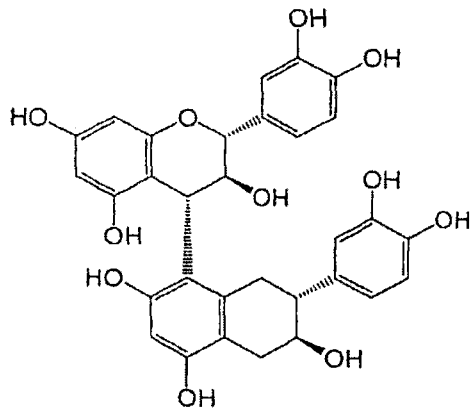
[化学式 1a]



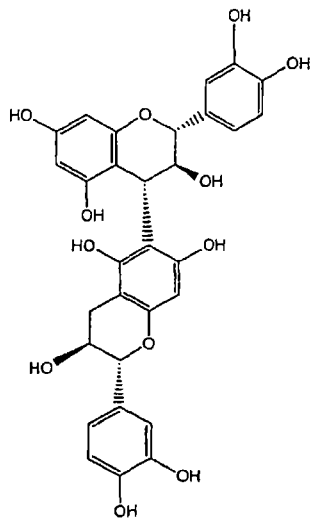
儿茶素



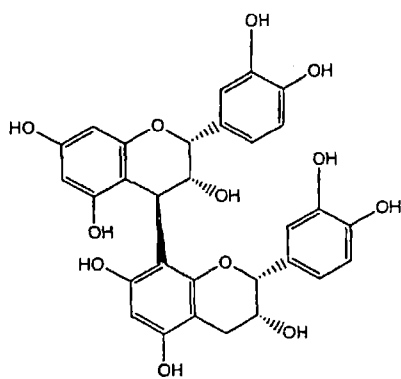
PB1 (表儿茶素-4β,8-儿茶素)



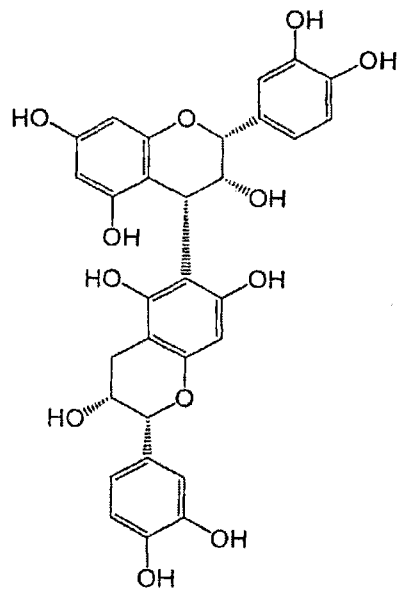
PB3 (儿茶素-4α,8-儿茶素)



PB7 (儿茶素-4α,6-儿茶素)



PB2 (表儿茶素-4β,8-表儿茶素)



PB5 (表儿茶素-4β,6-表儿茶素)

(1) OPC 总量的测定

根据本发明, 无需考虑分析物中低聚原花青素(OPC)含有的黄烷-3-醇聚合物的类型和聚合度, 当测定水解 OPC 产生的花青素时, 从测得值可以测定 OPC 的总量。本发明的方法可以按照下列顺序进行:

OPC 的水解

可以在酸性条件下通过热分解进行低聚原花青素的水解。优选的条件包括例如使用酸/低级醇混合物作为酸性条件, 所述酸优选是盐酸、硫酸或硝酸, 所述低级醇优选是丙醇、丁醇、戊醇和/或异戊醇。热分解可以在温度 50-100°C, 优选 80-100°C, 更优选 85-95°C 下进行, 反应时间为 30 分钟或更长, 优选 1 小时或更长。所述酸的浓度选自 0.1-2N, 更优选 0.4-1N。

进行水解时, 如果分析物是含有低浓度的低聚原花青素的液体样品, 那么可使用适当的方法浓缩样品, 例如冻干或在减压条件下固化至干燥。

将所述分析物(包括其浓缩物)溶解于上述酸/低级醇混合物中, 其浓度为 0.01-1%, 优选 0.05-0.2% (0.5-2mg/ml), 由此进行水解。

水解的具体例子如下: 在玻璃试管中, 将含有原花青素的样品(0.5mg)溶解于 1ml 0.6N 的 HCl/丁醇中, 所得溶液在 90°C 的水浴中静置 2 小时。反应完成后, 使用 UV-265 (Shimadzu Corp.) 测量 700-400nm 的吸收光谱。测量 551nm 处的吸光度证实水解反应是否进行完全而产生花青素。

花青素量的测量

可通过任意公知方法测量水解产生的花青素量, 例如, 可容易地通过高效液相色谱法或吸光度法完成。吸光度法可以使用未处理的水解产物, 并优选测量 550-552nm 的吸光度, 在此波长处, 花青素在可见吸收光谱图中显示最大吸收。在此波长处, 低聚原花青素水解产生的花青素以外的组分(例如, 儿茶素: 最大吸收波长 270nm)的影响可以忽略。

HPLC 方法的例子具体描述如下: 使用 HPLC 柱 YMC-ODS-A312 (6mm×150mm, YMC), 乙酸: 甲醇: 水 = 15: 17.5: 67.5 的混合物 1ml/min,

柱温 40°C, 检测 A520nm 的面积值以测定花青素。氯化氰定、氯化翠雀定和氯化天竺葵色素(均获自 Funakoshi)可用作标准物质。这些标准物质的保留时间各不相同, 其混合物或选自其中的任意一种可用作标准物质。对于 HPLC 柱, 不仅上述 C18 基树脂, 而且 C8-、C30-或聚合物基 C18 树脂都可以进行相似的分析, 只要其是反相树脂。

OPC 总量的计算

基于上述测定的花青素量, 测定分析物中低聚原花青素的量, 使用如下方法: a)通过水解一个 n-聚体产生的花青素量为 $n/2$, 而与 OPC 中含有的黄烷-3-醇聚合物的聚合度 n 的大小无关。基于这一事实, 水解产生的花青素量乘以系数 2, 可以得到预定量的分析物中例如以 mg 计的 OPC 总量。或者, (b)水解 OPC 产生的花青素量与 OPC 的总量成比例, 而与 OPC 中含有的黄烷-3-醇聚合物的聚合度 n 的大小无关。基于这一事实, 将水解产生的花青素量与水解已知量的 OPC 标准物质产生的花青素量相比较, 可通过校正曲线或下述公式测定分析物中 OPC 的总量(例如, 以 mg 计)和/或分析物中 OPC 的比例(a%):

$$\text{OPC 总量(mg)} = (\text{样品的测量值} / \text{标准物质的测量值}) \times \text{标准物质的量(mg)} \quad (\text{公式 1})$$

$$\text{分析物中 OPC 的比例(a\%)} = (\text{OPC 总量(mg)} / \text{分析物的量}) \times 100 \quad (\text{公式 2})$$

使用的适宜标准物质可选自原花青素 B1 和原花青素 B2 (两者均获自 Funakoshi)。

(2) 组成 OPC 的每种 n-聚体的分析

在本发明特别优选的实施方案中, 除了在上述(1)中测定预定重量的分析物中的 OPC 总重量之外, 或者独立于上述测定, 可使用高效液相色谱法(HPLC)测定出 OPC 中各种黄烷-3-醇聚合物的比例。通过如此做法, 本发明还提供了一种新的 OPC 测定方法, 该方法测定了预定重量的分析物中含有的、具有不同聚合度 n 的各种聚合物的重量。

高效液相色谱法中使用的柱优选是正相柱, 特别优选填装有硅胶基树脂的正相柱。本发明者的研究表明, 具有不同聚合度(在此情况下, 也

包括 $n=1$)的原花青素可以通过色谱法在正相柱上十分满意地分离为各个组分。从黄烷-3-醇类具有高极性的事实判断,到目前为止,人们仍然认为正相柱不能分离黄烷-3-醇类。此外,本发明的方法能使用紫外检测器进行测量,而不需要质谱检测器。

高效液相色谱法的条件可以根据需要确定。具体而言,例如使用色谱柱 Inertsil SIL (4.6mm $\varnothing$ ×150mm, GL Sciences Inc.),洗脱液例如是己烷、甲醇、四氢呋喃和甲酸的混合物。优选使用己烷: MeOH: THF: HCOOH=45: 40: 14: 1 进行等度洗脱(约 1ml/min)。使用己烷: MeOH: THF: HCOOH=40-60: 30-50: 10-20: 0.1-5 甚至可以在 0.3-1.5ml/min 的流速下进行分析。柱温为 10-60°C,优选 40°C,检测器优选是光电二极管阵列检测器(PDA),用于采集 240-400nm 的光谱数据。这是由于 OPC 在 280nm 具有最大吸收,但当样品与其他多酚类混合时,280nm 以外波长处的不同峰构成了最大吸收,因此有可能将 OPC 与其他多酚类区别开并排除它们。然而,当仅可以使用单波长检测器的情况下,可以只使用 A280nm 的吸收进行分析。

使用色谱法分离的所有聚合物的总峰面积(所有聚合物包括二聚体或更高聚合度的聚合物)是在 280nm 处具有最大吸收的 A280nm 峰的面积值总和。所使用的色谱柱可以是 Shimpack PREP-SIL(H) (4.6mm $\varnothing$ ×300mm, Shimadzu Corp.)或 Supersher Si60 (4.5mm $\varnothing$ ×100mm, Merck & Co.)以及 Inertsil SIL (4.6mm $\varnothing$ ×150mm, GL Sciences Inc.)。

基于高效液相色谱法得到的峰面积,利用下述公式可计算组成 OPC 的每种 n -聚体的比例(b%):

$$b\% = \{\text{峰面积(每种 } n\text{-聚体)}\} / \{\text{总峰面积(所有聚合物)}\} \times 100 \quad (\text{公式 } 3)$$

根据如此得到的每种 n -聚体的比例和前述(1)得到的 OPC 重量,可以通过下述公式测定预定重量的分析物中含有的例如以 mg 计的每种 n -聚体的重量:

$$n\text{-聚体的量(mg)} = \text{OPC 的总量(mg)} \times n\text{-聚体的比例(b\%)} / 100 \quad (\text{公式 } 4)$$

下面通过实施例更详细地描述本发明。然而,本发明并不限于这些

实施例。

实施例 1 酸水解条件的研究

观察松树皮提取物(flavangenol)被酸分解时随时间的变化。松树皮提取物(1mg)溶解于 1ml 0.6NHCl/BuOH 中，在 90℃ 的热水浴中加热该溶液。由 20 分钟至 140 分钟，每隔 20 分钟进行采样。样品用丁醇按 1：10 进行稀释，测量 400-700nm 的可见吸收光谱。所有样品的最大吸收出现在 551nm。测量结果显示在表 1 中。

表 1 松树皮提取物酸分解随时间的变化

时间	吸光度(551nm)
20 分钟	0.732
40 分钟	0.796
60 分钟	0.819
80 分钟	0.830
100 分钟	0.867
120 分钟	0.877
140 分钟	0.823

结果是，在酸分解过程中，吸光度随时间的推移缓慢增加，120 分钟时达到峰值。基于该结果，随后的试验中，水解期间定为 120 分钟(2 小时)。

实施例 2 酸水解中花青素的产生和测定

在玻璃试管中，将含有原花青素的样品(0.5mg)溶解于 1ml 0.6N HCl/丁醇中，所得溶液在 90℃ 的水浴中静置 2 小时。反应完成后，用 UV-265 (Shimadzu Corp.)测量 700-400nm 的吸收光谱，并测定 551nm 的吸光度。在下述条件下，使用 HPLC 对反应完成后的溶液进行分析以测定花青素：

- 柱：YMC-ODS-A312，6mmØ×150mm
- 流动相：CH₃COOH：MeOH：H₂O=15：17.5：67.5
- 检测：A520nm (使用 PDA 在 400-600nm 测量得到)

用于分析的标准物质翠雀定、靛定和天竺葵色素购自 Funakoshi。标准物质翠雀定在 4.2 分钟流出，其 λ_{max} 为 535nm；靛定在 5.5 分钟流出，

其 $\lambda_{\max}$ 为 525nm；天竺葵色素在 8.0 分钟流出，其 $\lambda_{\max}$ 为 515nm。如同翠雀定、氰定和天竺葵色素一样，按照上述条件对来自样品酸水解物的组分进行分析。

松树皮提取物、葡萄籽多酚、茶多酚、苹果多酚、罗望子果、原花青素 B1 (Funakoshi)用作 OPC 的标准物质。

结果显示在表 2 和表 3 中。

表 2 吸光度法测定 OPC 含量

	A550nm	OPC 含量
原花青素 B1	1.6905	100.0%
松树皮提取物	0.8897	52.6%
苹果	0.3804	22.5%
葡萄籽	0.7523	44.5%
罗望子果	0.7641	45.2%

表 3 HPLC 法测定 OPC 含量

样品	氰定	OPC 含量
	$\mu\text{g/ml}$	
原花青素 B1	66.19	100.0%
松树皮提取物	29.45	44.5%
罗望子果	28.64	43.3%
苹果	13.48	20.4%
葡萄籽	27.81	42.0%
绿茶	1.84+1.98*	5.8%

*: 1.84 $\mu\text{g/ml}$ 氰定+1.98 $\mu\text{g/ml}$ 翠雀定

实施例 3 正相 HPLC 对儿茶素、二聚体和三聚体进行分析

在下述条件下，使用正相 HPLC 分析用于儿茶素和原花青素的标准物质：

将(+)-儿茶素(Nacalai Tesque)、(-)-表儿茶素(Wako Pure Chemical Industries)、原花青素 B1 (Funakoshi)的样品(每种样品 0.1mg)分别溶解于 1ml 流动相中，用 0.45 μm 滤器过滤上述溶液，然后在下述条件下进行

HPLC 分析。

使用下面实施例 5 描述的方法合成三聚体。

柱：Inertsil SIL，4.6mmØ×150mm

流动相：己烷：MeOH：THF：HCOOH=45：40：14：1

检测：A280nm (使用 PDA 在 240-400nm 测量得到)

在这些条件下，单体((+)-儿茶素和(-)-表儿茶素)在 2.9 分钟流出，二聚体在 3.6 分钟流出，三聚体在 4.3 分钟流出。

这些物质的色谱图如图 1 所示。

实施例 4 通过正相 HPLC 进行分析

在下述条件下，使用正相 HPLC 分析含有儿茶素和原花青素的混合态样品：

含有原花青素的样品(1-2mg)溶解于 1ml 流动相中，用 0.45µm 滤器过滤上述溶液，在下述条件下进行 HPLC 分析。

使用的样品为苹果多酚、葡萄籽多酚、松树皮提取物和罗望子果。

柱：Inertsil SIL，4.6mmØ×150mm

流动相：己烷：MeOH：THF：HCOOH=45：40：14：1

检测：A280nm (使用 PDA 在 240-400nm 测量得到)

作为分析图的色谱图如图 2 所示。这些图中，符号 X 代表在 280nm 没有最大吸收且不同于 OPC 的多酚类。

每个样品中的二聚体和三聚体的浓度通过公式 $c\% = a\% \times b\%$ 测定。结果示于表 4。

表 4 二聚体和三聚体的含量

	OPC 的纯度		A280nm 的比例	丰度
	a%		b%	c%
松树皮提取物	44.5%	二聚体	55.4%	24.7%
	44.5%	三聚体	32.0%	14.2%
苹果多酚	20.4%	二聚体	31.6%	6.4%
	20.4%	三聚体	23.5%	4.8%
葡萄籽多酚	42.0%	二聚体	12.5%	5.3%
	42.0%	三聚体	5.8%	2.4%
罗望子果	43.3%	二聚体	22.8%	9.9%
	43.3%	三聚体	23.2%	10.0%

实施例 5 OPC 的合成

根据论文(1981, J.C.S. Perkin I. 1235-1245)按照下述方式合成 OPC。

将(+)-紫杉叶素(500 mg)溶解于 50ml 乙醇中，加入 200mg NaBH₄。然后，加入 1g (+)-儿茶素并溶解。然后加入 HCl，将混合物搅拌 1 小时。反应产物用反相 HPLC 纯化得到三聚体。

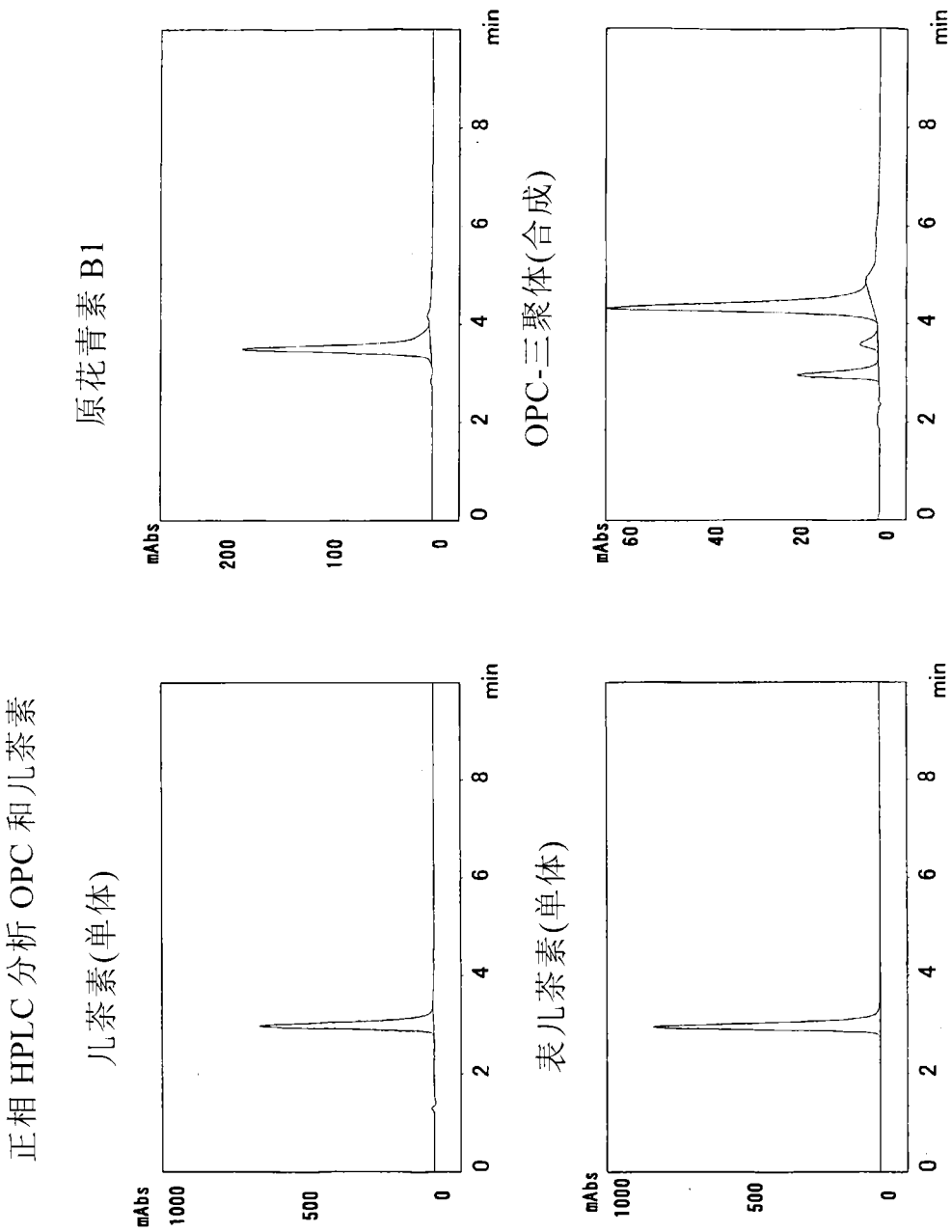


图 1

OPC 原料的正相 HPLC 色谱图

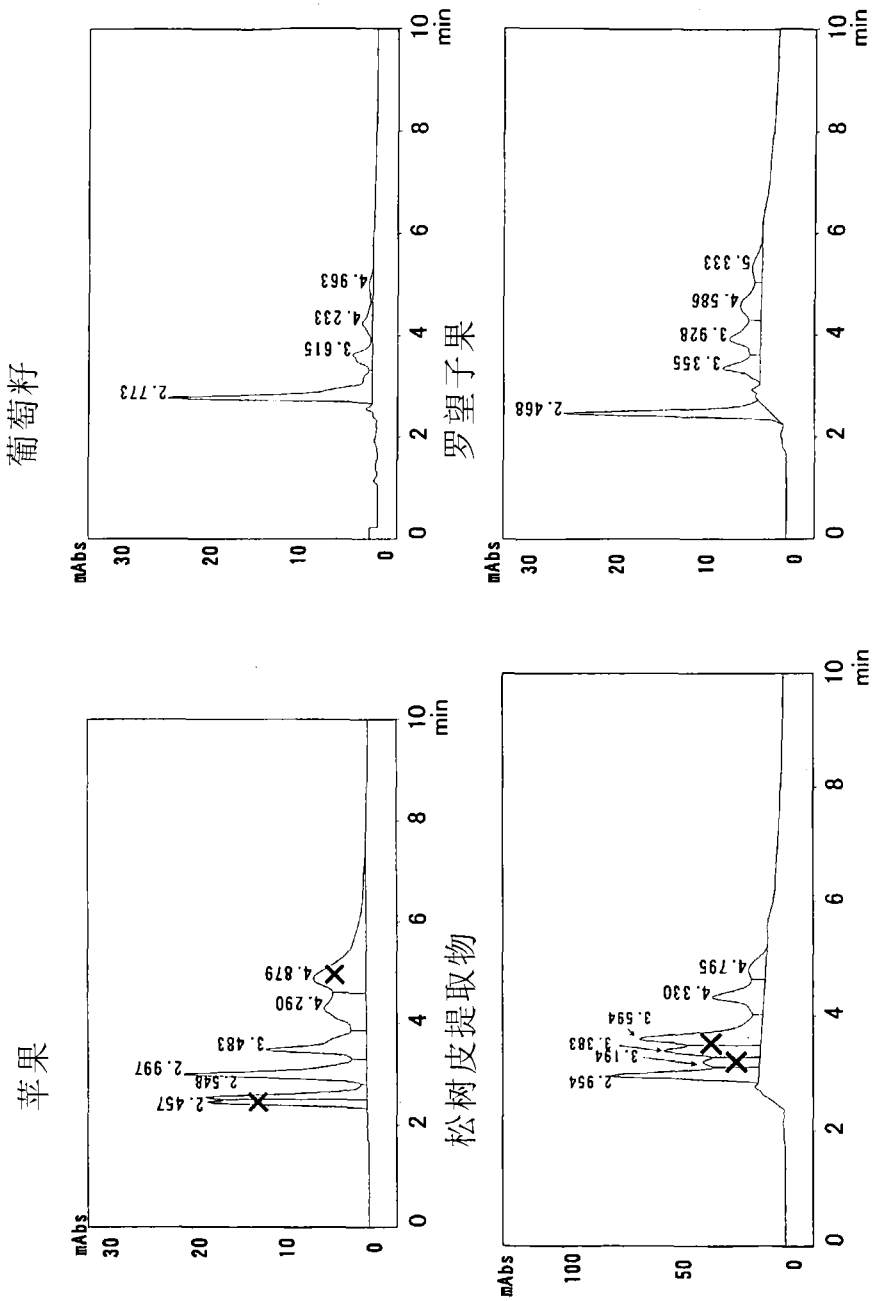


图 2