

葡萄籽超微粉体外消化后抗氧化能力的检测*

李 华,李佩洪,李 勇,王晓宇

(西北农林科技大学葡萄酒学院,陕西 杨凌,712100)

摘 要 利用不同的方法检测葡萄籽超微粉经体外消化后的抗氧化能力。通过对总酚和原花青素含量的测定、及抗脂质过氧化能力、清除羟自由基能力、清除 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)、ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))自由基能力、铜离子还原能力的测定,得出:葡萄籽超微粉具有很高的自由基清除能力、还原能力和抗脂质过氧化的能力。在利用透析袋模拟抗氧化活性物质的吸收实验中,大量的抗氧化活性物质能够以被动吸收的方式进入透析袋内,透析液具有很强的抗氧化能力。

关键词 葡萄籽,模拟胃肠,抗氧化

葡萄籽是葡萄酒生产中的副产物含有丰富的蛋白质、纤维素、脂肪、酚类物质、矿物质和维生素等营养成分,葡萄籽中的酚类物质尤其是原花青素被证明具有非常高抗氧化活性的物质,此外还含有抗癌物质——白藜芦醇等^[1]。

目前对葡萄籽抗氧化能力的体外检测方法主要是利用溶剂浸提葡萄籽后,检测葡萄籽提取物的抗氧化活性。但是利用溶剂提取在提取物的种类和数量上都有别于生理环境。而通过人体或动物性试验,不仅复杂而且受到许多因素的制约。因此,本研究通过体外模拟人工胃肠消化、吸收环境,对葡萄籽超微粉进行处理,检测其主要抗氧化成分和抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

葡萄籽超微粉,西北农林科技大学第五实验室提供;ABTS[2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、DPPH(1,1-二苯基苦基苯肼)、Trolox(水溶性 V_E),Sigma 公司。

其他化学试剂为国产分析纯。

MV-1700 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),冷冻离心机 SORVALL(美国科峻仪器公司),电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂),QYC 200 恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司)。

1.2 实验方法

第一作者:博士,教授。

* 科技部“科技成果重点推广项目计划”(2004EC000317)。

收稿日期:2008-02-28,改回日期:2008-07-14

1.2.1 样品的处理

0.2 g 葡萄籽超微粉在模拟胃液^[2]20 mL 中消化 2 h 后,在透析袋(截留相对分子质量 3 600)中加入 pH 7.4 磷酸缓冲液 20 mL,浸没于模拟胃液中,30 min 后,加入胰酶,再消化 2h。整个过程在 37℃、120 g 恒温摇床中进行。消化完成后分别收集透析袋内、外的溶液,3 000 g 离心 10 min,收集上清液,4℃保存备用。

1.2.2 多酚含量的测定

参照王华^[3]的方法,利用福林/肖卡法测定多酚含量。总酚测定标准曲线回归方程为: $y = 0.0012x + 0.0254$, $R^2 = 0.999$ 。

1.2.3 原花青素含量测定

参照李华等人^[4]的方法,利用铁盐催化比色法测定原花青素含量。原花青素测定标准曲线回归方程为: $y = 0.0048x + 0.0226$, $R^2 = 0.9979$ 。

1.2.4 抗脂质过氧化能力测定

参照田龙^[5]的方法,有所改动,本研究利用 AP-PH 溶液引发蛋黄卵磷脂的脂质过氧化。

1.2.5 清除·OH 自由基的活性

参照周贤等人^[6]的方法,利用 fenton 反应产生羟自由基。

采用清除·OH 的 IC₅₀ 值(清除 50% 自由基时样品的浓度)表示抗氧化剂清除自由基能力。

1.2.6 DPPH 自由基清除能力测定

参照彭长连等人^[7]的方法,1 g 葡萄籽超微粉的 DPPH 自由基清除能力以达到相同自由基清除能力所需 Trolox 的量表示(TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity)。Trolox 的 DPPH 清除率回归方程为: $y = 0.0006x - 0.0007$, $R^2 = 0.9673$ 。

1.2.7 ABTS⁺ 自由基清除能力测定

参照韩光亮等人^[8]的方法,1 g 葡萄籽超微粉的 ABTS 自由基清除能力以达到相同自由基清除能力所需 Trolox 的量表示。Trolox 的 ABTS⁺ 清除率的回归方程为: $y = 0.0007x - 0.0486$, $R^2 = 0.995$ 。

1.2.8 铜离子还原能力(CUPRAC)测定

参照 Resat Apak, Kubilay Gycu^[9]的方法,1g 葡萄籽超微粉的铜离子还原能力以达到相同还原力所需 Trolox 的量表示。Trolox 的铜离子还原能力(CUPRAC)的回归方程为: $y = 0.0004x + 0.1027$, $R^2 = 0.982$ 。

2 结果与讨论

2.1 总酚与原花青素含量

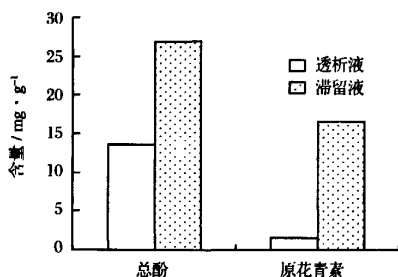


图1 葡萄籽超微粉的总酚与原花青素含量

葡萄籽多酚具有延缓衰老、抗癌、保护胃粘膜、抑制胆固醇的吸收、抗滤过性病毒、抗溃疡、抗炎症、改善肠道微循环等功效,还可以作为食品添加剂、化妆品添加剂。有研究表明,葡萄籽提取物的抗氧化能力强于人工合成的食品抗氧化剂 BHA、BHT,以及天然的抗氧化剂 V_C、V_E。

葡萄籽中含有大量的多酚类物质,主要是原花青素、丹宁、以及白藜芦醇。Guendez 等人^[10]测定了 9 种酿酒葡萄的葡萄籽多酚含量,得出每 100 g 葡萄籽中的总酚含量范围 55.1~964 mg,葡萄籽多酚中以单体儿茶酚含量最高,达 49.8%,其次是表儿茶素,表儿茶酸, V_{B1}, V_{B6}。在本研究中,葡萄籽超微粉的总的多酚含量为 40.37 mg/g(以没食子酸计),总的原花青素含量为 18 mg/g(以标准原花青素提取物计)。Perez-Jimenez, 等人^[12]研究得出,小麦等植物类日常饮食经过体外消化后的总酚和抗氧化活性均高于通过溶剂提取法得到的抗氧化活性,这是由于在胃酸性 pH 和各种消化酶的存在下有利于活性成分的释放。同样,本文测定结果也高于其他作者利用有机溶剂提取的测定结果。

由于透析袋具有选择透过作用,且分子质量越小越容易通过透析作用进入透析袋内。小分子的多酚物质通过透析作用进入到透析袋内,而大分子的多酚物质则不能透过而留在透析袋外,由此而模拟小肠的吸收。由图 1 可知,透析液的多酚含量为 13.52 mg/g,滞留液的多酚含量为 26.85 mg/g,透析液的多酚的含量低于滞留液。原花青素在人工胃液中比较稳定,在人工肠液中呈缓慢分解趋势,原花青素分子质量范围很大,从 290~3100(十聚体),分子量越小越容易通过透析作用进入透析袋内,由图 1 可知,透析液的原花青素为 1.5 mg/g,滞留液的原花青素为 16.5 mg/g。透析液的原花青素含量低于透析袋外的。这一结果证明了有许多大分子物质例如缩合丹宁不能通过半透膜而进入血液中。

2.2 生物体内自由基的清除能力

人体内自由基的数量过多,会损坏细胞结构,发生脂质过氧化,干扰人体正常代谢活动,引起机体衰老,动脉粥样硬化、心血管疾病、基因突变、癌症等疾病。有机体内常见的自由基有两类:氧自由基和脂类自由基。在氧自由基中,又以羟自由基的损伤力最强。

2.2.1 抗脂质过氧化能力

葡萄籽超微粉是一种天然的抗氧化剂,具有清除自由基的能力。朱振勤^[13]等人证明,葡萄籽提取物原花青素能有效地清除羟自由基,并有效抑制脂质过氧化。经检测,在本体系中,透析液的抗脂质过氧化能力达到 70.37%,滞留液抗脂质过氧化能力达到 74.07%。透析袋内外消化液均具有很强的抗脂质氧化的能力,说明葡萄籽微粉具有很好的防治动脉粥样硬化的功能。

2.2.2 葡萄籽超微粉清除羟自由基能力

生物体内活性氧代谢物质羟自由基可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,并且羟自由基能由最初的链反应增加氧化损伤的能力。损伤膜结构及功能和多种生物分子。吕禹泽^[14]等人测定葡萄多酚对羟自由基的清除率的 IC₅₀ = 1.91 mg/mL。

如图 2 所示,透析液羟自由基清除率的回归方程为: $y = 20.724x + 10.929$, $R^2 = 0.9467$,其 IC₅₀ = 1.884 g/L,滞留液羟自由基清除率的回归方程为: $y = 197.7x - 6.9497$, $R^2 = 0.9934$,其 IC₅₀ = 0.288 g/L。透析液的清除羟自由基的能力低于滞留液,这一结果与本研究的 DPPH 法、ABTS 法、CUPRAC 法测定结果一致。不论透析膜内外,葡萄籽微粉都表

现出了很好的羟自由基清除能力。

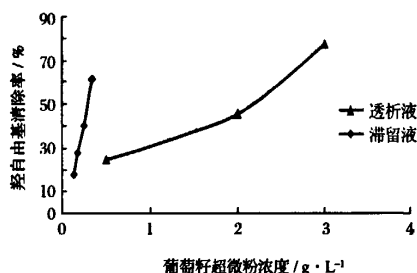


图2 葡萄籽超微粉羟自由基的清除率

2.3 葡萄籽超微粉清除人工自由基和还原能力

DPPH·、ABTS⁺是很稳定的有色人工自由基,在特定波长下有吸收。其与自由基清除剂作用后,颜色变浅,特定波长下的吸收变弱。若受试物能将其清除,则提示受试物具有降低羟自由基、烷自由基或过氧化自由基有效浓度和打断脂质过氧化链反应作用。由图3可知,透析液的DPPH·清除能力为:232.03 μmol/L TEAC,滞留液的DPPH·清除能力为:600.62 μmol/L TEAC,1g葡萄籽超微粉总的DPPH·清除能力为:832.66 μmol/L TEAC;透析液的ABTS⁺清除能力为:422.34 μmol/L TEAC,滞留液的ABTS⁺清除能力为:719.66 μmol/L TEAC,1g葡萄籽超微粉总的ABTS⁺清除能力为:1142.00 μmol/L TEAC。透析袋内、外的消化液都具有DPPH·、ABTS⁺自由基清除能力。Guendez^[15]等人发现,DPPH·自由基清除率和葡萄籽提取物有显著的相关性($R^2 = 0.6499$, $P < 0.01$)。在本研究中,透析液的DPPH·、ABTS⁺清除能力都低于滞留液,而透析液的多酚含量亦低于滞留液,说明二者有一定的相关性。

铜离子还原能力(CUPRAC)原理:在pH=7的醋酸盐缓冲液环境中,Cu(II)被还原剂还原为Cu(I),Cu(I)和新亚铜试剂反应显色。还原能力的大小和还原酮的存在密切联系,推测葡萄籽多酚和还原酮表现还原能力的机理类似,都是通过转移电子来打断自由基链式反应。该法与最常用的还原能力测定方法FRAP相比最大的优点在于:作用环境接近生理pH值,而且可以测定硫醇类抗氧化剂。

在本研究中,如图3所示,透析液的CUPRAC为1321.5 μmol/L TEAC,滞留液的CUPRAC为1746.5 μmol/L TEAC,1g葡萄籽超微粉总的CUPRAC为3068 μmol/L TEAC,证明了葡萄籽超微粉具有强的还原能力。

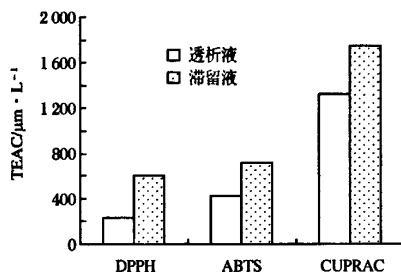


图3 葡萄籽超微粉的DPPH·、ABTS⁺清除能力,铜离子还原能力

3 结论

(1)葡萄籽超微粉具有很高的自由基清除能力、还原能力和抗脂质过氧化的能力,说明它可以作为一种非常好的天然抗氧化剂。

(2)通过模拟胃肠消化环境的方法,不仅检测环境更加接近生理环境,而且本实验利用透析袋模拟活性物质的被动吸收状况。研究结果表明:大量的抗氧化活性物质能够以被动吸收的方式进入透析袋内,透析液具有很强的抗氧化能力,而这一结果是利用普通溶剂提取的方法无法获得的。

参考文献

- 李银平,薛雪萍,李华,等.葡萄籽成分与营养评价[J].食品与发酵工业,2006,32(12):108~113
- 中华人民共和国卫生部药典委员会编.中华人民共和国药典[M].北京:人民卫生出版社,1990.附录16
- 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
- 李华,肖付才.铁盐催化比色法测定葡萄籽超微粉中的原花青素[J].食品研究与开发,2007,28(9):114~117
- 田龙.猕猴桃果水溶性多糖硫酸酯的制备及抗氧化活性[J].华中农业大学学报,2007,26(4):570~573
- 周贤,王昌禄.茅台酒大曲中抗氧化物质的分离及活性研究[J].食品科学,2005,26,增刊:10~11
- 彭长连,陈少薇.用清除有机自由基法评价植物抗氧化能力[J].生物化学与生物物理进展,2000,27(6):658~661
- 韩光亮,李翠梅.改良的ABTS⁺法及其在优化抗氧化活性物质提取中的应用[J].卫生研究,2004,33(5):620~622
- Resat Apak, Kubilay Güçlü, et al. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay [J]. Microchim Acta, 2008, 160:413~419
- Guendez R, Kallithraka S, Makris D P, et al. Determination of the antioxidant capacity of grape seed extract by DPPH·, ABTS⁺ and CUPRAC methods [J]. Food Chemistry, 2007, 103:108~113

- nation of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts; Correlation with antiradical activity[J]. Food Chemistry, 2005, 89: 1~9
- 11 Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 5 036~5 040
- 12 Serrano J, Goni I, Saura-Calixto F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity[J]. Food Research International, 2007, 40: 15~21
- 13 朱振勤, 翟万银. 葡萄籽原花青素提取物抗氧化作用研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2003, 1: 98~101
- 14 吕禹泽, 宋 钰. 葡萄多酚的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 213~216
- 15 Guendez R, Kallithraka S, Makris D P, et al. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts; Correlation with antiradical activity[J]. Food Chemistry, 2005, 89: 1~9

The Antioxidant Capacity of Ultra-fine Powder of Grape Seeds under Conditions of *in vitro* Digestion

Li Hua, Li Peihong, Li Yong, Wang Xiaoyu

(College of Enology in Nwsuaf, Yangling, 712100, China)

ABSTRACT We used several different methods to determine the antioxidant capacity of ultra-fine powder of grape seeds after *in vitro* digestion. The antioxidant potential of the extract was assessed by performing different *in vitro* assays, such as the total content of phenolic and the procyanidins, CUPRAC, DPPH, ABTS + and OH radical scavenging capacities and peroxidation inhibiting activity. The results showed that the sample exhibited strong antioxidant activity. Dialyzing bag was used to simulate the gastrointestinal assimilation; much of strong active antioxidants permeated into the dialyzing bag by passive absorption.

Key words simulate gastrointestinal, antioxidant activity

行业动态

国家科技支撑农业领域食品加工技术及装备进展

国家科技支撑计划农业领域项目针对高效、节能、环境友好方向发展的共性关键技术与装备等瓶颈问题,通过自主创新 and 集成创新,研究并开发出了食品冷杀菌、高效节能干燥、连续真空冷冻干燥、大型船用急冷设备等 15 种食品加工重大关键技术和装备,全面提升了我国冷加工、食品包装以及薯类加工技术与装备等领域研究水平,迅速缩小我国在上述领域与欧美发达国家的差距,使我国成为少数几个可以制造食品冷加工、大型连续成套高技术设备的国家之一。

在玉米、薯类、肉类、果类、蛋类等与国计民生相关的大宗农产品的深度加工上取得重大突破和进展,开发了玉米化工醇、苹果果胶、马铃薯雪花全粉、蛋粉等量大面广的 101 个产品和 15 种新材料,并实现了金华火腿等传统肉制品的工业化生产,缩短了生产周期,提高了产品质量和生产效率。突破了玉米山梨醇氢解技术,首创了玉米化工醇工业化生产工艺;突破了淀粉回生老化制约,形成了大量大宗方便食品新产品;突破了马铃薯和甘薯干燥技术,推动了薯类地区资源优势向经济优势的转变。建立了试验基地 21 个、中试生产线 20 条、生产示范线 42 条,新增产值 21 亿元,新增利税 3.92 亿元。上述一系列重大关键技术的突破为提升食品产业核心竞争力、提高农业资源利用率和附加值、促进农业可持续发展、增加农民收入起到了重要的推动作用。

系统开展了功能性食品评价、有效成分检测和鉴别、功能因子高效分离与制备及其生物活性稳态化共性关键技术研究,进行了具有减肥、辅助降血脂、降血压、降血糖、抗氧化、调节异常代谢以及辅助改善老年记忆等功能的新产品研发与产业化示范。研究建立了黄酮类化合物等功能因子指纹图谱,突破了长期困扰我国功能食品行业发展中的瓶颈技术——功能性食品的真伪鉴别问题,极大地提高了功能性食品鉴定的可行性和可靠性;在功能性低聚糖与多糖、活性蛋白与多肽、功能性油脂、功能性色素与黄酮等功能因子的高效提取分离,功能因子绿色高效低成本生产和工业化规模的连续分离与制备等方面取得重大技术突破,为保健食品开发提供了技术保障。