

紫外光辐射对葡萄籽原花色素组成及清除自由基活性的影响*

罗冠中 张泽生

(天津科技大学食品工程与生物技术学院,天津市食品营养与安全重点实验室,天津,300222)

摘要 对葡萄籽提取物原花色素受紫外辐射后的含量、3种主要化合物及清除 DPPH 自由基活性的变化进行了研究。结果表明,经 5 d 的紫外照射,原花色素的含量明显下降 ($P < 0.01$),3 种主要化合物儿茶素或表儿茶素的聚合体(二聚体)、表儿茶素、儿茶素依次消失,然而其 DPPH 清除率与对照样品相差不大 ($P > 0.05$),据进一步研究,紫外照射后,原花色素可能发生了聚合并生成花色色素等有色物质,具体生成物及活性仍有待深入研究。

关键词 原花青素,紫外辐射,自由基

近年来,葡萄籽提取物原花色素作为一种具有强抗氧化、清除自由基活性的天然产物已被广泛研究^[1]。由于这类化合物易于被氧化,它的稳定性及生产、贮藏等条件的研究就显得十分重要。国内韩菊、魏福祥等人^[2]对葡萄籽中低聚原花色素在不同温度、光照等条件下的稳定性进行了研究,但尚未有关于紫外辐射对原花色素影响的详细报道。由于原花色素具有很强的抗紫外辐射能力,它的一个主要应用就是作为抗氧化、清除自由基的功效成分被添加到化妆品中,所以有必要研究紫外光对其主要成分及抗氧化、清除自由基活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄籽(天津巨峰葡萄),经洗净、60℃烘干,粉碎过 20 目筛,密封保存于 4℃ 备用。

儿茶素、表儿茶素标准品(Merck 公司),甲醇(CR)、乙腈(CR)、冰醋酸(CR),香草醛(AR)、浓 H_2SO_4 (AR),AB-8 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司),实验用重蒸水。

1.2 仪器

LabAlliance Series III 高效液相色谱仪,LabAlliance Model525 检测器,Kromasil C_{18} 5 μ 色谱柱(250 mm×4.6 mm);高效液相质谱联用仪 1100 Series LC-MSD-Trap-SL(Agilent 公司);紫外可见分光光度计(岛津 1240 型);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂 RE-3000);DC-P3 型全自动测色色差计(北京市兴光测色仪器公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 原花色素的提取及精制

葡萄籽→清洗→烘干→粉碎→过 20 目筛→料液比 1:20(g:mL,溶液为体积分数 60% 乙醇溶液),温度 50℃,热回流浸提 50 min→布氏抽滤→旋转蒸发→AB-8 大孔吸附树脂柱→体积分数 70% 乙醇洗脱→冷冻干燥

经过大孔树脂吸附精制的葡萄籽提取物,去除了粗提物中的多糖、蛋白等杂质,其原花色素含量可达 95% 以上。

1.3.2 紫外光辐射^[3]

将 1.3.1 原花色素精提物溶于重蒸水,配成 0.3 mg/mL 溶液。将配好的溶液 40 mL 倒入直径为 40 mm,高 55 mm 的烧杯中,并将烧杯置于紫外箱中(220 V、50 Hz),烧杯中溶液液面与紫外光源之间的垂直距离为 55 cm,连续照射 5 d;将烧杯置于暗处作为对照样。每 24 h 进行补水,维持溶液浓度不变,在紫外照射过程中保持温度为 $(25 \pm 1)^\circ C$ 。

1.3.3 硫酸-香草醛法测定原花色素的含量^[4]

准确量取 0.5 mL 被测样品水溶液于 10 mL 比色管中,加入 2.5 mL 30 g/L 香草醛溶液,然后加入 2.5 mL 体积分数 30% 硫酸-甲醇溶液,对照样中加入 0.5 mL 样品,2.5 mL 甲醇和 2.5 mL 体积分数 30% 硫酸-甲醇溶液,30℃ 条件下避光反应 20 min,在 500 nm 处测定吸光度。根据实验测定的标准曲线(以儿茶素为标准): $y = 1.721 4x - 0.004 4$, $R^2 = 0.995 6$ 计算结果,其中 y 为实验所得的吸光度(ABS), x 为样品浓度(mg/mL)。

1.3.4 高效液相与高效液相-质谱法测定样品原花色素的组成

(1)流动相的梯度条件(见表 1)。

第一作者:硕士研究生。

*天津市经委科研项目(No. 20039905)

收稿日期:2005-06-13,改回日期:2005-08-26

表1 流动相的梯度条件

时间/min	流量/mL·min ⁻¹	A/%	B/%
0.0	1.00	93	7
5.0	1.00	93	7
80.0	1.00	80	20
90.0	1.00	0	100
95.0	1.00	0	100
100.0	1.00	93	7

A, 2.5%冰醋酸溶于双蒸水; B, 80%乙腈溶于A。

(2)进样量 20 μ L, 保持 25℃, 于 280 nm 下检测。

(3)质谱条件:扫描方式为正离子扫描(ESI, m/z 100~1 000),毛细管电压 4.2 kV,锥孔电压 40 V,光电倍增器电压 150 V,离子源温度 120℃,脱溶剂气温度 350℃。

1.3.5 DPPH 清除率的测定^[5]

(1)基本原理。二苯代苦味酰基自由基(DPPH·)是一种很稳定的以氮为中心的自由基,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的有效浓度和切断脂质过氧化链反应的作用。DPPH·有个单电子,在 517 nm 有强吸收,其甲醇溶液呈深紫色,加入受试物后,在 517 nm 处可以动态监测其对 DPPH·的清除效果。

(2)标准曲线的制作。准确称取 DPPH 标准品 25 mg,用甲醇定容至 500 mL。得浓度为 0.5 mg/mL 的母液,再用甲醇稀释成不同浓度,用分光光度计于 517 nm 处分别测定吸光度,得标准曲线 $y = 3.9211x + 0.0246, R^2 = 0.9989$ 。

(3)测定。取 0.2mL 浓度为 0.03mg/mL(将样品稀释 10 倍)的紫外样或对照样的甲醇溶液,加入 7.8mL 浓度为 0.025 mg/mL DPPH·甲醇溶液,立即混匀,保持室温于暗处反应 100 min,用分光光度计于 517 nm 处,在一定时间间隔内测定吸光度,直到读数稳定。

(4)计算。经待测样品作用后,DPPH·和剩余百分含量可由下式得到:

$$\text{DPPH}/\% = (\text{DPPH}_t/\text{DPPH}_{t=0}) \times 100$$

式中: $\text{DPPH}_{t=0}$, 0 时刻体系中 DPPH·的起始浓度; DPPH_t , t 时刻体系中 DPPH·浓度。

以 1 减去 DPPH·的剩余百分含量,即为试样对 DPPH·的清除率。

1.3.6 颜色测定

采用 CIE1976 $L^*a^*b^*$ 表色系统来反映原花色素紫外辐射影响后的色泽变化情况,系统中 L^* 反映样品的亮度, $\pm a^*$ 反映样品的红值和绿值, $\pm b^*$

反映样品的黄值和蓝值。总色差 ΔE 由下式求得:

$$\Delta E = (\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta L^{*2})^{1/2}$$

其中 $\Delta a^* = a^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b^* - b_0^*$, $\Delta L^* = L^* - L_0^*$, a_0^* , b_0^* , L_0^* 分别为样品对应的 3 个初始值。

1.3.7 数据分析

数据分析采用 statistical analysis systems(SAS, 1999)软件包。文中所求平均值为 3 次测量结果平均,其中为平均值,SD 为标准偏差。显著性分析采用学生氏 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 紫外照射时间对原花色素含量影响

对紫外照射下的原花色素含量进行 5 d 的监测,并与无光照的对照样进行对照比较(见表 2)。

表2 原花色素含量随紫外照射时间的变化

时间/d	对照样原花色素 含量($\bar{x} \pm \text{SD}$)/mg·mL ⁻¹	紫外样原花色素 含量($\bar{x} \pm \text{SD}$)/mg·mL ⁻¹
	含量($\bar{x} \pm \text{SD}$)/mg·mL ⁻¹	含量($\bar{x} \pm \text{SD}$)/mg·mL ⁻¹
0	0.288 1 \pm 0.001 1	0.288 1 \pm 0.001 1
1	0.276 6 \pm 0.001 0	0.211 2 \pm 0.003 7
2	0.214 7 \pm 0.002 4	0.168 2 \pm 0.006 1
3	0.221 7 \pm 0.003 2	0.125 0 \pm 0.007 4
4	0.214 7 \pm 0.005 2	0.108 8 \pm 0.005 6
5	0.217 6 \pm 0.001 0	0.082 8 \pm 0.005 4

从表 2 中数据可以看出,5 d 内紫外样的原花色素含量随照射时间的延长逐渐下降,而对照样的变化很小,后 4 d 基本保持不变。紫外样与对照比较,二者有着明显的差异($P < 0.05$),经过 5 d 的照射后原花色素含量仅为初始时的 28.74%,而对照样为初始时的 75.53%。韩菊、魏福祥等人^[2]测定了于自然光及室外强光照下的原花色素吸光度的变化,结果表明自然光照射 10 d 原花色素稍有减少,而室外强光照射 5 h 以上原花色素含量就有所下降。可见,原花色素于紫外光辐射下不稳定,在生产及贮藏过程中应尽量避免紫外光或强光的辐射。

2.2 紫外照射对原花色素中主要化合物的影响

利用标准品及 HPLC-MS 法鉴定出了葡萄籽低聚原花色素中的 3 种主要化合物(见图 1)。其中二聚体的鉴定采用 HPLC-MS 法(见图 2),经明显分子离子峰(二聚体 $-H + Na^+ = 601$)及黄酮化合物常见的 RDA 裂解方式可确定其为一种儿茶素或表儿茶素的二聚体。实验通过 HPLC 法检测了紫外照射下原花色素中上述 3 种主要化合物儿茶素、表儿茶素以及 1 种二聚体的含量变化(见表 3)。

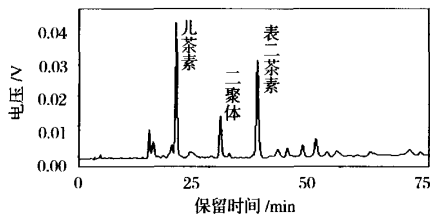


图1 葡萄籽原花色色素高效液相色谱

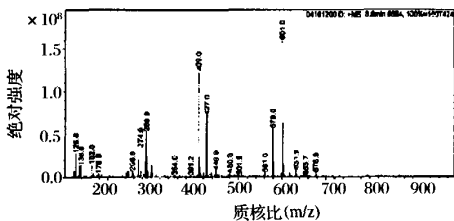


图2 原花色色素1种二聚体的质谱图

表3 在紫外照射下原花色色素中儿茶素、表儿茶素与1种二聚体的含量¹⁾

照射时间 /d	对 照				紫 外			
	峰面积 × 10 ⁻⁵			儿茶素含量 /mg·mL ⁻¹	峰面积 × 10 ⁻⁵			儿茶素含量 /mg·mL ⁻¹
	儿茶素	二聚体	表儿茶素		儿茶素	二聚体	表儿茶素	
0	1.059	0.858	1.323	0.018 4	1.059	0.858	1.323	0.018 4
1	1.029	0.829	1.116	0.018 0	1.080	0.402	0.640	0.018 1
2	0.976	0.804	1.021	0.017 3	0.950	0.196	0.370	0.017 0
3	0.903	0.772	0.858	0.016 4	0.686	—	0.171	0.013 7
4	0.880	0.746	0.771	0.016 2	0.084	—	—	0.006 2
5	0.679	0.513	0.671	0.013 6	—	—	—	—

1) 表3中儿茶素含量是根据儿茶素标准曲线计算所得,其余化合物含量由测得的峰面积表示并与儿茶素峰面积比较,“—”表示该化合物含量已低于高效液相色谱的最小检出限,表3中数据为3次测量结果的平均值。

从表3可以看出,经紫外照射,检测的3种主要化合物含量都有所下降,相对儿茶素而言,二聚体(第3天已检测不出)、表儿茶素(第4天已检测不出)下降最快,这可能表明二者在抗紫外辐射时要先于儿茶素被氧化,也说明了它们在紫外光照射下极不稳定。经过5 d照射,HPLC法已经检测不到这3种化合物了。可见,与对照样比较,紫外照射对这3种化合物的影响是比较明显的,第5天对照样儿茶素含量为最初的73.91%,紫外样已检测不出儿茶素。

2.3 紫外照射对原花色色素清除 DPPH 能力的影响

许多文献已报道原花色色素具有很强的抗氧化、清除自由基功效,根据上述实验结果原花色色素在紫外照射下不稳定,现监测其在紫外光下清除 DPPH 能力的变化(见图3)。

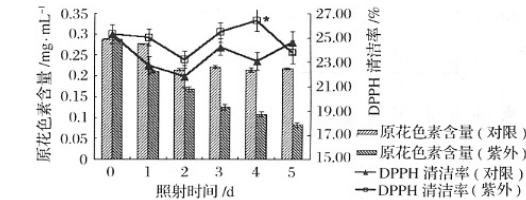


图3 五天内紫外照射下原花色色素含量及其 DPPH 清除率的变化

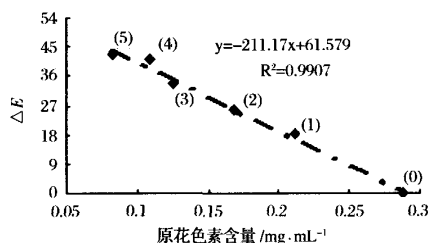
图3中“*”代表统计分析有显著性差异,其值为0.01 < P < 0.05

如图3所示,于紫外照射下原花色色素含量随时间延长下降非常明显,而 DPPH 清除率的测定表明,除

第4天(* 0.01 < P < 0.05)清除率紫外样与对照有显著差异外,其余4天 DPPH 清除率差异均无显著性(P > 0.05)。从这个结果可以看出,紫外照射对原花色色素的组成、结构有较大影响,而对其清除自由基活性的影响不大。台湾的 Duh 等人^[6]对花生壳甲醇萃取物(其中主要是多酚类物质)经紫外照射后进行抑制亚油酸过氧化活性的测定,测定结果同样表现不出显著性。通常认为氧化聚合对儿茶素类物质的活性不利,但近来诸多报道显示,经高温、光照、发酵等因素^[7]诱导此类物质氧化后,其仍具有很强的生理活性,甚至有些活性要强于未经诱导氧化的样品(如本实验第4天结果)。

根据以上结果推断,很可能原花色色素在紫外照射下被氧化聚合了(因为 HPLC 法检测不出聚合度更高的聚合物来,而经测定于紫外照射后样品于280nm处仍有较强吸收),另一方面,由于原花色色素含量有所下降,证明不只是简单的聚合反应,而很有可能转化为新一类化合物。在实验中发现随紫外照射,原花色色素溶液的颜色逐渐加深,为了进一步研究,本文对其色泽变化进行了测定(见图4)。

对5天紫外照射的原花色色素溶液色泽测定并绘制△E-原花色色素含量图,进行回归分析。从图4中结果看出,色泽变化与原花色色素含量呈明显的反相关(R² = 0.990 7),由此可以表明,原花色色素在紫外照射后至少生成了有色物质。1960年,Freudenberg与Weinges提出了原花色色素是指从植物中分离得到的



(0)~(5)分别表示实验进行的天数

图4 紫外照射对原花色素溶液色泽的影响

无色的、在热酸处理下能产生花色素的物质。很有可能,经紫外照射后原花色素同样转化为花色素,而花色素为有色物质且具有较强的抗氧化、清除自由基活性。

3 结 论

(1) 葡萄籽提取物原花色素在紫外照射下不稳定,但其经紫外照射后,仍具有较强的清除自由基能力。

(2) 原花色素经紫外照射后可能发生氧化聚合以及生成花色素等有色物质,使其溶液颜色加深,其具体的生成物与活性有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 国 植,徐 莉. 原花色素:具有广阔发展前景的植物药[J]. 国外医药(植物分册),1996,11(5):196~204
- 2 韩 菊,魏福祥. 葡萄籽中低聚原花色素的性能研究[J]. 食品科学,2003,24(2):36~38
- 3 Kurechi T, Kato T. Studies on the antioxidants: XI. oxidation products of concomitantly used butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene[J]. J Am Oil Chem Soc, 1980, 60:220~223
- 4 孙 芸. 硫酸-香草醛法测定葡萄籽原花青素含量[J]. 食品与发酵工业,2003, 29(9):43~46
- 5 凌关庭. 抗氧化食品与健康[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.344~345
- 6 Duh Pind, Yen Gowchin. Changes in antioxidant activity and components of methanolic extracts of peanut hulls irradiated with ultraviolet light[J]. Food Chemirrry,1995,54:127~131
- 7 Yen Gowchin, Chen Huiyin. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45:30~34

Influence of Components and Radical-scavenging Activity of Proanthocyanidins from Grape Seeds by UV Irradiation

Luo Guanzhong Zhang Zesheng

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Food Nutrition and Safety Key-Lab, Tianjin, 300222, China)

ABSTRACT The contents, scavenging DPPH activity and variations of the main kinds of components of proanthocyanidins from grape seeds after UV irradiation were investigated. During the 5-day irradiation, the contents of proanthocyanidins decreased significantly($p < 0.01$), and the three main kinds of components —the dimmer, epicatechin and catechin—were vanished in turn. However, the ratios of scavenging DPPH were not obviously different from the controls($p > 0.05$). Further research showed, after the UV irradiation the proanthocyanidins were probably polymerized and produced pigment such as anthocyanins, which will be investigated deeply in the future.

Key words proanthocyanidins, UV irradiation, free radicals

行业动态

西王集团公司 15 万 t 玉米油扩建项目全面展开

西王沙渥拉 15 万 t 玉米油扩建项目进展顺利,生产设备招标工作和厂房基础设施建议已全面展开。该项目总投资 6 800 万元,建设工期 100 天。它的建设将为今后西王沙渥拉合资公司打造全国最大的玉米油生产基地奠定坚实的基础。

苏北最大的氨基酸生产项目投产

总投资 6000 万元的苏北最大的氨基酸生产项目在苏北赣榆县连云港顺德生物工程有限公司正式投产,可年产多种氨基酸 1 500t,年产值 8 000 万元。主要产品有 L-胱氨酸、亮氨酸、L-酪氨酸、L-复合氨基酸粉,用于医药、食品、饲料添加剂等行业。产品将销往宁波、上海、湖北等地,并出口日本、美国、韩国等国家。