

文章编号:1673-1689(2006)02-0102-05

DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力

李春阳^{1,2}, 许时婴¹, 王璋¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江苏省农业科学院 农产品加工研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 通过 DPPH 法测定葡萄籽原花青素抗氧化、清除自由基能力, 实验表明: 随着葡萄籽原花青素纯化程度的提高, 其抗氧化、清除自由基的能力也相应地提高。葡萄籽原花青素纯化物的抗氧化、清除自由基能力大于 VC 和芦丁, 葡萄籽粗提物的抗氧化、清除自由基能力略低于 VC, 但高于芦丁。GSP、GSPP1、GSPP2、GSPP3、GSPP3-SP、VC、芦丁清除 DPPH 自由基的半抑制量分别为 118, 93, 88, 86, 63, 110, 170 g/kg, 其自由基清除能力 AE 分别为 0.84×10^{-2} 、 1.08×10^{-2} 、 1.14×10^{-2} 、 1.16×10^{-2} 、 1.58×10^{-2} 、 0.59×10^{-2} 、 0.59×10^{-2} 。

关键词: 葡萄籽; 原花青素; DPPH

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

Measuring the Antiradical Efficiency of Proanthocyanidin from Grape Seed by the DPPH · Assay

LI Chun-yang^{1,2}, XU Shi-ying¹, WANG Zhang¹

(1. School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Agricultural Products Processing Institute of Jiangsu Agricultural Academy, Nanjing 210014, China)

Abstract: The efficiency of antioxidant and antiradical of the proanthocyanidin extracted from grape seed was determined by the DPPH · assay. It was found that the efficiency increases with the purified degree of the proanthocyanidin from grape seed. The ability of antioxidant and antiradical of the proanthocyanidin from grape seed was greater than those of VC and rutin. The antioxidant and antiradical ability of GSP was slightly lower than those of VC, but higher than those of rutins. EC_{50} (50% the initial DPPH · concentration) of the GSP, GSPP1, GSPP2, GSPP3, GSPP3-SP, VC and rutin, was 118, 93, 88, 86, 63, 110, 170 g/kg DPPH · respectively, and the antiradical efficiency (AE) was 0.84×10^{-2} 、 1.08×10^{-2} 、 1.14×10^{-2} 、 1.16×10^{-2} 、 1.58×10^{-2} 、 0.59×10^{-2} 、 0.59×10^{-2} .

Key words: grape seed; proanthocyanidin; DPPH ·

开发和研制天然植物抗氧化剂, 消除氧自由基对机体的损害作用, 是目前医药和食品研究中的一个重点。流行病学研究发现, 欧美等发达国家的心脑血管发病率和死亡率都居世界首位, 而法国却与此相反^[1]。调查发现, 法国红葡萄酒消费量居世界

首位, 红葡萄酒中含有大量多酚类物质——原花青素, 它们可以有效地清除有害的氧自由基, 抑制红细胞膜和低密度脂蛋白脂质过氧化, 促进内皮细胞松弛因子的形成, 防止血小板凝聚, 防止心脑血管疾病^[2-4]。国内外研究表明^[5-8], 植物中的原花青

收稿日期: 2005-02-23; 修回日期: 2005-05-17.

作者简介: 李春阳(1966-), 男, 河北秦皇岛人, 食品科学与工程博士研究生。

素(也称缩合单宁)具有显著的抗氧化、抗基因突变、消炎、抑菌、清除超氧阴离子自由基、羟基自由基、减少脂质过氧化自由基、抑制脂质过氧化等作用。其作用机理主要是原花青素能够与自由基交换一个氢原子或电子,与欲清除的自由基有近似的氧化还原电位,生成的自由基通过离域化而稳定。由于原花青素分子结构上有多个酚羟基,它们可以与暂存性自由基(transient radical)结合,生成稳定的自由基(stable radical),整合启动脂质过氧化的金属离子,参与抗氧化的协同作用。通过终止自由基链式反应,螯合金属离子,清除活性氧(与封闭系统中的氧反应),原花青素可以减少或消除氧自由基对机体组织和器官的损害作用。关于葡萄籽原花青素清除自由基能力的测定已有一些报道^[9~11],作者用 DPPH 法测定葡萄籽原花青素抗氧化、清除自由基能力。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

葡萄籽原花青素:葡萄籽粉先经乙醇提取,然后用 HP-2MGL 大孔吸附树脂纯化制备;2,2-二苯基-1-苦味肼基自由基(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, free radical 简称 DPPH·);纯度>90%,美国 Sigma-Aldrich 公司产品;HP-2MGL 大孔吸附树脂:日本三菱株氏会社产品;SephadexLH-20:瑞士法玛西亚公司产品;维生素 C,芸香糖苷(芦丁):中国医药(集团)上海化学试剂有限公司产品;甲醇等试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 DPPH 法测定葡萄籽原花青素抗氧化、清除自由基的原理 二苯基苦味肼基自由基 [DPPH·] 是一种稳定的以氮为中心的自由基,在 515 nm 波长处有最大吸收。[DPPH·] 甲醇溶液呈紫色,其浓度与吸光度呈线性关系。在 [DPPH·] 甲醇溶液中加入葡萄籽原花青素后,原花青素可以与 [DPPH·] 自由基结合或发生替代,使 [DPPH·] 自由基数量减少,溶液颜色变浅,表现为:其在 515 nm 波长处的吸光度不断减小,直至达到稳定。因此,可以通过在 515 nm 波长处检测葡萄籽原花青素对 [DPPH·] 自由基的清除效果,计算其抗氧化能力。

1.2.2 标准曲线的制作 准确称取 [DPPH·] 2.5 mg,用甲醇定容到 100 mL,配制成质量浓度为 2.5×10^{-2} mg/mL 的标准溶液,置冰箱中保藏备用(现用现配)。分别取 0、2、4、6、8、10 mL 标准溶液,用

甲醇定容至 10 mL,最终质量浓度分别为 0、5、10、15、20、25 μ g/mL。

测定上述标准溶液在 515 nm 波长处的吸光度,制作标准曲线(见图 1)。其线性回归方程为:

$$Y = 0.022X - 0.0032, R^2 = 0.9997.$$

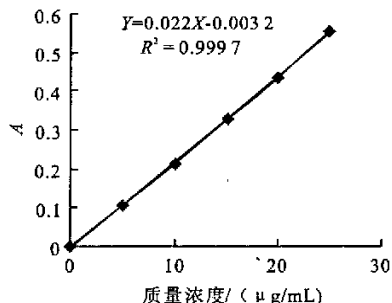


图 1 [DPPH·] 标准曲线

Fig. 1 The standard curve of [DPPH·]

1.2.3 葡萄籽原花青素分级提取 称取 1 000 g 真空干燥葡萄籽,粉碎成 40 目左右的粉末,用体积分数 70% 的乙醇溶液搅拌提取 3 次合并提取液,离心过滤,得澄清的滤液。滤液在 40℃ 以下减压浓缩,经喷雾干燥,得葡萄籽原花青素粗粉(Crude Grape Seed Proanthocyanidin, 简称 GSP)。称取一定量粗提物,用水溶解后,过滤,上 HP-2MGL 大孔吸附树脂柱,葡萄籽原花青素吸附在树脂柱上,用去离子水洗脱蛋白、糖等杂物后,依次用体积分数 30%、50%、70% 的乙醇洗脱,将洗脱液真空浓缩并冷冻干燥,分别得到葡萄籽原花青素纯化物 1、2、3 干粉(简称 GSPP1、GSPP2、GSPP3)。将 GSPP3 用甲醇溶液溶解,再用 Sephadex-LH20 吸附柱纯化,最后用体积分数 50% 的丙酮溶液洗脱,得到较纯的葡萄籽原花青素纯化物 4(简称 GSPP3-SP)。

1.2.4 自由基残留率的测定方法 葡萄籽原花青素对 [DPPH·] 自由基清除能力的测定参阅 Brand-William(1995)^[12]。取适量的葡萄籽原花青素分级产品,以维生素 C 和芦丁作对照。以甲醇为溶剂,配制不同浓度的葡萄籽原花青素,分别取 0.1 mL 样液,加入 3.9 mL 质量浓度为 25 mg/L [DPPH·] 标准液(现用现配),以甲醇替代样液为空白。将混合溶液摇匀,用比色皿,在 515 nm 波长处,测定其在不同时间的吸光度值,根据标准曲线可以换算成 [DPPH·] 的质量浓度,从而计算出 [DPPH·] 残留率。根据 [DPPH·] 残留率和相应的葡萄籽原花青素添加量,可以绘制原花青素清除 [DPPH·] 自由基的曲线。

1.2.5 半抑制量的计算和清除能力的评价 根据不同级葡萄籽原花青素的清除 [DPPH·] 自由

基的曲线,计算得到[DPPH·]的原始质量浓度减少至50%(稳定态)时葡萄籽原花青素的添加量(EC50),引用一个新的参数-自由基清除能力AE(Antiradical efficiency), $AE=1/EC_{50}$ 。根据AE的大小判断抗氧化剂清除自由基的能力的大小,AE越大其清除自由基能力越强。

2 结果与讨论

2.1 残留率和抗氧化剂半抑制量的计算

根据[DPPH·]的质量浓度与吸光度的关系曲线(见图1),可以将添加自由基清除剂后测得的吸光度换算为[DPPH·]的质量浓度,从而计算出添加自由基清除剂如葡萄籽原花青素、VC、芦丁后的[DPPH·]残留率,其计算公式如下:

$$[DPPH \cdot]_{REM} = [DPPH \cdot]_T / [DPPH \cdot]_{T=0} \times 100\%$$

其中[DPPH·]_T为自由基清除过程中某一时刻DPPH·的质量浓度,[DPPH·]_{T=0}为DPPH·的原始质量浓度。

根据抗氧化剂添加量与[DPPH·]残留率,制作二者的关系曲线,通过线性回归分析可以得到回归方程,根据回归方程式可以计算出[DPPH·]残

留率为50%时的抗氧化剂量即半抑制量。

2.2 不同级分葡萄籽原花青素清除自由基的能力比较

从图2~6可见,对于GSP来说,随着添加量的增加,[DPPH·]自由基残留率迅速降低,当GSP添加量从64 g/kg增大到256 g/kg时,[DPPH·]自由基残留率从71.37%降到8.86%,继续提高GSP加入量,[DPPH·]自由基残留率降低开始趋缓。当添加量增大到513 g/kg时,[DPPH·]自由基残留率稍有下降为8.14%,与添加量为256 g/kg时相差不大。这说明在添加GSP初始阶段(即反应初期),原花青素迅速与[DPPH·]自由基结合生成DPPH-PheO大量[DPPH·]被消耗,表现为[DPPH·]残留率迅速降低。当继续加入GSP,使[DPPH·]减少到一定程度,就会出现原花青素芳香环上的羟基和[DPPH·]相互竞争与PheO·结合生成PheO-PheO,从而抑制了原花青素与[DPPH·]自由基的结合,致使溶液中残留少量的[DPPH·]。比较图2~6,可以发现,随着葡萄籽原花青素纯化程度的提高,清除[DPPH·]自由基所需原花青素的量相应减少,抗氧化性增高。

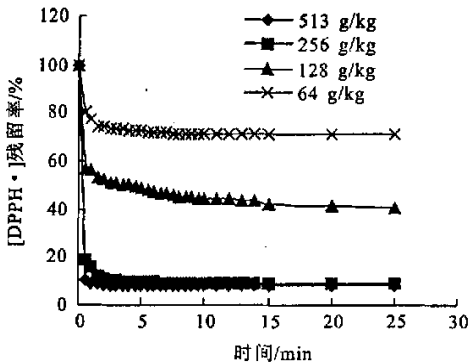


图2 葡萄籽GSP清除[DPPH·]曲线

Fig.2 The anti-DPPH· curve of GSP

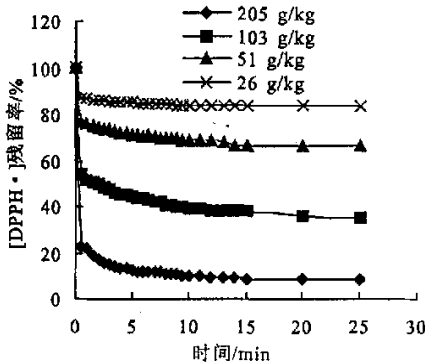


图3 葡萄籽GSPP1清除[DPPH·]曲线

Fig.3 The anti-DPPH· curve of GSPP1

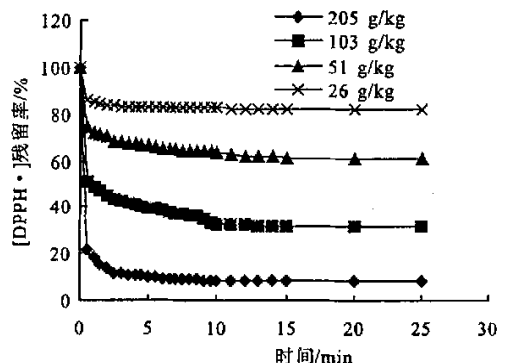


图4 葡萄籽GSPP2清除[DPPH·]曲线

Fig.4 The anti-DPPH· curve of GSPP2

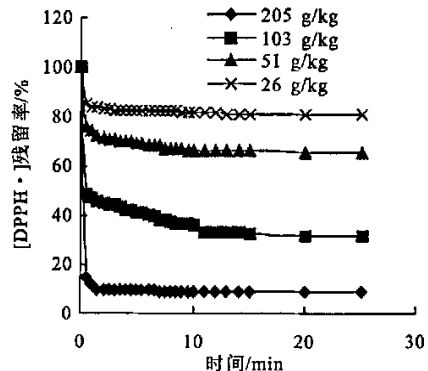


图5 葡萄籽GSPP3清除[DPPH·]曲线

Fig.5 The anti-DPPH· curve of GSPP3

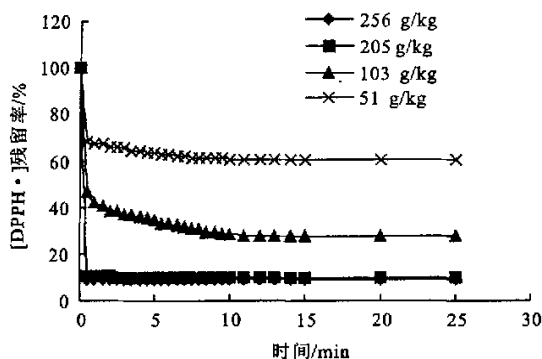


图 6 葡萄籽 GSPP3-SP 清除 [DPPH·] 曲线

Fig. 6 The anti-DPPH· curve of GSPP3-SP

2.3 葡萄籽原花青素同 VC 和芦丁的抗氧化速度比较

从图 7 可以看到, VC 清除自由基的速度很快, 为快速抗氧化剂。在 [DPPH·] 溶液中加入 VC 后, [DPPH·] 残留率迅速下降, 30 s 左右即达到稳定, 随着时间的延长 [DPPH·] 残留率变化很小。VC 加入量从 30 g/kg 增大到 240 g/kg 时, [DPPH·] 残留率下降幅度很大, 继续提高 VC 加入量, [DPPH·] 残留率下降幅度显著变小。而芦丁属于慢速抗氧化剂, 加入后 [DPPH·] 残留率在 3 min 左右才达到稳定(见图 8)。

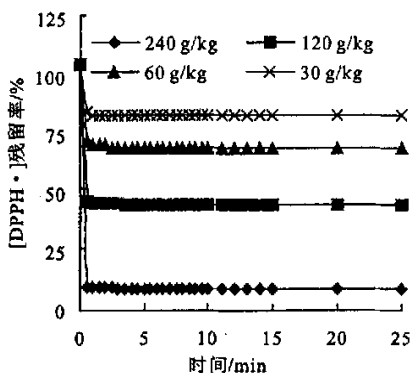


图 7 VC 清除 [DPPH·] 曲线

Fig. 7 The anti-DPPH· curve of VC

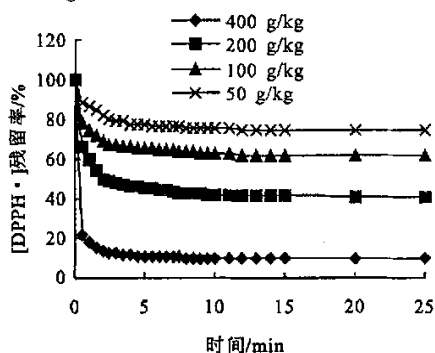


图 8 芦丁清除 [DPPH·] 曲线

Fig. 8 The anti-DPPH· curve of Rutin

由表 1 可知, 添加原花青素后, [DPPH·] 残留率达到稳定的时间处于 VC 与芦丁之间, 说明原花青素抗氧化速度略小于或接近于 VC, 远大于芦丁。

表 1 葡萄籽原花青素同 VC 和芦丁的抗氧化速度比较

Tab. 1 The antioxidant speed of GSP to that of Vitamin A and Rutin

抗氧化剂	添加量/(g/kg)	[DPPH·] 残留率达到稳定时的时间/min
葡萄籽原花青素	26~205	0.5~1.5(中速抗氧化剂)
VC	30~240	0.5~1(快速抗氧化剂)
芦丁	50~400	2~3(慢速抗氧化剂)

2.4 不同级分葡萄籽原花青素同 VC 和芦丁清除自由基的能力比较

根据图 2~8 各种抗氧化剂的自由基清除曲线(也称抗氧化曲线), 通过计算, 可以得到抗氧化剂质量分数与自由基残留率关系的线性回归方程, 并由此求出半抑制浓度 EC₅₀ 和自由基清除能力 AE。由表 2 可以看出, 清除自由基能力的大小顺序为: GSPP3-SP>GSPP3>GSPP2>GSPP1>VC>GSP>芦丁, 葡萄籽原花青素经纯化后, 纯化程度越高, 其抗氧化性、清除自由基能力越强。经纯化的葡萄籽原花青素抗氧化、清除自由基能力大于 VC 和芦丁, GSP 的抗氧化、清除自由基能力略低于 VC, 但高于芦丁。这主要是由于原花青素含有的酚羟基较多, 因此其终止自由基链式反应的效果比 VC 好。从原花青素和芦丁化学结构来看(见图 9), 由于芦丁 C 环 3 位 C 上的羟基与芸香糖结合成苷, 增加了其空间位阻, 结果使芦丁的抗氧化能力比原花青素低。

表 2 不同级分葡萄籽原花青素与 VC 和芦丁清除自由基能力的比较

Tab. 2 The antiradical efficiency of grape seed proanthocyanidin, Vitamin A, and Rutin

抗氧化剂	加入量与 [DPPH·] 残留率线性关系	半抑制量/(g/kg)	清除能力 (AE=1/EC ₅₀)
GSP	$Y = -0.3147x + 87.137$	118	0.84×10^{-2}
GSPP1	$Y = -0.4102x + 87.980$	93	1.08×10^{-2}
GSPP2	$Y = -0.3925x + 83.617$	88	1.14×10^{-2}
GSPP3	$Y = -0.3984x + 84.992$	86	1.16×10^{-2}
GSPP3-SP	$Y = -0.3084x + 69.368$	63	1.58×10^{-2}
VC	$Y = -0.3307x + 86.456$	110	0.91×10^{-2}
芦丁	$Y = -0.1800x + 80.578$	170	0.59×10^{-2}

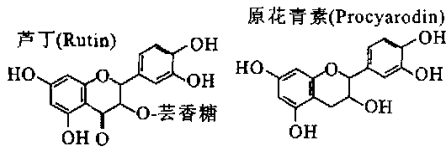


图9 芦丁和原花青素化学结构

Fig. 9 The chemical structure of Rutin and Procyanidin

Trolox 是一种水溶性较强同时在脂相中也有一定溶解度的合成抗氧化剂,分子结构与维生素 E 相类似。国际上^[13],天然抗氧化剂的抗氧化能力一般用 TECA (Trolox Equivalent Capacity of Antioxidant Activity) 值来表示,该数值越大,其抗氧化能力越强。TECA 值是指在一定条件下,1 mmol 待测物的抗氧化力相当于 Trolox 的浓度数^[14]。芦丁的 TECA (Trolox Equivalent Capacity of Antioxidant Activity) 值为 2.40 ± 0.06 , 而原花青素主要结构单位矢车菊素为 4.42 ± 0.12 , 因此原花青素对自由基的清除能力要比芦丁强,容易中断自由

基、终止链式反应^[15]。

3 结论

DPPH 法可以用于葡萄籽原花青素抗氧化能力的测定,并能很好地反映出不同级分原花青素与抗氧化剂对照物之间的抗氧化差别。

随着葡萄籽原花青素纯化程度的提高,其抗氧化、清除自由基的能力也相应地提高。葡萄籽原花青素抗氧化、清除自由基的能力大于 VC 和芦丁,葡萄籽粗提物抗氧化、清除自由基能力略低于 VC,但高于芦丁。

葡萄籽原花青素 GSP、GSPP1、GSPP2、GSPP3、GSPP3-SP、VC、芦丁清除 DPPH· 自由基 (2.5×10^{-2} mg/mL) 的半抑制量分别为 118, 93, 88, 86, 63, 110, 170 g/kg [DPPH·], 其自由基清除能力 AE 分别为 0.84×10^{-2} , 1.08×10^{-2} , 1.14×10^{-2} , 1.16×10^{-2} , 1.58×10^{-2} , 0.59×10^{-2} , 0.59×10^{-2} 。

参考文献:

- [1] Teresa Escribano-bailón, Yolanda Gutiérrez-Fernández. Characterization of procyanidins of vitis vinifera variety tina del pais grape seeds[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 1794-1799.
- [2] Jorge M, Ricardo Da Silva, Jacques Rigaud, et al. Procyanidin Dimers and Trimers from Grape Seeds[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 1259-1264.
- [3] Herbert Kolodziej. Procyanidins from medicinal birch: bonding patterns and sequence of units in triflavanoids of mixed stereochemistry[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 3487-3492.
- [4] Makoto saito, Hiroshi Hosoyama, et al. Antulcer activity of grape seed extracts and procyanidins[J]. *J Agril Food Chem*, 1998, 46: 1460-1464.
- [5] Tamura H, Yamagami A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat bailey a grape[J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(8): 1612-1615.
- [6] Jacob R A. The integrated antioxidant system[J]. *Nutr Res*, 1995, 15(5): 755-766.
- [7] Lee Y, Howard L R, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capiscum annum*) cultivars[J]. *J Food Sci*, 1995, 60(3): 473-476.
- [8] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(1): 27-32.
- [9] Yoshida T, Mori K, Hatano T, et al. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenol on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH·) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(7): 1919-1921.
- [10] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(6): 945-948.
- [11] Yen G, Hsieh P P. Antioxidant activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products[J]. *J Sci Food Agric*, 1995, 67(3): 415-420.
- [12] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *Lebensm Wiss Technol*, 1995, 28(1): 25-30.
- [13] Miller N J, Rice-Evans C. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. *Clin Sci*, 1993, 84: 407-402.
- [14] Rice-Evans C, Miller N J. Total antioxidant status in plasma and body fluids[J]. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 279-283.
- [15] 林亲录, 施兆鹏. 类黄酮与酚酸等天然抗氧化剂的结构与其抗氧化力的关系[J]. *食品科学*, 2001, (6): 85-91.

(责任编辑:朱明)