

莲子皮原花青素测定方法的研究

李绮丽¹, 吴卫国^{1,2}, 彭芳刚¹, 毛海峰³

(1. 湖南农业大学, 食品科技学院, 湖南长沙 410128) (2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128) (3. 湖南省粮油科学研究设计院, 湖南长沙 410128)

摘要: 采用以盐酸为香草醛法的介质测定莲子皮原花青素的含量, 考察了盐酸浓度、香草醛浓度、反应时间、反应温度、光照等因素对原花青素与香草醛显色反应的影响。结果表明, 香草醛-盐酸法测定莲子皮原花青素含量的适宜条件为: 0.5 mL 提取液, 3 mL 4% 香草醛的甲醇溶液以及 1.5 mL 浓盐酸的甲醇溶液, 混匀后于 30 °C 水浴保温 20 min 后即可测定 A₅₀₀。采用此法测定莲子皮原花青素的含量稳定性和重现性好, 方法回收率高。

关键词: 原花青素; 香草醛; 影响因素; 条件优化

文章编号: 1673-9078(2012)2-241-245

Determination of Proanthocyanidins Content in the Skin of Lotus

LI Qi-li¹, WU Wei-guo^{1,2}, PENG Fang-gang¹, MAO Hai-feng³

(1. College of Food Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

(2. Hunan Provincial Key Lab of Food Science and Bio-technology, Changsha 410128, China)

(3. Hunan Scientific Research and Design Institute, Changsha 410128, China)

Abstract: Vanillin assay was carried out in HCl medium to determine the content of proanthocyanidins in the skin of lotus extract. Several parameters affecting the precision and accuracy of vanillin assay including HCl concentration, vanillin concentration, reaction time, reaction temperature, and sunlight were studied. The results showed that the proper reaction conditions were as the following: the medium comprised of 0.5 mL of sample, 3 mL of 4% vanillin solution in methanol, and 1.5 mL of concentrated HCl in methanol, and the reaction was carried out at 30 °C for 20 min (measured at 500 nm). Assessment of the method by statistics showed that the method had high stability, reproduction, and recovery.

Key words: proanthocyanidins; vanillin assay; affecting factors; conditions optimization

聚黄烷醇类多酚, 又称原花青素, 具有 C₆-C₃-C₆ 的结构特征, 它包括单体原花青素和聚合体原花青素。通常将聚合度较低的二-四聚体称低聚原花青素或寡聚原花青素(oligomeric proanthocyanidins, 简称 OPC), 五聚体及以上则称为高聚原花青素或多聚原花青素(polymeric proanthocyanidins, 简称 PPC)。原花青素(proanthocyanidin, PC)是很有利用价值的天然产物。随着对植物原花青素的结构、性质、生理活性及其应用价值的深入研究, 它所具有的清除自由基、抗氧化^[1]、抗病毒^[2]、抗细菌^[3,5]和抑制肿瘤^[6]等多种生物活性为大量实验所证实。因此, 从不同植物中提取分离原花青素, 并进行精细化利用的研究引起了人们广泛的关注。

莲子作为传统已开拓的中药材已为人所熟知, 在

收稿日期: 2011-11-15

作者简介: 李绮丽(1986-), 女, 博士研究生, 研究方向为园艺产品采后科学与技术

通讯作者: 吴卫国(1968-), 男, 博导, 研究方向为食品科学

中医处方上, 莲子通常称为莲肉。古人说, 吃莲子能返老还童、长生不老。通过对莲的初步成分分析, 发现莲子表皮富含原花青素, 而原花青素具有的抗氧化等功能活性可能是莲子具有药用价值的主要原因之一, 因此, 若能从莲子表皮中提取分离原花青素, 并开展应用研究将是一项非常有意义的工作。

目前, 对于原花青素的测定, 国内外常用的方法有铁盐催化比色法^[7]、HPLC 法^[8]、香草醛-盐酸法^[9]、香草醛-硫酸法^[10]和正丁醇-盐酸法^[11]等。铁盐催化比色法是由 Swain 和 Hillis^[12]于 1959 年提出的, 其反应的特征性显著, 并且操作简便, 但是测定结果的重现性较差。香草醛法较正丁醇法而言, 对缩合单宁的选择性虽然不是很好, 但是其吸光值较后者高 10~20 倍, 非常灵敏; 正丁醇法受多酚分子结构影响太大, 因此在缩合单宁含量低的样品测定中选用香草醛法为最好。鲍俊竹等^[13]发现用 3 种不同方法所得到的标准曲线, 对葡萄籽提取物样品中原花青素含量的测定及比较可看出, 香草醛-盐酸法所得到的含量精确度较高,

主要是因为原花青素的结构体、儿茶素或表儿茶素及其低聚体均参加反应;正丁醇-盐酸法中,其对儿茶素等单体不反应,而且对原花青素的高聚体的反应也不是很完全;香草醛-硫酸法中硫酸加入时会产生很高的热量,从而使原花青素氧化分解,造成测量结果偏低。

香草醛法的原理在于原花青素在酸性条件下,由于黄烷-3-醇单体的A环有较高的化学活性,其上的间苯三酚或间苯二酚与香草醛发生缩合,产物在浓酸作用下就会形成有色的正碳离子。采用分光光度法测其吸光度,然后根据标准曲线来计算样品中原花青素的含量,一般以儿茶素作为标准品。

目前,已有采用香草醛-盐酸法测定葡萄籽中原花青素的含量^[4],但葡萄籽的来源不同,会导致所用盐酸、香草醛的浓度、显色时间、温度也不同。因此对于原花青素的测定,目前还无国标进行统一规定。国内运用此法对莲子中原花青素的测定尚无先例,故本文在前人对葡萄、高粱的原花青素测定方法的基础上,对莲子原花青素的测定方法需进行改进。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

原花青素,化学标准品,天津晶纯实业有限公司;自制莲子皮原花青素提取物;甲醇,浓盐酸,香草醛均为分析纯;UV-754紫外可见分光光度计;恒温水浴锅。

1.2 实验方法

1.2.1 最大吸收波长的确定

取0.5 mL浓度为0.4 mg/mL莲子皮原花青素提取物和原花青素标样的水溶液,加入3 mL 4%香草醛甲醇溶液和1.5 mL浓盐酸,30℃水浴20 min后,在紫外可见光区进行扫描,确定反应体系的最大吸收波长。

1.2.2 香草醛/盐酸比色法测定的影响因素

参照1.2.1的反应体系,探讨香草醛浓度(2%、4%、6%、8%、10%)、盐酸浓度(20、40、60、80、100%)、反应时间(15、25、35、45、55 min)、反应温度(20℃、30℃、40℃、50℃、60℃)对原花青素与香草醛反应吸光度的影响。

光照影响的测定按照最佳实验条件,在避光与不避光条件下在10 min、20 min、30 min、40 min、50 min测定0.4 mg/mL的莲子皮原花青素提取物和原花青素标样的水溶液与香草醛反应的吸光度。

1.2.3 优化方法的评价

1.2.3.1 标准曲线

配制0.04~0.40 mg/mL的原花青素水溶液,于比色管中分别加入0.5 mL浓度为0.04、0.08、0.16、0.24、

0.32、0.40 mg/mL原花青素水溶液、3 mL 4%香草醛的甲醇溶液以及1.5 mL浓盐酸,混匀后于30℃水浴保温20 min后测定A₅₀₀,绘制标准曲线。

1.2.3.2 测定方法的精密度测试:

(1)重复性试验:准确配制浓度为0.04 mg/mL和0.40 mg/mL的莲子皮原花青素提取物的水溶液,于比色管中加入0.5 mL该溶液、3 mL 4%香草醛的甲醇溶液以及1.5 mL浓盐酸,混匀后于30℃水浴保温20 min后测定A₅₀₀,共测定5次。此测定在相同条件下,由一个分析人员独立完成。

(2)中间精密度试验:在同一个实验室,不同时间由不同分析人员用不同设备按照(1)的方法进行测定,测定5次,测定结果之间的精密度,称为中间精密度。

(3)重现性试验:在不同实验室由不同分析人员按照(1)的方法进行测定,测定5次,测定结果之间的精密度,称为重现性。

测定方法的回收率:取20 mg的莲子皮原花青素粗提物定容到50 mL。吸取0.5 mL此溶液按照确定的方法测定其原花青素的含量,重复测定5次。再加入配制的0.4 mg/mL的儿茶素标准溶液0.5 mL,按照同样的方法测定混合后的原花青素总含量。计算回收率。

2 结果与amp;讨论

2.1 反应条件的选择

2.1.1 光照的影响

0.5 mL 0.4 mg/mL的样品水溶液加3 mL 4%香草醛/甲醇加1.5 mL浓盐酸,30℃温度下反应20 min后测定A₅₀₀。分别在避光、不避光条件下进行试验,检测原花青素标准品与莲子皮原花青素提取物与香草醛的反应有没有受光照的影响。

表1 光照对原花青素测定的影响

Table 1 Effect of Light on the determination results of proanthocyanidins

时间/min	10	20	30	40	50	m±SD
标样避光 A1	0.280	0.283	0.281	0.278	0.277	0.280±0.002
标样不避光 A2	0.278	0.281	0.283	0.281	0.278	0.280±0.002
提取物避光 A3	0.186	0.188	0.186	0.183	0.183	0.185±0.002
提取物不避光 A4	0.185	0.187	0.189	0.186	0.182	0.185±0.003

由上表来看,反应在避光与不避光的条件下,对数据做差异性分析表明,两者差异不显著(P<0.05)。只是在不避光的条件下反应比避光时更快,故能更快的达到最大吸光度。而避光条件下也能反应完全并达到最大吸光度,只是时间会稍微推迟。由此可见,光照对于原花青素与香草醛的反应影响并不明显。为了

检测方便, 接下来的试验均在不避光的条件下进行。

2.1.2 最大吸收波长的确定

一般而言, 原花青素可与香草醛反应生成红色的络合物, 其最大吸收波长一般位于 490~510nm 之间。但不同结构的单宁与香草醛反应的动力学及形成产物结构不同, 因此产物的最大吸收波长也不尽相同。为了确定比色的最大吸收波长, 本文将莲子皮原花青素提取物在香草醛-盐酸溶液中显色, 并在 UV-754 紫外可见分光光度计上进行了 400~600 范围内的扫描, 结果如图 1 所示。

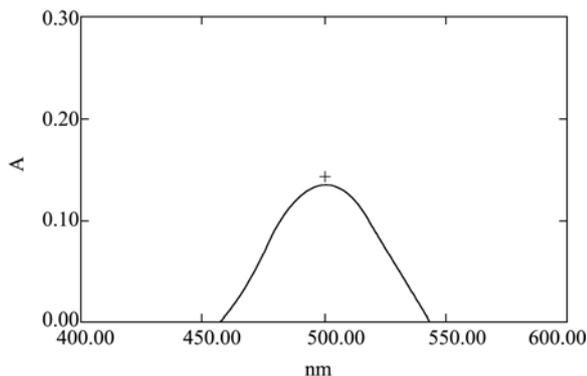


图 1 莲子皮原花青素紫外波长扫描图

Fig.1 The UV wavelength scanning diagram of proanthocyanidins in the skin of Lotus

由图 1 可知, 莲子皮原花青素与香草醛反应产物最大吸收波长为 500 nm, 因此将香草醛硫酸显色法的测定波长确定为 500 nm。

2.1.3 香草醛的浓度

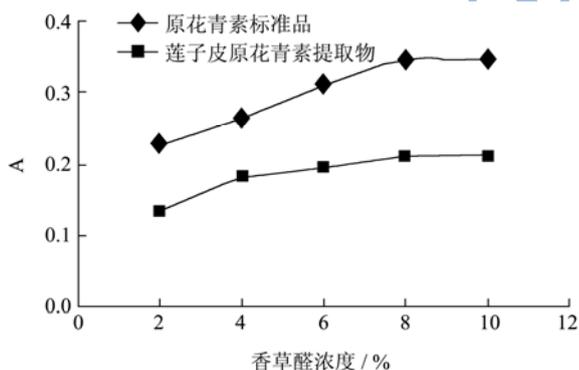


图 2 香草醛浓度对原花青素测定的影响

Fig.2 Effect of vanillin on the determination results of proanthocyanidins

0.5 mL 0.4 mg/mL 的样品水溶液, 采用 2%、4%、6%、8%、10% 香草醛/甲醇 3 mL, 浓盐酸 1.5 mL, 30 °C 下反应 20 min, 测定 A₅₀₀, 考察不同香草醛浓度对反应的影响, 结果如图 2 所示。

图 2 结果表明, 随着香草醛浓度的增加, 反应吸光度也在不断增加。但当空白管中香草醛浓度超过 4% 以后, 与浓盐酸结合溶液会变为黄绿色。据推断可能

是由于在酸性溶液中香草醛易发生自身缩合反应而使呈色不稳定, 故过高的香草醛浓度应避免。因此在保证反应能充分进行达到最大吸光度的前提下, 又不能使香草醛发生自缩合反应, 故香草醛的浓度选择为 4%。另通过试验发现, 现配的香草醛溶液与放置一天的香草醛与原花青素反应, 吸光度值差别比较大, 故在测定中要用现配香草醛甲醇溶液。

2.1.4 盐酸的浓度

取 0.5 mL 浓度为 0.4 mg/mL 莲子皮原花青素提取物的水溶液, 加入 3 mL 4% 香草醛甲醇溶液分别和 1.5 mL 盐酸质量分数分别为 20%、40%、60%、80%、100% 进行反应, 30 °C 水浴 20 min, 研究不同盐酸质量分数对反应的影响, 结果如图 3 所示。

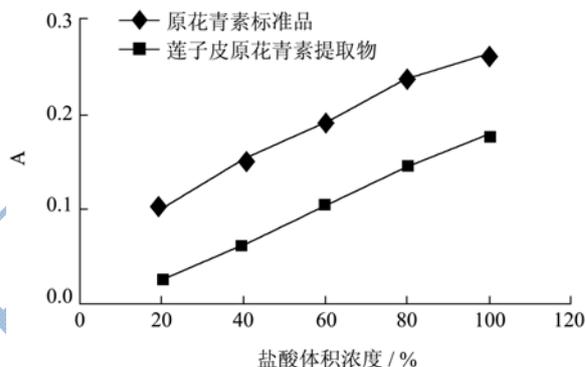


图 3 盐酸体积浓度对原花青素测定的影响

Fig.3 Effect of HCl on the determination results of proanthocyanidins

由图 3 可知, 盐酸体积浓度对反应吸光度有很大影响, 随着盐酸浓度增高, 反应越灵敏。故在保证与 4% 的香草醛不发生自缩合反应导致溶液颜色呈现黄绿色的前提下, 选择浓盐酸 100% 进行反应为最佳条件。

2.1.5 时间与温度

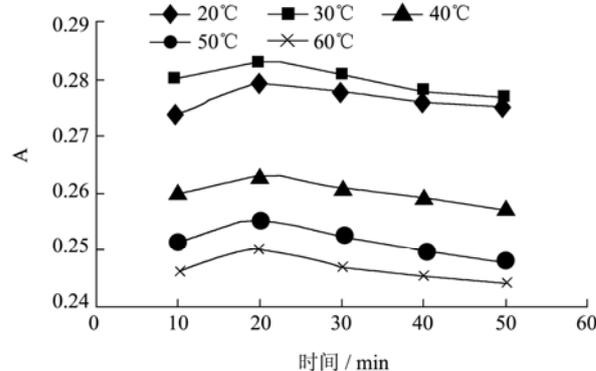


图 4 温度、时间对原花青素标准测定的影响

Fig.4 Effect of temperature and time on the determination results of proanthocyanidins standard

取 0.5 mL 浓度为 0.4 mg/mL 莲子皮原花青素水溶液和原花青素标准品溶液, 加入 3 mL 4% 香草醛甲醇

溶液和 1.5 mL 浓盐酸, 分别在 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 分别水浴 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min, 研究不同反应时间和反应温度对香草醛与原花青素反应的影响, 结果如图 4、5 所示。

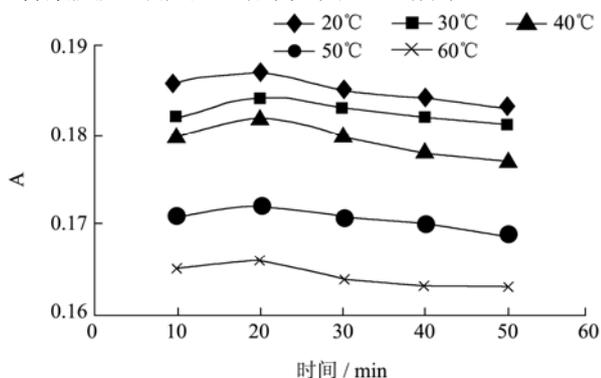


图5 温度、时间对原花青素提取物测定的影响

Fig.5 Effect of temperature and time on the determination of proanthocyanidins

由图 4、5 可知, 总的来说, 反应时间对反应吸光度的影响不大。在 20 min 左右, 吸光度趋于最大值, 之后随着反应时间的延长吸光值开始下降。下降的原因可能是因为反应生成的有色物质不稳定, 随着时间的延长又发生了可逆反应。依据上述结果, 本实验选择测定时间为 20 min。

吸光度值随温度的变化可看出, 温度在 20~30°C 之间, 随着温度的上升, 吸光值也在增加; 而 30~60°C 范围内, 吸光度持续下降。分析原因, 可能是因为温度的升高影响了黄烷-3-醇单体的 A 环的化学活性, 干扰了其上的间苯三酚或间苯二酚与香草醛发生缩合, 因此反应不充分, 吸光度值偏低。故本实验选择温度为 30 °C 作为测定的反应温度。

2.2 方法评价

2.2.1 曲线关系考察

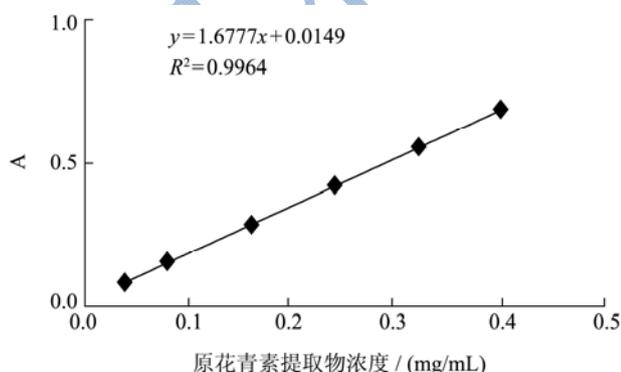


图6 莲子皮原花青素标准曲线

Fig.6 Calibration curves of proanthocyanidins in the skin of Lotus

取 20 mg 莲子皮原花青素粗提物, 用蒸馏水定容至 50 mL 容量瓶中, 得 0.4 mg/mL 的原花青素溶液。

分别吸取溶液 1、2、4、6、8 mL 定容至 10 mL, 制成浓度为 0.04、0.08、0.16、0.24、0.32、0.4 mg/mL 的标准系列, 取 0.5 mL 原花青素溶液, 加入 3 mL 4% 的香草醛甲醇溶液, 1.5 mL 浓盐酸, 立即充分混匀, 30 °C 显色 20 min, 测定 A₅₀₀ 并绘制标准曲线见图 6。线性方程为: $Y=1.6777X+0.0149$, $R^2=0.9964$, 具有很好的线性关系。其中 X 为浓度 (mg/mL), Y 为吸光度。

2.2.2 精密度测试

2.2.2.1 重复性试验

将莲子皮原花青素提取物配制成 0.04 mg/mL 和 0.4 mg/mL 的水溶液, 按照最佳实验条件平行测定 5 次 A₅₀₀, 求出变异系数, 结果见表 2。

表2 重复性试验中原花青素吸光度值

Table 2 The absorbance of proanthocyanidins in repeated tests

浓度/(mg/mL)	0.04	0.4
吸光度 A1	0.074	0.444
吸光度 A2	0.072	0.442
吸光度 A3	0.072	0.444
吸光度 A4	0.073	0.442
吸光度 A5	0.073	0.443
平均值	0.073	0.443
标准偏差	0.0009	0.0010
变异系数/%	1.2	0.2

由表 2 可知, 该实验方法吸光度的标准偏差分别为 0.0009 和 0.0010, 变异系数为 1.2% 和 0.2%; 呈现出良好的重现性和稳定性。

2.2.2.2 中间精密度

表3 中间精密度试验中原花青素吸光度值

Table 3 The absorbance of proanthocyanidins in intermediate precision tests

浓度/(mg/mL)	0.04	0.4
吸光度 A1	0.071	0.440
吸光度 A2	0.073	0.441
吸光度 A3	0.072	0.440
吸光度 A4	0.070	0.439
吸光度 A5	0.074	0.443
平均值	0.072	0.441
标准偏差	0.0016	0.0016
变异系数/%	2.2	0.3

将莲子皮原花青素提取物配制成 0.04 mg/mL 和 0.4 mg/mL 的水溶液, 按照最佳实验条件平行测定 5 次 A₅₀₀, 求出变异系数, 结果见表 3。

由表 3 可知, 该实验方法吸光度的标准偏差分别为 0.0016 和 0.0016, 变异系数为 2.2% 和 0.3%; 表明

重现性和稳定性良好。

2.2.2.3 重现性

将莲子皮原花青素提取物配制成 0.04 mg/mL 和 0.4 mg/mL 的水溶液,按照最佳实验条件平行测定 5 次 A_{500} ,求出变异系数,结果见表 4。

表 4 重现性试验中原花青素吸光度值

Table 4 The absorbance of proanthocyanidins in reproducible tests

浓度/(mg/mL)	0.04	0.4
吸光度 A1	0.070	0.440
吸光度 A2	0.071	0.443
吸光度 A3	0.075	0.445
吸光度 A4	0.072	0.442
吸光度 A5	0.071	0.441
平均值	0.072	0.443
标准差	0.0019	0.0021
变异系数/%	2.6	0.5

由表 4 可知,该实验方法的变异系数分别为 2.6% 和 0.5%;呈现出良好的重现性和稳定性。

2.2.2.4 加标回收率测定

取 20 mg 的莲子皮原花青素粗提物定容到 50 mL。吸取 0.5 mL 此溶液按照确定的方法测定其原花青素的含量,重复测定 5 次。再加入配制的 0.4 mg/mL 的儿茶素标准溶液 0.5 mL,按照同样的方法测定混合后的原花青素总含量。计算加标回收率。结果见表 5。

表 5 同一添加量样品原花青素的回收率

Table 5 The recovery from sample of proanthocyanidins

原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率/%	平均值	变异系数%
0.117	0.2	0.336	109.5		
0.117	0.2	0.330	106.5		
0.117	0.2	0.333	108	107.8	1.06
0.117	0.2	0.331	107		
0.117	0.2	0.333	108		

由表 5 可知,该方法的变异系数仅为 1.06%,具有较高的回收率 107.8%。

3 结论

本实验采用香草醛/盐酸比色法测定莲子皮原花青素的含量,探讨了对莲子皮原花青素与香草醛反应灵敏度的影响因素,得出如下结论:盐酸-香草醛法测定原花青素含量的最佳条件为:0.5 mL 提取液,3 mL 4% 香草醛的甲醇溶液以及 1.5 mL 浓盐酸,混匀后于

30 °C 水浴保温 20 min 后测定 A_{500} ;在实验过程中光照对该实验影响不大;但香草醛甲醇溶液一定要现配。优化后的香草醛/盐酸法用于测定莲子皮中原花青素含量,其稳定性和重现性好,回收率高。

参考文献:

- [1] Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, et al. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavanols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds [J]. *Agri Food Chem*, 2000, 48(5): 1738-1745
- [2] 彭慧琴,蔡卫民,项哨.茶多酚体外抗流感病毒 A3 的作用[J]. *茶叶科学*,2003,23(1):79-81
- [3] 董金莆,李瑶卿,洪绍梅.茶多酚对 8 种致病菌最低抑制浓度的研究[J]. *食品科学*,1995,16(1):6-12
- [4] 戚向阳.苹果多酚抑菌作用的研究[J]. *食品科学*,2003,24(5): 33-36
- [5] 唐裕芳,张妙.茶多酚的抑菌活性研究[J]. *浙江林学院学报*,2005,22(5):553-557
- [6] Joshi S S. Cytotoxicity of a novel grape seed proanthocyanidins extract against elected human cancer cells [J]. *Second International conference on Natural Antioxidant and Disease*, 1998, 6: 24-27
- [7] David M M, Malcom R S. *Analyst*, 1994, 119(5): 863-868
- [8] Yanagida A, Kanda T Setal. *Journal of Chromatography A*, 1999, 855(1): 181-190
- [9] 李春阳,许时婴,王璋.香草醛-盐酸法测定葡萄籽梗中原花青素含量的研究[J]. *食品科学*,2004,25(2):157-161
- [10] 杨依姗,李春美,陈美红.香草醛-硫酸法测定柿子单宁含量条件的优化[J]. *食品科技*,2010,35(12):267-272
- [11] Richard M W, Thomas H T, James P M. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis [J]. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2008, 88(6): 1060-1067
- [12] Swain T, Hillis W E. *Journal of Sci Food Agric.*, 1959, 10: 63
- [13] 鲍俊竹,陈月坤,徐桂花.测定葡萄籽提取物中原花青素含量的方法[J]. *农业科学研究*,2005,26(1):43-46
- [14] 张晓燕,杨宜婷,刘硕.复合多糖胶囊中原花青素含量测定方法的研究[J]. *现代食品科技*,2011,27(10):1288-1290