

对-二甲基氨基肉桂醛法测定山竹原花青素

黄雪松, 黄文烨

(暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要: 介绍了以对-二甲基氨基肉桂醛 (DMAC) 为显色剂测定原花青素含量的分光光度法, 并测定了山竹果皮、花萼和果肉中原花青素的含量。DMAC 溶液与儿茶酚反应后 60 min 内吸光度测定显示, 两者形成的缩合物吸光度在 15~35 min 内比较稳定, 适宜测量。DMAC 溶液配制后, -18 ℃ 暗处保存 2 d、6 d 后使用与当天使用的测定结果有明显差异, 因此建议当天配制使用。另外, 香草醛法与 DMAC 法进行了比较分析, DMAC 法测定的山竹原花青素含量低, 但其灵敏性远高于香草醛法。实验测得, 以儿茶酚为标准品得到的线性方程为 $y = 0.0937x - 0.0029$ ($R^2 = 0.9993$); 山竹中果皮、花萼和果肉中原花青素的含量分别为: 4.23 ± 0.24 mg/g, 0.85 ± 0.02 mg/g, 0.53 ± 0.03 mg/g (以儿茶酚计)。

关键词: 对-二甲基氨基肉桂醛; 原花青素; 多酚化合物; 植物提取物; 山竹; 分光光度法

文章编号: 1673-9078(2013)7-1687-1690

Determination of Proanthocyanidins in Mangosteen by 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde Assay

HUANG Xue-song, HUANG Wen-Ye

(Department of Food Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 4-(Dimethylamino)cinnamaldehyde (DMAC) was introduced as a chromogenic agent to determine proanthocyanidins by spectrophotometry, and the content of proanthocyanidins in rind, calyx lobes and aril of mangosteen were detected by DMAC assay. The condensation compound of DMAC and catechin was stable and can be measured in 15~35 min after reaction, while DMAC solution is suggested to be used fresh daily. Vanillin assay was also conducted in determining mangosteen proanthocyanidins, which showed a higher content but less sensitivity compared with DMAC assay. The standard curve was $y = 0.0937x - 0.0029$ ($R^2 = 0.9993$) in DMAC assay. Proanthocyanidins content in rind, calyx lobes and aril of fresh mangosteen were 4.23 ± 0.24 mg/g, 0.85 ± 0.02 mg/g and 0.53 ± 0.03 mg/g, respectively, using catechin as standard.

Key words: 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde; proanthocyanidins; polyphenolic compounds; plant extracts; *Garcinia mangostana* L.; spectrophotometry

山竹(*Garcinia mangostana* L.), 原名莽吉柿, 属藤黄科藤黄属, 是一种原产于马来半岛和马来群岛的热带水果, 东南亚地区栽培较多, 我国云南、广西、广东和福建等地已大力发展种植。山竹甜酸适口、风味鲜美、回味无穷, 有热带“果后”的美称^[1]。山竹果皮有较好的保健、药用价值, 如泰国民间一直用于治疗腹泻、痢疾、伤口处理和皮肤感染等^[2~3]。这些保健与药用活性, 除与其所含有的单宁、氧杂蒽酮类化合物^[4]有关外, 还与其所含有的原花青素类 (Proanthocyanidins) 物质有直接或间接的关系。现代研究证实: 原花青素有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、保

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAD031B03)

作者简介: 黄雪松 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为功能食品与食品安全; 黄文烨 (1992-), 女, 本科生, 研究方向为食品质量与安全

护心血管、降压、抗炎等多种生物活性^[5], 可广泛用于保健食品生产中。因此, 快速、准确、有效地测定保健食品中原花青素的含量是检测、控制其活性与质量的前提。

原花青素是以黄烷-3-醇、黄烷-4-醇、黄烷-3, 4-二醇等为单体聚合而成的、在酸性条件下加热产生花青素的一类聚合物, 其聚合度大小不一; 化学性质活泼而难以测定^[6]。测定原花青素的方法虽多, 但均不完美, 各有其优缺点。如正丁醇-盐酸法和盐酸/醋酸/硫酸-香草醛法, 速度快但专一性差; 高效液相色谱法 (HPLC)、凝胶渗透色谱^[7]和 MALDI-TOF-MS (基质辅助激光解析电离飞行时间质谱)^[8~9]等专一性较好, 但速度慢、成本高或需要专门的仪器设备。我国国标使用的是正丁醇-盐酸法和 HPLC 两种相结合的方法^[10]。DMAC[对-二甲基氨基肉桂醛, 4-(Dimethylamino)

cinnamaldehyde]法 (其反应机理见图 1) 速度快且专一性较强, 其灵敏度是香草醛法的五倍, 很少受到花青素等多酚物质的干扰^[11-12]。而且作为法国蔓越橘 (Cranberry) 饮料、饮料浓缩粉末, 蔓越橘饮料鸡尾酒和鲜冻蔓越橘等声称有抗菌粘附性活性的原花青素含量的 AFSSA (法国食品卫生安全署, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) 权威检测方法^[13]。但还未见到国内用 DMAC 测定原花青素的报道。另外, 山竹中含有组成山竹原花青素的儿茶素类单体, 因此, 本文中的两种方法测定的原花青素含量为原花青素及儿茶素类单体物质的总含量。本文以山竹为样品, 以香草醛-盐酸法作参比, 探讨 DMAC 法测定原花青素的可行性。

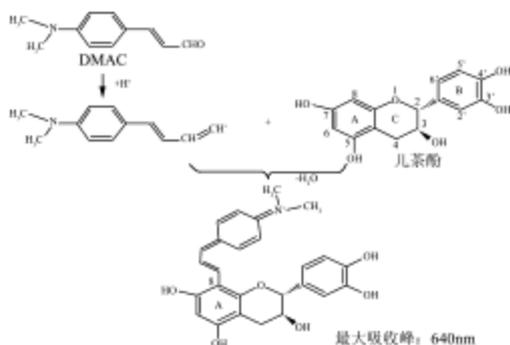


图 1 儿茶酚与 DMAC 的缩合反应

Fig.1 Condensation of catechin with 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde (DMAC)

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器设备

山竹购自广州市石牌美化超市。取其果皮、花萼和果肉。果皮和花萼加水打浆, 与果肉 (未处理) 共同放入 -70 °C 超低温冰箱冷冻 24 h 后, 于冷冻干燥机中冻干, 粉碎, 得到山竹果皮、花萼和果肉粉末。(+) -儿茶酚 (HPLC ≥ 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 对-二甲基氨基肉桂醛 (98%, 阿拉丁)。乙醇 (98% 食用酒精); 香草醛; 盐酸 (37%); 冰醋酸, 均为分析纯。实验用水皆为蒸馏水。

瑞利紫外/可见分光光度计 UV-9600; REVC0 超低温冰箱; 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; HH-4 恒温水浴锅, 江苏金坛市宏华仪器厂; KDC-1044 低速离心机, 科大创新股份有限公司中佳分公司。

1.2 实验方法

1.2.1 儿茶酚标准溶液的配制

乙醇溶解 0.0100 ± 0.0001 g 儿茶酚粉末, 稀释至 3、4、5、6、7 mg/L 和 100、150、200、250 mg/L, 分别

作为 DMAC 法和香草醛法的标准溶液。

1.2.2 DMAC 法

① DMAC 溶液的配制: 酸-水-乙醇以 25:25:150 (V/V) 的比例配制成酸性乙醇, 将 0.1% (m/V) 的 DMAC 粉末溶解于酸性乙醇中得到 DMAC 溶液^[13]。当天使用。

② 测定: 向比色皿中以 1:3 (V/V) 的比例加入标准溶液或原花青素提取液和 DMAC 溶液, 在 640 nm 的波长下进行测量。

1.2.3 香草醛-盐酸法

① 香草醛溶液的配制: 甲醇溶解香草醛粉末, 配制成质量分数为 4% 的香草醛-甲醇溶液。

② 测定: 3.0 mL 香草醛-甲醛溶液, 1.5 mL 盐酸和 0.5 mL 标准溶液或原花青素提取液在 30 ± 1 °C 恒温避光的条件下反应 15 min, 在 500 nm 波长下比色。

1.2.4 原花青素提取液的制备与测定

分别取 0.5 g 果皮、花萼和果肉粉末, 用丙酮-水-醋酸 (150:49:1, V/V/V) 溶液定容至 10 mL。20 °C 超声波处理 30 min; 20 °C 振荡 1 h; 3100 r/min 离心 10 min^[14]。取上清液, 并作一定比例稀释, 得到原花青素提取液。用 DMAC 法和香草醛法测定原花青素含量。

1.2.5 原花青素含量计算式

$$\text{原花青素含量 (mg/g)} = [C \times D \times V] / [1000 \times S]$$

注: C 为样品提取液中原花青素的浓度 (mg/L); D 为提取液稀释倍数; V 为提取液体积 (mL); S 为样品质量 (g)。

2 结果与讨论

2.1 DMAC 与儿茶酚衍生化反应的适宜时间

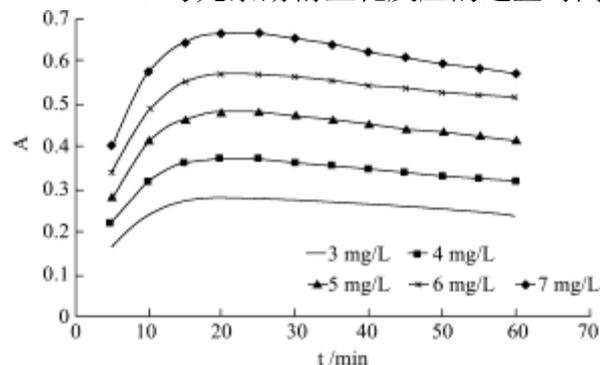


图 2 吸光度随时间变化曲线

Fig.2 Curve of absorbance of catechol

图 2 所示为 60 min 内不同浓度儿茶酚吸光度随时间变化曲线。可以看出: 在 15~35 min 内, 吸光度大小波动比较小。15~35 min 间测定其与 DMAC 衍生物的吸光度能得到比较稳定的数据。因此, DMAC 法测定山竹等食品中的原花青素时, 应当于衍生化反应后

的 15~35 min 间进行测定。在后续实验中均取衍生化反应 15~35 min 间的平均数据。

2.2 DMAC 溶液的稳定性

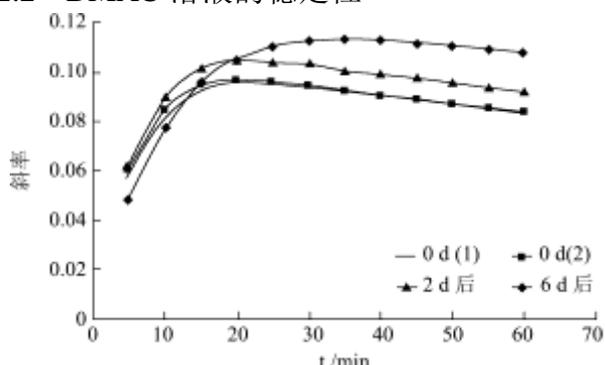


图 3 DMAC 溶液在不同保存时间下的斜率-时间变化曲线

Fig.3 Curve of slope over time by using DMAC after different stored time

由图 3 可以看出: DMAC 溶液配制后当天直接使用[当天(1)(2)为两次 DMAC 溶液在同天配制并使用的实验], 与儿茶酚标准液反应相同时间后得到的变化曲线基本一致, 其摩尔吸光系数 ϵ (摩尔吸光系数 $\epsilon = \text{斜率} \times \text{儿茶酚相对分子质量} \times 1000$) 差异不显著。在试剂配制 2 d 后、6 d 后 (-18 °C 暗处放置) 使用时, 其变化曲线之间则差异显著。如若以反应后同时间段内当天 (1)(2) 的摩尔吸光系数 ϵ 的平均值为基准, 15 min 时两天后 ϵ 的相对误差范围是 8.69%, 6 d 后的 ϵ 相对误差仅为 2.25%; 但 20 min~35 min 间 ϵ 的相对误差范围分别为 8.58~9.99%, 9.64~22.86%。因此, 建议 DMAC 当天配制使用。

2.3 原花青素含量

山竹果皮、花萼和果肉中原花青素的测定结果见表 1。

表 1 两种方法测定的山竹果皮、花萼和果肉中原花青素含量 (n=3)

Table 1 Content of proanthocyanidins in rinds, calyx lobes and arils of mangosteen by DMAC assay and vanillin assay

方法	果皮	花萼	果肉
DMAC 法/(mg/g)	4.23±0.24*	0.85±0.02	0.53±0.03
香草醛法/(mg/g)	17.22±0.72	3.93±0.12	2.34±0.17

注: *平均数±标准差, 皆以儿茶酚计。

由表 1 的可以看出, 香草醛法测得的原花青素量是 DMAC 法的 4 倍左右, 这是由于 DMAC 法和香草醛法反应原理的不同。DMAC 只与原花青素终端单元酚羟基反应; 香草醛则不限于与其终端单元反应, 而且和聚多酚反应的吸光度会高于和单体的反应。据报道, 山竹的果皮中原花青素平均聚合度为 6.6^[4]。本研究是以儿茶酚作为标准品, 因此, DMAC 法测定会低

估原花青素的含量, 而香草醛法会使测定结果偏高。针对不同种类的食品, 采取以测定对象中提纯的原花青素为标准物的方式^[4], 能够有效地改善准确性。

DMAC 法中儿茶酚标准曲线的回归方程为 $y=0.0937x-0.0029$ ($R^2=0.9993$, $n=6$); 香草醛法中儿茶酚标准曲线的回归方程为 $y=0.0026x+0.0028$ ($R^2=0.9974$, $n=5$)。由两种方法回归方程的斜率可知, DMAC 法生成的缩合物摩尔吸光度 ϵ 约 36 倍于其香草醛法生成的缩合物, DMAC 法灵敏度明显高于香草醛法。

2.4 讨论

根据上述结果与分析可以看出, DMAC 分光光度法测定原花青素, 具有快速、易于操作、检测成本低廉、结果相对准确等优点。大量研究证实: DMAC 法对原花青素的反应具有良好的专一性, 对槲皮苷 (Quercetin)、染料木黄酮 (Genistein)、大豆苷元 (Daidzein)、毛地黄黄酮 (Luteolin)、没食子酸 (Gallic acid)、阿魏酸 (Ferulic acid)、香豆酸 (Coumaric acid)、绿原酸 (Chlorogenic acid)、柚皮素 (Naringenin)、杨梅酮 (Myricetin)、橙皮素 (Hesperitin) 和芹菜苷元 (Apigenin) 等均无明显的反应, 而对黄烷醇类及其没食子酸盐和某些吲哚类与 DMAC 有特异性反应^[11]。与香草醛法相比, DMAC 法也更不容易受到黄酮、花青素等酚性杂质的干扰^[12,14]。香草醛法的专一性不佳, 对多聚物测量偏高 (见 3.2 部分) 以及目前对山竹原花青素组成的不明确, 使得 DMAC 法的测定结果与香草醛法并没有得到很好的契合。但 Prior 以 DMAC 法 (原花青素 A2 为标准品) 在 5 个分析实验室间进行了 11 个蔓越橘样品原花青素含量的测定, 得到了比较好的一致性; 与重量分析的结果相关系数达 0.989^[13]; Payne 对可可类食品原花青素测定的结果 (原花青素 B2 为标准品) 也与液相色谱 (LC) 测定结果一致^[11], 这说明 DMAC 法有比较好的准确性、重复性。

3 结论

本文介绍了 DMAC 法, 并用 DMAC 法测定了山竹果皮、花萼和果肉中原花青素的含量, 该方法简便、灵敏。DMAC 溶液当天配制, 选用反应后 15~35min 间测量吸光度比较稳定。实验中测得, 以儿茶酚为标准品得到的标准曲线方程为 $y = 0.0937x - 0.0029$ ($R^2 = 0.9993$); 山竹中果皮、花萼和果肉中原花青素的含量分别为: 4.23±0.24 mg/g, 0.85±0.02 mg/g, 0.53±0.03 mg/g (以儿茶酚计)。另外, 通过与香草醛法的对比、国外对 DMAC 法的研究和应用分析, DMAC 法能作

为一种比较实用、准确的商业检测法。标准品的选择,山竹果皮、花萼和果皮等中原花青素的构成和聚合度还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 蒋依辉,李春雨,戴宏芬,等.山竹的食用药用价值及综合利用研究进展[J].广东农业科学,2011,3:50-53
Jiang N H, Li C Y, Dai H F, et al. The edible and medicinal value of mangosteen and its comprehensive utilization [J]. Guangdong Agricultural Science, 2011, 3: 50-53.
- [2] Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, et al. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(10): 3227-3239
- [3] Yu L M, Zhao M M, Yang B, et al. Phenolics from hull of *Garcinia mangostana* fruit and their antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 176-181
- [4] Fu C L, Loo A E K, Chia F P P, et al. Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 7689-7694
- [5] 孙传范.原花青素的研究进展[J].食品与机械,2010,26(4): 146-148,152
Su C F. Research Progress on Procyanidins [J]. Food and Machinery, 2010, 26(4): 146-148, 152
- [6] 石碧,狄莹.植物多酚[M].北京:科学出版社,2000
Shi B, Di Y. Plant polyphenol [M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [7] Kennedy J A, Taylor A W. Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 995: 99-107.
- [8] 张亮亮.MALDI-TOF质谱联合NMR及HPLC分析植物单宁结构及抗氧化能力研究[D].厦门:厦门大学,2009
Zhang L L. MALDI-TOF MS Combined with NMR and HPLC Analysis of Vegetable Tannins with Their Antioxidant Activities [D]. Xiamen: Xiamen University, 2009
- [9] 周海超,魏淑东,李敏,等.基质辅助激光解吸飞行时间质谱方法分析山竹果皮缩合单宁[J].分析化学,2010,10:1492-1496
Zhou H C, Wei H D, Li M, et al. Analysis of Condensed Tannins from Mangosteen Pericarps by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. Chinese journal of analytical chemistry, 2010, 10: 1492-1496.
- [10] GB/T 22244-2008,保健食品中前花青素的测定[S]
GB/T 22244-2008, determination of procyanidins in health foods[S]
- [11] Payne M J, Hurst W J, Stuart D A, et al. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC [J]. Journal of AOAC International, 2010, 93(1): 89-96
- [12] Hümmer W, Schreier P. Analysis of proanthocyanidins[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2008, 52(12): 1381-1398
- [13] Prior R L, Fan E, Ji H, et al. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(9): 1473-1478.
- [14] Feliciano R P, Shea M P, Shanmuganayagam D, et al. Comparison of Isolated Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) Proanthocyanidins to Catechin and Procyanidins A2 and B2 for Use as Standards in the 4-(Dimethylamino) cinnamaldehyde Assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4578-4585