

微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法动态监测从红酒中分离得到的不同种类多酚化合物的抗氧化活性

李媛媛¹, 李灵犀^{1,2}, 崔艳², 孙宝山²

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016) (2. 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁沈阳 110016)

摘要: 本文确定了微型 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基清除能力测定法(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氨基双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐总抗氧化能力测定法(2,20-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS)和铁离子还原/抗氧化力测定法(ferric reduction ability plasma assay, FRAP)测定从红酒中分离得到的不同种类多酚化合物抗氧化活性的最佳反应时间以及抗氧化活性的大小。以抗氧化剂 Trolox 和 Vc 为对照, 动态监测红酒中不同种类多酚化合物在三种体系中的反应过程, 计算不同浓度下红酒多酚类化合物的抗氧化活性。结果表明, 三种反应体系的最佳反应时间分别是 100 min、240 min 和 370 min。不同种类的红酒多酚类化合物与抗氧化剂一样, 其样品浓度与抗氧化活性呈明显的量效关系。从相关性分析得出, 表儿茶素、多聚体、低聚体、花色苷是影响葡萄酒抗氧化活性的主要成分, 可以将其确定为葡萄酒质量控制的指标。本文建立的微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法操作简单, 重复性好, 样品消耗少。

关键词: DPPH; ABTS; FRAP; 红酒多酚; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2017)8-130-140

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.020

A Micro-model of DPPH, ABTS, and FRAP for Dynamic Monitoring of the Antioxidant Activity of Different Types of Polyphenols Isolated from Red Wine

LI Yuan-yuan¹, LI Ling-xi^{1,2}, CUI Yan², SUN Bao-shan²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

(2. School of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The optimal reaction time and the antioxidant activity of different types of polyphenols isolated from red wine were determined using a micro-model of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,20-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), and ferric reduction ability plasma (FRAP) assays. Using Trolox and vitamin C as controls, the reaction processes of different types of red wine polyphenols in DPPH, ABTS, and FRAP systems were dynamically monitored, and the antioxidant activity of red wine polyphenols at different concentrations were calculated. The results showed that the optimal reaction times of DPPH, ABTS, and FRAP were 100 min, 240 min, and 370 min, respectively. Different types of red wine polyphenols were similar to the antioxidants, and their antioxidant activity showed a dose-dependent relationship with concentration. The correlation analysis suggested that epicatechin, polymers, oligomers, and anthocyanins were the main components affecting the antioxidant activity of red wine and could be determined as indicators for red wine quality control. The micro-model of DPPH, ABTS, and FRAP established in this study was simple and reproducible, and demonstrated low sample consumption.

Key words: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS); ferric reducing ability of plasma (FRAP); red wine polyphenols; antioxidant activity

作为一种兼具良好口感和保健功效的高端饮品,

收稿日期: 2017-02-10

基金项目: 辽宁省科技厅引进海外研发团队专项资金(辽外专 2011-5 号)

作者简介: 李媛媛(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 葡萄与葡萄多酚

通讯作者: 孙宝山(1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 葡萄与葡萄酒科

学

红酒越来越受到消费者的喜爱。目前, 红酒已是国际上仅次于啤酒的第二大饮料酒。1990 年, 世界卫生组织(WHO)在全世界范围内进行的一项称之为“MONICA”的有关心血管疾病免疫学研究项目也揭示, 法国人尽管摄食更多的饱和脂肪以及更少锻炼, 但患心脏病的风险仍比美国人要低, 这就是著名的“法

国悖论”(French paradox)。经过进一步深入调查研究,许多学者把“法国悖论”归因于红酒中所含有的多酚类化合物^[1-3]。大量的研究表明氧化问题是造成衰老和心血管疾病的主要原因^[4-7],而被认为是红酒中活性成分的多酚类化合物具有很强的抗氧化活性,因此对于很多疾病,如抗心血管病、抗炎症、预防癌症和抗动脉粥样硬化等的预防都具有很好的效果^[8-13]。化合物的生物活性与其化学结构有关,从化学结构上讲,红酒中的多酚类化合物分为低聚体、多聚体、花色苷、酚酸和白藜芦醇苷等^[13]。目前国内外针对红酒多酚类化合物抗氧化活性的研究多是不同品种或不同地区红酒抗氧化活性的比较,而未见不同种类红酒多酚化合物的抗氧化活性研究^[14-17]。此时测的红酒里边往往含有各种多酚及非多酚类化合物,得到的抗氧化活性是各类化合物抗氧化活性的总和,并不能反映红酒多酚类化合物抗氧化活性的总和,更不能反映不同种类红酒多酚类化合物的抗氧化特性。因此,为了对红酒中活性多酚成分进行更深入的研究,找到其中起主要作用的活性成分,建立一种简单、有效、稳定的抗氧化检测方法来同时检测不同种类红酒多酚化合物显得尤为重要。

目前,测定抗氧化活性的方法非常多,常使用的抗氧化方法分为两类基于H原子转移(HAT)的方法和基于电子转移(SET)的方法^[18]。基于氢原子转移(HAT)的方法,包括ORAC、TBARS、FTC;基于电子转移(SET)的方法,包括DPPH、ABTS和FRAP等^[19]。相比于HAT机制的方法,基于SET机制的方法以测定氧化还原潜力为基础,大多操作简单,重复性好,灵敏度高,便于实验室大规模日常操作,也是目前使用最广泛的方法^[20-22]。但现有文献报道利用DPPH、ABTS和FRAP法检测天然产物的抗氧化活性主要用的是分光光度法,该方法在筛选样品时,存在样品消耗量大、多样品测定时操作繁琐以及耗时长等缺陷,不适合天然产物中微量成分的活性测定^[23-25]。而微型实验作为现代科学研究的重要方法之一,旨在以尽量少的化学原料和试剂获得尽可能多的化学信息^[26-28]。同时现有的测定方法中对于反应时间的选择大多仅仅依据参考文献来确定,而未进行实验考察^[29-31]。不同的化合物其化学性质不一样,反应的快慢也不一样,不同的时间点下测得的活性差别很大,因此,为了更加准确的衡量不同化合物的抗氧化活性,应该找到化学反应平衡点即自由基清除率或吸光度达到稳态,以此确定合适的反应时间。本文通过对传统DPPH、ABTS和FRAP法进行改进,利用酶标仪建立了基于96孔板检测红酒中不同种类多酚化合物抗氧化活性

的微型筛选模型,该模型同样适用于其它苹果、蓝莓多酚类化合物以及一些微量物质如天然提取或合成单体的抗氧化活性的测定,有助于加速天然产物中有效单体组分的筛选。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红酒多酚类化合物采用SUN和LI等人的方法分离并鉴定^[32,33]。分离得到的低聚体和多聚体经香草醛反应测得其原花青素含量分别为92.17%和90.36%,经苄硫醇水解反应后计算得其聚合度分别为 2.17 ± 0.12 和 9.87 ± 0.35 ;分离得到的酚酸经UPLC-Q-TOF-MS/MS测定,其主要成分为没食子酸(Gallic acid)、单咖啡酰酒石酸(caftaric acid)和单香豆酰酒石酸(coutaric acid),根据峰面积归一化法计算得酚酸总含量为96.67%;分离得到的花色苷经HPLC-ESI-MS/MS测定,其主要成分为锦葵色素-3-O-葡萄糖苷(Malvidin-3-O-glucoside)、芍药色素-3-O-葡萄糖苷(Peonidin-3-O-glucoside)、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷(Delphinidin-3-O-glucoside)和矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷(Petunidin-3-O-glucoside),根据峰面积归一化法计算得花色苷总含量为94.72%。

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, $C_{18}H_{12}N_5O_6$)、ABTS(2,2-联氮基双(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐, $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_2)_2$)、TPTZ(2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪, $C_{18}H_{12}N_6$)、Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸, $C_{14}H_{18}O_4$), Aldrich公司; L-抗坏血酸(Vc),美国福禄克(Fluke)公司;白藜芦醇苷和表儿茶素,成都曼思特生物科技有限公司;甲醇(分析级)、娃哈哈水,山东禹王集团。

1.2 仪器与设备

瑞士Tecan M200 PRO多功能酶标仪,瑞士TECAN公司;96孔细胞培养板,美国康宁生命科技有限公司;微量移液器,赛默飞世尔科技公司;XS204 Delta Range分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;CS501型超级恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品储备液的配制

精密称取各样品及抗氧化剂Trolox、Vc适量,置于10 mL容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得表儿茶素(5 mmol/L)、低聚体(5 mmol/L)、白藜芦

醇苷(4 mmol/L)、多聚体(3 mmol/L)、酚酸(3 mmol/L)和花色苷(3 mmol/L)储备液。

1.3.2 微型 DPPH 法的建立

1.3.2.1 反应液的配制

DPPH 储备液(0.20 mmol/L): 准确称取 20 mg DPPH, 用甲醇溶解并定容于 250 mL 容量瓶中, 避光保存(0~4 °C)。

DPPH 工作液: 取 DPPH 储备液 15 mL 置于 25 mL 容量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 避光静置 10 min。在 517 nm 下测定 DPPH 工作液的吸光度为 0.74±0.03, 一次测定需要 10 mL(现用现配)。

1.3.2.2 样品及 Trolox、Vc 的测定方法

参考张舒婷等的方法, 并作适当修改^[34]。在 96 孔板中依次加入 200 μL 的 DPPH 工作液和 5 μL 不同浓度的样品溶液和 Vc、Trolox 溶液, 摇匀, 室温下动态测定波长 517 nm 处的吸光度 A(n=3)。空白组用甲醇代替 DPPH 工作液, 对照组用甲醇代替样品溶液。将能够有效清除 50% 自由基的样品浓度定义为抗氧化活性(EC₅₀)。

1.3.3 微型 ABTS 法的建立

1.3.3.1 反应液的配制

0.02 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.5): 准确称取 295 mg 无水乙酸钠(分子量 82.03), 娃哈哈纯净水溶解, 加 0.37 mL 冰乙酸定容于 500 mL。

储备液 1: 准确称取 ABTS 96.02 mg, 用 pH 4.5 醋酸缓冲液溶解并定容于 25 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 7 mmol/L ABTS 溶液, 避光保存(0~4 °C)。

储备液 2: 准确称取过硫酸钾 66.24 mg, 用 pH 4.5 醋酸缓冲液溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 配制成浓度为 2.45 mmol/L 过硫酸钾水溶液, 避光保存(0~4 °C)。

ABTS 工作母液: 分别量取 5 mL 储备液 1 和储备液 2, 两者等体积混合, 室温避光反应 12~16 h。

ABTS 工作液: 取 2.80 mL ABTS 母液, 用 pH 4.5 醋酸缓冲液将母液稀释至 65 mL, 室温避光后放置半个小时后, 在 734 nm 下测定其吸光度为 0.74±0.03。

1.3.3.2 样品及 Trolox、Vc 的测定方法

参考 Ozgen 等的方法, 并作适当修改^[35]。在 96 孔板中依次加入 200 μL 的 ABTS 工作液和 10 μL 不同浓度的样品溶液和 Vc、Trolox 溶液, 摇匀, 室温下动态测定波长 734 nm 处的吸光度 A(n=3)。空白组用 pH 4.5 醋酸缓冲液代替 ABTS 工作液, 对照组用甲醇代替样品溶液。将能够有效清除 50% 自由基的样品浓度定义为抗氧化活性(EC₅₀)。

1.3.4 微型 FRAP 法的建立

1.3.4.1 反应液的配制

醋酸缓冲液(pH 3.6): 准确称取 455.30 mg 无水乙酸钠, 娃哈哈纯净水溶解并加入 3.97 mL 冰乙酸, 定容至 250 mL 容量瓶, 即得 0.30 mol/L 的醋酸缓冲液。

TPTZ 溶液(10 mmol/L): 准确称取 156.20 mg TPTZ 于烧杯中, 蒸馏水溶解, 加入 0.17 mL 浓盐酸, 定容至 100 mL。

FeCl₃ 溶液(20 mmol/L): 准确称取 270.03 mg FeCl₃·6H₂O, 溶解定容至 50 mL。

FRAP 工作液: pH 3.6 醋酸缓冲液、TPTZ 溶液和 FeCl₃ 溶液按比例(10:1:1)混合, 现用现配。FRAP 工作液配制后 37 °C 孵育, 并宜在 1~2 h 内使用完毕。一次测定需 10 mL。

1.3.4.2 样品及 Trolox、Vc 的测定方法

参考张舒婷等的方法, 并作适当修改^[34]。在 96 孔板中依次加入 180 μL 的 FRAP 工作液和 5 μL 不同浓度的样品溶液和 FeSO₄、Trolox 溶液, 摇匀, 37 °C 孵育, 动态测定波长 593 nm 处的吸光度 A(n=3)。空白组用 pH 3.6 醋酸缓冲液代替 FRAP 工作液, 对照组用甲醇代替样品溶液。根据反应后 A 值, 在标准曲线上求得相应 FeSO₄ 的浓度(mmol/L), 定义为 FRAP 值。FRAP 值越大, 抗氧化活性越强。

1.3.5 数据分析

采用 SPSS 22.0 分析软件对数据进行统计、计算和分析, 并利用 Origin 9.0 绘制出各个组分的动力学曲线。

2 结果与分析

2.1 动态监测红酒多酚类化合物的抗氧化活性

为了全面考察反应时间对测得的抗氧化活性结果的影响, 本实验共测定了包括红酒多酚类化合物以及常用的抗氧化剂 Trolox、Vc、FeSO₄ 在内的 9 种化合物。

由图 1~3 可知, 随着多酚样品及抗氧化剂样品浓度的增大, 其清除自由基或还原 Fe³⁺-TPTZ 的能力也愈大, 表明其抗氧化能力与样品浓度呈明显的量效关系。对于红酒多酚类化合物, 在某一样品浓度下, 红酒多酚类化合物清除自由基或还原 Fe³⁺-TPTZ 的能力随时间变化而变化, 表明抗氧化能力与时间呈明显的依赖关系。在反应初期, 多酚类物质清除自由基或还原 Fe³⁺-TPTZ 的能力有着一个快速的升高, 说明在反应初期, 由于物质浓度较大, 化学反应速率较快; 在

反应后期, 反应速率逐渐降低。另外从图 1~3 中来看, 低浓度样品要比高浓度样品达到动态平衡所需的时间短, 这是由于相同时间内低浓度对 DPPH 自由基清除率的改变相对于高浓度的要小, 但这并不代表其就达到了动态平衡。因此, 实验中主要依据高浓度的时间

曲线图来判断是否达到动态平衡。综上所述, 分别将反应 100 min、240 min 和 370 min 后的测定值作为微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法抗氧化活性的测定值, 将反应初始时刻的测定值作为微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法测定抗氧化剂 Trolox 和 Vc 的抗氧化活性值。

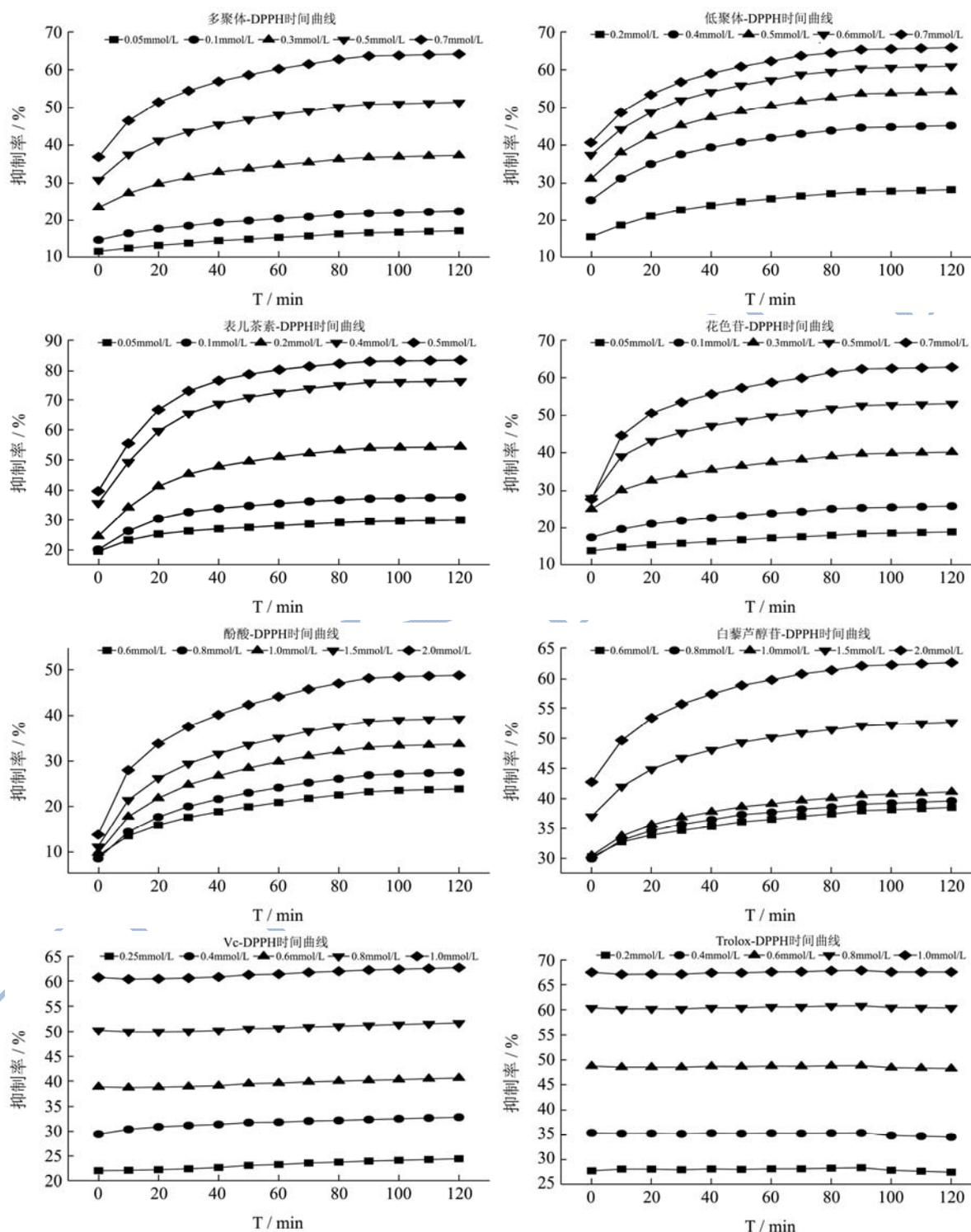


图 1 红酒多酚类化合物和抗氧化剂对 DPPH 自由基的抑制率随时间的变化

Fig.1 Changes in the inhibitory percentage of the DPPH radical with red wine polyphenols

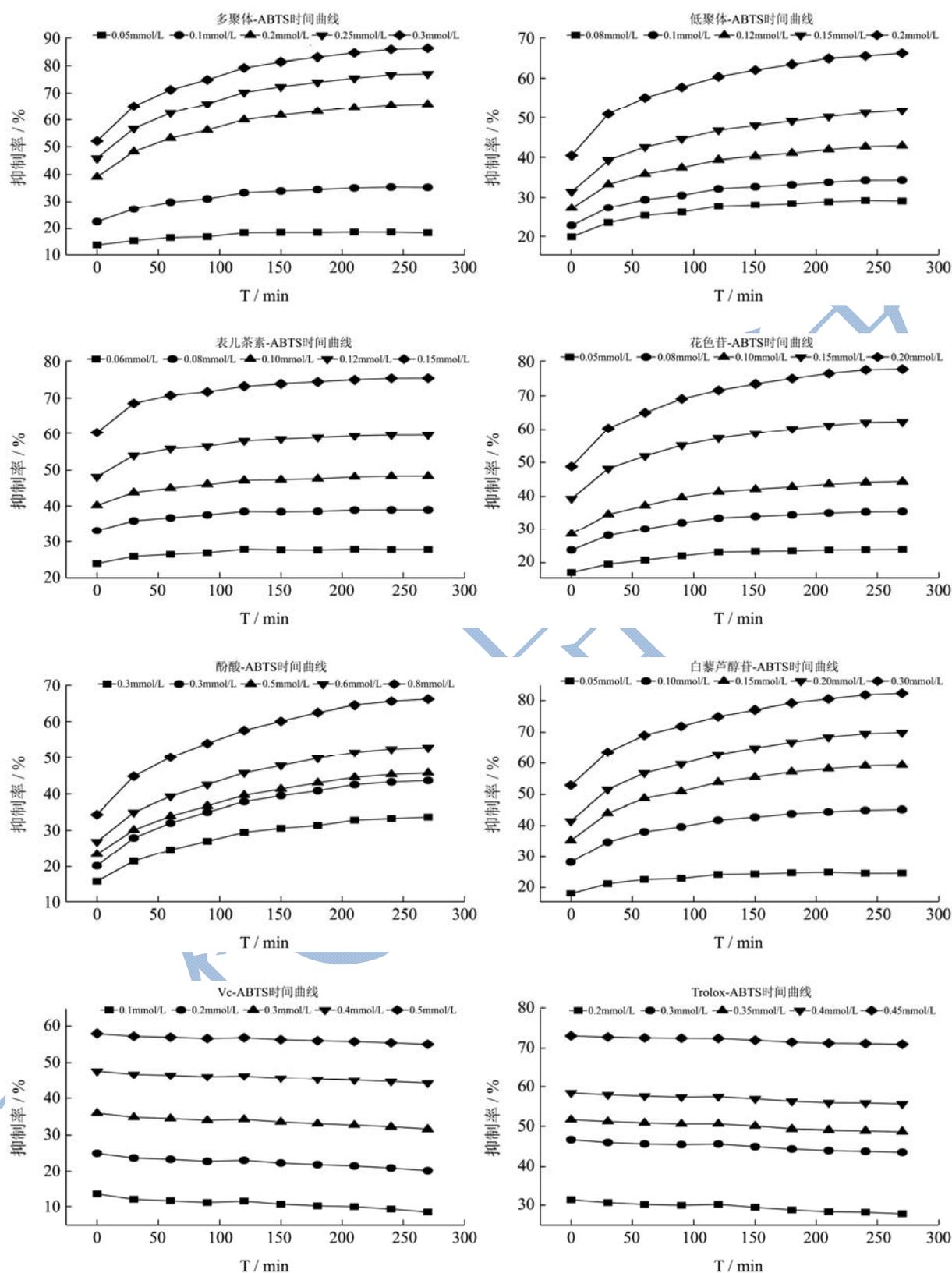


图2 红酒多酚类化合物和抗氧化剂对ABTS自由基的抑制率随时间的变化

Fig.2 Changes in the inhibitory percentage of the ABTS radical with red wine polyphenols

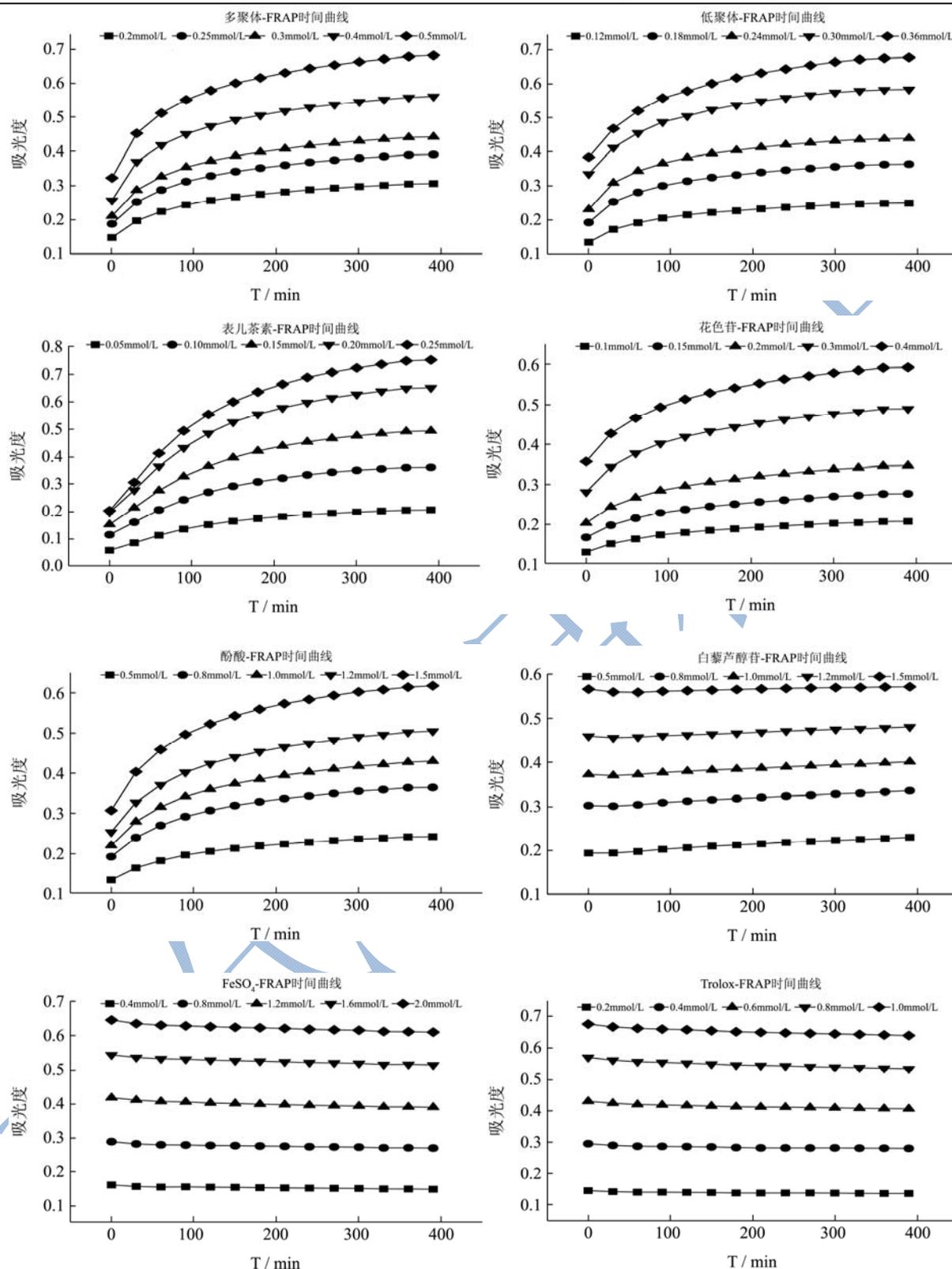


图3 红酒多酚类化合物和抗氧化剂对Fe³⁺-TPTZ还原能力随时间的变化

Fig.3 Changes in Fe³⁺-TPTZ reducing capacity with red wine polyphenols

抗氧化活性的大小与酚羟基的数目有关, 酚羟基的数目越多抗氧化活性越强^[36]。在 DPPH 实验中, 红酒多酚类化合物中表儿茶素结构含有的酚羟基数目最多, 其反应速率也最快; 白藜芦醇苷和酚酸含有的酚

羟基数目最少, 其反应速率也最慢。同时由于酚酸自身的酸性使其在质子性溶剂(甲醇和乙醇)中的反应速率受阻, 也会减慢其与自由基的反应速率^[37]。这表明抗氧化物的反应速率与其抗氧化活性成正相关。对

于抗氧化剂 Trolox 和 Vc, 不管是低浓度还是高浓度, 随着反应时间的延长, Trolox 其抑制率基本保持不变, 而 Vc 则有一定的升高, 表明 Trolox 对 DPPH 自由基的清除能力与时间无明显的依赖关系。杨盈等人研究发现, Trolox 与 DPPH 自由基的反应分为两步进行。首先, DPPH 自由基单电子氧化色满醇基团生成色满醇自由基中间产物, 这一步属于可逆反应。其次, 两个色满醇自由基进一步发生自歧化, 生成一分子色满醇和一分子氧化形式, 而这一步歧化反应是不可逆反应。自歧化反应的不断发生使得第一步反应不断向右进行, 导致色满醇自由基中间产物的不断, 这也就解释了为什么 Trolox 与 DPPH 自由基反应速率非常快^[38]。李铨华等人研究表明 DPPH 在溶液中是以自由基形态和含氮-氮双键的高度共轭结构的正离子(DPPH⁺)存在且 Vc 对这两种形态都有清除作用, 而当 Vc 浓度较高时(大于 DPPH 浓度)时, Vc 的还原性导致其直接还原 DPPH⁺的氮-氮双键并使其分解, 加剧了抗氧化反应的程度, 从而使得 Vc 对 DPPH 自由基的清除率随着时间变化有所升高^[39]。

在 FRAP 实验中, 白藜芦醇苷同抗氧化剂 Trolox

表 1 DPPH、ABTS 和 FRAP 法测定的红酒多酚类化合物的回归方程及相对标准偏差

Table 1 Regression equation and relative standard deviation (RSD) of red wine polyphenols by DPPH, ABTS, and FRAP assays

Compounds	DPPH/($\mu\text{mol/L}$)		ABTS/($\mu\text{mol/L}$)		FRAP/($\mu\text{mol/L}$)	
	Regression equation	RSD/%	Regression equation	RSD/%	Regression equation	RSD/%
Polymer	$y=0.545-0.432x(R^2=0.997)$	1.33	$y=0.629-1.687x(R^2=0.991)$	1.38	$y=0.033+1.013x(R^2=0.991)$	1.01
Oligomer	$y=0.560-0.467x(R^2=0.994)$	1.95	$y=0.652-1.865x(R^2=0.996)$	1.73	$y=0.020+1.923x(R^2=0.999)$	1.46
Epicatechin	$y=0.473-0.692x(R^2=0.990)$	0.83	$y=0.710-3.232x(R^2=0.9991)$	1.97	$y=0.076+2.659x(R^2=0.995)$	1.39
Anthocyanins	$y=0.521-0.414x(R^2=0.993)$	1.91	$y=0.642-2.232x(R^2=0.996)$	1.13	$y=0.083+1.259x(R^2=0.994)$	0.95
PAs	$y=0.602-0.084x(R^2=0.997)$	1.57	$y=0.592-0.396x(R^2=0.998)$	1.45	$y=0.062+0.340x(R^2=0.999)$	1.29
Piceid	$y=0.482-0.112x(R^2=0.995)$	1.83	$y=0.590-1.430x(R^2=0.993)$	0.44	$y=0.058+0.334x(R^2=0.998)$	0.56
Trolox	$y=0.542-0.332x(R^2=0.990)$	0.92	$y=0.727-0.937x(R^2=0.996)$	1.66	$y=0.020+0.605x(R^2=0.996)$	1.67
Vc	$y=0.567-0.314x(R^2=0.996)$	1.02	$y=0.741-0.782x(R^2=0.9996)$	1.18		
FeSO ₄					$y=0.043+0.306x(R^2=0.998)$	0.97

注: PAs=Phenolic acids.

由表 1 可知, 在抗氧化实验中, 红酒多酚类化合物和抗氧化剂(Trolox、Vc)在线性范围内与其清除自由基或还原 Fe³⁺-TPTZ 的能力之间线性关系良好, 且所得误差均小于 2.00%, 符合要求。因此说明本文建立的微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法方法可靠, 重复性良好。同时, 与传统 DPPH、ABTS 和 FRAP 法检测天然产物抗氧化活性的方法相比, 本文利用酶标仪建立的基于 96 孔板检测红酒中不同种类多酚化合物抗氧化活性的微型筛选模型, 不仅方法可靠、重复性良好, 且能够同时测定 3~4 个样品线性范围的抗氧化活性, 这大大的节约了实验时间。

和 FeSO₄ 一样在反应一开始即达到动态平衡。说明白藜芦醇苷同抗氧化剂一样, 不管是低浓度还是高浓度, 反应速率都很快, 其对 Fe³⁺-TPTZ 复合物的还原能力与时间无明显的依赖关系。Gulcin 等人研究发现白藜芦醇除了是极强的抗氧化剂, 能有效的清除自由基, 还能螯合亚铁离子^[41]。因此可能是白藜芦醇苷与还原得到的 Fe²⁺发生螯合使得加速了抗氧化反应的速率。不同的是在反应后期白藜芦醇苷对 Fe³⁺-TPTZ 复合物的还原能力有所升高, 而抗氧化剂 Trolox 和 FeSO₄ 对 Fe³⁺-TPTZ 复合物的还原能力则有所降低, 说明与抗氧化剂 Trolox 和 FeSO₄ 相比, 白藜芦醇苷同其它红酒多酚类化合物一样能够有效且持久起到抗氧化作用, 不受其它外界环境的影响。

2.2 微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法的验证结果

为了更好的将微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 法应用于实践, 对上述微量模型中的线性关系以及精密度进行了考察。

2.3 红酒多酚类化合物的抗氧化活性

多酚类化合物的抗氧化活性与其酚羟基的数目和位置均有关, 酚羟基数目越多其抗氧化活性越强, 同时具有邻位酚羟基结构的化合物其抗氧化活性也越强^[42]。由表 2 可知, 对于原花青素类化合物(相对表儿茶素的摩尔浓度), 其抗氧化活性顺序为表儿茶素>低聚体>多聚体, 表明聚合度越大其抗氧化活性越小。原因是随着聚合度的增加, 单位表儿茶素的酚羟基数目越少, 因此抗氧化活性也越小。对于非聚合类化合物, 其抗氧化活性大小为: 表儿茶素>花色苷>白藜芦

醇昔>酚酸。其中虽然酚酸中具有一对邻位酚羟基，但是由于其苯环一端连接有一个长碳链，空间位阻相应的较大，故影响了其与自由基和复合物的结合，从而降低了其抗氧化活性。对于抗氧化剂（Trolox 和 Vc），红酒多酚类化合物除了酚酸，其抗氧化活性均

比抗氧化剂 Trolox 和 Vc 大，且表儿茶素的抗氧化活性最大。从相关性分析得出，表儿茶素、多聚体、花色苷和低聚体是影响葡萄酒抗氧化活性的主要成分，可以将其确定为葡萄酒的质量控制指标。

表 2 DPPH、ABTS 和 FRAP 法测定的红酒多酚类化合物的抗氧化活性值及线性范围

Table 2 Antioxidant activity and linear range of red wine polyphenols by DPPH, ABTS, and FRAP assays

Compounds	DPPH/($\mu\text{mol/L}$)		ABTS/($\mu\text{mol/L}$)		FRAP/($\mu\text{mol/L}$)	
	EC ₅₀	Linear range	EC ₅₀	Linear range	FRAP value	Linear range
Polymer	575±7	218-762	153±2	87-218	6.24±0.06	136-407
Oligomer	560±11	52-724	144±2	54-323	4.51±0.07	218-547
Epicatechin	247±2	52-523	106±2	21-157	11.06±0.15	52-261
Anthocyanins	543±10	52-723	123±1	52-206	5.53±0.05	52-413
PAAs	2537±39	1084-3251	573±8	325-1084	1.22±0.02	542-1625
Piceid	1674±31	619-2062	133±1	52-309	1.38±0.01	516-1547
Trolox	686±6	209-1044	380±6	209-522	2.17±0.04	209-1044
Vc	867±9	256-1024	447±5	102-512		
FeSO ₄						400-2001

注：PAAs=Phenolic acids。

目前有很多在线检测抗氧化活性的方法，如 HPLC-DPPH 法，该方法具有在线、高通量筛选、快速分析的特点。但研究表明，不同类型的样品其组成与结构不同，其抗氧化反应的机制不同，达到平衡所需的时间存在很大差异。很多天然产物中的活性成分，如多酚类化合物，其对 DPPH 自由基的清除作用是时间和浓度依赖型(长效型抗氧化剂)的。HPLC-DPPH 只能检测出其混合反应瞬时抗氧化活性，并不能代表其最终的抗氧化活性。因此，这种在线检测的方法只适用于类似抗氧化剂 Trolox 和 Vc 这种时间不依赖型的抗氧化剂(短效型抗氧化剂)。对于时间依赖型的抗氧化剂来说，有时往往会得到与事实相反的实验结果，如邢航等得出原花青素二聚体 B₂ 没有自由基清除活性，这与 MUSEL 等得出的结果就完全相反^[43,44]。而本研究中通过计算发现，在 DPPH 实验中，在反应达到动态平衡时，酚酸类化合物对 DPPH 自由基的抑制率增加了 10%~35%左右，低聚体对 DPPH 自由基的抑制率增加了 5%~28%左右。反应初期，2.00 mmol/L 的酚酸类化合物对 DPPH 自由基的抑制率为 14%左右，远小于 0.30 mmol/L 多聚体对 DPPH 自由基的抑制率，而当达到反应平台期时，2.00 mmol/L 的酚酸类化合物对 DPPH 自由基的抑制率达到 48%左右超过了 0.30 mmol/L 多聚体对 DPPH 自由基的抑制率。综上所述，未经过实验考察仅依据文献方法来选取反应时间点来表征样品的抗氧化活性是不准确的。

3 结论

研究首次通过微型 DPPH、FRAP 和 ABTS 法动态监测了红酒中不同种类多酚类化合物的抗氧化活性。确定微型 DPPH 法将 200 μL 的 DPPH 工作液与 5 μL 样品溶液作为反应体系，在室温下孵育反应，测定波长为 517 nm，反应时间为 100 min；微型 ABTS 将 200 μL 的 ABTS 工作液与 10 μL 样品溶液作为反应体系，在室温下孵育反应，测定波长为 734 nm，反应时间为 240 min；微型 FRAP 将 180 μL 的 ABTS 工作液与 5 μL 样品溶液作为反应体系，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应，测定波长为 593 nm，反应时间为 370 min。线性回归方程表明，所测样品在一定浓度范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.990$, $\text{RSD} < 2.00\%$)，且所得误差均小于 2.00%。说明本文建立的基于 96 孔板酶标仪检测的微型 DPPH、ABTS 和 FRAP 抗氧化活性筛选模型可操作性强、结果可靠，能够为其今后体内生物活性的量效关系研究提供客观实验依据。同时 EC₅₀ 值和 FRAP 值表明，表儿茶素、多聚体、花色苷和低聚体是影响葡萄酒抗氧化活性的主要成分。因此，今后有必要针对这 4 类成分进行更深入的研究。

参考文献

- [1] D'archivio M, Filesi C, Vari R, et al. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies [J]. International

- Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(4): 1321-42
- [2] Nicholson S K, Tucker G A, Brameld J M. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells [J]. Proc. Nutr. Soc., 2008, 67(1): 42-7
- [3] Dell'agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols [J]. Cardiovasc. Res., 2004, 63(4): 593-602
- [4] 凌关庭. 氧化·疾病·抗氧化(V)[J]. 粮食与油脂, 2004, 1: 47-49
LING Guan-ting. Antioxidant-oxidation-disease(V) [J]. Cereals & Oils, 2004, 1: 47-49
- [5] 翟艳红, 康素玲. 氧自由基与心血管系统疾病的关系[J]. 医学综述, 2001, 7(5): 280-282
ZHAI Yan-hong, KANG Su-ling. Relationship between oxygen free radicals and cardiovascular system diseases [J]. Medical Recapitulate, 2001, 7(5): 280-282
- [6] 孙铁民, 李铎. 自由基与若干疾病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(6): 385-387
SUN Tie-min, LI Xian. Relationship between free radicals and a number of diseases [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2000, 20(6): 385-387
- [7] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88
LI Yong, KONG Ling-qing, GAO Hong, et al. Progress on free radical and diseases [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(4): 85-88
- [8] Di Lorenzo A, Bloise N, Meneghini S, et al. Effect of winemaking on the composition of red wine as a source of polyphenols for anti-infective biomaterials [J]. Materials, 2016, 9(5): 316
- [9] Roswall N, Weiderpass E. Alcohol as a risk factor for cancer: existing evidence in a global perspective [J]. Journal of Preventive Medicine and Public Health Yebang Uihakhoe Chi, 2015, 48(1): 1-9
- [10] Nunes C, Ferreira E, Freitas V, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of red wine extract: unveiling the mechanisms in colonic epithelial cells [J]. Food Funct., 2013, 4(3): 373-383
- [11] Chiva-Blanch G, Arranz S, Lamuela-Raventos R M, et al. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies [J]. Alcohol and Alcoholism, 2013, 48(3): 270-277
- [12] Sun B, Neves A C, Fernandes T A, et al. Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(12): 6550-6557
- [13] Lippi G, Franchini M, Favalaro E J, et al. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox"[J]. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2010, 36(1): 59-70
- [14] 蒋宝, 罗美娟, 张振文. 海拔对黄土高原地区赤霞珠和品丽珠葡萄酒中酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 2: 223-230
JIANG Bao, LUO Mei-juan, ZHANG Zhen-wen. Influence of altitudes on phenolic compounds and antioxidant activities cabernet sauvignon and merlot wines in loess plateau region [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 2: 223-230
- [15] 李华, 李勇, 吴莹, 等. ABTS-(+)法测定葡萄酒抗氧化活性的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 11: 90-96
LI Hua, LI Yong, WU Ying, et al. Research of antioxidant activity of wines determined by the ABTS⁺ method [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2009, 11: 90-96
- [16] 孙翔宇, 杜国荣, 马婷婷, 等. 陕西省售国产葡萄酒中多酚类物质的特征与抗氧化能力分析[J]. 现代食品科技, 2014, 30(8): 242-250
SUN Xiang-yu, DU Guo-rong, MA Ting-ting, et al. Polyphenol composition and antioxidant activity of domestic wines from shaanxi province [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(8): 242-250
- [17] 王月晖, 崔灵绸, 徐洪宇, 等. 不同品种干红葡萄酒色泽及抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 252-259
WANG Yue-hui, CUI Ling-chou, XU Hong-yu, et al. Antioxidant activity of different varieties of dry red wine color and analysis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 252-259
- [18] 王晓宇. 葡萄酒抗氧化活性及其检测方法的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008
WANG Xiao-yu. Study on the antioxidant activity and methods of detection in wine [D]. Xianyang: Northwest Agriculture and Forestry University, 2008
- [19] Prior R L, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10): 4290-4302
- [20] 李勇. 葡萄酒抗氧化活性测定方法研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2009
LI Yong. Research on mensuration methods of wine antioxidant activity [D]. Xianyang: Northwest Agriculture

- and Forestry University, 2009
- [21] 曾维才,石碧.天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J].化工进展,2013,32(6):1205-1213,1247
ZENG Wei-cai, SHI Bi. Common methods of antioxidant activity evaluation for natural products: a review [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2013, 32(6): 1205-1213, 1247
- [22] 刘微微,任虹,曹学丽,等.天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J].食品科学,2010,31(17):415-419
LIU Wei-wei, REN Hong, CAO Xue-li, et al. Progress in evaluation techniques for antioxidant activity of natural products *in vitro* [J]. Food Science, 2010, 31(17): 415-419
- [23] 勾明玥,刘梁,张春枝.采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性[J].食品与发酵工业,2010,3:148-150
GOU Ming-yue, LIU Liang, ZHANG Chun-zhi. Determination of antioxidant activity in 26 plants by DPPH method [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 3: 148-150
- [24] 陈玉霞,刘建华,林峰,等.DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性[J].实验室研究与探索,2011,30(6):11-14
CHEN Yu-xia, LIU Jian-hua, LIN Feng, et al. Determination of antioxidative activity of 41 kinds of Chinese herbal medicines by using DPPH and FRAP methods [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2011, 30(6): 11-14
- [25] 邱金东,汤昆.DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J].中成药,2008,30(8):1215-1216
QIU Jin-dong, TANG Kun. DPPH and ABTS assay *in vitro* antioxidant activity of walnut [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2008, 30(8): 1215-1216
- [26] 曹晓群,朱晓慧,王玉民.化学实验微型化的改革与实践[J].实验室科学,2008,1:24-25
CAO Xiao-qun, ZHU Xiao-hui, WANG Yu-min. Reform and practice of chemistry experiment microminiaturization [J]. Laboratory Science, 2008, 1: 24-25
- [27] 谷春秀,王晓蕾,李颖,等.微型实验的开发与研究-分析专业常规实验微型化[J].生命科学仪器,2012,10(6):3-9
GU Chun-xiu, WANG Xiao-lei, LI Ying, et al. Study and development of mini-experiments-miniaturization of routine experiments in analysis [J]. Science Instruments, 2012, 10(6): 3-9
- [28] 李维峰,张小华,杨建军,等.无机化学实验微型化的研究[J].中医教育,2009,28(1):21-25
LI Wei-feng, ZHANG Xiao-hua, YANG Jian-jun, et al. Exploration into minimization of inorganic chemistry experiment [J]. Education of Chinese Medicine, 2009, 28(1): 21-25
- [29] 李昌勤,姚辰,朱荣遥,等.基于 DPPH、ABTS 和 FRAP 的中药女贞子抗氧化谱效关系研究[J].中国中药杂志,2016,41(9):1670-1677
LI Chang-qin, YAO Chen, ZHU Rong-yao, et al. Spectrum-effect relationship in antioxidant activity of *ligustri lucidi fructus* based on DPPH, ABTS and FRAP assays [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(9): 1670-1677
- [30] 梁从莲,刘红燕,崔媛,等.金银花指纹图谱及其清除 DPPH 自由基的谱-效关系[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(17):44-46
LIANG Cong-lian, LIU Hong-yan, CUI Yuan, et al. Chromatography-efficacy relation between HPLC fingerprints of *loniceræ japonicæ flos* and its effect in scavenging DPPH free radicals [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(17): 44-46
- [31] 郭长江,杨继军,李云峰,等.FRAP 法测定水果不同部分抗氧化活性[J].中国公共卫生,2003,19(7):841-843
GUO Chang-jiang, YANG Ji-jun, LI Yun-feng, et al. Antioxidant capacity of different parts of fruits determined by FRAP assay [J]. Chinese Journal of Public Health, 2003, 19(7): 841-843
- [32] Sun B, Leandro M C, De Freitas V, et al. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1128(1-2): 27-38
- [33] LI Y, LI L, CUI Y, et al. Separation and purification of polyphenols from red wine extracts using high speed counter current chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2017
- [34] Zhang S, Cui Y, Li L, et al. Preparative HSCCC isolation of phloroglucinolysis products from grape seed polymeric proanthocyanidins as new powerful antioxidants [J]. Food Chemistry, 2015, 188: 422-429
- [35] Ozgen M, Reese R N, Tulio A Z, et al. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(4): 1151-1157
- [36] Csepregi K, Neugart S, Schreiner M, et al. Comparative evaluation of total antioxidant capacities of plant polyphenols

- [J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2016, 21(2)
- [37] 尚亚靖.酚类抗氧化剂的结构修饰及其细节性机制研究[D].兰州:兰州大学,2010
SHANG Ya-jing. Structure modification and mechanism research of phenolic antioxidants [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2010
- [38] 杨盈,刘扬,聂舟,等.Trolox 及其酯化物与 DPPH 自由基的反应机理[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*,2009,30(3): 280-283
YANG Ying, LIU Yang, NIE Zhou, et al. Reaction mechanism of trolox and its ester derivative reacted with DPPH-radical [J]. *Journal of Huaqiao University (Natural Science)*, 2009, 30(3): 280-283
- [39] 李铨军,崔胜云.抗坏血酸清除 DPPH 自由基的作用机理[J]. *食品科学*,2011,32(1):86-90
LI Xuan-jun, CUI Sheng-yun. DPPH radical scavenging mechanism of ascorbic acid [J]. *Food Science*, 2011, 32(1): 86-90
- [40] 张逸波,郑文杰,黄峙,等.硒杂环化合物 SPO 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*,2010, 30(7):1866-1871
ZHANG Yi-bo, ZHENG Wen-jie, HUANG Zhi, et al. Spectrometric investigation of the antioxidant activity of a novel synthetic selenadiazole derivative SPO against DPPH and ABTS free radicals [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(7): 1866-1871
- [41] G LINÌ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(1): 210-8
- [42] 应龙彬,池玉梅.植物药黄酮苷类化合物的分离及其构效关系研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*,2007,12:100-102
YING Long-bin, CHI Yu-mei. Isolation of flavonoid compounds of plant and its research progress in structure-activity relationship [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine*, 2007, 12: 100-102
- [43] Musel K J, Garc A-Alonso M, Mart N-L Pez M, et al. Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2007, 8(8): 797
- [44] 邢航,张媛婷,鲁雪峰,等.高效液相色谱-二苯基三硝基苯肼在线检测葡萄酒中抗氧化活性成分[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(21):127-131
XING Hang, ZHANG Yuan-ting, LU Xue-feng, et al. On-line HPLC-DPPH assay for analysis of antioxidant compounds in grape wine [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 19(21): 127-131