

# 葡萄籽原花青素的分离纯化及其自由基淬灭活性的研究(下)

马庆一, 宋彦显, 赵松涛

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 本实验使用薄层扫描法进一步确认了梯度提取的乙酸乙酯、乙醚组中原花青素单体含量, 并与香草醛-盐酸法的结果加以对比, 又用分光光度法考查了 pH 值、温度、光照以及用抗坏血酸和亚硫酸氢钠处理对原花青素稳定性的影响, 最后用  $\beta$ -环糊精制备了原花青素微胶囊。结果发现, 乙酸乙酯、乙醚组中原花青素单体百分含量分别为 29.02% 和 59.98%, 与香草醛-盐酸法测定结果 (33.25% 和 60.64%) 基本一致; 较低的 pH 值 (pH 3~5)、避光、室温 (20 °C) 有利于原花青素的保存, 添加 0.6% 的抗坏血酸或 0.75% 亚硫酸氢钠对原花青素有很强的保护作用;  $\beta$ -环糊精、提取物用量分别为 10 g 和 0.189 g 时, 微胶囊产率和包含效率分别为 80.4% 和 20.5%。

**关键词:** 葡萄籽; 原花青素; 薄层扫描; 稳定性; 原花青素微胶囊

## Study on Isolation, Purification and the Free-Radical Scavenging

### Effect of Proanthocyanidins from Grape Seed (2)

MA Qing-yi, SONG Yan-xian, ZHAO Song-tao

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The content of proanthocyanidins monomer extracted by ethyl acetate or ether was confirmed by thin layer chromatography scan (TLCS), and the results were compared with those by vanillin-HCl method. The effects of pH value, temperature, light, treatment with Vc and sodium hydrogen sulfite on the stability of proanthocyanidin in grape seeds were also investigated. Then the microcapsule of proanthocyanidins was made using  $\beta$ -cyclodextrin as coating material. The results showed that the contents of monomer in ethyl acetate and ether extracts by TLCS were 29.02% and 59.98%, respectively, which were in accordance with those by vanillin-HCl method. Proanthocyanidins was stable without light at low pH value (3~5) and room temperature. 0.6% Vc or 0.75% sodium hydrogen sulfite showed very strong protective effect on proanthocyanidins. When 10 g  $\beta$ -cyclodextrin and 0.189 g proanthocyanidins were used, the output and embedding efficiency of Proanthocyanidins microcapsule could reach 80.4% and 20.5%.

**Key words:** grape seeds; proanthocyanidins; TLCS; stability; proanthocyanidins microcapsule

在上文“葡萄籽原花青素的分离纯化及自由基淬灭活性的研究(上)”中, 我们用有机溶剂梯度法及酶法提取了葡萄籽原花青素, 过大孔树脂柱获取 40% 乙醇组分, 并经制备薄层色谱法纯化得到了单体及二聚体, 经香草醛-盐酸法<sup>[1,2]</sup>测得乙酸乙酯和乙醚组中原花青素单体的百分含量分别为 33.25% 和 60.64%。

香草醛-盐酸法<sup>[1,2]</sup>是测定葡萄籽原花青素的传统方法, 但最近屡见报道的薄层扫描法<sup>[3]</sup>因操作简便, 结果可靠, 无需昂贵设备而备受关注。本实验中我们计划用薄层扫描法进一步确认上文中香草醛-盐

收稿日期: 2006-12-12

作者简介: 马庆一(1944-), 男, 教授, 研究生导师, 博士后, 研究方向: 天然抑菌剂, 天然抗氧化剂, 可食性涂膜保鲜, 食品功能基料及保健食品等

酸法葡萄籽原花青素测定结果。稳定性是葡萄籽原花青素应用的核心问题, 因而利用分光光度法考查 pH 值、温度、加热时间、光照、抗坏血酸、亚硫酸氢钠处理对其稳定性的影响。鉴于保护和缓释在原花青素应用中的特殊作用, 我们还设计了其微胶囊制备的实验。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

721 紫外可见分光光度计; ZFQ85A 旋转蒸发器; GL-18C 高速台式离心机; CS-9301 薄层扫描仪。

葡萄籽: 购自明权葡萄酒厂; DPPH·(1, 2-二苯基-2-苦肼基): Fluka Chemie GmbH Sigma-Aldrich; 原

花青素单体标准品:天津尖峰天然产物研究开发公司;其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 薄层扫描法测定乙醚、乙酸乙酯组中原花青素单体含量

#### 1.2.1.1 薄层扫描条件

使用 CS-9301 薄层扫描仪,扫描板选用 10×20 cm 玻璃板,展开剂体系:甲苯-丙酮-冰乙酸(V<sub>甲苯</sub>:V<sub>丙酮</sub>:V<sub>冰乙酸</sub>=2:2:1),显色剂:硫酸-香草醛,扫描波长为 490 nm。

#### 1.2.1.2 薄层扫描方法

##### (1) 标准溶液配制

将原花青素的标准品配成 7.90 mg/mL 的标准溶液。

##### (2) 显色剂配制

香草醛 3 g,浓硫酸 1 mL,乙醇 100 ml 配成溶液,现配现用。

##### (3) 板的制备与活化<sup>[4]</sup>

称取一定量硅胶 G,溶于含有 1%羧甲基纤维素的水中,涂布于洁净的 10×20 cm 的玻璃板上,阴干,110 °C 活化 1 h。

##### (4) 层析操作

用标准定量点样管点样,在展开缸中展开,展距达 10 cm 时,取出吹干,用浓硫酸-香草醛喷雾法显色。

##### (5) 扫描

用薄层扫描仪扫描硅胶板上样品斑点的吸收光谱,找出最大吸收波长,并定其为扫描波长。

### 1.2.2 葡萄籽低聚原花青素稳定性的研究

利用分光光度法分别研究 pH 值、加热温度、加热时间、光照、抗坏血酸、亚硫酸氢钠对原花青素加工稳定性的影响。

### 1.2.3 低聚原花青素微胶囊制备<sup>[5,6]</sup>

取 3 份 10 g β-环糊精分别溶于 50 °C 100 mL 50% 乙醇溶液中,分别记为 A<sup>#</sup>、B<sup>#</sup>、C<sup>#</sup>,再分别加入 50 mL、20 mL 和 10 mL 原花青素粗提液,搅拌 4 h,自然冷却,0 °C 保持 16 h,过滤,反复用乙醇洗涤后干燥即得原花青素微胶囊。

原花青素微胶囊产率(%)=(产品的原花青素含量/加入的原花青素的总量)\*100%

原花青素微胶囊效率(%)=(1-微胶囊的表面原花青素的含量/产品总的原花青素含量)\*100%

## 2 结果与讨论

### 2.1 薄层扫描定量测定上文梯度提取的乙酸乙酯、乙醚组中原花青素单体的含量

#### 2.1.1 原花青素单体标准曲线

取 7.90 mg/mL 原花青素单体标准溶液 0.5 μL、1 μL、2 μL、3 μL、4 μL、5 μL 在同一硅胶板上点样,每两点间距 13.0 mm,展开后经扫描发现前 5 个点线性较好,其标准曲线如图 1,其线性回归方程为  $y=3410x+266.92$ ,  $R^2=0.9985$ ,线性范围为 0~31.6 μg。

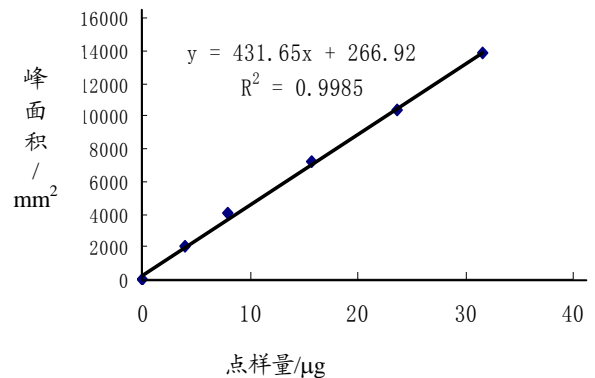


图 1 原花青素单体标准曲线

#### 2.1.2 精密度(重现性)和稳定性实验

取原花青素单体标准溶液 6 份各 1 μL,在同一板上点样、展开、显色、扫描,结果如表 1,计算 6 次相对值的相对标准偏差为 1.83%。

表 1 薄层扫描定量分析精密度实验

编号	1	2	3
峰面积/(mm <sup>2</sup> )	38515.785	39283.895	37126.896
编号	4	5	6
峰面积/(mm <sup>2</sup> )	38492.336	38486.984	38588.459

对上述样点,隔一定时间扫描一次,结果如表 2。

表 2 薄层扫描定量分析稳定性实验

时间/min	0	5	10
面积/(mm <sup>2</sup> )	38515.785	38452.189	37451.111
时间/min	15	20	23
面积/(mm <sup>2</sup> )	36411.172	35396.715	34945.621

结果表明,显色后 5 min 内较稳定,随后稳定性随时间的增加成线性下降,因此,如果在同一块板上展开几乎不影响扫描。

#### 2.1.3 薄层扫描测定乙酸乙酯、乙醚组中原花青素单体的含量

用外标两点法测定:取原花青素单体标准溶液 1 μL 和 3 μL,5 μL 乙酸乙酯组分(6.87 mg/ml)和乙醚组分(10.92 mg/ml)各 4 份在同板点样,展开,显色。5 μL 乙酸乙酯组分(6.87 mg/ml)和乙醚组分(10.92 mg/ml)的扫描结果分别见表 3 和表 4。

表3 梯度提取的乙酸乙酯组中原花青素单体含量测定

编号	1	2	3	4	平均
含量/ $\mu\text{g}$	10.009	9.938	9.804	10.120	9.968
百分含量/%	29.14	28.93	28.54	29.46	29.02

表4 梯度提取的乙醚组中原花青素单体含量测定

编号	1	2	3	4	平均
含量/ $\mu\text{g}$	32.05	32.34	33.64	32.97	32.75
百分含量/%	58.7	59.23	61.61	60.38	59.98

从表3、表4知,梯度提取的乙酸乙酯和乙醚组中原花青素单体含量分别为29.02%、59.98%,同上文用与香草醛一盐酸法测定结果(33.25%和60.64%)基本一致。

实验过程中影响薄层扫描的因素很多:(1)斑点显色是否稳定,如果显色不均匀或不稳定将直接影响测量的准确性。最好以对照品与样品同板展开、显色、测定,另外也可在显色后放置2h,待稳定后再扫描。

(2)点样的准确性,点样的准确性受人为影响较大,用定量毛细管容易操作,但样点直径较大,不易控制,因此要用平头微量注射器来点样。(3)展开温度,一般来讲薄层展开对温度要求不高(室温即可),但原花青素的极性较大,在展开过程中容易扩散,影响扫描,最好在0℃展开,可减少扩散。

## 2.2 葡萄籽中低聚原花青素稳定性实验

### 2.2.1 pH的影响

配制不同pH值(2.06、3.95、5.04、6.20、8.00、10.03)的葡萄籽原花青素溶液(2mg/ml),各取5ml,分别于60℃加热60min,然后测定其保存率及各组活性,结果见图2。结果表明,pH值为2.06时,葡萄籽低聚原花青素热稳定性最好,pH在2~6之间变化时,热稳定性变化不大,pH值为碱性时稳定性较差。酸性条件有利于原花青素的保存。pH为2.06时,原花青素的保存率最高但活性较低,原花青素存放pH应控制在3~5之间。

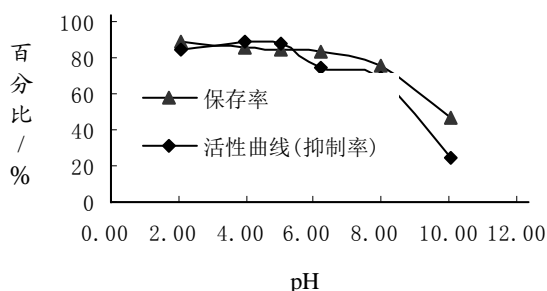


图2 pH值与原花青素保存率和活性的关系

### 2.2.2 温度、时间对原花青素稳定性的影响

取5mL pH 5.04的葡萄籽原花青素溶液(2

mg/ml) 5份,分别在20、40、60、80、100℃下加热60min,测得葡萄籽原花青素保存率见图3。在同样浓度与pH下,100℃加热不同时间,测得葡萄籽原花青素保存率见图4。

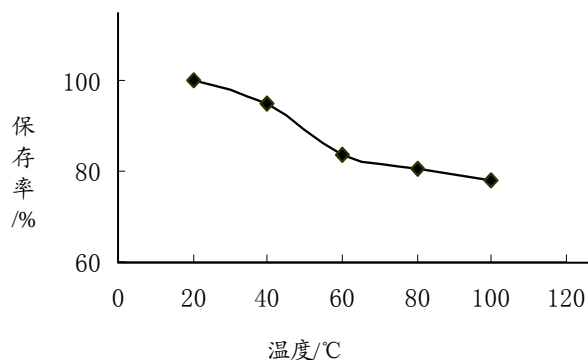


图3 温度对原花青素稳定性的影响

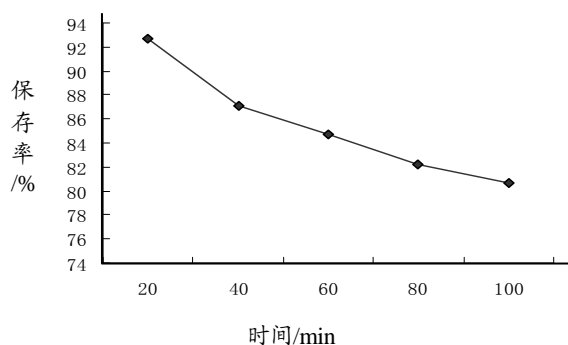


图4 时间对原花青素稳定性的影响

由图3、4可看出:长时间高温加热不利于原花青素的保存,在热处理过程中应尽可能地减少处理时间,降低处理温度。

### 2.2.3 光照对原花青素稳定性影响

取5mL pH 5.04的葡萄籽原花青素溶液(2mg/ml) 5份,分别在不同光照下存放2d后,测定葡萄籽原花青素保存率,结果见图5。实验表明低温避光有利于原花青素的保藏。

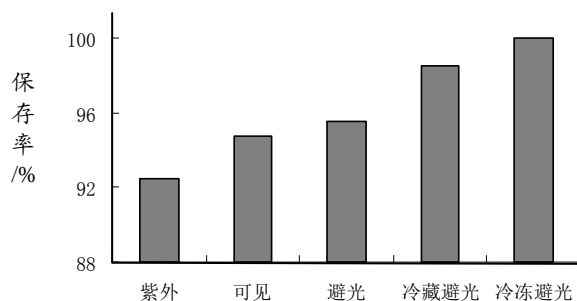


图5 不同光照条件对原花青素稳定性的影响

### 2.2.4 添加物对原花青素稳定性的影响

取5mL pH 5.04的葡萄籽原花青素溶液(2mg/ml) 10份,分别添加不同浓度的Vc、亚硫酸氢钠,并在

100 °C下加热 60 min, 葡萄籽热稳定性的影响试验结果见表 6 和表 7。

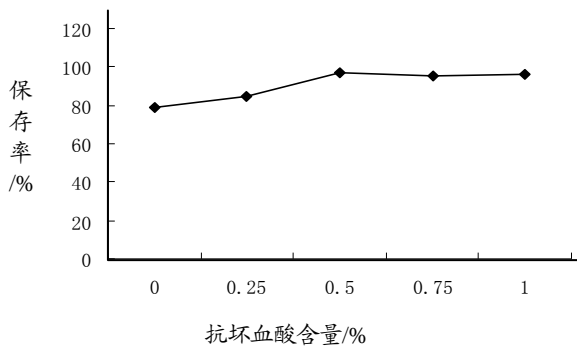


图 6 抗坏血酸对原花青素稳定性的影响

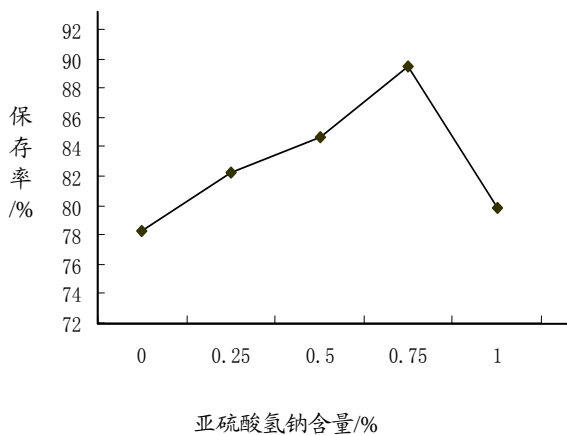


图 7 亚硫酸氢钠对原花青素热稳定性的影响

从图 6 和 7 试验结果可以得知, 随  $V_C$  浓度的加大原花青素稳定性提高, 浓度达到一定程度, 稳定性提高趋势减弱, 添加 0.75% 亚硫酸氢钠对原花青素的保护作用最强。

### 2.3 低聚原花青素微胶囊制备

用  $\beta$ -环糊精作微胶囊包覆材料, 对使用不同芯材和壁材比例的低聚原花青素微胶囊进行研究。它们的包合效率和产率载于表 5。

如表 5 所示, 随着壁材和芯材比例的增加, 原花青素的产率几乎不变, 但其效率却随着壁材和心材比例的增加而增加。当  $\beta$ -环糊精用量为 10 g, 提取物用

量为 0.189 g 时, 微胶囊产率和包合效率分别为 80.4% 和 20.5%, 由此数据足见  $\beta$ -环糊精包合制备微胶囊的工艺有待改进。

表 5 低聚原花青素微胶囊试验结果

$\beta$ -环糊精用量/g	10	10	10
提取物用量/g	0.945	0.378	0.189
产品总原花青素含量/g	0.779	0.307	0.152
微胶囊表面原花青素含量/g	0.699	0.253	0.121
原花青素微胶囊产率/%	82.4	81.2	80.4
原花青素微胶囊效率/%	10.3	17.6	20.5

## 3 结论

3.1 薄层扫描结果显示: 梯度提取的乙酸乙酯、乙醚组中原花青素单体含量分别为 29.02% 和 59.98%, 同上文用与香草醛一盐酸法测定结果 (33.25% 和 60.64%) 基本一致。

3.2 低 pH 值(3~5)、避光、室温 (20 °C) 有利于原花青素的保存, 添加 0.6% 的抗坏血酸或 0.75% 亚硫酸氢钠对原花青素有很强的保护作用。

3.3  $\beta$ -环糊精、提取物用量为 10 g 和 0.189 g 时, 微胶囊产率和包合效率分别为 80.4% 和 20.5%。 $\beta$ -环糊精包合制备微胶囊工艺有待改进。

## 参考文献

- [1] 姚开, 何强等. 葡萄籽提取物原花青素含量的不同测定方法比较[J]. 化学研究与应用, 2002, 14(2): 230-232.
- [2] 李春阳, 许时婴等. 香草醛一盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25 (2): 157-160.
- [3] Lawrence J P, Lianana N H, Back G C. Phytochemistry, 1986, 25(1):223-230.
- [4] 北京大学. 有机化学实验[M]. 北京大学出版社
- [5] 宋健, 陈磊. 微胶囊化技术应用[M]. 化学出版社, 2001.
- [6] 王可兴, 潘思秩等. 原花青素微胶囊工艺及稳定性研究[J]. 食品科学, 2003, 8(24): 88-91

(上接第16页)

- [2] 刘晓艳, 邱泰球, 黄卓烈等. 不同方法对酵母细胞膜通透性的影响[J]. 华南农业大学学报(自然科学版) 2004, 25(1): 74-76
- [3] 连喜军, 王昌禄, 顾晓波等. 酪蛋白水解物和吐温-80对红曲

红色素发酵的影响[J]. 食品科技. 2003, 4: 8-11

- [4] J.L. Casas L'opez et al. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus* [J] Journal of Biotechnology, 2005, 116: 61-77