

动态监测三种儿茶素单体清除 自由基能力

刘彦霞, 田 强

(北京联合大学应用文理学院, 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

摘要:以Trolox为参照物, 动态监测葡萄籽中所富含的儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)清除ABTS⁺与DPPH·自由基的过程, 比较三种儿茶素单体体外清除自由基的能力。结果显示在两种反应体系中, 对于同一样品, 随着浓度增大其自由基清除能力增强; Trolox与自由基反应达到平衡所需时间最短, 但其自由基清除率低于ECG, 两种反应体系中Trolox与EC、C清除自由基的能力大小顺序不同。总体来看, 三种儿茶素单体清除自由基的能力ECG>EC>C。

关键词:儿茶素, DPPH·, ABTS⁺

Comparing the capacity of three kinds of catechins in scavenging free radicals

LIU Yan-xia, TIAN Qiang

(Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Foods, College of Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: The *in vitro* scavenging capacity of (+)-Catechin(C), (-)-Epicatechin(EC) and (-)-Epicatechin-3-O-gallate(ECG) were compared, by monitoring the scavenging rate of DPPH· and ABTS⁺, with the Trolox as the reference. The result showed that, for the same sample, the radical scavenging rate increased with its concentration increasing. Trolox reached equilibrium with the shortest time, but its ability of scavenging free radical was below that of ECG. Trolox, C, and EC were in different order in two reactive systems. In general, the free radical scavenging capacity of these three kinds of catechins was in the order of ECG>EC>C.

Key words: catechins; DPPH·; ABTS⁺

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)06-0136-05

研究发现, 体内自由基过量是诱发多种疾病的根源, 利用抗氧化剂清除多余的自由基, 有益于疾病的预防及治疗^[1]。儿茶素类物质广泛存在于植物界, 葡萄与茶叶中此类物质含量最为丰富。此类物质由于分子中具有连(或邻)苯酚基结构具有强抗氧化活性^[2-3]。茶叶中儿茶素类物质主要有表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(ECG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)和表没食子儿茶酸酯(EGCG), 其中EGCG的含量最高。有关EGCG、EC、EGC、ECG抗氧化能力进行研究的文献报道较多^[4-6], 一般认为酯型儿茶素的抗氧化能力较简单儿茶素强, 但不同体系研究结果不一致。在较早的研究中, 梁钢等利用维生素C-NADPH诱发的脑、肝、肾微粒体的脂质过氧化体系对EGCG、EC及ECG的抗氧化能力进行研究, 发现其中EGCG作用

最强, EC次之, 而ECG作用最弱^[7]; 涂云飞等利用二次通用旋转回归设计对儿茶素各成分清除羟自由基能力进行比较发现, ECG>EC>EGCG^[8]。

葡萄籽是葡萄酒生产企业主要的副产品, 其中所含有的儿茶素单体类物质主要有儿茶素(C)、EC、EGCG^[9]。茶叶中针对儿茶素类物质清除自由基能力的研究能够为葡萄籽中此类物质的应用提供参考, 但鉴于两种原料所含儿茶素种类不同, 且研究结果有待进一步分析, 所以葡萄籽中儿茶素物质抗氧化活性仍需要进一步的研究。DPPH·、ABTS⁺分别为稳定的脂溶性与水溶性自由基, 常被用于抗氧化剂清除自由基能力的检测^[10-11], 但不同物质因结构不同, 与DPPH·、ABTS⁺反应速率不同, 因此反应到达平衡的时间也存在差异, 因此用固定时间清除率或EC₅₀值(自由基清除率为50%时所需样品浓度)表示可能会判断错误^[12]。本文以抗氧化剂Trolox作为参考, 对葡萄籽中富含的三种儿茶素单体C、EC、ECG清除自由基的能力进行动态监测, 以期对葡萄籽中此类物质的开发利用及功能食品的功能评价方法研究提供素材。

收稿日期: 2013-07-19

作者简介: 刘彦霞(1976-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 保健食品功能评价。

基金项目: 北京市教委重点实验室引导基金项目。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯对照品(纯度>98%) 购于中国药品生物制品检定所; ABTS⁺[2, 2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], DPPH•[2, 2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl], Trolox [6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid] 购于Aladdin公司。

UV-2450型紫外可见分光光度计 日本SHIMADZU公司; 荣华HH-4型数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制

1.2.1.1 DPPH•法标准曲线的制作 配制浓度分别为0.05、0.0375、0.0250、0.0125、0.0062、0.0031mg/mL的DPPH•乙醇溶液, 检测各浓度DPPH•溶液在517nm下的吸收值, 每个浓度重复3次, 取平均值。以DPPH•浓度为横坐标, 517nm下的吸收值为纵坐标做标准曲线。

1.2.1.2 ABTS⁺标准曲线的制作 配制浓度分别为0.07、0.0525、0.0350、0.0175、0.00875、0.00437mg/mL的ABTS⁺水溶液, 检测各浓度ABTS⁺溶液在734nm下的吸收值, 每个浓度重复3次, 取平均值。以ABTS⁺浓度为横坐标, 734nm下的吸收值为纵坐标做标准曲线。

1.2.2 样品溶液的配制

1.2.2.1 Trolox样品溶液 用十万分之一天平准确称取Trolox 20mg, 溶解于少量95%乙醇并定容于50mL, 用95%乙醇稀释至浓度为0.05、0.025、0.0125mg/mL。

1.2.2.2 C、EC、ECG样品溶液 方法参考1.2.2.1。

1.2.2.3 ABTS⁺工作液 配制方法参考刘薇等^[13]。

1.2.3 样品的测定步骤

1.2.3.1 DPPH•法 于3mL 0.05mg/mL DPPH•溶液中分别加入0.5mL不同浓度的EC、C、ECG、Trolox溶液, 反应总体积为3.5mL, 在517nm处测定随时间变化的吸收值的动力学趋势, 每30s取值1次, 至1h。记录吸收值(A_T), 同时测定3mL DPPH•工作液中加入0.5mL 95%乙醇溶液的吸收值(A₀), 每个浓度3次重复。按表1测定。

表1 DPPH•法样品测定的步骤

Table 1 Steps of measuring the samples' capacity of scavenging DPPH•

溶液(mL)	空白管	样品管
DPPH•工作液	3.0	3.0
样品	-	0.5
无水乙醇	0.5	-

混匀后, 在517nm波长处以95%乙醇调零比色测定其吸光度

DPPH•自由基清除率计算方法参考李小飞等^[14], 稍作调整:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{[(A_T - A_0) - b] \times 3.5}{3 \times 0.05a} \right)$$

式中, a、b分别为DPPH•标准曲线中的斜率与截距。

1.2.3.2 ABTS⁺法 向4.5mL 0.07mg/mL ABTS⁺溶液中分别加入0.5mL不同浓度的EC、C、ECG、Trolox溶液, 反应总体积为5mL, 在734nm处测定随时间变化的吸收值的动力学趋势, 每30s取值1次, 至1h。记录吸收值(A_T), 同时测定4.5mL ABTS⁺工作液中加入0.5mL 95%乙醇溶液的吸收值(A₀), 每个浓度3次重复。按表2测定。

表2 ABTS⁺法 样品测定的步骤

Table 2 Steps of measuring the samples' capacity of scavenging ABTS⁺

溶液(mL)	空白管	样品管
ABTS ⁺ 工作液	4.5	4.5
样品	-	0.5
无水乙醇	0.5	-

混匀后, 在734nm波长处以蒸馏水调零比色测定其吸光度

ABTS⁺自由基清除率计算方法参考文献李小飞等^[14], 稍作调整:

$$\text{ABTS}\cdot\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{[(A_T - A_0) - d] \times 5}{4.5 \times 0.07c} \right) \times 100$$

式中, c、d分别为ABTS⁺标准曲线中的斜率与截距。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

图1所示分别为DPPH•与ABTS⁺两种自由基的标准曲线, 线性关系均达到0.999, 可以用于定量分析。

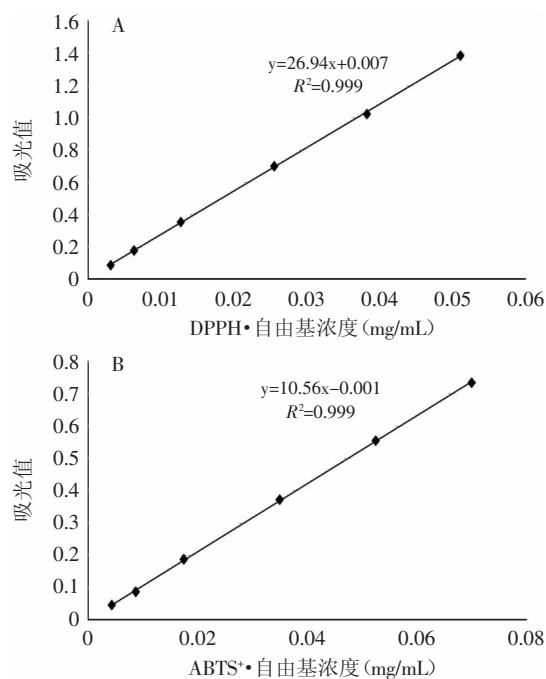


图1 自由基浓度-吸光值标准曲线

Fig.1 Standard concentration-absorbance curve

注: A: DPPH•; B: ABTS⁺。

2.2 动态监测三种儿茶素对自由基的清除能力

2.2.1 动态监测儿茶素清除DPPH·自由基能力

DPPH·自由基是一种稳定的以氮为中心的自由基,在517nm波长处有最大吸收。DPPH·乙醇溶液呈紫色,其浓度与吸光度呈线性关系。在DPPH·乙醇溶液中加入被测物质,被测物质中的抗氧化成分会与DPPH·自由基结合,使DPPH·自由基数量减少,溶液颜色变浅,在517nm波长处的吸光度不断下降,直至达到稳定。

图2~图4分别表示样品浓度分别为0.05、0.025、

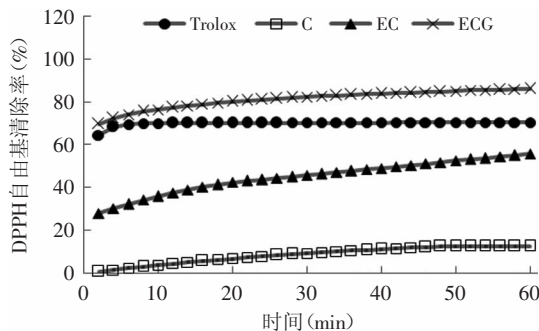


图2 样品浓度为0.05mg/mL时各样品对DPPH·自由基清除率随时间的变化

Fig.2 Change of DPPH· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.05mg/mL

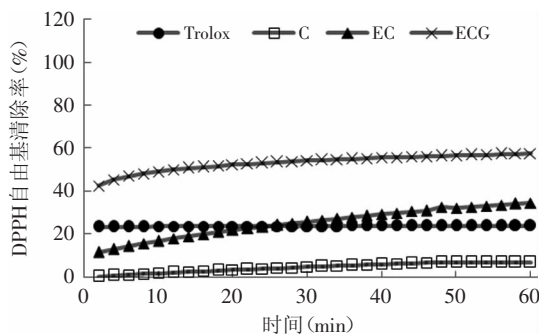


图3 样品浓度为0.025mg/mL时各样品对DPPH·自由基清除率随时间的变化

Fig.3 Change of DPPH· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.025mg/mL

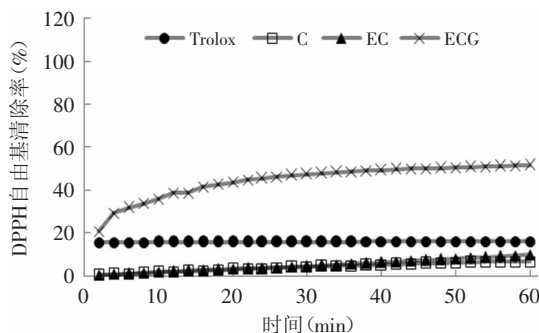


图4 样品浓度为0.0125mg/mL时各样品对DPPH·自由基清除率随时间的变化

Fig.4 Change of DPPH· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.0125mg/mL

0.0125mg/mL时,Trolox、C、EC、ECG对DPPH·自由基清除率随时间变化的情况。

每种物质在不同浓度时对于DPPH·自由基的清除率不同,并随着浓度的增高而变大,存在一定的量效关系。Trolox反应达到平衡所需时间较短,在较低的两个浓度下,2min内达到平衡,浓度较高时,于6min之前达到平衡。当样品浓度不同,反应到达平衡时的清除率分别为:当浓度为0.0125mg/mL时,其DPPH·自由基清除率约15%;浓度为0.025mg/mL时,清除率约24%;在浓度为0.05mg/mL时,清除率约70%。C、EC、ECG的DPPH·清除率达到平衡所需时间较长,在60min之内始终显示逐渐增大的趋势。在反应进行到60min时,EC的DPPH·清除率在低中高三个浓度下分别为:约10%、35%、56%;ECG的DPPH·清除率在两个较低浓度时达到50%,在最高浓度时达到86%。在三个浓度下,ECG清除DPPH·自由基的清除率最高,Trolox的DPPH·清除率在最高与最低浓度时都仅次于ECG,高于EC、C,但在中间浓度时EC的自由基清除能力在30min之前低于Trolox,而此后超过了Trolox。三种儿茶素中C的清除DPPH·自由基的能力最弱,在最高浓度达到平衡时其DPPH·清除率约12%。三种儿茶素清除DPPH·自由基的能力ECG>EC>C。

2.2.2 动态监测儿茶素清除ABTS⁺·自由基能力

ABTS⁺·是经过硫酸钾氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基,其水溶液最大吸收波长为734nm。向该反应体系中加入被测物质,如果被测物质中存在抗氧化成分,抗氧化成分会与ABTS⁺·发生反应而使ABTS⁺·在734nm的吸光值降低。

图5~图7分别表示样品浓度分别为0.05、0.025、0.0125mg/mL时,Trolox、C、EC、ECG对ABTS⁺·自由基清除率随时间变化的情况。

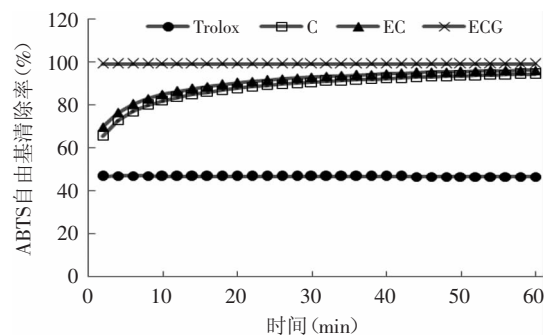


图5 样品浓度为0.05mg/mL时各样品对ABTS·自由基清除率随时间的变化

Fig.5 Change of ABTS⁺· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.05mg/mL

每种物质在不同浓度时对于ABTS⁺·自由基的清除率不同,并随着浓度的增高而升高,存在一定的量效关系。Trolox在三个浓度梯度下都是在2min之内就达到了平衡,其ABTS⁺·自由基的清除率始终低于三种儿茶素。Trolox的浓度不同,当反应达到平衡时对ABTS⁺·自由基的清除率也不同,在浓度为0.0125mg/mL

时,其ABTS⁺·自由基清除率约14%;浓度为0.025mg/mL时,清除率约27%;在浓度为0.05mg/mL时,清除率约47%。在两个较低浓度下,C、EC、ECG三者的ABTS⁺·自由基清除率变化情况相似,ECG与EC清除率变化曲线几乎重叠,二者对ABTS⁺·自由基清除率高于C,样品浓度为0.025mg/mL时,ECG与EC都在10min之内达到反应平衡。在样品浓度为0.05mg/mL时,儿茶素与表儿茶素自由基清除率随时间的变化曲线几乎重叠,在反应2min时清除率为65%左右,而至反应60min时清除率达到95%左右。ECG在浓度为0.05mg/mL时于2min之内自由基清除率达到最大99%。总体来说,三种儿茶素清除ABTS⁺·自由基的能力ECG>EC>C,这与以往酯型儿茶素抗氧化能力强于简单儿茶素的观点相一致。李华等^[15]曾从分子中相关原子所带净电荷及活性中心原子的键长来分析分子活性,分子活性中心净电荷值越大,分子活性越强;分子中活性中心原子的键长越长,易脱氢,因此越活泼。Trolox在两种自由基体系中反应达到平衡所需时间较儿茶素类物质短,但在相同浓度下,对于DPPH·与ABTS⁺·两种自由基,其清除能力均较ECG弱;在ABTS⁺·这种水溶性的自由基体系中,Trolox清除自由基的能力低于C、EC,而在DPPH·这种脂溶性体系中,其清除自由基的能力强于C与EC,这一结果可能与反应体系及抗氧化剂的分子结构不同有关,在不同反应体系中,抗氧化剂供氢或电子转移的速度表现也不同。

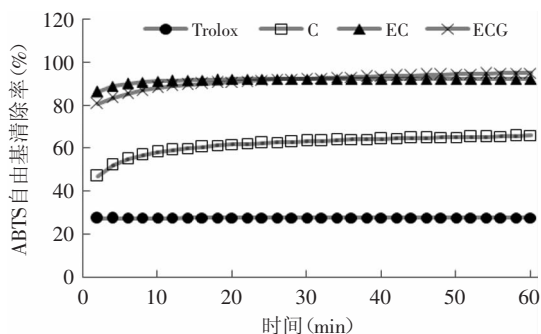


图6 样品浓度为0.025mg/mL时各样品对ABTS⁺·自由基清除率随时间的变化

Fig.6 Change of ABTS⁺· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.025mg/mL

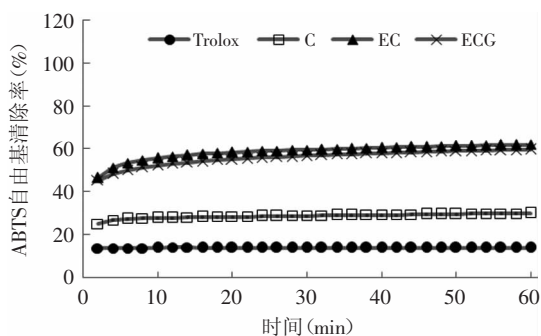


图7 样品浓度为0.0125mg/mL时各样品对ABTS⁺·自由基清除率随时间的变化

Fig.7 Change of ABTS⁺· radical scavenging rate of samples with concentration of 0.0125mg/mL

3 结论

本研究运用DPPH·、ABTS⁺·两种自由基反应体系对儿茶素单体清除自由基能力进行监测发现:不同物质清除同一种自由基时达到反应平衡的时间不同,在本实验中,Trolox在两种自由基反应体系中达到反应平衡所需时间都最短;同一种物质,不同浓度达到反应平衡时的清除率也不同,如对于同一种儿茶素,样品浓度增大其自由基清除能力增高。因此,在对不同物质的抗氧化能力进行对比时,要在相同浓度条件下,反应都能达到平衡时的自由基清除率相比较才有可比性。此实验中,在两种自由基反应体系中,ECG在各浓度水平下自由基清除能力都最强,EC自由基清除率高于C,因此总体来看,三种儿茶素单体清除自由基的能力ECG>EC>C,酯型儿茶素抗氧化能力强于儿茶素单体的结果与以往研究相一致,EC清除自由基强于可能与其构型有关,其作用机理仍然需要研究。

参考文献

- [1] EI-Mowafy AM, Salem HA, AL-Gayyar MM, *et al.* Evaluation of renal protective effects of the green-tea(EGCG) and red grape resveratrol:role of oxidative stress and inflammatory cytokines[J]. Natural Product Research:Formerly Natural Product Letters, 2011, 25(8): 850-856.
- [2] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids[J]. Fitoterapia, 2011, 82: 513-523.
- [3] Szeto Y T, Lee K Y, Kalle W, *et al.* Protective effect of grape seed extracts on human lymphocytes: a preliminary study[J]. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 2013, 38 (3): 275-279.
- [4] 赵文红, 邓泽元, 范亚苇, 等. 儿茶素体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(12): 278-282.
- [5] Xiao J, Wang Y, Yang F. EGCG Enhanced the antioxidant potential of purified fractions from crude tea polysaccharides[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2012, 53: S90.
- [6] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications[J]. Biochemical Pharmacology, 2011, 82(12): 1807-1821.
- [7] 梁钢, 黄志明, 洪息君. 儿茶素三种成分的抗氧化作用研究[J]. 广西医科大学学报, 1998, 15(1): 7-9.
- [8] 涂云飞, 杨秀芳, 孔俊豪, 等. 儿茶素及茶黄素单体间清除羟自由基能力研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 653-659.
- [9] Liu Y X, Pan Q H, Yan G L, *et al.* Changes of Flavan-3-ols with different degrees of polymerization in seeds of 'Shiraz', 'Cabernet Sauvignon' and 'Marselan' grapes after veraison[J]. Molecules, 2010, 15(11): 7763-7774.
- [10] Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2010, 49: 503-515.
- [11] 马庆一, 宋彦显, 赵松涛. 葡萄籽原花青素的分离纯化及

(下转第145页)

和壳中的挥发性成分含量,结果表明,香辛料中含有的挥发性成分保留在葵瓜子壳和仁中的含量不同。仅保留在香瓜子仁中的香辛料成分有庚醛、桉烯、松香芹酮等21种;而仅保留在葵瓜子壳中香辛料中挥发性成分有异戊酸、坎烯、 α -石竹烯等31种;葵瓜子仁和壳中发现的相同的挥发性成分如桉树醇、芳樟醇、丁香酚等20种在仁中的含量高于壳,而柠檬烯、茴香脑、姜烯等16种挥发性成分在壳中的含量高于仁。其中由香辛料带入的主要挥发性成分在壳和仁中的含量有明显差异(见图2)。不同香辛料中挥发性成分在瓜子壳和仁的保留量不同,主要原因可能是瓜子壳和瓜子仁中的组织结构不同和化学成分的差异引起的,反应了不同的香气成分保留在生葵瓜子仁和壳中的难易程度不同。在对香瓜子生产工艺进行改进时,有必要结合相关香气化合物特性、葵瓜子仁的组织结构和壳的结构,来提高香辛料的利用率和香瓜子的品质。

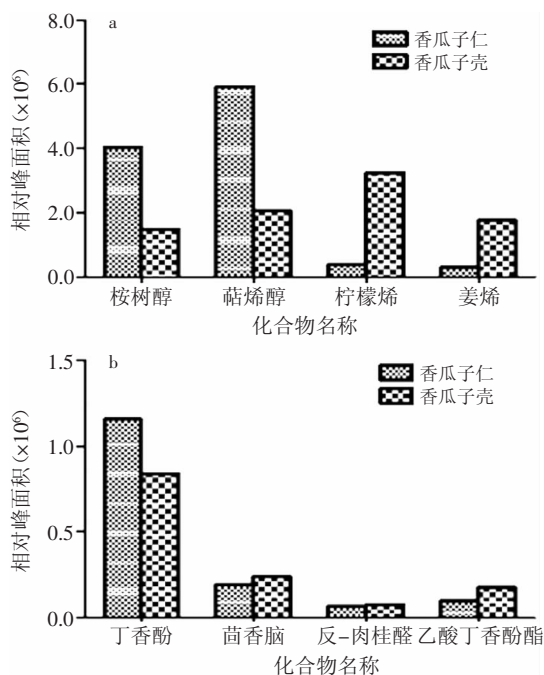


图2 洽洽香瓜子(壳、仁)中几种主要挥发性成分含量比较
Fig.2 The contents of the several major volatile components in Qiaqia aroma sunflower seeds (in-shell, kernel)

3 结论

本文采用SDE方法提取,结合GC-MS分离鉴定了原料葵瓜子和洽洽香瓜子的挥发性香气成分,比

较了不同的香气成分在葵瓜子仁和壳中的保留量。洽洽香瓜子经过“百煮”工艺,使得香辛料中的部分挥发性成分进入葵瓜子仁中,形成洽洽香瓜子的特殊品质。不同的香气成分在生葵瓜子仁和壳中保留量有差异,反映了保留的难易程度不同。对香瓜子生产工艺进行改进时,有必要结合相关香气化合物特性、葵瓜子仁的组织结构和壳的结构,来提高香辛料的利用率和香瓜子的品质。

参考文献

[1] 赵国平,戴慎,陈仁寿. 中药大辞典[M]. 第二版. 上海:上海科学技术出版社,2006:1907-1909.

[2] USDA. National Nutrient Database for Standard Reference [Z]. 2003:7.

[3] Hu FB, Willett WC. Optimal diets for the prevention of coronary heart disease[J]. Journal of the American Medical Association, 2002, 288(20):2569-2578.

[4] 李桂花,何巧红,杨君. 一种提取复杂物质中易挥发成分的有效方法——同时蒸馏萃取及其应用[J]. 理化检验:化学分册, 2009, 45(4):494-496.

[5] Watkins PJ, Rose G, Warner RD, et al. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) with simultaneous distillation-extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in heated beef and sheep fats[J]. Meat Science, 2012, 91(2):99-107.

[6] Búez D, Morales D, Pino J A. Volatiles from Michelia champaca flower: comparative analysis by simultaneous distillation-extraction and solid phase microextraction[J]. Nat Prod Commun 2012, 7(5):659-660.

[7] 陈海涛,张宁,孙保国. SPME或SDE结合GC-MS分析贾永信十香酱牛肉的挥发性风味成分[J]. 食品科学, 2012, 33(18):171-175.

[8] 谢建春. 现代香味分析技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:70-73.

[9] 贾春晓,毛多斌,孙晓丽,等. 烘烤葵花籽的香气成分分析及最佳烘烤条件研究[J]. 食品工业科技, 2006(8):61-65.

[10] 金宏,公衍玲,赵文英. 丁香挥发油GC-MS特征指纹图谱[J]. 青岛科技大学报, 2007, 28:109-112.

[11] 贾春晓,王瑞玲,毛多斌,等. MAE-HS-SPME联合萃取GC-MS分析肉桂香气成分[J]. 精细化工, 2010, 27:682-687.

[12] 张莉,王晓华,杨天祝. 超临界CO₂流体萃取法提取小茴香挥发油化学成分的研究[J]. 山东化工, 2007, 36(8):36-39.

[13] 孙保国,何坚. 香料化学与工艺学[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:85-87.

[14] 汪正范. 色谱定性与定量[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:142-152.

(上接第139页)

其自由基淬灭活性的研究(上)[J]. 现代食品科技, 2007, 23(4):1-5.

[12] 林恋竹,赵谋明. 反应时间对DPPH·法、ABTS⁺·法评价抗氧化性结果的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(5):63-67.

[13] 刘薇,邱乐,杨婧,等. ABTS与邻二氮菲-Fe³⁺法测定保健

食品抗氧化能力比较分析[J]. 食品工业, 2013, 34(3):120-124.

[14] 李小飞,张伟,薛淑媛,等. 两种测试方法对DPPH分光光度法测试结果的影响[J]. 生物技术, 2007, 17(4):51-53.

[15] 李华,刘玉明. 儿茶素抗氧化活性的构效关系[J]. 化学研究与应用, 2003, 15(4):524-526.