西北林学院学报 2006，21(2)：61～63
Journal of Northwest Forestry University

流动注射-抑制化学发光法测定原花青素的研究

刘步明， 韩志萍， 马亚军

(榆林学院 化学系，陕西 榆林 719000)

摘 要：建立了测定葡萄籽提取物中原花青素的流动注射-抑制化学发光分析方法。本研究是将一定量的原花青素标准液或样品液与 5×10^{-3} mol/L H_2O_2 和 3×10^{-3}mol/L KIO_4 溶液混合，注入到 1×10^{-5}mol/L 鲁米诺载流中，以记录到的峰高定量。在碱性条件下，原花青素对鲁米诺-H_2O_2-KIO_4 体系的化学发光有显著抑制作用，其抑制程度的大小与原花青素的含量成线性关系。方法的线性范围为 0.4～20.0 μg/mL，检出限为 0.05 μg/mL；RSD 为 1.3%。采样频率为 240 次/h。此法快速简便，可方便地用于葡萄籽提取物中原花青素的测定。

关键词：葡萄籽；原花青素；流动注射；化学发光
中图分类号：S718.43 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-7461(2006)02-0061-03

Determination of Oligomeric Procyanidins in Grape Seeds Using Flow Injection Chemiluminescence Inhibition

LIU Bu-ming， HAN Zhi-ping， MA Ya-jun

(*Department of Chemistry，Yulin University，Yulin， Shaanxi* 719000，*China*)

Abstract：To establish a flow injection chemiluminescence inhibition method for determination of oligomeric procyanidins in grape seeds. The flow line of the sample， H_2O_2 and KIO_4 was inserted into luminal carrier solution. The mixed solution was led into the recorded. Oligomeric procyanidins could inhibit the CL reaction of luminal-system in alkaline aqueous solution and the CL emission was inversely correlated with the oligomeric procyanidins concentration. The linear range was 0.4～20.0 μg/mL with a detection limit of 0.06 μg/mL and a relative standard deviation of 1.4%(n=11). The sampling frequency was 240 h. The method is simple ，rapid and can be used for determination of oligomeric procyanidins in grape seeds.

Key words：grape seeds； oligomeric procyanidins； flow injection； chemiluminescence

原花青素(procyanidins PC)属于缩合单宁(condensed tannin)，主要由儿茶素和表儿茶素聚合而成的低聚混合物，广泛分布于植物界，也存在于一些饮料、蔬菜、水果和粮食中，与人类生活和健康密切相关。Jacques M 等于 1951 年首次发现了低聚原花青素(oligomeric procyanidins OPC's)的抗氧化性能[1]，而后又进一步发现葡萄籽中 OPC's 的含量远远高于松树皮，并实现了产业化[2]。近年来，大量事实证明，OPC's 不仅拥有强的抗氧化性能、清除自由基的能力和对人体微循环特殊改善的双重功效，并以其高效、低毒、高生物利用率而著称。关于原花青素的测定方法尚无统一标准，文献报道的有正丁醇－盐酸法、香草醛－盐酸法[3]及铁盐催化比色法[4]等，另外还有薄层层析法[5]、HPLC-MS 法[6]等。用流动注射-抑制化学发光法测定原花青素尚未见文献报道。本文利用原花青素还原，抑制鲁米诺体系的化学发光，在碱性条件下，其抑制程度与原花青素浓度之间呈线性关系。依据此原理，建立了流动注射抑制化学发光法测定原花青素的新方法。该方法有操作简单快速、灵敏度高、检出限低、线性范围宽、自动化程度高等优点。用于实际样品测定，结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

IFFL-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞

收稿日期：2005-08-01 修回日期：2005-09-15
作者简介：刘步明(1958-)，男，陕西清涧人，副教授，主要从事天然保健品的研究。

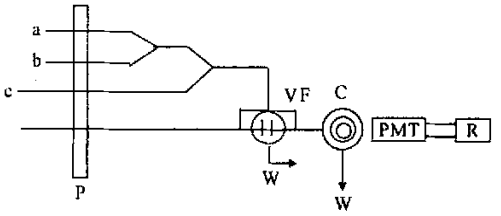
万方数据

科电子设备有限公司);TCL788A 型 PC 机;酸度计;Plus420A(美国 ORION 公司)。

原花青素标准溶液(0.4 mg/mL):准确称取 0.1 g原花青素标准品(99.5%,云南生物资源开发公司提供)用水溶解定容至 250 mL 容量瓶中,使用时用水稀释至所需浓度;1×10^{-2} mol/L 鲁米诺储备液:称取 1.772 g 鲁米诺和 4 g NaOH,用水溶解后转入 1 L 容量瓶中,摇匀,放置 3 d 后使用;1×10^{-5} mol/L 鲁米诺工作液:移取鲁米诺储备 1 mL 于 1 L 容瓶中,用 1 mol/LNaOH 溶液定容;0.1 mol/L H_2O_2 储备:移取 30% H_2O_2 10.21 mL 于 1 L 容量瓶中,加水定容;5×10^{-3} mol/L H_2O_2 标准液:移取 0.1 mol/L H_2O_2 储备液 5 mL 和 1×10^{-2} mol/L EDTA 溶液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中加水定容;3×10^{-3} mol/L H_2O_2 溶液;1×10^{-2} mol/L EDTA 溶液。

以上试剂均为分析纯,水为高沸去离子水。

1.2 试验方法



a. 鲁米诺溶液;b. 样品溶液;c. 双氧水溶液;
P. 蠕动泵;V. 注射阀;F. 流通池
W. 废物;PMT,光电倍增管;R. 计算机采集

图 1 流动注射化学发光分析流路

Fig. 1 Scheme of flow-injection chemiluminescence analysis

由图 1 可知,分别流经 b,c 通道的 H_2O_2 和 KIO_4 溶液混合后进入采样环,在载流的推动下进入流通池,与由 d 通道流入的 Luminol 因扩散而发生化学反应,产生一定波长的光辐射,其化学发光强度 A_d 由计算采集并处理。当去离子水经 a 通道进入采样环时测得的峰高为 Ao,当样品溶液经 a 通道进入采样环时测得的峰高为 As,二者的差值 $\triangle A$($\triangle AI=As-Ao$)与样品浓度成线性关系,据此进行定量测定。

2 结果与分析

2.1 流动注射参数的选择

2.1.1 *采样环体积的影响* 在最佳化学反应条件下,研究 10~200 μL 的采样环体积对测定结果的影响。结果表明,开始随着采样环体积的增加,发光强度也增大,采样环体积为 40 μL 时达到最大,此后随采样环体积的增加,发光强度减小且易产生双峰,这可能是由于采样环体积太大,试剂和试样混合不均匀缘故。故本试验选择采样环体积为 40 μL。

2.1.2 *流速和反应管长度的影响* 在化学发光流动体系中,流速太慢会导致最大发光信号出现在进入流通池之前,流速太快会导致最大发光信号出现在进入流通池之后,都不能被光电倍增管完全检测;同时由于该体系是一个快速化学发光反应,为了避免在进入流通池前化学发光强度达到最大值,故反应管长度应尽可能的短。综合考虑,本文选择流速为 4 mL/min,反应管长为 6 cm。

2.2 反应条件的选择

2.2.1 *反应介质的影响* 鲁米诺的氧化发光反应在碱性介质中进行,且介质的 pH 值会影响氧化剂的电极电位,即影响其氧化能力,从而会影响化学发光强度。本文在固定其他化学试验条件下,试验不同 pH 值对化学发光强度的影响。结果表明(图 2),pH 值在 10~14 范围内,$\triangle I$ 随着 pH 值的增加而增加,当 pH 值为 12.8~13.2 时达到最高且稳定,此后 $\triangle I$ 随着 pH 值的增加开始减小,同时本文考察了 NaOH-Na_2CO_3、NaOH-NaH_2PO_4 和 $NaOH_3$ 种介质对化学发光的影响。结果表明,在 pH 为 13 的 NaOH-Na_2CO_3 介质中,反应发光强度最大。故本文选择用值为 13 的 NaOH-Na_2CO_3 作为反应介质。

2.2.2 *鲁米诺浓度的影响* 结果表明(图 3),鲁米诺浓度在 1×10^{-5} mol/L 时有较大的发光强度,当其浓度大于 1×10^{-5} mol/L 时出现双峰,且发光强度显著下降。故选择鲁米诺的浓度为 1×10^{-5} mol/L。

2.2.3 *H_2O_2 和 KIO_4 浓度的影响* 这 2 种氧化剂的浓度在一定范围内影响发光信号的强度,在原花青素和鲁米诺浓度不变下,不同浓度的 H_2O_2 和 KIO_4 对发光强度的影响如图 4 所示。试验结果表明,随着 H_2O_2、KIO_4 溶液浓度的增加,相对发光强度存在一个极值。当 KIO_4 溶液浓度在 2.8×10^{-3}~3.2×10^{-3} mol/L、H_2O_2 浓度为 5×10^{-3} mol/L 范围内时,发光强度达到最大,大于或小于此浓度,发光强度均减小。故选择 H_2O_2 浓度为 5×10^{-3}mol/L、KIO_4 溶液为 3×10^{-3} mol/L。

2.2.4 *EDTA 浓度的影响* 为了消除金属离子的干扰,H_2O_2 中加入 EDTA 进行掩蔽。试验表明,EDTA 浓度小于 1.5×10^{-3} mol/L 时,反应的发光强度基本不变,高于此浓度时,反应的发光强度略有下降,故选择 1×10^{-3} mol/L 的 EDTA。

万方数据

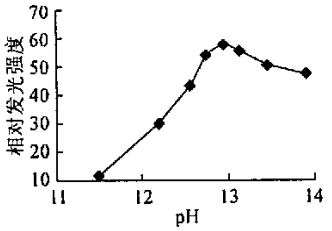


图 2　pH 值对相对发光强度的影响
Fig. 2　Effect of pH on the CL intensity

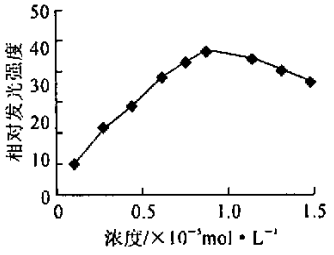


图 3　鲁米诺的浓度对相对发光强度的影响
Fig. 3 Effect of luminol concentration on the intensity

2.3　标准曲线、精密度及检出限

在选定的最佳试验条件下，原花青素浓度与化学发光强度的减小值成良好线性关系，为了提高测定的精密度和准确度，标准曲线按原花青素浓度分 a、b 两段绘制，其线性回归方程为：

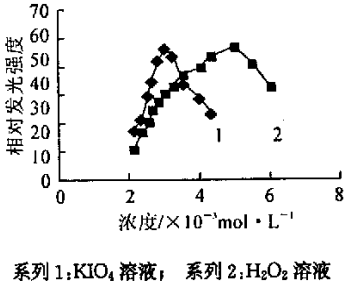
a：原花青素浓度为 0.4～9.0 μg/mL 时，$\triangle A_{cl}=373.52C-18.047$　$r=0.999\ 3$

b：原花青素浓度为 9.0～20.0 μg/mL 时，$\triangle A_{cl}=383.85\ C-854.28$ $r=0.995\ 7$

根据 IUPAC 建议，计算出方法的检出限为 0.06 μg/mL。由上可以看出，a 段的 r=0.999 3，准确度较高，故在实际用中应以 0.4～9.0 μg/mL 浓度为最佳。

2.4　干扰试验

在最佳的试验条件下，本文考察了可能存在的药物赋型剂对原花青素测定的影响（测量误差在 3%以内）。结果表明，20 倍的滑石粉、糊精、硬脂酸镁、淀粉、羟基纤维不干扰；可见药物中常用的添加剂均不干扰本法对原花青素的测定。



系列 1：KIO_4 溶液；　系列 2：H_2O_2 溶液

图 4　H_2O_2、KIO_4 浓度对相对发光强度的影响
Fig 4　Effect of KIO_4 and H_2O_2 concentration on the CL intensity

3　样品测定

3.1　样品处理

准确称取葡萄籽提取物保健药品 5 粒，研细混匀，称取适量（相当于原花青素 160 mg）溶解，定容于 100 mL 容量瓶中，过滤后待测。

3.2　样品测定

取样品溶液 2 mL，按试验方法测定（表 1）。

表 1　样品中原花青素的测定结果及方法回收率

Table 1　Determination rusults of procyanidins and the rate of recovery

样品	表示量	样品含量	加入量 /μg·mL⁻¹	测得量 /μg·mL⁻¹	回收率 /%	RSD %
1	50 /mg·粒	48.7 /mg·粒	0.48 0.96	0.490 0.933	102.1 97.2	1.4
2	95%	96.1%	0.48 0.96	0.485 0.987	101.1 102.8	1.3

1-Grape seed（瑞士中草药有限公司）；2- Grape seed（四川大力天然产物公司）

建立的鲁米诺-H_2O_2-KIO_4 体系在碱性条例下，对原花青素的化学发光有显著抑制作用，其抑制程度的大小与原花青素含量成线性关系，检出限为 0.05 μg/mL，*RSD* 为 1.3%，此法快速，简便，可方便地用于葡萄籽提取物中原花青素的测定。

参考文献：

[1] Guy R C E，Home A W. Extrusion and co-extrusion of cereals [A]. In：Blanshard M V，Mitchell J R，ed. Food Strucure-It's creation and evalution[C]. London：Butterworths 1988.

[2] Myers R. H，Montgomery D，C. Response surface methodology[M]. New York：John Wiley. & Sons，Lnc，1995.

[3] 姚开，何强，吕远平，等. 葡萄籽提取物中原花青素含量不同测定方法的比较[J]. 化学研究与应用. 2002，14(2)：230-232.

[4] 傅武胜，蔡一新，林丽玉，等. 铁盐催化比色法测定葡萄子提取珠中原花青素[J]. 食品与发酵工业，2001，27(10)：57-61.

[5] Lea A G H，The phenoics of cider：oligomers and polymers prrocyanidins[J]. Food Agric Sci，1978，29：471-477.

[6] Rigand J，Escribano B，Prieure M T，et al. Normalphase high-performance liquid chromatoghic speration of procyanidins from cacao beans and grape speeds[J]. Chromatogr，1993，654：255-260.

万方数据