

化学发光法测定原花青素的研究

刘步明

(榆林学院化学与化学工程学院 陕西 榆林 719000)

摘 要: 本文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。利用原花青素还原 ClO^- , 抑制 ClO^- -Luminol 体系的化学发光, 在碱性条件下, 其抑制程度的大小与原花青素的浓度在一定范围内呈现良好的线性关系。该方法线性范围为 $0.08 \sim 19.0 \mu\text{g/ml}$, 检出限为 $0.06 \mu\text{g/ml}$, 11 次测定的 RSD 为 1.2%。本法对样品可直接进行测定, 不需特殊处理。

关键词: 流动注射; 化学发光; 原花青素; 葡萄籽

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

LIU Bu-ming

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yulin College, Yulin 719000, China)

Abstract: To establish a flow injection chemiluminescence (CL) inhibition method for determination of Oligomeric Procyanidins in grape seeds. The flow line of the sample, ClO^- was inserted into Luminol carrier solution. The mixed solution was led into the recorded. Oligomeric Procyanidins could inhibit the CL reaction of Luminol-system in alkaline aqueous solution and the CL emission is inversely correlated with the Oligomeric Procyanidins concentration. The linear range is $0.008 \sim 19.0 \mu\text{g/ml}$ with a detection limit of $0.005 \mu\text{g/ml}$ and a relative standard deviation of 1.2% ($n=11$). The method is simple, rapid and can be used for determination of Oligomeric Procyanidins in grape seeds with a satisfactory result.

Key words: flow injection; chemiluminescence (CL); Oligomeric Procyanidins; grape seeds

中图分类号: 0657.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0250-03

原花青素(Procyanidins, PC)是一种强抗氧化剂和强自由基清除剂, 具有抗氧化、抗自由基损伤等多种生物学功效, 可以清除体内自由基, 减少细胞膜脂质过氧化, 从而降低与自由基有关的疾病的发生, 延缓衰老^[1-2]。关于原花青素的测定方法文献报道的有正丁醇-盐酸法、香草醛-盐酸法^[2]及铁盐催化比色法^[3]等, 另外还有薄层层析法^[4]、HPLC-MS 法^[5]等。大量文献报道, 葡萄籽和松树皮中含有丰富的原花青素, 我国植物资源丰富, 并随着食品加工业的发展, 出现了大量的加工下脚料和废弃物, 为了寻找廉价易得的原花青素资源, 本文利用原花青素对化学发光体系的抑制作用, 采用流动注射-抑制化学发光法对葡萄籽提取物中的原花青素的含量进行了测定, 与文献^[7]相比, 线性范围的下限和检出线均低一个数量级, 本法可直接进行测定, 且测定结果令人满意。

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; $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 鲁米诺储备液: 称取 0.1772 g 鲁米诺和 0.4 g NaOH , 用水溶解后转入 1 L 容量瓶中, 摇匀, 定容, 放置 3 d 后使用; $7 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 鲁米诺工作液: 移取鲁米诺储备 70 ml 于 1 L 容量瓶中, 加入 1.06 g NaCO_3 和适量水, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 为 12, 加水定容; NaClO 溶液: 0.06 mol/L , 使用时新配置。

以上试剂均为分析纯, 水为亚沸高纯去离子水。

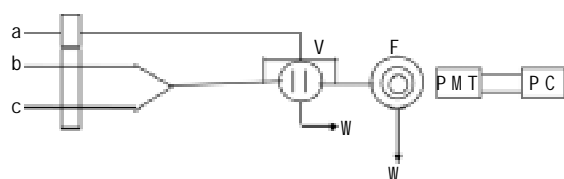
1.2 方法

流动注射化学发光的流路装置如图 1 所示。

分别流经 b, c 通道的 PC 和 ClO^- 溶液混合后进入采样环, 在载流的推动下进入流通池, 与由 a 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

收稿日期: 2005-11-15

作者简介: 刘步明 (1958-), 男, 副教授, 主要从事天然保健品的研究。



a-Luminol solution; b-PC; c-ClO⁻; P-peristaltic pump; V-injecting valve; F-flowing cell; W-waste; PMT-photomultiplier; PC-computer.

图1 流动注射化学发光分析流程图

Fig.1 Scheme of flow-injection chemiluminescence analysis

射, 其化学发光强度 I_{CL} 由计算机采集并处理。当去离子水经 a 通道进入采样环时测得的峰高为 I_0 , 当样品溶液经 a 通道进入采样环时测得的峰高为 I_s , 二者的差值 I ($I = I_s - I_0$) 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 化学发光反应体系的动力学

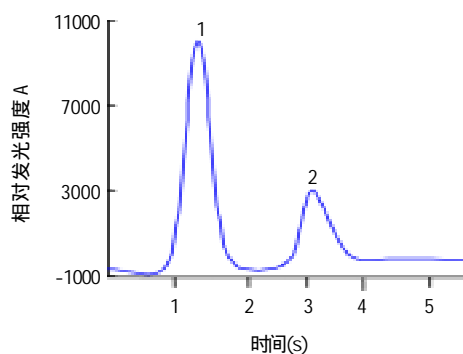


图2 PC-ClO⁻·-Luminol(1)和 ClO⁻·-Luminol(2)的化学发光动力学曲线

Fig.2 Kinetics curve of PC-ClO⁻·-Luminol(1) and -ClO⁻·-Luminol(2)

图2为原花青素加入前后体系的化学发光反应的动力学曲线, 可以看出原花青素对体系有显著的抑制作用, 其动力学过程表明该体系是一个快速发光反应, 注射待测液1s后可观察到发光信号, 2s内发光信号达最大值, 4s后回到基线。

2.2 NaClO 浓度和其稳定性影响

在固定原花青素和 Luminol 浓度的条件下, 考察了不同浓度的 NaClO 对相对化学发光强度的影响。结果如图3所示, 随着溶液浓度的增加, 相对发光强度也增加, 当其浓度在 0.05 ~ 0.08 mol/L 范围时相对发光强度达到最大且趋于稳定。此后相对发光强度开始减小。故本文控制的 NaClO 浓度为 0.06 mol/L。由于 NaClO 的不稳定性, 测定应在 8 h 内完成。

2.3 鲁米诺浓度及 pH 值的影响

在 $0.5 \times 10^{-5} \sim 20.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围内研究了 Luminol

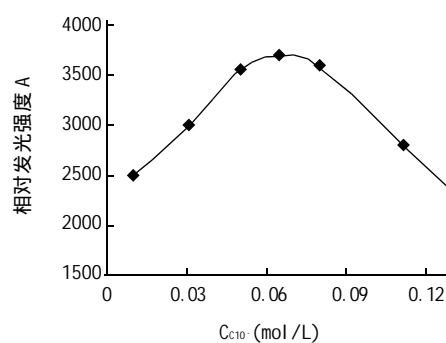


图3 NaClO 值对相对发光强度的影响

Fig.3 Effect of pH on NaClO intensity

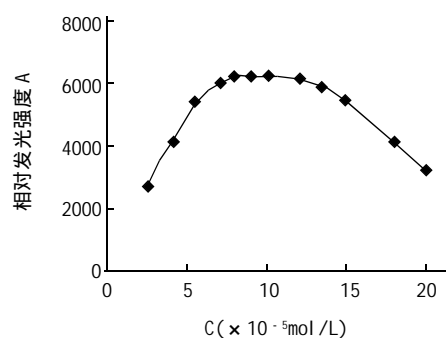


图4 鲁米诺的浓度对相对发光强度的影响

Fig.4 Effect of Luminol concentration on intensity

浓度对相对化学发光强度的影响, I 随着 Luminol 浓度的增加而增大, 当 Luminol 浓度在 $6.0 \times 10^{-5} \sim 8.0 \times 10^{-5}$ mol/L 范围时, I 达到最大, 此后 I 逐渐减小。故本文选择 Luminol 的浓度为 7.0×10^{-5} mol/L。鲁米诺的氧化发光反应需在碱性介质中进行, 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。试验结果表明, 当 pH 在 10 ~ 13 范围内, I 随着 pH 值的增加而增加, 当 pH 值为 11.7 ~ 12.2 时 I 达到最大且稳定, 此后随着值的增加开始减小; 同时本文考察了浓度均为 0.01 mol/L 的 Na₂CO₃-NaOH、NaOH、NaH₂PO₄-NaOH 三种介质对化学发光强度的影响。发现在 pH 为 12 的 0.01 mol/L Na₂CO₃-NaOH 的介质中, 反应发光强度最大。所以选择用 pH 值为 12 的 0.01 mol/L Na₂CO₃-NaOH 作为 Luminol 的反应介质。

2.4 流动注射参数的选择

2.4.1 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 30 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。故本文选择采样环体积为 30 μl。

2.4.2 流速和反应管长度的影响 同文献[7]。

2.5 干扰实验

在最佳实验条件下,可能存在的药物赋型剂对原花青素(16.0 $\mu\text{g/ml}$)测定的影响情况如下:50倍的石粉、糊精、硬脂酸镁、淀粉、羟甲基纤维素均不干扰。

2.6 标准曲线、精密度及检出限

在选定的最佳实验条件下,原花青素浓度与化学发光强度的减小值成良好线性关系,其线性回归方程为:

- a: 原花青素浓度为0.08~2.8 $\mu\text{g/ml}$ 时,
 $I_{cl} = 1348.6 C - 1656.6$ $r = 0.9975$ $RSD = 1.3\%$;
 b: 原花青素浓度为2.8~8.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,
 $I_{cl} = 447.0 C - 4205.3$ $r = 0.9951$ $RSD = 1.2\%$;
 c: 原花青素浓度为8.0~190 $\mu\text{g/ml}$ 时,
 $I_{cl} = 60.6 C - 7503.7$ $r = 0.9986$ $RSD = 1.2\%$ 。

根据IUPAC建议,计算出方法的检出限为0.06 $\mu\text{g/ml}$ 。

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160mg)溶解,定容于100ml容量瓶中,过滤后待测。

3.2 样品测定

取样品溶液2ml,按试验方法测定,计算样品含量表1。

4 结论

本文建立的鲁米诺- ClO^- 体系在碱性条下,对原花

表1 样品中原花青素的测定结果

Table 1 Determination results of PC in two samples

样品	标准量	样品含量	加入量($\mu\text{g/ml}$)	测得量($\mu\text{g/ml}$)
1#	50(mg/粒)	48.7(mg/粒)	0.100	0.101
			0.200	0.203
2#	95%	96.1%	0.100	0.098
			0.200	0.205

注:1#-Grape seed瑞士中草药有限公司;2#-Grape seed四川大力天然生物公司。

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的含量成线性关系,检出限为0.06 $\mu\text{g/ml}$,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[M]. In Food Structure-It's creation and evaluation BLANCHARD J M V, MITCHELL J R. Butterworths London, 1988: 331-349.
- [2] MYERS R H, MONTGOMERY D C. Response surface methodology [M]. John Wiley Sons Inc New York, 1995: 297-232.
- [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籽提取物中原花青素[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(10): 57-61.
- [5] LEA A G H. The phenolics of clod: oligomers and polymers of procyanidins [J]. Food Agric Sci, 1978, 29: 471-477.
- [6] RIGAND J, ESCRIBANO-B MT, PRIEURC, et al. Normal phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds[J]. Chromatogr, 1993, 654: 255-260.
- [7] 卢翠英. 流动注射-抑制化学发光法测定葡萄籽提取物中原花青素[J]. 分析测试学报, 2004, 23(2): 75-77.



研究发现大肠杆菌致病的原因

近日,美国艾荷华州大学的一名研究人员称,缺少辐射杀菌可能是大肠杆菌致病的一个可能原因。

动物学教授Dennis Olson说。“如果含有大肠杆菌O157:H7的菠菜被紫外照射杀菌的话,就不会导致199例致病,102例住院和3例死亡了。”他同时负责和主管艾荷华州商业的辐射装置-线性加速器。

早在20年前美国食品药品监督管理局(FDA)就允许利用紫外照射的方式杀死水果和蔬菜中的虫子,目前这项技术还没有运用于食物的病原细菌的控制,这归因于FDA的批准程序。1986年,大肠杆菌就被定义为病原性细菌,而用辐射方式杀灭细菌的技术却被搁置了6年。尽管FDA没有因此受到任何外部的压力,消费者和食品工业却需要快速通过这项技术来处理一些即食的食品。

采用辐射的方式可杀灭导致食源性疾病的微生物,辐射过程中,能量波会杀灭不好的微生物,而且不会残留在食物中。辐射杀菌技术在其他大约36个国家都已被批准,实际应用却很少,因为消费者和杀菌装置太费钱的原因。

在美国,目前FDA批准了辐射可以用于杀灭小麦、土豆、面粉、辣椒、茶叶、水果和蔬菜中的虫子。辐射还可以用于控制植物的发芽和成熟。1985年,批准用辐射了控制猪肉的旋毛虫,鸡肉中的沙门氏菌和其他有害细菌。2000年批准用于鸡蛋的杀菌。