

玫瑰香葡萄生长期酚类物质含量及抗氧化活性的变化

李杨昕¹, 张元湖^{1*}, 田淑芬², 李玲玲¹

(¹ 山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; ² 天津市林业果树研究所, 天津 300384)

摘要: 以玫瑰香 (Muscat Hamburg) 葡萄为试材, 通过测定不同生长发育期酚类物质含量和其清除自由基的能力, 对酚类物质的动态变化及其与抗氧化活性的关系进行了研究。结果表明, 叶片、茎、卷须的总酚, 类黄酮和原花色素含量随果实的发育呈先下降后上升的趋势, 在果实快速生长期达到最低点, 之后有所增加。叶片酚类物质含量最高, 茎中含量最低。果皮酚类物质含量的变化趋势与叶、茎、卷须中相同, 在果实成熟期达最低点。果肉中酚类物质含量极低, 且在整个生长期无明显变化。各器官的抗氧化活性与酚类物质含量呈正相关。

关键词: 葡萄; 器官; 总酚; 类黄酮; 原花色素; 抗氧化活性

中图分类号: S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 05-1093-05

Dynamic Changes of Polyphenols and Their Relationship with Antioxidant Capacity in the Muscat Hamburg Grapevine

LI Yang-xin¹, ZHANG Yuan-hu^{1*}, TIAN Shu-fen², and LI Ling-ling¹

(¹ College of Life Science, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; ² Tianjin Research Institute of Forestry and Pomology, Tianjin 300112, China)

Abstract: We studied the dynamic changes of polyphenols and their relationship with antioxidant capacity in different organs of Muscat Hamburg by measuring the contents of polyphenols and free radical scavenging activity in different growth periods. The content of total polyphenols, flavonoids and Proanthocyanidins (PAs) in leaf, stem and tendril decreased at first, increased with the development of the grape berry, became the lowest in the fast growth stage of the grape berry, and then increased to a certain degree. The content of polyphenols was the highest in leaf and the lowest in stem. The trend of polyphenols in skin was the same as in leaf, stem and tendril, and became the lowest in the grape ripening period, while the content of polyphenols in grape pulp was very low and stable during growth periods. The positive correlation of the antioxidant capacities of grapevine organs and polyphenols was found.

Key words: Grapevine; Organ; Total polyphenol; Flavonoid; Proanthocyanidins; Antioxidant capacity

酚类物质 (polyphenols) 是植物体内重要的次生代谢物之一, 主要分为类黄酮类和非类黄酮类两类, 具有特殊的生物活性, 在医疗、保健等方面具有重要的作用和利用价值 (唐传核和彭志英, 2000; 李华, 2001; 郭新竹和宁正祥, 2002)。

葡萄含有大量的生物活性物质, 特别是类黄酮类多酚。原花色素是单宁的主要成分, 对果实成熟过程中风味形成起着重要作用 (Souquent et al., 1996)。目前, 对于葡萄在抗氧化方面的贡献越来越

收稿日期: 2007-07-09; 修回日期: 2007-08-20

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yhzhang@sdaa.edu.cn)

越受到人们的关注,但主要集中在葡萄籽和葡萄酒方面(张峻等,2001;丁燕和赵新节,2003),植株整个生长期内的抗氧化能力变化并未引起人们的重视,酚类物质在植物体内的代谢途径也不十分清楚。

作者研究葡萄茎、叶片、卷须及果实酚类物质含量的动态变化及其抗氧化活性,旨在为探索酚类物质在植株体内的代谢途径及葡萄的全面利用提供理论依据。

1 材料与方法

供试葡萄品种为‘玫瑰香’(Muscat Hamburg),采自天津市汉沽区农林局葡萄示范园。

在预先选择的100株8年生植株上,自新梢梢尖向下30 cm内随机采样。从开花期(5月30日)开始每15 d左右于11:00~14:00采样1次,各器官约2 g。果实从浆果生长期(7月24日)开始采样。

将采后样品放置超低温冰箱(-80℃)过夜预冷,果皮与果肉人工剥离,各器官分别用液氮研磨后置于超低温冰箱保存。

取研磨后的样品0.5 g置于50 mL三角瓶中,加入12.5 mL 75%的甲醇,密封,水浴(55℃)浸提3 h,冷却,10 000 r/min离心10 min,取上清液定容至25 mL,得到提取液。

测定总酚(鞠志国,1989)、类黄酮(孙希云等,2004)和原花色素(李春阳等,2004)含量,以及清除 $O_2^{\cdot-}$ (Beauchamp & Fridovich, 1971),DPPH·(对二苯代苦味肼基)(Fabio et al., 2004; Zhou & Yu, 2004),ABTS $^{+ \cdot}$ [2,2'-连氮基-双(3-乙基并二氢噻唑-6-磺酸)二铵盐](Nikolaos et al., 2004)自由基的能力。其中清除 $O_2^{\cdot-}$ 和DPPH·自由基的能力以清除自由基量的大小即抑制率表示。清除ABTS $^{+ \cdot}$ 自由基的能力用Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)的浓度表示,即相当于多大浓度的Trolox(一种类似维生素E的水溶性物质,可清除ABTS $^{+ \cdot}$ 自由基)。

每个指标重复测定5次。

2 结果与分析

2.1 酚类物质含量变化

在葡萄的生长发育期内,各个器官内的酚类物质含量并不是一成不变的。

由图1可知,叶片、茎、卷须中的酚类物质含量随着果实的发育逐渐降低,快速生长期(始花后30 d)达到最低,之后有所增加。而果实中,果皮酚类物质含量自浆果生长期开始下降,至浆果成熟期(90 d)达最低点,之后有小幅度的上升趋势;原花色素一直呈降低趋势。果肉酚类物质没有明显的变化,且含量极低。

2.2 抗氧化活性与酚类物质含量的关系

由表1可知,葡萄各个器官清除自由基的能力与它们各个时期的酚类物质含量变化基本一致,呈

表1 葡萄中酚类物质含量和抗氧化能力相关性分析

Table 1 Correlation between phenolics contents and antioxidant ability in grape

	总酚 Total polyphenols	类黄酮 Flavonoids	原花色素 PAs	DPPH·	ABTS $^{+ \cdot}$	$O_2^{\cdot-}$
总酚 Total polyphenols	1	0.925**	0.839**	0.933**	0.951**	0.731**
类黄酮 Flavonoids		1	0.932**	0.970**	0.955**	0.607**
原花色素 PAs			1	0.892**	0.871**	0.455**

** : 在0.01水平上呈显著相关。

** : Correlation is significant at 0.01 level.

显著正相关, 表明葡萄的抗氧化能力主要来自其中所含的多酚类物质。其中总酚和类黄酮的含量与 DPPH 法和 ABTS 法测得的抗氧化能力间的相关系数分别达到 0.933 和 0.955 以上。

如图 1 所示, 叶片、茎、卷须对超氧阴离子自由基、DPPH· 自由基和 ABTS⁺· 自由基的清除能力与酚类物质含量的变化基本一致, 均呈现先下降后有小幅上升趋势。茎和卷须对 DPPH· 自由基的清除能力与酚类物质的含量相关性略低。叶片的清除能力在果实成熟后有所增加。果实对超氧阴离子自由基的清除能力呈现先下降后上升的趋势, 在浆果成熟期达到最大值。果皮对两种体外自由基的清除能力很强, 高于叶片, 其清除能力均是先下降, 在果实成熟后上升。果肉中酚类物质含量及对 3 种自由基的清除效果变化不大。

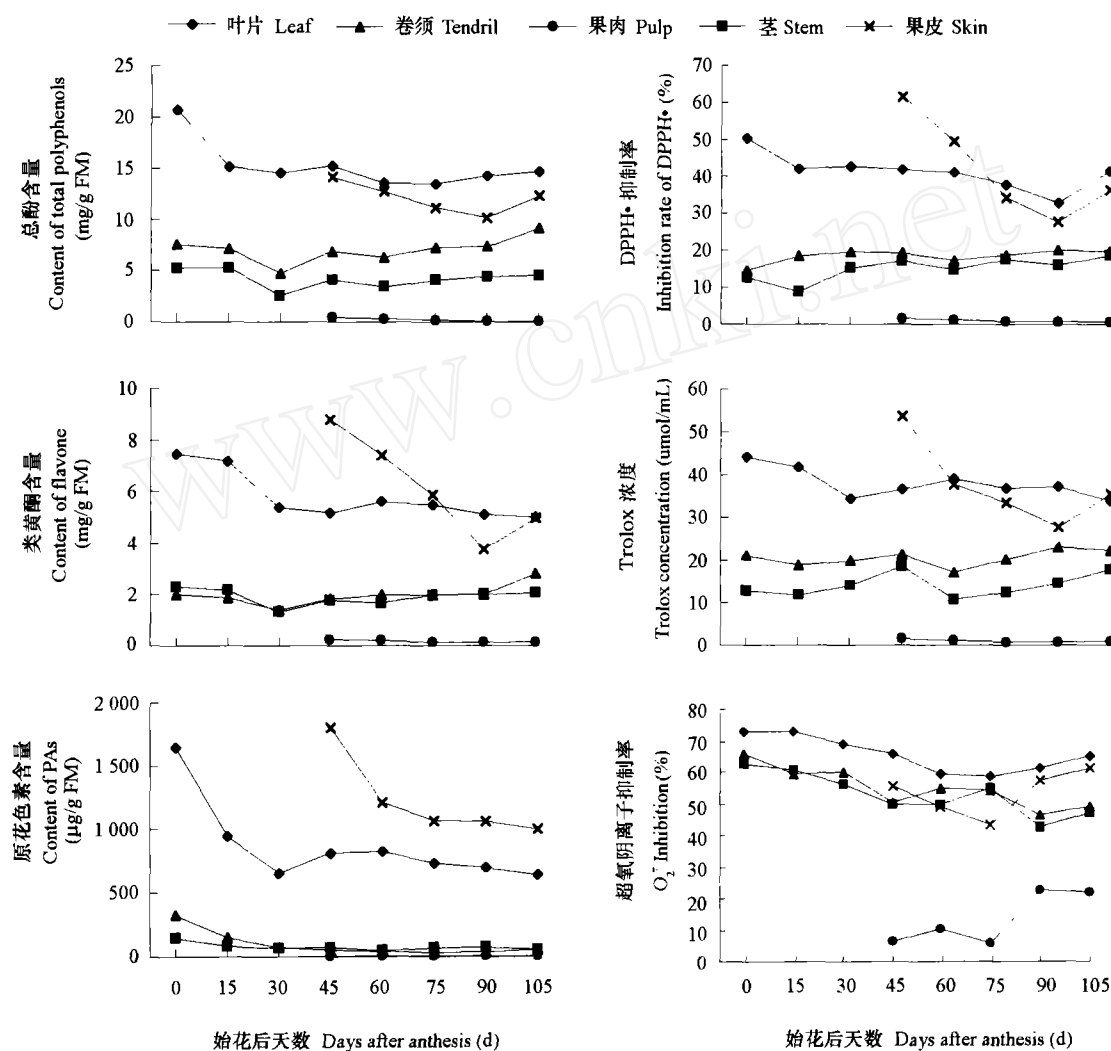


图 1 葡萄各器官酚类物质含量动态变化及其对 3 种自由基的清除效果

Fig. 1 Changes of polyphenols in different organs and their effects on scavenging three free radicals

3 讨论

根据试验中各个器官内酚类物质的变化趋势, 我们推测, 进入开花期后, 葡萄植株的其他器官就在为果实的发育做准备, 酚类物质开始由其他器官向果实运输。在果实生长发育的快速生长期反映最为明显。

随着果实的成熟,果粒内部发生一系列复杂的生化变化:含糖量急剧增加,含酸量下降,果皮内芳香物质逐渐形成,单宁则不断减少等;同时,种子由绿色变为棕褐色,种皮变硬。此时,果皮和果肉内的总酚含量降低至最低点,可能与此时的酚类物质大量向种子运输有关。这与《葡萄学》(贺普超,1999)中关于葡萄果实发育和茎叶的生长特点相符合,为进一步深入阐明次生物质代谢途径提供了一定的试验数据。同时,类黄酮和原花色素的含量与总酚含量呈显著正相关性(表1),表明类黄酮和原花色素是葡萄中较为重要的两类物质,其含量在很大程度上影响着葡萄的品质。

评价一种物质的抗氧化活性通常是看其对自由基的清除能力,多以抑制率或半抑制浓度(IC_{50})作为衡量标准。目前,用于体外测定物质抗氧化活性的方法有比色法、化学发光法、荧光法和电子自旋共振法(ESR)等。大多是针对物质清除某一种自由基而言,并不能反映其总的抗氧化能力,因为物质总的抗氧化能力是物质清除不同的自由基或者是物质的不同活性成分清除不同的自由基的有效和。

鉴于物质在肌体内起作用的正是其总的抗氧化能力,因此用总的抗氧化能力(Total antioxidant activity, TAA)来评价物质的抗氧化活性是很有必要的。

目前,国内外较普遍用于体外测定物质总抗氧化能力的方法有4种,即FRAP(Ferric reducing antioxidant power)法、ORAC(Oxygen radical absorbance capacity)法、DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)法和ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt]法。

相对于抗氧化能力测定的体内方法(主要是动物试验和流行病学调查),DPPH和ABTS这两种体外抗氧化活性测定方法花费的时间短、经费少,所需仪器设备简单。与其他几种抗氧化能力体外测定法相比,快速,简便,与抗氧化剂的生物活性相关性强,因而较为广泛地应用于生物样品、果蔬类等的抗氧化能力测定。本试验就采用了这两种方法。

DPPH在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其甲醇溶液呈紫色,在517 nm处有强烈吸收。有自由基清除剂存在时,DPPH的孤对电子被配对而使其颜色变浅,在最大吸收波长处的吸光度变小。这两者呈线性关系,即抗氧化能力越强,吸光度下降值越大。以此表示自由基清除剂抗氧化能力的大小。

ABTS经活性氧氧化生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 $ABTS^{+ \cdot}$,向其中加入自由基清除剂,两者发生反应使体系褪色,在 $ABTS^{+ \cdot}$ 自由基最大吸收波长734 nm处,吸光度值下降。该反应通常用Trolox(一种类似于维生素E的水溶性物质)作为标准品与不同的抗氧化剂进行比较,换算出被测物质总的抗氧化能力,结果多表示为达到一定浓度测试物质相当的抗氧化能力所需要的Trolox的浓度,所以该法也称TEAC法(Trolox equivalent antioxidant capacity)(Fabio et al., 2004; Zhou & Yu, 2004)。

超氧阴离子自由基是生物体内有氧代谢过程中产生的一种重要的氧自由基,它是所有氧自由基中形成最早的,它的存在能够直接或间接的破坏生物体内的大分子,诱发膜脂过氧化,是生物体衰老和许多疾病产生的重要原因(Peter & Pugliese, 1987)。

葡萄中含有的酚类物质主要有类黄酮类物质、缩和单宁(即原花色素)、花色素和酚酸等,主要分布在叶片和果皮中,果肉中的含量很少(段长青等,1998)。

通过本试验发现,果皮和叶片有很高的清除自由基的能力,茎和卷须次之,而果肉最低,这与酚类物质在葡萄体内的分布是一致的。同时,一直被人们当作浪费光合产物的卷须拥有较高的抗氧化能力,可被加工利用或直接食用。

葡萄各个器官对两种体外自由基的清除能力趋势基本相同,说明葡萄各个器官对阳离子自由基和无电荷的中性自由基的清除能力是一致的。酚类物质含量与对两种体外自由基的清除能力间的相关性高于对超氧阴离子自由基的清除能力,也证明两种体外自由基可以更好的体现葡萄的抗氧化能力。本

研究为进一步开发葡萄抗氧化资源与利用提供了一定依据。

References

- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Inproved assays and an assay applicable to acrylamid gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276 – 287.
- Ding Yan, Zhao Xin-jie. 2003. Structures and properties of phenols and the association with grapes and wines. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 1: 13 – 17. (in Chinese)
- 丁 燕, 赵新节. 2003. 酚类物质的结构与性质及其与葡萄及葡萄酒的关系. *中外葡萄与葡萄酒*, 1: 13 – 17.
- Duan Chang-qing, He Pu-chao, Zhou Cun-tian. 1998. Research on polyphenols of chinese wild grape resource. In: Li Hua ed. *Proceedings of international symposium on viticulture and enology*. Xi'an: Shaanxi People Press: 113 – 117. (in Chinese)
- 段长青, 贺普超, 周存田. 1998. 中国野生葡萄资源中酚类物质研究. 见: 李 华主编. *国际葡萄与葡萄酒学术研讨会论文集*. 西安: 陕西人民出版社: 113 – 117.
- Fabio C, Alessandra B, Anna G, Claudio R. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious as related to their phenolic composition. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4684 – 4689.
- Guo Xin-zhu, Ning Zheng-xiang. 2002. Natural polyphenol and its antioxidation. *Food Industry*, 3: 28 – 29. (in Chinese)
- 郭新竹, 宁正祥. 2002. 天然酚类化合物及其保健作用. *食品工业*, 3: 28 – 29.
- He Pu-chao. 1999. The study of grape. Beijing: Chinese Agricultural Press: 39 – 40, 47, 56 – 57, 93 – 102. (in Chinese)
- 贺普超. 1999. 葡萄学. 北京: 中国农业出版社: 39 – 40, 47, 56 – 57, 93 – 102.
- Ju Zhi-guo. 1989. Introduction to a modified colormetric method for measuring phenolics. *Journal of Laiyang Agricultural College*, 6 (2): 48 – 49. (in Chinese)
- 鞠志国. 1989. 一种改进的酚类物质测定方法. *莱阳农学院学报*, 6 (2): 48 – 49.
- Li Chun-yang, Xu Shi-ying, Wang Zhang. 2004. Vanillin – HCl assay for the proanthocyanidins content of grape seed and stem. *Food Science*, 25 (2): 157 – 160. (in Chinese)
- 李春阳, 许时婴, 王 璋. 2004. 香草醛 – 盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究. *食品科学*, 25 (2): 157 – 160.
- Li Hua. 2001. A manual of grape intensivism cultivation. Xi'an: Xi'an Map Press. (in Chinese)
- 李 华. 2001. 葡萄集约化栽培手册. 西安: 西安地图出版社.
- Nikolaos N, Wang L F, Maria T, Zhang H Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ · assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 4669 – 4674.
- Peter T, Pugliese. 1987. Concepts in aging and the skin. *Cosmetics & Toiletries*, 102 (4): 19 – 44.
- Souquent J M, Chegnier V, Brossaud F, Moutounet M. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43 (2): 509 – 512.
- Sun Xi-yun, Niu Guang-cai, Meng Xian-jun, Zhang Qi. 2004. Study on extracting flavonoids from *Portulaca oleracea* L. *Food and Fermentation Industries*, 30 (11): 135 – 137. (in Chinese)
- 孙希云, 牛广财, 孟宪军, 张 琦. 2004. 马齿苋中黄酮类化合物的最佳提取工艺. *食品与发酵工业*, 30 (11): 135 – 137.
- Tang Chuan-he, Peng Zhi-ying. 2000. Grape polyphenol compounds and their physiological functions. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, 2: 12 – 15. (in Chinese)
- 唐传核, 彭志英. 2000. 葡萄多酚类化合物以及生理功能. *中外葡萄与葡萄酒*, 2: 12 – 15.
- Zhang Jun, Ji Wei-zhi, Qi Xin. 2001. The extraction of polyphenols from grape seeds and its antioxidant activity towards edible oils. *Food Science*, 22 (10): 43 – 45. (in Chinese)
- 张 峻, 吉伟之, 齐 欣. 2001. 葡萄籽中多酚类物质的提取及其对油脂的抗氧化作用. *食品科学*, 22 (10): 43 – 45.
- Zhou K Q, Yu L L. 2004. Antioxidant properties of bran extracts from trego wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1112 – 1117.