

地形对品丽珠葡萄果实中多酚物质及其抗氧化活性的影响

Analysis of polyphenolic content and antioxidant capacity of Cabernet Franc berries in different terrain conditions

蒋宝¹ 罗美娟¹ 张振文²

JIANG Bao¹ LUO Mei-juan¹ ZHANG Zhen-wen²

(1. 渭南职业技术学院食品检测中心, 陕西 渭南 714000; 2. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

(1. Food Determine Centre, Weinan Vocational & Technical College, Weinan, Shaanxi 714000, China;

2. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

摘要:以品丽珠葡萄果实为研究对象,通过对其基本理化指标、抗氧化能力及多酚组成和含量进行检测,比较地形对葡萄果实中多酚物质及其抗氧化活性的影响。结果表明:平地 and 坡地条件下品丽珠果实中各酚类物质总量互有高低;平地果实的抗氧化能力强于坡地果实;在 2 种地形的品丽珠果皮中共检出 17 种单体花色苷(即 12 种花色苷衍生物和 5 种花色苷基本体);地形对果皮花色苷单体物质的组成没有影响,但对其含量存在不同程度的影响;坡地果皮中 5 种基本花色苷单体的含量均高于平地果皮。葡萄园的地形因素对果实中多酚类物质组成和含量及抗氧化活性造成不同程度的影响。

关键词:地形;葡萄;多酚;抗氧化;液相色谱—质谱技术

Abstract: To understand the difference in the phenolic compounds and antioxidant activities of Cabernet Franc berries where were from two different terrain vineyards in the Loess Plateau region, the physico-chemical index, antioxidant activities, the phenolic composition and concentration of grape samples were determined. The results showed that the different kind of phenolic compound contents of grape berries were not uniform variation law; The antioxidant activities of slope land berries was lower than the flat land berries; The total 17 individual anthocyanin compounds were identified in flat and slope land berries (including 12 anthocyanin derivatives and 5 basic anthocyanins); Terrain conditions had no effect on anthocyanin composition, but had effect on anthocyanin concentration in different extent; The concentration of 5 basic anthocyanins from slope land vineyard berries were higher than flat land berries. So the terrain condition of vineyard could really influence the phenolics composition and con-

tent, antioxidant activity of Cabernet Franc berries.

Keywords: terrain; grape; polyphenolics; antioxidant capacity; HPLC—UV—MS/MS

葡萄酒的质量首先取决于酿造原料(葡萄果实)的品质。酿造原料品质的好坏,除常以总糖、总酸和糖酸比值等参数作为指标外,酚类物质含量也日渐成为重要指标之一。酚类物质是存在于葡萄果实(主要位于果皮)中的一类植物次生代谢物质,这类物质能最终影响其所酿造葡萄酒的颜色、风味和收敛性。另外,该类物质还有助于降低人类患慢性疾病和心血管疾病的机率^[1]。

通常将酚类物质分为类黄酮和非类黄酮 2 类,其中类黄酮物质又包括花色苷、黄酮醇和黄烷醇。相同的葡萄品种,常因生态环境条件不同导致其果实中酚类物质的含量和组分存在差异,其中就包括葡萄园的坡度、坡向和海拔等,这些因素能改变葡萄园的小气候,从而影响果实酚类物质的代谢产生^[2]。

山西乡宁地区位于晋西黄土高原,该地区因光照充足、昼夜温差较大等生态条件被认为是葡萄酒的优质产区。但这类地区沟壑纵横,葡萄园多位于不同海拔、不同坡度的山地上,由此造成的山地小气候对酿酒葡萄品质产生影响。品丽珠(Cabernet Franc)作为该地区的主栽品种,目前关于地形条件对其果实多酚含量及抗氧化能力的影响尚不清楚。本研究拟通过光谱和色谱技术,对上述内容展开研究,为中国山地产区酿酒原料的品质调控提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试品种为品丽珠。在果实充分成熟后人工采收葡萄,

基金项目:国家葡萄产业技术体系(编号:CARS-30-zp-09);渭南职业技术学院院级重点项目(编号:WZYZ201301)

作者简介:蒋宝(1981—),男,渭南职业技术学院讲师,博士。

E-mail: treebaojiang@163.com

收稿日期:2014-12-20

采样地点位于山西省戎子酒庄的驮腰坡村(平地)和坪塬村(坡地)。该品种于2007年定植,且平地和坡地葡萄园的田间管理措施相同。

1.2 试验试剂

水溶性维生素 E(trolox)、二甲花翠素葡萄糖苷(malvidin-3-O-glucoside)、二甲氨基肉桂醛(*p*-DMACA)、2,2-二苯代苦味酰基苯肼(DPPH)和儿茶素(catechin);美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 仪器与设备

低温冷冻离心机;Eppendorf 5804R 型,德国 Eppendorf 公司;

紫外可见分光光度计:UV-1800 型,日本岛津公司;

高液相色谱仪—质谱:1100Agilent 型,美国 Agilent 有限公司。

1.4 样液提取方法

葡萄试样收集以后,一份破碎取汁,用于果实基本理化指标的测定;另一份用酸化甲醇提取果实中酚类物质,收集的提取液用于多酚类物质含量和果实抗氧化活性的测定。

1.5 果皮花色苷的提取方法

将葡萄皮干粉转入酸化甲醇溶液中,并在摇床中避光提取,然后再低温离心,重复提取4次,合并上清液后用旋转蒸发仪蒸干,残渣用流动相(2%甲酸水溶液:2%甲酸乙腈溶液=9:1)定容至10 mL,样品进样前用0.45 μm 滤膜过滤^[3]。

1.6 测定指标

1.6.1 理化指标的测定 总糖(以葡萄糖计)、总酸(以酒石酸计)、单宁(以单宁酸计)及 pH 值等测定参照文献^[4]的方法进行。

1.6.2 酚类物质总量的测定 总酚含量的测定选用福林—肖卡法^[5](以没食子酸计);总类黄酮和总黄烷醇含量的测定分别选用 $N_2O_2-Al(Cl)_3$ 法^[6]和 DMACA 法^[7](均以儿茶素计);总花色苷含量的测定选用 pH 值示差法^[8](以二甲花翠素葡萄糖苷计)。

1.6.3 抗氧化能力的测定 DPPH 自由基清除力和铜离子还原力(CUPRAC)的测定分别选用 Brandwilliams 等^[9]和 Apak 等^[10]的方法,结果均以 Trolox 表示。

1.6.4 果皮花色苷单体酚的测定 利用 HPLC—UV—MS/MS 技术,结合离子的保留时间对品丽珠果皮中花色苷单体进行定性分析^[3];利用外标法对花色苷单体进行定量计

算(以二甲花翠素葡萄糖苷作为标准物),每个样品重复进样2次。

1.7 数据分析

采用 SPSS 17.0 进行方差分析,色谱数据重复测定2次,结果以测定均值表示;其它数据重复测定3次,结果表示为“均值±SD”。

2 结果与分析

2.1 果实理化指标的分析

由表1可知,平地和坡地条件下品丽珠果实的总糖、总酸和糖酸比相差不大,其中总糖含量均接近200 g/L,糖酸比值超过20,表明2种地形下果实的成熟状况良好。此外,平地和坡地果实的单宁含量分别为3.0、3.1 g/L,坡地果实略高,这有利于提高葡萄酒的品质。

2.2 果实酚类物质含量及抗氧化活性的分析

酚类物质含量丰富的果实有助于酿造高品质的葡萄酒。地形条件的不同能改变葡萄园的小气候。通常随着葡萄园海拔的增加,环境的温度会降低,而光强和紫外辐射则明显增加,同时葡萄园昼夜温度的变化幅度增大。所以说葡萄园海拔的不同导致上述气候因子发生变化,进而影响葡萄果实的品质。

由表2可知,平地果实的总酚和总黄烷醇含量高于高海拔坡地果实,尤其是总黄烷醇含量相差10%左右,但它们的差异未达到显著性水平($P \leq 0.05$)。黄烷醇含量高的葡萄果实有利于增强葡萄酒的涩味和抗氧化能力。类黄酮物质是葡萄果实中含量较高,成分较为复杂的一类多酚物质。从表2还可以发现,高海拔坡地果实中总类黄酮和总花色苷含量要高出平地果实20%以上,并且含量的差异均达到显著性水平($P \leq 0.05$),所以总酚含量高的葡萄果实,其总类黄酮含量未必也高。葡萄品种是影响其果皮上花色苷物质组成和含量的主要因素,但果皮花色苷物质的合成代谢受生态环境条件的影响。通常认为,高海拔坡地葡萄园的强光、低温和较大的昼夜温差互相作用,共同影响着葡萄果皮中花色苷物质的积累^[11]。Hess 等^[12]研究证实:高海拔葡萄果实通过增加果皮的厚度来增加其果实中花色苷的含量。

由于植物体中含有多种类型的自由基和丰富的抗氧化资源,且它们的理化特征迥异,为了更加有效地评价植物体的抗氧化能力,通常在试验中将不同抗氧化机理的方法相结合。由表2可知,在本研究中,DPPH 自由基清除力和铜离子还原力法(CUPRAC)的抗氧化测定结果一致,表明

表1 地形条件对品丽珠果实理化指标的影响

Table 1 Effect of terrain condition on physicochemical index of Cabernet Franc berries

| 采样点 | 海拔/m | 总糖/(g·L ⁻¹) | 总酸/(g·L ⁻¹) | 糖酸比 | pH | 单宁/(g·L ⁻¹) |
|-----|-------|-------------------------|-------------------------|----------|---------|-------------------------|
| 平地 | 1 201 | 198.5±4.0 | 7.2±0.7 | 27.6±0.5 | 3.3±0.3 | 3.0±0.2 |
| 坡地 | 1 381 | 197.4±3.8 | 6.9±0.2 | 28.6±1.3 | 3.1±0.1 | 3.1±0.1 |

表 2 地形条件对品丽珠果实酚类物质含量及抗氧化活性的影响[†]

Table 2 Effect of terrain condition on phenolics content and antioxidant activity of Cabernet Franc berries

| 采样点 | 总酚/ (mg · kg ⁻¹) | 总类黄酮/ (mg · kg ⁻¹) | 总黄烷醇/ (mg · kg ⁻¹) | 总花色苷/ (mg · kg ⁻¹) | 抗氧化活性/(μ mol · kg ⁻¹) | |
|-----|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| | | | | | DPPH | CUPRAC |
| 平地 | 2 403.4±74.1 | 1 310.5±29.9 | 334.4±7.8 | 1 061.0±17.2 | 6 871.6±150.5 | 26 025.2±542.0* |
| 坡地 | 2 305.5±28.3 | 1 769.5±110.4* | 303.9±18.9 | 1 293.7±9.7* | 6 604.9±94.2 | 22 149.8±338.5 |

† * 表示差异在 P≤0.05 水平上的显著性,否则表示差异不显著。

处于低海拔的平地品丽珠果实抗氧化能力强于坡地高海拔果实,两种测定方法获得了较好的协同性。此外,当选用 CUPRAC 法进行测定时,平地果实的抗氧化值显著地(P≤0.05)高出坡地约 18%,而 DPPH 自由基清除法测得的抗氧化值差异并不显著,体现了抗氧化方法间的特异性。

2.3 果皮花色苷单体的分析

为进一步研究葡萄园地形条件对品丽珠果皮单体花色苷组成和含量的影响,本试验利用高效液相色谱技术在 2 种地形的果皮中共检出 17 种单体花色苷(包括 12 种花色苷衍生物和 5 种花色苷基本体)。由表 3 可知,2 种地形条件下品丽珠果皮花色苷单体的组成完全相同。平地 and 坡地果皮中 5

种基本花色苷的总量分别为 7 132.1, 9 042.4 mg/kg,其中,高海拔坡地果皮基本花色苷的单体和总量均最高,坡地总量约为平地的 1.3 倍。2 种地形条件下检测到的 12 种花色苷衍生物含量存在不同程度的差异,其中花翠素顺式香豆酰化葡萄糖苷(序号 9 物质)坡地约为平地的 5 倍;二甲花翠素类含量在衍生物中所占比例最大,它们是花色苷物质的主要组成部分,这与前人^[13]研究结果一致。由于本研究所用葡萄的田间管理措施完全相同,故产区地形因素对品丽珠果皮花色苷单体含量存在不同程度的影响,但对其组成没有任何影响。

3 结论

通过对地形对品丽珠果实中多酚物质及其抗氧化能力影响的研究,得出以下结论:

(1) 平地 and 坡地条件下品丽珠果实中各酚类物质总量互有高低;铜离子还原力法的测定结果表明,平地果实的抗氧化能力显著地高于坡地果实;两种抗氧化方法的测定结果彼此间存在协同性和特异性。

(2) 地形对品丽珠果皮花色苷单体物质的组成没有影响,但对其含量存在不同程度的影响,且坡地果皮中 5 种基本花色苷单体的含量均高于平地果皮,总量则高出 30%。

表 3 地形条件对品丽珠果皮花色苷组成和含量的影响

Table 3 Effect of terrain condition on anthocyanins composition and concentration of Cabernet Franc grape skins

| 序号 | 化合物 | 果皮花色苷含量/ (mg · kg ⁻¹) | |
|----|-----------------|--------------------------------------|---------|
| | | 平地 | 坡地 |
| 1 | 甲基花翠素葡萄糖苷 | 691.6 | 939.7 |
| 2 | 花翠素葡萄糖苷 | 1 093.8 | 1 295.2 |
| 3 | 花青素葡萄糖苷 | 262.5 | 311.7 |
| 4 | 二甲花翠素葡萄糖苷 | 3 980.9 | 5 106.0 |
| 5 | 甲基花青素葡萄糖苷 | 1 103.3 | 1 389.8 |
| 6 | 花翠素乙酰化葡萄糖苷 | 231.3 | 328.0 |
| 7 | 花青素乙酰化葡萄糖苷 | 81.2 | 103.7 |
| 8 | 甲基花翠素乙酰化葡萄糖苷 | 183.8 | 275.3 |
| 9 | 花翠素顺式香豆酰化葡萄糖苷 | 33.8 | 155.4 |
| 10 | 甲基花青素乙酰化葡萄糖苷 | 618.9 | 659.3 |
| 11 | 二甲花翠素乙酰化葡萄糖苷 | 1 927.6 | 1 953.6 |
| 12 | 花青素香豆酰化葡萄糖苷 | 132.8 | 163.2 |
| 13 | 甲基花青素咖啡酰化葡萄糖苷 | 69.2 | 81.6 |
| 14 | 甲基花青素顺式香豆酰化葡萄糖苷 | 40.3 | 38.1 |
| 15 | 二甲花翠素顺式香豆酰化葡萄糖苷 | 87.2 | 83.9 |
| 16 | 甲基花青素反式香豆酰化葡萄糖苷 | 425.5 | 432.5 |
| 17 | 反式二甲花翠素香豆酰化葡萄糖苷 | 1 373.1 | 1 511.8 |

参考文献

- 1 丁仁君,夏延斌.葡萄酒中的有机酸及检测方法研究进展[J].食品与机械,2014,30(1):243~247.
- 2 Mateus N, Proenca S, Ribeiro P, et al. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera*. L varieties concerning vineyard altitude[J]. Ciências Tecnologia de Alimentos, 2001, 3(2): 102~110.
- 3 何建军.影响酿酒葡萄果实花色苷结构修饰的因素分析[D].北京:中国农业大学,2010.
- 4 王华.葡萄与葡萄酒实验技术操作规范[M].西安:西安地图出版社,1999:152~153.
- 5 Rapisarda P, Tomaino A, Lo Cascio R, et al. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(11): 4 718~4 723.
- 6 Kim D O, Chun O K, Kim Y J, et al. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(22): 6 509~6 515.

(下转第 97 页)

聚合物 Fe_3O_4 -MIPS, 通过对粒子以及聚合物的表征, 结果表明: 聚合物 Fe_3O_4 -MIPS 的平均粒径为 15 nm, 磁滞回线表明饱和磁强度、剩磁、矫顽力分别为 46.680 emu/g、1.0639 emu/g、12.896 G。聚合物在 BPA 乙醇液中的吸附试验结果表明: Fe_3O_4 -MIPS 对 BPA 的吸附速率大于非印记聚合物; Scatchard 模型分析表明分子印迹聚合物 Fe_3O_4 -MIPS 对 BPA 的表观最大吸附量为 126.44 $\mu\text{mol/g}$; 重复吸附性试验表明, 聚合物在对 BPA 进行了 5 次吸附之后仍然可以达到首次吸附量的 91.26%, 选择吸附性试验进一步说明聚合物对双酚 A 具有特异识别性, 能很好的进行选择分离。

参考文献

- 1 牛海岗, 王宏元, 张育辉. 双酚 A 对中国林蛙蝌蚪生长发育的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 408~414.
- 2 Tyl R W, Myers C B, Marr M C, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A (BPA) in CD-1 (Swiss) mice[J]. Toxicol. Sci., 2008, 104(2): 362~384.
- 3 Jose Luis Vilchez, Alberto Zafra, Antonio Gonzalez-Gasado, et al. Determination of trace amounts of Bisphenol F, Bisphenol A and their diglycidyl ethers in wastewater by gas chromatography mass spectrometry[J]. Analytica chimica acta, 2001, 431: 31~40.
- 4 任仁, 陈明, 武少华, 等. 环境样品中烷基酚和双酚 A 的分析方法[J]. 北京工业大学学报, 2004, 30(3): 348~353.
- 5 于达维. 欧美禁用双酚 A 塑料婴儿奶瓶中国出口将遭冲击[N]. 新世纪周刊, 2010-12-05(001).
- 6 Tsuda T, Suga K, Kaneda E, et al. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications, 2000, 746(2): 305~309.
- 7 Maragou N C, Lampi E N, Thomaidis N S, et al. Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography - mass spectrometry[J]. Chromatogr. A, 2006, 1129(2): 165~173.

- 8 Hegnerova K, Pi Iariki M, Tyinbachov M, et al. Detection of bisphenol A using a novel surface Plasmon resonance biosensor[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 398: 1963~1966.
- 9 Navarro-Villoslada F, Vicente Blanca San, Moreno-Bondi Maria C. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 504(1): 149~162.
- 10 Ji Yong-sheng, Yin Juan-juan, Xu Zhi-gang, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for rapid determination of bisphenol A in environmental water and milk samples [J]. Anal Bioanal Chem., 2009, 395: 1125~1133.
- 11 陈亭汝, 孙瑾. Fe_3O_4 磁性纳米粒子的共沉淀法制备研究[J]. 应用化工, 2009, 38(2): 226~228.
- 12 Xu Zhou, Ding Li, Long Yan-jiao, et al. Preparation and evaluation of superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of bisphenol A in packed food[J]. Anal. Methods, 2011, 3: 1737~1744.
- 13 苏博, 宫建龙, 罗来盛, 等. 双酚 A 分子印迹聚合物的制备及其在水相中的吸附性能[J]. 化工环保, 2011, 31(2): 167~171.
- 14 许志峰, 刘岚, 邓芹英. 双酚 A 的分子烙印聚合物的制备和结合特性的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(3): 53~57.
- 15 Shen Xing-can, Fang Xiu-zhou, Zhou Ying-hua, et al, Synthesis and Characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-modified superparamagnetic magnetite nanoparticles[J]. Chemistry Letters, 2004, 33(11): 1468~1469.
- 16 Huang Zhong-bing, Tang Fang-qiong. Preparation, structure, and magnetic properties of mesoporous magnetite hollow spheres [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 281: 432~436.
- 17 Liu Z L, Ding Z H, Yao K L, et al. Preparation and characterization of polymer-coated core-shell structured magnetic microbeads[J]. Magn Magn Mater, 2003, 265: 98~105.
- 18 赵美萍, 李元宗, 张新祥, 等. 双酚 A 分子印迹聚合物的制备和识别性能研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(7): 1204~1206.

(上接第 82 页)

- 7 Li Y G, Tanner G, Larkin P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1996, 70(1): 89~101.
- 8 Orak H H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenol oxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111(3): 235~241.
- 9 Brandwilliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity[J]. LWT-Food Science and Technology, 1995, 28(1): 25~30.
- 10 Apak R, Guclu K, Ozyurek M, et al. Novel total antioxidant

capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupricion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(26): 7970~7981.

- 11 Takayoshi Y, Seok T J, Nami G Y, et al. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2006, 57(1): 54~59.
- 12 Hess S. Exploring high altitude viticulture[EB/OL]. (2007-10-04) [2014-07-10]. <http://www.theelevationofwine.org/press>.
- 13 Radovanović B, Radovanović A. Free radical scavenging activity and anthocyanin profile of Cabernet Sauvignon wines from the Balkan region[J]. Molecules, 2010, 15(6): 4213~4226.