

蛋白-单宁沉淀法测定葡萄籽中单宁含量

胡立志, 袁春龙, 袁琳

(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用单宁-蛋白沉淀法测定葡萄籽超微粉中的单宁含量, 分别从机器精密度, 线性范围, 方法检出限, 方法精密度, 加标回收率等方面进行比较, 以研究葡萄籽超微粉中单宁含量的测定方法。结果表明: 机器精密度 1.144%, 线性范围 50~250 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9966$), 方法检出限 0.339 $\mu\text{g/mL}$, 平行性精密度 0.2454%, 重复性精密度 0.2159%, 加标回收率为 97.47%~101.49%。该方法可用于葡萄籽超微粉中单宁含量的测定。

关键词:单宁; 蛋白沉淀法; 精密度; 回收率; 方法检出限

中图分类号:TS 261.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)14-0023-04

葡萄籽作为葡萄加工后的副产物^[1], 它不仅含有丰富的蛋白质、纤维素、脂肪、矿物质和维生素等营养成分, 而且具有很高的保健功能^[2]。利用超微粉碎技术对葡萄籽进行深加工^[3], 不仅完整的保持了葡萄籽中的营养成分, 而且还能更好的发挥其保健功效^[4], 尤其是在抗氧化, 清除体内有害氧自由基, 防辐射, 降低血脂和预防高血压, 保持肠道健康等方面比较显著^[5-8]。因此, 合理利用葡萄籽, 不仅可以避免环境污染, 而且可以增加葡萄酒行业的附加值, 提高经济效益。

葡萄籽中含有大量的多酚类物质, 葡萄籽中的酚类占葡萄果实酚类的 50%~70%。其中, 单宁是主要多酚类物质的一种。单宁是能与蛋白质形成复合物的植物多酚类物质^[9]。因此, 充分利用这一化学特性, 通过间接方式可以检测出葡萄籽中单宁的含量。目前, 对葡萄籽中单宁测定的方法主要是利用溶剂提取葡萄籽后, 检测葡萄籽中单宁的含量。单宁的测定方法有经典方法和现代方法, 经典方法由于简单、易于操作, 至今仍被大量应用于单宁含量的测定; 现代方法由于大多数仪器价格昂贵, 虽然在某些方面精密度提高了, 但仍不适于推广应用^[10]。而蛋白单宁沉淀法操作简单, 易于掌控, 方便快捷的方法, 非常适合实验室操作。此法是基于牛血清蛋白和碱性磷酸酶的共沉淀作用, 碱性磷酸酶沉淀的活性的数量显示与出现的单宁的数量呈比例, 因

此能直接被检测出来^[11]。所以, 该试验通过蛋白单宁沉淀法很好的测量了葡萄籽中单宁的含量, 充分检测了此方法, 验证了方法的可行性, 为实验室提供了一种方便快捷的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 “赤霞珠”葡萄籽来自新疆石河子, 自然风干保存。

1.1.2 试验试剂 羧甲基纤维素钠(西安惠安集团纤维素化学厂), 无水乙醇(西安三浦化学试剂有限公司), 氯化钠、丙酮、冰醋酸、六水合三氯化铁、无水碳酸钠(天津博迪化工有限公司), 浓盐酸(四川西陇化工有限公司), 氢氧化钠(汕头市西龙化工有限公司), 酒石酸氢钾(天津市科密欧化学试剂有限公司), 十二烷基硫酸钠(SDS)、儿茶素(Catechin)、三乙醇胺(TEA)、牛血清蛋白(BSA)(来自 SIGAMA), 比色皿(4 mL), 葡萄籽超微粉(来自葡萄酒学院实验室), 去离子水, 磷酸缓冲液, 吸水纸。

1.1.3 试验仪器 紫外分光光度计(Sp-756), 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司), 摇床(上海福玛设备有限公司), 移液枪(5 000、1 000、200、100 μL), 50 mL 离心管, pH 计(PB-10), 电子天平(SHIMADZU), 贝利粉碎机(BFM-6BI 型, 山东倍力粉技术工程有限公司), 冷冻高速离心机(RC-5C+型, 美国科俊仪器公司), 真空泵(SHB-III型, 郑州长城科工贸有限公司), 涡旋混合器(G-560E, Scientific Industries), 干燥箱(101-J 型, 上海医用仪表厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验原理 利用单宁和蛋白质产生的沉淀反应分离提纯单宁, 再将单宁溶解使其与显色剂作用发生显

第一作者简介:胡立志(1985-), 男, 硕士, 研究方向为葡萄酒化学。
E-mail: hulizhi86362028@126.com

责任作者:袁春龙(1969-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为葡萄酒化学。

基金项目:陕西省农业攻关资助项目(2011K02-04); 西北农林科技大学人才支持计划资助项目(2111020901)。

收稿日期:2012-03-30

色反应,其颜色的深浅与单宁的含量呈正相关,并在 510 nm 波长下有最大吸收。并且吸光值与单宁的量在一定浓度范围内呈线性关系。

1.2.2 配制试剂 buffer A:量取 500 mL 去离子水,加入 12 mL 冰醋酸和 9.86 g 氯化钠,待盐完全溶解后,用 10% 的氢氧化钠溶液调节 pH 4.9,用去离子水定容到 1 L,保质期 1 个月。buffer B:取一个 1 L 的烧杯,加入 800 mL 的去离子水,加入 5.0 g 酒石酸氢钾和 120 mL 无水乙醇,搅拌约 5 min,用 2.0 N HCl 调 pH 3.3,然后倒入 1 L 量筒,用去离子水冲洗烧杯 3 次,加入到量筒中,然后用去离子水定容,存放于棕色瓶中,室温贮存,待用。buffer C:准确量取 50 g SDS(十二烷基磺酸钠),加入到 800 mL 去离子水中,再加入 50 mL TEA(三乙醇胺)试剂,搅拌时用 pH 计监控 pH,待其稳定后用浓盐酸调节 pH 9.4,然后用去离子水定容到 1 L,保质期 1 个月。显色剂 FeCl_3 的配制:准确量取 0.676 g 六水合三氯化铁,加入到 250 mL 去离子水中,再加入 200 μL 浓盐酸,混合均匀后即得 250 mL 三氯化铁溶液,保质期 1 个月。标准儿茶素溶液:准确量取 2 mg 儿茶素,加入到 200 μL 无水乙醇中,再加入 1.8 mL 去离子水,每次现用现配,于 -20°C 下保存。蛋白质溶液:将 1 g BSA(牛血清蛋白)加入到 1 L buffer A 试剂中,即得到 1 mg/mL 的蛋白质溶液,于 4°C 下冰箱保存。

1.2.3 葡萄籽超微粉中单宁成分的提取 将 0.2 g 的葡萄籽超微粉倒入 50 mL 的离心管中,向离心管中加入 10 mL 含有 70% 丙酮的水溶液,旋紧盖子,在 100 r/min、 20°C 条件下过夜浸提,12 h 后,在 8 000 r/min、 4°C 条件下离心 15 min,收集提取液,然后再向离心管中加入 10 mL 含有 70% 丙酮的水溶液二次浸提,重复上述过程。合并 2 次的提取液,在 38°C 水浴、120 r/min 条件下,用旋转蒸发仪除去丙酮,大约旋转蒸发 25 min,到负压稳定在 0.9 MPa 时,说明丙酮已经全部蒸出,然后将包含单宁的水的提取物转移到试管中,定容到 10 mL, -20°C 冷冻保存直到用作分析。

1.3 测定方法

根据 Harbertson J^[11] 的方法进行适当的调整,将 75 μL 样品加入到离心管中,然后向离心管中加入 1 425 μL buffer B(样品与 buffer B 共 1 500 μL)。向离心管中加入 3 mL 的蛋白缓冲液,室温反应 15 min,在 13 500 r/min 条件下离心 5 min,结束之后去掉所有上清液。然后加入 2 625 μL buffer C 室温反应 10 min,接着涡旋震荡 10 min。把样品倒入比色皿,在 510 nm 条件下读数,用 2 625 μL buffer C 作为空白对照,标定单宁背景值。加入 375 μL 的三氯化铁后室温反应 10 min,在 510 nm 下读取单宁值。

1.3.1 标准曲线的绘制 精确称量 6.0 mg 儿茶素(精确到 0.1 mg)于 10 mL 的离心管中,加入 600 μL 无水乙醇,然后加入 5.4 mL 的去离子水,摇匀即配成 1.0 mg/mL 的酚母液。分别取 0、150、300、450、600、750 μL 的酚母液于不同的比色皿中,用 buffer C 调整各个比色皿的容积为 2 625 μL ,在 510 nm 下测定吸光值,记为 A_1 ;然后各个比色皿中加入 375 μL 的 FeCl_3 溶液(含有 0.01 N HCl),混合均匀,室温反应 10 min,在 510 nm 测吸光值,记为 A_2 ,单宁最终的吸光值 $A=A_2-A_1$ 。

1.3.2 仪器精密度 仪器能可靠检测的最小信号所对应的待测元素的最小量。采用纯水,在一定时间内测定 12 次以上,以 3 倍标准偏差对应的含量或浓度表示。

1.3.3 方法检出限 采用不同含量的标准物质,在一定时间间隔内进行不少于 10 次的测定,应用线性拟合得到校正曲线,然后应用校正曲线的截距计算出最低检出限^[12]。

1.3.4 平行性精密度 取 3 个平行样品,从 600~1 200 的梯度中选取 5 个梯度,分别测定 3 次,共测定 15 次,比较计算相对标准偏差,即 RSD。

1.3.5 重复性精密度 取 1 个样品,从 600~1 200 的梯度中选取 5 个梯度,每个梯度测定 3 次,共测定 15 次,比较计算相对标准偏差,即 RSD。

1.3.6 方法的准确度 用加标回收率表示,在测定样品时,于同一样品中加入一定量的标准物质进行测定,将测定结果扣除样品的测定值,计算回收率^[13]。即取一样品,从 600~1 200 的梯度中选取 5 个梯度,每个梯度准确量取相同的 2 份,其中 1 份按照下表对应加入标准物儿茶素,另 1 份不做任何处理,然后按照方法同时进行测定,并计算加标回收率^[14]。加标回收率=(加标样品测定值-未加标测定值)/标准儿茶素加入量 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制(工作曲线线性范围)

以标准物浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光值为纵坐标作图,并进行回归分析,得回归方程: $y=0.0082x-0.0594$,相关系数 $R^2=0.9966$,表明该标准曲线的相关性比较高。

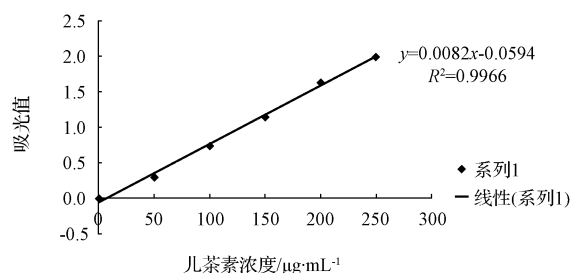


图1 儿茶素标准曲线

表 1 儿茶素标准曲线的吸光值

标准物浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0	50	100	150	200	250
吸光值 A1	0	0.099	0.161	0.146	0.095	0.112
吸光值 A2	0	0.393	0.896	1.292	1.721	2.097
吸光值(A)	0	0.294	0.735	1.146	1.626	1.985

2.2 检出限

2.2.1 仪器精密度 仪器精密度是指在相同的试验条

表 2

仪器精密度

试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
吸光值	0.034	0.034	0.034	0.035	0.034	0.034	0.034	0.035	0.034	0.034	0.034	0.034
标准偏差	0.000389											

注: $\text{RSD} = \text{标准偏差} / \text{平均值} \times 100\% = 0.000389 / 0.034 \times 100\% = 1.144\%$ 。

2.2.2 方法检出限 在方法检出限的问题上,其基本概念是一致的。即方法检出限是指一个给定的分析方法,能以可靠的合理的置信水平检出被测元素的最小浓度或量^[15]。分歧在于如何直接进行测量和计算方法检出限,目前尚无统一的规定^[16]。IUPAC(国际纯粹与应用化学联合会)和欧盟推荐使用校正曲线法来估算检出限。当目标分析物的浓度接近于 0 时,不仅系统误差的影响较大,而且测量也十分困难,因此,IUPAC 认为可以用校准曲线的截距来估算检出限。一共选取了 5 个点,每个点进行了 10 次测量。按照绘制标准曲线的方法进行测量,测量值见表 3。根据表 4 数据,得校正曲线见图 2。校正曲线方程: $y = 0.0079x - 0.0302$, $R^2 = 0.9981$,截距为 0.0302(取相对值),目标分析物的最低检出限(以浓度为单位表示)的公式: $\text{MDL} = t_{0.05} S_b / a$ 。式中: $t_{0.05}$ 为 t 分布在置信度为 95%、自由度等于 $n-2$ 时的 t 值,该方法的自由度为 8,由查表可得, $t_{0.05} = 1.85$; S_b 为校正曲线的截距的标准偏差,由表 3 可知截距的大小,然后运用标准偏差公式可算出 $S_b = 0.001448$; a 为校正曲线的平均斜率,为 0.0079。将上述各值带入公式,则: $\text{MDL} = 1.85 \times 0.001448 / 0.0079 = 0.339 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 3 校正曲线数值

	25	50	75	100	150	截距	斜率
$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$							
第 1 次	0.144	0.348	0.556	0.758	1.171	0.0327	0.0079
第 2 次	0.145	0.348	0.556	0.759	1.171	0.0323	0.0079
第 3 次	0.144	0.352	0.558	0.759	1.171	0.0314	0.0079
第 4 次	0.149	0.352	0.556	0.759	1.171	0.0299	0.0079
第 5 次	0.149	0.352	0.556	0.759	1.171	0.0299	0.0079
第 6 次	0.150	0.352	0.558	0.759	1.171	0.0293	0.0079
第 7 次	0.151	0.352	0.558	0.759	1.171	0.0289	0.0079
第 8 次	0.151	0.352	0.558	0.759	1.171	0.0289	0.0079
第 9 次	0.151	0.352	0.558	0.759	1.172	0.0291	0.0079
第 10 次	0.151	0.352	0.558	0.759	1.172	0.0291	0.0079
平均值	0.1485	0.3512	0.5572	0.7589	1.1712	0.03015	0.0079

2.3 精密度

试验方法的精密度是用所测试验结果的相对偏差来说明的。精密度是在相同条件下,同一试样的重复测定值之间的符合程度,通常包括平行精密度和重复精密度。

件下多次重复测定的结果彼此相符合的程度,通常用测定结果的相对标准偏差(RSD)来表示。合格的精密度是仪器保证验证结果准确、可靠的重要前提。由表 2 可知,仪器精密度为 1.144%,可知每次测定结果接近平均值的概率达到 98%以上,为后续工作提供了重要保障。

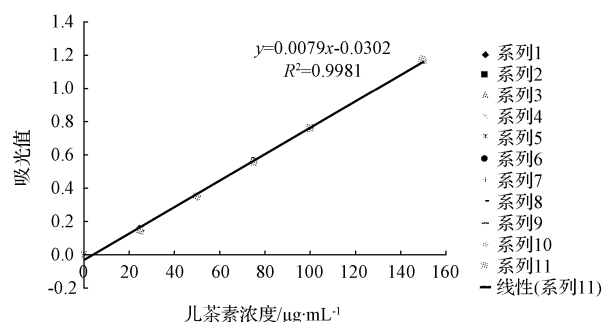


图 2 儿茶素校正曲线

2.3.1 平行性精密度 选择 3 个平行样品,每个样品选择 5 个稀释倍数,按照步骤进行测定,结果见表 4。单宁含量的标准偏差为 0.000993,单宁含量的平均值为 0.40468,因此相对标准偏差 $\text{RSD} = \text{SD} / \bar{X} \times 100\% = \text{标准偏差} / \text{平均值} \times 100\% = 0.2454\%$ 。

表 4 样品平行测定值

提取物体积 $/\mu\text{L}$	吸光度 A1	吸光度 A2	吸光度 A3	吸光度 均值 A	单宁含量 $/\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
600	0.603	0.595	0.610	0.603	0.4039
750	0.772	0.767	0.780	0.773	0.4060
900	0.938	0.922	0.951	0.937	0.4050
1 050	1.100	1.071	1.138	1.103	0.4050
1 200	1.265	1.249	1.277	1.264	0.4035

2.3.2 重复性精密度 选择一个样品,每个样品选择 5 个稀释倍数,每个重复测定 3 次,结果见表 5。单宁含量的标准偏差为 0.000873,单宁含量的平均值为 0.40438,因此相对标准偏差 $\text{RSD} = \text{SD} / \bar{X} \times 100\% = \text{标准偏差} / \text{平均值} \times 100\% = 0.2159\%$ 。无论是平行性精密度,还是重复性精密度,都达到了 99%的正确度,说明此测定方法重现性良好,适合单宁含量的测定。

表 5 样品重复测定值

提取物体积 $/\mu\text{L}$	吸光度 A1	吸光度 A2	吸光度 A3	吸光度 均值 A	单宁含量 $/\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
600	0.603	0.602	0.603	0.603	0.4039
750	0.772	0.772	0.773	0.772	0.4056
900	0.938	0.937	0.937	0.937	0.4050
1 050	1.100	1.097	1.098	1.099	0.4036
1 200	1.265	1.265	1.264	1.265	0.4038

2.4 方法的准确度

对同一样品取 2 份试样,其中 1 份测定原水样中的被测组分,根据原水样的测定值和加标回收分析的控制条件,在另 1 份水样中加入一定量的标准物质,和原水样同时进行测定。加标水样的测定值减去原水样的测定值,其差值与加入标准物质的理论值之比即为样品加标回收率。该方法选用加标量为待测物含量的 1 倍,选择 2 份 3 个不同的提取液稀释倍数,其中 1 份分别加入等同于其浓度的标准儿茶素溶液。由表 6 可知,回收率为 97.47%~101.49%,所以回收率范围在 95%~105%之间,完全符合残留分析要求,数据可行,具有良好的准确度。

表 6 样品准确度测定值

提取物体积 / μL	原样吸光值	对应加入儿茶素 的质量/ mg	加标样吸光值	加标回收率
600	0.603	0.240	1.215	1.0149
750	0.773	0.300	1.554	1.0103
900	0.937	0.366	1.852	0.9765
1 050	1.103	0.426	2.189	0.9846
1 200	1.264	0.483	2.496	0.9747

3 结论

在机器精密度良好的条件下,通过对蛋白-单宁沉淀法的分析,得出该方法的方法检出限 $\text{MDL} = 0.339 \mu\text{g/mL}$ 、平行性精密度 $\text{RSD} = 0.2454\%$ 、重复性精密度 $\text{RSD} = 0.2159\%$ 、加标回收率在 97.47%~101.49%之间,完全符合残留分析要求,数据可行。以儿茶素为标准参考物的表达方式使试验结果更具说服力。而且,在 50~250 $\mu\text{g/mL}$ 儿茶素浓度范围内,具有较好的相性关系($R^2 = 0.9966$)。因此,蛋白-单宁沉淀法能够准确的测定出葡萄籽超微粉中单宁的含量。

参考文献

- [1] 李莹,苏婷婷,王战勇.葡萄加工副产品的综合利用研究[J].中国农学通报,2006,22(4):106-108.
- [2] 李银平,薛雪萍,袁春龙,等.葡萄籽成分与营养评价[J].食品与发酵工业,2006,32(12):108-113.
- [3] 李华,袁春龙,沈洁.超微粉碎技术在葡萄籽加工中的应用[J].华南理工大学学报,2007,35(4):123-126.
- [4] 薛雪萍,李华,袁春龙,等.葡萄籽超微粉的结块性研究[J].西北农林科技大学学报,2007,35(6):104-107.
- [5] 熊何健,周常义,郑新阳,等.葡萄籽多酚对高脂膳食小鼠降血脂和抗氧化功能的影响[J].江西农业学报,2008,20(1):105-107.
- [6] 陆兴熠,刘剑英,钟进义.葡萄多酚对核辐射接触人员氧化损伤防护作用[J].中国公共卫生,2008,24(9):53-54.
- [7] 舒啸尘,李悠慧,严卫星,等.葡萄籽多酚在拟衰老模型小鼠中抗氧化功能的研究[J].卫生研究,2002,31(3):45-50,54.
- [8] 丰娟娟,徐贵发.葡萄籽提取物对人体抗氧化能力的影响[J].山东大学学报,2007,45(10):18-20.
- [9] Harold J, Blytt, Timothy K, et al. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and Xinhbiting digestive enzymes[J]. Journal of chemical ecology, 1988, 6(14): 1455-1465.
- [10] 王书园,俞凌云,朱云.单宁的分析研究现状[J].江苏调味副食品, 2008,25(5):16-19.
- [11] Harbertson J, Kennedy F J A, Adams D O. Change of tannins in grape skin and seed of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot Noir during ripening period[J]. Am J Enol Vitic, 2002, 53:54-59.
- [12] 陈桂芳,倪建秀,周国勤.日本沼虾中磺胺类药物残留量测定的检出限问题[J].江苏农业科学,2009(4):346-349.
- [13] GB/T 5750.3-2006,生活饮用水标准检验方法,水质分析质量控制[S].
- [14] 李义,禹海青,董建芳,等.加标回收在水质分析中的应用及回收率计算方法[J].岩矿测试,2010,29(5):124-127.
- [15] American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater[S]. 19th Edition 1995,1010C,1030E.
- [16] 朱家平,王亚平,刘建坤.不确定度连续传递模型及其在化学测量中的应用[J].地质通报,2009,28(10):1481-1485.

The Method of Tannin-protein Precipitate to Determinate Content of Tannins in Grape Seed

HU Li-zhi, YUAN Chun-long, YUAN Lin

(College of Enology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Using the method of tannin-protein precipitate to detect the content of tannins, the experimental condition from the precision of the machine, linearity, method detection limit (MDL), accuracy and recovery to carry on the comparison were analyzed, in order to determinate the concentration of tannins in the ultrafine powder of grape seed. The results showed that the linearity of correlation of catechin were good in the range of 50~250 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9966$), the precision of the machine was 1.144%, MDL 0.339 $\mu\text{g/mL}$, the parallel precision 0.2454%, the repeatability precision 0.2159% and the recovery rate was 97.47%~101.49%. The method was able to determine the content of tannins in the ultrafine powder of grape seed.

Key words: tannins; tannin-protein precipitate; precision; recovery rate; MDL