

葡萄籽提取物主要质量指标研究

朱 宏¹, 姜 雨², 梁克红¹, 仇 菊¹, 王 靖^{1*}

(1. 农业农村部食物与营养发展研究所, 北京 100081; 2. 国家市场监督管理总局食品审评中心, 北京 100070)

摘 要: 目的 对比目前现行主要质量标准, 验证保健食品原料葡萄籽提取物主要质量指标的参数。**方法** 搜集 30 批次葡萄籽提取物, 采用紫外分光光度法测定了葡萄籽提取物的原花青素值、多酚含量, 采用液相色谱法测定了儿茶素、表儿茶素含量, 参照食品安全国家标准, 测定了灰分、水分、微生物指标(菌落总数、大肠杆菌、沙门氏菌、酵母菌、霉菌)、重金属和溶剂残留等主要质量指标。**结果** 所有葡萄籽提取物样品中原花青素值范围在 81.1%~108.2%之间; 儿茶素及表儿茶素含量范围为 1.12%~8.58%; 多酚含量在 70.1%~106.1%之间; 灰分含量范围在 0.2%~1.8%; 水分含量范围在 3.76%~5.23%。变异系数由大到小的顺序为: 儿茶素、表儿茶素 > 灰分 > 多酚 > 水分 > 原花青素值。所有样品菌落总数均小于 10 CFU/g, 大肠杆菌、沙门氏菌均未检出, 酵母菌、霉菌总数均小于 10 CFU/g, 甲醇、乙醇残留均小于 2 mg/kg, 重金属(以 Pb 计)小于 0.05 mg/kg。**结论** 与我国目前唯一相关标准对比, 所有质量指标中, 仅原花青素值的限量需要进一步调整。

关键词: 葡萄籽提取物; 质量标准; 理化指标; 微生物指标

Study on the main quality indexes of grape seed extract

ZHU Hong¹, JANG Yu², LIANG Ke-Hong¹, QIU Ju¹, WANG Jing^{1*}

(1. Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China;
2. Center for Food Evaluation, State Administration for Market Regulation, Beijing, 100070, China)

ABSTRACT: Objective To verify the main quality index parameters of grape seed extract, compared with the current main related quality standards. **Methods** 30 batches of grape seed extracts were collected, the contents of procyanidins and polyphenols in grape seed extract were determined by UV spectrophotometry. The contents of catechin and epicatechin were determined by liquid chromatography. The main quality indexes such as ash, moisture, microbial indexes (total number of colonies, *Escherichia coli*, *Salmonella*, yeast, mold), heavy metals and solvent residues were determined according to the national food safety standards. **Results** Procyanidins of all arape seed extracts ranged from 81.1% to 108.2%; catechins and epicatechins ranged from 1.12% to 8.58%; polyphenols ranged from 70.1% to 106.1%; ash ranged from 0.2% to 1.8%; moisture content ranged from 3.76% to 5.23%. The order of coefficient of variation was catechin and epicatechin>ash>polyphenol>moisture>procyanidin value. The total number of colonies in all samples was less than 10 CFU/g, *Escherichia coli* and *Salmonella* were not detected, the total number of yeasts and molds was less than 10 CFU/g, the residue of methanol and ethanol was less than 2 mg/kg, and

基金项目: 国家市场监督管理总局保健食品审评中心课题项目、中国农业科学院科技创新工程项目

Fund: Supported by the Center for Food Evaluation, State Administration for Market Regulation, and the Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences

***通讯作者:** 王靖, 研究员, 主要研究方向为食物与营养监测。E-mail: wangjing07@caas.cn

***Corresponding author:** WANG Jing, Professor, Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, No. 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: wangjing07@caas.cn

the heavy metal (based on Pb) was less than 0.05 mg/kg. **Conclusion** Compared with the only relevant standard in China, only the limit of procyanidins in all quality indicators needs to adjust further.

KEY WORDS: grape seed extract; quality standard; physical and chemical indexes; microbial index

1 引言

葡萄酒生产是目前世界上最重要的农业活动之一，酿酒过程中会产生大量的废物和副产品，如葡萄杆、葡萄籽、耗尽的酵母、酒泥和废水^[1]。在我国，每年葡萄酒加工企业产生大量葡萄籽废弃物，葡萄籽富含高附加值的化合物，可被用作食品添加剂或保健食品的原料。葡萄籽提取物(grape seed extract, GSE)是从葡萄籽中提取分离得到的一类多酚类物质，主要由原花青素、儿茶素、表儿茶素、没食子酸、表儿茶素没食子酸酯等多酚类物质组成。一般是由单体(5%~30%)、低聚物(17%~63%)和高聚物(11%~39%)组成的不均匀混合物^[2]。原花青素是 GSE 的主要成分，GSE 的红色外观和苦涩口感均来自于原花青素^[3]。GSE 具有很好地生理功能活性，如抗氧化、抗衰老、抗炎症、抑菌、抗肿瘤等^[4,5]。

目前，GSE 是一种重要的保健食品及其原料。然而，我国还没有在保健食品原料层面，针对 GSE 制定质量标准。因此，2019 年国家市场监督管理总局食品审评中心(国家中药品种保护审评委员会)作为保健食品审批主管部门，组织专家对 GSE 质量标准进行研究梳理。研究显示，目前国际上最权威的关于 GSE 质量标准为美国药典《葡萄籽低聚原花青素》^[6](USP38)，我国葡萄籽提取物质量标准有 T/CCCMHP1.19-2016《植物提取物-葡萄籽提取物(葡萄籽低聚原花青素)》^[7]。GSE 质量标准主要的指标包括原花青素含量，儿茶素、表儿茶素含量，多酚含量，水分，灰分，微生物指标，重金属等。然而，目前我国企业生产的 GSE 主要质量指标的水平还需要普查，关于保健食品标准中 GSE 主要质量指标的参数如何设置也需要结合具体生产水平而定。

因此，为摸清我国 GSE 整体质量水平，本研究搜集了我国两大主要生产企业，共 30 批次 GSE 样品，测定了其质量指标，并对比现行主要相关质量标准，旨在为我国保健食品原料标准制定提供重要参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

从我国两大主要 GSE 生产商(天津市尖峰天然产物研究开发有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司)各收集 15 批次，合计共 30 批次 GSE 样品。同品种、同等级、同一批投料生产的 GSE 产品，以同一生产日期为 1 批次。

USP 葡萄籽提取物低聚原花青素标准品(CAS: 222838-60-0, 纯度≥97%)、(+)-儿茶素标准品(CAS: 154-23-4, 纯度≥97.0%)、没食子酸标准品(CAS: 149-91-5, 纯度≥97.5%)、福林酚试剂(北京索莱宝科技有限公司); 盐酸、正丁醇、甲醇、硫酸铁铵(色谱纯, 国药集团)。

2.2 实验方法

2.2.1 原花青素值测定

参照 T/CCCMHP1.19-2016^[7]，略有改动。精密移取 1.0 mL 供试品溶液，6.0 mL 5%的盐酸-正丁醇溶液和 0.2 mL 2%硫酸铁铵溶液至 10 mL 的顶空瓶中，盖上顶空瓶的盖和垫，用压盖器封口，将顶空瓶放于水浴(100 °C±2 °C)锅中(瓶中试剂部分应处于水面以下)，水浴 40 min，取出，在冷水浴(2 °C~10 °C)中迅速冷却 20 min。照上述方法精密移取 1 mL 甲醇，6 mL 盐酸-正丁醇和 0.2 mL 硫酸铁铵溶液于 10 mL 顶空瓶中，同法制备 1 个试剂空白。用试剂空白作对照，在 546 nm 处测定供试品溶液的吸光度 A₁。葡萄籽提取物中原花青素值以 w₁ 计，按下列公式计算：

$$w_1 = (A_1 \times V_1 \times 7200) / (m_1 \times 275)$$

式中：w₁ 为供试品中原花青素值的质量分数；A₁ 为供试品溶液在吸收波长 546 nm 处的吸光度；V₁ 为供试品溶液的稀释体积，mL；m₁ 为供试品的称样量，mg；275 为标准原花青素 100 的检测值。

2.2.2 儿茶素与表儿茶素的测定

参考美国药典，略有改动^[6]。采用液相色谱法。色谱条件。色谱柱：Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；检测波长：278 nm；流动相 A：色谱纯乙腈；流动相 B：0.3%磷酸。梯度洗脱程序为见表 1。流速：0.7 mL/min；温度：30 °C。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution procedure

时间/min	A/%	B/%
0~45	10-20	90-80
45~65	20-60	80-40
65~66	60-10	40-90
66~85	10	90

配置 0.5 mg/mL(+)-儿茶素标准品溶液，5 mg/mL USP 的葡萄籽低聚原花青素溶液，进样量为 10 μL，确定保留时间。精密称取供试品 50 mg，置于 10 mL 容量瓶中，加

溶解液适量, 超声溶解, 将溶解液定容至刻度, 摇匀, 配成浓度为 5 mg/mL 的样品溶液, 离心, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得供试品溶液。采用外标法计算含量。葡萄籽提取物中(+) - 儿茶素和(-) - 儿茶素含量和以质量分数 w_3 计, 数值以%表示, 按下列公式计算:

$$w_3 = \frac{A_2 \times C_2 \times V_3}{A_3 \times m_3} \times 100\%$$

式中: w_3 为供试品中(+) - 儿茶素和(-) - 表儿茶素的组分的质量分数和, %; A_2 为供试品溶液中(+) - 儿茶素和(-) - 表儿茶素的峰面积和; A_3 为标准溶液 A 中图谱(+) - 儿茶素的峰面积; C_2 为标准品溶液 A 中(+) - 儿茶素的浓度, mg/mL; V_3 为供试品溶液的稀释体积, mL; m_3 为供试品的称样量, mg。

2.2.3 福林酚法测定总酚含量

参照朱宏等^[8]研究, 采用福林酚法测定提取液中的总酚含量。标准曲线绘制。使用没食子酸标准品配制质量体积浓度为 500 μg/mL 的水溶液, 分别取 200、400、600、800 和 1000 μL 置于 10 mL 离心管中, 加水至 6 mL, 再分别加入 0.5 mL 福林酚试剂、1.5 mL 20% Na_2CO_3 溶液以及 2 mL 水。将上述溶液摇匀后, 置于 75 °C 水浴中保温 10 min。在 760 nm 处测定吸光值。

样品测定: 以不加提取液的溶液为空白, 将多酚提取液用 50% 乙醇适当稀释后取 500 μL, 加水至 6 mL, 之后步骤与制作标准曲线同, 得到吸光值。结果以总多酚占干物的质量分数表示。

2.2.4 水分与灰分的测定

水分测定参照 GB 5009.3-2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》^[9], 灰分测定参照 GB 5009.4-2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》^[10]。

2.2.5 微生物

菌落总数的测定参照 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[11]。大肠杆菌检测参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[12], 沙门氏菌的测定参照 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[13]。霉菌与酵母的测定参照 GB 4789.15-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》^[14]。

2.2.6 重金属与溶剂残留

重金属的测定参照 GB 5009.74-2014《食品安全国家标准 食品添加剂中重金属限量试验》^[15]。本法中所指的重金属系指在实验条件下能与硫代乙酰胺或硫化钠作用显色的金属杂质。溶剂残留按《中华人民共和国药典(2010 年版)》^[16]第一部附录 VIII P 残留溶剂测定法进行测定。

2.3 数据处理

采用 SPSS 对数据进行方差分析。

3 结果与分析

3.1 理化分析

表 2 为 30 批次葡萄籽提取物主要理化指标, 包括原花青素值、儿茶素和表儿茶素含量、多酚、灰分和水分。图 1 为儿茶素与表儿茶素的液相色谱图。由表 2 可知, 原花青素值范围在 81.1%~108.2%之间, 均值为 94.60, 变异系数为 6.7%; 儿茶素、表儿茶素含量范围为 1.12%~8.58%, 均值为 3.92%, 变异系数为 63.25%; 多酚含量在 70.1%~106.1%之间, 均值为 89.0%, 变异系数为 10.81%; 灰分含量范围在 0.2%~1.8%, 均值为 0.85%, 变异系数为 59.47%; 水分含量范围在 3.76%~5.23%, 均值为 4.52%, 变异系数为 7.12%。5 个指标, 按照变异系数由大到小的顺序为: 儿茶素、表儿茶素 > 灰分 > 多酚 > 水分 > 原花青素值。

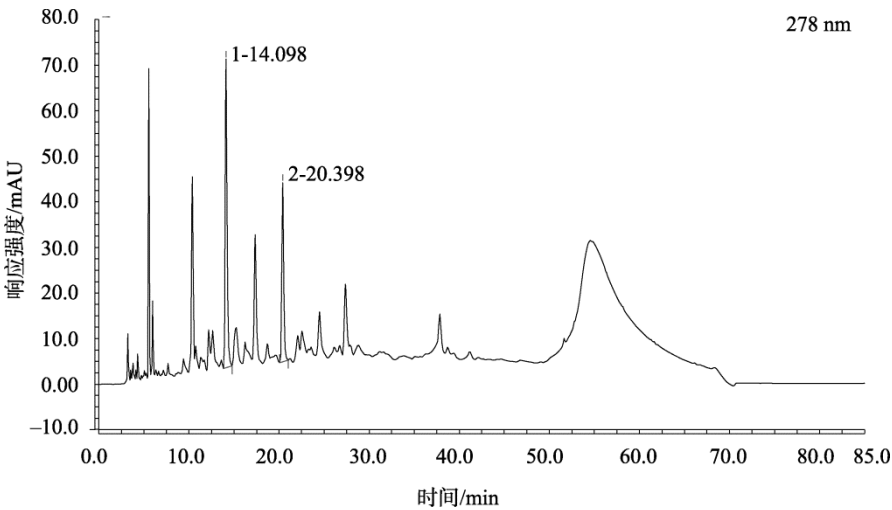
原花青素值表征的是原花青素的相对含量, 而非绝对含量。原花青素, 尤其是低聚原花青素是葡萄籽提取物中最主要的功能活性成分^[17]。朱宏等^[18]研究显示烘干等热加工条件会使得原花青素发生降解, 而冷冻或超高压处理则对其影响不大。本研究结果显示, 虽然原花青素值、多酚的变异系数并不大, 分别为 6.70%和 10.81%。以上 2 个指标的共同点是只能表征一类混合物的相对含量, 无法对其中有效组分进行质量控制。

3.2 微生物

表 3 为 30 批次 GSE 微生物检测结果。结果显示所有样品菌落总数均小于 10 CFU/g, 大肠杆菌、沙门氏菌均未检出, 酵母菌总数小于 10 CFU/g, 霉菌总数小于 10 CFU/g。本实验结果均满足美国药典 USP 38^[6]以及我国团体标准 T/CCCMHPIE1.19-2016 对于 GSE 微生物的限量要求。

表 2 葡萄籽提取物理化指标
Table 2 Physical and chemical indexes of grape seed extraction

指标	均值	标准差	最小值	最大值	变异系数/%
原花青素值/%	94.60	6.34	81.1	108.2	6.70
儿茶素、表儿茶素/%	3.92	2.48	1.12	8.58	63.25
多酚/%	89.0	9.6	70.1	106.1	10.81
灰分/(g/100 g)	0.85	0.51	0.2	1.8	59.47
水分/%	4.52	0.32	3.76	5.23	7.12



注: 1. 儿茶素; 2. 表儿茶素。
图 1 儿茶素与表儿茶素的液相色谱图
Fig.1 HPLC analysis of catechin and epicatechin

表 3 微生物指标检测结果
Table 3 Microbiological index test results

样品编号	菌落总数/(CFU/g)	大肠杆菌/(25 g)	沙门氏菌/(25 g)	酵母菌/(CFU/g)	霉菌/(CFU/g)
所有样品	<10	未检出	未检出	<10	<10

3.3 溶剂残留与重金属

表 4 为 30 批次 GSE 样品溶剂残留与重金属检测结果, 结果显示甲醇、乙醇残留均小于 2 mg/kg, 重金属(以 pb 计) 小于 0.05 mg/kg。需要特别注意的是: 由于最新版本的 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[19] 已经删除了甲醇作为加工助剂。虽然 T/CCC MHPIE1.19-2016 中含有甲醇残留指标, 但遵守团体标准应当符合国家强制标准的原则, 所以甲醇将不能在 GSE 的提取工艺中出现, 其残留量应为未检出。GB 5009.266-2016《食品安全国家标准 食品中甲醇的测定》^[20]中显示, 该国标检测方法的检出限为 7.5 mg/kg, 而本实验中 GSE 样品均小于 2 mg/kg, 低于检出限可视为未检出, 符合食品安全国家标准的规定。

表 4 溶剂残留与重金属检测结果
Table 4 Detection results of solvent residues and heavy metals

样品编号	溶剂残留(甲 醇)/(mg/kg)	溶剂残留(乙醇) /(mg/kg)	重金属(以 Pb 计)/(mg/kg)
所有样品	<2	<2	<0.05

3.4 质量指标参数分析

图 2 为测定的 30 批次 GSE 样品主要质量指标的分

布情况, 包括原花青素值, 儿茶素、表儿茶素含量, 多酚含量, 灰分和水分, 虚线指示的为团体标准 T/CCC MHPIE1.19-2016 对应的值。团体标准规定, 原花青素值不低于 95%, 儿茶素与表儿茶素含量不高于 19%, 多酚含量不低于 70%, 灰分不高于 2%, 水分不高于 6%。由图 2 可知, 除原花青素值以外, 30 批次 GSE 样品中儿茶素、表儿茶素含量、多酚、灰分、水分均符合团体标准所设定的限制。与团体标准对比, 规定原花青素值不低于 95%, 然而本实验的 30 批次样品中, 仅有 12 个样品高于 95%。原花青素值作为最早的葡萄籽提取物质量指标, 原花青素值 95 已成为国际市场中、低端葡萄籽提取物产品的代言词, 该指标对原花青素中有效组分没有进行质量控制。从本研究结果也可以看出, 该指标在质量控制上存在缺陷, 高于或低于限值也不能完全说明 GSE 的质量。与我国团体标准不同, 美国药典直接采用低聚原花青素含量作为指标, 限值为 $\geq 75\%$ 。直接以低聚原花青素含量作为质量指标, 优点是准确。美国药典采用液相色谱法, 以 USP 的低聚原花青素、儿茶素标品作为内标。鉴于我国国家标准中已有 GB/T 22244-2008《保健食品中前花青素的测定》^[21], 规定了原花青素的液相色谱法, 建议今后制定葡萄籽提取物质量标准时, 以原花青素含量为指标, 采用液相色谱法测定。

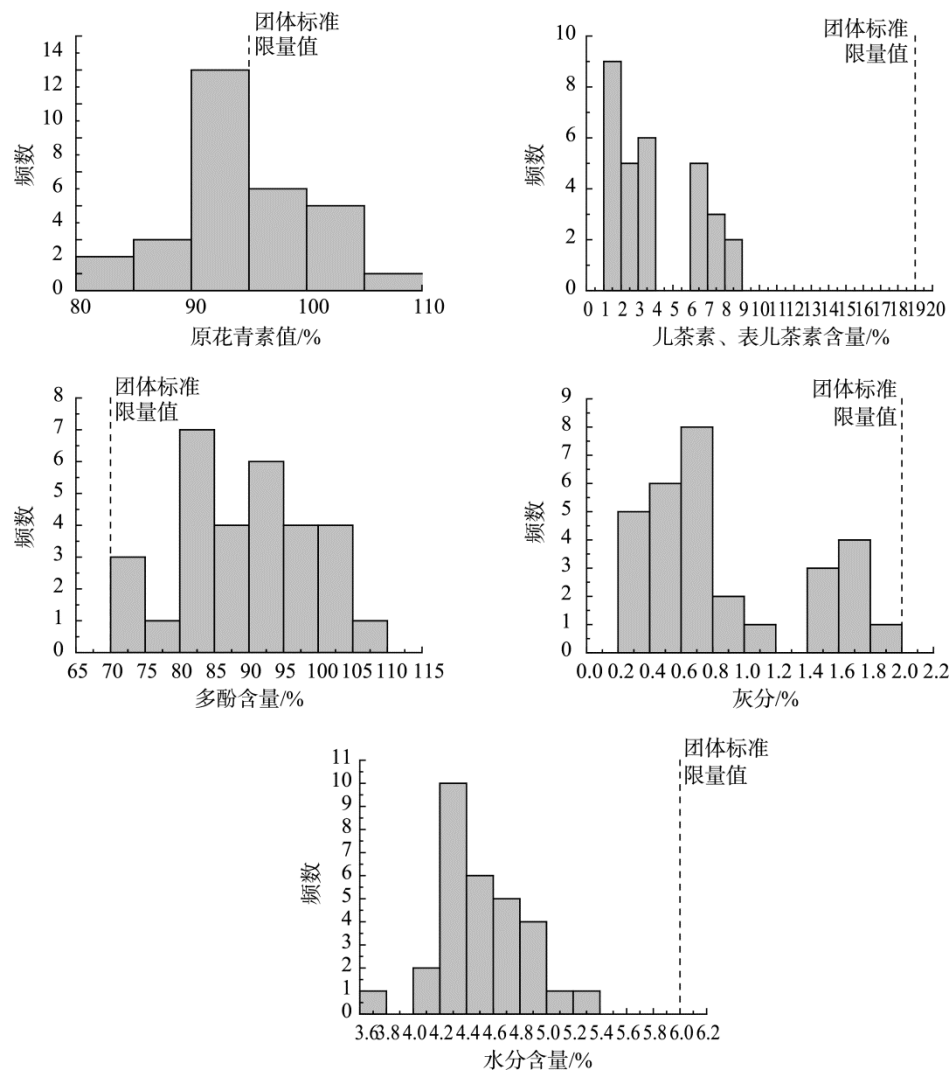


图2 GSE 样品质量指标分布(n=3)
Fig.2 Distribution of GSE sample quality index (n=3)

4 结论与讨论

本研究测定了 30 批次 GSE 样品的主要质量指标, 并与我国唯一相关标准(T/CCCMHPIE 1.19-2016)进行对比分析。结果显示, 除原花青素值以外, 30 批次 GSE 样品中儿茶素、表儿茶素含量、多酚、灰分、水分均符合该项团体标准(T/CCCMHPIE 1.19-2016)所设定的限制。然而原花青素作为 GSE 最重要的质量指标, 仅 40%样品可以达到团体标准要求。本研究对今后相关国家标准的制定有以下 3 点建议: ①取消原花青素值, 采用原花青素含量作为主要质量指标; ②原花青素含量的测定方法采用高效液相色谱法; ③溶剂残留等相关安全指标参照食品安全国家标准执行, 无需单独设置。

参考文献

[1] Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, et al. Green alternative methods for the

extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2016, 49: 96–109.

[2] Waterhouse AL, Ignelzi S, Shirley JR. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts [J]. *Am J Enolog Viticul*, 2000, 51(4): 383–389.

[3] Hernandez-Jimenez A, Gomez-Plaza E, Martinez-Cutillas A, et al. Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell × Syrah Grapes [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(22): 10798–10803.

[4] Kamel C, Mohamed M, Takwa B, et al. Safety evaluation, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of subchronically dietary supplemented high dosing grape seed powder (GSP) to healthy rat [J]. *Biomed Pharm*, 2018, 107: 534–546.

[5] Sangeetha P, Balu M, Haripriya D, et al. Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins [J]. *Exper Gerontol*, 2005, 40(10): 820–828.

[6] The United States Pharmacopoeial Convention. Grape seeds oligomeric proanthocyanidins [M]. Baltimore: United Book Press, 2014.

- [7] T/CCCMHPIE1.19-2016 植物提取物-葡萄籽提取物(葡萄籽低聚原花青素)[S].
T/CCCMHPIE1.19-2016 Plant extract grape seed extract (grape seed oligomeric proanth cyanidins) [S].
- [8] 朱宏, 陈敏, 孙恬, 等. 不同加工方式对香椿多酚抗氧化活性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(4): 111-114.
Zhu H, Chen M, Sun T, *et al.* Effect of different processing approaches on antioxidant activity of toona sinensis polyphenols [J]. J Chin Agric Univ, 2010, 15(4): 111-114.
- [9] GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定[S].
GB 5009.3-2016 National food safety standard-Determination of moisture in food [S].
- [10] GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S].
GB 5009.3-2016 National food safety standard-Determination of ash in food [S].
- [11] GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
GB 4789.2-2016 National food safety standard-Microbiological examination-Determination of total bacterial count [S].
- [12] GB 4789.3-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数[S].
GB 4789.3-2016 National food safety standard-Microbiological examination-Coliform count [S].
- [13] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Salmonella test [S].
- [14] GB 4789.15-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数[S].
GB 4789.15-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Mould and yeast count [S].
- [15] GB 5009.74-2014 食品安全国家标准 食品添加剂中重金属限量试验[S].
GB 5009.74-2014 National food safety standard-Limit test of heavy metals in additive [S].
- [16] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
Pharmacopoeia Committee of the people's Republic of China. Pharmacopoeia of the people's Republic of China (2010 Edition) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010.
- [17] Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry [J]. J Funct Food, 2020, 67: 103861.
- [18] 朱宏, 徐佳, 王晓宇, 等. 国内外葡萄籽提取物(低聚原花青素)质量标准对比分析[J]. 中国标准化, 2020, (4): 187-192.
Zhu H, Xu Jia, Wang XY, *et al.* Comparative of standards of grape seed extract (oligomeric proanthocyanidins) at home and abroad [J]. Chin Stand, 2020, (4): 187-192.
- [19] GB 2760-2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard-Standard for use of food additives [S].
- [20] GB 5009.266-2016 食品安全国家标准 食品中甲醇的测定[S].
GB 5009.266-2016 National food safety standard-Determination of methanol in food [S].
- [21] GB/T 22244-2008 保健食品中前花青素的测定[S].
GB/T 22244-2008 Determination of proanthocyanidins in health food [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



朱 宏, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食物营养与安全。
E-mail: zhuhong@caas.cn

王 靖, 研究员, 主要研究方向为食物与营养监测。
E-mail: wangjing07@caas.cn