

提取溶剂对青稞提取物总酚、黄酮含量及其抗氧化活性的影响

Effect of different solvents on total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of highland barley

申迎宾¹

张友维²

黄才欢¹

陈永生¹

SHNE Ying-bin¹ ZHANG You-wei² HUANG Cai-huan¹ CHEN Yong-sheng¹

王立^{3,4} 欧仕益¹ 张晖^{3,4}

WANG Li^{3,4} OU Shi-yi¹ ZHANG Hui^{3,4}

(1. 暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632; 2. 江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223003;
3. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 4. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China;

2. Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an, Jiangsu 223003, China;

3. China State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;

4. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:以 3 种不同的青稞为原料,采用不同的提取溶剂(水、60%乙醇、60%甲醇、60%丙酮、95%乙醇、100%甲醇、100%丙酮)对青稞进行提取。对各提取物的总酚、总黄酮进行测定,同时采用 3 种抗氧化方法:二苯代苦味酰自由基(DPPH)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐自由基(ABTS)和总抗氧化能力(FARP)评价青稞提取物的抗氧化活性。结果表明,95%乙醇和 60%丙酮更有利于青稞多酚的提取。藏青 2000 的各溶剂提取物的总酚、总黄酮及抗氧化活性普遍高于相应溶剂的循化蓝青稞和香格里拉绿青稞。藏青 2000 的 60%丙酮提取物含有最高的总酚含量,达到 211.92 mg GAE/100 g DW;在 60%乙醇提取时具有最高的总黄酮含量,达到 60.11 mg RT/100 g DW;在 60%乙醇提取时具有最强的 DPPH 清除能力,达到 80.08%;而用 60%丙酮提取时,具有最强的 ABTS 清除能力和总抗氧化能力,分别达到了 1.85、9.28 mmol TEAC/100 g DW。总酚含量与抗氧化活性均具有显著的相关性,FRAP 法与 DPPH、

ABTS 法具有极显著的相关性。综上所述,青稞富含总酚成分,是一种潜在的天然抗氧化剂资源。

关键词:青稞;总酚;总黄酮;抗氧化;DPPH;ABTS;FRAP

Abstract: The objectives of this study were to evaluate total phenolic, total flavonoid content and antioxidant activities of different extraction from three kinds of highland barley. The results showed that 95% ethanol and 60% acetone were better to extract phenolic compounds than other solvents. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant activities of Zangqing 2000 using different solvents were higher than that of Xunhua and Shangri-la highland barley. Meanwhile, the highest total phenolic content of Zangqing 2000 was 211.92 mg GAE/100 g DW in 60% acetone, the highest total flavonoid content of Zangqing 2000 was 60.11 mg RT/100 g DW in 60% ethanol, the highest ABTS scavenging ability and total antioxidant activity of Zangqing 2000 were 1.85 and 9.28 mmol TEAC/100 g DW, respectively. Furthermore, there was a significant correlation between total phenolic content and antioxidant methods. FRAP method was significantly correlated to DPPH and ABTS methods. These results suggested that highland barley was rich in phenolic content and considered as a good natural antioxidant resource.

Keywords: highland barley; total phenolic content; total flavonoid content; antioxidant activity; DPPH; ABTS; FRAP

基金项目:中国博士后科学基金(编号:2016M602605);广东省自然科学基金(编号:32215105);江苏省自然科学基金(编号:BK20130410);“十二五”科技支撑计划(编号:2012BAD37B08-3);863 计划(编号:2013AA102203-7);国家自然科学基金(编号:31471617)

作者简介:申迎宾,男,暨南大学在读博士后。

通信作者:张晖(1967-),女,江南大学教授。

E-mail: zhanghuiguwzx@gmail.com

收稿日期:2015-08-31

流行病学研究^[1-3]表明,全谷物与氧化应激相关的慢性病有着密切关系,在一定程度上有助于缓和慢性病的发展。

其机制可能与全谷物中的多酚类成分有关^[4-5],因此谷物的抗氧化活性开始被广大学者重视。

随着人们对全谷物的认识和不断的推广,谷物多酚被认为是全谷物发挥作用的主要物质基础。青稞由于其生长在高海拔、高寒、缺氧、强光照的极端环境下,因此和其他谷物不同,是一种高蛋白、高纤维、低脂肪、低糖的谷物资源,这符合现代人“三高两低”的饮食结构。以往研究多偏向于青稞花色苷的研究^[6-7],而对青稞总多酚和黄酮的研究较少^[8-9],但是有关溶剂对其多酚含量的影响报道也较少^[10],Zhao等^[10]研究比较了水、80%乙醇、80%甲醇、80%丙酮4种提取溶剂对大麦多酚及抗氧化活性的影响,认为80%丙酮适合大麦多酚成分的提取,但没有考虑溶剂对总黄酮的影响。张海晖等^[11]研究了70%乙醇、70%甲醇和70%丙酮对米糠、高粱、甜高粱、大麦、水稻、燕麦等谷物的多酚含量及抗氧化活性的影响,认为70%乙醇更有利于多酚化合物的提取,但没有研究高浓度的有机溶剂对多酚含量的影响,也没有考察其对总黄酮含量的影响。因此,本试验选择3种青稞为原料,较为系统的研究不同的提取溶剂对青稞总酚、总黄酮含量和抗氧化活性(DPPH、ABTS、FARP)的影响;分析青稞总酚、总黄酮与抗氧化活性的相关性;抗氧化方法间的相关性,为其功能产品的开发提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

藏青2000:产地西藏日喀则,迪庆香格里拉青稞资源开发有限公司;

循化蓝青稞、香格里拉绿青稞:彩云之南美食坊;

福林酚试剂:2 mol/L,上海荔达生物科技有限公司;

对二苯代苦味酰自由基(DPPH)、3-吡啶三吡嗪(TPTZ)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)和水溶性维生素E衍生物(Trolox):分析纯,美国Sigma公司;

没食子酸、芦丁:纯度>99.98%,北京百灵威科技有限公司;

高速中药粉碎机:DFY-500型,浙江温岭市林大机械有限公司;

水浴恒温振荡器:SHZ-B型,上海市实验仪器厂;

电热鼓风干燥箱:GZX-QF101-3S型,上海跃进医疗器械厂;

可见分光光度计:722N型,上海精密科学仪器有限公司;

精密电子天平:FA100,上海上平仪器公司;

离心机:L550型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 提取工艺流程 青稞用粉碎机整粒磨碎,过60目筛,备用。准确称量1.0 g各青稞粉末,用25 mL相应提取溶剂在60℃下,震荡提取2 h,重复2次,旋转浓缩,采用60%乙醇定容25 mL,青稞提取物浓度为40 mg青稞谷物/mL,-20℃保存待测。

1.2.2 总酚含量的测定 采用福林酚法^[12]。取0.5 mL青

稞提取物样品,加入0.5 mL福林酚试剂和2 mL 15%的碳酸钠溶液,充分混合,定容至10 mL,然后混匀,室温下反应60 min,以不加碳酸钠溶液的反应液为空白,在特征吸收波长765 nm处测定吸光度值,记录数据,根据没食子酸标准曲线的线性方程: $Y=0.0893X+0.1295$ ($R^2=0.9978$)计算样品总酚的相对含量。以mg GAE/100 g DW计算。

1.2.3 总黄酮的测定 根据NY/T 1295—2007标准,配制不同浓度的芦丁标准溶液0.000,0.025,0.050,0.100,0.150,0.200 mg/mL,取各标准液1 mL,加入0.1 mol/L三氯化铝($AlCl_3 \cdot 6H_2O$)2 mL,加入乙酸钾1.5 mL,加入相应溶剂0.5 mL,室温放置30 min,以试剂溶剂为参比溶液,在420 nm处测定吸光度。以吸光度和芦丁浓度绘制标准曲线,样品测定时,取样品液1 mL,按照上述操作进行试验,根据线性方程 $Y=11.828X+0.0451$ ($R^2=0.9941$)测定样品中的总黄酮含量,表示为mg Rutin/100 g DW。

1.2.4 DPPH自由基清除能力测定 根据文献^[13~14]并做一定修改。称量一定质量的DPPH,以乙醇为溶剂,制浓度为 2×10^{-4} mol/L的DPPH溶液,保存于4℃冰箱中,备用。在4 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH溶液中加入0.5 mL青稞提取液样品,摇匀,然后在室温下放置30 min,在517 nm下测定其吸光值 A_i ;同时测定4 mL 2×10^{-4} mol/L DPPH·溶于0.5 mL的60%乙醇混合液的吸光值 A_c ;根据式(1)计算青稞样品对DPPH的抑制率。

$$S = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S——DPPH的抑制率,%;

A_i ——加样品时DPPH·溶液的吸光值;

A_c ——未加样品时DPPH·溶液的吸光值。

1.2.5 ABTS自由基的测定 根据文献^[10]并做一定修改,取4.9 mL ABTS⁺溶液与0.1 mL青稞提取液混合,反应10 min,测定734 nm下吸光度,空白为0.1 mL相应提取溶剂。以Trolox为参照,制作标准曲线,根据线性方程 $Y=0.8151X+0.0076$ ($R^2=0.9985$),计算对ABTS自由基的清除效果,计算结果以mmol TEAC/100 g DW表示。

1.2.6 总抗氧化能力测定 根据文献^[15]并做相应修改:取4 mL的FRAP试剂与0.1 mL青稞提取物样品,混匀,反应10 min,然后在593 nm下测吸光值。以不同浓度梯度的Trolox溶液为标样作标准曲线,总抗氧化能力用TEAC(水溶性维生素E抗氧化当量,trolox equivalent antioxidant capacity)表示,空白0.1 mL相应提取溶剂,得到吸光值(Y)与Trolox含量(x)之间的回归方程 $Y=0.6726X+0.2266$ ($R^2=0.9959$)。

1.3 数据处理与分析

采用Excel 2003和SPSS17.0软件进行数据处理,结果以均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂对青稞提取物总酚含量的影响

研究^[1,16-17]表明,谷物中富含多酚成分,是一种潜在的

天然抗氧化剂资源。溶剂对青稞提取物总酚含量的影响见表 1。由表 1 可知,藏青 2000 和香格里拉绿青稞均在 60% 丙酮提取时,具有最高的总酚含量,分别达到了 211.92, 180.36 mg GAE/100 g DW, 是其相应水提取物的 1.35, 2.65 倍。而循化蓝青稞在 95% 乙醇提取时,总酚含量最高,达到了 169.84 mg GAE/100 g DW, 是其水提取物的 1.69 倍。除 60% 丙酮和 95% 乙醇外,在使用相同的提取溶剂时,藏青 2000 的总酚含量最高,循化蓝青稞次之,而香格里拉绿青稞最低。综上表明,在提取青稞总酚时,可以选择 60% 的丙酮或者 95% 的乙醇作为提取溶剂。

表 1 溶剂对青稞提取物总酚含量的影响

Table 1 Effect of different extraction solvents on total phenolic contents of highland barley

提取溶剂	mg GAE/100 g DW		
	藏青 2000	循化蓝青稞	香格里拉绿青稞
水	156.07±5.37	100.51±4.07	68.12±2.06
60%乙醇	188.02±10.11	123.03±7.23	109.55±6.77
95%乙醇	201.32±7.92	169.84±8.77	172.49±9.22
60%甲醇	201.23±8.63	133.24±6.55	96.99±5.21
100%甲醇	189.11±8.72	142.65±6.98	99.46±6.23
60%丙酮	211.92±8.44	132.59±4.33	180.36±6.44
100%丙酮	176.32±6.94	98.86±4.07	73.66±3.77

2.2 提取溶剂对青稞提取物总黄酮含量的影响

溶剂对青稞提取物总黄酮含量的影响见表 2。由表 2 可知,藏青 2000 和循化蓝青稞均在 60% 乙醇提取时,具有最高的总黄酮含量,分别达到了 60.11, 45.06 mg RT/100 g DW, 是其相应水提取物的 1.36, 1.28 倍。而香格里拉绿青稞在 60% 的甲醇提取时具有最高的总黄酮含量,达到了 52.99 mg RT/100 g DW, 是其水提取物的 1.39 倍。在使用相同提取溶剂时,藏青 2000 的总黄酮含量均较循化蓝青稞和香格里拉绿青稞高。综上表明,在提取青稞总黄酮时,60% 乙醇和 60% 甲醇可以作为提取溶剂。

2.3 DPPH 自由基清除能力

溶剂对青稞提取物清除 DPPH 自由基能力的影响见表 3。由表 3 可知,3 种青稞均在 60% 乙醇提取时,DPPH 清除能力达到最高,分别达到了 80.08%, 72.66%, 50.32%, 是其相应水提取物的近 13, 57, 22 倍。同时,青稞的相同溶剂

表 2 溶剂对青稞提取物总黄酮含量的影响

Table 2 Effect of different extraction solvents on total flavonoid contents of highland barley

提取溶剂	mg RT/100 g DW		
	藏青 2000	循化蓝青稞	香格里拉绿青稞
水	44.23±3.22	35.29±2.08	38.07±1.97
60%乙醇	60.11±3.07	45.06±2.66	50.94±2.96
95%乙醇	55.38±2.76	40.02±2.08	39.26±2.06
60%甲醇	52.27±2.79	37.47±1.78	52.99±1.97
100%甲醇	44.05±2.22	29.03±1.98	40.11±2.08
60%丙酮	39.26±1.98	40.27±2.88	50.39±2.67
100%丙酮	48.29±3.88	39.85±2.11	41.66±2.08

表 3 溶剂对青稞提取物清除 DPPH 自由基能力的影响
Table 3 Effect of different extraction solvents on DPPH radical scavenging ability of highland barley %

提取溶剂	藏青 2000	循化蓝青稞	香格里拉绿青稞
水	6.21±0.51	1.28±0.12	2.31±0.21
60%乙醇	80.08±2.08	72.66±4.32	50.32±3.21
95%乙醇	51.21±3.29	44.78±2.93	25.33±1.92
60%甲醇	49.87±2.98	46.76±3.18	23.97±1.99
100%甲醇	52.38±2.06	48.59±3.98	26.44±2.01
60%丙酮	58.62±2.58	54.96±2.96	22.39±1.97
100%丙酮	59.33±2.79	46.47±2.65	26.59±1.96

提取物(除水外)的 DPPH 自由基清除能力普遍是藏青 2000 最高,循化蓝青稞次之,香格里拉绿青稞最低。总体来看,如果以 DPPH 清除能力为衡量指标,则 60% 乙醇更适合作为青稞的提取溶剂。

2.4 ABTS 自由基清除能力

溶剂对青稞提取物清除 ABTS 自由基能力的影响见表 4。由表 4 可知,3 种青稞均在 60% 丙酮提取时,ABTS 自由基清除能力达到最高,分别为 1.85, 1.71, 1.55 mmol TEAC/100 g DW, 分别为相应水提取物的 1.40, 1.78, 2.82 倍。在使用相同提取溶剂提取时,藏青 2000 含量最高,循化蓝青稞次之,香格里拉绿青稞最低(60% 乙醇除外)。在相同提取溶剂时,藏青 2000 的 ABTS 自由基清除能力较其他两种青稞强。这表明,如果以 ABTS 自由基清除能力为衡量指标,则 60% 丙酮更适合作为青稞的提取溶剂。

2.5 总抗氧化能力

溶剂对青稞提取物总抗氧化能力的影响见表 5。由表 5 可知,3 种青稞均在 60% 丙酮提取时,总抗氧化能力达到最高,分别为 9.28, 7.91, 3.86 mmol TEAC/100 g DW, 分别为相应水提取物的 3.22, 4.10, 3.11 倍。这说明 60% 丙酮有利于青稞高抗氧化活性物质的提取。在采用相同提取溶剂时,藏青 2000 的总抗氧化能力均较其他两种青稞强。

2.6 相关性分析

由表 6 可知,总酚与 DPPH 自由基清除率的相关系数为 0.48, 达到了显著水平。与 ABTS 和 FRAP 两种方法的相关系数为 0.617 和 0.597, 并达到了极显著水平,这说明总酚与体外抗氧化活性密切相关,同时也表明存在其他成分对抗氧

表 4 溶剂对青稞提取物清除 ABTS 自由基能力的影响
Table 4 Effect of different extraction solvents on ABTS radical scavenging ability of highland barley

提取溶剂	mmol TEAC/100 g DW		
	藏青 2000	循化蓝青稞	香格里拉绿青稞
水	1.32±0.12	0.96±0.07	0.55±0.03
60%乙醇	1.78±0.09	0.97±0.08	1.22±0.07
95%乙醇	1.02±0.09	0.67±0.04	0.67±0.03
60%甲醇	1.69±0.12	0.97±0.06	0.99±0.05
100%甲醇	1.54±0.17	1.32±0.06	1.19±0.04
60%丙酮	1.85±0.11	1.71±0.09	1.55±0.07
100%丙酮	1.02±0.07	0.54±0.06	0.39±0.08

表5 溶剂对青稞提取物总抗氧化能力的影响

Table 5 Effect of different extraction solvents on total antioxidant activity of highland barley

提取溶剂	藏青 2000	循化蓝青稞	香格里拉绿青稞
水	2.88±0.56	1.93±0.78	1.24±0.33
60%乙醇	4.56±0.89	3.97±0.76	2.03±0.44
95%乙醇	4.44±0.39	3.09±0.62	2.08±0.22
60%甲醇	4.66±0.66	4.23±0.78	2.16±0.43
100%甲醇	4.86±0.65	4.57±0.66	2.31±0.44
60%丙酮	9.28±0.67	7.91±0.66	3.86±0.86
100%丙酮	4.49±0.76	3.41±0.45	2.18±0.28

表6 青稞总酚和总黄酮与抗氧化方法的相关性[†]

Table 6 Pearson's Correlation among TPC, TFC and antioxidant methods

检测指标	总酚	总黄酮	DPPH	ABTS
总黄酮	0.365			
DPPH	0.480*	0.345		
ABTS	0.617**	0.317	0.412	
FRAP	0.597**	0.003	0.611**	0.695**

† * 代表显著(P<0.05), ** 代表极显著(P<0.01)。

化活性的贡献。青稞中的总黄酮与抗氧化活性没有相关性。DPPH 和 FRAP 相关性较高(0.611),且达到了极显著水平,ABTS 与 FRAP 两种方法的相关性较高(0.695),也达到了极显著水平,说明 FRAP 与 DPPH、ABTS 具有一定的同质性,这表明,在评估青稞抗氧化活性时,可以选择 DPPH、ABTS 两种方法,FRAP 则可以不列入选项,同时,为了更好的评估青稞的抗氧化活性,可以再采用不同机理的抗氧化评价方法,从不同侧面来反应青稞抗氧化活性的水平。

3 结论

任何一种溶剂均不可能将谷物中的所有抗氧化成分提取出来,考虑到谷物中的主要抗氧化成分是多酚类化合物,在水、乙醇、甲醇和丙酮中溶解度较高。本试验选择水、乙醇、甲醇、丙酮作为溶剂,重点考察中、高浓度溶剂对青稞总酚、总黄酮及抗氧化活性的影响。结果表明,中浓度的有机溶剂更有利于总酚成分的溶出,且节约了成本。但本研究没有考察多酚的具体成分,也没有从生物吸收代谢角度考察多酚摄入后的抗氧化活性情况,将在后续研究中加以完善。同时,由于 FRAP 法与 DPPH 和 ABTS 法具有显著的相关性,所以在以后的评价试验中可以简化青稞体外抗氧化活性评价方法。

参考文献

[1] LIU Rui-hai. Whole grain phytochemicals and health[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(3): 207-219.

[2] KRISTENSEN M, TOUBRO S, JENSEN M G, et al. Whole grain compared with refined wheat decreases the percentage of body fat following a 12-week, energy-restricted dietary intervention in postmenopausal women[J]. Journal of Nutrition, 2012,

142(4): 710-716.

[3] BORNEO R, LEÓN A E. Whole grain cereals: functional components and health benefits[J]. Food & Function, 2012, 3(2): 110-119.

[4] MIN B, GU L, MCCLUNG A M, et al. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 715-722.

[5] LIU Rui-hai. Dietary bioactive compounds and their health implications[J]. Journal of Food Science, 2013, 78: A18-A25.

[6] BELLIDO G G, BETA T. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black, and common barley[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(3): 1 022-1 028.

[7] KOHYAMA N, ONO H, YANAGISAWA T. Changes in anthocyanins in the grains of purple waxy hull-less barley during seed maturation and after harvest[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(14): 5 770-5 774.

[8] GONG Ling-xiao, JIN Cheng, WU Li-jiang, et al. Tibetan hull-less barley (*Hordeum vulgare* L.) as a potential source of antioxidants[J]. Cereal Chemistry, 2012, 89(6): 290-295.

[9] KIM M J, HYUN J N, KIM J A, et al. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(12): 4 802-4 809.

[10] ZHAO Hai-feng, DONG Jiang-jun, LU Jian, et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7 277-7 286.

[11] 张海晖, 段玉清, 倪燕, 等. 谷物中多酚类化合物提取方法及抗氧化效果研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(6): 107-111.

[12] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1965, 16: 144-158.

[13] FERNANDEZOROZCO R, ROCA M, GANDULROJAS B, et al. DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24 (6): 858-864.

[14] 谢思芸, 钟瑞敏, 肖仔君, 等. 杨梅果醋体外抗氧化活性的研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 125-128.

[15] ZHU Xun-tao, SCHAICH K, CHEN Xi, et al. Antioxidant Effects of sesamol released from polymeric films on lipid oxidation in linoleic acid and oat cereal[J]. Packaging Technology and Science, 2013, 26(1): 31-38.

[16] OKARTER N, LIU Chang-shu, MARK E S, et al. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 249-257.

[17] WANG Li-feng, CHEN Jing-yi, XIE Hui-hui, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of adlay varieties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(21): 5 103-5 113.