

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0110-05

黍稷麸皮酚酸提取物抗氧化活性研究

牛伟^{1*},鹿茸²,乔治军³,张丽珍²¹山西省农业科学院; ²山西大学生命科学学院; ³农业部黄土高原作物

基因资源与种质创制重点实验室 山西省农业科学院农作物品种资源研究所,太原 030006

摘要:以黍稷麸皮 Cimi2 为研究对象,比较了四种多酚提取方法的效果及提取物清除自由基的能力。从总酚来看,用乙醇浸提法、超声助溶法、酶解法以及超声与酶结合法分别得到 225.77, 192.23, 231.01, 221.15 mg 没食子酸/100 g 样品。四种方法中得到的结合酚和自由酚比例为 49:51, 29:71, 31:69, 28:72。对 9 个品种的麸皮提取物的体外抗氧化能力检测结果表明,黍稷麸皮酚酸对 DPPH、超氧阴离子、羟自由基都有明显的清除作用。其中 zigangmi 清除 DPPH 自由基能力和体外总抗氧化能力最强, Cimi2 的清除羟自由基能力最强。

关键词:黍稷;自由酚;结合酚;提取方法;抗氧化能力

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Antioxidant Activity of Phenolics from *Panicum miliaceum* L. Bran

NIU Wei^{1*}, LU Rong², QIAO Zhi-jun³, ZHANG Li-zhen²¹Shanxi Academy of Agricultural Sciences; ²School of Life Science, Shanxi University; ³Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan 030006, China

Abstract: The bran of proso millet cultivars were analyzed for their phenolic content and antioxidant activities. Four extraction methods, including ethanol solvent, ultrasonic-assisted ethanol extraction, enzymolysis, ultrasonic-enzymolysis method, were compared for their efficiency of phenolic content of the Cimi2 bran. The total phenolic content were 225.77, 192.23, 231.01, 221.15 mg/100 g respectively. The ratios of bound phenolic to free phenolic were 49:51, 29:71, 31:69, 28:72 for four extraction methods respectively. Total phenolics from proso millet bran has a scavenging activity on DPPH, O₂⁻ and ·OH radicals. The highest DPPH scavenging ability and total antioxidant capacity was found in zigangmi bran. The highest hydroxyl radical scavenging ability was found in Cimi2 bran.

Key words: *Panicum miliaceum* L., free phenolic; bound phenolic; extraction methods; antioxidant activity

据《名医笔录》记载黍稷是传统的药食兼用谷物资源。研究表明黍稷食品的摄入可以减少患一些慢性病的风险,例如心血管疾病^[1],Ⅱ型糖尿病^[1],肝损伤^[3]等。麸皮通常占黍稷质量的 20%,是黍稷加工的副产品,麸皮中的酚酸是糜米中含量的近 4 倍^[4]。对黍稷麸皮酚酸提取效率及体外抗氧化能力深入研究,提高其经济附加值具有重要意义。

目前对植物多酚的提取方法主要有溶剂萃取法^[5],微波助提法^[6],吸附分离提取法^[7],生物酶解法^[8],半仿生法^[9],超声助溶法^[10]等。溶剂萃取法利用相似相溶原理。超声助溶法利用超声的空化作用和机械破坏作用,加速植物细胞内的有效成分向

溶剂中扩散。酶使植物细胞壁疏松破裂可以达到加速提取胞内有效成分的目的。本文通过对比乙醇浸提法、超声助溶法、酶解法和超声与酶结合法,以期寻找糜子麸皮酚酸类物质提取的最佳方法,为生产实践提供依据。

自由基作为机体的一种正常代谢产物,产生与消退处于动态平衡之中。当平衡破坏时,过剩的自由基就会导致机体生命活动紊乱,许多疾病接踵而至,如免疫系统造成破坏,机体发生炎症、癌变和肿瘤^[11]。本文用清除 DPPH 自由基能力、总抗氧化能力、羟自由基测定以及抗超氧阴离子自由基测定检测黍稷麸皮的抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黍稷样品由山西省农业科学院农作物品种资源

收稿日期:2014-7-01 接受日期:2014-09-23

基金项目:国家现代农业产业技术体系--国家谷子糜子产业技术
体系(CARS-07-12.5-A12);山西省留学基金(2014-
101);山西省国际合作项目(2014081059)

*通讯作者 E-mail:niuwillame@163.com

研究所提供,2012 年产于山西。实验试剂:甲醇,乙醇、NaOH、浓盐酸、乙酸乙酯、福林酚、 Na_2CO_3 ,均为分析纯;没食子酸(纯度 98.5%,Sigma)。1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH,美国 sigma),抗坏血酸(Vc,上海安谱),总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒、清除羟自由基试剂盒、清除超氧阴离子自由基试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

JLGJ-45 型检验砻谷机(浙江台州市粮仪厂);Foss CYCLOTEC 1093 型旋风磨(Foss 公司);Sartorius BS223S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);DHC-9040S 电热恒温鼓风干燥箱(宁波东南仪器有限公司);MX-RL-Pro 旋转混匀仪(赛洛捷克公司);Sigma 2-16PK 高速冷冻离心机(德国西格玛公司);RE-2000A 型旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);752PC 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);KQ3200DE 型数控超声波清洗器(江苏昆山)。

1.3 方法

1.3.1 自由酚的提取

1.3.1.1 乙醇浸提法

将黍稷 Cimi2 麸皮用 Foss 粉碎机粉碎后,称取 0.800 g,加入去离子水 10 mL 在旋转混匀仪上预浸泡 24 h,2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。沉淀用 20 倍体积的 70% 乙醇溶液(pH4.0)浸泡,在 40 °C 水浴上充分震荡反应 1.5 h。2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。重复上述步骤三次,合并所有上清液于 75 °C 水浴下旋转蒸干,去离子水定容至 5 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 °C 保存备用。

1.3.1.2 超声助溶法

称取 0.800 g Cimi2 麸皮,加入 10 mL 去离子水在旋转混匀仪上预浸泡 24 h,2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。沉淀用 20 倍体积的 70% 乙醇溶液(pH4.0)浸泡,充分震荡混匀后在温度为 40 °C,功率为 120W 的超声仪上处理 30 min,2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。重复上述步骤,合并所有上清液于 75 °C 水浴下旋转蒸干,去离子水定容至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 °C 保存备用。

1.3.1.3 酶解法

称取 0.800 g Cimi2 麸皮,加入 10 mL 去离子水

在旋转混匀仪上预浸泡 24 h 后,调节 pH5.0 加入 1% 纤维素酶,于 50 °C 水浴下酶解 3 h。80 °C 水浴 20 min 将酶灭活后于 2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。沉淀用 20 倍体积的 70% 乙醇溶液(pH4.0)浸泡,充分震荡混匀后 40 °C 水浴浸提 1 h。2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。重复浸提一次,合并上清液于 75 °C 水浴下旋转蒸干,去离子水定容至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 °C 保存备用。

1.3.1.4 超声与酶结合法

称取 0.800 g Cimi2 麸皮,加入 10 mL 去离子水在旋转混匀仪上预浸泡 24 h 后,调节 pH5.0 加入 1% 纤维素酶,于 50 °C 水浴下酶解 3 h,80 °C 水浴 20 min 将酶灭活后于 2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。沉淀用 20 倍体积的 70% 乙醇溶液(pH 4.0)浸泡,充分震荡混匀后于 40 °C,功率为 120 W,超声 30 min 后,2500 rpm 离心 10 min,收集上清液。重复超声和乙醇浸提一次,合并所有上清液于 75 °C 水浴下旋转蒸干,去离子水定容至 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 °C 保存备用。

1.3.2 结合酚的提取

用 20 mL 2 mol/L 的 NaOH 将上一步的沉淀碱化,在室温下震荡消化 1 h 后用浓盐酸将反应体系 pH 调至中性。加入 20 mL 乙酸乙酯混匀,充分震荡混合提取 5 min 后,2500 rpm 离心 10 min,收集上层上清液。重复三次,合并上层上清液于 45 °C 水浴下旋转蒸干,用去离子水定容至 5 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20 °C 保存备用。

1.4 总酚含量的测定

1.4.1 标准液的制备

准确称取没食子酸标准品 25 mg 溶于 25 mL 去离子水中,得到标准溶液的母液。将母液稀释至系列浓度(μg/mL):0,20,60,100,150,200,300,400,500,600,将标准溶液避光保存,以备检测绘制标准曲线。

1.4.2 样品总酚含量的测定

样品总酚含量的测定采用福林-酚法^[12]。将样品于 37 °C 下水浴解冻,在试管中加入 100 μL 样品液(或标准溶液),400 μL 去离子水和 100 μL 福林-酚试剂,充分震荡混匀反应 6 min。再加入 1 mL 7 g/100 mL 的 Na_2CO_3 溶液和 0.8 mL 去离子水,充分震荡混匀,室温下避光静置 90 min。用分光光度计检测 760 nm 处的吸光度值。多酚含量以每 100 g 样

品干重中对应的没食子酸的毫克数表示(mg 没食子酸/ 100 g 样品)。

1.5 清除 DPPH 自由基的能力

参照 Brandwilliams 等的方法^[13]。将麸皮乙醇自由酚提取物系列稀释后,以 V_c 为对照,在 4 mL 的体系反应 30 min 后, 517 nm 处测吸光值。自由基清除率(Y)依下式计算: $Y = [1 - (\text{As-Ar}) / \text{Ao}] \times 100$

其中,As 为 2 mL DPPH 溶液与 2 mL 样品提取物系列稀释液体系反应的吸光值;Ar 为 2 mL 甲醇和样品提取物系列稀释液体系反应的吸光值;Ao 为 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 甲醇体系反应的吸光值。

IC_{50} 是指清除率为 50% 时的提取物的浓度。本文采用 IC_{50} 比较其抗氧化活性的大小。 IC_{50} 越小, 抗氧化能力越强。

1.6 清除羟自由基能力

采用比色法测定,检测步骤参照试剂盒说明书进行。每克黍稷麸皮在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 1 min ,使反应体系中 H_2O_2 的浓度降低 1 mmol/L 为一个抑制羟自由基能力单位(U/g 样品)。

1.7 清除超氧阴离子自由基能力

采用比色法测定,检测步骤参照试剂盒说明书进行。每百克黍稷麸皮在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 40 min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 $1\text{ mg} V_c$ 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个清除超氧阴离子自由基活力单位($\text{U}/100\text{ g}$ 样品)。

1.8 总抗氧化能力

采用比色法测定,检测步骤参照试剂盒说明书进行。总抗氧化能力的单位定义为:在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 时每分钟每克黍稷麸皮使反应体系的吸光度值每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位(U/g 样品)。

1.9 数据分析

以上试验每份样品做三次重复,结果表示为(平均值 \pm 标准偏差)。使用 Excel 2010 分析数据平均值,SD 值并绘图。使用 SPSS 19.0 进行方差显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取方法黍稷麸皮酚酸含量

采用福林-酚法测定没食子酸标准曲线的回归方程为 $Y = 0.0039X + 0.0593$, $R^2 = 0.9929$, 可以用于测定酚酸含量。

四种方法提取 Cimi2 麸皮的多酚含量结果见图

1。乙醇浸提法提取的结合酚和自由酚含量比例为 $49:51$,结合酚约占总酚的一半。超声助溶法提取的结合酚和自由酚含量比例为 $29:71$,酶解法提取的结合酚和自由酚含量比例为 $31:69$,超声与酶结合法提取的结合酚和自由酚含量比例为 $28:72$,这三种方法提取的结合酚和自由酚的比例没有显著差异。从自由酚含量来看,传统的乙醇提取法提取得到的自由酚含量最少,为 $116.22\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品。酶解法提取得到的自由酚含量最高,超声与酶结合法次之,其含量分别为 $160.37\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品(酶解法), $159.34\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品(超声与酶结合法)。从总酚含量来看,超声助溶法提取得到总酚含量最少,为 $192.23\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品。乙醇浸提法,超声与酶结合法以及酶解法提取的到总酚含量差异不显著,分别为 $225.77\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品(乙醇浸提法), $221.15\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品(超声与酶结合法), $231.01\text{ 没食子酸}/100\text{ g}$ 样品(超声与酶结合法)。

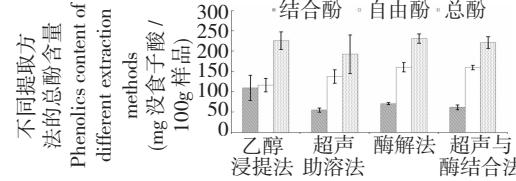


图 1 不同提取方法的酚酸含量

Fig. 1 Phenolics content of different extraction methods

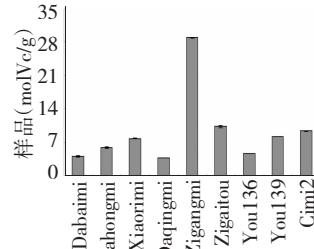


图 2 不同品种清除 DPPH 自由基能力

Fig. 2 DPPH scavenging ability of different cultivars

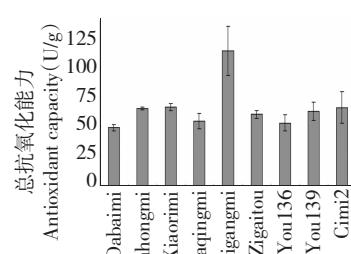


图 3 不同品种总抗氧化能力

Fig. 3 The total antioxidant capacity of different cultivars

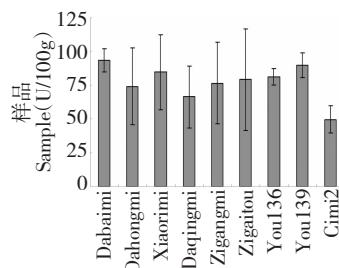


图 4 不同品种清除超氧阴离子能力

Fig. 4 anti-superoxide anion scavenging ability of different cultivars

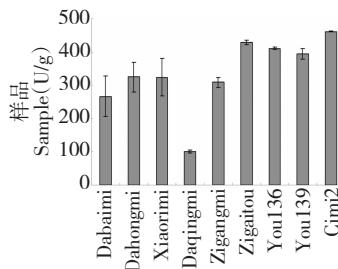


图 5 不同品种清除羟自由基能力

Fig. 5 hydroxyl radical scavenging ability of different cultivars

样品(酶解法)。我们可以推测酶的使用可以使一部分结合态的酚酸转变为自由态,提前释放出来,而单纯使用超声法,虽然自由酚含量有所提高,但总酚含量有所降低,可能是超声法使一些酚酸的结构遭到了破坏。

2.2 不同黍稷品种麸皮抗氧化能力

黍稷麸皮乙醇浸提法提取物的清除 DPPH 有机自由基能力、总抗氧化能力、清除超氧阴离子能力和清除羟自由基能力分别见图 2、图 3、图 4 和图 5。文中所用黍稷麸皮颜色各异,基本上可以代表自然样品的多样性。其中 Dabaimi 和 Daqingmi 为白色, Dahongmi, Cimi2 为红色, you136, zigaitou 为黄色, zigangmi, you139 为黑色, xiaorimi 为绿色。

不同黍稷麸皮清除 DPPH 自由基能力为 3.67 ~ 28.95 mmolVc/g 麸皮样品。不同品种间的差异显著。其中麸皮颜色呈黑色的 zigangmi 清除 DPPH 自由基能力最强,每克黍稷麸皮相当于 28.95 mmol 的 Vc。

不同品种黍稷麸皮的体外抗氧化能力为 49.29 ~ 114.41 U/g 麸皮样品。不同品种间的差异变化较大。其中麸皮颜色呈黑色的 zigangmi 的体外总抗氧化能力最强。

不同品种黍稷麸皮清除超氧阴离子能力为 49.69 ~ 93.20 U/100 g 麸皮样品。其中麸皮颜色呈红色的 Cimi2 的清除超氧阴离子能力最小。其余品种间的差异不显著。

不同品种黍稷麸皮清除羟自由基能力为 101.83 ~ 462.05 U/g 麸皮样品。不同品种间的差异变化较大。其中麸皮颜色呈白色的 daqingmi 的清除羟自由基能力最小,麸皮颜色呈红色的 Cimi2 的清除羟自由基能力最强。

3 结论

本文用四种不同方法提取 Cimi2 的麸皮多酚。从总酚来看,用乙醇浸提法、超声助溶法、酶解法以及超声与酶结合法得到总酚量差异不显著,但四种方法中得到的结合酚和自由酚比例不同。超声与酶结合法以及酶解法提取得到的自由酚含量较高。对 9 个品种麸皮酚酸提取物的体外抗氧化能力检测结果表明,黍稷麸皮酚酸对 DPPH、超氧阴离子、羟自由基都有明显的清除作用,并有较强的总抗氧化能力。但不同品种麸皮提取物的清除各种自由基及其总抗氧化能力不同。其中 zigangmi 清除 DPPH 自由基能力和体外总抗氧化能力最强, Cimi2 的清除羟自由基能力最强。

参考文献

- Kumari KS, Thayumanavan B. Characterisation of starches of proso, foxtail, barnyard, kodo and little millets. *Plant Foods Hum Nutri*, 1998, 53:47-56.
- Denery-Papini S, Nicolas Y, Popineau Y. Efficiency and limitation of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. *J Cereal Sci*, 1999, 30:121-131.
- Nishizawa N, Sato D, Ito Y, et al. Effects of dietary protein of proso millet on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66:2-96.
- Lu R(鹿茸), Tian Q(田琴), Sun N(孙楠), et al. Determination of phenolic compound in Proso millet by HPLC. *Food Sci(食品科学)*, 2014, 35:52-155.
- Ruan YF(阮玉凤), Huang ZJ(黄祉健), Zhu XY(朱晓莹), et al. Extraction of plant polyphenols progress. *Guangdong Chem Industry(广东化工)*, 2013, 40(21):89-90.
- Wen CJ(文春鹃), Chen XG(陈祥贵), Rao S(饶夙), et al. Microwaves assisted extraction of polyphenol from pomegranate peel. *Food Mach(食品与机械)*, 2011, 27:103-106.

(下转第 82 页)