

文章编号:1673-1689(2008)01-0057-05

大麦总多酚不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除能力的影响

陆 健¹, 樊 伟², 孔维宝¹, 赵海锋¹, 董建军², 单连菊², 林 艳²

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 青岛啤酒股份有限公司, 山东 青岛 266061)

摘 要: 酚类化合物是大麦中主要的抗氧化物质之一, 直接影响到麦芽、麦汁和啤酒的品质。研究了体积分数 100% 的甲醇、体积分数 80% 的甲醇、体积分数 80% 的乙醇、体积分数 80% 的丙酮和水等 5 种不同提取溶剂对大麦游离多酚和结合多酚提取率的影响, 以及不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基能力的差异。结果表明: 提取溶剂对大麦多酚的提取效率有显著影响, 不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基的能力有显著性差异; 其中以 80% 丙酮溶液为提取溶剂时, 所得提取物的游离多酚质量分数及其对 DPPH 自由基清除率最高, 可作为大麦抗氧化物质的提取溶剂; 不同品种大麦间游离总多酚质量分数及其对 DPPH 自由基清除率存在显著差异; 结合 Folin-Ciocalteu 法和 DPPH 自由基清除率法分别测定大麦总多酚质量分数和抗氧化力, 可初步评价大麦原料的抗氧化特性。

关键词: 大麦; 多酚物质; 提取溶剂; 抗氧化物质; DPPH 自由基

中图分类号: Q 946; TS 262.5

文献标识码: A

Study on the Extraction of Total Polyphenol in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and its Ability on Scavenging DPPH Free Radical

LU Jian¹, FAN Wei², KONG Wei-bao¹, ZHAO Hai-feng¹,

DONG Jian-jun², SHAN Lian-ju², LIN Yan²

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Tsingtao Brewery Co., Ltd. Qingdao 266061, China)

Abstract: Phenolic compounds are the most important antioxidant in barley, which influence the qualities of malt, wort and finished beer directly. Effects of different extraction solvents (100% methanol, 80% methanol, 80% ethanol, 80% acetone and water) on the total polyphenol yield and antioxidant activity of barley were studied. The results showed that the extracting solvent significantly influenced the total free and bound polyphenol yield and antioxidant activity from barley extracts. 80% acetone is a selected solvent for extracting phenolic antioxidant from barley. Differences in total phenolics content and antioxidant activity of different barley varieties were observed. The Folin-Ciocalteu method for total phenolics content and the free radical DPPH scavenging method for antioxidant activity could be used as estimation of barley antioxidant activity.

Key words: barley; phenolic compounds; extraction solvent; antioxidant; DPPH free radical

收稿日期: 2007-01-21.

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0532); 江苏省“青蓝工程”项目.

作者简介: 陆健 (1968-), 男, 江苏太仓人, 工学博士, 教授, 主要从事酿酒微生物与酶技术研究. Email: jlu@jiangnan.edu.cn

大麦中的酚类物质是啤酒多酚的主要来源,约占啤酒中多酚质量的70%~80%。多酚物质主要以游离和结合两种形式存在于大麦籽粒中,游离多酚多为小分子的单酚类物质,其含量较结合多酚要少;而结合多酚主要为细胞壁结合物质。多酚物质作为有效的自由基清除剂(清除羟基自由基、超氧自由基等)、抑制剂(抑制脂肪酸氧化酶)和螯合剂(螯合铜、铁等离子),是啤酒中重要的内源性抗氧化剂,它们对成品啤酒的色泽、口感和稳定性具有重要影响^[1]。研究表明,在酿造过程中,通过工艺控制提高啤酒中多酚物质的含量,可减少氧化反应的发生,有利于提高成品啤酒的风味稳定性^[2]。因此,大麦作为主要的酿造原料,从原料来源上提高其内源性抗氧化力,是改善成品啤酒质量的重要途径之一。

目前,用于提取多酚抗氧化物质的溶剂体系主要有水相、有机溶剂和水相与有机溶剂结合提取等。但是,由于提取溶剂的不同,使得在研究结果上也存在一定的差异^[3-5]。作者研究了不同组成提取溶剂对大麦总多酚提取率及其抗氧化力的影响,为建立一种有效评价大麦总多酚含量和抗氧化能力的方法提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

DPPH(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)、Folin-Ciocalteu 试剂(Fc)、没食子酸(gallic acid, GA): Sigma 公司产品;甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯:分析纯,上海国药集团产品;供试样品:作者从不同农场和麦芽厂收集。

1.2 实验方法

1.2.1 大麦游离多酚提取 根据文献^[2]和^[3]的方法修改。参考文献数据和作者的预实验结果,确定提取溶剂的比例。称取1.00 g 冷冻干燥的大麦细粉于15 mL 离心管中,分别加10 mL 体积分数为100%甲醇、80%甲醇、80%乙醇、80%丙酮和水溶液(各含质量分数0.1%醋酸),充氮气密封后在40℃超声波水浴中提取1 h,提取液以10 000 g 离心15 min,取上清液用氮气吹干,残余物用甲醇定容至2.0 mL,用于测定总多酚质量分数和DPPH 自由基清除率。水提取物离心后,上清液用75 mL 乙酸乙酯分3次萃取,合并有机相,并在40℃水浴中旋转蒸发至干,残余物用甲醇定容至2.0 mL。离心后所得固体残余物用于提取结合多酚。为防止氧

化,在整个操作过程中应隔氧,制备所得样品测定前均充氮气后在-20℃冰箱中保存。

1.2.2 大麦结合多酚提取 根据文献^[3]的方法修改。由1.2.1提取所得的固体残余物用10 mL 4 mol/L 的NaOH 溶液在40℃超声水解提取4 h。所得水解液用4 mol/L HCl 调pH 至2~3。用100 mL 乙酸乙酯分4次萃取。合并有机相萃取液,在40℃水浴中旋转蒸发干燥,残余物用甲醇定容至2.0 mL,用于测定总多酚质量分数和DPPH 自由基清除率。

1.2.3 总多酚(total phenolic compounds, TPC)质量分数测定 将0.5 mL 提取液加入到2.5 mL 新鲜稀释10倍的Fc试剂中,混匀后反应5 min,加2.0 mL 质量分数7.5% Na₂CO₃溶液,加水定容至10.0 mL。在室温下避光放置2 h,测定760 nm 波长下的吸光值,用0.5 mL 蒸馏水代替提取液作空白对照。总多酚含量以没食子酸(GA)当量表示^[2, 6]。

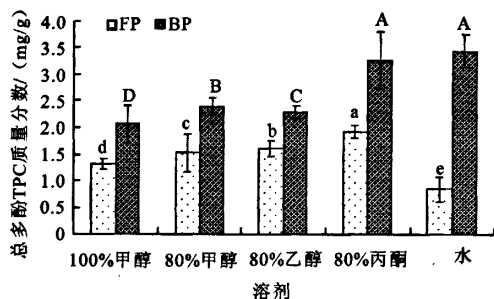
1.2.4 DPPH 自由基清除率测定 加0.1 mL 提取液于2.9 mL 6.0×10⁻⁵ mol/L 的DPPH 甲醇溶液中,摇匀,室温避光反应30 min 后于517 nm 处测其吸光度,计算对DPPH 的清除率。A₁为30 min 后2.9 mL DPPH 加0.1 mL 样品的吸光度,A₂为30 min 后2.9 mL DPPH 加0.1 mL 甲醇的吸光度,A₃为2.9 mL 甲醇加0.1 mL 样品的吸光度,以甲醇为空白对照。求得清除率后,以Trolox 标准梯度浓度溶液与相应清除率绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂对提取物总多酚质量分数的影响

从图1可以看出,用不同组成的溶剂提取大麦多酚物质时,其质量分数均存在显著性差异。其中以体积分数80%丙酮为提取溶剂时,游离总多酚质量分数最高,体积分数80%乙醇次之,水溶剂提取的最少。用甲醇做提取溶剂时,体积分数80%的甲醇比纯甲醇提取液所得总多酚的大。这可能是由于醇水混合提取液更有利于提取水溶性和醇溶性的多酚物质。从图1也可以看出,大麦结合多酚的质量分数要明显高于游离多酚,而且样品经碱水解后提取的结合总多酚质量分数比纯水提取的质量分数大。这主要是在提取游离多酚时,在纯水相中未能提取的结合多酚物质经碱水解之后得以释放,使得其结合多酚的质量分数比其它溶剂提取所得质量分数大。经体积分数80%丙酮处理过的

样品,所提取的结合多酚的量要比甲醇和乙醇处理过的样品的量大,这可能和样品在丙酮中具有良好的分散性有关。以上结果说明不同溶剂对不同种类抗氧化物质的提取具有选择性,不同的溶剂提取抗氧化物质的效率也不同。结果表明:以体积分数 80% 丙酮水溶液提取大麦总多酚比较合适。



FP(游离多酚);BP(结合多酚)不同大小写字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异

图 1 不同溶剂对大麦提取物总多酚质量分数的影响

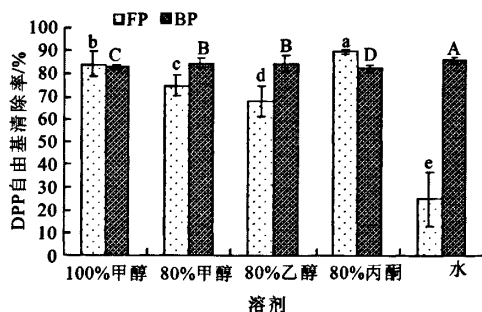
Fig. 1 Effect of extraction solution on total phenolic compounds of barley

2.2 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除率

DPPH 检测法是通过 DPPH 分子中 1 个稳定的自由基与抗氧化剂提供的 1 个电子配对结合,使 DPPH 的特征紫色消失,因此可用于抗氧化剂清除自由基能力的评价^[9]。从图 2 可知,不同溶剂提取的大麦游离多酚清除 DPPH 自由基的能力存在显著性差异,其中以体积分数 80% 丙酮的清除率最高,其次分别为体积分数 100% 甲醇、80% 甲醇、80% 乙醇和水。而经不同溶剂提取、碱水解之后的结合多酚的 DPPH 自由基清除率均较高。除 80% 丙酮和 100% 甲醇提取液外,其它均高于游离多酚。这也说明结合多酚在抗氧化性能方面也有很大贡献,这一观点也在已有的报道中得到了证实。Mailard 等^[10]的研究表明,阿魏酸和 p-香豆酸在结合多酚中提供了约占总量 14%~22% 的抗氧化活性,是为啤酒提供还原力的主要酚酸。而 Bonoli 等^[3]在研究大麦面粉的不同溶剂提取物清除 DPPH 自由基能力时发现,以体积分数 80% 丙酮提取物的清除率最高。这说明不同的溶剂对大麦中抗氧化物质的提取具有选择性,而且,不同提取物中抗氧化物质的量和种类均有所差异,最终表现在清除自由基能力的强弱上。

2.3 不同溶剂提取的游离多酚对 DPPH 自由基速率的影响

从图 3 可以看出,不同溶剂组成提取物在清除



FP(游离多酚);BP(结合多酚);不同大小写字母表示在 0.05 水平上存在显著性差异

图 2 不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除率

Fig. 2 Effect of extraction solution on the ability of scavenging DPPH free radical

DPPH 自由基速率上也表现出显著差异。其中以 80% 丙酮的清除速率最快,约在反应进行 15 min 后,517 nm 处吸光度的降低非常缓慢。其它提取物的清除速率由快到慢依次为体积分数 100% 甲醇、80% 甲醇、80% 乙醇和水。从体积分数 80% 甲醇和 100% 甲醇提取物提取总多酚的质量分数和清除自由基的速率分析,用体积分数 80% 甲醇提取的总多酚含量略高于用纯甲醇提取的总多酚质量分数,但是纯甲醇提取物清除 DPPH 自由基的能力要高于甲醇与水的混合提取液。这说明,有机溶剂与水的混合提取液可提高总多酚的提取率,但是提取物在抗氧化特性上却低于纯有机提取溶剂。分析认为,这主要是因为不同溶剂对酚类物质的提取具有选择性(主要表现为在水相和有机相中具有不同的溶解性能),而不同的酚类化合物具有不同的抗氧化特性(如没食子酸和儿茶酸具有不同的抗氧化特性),进而造成了不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除速率的不同。

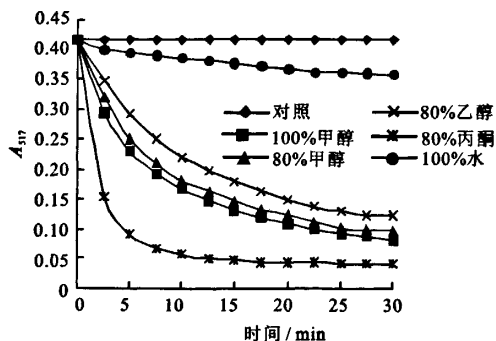


图 3 不同溶剂提取的游离多酚对清除 DPPH 自由基速率的影响

Fig. 3 Effects of extraction solution on the rate of scavenging DPPH radical for bound phenolic compounds of barley

2.4 不同溶剂提取的结合多酚对清除 DPPH 自由基速率的影响

从经不同溶剂处理和碱水解提取的大麦结合多酚清除 DPPH 自由基能力的速率来看,反应进程趋于一致(见图 4)。其中以水提物清除的速率最快,体积分数 80%丙酮次之。这可能是因为在前

2.5 不同品种大麦游离总多酚含量和抗氧化力的相关性

表 1 数据显示了用体积分数 80%丙酮提取的 22 种不同品种和同一品种不同产地大麦的游离总多酚质量分数(FPC)和抗氧化力当量(TEAC)的比较。用 Folin-Ciocalteu 法所测得的大麦游离总多酚质量分数在 1.61 mg/g(KA-4B 3#)至 2.23 mg/g(武啤 1 号)不等,平均质量分数在 1.91 mg/g 左右。不同品种大麦的抗氧化活力在 8.79~10.65

μmol/g(以绝干大麦计)之间,其中法国大麦 Esterel 品种的抗氧化活力最高,而 KA-4B 3# 品种的抗氧化活力最低,平均值为 9.51 μmol/g。分析认为这种游离总多酚含量和抗氧化力的差异主要是由大麦本身的品种特性、种植条件和生长环境因素所造成。

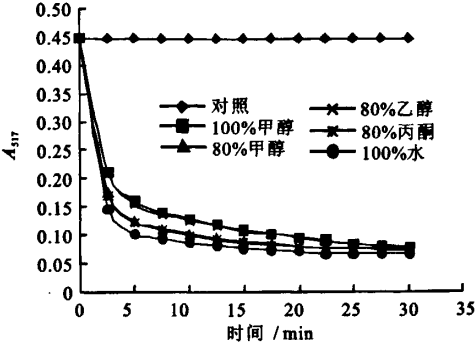


图 4 不同溶剂提取的结合多酚对清除 DPPH 自由基速率的影响

Fig. 4 Effects of extraction solution on the rate of scavenging DPPH free radical for free phenolic compounds of barley

表 1 不同品种大麦间游离总多酚质量分数(FPC)和抗氧化力当量(TEAC)的比较

Tab. 1 Comparison of free total FPC and TEAC in different barley varieties

大麦品种	游离总多酚(FPC) 质量分数/(mg/g)	抗氧化活力(TEAC)/ (μmol/g)	产地	收获年份
Hamellin	1.85±0.06	9.26±0.09	澳大利亚	2005
Esterel	2.13±0.05	10.65±0.12	法国	2005
Scalate	1.85±0.05	9.30±0.03	法国	2005
浙农二号	2.07±0.04	10.25±0.20	江苏射阳	2005
KA-4B 1#	1.82±0.08	9.35±0.16	江苏盐城	2005
KA-4B 2#	1.83±0.07	9.06±0.45	江苏射阳	2005
KA-4B 3#	1.61±0.03	8.79±0.16	江苏射阳	2004
KA-4B 4#	1.90±0.10	9.88±0.28	江苏连云港	2005
KA-4B 5#	1.95±0.22	9.65±0.17	江苏连云港	2004
苏啤 1 号	2.00±0.12	8.93±0.26	江苏盐城	2005
苏引 1 号	1.77±0.04	9.56±0.19	江苏连云港	2004
苏引 2 号	1.82±0.09	9.19±0.15	江苏盐城	2004
淮麦 19 号	1.85±0.08	9.67±0.13	江苏射阳	2005
沪麦 16 号	2.17±0.03	10.26±0.18	江苏射阳	2005
沪麦 8 号	2.07±0.03	9.78±0.51	江苏射阳	2005
甘啤 3 号 1#	1.73±0.08	8.81±0.10	甘肃白银	2005
甘啤 3 号 2#	1.96±0.05	9.47±0.09	甘肃玉门	2004
甘啤 4 号 1#	1.86±0.07	9.31±0.21	甘肃山丹	2005
甘啤 4 号 2#	1.95±0.10	9.70±0.11	甘肃武威	2004
武啤 1 号	2.23±0.05	10.03±0.08	甘肃武威	2004
垦啤 2 号	1.84±0.14	9.30±0.42	黑龙江农垦	2005
垦啤 3 号	1.84±0.03	9.01±0.04	黑龙江农垦	2005
样本数	22	22		
平均值	1.91	9.51		
标准误差	0.15	0.49		
最大值	2.23	10.65		
最小值	1.61	8.79		
全距	0.62	1.86		

表中测定数据均为平均值±标准偏差 (n=6)

不同品种大麦间游离总多酚质量分数(FPC)和抗氧化力当量(TEAC)的线性分析见图 5。相关性分析结果表明:游离总多酚质量分数(FPC)和抗氧化力当量(TEAC)之间存在高度显著的正相关性($r=0.789, P<0.01$),说明多酚含量对大麦抗氧化活力有较大贡献。这一结果为大麦还原力的评价提供了依据。

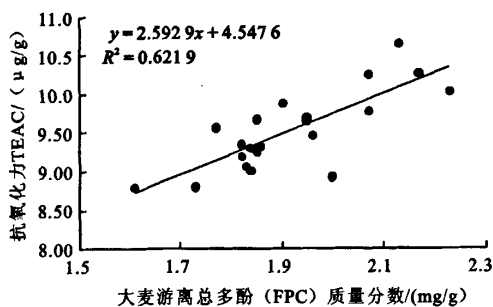


图 5 不同品种大麦间游离总多酚质量分数(FPC)和抗氧化力当量(TEAC)的相关性分析

Fig. 5 Correlations analysis of FPC and TEAC in different barley varieties

3 结 语

不同组成的提取溶剂对大麦酚类物质的提取量和提取物清除 DPPH 自由基的能力有显著影响。因此,选择合适的提取溶剂对于评价大麦样品的总多酚含量和抗氧化力非常重要。作者研究表明:以体积分数 80% 丙酮溶液作为大麦抗氧化物质的提取溶剂时,所得提取物的游离总多酚质量分数和 DPPH 自由基清除率均高于其它提取溶剂,而且,其清除 DPPH 自由基的速率也高于其它提取溶剂,因此丙酮可作为大麦抗氧化物质的有效提取溶剂。通过比较大麦总多酚含量和 DPPH 自由基清除率,可评价大麦品种的抗氧化特性,为啤酒酿造原料的选择提供参考依据。

参考文献(References):

- [1] Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, et al. The chemistry of beer aging-a critical review[J]. *Food Chemistry*, 2006, 95: 357-381.
- [2] Maillard M N, Soum H, Boivin P, et al. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content[J]. *Lebensm. -Wiss. Technol*, 1996, 29: 238-244.
- [3] Bonoli M, Verardo V, Marconi E, et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52: 5195-5200.
- [4] Zilinski H, Kozłowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48: 2008-2016.
- [5] Zhou Kequan, Yu Liangli. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation[J]. *Lebensm. -Wiss. U-Technol*, 2004, 37: 717-721.
- [6] Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent[J]. *Am J Enol Vitic*, 1965, 16, 144-158.
- [7] Brand W W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity[J]. *Lebensm. -Wiss. Technol*, 1995, 28, 25-30.
- [8] Goupy P, Hugues M, Boivin P, et al. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts of isolated phenolic compounds[J]. *Journal of Science Food Agriculture*, 1999, 79: 1625-1634.
- [9] Parejo I, Codina C, Petrakis C, et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay[J]. *Journal Pharmacol Toxicol*, 2000, 44: 507-512.
- [10] Maillard M N, Berset C. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1995, 43: 1789-1793.

(责任编辑:朱明)