

HPLC 同时检测发芽黑小麦中 10 种黄酮类化合物方法的建立

李倩^{1,2,3} 张悦瑶^{1,2,3} 杨子怡^{1,2,3} 刘瑞^{1,2,3*} 李小东^{1,4} 于章龙^{1,4} 孙元琳^{2,3}

(1. 山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030800; 2. 运城学院生命科学系, 山西 运城 044000; 3. 山西省特优农产品梯次高值利用技术创新中心, 山西 运城 044000; 4. 山西农业大学棉花研究所, 山西 运城 044000)

摘要: 为探究黑小麦在发芽过程中黄酮类化合物质量分数的变化, 建立了一种高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 同时检测发芽黑小麦中 10 种黄酮类化合物的方法。以 Agilent 1260 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm×5 μm) 为固定相, 乙腈和体积分数 0.8% 的磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流量设定为 0.8 mL/min, 检测波长为 225 nm, 柱温保持在 25 °C。结果表明, 在质量浓度为 20~100 μg/mL 时, 葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮 10 种黄酮类化合物的质量浓度与峰面积之间呈现出良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.9991$, $n=6$); 这些化合物的精密度、重复性和稳定性结果显示, 峰面积相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 均小于 2.00%, 加标回收率为 98.72%~102.03%, 表明所建立的检测方法准确可靠。另外, 对发芽黑小麦中 10 种黄酮类化合物提取方法进行了优化, 即采用乙醇体积分数为 70% 的盐酸-乙醇溶液 (料液比 1 g:25 mL), 在 85 °C 下回流 90 min 时提取效果最佳, 并检测了不同发芽时间 (1、3、5、7 d) 黑小麦中 10 种黄酮类化合物的质量分数。该研究为发芽黑小麦中功能活性成分的研究奠定了基础, 同时也为其产品的质量控制和评估提供了参考依据。

关键词: 黑小麦; 高效液相色谱; 黄酮类化合物; 发芽

Establishment of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Ten Flavonoids in Germinated Black Wheat

LI Qian^{1,2,3} ZHANG Yueyao^{1,2,3} YANG Ziyi^{1,2,3} LIU Rui^{1,2,3*} Li Xiaodong^{1,4}
YU Zhanglong^{1,3} SUN Yuanlin²

(1. College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030800, China; 2. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China; 3. Shanxi Technology Innovation Center of High Value-Added Echelon Utilization of Premium Agro-Products, Yuncheng 044000, China; 4. Institute of Cotton Research, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000, China)

Abstract: To investigate the changes in the mass fraction of flavonoids in the germination process of black wheat, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous determination of 10 flavonoids in germinated black wheat. An Agilent 1260 ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm×5 μm) was used as the stationary phase, with a gradient elution of acetonitrile and 0.8% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase. The flow rate was set at 0.8 mL/min, with a detection wavelength of 225 nm and the column

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072222); 山西省基础研究计划项目 (20210302124069); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金 (2024CYJSTX10-22); 山西省研究生教育教学改革课题 (2022YJJG269); 运城市基础研究计划项目 (YCKJ-2024024); 运城学院食品科学与工程校级重点学科经费资助项目 (XK-2021008); 特色农产品发展学科群科研项目 (SKX-202211)。

通信作者: 刘瑞 (1987—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事功能食品与品质调控研究。E-mail: liuruiyuc@126.com

收稿日期: 2024-04-14 修回日期: 2024-07-22

temperature maintained at 25 °C. The results showed that the mass concentration of 10 flavonoids, including puerarin, epicatechin, rutin, luteolin, quercetin, apigenin, naringenin, kaempferol, isorhamnetin, and chalcone, exhibited a good linear relationship with peak area ($R^2 \geq 0.999$, $n=6$) within the mass concentration range of 20~100 $\mu\text{g/mL}$. Precision, repeatability, and stability tests of these compounds showed that the relative standard deviation (RSD) of the peak area was less than 2.00%, and the spiked recovery rate ranged from 98.72% to 102.03%, demonstrating the accuracy and reliability of the established method. Additionally, the extraction method for 10 flavonoids in germinated black wheat was optimized, with the best efficiency achieved using a hydrochloric acid-ethanol solution with a 70% ethanol volume fraction (a solid-to-liquid ratio of 1 g : 25 mL), and refluxing at 85 °C for 90 min. The mass fractions of 10 flavonoid were also determined in black wheat germinated for 1, 3, 5, and 7 d. This research lays a foundation for studying functional bioactive ingredients in germinated black wheat and offers a reference for the quality control and evaluation of its products.

Keywords: black wheat; high-performance liquid chromatography; flavonoids; germination

黑小麦是一种优质的小麦品种,因其天然性、营养性和功能性而备受关注^[1]。黑小麦富含天然花色苷、多酚、蛋白质、必需脂肪酸、矿物质以及各种微量元素等^[2-3],其中酚类物质是谷物中的主要抗氧化成分^[4]。Ghumman 等^[5]研究发现,小麦发芽后其营养成分、抗营养因子和生物活性物质均会发生显著变化,尤其是酚类物质的组成和含量变化较大。发芽过程不仅可以将种子中的大分子物质转化为更易于人体吸收的小分子物质,还能激发生物活性,提升蛋白质的消化率,降低抗营养因子含量^[6]。有研究者^[7-8]研究了发芽时间对不同地区小麦种子发芽过程中酚类物质变化的影响发现,发芽小麦中酚类物质含量显著提高,且游离酚与结合酚的含量和种类均有所增加。

黄酮类化合物属于多酚,广泛存在于水果、蔬菜以及谷物中。植物源性黄酮类化合物是人体最容易摄取的具有广泛生物活性的营养物质,能够有效预防脑血管疾病,增强大脑神经血管功能^[9]。小麦中的黄酮类化合物来源于苯丙氨酸转化为肉桂酸的苯丙烷代谢途径^[10],通过这一途径生成的黄酮类化合物主要包括葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮等^[11-14]。目前,对黄酮类化合物进行定量分析的方法主要有 HPLC 法、UPLC 法、UPLC-MS 法^[15]等。由于 UPLC 和 UPLC-MS 法对设备的要求较高,且仪器价格高昂,而 HPLC 法简便易行,是检测黄酮类化合物更为有效且实用的方法。殷丛培等^[16]采用 HPLC 法测定了不同发育时期高粱籽粒中儿茶素、表儿茶素和芦丁等 9 种黄酮类化合物含

量。王婷等^[17]采用 HPLC 法测定了银杏叶中的芦丁和异鼠李素含量。目前,同时检测发芽谷物中葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮这 10 种黄酮类化合物的研究鲜见报道。作者以黑小麦为原料,采用 HPLC 法实现了对黑小麦发芽过程中 10 种黄酮类化合物质量分数的动态监测,为其功能活性成分的研究奠定了基础,同时也为其产品的质量控制和评估提供了参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

运黑 161 黑小麦:山西农业大学棉花研究所;黄酮类化合物(葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素、查耳酮)标准品:纯度 $\geq 97\%$,美国 Sigma-Aldrich 公司;乙腈(色谱纯)、磷酸(色谱纯):西陇科学股份有限公司;盐酸:天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:Agilent 1260 型,美国安捷伦科技有限公司;恒温恒湿培养箱:HWS-160 型,宁波江南仪器厂;高速冷冻离心机:GL-20B 型,上海安亭科学仪器厂;真空冷冻干燥机:SCIENTZ-10N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;紫外分光光度计:UV9000S 型,上海元析仪器有限公司;恒温水浴锅:HWS-24 型,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 检测波长确定

分别称取 50.00 mg 的葛根素、表儿茶素、芦

丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮标准品,使用色谱级甲醇溶解并定容至50 mL,制得1.00 mg/mL的标准品溶液。利用紫外分光光度计对各标准品溶液进行全波长扫描,以色谱级甲醇作为空白溶剂,根据扫描结果确定最终的检测波长。

1.3.2 流动相确定

分别吸取1.00 mL的1.00 mg/mL标准品溶液于同一个容量瓶中,用色谱级甲醇定容至50 mL,制备成20 μ g/mL的混合标准品溶液。分别使用甲醇-水和乙腈-水为流动相比较各黄酮类化合物的出峰情况及分离效果,并在此基础上调整流动相的体积比,确定梯度洗脱程序。

1.3.3 色谱条件

使用ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm \times 5 μ m),进样量为10 μ L,流量为0.8 mL/min,检测波长为225 nm,柱温为25 $^{\circ}$ C。流动相A为乙腈,流动相B为体积分数0.8%的磷酸水溶液,梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Table1 Gradient elution procedures

时间/min	流动相A 体积分数/%	流动相B 体积分数/%
0	18	82
5.00	24	76
8.00	36	64
10.00	38	62
20.00	40	60
20.01	45	55
25.00	65	35
30.00	70	30
35.00	71	29

1.3.4 标准曲线绘制

称取50.00 mg的葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮标准品,分别用甲醇溶解,然后定容于50 mL容量瓶中,制得1.00 mg/mL的标准品母液。分别吸取各标准品母液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL于5个50 mL容量瓶中,用甲醇定容,得到所测10种黄酮类化合物质量浓度分别为20、40、60、80、100 μ g/mL的梯度混合标准品溶液。过0.22 μ m滤膜,按照1.3.3的方法进行测定,以标准品

的质量浓度(μ g/mL)为横坐标,标准品色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.5 发芽黑小麦制备

准确称取50 g黑小麦种子,用自来水淋洗5遍后沥干。然后用自来水(料液比1 g:6 mL)浸泡8 h。浸泡结束后,将黑小麦种子沥干并置于底部有孔的发芽盒中,在恒温恒湿培养箱(温度25 $^{\circ}$ C,相对湿度85%)中避光发芽。期间每隔8 h浇水1次,每次浇水100 mL。在发芽后的第1、3、5、7天分别取样,并以未经处理的黑小麦作为未发芽对照组。样品收取后,首先置于超低温(-80 $^{\circ}$ C)冰箱中冷冻12 h,随后放入真空冷冻干燥机中冷冻干燥。冻干后的样品磨成粉并过60目筛备用。

1.3.6 黄酮类化合物提取条件的确定

1) 提取溶剂的选择:称取3份各2.00 g发芽第5天的黑小麦粉,分别置于50 mL圆底烧瓶中。向每个烧瓶中分别加入40 mL盐酸-甲醇(取700 mL甲醇,加入100 mL盐酸,超纯水定容至1 L)、盐酸-乙醇(取700 mL乙醇,加入100 mL盐酸,超纯水定容至1 L)、盐酸-水(取100 mL盐酸,超纯水定容至1 L)溶液,在85 $^{\circ}$ C回流提取90 min,冷却后转移至50 mL容量瓶中,并用相应的提取溶剂定容至刻度。充分混匀后,以6 000 r/min的速度离心10 min。取上清液过0.22 μ m滤膜,然后按照1.3.3的方法进行测定。根据检测到的黄酮类化合物种类和质量分数初步确定最适的提取溶剂。在此基础上,以测得的10种黄酮类化合物总质量分数为指标,进一步优化提取溶剂中各组分的体积比。

2) 回流提取时间的确定:称取6份各2.00 g发芽第5天的黑小麦粉,分别置于6个50 mL圆底烧瓶中。加入40 mL的盐酸-乙醇溶液,分别进行0、30、60、90、120、150 min的回流提取,回流提取温度为85 $^{\circ}$ C。冷却后转移至50 mL容量瓶中,并用乙醇-盐酸溶液定容。充分混匀后,以6 000 r/min的速度离心10 min。取上清液过0.22 μ m滤膜,然后按照1.3.3的方法进行测定。以测得的10种黄酮类化合物总质量分数为指标,确定最适回流提取时间。

3) 回流提取温度的确定:称取6份各2.00 g发芽第5天的黑小麦粉,分别置于6个50 mL圆底烧瓶中。加入40 mL的盐酸-乙醇溶液,分别以75、

80、85、90、95、100 °C 为回流提取温度,回流提取 90 min。冷却后转移至 50 mL 容量瓶中,并用乙醇-盐酸溶液定容。充分混匀后,以 6 000 r/min 的速度离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜,然后按照 1.3.3 的方法进行测定。以测得的 10 种黄酮类化合物总质量分数为指标,确定最适回流提取温度。

4) 料液比的确定:称取 4 份各 2.00 g 发芽第 5 天的黑小麦粉,分别置于 6 个 50 mL 圆底烧瓶中。分别加入 20、40、60、80 mL 盐酸-乙醇溶液,于 85 °C 回流提取 90 min。冷却后继续加入盐酸-乙醇溶液补至总体积为 30、50、70、90 mL,即发芽黑小麦粉与提取溶剂质量体积比分别为 1 g:15 mL、1 g:25 mL、1 g:35 mL、1 g:45 mL。充分混匀后,以 6 000 r/min 的速度离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜,然后按照 1.3.3 的方法测定。以 10 种黄酮类化合物总质量分数为指标,确定最适料液比。

1.3.7 样品提取及质量分数测定

1) 样品溶液的制备:参照行业标准^[18]并稍加修改。称取 2.00 g 发芽黑小麦粉于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 40 mL 盐酸-乙醇溶液(取 700 mL 乙醇,加入 100 mL 盐酸,加水定容至 1 L)。在 85 °C 回流提取 90 min,冷却后转移至 50 mL 容量瓶中,用乙醇-盐酸溶液定容。充分混匀后,于 6 000 r/min 离心 10 min。取上清液过 0.22 μm 滤膜,然后按照 1.3.3 的方法进行测定。

2) 质量分数的测定:根据上述方法测定样品中的葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素、查耳酮的质量浓度(μg/mL),再根据式(1)计算样品中黄酮类化合物的质量分数。

$$\omega = \rho \times V / m \times f \quad (1)$$

式中:

ω ——样品中所测黄酮类化合物的质量分数, μg/g;

ρ ——标准曲线计算的样品溶液中黄酮类化合物的质量浓度, μg/mL;

V ——样品溶液的定容体积, mL;

m ——样品的质量, g;

f ——样品溶液的稀释倍数。

1.3.8 方法学验证

1) 精密度试验:按照 1.3.4 的方法制备混合标

准品溶液,分别吸取 40 μg/mL 的葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮标准溶液于 1.3.3 的色谱条件下进样测定。进样量为 10 μL,重复进样 6 次,根据色谱峰面积计算 RSD 值。

2) 重复性试验:称取 6 份同一批发芽第 5 天的发芽黑小麦粉,每份各 2.00 g,按照 1.3.6 的方法制备样品溶液。然后根据 1.3.3 的方法测定葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮的质量浓度。根据各黄酮类化合物对应的色谱峰面积计算 RSD 值。

3) 稳定性试验:称取 3 份同一批发芽第 5 天的黑小麦粉,按照 1.3.6 的方法制备样品溶液。将制备好的样品溶液在 24 h 内每隔 4 h 测定一次黄酮类化合物质量浓度。根据样品中葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素、查耳酮这 10 种黄酮类化合物对应的色谱峰面积计算 RSD 值。

4) 加标回收率试验:分别称取 3 份各 1.00 g 发芽黑小麦粉,按照 1.3.6 的方法提取并制备样品溶液,然后按 1.3.3 的方法测定 10 种黄酮类化合物的质量浓度。再称取 9 份各 1.00 g 发芽黑小麦粉,每 3 份为 1 组,分为低、中、高 3 个等级加入标准品溶液。再按照 1.3.6 的方法制备样品溶液,并按 1.3.3 的方法测定 10 种黄酮类化合物的质量浓度,计算平均加标回收率。

1.4 数据处理

采用 Excel 2019 和 IBM SPSS statistics 25.0 进行数据处理,Origin 2021 软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析条件的确定

2.1.1 检测波长确定

将 10 种黄酮类化合物的标准品溶液于紫外分光光度计上进行全波长扫描,结果发现这 10 种黄酮类化合物在 225 nm 处均表现出较强的紫外吸收,因此确定检测波长为 225 nm。

2.1.2 流动相确定

比较甲醇-水、乙腈-水作为流动相时 10 种黄酮类化合物的出峰情况及分离效果,结果表明以甲醇-水作为流动相时分离效果较差,存在色谱峰

重叠的情况;而采用乙腈-水作为流动相时能实现基线分离,但峰形不对称。为了改进这些不足,进一步试验了乙腈和不同体积分数的磷酸水溶液作为流动相的分离效果。结果表明,当磷酸体积分

数为0.8%时,不仅实现了各组分的基线分离,而且获得了较为理想的峰形。在此基础上通过梯度洗脱优化峰形并缩短洗脱时间,确定最佳的梯度洗脱程序,色谱图见图1。

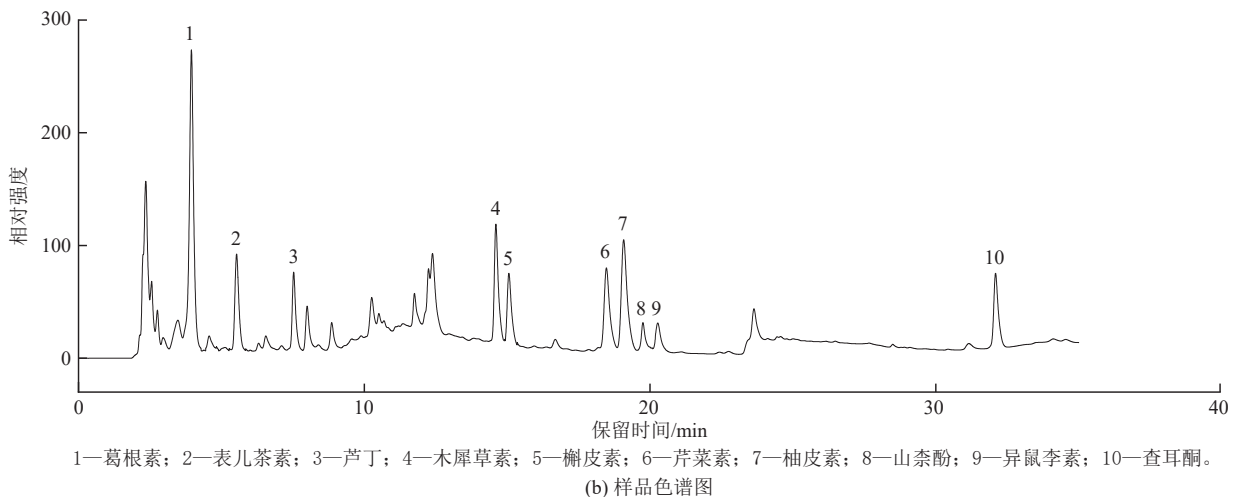
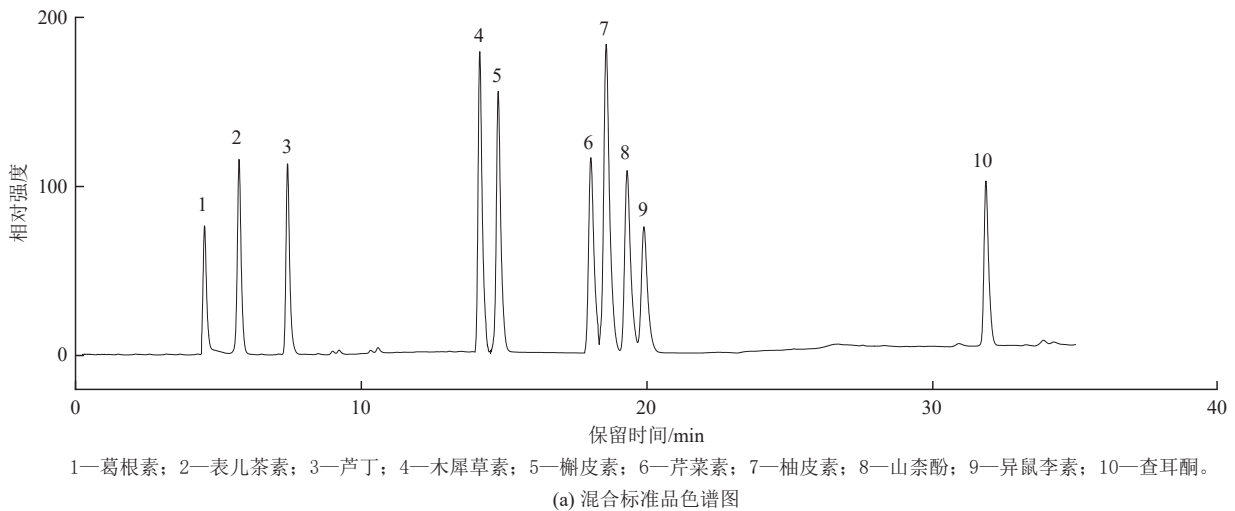


图1 混合标准品和样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standards and samples

2.2 线性关系结果

HPLC测定10种黄酮类化合物的线性关系结果见表2。10种黄酮类化合物在20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其峰面积与质量浓度之间呈现出良好的线性关系,所有化合物的相关系数均不低于0.999 1。

2.3 样品提取方法确定

2.3.1 提取溶剂确定

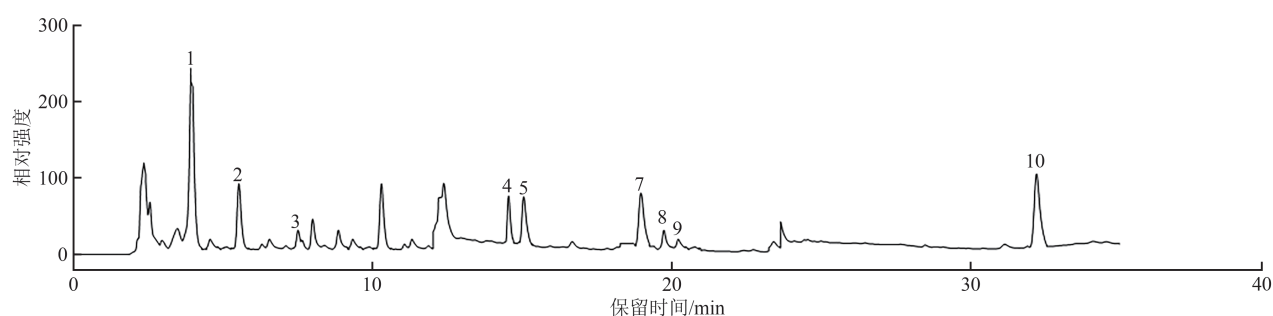
比较盐酸-甲醇、盐酸-乙醇和盐酸-水这3种提取溶剂对发芽黑小麦粉中黄酮类化合物的提取效果,结果见图2。以盐酸-甲醇作为提取溶剂时,

样品中的芦丁、木犀草素和异鼠李素质量分数较低且芹菜素未被检测出;以盐酸-水作为提取溶剂时,样品中的葛根素、芦丁、木犀草素和查耳酮质量分数较低,且芹菜素、柚皮素、山柰酚和异鼠李素未被检出;以盐酸-乙醇作为提取溶剂时,在相同测定条件下,10种黄酮类化合物均能被检测到,且总体提取率高于盐酸-甲醇和盐酸-水的提取效果。这可能是由于乙醇与这10种黄酮类化合物的极性相近,使得这些黄酮类化合物更易溶于盐酸-乙醇溶液,因此选择盐酸-乙醇作为提取溶剂。另

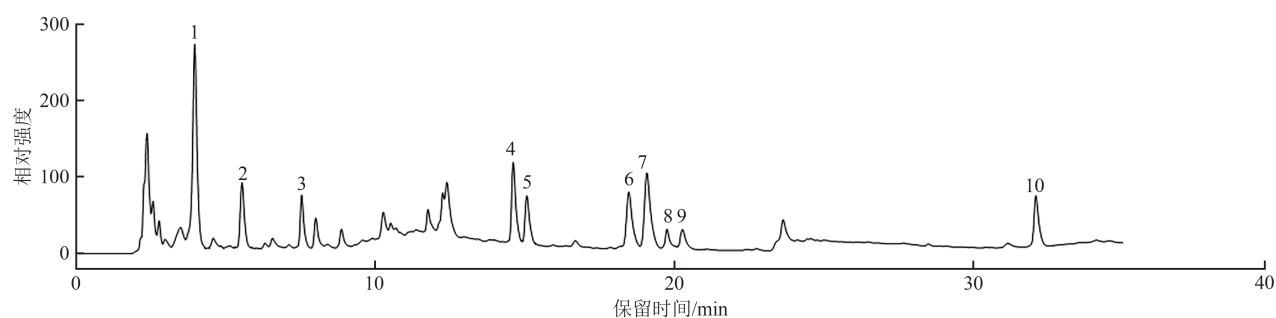
表 2 10 种黄酮类化合物的线性方程、线性范围及相关系数

Table 2 Linear equations, linear ranges, and correlation coefficients for the 10 flavonoids

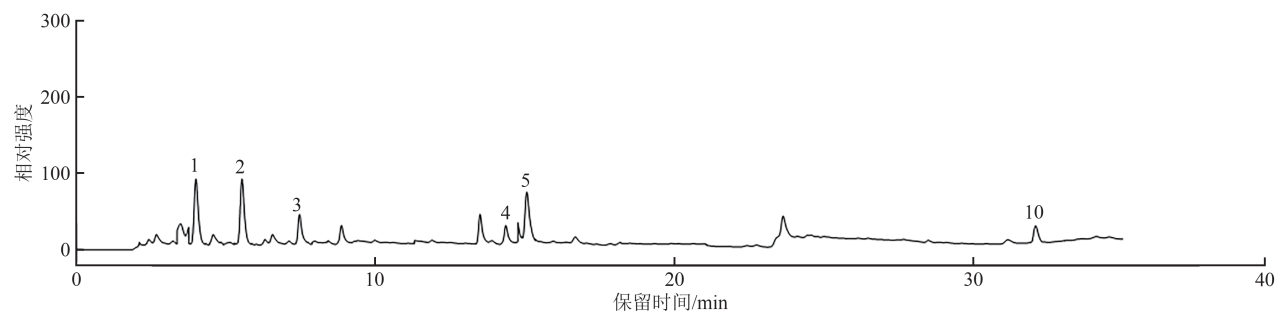
化合物	线性方程	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	R^2	检出限/($\mu\text{g/mL}$)
葛根素	$y=19.341x-13.803$	20~100	0.999 3	0.15
表儿茶素	$y=27.447x+6.134$	20~100	0.999 9	1.00
芦丁	$y=25.753x+6.058 4$	20~100	0.999 8	1.00
木犀草素	$y=44.989x-5.361 7$	20~100	0.999 9	0.21
槲皮素	$y=42.563x+10.02$	20~100	0.999 8	0.24
芹菜素	$y=41.155x-27.632$	20~100	0.999 3	0.46
柚皮素	$y=64.631x+28.906$	20~100	0.999 9	0.46
山柰酚	$y=38.697x+15.522$	20~100	0.999 8	0.87
异鼠李素	$y=27.29x+43.639$	20~100	0.999 1	0.87
查耳酮	$y=27.455x+24.923$	20~100	0.999 6	1.00



1—葛根素；2—表儿茶素；3—芦丁；4—木犀草素；5—槲皮素；7—柚皮素；8—山柰酚；9—异鼠李素；10—查耳酮。
(a) 盐酸-甲醇为提取溶剂时样品液相色谱图



1—葛根素；2—表儿茶素；3—芦丁；4—木犀草素；5—槲皮素；6—芹菜素；7—柚皮素；8—山柰酚；9—异鼠李素；10—查耳酮。
(b) 盐酸-乙醇为提取溶剂时样品液相色谱图



1—葛根素；2—表儿茶素；3—芦丁；4—木犀草素；5—槲皮素；10—查耳酮。
(c) 盐酸-水为提取溶剂时样品液相色谱图

图 2 不同提取溶剂提取样品时黄酮类化合物的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of flavonoids extracted from samples using different extraction solvents

外,进一步比较了不同体积分数的乙醇对这10种黄酮类化合物提取率的影响,见图3。结果表明,体积分数70%的乙醇提取效果最佳。当乙醇体积分数过低时,测得的10种黄酮类化合物总质量分数较低;当乙醇体积分数过高时,会导致发芽黑小麦粉中的一些非黄酮类物质如糖类和脂溶性化合物大量析出^[19],从而影响黄酮类化合物的定量研究。这与钟菲菲等^[20]关于湘莲中3种黄酮类化合物的提取优化结果一致。因此,最终确定提取溶剂为体积分数70%的盐酸-乙醇溶液。

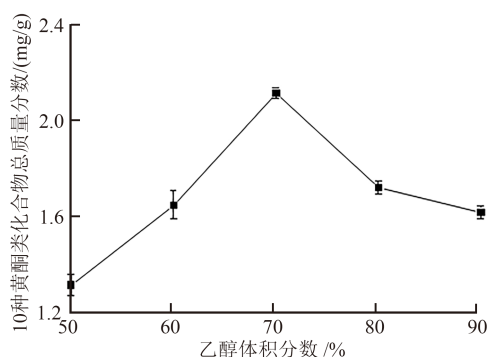


图3 乙醇体积分数对黄酮类化合物总质量分数的影响

Fig. 3 Effect of ethanol volume fraction in extraction solvent on the total mass fraction of flavonoids

2.3.2 回流提取时间确定

回流提取时间对10种黄酮类化合物总质量分数的影响见图4(a)。在0~90 min,随着回流提取时间的延长,10种黄酮类化合物总质量分数呈上升趋势;当提取时间超过90 min时,黄酮类化合物

总质量分数随着回流提取时间的延长而降低。因此,确定最适回流提取时间为90 min。

2.3.3 回流提取温度确定

在确定最佳回流提取时间为90 min的基础上,研究了回流提取温度对10种黄酮类化合物总质量分数的影响,结果见图4(b)。当回流提取温度为85 °C时,发芽黑小麦中10种黄酮类化合物总质量分数最高。因此,确定最适回流提取温度为85 °C。

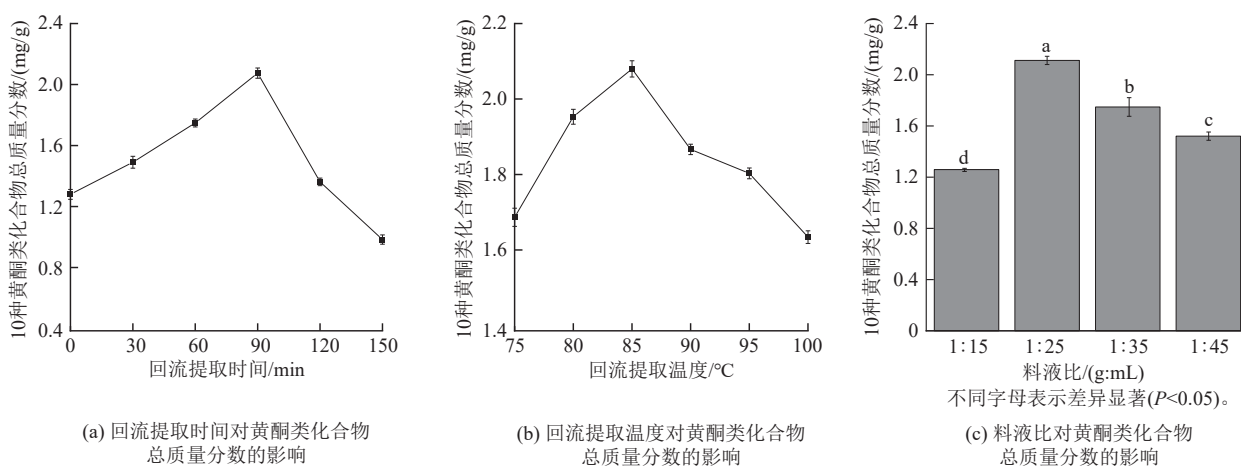
2.3.4 料液比确定

在确定以盐酸-乙醇溶液为提取溶剂、90 min为回流提取时间、85 °C为回流提取温度的基础上,研究料液比对发芽黑小麦粉中10种黄酮类化合物总质量分数的影响,结果见图4(c)。当料液比为1 g:25 mL时,提取出的10种黄酮类化合物总质量分数最高。当溶剂体积过低时,发芽黑小麦粉中黄酮类化合物未充分溶解;而当提取溶剂体积过高时,10种黄酮类化合物总质量分数降低。导致这一现象的原因可能是10种黄酮类化合物已被完全提取,继续增加提取溶剂的体积,会导致单位体积提取液中所测10种黄酮类化合物的质量下降。这与郭瑛等^[21]关于蔷薇花中总多酚的提取优化结果一致。另外,提取溶剂用量过多会造成资源浪费。因此,确定最适料液比为1 g:25 mL。

2.4 方法学验证结果

2.4.1 精密度

将标准品溶液连续进样6次,测得葛根素、表儿



(a) 回流提取时间对黄酮类化合物总质量分数的影响

(b) 回流提取温度对黄酮类化合物总质量分数的影响

(c) 料液比对黄酮类化合物总质量分数的影响

图4 不同提取条件对黄酮类化合物总质量分数的影响

Fig. 4 Effect of different extraction conditions on the total mass fraction of flavonoids

茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮这 10 种黄酮类化合物色谱峰面积的 RSD 值 ($n=6$) 分别为 1.05%、0.96%、1.14%、1.02%、1.05%、1.07%、0.96%、1.02%、1.08%、1.56%，均低于 2.00%，表明仪器精确度良好。

2.4.2 重复性

制备 6 份同一批样品溶液进行测定,结果显示葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮的峰面积 RSD 值 ($n=6$) 分别为 1.25%、1.91%、1.50%、1.01%、1.68%、1.84%、1.78%、1.63%、1.53%、

1.65%，均低于 2.00%，表明仪器重复性良好。

2.4.3 稳定性

将制备好的样品溶液在 24 h 内每隔 4 h 进样一次,测得葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮这 10 种黄酮类化合物峰面积的 RSD 值 ($n=7$) 分别为 1.34%、1.74%、1.71%、0.93%、1.04%、1.96%、1.14%、1.95%、1.86%、1.20%，均低于 2.00%，表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 加标回收率

加标回收率测定结果见表 3,葛根素、表

表 3 加标回收率试验结果 ($n=3$)
Table 3 Results of the spiked recovery test ($n=3$)

化合物	样品中化合物质量/ μg	加入质量/ μg	测得质量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD 值/%
葛根素	1.612	0.800	2.414	100.25	99.40	0.88
		1.600	3.188	98.50		
		2.400	3.999	99.46		
表儿茶素	0.605	0.300	0.904	99.67	100.19	0.99
		0.600	1.213	101.33		
		0.900	1.501	99.56		
芦丁	0.339	0.200	0.540	100.50	102.03	1.40
		0.300	0.649	103.33		
		0.400	0.748	102.25		
木犀草素	0.411	0.200	0.612	100.50	100.44	1.08
		0.400	0.817	101.50		
		0.600	1.007	99.33		
槲皮素	0.229	0.100	0.328	99.00	100.28	1.25
		0.200	0.432	101.50		
		0.300	0.530	100.33		
芹菜素	0.279	0.150	0.427	98.67	98.72	1.56
		0.250	0.522	97.20		
		0.350	0.630	100.29		
柚皮素	0.177	0.150	0.325	98.67	99.09	1.56
		0.200	0.379	101.00		
		0.250	0.421	97.60		
山柰酚	0.043	0.020	0.063	100.50	99.86	1.33
		0.040	0.084	100.75		
		0.060	0.102	98.33		
异鼠李素	0.005	0.001	0.006	100.00	99.33	1.16
		0.005	0.001	98.00		
		0.010	0.015	100.00		
查耳酮	0.384	0.200	0.580	98.00	98.75	0.76
		0.400	0.779	98.75		
		0.600	0.981	99.50		

儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素和查耳酮的平均回收率为98.72%~102.03%，且RSD值均低于2.00%，表明该试验使用的提取及测定方法准确度高。

2.5 发芽黑小麦中10种黄酮类化合物质量分数

发芽时间对黑小麦中10种黄酮类化合物质量分数的影响见表4。与未发芽对照组相比，黑小麦在发芽处理后产生了木犀草素；随着发芽时间的延长，在第3天时检测出了槲皮素、柚皮素和山柰酚；直到发芽第5天时才有少量异鼠李素生成。葛根素、表儿茶素和查耳酮质量分数均在发芽1~5 d显著上升，但在第7天时显著下降。芹菜素质量分数在发芽1~7 d显著上升。芦丁质量分数在发芽1~5 d内呈先下降后上升的趋势，并在发芽第5天达到峰值，为172.27 $\mu\text{g/g}$ ，这与罗

佳倩等^[22]对发芽苦荞中芦丁质量分数变化的研究结果相似。总体而言，10种黄酮类化合物在发芽第5天的黑小麦中均可检测到，且不同发芽时间的质量分数有较大差异。在发芽的1~5 d，随着发芽时间的延长，黑小麦中的10种黄酮类化合物总质量分数显著增加，且种类多样，这可能是因为籽粒细胞壁中所含的黄酮类化合物在萌发过程中被降解释放，且发芽激活了黑小麦籽粒中黄酮类化合物合成的关键酶，这与其他研究者^[23-24]的研究结果一致。但在发芽第7天时，黑小麦中的黄酮类化合物总质量分数明显减少。黄酮类化合物合成途径涉及多种酶，次级代谢产物的合成往往是多个酶共同作用的结果^[25-26]，具体原因还需进一步探讨。综上可知，发芽处理能够明显改变黑小麦中这10种黄酮类化合物的组成及质量分数。

表4 发芽时间对黑小麦中10种黄酮类化合物质量分数的影响

Table 4 Effect of germination time on the mass fractions of 10 flavonoids in black wheat

发芽时间/d	葛根素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	表儿茶素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	芦丁 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	木犀草素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	槲皮素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	芹菜素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	柚皮素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	山柰酚 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	异鼠李素 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	查耳酮 质量分数/ ($\mu\text{g/g}$)	总质量 分数/ ($\mu\text{g/g}$)
0	291.23± 3.62 ^e	70.98± 2.77 ^d	150.37± 0.98 ^b	—	—	44.67± 0.71 ^e	—	—	—	42.11± 1.59 ^d	598.68± 1.54 ^e
1	363.96± 5.66 ^d	72.11± 1.32 ^d	146.35± 2.13 ^b	27.05± 0.30 ^d	—	48.73± 0.55 ^d	—	—	—	56.47± 1.21 ^c	714.67± 8.58 ^d
3	558.27± 6.13 ^e	130.40± 1.749 ^c	149.74± 2.14 ^b	104.06± 1.81 ^c	21.99± 0.40 ^e	106.07± 1.25 ^e	58.10± 0.90 ^e	40.72± 0.54 ^a	—	164.67± 2.36 ^b	1 334.03± 16.08 ^e
5	787.70± 3.22 ^a	183.68± 4.94 ^a	172.27± 3.84 ^a	218.30± 3.46 ^a	117.10± 1.14 ^a	140.10± 2.12 ^b	230.32± 0.43 ^a	40.12± 0.71 ^a	28.34± 0.60 ^a	187.86± 4.77 ^a	2 105.78± 25.69 ^a
7	639.69± 5.38 ^b	139.35± 2.30 ^b	150.13± 2.33 ^b	155.58± 1.18 ^b	27.23± 0.35 ^b	197.34± 2.88 ^a	108.29± 1.70 ^b	40.96± 1.13 ^a	23.66± 0.47 ^b	59.24± 0.31 ^c	1 541.48± 16.82 ^b

注:0 d表示未发芽黑小麦对照组;“—”表示未检测到;同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论

作者优化了发芽黑小麦中10种黄酮类化合物的提取方法，并建立了HPLC快速检测葛根素、表儿茶素、芦丁、木犀草素、槲皮素、芹菜素、柚皮素、山柰酚、异鼠李素、查耳酮10种黄酮类化合物的方法，可以同时发芽黑小麦中10种黄酮类化合物进行定量分析。此外，对发芽1、3、5、7 d时黑小麦中10种

黄酮类化合物质量分数进行测定。结果表明，发芽处理可以显著促进黑小麦中木犀草素、槲皮素、柚皮素、山柰酚和异鼠李素的生成；除芹菜素与山柰酚外，其余8种黄酮类化合物质量分数在第5天时均达到峰值，其中葛根素质量分数最高，为787.70 $\mu\text{g/g}$ ，异鼠李素质量分数最低，为28.34 $\mu\text{g/g}$ 。发芽7 d时，芹菜素质量分数继续上升至197.34 $\mu\text{g/g}$ ，而山

酚质量分数基本保持不变,其他 8 种黄酮类化合物的质量分数则有所下降,说明发芽过程能显著改变黑小麦中黄酮类化合物的组成及质量分数。该研究采用的方法具有较高的准确性和可靠性,操作简便快速,适用于发芽谷物中 10 种黄酮类化合物的定量分析。

参考文献

- [1] 陈权权,郭祯祥,郭嘉. 黑小麦加工利用的研究进展及前景展望[J]. 食品研究与开发,2020,41(1):196-200.
CHEN Q Q, GUO Z X, GUO J. Research progress and prospects of processing and utilization of triticale [J]. Food Research and Development, 2020, 41(1): 196-200. (in Chinese)
- [2] 牛新奎,韩小贤,郑学玲. 黑小麦粉的抗氧化成分及活性[J]. 现代食品科技,2022,38(9):292-297.
NIU X K, HAN X X, ZHENG X L. Antioxidant components and activity of triticum aestivum flour [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 292-297. (in Chinese)
- [3] 夏瑞雪,魏帅,郭波莉,等. 豫北地区小麦籽粒矿物质元素含量分析[J]. 核农学报,2017,31(3):516-523.
XIA R X, WEI S, GUO B L, et al. Analysis of mineral element content of wheat in northern area of Henan Province[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(3):516-523. (in Chinese)
- [4] 李华,马丹妮,吴莹晗,等. 五种黑小麦的营养价值、抗氧化活性和淀粉消化性[J]. 食品与发酵工业,2020,46(12):80-86.
LI H, MA D N, WU Y H, et al. Nutritional value, antioxidant activity and starch digestibility of five triticale varieties [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(12):80-86. (in Chinese)
- [5] GHUMMAN A, SINGH N, KAUR A. Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(10):2191-2200.
- [6] 张驰. 发芽青稞熟粉的功能特性及其在烘焙食品中的应用研究[D]. 广州:华南理工大学,2020.
- [7] CHEN Z J, WANG P, WENG Y, et al. Comparison of phenolic profiles, antioxidant capacity and relevant enzyme activity of different Chinese wheat varieties during germination [J]. Food Bioscience, 2017, 20: 159-167.
- [8] HAN I. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory, and anti-inflammatory activities and cell toxicity of waxy and normal wheat sprouts at various germination time [J]. Applied Sciences-Basel, 2021, 11(16):7755.
- [9] OGHBAEI M, PRAKASH J. Bioaccessible phenolics and flavonoids from wheat flour products subjected to different processing variables[J]. Cereal Chemistry, 2019, 96(6): 1068-1078.
- [10] WANG X, ZHANG X C, HOU H X, et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal the accumulation patterns of phenylpropanoids and flavonoids in different colored-grain wheats (*Triticum aestivum* L.) [J]. Food Research International, 2020, 138(Pt A):109711.
- [11] ZENGIN G, NITHIYANANTHAM S, SARIKURKCU C, et al. Identification of phenolic profiles, fatty acid compositions, antioxidant activities, and enzyme inhibition effects of seven wheat cultivars grown in Turkey: a phytochemical approach for their nutritional value [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(10):2373-2382.
- [12] HERNÁNDEZ L, AFONSO D, RODRÍGUEZ E M, et al. Phenolic compounds in wheat grain cultivars [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2011, 66(4):408-415.
- [13] BUŚKO M, GÓRAL T, OSTROWSKA A, et al. The effect of *Fusarium* inoculation and fungicide application on concentrations of flavonoids (apigenin, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin, rutin, vitexin) in winter wheat cultivars [J]. American Journal of Plant Sciences, 2014, 5(25):3727-3736.
- [14] 李国庆. 黄酮醇在小麦抗旱节水中的功能分析[D]. 济南:山东大学,2022.
- [15] 张宗伟,林逸凡,刘剑,等. UPLC-MS/MS法同时测定红豆树中 12 个黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(3):468-475.
ZHANG Z W, LIN Y F, LIU J, et al. Simultaneous determination of 12 flavonoids in *Ormosia hosiei* Hemsl. Et Wils. by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, 42(3):468-475. (in Chinese)
- [16] 殷丛培,吴盟,王志博,等. 高粱籽粒中 9 种黄酮类化合物的积累特性分析[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(12): 76-83.
YIN C P, WU M, WANG Z B, et al. Analysis on accumulation characteristics of nine flavonoids in sorghum grains [J]. Journal of the Chinese Cereals and

- Oils Association, 2022, 37(12): 76-83. (in Chinese)
- [17] 王婷, 卜丽双, 刘登帅, 等. 高效液相色谱法同时测定银杏叶及其提取物中4种游离黄酮含量[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(4): 154-158.
- WANG T, BU L S, LIU D S, et al. Simultaneous determination of four free flavonoids extracted from *Ginkgo biloba* leave and its extracts by HPLC[J]. China Food Additives, 2019, 30(4): 154-158. (in Chinese)
- [18] 中华人民共和国农业农村部. 植物源性食品中10种黄酮类化合物的测定 高效液相色谱-串联质谱法: NY/T 3950—2021[S]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- [19] 王宏亮, 惠哲哲, 梁犇, 等. 皂荚叶多糖提取工艺及其抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(12): 176-182.
- WANG H L, HUI Z Z, LIANG B, et al. Primary study on extraction technology and antioxidant activity of polysaccharides from *Gleditsia sinensis* leaves [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(12): 176-182. (in Chinese)
- [20] 钟菲菲, 李静, 雷德卿, 等. HPLC法同时测定湘莲中芦丁、金丝桃苷及槲皮素含量[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 57-64.
- ZHONG F F, LI J, LEI D Q, et al. Determination of rutin, hyperoside, quercetin in Xiang lotus by HPLC[J]. Food & Machinery, 2023, 39(9): 57-64. (in Chinese)
- [21] 郭瑛, 赵文惠, 李安林, 等. 疏花蔷薇花总多酚提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(3): 116-122, 180.
- GUO Y, ZHAO W H, LI A L, et al. Optimization of extraction process of total polyphenols and their antioxidant activity in *Rosa laxa* Retz. flowers[J]. Food Research and Development, 2024, 45(3): 116-122, 180. (in Chinese)
- [22] 罗佳倩, 周丽玲, 李高阳, 等. 发芽和水热处理对苦荞活性成分及功能特性的影响[J]. 食品与机械, 2023, 39(4): 142-150.
- LUO J Q, ZHOU L L, LI G Y, et al. Effects of sprouting and hydrothermal treatment on active components and functional properties of tartary buckwheat[J]. Food & Machinery, 2023, 39(4): 142-150. (in Chinese)
- [23] 马燕, 王婧, 程永霞, 等. 发芽对小麦苗酚类物质及抗氧化能力的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(18): 178-185.
- MA Y, WANG J, CHENG Y X, et al. Effects of germination on phenolics and antioxidant capacity of wheat seedlings[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(18): 178-185. (in Chinese)
- [24] 韩雅盟. 不同加工方式对藜麦酚类物质及其抗氧化活性的影响[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- [25] 王杰. 海蓬子种子发芽富集生理活性物质的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [26] 程佳丽, 刘军, 毛佳奇, 等. 不同光照对荞麦芽黄酮类化合物及相关代谢酶基因表达的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 72-79.
- CHENG J L, LIU J, MAO J Q, et al. Effects of different illumination treatments on flavonoids and gene expression of related metabolic enzymes in buckwheat sprouts[J]. Food Science, 2021, 42(23): 72-79. (in Chinese)

(责任编辑: 刘冬梅)