

杜道坤,贺娟,孟利东,等.黑青稞花色苷提取及抗氧化活性的分析[J].江苏农业科学,2017,45(18):173-179.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.044

# 黑青稞花色苷提取及抗氧化活性的分析

杜道坤,贺娟,孟利东,康志钰

(云南农业大学农学与生物技术学院,云南昆明 650201)

**摘要:**为探讨黑青稞色素资源的开发与利用,以完整黑青稞种子为材料,在单因素试验基础上结合响应面分析法,以提取温度、液料比、乙醇浓度、pH 值为因素,花色苷提取量为响应值优化黑青稞花色苷提取工艺,进而测定其还原能力,以及清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、羟自由基、超氧阴离子自由基的能力。结果表明,黑青稞花色苷最佳提取工艺参数为提取温度 60 ℃,液料比 10.04 mL:g,乙醇浓度 55.76%,pH 值 1,在该条件下提取 1 h 花色苷的实际提取量为 9.68 mg/100 g,而在此基础上使用超声波提取 40 min,提取量达到 14.04 mg/100 g,提高了提取效率。同时所提黑青稞花色苷的抗氧化活性较强,且抗氧化能力与花色苷浓度间存在剂量效应关系;与维生素 C(vitamin C,简称 VC)相比,黑青稞花色苷清除 DPPH 自由基和羟自由基能力较强,但还原能力和清除超氧阴离子能力没有 VC 强。黑青稞花色苷对自由基的清除能力大小依次为 DPPH 自由基>羟自由基>超氧阴离子自由基,半抑制浓度(50% inhibitory concentration,简称 IC<sub>50</sub>)依次为 0.186、0.268、0.293 mg/mL,说明黑青稞花色苷是一种较好的天然抗氧化剂。

**关键词:**黑青稞;花色苷;响应面法;提取工艺;抗氧化活性

**中图分类号:**S512.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0173-06

青稞(*Hordeum vulgare* Linn. var. *nudum* Hook. f.)在植物分类学上为禾本科大麦属普通大麦种多棱裸粒大麦变种<sup>[1]</sup>。我国拥有丰富的青稞资源,品种繁多、种类各异,其中黑青稞是一种独特的种质资源,具有很大的开发价值。黑青稞种皮中含有丰富的花色苷而区别于普通白青稞,单月琴就从囊谦黑青稞的酸性乙醇提取液中鉴定出可能的 7 种花色苷<sup>[2]</sup>。花色苷是一种的水溶性的天然色素,它主要存在于植物的花、果实、种子中,从而使它们呈现出黑、紫、蓝等多种颜色。现代研究证明,人工合成的色素对人类的健康存在潜在的致畸性、致癌性<sup>[3]</sup>,而天然色素花色苷不仅无毒无害,还具有清除自由基、防癌抗肿瘤、清脂减肥等与人类健康息息相关的功能<sup>[4-6]</sup>,所以黑青稞具有生产天然色素的开发和利用前景,而提取其中的花色苷是利用黑青稞的第 1 步,研究其提取工艺具有重要意义。

不同的提取条件对黑青稞花色苷的提取效果存在不同的影响。响应面分析法(response surface methodology,简称 RSM)就是使用多元二次回归方程来拟合多个提取条件(因素)与试验指标(响应值)之间的函数关系,并通过分析回归方程来优化工艺参数,它保留了正交试验工作量少的优点,还克服了不能在整个区域上得出最佳因素组合和最优值的缺点<sup>[7-8]</sup>。陈建国等使用这种方法以黑青稞种子粉为材料优化了其花色苷的提取工艺<sup>[9]</sup>。但是青稞种子中淀粉成分独特,

普遍含有 74%~78% 的支链淀粉,有的甚至更高<sup>[10]</sup>,使用种子粉提取在加热的过程中使提取液变得黏稠、糊化而影响测定结果,且黑青稞花色苷多数集中在种皮,所以本研究以去杂的、完整的黑青稞种子为材料,使用响应面法优化其提取工艺,并初步探索超声波辅助提取黑青稞花色苷,同时测定所得花色苷提取液的抗氧化活性,旨在为黑青稞天然色素的进一步研究和开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

以云南省当地种皮颜色为黑色的青稞为材料。

主要试剂有甲醇、乙醇、盐酸、三氯乙酸、柠檬酸、冰乙酸、甲酸、乙酸乙酯、30% 双氧水、硫酸亚铁、水杨酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl,简称 DPPH)、铁氰化钾、氯化铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、Tris-base、邻苯三酚,均为分析纯。

### 1.2 仪器设备

主要仪器有 Agilent Cary60 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司)、Alpha 1-2 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司)、RE-52B 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、予华 SHZ-D 型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司)、KQ32001 超声波振荡器(东莞市柯桥超声波设备有限公司)、YXT-2 型高速电动离心机、恒温水浴锅、电子天平等。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 黑青稞花色苷吸收波长的选择** 参照孙荣琴等的方法<sup>[11]</sup>,使用 1% 盐酸甲醇进行提取,将提取液离心定容后再用紫外-可见分光光度计(Agilent Cary 60)进行 250~700 nm 的扫描,确定可见光区内最大吸收波长( $\lambda_{\max}$ )。

**1.3.2 单因素试验设计** 以黑色种皮的青稞种子为材料,分

收稿日期:2016-04-20

基金项目:云南农业大学创新基金。

作者简介:杜道坤(1989—),男,河南信阳人,硕士研究生,主要从事作物遗传和品种改良研究。E-mail:490041070@qq.com。

通信作者:康志钰,博士,副教授,主要从事作物遗传育种及种子科学与工程方面的研究。E-mail:zhiyukang@163.com。

别考察种子粉碎与未粉碎、提取剂、乙醇浓度、提取剂 pH 值、酸化剂、提取温度、提取时间、液料比 8 个单因素对黑青稞籽粒花色苷提取量的影响。

1.3.2.1 种子粉碎与未粉碎的选择 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子和过 60 目筛网的黑青稞种子粉,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,配制 pH 值 = 3 的 60% 乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.2 提取剂的确定 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,分别配制 pH 值 = 3 的蒸馏水、60% 甲醇、纯甲醇、60% 乙醇、纯乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.3 乙醇浓度的选择 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,分别配制 pH 值 = 3 的 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.4 pH 值的确定 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,分别配制 pH 值为 1、2、3、4、5 的 60% 乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.5 酸化剂的选择 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,分别以盐酸、三氯乙酸、冰乙酸、甲酸、柠檬酸为 pH 值调节剂,配制 pH 值 = 3 的 60% 乙醇在温度为 50 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.6 提取温度的确定 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,配制 pH 值 = 3 的 60% 乙醇,分别在温度为 30、40、50、60、70、80 ℃ 的水浴条件下提取 1 h。

1.3.2.7 提取时间的确定 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,按照 10 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,配制 pH 值 = 3 的 60% 乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下分别提取 0.5、1、2、3、4、5 h。

1.3.2.8 液料比的确定 分别称取 1 g 去杂的完整黑青稞种子,分别按照 5 mL : 1 g、10 mL : 1 g、20 mL : 1 g、30 mL : 1 g、40 mL : 1 g、50 mL : 1 g 的液料比,以盐酸为酸化剂,配制 pH 值 = 3 的 60% 乙醇,在温度为 50 ℃ 的水浴条件下分别提取 1 h。

1.3.3 花色苷提取量的测定 将按照以上单因素试验所确定的提取条件得到的提取液离心后,以提取剂为空白对照,在  $\lambda_{\max}$  处测定吸光度,参考赵桃等的方法<sup>[12]</sup>计算得出提取量,均平行测定 3 次,相关公式:

$$\text{提取量}(\text{mg}/100\text{ g}) = \frac{D \times V \times N \times 100}{98.2 \times m}。$$

式中: $D$  为在  $\lambda_{\max}$  处的吸光度; $V$  为稀释体积, mL;  $N$  为稀释倍数; 98.2 为花色素的平均消光系数;  $m$  为样品干质量, g。

1.3.4 黑青稞花色苷的响应面试验及模型验证 根据单因素试验结果,选取对黑青稞花色苷提取量影响较大的 4 个因素提取温度( $A$ )、液料比( $B$ )、乙醇浓度( $C$ )、pH 值( $D$ )作为影响因子,以提取量作为响应值,根据 Box - Benhnken 中心组合设计原理使用 4 因素 3 水平试验设计(表 1)。利用 Design - Expert 8.06 软件对数据进行分析。用响应面法分析得出的黑青稞花色苷最佳提取条件进行验证,算出实际提取

表 1 响应面设计的因素与水平

水平	因素			
	A:提取温度 (℃)	B:液料比 (mL : g)	C:乙醇浓度 (%)	D:pH 值
-1	40	5 : 1	50	1
0	50	10 : 1	60	2
1	60	15 : 1	70	3

量与模型的预测值进行比较。

1.3.5 超声波辅助提取试验 根据所得最佳提取条件,为进一步缩短提取时间,进行超声波辅助提取试验,超声波分别提取 20、40、60、80 min 后测定提取量,平行测定 3 次。

1.3.6 抗氧化性的测定 根据“1.3.4”节优化的提取条件提取黑青稞中的花色苷,滤液经乙酸乙酯萃取 3 次进行纯化,40 ℃ 下旋转蒸发至溶液黏稠,最后置于冷冻干燥机中获得紫色冻干粉,然后用 60% 乙醇溶液配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的黑青稞花色苷溶液进行抗氧化性的研究,使用相同浓度的维生素 C (vitamin C, 简称 VC) 溶液作为阳性对照。

1.3.6.1 还原能力的测定参考莫开菊等的方法<sup>[13]</sup>。采用普鲁士法,分别准确移取 1.0 mL 不同浓度样品于干燥试管中,再依次加入 3.0 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 = 6.6)、2.5 mL 1% 六氰合铁酸钾溶液,于 50 ℃ 水浴保温 20 min 后,迅速冷却,再加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸,离心,取 3.0 mL 上清液,再依次加入 3.0 mL 蒸馏水,0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液,混匀后,室温静置 10 min,再在波长 700 nm 处测定其吸光度。

1.3.6.2 DPPH 清除能力参考朱璐等的方法<sup>[14]</sup>。精确称取 2.5 mg DPPH 粉末,用无水乙醇定容至 100 mL,避光保存备用。分别取 1.0 mL 不同浓度的样品溶液于试管中,再加入 2.0 mL DPPH 溶液,摇匀后室温避光保存 30 min,以无水乙醇作为空白对照,在 517 nm 处测吸光度。计算清除率,并计算当清除率达到 50% 时所需的浓度,即  $IC_{50}$  值,清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{D_{1(517\text{ nm})} - D_{2(517\text{ nm})}}{D_{0(517\text{ nm})}}) \times 100\%。$$

式中: $D_{0(517\text{ nm})}$  为不加样品溶液的空白管溶液的吸光度; $D_{1(517\text{ nm})}$  为反应溶液的吸光度; $D_{2(517\text{ nm})}$  为不加 DPPH 溶液的对照管吸光度。

1.3.6.3 羟自由基清除能力参考赵桃等的方法<sup>[12]</sup> 取干燥试管,依次加入 1.0 mL 8.8 mmol/L  $H_2O_2$ 、1.0 mL 10 mmol/L  $FeSO_4$ 、1.0 mL 10 mmol/L 水杨酸乙醇溶液,再加入 1.0 mL 样品溶液,最后加入 1.0 mL  $H_2O_2$  于 37 ℃ 水浴中反应 0.5 h,以蒸馏水作为对照,在 510 nm 处测吸光度,计算清除率:

$$\text{清除率} = (1 - \frac{D_{1(510\text{ nm})} - D_{2(510\text{ nm})}}{D_{0(510\text{ nm})}}) \times 100\%。$$

式中: $D_{0(510\text{ nm})}$  为不加样品溶液空白管溶液的吸光度; $D_{1(510\text{ nm})}$  为反应溶液的吸光度; $D_{2(510\text{ nm})}$  为含 1.0 mL  $H_2O_2$  和 1.0 mL 样品溶液对照管的吸光度。

1.3.6.4 超氧阴离子自由基清除能力参考资名扬等的方法<sup>[15]</sup> 采用邻苯三酚自氧化速率法,取干燥试管加入 4.5 mL pH 值 = 8.2 的 50 mmol/L Tris - HCl 缓冲液和 4.5 mL

蒸馏水,混合后在 25 ℃ 恒温水浴中保温 20 min,然后加入于 25 ℃ 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.3 mL,迅速摇匀后倒入比色皿,每隔 0.5 min 在波长 320 nm 处测定溶液的吸光度,至 5 min 后停止。计算线性范围内 1 min 吸光度的增加值 ( $\Delta D_{0(320\text{ nm})}$ )。在加入邻苯三酚前,先加入 1.0 mL 样品溶液,蒸馏水 3.5 mL,从而得到  $\Delta D_{320\text{ nm}}$ ,按下式计算清除率:

$$\text{清除率} = \frac{\Delta D_{0(320\text{ nm})} - \Delta D_{320\text{ nm}}}{\Delta D_{0(320\text{ nm})}} \times 100\%。$$

式中: $\Delta D_{0(320\text{ nm})}$  表示邻苯三酚自氧化速率; $\Delta D_{320\text{ nm}}$  表示加入样品溶液后邻苯三酚的自氧化速率。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑青稞花色苷吸收波长的确定

由图 1 可知,黑青稞花色苷提液在紫外区 270 ~ 280 nm 和可见光区 500 ~ 550 nm 之间均有吸收峰出现,分别为 275,528 nm,符合花色苷特征吸收峰的范围,在 324 nm 处有吸收峰,则表示该色素分子结构具有酰化基团<sup>[16]</sup>。因此确定黑青稞花色苷测定波长为 528 nm。

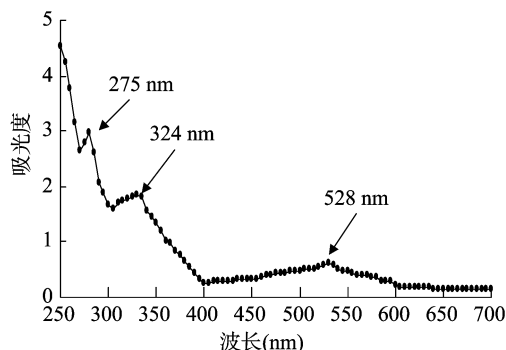


图1 黑青稞花色苷提取液的光吸收图谱

### 2.2 花色苷提取的单因素试验结果

2.2.1 籽粒粉碎与未粉碎的影响 由图 2 - A 可看出,完整种子的花色苷提取量高于过 60 目筛的黑青稞种子粉,这是由于黑青稞种子中含有大量的支链淀粉<sup>[10]</sup>,在加热过程中造成溶液黏稠不利于色素的溶解。因此,以后试验均采用完整的种子浸提。

2.2.2 提取剂的影响 由图 2 - B 可看出,以 60% 甲醇为提取剂时花色苷提取量最高,其次为 60% 乙醇,100% 乙醇的花色苷提取量最低,说明水能促进色素的溶解。由于甲醇对人体毒性较强,而乙醇无毒且易回收,因此一般选用一定浓度的乙醇溶液作为提取剂。

2.2.3 乙醇浓度的影响 由图 2 - C 可知,随着乙醇浓度的增大,花色苷提取量先升高后下降,当乙醇浓度达到 60% 时,花色苷提取量最高,当超过 60% 后,花色苷提取量便开始下降。由于水能渗透进植物细胞,因此适量的水有利于花色苷从细胞中渗出。由此可知,60% 乙醇溶液提取效果最好。

2.2.4 提取液 pH 值的影响 由图 2 - D 可知,当提取液 pH 值为 2 时花色苷提取量最高,之后随着 pH 值的升高,花色苷提取量开始下降。酸性溶剂能破坏细胞膜从而有利于水溶性色素的溶解,但过高的 pH 值会使溶液中花色苷的结构向无色的查耳酮转变,稳定性变差<sup>[17]</sup>。本试验结果表明,黑青稞花色苷溶液在 pH 值为 2 时比较稳定。

2.2.5 溶液酸化剂的影响 由图 2 - E 可知,经盐酸酸化的提取剂提取花色苷的提取量最高,其次为甲酸,柠檬酸的提取量最低,所以以盐酸作为下步试验的酸化剂。该结果与赵桃等的研究结果<sup>[12]</sup>不一致,可能是其他提取条件不一样或不同黑青稞材料的花色苷对各酸化剂的适应性不同所致。

2.2.6 提取温度的影响 由图 2 - F 可知,随着提取温度的升高,黑青稞花色苷提取量先升高后降低,在 50 ℃ 时提取量达到最大值,此时再提高温度,就会对花色苷的结构造成破坏,促进其降解,从而使提取量降低。

2.2.7 提取时间的影响 由图 2 - G 可知,随着提取时间的延长,花色苷提取量也在逐渐提高。提取时间从 0.5 h 升到 1 h 时,黑青稞花色苷提取量提高明显,而后再增加提取时间,提取量虽有提高但它们之间变化并不明显。过长的提取时间可能会促进杂质的渗出和花色苷受热降解,所以选择提取时间为 1 h。

2.2.8 液料比的影响 由图 2 - H 可知,随着液料比的增大,花色苷提取量先提高后变化平缓,10 mL : 1 g 液料比的提取量最高。当液料比超过 10 mL : 1 g 时,增加液料比对提取效果影响并不明显,并且过量的提取剂会增加浓缩的时间与成本。

### 2.3 数学模型与方差分析结果

根据单因素试验结果,选取提取温度(A)、液料比(B)、乙醇浓度(C)、pH 值(D)等 4 个对黑青稞花色苷提取量影响较大的因素为自变量,以提取量为响应值的响应面分析结果如表 2 所示。

使用 Design - Exper 8.06 软件对试验结果进行多元回归拟合,得到以提取量(Y)为目标函数,提取温度(A)、液料比(B)、乙醇浓度(C)、pH 值(D)为自变量的二次多元回归方程:

$$Y = -38.97643 + 0.86928A - 0.23019B + 0.76775C + 2.07251D - 4.58205 \times 10^{-3}AB - 6.58725 \times 10^{-4}AC - 0.067739AD + 0.024427BC - 0.078494BD + 0.040462CD - 5.44578 \times 10^{-3}A^2 - 0.038747B^2 - 9.09141 \times 10^{-3}C^2 - 0.79513D^2。$$

由表 3 可知,该模型  $P < 0.0001$ ,极显著。模型  $R^2$  为 0.9632 > 0.900,说明相关性良好,即该模型可以解释 96.32% 的数据。失拟项不显著,表明回归方程对试验数据拟合度高,可以使用该模型进行分析和预测。对模型中各回归系数进行显著性检验发现,A、D 因素对提取量的影响极显著,各因素对提取量的影响从大到小排序为 pH 值 > 提取温度 > 液料比 > 乙醇浓度,并且温度和 pH 值交互影响显著,液料比和乙醇浓度交互影响极显著。

### 2.4 响应面结果分析

响应曲面能直观反映各因素间的相互作用,由上述研究结果可知 AD、BC 交互作用分别为显著、极显著,使用 Design - Exper 8.06 软件得到相应的响应曲面和等高线,如图 3、图 4 所示。随着 pH 值、液料比、乙醇浓度这 3 个因素的增大或减小,对提取量的影响较大,并且 pH 值对提取量变化的影响极显著。

通过软件对方程进一步分析得出,黑青稞花色苷提取的最佳条件为提取温度 60 ℃,液料比 10.04 mL : 1 g,乙醇浓度

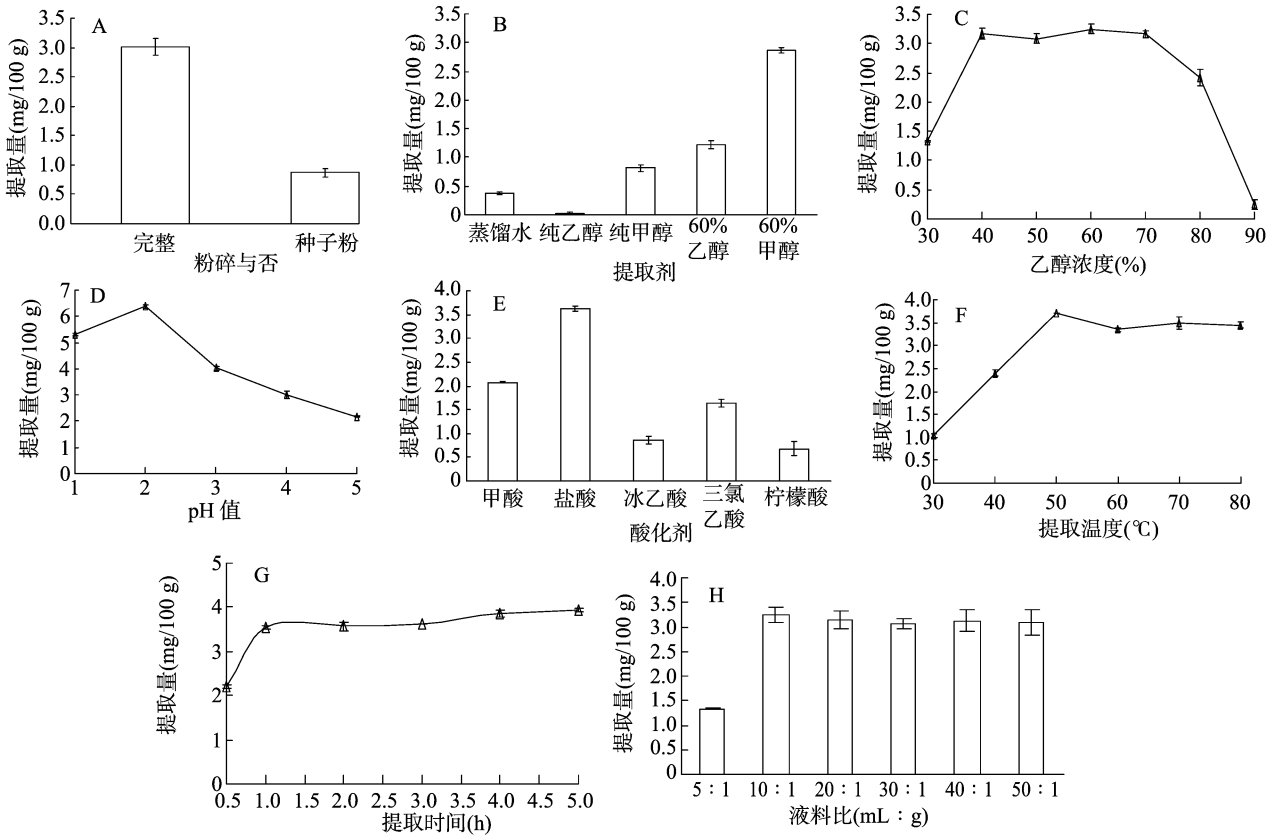


图2 花色苷提取的单因素试验结果

表 2 响应面试验设计与结果

编号	因素				提取量 (mg/100 g)
	A:提取 温度	B:液料比	C:乙醇 浓度	D:pH 值	
1	-1	1	0	0	3.86
2	0	-1	-1	0	5.60
3	1	0	1	0	5.73
4	-1	0	-1	0	2.71
5	0	0	0	0	6.31
6	0	0	0	0	6.12
7	-1	0	0	-1	6.52
8	0	-1	0	1	1.45
9	1	0	0	1	1.78
10	0	0	0	0	5.12
11	0	-1	1	0	2.12
12	-1	-1	0	0	3.04
13	0	0	-1	1	1.23
14	0	1	1	0	5.42
15	-1	0	1	0	2.97
16	0	0	0	0	6.01
17	1	-1	0	0	5.14
18	0	1	0	1	1.67
19	0	1	0	-1	7.28
20	0	0	1	1	1.09
21	0	1	-1	0	4.02
22	-1	0	0	1	1.43
23	1	0	0	-1	9.58
24	0	-1	0	-1	5.49
25	0	0	-1	-1	7.89
26	0	0	0	0	5.92
27	1	1	0	0	5.05
28	0	0	1	-1	6.13
29	1	0	-1	0	5.73

表 3 回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	134.23	14	9.59	26.16	<0.000 1 **
A:温度	12.95	1	12.59	35.33	<0.000 1 **
B:液料比	1.66	1	1.66	4.53	0.051 6
C:乙醇浓度	1.15	1	1.15	3.14	0.098 3
D:pH 值	97.62	1	97.62	266.32	<0.000 1 **
AB	0.21	1	0.21	0.57	0.461 7
AC	0.017	1	0.017	0.047	0.830 9
AD	1.84	1	1.84	5.01	0.042 0 *
BC	5.97	1	5.97	16.28	0.001 2 **
BD	0.62	1	0.62	1.68	0.215 8
CD	0.65	1	0.65	1.79	0.202 6
A <sup>2</sup>	1.92	1	1.92	5.25	0.038 0 *
B <sup>2</sup>	6.09	1	6.09	16.61	0.001 1 **
C <sup>2</sup>	5.36	1	5.36	14.63	0.001 9 **
D <sup>2</sup>	4.10	1	4.10	11.19	0.004 8 **
残差	5.13	14	0.37		
失拟项	4.31	10	0.43	2.10	0.247 9
纯误差	0.82	4	0.21		
总回归	139.36	28			

注：“\*”“\*\*”分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。

55.76%，pH 值 = 1，在此条件下提取量的预测值为 9.29 mg/100 g。

2.5 模型验证和超声波辅助提取

对根据模型得到的提取黑青稞花色苷的最佳条件进行验证，平行测定 3 次得到的实际提取量平均值为 9.68 mg/100 g，

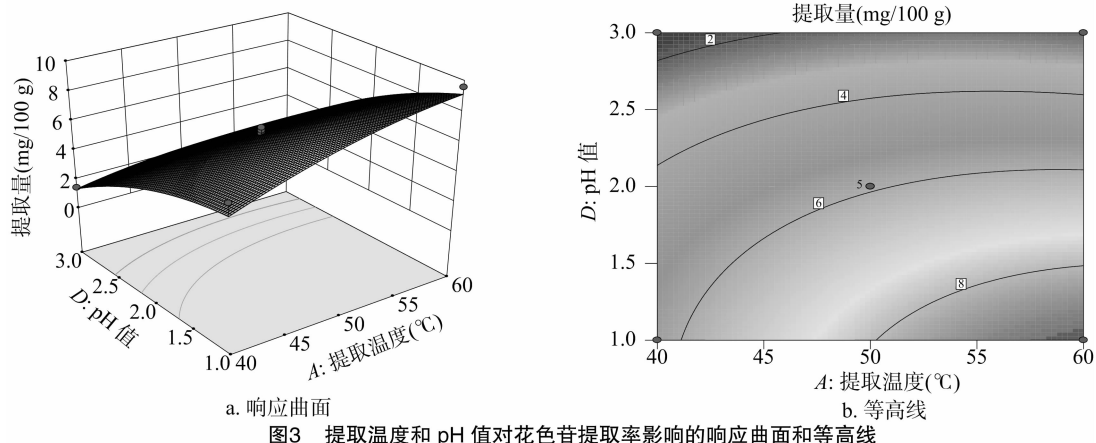


图3 提取温度和 pH 值对花色苷提取率影响的响应曲面和等高线

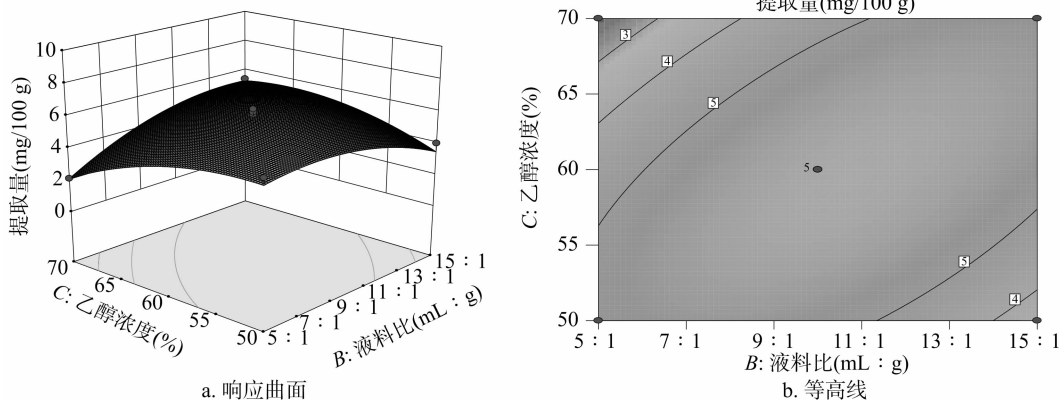


图4 乙醇浓度和液料比对花色苷提取率影响的响应曲面和等高线

与模型理论值 9.29 mg/100 g 很接近,表明该模型对黑青稞花色苷的提取具有一定实际应用价值。

在最优提取条件的基础上使用超声波辅助提取黑青稞总花色苷的结果如图 5 所示,可见随着超声时间的延长,黑青稞花色苷提取量也在不断提高。这是由于超声波增强了溶剂的水合与渗透作用,加速了花色苷的溶出。超声波处理 20 min 后花色苷提取量为 11.15 mg/100 g,不仅比浸提法提取 1 h 得到的提取量要高 1.47 mg/100 g,还缩短了时间,超声 40 min 后花色苷提取量为 14.04 mg/100 g,随后增加超声时间对提取量的变化并不明显,超声 80 min 时花色苷提取量为 15.03 mg/100 g,而且超声时间过长,也会促进糖、淀粉等其他杂质的渗出而造成溶液黏稠,增加了纯化的难度,因此超声时间以 40 min 为宜。

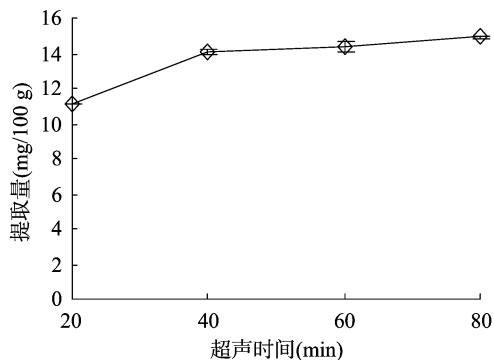


图5 超声波时间对黑青稞花色苷提取量的影响

## 2.6 黑青稞花色苷的抗氧化性

利用反应体系中的还原物质可将  $\text{Fe}^{3+}$  还原成  $\text{Fe}^{2+}$ ,从而使溶液颜色加深,因此吸光度越高,溶液中物质的还原能力越强。由图 6-a 可见,随着黑青稞花色苷、维生素 C 浓度的增大,吸光度也在增大,说明还原能力也越来越强。黑青稞花色苷浓度与吸光度之间的相关系数为 0.958,呈显著正相关,维生素 C 浓度与吸光度之间的相关系数为 0.982,呈极显著正相关,说明还原能力与它们的浓度之间关系密切,并且总体上黑青稞花色苷的还原能力不如维生素 C。

DPPH 由于自身特殊的分子结构,在 517 nm 下有强烈吸收峰,并且它的乙醇溶液肉眼观察下为紫色,抗氧化剂有供氢能力,可与 DPPH 的孤对电子配对使其原有结构破坏,颜色变浅,吸光度降低,抗氧化性也就越强。通常以  $\text{IC}_{50}$  (即清除率过半时抗氧化剂的浓度)来表示抗氧化能力,其值越小抗氧化能力越强。由图 6-b 可见,随着花色苷、维生素 C 浓度的增大,它们对 DPPH 自由基的清除能力也在逐渐增强。黑青稞花色苷、维生素 C 的浓度 ( $x$ , mg/mL) 与 DPPH 自由基清除率 ( $y$ , %) 的回归方程分别为  $y = 92.423x + 32.793$ 、 $y = 87.263x + 22.785$ ,  $r^2$  分别为 0.964 3、0.992 9,说明它们的线性关系良好。由此得出,花色苷、维生素 C 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 0.186、0.311 mg/mL,说明黑青稞花色苷清除 DPPH 能力要好于维生素 C,清除效果约为维生素 C 的 2 倍。

利用水杨酸与抗氧化剂相互竞争溶液中羟自由基的能力,使原本水杨酸与羟自由基生成的物质颜色变浅,因此可在 510 nm 下测定吸光度的变化来反映该物质的清除能力,通常

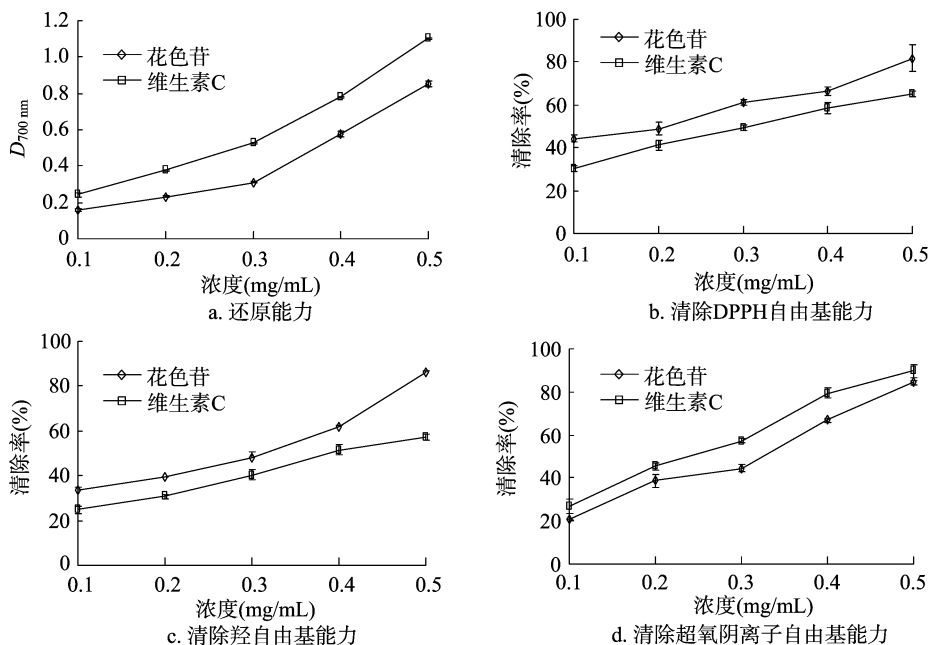


图6 黑青稞花色苷抗氧化能力

用  $IC_{50}$  表示。羟自由基是对生物体危害最大的自由基,可使红细胞失活,降解 DNA、细胞膜和多糖化合物,从而引起器官、组织病变<sup>[18]</sup>。由图 6-c 可知,黑青稞花色苷和维生素 C 都有一定的清除羟自由基能力,其清除率随浓度增大而提高,线性关系较好。同样得出黑青稞花色苷对羟自由基的  $IC_{50}$  为 0.268 mg/mL,维生素 C 对羟自由基的  $IC_{50}$  为 0.406 mg/mL,说明黑青稞花色苷的羟自由清除能力要好于维生素 C。

由于邻苯三酚碱性溶液在自然状态下几十秒后会产生超氧阴离子,并进一步产生具有颜色的中间物质,该物质的吸光度可随时间的延长而呈线性增加,当有抗氧化剂加入时可抑制该物质的生成而被用来测定抗氧化性,通常用  $IC_{50}$  表示。超氧阴离子自由基不仅自身具有一定破坏性,它还会继续反应产生其他氧自由基,对生物体的损坏作用进一步加大<sup>[19]</sup>。由图 6-d 可见,随着花色苷、维生素 C 浓度的增大,它们对超氧阴离子自由基的清除能力呈现递增的趋势,具有较好的线性关系。同样得出黑青稞花色苷对超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$  为 0.293 mg/mL,维生素 C 对超氧阴离子自由基的  $IC_{50}$  为 0.239 mg/mL,说明维生素 C 对超氧阴离子的清除效果要略好于黑青稞花色苷。

### 3 结论

因为众多提取条件都会对黑青稞花色苷提取量具有不同程度的影响,所以先根据单因素试验结果,选取对提取量影响较大的提取温度、乙醇浓度、液料比、pH 值 4 个因素,以提取量为响应值,使用响应面分析法优化提取条件,结果为提取温度 60 °C,液料比 10.04 mL : 1 g,乙醇浓度 55.76%,pH 值 = 1,在此条件下提取 1 h 的提取量的实测值为 9.68 mg/100 g;并且各因素对黑青稞花色苷提取量影响的大小顺序为 pH 值 > 提取温度 > 液料比 > 乙醇浓度。在此基础上超声波辅助提取 40 min,提取量为 14.04 mg/100 g,不仅缩短了提取时间还提高了提取量,是一种缩短提取时间的有效方法。

通过测定还原能力、清除 DPPH 自由基能力、清除羟自由基能力、清除超氧阴离子自由基能力发现,黑青稞花色苷具有一定的抗氧化活性,与维生素 C 相比,其清除 DPPH 自由基和清除羟自由基能力较强,但还原能力和清除超氧阴离子自由基能力没有维生素 C 强。它对自由基的清除能力大小依次为 DPPH 自由基 > 羟自由基 > 超氧阴离子自由基,  $IC_{50}$  依次为 0.186、0.268、0.293 mg/mL,是一种较好的天然抗氧化剂。

### 参考文献:

- [1] 谢宗万. 本草纲目药物彩色图鉴[M]. 1 版. 北京:人民卫生出版社,2001:221.
- [2] 单月琴. 青稞黑色素的鉴定[C]//第十四届全国感染药学术会议论文汇编,中国药学会医院药专业委员会,2012:357-366.
- [3] 高彦祥,许正虹. 食用天然色素安全性进展研究[J]. 食品科学,2005,26(增刊1):158-162.
- [4] 李莉蓉,张名位,刘邻渭,等. 三种黑色粮油作物种皮花色苷提取物抗氧化能力的稳定性比较[J]. 中国农业科学,2007,40(9):2045-2052.
- [5] 倪勤学,霍艳荣,陆国权. 花色苷保健功能的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(35):20025-20028.
- [6] 胡艳,郭红辉,王庆,等. 黑米花色苷提取物对高脂膳食诱导大鼠肥胖形成的影响[J]. 食品科学,2008,29(2):376-379.
- [7] 杨文雄,高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2005(2):68-71.
- [8] 张赛男,陈毅勇,宗俊,等. 响应面法优化微波提取玫瑰茄花色苷工艺研究[J]. 粮油食品科技,2015,23(6):57-61.
- [9] 陈建国,梁寒峭,李金霞,等. 响应曲面法优化黑青稞花青素的提取工艺[J]. 食品工业,2016,37(1):80-83.
- [10] 江春燕,严冬,谭进,等. 青稞的研究进展及应用现状[J]. 西藏科技,2010(2):14-16.
- [11] 孙荣琴,郭华春. 七个紫甘薯品种块根花色苷含量的比较[J]. 作物杂志,2008(6):56-59.

刁小琴,关海宁,李 杨,等. 草酸结合臭氧处理对休眠后期马铃薯生理指标的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):179-181.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.045

# 草酸结合臭氧处理对休眠后期马铃薯生理指标的影响

刁小琴,关海宁,李 杨,乔秀丽

(绥化学院食品与制药工程学院,黑龙江绥化 152061)

**摘要:**以休眠后期的马铃薯为试验材料,对其进行不同浓度的草酸结合臭氧处理,研究不同处理对马铃薯品质和生理特性的影响。结果表明,经过 25 mmol/L 草酸溶液结合 10 min 臭氧、50 mmol/L 草酸溶液结合 10 min 臭氧、只通 10 min 臭氧处理均可以不同程度地抑制马铃薯可溶性固形物含量、淀粉含量、抗坏血酸含量、总酚含量的下降并控制呼吸强度、多酚氧化酶活性、过氧化物酶活性的增加,与对照相比更能有效延缓马铃薯的衰老进程,使马铃薯保持了较好的贮藏品质。25 mmol/L 草酸溶液结合 10 min 臭氧处理的马铃薯的保鲜效果最好,可以很好地保持马铃薯的品质,延长马铃薯的货架期。

**关键词:**草酸;臭氧;休眠;马铃薯;品质;生理指标;衰老;保鲜;货架期

**中图分类号:**S532.01;TS205 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0179-03

马铃薯是重要粮食作物之一,采后仍是一个活体进行着新陈代谢<sup>[1]</sup>。马铃薯属于休眠类蔬菜,贮藏过程中会进入休眠状态,休眠后期即为萌芽期,在萌芽期间薯块呼吸旺盛,迅速发芽,组织中所含大量淀粉迅速转化,大量失水,造成表皮萎蔫,品质劣变,并产生龙葵素等有毒物质,进而失去食用价值<sup>[2]</sup>。草酸由生物体内代谢产生,是一种安全无毒的有机酸,草酸处理可以明显改善果实的果肉着色,推迟乙烯高峰期到来,降低果实呼吸速率,从而延缓果实成熟进程,延长果实的贮藏保鲜时间<sup>[3-4]</sup>。目前,草酸在果蔬贮藏保鲜中的作用已受到了人们极大的关注。臭氧( $O_3$ )氧化性强,对微生物可以起到很好的灭菌作用<sup>[5]</sup>,而且具有无残留的特点,因此被广泛应用于水处理、医疗灭菌、农业的采前防病以及采后保鲜等方面。本研究采用草酸结合臭氧处理休眠后期的马铃薯,通过测定多个生理指标的变化,探讨草酸结合臭氧对货架期马铃薯的保鲜效果,为休眠后期马铃薯的货架保鲜提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

马铃薯品种为绥化产黄麻子,块茎在农户地下窖贮藏 3 个月后运回实验室,于 2~4 °C 条件下贮藏备用。随机挑选大

小均匀、无机械伤、无发芽绿变的马铃薯为供试材料。

### 1.2 试剂与仪器

无水乙醇、浓盐酸、甲醇等均为分析纯。TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);冷冻离心机(上海楚柏实验设备有限公司)。数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);台式离心机(湖南星科科学仪器有限公司)。

### 1.3 试验方法

分别用 25 mmol/L 草酸溶液结合 10 min 臭氧、50 mmol/L 草酸溶液结合 10 min 臭氧和只通 10 min 臭氧 3 种方法处理马铃薯,未做处理的马铃薯作对照组。将处理组和对照组的块茎置于常温(20 °C)进行货架试验。每个处理 30 个块茎,每 2 d 测定 1 次生理生化指标,每次测定重复 3 次。

### 1.4 指标测定

可溶性固形物含量的测定采用手持折光仪法;淀粉含量的测定采用碘比色法<sup>[6]</sup>;抗坏血酸含量的测定用 2,6-二氯酚靛溶液滴定法<sup>[6]</sup>;总酚含量测定采用福林-酚比色法<sup>[7]</sup>;多酚氧化酶(PPO)活性用邻苯二酚比色法<sup>[8]</sup>测定,过氧化物酶(POD)活性用愈创木酚比色法<sup>[9]</sup>测定,1 个酶活性单位(U)定义为测定条件下 1 min 引起吸光度改变 0.01 所需的酶量[酶活性单位为 U/(g·min)];呼吸速率的测定采用气流法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对马铃薯可溶性固形物含量的影响

可溶性固形物含量不仅影响果实的口感风味,还是呼吸

收稿日期:2016-05-13

基金项目:黑龙江省绥化市科技计划(编号:SHKJ2015-002)。

作者简介:刁小琴(1979—),女,山西怀仁人,博士,副教授,研究方向为农畜产品加工与贮藏。E-mail:diaoxiaoqing172@163.com。

[12]赵 桃,马 林,李嘉佳,等. 黑青稞花色素的提取工艺[J]. 食品研究与开发,2010,31(9):228-233.

[13]莫开菊,柳 圣,程 超,等. 生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2006,27(9):110-115.

[14]朱 璐,董 福,冯叙桥,等. 浸提法、超声波法和微波法提取紫薯花色苷的抗氧化性比较研究[J]. 食品科学,2015,36(19):83-88.

[15]资名扬,王 琴,温其标,等. 紫甘薯花色苷光谱特性及抗氧化性的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(11):1279-1281.

[16]孙建霞,张 燕,孙志健,等. 花色苷的资源分布以及定性定量分析方法研究进展[J]. 食品科学,2009,30(5):263-268.

[17]王 锋,邓洁红,谭兴和,等. 花色苷及其共色作用研究进展[J]. 食品科学,2008,29(2):472-476.

[18]肖军霞,黄国清,仇宏伟,等. 红树莓花色苷的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品科学,2011,32(8):15-18.

[19]刘占才,牛俊英. 超氧阴离子自由基对生物体的作用机理研究[J]. 焦作教育学院学报(综合版),2002,18(4):48-51.