

酸法提取青稞麸皮结合酚工艺优化

徐 菲^{1,2}, 杨希娟^{2,3}, 党 斌^{2,3*}, 赵亚东^{1,2}, 吴昆仑³, 迟德钊³

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 西宁 810016;
3. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016)

摘 要: 为了提高青稞的附加利用价值, 该文以青稞麸皮为研究对象, 考察了提取试剂、酸质量分数、萃取 pH 值、料液比和提取温度对多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力的影响。采用中心组合设计优化其结合酚提取工艺。结果表明, 青稞结合酚提取最优工艺条件为: 提取试剂为硫酸, 酸质量分数为 11.10%, 水料比为 1:17 g/mL, 提取温度为 75℃, pH 值不作处理, 此条件下提取得到的结合酚质量分数达 224.33 mg/(100 g), DPPH·自由基清除能力达 9 919.28 $\mu\text{mol}/(100 \text{ g})$, 与预测值多酚质量分数 243.80 mg/(100 g), 其 DPPH·自由基清除能力 9 087.02 $\mu\text{mol}/(100 \text{ g})$ 基本一致。高效液相色谱法检测到最优工艺下所得青稞结合酚中含有 8 种酚酸及 8 种黄酮类物质, 总量达 325.104 mg/(100 g)。研究结果为全面评价青稞结合酚含量及青稞麸皮的高效利用提供科学依据。

关键词: 提取; 工艺; 优化; 青稞麸皮; 结合酚; 中心组合法

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.17.040

中图分类号: X712

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-17-0301-08

徐 菲, 杨希娟, 党 斌, 赵亚东, 吴昆仑, 迟德钊. 酸法提取青稞麸皮结合酚工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(17): 301—308. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.17.040 http://www.tcsae.org

Xu Fei, Yang Xijuan, Dang Bin, Zhao Yadong, Wu Kunlun, Chi Dezhaoh. Optimization of combined phenols extraction with sulfuric acid from hulless barley bran[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(17): 301—308. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.17.040 http://www.tcsae.org

0 引 言

青稞 (*Hordeum vulgare L. var. nudum Hook. f.*) 属禾本科大麦属, 在植物学上属于栽培大麦的变种, 因其籽粒内外稃与颖果分离, 籽粒裸露, 故称裸大麦^[1]。青稞是青藏高原地区一年一熟的高寒河谷种植的标志性作物, 是藏区农牧民的主要口粮, 是青藏高原最具特色的农作物, 年总产量约 100 万 t^[2], 占青藏高原地区粮食作物面积的 60%以上和粮食总产量的 58%~60%^[3]。青稞以其“三高两低” (高蛋白、高纤维、高维生素、低糖、低脂) 的独特营养功能特性迎合了当前追求营养、健康的消费需求, 备受消费者青睐^[4]。随着青稞产业的发展, 青稞食品开发过程中所用的青稞面粉原料需求增大, 而且青稞出粉率仅为 50%左右, 因此在青稞制粉过程中产生了大量麸皮。青稞麸皮由青稞种皮、糊粉层、少量胚和胚乳组成, 富含多种酚类化合物, 如酚酸、黄酮、花青素等。多酚作为重要的抗氧化物质, 可对人类的心血管疾病、糖尿病、肥胖和肿瘤等起到突出的防治作用, 且各种来

源的多酚物质已广泛应用于食品、医药、化妆品等行业^[5]。但目前青稞麸皮仅作为饲料利用或废弃, 造成很大的浪费。因此, 探索从青稞麸皮中提取多酚的方法, 对提高麸皮的综合利用和附加值具有重要意义^[6]。

目前, 关于谷物酚类物质的提取方法较多, 但大多仅限于游离态, 而酚类物质在谷物中有游离态、可溶性结合态和不溶性结合态 3 种形式, 且大部分都是结合态, 80%以上存在于麸皮和胚乳中^[7-9]。结合酚的提取方法主要有碱法多采用氢氧化钠溶液, 以及酸法多采用盐酸、硫酸溶液, 其中碱法最为常用, 但苏东晓^[10]发现酸法和碱法水解得到的荔枝结合酚的种类与含量明显不同, 并且前者的总结合酚含量以及抗氧化能力均比后者高。Arranze 等^[11]以小麦为原料提取结合酚也得到类似结论。而关于青稞中结合酚的不同提取方法比较未见相关报道, 因此, 本文以青稞麸皮为原料, 通过比较不同方法对青稞结合酚的提取效果, 确定其提取溶剂并优化提取工艺参数, 以期得到适合青稞结合酚的提取方法, 为全面评价青稞结合酚含量及青稞麸皮的高效利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

原料: 昆仑 15 号麸皮 (其中水分 10.12%, 灰分 0.75%, 脂肪 2.45%, 粗纤维 4.54%, 淀粉 38.52%, 蛋白质 11.86%, β -葡聚糖 4.8%) 由青海省农林科学院作物育种栽培研究所提供, 样品 40℃干燥至含水率 10.12%后粉碎过 60 目筛, 筛上物备用。

收稿日期: 2016-03-07 修订日期: 2016-05-31

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-05); 不同粒色青稞品质分析及酚类物质组成与抗氧化活性研究 (2014-04)。

作者简介: 徐 菲, 女 (满族), 河北保定人, 主要从事大麦产后加工研究。西宁 青海大学农牧学院, 810016。Email:

*通信作者: 党 斌, 男, 陕西山阳人, 副研究员, 主要从事杂粮加工与利用方面研究。西宁 青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 810016。

Email: dangbin811@tom.com。

试剂：丙酮、正己烷、甲醇、氢氧化钠、盐酸、硫酸、乙酸乙酯、碳酸钠均为市售分析纯；冰醋酸、乙腈均为色谱纯，购自天津市凯通化学试剂有限公司；福林酚为优级纯，购自北京索莱宝科技有限公司；DPPH·自由基、水溶性维生素 E、没食子酸、根皮酚、原儿茶酸、绿原酸、儿茶酸、2,4-二羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、4-香豆酸、芦丁、阿魏酸、水杨酸、柚皮苷、橙皮苷、苯甲酸、邻香豆酸、杨梅素、槲皮素、藜芦酸、柚皮素、山柰酚标准品均为试剂级，购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

FW-100 高速万能粉碎机，天津市泰斯特仪器有限公司；AL204 万分之一分析天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；KQ-500DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声波仪器有限公司；TGL-20M 高速台式冷冻离心机，上海沪粤明科学仪器有限公司；DKB-600B 型电热恒温水箱，上海一恒科学仪器有限公司；QL-901 漩涡混合器，江苏海门市麒麟医用仪器厂；Retavapor R-215 旋转蒸发器，瑞士布奇有限公司；N4S 紫外可见分光光度计，上海仪电分析仪器有限公司；Waters 600E-2487 液相色谱仪，美国沃特世科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 青稞结合酚提取工艺

称取 1 g 青稞麸皮，加入 25 mL 体积分数为 80% 的丙酮 20 °C 下 500 W 超声波处理 30 min，离心（4 000 r/min，10 min），弃去上清液，残渣用同样方法提取 2 次。向残渣中加入 20 mL 正己烷，振荡后离心（2 000 r/min，5 min）弃去上清液，向沉淀物中加入 20 mL 提取试剂，70 °C 下水浴 1 h，将 pH 值调至中性，加入 20 mL 乙酸乙酯萃取 5 次，离心（2 000 r/min，5 min），合并乙酸乙酯萃取相，在 45 °C 条件下旋转蒸发至浸膏状，残余物用甲醇定容至 10 mL，0.45 μm 有机膜过滤，得青稞结合酚提取液，-20 °C 避光保存^[12-13]。

1.3.2 不同试剂对青稞结合酚提取的比较

按照上述工艺，其余参数固定，分别使用质量分数为 10% 的氢氧化钠溶液、10% 的盐酸溶液、10% 的硫酸溶液 3 种不同的试剂提取青稞结合酚，比较不同试剂对提取液中多酚质量分数以及 DPPH·自由基清除能力的影响^[9]。

1.3.3 单因素试验

以硫酸溶液为提取试剂，各因素基本条件定为：酸质量分数为 10%，料液比 1:20 g/mL，提取温度 70 °C，萃取 pH 值为中性。改变其中一个条件，分别考察其余条件对提取液中多酚质量分数以及 DPPH·自由基清除能力的影响。各因素试验范围为酸质量分数：10%、15%、20%、25%；料液比：1:5、1:10、1:15、1:20 g/mL；提取温度：60、70、80、90 °C；萃取 pH 值：不作处理、调至中性。

1.3.4 中心组合优化试验

在单因素试验基础上，采用 Box-Behnken 法以料液比（A）、酸质量分数（B）、提取温度（C）为自变量，提取液多酚质量分数（Y₁）、DPPH·自由基清除能力（Y₂）为响应值进行三因素三水平的中心组合试验（表 1）。

表 1 中心组合试验因素水平表

水平编码 Code level	料液比 Solid-liquid ratio A/(g·mL ⁻¹)	酸质量分数 Acid concentration B/%	提取温度 Extraction temperature C/°C
+1	1:13	8	65
0	1:15	10	70
-1	1:17	12	75

1.3.5 青稞多酚组成及含量分析

采用高效液相色谱（HPLC）法对最优工艺条件下以及常规碱法所得的提取液进行分析，色谱条件为：YMC-Pack OD SAM-303 色谱柱，流动相梯度洗脱，流速 0.8 mL/min，检测波长 280 nm，进样量 20 μL，运行时间 60 min^[14-15]。

1.3.6 多酚质量分数测定

1) 标准曲线绘制

准确称取 10 mg 没食子酸用蒸馏水定容至 10 mL 得到 stock I 标准液，准确吸取 2.5 mL stock I 用蒸馏水定容至 25 mL 得到 stock II 标准液。准确吸取 stock II 标准液 0、1、2、3、4、5 mL，stock I 标准液 0.75、1、1.5 mL，用蒸馏水定容至 5 mL，得到质量浓度梯度为 0、20、40、60、80、100、150、200、300 μg/mL 的标准使用液。分别吸取上述标准使用液 125 μL 于试管中，再加入 500 μL 蒸馏水和 125 μL 福林酚，摇匀，反应 6 min 后加入 1.25 mL 质量分数为 7% Na₂CO₃ 溶液再加入 1 mL 蒸馏水，20 °C 下避光放置 1.5 h 后，以零管为空白调零，在波长 760 nm 下测定吸光度，重复 2 次^[16]。

以没食子酸浓度为横坐标，A₇₆₀ 值为纵坐标绘制标准曲线，回归方程为 $Y=0.0042X+0.0124$ （0~300 μg/mL， $R^2=0.9996$ ）。多酚质量分数以每 100 g 提取物（干基）中所含相当于没食子酸的量（mg/(100 g)）表示，计算公式为多酚质量分数（mg/(100g)）=[(Y₁·V₁)/(1000·M₁)]×100。式中 Y₁ 为测定的多酚质量浓度，μg/mL；V₁ 为提取液的总体积，mL；M₁ 为样品干质量，g。

2) 样品多酚质量分数测定

吸取样品提取液 125 μL 于试管中，再加入 500 μL 蒸馏水和 125 μL 福林酚，摇匀，反应 6 min 后加入 1.25 mL 7% Na₂CO₃ 溶液，再加入 1 mL 蒸馏水，室温下避光放置 1.5 h 后，以甲醇代替样品提取液为空白调零，在波长 760 nm 下测定吸光度，重复 2 次。根据标准曲线计算出样品中多酚质量分数，以 mg/(100g) 表示。

1.3.7 DPPH·自由基清除能力测定

1) 标准曲线绘制

准确称取水溶性维生素 E（Trolox）25.03 mg，用甲醇溶解后定容至 100 mL 得到浓度为 1000 μmol/L 的标准储备液，继续稀释此标准储备液，得到浓度为 20、40、60、80、100、120、140 μmol/L 的 Trolox 标准使用液备用。分别吸取上述标准使用液 1 mL 于试管中，再加入 4.5 mL 0.1 mmol/L DPPH·甲醇溶液，充分摇匀后避光反应 30 min，以甲醇代替标准使用液为空白，在波长 517 nm 下测定吸光度，重复 3 次^[17-19]。

以水溶性维生素 E 浓度为横坐标, A_{517} 值为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = -0.0042X + 0.0233$ ($0 \sim 140 \mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.9928$)。DPPH· 自由基清除能力以每 100g 提取物 (干基) 中所含相当于水溶性维生素 E 的量 ($\mu\text{mol}/(100 \text{ g})$) 表示, 计算公式为 $\text{DPPH}\cdot \text{自由基清除能力} (\mu\text{mol}/(100 \text{ g})) = [(Y_2 \cdot V_2 \cdot N) / (1000 \cdot M_2)] \times 100$ 。

式中 Y_2 为测定的 DPPH· 自由基清除能力, $\mu\text{mol/L}$; V_2 为提取液的总体积, mL; N 为稀释倍数; M_2 为样品干质量, g。

2) 样品 DPPH· 自由基清除能力测定

吸取稀释 50 倍的样品提取液 1 mL 于试管中, 再加入 4.5 mL 0.1 mmol/L DPPH· 甲醇溶液, 充分摇匀后避光反应 30min, 以甲醇代替样品提取液调零, 在波长 517 nm 下测定吸光度, 重复测定两次。根据标准曲线计算出样品提取液清除 DPPH· 自由基能力, 以 $\mu\text{mol}/(100 \text{ g})$ 表示。

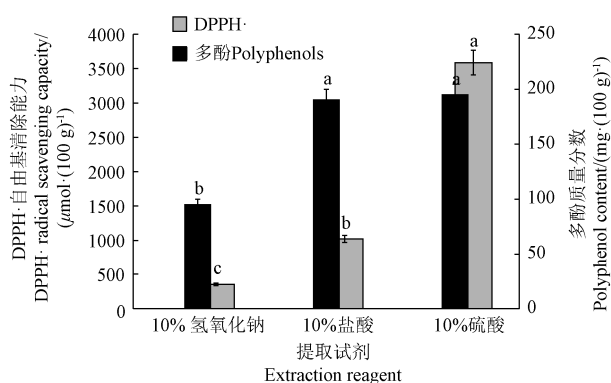
1.4 数据处理方法

部分试验数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示, 单因素试验数据处理使用 excel 软件进行, 差异显著性分析使用 DPS7.05 软件进行, 中心组合法试验数据处理使用 DesignExpert 8.0.5 软件进行。

2 结果与分析

2.1 不同试剂对青稞结合酚提取的比较结果

由图 1 可以看出, 硫酸水解得到的多酚质量分数在 5% 显著水平上高于盐酸及氢氧化钠, DPPH· 自由基清除能力在 5% 显著水平上同样高于氢氧化钠, 这与苏东晓^[10]以及 Arranze 等^[11]的结论一致, 即强硫酸水解更容易释放出麸皮内部和与细胞壁成分 (如膳食纤维、蛋白质) 相结合的酚酸。但 Kim 等^[20]采用 HPLC 法比较了不同水解法对酚酸提取效果的影响, 认为碱水解法释放的酚酸量最多, 且碱水解所得酚酸的抗氧化能力明显高于酸法。这可能是由于所采用原料以及酸解和碱解具体条件的不同造成。因此本试验选择硫酸作为提取试剂。



注: 固定条件为料液比 1:20 g/mL, 提取温度 70 °C, 萃取 pH 值调至中性。同一指标上标不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Note: Fixed conditions were solid-liquid ratio 1:20 g/mL, extraction temperature 70 °C, extraction pH value adjusted to neutral. Different letters represent the difference in 5% significance level.

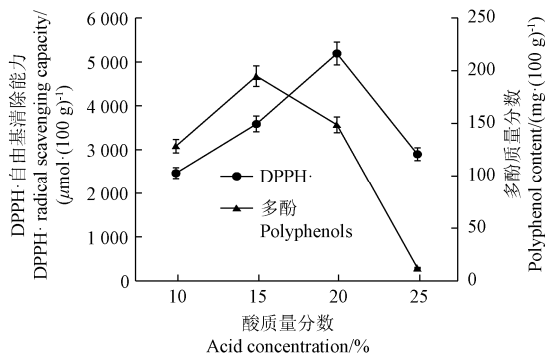
图 1 提取试剂对多酚质量分数和 DPPH· 自由基清除能力的影响

Fig.1 Effects of extraction solvents on polyphenol content and DPPH· radical scavenging capacity

2.2 单因素试验结果

2.2.1 酸质量分数的确定

由图 2 可以看出, 随着硫酸浓度的提高多酚质量分数以及 DPPH· 自由基清除能力先增后减, 分别在 15% 和 20% 处达到最高点, 但在 20% 处多酚质量分数已经出现下降, 可能原因是高温条件下强酸会使阿魏酸、对香豆酸等多酚发生分解^[21]从而使总酚含量反而降低。因此选择 15% 为较佳酸质量分数。



注: 固定条件为提取试剂硫酸, 料液比 1:20 g/mL, 提取温度 70 °C, 萃取 pH 值调至中性。

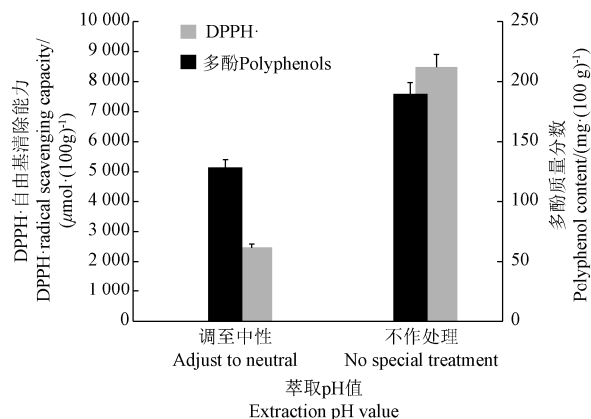
Note: Fixed conditions were extraction reagent H_2SO_4 , solid-liquid ratio 1:20 g/mL, extraction temperature 70 °C, extraction pH value adjusted to neutral.

图 2 酸质量分数对多酚质量分数和 DPPH· 自由基清除能力的影响

Fig.2 Effects of acid concentration on polyphenol content and DPPH· radical scavenging capacity

2.2.2 萃取 pH 值的确定

由图 3 可以看出, 硫酸水解后继续保持酸性环境下用乙酸乙酯萃取得到的多酚质量分数以及 DPPH· 自由基清除能力均高于将 pH 值调至中性后再进行萃取。可能的原因是酸解之后继续保持酸性环境有利于醚键与酯键断裂反应的进一步进行从而释放出更多的多酚^[22]。因此酸解之后不再调节 pH 值直接进行萃取。



注: 固定条件为提取试剂硫酸, 酸质量分数 15%, 料液比 1:20 g/mL, 提取温度 70 °C。

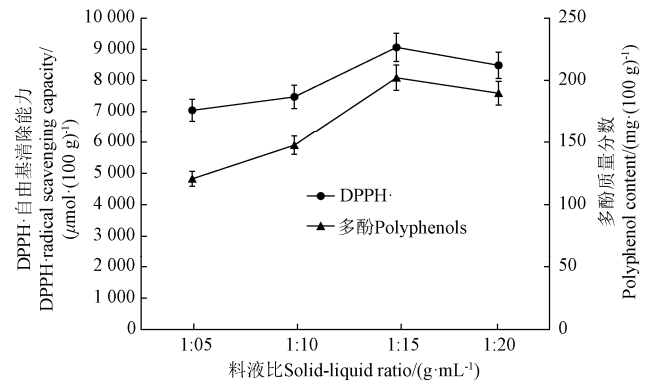
Note: Fixed conditions were extraction reagent H_2SO_4 , acid concentration 15%, solid-liquid ratio 1:20 g/mL, extraction temperature 70 °C.

图 3 萃取 pH 值对多酚质量分数和 DPPH· 自由基清除能力的影响

Fig.3 Effects of extraction pH value on polyphenol content and DPPH· radical scavenging capacity

2.2.3 料液比的确定

由图 4 可以看出, 多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力呈现出相同的趋势, 随着料液比的增大先上升后下降, 在 1:15 g/mL 处达到最大值。可能的原因是随着酸溶液的增多结合酚更多的被释放, 但酸溶液超过一定范围后会造成某些多酚降解而使总酚含量下降。因此选择 1:15g/mL 为较佳料液比。

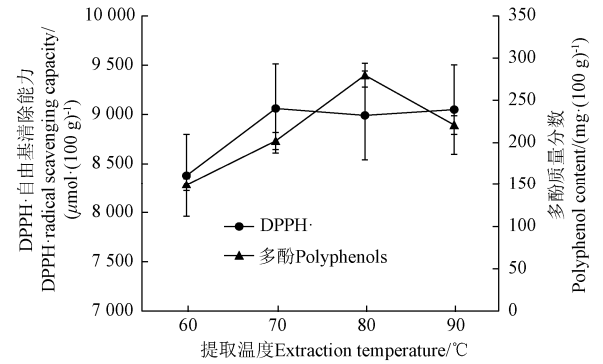


注: 固定条件为提取试剂硫酸, 酸质量分数 15%, 提取温度 70 ℃, 萃取 pH 值不做处理。
Note: Fixed conditions were extraction reagent H₂SO₄, acid concentration 15%, extraction temperature 70 ℃, extraction pH value no special treatment.

图 4 料液比对多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力的影响
Fig.4 Effects of solid-liquid ratio on polyphenol content and DPPH· radical scavenging capacity

2.2.4 提取温度的确定

由图 5 可以看出, 随着温度的升高, 多酚质量分数先增后减, 在 80 ℃达到最大, 而 DPPH·自由基清除能力同样呈现上升趋势在 70 ℃达到最大后趋于稳定但有下降趋势。80 ℃提取所得多酚总量较多但其抗氧化能力稍有降低, 并且考虑到高温强酸会分解部分多酚以及增加能耗等实际操作问题, 选择 70 ℃为较佳提取温度。



注: 固定条件为提取试剂硫酸, 酸质量分数 15%, 料液比 1:15 g/mL, 萃取 pH 值不做处理。
Note: Fixed conditions were extraction reagent H₂SO₄, acid concentration 15%, solid-liquid ratio 1:15 g/mL, extraction pH value no special treatment.

图 5 提取温度对多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力的影响

Fig.5 Effects of temperature on polyphenol content and DPPH· radical scavenging capacity

2.3 中心组合试验结果

2.3.1 回归模型的建立及显著性检验

分别以多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力为指标, 对表 2 数据进行二次多元回归拟合得到青稞结合酚提取工艺的数学模型为(剔除不显著项):

$$Y_3=187.48+14.47A+20.36B+38.80C+9.90AC-16.04B^2-8.24C^2$$

$$Y_4=8324.70+340.75A+325.00B+410.96C-156.98BC-150.02A^2-273.92B^2。$$

式中 Y₃ 为多酚质量分数, mg/(100g); Y₄ 为 DPPH·自由基清除能力, μmol/(100g)。A、B、C 分别为料液比, g/mL; 酸质量分数, %; 提取温度, ℃。两个回归模型经方差分析进行显著性及拟合度检验如下(表 3、表 4)。

表 2 中心组合试验结果
Table 2 Results of central composite experiments

序号 Number	料液比 Solid-liquid ratio <i>A</i>	酸质量分数 Acid concentration <i>B</i>	提取温度 Extraction temperature <i>C</i>	多酚质量分数 Polyphenol content/ (mg·(100 g) ⁻¹)	DPPH·自由基清除能力 DPPH· radical scavenging capacity/ (μmol·(100 g) ⁻¹)
1	1	0	1	238.40	9060.9
2	0	1	1	221.26	8641.8
3	0	0	0	195.47	8466.7
4	1	-1	0	158.61	7802.63
5	0	0	0	185.70	8251.61
6	0	0	0	180.29	8234.35
7	0	-1	-1	104.30	7290.19
8	1	1	0	201.50	8688.22
9	-1	0	1	187.56	8339.64
10	0	-1	1	183.24	8341.19
11	0	0	0	184.29	8455.92
12	-1	0	-1	130.27	7480.45
13	1	0	-1	141.49	8106.5
14	0	0	0	191.63	8214.92
15	-1	-1	0	132.03	7313.45
16	-1	1	0	174.36	7798.74
17	0	1	-1	143.986	8218.73

表 3 多酚质量分数回归模型方差分析表

Table 3 Variance analysis of regression model of polyphenol content

误差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P Value	显著性 Significance
A	1 675.491	1	1 675.491	72.29185	<0.0001	**
B	3 317.374	1	3 317.374	143.1336	<0.0001	**
C	12 045.31	1	12 045.31	519.7148	<0.0001	**
AB	0.076709	1	0.076709	0.00331	0.9557	
AC	392.3308	1	392.3308	16.92776	0.0045	*
BC	0.692273	1	0.692273	0.029869	0.8677	
A ²	97.43272	1	97.43272	4.203896	0.0795	
B ²	1 083.445	1	1 083.445	46.74703	0.0002	*
C ²	285.7315	1	285.7315	12.32836	0.0098	*
模型 Model	19 023.66	9	2 113.74	91.2008	<0.0001	**
残差 Residual	162.2374	7	23.17677			
失拟项 Lack of fit	16.24817	3	5.416058	0.148396	0.9255	Not significant
纯误差 Pure error	145.9892	4	36.4973			
总和 Total sum	19 185.89	16				

注：**差异极显著 ($P<0.01$)，*差异显著 ($P<0.05$)。
Note: ** Significant at 1% level, * Significant at 5% level.

表 4 DPPH·自由基清除能力回归模型方差分析表

Table 4 Variance analysis of regression model of DPPH· radical scavenging capacity

误差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F Value	P 值 P Value	显著性 Significance
A	928 864.1	1	928 864.1	81.29327	<0.0001	**
B	845 019.5	1	845 019.5	73.95528	<0.0001	**
C	1 351 089	1	1 351 089	118.2459	<0.0001	**
AB	40 060.02	1	40 060.02	3.506014	0.1033	
AC	2 266.236	1	2 266.236	0.198339	0.6695	
BC	98 574.02	1	98 574.02	8.627102	0.0218	*
A ²	94 765.27	1	94 765.27	8.293763	0.0237	*
B ²	315 919.1	1	315 919.1	27.64893	0.0012	*
C ²	21 945.76	1	21 945.76	1.920671	0.2083	
模型 Model	3 705 983	9	411 775.9	36.03822	<0.0001	**
残差 Residual	79 982.61	7	11 426.09			
失拟项 Lack of fit	17 043.01	3	5 681.002	0.361045	0.7855	Not significant
纯误差 Pure error	62 939.61	4	15 734.9			
总和 Total sum	3 785 965	16				

注：**差异极显著 ($P<0.01$)，*差异显著 ($P<0.05$)。
Note: ** Significant at 1% level, * Significant at 5% level.

由表 3 可知，多酚质量分数的回归模型 $P<0.01$ 达到极显著水平，失拟项 $P=0.9255$ 不显著，决定系数 $R^2=0.9807$ ，说明该方程与实际情况相符，可以充分的反映出各因素与响应值的真实关系。料液比 (A)、酸质量分数 (B) 和提取温度 (C) 均对多酚质量分数有显著影响，其中酸质量分数 (B) 和提取温度 (C) 与多酚质量分数还有明显的二次关系，并且料液比 (A) 与提取温度

存 (C) 在显著的交互作用。

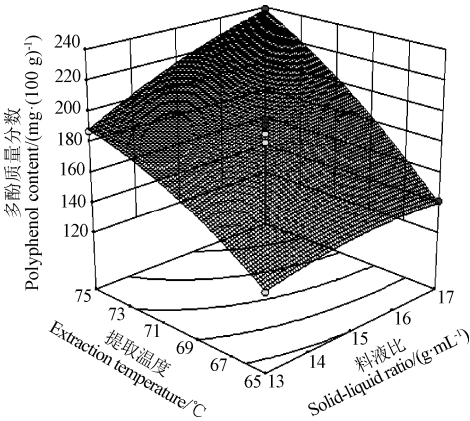
由表 4 可知，DPPH·自由基清除能力的回归模型 $P<0.01$ 达到极显著水平，失拟项 $P=0.7855$ 不显著，决定系数 $R^2=0.9517$ ，说明该方程与实际情况相符，可以充分的反映出各因素与响应值的真实关系。料液比 (A)、酸质量分数 (B) 和提取温度 (C) 均对 DPPH·自由基清除能力有显著影响，其中料液比 (A) 和酸质量分数 (B) 与 DPPH·自由基清除能力还有明显的二次关系，并且酸质量分数 (B) 与提取温度 (C) 存在显著的交互作用。

2.3.2 主效应分析

由回归方程可知，各因素对多酚质量分数的影响大小依次为： $C>B>A$ ，对 DPPH·自由基清除能力的影响大小依次为： $C>A>B$ 。可见提取温度对所得青稞多酚提取液中多酚质量分数以及 DPPH·自由基清除能力影响均为最大。

2.3.3 交互作用分析

由回归分析可得，以多酚质量分数为响应值时，料液比与提取温度存在显著的交互作用，其响应面图如图 6 所示。以 DPPH·自由基清除能力为响应值时，酸质量分数与提取温度存在显著的交互作用，其响应面图如图 7 所示。



注：酸质量分数为 10%。
Note: Acid concentration was 10%.

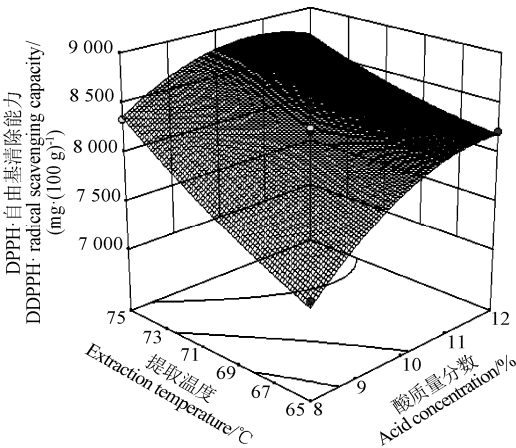
图 6 料液比与提取温度交互作用对多酚质量分数影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot for alternating effects of solid-liquid ratio and temperature on polyphenol content

由图 6 可以看出，随着料液比的增加，多酚质量分数缓慢上升；随着提取温度的提高，多酚质量分数持续上升，大于 73 °C 以后趋于平缓。且提取温度曲面较陡，说明提取温度对多酚质量分数增加的影响较料液比显著。因为温度以及酸含量的增大有利于酯键和醚键的断裂使与蛋白质、多糖等结合的多酚得到更多释放，但是强酸在高温下会使部分肉桂酸衍生物、阿魏酸、对香豆酸、咖啡酸等发生分解，因此当酸含量以及温度达到一定程度之后，结合酚总量增多趋势放缓甚至下降。

由图 7 可以看出，随着酸质量分数的增加，DPPH·自由基清除能力呈现先增后减的趋势，存在极值。这是由于酸质量分数的增大有利于多酚的释放，提取液抗氧化

能力随之增强,但当体系中的酸超过一定浓度后会抑制多酚酚羟基的电离,使其提供氢质子与 DPPH·自由基孤对电子配对的能力下降,因此抗氧化能力反而降低。随着提取温度的提高,DPPH·自由基清除能力则一直呈现上升趋势,大于 73℃以后趋于平缓。这是由于温度升高同样有利于多酚释放并且促进酚羟基电离,提取液抗氧化能力增强,但温度升高到一定程度后电离程度趋于完全,抗氧化能力随之趋于稳定。可得,在提取温度为 71~73℃,酸质量分数为 10%~11%的范围内 DPPH·自由基清除能力最强。且提取温度曲面较陡,说明提取温度对 DPPH·自由基清除能力的增加的影响较酸质量分数显著。



注:料液比为 1:15 g/mL。
Note: Solid-liquid ratio was 1:15 g/mL.

图 7 酸浓度与提取温度交互作用对 DPPH·自由基清除能力影响的响应面图

Fig.7 Response surface plot for alternating effects of acid concentration and temperature on DPPH· radical scavenging capacity

2. 3. 4 最优工艺验证试验

通过 Design Expert 8.0.5 软件的优化功能,在回归模型的基础上得出青稞结合酚提取最优工艺参数为: $A=1.0$, $B=0.55$, $C=1.0$, $Y_3=243.80\text{ mg}/(100\text{ g})$, $Y_4=9087.02\text{ }\mu\text{mol}/(100\text{ g})$ 。即当料液比为 1:17 g/mL,酸质量分数为 11.10%,提取温度为 75℃时,提取所得多酚质量分数理论最大值可达 243.80 mg/(100 g),其 DPPH·自由基清除能力可达 9087.02 $\mu\text{mol}/(100\text{ g})$ 。在此工艺条件下进行验证试验,实际所得多酚质量分数为 224.33 mg/(100 g),其 DPPH·自由基清除能力为 9919.28 $\mu\text{mol}/(100\text{ g})$,与预测值的绝对误差为 0.08,基本符合,说明本优化工艺具有可行性。

Kafui Kwami Adom 等^[16]对常见谷物中多酚含量进行测定,表明玉米结合酚为 230.012 mg/(100 g),大米结合酚为 59.555 mg/(100 g),小麦结合酚为 104.601 mg/(100 g),燕麦结合酚 81.047 mg/(100 g),可以看出,酸法最优工艺下所得青稞结合酚提取液中总酚含量与玉米相当,并且高于其余几种常见谷物,具有明显优势。

2. 4 青稞多酚组成及含量分析结果

HPLC 法检测了酸法最优工艺下与碱法(见 1.3.2)提取得到的青稞结合酚提取液中多酚的组成及含量(表

5)。酸法提取的结合酚中共检测到 16 种酚类物质,总量达 325.104 mg/(100 g),而常规碱法中只检测到 15 种酚类物质,总量仅为 115.382 mg/(100 g),其中 2,4-二羟基苯甲酸、芦丁、阿魏酸、水杨酸、柚皮苷、橙皮苷、苯甲酸、邻香豆酸、杨梅素、槲皮素、藜芦酸、柚皮素、山柰酚在两种提取液中均检测到,没食子酸、丁香酸、4-香豆酸仅在酸法提取液中检测到,儿茶酸、香草酸仅在碱法提取液中检测到。酸法提取液中丁香酸、苯甲酸、没食子酸含量丰富,碱法提取液中柚皮苷、芦丁等黄酮类物质含量丰富。由于醚键对酸溶液较敏感,而酯键对碱溶液较敏感,因此酸水解更有利于释放以醚键与木质素、纤维素结合的丁香酸、苯甲酸、没食子酸等羟基苯甲酸衍生物,而不利于释放以酯键与多糖、蛋白质结合的阿魏酸等肉桂酸衍生物^[23-25],这与 Max 等^[24]的结论一致,他们认为阿魏酸等肉桂酸衍生物在热酸性条件下易降解^[25]。但是本试验中常规碱水解法也未对阿魏酸的释放表现出明显优势,这可能与原料特性有关,也有可能是在高温的作用下,阿魏酸自身发生分解反应或与提取液中的其他物质化合,致使溶液中阿魏酸提取量减少^[26]。综合分析,青稞结合酚酸法最优工艺提取效果要优于常规碱法,可证明青稞中确实含有丰富多样的酚类物质,并且能更大程度的被提取出来,为青稞结合酚的提取及开发利用提供了科学依据及方法。

表 5 酸法及碱法提取液结合酚种类及含量
Table 5 Type and content of combined phenols of acid and alkaline extraction

		mg·(100 g) ⁻¹	
名称	Name	酸法 Acid-extraction	碱法 Alkaline extraction
根皮酚	Phloroglucino	nd	nd
没食子酸	Gallic acid	33.365±5.21	nd
原儿茶酸	Protocatechuic acid	nd	nd
绿原酸	Chlorogenic acid	nd	nd
儿茶酸	Catechin	nd	1.803±0.126
2,4-二羟基苯甲酸	2,4-Dihydroxy benzoic acid	1.287±0.295	0.405±0.058
香草酸	Vanillic acid	nd	3.124±0.315
丁香酸	Syringic acid	127.467±9.152	nd
4-香豆酸	4-cumaric acid	17.859±3.256	nd
芦丁	Rutin	4.211±0.395	21.625±3.134
阿魏酸	Ferulic acid	1.083±0.074	0.411±0.022
水杨酸	Salicylic acid	1.892±0.354	46.134±4.120
柚皮苷	Naringin	1.209±0.217	26.307±3.211
橙皮苷	Hesperidin	9.582±1.356	1.031±0.211
苯甲酸	Benzoic acid	98.425±6.783	3.602±0.089
邻香豆酸	Adjacent cumaric acid	2.771±0.922	1.104±0.052
杨梅素	Myricetin	0.819±0.100	0.399±0.012
槲皮素	Quercetin	5.213±1.256	2.451±0.064
藜芦酸	Veratric acid	9.350±1.529	4.738±0.110
柚皮素	Naringenin	7.136±2.098	1.227±0.067
山柰酚	Kaempferol	3.435±0.750	1.019±0.054

注:“nd”表示该物质未检出。
Note: “nd” indicates that the substance was not found.

3 结 论

1) 不同试剂对青稞结合酚提取的比较试验表明, 硫酸及盐酸水解得到的多酚质量分数和 DPPH·自由基清除能力显著高于氢氧化钠 ($P<0.05$), 说明酸法提取效果优于碱法。而硫酸水解得到的结合酚提取液的多酚质量分数又显著高于盐酸 ($P<0.05$), 说明酸法中硫酸提取效果优于盐酸。

2) 中心组合优化青稞结合酚提取工艺参数为: 料液比 1:17 g/mL, 硫酸质量分数 11.10%, 提取温度 75 °C, 并继续保持酸性环境下萃取。此工艺下所得青稞结合酚提取液中多酚质量分数达 224.33 mg/(100 g), DPPH·自由基清除能力达 9 919.28 $\mu\text{mol}/(100\text{ g})$, 与预测值多酚质量分数 243.80 mg/(100 g), DPPH·自由基清除能力 9 087.02 $\mu\text{mol}/(100\text{ g})$ 基本一致, 说明本优化工艺具有可行性。

3) 高效液相色谱分析青稞多酚组成及含量, 检测到没食子酸、2,4-二羟基苯甲酸、丁香酸、4-香豆酸、芦丁、阿魏酸、水杨酸、柚皮苷、橙皮苷、苯甲酸、邻香豆酸、杨梅素、槲皮素、藜芦酸、柚皮素、山柰酚共 8 种酚酸及 8 种黄酮类物质, 总量达 325.104 mg/(100 g), 可见青稞中酚类物质含量丰富且种类多样, 为青稞作为保健食品的深入开发以及青稞麸皮综合利用提供了科学依据。

[参 考 文 献]

- [1] 郭本兆. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987, 701.
- [2] 刘新红. 青稞品质特性评价及加工适宜性研究[D]. 西宁: 青海大学, 2014.
Liu Xinhong. Study on Quality Evaluation and Processing Suitability of Hulless Barley[D]. Xining: Qinghai University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [3] 龚凌霄. 青稞全谷物及其防治代谢综合征的作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
Gong Lingxiao. Studies on Whole Grain of Tibetan Hulless Barley and Its Effect on Metabolic Syndrome[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [4] 姚豪颖叶, 聂少平, 鄢为唯, 等. 不同产地青稞原料中的营养成分分析[J]. 南昌大学学报: 工科版, 2015, 37(1): 11—15.
Yao Haoyingye, Nie Shaoping, Yan Weiwei, et al. Analysis on nutritional ingredients in Hulless barley from different producing areas[J]. Journal of Nanchang University: Engineering & Technology, 2015, 37(1): 11—15. (in Chinese with English abstract)
- [5] 李健, 杨昌鹏, 李群梅, 等. 植物多酚的应用研究进展[J]. 广西轻工业, 2008, (12): 1—3.
Li Jian, Yang Changpeng, Li Qunmei, et al. Advances in the study of application of plant polyphenols[J]. Guang Xi Journal of Light Industry, 2008, (12): 1—3. (in Chinese with English abstract)
- [6] 何玉凤, 钱文珍, 王建凤, 等. 废弃生物质材料的高附加值再利用途径综述[J]. 农业工程学报, 2016, 32(15): 1-8.
He Yufeng, Qian Wenzhen, Wang Jianfeng, et al. High value-added reutilization approach for waste biomass materials[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(15): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [7] 李富华, 郭晓晖, 夏春燕, 等. 全谷物酚类化合物抗氧化活性研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 299—304.
Li Fuhua, Guo Xiaohui, Xia Chunyan, et al. Research advance in antioxidant activity of phenolic compounds in whole grains[J]. Food Science, 2012, 33(13): 299—304. (in Chinese with English abstract)
- [8] Perez-jimenez J, Torres J L. Analysis of non-extractable phenolic compounds in foods: the current state of the art[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24): 12713—12724.
- [9] Vaher M, Matso K, Levandi T, et al. Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties[J]. Procedia Chemistry, 2010, 2(1): 76—82.
- [10] 苏东晓. 荔枝果肉的分离鉴定既起到调节脂质代谢作用机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
Su Dongxiao. Preparation and Structure Identification of Litchi Pulp Polyphenols and Research on the Mechanism of Their Hypolipidemic Effect[D]. Wuhan: Huangzhong Agricultural University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [11] Arranz S, Saura Calixto F. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet[J]. Journal of Cereal Science, 2010, 51(3): 313—318.
- [12] Liu Chong, Zhang Ruiting, Liu Be nguo et al. Effect of steam explosion treatment on phenolic acid composition of wheat bran and its antioxidant capacity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(6): 308-314.
- [13] Lopez-Martinez L X, Oliart-Ros R M, Valerio-Alfaro G, Lee C H, Parkin K L, Garcia H S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(6): 1187—1192.
- [14] Mi-jung K I M, Jong-nae H Y U N, Jin-ae K I M, et al. Relationship between phenolic compounds, anthocyanins content and antioxidant activity in colored barley germplasm[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(12): 4802—4809.
- [15] 罗凡, 费学谦, 李康雄, 许伟, 等. 加工工艺对油茶籽油氧化稳定性及酚类物质含量的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 293—299. <http://www.tcsae.org>
Luo Fan, Fei Xueqian, Li Kangxiong, Xu Wei, Guo Shaohai. Effect of refining process on phenolic compounds and oxidation stabilities in oil-tea camellia seed oil[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(14): 293—299. (in Chinese with English abstract)
- [16] Adom K K, Sorrells M E, Liu R H. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2297—2306.
- [17] Abu Bakar M F, Mohamed M, Rahmat A, et al. Photochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus)[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 479—483.
- [18] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9): 1231—1237.
- [19] 李青, 张名位, 张瑞芬, 等. 5 种籼稻品种谷壳中游离态和结合态酚类物质含量及其抗氧化活性比较[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6): 1150—1158.
Li Qing, Zhang Mingwei, Zhang Ruifen, et al. Free and bound phenolic contents and antioxidant activity of five

- varieties of indica rice husk[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(6): 1150—1158. (in Chinese with English abstract)
- [20] Kim K H, Tsto R, Yang R, et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extract and the effect of hydrolysis conditions[J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3): 466—473.
- [21] Robbins R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(10): 2866—2887.
- [22] Liyana-Pathirana C M, Dexter J, Shahidi F. Antioxidant properties of wheat as affected by pearling[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(17): 6177—6184.
- [23] 纵伟, 赵光远, 张文叶. 阿魏酸研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2006, (5): 71—73.
- Zong Wei, Zhao Guangyuan, Zhang Wenye. Research progress on ferulic acid[J]. *China Food Additives*, 2006, (5): 71—73. (in Chinese with English abstract)
- [24] Max B, Torrado A M, Moleds A B, et al. Ferulic acid and p-coumaric acid solubilization by alkaline hydrolysis of the solid residue obtained after acid prehydrolysis of vine shoot prunings: effect of the hydroxide and pH[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43(2): 129—134.
- [25] Gao L, Mazza M. Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by high-performance liquid chromatograph and capillary gas-liquid chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(1): 118—125.
- [26] Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, et al. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats[J]. *Cancer Letters*, 2000, 157(1): 15—21.

Optimization of combined phenols extraction with sulfuric acid from hulless barley bran

Xu Fei^{1,2}, Yang Xijuan^{2,3}, Dang Bin^{2,3*}, Zhao Yadong^{1,2}, Wu Kunlun³, Chi Dezhao³

(1. *Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016;*

2. *Key Laboratory of Qinghai Province Tibetan Plateau Agric-Product Processing, Xining 810016;*

3. *State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016*)

Abstract: Hulless barley belongs to the genus *Hordeum* in the family Gramineae, and it is the mutation of cultivated barley in botany. It is also called naked barley because its lemma and palea are separated from caryopsis and its grain exposes. Hulless barley is the most characteristic crop on the Tibetan Plateau, and it has a high value in nutrition and health care. In addition to some well known functional ingredients, like dietary fiber and β -glucan, hulless barley also contains a variety of phenolic compounds, such as tocol, flavonoids, and anthocyanins. As important dietary antioxidant components, these substances play a prominent protective effect on human cardiovascular disease, diabete, obesity and cancer. The content of phenolic compounds in barley is much higher than other cereals. Currently, researches on hulless barley are mainly focused on the feed industry, traditional food processing industry, wine making industry and β -glucan. Phenols, which are important functional components, have not received enough attention, so the related studies about the phenolic in hulless barley are of great significance. Free form, soluble combined form and insoluble combined form are the 3 main states of polyphenols in grain, and combined form is the most common state of polyphenols in grain. Research found that when respectively using acid and alkaline hydrolysis to extract combined phenols from lychee, different type and content were obtained, and the total phenolic content and antioxidant capacity of the former were higher than the latter; a similar result was also obtained when using wheat as raw material, but related researches on combined phenol of hulless barley have not yet been reported. In order to further develop the most characteristics crop on the Tibetan plateau, taking hulless barley as the raw material, central composite design was used to optimize the extraction process of combined phenols based on the single factor experiments in this paper. Different extraction reagents, NaOH, HCl and H₂SO₄ were compared and H₂SO₄ solution was selected as the best extraction reagent. Acid concentration, extraction pH value, solid-liquid ratio, and extraction temperature were studied with combined phenols content and DPPH radical scavenging capacity as indices. Solid-liquid ratio, acid concentration and extraction temperature were selected as 3 factors when using Box-Behnken central composite design to optimize the extraction parameters. Results showed that the optimum extraction parameters should be as follows: solid-liquid ratio of 1:17 g/mL, acid concentration of 11.10%, and extraction temperature of 75 °C. Under the condition, polyphenol content was 224.33 mg/(100 g) and DPPH radical scavenging capacity was 9 919.28 μ mol/(100 g) which were consistent with predicted values and significantly better than rice, wheat and oat. High performance liquid chromatography was used to detect this optimum extract and 8 kinds of phenolic acids and 8 kinds of flavonoids were found using acid method, such as, gallic acid, 2,4-dihydroxy benzoic acid, syringic acid, 4-coumaric acid, rutin, ferulic acid, salicylic acid, naringin, hesperidin, benzoic acid, adjacent coumaric acid, myricetin, quercetin, veratric acid, naringenin, kaempferol, and total content was up to 325.104 mg/(100 g). By comparing the difference of different reagents in the extraction of combined phenol from hulless barley and optimizing the extraction parameters, this paper provides a scientific basis and method for the developing and utilization of hulless barley as health food.

Keywords: extraction; processing; optimization; hulless barley bran; combined phenol; central composite method