苦荞芽中黄酮类化合物含量及其抗氧化性的研究

王静波[1,2]，赵江林[2]，彭镰心[2]，邹亮[2]，向达兵[2]，赵钢[1]
（1. 成都大学生物产业学院，四川成都 610106）（2. 西华大学生物工程学院，四川成都 610039）

摘要：以反相高效液相色谱法测定苦荞在发芽过程中芦丁和槲皮素含量变化，采用分光光度法测定苦荞种子及其苦荞芽提取物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力。结果表明，苦荞发芽第 1~10 d 范围内，黄酮类物质含量逐渐升高，在第 10 d 时达到最大值；且苦荞发芽后其抗氧化性较种子有明显的提高。

关键词：苦荞芽；芦丁；槲皮素
文章篇号：1673-9078(2013)5-965-968

Development on Flavonoids and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat Sprout

WANG Jing-bo[1,2], ZHANG Jiang-lin[1], PENG Lian-xin[1], ZOU Liang[1], XIANG Da-bing[1], ZHAO Gang[1]
(1.College of Biological Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, Sichuan, China)
(2.College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, Sichuan, China)

Abstract: Rutin and quercetin content in tartary buckwheat sprout were analyzed by HPLC. The DPPH and ABTS radical scavenging capacity of tartary buckwheat seed and sprout ware measured by spectrophotometry. The results showed that the dynamic changes of flavonoids in tartary buckwheat were increased on day 1 to 10 and reach its peak on day 10. After germination, the antioxidant capacity of tartary buckwheat sprout had significantly improved.

Key words: tartary buckwheat sprouts; rutin; quercetin

苦荞麦又称鞑靼荞麦（*F. tartaricum*），属蓼科（Polygonaceae）荞麦属（*Fagopyrum Gaerth*），是一种药食兼用作物。苦荞麦富含蛋白质、淀粉、脂肪、维生素、矿物质和微量元素等营养功能成分，特别是含有其他粮食作物所没有的黄酮类化合物，其中以芦丁含量最高，约占总黄酮化合物的 85%[1]。黄酮类化合物常作为一种抗氧化剂使用，20 世纪 80 年以来，对黄酮类化合物的研究开始转向对其活性自由基的清除以及其防病治病功能上[2]，毒理学实验证明，苦荞黄酮为无毒、无副作用的物质，药效学的动物实验及临床观察表明其具有降血糖、降血脂、降血压以及预防心血管疾病、防癌抗癌、调节免疫、抗衰老、抗菌抗病毒以及止血镇痛等诸多功效[3~5]。已有研究表明萌发能显著提高苦荞麦的活性物质含量，提高苦荞原有的药食两用保健功能[6~8]。因而，充分利用苦荞芽，大力开发和研制苦荞芽系列产品，在医药、化妆品、保健品等方面均具有广阔的应用前景和现实意义。

收稿日期：2012-12-05
基金项目：国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助（CAS-08-03B）
作者简介：王静波（1988-），女，硕士，研究方向为现代食品加工技术
通讯作者：赵钢（1960-），男，教授，研究方向为特色杂粮选育及产品开发利用

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦荞：川荞一号，成都大学试验田；芦丁、槲皮素 生化试剂，中国药品生物制品检定所；甲醇 HPLC 级；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)，2,2-联氮-二（3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸）二铵盐（ABTS），Sigma 公司；其余试剂均为分析纯。

UV-3200S 紫外可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司；AP-01P 型真空泵 天津奥特赛恩斯仪器有限公司；DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；ESJ120-4 型电子分析天平，沈阳龙腾电子有限公司；KH5200DE 型数控超声波清洗器，昆山禾创超声仪器有限公司；岛津 LC-20A 高效液相色谱仪；岛津 SPD-20A 检测器；AT-330 柱温箱；N2000 色谱工作站 浙江大学智达信息工程有限公司；Diamonsil C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)。

1.2 试验方法

1.2.1 苦荞的发芽

苦荞喜欢凉爽而湿润的气候，其种子的出苗，主

要取决于气温和水分。选择当年优质的苦荞种子，用0.1%的高锰酸钾溶液消毒 2 min，蒸馏水洗净，分别均匀置于铺有三层滤纸 10 cm×10 cm 的发芽盒中，每盒 60 粒，在 25 ℃条件下萌发[9~10]。苦荞种子在发芽 24 h 后即萌发，从第一天起，在每天同一时间取苦荞芽全株，去壳，统计苦荞芽发芽过程中的鲜重（g/100 株）变化。同时将样品烘干，粉碎，备用，取样至第 12 d。

1.2.2 样品提取液的制备

精密称取样品 0.1 g，加入 25 mL、70%甲醇溶液，55 ℃条件下超声提取 25 min (50 Hz)，静置放冷，用 70%甲醇溶液补足重量，样品进样前，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

1.2.3 芦丁、槲皮素含量的测定[11]

用反向高效液相色谱法（RP-HPLC）测定苦荞芽中主要黄酮类物质：芦丁和槲皮素的含量[13~14]。其检测色谱条件为：色谱柱：Diamonsil-C18 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：甲醇-1%冰乙酸等度洗脱(体积比为 50:50)；流速：1.0 mL/min；检测波长：360 nm；柱温：30 ℃；进样量 20 μL。

芦丁、槲皮素标准曲线的制定：分别精密称量芦丁标准品5.08 mg和槲皮素标准品2.44 mg于25 mL容量瓶中，用70%甲醇溶液定容至25 mL，即得芦丁、槲皮素的混合对照品储备溶液（S1），取S1溶液5 mL用70%甲醇稀释至10 mL，再依次等倍稀释，得到标准曲线工作溶液S2-S7，进样前，经0.45 μm微孔滤膜过滤。以标准曲线工作溶液浓度C (mg/mL)为纵坐标，峰面积A为横坐标，绘制标准曲线，采用Excel软件处理，获得芦丁、槲皮素的标准曲线图，记录其标准曲线方程及线性相关系数。根据样品的芦丁、槲皮素峰面积，按照各物质的标准曲线回归方程，即得各样品的浓度。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力的测定[12~13]

准确称取 DPPH 粉末，用甲醇溶解配备 0.3 mmol/L 储备液，4 ℃避光保存备用。在反应体系中，于 10 mL 比色管中加入 1 mL 不同浓度的样品或参比溶液，再加入 4 mL 的 DPPH 甲醇溶液，振荡摇匀，于室温下避光静置 30 min，在 517 nm 处的其吸光度值。

DPPH 自由基清除率(%)=(1-As/Ao)×100%

注：As 为样品管的吸光值；Ao 为对照管的吸光值。

DPPH 自由基清除率(%)越高，说明其抗氧化能力越强。

1.2.5 ABTS 自由基清除能力的测定[14~15]

用 pH=7.4 的 PBS 溶液配制 5 mmol/L 的 ABTS 储备液，与 MnO_2 反应后，室温暗处静置过夜，再用 PBS(pH7.4)稀释到 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02，于 -20 ℃保存备用。在反应体系中，于 10 mL 比色管中加入 200 μL 不同浓度的样品或参比溶液，再加入 3mL 的 ABTS 溶液，振荡摇匀，与室温避光静置 1 min，在 734 nm 处测定其吸光度值。

ABTS 自由基清除率(%)=(1-As/Ao)×100%

注：As 为样品管的吸光值；Ao 为对照管的吸光值。

ABTS 自由基清除率(%)越高，其抗氧化能力越强。

2 结果与讨论

2.1 苦荞发芽过程中鲜重的变化

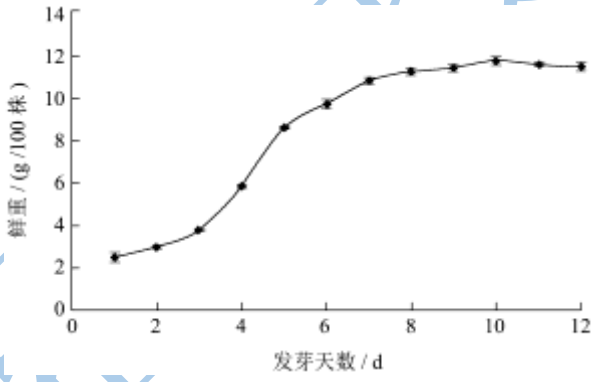


图 1 苦荞芽鲜重的变化趋势

Fig.1 Kinetic studies on fresh weight (FW) of tartary buckwheat sprout

从图 1 可以看出，苦荞发芽过程中鲜重在前 3 d 变化较小，在 3~10 d 范围内，鲜重逐渐增加，在第 10 d 时鲜重达到最大值，之后处于相对稳定的水平。第 10 d 时苦荞芽的鲜重为：11.82±0.18 g/100 株。

2.2 芦丁、槲皮素标准曲线回归方程

按照 1.2.3 的方法，得到芦丁、槲皮素的标准曲线方程及线性相关系数，结果见表 1。

表 1 芦丁、槲皮素标准曲线回归方程

Table 1 The standard curve and regression equation of rutin and quercetin

标准品	质量浓度线性范围/(mg/mL)	回归方程	R^2
芦丁	0.003-0.203	C=6×10-8A+0.001	0.9998
槲皮素	0.003-0.098	C=3×10-8A+0.0006	0.9999

2.3 苦荞芽中芦丁和槲皮素总量的变化趋势

按照 1.2.3 的方法测定苦荞发芽过程中各样品芦丁和槲皮素的含量，表明苦荞芽中槲皮素含量甚微，其含量范围在你 0.30~0.91 mg/g 之间，黄酮类物质以芦丁为主，得到苦荞发芽过程中苦荞芽芦丁含量的变化趋势如图 2。

从图 2 可知，苦荞发芽过程中，在 1~10 d 范围内

芦丁含量逐渐升高，在第 10 d 时达到最大值，然后处于相对稳定水平。苦荞种子中的芦丁含量为 19.16±0.25 mg/g，发芽第 10 d 时苦荞芽的芦丁总含量为 53.96±0.38 mg/g。可知，苦荞经过发芽后，芦丁含量显著提高，因而对苦荞芽的有效利用具有重要的现实意义。

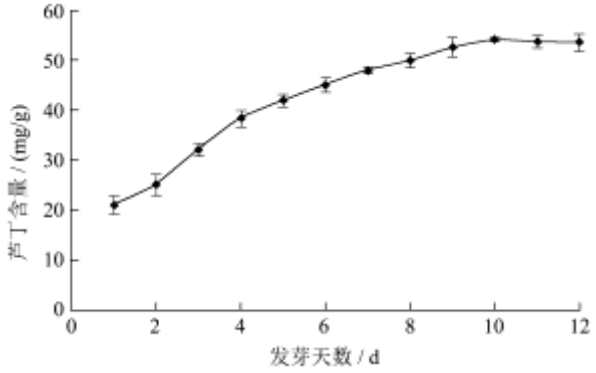


图 2 苦荞芽芦丁含量的变化趋势

Fig.2 Kinetic studies on rutin of tartary buckwheat sprout

芦丁及槲皮素混合对照品溶液以及苦荞芽样品提取液的色谱图见图 3。

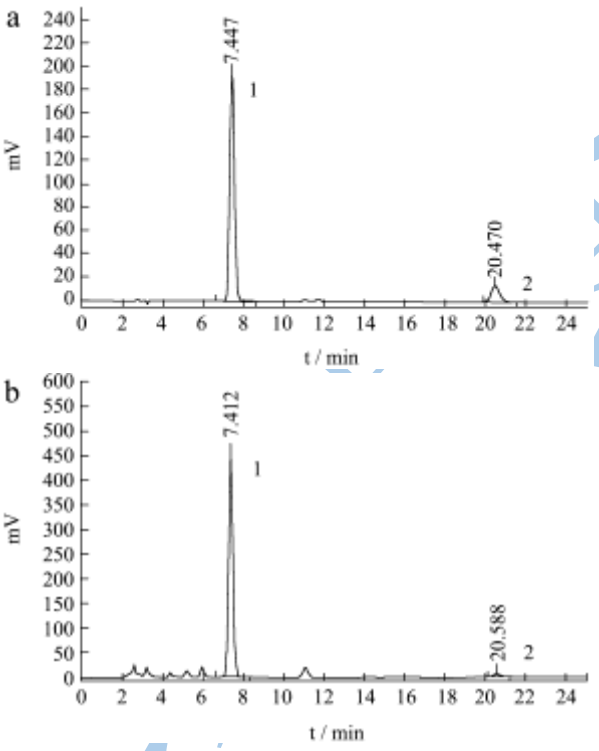


图 3 对照品及样品 HPLC 图

Fig.3 HPLC profiles for rutin and quercetin analysis

注：（A）芦丁、槲皮素混合对照品；（B）苦荞芽提取液；1：芦丁；2：槲皮素。

2.4 苦荞芽的 DPPH 自由基清除能力

按照 1.2.4 的方法测定苦荞芽提取物浓度为 0.4 mg/mL 时，其 DPPH 自由基清除能力，其结果见图 4。

从图 4 可知，当苦荞芽提取液浓度为 0.4 mg/mL 时，在发芽第 1~10 d 范围内，随着发芽天数的增加，DPPH 自由基清除率不断升高，并且在第 10 d 时达到最大值，此时其清除率为 63.24%。表明黄酮类物质含量增加有利于样品 DPPH 自由基清除能力的增强。苦荞芽的 ABTS 自由基清除能力

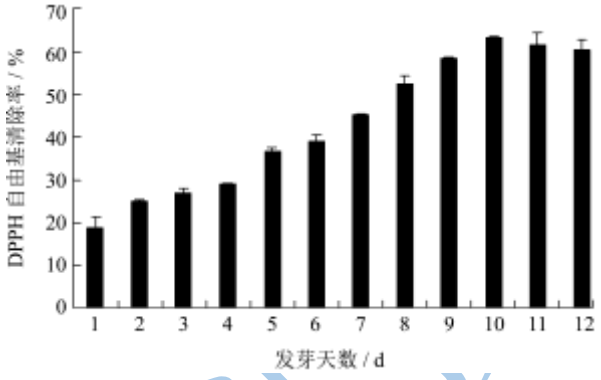


图 4 苦荞芽中 DPPH 自由基清除率 Y（%）的变化趋势

Fig.4 Kinetic studies on DPPH radical scavenging capacity Y (%) of tartary buckwheat sprout

按照 1.2.5 的方法测定苦荞芽提取物浓度为 0.4 mg/mL 时，其 ABTS 自由基清除能力，其结果见图 5。

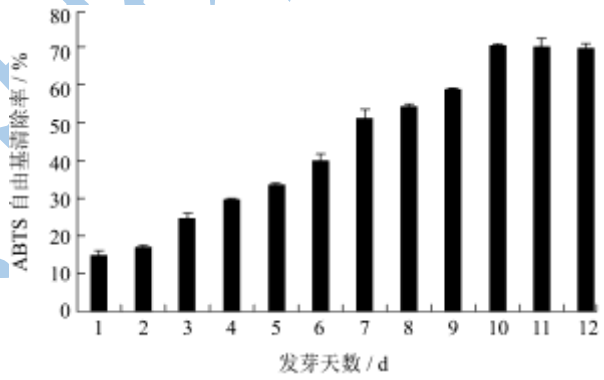


图 5 苦荞芽 ABTS 自由基清除率 Y（%）的变化趋势

Fig.5 Kinetic studies on ABTS radical scavenging capacity Y (%) of tartary buckwheat sprout

从图 5 可知，当苦荞芽提取液浓度为 0.4 mg/mL 时，在发芽第 1~10 d 范围内，随着发芽天数的增加，ABTS 自由基清除率不断升高，并且在第 10 d 时达到最大值，此时其清除率为 71.14%。表明黄酮类物质含量增加有利于样品 ABTS 自由基清除能力的增强。

3 结论

苦荞中的黄酮类化合物以芦丁和槲皮素为主，以芦丁和槲皮素的含量表示苦荞芽中主要黄酮类物质的含量。结果表明，发芽能有效提高苦荞主要黄酮类物质的含量，且在发芽第 1~10 d 范围内黄酮类物质的含量逐渐升高，在第 10 d 时，达到最大值 54.27±0.38 mg/g，其含量为苦荞种子的 2.73 倍。苦荞种子提取液的 DPPH 以及 ABTS 自由基清除能力变化趋势和黄酮

类物质的含量变化趋势相同，均在第 10 d 时达到最大清除率；发芽第 10 d 时的苦荞芽提取液 DPPH 以及 ABTS 自由基清除率分别为 63.24%、71.14%，表明苦荞芽提取物的抗氧化活性和其黄酮类物质的含量有很大的关系，黄酮类物质含量的增加有利于样品 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力的增强。因而，萌发处理是提高苦荞黄酮类物质的含量以及增强其抗氧化活性的有效手段，对苦荞芽的研究与开发具有重要的意义。

参考文献

[1] 张强,李艳琴.苦荞菜中总黄酮的测定[J].食品与药品,2007,9(04A):24-35

[2] 任顺成,孙军涛.荞麦粉、皮、芽中黄酮类化合物抗氧化研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2008,29(2): 15-17

[3] 赵钢.荞麦加工与产品开发新技术[M].北京:科学出版社,2010

[4] 赵忠丽,赵永进.苦荞麦的营养成分及其保健功能[J].食品科技,2003,4:33-35

[5] 宋毓雪,黄凯峰.苦荞营养保健成分研究[J].安徽农业科学,2011,39(1):100-102

[6] 李灵芝,李海平.微量元素锌对苦荞种子萌发及生理特性的影响[J].西南大学学报(自然科学版),2008,30(3):80-83

[7] 周小理,宋鑫莉.萌动对植物籽粒营养成分的影响及荞麦萌动食品的研究[J].上海应用技术学院学报(自然科学版),2009, 9(3): 171-174

[8] 李金娣,龙施华,李子院,等.类黄酮化合物氧化前后含量和抗氧化性的变化[J].湖南农业科学,2012,9:32-34

[9] 李海平,李灵芝,任彩文,等.温度、光照对苦荞麦种子萌发、幼苗产量及品质的影响[J].西南师范大学学报(自然科学版),2009,34(5):158-161

[10] 刘永文,樊燕,刘德光,等.两种荞麦生产芽菜的对比试验初探[J].南方农业,2012,6(5):33-34

[11] 邹亮,赵钢,王战国,等.苦荞提取物中芦丁和槲皮素的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):60-62

[12] 郑善元,陈填烽,郑文杰,等.单丛茶水提取物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究[J].光谱学与光谱分析, 2010, 30(9):2417-423

[13] 李琼.芸豆不同发芽阶段生物类黄酮对 DPPH 自由基的清除效率研究[J].安徽农业科学,2011,39(20):12072-12074

[14] 张逸波,陈填烽,郑文杰,等.硒杂环化合物 SPO 清除 DPPH 和 ABTS 自由基的光谱学研究[J].光谱学与光谱分析, 2010,30(7): 1866-1871

[15] 邱金东,汤昆.DPPH 和 ABTS 法测定核桃仁的体外抗氧化活性[J].中成药,2008,30(8):1215-1216

现代食品科技