全麦粉模拟消化过程中的抗氧化活性研究

王慧清[1,2]，刘冬[2]，孙海燕[2]，明建[1]
（1.西南大学食品科学学院，重庆 400715）
（2.深圳职业技术学院深圳市发酵精制检测系统重点实验室，广东深圳 518055）

摘要：本文以 3 个不同品种小麦为原料（AK58、西农 979、扬麦 16），通过体外模拟胃肠消化实验，测定全麦粉在消化过程中多酚和黄酮含量及抗氧化活性变化规律。结果表明：在模拟消化过程中，酶对多酚释放作用显著，胃消化中最大释放量为胃消化 0 h 的 3.03~3.14 倍，肠消化中最大释放量为胃消化 0 h 的 5.54~5.94 倍和肠消化 0 h 的 1.77~1.94 倍；胃酸和酶均对黄酮释放具有显著效果，胃消化中最大释放量为胃 0 h 的 1.72~1.94 倍，肠消化中最大释放量为胃 0 h 的 2.34~3.14 倍和肠消化 0 h 的 1.57~1.71 倍；小麦粉抗氧化能力（ORAC）在消化过程中增加显著，胃消化中最大抗氧化能力为胃消化 0 h 的 2.14~3.92 倍，肠消化中最大抗氧化能力为胃消化 0 h 的 7.19~10.18 倍和肠消化 0 h 的 2.72~3.24 倍。此外，抗氧化能力与多酚释放量存在极显著正相关（r_s=0.90~0.99，p<0.01）。

关键词：全麦粉；多酚；黄酮；抗氧化
文章篇号：1673-9078(2015)10-122-128 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.021

Antioxidant Activity of Whole Wheat Flour during *in Vitro* Simulated Digestion

WANG Hui-Qing[1,2], LIU Dong[2], SUN Hai-yan[2], MING Jian[1]
(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)
(2.Shenzhen Key Laboratory of Fermentation, Purification and Analysis, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The polyphenol and flavonoid content as well as antioxidant activity were determined during *in vitro* simulated digestion of three wheat varieties (AK58, xinong979, yangmai16). The results showed that enzymes had a significant effect on the release of polyphenols during the simulated digestion. The maximum release amount was 3.04~3.14 times that of 0~h stomach digestion, while the maximum release of intestinal digestion was 5.24~5.94 times that of 0~h stomach digestion and 1.77~1.94 times 0~h intestinal digestion. Stomach acid and enzymes had significant effects on the release of flavonoids. The maximum release during stomach digestion was 1.72~1.94 times of 0 h stomach digestion, while the maximum release during intestinal digestion was 2.34~3.14 times of 0 h stomach digestion and 1.57~1.71 times of 0 h intestinal digestion. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of the wheat flour significantly increased during the digestion. The strongest ORAC during stomach digestion was 2.14~3.92 times that of 0 h stomach digestion, while that of intestinal digestion was 7.19~10.18 times that of 0 h stomach digestion and was 2.72~3.24 times that of 0 h intestinal digestion. In addition, there was a significant positive correlation between the antioxidant activity and the release of polyphenols (r_s=0.90-0.99，p<0.01).

Key words: whole wheat flour; polyphenol; flavonoid; antioxidant

小麦作为中国主要食粮之一，是全国大部分居民赖以生存的基本食物。但随着传统粮油加工过程的逐步精细化，小麦麸皮中富含的营养物质和生物活性物质大量流失，不仅降低了小麦的营养价值和保健功能，而且造成原料的浪费。全麦食品因其较全面的营养价值和保健功能而倍受关注。全麦食品由全麦粉制做而成，全麦粉是将整粒小麦不经去除麸皮和胚芽部分直接粉碎研磨制成。与普通精面粉相比，全麦粉由于保留了小麦的麸皮和胚芽部分而富含蛋白质、脂质、B 族维生素和矿物质等营养物质以及膳食纤维、多酚、植物甾醇等生物活性物质[1]。研究表明全麦食品的摄入能有效的预防癌症、肥胖和心血管疾病的发生。其中，麸皮富含的膳食纤维能降低胆固醇，有效预防糖尿病的发生；B 族维生素对预防脚气病、癞皮病等皮

收稿日期：2014-12-23
基金项目：广东省省国际合作项目（2012B050600031）；广东省教育部产学研结合项目（2012B091100411）；深圳市科技计划项目（ZDSY20120619093923525）
作者简介：王慧清（1989-），女，硕士研究生，研究方向为食品化学与营养学
通讯作者：明建（1972-），男，博士，教授，研究方向为食品化学与营养学；刘冬（1968-），男，博士，教授，研究方向为食品生物技术

肤病效果显著；胚芽部分含有的脂质、蛋白质等对保护心脏大有益处[2~4]。

自由基是机体正常代谢的产物，但当人体自由基的产生系统和消除系统失衡时会引起自由基过剩，损害机体组织和细胞，从而导致衰老、心血管疾病、糖尿病、癌症等疾病的发生。研究发现，过剩自由基的产生几乎与人类大多数疾病的发生均有关。因此，研究具有清除自由基功能的抗氧化食品已经成为热点。目前虽然对于全麦食品营养保健功能的研究较多，但对于全麦食品的抗氧化功能却鲜有报道。本实验通过体外模拟胃肠消化实验，研究全麦粉在人体消化过程中抗氧化活性的变化规律，不仅从抗氧化的角度丰富和完善了全麦食品的营养健康理论，也对全麦食品的加工和消费提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

采用全国大范围种植的小麦品种 AK58(A)、西农 979(B)和扬麦 16(C)，其中 AK58、西农 979 产自河南，扬麦 16 产自江苏。没食子酸、儿茶素、福林酚试剂（分析纯）、2,2'-偶氮二异丁基脒盐酸盐（AAPH）、荧光素钠盐、胃蛋白酶、胰酶、胆汁提取液均购自美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

高带中药粉碎机，中国大海药材器械厂；DK-8B 型电热恒温水浴锅，上海精密实验设备有限公司；5810R 台式高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；Laborota 4001 型旋转蒸发仪，德国 Heidolph 公司；Spectra Max M2 型连续光谱密度荧光检测仪，美国 Molecular 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理

所有小麦样品研磨成粉，充分混匀备用。

1.3.2 小麦中酚类化合物提取

参照 Adom 方法[5]，并根据实验条件略作修改。准确称取 1 g(绝干重)样品，加 10 mL 正己烷除脂，重复操作三次；加入 50 mL 预冷 80%丙酮，均质，离心（4000 r/min，10 min），收集上清液，重复此操作 5 次。合并上清液，45 ℃旋转蒸干，50%甲醇定容至 10 mL，得游离酚类提取物，-80 ℃保存备用。

在提取游离酚后的残渣中加入 20 mL 2 mol/L NaOH 溶液，充氮气 2 min，避光室温振荡消化 1 h；用浓盐酸调 pH 至 2.0，加入 20 mL 正己烷混匀，弃去上层油脂层，重复此操作 2 次；加入 20 mL 乙酸乙酯，震荡，离心，取上清液，重复此操作 5 次。合并上清液，45 ℃旋转蒸干，50%甲醇定容至 10 mL，得结合酚类提取物，-80 ℃保存备用。

1.3.3 体外模拟消化

体外模拟消化实验参照赵旭[6]实验方法。体外模拟消化包含体外模拟胃消化和体外模拟肠消化两部分。体外模拟肠消化是在胃消化的基础上，根据胃消化的最佳消化时间点，即在该时间点之后多酚含量无显著差异再进行肠消化。

1.3.3.1 模拟胃液消化

称取 20 g（绝干重）样品，加入 200 g 生理盐水，沸水浴糊化(80 ℃，10 min)；冷却，去离子水恒重至 220 g；1 mol/L HCl 调 pH 至 2.0，加入 2.5 mL 胃蛋白酶溶液（0.2 g 胃蛋白酶溶于 5 mL 0.01 mol/L HCl）。空白对照组用等体积的生理盐水替代盐酸和胃液，胃酸对照组用等体积 0.01 mol/L HCl 代替胃蛋白酶。避光，充分充入氮气后在 37 ℃的恒温水浴摇床消化 4 h。

分别在消化 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h 时取出一定质量的悬浊液，12000 r/min，4 ℃，离心 15 min，取上清液，分装，-80 ℃保存备用。

1.3.3.2 模拟肠液消化

向达到最佳胃消化时间的消化液中加入 1 M $NaHCO_3$ 调 pH 至 6.9；加入 5 mL 胰酶-胆汁提取物(4 g 胰酶、25 g 胆汁提取液溶于 1 L 0.1 mol/L $NaHCO_3$ 缓冲溶液)，混匀。空白组用等体积 $NaHCO_3$ 缓冲溶液代替胰酶-胆汁提取物。避光，充分充入氮气，37 ℃恒温水浴摇床消化 6 h。

分别在胃消化 0 h、肠消化 0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 分别取出一定质量的悬浊液，12000 r/min，4 ℃离心 15 min，取上清液，分装，-80 ℃保存备用。

1.3.4 多酚含量测定

小麦提取多酚及消化后所有样品测定前 37 ℃水浴解冻，12000 r/min，4 ℃离心 15 min，取上清液直接进行多酚含量测定。多酚含量测定采用 Folin-Ciocalten 法[7]。以没食子酸为标准品，多酚含量以 mg 没食子酸当量/100 g 干物质(mg GAE/100 g DW)表示。

1.3.5 黄酮含量测定

黄酮含量测定采用氯化铝-亚硝酸钠比色法[8]。以儿茶素为标准品，黄酮含量以 mg 儿茶素当量/100 g 干物质(mg CE/100 g DW)表示。

1.3.6 抗氧化活性（ORAC）测定

参照 Faller 和 Wolfe 方法[9~10]，ORAC 值用μmol

Trolox 当量/100 g 干物质（μmol TE/100 g DW）表示。

1.3.7 数据处理

实验结果用 Mean±SD 表示，重复三次。显著性检验及相关性分析采用 SPSS 20.0 软件进行分析，$p<0.05$ 为差异显著。

2 结果与讨论

2.1 体外模拟消化前后多酚含量

由表 1 可知，3 个品种小麦游离酚含量之间差异不显著（$p>0.05$）；结合酚含量之间差异显著（$p<0.05$），且结合酚含量显著高于游离酚含量，AK58、西农 979、扬麦 16 结合酚含量分别占总酚含量的 75.0%、69.7%、72.2%。Dinelli[11]对 22 种小麦多酚研究结果表明，小麦中多酚主要以结合酚为主，且结合酚含量平均为总酚含量的 72%。由实验结果可知，小麦品种和种植区域的差异会导致多酚含量的差异。

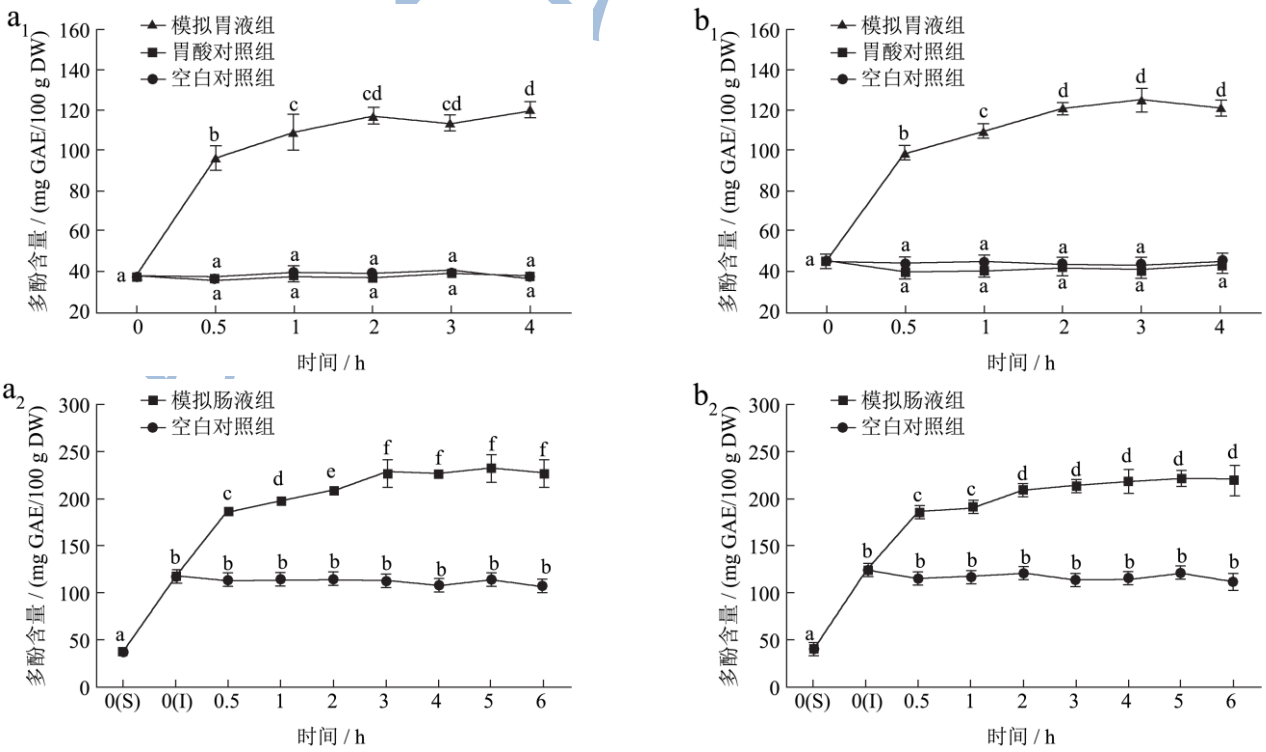
3 个品种小麦粉在体外模拟胃肠消化过程中多酚释放量的变化情况见图 1，与空白对照组相比，模拟胃液消化过程中胃蛋白酶对多酚释放具有显著作用，胃酸对多酚释放没有影响。多酚释放量在 0.5 h 内增加显著，0.5 h 后释放量增加缓慢，AK58、西农 979、扬麦 16 多酚释放量分别在 2 h、2 h、1 h 趋于稳定（$p>0.05$），多酚最大释放量分别为 120.14±4.33、125.56±5.79、121.08±3.72 mg GAE/100 g DW，为胃消化 0 h 总酚含量的 3.03~3.14 倍。

表 1 3 个小麦品种多酚含量、黄酮含量及 ORAC 值

Table 1 Total polyphenol and flavonoid content and ORAC of three wheat varieties

测定指标	类型	小麦品种		
		AK58	西农 979	扬麦 16
多酚含量/(mg GAE/100g DW)	游离酚	44.43±2.07 a	44.82±2.07 a	44.76±1.78 a
	结合酚	132.68±5.42 c	101.03±4.17 a	115.71±2.36 b
	总量	177.11±7.49	145.85±6.24	160.47±4.14
黄酮含量/(mg CE/100g DW)	游离酚	6.65±0.22 b	5.80±0.57 a	5.19±0.26 a
	结合酚	8.21±0.60 b	6.05±0.59 a	6.99±0.55 a
	总量	14.86±0.82	11.85±1.16	12.18±0.81
ORAC 值/(μmol TE/100g DW)	游离酚	1087.43±65.34 a	1151.12±236.15 a	1203.54±136.95 a
	结合酚	3980.49±101.90 b	2305.33±93.95 a	2736.11±464.96 a
	总量	5067.92±167.24	3456.45±330.1	3939.65±601.91

注：在同一行中不同的小写字母代表品种之间存在显著差异（$p<0.05$），同一行中相同字母则代表品种间无显著差异（$p>0.05$）。



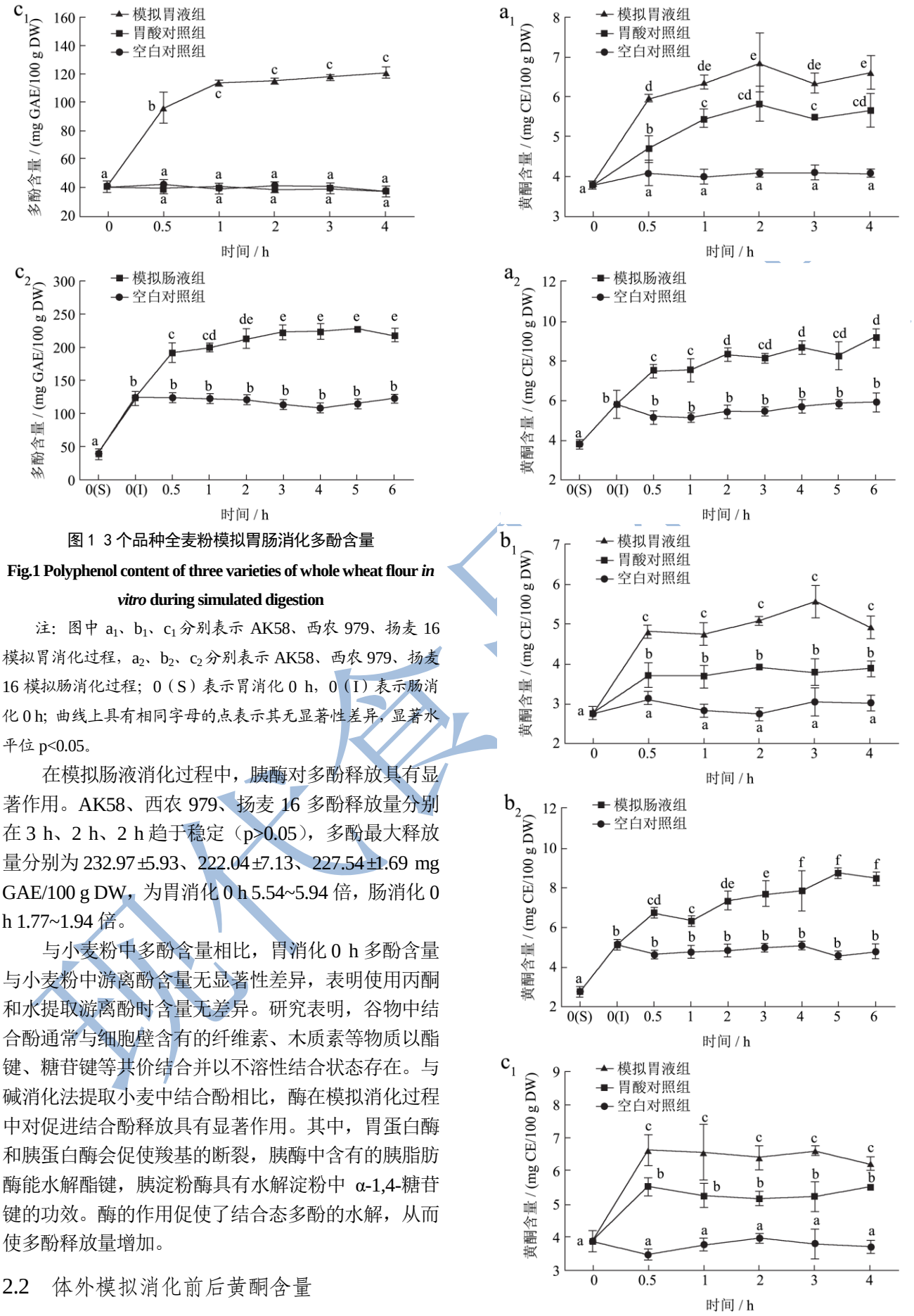


图 1 3 个品种全麦粉模拟胃肠消化多酚含量

Fig.1 Polyphenol content of three varieties of whole wheat flour *in vitro* during simulated digestion

注：图中 a_1、b_1、c_1 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟胃消化过程，a_2、b_2、c_2 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟肠消化过程；0（S）表示胃消化 0 h，0（I）表示肠消化 0 h；曲线上具有相同字母的点表示其无显著性差异，显著水平位 $p<0.05$。

在模拟肠液消化过程中，胰酶对多酚释放具有显著作用。AK58、西农 979、扬麦 16 多酚释放量分别在 3 h、2 h、2 h 趋于稳定（$p>0.05$），多酚最大释放量分别为 232.97±5.93、222.04±7.13、227.54±1.69 mg GAE/100 g DW，为胃消化 0 h 5.54~5.94 倍，肠消化 0 h 1.77~1.94 倍。

与小麦粉中多酚含量相比，胃消化 0 h 多酚含量与小麦粉中游离酚含量无显著性差异，表明使用丙酮和水提取游离酚时含量无差异。研究表明，谷物中结合酚通常与细胞壁含有的纤维素、木质素等物质以酯键、糖苷键等共价结合并以不溶性结合状态存在。与碱消化法提取小麦中结合酚相比，酶在模拟消化过程中对促进结合酚释放具有显著作用。其中，胃蛋白酶和胰蛋白酶会促使羧基的断裂，胰酶中含有的胰脂肪酶能水解酯键，胰淀粉酶具有水解淀粉中 α-1,4-糖苷键的功效。酶的作用促使了结合态多酚的水解，从而使多酚释放量增加。

2.2 体外模拟消化前后黄酮含量

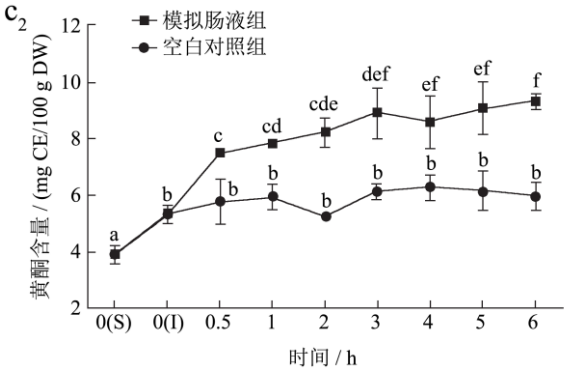


图 2 3 个品种全麦粉模拟胃肠消化黄酮含量

Fig.2 Flavonoid content of three varieties of whole wheat flour *in vitro* during simulated digestion

注：图中 a_1、b_1、c_1 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟胃消化过程，a_2、b_2、c_2 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟肠消化过程；0（S）表示胃消化 0 h，0（I）表示肠消化 0 h；曲线上具有相同字母的点表示其无显著性差异，显著水平位 $p<0.05$。

由表 1 中黄酮含量可知，AK58 总黄酮含量最高为 14.86±0.82 mg CE/100 g DW，与西农 979 和扬麦 16 总黄酮含量差异显著。其中，AK58 与西农 979 游离黄酮含量相比无显著性差异，与扬麦 16 游离黄酮含量相比存在显著差异；西农 979 与扬麦 16 游离黄酮含量之间差异不显著；AK58、西农 979 和扬麦 16 结合黄酮含量之间差异显著。

如图 2 所示，在模拟胃消化过程中，胃酸和胃蛋白酶对黄酮释放均有影响，且模拟胃液组与空白对照、胃酸对照组之间差异显著（$p<0.05$）。AK58、西农 979、扬麦 16 在模拟胃消化过程中黄酮释放量分别在 1 h、0.5 h、0.5 h 趋于稳定，黄酮最大释放量分别为 6.86±0.43、5.36±0.14、6.64±0.46 mg CE/100 g DW，为胃消化 0 h 黄酮含量的 1.72-1.94 倍。在模拟肠消化过程中，胰酶对黄酮释放作用显著，AK58、西农 979、扬麦 16 的黄酮释放量分别在 2 h、4 h、3 h 趋于稳定，黄酮最大释放量分别为 9.15±0.48、8.71±0.19、9.05±0.93 mg CE/100 g DW，为胃消化 0 h 的 2.34-3.14 倍，肠消化 0 h 的 1.57~1.71 倍。

黄酮类物质是通过两个苯环和一个吡喃环相互连接而形成的一系列化合物，由于结构中吡喃环氧化程度不同以及两侧苯环上取代物的种类、数量、位置的不同而以不同的形式存在，且多溶于有机溶剂。与小麦粉中黄酮含量相比，胃消化 0 h 黄酮含量低于小麦粉中游离黄酮含量，推测可能是由于水溶性黄酮类物质含量较低所致。而在消化过程中，胃酸和酶对黄酮的释放均具有显著作用，且胃消化中黄酮的最大释放量与小麦粉中游离黄酮含量之间无显著性差异。Crespy 等[12]研究发现游离的黄酮苷元能在胃部被吸收，而黄酮糖苷则不能吸收，则胃消化中黄酮释放量增加可能是因为游离黄酮苷的吸收。而肠消化中黄酮释放量持续增加可能是由于胰蛋白酶的作用使黄酮糖苷部分吸收所致，不能被小肠吸收的糖苷经证实进入大肠被各种微生物代谢成苷元和其他芳香酸[13]，肠消化中黄酮的最大释放量低于小麦粉中总黄酮含量并存在显著性差异，可能是由于部分糖苷在小肠中不能被吸收造成。

2.3 体外模拟消化前后抗氧化活性（ORAC）变化

氧化自由基吸收能力（ORAC）是评价抗氧化活性较为前沿的化学抗氧化方法。Okarter 等[4]测定 6 种全麦粉的 ORAC 值表明结合酚对总酚抗氧化贡献率在 60%以上。由表 1 得，AK58、西农 979、扬麦 16 中结合酚的抗氧化能力显著高于游离酚，且结合酚对总多酚抗氧化能力的贡献率分别为 78.54%、66.70%、69.45%。

3 个品种小麦在模拟消化过程中抗氧化活性 ORAC 值变化规律见图 3，模拟胃消化过程中，模拟胃液组与空白对照组、胃酸对照组之间差异显著。AK58、西农 979、扬麦 16 在模拟胃消化过程中抗氧化活性分别在 1 h、1 h、2 h 趋于稳定（$p>0.05$），最大值分别为 1781.00±213.82、2274.13±285.73、1415.24±128.86 mol TE/100 g DW，为胃消化 0 h 2.14~3.92 倍。在模拟肠液消化过程中，西农 979、AK58、扬麦 16 抗氧化活性分别在 3 h、2 h、2 h 趋于稳定，最大值分别为 5235.24±266.64、5904.33±1026.40、4749.25±236.52 mol TE/100 g DW，为胃消化 0 h 7.19~10.18 倍，肠消化 0 h 2.72~3.24 倍。

表 2 个不同品种小麦多酚、黄酮含量与 ORAC 值之间 Pearson 相关系数

Table 2 Pearson correlation coefficients between polyphenol content, flavonoid content, and ORAC of the three varieties of whole wheat flour

相关系数 r_s	消化阶段	AK58	西农 979	扬麦 16
多酚	消化前	0.99**	0.98**	0.94**
	消化后	0.97**	0.93**	0.96**
黄酮	消化前	0.89*	0.51	0.96**
	消化后	0.86**	0.89**	0.87**

注：*表示显著相关（$p<0.05$），**表示极显著相关（$p<0.01$）。

表 2 给出了消化前后多酚、黄酮含量与抗氧化能力的相关性分析。分析可知，消化前后样品抗氧化能

力与总酚含量存在极显著正相关，与文献报道一致[14]。消化后黄酮释放量与抗氧化活性也显著正相关。

在模拟胃消化过程中胃酸对照组和空白对照组的多酚含量与消化前样品中游离酚含量无显著差异，但与消化前小麦粉游离酚抗氧化能力相比，胃酸对照组与空白对照组抗氧化能力却显著低于样品中游离酚抗氧化能力，由于游离酚、空白对照组和胃酸对照组对样品的处理方式不同，推测在相同多酚含量下，抗氧化能力强弱与多酚提取方式有关。

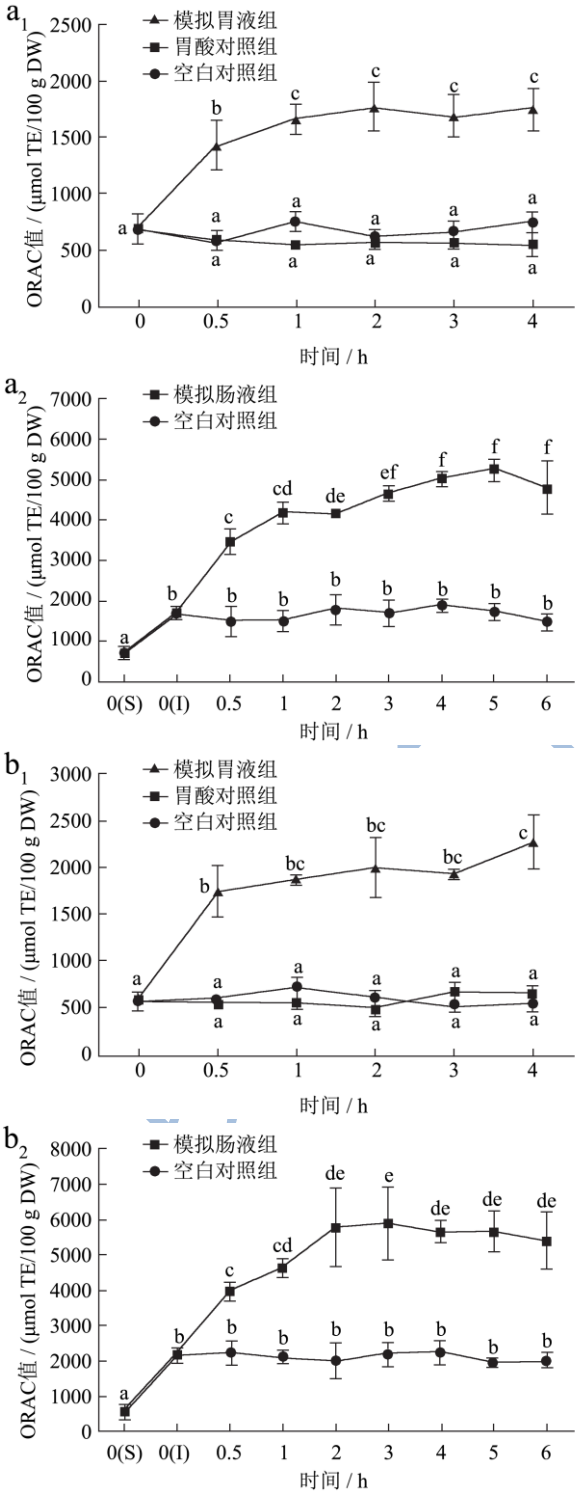


图 3 3 个品种全麦粉模拟胃肠消化 ORAC 值

Fig.3 The ORAC of three varieties of whole wheat flour *in vitro* during simulated digestion

注：图中 a_1、b_1、c_1 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟胃消化过程，a_2、b_2、c_2 分别表示 AK58、西农 979、扬麦 16 模拟肠消化过程；0（S）表示胃消化 0 h，0（I）表示肠消化 0 h；曲线上具有相同字母的点表示其无显著性差异，显著水平位 $p<0.05$。

3 结论

全谷物因其全面的营养价值和保健功能倍受消费者的亲睐，本实验通过体外模拟消化对 AK58、西农 979、扬麦 16 三个品种的全麦粉在消化过程中抗氧化活性变化进行研究，结果表明：在消化过程中，酶对多酚和黄酮的释放作用显著，多酚和黄酮释放量显著增加，并表现出一定的时效关系；在抗氧化试验中，样品抗氧化活性在消化过程中显著增加，并与消化过程中总酚含量呈现显著正相关。

参考文献

[1] Liu R H. Whole grain phytochemicals and health [J]. Journal of Cereal Science, 2007, 46(3): 207-219

[2] 朱晓月,黄志远,马记红,等.全麦粉营养及生产工艺探讨[J]. 粮食加工,2014(1):12-14

ZHU Xiao-yue, HUANG Zhi-yuan, MA Ji-hong, et al. Discuss of nutrition and production technology of the whole wheat flour [J]. Food Processing, 2014, 1: 12-14

[3] Okarter N, Liu R H. Health benefits of whole grain phytochemicals [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010, 50(3): 193-208

[4] Okarter N, Liu C S, Sorrells M E, et al. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat [J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 249-257

[5] Adom K K, Sorrells M E, Liu R H, et al. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2297-2306

[6] 赵旭.体外模拟消化对小麦和大米抗氧化活性和抗细胞增殖作用影响的研究[D].广州:华南理工大学,2013
ZHAO Xu. Study on influence of in *vitro* dijestion on antioxidant and antiproliferative activity of wheat and rice [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013

[7] Van H P, Morita N. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities [J]. Food Chemistry, 2008, 109(2): 325-331

[8] Adom K K, Sorrells M E, Liu R H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(26): 7825-7834

[9] Wolfe K L, Kang X M, He X. Cellular antioxidant activity of common fruits [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(18): 8418-8426

[10] Faller A L K, Fialho E, Liu R H. Cellular antioxidant activity of feijoada whole meal coupled with an in *vitro* digestion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(19): 4826-4832

[11] Dinelli G, Segura-Carretero A, Di Silvestro R, et al. Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(42): 7670-7681

[12] Crespy V, Morand C, Besson C, et al. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(3): 618-621

[13] Aura A M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon [J]. Phytochemistry Reviews, 2008, 7(3): 407-429

[14] Chandrasekara A, Shahidi F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in *vitro* digestion and microbial fermentation [J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1): 226-237