高粱糠不同存在形态酚类物质的 AB-8 大孔树脂纯化及对红细胞氧化溶血的保护作用

陈华敏，赖富饶，孙崇臻，张猛猛，吴晖，唐语谦，李晓凤
（华南理工大学食品科学与工程学院，广东广州 510640）

摘要：本文对提取得到的高粱糠不同存在形态酚类物质进行 AB-8 大孔树脂纯化，之后进行高效液相色谱分析及抗 AAPH 氧化溶血效果的测定。经 AB-8 大孔树脂纯化后，总酚含量依次为游离酚、束缚型酯型酚、束缚型苷型酚、可溶性苷型酚、可溶性酯型酚。而 HPLC 的分析结果显示，所检测到的 18 种酚类化合物的总量顺序依次是：束缚型酯型酚>游离酚>束缚型苷型酚>可溶性酯型酚>可溶性苷型酚。200 μg/mL 的游离型、束缚型和可溶型酯型酚可使 AAPH 溶血率降至约 10%，接近阴性对照组，而可溶性苷型酚仍为 28.84%。五类酚类物质的预处理使得 AAPH 损伤的人血红细胞内的 MDA 含量减少，GSH/GSSG 升高，使红细胞恢复到正常状态；SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活力较弱的红细胞也受到了保护。综上，经 AB-8 大孔树脂纯化后的高粱糠不同存在形态酚类物质可以保护人血红细胞免受 AAPH 的损伤，其细胞内抗氧化活性与总酚含量和酚类化合物的组成有联系。

关键词：高粱糠；酚类物质；AB-8 大孔树脂；抗氧化活性；人血红细胞
文章篇号：1673-9078(2017)9-63-70 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.009

Purification of Different Phenolic Compounds from Sorghum Bran on AB-8 Macroporous Resin and Protective Effects against Oxidative-stress-induced Erythrocyte Hemolysis

CHEN Hua-min, LAI Fu-rao, SUN Chong-zhen, ZHANG Meng-meng, WU Hui, TANG Yu-qian, LI Xiao-feng
(School of food science and engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Different types of phenols extracted from sorghum bran were purified on the AB-8 macroporous resin and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The inhibitory effects of the phenols on human-erythrocyte hemolysis caused by 2,20-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) were studied. The results showed that after purification on the AB-8 macroporous resin, phenol concentrations were in the following order: free phenols > insoluble bound esterified phenols > insoluble bound glycosidic phenols > soluble glycosidic phenols > soluble esterified phenols. According to the results of HPLC, the concentrations of 18 phenolic compounds were in the following order: insoluble bound esterified phenols > free phenols > insoluble bound glycosidic phenols > soluble esterified phenols > soluble glycosidic phenols. After the treatment with 200 μg/mL insoluble bound esterified, free, insoluble bound glycosidic, or soluble esterified phenols, the rate of AAPH-induced hemolysis of erythrocytes decreased to ~10%, which was close to that of the negative control group; the AAPH hemolysis rate of erythrocytes in the soluble glycosidic phenolic (200 μg/mL) treatment group was still 28.84%. Pretreatments with five different types of phenols effectively reduced the concentration of malondialdehyde (MDA), increased the glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) ratio in the AAPH-treated erythrocytes, and restored the erythrocytes to the normal state. The erythrocytes with relatively low superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were also protected. In conclusion, the different types of phenols from sorghum bran after purification on the AB-8 macroporous resin may protect human erythrocytes from the damage caused by AAPH-generated free radicals, and their intracellular antioxidant activity is related to their total

收稿日期：2017-05-20
基金项目：中央高校基本科研业务费专项资助项目（2013ZM0065）；广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室开放基金资助项目（201304）；广东省高等学校科技创新重点项目（2012CXZD0009）；国家自然科学基金项目（31201330）；广州市科技攻关项目（201300000202）
作者简介：陈华敏（1993-），女，硕士，研究方向：食品科学与工程
通讯作者：赖富饶（1981-），男，博士，讲师，研究方向：农产品深加工；吴晖（1967-），男，博士，教授，研究方向：食品安全与天然产物化学

phenolic content and composition of a mixture of phenolic compounds.

Key words: sorghum bran; phenols; AB-8 macroporous resin; antioxidant activity; human erythrocytes

高粱(*Sorghum bicolor* (*L.*) *Moench*)按性状及用途可将高粱分为食用高粱、糖用高粱和帚用高粱 3 类，全球 42%的高粱用于食品消费[1]。高粱适口性低于水稻和小麦，因此食用高粱逐渐减少，加上高粱综合利用与产品深加工技术研究少见，增产不增收，造成中国高粱种植面积缩减[2]，但是需求量却是在增加的，2014 年中国成为全球第一大高粱进口国，进口量和进口额均占全球的 70%以上，进口的大部分是饲用高粱，流向饲料企业[3]。

高粱作为食用和饲用时一般要经过碾磨去掉外种皮，而脱壳后的高粱籽粒，再次加工时脱下的皮层和少量胚和胚乳的混合物则是高粱糠。高粱糠是高粱加工过程中的副产品，富含原花青素、黄酮和酚酸等酚类化合物，是一个未被充分利用的的植物源性物质[4]。缩合单宁高粱品种的糠皮具有比蓝莓和草莓等更高的抗氧化活性[5]，可以被认为是天然抗氧化剂的一个很好的来源，在膳食中加入高粱糠可防止结肠癌的发生[6]。近年来高粱糠中酚类物质的研究还处在有机试剂粗提物的层面[7,8]，而且更多的是原花青素的提取及活性研究[9,10]。

高粱糠中不同存在形态酚类物质的提取及体外抗氧化活性的研究已有报道[11]，但体外抗氧化活性测定的化学法并不能展现出其在机体内的抗氧化效果和适用浓度范围。红细胞有典型的生物体细胞膜结构，在体外，诱导的氧化应激环境同样会使它发生氧化溶血，不含有细胞核和复杂的代谢途径，排除了自身的干扰因素，是评价抗氧化活性的理想模型[12]。本文用 AB-8 大孔树脂对高粱糠五类不同存在形态酚类物质进行纯化，并对纯化后的酚类物质进行液相分析，以及测定其对红细胞 AAPH 氧化溶血保护作用的测定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高粱糠（产地：山东省临沂市沂蒙山），过四十目筛，密封干燥处放置备用。

酚试剂，上海源聚生物科技有限公司；AB-8 大孔树脂；冰乙醇、甲醇、乙腈（色谱纯），阿拉丁试剂公司；二甲基亚砜（DMSO），MYM Biological Technology Company；人全血，广州鸿泉生物科技有限公司；2,2’-偶氮（二异丁基脒二盐酸盐）AAPH，上海麦克林生化科技有限公司；PBS，美国 Hyclone 公司；总蛋白(CBA)、丙二醛（MDA）、SOD、CAT、GSH-PX、GSH 和 GSSG 等试剂盒，南京建成生物科技有限公司。

标准品：没食子酸、3,4-二羟基苯甲酸、新绿原酸、对羟基苯甲酸、儿茶素、绿原酸、异绿原酸、咖啡酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、芦丁、阿魏酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、水杨酸、木犀草素、肉桂酸和山奈酚，阿拉丁公司。

丙酮、乙酸乙酯、正己烷、甲醇、氢氧化钠、浓盐酸、没食子酸、无水碳酸钠和乙醇等均为分析纯。

1.2 主要仪器及设备

Spectrumlab 752S 紫外可见分光光度计，上海棱光技术有限公司；6CE-60F-717P 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；SCIENTz-18N 冷冻干燥机，宁波新芝生物科技股份有限公司；1420 多微孔板检测器 Victor^3$_{TM}$ multilabel counter，美国 Perkin Elmer 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 高粱糠中不同存在形态酚类物质的提取[11]

按照文献[11]的方法进行提取后，45 ℃真空浓缩去除有机试剂后，冷冻干燥，4 ℃保存备用。

1.3.2 AB-8 大孔树脂纯化

AB-8 大孔吸附树脂经过预处理后，采用湿法装柱（150 mm×20 mm），用蒸馏水过夜洗脱，流速 1 mL/min，使柱床紧实。将五种不同存在形态酚类物质的乙酸乙酯萃取冻干粉配制成溶液，300 mg/5 mL，缓慢上样后避光吸附 4 h；再用 300 mL 去离子水洗脱除去水溶性杂质，流速 1 mL/min；接着用 500 mL 70%乙醇水溶液进行洗脱，将收集到的洗脱液 45 ℃真空浓缩后，冷冻干燥。

1.3.3 总酚含量测定

测定 AB-8 大孔树脂纯化前后不同存在形态酚类物质的总酚含量。测定方法参照文献[11]。

1.3.4 高效液相色谱分析

参考文献[12]的方法，但对洗脱程序和流速条件作了修改。洗脱程序：0~30 min，100% B~85% B；30~45 min，85% B~67% B；45~70 min，67% B~50% B；70~75 min，50% B~0% B。流速为 0.6 mL/min。其余条件不变。将酚类化合物的标准品配置成一定浓度的溶液，按上述色谱条件测定并制作标准曲线，采用外标法进行定量。将纯化后的高粱糠五类酚类物质配置成 2

mg/mL 的溶液。每种酚类化合物的含量用 μg/g powder 表示。

1.3.5 AAPH 氧化溶血率的测定

将加有肝素抗凝剂的人全血在 4 ℃、1200 g 离心 10 min，使红细胞和血浆分离，红细胞沉淀用 pH 7.4 的 PBS 清洗至上清液澄清透明。吸取一定量红细胞沉淀，用 PBS 稀释成约 20%的红细胞悬液。红细胞氧化溶血实验参考张虹等[13]的方法进行，稍有修改。将实验组分为 A 组为阴性对照组；B 组为阳性对照组；C 组为样品保护组；D 组为毒性对照组；E 组为全溶血组。A 组：0.2 mL 红细胞悬液+0.2 mL PBS→37 ℃摇床 180 r/min 振荡预培养 30 min→0.4 mL PBS；B 组：0.2 mL 红细胞悬液+0.2 mL PBS→37 ℃摇床 180 r/min 振荡预培养 30 min→0.4 mL AAPH；C 组：0.2 mL 红细胞悬液+0.2 mL 不同浓度样品溶液（10、25、50、100、200、300、300 μg/mL，PBS 配制）→37 ℃摇床 180 r/min 振荡预培养 30 min→0.4 mL AAPH；D 组：0.2 mL 红细胞悬液+0.2 mL 样品溶液（300 μg/mL）→37 ℃摇床 180 r/min 振荡预培养 30 min→0.4 mL PBS；E 组：0.2 mL 红细胞悬液+0.2 mL 蒸馏水→37 ℃摇床 180 r/min 振荡预培养 30 min→0.4 mL 蒸馏水。之后再将上述所有实验组置于 37 ℃摇床 180 r/min 振荡反应 2 h，加入 5 mL PBS，1200 g 下离心 10 min 后，取上清于 540 nm 处测得吸光值分别为 A_a、A_b、A_c、A_d 和 A_e。

样品保护组溶血率%=A_c/A_e×100

阳性对照组溶血率%=A_b/A_e×100

阴性对照组溶血率%=A_a/A_e×100

毒性对照组溶血率%=A_d/A_e×100

1.3.6 红细胞内 MDA、GSH 和 GSSG 含量的测定

将经 1.3.5 处理后的红细胞用 PBS 洗涤 2~3 次，加入约 4 倍体积超纯水裂解细胞，冰浴 10 min 后于 4 ℃、1200 g 离心 5 min，上清液-80 ℃冰箱保存备用，按试剂盒标明方法测量总蛋白 CBA、丙二醛 MDA，还原性谷胱甘肽 GSH，氧化型谷胱甘肽 GSSG 的含量。

1.3.7 红细胞内抗氧化酶活力的测定

将经 1.3.5 处理后的红细胞裂解液按照试剂盒的说明说明书测定细胞内超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT 以及谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 的酶活力。酶活力单位定义如下，SOD：在该反应体系中 SOD 抑制百分率达到 50%时，反应体系中的 SOD 酶活力为一个酶活力单位；CAT：每秒钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为一个酶活力单位；GSH-Px：5 min 内使 GSH 浓度降低 1 μmol 为一个酶活力单位。

1.3.8 数据统计分析

所有试验均做 3 组平行，结果以平均值±标准方差(mean±SD)表示。Origin 8.5.1 作图，采用 SPSS 17.0 统计软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's multiple range test 方法进行数据统计。

2 结果与讨论

2.1 AB-8 大孔树脂纯化后高粱糠不同存在酚类物质的总酚含量及酚类化合物组成

大孔树脂由于具有比表面积大、吸附容量大、选择性好、再生处理方便和吸附速度快等特点，特别适合于从水溶液中分离天然化合物。它的吸附作用与表面吸附、表面电性或形成氢键等有关。AB-8 大孔树脂广泛用于酚类物质的层析纯化[14,15]。选用 AB-8 树脂为吸附材料作柱层析纯化，对乙酸乙酯萃取得到的酚类物质进行进一步的纯化，除去杂质，尽可能的回收全部的酚类物质。

纯化前后的总酚含量如表 1 所示，其中游离酚和可溶性酚的纯度提高较大，可能是由于其提取方法的差异而含有较多的色素杂质，AB-8 大孔树脂可有效地吸附除去这些杂质，而使得其总酚含量得到较大程度

表 1 AB-8 大孔树脂纯化前后五类酚类物质的总酚含量

Table 1 Total phenolic content of the five different types of polyphenols before and after purification on the AB-8 macroporous resin

酚类物质	总酚含量 mg GAE/g powder		纯度提高率/%
	纯化前	纯化后	
游离酚	168.28±4.77^{b}	307.27±3.43^{a}	82.65
可溶性酯型酚	172.07±2.73^{b}	210.134±1.18^{e}	22.12
可溶性苷型酚	153.31±8.95^{c}	217.34±4.92^{d}	41.77
束缚型酯型酚	224.01±7.40^{a}	249.37±3.33^{b}	11.32
束缚型苷型酚	216.05±5.97^{a}	231.55±2.05^{c}	7.18

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一列数据中，小写字母完全不同时，表示不同酚含量存在显著性差异（p<0.05，n=3）。

的提高。纯化后得到的五类酚类物质冻干粉的总酚含量最高的是游离酚，307.27 mg GAE/g powder；束缚型酯型酚（249.37 mg GAE/g powder）、束缚型苷型酚（231.55 mg GAE/g powder）总酚含量次之，可溶性苷型酚（210.13 mg GAE/g powder）含量较低，可溶性酯型酚（217.34 mg GAE/g powder）含量最少。

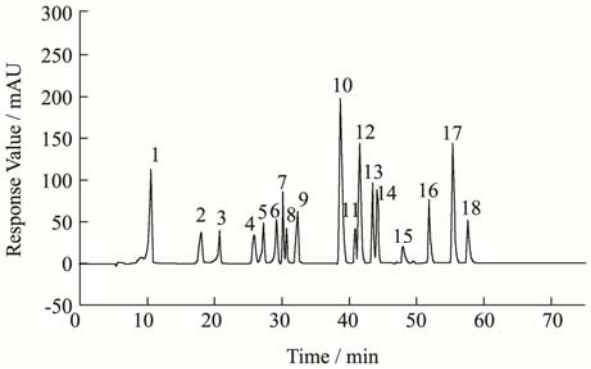


图 1 18 种酚类化合物标准混合样品液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of eighteen mixed phenolic standards

本次实验选择了 18 种酚类化合物标准品，混合标准品的液相图谱如图 1 所示，出峰顺序可看表 2。对 AB-8 大孔树脂纯化后的高粱糠酚类物质也进行了 HPLC 分析，由表 2 可知，所检测到的 18 种酚类化合物的总量顺序依次是：束缚型酯型酚>游离酚>束缚型苷型酚>可溶性酯型酚>可溶性苷型酚。纯化过程会使部分酚类物质富集或损失。如水杨酸，在高粱糠中所占的比例较大[11]，但纯化后，比例减少；而对香豆酸的比例则升高。游离酚中的酚类物质种类比较多，而且含量都是比较相近，比较突出的是木犀草素（19096.11 μg/g powder，16.62%）和山柰酚（28261.09 μg/g powder，24.59%）。而可溶性酯型酚中含量较多的是阿魏酸（9574.89 μg/g powder，22.64%）。可溶性苷型酚中的酚类化物含量都较少，相对较多的是对羟基苯甲酸（1866.31 μg/g powder，16.08%）和隐绿原酸（1838.06 μg/g powder，15.84%）。束缚型酯型酚和束缚型苷型酚的对香豆酸和阿魏酸所占比例较大，与高粱糠中含量相吻合[11]，纯化过程未造成对香豆酸和阿魏酸过多损失。所测定的总酚含量与 18 种酚类单体的总量有较大差异，这可能是由福林酚测定方法的局限性造成的，另外，液相图谱中还有部分未知的峰未找到匹配的标准品。

表 2 AB-8 大孔树脂纯化后高粱糠不同存在酚类物质的酚类化合物组成

Table 2 Content of phenolic compounds of the five different forms of polyphenols after purification with AB-8 macroporous resin

出峰顺序	酚类化合物	μg/g powder				
		游离酚	可溶性酯型酚	可溶性苷型酚	束缚型酯型酚	束缚型苷型酚
1	没食子酸	346.87±0.29^{m}	901.72±6.39^{ij}	606.43±1.45^{e}	300.26±3.78^{l}	314.94±3.63^{l}
2	3,4-二羟基苯甲酸	1376.00±4.40^{k}	806.41±11.37^{j}	634.10±14.31^{e}	1023.86±133.95^{i}	803.29±2.57^{k}
3	新绿原酸	290.19±17.07^{m}	-	-	602.81±42.23^{jk}	-
4	对羟基苯甲酸	7905.53±16.24^{e}	4972.06±20.63^{d}	1866.31±134.33^{a}	2963.02±10.98^{e}	5203.64±15.37^{de}
5	绿原酸	909.41±13.95^{l}	2613.44±33.93^{f}	1005.90±1.13^{d}	496.26±3.39^{kl}	-
6	隐绿原酸	2610.92±166.98^{j}	1907.83±37.19^{g}	1838.06±18.22^{a}	2091.39±10.63^{g}	-
7	咖啡酸	3565.42±15.03^{i}	-	-	1615.58±2.82^{h}	5448.86±109.89^{cd}
8	香草酸	9278.89±460.92^{c}	5510.69±377.95^{b}	1596.01±30.71^{b}	2056.41±12.66^{g}	5602.13±96.17^{e}
9	丁香酸	9120.37±138.47^{c}	1920.56±89.71^{g}	1046.61±9.43^{d}	637.82±4.04^{jk}	1329.10±32.33^{j}
10	对香豆酸	8402.22±518.14^{d}	5273.29±37.04^{c}	293.10±28.19^{f}	61114.06±78.71^{a}	32965.27±11.11^{a}
11	芦丁	7339.11±374.23^{f}	894.18±74.85^{ij}	-	2109.07±11.64^{g}	3282.21±219.90^{g}
12	阿魏酸	4630.50±354.87^{h}	9574.89±61.04^{a}	558.53±38.13^{e}	36705.62±63.79^{b}	16012.44±61.96^{b}
13	异绿原酸 B	578.78±3.07^{l}	1843.54±52.11^{g}	-	5034.58±222.05^{d}	3761.87±152.23^{f}
14	异绿原酸 A	1359.50±12.35^{k}	298.69±0.69^{k}	-	2646.10±333.21^{f}	1765.00±120.04^{h}
15	水杨酸	6329.01±236.91^{g}	1528.29±40.61^{i}	-	6743.83±464.80^{c}	1513.93±63.18^{ij}
16	木犀草素	19096.11±76.25^{b}	4582.21±63.11^{e}	1241.87±24.81^{c}	4955.22±81.35^{d}	5729.62±147.75^{c}
17	肉桂酸	3514.41±42.69^{i}	1573.42±11.85^{h}	1238.56±4.87^{c}	736.13±2.27^{j}	-
18	山柰酚	28261.09±212.63^{a}	-	-	-	-
	总	114914.32±35.13	42285.65±325.04	11605.79±81.09	131832.01±48.66	83732.29±807.99

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一列数据中，小写字母完全不同时，表示存在显著性差异（p<0.05，n=3），“-”表示未检测到

2.2 高粱糠不同存在酚类物质对红细胞 AAPH 氧化溶血的保护作用

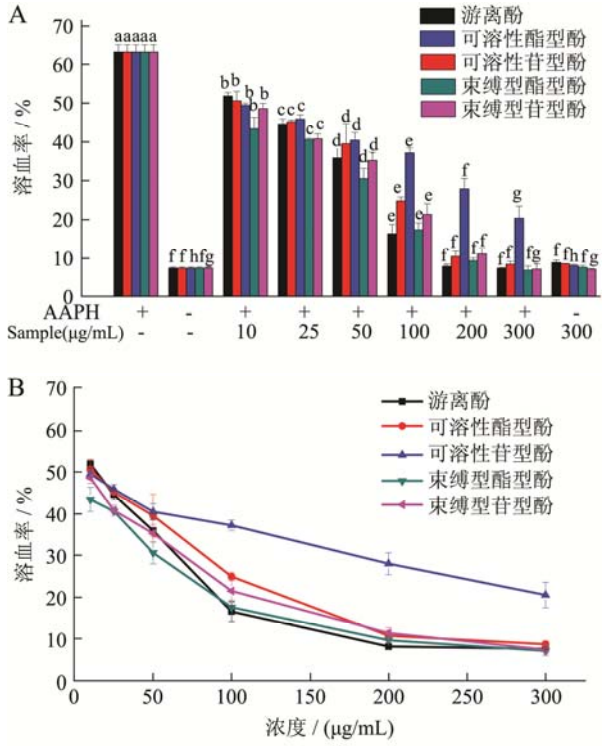


图 2 高粱糠不同存在形态酚类物质对人血红细胞 AAPH 氧化溶血的保护作用

Fig. 2 Protective effects of the different types of polyphenols on AAPH-induced hemolysis of human erythrocytes

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一组数据中，小写字母完全不同时，表示存在显著性差异（p<0.05，n=3）。

红细胞细胞结构简单，是抗氧化评价方法的常用理想模型，氧化剂，如 AAPH 和 H_2O_2 等产生的自由基可诱导红细胞脂质过氧化，使红细胞膜完整性受到损害，最终导致溶血现象，抗氧化剂则可以抑制此现象，保护红细胞不受氧化剂影响，可以利用红细胞的溶血抑制率来评价抗氧化剂对红细胞的保护作用及其抗氧化活性[16]。本文对高粱糠不同存在形态酚类物质抑制 AAPH 对红细胞的氧化溶血损伤进行测定比较，见图 2A，空白组的红细胞损伤率为 7.48%，而毒性对照组中，不加 AAPH，只加入 300 μg/mL 游离酚、可溶性酯型酚、可溶性苷型酚、束缚型酯型酚或束缚型苷型酚的红细胞溶血率分别为 8.93%、8.64%、8.13%、7.66%和 7.20%，与空白组的溶血率不存在显著性差异，说明 300 μg/mL 的高粱糠酚类物质样品对红细胞无毒害作用，对实验无影响。

加入 AAPH 而未加样品保护的红细胞溶血率为 63.21%，而高粱糠不同存在形态酚类物质的加入使溶血现象得到抑制，溶血率降低，且随着剂量的增大，溶血率下降，对红细胞的保护作用也明显。但五类不同存在形态的酚类物质对红细胞溶血的抑制作用存在着差异，见图 2B。当浓度达到 200 μg/mL，加入游离型、束缚型和可溶型酯型酚，溶血率已降至 10%，而可溶性苷型酚的溶血率仍为 28.84%。游离酚总酚含量最高，而束缚型酯型酚因含有高含量的对香豆酸和阿魏酸，二者对 AAPH 诱导的红细胞溶血的抑制作用相近且较高；束缚型苷型酚、可溶性酯型酚次之；可溶性苷型酚最弱，有可能是因其总酚含量较低，且测得的酚类化合物单体的含量都远远低于其他酚类物质。有文献表明，四种谷物总多酚（包括游离型和结合型）抑制小鼠红细胞 H_2O_2 血溶性比较测定表明高粱辽甜 1 号对小鼠红细胞的溶血性抑制作用最强[17]。而谷物中酚类物质主要集中于糠和麸中，对高粱糠中的酚类物质进行人血红细胞的实验更具现实意义。陈彩薇[18]对米糠中的不同存在形态酚类物质也进行了羊血红细胞的抗 AAPH 氧化溶血的测定，谷物酚类物质表现出较高的细胞抗氧化活性。

2.3 高粱糠不同存在形态酚类物质抑制红细胞内 MDA 的积累

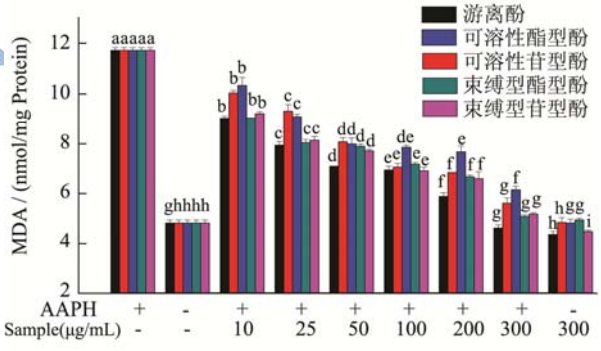


图 3 高粱糠不同存在形态酚类物质处理后红细胞 MDA 含量的变化

Fig. 3 Changes in the MDA content of erythrocytes after the treatment with different types of phenols from sorghum bran

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一组数据中，小写字母完全不同时，表示存在显著性差异（p<0.05，n=3）。

自由基过剩时会攻击细胞膜脂质，引起脂质过氧化并导致脂质过氧化终产物丙二醛（MDA）的积累。MDA 在细胞内的含量过高会破坏细胞膜的结构和功能，引起细胞代谢紊乱及功能障碍最终导致细胞凋亡。AAPH 诱导损伤时，红细胞由膜表面光滑的中间凹陷

的圆饼状变成表面粗糙不平，细胞膜棘状凸起的小刺球；当有了抗氧化剂的保护时，细胞形态又接近正常形态[19]，抑制细胞内 MDA 含量的积累可保护细胞膜。图 3 显示，加入 AAPH 诱导损伤红细胞的 MDA 含量由 4.81 nmol/mg Protein 增至 11.73 nmol/mg Protein。而很明显，而在高粱糠酚类物质的保护下，MDA 的含量有了不同程度的下降，说明高粱糠酚类物质可以一直 AAPH 诱导的红细胞膜脂质过氧化，减少 MDA 的积累。山奈酚[20]、咖啡酸[19]和茶多酚[21]等酚类物质可明显抑制 AAPH 损伤后 MDA 的产生。

不同的酚类物质样品所显示的抑制效果有所差异。300 μg/mL 游离型、束缚型酯型酚和束缚型苷型酚的加入可使 MDA 的含量降至约 5 nmol/mg Protein，而可溶性苷型酚的仍为 6.15%。游离酚、束缚型酯型酚和束缚型苷型酚对 AAPH 诱导的红细胞细胞膜脂质过氧化具有更强的抑制作用，可溶性酯型酚次之，可溶性苷型酚最弱，这与红细胞溶血的抑制作用相一致。

2.4 高粱糠不同存在形态酚类物质处理后红细胞内 GSH、GSSG 含量变化

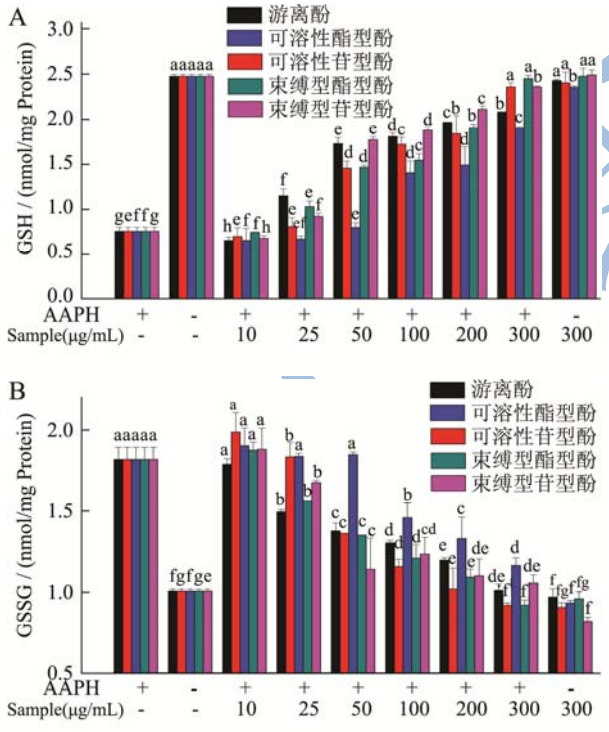


图 4 高粱糠不同存在形态酚类物质处理后红细胞 GSH（A）和 GSSH（B）含量的变化

Fig.4 Changes in GSH (A) and GSSH (B) content in erythrocyte after the protection of different forms of phenols from sorghum bran

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一组数据中，小写字母完全不同时，表示存在显著性差异（$p<0.05$，n=3）。

谷胱甘肽（GSH）是广泛存在于体内，是重要的抗氧化剂和自由基清除剂，谷胱甘肽氧化型（GSSG）为 GSH 的氧化形式，当机体处于正常生理状态下，二者构成动态平衡，GSH/GSSG 维持在高比率，形成有效的抗氧化系统。而在氧化应激时，GSH 氧化成 GSSG，GSH/GSSG 比率下降，故可借以评估氧化损伤情况。

本实验对高粱糠酚类物质和 AAPH 处理的红细胞中 GSH 和 GSSG 的含量进行测定，结果如图 4 所示。红细胞在正常的生理状态下，GSH 的含量高于 GSSG。未加样品进行保护只有 AAPH 损伤处理的红细胞，GSH 含量从 2.47 nmol/mg protein 急剧降至 0.75 nmol/mg protein。与此同时，GSSG 的含量从 1.00 nmol/mg protein 上升至 1.82 nmol/mg protein。经高粱糠酚类物质的预处理，红细胞中的 GSH 氧化成 GSSG 的过程被抑制，红细胞内的 GSH 含量显著增加，而 GSSG 的含量得到了控制并使其下降，高粱糠酚类物质可有效的抑制 AAPH 诱导的氧化应激，使 GSH 和 GSSG 的回到平衡状态，并且存在剂量依赖性。蜂蜜中的酚类提取物也可通过抑制 GSH 的减少来抵抗 AAPH 氧化性溶血，且酚类物质的浓度越高，GSH 的含量升高[22]。但同等质量浓度的不同酚类物质的抑制效果有所差异。当浓度达到 300 μg/mL，束缚型酯型酚和可溶性酯型酚的处理可使红细胞的 GSH 和 GSSG 恢复到正常水平；虽然 300 μg/mL 的束缚型苷型酚和游离酚对红细胞的溶血抑制率已达到了 90%，但 GSSG 和 GSH 的含量与正常水平略有偏差，而可溶性苷型酚的效果则是最弱的。这可能与高粱糠不同存在形态酚类物质之间的抗氧化能力的差异有关[11]。

2.5 高粱糠不同存在形态酚类物质红细胞抗氧化酶平均酶活力的变化

成熟红细胞不仅无细胞核，而且也无线粒体、核蛋白体等细胞器，不能进行核酸和蛋白质的生物合成，主要靠成熟期以前合成的酶来进行正常的运转。在氧化应激的环境中，抗氧化物酶活力高的红细胞更有机会存活下来[23]。而本实验测定的是存活细胞中的平均酶活力，越多的酶活力低的红细胞因受到保护而存活，测得的平均酶活力则更低。从数据可看出，AAPH 损伤的阳性对照组的存活的红细胞中 SOD、CAT 和 GPx 平均酶活力分别为 39.82、53.11 和 318.07 U/mg Protein，比阴性对照组的平均酶活力 23.96、31.16 和

205.55 U/mg Protein 要高，而高粱糠酚类物质的预处理保护了红细胞不受自由基的攻击，部分过氧化物酶酶活力较低的红细胞因受保护而存活下来。

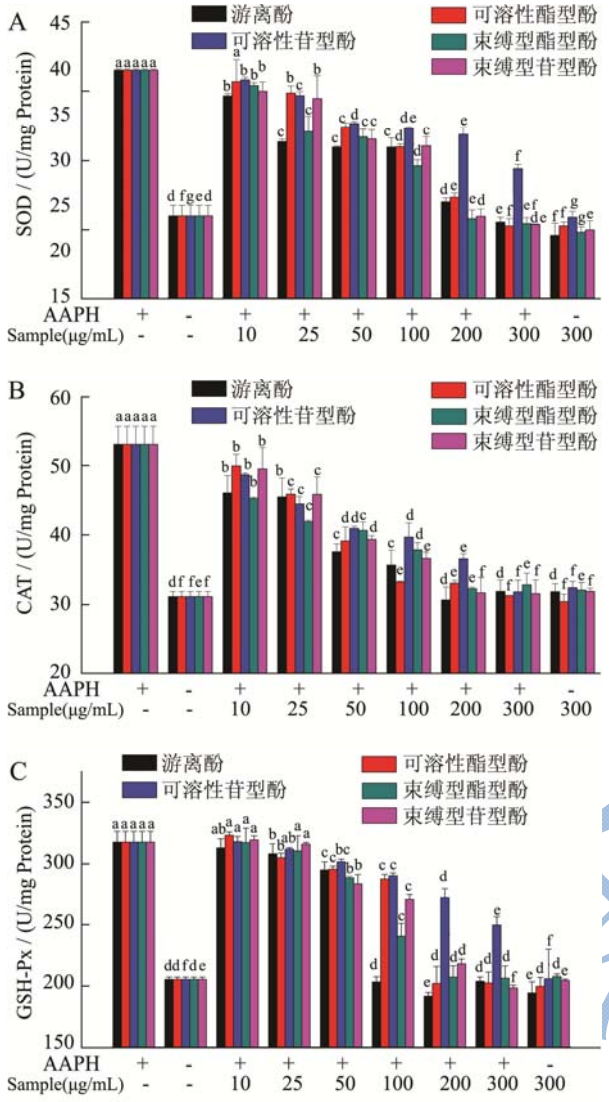


图 5 高粱糠不同存在形态酚类物质处理后红细胞平均抗氧化物酶活力 SOD（A）、CAT（B）和 GSH-Px（C）的变化

Fig.5 Changes of average activity of antioxidant enzymes SOD (A), CAT (B), GSH-Px (C) in erythrocytes after the treatment with different types of phenols from sorghum bran

注：采用 Duncan's multiple range test 进行分析。同一组数据中，小写字母完全不同时，表示存在显著性差异（p<0.05，n=3）。

作用浓度为 200 μg/mL 的时候，可溶性苷型酚类物质处理的红细胞的 SOD 和 GPx 平均酶活力分别为 32.88 和 272.54 U/mg Protein，其它酚类物质处理后的红细胞的 SOD、GPx 平均酶活力已接近阴性对照，可能是在同样的质量浓度下可溶性苷型酚对 SOD、GPx 酶活力较弱的红细胞的保护作用不如其他四类酚类物质，而五类酚类物质对 CAT 酶活力较弱的细胞保护效果相似。保护作用的强弱则很有可能是因为高粱糠可溶性苷型酚中的部分酚类化合物单体的含量均远远低于其他四类酚类物质。

3 结论

本文对高粱糠提取得到的五类酚类物质进行了 AB-8 大孔树脂纯化，纯化后得到的五类酚类物质冻干粉的总酚含量有了不同程度的提高，含量高低顺序依次是游离酚、束缚型酯型酚、束缚型苷型酚、可溶性苷型酚、可溶性酯型酚。而高效液相色谱法检测分析显示，所检测到的 18 种酚类化合物的总量顺序依次是：束缚型酯型酚>游离酚>束缚型苷型酚>可溶性酯型酚>可溶性苷型酚。利用体外红细胞抗氧化模型来评价酚类物质的抗氧化活性，游离酚和束缚型酯型酚对 AAPH 诱导的红细胞溶血的抑制作用较高；束缚型苷型酚、可溶性酯型酚次之；可溶性苷型酚最弱。与 AAPH 损伤组相比，高粱糠中不同存在形态酚类物质处理后，红细胞内的 MDA 含量减少，GSH/GSSG 升高，使细胞恢复到正常状态；SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活力较弱的红细胞也受到了保护而存活下来，说明高粱糠中不同存在形态酚类物质保护了红细胞免受 AAPH 的损伤。但可溶性苷型酚的保护作用相较而言较弱，有可能是因其总酚含量较低，且测得的酚类化合物单体的含量都远远低于其他酚类物质。

本实验以红细胞为模型测定了高粱糠不同存在形态酚类物质的抗氧化效果，为高粱糠酚类物质在功能性食品方面的应用提供了研究基础。对于高粱糠中提取得到的一些未知或含量较高的酚类化合物可再进一步的分离纯化，从而更全面地对高粱糠酚类物质进行研究。

参考文献

[1] Althwab S, Carr T P, Weller C L, et al. Advances in grain sorghum and its co-products as a human health promoting dietary system [J]. Food Research International, 2015, 77: 349-359

[2] 翟世宏,白文斌,贺文文,等.我国酿造高粱生产现状及发展趋势[J].现代农业科技,2014,2:93-94
ZHAI Shi-hong, BAI Wen-bin, HE Wen-wen, et al. The production situation and development trend of China's brewing sorghum [J]. Modern Agricultural Technology, 2014, 2: 93-94

[3] 刘慧,周向阳.国内外高粱贸易现状及发展趋势[J].农业展望,2016,8:63-66
LIU Hui, ZHOU Xiang-yang. Sorghum trade status quo and

development trend at home and abroad [J]. Agricultural Outlook, 2016, 8: 63-66

[4] Awika J M, Rooney L W, Wu X, et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(23): 6657-6662

[5] Awika J M, Rooney L W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health [J]. Phytochemistry, 2004, 35(38): 1199-1221

[6] N D Turner, S S Taddeo, J B Lewis, et al. Rats consuming bran from black and brown sorghums have lower short chain fatty acid concentrations and fewer aberrant colonic crypts [J]. FASEB J ,2009, 23(1): 560-562

[7] Burdette A, Garner P L, Mayer E P, et al. Anti-inflammatory activity of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans [J]. Journal of Medicinal Food, 2010, 13(4): 879-887

[8] 李歌,张超,苏优拉,等.高粱糠乙醇提取物对 4 种植物油氧化稳定性的影响[J].食品工业科技,2017,3:118-121,126
LI Ge, ZHANG Chao, SU You-la, et al. Effect of ethanol extracts from sorghum bran on oxidative stability of four kinds of vegetable oils [J]. Food Industry Technology, 2017, 3: 118-121, 126

[9] Hargrove J L, Greenspan P, Hartle D K, et al. Inhibition of aromatase and α-amylase by flavonoids and proanthocyanidins from *Sorghum bicolor* bran extracts [J]. Journal of Medicinal Food, 2011, 14(7-8): 799-807

[10] 黄曼.原花青素四聚体干预变形链球菌血清型 c 体外粘附途径及机理研究[D].武汉:华中农业大学,2013
HUANG Man. *In vitro* of effects and mechanism of proanthocyanidins tetramers intervene *S.mutans Ingbritt* (c) in adherent pathway [D]. Wuhan: Central China Agricultural University, 2013

[11] 陈华敏,吴晖,赖富饶,等.高粱糠中不同存在形态酚类物质的组成及抗氧化活性[J].现代食品科技,2016,32(8):77-82
CHEN Hua-min, WU Hui, LAI Fu-rao, et al. Composition and antioxidant activity of different forms of phenolic compounds from sorghum bran [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(8): 77-82

[12] 杜小燕.泡盛曲霉发酵麦麸过程中酚类物质含量的变化与生物活性的相关性研究[D].广州:华南理工大学,2014
DU Xiao-yan. Study on correlations between contents of phenolic compounds of wheat bran fermented by *Aspergillus Awamori* and activities of three types of enzyme and biological activities [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014

[13] 张虹,张猛猛,赖富饶,等.甜菜碱保护细胞免受 AAPH 损伤的研究[J].现代食品科技,2016,32(6):18-23
ZHANG Hong, ZHANG Meng-meng, LAI Fu-rao, et al. Protective effects of betaine on 2,2-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress in cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(6): 18-23

[14] Xi L, Mu T, Sun H. Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas*, L.) leaves by AB-8 macroporous resins [J]. Food Chemistry, 2015, 172(172): 166-174

[15] 吴海霞,吴彩娥,李婷婷,等.大孔树脂纯化银杏叶黄酮的研究[J].现代食品科技,2013, 29(12):2964-2969
WU Hai-xia, WU Cai-e, LI Ting-ting, et al. Purification of flavones from *Gingko biloba* leaves by macroporous resin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 2964-2969

[16] 何佳易.红细胞氧化模型评价抗氧化活性的方法学研究[D].扬州:扬州大学,2013
HE Jia-yi. Methodological study on evaluation of antioxidant activity by hemolysis model [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013

[17] 申迎宾.四种谷物多酚抗氧化、降血脂作用评价研究[D].无锡:江南大学,2016
SHEN Ying-bin. Antioxidant activity and hypolipidemic effects of polyphenol extracted from four grains [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016

[18] 陈彩薇.脱脂米糠中不同存在形态酚类物质的抑菌和抗氧化活性研究[D].广州:华南理工大学,2016
CHEN Cai-wei. Antibacterial activity and antioxidant activity of different form phenolics from defatted rice bran [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016

[19] Wang G, Lei Z, Zhong Q, et al. Enrichment of caffeic acid in peanut sprouts and evaluation of its *in vitro*, effectiveness against oxidative stress-induced erythrocyte hemolysis [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 332-341

[20] Liao W, Chen L, Ma X, et al. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016: 114-124

[21] Liu S, Huang H. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 1095-110

[22] Alvarezsuarez J M, Giampieri F, Gonzálezparamás A M, et al.

Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage [J]. Food & Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1508-1516

[23] Zhang M, Zhang H, Li H, et al. Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64(42): 7921-793

现代食品科技