

黑豆皮多酚提取物抗氧化活性研究

Study on antioxidant activities of various solvent polyphenol extracts from black soybean seed coat

任曼妮 王存堂 唐旭华 孙 鹏 高曾明

REN Man-ni WANG Cun-tang TANG Xu-hua SUN Peng GAO Zeng-ming

(齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

摘要:以黑豆皮为原料,分别利用体积分数 70% 的甲醇、乙醇和丙酮作为提取溶剂进行多酚类物质提取,研究提取物中总酚、总黄酮含量及抗氧化活性。结果显示:丙酮提取物的多酚得率最高 $[(11.23 \pm 0.05) \text{ g}/100 \text{ g}]$,且提取物中的总酚含量为 $(845.32 \pm 21.35) \text{ mg/g}$,总黄酮含量为 $(63.72 \pm 2.35) \text{ mg/g}$ 。同时,丙酮提取物对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的 IC_{50} 分别为 (0.059 ± 0.005) , $(0.057 \pm 0.004) \text{ mg/mL}$,其抗氧化能力低于抗坏血酸而高于甲醇和乙醇提取物。

关键词:黑豆皮;总酚;总黄酮;抗氧化活性

Abstract: Black soybean seed coat were extracted using three solvent systems: 70% acetone, ethanol and methanol. The extracts were tested for their total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activities. The results showed that the extracts with acetone as the extraction agent had the highest yield $[(11.23 \pm 0.005) \text{ g}/100 \text{ g}]$, and the extracts had the highest total phenol content of $(845.32 \pm 21.35) \text{ mg/g}$ and total flavonoids content of $(63.72 \pm 2.35) \text{ mg/g}$. Meanwhile, IC_{50} of acetone extract on DPPH free radical and ABTS free radical were $(0.059 \pm 0.005) \text{ mg/mL}$ and $(0.057 \pm 0.004) \text{ mg/mL}$, respectively. The antioxidant activities were lower than ascorbic acid but higher than methanol extracts and ethanol extracts.

Keywords: black soybean seed coat; total phenol; total flavonoid; antioxidant activity

黑豆是一年生草本豆科植物,原产于中国东北三省、

安徽、河南、河北、山东等。其形状多呈扁圆、长椭圆形或肾状形。黑豆作为药食两用物质,历史久远^[1]。黑豆营养物质丰富,被誉为“植物蛋白之王”^[2]。此外,黑豆还富含植物活性物质,具有比其他可食用豆类更高的酚类物质和抗氧化性^[3],且这些酚类物质多集中在黑豆皮中^[4]。

Xu 等^[5]通过 HPLC 从黑豆中分析出 12 种异黄酮类化合物;Feng 等^[6]通过 HPLC 从黑豆中鉴定出 4 种异黄酮;Lee 等^[7]分析了黑豆中花青素的组成。研究^[5,8]表明,黑豆皮所富含的酚类化合物使得黑豆比其他豆类具有更高的自由基清除能力和总抗氧化能力。黑豆皮中的酚类物质具有很多生物活性,如抗辐射、抗氧化、抗脂肪和降血脂、降血糖、促进伤口愈合、抗炎等。Kwon 等^[9]通过高脂肪喂养小鼠,表明黑豆皮提取物可以转变高脂肪饮食对体重、血清脂质的影响;Wang 等^[10]通过建立高血糖小鼠模型,证明了黑豆皮提取物具有改善氧化应激诱导的小鼠高血糖症状。此外,Nizamutdinova 等^[11]发现黑豆皮提取物对伤口愈合有促进作用。

试验拟以黑豆皮为原料,分别利用体积分数 70% 的甲醇、乙醇和丙酮作为提取溶剂进行多酚类物质提取,测定提取物中总酚、总黄酮含量及抗氧化活性,为黑豆营养功能的深度开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黑豆皮:市售,粉碎,过 80 目筛备用;

ABTS、DPPH:分析纯,美国 Sigma-Aldrich 化学试剂公司;

没食子酸标准品、芦丁标准品、Folin-酚试剂、2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、碳酸钠、丙酮、甲醇、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、硫酸亚铁、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁:分析纯,天津凯通化学试剂公司。

基金项目:2019 大学生创新创业项目(编号:2019102332172);黑龙江省教育厅基本业务专项(编号:YSTSXK201812, LTSW201723,135309213)

作者简介:任曼妮,女,齐齐哈尔大学助教,硕士。

通信作者:王存堂(1980—),男,齐齐哈尔大学教授,博士。

E-mail: robbertwang@163.com

收稿日期:2019-05-20

1.1.2 仪器与设备

电子分析天平:ME204 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

高速万能粉碎机:FW100 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-5100 型,上海元析仪器有限公司;

高速离心机:LG10-24A 型,北京京立离心机有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-6 型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;

旋转蒸发仪:RE-200A 型,上海亚荣生化仪器厂;

真空冷冻干燥机:LGI-25C 型,北京四环科学仪器厂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 黑豆皮多酚类物质的提取 称取 0.5 g 黑豆皮粉,分别用 20 mL 体积分数为 70% 的乙醇、甲醇、丙酮避光震动提取 20 min,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液。沉淀用同样的方法再次提取,合并两次所得上清液,50 ℃ 真空下浓缩 2 h,再转至 -40 ℃ 真空干燥 48 h。粉末于 -20 ℃ 密封储存备用。按式(1)计算多酚物质得率。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100, \quad (1)$$

式中:

c ——多酚物质得率, g/100 g;

m_1 ——提取物干粉质量, g;

m_2 ——黑豆皮干粉质量, g。

1.2.2 总酚含量测定 采用福林酚法,参考 Xue 等^[12]方法并稍作修改。取 0.15 mL 提取液稀释至 0.1 mg/mL,于 10 mL 具塞比色管中,加入 10 倍稀释的 0.2 mol/L 福林酚试剂,利用涡旋混匀器混匀,静置 5 min。然后加入 6% (体积分数) Na_2CO_3 溶液 1.5 mL,将此混合液于 75 ℃ 下水浴 10 min,随后立即冰浴终止反应,用蒸馏水定容至刻度。于 725 nm 处测定反应液吸光值。同时以 0.15 mL 甲醇代替提取液作空白对照,配置不同浓度梯度没食子酸标准品制作标准曲线($y=0.031x+0.013, R^2=0.998$)。总酚含量以每克黑豆皮提取物干基中所含没食子酸当量的毫克数表示,重复测定 3 次。

1.2.3 总黄酮含量测定 参考 Zhang 等^[13]的三氯化铝分光光度法略加改动。取 1 mL 提取液稀释至 0.1 mg/mL,于 10 mL 具塞比色管中,加入 5 g/L NaNO_2 溶液 0.3 mL 摇匀,静置 6 min 后再加入 10 g/L $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液 0.3 mL,静置 6 min。加入 10% (质量分数) NaOH 溶液 4.0 mL,用蒸馏水定容,静置 15 min,于 510 nm 下测其吸光值。同时以 1 mL 甲醇代替提取液作空白对照,配置不同浓度梯度芦丁标准品制作标准曲线($y=1.016x-0.012, R^2=0.998$),总黄酮含量以每克黑豆

皮提取物干基中芦丁当量毫克数表示。重复测定 3 次。

1.2.4 DPPH 自由基清除性能测定 参考 Bakar 等^[14]的方法并略有改动。吸取 0.4 mL 不同浓度(0.012 5~0.200 0 mg/mL)提取液于试管中,再加入 0.1 mmol/L DPPH 甲醇溶液 4.5 mL (Abs 为 1.00 ± 0.02 ,临用现配),充分摇匀后避光反应 30 min,以甲醇代替样品提取液为空白调零,517 nm 下测定吸光度值,配置不同浓度的抗坏血酸(0.012 5~0.200 0 mg/mL)作为阳性对照。按式(2)计算 DPPH 自由基清除率^[15]。

$$k = (1 - \frac{A_2}{A_1}) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

k ——自由基清除率, %;

A_2 ——对照组吸光度值;

A_1 ——样品组吸光度值。

1.2.5 ABTS 自由基清除性能测定 参考 Re 等^[16]和李青等^[17]的方法并略有改动。将 7 mmol/L ABTS 水溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液混合,避光放置 12~16 h,形成 ABTS^+ 自由基储备液。用无水乙醇稀释,734 nm 下调其吸光度为(0.700 ± 0.020),得 ABTS^+ 自由基工作液,于 30 ℃ 下储存储备用。吸取不同浓度(0.012 5~0.100 0 mg/mL)提取液加入 ABTS^+ 自由基工作液 1 mL 混合均匀,避光放置 30 min 后,于 734 nm 下测其吸光度值,以甲醇为空白对照,以不同浓度的抗坏血酸(0.012 5~0.200 0 mg/mL)作为阳性对照。重复测定 3 次。按式(2)计算 ABTS 自由基清除率。

1.2.6 铁还原能力测定 参考 Benzie 等^[18]方法并略有改动。300 mmol/L pH 3.6 醋酸钠缓冲液、10 mmol/L TPTZ、20 mmol/L FeCl_3 溶液,按照体积比 10:1:1 混合,混匀后于 37 ℃ 水浴备用。吸取 120 μL 不同浓度(0.012 5~0.200 0 mg/mL)提取液,加入去离子水 360 μL 及 FRAP 溶液 3.6 mL。混匀后于 37 ℃ 水浴 30 min,593 nm 测定吸光值,重复测量 3 次,并以抗坏血酸代替提取物作为阳性对照。吸光度值越大,表明铁还原能力越强。

1.3 数据统计与分析

试验结果均表示为“平均值±标准偏差”,应用 SPSS 11.5 软件进行方差分析,并进行 Duncan's 差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 多酚得率、总酚含量和总黄酮含量

由表 1 可知,丙酮提取物的多酚得率最高,为(11.23 ± 0.05) mg/100 g。不同溶剂提取物中总酚含量、总黄酮含量大小顺序为:丙酮提取物 > 乙醇提取物 > 甲醇提取物,且不同溶剂提取物中总酚含量、总黄酮含量存

表 1 黑豆皮不同溶剂提取物的多酚得率、总酚含量和总黄酮含量[†]

Table 1 Extracting yields, total phenolic contents and total flavonoid content of different solvents extracted from black soybean seed coat

样品	多酚得率/(10 ⁻² g·g ⁻¹)	总酚含量/(mg·g ⁻¹)	总黄酮含量/(mg·g ⁻¹)
甲醇提取物	8.23±0.03 ^c	515.79±12.47 ^c	39.72±2.47 ^c
乙醇提取物	9.60±0.03 ^b	596.43±25.58 ^b	46.93±3.58 ^b
丙酮提取物	11.23±0.05 ^a	845.32±21.35 ^a	63.72±2.35 ^a

[†] 同列字母不同表示差异显著(P<0.05)。

在显著差异。

2.2 DPPH 自由基清除性能

由图 1 可知,丙酮提取物中 DPPH 自由基清除能力 IC₅₀ 最低[(0.059±0.005) mg/mL],表明丙酮提取物的 DPPH 自由基清除能力最强,甲醇与乙醇提取物的 DPPH 自由基清除能力无显著差异,均低于抗坏血酸 DPPH 自由基清除能力[(0.021±0.004) mg/mL]。

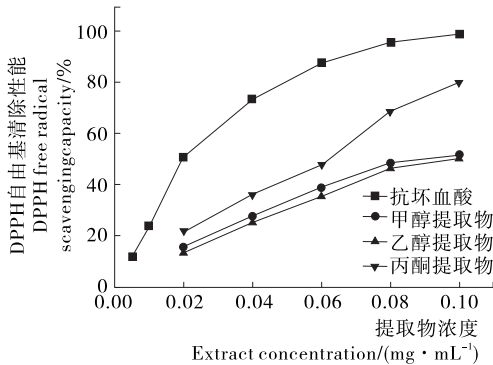


图 1 黑豆皮不同溶剂提取物的 DPPH 自由基清除性能
Figure 1 DPPH radical scavenging activities of black soybean seed coat with different solvents

2.3 ABTS 自由基清除性能

由图 2 可知,丙酮提取物中 ABTS 自由基清除能力 IC₅₀ 最低[(0.057±0.004) mg/mL],表明丙酮提取物的 ABTS 自由基清除能力最强,甲醇与乙醇提取物的 ABTS

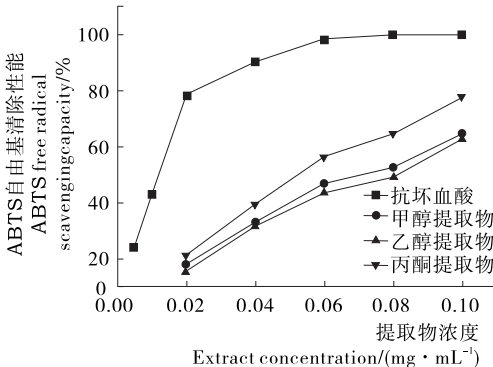


图 2 黑豆皮不同溶剂提取物的 ABTS 自由基清除性能
Figure 2 ABTS radical scavenging activity of solvent extracts prepared from black soybean seed coat

自由基清除能力无显著差异,均低于抗坏血酸 ABTS 自由基清除能力[(0.017±0.002) mg/mL]。

2.4 铁还原能力

由图 3 可知,所有提取液均表现出一定程度的铁还原能力,呈线性浓度依赖性,且提取物的铁还原能力显示出与 DPPH 和 ABTS 自由基清除活性相似的趋势。在相同的质量浓度时,铁还原能力大小顺序为:丙酮提取物>甲醇提取物>乙醇提取物。

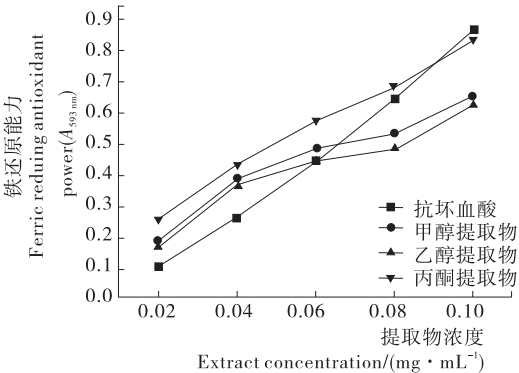


图 3 黑豆皮不同溶剂提取物的铁还原能力
Figure 3 Ferric reducing antioxidant power of different solvents from black soybean seed coat

3 结论

通过试验发现当体积分数均为 70% 时,丙酮提取物中多酚类物质含量(总酚、总黄酮)、抗氧化性均高于甲醇、乙醇提取物。黑豆皮富含多酚类物质,可应用于功能性食品或作为食品营养强化添加剂。试验仅对黑豆皮中多酚类物质总含量进行了测定,其功能性多酚单体的种类、含量及其多酚化合物代谢路径有待深入研究。

参考文献

[1] 张星, 超声波微波辅助提取黑豆异黄酮及其生物活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017: 1.
[2] 江甜, 何毅, 祝振洲, 等. 黑豆蛋白的分级提取及黑豆花色苷的成分鉴定[J]. 食品科学, 2017, 38(4): 217-222.
[3] FURUTA S, TAKAHASHI M, TAKAHATA Y, et al. Radical-scavenging activities of soybean cultivars with black

seed coats[J]. Food Sci Technol Res, 2003, 9(1): 73-75.

[4] 阙春娇. 不同豆类营养成分及抗氧化组分研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017: 68-77.

[5] XU Bao-jun, SAM K C C. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 7 165-7 175.

[6] FENG Sheng-bao, SONG Li-xia, LEE Yuan-kun, et al. The effects of fungal stress on the antioxidant contents of black soybeans under germination[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(23): 12 491-12 496.

[7] LEE J H, KANG N S, SHIN S O, et al. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 226-231.

[8] ZHANG Rui-fen, ZHANG Fang-xuan, ZHANG Ming-wei, et al. Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr) varieties[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(11): 5 935-5 944.

[9] KWON S H, AHN I S, KIM S O, et al. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins [J]. Journal of Medicinal Food, 2007, 10(3): 552-556.

[10] WANG Jian-yun, ZHU Chuang, QIAN Tian-wei, et al. Extracts of black bean peel and pomegranate peel ameliorate oxidative stress induced hyperglycemia in mice[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2015, 9(1): 43-48.

[11] NIZAMUTDINOVA I T, KIM Y M, CHUNG J I, et al. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(11): 2 806-2 812.

[12] XUE Zin-ping, FENG Wei-hua, CAO Jian-kang. Antioxidant activity and total phenolic contents in peel and pulp of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill) fruits[J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33(5): 613-629.

[13] ZHANG Hao, JIANG Lu, YE Shu, et al. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) from China[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(6): 1 461-1 465.

[14] BAKAR M F A, MOHAMED M, RAHMAT A, et al. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 479-483.

[15] ZHU Ke-xue, LIAN Cai-xia, GUO Xiao-na, et al. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1 122-1 126.

[16] 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): 1 231-1 237.

[17] 李青, 张名位, 张瑞芬, 等. 5 种水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): 1 150-1 158.

[18] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.

信息窗

欧盟食品安全局拟修改噻菌环胺在多种食品中的残留限量

2019 年 10 月 15 日, 欧盟食品安全局(EFSA)就噻菌环胺(Cyprodinil)在多种食品的最大残留限量(MRL)发布意见。

申请人 DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH 向奥地利国家主管部门提交了申请, 欧盟食品安全局依据 (EC)No396/2005 第 12 章的规定进行了评估, 具体修订情况如下:

产品	现有 MRL(mg/kg)	拟议 MRL(mg/kg)
葡萄	0.30	0.05
鲜食葡萄	0.30	0.05
酿酒葡萄	0.30	0.05
莴苣	0.03	0.03
菠菜	1.00	0.90

(来源: <http://news.foodmate.net>)