

绿豆多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of extraction process of mung bean polyphenols and antioxidant properties

盛亚男¹ 王长远^{1,2} 张舒¹

SHENG Ya-nan¹ WANG Chang-yuan^{1,2} ZHANG Shu¹

富天昕¹ 冯玉超¹ 秦海波¹

FU Tian-xin¹ FENG Yu-chao¹ QIN Hai-bo¹

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319;

2. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. Key Laboratory of Agro-Products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

摘要:采用溶剂浸提法对绿豆中多酚进行提取,研究液料比、提取时间及提取温度对绿豆多酚提取量的影响,优化了绿豆多酚的提取工艺,并研究了提取液的抗氧化活性。结果表明:最优提取工艺为提取料液比 1:12(g/mL)、提取温度 46℃、提取时间 1.6 h。该条件下多酚提取量为 11.74 mg/g。最佳工艺得到的提取液对超氧阴离子自由基清除率为 58.5%,亚硝酸根离子清除率为 26.0%,表明绿豆多酚具有良好的抗氧化活性。

关键词:绿豆;多酚;溶剂提取法;抗氧化活性

Abstract: Response surface method (RSM) was used to optimize the extraction process of mung bean polyphenols and study its antioxidant activity. The results showed that the optimal extraction process was 1:12 (g/mL), extracted at 46℃ for 1.6 h. The amount of polyphenol extracted under the control of these conditions was 11.74 mg/g. The rate of polyphenol superoxide anion free radical scavenging in mung bean was 58.5%, and that of the nitrite ion clearance was 26.0%. Therefore, it inclined that the polyphenols from mung bean had good antioxidant activity.

Keywords: mung bean; polyphenols; solution extraction; antioxidant activity

绿豆又名青小豆,为药食两用作物^[1],具有较高的药用价值和良好的保健功能^[2-3]。目前,绿豆的加工以传统淀粉制品为主,造成了绿豆资源的浪费。近年来,越来越多学者开始关注绿豆蛋白^[4]及膳食纤维^[5]、抗性淀粉^[6]、酚类物质^[7]、黄酮类化合物^[8]等功能成分的开发。

植物是酚类物质的主要来源。目前对植物中的酚类物质已有较多研究,Dueñas等^[8]采用液相色谱技术测得西班牙产芸豆的酚类物质总量为 279.68 μg/g;García-La-fuente等^[9]采用化学方法测得西班牙产紫色芸豆的总酚含量为 13.41 mg/g;冉军舰等^[10]采用超声波辅助纤维素酶法对苹果中的多酚进行提取,将其纯度由原来的 0.67% 提高至 41.65%;王静等^[11]研究了用热浸法对花生壳中多酚类物质进行提取,其提取率为 5.66 mg/g;李银平等^[12]研究了微波提取葡萄籽多酚,最佳工艺条件下的提取液总酚含量为 96.25 mg/g;伊文峰等^[13]研究了超临界萃取油茶中多酚的方法,总酚提取率达 46.76%。程安玮等^[14]比较了 4 种豆类中多酚、类黄酮含量及抗氧化活性。

试验拟对绿豆多酚提取工艺进行优化,并研究提取物的抗氧化活性,以期对绿豆功能性食品、药品的开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与试剂

绿豆:市售;

基金项目:国家十三五支撑计划(编号:2017YFD0401203);黑龙江省自然基金项目(编号:LH2019C054);黑龙江省农垦总局科技项目(编号:HNK135-05-01);黑龙江省博士后基金项目(编号:LBH-Z15217)

作者简介:盛亚男,女,黑龙江八一农垦大学在读硕士研究生。

通信作者:王长远(1976—),男,黑龙江八一农垦大学教授,博士。

E-mail: byndwcy@163.com

收稿日期:2019-05-07

无水乙醇、没食子酸、福林酚试剂等:分析纯,天津市春盛化学试剂有限公司;

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氰化钾等:分析纯,辽宁泉瑞试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高速粉碎机:ZK-300B 型,德清拜杰电气有限公司;

干燥箱:DHG-9240A 型,苏州奥峰烘箱制造有限公司;

分光光度计:723A 型,上海精密科学仪器有限公司;

恒温水浴锅:DK-S24 型,上海双旭电子有限公司;

高速离心机:VL-220B 型,长沙湘仪有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理 绿豆清洗后烘干至恒重,粉碎,过 70 目筛,得绿豆粉,于冰箱保存备用。

1.2.2 没食子酸标准曲线的绘制 根据文献[15]修改如下:称取 20 mg 没食子酸于 100 mL 容量瓶中定容,分别取 0.00,0.05,0.10,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL 没食子酸溶液并加水至 1 mL,随即各加入 2 mol/L 福林酚试剂 0.5 mL 混匀,于暗处放置 5 min,然后加入 20% Na_2CO_3 溶液 2.0 mL 后加蒸馏水并定容至 25 mL,充分混匀后于室温静置 1 h。以蒸馏水为空白对照,于 760 nm 下测吸光度值。以没食子酸浓度为横坐标(mg/mL),吸光度值为纵坐标绘制标准曲线,线性回归方程为 $y = 91.4x + 0.017$ ($R^2 = 0.9956$)。

1.2.3 绿豆多酚提取量的测定 根据文献[16]修改如下:取 800 μL 提取液于 25 mL 具塞试管中,加水定容至 1 mL,加入 0.5 mL 福林酚试剂混匀,放置暗处反应 5 min,然后加入 20% Na_2CO_3 溶液 2 mL 并定容至 25 mL,混匀后于室温静置 1 h。测定样品的吸光度值,并代入没食子酸标准曲线计算多酚含量。

1.2.4 单因素试验设计

(1) 料液比:称取 4 g 绿豆粉于 250 mL 具塞三角瓶中,分别按料液比 1:5,1:10,1:15,1:20,1:25 (g/mL)与体积分数为 60% 的乙醇混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 h,考察料液比对多酚提取量的影响。

(2) 提取时间:称取 4 g 绿豆粉于 250 mL 具塞三角瓶中,按料液比 1:15 (g/mL)与体积分数为 60% 的乙醇混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 下分别提取 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 h,考察提取时间对多酚提取量的影响。

(3) 提取温度:称取 4 g 绿豆粉于 250 mL 具塞三角瓶中,按料液比 1:15 (g/mL)与体积分数为 60% 的乙醇混合,分别于 30,40,50,60,70 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 h,考察提取温度对多酚提取量的影响。

1.2.5 响应面优化试验设计 在单因素试验的基础上,以多酚提取量为响应值,以料液比、提取时间、提取温度

为因变量进行三因素三水平的响应面试验,优化绿豆多酚提供工艺参数。

1.2.6 超氧阴离子自由基清除能力测定 根据文献[17-18]修改如下:取 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.5 mL 于具塞试管中,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅保温 20 min。取出后立即加入绿豆多酚提取液 1.0 mL 及 3 mmol/L 邻苯三酚溶液(25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热 5 min)0.3 mL,摇匀后放入水浴锅内反应 5 min。结束后加入 8 mol/L HCl 溶液 1 mL 终止反应,于 330 nm 处测定吸光度值,以蒸馏水代替邻苯三酚测得吸光度值,按式(1)计算超氧阴离子自由基清除率。

$$E = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

E ——自由基清除能力,%;

A_0 ——空白对照吸光值;

A_1 ——加入提取液后吸光值。

1.2.7 亚硝酸根离子清除能力测定 根据文献[19]修改如下:取绿豆多酚提取液 2 mL 于具塞试管中,加入 0.005 mg/mL 亚硝酸钠溶液 1 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅反应 30 min 后加入 0.4% 对氨基苯磺酸溶液 1 mL,摇匀静置 5 min。随即加入 0.2% 盐酸萘乙二胺溶液 0.05 mL,摇匀后加水定容至 25 mL,静置 15 min 后,于 530 nm 下测吸光值。以 2.0 mL 蒸馏水替代样品,测得吸光值,按式(1)计算亚硝酸根离子清除率。

1.3 数据处理

采用 Office 2010 进行数据处理,每组数据进行 3 个平行试验,取平均值并计算相对标准偏差,采用 Design Expert 10 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比 由图 1 可知,绿豆多酚的提取量随料液比的提高而增加,当料液比达到 1:15 (g/mL)时多酚提取量达到最大值,可能是溶剂增至 1:15 (g/mL)前,乙醇使绿豆多酚与大分子物质(蛋白质、多糖)间的共价键

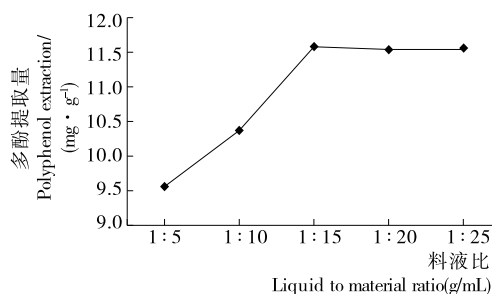


图 1 不同料液比下的多酚提取量

Figure 1 Polyphenol content at different ratios of material to liquid

断开,溶剂越多可使其断键越完全。随后多酚提取量趋于平稳,可能是在多酚提取量达到顶峰后,增加溶剂也不能使多酚的提取含量提高。从提取效果和溶剂用量综合考虑,选取最佳料液比为 1:15 (g/mL)。

2.1.2 提取时间 由图 2 可知,绿豆多酚的提取量随提取时间的增加先上升,当提取时间为 3 h 时多酚提取量达到峰值,之后呈现下降趋势,可能是过长时间暴露在空气中,多酚会氧化为醌类物质或者分解。综合考虑,选取最佳提取时间为 3 h。

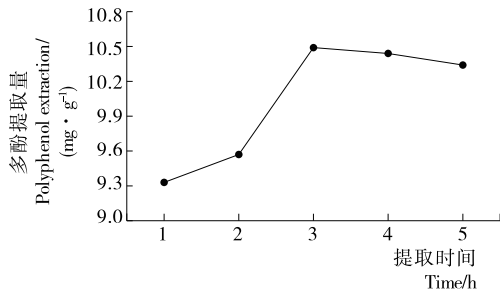


图 2 不同提取时间下的多酚提取量
Figure 2 Polyphenol content at different extraction times

2.1.3 提取温度 由图 3 可知,多酚提取量随提取温度的升高先上升后下降,当提取温度为 50 ℃时提取量达最大值。提取温度为 40~50 ℃时,多酚提取量上升较快,可能是绿豆中部分游离酚转化为结合酚,且在此温度范围内可能活化了多酚物质使其分子运动速率变大,从而使多酚物质被大量提取出来;提取温度超过 60 ℃后,多酚提取量急剧下降,可能是过高的温度导致多酚分解或挥发。故选取最佳提取温度为 50 ℃。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 试验设计与结果分析 根据 Box-Behnken 中心组合原理进行响应面设计,试验因素水平表见表 1,试验设计与结果见表 2。

利用 Design Expert 10 软件对表 2 试验数据进行二次多项式回归拟合,得到以多酚含量(Y)为响应值的回归

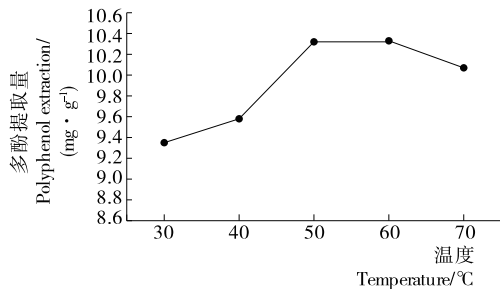


图 3 不同提取温度下的多酚含量
Figure 3 Polyphenol content at different extraction temperatures

表 1 因素和水平表

Table 1 Factor and level table

水平	X ₁ 料液比(g/mL)	X ₂ 提取时间/h	X ₃ 提取温度/℃
-1	1:5	1	30
0	1:15	3	50
1	1:25	5	70

表 2 多酚提取量响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface test for polyphenol extraction

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	多酚提取量/(mg · g ⁻¹)
1	0	0	0	11.87
2	1	0	1	11.44
3	-1	-1	0	11.63
4	1	1	0	11.88
5	0	0	-1	11.16
6	-1	0	1	11.21
7	-1	0	-1	11.23
8	0	0	0	11.97
9	0	0	0	12.12
10	0	0	0	11.91
11	0	0	0	12.09
12	-1	1	0	11.75
13	1	-1	0	11.67
14	0	-1	1	11.37
15	0	1	-1	11.21
16	1	0	-1	11.07
17	0	1	1	11.32

方程:

$$Y=11.94+0.021\ 6X_1+0.153\ 4X_2+0.152\ 2X_3+0.019\ 7\ X_1X_2+0.097X_1X_3-0.073\ 8X_2X_3-0.107\ 4X_1^2-0.106\ 6X_2^2-0.648\ 5X_3^2\quad (2)$$

为检验回归方程中各因素对多酚提取量的影响程度以及有效性,对式(2)进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,回归模型具有高度的显著性($P<0.000\ 1$),失拟项不显著($P=0.800\ 9>0.05$), $R^2=0.969\ 7$,表明模型或因素拟合度好,试验误差小;变异系数 $CV=0.8\%$,表明置信度较高,因此该模型能够反映响应值的变化,可以利用此数据模型来推测绿豆多酚的提取结果;对回归模型进行显著性检验可知, X_2 、 X_3 、 X_3^2 对多酚提取量有显著影响($P<0.05$), X_3^2 对多酚提取量有极显著影响($P<0.01$),其他项影响不显著;根据 F 值可知,各因素对绿豆多酚提取量的影响顺序为:提取温度>提取时间>料液比。

2.2.2 最佳工艺参数 采用 Design Expert 10 软件优化得到最佳绿豆多酚提取工艺参数为:料液比 1:11.61

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.930 0	9	0.214 4	24.922 9	<0.000 1
X ₁	0.002 9	1	0.002 9	0.337 4	0.579 6
X ₂	0.070 0	1	0.070 0	8.131 0	0.024 6
X ₃	0.083 2	1	0.083 2	9.669 7	0.017 1
X ₁ X ₂	0.002 0	1	0.002 0	0.235 3	0.642 4
X ₁ X ₃	0.038 0	1	0.038 0	4.419 1	0.073 6
X ₂ X ₃	0.015 4	1	0.015 4	1.790 7	0.222 7
X ₁ ²	0.043 5	1	0.043 5	5.059 4	0.059 3
X ₂ ²	0.064 6	1	0.064 6	7.510 3	0.029 0
X ₃ ²	1.634 7	1	1.634 7	189.987 6	<0.000 1
残差	0.060 2	7	0.008 6		
失拟误差	0.012 2	3	0.004 1	0.340 0	0.800 9
纯误差	0.048 1	4	0.012 0		
总和	1.990 0	16			

(g/mL)、提取温度 45.64 ℃、提取时间 1.57 h,预测多酚提取量为 11.78 mg/g。由于此参数不利于操作,因此调节为料液比 1:12 (g/mL)、提取温度 46 ℃、提取时间 1.6 h。在此条件下进行验证实验(平行 3 次),得到绿豆多酚的平均提取量为 11.74 mg/g,与预测值相近,说明利用响应面分析法优化绿豆中多酚提取量的数值是真实可靠的。

2.3 绿豆多酚抗氧化活性

2.3.1 清除超氧阴离子自由基能力 通过试验可知,样品提取液(0.232 8 mg/mL)对超氧阴离子自由基的清除率为 58.5%,介于红小豆(0.259 2 mg/mL)(清除率 50%)与豇豆(0.283 5 mg/mL)(清除率 60%)之间^[14],说明绿豆多酚提取液清除能力良好。

2.3.2 清除亚硝酸根离子能力 通过试验可知,样品提取液对亚硝酸根离子的清除率为 26.0%,说明绿豆多酚提取液具有清除亚硝酸根离子的能力。

3 结论

试验结果表明,最佳绿豆多酚提取工艺为提取温度 46 ℃,提取时间 1.6 h,料液比 1:12 (g/mL),该条件下绿豆多酚提取量为 11.74 mg/g。对绿豆多酚提取液进行抗氧化性研究发现,绿豆多酚对超氧阴离子自由基的清除率为 58.5%,对亚硝酸根离子的清除率为 26.0%,具有较强的抗氧化能力。试验并未对多酚类化合物进行准确性,后续可采用 LC-MS 对绿豆多酚类化合物进行定性定量分析,并采用大孔吸附树脂进行分析纯化,以筛选出起决定性作用的多酚类化合物。

参考文献

[1] 周俊玲,张蕙杰. 中国绿豆国际贸易发展的分析与展望[J]. 农业展望, 2014, 10(5): 63-67.

[2] 王河. 绿豆的药用价值[J]. 农村成人教育, 1994(2): 28.

[3] 董银卯. 萌芽绿豆抗敏抗氧化活性物质分析及其作用机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014: 76-90.

[4] 曾志红,王强,林伟静,等. 绿豆蛋白营养及功能特性分析[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(6): 51-55.

[5] 谢涛. 三种回生抗性淀粉对米淀粉的冻融与流变性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(12): 28-34.

[6] 李洪飞,李文杰,孙大庆,等. 微波辅助提取绿豆多酚的工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(5): 116-122.

[7] 谢姗,杜婷,韩雪,等. 绿豆黄酮对急性酒精性肝损伤的保护作用研究进展[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(10): 105-108.

[8] DUENAS M, MARTINEZ-VILLALUENGA C, LIMON R I, et al. Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans[J]. Food Research International, 2015, 70: 55-63.

[9] GARCIA-LAFUENTE A, MORO C, MANCHON N, et al. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans[J]. Food Chemistry, 2014, 161: 216-223.

[10] 冉军舰. 苹果多酚的组分鉴定及功能特性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013: 14-22.

[11] 王静,杨旭亮,王亚东,等. 热浸法提取花生壳中多酚类物质的工艺研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2008(4): 70-73.

[12] 李银平. 微波及超声波辅助提取葡萄籽多酚与提取液特性表征的研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012: 79-80.

[13] 伊文峰. 超临界萃取油茶中多种活性成分的研究[D]. 天津: 天津大学, 2013: 54-56.

[14] 程安玮,吴剑夫,秦宏伟,等. 4 种豆类中多酚、类黄酮含量及抗氧化活性研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(10): 28-32.

[15] 高畅,程大海,高欣,等. 蓝莓果渣提取物总酚含量及抗氧化活性研究[J]. 植物研究, 2010, 30(2): 253-256.

[16] 张春玲,许新兵,任小娜. 肉苁蓉中多酚类物质提取条件的优化及含量的测定[J]. 福建分析测试, 2019, 28(2): 52-57.

[17] 赵文英,崔波,朱政,等. 提取方法对石榴籽油提取率及抗氧化活性的影响[J]. 中国林副特产, 2010(4): 4-6.

[18] 董彩文,段蒙蒙,李帅红,等. 福林一酚比色法测定黄秋葵汁中的总多酚[J]. 食品科技, 2015, 40(4): 352-355.

[19] 蔡亭,汪丽萍,刘明,等. 浸泡时间对绿豆浸泡液中多酚及抗氧化活性的影响[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(5): 9-12.