

小扁豆中多酚物质的提取与组分鉴定

Isolation and identification of polyphenols from lens culinaris medik

刘翔宇^{1,2} 赵培^{1,2} 阎亚丽^{1,2} 刘建福^{1,2} 陈庆森^{1,2}

LIU Xiang-yu^{1,2} ZHAO Pei^{1,2} YAN Ya-li^{1,2} LIU Jian-fu^{1,2} CHEN Qing-sen^{1,2}

(1. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134; 2. 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

(1. College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;
2. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin 300134, China)

摘要:采用有机溶剂法提取小扁豆中多酚类物质,利用响应面法(RSD)对提取工艺条件进行优化,并采用高效液相色谱(HPLC)对提取物进行分析和鉴定。结果表明,当料液比 1 : 190(m : V),提取温度 82.60 °C,丙酮浓度 12.96% 时小扁豆多酚平均产率可达到 26.94% (m/m)。分析结果显示:采用该方法提取的小扁豆多酚主要由没食子酸、香草醛、香豆酸、芦丁、槲皮素等物质组成。

关键词:小扁豆;多酚;浸提;高效液相色谱;成分分析

Abstract: Using organic solvent method to extract polyphenols in lentils, the extraction process was optimized by making response surface experiment. Results of the study indicated that, when the mass ratio of solid and solvent was 190 : 1 (V : m); the temperature was 82.60 °C; the concentration of acetone was 12.96%, a better extraction effect could be obtained, and the average extraction rate could reach 26.94% (m/m). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis has showed that the polyphenols of lentils which extracted by this method were mainly composed of vanillin, p-coumaric acid, rutin and quercetin.

Keywords: lens; polyphenols; isolation by organic solvent; high performance liquid chromatography (HPLC); componential analysis

植物多酚(plant polyphenols)包括单宁以及与单宁有生源关系的所有化合物,是分子结构中含有多个羟基的酚类化合物^[1],为植物的次级代谢产物,其含量仅低于木质素、半纤维素和纤维素^[2]。目前已经发现植物多酚具有多种生物活性功能,如清除体内自由基、抗氧化^[3-4]、抗肿瘤^[5]、抗骨质

疏松^[6]、调节肠道菌群^[7]等。

关于有机溶剂提取多酚,已经有研究发现用乙醇/水(4 : 1)、甲醇/水(4 : 1)、丙酮/水(4 : 1)和乙醇/丙酮/水(7 : 7 : 6)4种溶剂体系提取大麦中的多酚类物质,发现丙酮溶剂体系的提取效果最好,并且产率超出其他溶剂体系1倍左右^[8]。另有研究^[9]发现,80%的丙酮溶液对儿茶素、咖啡酸、阿魏酸、香草醛和p-香豆酸提取能力最佳,而原儿茶素和没食子酸则用纯水提取效果最好。Ghasemzadeh等^[10]对甲醇、丙酮和氯仿提取生姜叶、莲和根中酚类物质的效果进行了比较,发现甲醇提取物中总酚、总黄酮、槲皮素、芦丁和儿茶素含量较其它溶剂高。贾冬英等^[11]在研究香蕉皮中多酚物质的提取工艺时发现,在不同的有机溶剂体系中,40%丙酮溶液提取效果最好。Mitić等^[12]用不同溶剂体系提取干红莓中酚类物质,发现不同溶剂对单体酚的提取效果差异较大,甲醇水有利于花青素类和酚酸类的提取,而丙酮水溶剂对黄酮醇以及黄酮醇物质的提取效果较好。上述研究成果报道了各种植物组织中多酚类物质提取的具体方法和思路,特别是对不同的提取溶剂系统对制备组织中多酚类物质的能力等方面的结论,为本研究提供了很好的启发和借鉴,也对本研究开展小扁豆多酚类物质的提取、分析鉴定以及深度开发具有较好的指导价值。

小扁豆学名兵豆(*Lens culinaris Medik*),为豆科兵豆属一年生或越年生草本植物^[13],主要分布于中国北方干旱与半干旱地区,属小杂粮作物^[14]。目前对小扁豆的研究,多集中于其所含有的小扁豆凝集素^[15-16]和植物学研究^[17-18]上,而对于其中含量约为20%~30%的多酚类物质,仅有使用未优化的提取工艺对其粗略提取估计含量的报道^[19]。基于前人对多酚与小扁豆的相关研究^[20],本研究拟采用单因素与响应面分析法确定有机溶剂浸提法提取小扁豆中的多酚物质的最佳条件,并采用高效液相色谱(HPLC)对提取物进行定性分析,为特定多酚成分的提取和中国传统药食两用作物小扁豆的加工利用提供基础资料。

基金项目:“十二五”国家科技计划(编号:2012BAD34B05)

作者简介:刘翔宇,男,天津商业大学在读硕士研究生。

通讯作者:刘建福(1967—)男,天津商业大学教授,博士。

E-mail:ljf@tjcu.edu.cn

陈庆森(1957—),男,天津商业大学教授,硕士。

E-mail:chqsen@tjcu.edu.cn

收稿日期:2015-12-18

1 材料与方法

1.1 材料与设备

小扁豆:天津市售;

乙醇、丙酮、乙酸乙酯、福林-酚试剂:分析纯;

甲醇、乙酸、没食子酸:色谱纯;

高效液相色谱用标准品(没食子酸、绿原酸、咖啡酸、大豆苷、香草醛、香豆酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素):纯度99.99%,上海融禾医药科技有限公司;

试验用水为去离子水;

紫外-可见分光光度计:T6新世纪型,北京普析通用仪器有限责任公司;

高速中药粉碎机:WND-100型,浙江省兰溪市伟能达电器有限公司;

真空旋转蒸发仪:RE-52AA型,上海亚荣生化仪器厂;

高效液相色谱仪系统:SSI-1500型,美国Evans Science and Technology公司;

色谱柱: C_{18} , $4\ \mu\text{m}\times 25\ \text{cm}$,日本Cosmosil公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理 小扁豆粉碎,过80目筛。取小扁豆粉用索氏提取器脱脂处理12 h后,于抽气瓶中,将乙醚彻底挥发,脱脂样品置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 密封冻藏待用。

1.2.2 多酚提取工艺 称取一定量的脱脂小扁豆粉,分别加入不同抽提溶剂,搅拌均匀后置于一定温度的电热恒温水浴锅中提取;将提取的混合物进行真空抽滤,滤液于 $55\ ^\circ\text{C}$ 下真空旋转蒸发至完全干燥,并回收溶剂。残留物用去离子水溶解,定容至溶剂体积的1/10,用于总多酚含量测定。试验重复3次,结果取平均值。

1.2.3 单因素试验设计 从提取溶剂(丙酮:5%,10%,15%,20%,25%,30%,50%,70%,90%;乙醇:10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%),料液比(1:100,1:120,1:140,1:160,1:180,1:200, $m:V$),提取时间(0.25,0.5,1,1.5,2,3,4,5,6 h)和提取温度(30,40,50,60,70,80,90 $^\circ\text{C}$)4个因素中分别选取1个作为变量同时其余3个作为固定参数,室温、光照作为控制参数,以小扁豆多酚提取产率(多酚质量/原料质量)为测定指标,研究确定最适提取条件。

1.2.4 响应面优化(RSD)分析 根据单因素试验结果及中心组合设计原理^[21],以小扁豆总多酚产率为响应值进行响应面分析。

1.3 分析检测方法

1.3.1 总多酚含量测定 采用Folin-Ciocalteu法^[22],以没食子酸质量浓度(g/mL)为横坐标 x ,吸光度 $A_{765\ \text{nm}}$ 为纵坐标 y ,绘制没食子酸标准曲线,所得标准曲线方程为: $y = 1.0654x - 0.0344$, $R^2 = 0.9915$ 。

1.3.2 高效液相色谱(HPLC)分析条件 使用 C_{18} 色谱柱,紫外检测器,柱温 $30\ ^\circ\text{C}$;流动相A为1%冰乙酸水溶液,B为甲醇;检测波长280 nm,线性梯度洗脱(梯度洗脱程序见

表1),流速为1.0 mL/min,进样量 $20\ \mu\text{L}$ 。

标准品配置为1 mg/mL的甲醇溶液(精密称取),进样前 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤。标样包含有:没食子酸、绿原酸、咖啡酸、大豆苷、香草醛、香豆酸、阿魏酸、芦丁、槲皮素。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

时间/min	A液流量/%	B液流量/%
0~7	65	35
7~9	65~50	35~50
9~12	50	50
12~14	50~59	50~41
14~19	59	41
19~22	59~20	41~80
22~28	20	80
28~40	20~65	80~35

1.4 统计学分析

试验数据的分析处理使用SPSS17.0统计软件。进行单因素方差分析时,处理结果以均数±标准差(±S)表示,定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 溶剂系统对多酚产率的影响 多酚的分子结构中含有多个羟基,使其易溶或可溶于水或醇、醚、酮、酯等有机溶剂^[23]。采用不同溶剂体系时多酚物质的浸出率与组成成分不同。本试验先使用纯水作为溶剂进行提取,最终得率平均在5%左右,后选取乙醇与丙酮溶液作为溶剂,结果见图1。由图1可知,乙醇/水作为溶剂体系,当乙醇浓度达20%时小扁豆多酚提取得到最佳得率(14.7%);而丙酮/水作为溶剂时,丙酮浓度为5%,10%,15%时获得最佳得率(17.2%~17.6%)。由于这3个试验点的最佳得率结果差异不显著,但仍显著高于右侧试验点及左侧0%(即纯水作为溶剂时)的提取率(5%),因此,考虑到系统误差与随机误差,以该丙酮浓度10%作为后续正交试验的中心试验点。另外,该结果与前期报道^[8-12]的有关丙酮/水提取体系的研究结果相同。

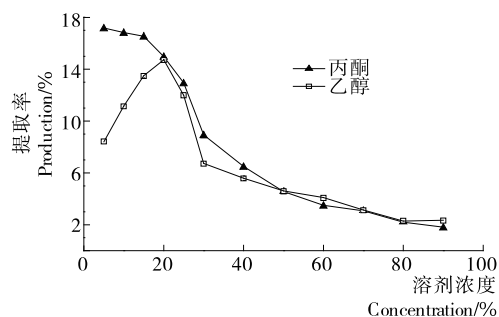


图1 乙醇、丙酮浓度对多酚产率的影响

Figure 1 Effect of ethanol concentration and acetone concentration on the production of lens polyphenols

2.1.2 料液比对多酚产率的影响 由图 2 可知,随着料液比的增大,多酚产率逐渐上升,在 1 : 180(*m* : *V*) 之后开始下降。该变化趋势可能与小扁豆中多酚类物质的溶解度与含量有关;也可能是溶剂体积的增加使得体系中溶氧的水平也随之增加,小扁豆粉与提取体系中氧的接触,以及体系中褐变的作用,导致多酚物质氧化,造成结果下降。试验还发现当溶剂用量低于 1 : 50(*m* : *V*) 时,小扁豆粉与溶剂混合后会形成糊状甚至结团现象。因此选择 1 : 180(*m* : *V*) 的料液比作为后续试验的中心试验点。

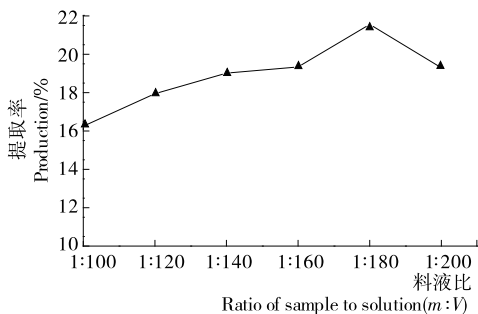


图 2 料液比对多酚产率的影响

Figure 2 Effect of ratio of sample to solution on the production of lens polyphenols

2.1.3 提取温度对多酚产率的影响 由图 3 可知:随着温度的上升,该体系对小扁豆多酚物质提取的产率缓慢上升,60 °C 后产率上升速度加快;当温度达到 80 °C 以后,提取产率显著下降,其原因可能是温度升高时,小扁豆中多酚物质溶解度增加,但过高的温度会导致多酚物质结构不稳定,发生异构化和氧化等反应而遭到破坏。因此,后续试验选取 80 °C 作为中心试验点。

2.1.4 提取时间对多酚产率的影响 由图 4 可知,提取产率在 1 h 左右出现最高峰,之后随着时间的延长,产率下降且基本维持在 19% 的水平。该研究结果提示,在用较高的温度(80 °C)进行提取时,提取时间过短会导致多酚物质不能完全溶出,而时间过长则会使多酚物质在高温环境下发生氧化反应,造成小扁豆粉中多酚物质的活性逐步降低,从而也导致检测结果下降。因此以 1 h 作为最佳的提取时间。

2.2 响应面试验结果与分析

根据单因素试验结果,固定丙酮为提取溶剂,反应时间 1 h,

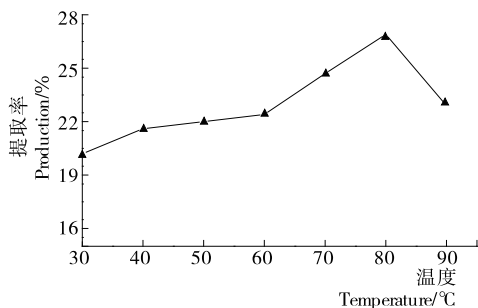


图 3 提取温度对多酚产率的影响

Figure 3 Effect of temperature on the production of lens polyphenols

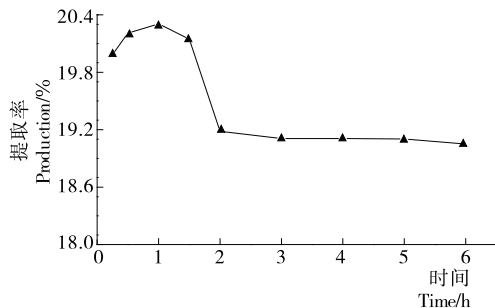


图 4 提取时间对多酚产率的影响

Figure 4 Effect of time on the production of lens polyphenols

选择料液比、提取温度、溶剂浓度,进行响应面分析,试验因素水平表见表 2。使用 Design-Expert, V. 8. 0. 5b 进行试验设计与结果数理统计,结果见表 3、4。得到的回归方程模型为:

表 2 响应面试验因素水平表

Table 2 Levels and codes of variables used in the experimental design

水平	A 料液比(<i>m</i> : <i>V</i>)	B 温度/°C	C 溶剂浓度/%
-1	170	75	5
0	180	80	10
1	190	85	15

表 3 响应面试验结果与分析

Table 3 RSD design matrix and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	多酚得率/%
1	0	0	0	26.0
2	1	-1	1	19.4
3	-1	1	1	17.4
4	0	-1.682	0	21.8
5	1	1	1	25.0
6	-1.682	0	0	23.0
7	0	1.682	0	18.6
8	0	0	0	24.8
9	1	1	-1	22.8
10	0	0	0	26.4
11	0	0	0	25.6
12	1.682	0	0	24.6
13	0	0	0	26.0
14	0	0	0	26.6
15	1	-1	-1	19.0
16	-1	-1	1	22.0
17	0	0	1.682	24.4
18	-1	-1	-1	25.8
19	-1	1	-1	19.8
20	0	0	-1.682	21.6

表4 回归模型的方差分析表

Table 4 Analysis of variance for the fitted quadratic regression equation

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	151.57	9	16.84	14.45	0.000 1
A	1.11	1	1.11	0.95	0.352 4
B	3.17	1	3.17	2.72	0.130 0
C	0.09	1	0.09	0.077	0.786 7
AB	50.00	1	50.00	42.91	<0.000 1
AC	9.68	1	9.68	8.31	0.016 3
BC	1.28	1	1.28	1.10	0.319 2
A ²	11.51	1	11.51	9.88	0.010 5
B ²	67.65	1	67.65	58.06	<0.000 1
C ²	19.95	1	19.95	17.12	0.002 0
残差	11.65	10	1.17		
失拟项	9.59	5	1.92	4.66	0.058 4
纯误差	2.06	5	0.41		
总和	163.22	19			

$$y = 25.92 + 0.28A - 0.48B + 0.081C + 2.50AB + 1.10AC + 0.40BC - 0.89A^2 - 2.17B^2 - 1.18C^2 \quad (1)$$

由表4可知,模型的 $P = 0.000 1 < 0.05$,表明回归模型高度显著,建立的模型有意义。失拟项 $P = 0.058 4 > 0.05$,无显著性差异,说明模型拟合程度良好。模型的残差可能由随机误差产生。对回归方程进行检验,其决定系数 $r^2 = 0.928 6$,即此模型能够解释92.86%的响应值变化,说明该模型能充分反映出各因素与响应值的关系,其影响不是简单的线性关系。通过该方程发现,各种因素之间存在着一定的交互作用,其中AB、B²、C²呈极显著影响($P < 0.01$),AC、A²呈显著影响($P < 0.05$)。在所选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序为温度>料液比>浓度。

各因素交互作用对小扁豆多酚物质提取产率的影响直观地体现于图5~7。

由图5可知,响应值对料液比与温度的交互作用不敏感,温度的变化对响应值影响较大。图6显示响应值对料液比与溶剂浓度的作用敏感。等高线图反映了料液比对产率

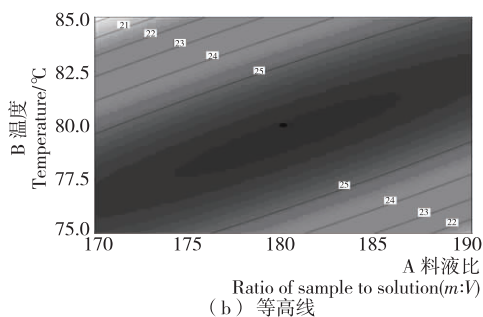
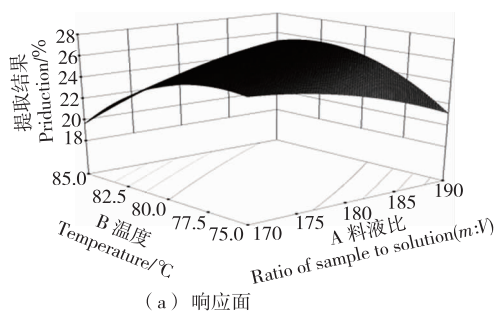


图5 料液比与温度对多酚产率的影响

Figure 5 Response surface and contour plots for the interactive effects of ratio of sample to solution and temperature on the production of lens polyphenols

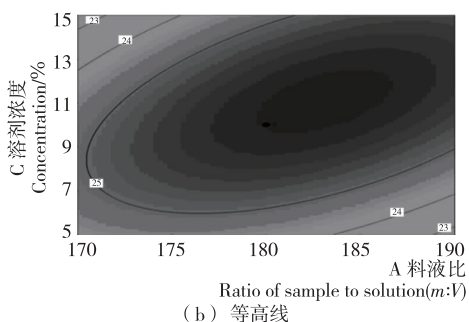
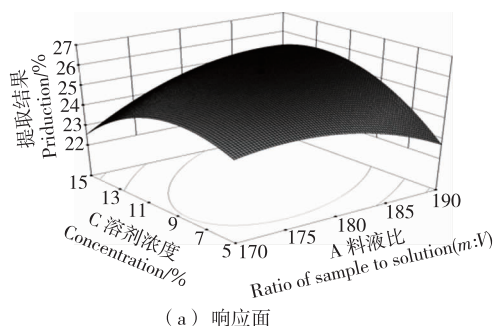


图6 料液比与丙酮浓度对多酚产率的影响

Figure 6 Response surface and contour plots for the interactive effects of ratio of sample to solution and acetone concentration on the production of lens polyphenols

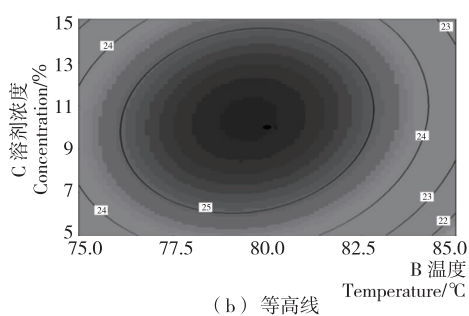
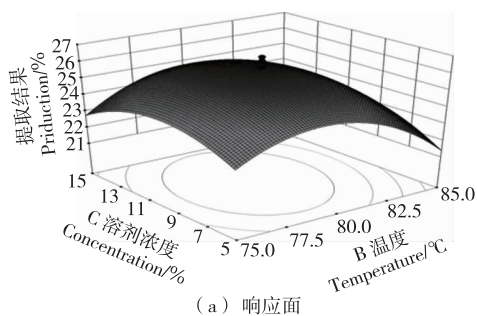


图7 丙酮浓度与温度对多酚产率的影响

Figure 7 Response surface and contour plots for the interactive effects of acetone concentration and temperature on the production of lens polyphenols

的影响较小,尤其是料液比较大时几乎不产生影响,可能是小扁豆中多酚物质全部溶出或已达到饱和的缘故。图 7 显示响应值对丙酮浓度与反应温度的变化敏感。从等高线可以看出温度对响应值的影响较大。

2.3 最优反应条件的确定及模型验证

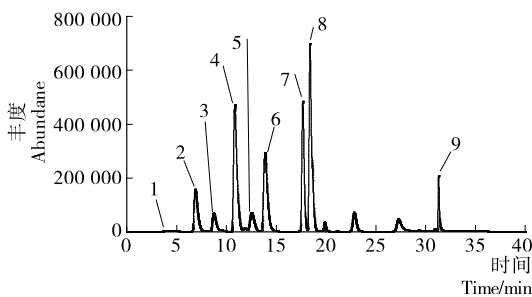
根据回归模型分析得出提取小扁豆多酚的最佳反应条件为:料液比 1 : 190(m : V),提取温度 82.60 °C,丙酮浓度 12.96%。该条件下预测的小扁豆多酚产率可达到 26.19%。采用确定的最佳反应条件进行 3 次提取验证实验,得到的实际平均产率为 26.94%,与模型预测值基本一致,说明预测值与实际值之间有较好的拟合性,模型可信度高。

验证结果显示,本试验建立的丙酮/水溶剂系统,对提取小扁豆中多酚类物质具有很好的效果,也说明了该提取系统优于甲醇/水系统,与 Xu 等^[24]的研究结果一致,即提取豆类中酚类物质时,丙酮提取剂优于乙醇提取剂。

2.4 小扁豆多酚物质提取产物的 HPLC 分析

对最佳条件提取的产物进行分析,结果见图 8、9。

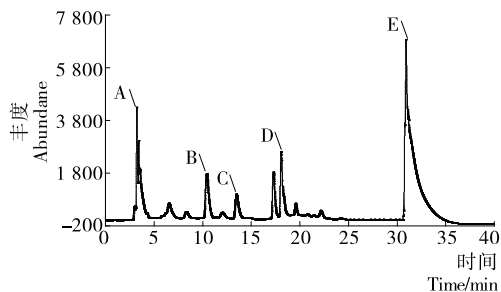
为了获得最佳的分析鉴定水平,本研究在流动相中添加适量(1%)的冰乙酸,可有效地改善色谱的分离效果,获得良好的峰型。研究还显示,进样量为 50 μL 时产生了较大的溶剂峰,又出现峰的宽度变大;而进样量小于 20 μL 时峰形不显著,因此综合考虑确定了进样量为 20 μL 。从 16 个标准样品中,通过比对保留时间,提取产物中 HPLC 分析的结果可知,该溶剂系统提取的产物主要含有多酚类物质的组分为:没食子酸(3.857)、香草醛(10.520)、香豆酸(14.196)、芦丁(16.593)和槲皮素(32.542)。



1. 没食子酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 大豆苷 5. 香草醛
6. 香豆酸 7. 阿魏酸 8. 芦丁 9. 槲皮素

图 8 标准样品色谱图

Figure 8 Chromatogram of polyphenols standard sample



A. 没食子酸 B. 香草醛 C. 香豆酸 D. 芦丁 E. 槲皮素

图 9 样品的色谱图

Figure 9 Chromatogram of lens polyphenols

4 结论

本研究建立的丙酮/水溶剂系统,通过对料液比、温度、溶剂浓度以及提取时间做单因素试验,进而利用响应面分析确定出小扁豆多酚物质最佳的提取条件,较系统地探讨了小扁豆多酚物质的提取工艺条件。最佳的提取条件为料液比 1 : 190(m : V),提取温度 82.60 °C,丙酮浓度 12.96%,得到的实际平均产率为 26.94%。研究采用高效液相色谱(HPLC)将该系统提取的小扁豆多酚产物进行分析和鉴定,确定提取的产物中分别含有没食子酸、香草醛、香豆酸、芦丁、槲皮素,这些组分均为豆类作物中常见多酚物质。

本试验以最佳提取得率为考量采用丙酮作为溶剂,但根据提取用途的不同,需要考虑丙酮溶剂含有毒性,而乙醇作为溶剂虽然得率略低于丙酮但更为安全,或者在后续试验、加工过程中通过物理化学方法将丙酮去除干净。同时研究为了尽可能检测出小扁豆多酚物质的种类,采用粗提取产物作为检测样本,若进行后续研究时,还需要考虑增加纯化工序的操作,如利用乙酸乙酯等有机溶剂,或使用大孔树脂吸附工艺等对提取产物进行纯化处理^[25]。

对于小扁豆而言,丙酮系统提取效果好的原因可能是小扁豆中香草醛与香豆酸的含量较高,而水分较多的溶剂提取效果优于水分较少溶剂则是由于没食子酸的存在引起的^[26]。而液相色谱图显示槲皮素与芦丁等含量高于前二者,原因可能为流动相采用了甲醇作为载体,其在甲醇中的溶解度高于其他多酚组分所致。总之,本研究初步探讨了小扁豆多酚物质提取的体系和条件,并利用 HPLC 定性地鉴定了小扁豆主要的多酚类物质的组分,但没有进行以某单一成分的最佳得率为目标的探讨,尚需进一步完善。

参考文献

- [1] McManus J P, Davis K G, Lilley T H, et al. The association of proteins with polyphenols[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1981(7): 309-311.
- [2] 宋立江, 狄差, 石碧. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势[J]. 化学进展, 2000, 12(2): 161-162.
- [3] 周跃勇, 王岸娜, 吴立根. 从猕猴桃中提取多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 56-60.
- [4] Sharma K, Bari S S, Singh H P. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(4): 253-258.
- [5] 王修杰, 袁淑兰. 植物多酚的防癌抗癌作用[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 508-517.
- [6] 张润普, 恪信. 橄榄多酚对卵巢切除大鼠骨密度和骨钙含量的影响[J]. 中外医疗, 2008(1): 22-23.
- [7] Lee H C, Jenner A M, Low C S, et al. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota[J]. Research in microbiology, 2006, 157(9): 876-884.
- [8] Bonoli M, Verardo V, Marconi E, et al. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemis-

- try, 2004, 52(16): 5 195-5 200.
- [9] Zhao Hai-feng, Dong Jian-jun, Lu Jian, et al. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare L.*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7 277-7 286.
- [10] Ghasemzadeh A, Jaafar H Z E, Rahmat A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) extracts [J]. J. Med. Plants Res, 2011, 5(7): 1 147-1 154.
- [11] 贾冬英, 李尧, 姚开, 等. 香蕉皮中多酚的提取工艺条件研究 [J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2005, 37(6): 52-55.
- [12] Mitić M N, Obradović M V, Kostić D A, et al. Phenolic profile and antioxidant capacities of dried red currant from Serbia, extracted with different solvent [J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(6): 1 625-1 631.
- [13] 张培轩, 段瑞, 黄鹏. 中国远志属药用植物资源及地理分布 [J]. 基层中药杂志, 2002, 16(6): 42-43.
- [14] 李云霞. 小扁豆种质资源筛选及评价 [J]. 杂粮作物, 2003, 23(6): 331-332.
- [15] 卓传尚, 柳丽娟, 吴秋芳. 小扁豆凝集素结合型甲胎球蛋白在肝癌诊断中的意义 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(2): 208-210.
- [16] 魏群, 黄介飞, 孟宪镛, 等. 血清小便斗凝集素结合型-1 抗凝血蛋白酶测定对原发性肝癌的诊断意义 [J]. 南通医学院学报, 1996, 16(4): 493-494.
- [17] 李金霞, 宋志蕾, 张志鹏. 重金属胁迫对小扁豆种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(26): 1-3.
- [18] 韩燕来, 远彤, 陈锋, 等. 小扁豆花芽分化与结实率的研究 [J]. 河南农业大学学报, 1999, 33(4): 403-406.
- [19] 刘明, 谭斌, 田晓红, 等. 七种食用豆化学组成及挤压加工特性研究 [J]. 食品科技, 2010(8): 189-197.
- [20] 郑菲, 黄亮, 李安平, 等. 响应面法优化橡胶壳中多酚提取工艺条件 [J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 49-51.
- [21] 朱晓阳, 钟海雁, 周波, 等. 油茶籽多酚超声辅助提取的响应面优化 [J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 166-170.
- [22] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods in Enzymology, 1999, 299: 152-178.
- [23] Akowuah G A, Ismail Z, Norhayati I, et al. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity [J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 311-317.
- [24] Xu Bao-jun, Sam K C Chang. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents [J]. Journal of Food Science, 2007, 72(2): S159-S166.
- [25] 袁英姿, 曹清明, 钟海雁, 等. 大孔吸附树脂纯化油茶籽多酚的研究 [J]. 食品与机械, 2009, 25(1): 61-63.
- [26] 唐华丽, 熊汉国, 王玮. 响应面法优化葡萄籽多酚提取工艺 [J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 147-149.
- (上接第 140 页)
- [4] Ocaño-Higuera V M, Maeda-Martínez A N, Marquez-Ríos E, et al. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 49-54.
- [5] 易宇文, 范文教, 贾洪峰, 等. 基于电子舌的微冻鲢鱼新鲜度识别研究 [J]. 食品与机械, 2014, 30(2): 142-145.
- [6] 史策. 鲢鱼尸僵及贮藏过程中 ATP 关联物及生化特性变化规律的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [8] Vázquez-Ortiz F A, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez M E, et al. Application of the freshness quality index (K Value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern Mexico [J]. Journal of Food Composition & Analysis, 1997, 10: 158-165.
- [8] 汤水粉, 钱卓真, 罗方方, 等. 高效液相色谱法测定水产品中 ATP 关联化合物 [J]. 渔业科学进展, 2014, (2): 110-116.
- [9] Kuda T, Fujita M, Goto H, et al. Effects of freshness on ATP-related compounds in retorted chub mackerel *Scomber japonicus* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2007, 40(7): 1 186-1 190.
- [10] Aubourg S P, Pinheiro C, Gallardo J M, et al. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*) [J]. Food Chemistry, 2005, 90(3): 445-452.
- [11] 邹耀洪. 香菇中 5-核苷酸的高效液相色谱-质谱分析 [J]. 食品科学, 2005(1): 196-198.
- [12] 张岩, 吕品, 王红, 等. 高效液相色谱法同时测定浓缩果汁中环磷酸腺苷和环磷酸鸟苷的含量 [J]. 食品科学, 2009(18): 321-322.
- [13] 李诚, 沈晓玲, 陈代文. 宰后肉成熟过程中的风味变化 [J]. 食品科技, 2008(2): 52-56.
- [14] 关志苗. K 值—判定鱼品鲜度的新指标 [J]. 水产科学, 1995, 1(14): 33-35.
- [15] 王槌, 张钟兴, 冯媛, 等. 几种淡水养殖鱼鲜度变化的特点 [J]. 水产学报, 1994(4): 272-277.
- [16] 刘亚, 章超梓, 陆子锋. 高效液相色谱法检测水产品中的 ATP 关联化合物 [J]. 食品与发酵工业, 2010(6): 137-141.
- [17] Özogul F, Özogul Y, Kuley E. Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4 °C) [J]. Food Chemistry, 2008, 108(3): 933-941.
- [18] 方燕, 过世东. 棚养和塘养甲鱼肌肉中呈味核苷酸的含量变化及比较 [J]. 食品研究与开发, 2006, 27(8): 17-22.
- [19] Khan A W, Davidek J, Lentz C P. Degradation of inosinic acid in chicken muscle during aseptic storage and its possible use as an index of quality [J]. Journal of Food Science, 2006, 33(1): 25-27.
- [20] 晋高伟, 李婷婷, 姜杨, 等. 0 °C 冷藏温度下草鱼新鲜度评价 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 312-316.
- [21] 邱伟强, 陈刚, 陈舜胜, 等. 离子对反相高效液相色谱法同时检测水产品中 6 种 ATP 关联化合物 [J]. 水产学报, 2011(11): 1 745-1 752.
- [22] 唐裕芳. 鱼肉的腐败机理及其防腐措施 [J]. 肉类工业, 2000(2): 30-32.