

# 几种黑豆成分、体外抗氧化及酶抑制作用对比

## Comparative study on several black bean components, antioxidant and enzyme inhibition in vitro

党玉婷<sup>1</sup> 张彦<sup>1</sup> 井波鑫<sup>1</sup> 苏晓萌<sup>2</sup> 柴希艳<sup>3</sup>

DANG Yuting<sup>1</sup> ZHANG Yan<sup>1</sup> JING Boxing<sup>1</sup> SU Xiaomeng<sup>2</sup> CHAI Xiyan<sup>3</sup>

(1. 西安医学院, 陕西 西安 710021; 2. 陕西福禄成工贸有限公司, 陕西 西安 710032;

3. 西安雨润百德健康管理有限公司, 陕西 西安 710065)

(1. Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. Shaanxi Fulu Cheng Industry and Trade Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710032, China; 3. Xi'an Yurun Baide Health Management Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710065, China)

**摘要:**目的:挑选黑豆药用与食用的适宜品种。方法:测定了9种黑豆的总酚酸、总黄酮、缩合单宁、总花色苷、总多糖和总蛋白质含量,并对黑豆提取物的体外抗氧化活性以及对 $\alpha$ -淀粉酶、胰脂肪酶、乙酰胆碱酯酶、酪氨酸酶的抑制作用进行比较。结果:总酚酸、总黄酮、缩合单宁、总花色苷含量为马料豆>小黑豆>黑豆;总多糖含量为小黑豆>黑豆>马料豆;总蛋白含量为马料豆>黑豆>小黑豆;抗氧化活性为马料豆>小黑豆>黑豆。体外试验发现,小黑豆与黑豆对多种酶均有抑制作用,强度各不相同。结论:不同品种黑豆的生物活性物质含量和功能存在差异。黑豆更适合食用,马料豆和小黑豆药用价值更高。

**关键词:**黑豆;活性成分;抗氧化作用;酶抑制作用

**Abstract: Objective:** The difference in bioactive substance content and bioactivity in black beans were compared. **Methods:** The contents of total phenolic acids, total flavonoids, condensed tannins, total anthocyanins, total polysaccharides and total proteins of nine kinds of black beans were determined. The antioxidant activities of black bean extracts in vitro and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase, pancreatic lipase, acetylcholinesterase and tyrosinase were compared. **Results:** The contents of total phenolic acid, total flavonoids, condensed tannins and total anthocyanins were as follows: equine bean >

small black bean > black bean; Total polysaccharide content: small black bean > black bean > horse bean; Total protein content: horse bean > black bean > small black bean. Antioxidant activity: horse bean > small black bean > black bean. In vitro experiments showed that little black bean and black bean had inhibitory effects on many enzymes, and the intensity was different. **Conclusion:** The contents and functions of bioactive substances in different varieties of black beans are different. Black beans are more suitable for eating, and horse bean and small black beans have higher medicinal value.

**Keywords:** black bean; active components; antioxidant effect; enzyme inhibition

黑豆在中国栽培历史悠久,品种较多,如:黑豆、黑大豆、小黑豆和马料豆等<sup>[1]</sup>。2020版《中国药典》记载其性状“长6~12 mm,直径5~9 mm,种皮呈黑色或灰黑色,有益精明目,养血祛风,利水,解毒的作用”<sup>[2]</sup>。历代古籍均认为“种皮黑者方可做药用”且“黑者入药,小者质佳”<sup>[3-4]</sup>。近年来陕北地区种植栽培黑豆已具有一定规模,且全部为小粒品种<sup>[5]</sup>。

黑豆可作为食品添加剂应用于大健康领域,在改善人类膳食结构和预防代谢综合征、肥胖和海尔默兹综合征中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>,这可能与黑豆中的次生代谢产物的抗氧化作用有关。但前人对黑豆的研究多集中在花青素、异黄酮等提取工艺上<sup>[7]</sup>。对于适合药用的黑豆品种,魏玉等<sup>[8]</sup>指出中药炮制辅料黑豆汁应选用“乌衣黄仁小扁粒黑豆”;李佳荣等<sup>[9]</sup>也通过比较不同产地黑豆大豆苷和大豆苷元的含量,提出优质药用的品种应是皮紫粒小的;李瑞等<sup>[10]</sup>比较了可作为豆芽、豆腐等豆制品的黑豆品种。从药用及食用价值两方面对黑豆进行综合评价,

**基金项目:**陕西省重点研发计划(编号:2023-ZDLNY-37);西安市科技局农业技术研发项目(编号:21NYYF062);西安医学院省级大学生创新创业项目(编号:S202211840071)

**作者简介:**党玉婷,女,西安医学院在读本科生。

**通信作者:**张彦(1979—),女,西安医学院副教授,硕士。

E-mail: 110493988@qq.com

**收稿日期:**2023-01-26 **改回日期:**2024-02-28

以及对不同品种黑豆活性进行比较的研究尚未见报道。

体外酶抑制和抗氧化活性测定是初步筛选生物活性的一种简便的方法<sup>[11]</sup>。胰脂肪酶是消化脂肪的关键酶； $\alpha$ -淀粉酶是重要的碳水化合物水解酶；乙酰胆碱酯酶是生物神经传导中的关键酶；酪氨酸酶是黑色素合成的关键限速酶<sup>[11]</sup>。以上酶抑制作用均与预防代谢综合征有关，与氧化应激也有关<sup>[11]</sup>。当前虽有黑豆体外抗氧化的研究<sup>[12]</sup>，但尚未见对黑豆代谢综合征相关酶的抑制作用研究。

研究拟比较不同品种黑豆的主成分，并测定黑豆对代

谢综合征相关酶的抑制作用和抗氧化活性，明确其生物活性，探讨其在代谢综合征的辅助预防中应用的可能性，以期为阐释黑豆药用与食用的适宜品种提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

黑豆样品：含水量 $<5\%$ ，根据《中国农业百科全书》<sup>[13]</sup>中有关中国大豆品种分类标准，按照籽粒重量将其分为大粒（百粒重 18.0 g 以上）、中粒（百粒重 12.0~17.9 g）、小粒（百粒重 11.9 g 以下）三类（见表 1），市售；

表 1 各黑豆样品信息  
Table 1 Sample information of black bean

| 样本  | 样品编号  | 样本来源    | 百粒重量/g | 平均直径/mm | 分级 | 子叶颜色 |
|-----|-------|---------|--------|---------|----|------|
| 小黑豆 | XHD01 | 河南郑州登封  | 10.31  | 6~8     | 小粒 | 黄色   |
| 小黑豆 | XHD02 | 陕西横山    | 14.45  | 6~8     | 中粒 | 焦黄色  |
| 小黑豆 | XHD03 | 陕西吴堡    | 10.10  | 6~8     | 小粒 | 黄色   |
| 小黑豆 | XHD04 | 黑龙江绥化   | 10.41  | 6~8     | 小粒 | 黄色   |
| 黑豆  | HD01  | 黑龙江哈尔滨  | 40.47  | 8~10    | 大粒 | 绿色   |
| 黑豆  | HD02  | 内蒙古巴彦淖尔 | 42.97  | 10~12   | 大粒 | 绿色   |
| 黑豆  | HD03  | 山东沂蒙山   | 19.50  | 8~9     | 大粒 | 绿色   |
| 黑豆  | HD04  | 山东丹波    | 55.52  | 10~12   | 大粒 | 黄色   |
| 马料豆 | MLD01 | 山东滨州    | 1.48   | 3~5     | 小粒 | 黄褐色  |

没食子酸、石杉碱甲、曲酸、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、(+)-儿茶素标准品：纯度 $>98\%$ ，宝鸡辰光生物科技有限公司；

福林酚：分析纯，上海源叶生物科技有限公司；

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)：分析纯，成都艾科达化学试剂有限公司；

2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)：分析纯，美国 Sigma 公司；

$\alpha$ -淀粉酶：13 U/mg，北京索莱宝科技有限公司；

胰脂肪酶：15~35 U/mg，上海阿拉丁生化科技有限责任公司；

乙酰胆碱酯酶(AChE)：200~1 000 U/mg，美国 Sigma 公司；

酪氨酸酶：500 U/mg，宝鸡辰光生物科技有限公司；

L-酪氨酸：分析纯，上海萨恩化学技术有限公司；

维生素 C 片：华中药业股份有限公司；

多奈哌齐：浙江华海药业股份有限公司；

奥利司他：湖南明瑞制药有限公司。

1.2 主要仪器与设备

酶标仪：ReadMax 1900/1900Plus 型，上海生物闪谱科技有限公司；

超声波清洗器：KQ-250B 型，昆山市超声仪器有限公司；

旋转蒸发仪：XD-52AA 型，上海申生科技有限公司；

全自动凯氏定氮仪：K1100F 型，深圳市赛亚泰科仪器设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 不同方法制备黑豆样品

(1) 超声提取：黑豆用粉碎机粉碎，过 100 目筛，备用。取黑豆粉 2 g，按 1 : 10 (g/mL) 的料液比加入体积分数为 70% 的乙醇，60℃ 超声提取 2 h 后 7 000 r/min 离心 8 min，取上清液，残渣在相同条件下重复提取 1 次，合并两次上清液，得质量浓度为 100 mg/mL 黑豆提取液。另取 20 g 黑豆粉同以上操作。将超声提取液浓缩蒸干制得黑豆提取物浸膏。称取浸膏 125 mg 用 pH 为 7.2~7.4 的 PBS 缓冲液配成质量浓度为 2.5 mg/mL 样品溶液，再稀释为质量浓度 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/mL 的黑豆提取物样品溶液。

(2) 丙酮提取：取 0.5 g 过筛后的黑豆粉，置于 5 mL 酸性 70% 丙酮(0.5% 乙酸)溶液中超声 3 h，避光静置 12 h 后，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液。残渣按相同方法再提取 1 次，合并浸提液，得黑豆提取液。

1.3.2 黑豆主成分测定

(1) 总酚酸含量：参照文献<sup>[11]</sup>取 1.3.1 中超声提取制备的黑豆提取液，采用福林酚法测定其总酚酸含量。

(2) 总黄酮含量：以(+)-儿茶素为标准品，取 1.3.1

中丙酮提取制备的黑豆提取液,参照文献[14]采用亚硝酸钠—硝酸铝法测定总黄酮含量,结果以每毫克儿茶素当量表示(mg CAE/g 样品)。

(3) 缩合单宁含量:以(+)-儿茶素为标准品采用香草醛盐酸法,参照文献[15]略作修改,取 1.3.1 中丙酮提取制备的黑豆提取液采用香草醛甲醇溶液—浓盐酸法,测定黑豆样品中缩合单宁的含量,结果以每毫克儿茶素当量表示(mg CAE/g 样品)。

(4) 总花色苷含量:参照文献[16]修改如下:取 1.3.1 中超声提取制备的黑豆提取液 3 mL,分别用 pH 1.0 的 0.025 mol/L KCl 溶液和 pH 4.5 的 0.4 mol/L 醋酸钠缓冲溶液定容至 10 mL。平衡 1 h 后,分别在 530,700 nm 处测吸光值,按式(1)~式(3)计算总花色苷含量(以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷计)。

$$A_{\lambda_{\max}} = (A_{530 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{530 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}, \quad (1)$$

$$C = \frac{A_{\lambda_{\max}} \times 10^3 \times M_w \times D \times F}{\epsilon \times l}, \quad (2)$$

$$W_A = \frac{C \times 10^{-3} \times V}{M} \times 100, \quad (3)$$

式中:

$A_{\lambda_{\max}}$ ——最大吸收波长处的吸光值;

$A_{530 \text{ nm}}$ ——530 nm 处的吸光度;

$A_{700 \text{ nm}}$ ——700 nm 处的吸光度;

$M_w$ ——矢车菊-3-O-葡萄糖苷的相对分子质量,449.2;

$D$ ——稀释体积;

$F$ ——浓度校正因数;

$\epsilon$ ——消光系数,29 600 L/(mol·cm);

$l$ ——光路长度,cm;

$W_A$ ——总花色苷含量,mg/100 g;

$C$ ——花色苷质量浓度,mg/L;

$V$ ——待测液的体积,mL;

$M$ ——样品质量,g。

(5) 总多糖含量:取 1.3.1 中丙酮提取制备的黑豆提取液,参照文献[17]采用苯酚硫酸法测定黑豆中总多糖。

(6) 总蛋白含量:取粉碎过 100 目筛的黑豆粉末,按 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》第一法(凯氏定氮法)测定总蛋白含量。

### 1.3.3 抗氧化活性

(1) DPPH 自由基清除活性:参照文献[18]修改如下:取 1.3.1 中超声提取制备的黑豆粗提液和 DPPH 溶液与无水乙醇反应测吸光度,按式(4)计算 DPPH 自由基清除率。

$$Y = \frac{(A_2 + A_3) - A_1}{A_2} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

$Y$ ——DPPH 自由基清除率,%;

$A_1$ ——待测试样吸光度;

$A_2$ ——不加待测试样而用无水乙醇代替待测试样的吸光度;

$A_3$ ——待测试样自身的吸光度。

(2) ABTS 自由基清除活性:参照文献[16]修改如下:将 ABTS 水溶液与  $K_2S_2O_8$  水溶液混合暗反应 12 h 后,用甲醇稀释使其吸光度在 0.78~0.82,得 ABTS 自由基工作液。在 1.3.1 中超声提取的黑豆提取物样品溶液或无水乙醇中加入 ABTS 自由基工作液混匀测定吸光度。按式(5)计算 ABTS 自由基清除率。

$$Y = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

$Y$ ——ABTS 自由基清除率,%;

$A_0$ ——无水乙醇+ABTS 自由基工作液的吸光度;

$A_1$ ——提取液+ABTS 自由基工作液的吸光度。

### 1.3.4 体外酶抑制活性研究

(1) 胰脂肪酶:参照文献[19]的方法配制胰脂肪酶溶液、底物 PNPP 溶液和阳性药奥利司他溶液。在 1.3.1 中超声提取的黑豆提取物样品溶液中加入缓冲液和胰脂肪酶,反应体系如表 2 所示,测定各组吸光度,按式(6)计算胰脂肪酶抑制率。

$$Y = \left(1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2}\right) \times 100\%, \quad (6)$$

式中:

$Y$ ——抑制率,%;

$A_1$ ——空白组吸光度;

$A_2$ ——空白对照组吸光度;

$A_3$ ——抑制组吸光度;

$A_4$ ——抑制对照组吸光度。

(2)  $\alpha$ -淀粉酶:参照文献[20]的方法配制  $\alpha$ -淀粉酶溶液、淀粉溶液和 DNS 显色剂溶液。根据如表 3 所示的反应体系测定在 1.3.1 中超声提取的黑豆提取物样品溶液各组的吸光度,按式(6)计算  $\alpha$ -淀粉酶抑制率。

(3) 乙酰胆碱酯酶:以阳性药石杉碱甲为阳性药,参照文献[21]的方法测定各黑豆提取物的吸光度,按式(7)计算乙酰胆碱酯酶抑制率。

$$Y = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}}{A_{\text{空白}}}\right) \times 100\%, \quad (7)$$

表 2 胰脂肪酶反应体系

| 组别             | 底物 | 样品  | 胰脂肪酶液 | PBS |
|----------------|----|-----|-------|-----|
| 空白组( $A_1$ )   | 50 | 0   | 100   | 100 |
| 空白对照组( $A_2$ ) | 50 | 0   | 0     | 200 |
| 抑制组( $A_3$ )   | 50 | 100 | 100   | 0   |
| 抑制对照组( $A_4$ ) | 50 | 100 | 0     | 100 |

表 3 α-淀粉酶活性测定体系

Table 3 α-amylase activity determination system μL

| 组别                     | 淀粉酶 | 样品  | 淀粉  | PBS | DNS |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 空白组(A <sub>1</sub> )   | 100 | 0   | 100 | 800 | 50  |
| 空白对照组(A <sub>2</sub> ) | 0   | 0   | 100 | 900 | 50  |
| 抑制组(A <sub>3</sub> )   | 100 | 100 | 100 | 700 | 50  |
| 抑制对照组(A <sub>4</sub> ) | 0   | 100 | 100 | 800 | 50  |

式中：

Y——乙酰胆碱酯酶抑制率，%；

A<sub>样品</sub>——只加样品吸光度；

A<sub>背景</sub>——PBS 溶液代替酶液吸光度；

A<sub>空白</sub>——溶剂代替样品吸光度。

(4) 酪氨酸酶：参照文献[22]，按式(8)计算酪氨酸酶抑制率。

$$Y=\frac{(A-B)-(C-D)}{A-B}\times 100\%,$$

(8)

式中：

Y——酪氨酸酶抑制率，%；

A——空白对照组(PBS 130 μL+酶 50 μL+底物 20 μL)吸光度；

B——空白背景组(PBS 180 μL+底物 20 μL)吸光度；

C——不同浓度样品组(PBS 80 μL+酶 50 μL+样品溶液 50 μL+底物 20 μL)吸光度；

D——试验背景组(PBS 130 μL+供试品溶液 50 μL+底物 20 μL)吸光度。

1.3.5 数据处理 平行测定 3 次，数值用  $\bar{X}\pm S$ ，使用 Origin8.5 软件进行数据处理和作图，采用 SPSS Statistics23.0 软件计算 IC<sub>50</sub> 值。

2 结果与分析

2.1 各黑豆样品的浸膏提取率

将1.3.1项下超声提取液浓缩蒸干制得的各黑豆样

品的浸膏计算提取率，提取率为浸膏质量与提取之前的黑豆粉总重之比，详见表 4。

表 4 各黑豆样品的浸膏提取率

Table 4 Extraction rate of extract from each black bean sample

| 样品    | 浸膏/g | 提取率/%  | 样品   | 浸膏/g | 提取率/%  |
|-------|------|--------|------|------|--------|
| XHD01 | 3.01 | 15.042 | HD01 | 2.54 | 12.694 |
| XHD02 | 3.20 | 12.750 | HD02 | 1.40 | 7.000  |
| XHD03 | 3.00 | 11.990 | HD03 | 1.95 | 9.745  |
| XHD04 | 2.39 | 11.944 | HD04 | 1.64 | 8.196  |
| MLD01 | 1.84 | 9.200  |      |      |        |

2.2 各黑豆总酚酸、总黄酮、缩合单宁、花色苷、多糖与总蛋白含量

小黑豆和马料豆中总酚酸含量和总黄酮、缩合单宁含量普遍远高于黑豆，以上 3 种分成含量为马料豆>小黑豆>黑豆。尤其是小黑豆的总黄酮与缩合单宁含量约是黑豆的 5~10 倍，马料豆约是黑豆的 8~20 倍。就总花色苷、总多糖和总蛋白含量而言，小黑豆与黑豆含量差别不大。比较发现总花色苷为马料豆>小黑豆>黑豆，总多糖为小黑豆>黑豆>马料豆，总蛋白为马料豆>黑豆>小黑豆，详见表 5。

2.3 黑豆提取物体外抗氧化活性

各类黑豆均具有一定的抗氧化活性。其中，马料豆>小黑豆>黑豆。黑豆各类品种中马料豆的抗氧化活性最好，但相同质量浓度下均不及阳性药维生素 C(V<sub>C</sub>)的抗氧化活性，详见图 1、图 2 及表 6。

2.4 黑豆提取物体外酶抑制活性

2.4.1 胰脂肪酶 以样品质量浓度为横坐标，抑制率为纵坐标作图，得到各样品质量浓度与抑制率的曲线图，见图 3。各品种黑豆粗提物对胰脂肪酶抑制作用的 IC<sub>50</sub>，结

表 5 各黑豆样品中主要活性成分含量

Table 5 Content of main active ingredients in each black bean sample

| 品种编号  | 总酚酸含量/<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) | 总黄酮含量/<br>(mg CAE·g <sup>-1</sup> ) | 缩合单宁含量/<br>(mg CAE·g <sup>-1</sup> ) | 总花色苷含量/<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) | 总多糖含量/<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) | 总蛋白含量/<br>(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| XHD01 | 11.541 8                        | 68.985 0                            | 264.330 6                            | 0.242 6                          | 50.396 1                        | 357                             |
| XHD02 | 12.677 3                        | 66.941 9                            | 187.248 9                            | 0.144 2                          | 55.106 6                        | 362                             |
| XHD03 | 11.278 9                        | 80.698 7                            | 273.774 9                            | 0.208 0                          | 54.256 1                        | 363                             |
| XHD04 | 14.195 2                        | 76.223 4                            | 262.941 7                            | 0.286 0                          | 59.653 6                        | 340                             |
| HD01  | 5.725 1                         | 13.494 1                            | 15.863 6                             | 0.046 1                          | 37.180 6                        | 373                             |
| HD02  | 1.812 7                         | 19.555 3                            | 50.585 1                             | 0.094 0                          | 47.975 5                        | 375                             |
| HD03  | 7.422 3                         | 14.016 2                            | 36.696 5                             | 0.113 9                          | 51.802 7                        | 372                             |
| HD04  | 1.183 3                         | 13.312 5                            | 41.696 4                             | 0.038 7                          | 44.475 3                        | 365                             |
| MLD01 | 20.721 1                        | 143.145 8                           | 382.522 6                            | 0.258 5                          | 39.928 4                        | 424                             |

果见表 7。

由图 3 和表 7 可知,各黑豆提取物在一定质量浓度范围内对胰脂肪酶均有较好的抑制作用,小黑豆>黑豆>马料豆。其中,小黑豆和黑豆的抑制效果优于阳性药奥利司他。

2.4.2  $\alpha$ -淀粉酶 以样品质量浓度为横坐标,抑制率为

纵坐标作图,得各样品质量浓度与抑制率的曲线图,见图 4。计算各黑豆提取物对  $\alpha$ -淀粉酶活性抑制作用的  $IC_{50}$ ,结果见表 8。

由图 4 和表 8 可知,各类黑豆提取物在一定质量浓度范围内对  $\alpha$ -淀粉酶均有抑制作用,其中马料豆>黑豆>小黑豆。

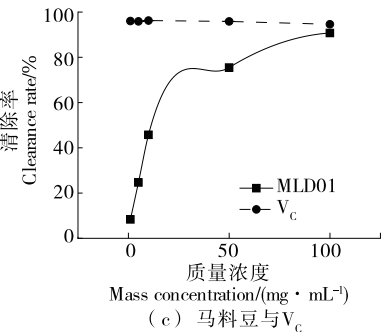
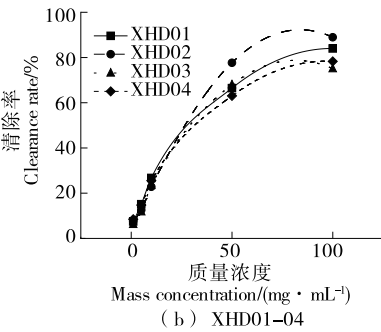
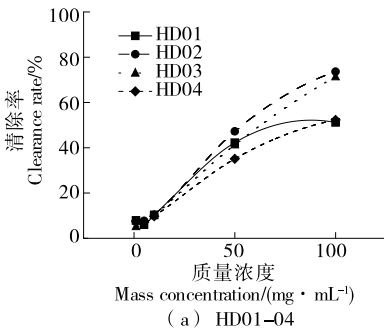


图 1 体外对 DPPH 自由基清除曲线

Figure 1 In vitro scavenging curve of DPPH free radical of extracts

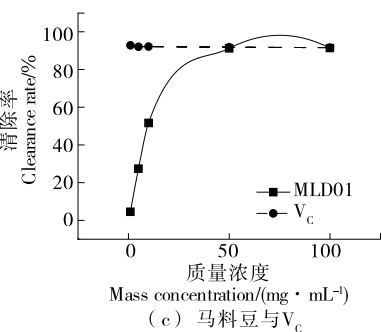
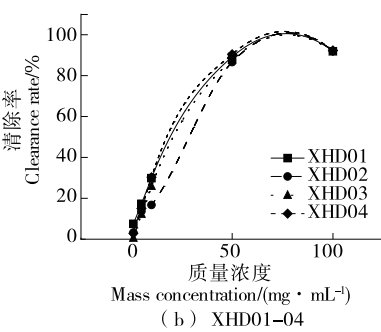
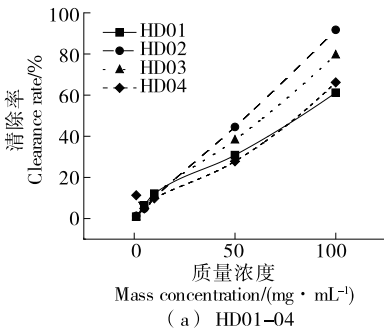


图 2 体外对 ABTS 自由基清除曲线

Figure 2 ABTS free radical scavenging curves of extracts in vitro

表 6 各黑豆提取物体外抗氧化活性的  $IC_{50}$  值

Table 6  $IC_{50}$  value of antioxidant activity of extracts of black bean in vitro

| 品种    | 清除 DPPH 自由基的 $IC_{50}$ 值 | 清除 ABTS 自由基的 $IC_{50}$ 值 |
|-------|--------------------------|--------------------------|
| XHD01 | 23.977                   | 14.824                   |
| XHD02 | 20.606                   | 19.530                   |
| XHD03 | 29.459                   | 18.163                   |
| XHD04 | 28.027                   | 15.573                   |
| HD01  | 96.445                   | 79.889                   |
| HD02  | 49.304                   | 40.794                   |
| HD03  | 57.032                   | 51.353                   |
| HD04  | 111.859                  | 91.277                   |
| MLD01 | 13.269                   | 10.303                   |
| $V_c$ | 0.164                    | 0.914                    |

2.4.3 乙酰胆碱酯酶 以样品质量浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,得到各样品质量浓度与抑制率的曲线图,见图 5。计算黑豆提取物对乙酰胆碱酯酶抑制作用的

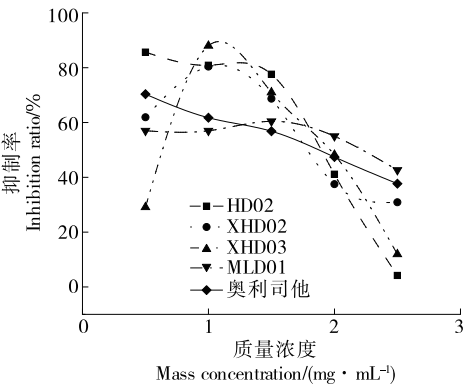


图 3 各黑豆提取物体外对胰脂肪酶的抑制作用

Figure 3 The inhibitory effect of black bean extract on pancreatic lipase in vitro



IC<sub>50</sub>, 结果见表 9。

由图 5 和表 9 可知,除黑豆外,小黑豆、马料豆及花青素单体(矢车菊素-3-O-葡萄糖苷)和阳性药石杉碱甲对乙酰胆碱酯酶均有一定的抑制作用,其中小黑豆>马料豆。

表 7 各黑豆提取物体外抑制胰脂肪酶的 IC<sub>50</sub> 值

Table 7 IC<sub>50</sub> value of pancreatic lipase inhibited by black bean extract in vitro

| 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------------------|
| HD02  | 1.614                                       | MLD01 | 2.977                                       |
| XHD02 | 1.707                                       | 奥利司他  | 1.665                                       |
| XHD03 | 1.213                                       |       |                                             |

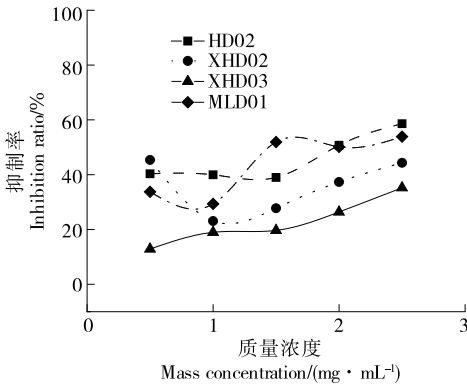


图 4 各黑豆提取物体外对 α-淀粉酶的抑制作用  
Figure 4 The inhibitory effect of black bean extract on α-amylase in vitro

表 8 各黑豆提取物体外抑制 α-淀粉酶的 IC<sub>50</sub> 值<sup>†</sup>

Table 8 IC<sub>50</sub> value of α-amylase inhibited by black bean extract in vitro

| 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------------------|
| HD02  | 2.031                                       | XHD03 | 6.905                                       |
| XHD02 | —                                           | MLD01 | 2.003                                       |

<sup>†</sup> “—”表示 IC<sub>50</sub> 值无法检测。

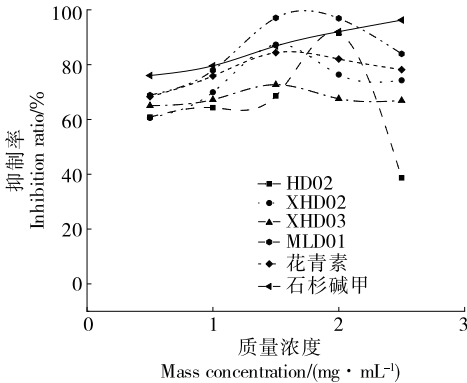


图 5 各黑豆提取物体外对乙酰胆碱酯酶的抑制作用  
Figure 5 The inhibitory effect of black bean extracts on acetylcholinesterase in vitro

2.4.4 酪氨酸酶 以样品质量浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,得到各样品质量浓度与抑制率的曲线图,见图 6。计算粗提物对酪氨酸酶活性抑制作用的 IC<sub>50</sub>, 结果见表 10。

表 9 各黑豆提取物体外抑制乙酰胆碱酯酶的 IC<sub>50</sub> 值<sup>†</sup>

Table 9 IC<sub>50</sub> value of black bean extract inhibited acetylcholinesterase in vitro

| 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------------------|
| HD02  | —                                           | MLD01 | 0.230                                       |
| XHD02 | 0.181                                       | 花青素   | 0.072                                       |
| XHD03 | —                                           | 石杉碱甲  | 0.188                                       |

<sup>†</sup> “—”表示 IC<sub>50</sub> 值无法检测。

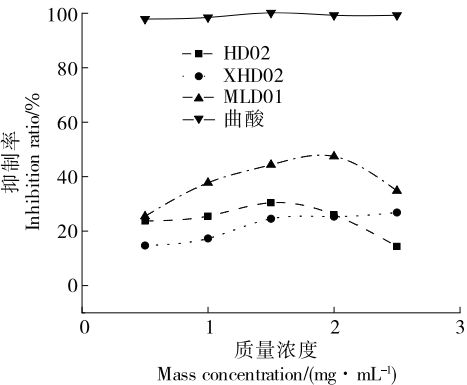


图 6 黑豆提取物体外对酪氨酸酶的抑制作用  
Figure 6 The inhibitory effect of black bean extract on tyrosinase in vitro

表 10 黑豆提取物体外抑制酪氨酸酶的 IC<sub>50</sub> 值

Table 10 IC<sub>50</sub> value of black bean extract inhibits tyrosinase in vitro

| 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 样品    | IC <sub>50</sub> 值/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------------------|-------|---------------------------------------------|
| HD02  | 0.001                                       | MLD01 | 4.581                                       |
| XHD02 | 17.041                                      | 曲酸    | 0.003                                       |

由图 6 和表 10 可知,各类黑豆在一定质量浓度范围内对酪氨酸酶均有抑制作用,黑豆>马料豆>小黑豆。其中,黑豆的抑制效果优于阳性药曲酸。

### 3 结论

酚酸、黄酮、花色苷等植物次生代谢产物与多种疾病治疗密切相关,而小黑豆的总酚酸、总黄酮、缩合单宁、总花色苷和总多糖含量高于其他品种,故小黑豆的药用价值更高。马料豆其百粒重量仅为小黑豆的 1/10,黑豆的 1/40。而马料豆除多糖含量外,其余主成分主要活性成分均高于小黑豆和黑豆,其抗氧化活性和酶抑制活性也较好。这印证了前人<sup>[8-9]</sup>提出的药用黑豆炮制何首乌等药材时应选择小黑豆的观点。

研究从药用和食用两个方面评价不同黑豆品种,发现黑豆体外有抗氧化和抑制多种代谢综合征相关酶的作用,其有辅助预防代谢综合征的应用价值<sup>[23]</sup>。后期可加强小黑豆药用价值的开发与研究,进一步开展整体动物体内试验进而对黑豆不同品种降脂降糖和预防海尔默兹综合征等生物活性进行深入研究。

### 参考文献

- [1] 张宽朝,李敏,汪炜姿,等.近20年国内外黑豆研究的文献计量研究:基于时空发展态势的分析[J].金陵科技学院学报,2020,36(4):81-86.  
ZHANG K C, LI M, WANG W Z, et al. Bibliometric study on Chinese and international black soybean research in the past 20 years: Analysis of space-time development status [J]. Journal of Jinling Institute of Technology, 2020, 36(4): 81-86.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:1 010.  
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia: Part II[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 1 010.
- [3] 刘江,吴海军,陈兴福.关于《中国药典》中黑豆鉴别方法的商榷与质量评价标准建议[J].中国药品标准,2021,22(5):418-423.  
LIU J, WU H J, CHEN X F. Discussion on identification method and quality evaluation standard of traditional Chinese medicine "Heidou" in the Chinese pharmacopoeia [J]. Drug Standards of China, 2021, 22(5): 418-423.
- [4] 林王敏,翁倩倩,邓爱平,等.黑豆的本草考证[J].中国中药杂志,2020,45(18):4 519-4 527.  
LIN W M, WENG Q Q, DENG A P, et al. Textual research on sojae semen nigrum [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 45(18): 4 519-4 527.
- [5] 高晶晶,慕苗.陕北小粒黑豆中黄酮的提取工艺研究[J].河南科学,2018,36(9):1 367-1 371.  
GAO J J, MU M. Extraction of flavonoids from black beans in northern Shaanxi [J]. Henan Science, 2018, 36(9): 1 367-1 371.
- [6] 王双侠,苏适,柴宝丽.黑豆中大豆异黄酮超声波法提取工艺优化[J].齐齐哈尔大学学报(自然科学版),2021,37(2):70-72.  
WANG S X, SU S, CHAI B L. Optimization of ultrasonic extraction on soy isoflavones from black beans [J]. Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition), 2021, 37(2): 70-72.
- [7] 孙长波,刘宏群.黑豆中总皂苷提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2020,41(24):137-141.  
SUN C B, LIU H Q. Study on extraction technology of total saponins from black bean [J]. Food Research and Development, 2020, 41(24): 137-141.
- [8] 魏玉,王彬,石延榜,等.多指标综合评分法优选中药炮制辅料黑豆汁的制备工艺[J].时珍国医国药,2023,34(3):605-608.  
WEI Y, WANG B, SHI Y B, et al. Optimization of preparation technology of black soybean juice by multi-index comprehensive evaluation method [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2023, 34(3): 605-608.
- [9] 李佳荣,刘美,邓莎,等.不同产地黑豆质量评价[J].中成药,2022,44(8):2 554-2 559.  
LI J R, LIU M, DENG S, et al. Quality assessment for sojae semen nigrum from different habitats [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(8): 2 554-2 559.
- [10] 李瑞,白伟,梁鸡保,等.优质专用小粒黑豆品种选育及其豆制品表现研究[J].大豆科技,2022(6):6-14.  
LI R, BAI W, LIANG J B, et al. Breeding of high quality specialized small grain black bean varieties and study on the performance of soybean products [J]. Soybean Science & Technology, 2022(6): 6-14.
- [11] 余雨婷,张彦,张迎,等.紫苏体外对代谢综合征相关四种酶抑制作用的研究[J].中国食品添加剂,2022,33(4):63-71.  
YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Study on enzyme inhibition of perilla in vitro on metabolic syndrome [J]. Chinese Food Additives, 2022, 33(4): 63-71.
- [12] 张榕欣,邱英莲,邓金兰,等.超声波辅助双酶法制备黑豆多肽的工艺优化及其抗氧化活性研究[J].饲料研究,2022,45(13):79-82.  
ZHANG R X, QIU Y L, DENG J L, et al. Ultrasound-assisted double-enzyme method for preparing process optimization of black soybean peptides and study on its antioxidant activity [J]. Feed Research, 2022, 45(13): 79-82.
- [13] 中国农业百科全书总编辑委员会.中国农业百科全书农作物卷:下册[M].北京:农业出版社,1991:824.  
China Agricultural Encyclopedia Editorial Committee. Chinese agricultural encyclopedia crop volume: Volume II [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1991: 824.
- [14] 李思获.高抗氧化能力豆类的筛选及其黄酮类物质消化吸收效果的评价[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2010:17.  
LI S D. Bean with high antioxidant flavonoids in the selection and evaluation of effects of digestion and absorption [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2010: 17.
- [15] BURNS R E. Method for estimation of tannin in grain sorghum [J]. Agronomy Journal, 1971, 63: 511-512.
- [16] WANG Y W, LUAN G X, ZHOU W, et al. Subcritical water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS analysis and antioxidant activity of anthocyanins from lycium ruthenicum murr [J]. Food Chemistry, 2018, 249: 119-126.
- [17] 张小荣,黄钰芳,何海,等.差示苯酚-硫酸法结合DNS法测定红芪多糖(HPS)含量[J].安徽农业科学,2022,50(4):186-189,253.  
ZHANG X R, HUANG Y F, HE H, et al. Differential phenol-sulfuric acid method combined with DNS method to determine the content of hedysarum polysaccharides (HPS) [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(4): 186-189, 253.

(下转第195页)

- [23] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [24] 陈美珺, 梁统, 周克元. 原花青素的抗炎作用及其作用机制探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(12): 1 080-1 082.  
CHEN M J, LIANG T, ZHOU K Y. The anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2008, 29(12): 1 080-1 082.
- [25] ZHENG W C, FENG Y J, BAI Y J, et al. Proanthocyanidins extracted from grape seeds inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells and induce apoptosis through the MAPK/Akt pathway[J]. *Food Bioscience*, 2022, 45: 101337.
- [26] SINGLETARY K W, MELINE B. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model[J]. *Nutrition and Cancer*, 2001, 39(2): 252-258.
- [27] 杜宏, 张娜, 高霞, 等. 莲房原花青素对人肝癌细胞 HepG2 生长及凋亡的作用[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(6): 891-893.  
DU H, ZHANG N, GAO X, et al. The effect of Lianfang proanthocyanidins on the growth and apoptosis of human liver cancer cell line HepG2[J]. *Journal of Practical Medicine*, 2008, 24(6): 891-893.
- [28] 梁慧敏, 时小燕, 梁志刚, 等. 原花青素对人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导分化作用[J]. *中国医疗前沿*, 2010, 55(21): 18-19.  
LIANG H M, SHI X Y, LIANG Z G, et al. The induced differentiation effect of procyanidins on human liver cancer cell line SMMC-7721[J]. *China Medical Frontier*, 2010, 55(21): 18-19.
- [29] 许慧. 莲房原花青素诱导 ROS 积蓄介导 HepG2 细胞自噬和凋亡的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016: 5-15.
- XU H. Study on the induction of ROS accumulation mediated autophagy and apoptosis in HepG2 cells by Lianfang proanthocyanidins[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016: 5-15.
- [30] MALDONADO M E, BOUSSEROUEL S, GOSSE F, et al. Implication of NF- $\kappa$ B and p53 in the expression of TRAIL-death receptors and apoptosis by apple procyanidins in human metastatic SW620 cells [J]. *Biomédica Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 2010, 30(4): 577-580.
- [31] 卢婷婷, 梁统. 原花青素对 IL-1 $\beta$  诱导的 A549 细胞环氧化酶-2 启动子活性的影响[J]. *郑州牧业工程高等专科学校学报*, 2010, 30(2): 1-3.  
LU T T, LIANG T. Effect of procyanidins on the COX-2 promoter activity in A549 cells induced by IL-1 $\beta$ [J]. *Journal of Zhengzhou Animal Husbandry Engineering College*, 2010, 30(2): 1-3.
- [32] ENGELBRECHT A M, MATTHEYSE M, ELLIS B, et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line [J]. *Cancer Letters*, 2007, 258(1): 150-153.
- [33] 栾秋英. 天然药物有效成分诱导白血病细胞凋亡与分化的研究进展[J]. *河南职工医学院学报*, 2010, 34(6): 126-129.  
LUAN Q Y. Research progress on the induction of apoptosis and differentiation of leukemia cells by natural drug active ingredients [J]. *Journal of Henan Workers' Medical College*, 2010, 34(6): 126-129.
- [34] ZHANG R, YU Q, LU W, et al. Grape seed procyanidin B2 promotes the autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells via regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Onco Targets and Therapy*, 2019, 12: 4 109-4 118.
- 
- (上接第 187 页)
- [18] 王宁, 张叶韬, 芦晓芳. 黑豆异黄酮的提取分离及其对 DPPH 自由基的清除能力[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(1): 171-176.  
WANG N, ZHANG Y T, LU X F. Extraction of isoflavones from *Glycine max* and its ability to scavenge DPPH free radicals[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2022, 50(1): 171-176.
- [19] LIANG L F, WANG T, CAI Y S, et al. Brominated polyunsaturated lipids from the Chinese sponge *Xestospongia testudinaria* as a new class of pancreatic lipase inhibitors [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 79(8): 290-297.
- [20] 田丝竹, 李绪文, 臧爽, 等. 10 种野生植物果实对  $\alpha$ -淀粉酶和酪氨酸酶的抑制作用及其酚类化合物含量和抗氧化活性研究[J]. *分析化学*, 2021, 49(3): 449-459.  
TIAN S Z, LI X W, ZANG S, et al. Investigation of  $\alpha$ -amylase and tyrosinase inhibitory activities, phenolic compounds, and antioxidant activity in ten kinds of wild fruits[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2021, 49(3): 449-459.
- [21] 丁林玲, 谢颖欣, 高伟, 等. 三叶木通果肉提取物的体外抗氧化及抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶能力[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(4): 1 058-1 065.
- DING L L, XIE Y X, GAO W, et al. In vitro antioxidant activities,  $\alpha$ -glucosidase and acetylcholinesterase inhibition ability of *Akebia trifoliata* pulp extracts[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(4): 1 058-1 065.
- [22] 黄淑安, 丁红霞, 杨远帆, 等. 琯溪蜜柚疏果黄酮酶法辅助提取工艺优化及其抑制酪氨酸酶活性[J/OL]. *食品工业科技*. (2023-11-03) [2023-11-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060298>.  
HUANG S A, DING H X, YANG Y F, et al. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from Guanxi Pomelo fruit and its inhibition of tyrosinase activity[J/OL]. *Food Industry Science and Technology*. (2023-11-03) [2023-11-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023060298>.
- [23] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 基于分子对接探究紫苏粗提物对代谢综合征相关酶的抑制作用[J]. *食品与机械*, 2022, 38(4): 183-188.  
YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Explore the inhibitory effect of *Perilla* crude extract on metabolic syndrome-related enzymes based on molecular docking[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(4): 183-188.