

黑小豆种皮花色苷的提取及体外抗氧化活性研究

李 芳, 阮长青*, 汤凯欣, 李巍威, 张雪路, 孙记涛

黑龙江八一农垦大学食品学院, 大庆 163319

摘要: 为了探索新的花色苷资源, 以黑小豆种皮为原料, 对其花色苷类色素的提取工艺进行了研究。通过单因素和 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察了乙醇浓度、料液比、温度和 pH 对粗提液中花色苷含量的影响。结果表明, 最佳提取条件为: 乙醇浓度 60%、料液比 1:20 (g: mL)、温度 50 °C、pH=2.0。此条件下, 黑小豆种皮粗提液中花色苷的含量最大 (5.912 mg/g); 黑小豆种皮花色苷粗提物得率为 19.1%, 纯度为 3.06%; 粗提物具有一定的总抗氧化能力和清除 $O_2^{\cdot -}$ 、 $\cdot OH$ 和 DPPH 自由基的能力。黑小豆种皮可作为一种新型花色苷资源加以利用。

关键词: 黑小豆种皮; 花色苷; 提取; 抗氧化活性

中图分类号: Q946.83; TS214.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.017

Extraction and *in vitro* Antioxidant Activity of Anthocyanins Pigment from *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi Hulls

LI Fang, RUAN Chang-qing*, TANG Kai-xin, LI Wei-wei, ZHANG Xue-lu, SUN Ji-tao

Food College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: In order to explore new anthocyanins resources, extraction process for anthocyanin pigments from *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi hulls was developed and optimized by single factor and $L_9(3^4)$ orthogonal experiments. The optimal conditions for the extraction of anthocyanins from *V. angularis* hulls was 60% ethanol as extraction solvent, solid-liquid ratio of 1:20 (g: mL), temperature of 40 °C and pH 2.0. Under these extraction conditions, the highest extraction amount for anthocyanins was 5.912 mg/g with extraction yield of 19.1% and purity of 3.06%. *V. angularis* hulls crude extract showed a strong $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ and DPPH radical scavenging ability. *V. hulls* can be utilized as a new type of anthocyanins resource.

Key words: *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohash hulls; anthocyanins; extraction; antioxidant activity

小豆 [*Vigna anagularis* (Wild) Ohwi & Oohashi], 为豆科、豇豆属、小豆种。按种皮颜色划分为红小豆、白(灰)小豆、桔黄小豆、绿小豆、黑小豆、花纹小豆、褐花斑小豆七个类型, 主要分布在华北、东北、西北和黄淮及长江中下游地区。我国是世界小豆生产最多的国家, 出口量常占世界首位^[1]。作为一种优质的食用豆类资源, 小豆蛋白质含量为 16.86%~28.32%, 比禾谷类作物高 2~3 倍, 富含 18 种氨基酸; 总淀粉含量为 41.83%~59.89%, 维生素、矿物质含量也较丰富^[2]。小豆有通便利尿、净化血液、解除疲劳、降低胆固醇等多种功效^[3]。种皮是黑小豆区别于红小豆的主要特征, 产生“小豆色”色素是由于花色素系统的存在^[4]。

花色苷是由花色素与糖以糖苷键结合而成的一类多酚类化合物, 广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根器官的细胞液中。花色苷作为天然色素和抗氧化剂, 引起国内外广泛的关注^[5,6], 对于其他食用黑色粮豆种子及种皮中花色苷的研究已有大量报道, 如黑大豆皮^[7]、黑玉米籽粒中花色苷的提取^[8]等。研究表明, 15 种常见食用豆类脱脂豆粉的乙醇浸提物中, 其中刀豆、黑小豆、花豇豆表现出较强的清除 DPPH 自由基能力, 而且黑小豆、黑大豆、绿大豆中大豆异黄酮含量较高, 其中黑小豆中大豆异黄酮的含量比大豆样品中的含量还高^[9]。小豆的抗氧化作用与小豆种皮所含色素和多酚等有密切的关系^[10]。黑小豆提取物对脂肪沉积具有一定的抑制作用, 可作为肥胖患者的膳食补充剂^[11]。而黑小豆种皮是紫黑色的聚合物, 对于其种皮花色苷的研究尚未见报道。本研究采用安全、廉价的乙醇为提取剂, 通过正交试验对黑小豆种皮花色苷的提取工艺

参数进行优化,以确定最佳提取工艺,为黑小豆种皮后续综合利用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 试验原料

黑小豆:购自黑龙江省绥化市。

1.2 试验试剂

pH = 1.0 氯化钾-盐酸缓冲液; pH = 4.5 乙酸-乙酸钠缓冲液; 盐酸、乙醇、氯化钾、乙酸钠、冰乙酸均为分析纯。矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(纯度 ≥ 98%):成都曼斯特生物科技有限公司。抗超氧阴离子自由基测试盒,总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒,羟自由基测定试剂盒:南京建成生物工程研究所;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):美国 Sigma 公司。

1.3 主要仪器设备

FW100 型高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;SevenMulti 型 pH 计,Mettler-Toledo 仪器有限公司;DGG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;722 型紫外-可见分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;SHZ-B 型水浴恒温振荡器,金坛市荣华仪器制造有限公司;R-200 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;ALPHA1-2 LD plus 型冷冻干燥机,德国 Christ 公司。

2 实验方法

2.1 黑小豆种皮预处理

黑小豆挑选、清洗,按黑小豆:水 = 2:3 的比例 40 ℃ 水浴 10 min,进行人工脱皮,于 43 ℃ 干燥箱中干燥至恒重,粉碎,过 60 目筛,备用。

2.2 黑小豆种皮花色苷的提取工艺

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g,加入一定体积的乙醇,室温条件下,用 1% 盐酸调节溶液的 pH,振荡,抽滤,定容。

2.3 花色苷含量的测定

花色苷含量采用 pH 示差法进行测定^[12]。

绘制标准曲线:取 20 mg 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷,定容至 200.0 mL,其浓度为 0.1 mg/mL,分别吸取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于比色管中,分别用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液定容至 10.0 mL,混匀,以空白试剂作参比,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度,以花色苷浓度(mg/mL)为横坐标,吸光值为纵坐标绘制曲线。

样品测定:提取液定容至 50.0 mL,分别取 1.0 mL,用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度,根据(1)式得出测定液中花色苷吸光度,再根据标准曲线查得 1.0 mL 测定液中花色苷浓度,乘以稀释倍数计算出粗提液中花色苷质量,据(2)式得出花色苷的含量,粗提液真空浓缩,冷冻干燥后得深红色粉末,分别据(3)、(4)式计算花色苷粗提物得率和纯度。

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5} \quad (1)$$

提取液中花色苷含量计算如下:

$$\text{花色苷含量}(\text{mg/g}) = \text{提取液中花色苷质量} / \text{黑小豆种皮质量} \times 1000 \quad (2)$$

花色苷粗提物得率计算如下:

$$\text{花色苷粗提物得率}(\%) = \text{冻干后质量} / \text{黑小豆种皮质量} \times 100 \quad (3)$$

花色苷纯度计算如下:

$$\text{花色苷纯度}(\%) = \text{提取液中花色苷质量} / \text{冻干后质量} \times 100 \quad (4)$$

2.4 单因素试验

2.4.1 乙醇浓度的选择

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g,以料液比 1:20(g:mL)分别加入 40%、50%、60%、70%、80% 乙醇溶液各 20.0 mL,室温条件下,用 1% 盐酸调节 pH 至 2.0,30 ℃、200 rpm 振荡 1 h,抽滤,定容至 50.0 mL,分别取 1.0 mL,用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度,计算出粗提液中花色苷含量。

2.4.2 料液比的选择

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g,分别加入 70% 乙醇溶液 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 mL,室温条件下,用 1% 盐酸调节 pH 至 2.0,30 ℃、200 rpm 振荡 1 h,抽滤,定容至 50 mL,分别取 1.0 mL,用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度,计算出粗提液中花色苷含量。

2.4.3 pH 的选择

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g,分别加入 70% 乙醇溶液 20.0 mL,室温条件下,用 1% 盐酸调节 pH 至 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0,30 ℃、200 rpm 振荡 1 h,抽滤,定容至 50.0 mL^[13],分别取 1.0 mL,用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL,分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度,计算出粗提液中

花色苷的含量。

2.4.4 浸提时间的选择

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g, 分别加入 70% 乙醇溶液 20.0 mL, 室温条件下, 用 1% 盐酸调节 pH 至 1.0, 30 °C、200 rpm 振荡 30、60、90、120、150 min, 抽滤, 定容至 50.0 mL, 分别取 1.0 mL, 用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL, 分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度, 计算出粗提液中花色苷含量。

2.4.5 浸提温度的选择

准确称取黑小豆种皮粉末 1.000 g, 分别加入

70% 乙醇溶液 20.0 mL, 室温条件下, 用 1% 盐酸调节 pH 至 1.0, 分别在 30、40、50、60、70、80 °C, 200 rpm 振荡 60 min, 抽滤, 定容至 50.0 mL, 分别取 1.0 mL, 用 pH 1.0 和 pH 4.5 的缓冲液稀释至 10.0 mL, 分别在 520 nm 和 700 nm 处测定吸光度, 计算出粗提液中花色苷的含量。

2.5 正交试验因素水平表

在单因素试验基础上, 选择乙醇浓度、料液比、pH 和温度为主要因素, 利用正交助手 V3.1 软件设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(如表 1)。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平 Level	A 浓度 Concentration	B 料液比 Solid-liquid ratio (g: mL)	C pH pH	D 温度 Temperature
1	60%	1:10	1.0	30 °C
2	70%	1:20	2.0	40 °C
3	80%	1:30	3.0	50 °C

2.6 数据统计分析

单因素实验、正交试验以及抗氧化活性测定均采用 3 次平行试验, 采用 Excel 2010 软件绘制图表, 通过 SAS 9.1.3 软件作单因素方差分析, 采用 LSD Duncan 对实验数据进行显著性分析 ($P < 0.05$), 结果以字母表示, 不同字母表示差异显著, 数据以其均值和相对标准偏差进行表征。

2.7 抗氧化能力测定

2.7.1 清除超氧阴离子自由基能力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100 \quad (5)$$

式中: A_0 为空白对照的吸光度平均值; A_1 为样品溶液的吸光度平均值。

2.7.2 清除羟自由基能力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定^[14]。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_2 - A_0) / A_1] \times 100 \quad (6)$$

式中: A_0 为对照组的吸光度; A_1 为空白组的吸光度; A_2 为样品溶液的吸光度。

2.7.3 清除 DPPH 自由基能力的测定

参照文献^[15], 精确吸取 2.0 mL 不同浓度的黑小豆皮花色苷溶液及 2.0 mL DPPH 溶液于试管中, 摇匀, 室温下暗处静置 30 min 后测定其吸光度, 以

2.0 mL DPPH 溶液与 2.0 mL 蒸馏水的混合液作为对照, 以 2.0 mL 花色苷溶液与 2.0 mL 乙醇的混合液作为空白。分别在 517 nm 处测定不同溶液的吸光度, 最终以清除率计花色苷溶液的抗氧化能力。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_2 - A_0) / A_1] \times 100 \quad (7)$$

式中: A_0 为空白组的吸光度; A_1 为对照组的吸光度; A_2 为样品溶液的吸光度。

2.7.4 总抗氧化能力的测定

采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。总抗氧化能力(T-AOC)计算公式为:

$$\text{T-AOC} / (\text{U/mL}) = (A_2 - A_1) \times N / 0.3C \quad (8)$$

式中: A_1 为对照组的吸光度; A_2 为样品溶液的吸光度; N 为反应体系稀释倍数(反应液总量/取样量); C 为花色苷浓度。

2.7.5 半抑制浓度的计算

半抑制浓度(IC_{50})为黑小豆种皮花色苷对自由基的清除率达到 50% 时对应的浓度, 可由线性关系得到。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

以矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷为标准, 得到的标准曲线方程为: $Y = 11.284X + 0.008$, 其中, Y 为溶液的

吸光度, X 为矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的浓度, 线性范围为 0.012 ~ 0.072 mg/mL, 相关系数 $R^2 = 0.9995$, 后续的花色苷含量均以该线性方程计算。

3.2 单因素试验

3.2.1 乙醇浓度的选择

选择料液比 1:20 (g: mL), 溶液 pH = 2.0, 浸提温度 30 °C, 浸提时间 1 h, 不同乙醇浓度 (40%、50%、60%、70%、80%) 提取时, 粗提液中花色苷含量见图 1。由图可知, 乙醇浓度在 40% ~ 70% 时, 粗提液中花色苷含量逐渐增大, 浓度达到 70% 时, 花色苷含量最大, 此后花色苷含量开始下降。乙醇浓度较低时, 一些水溶性成分溶解性较好, 花色苷溶出较少, 当乙醇浓度增大至提取剂与黑小豆种皮花色苷的极性接近时, 溶出最多。尽管 Chandrasekhar^[16] 等研究表明使用 50% 乙醇提取紫甘蓝中的花色苷效果最佳, 然而 Paula^[17] 等大多数研究者研究表明, 其他条件几乎相同, 80% 的乙醇提取紫茄皮中花色苷效果最佳。可能是各研究所用的原料不同, 存在的花色苷结构也不同, 极性存在差异, 当原料中花色苷的极性与乙醇浓度极性接近时, 获得的花色苷含量最大, 故使的各研究所用提取剂的浓度不同。

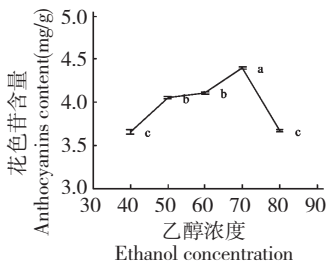


图 1 乙醇浓度对花色苷含量的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on anthocyanins content

注: 不同字母表示差异显著, 下同

Note: Different letters indicated significant difference, same as below

3.2.2 料液比的选择

选择乙醇浓度 70%, 溶液 pH = 2.0, 浸提温度 30 °C, 浸提时间 1 h。不同料液比 (1:5、1:10、1:20、1:30、1:40) 提取时, 粗提液中花色苷含量见图 2。由图可知, 随着料液比的增加, 粗提液中花色苷含量逐渐增大, 当料液比为 1:20 (g: mL) 时, 花色苷含量最大, 此后逐渐下降。这是由于提取剂用量较小时, 花色苷分子扩散速度慢, 不能充分溶出, 随着提取剂用量的增大, 溶质充分溶出, 此后由于其他成分对花色苷的吸附作用而导致含量略有下降。而李次力等^[18] 一些研究也表明料液比 1:20 (g: mL) 时, 黑芸

豆中花色苷色素的提取率最大, 不同的原料, 大部分料液比接近于 1:20 (g: mL) 时, 原料中的花色苷可以充分萃取出, 花色苷含量最大, 但部分原料中花色苷的溶解性略有不同, 故选取的料液比也有所不同。

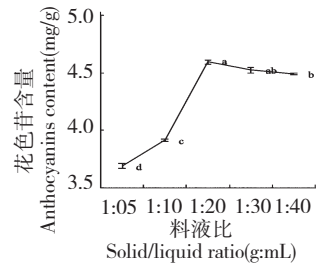


图 2 不同料液比对花色苷含量的影响

Fig. 2 Effect of solid/liquid ratio on anthocyanins content

3.2.3 pH 的选择

选择乙醇浓度 70%, 料液比 1:20 (g: mL), 浸提温度 30 °C, 浸提时间 1 h。不同 pH (1.0、2.0、3.0、4.0、5.0) 提取时, 粗提液中花色苷含量见图 3。由图可知, 随着溶液 pH 的增加, 粗提液中花色苷含量先增加后减少。在 pH = 2.0 时, 花色苷含量最大, pH 值 2.0 ~ 5.0 时, 花色苷含量显著降低。这是因为花色苷在酸性条件下呈稳定的红色, 随着 pH 增加至近中性, 花色苷的结构发生改变, 变为无色^[12], 故选择 pH = 2.0 为适宜。王旭等^[8] 的研究表明, pH 为 1.0, 黑玉米籽粒中花色苷的提取率最大, 但是也有部分的研究, 而黑大豆皮中花色苷的酶法提取时, pH 为 4.0 时提取率最大^[19]。由于原料和其他条件不同, 溶液的 pH 有所不同, 因为在保证花色苷提取率高的前提下, 还应考虑其稳定性。

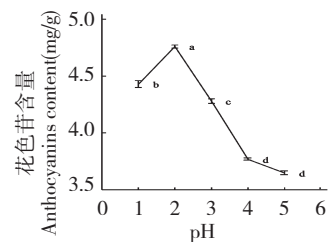


图 3 不同 pH 对花色苷含量的影响

Fig. 3 Effect of pH value on anthocyanins content

3.2.4 浸提时间的选择

选择乙醇浓度 70%, 溶液 pH = 2.0, 料液比 1:20 (g: mL), 浸提温度 30 °C。不同浸提时间 (30、60、90、120、150 min) 提取时, 粗提液中花色苷含量见图 4。由图可知, 随着浸提时间的延长, 粗提液中

花色苷含量逐渐增加,但超过 120 min,含量开始下降,原因可能是在一定的温度下,随着提取时间的延长,由于原料特性以及环境中光照、氧气等的影响,使得花色苷的稳定性下降,分子结构被破坏^[20],溶出量减少。

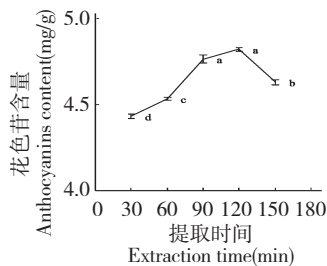


图 4 不同浸提时间对花色苷含量的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on anthocyanins content

3.2.5 浸提温度的选择

选择乙醇浓度 70%, 溶液 pH = 2.0, 料液比 1:20(g: mL), 浸提时间 120 min。不同浸提温度(30、40、50、60、70、80 °C)提取时,粗提液中花色苷含量见图 5。由图可知,温度升至 40 °C 时,粗提液中花色苷含量最高,随着温度进一步升高,花色苷含量出现下降。产生这种现象的原因可能是温度低,花色苷溶出的不完全,故其含量较低,然而花色苷是热敏性色素,在高温下不稳定,结构容易发生改变,温度升高,使部分花色苷发生分解^[12],故使得花色

苷的含量有所下降,说明黑小豆种皮花色苷的热稳定性较差。而徐金瑞等^[15]研究选取 60 °C 为黑大豆种皮花色苷提取的最佳温度,本研究表明,40 °C 时黑小豆种皮的花色苷含量最大,可能是由于黑大豆与黑小豆中花色苷的含量差异及其于其他成分的作用程度不同,而导致花色苷的溶出需要不同的温度^[7]。

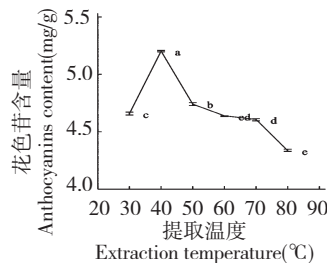


图 5 不同浸提温度对花色苷含量的影响

Fig. 5 Effect of extraction temperature on anthocyanins content

3.3 正交实验

由上述的单因素试验选择出对花色苷提取率影响较大的四个因素,分别为提取剂浓度、pH、料液比、温度,选取三个水平,提取时间为 120 min,采用 L₉(3⁴) 正交试验优化黑小豆种皮中花色苷的提取工艺。基于单因素试验结果确定的最适条件,选择提取剂浓度、pH、料液比、温度为自变量,以花色苷含量为因变量,设计正交实验,结果如表 2。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of L₉(3⁴) orthogonal test

实验号 No.	A	B	C	D	花色苷含量 Anthocyanins content (mg/g)
1	1	1	1	1	4.409
2	1	2	2	2	5.853
3	1	3	3	3	5.047
4	2	1	2	3	5.605
5	2	2	3	1	4.369
6	2	3	1	2	5.286
7	3	1	3	2	4.268
8	3	2	1	3	5.397
9	3	3	2	1	5.210
K ₁	15.309	14.082	15.092	14.188	
K ₂	15.261	15.619	16.869	15.207	
K ₃	14.875	16.443	14.184	16.749	
k ₁	5.103	4.761	5.031	4.663	
k ₂	5.087	5.206	5.556	5.136	
k ₃	4.958	5.181	4.561	5.350	
R	0.145	0.445	0.995	0.687	

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Source	偏差平方和 Type III sum of squares	自由度 df	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	0.038	2	1.00	19.00	
B	0.376	2	9.895	19.00	
C	1.487	2	39.132	19.00	*
D	0.742	2	19.526	19.00	*
误差 Error	3.77	2			

由表2可知,各因素对黑小豆种皮花色苷含量的影响次序为:pH > 温度 > 料液比 > 乙醇浓度。优化的各因素最佳工艺条件为 A₁B₂C₂D₃,即 pH 为 2.0,提取温度为 50 ℃,料液比为 1:20(g:mL),乙醇浓度为 60%。由表3可知,pH 和温度对黑小豆种皮花色苷含量具有显著影响,料液比和乙醇浓度对花色苷的含量未表现出显著的影响。这与正交试验得到的结果 C > D > B > A 相符,即 pH > 温度 > 料液比 > 乙醇浓度,故选择 A₁B₂C₂D₃ 为最佳试验组合。

由于优化出的试验组合不在正交表中,故进行验证试验,在最佳工艺条件下提取(三次平行),其含量分别为 5.893、5.926、5.917 mg/g,最终得到的粗提液中黑小豆种皮花色苷含量为 5.912 mg/g;黑小豆种皮粗提液冻干后,得率为 19.1%,其纯度为 3.06%。较黑大豆皮中花色苷含量(4.95 mg/g)^[19]、紫山药花色苷含量(2.075 mg/鲜紫山药 g)

高^[21],较黑玉米籽粒中花色苷的得率(18.71%)高^[8]。

3.4 黑小豆种皮花色苷粗提物的抗氧化性

由表4可知,黑小豆种皮花色苷粗提物具有一定的抗氧化能力,以 Vc 作阳性对照时,随着质量浓度的增大,花色苷粗提物和 Vc 的总抗氧化力以及对 O₂^{·-}、·OH 和 DPPH 自由基的清除率与花色苷粗提物、Vc 的质量浓度呈正相关,而且不同质量浓度的花色苷粗提物之间抗氧化能力差异显著。黑小豆种皮花色苷粗提物对 O₂^{·-}、·OH 和 DPPH 自由基的半抑制浓度 IC₅₀ 分别是 0.24 mg/mL、0.59 mg/mL 和 0.21 mg/mL,而 Vc 对 O₂^{·-}、·OH 和 DPPH 自由基的半抑制浓度 IC₅₀ 分别是 0.21 mg/mL、0.20 mg/mL 和 0.11 mg/mL。由于黑小豆种皮粗提物未经进一步纯化,与 Vc 相比较,总抗氧化力及清除自由基能力较 Vc 低。

表4 不同质量浓度黑小豆种皮花色苷粗提物和 Vc 的抗氧化能力

Table 4 Antioxidant activity of different concentrations of anthocyanins from *V. angularis* hulls and Vc

质量浓度 Concentration (mg/mL)	·OH 清除率 ·OH scavenging rate (%)		O ₂ ^{·-} 清除率 O ₂ ^{·-} scavenging rate (%)		DPPH· 清除率 DPPH· scavenging rate (%)		总抗氧化能力 Total antioxidant capacity (U/mL)	
	Vc	花色苷粗提物	Vc	花色苷粗提物	Vc	花色苷粗提物	Vc	花色苷粗提物
0.1	33.24 ± 1.38 ^d	24.51 ± 1.23 ^c	32.17 ± 1.45 ^d	24.40 ± 1.15 ^c	48.23 ± 2.03 ^d	34.15 ± 2.03 ^d	1.31 ± 0.09 ^f	0.44 ± 0.03 ^f
0.2	49.53 ± 1.95 ^c	30.35 ± 1.08 ^b	46.74 ± 1.28 ^c	41.20 ± 1.78 ^b	65.74 ± 3.41 ^c	48.36 ± 2.41 ^c	2.75 ± 0.12 ^e	1.60 ± 0.08 ^e
0.3	76.46 ± 3.04 ^b	34.73 ± 1.95 ^b	73.21 ± 3.64 ^b	57.76 ± 1.64 ^a	80.25 ± 4.56 ^b	58.46 ± 3.56 ^b	4.38 ± 0.19 ^d	2.58 ± 0.13 ^d
0.4	87.37 ± 3.89 ^a	39.91 ± 0.98 ^b	83.26 ± 4.97 ^a	60.31 ± 2.12 ^a	85.66 ± 4.79 ^a	63.73 ± 3.79 ^a	5.95 ± 0.28 ^c	3.78 ± 0.22 ^c
0.5	91.20 ± 4.21 ^a	43.58 ± 1.73 ^b	85.20 ± 5.23 ^a	61.91 ± 1.75 ^a	87.37 ± 5.03 ^a	65.21 ± 3.03 ^a	7.42 ± 0.36 ^b	5.29 ± 0.31 ^b
0.6	93.61 ± 4.55 ^a	52.38 ± 2.06 ^a	87.56 ± 5.88 ^a	62.56 ± 2.23 ^a	89.41 ± 4.97 ^a	67.86 ± 3.97 ^a	8.98 ± 0.46 ^a	6.86 ± 0.37 ^a

注:不同上标字母代表差异显著(P < 0.05)。

Note: Different superscript letters indicated significant difference, P < 0.05.

4 结论

本研究以乙醇为提取剂,利用 pH 示差法测定黑小豆种皮粗提液中花色苷含量,在单因素试验的

基础上,通过正交实验和方差分析确定了黑小豆种皮花色苷提取的最佳工艺:pH = 2.0,提取温度为 50 ℃,料液比为 1:20(g:mL),乙醇浓度为 60%,此条件下,黑小豆种皮中花色苷含量为 5.912 mg/g。粗

提液冻干后,得率为 19.1%,纯度为 3.06%。此操作工艺简单、省时、成本低廉。黑小豆种皮花色苷含量较高,其花色苷粗提物表现出一定的抗氧化能力。在利用脱皮机分离种皮与豆瓣(胚)后,豆瓣可作为食品加工原料,其种皮则可作为一种新的花色苷资源加以利用。黑小豆种皮中花色苷的进一步纯化,对于深入研究其有效成分、结构、理化性质以及体内外生物活性等具有一定指导意义。

参考文献

- Zheng ZJ(郑卓杰). Chinese Edible Beans Science. Beijing: China Agriculture Press, 1997. 173-187.
- Li AZ(李安智). Chinese Edible Beans Identification and Evaluation of Nutritional Quality. Beijing: China Agriculture Press, 1993. 317.
- Long YJ(龙静宜), Lin LF(林黎奋), Hou XS(侯修身), et al. Edible Legumes. Beijing: Science Press, 1989. 171.
- Sasamura S, Takeda K. Black red pigment of "Azuki Bean" studies on anthocyanins LV. *Bot Mag Tokyo*, 1966, 79: 807-810.
- Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods of characterization of polyphenol compounds in fruit and vegetables. *Food Chem*, 2011, 126: 1821-1835.
- Tsuda T. Anthocyanins as functional food factors-chemistry, Nutrition and Health Promotion. *Food Sci Technol Res*, 2012, 18: 315-324.
- Sun XX(孙晓侠), Ma L(马龙). Study on extracting of pigment from black soybean hulls with cellulose. *Sci Tech Food Ind(食品工业科技)*, 2010, 31: 319-321.
- Wang X(王旭), Tan HN(覃鸿妮), Yuan WJ(袁文娟), et al. Optimization of extraction conditions for anthocyanins from *Dark Maize*. *Food Sci(食品科学)*, 2013, 34(12): 36-39.
- Ren SC(任顺成), Wang P(王鹏), Wang GL(王国良), et al. Determination of flavonoid contents in common edible legumes. *J Chin Cereal Oil Assoc(中国粮油学报)*, 2009, 24: 132-137.
- Takahama U, Yamauchi R, Hirota S. Isolation and Characterization of a cyanidin-catechin pigment from Adzuki Bean (*Vigna angularis*). *Food Chem*, 2013, 141: 282-288.
- Kim M, Park JE, Song SB, et al. Effects of Black Adzuki Bean (*Vigna angularis*) extract on proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *Nutrients*, 2015, 7: 277-292.
- Rapisarda F, Fanella F, Maccarone E. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2249-2252.
- Zou Y(邹阳), Zhang XL(张秀玲), Shi Y(石岳). The extraction of anthocyanin pigment from wild blueberry. *Modern Food Sci Tech(现代食品科技)*, 2006, 23: 60-62.
- Wang Y, Evangelista S, Liu Y, et al. Beneficial effects of nebivolol and hydrochlorothiazide combination in spontaneously hypertensive rats. *J Int Med Res*, 2013, 41: 603-617.
- Xu JR(徐金瑞), Zhang MW(张名位), Liu XH(刘兴华), et al. Extraction and antioxidation of anthocyanin of black soybean seed coat. *T CSAE(农业工程学报)*, 2005, 21: 161-164.
- Chandrasekhar J, Madhusudhan MC, Raghavarao KSMS. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food Bioprod Proc*, 2012, 90: 615-623.
- Paua JT, Paviani LC, Foglio MA, et al. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. *J Supercrit Fluid*, 2013, 81: 33-41.
- Li CL(李次力). Study on microwave extraction and functional properties of anthocyanin pigment from black kidney bean. *Food Sci(食品科学)*, 2008, 29: 299-302.
- Song Y(宋岩), Yu GP(于国萍), Wu H(吴昊), et al. Ultrasonic-enzyme compound method extraction of anthocyanins from black soybean hulls. *Food Ind(食品工业)*, 2013, 34(1): 17-20.
- Xiao JX(肖军霞), Huang GQ(黄国清), Chi YS(迟玉森). Extraction of anthocyanins from cherry and its antioxidant activity. *J Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报)*, 2011, 11(5): 70-75.
- Ni QX(倪勤学), Gao QX(高前欣), Huo YR(霍艳荣), et al. Extraction and antioxidant activity of pigment from Purple Yam. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2012, 24: 229-233.