

# 正交实验法 优化酒石酸提取黑豆皮花色苷工艺

丁洁, 陈静, 沙芮, 牛犇\*, 梁宁, 洪霞  
(甘肃省商业科技研究所, 甘肃兰州 730020)

**摘要:**目的:优化酒石酸提取黑豆皮花色苷的工艺。方法:以黑豆皮为原料,黑豆皮花色苷含量为指标,在单因素实验基础上,采用正交实验设计法优化酒石酸提取黑豆皮花色苷的工艺。结果:酒石酸提取黑豆皮花色苷最佳提取工艺为酒石酸质量分数40%,料液比1:30 g/mL,加热温度60℃,加热时间150 min。花色苷含量14.32 mg/g。优选工艺条件下,黑豆皮花色苷含量14.32 mg/g。结论:结果稳定,具有生产应用价值。

**关键词:**黑豆皮种皮,花色苷,L-酒石酸,正交实验法

## Optimization of tartaric acid extraction of anthocyanins from soybean hulls by orthogonal experiment

DING Jie, CHEN Jing, SHA Rui, NIU Ben\*, LIANG Ning, HONG Xia

(Commercial Technology Institute of Gansu Province, Lanzhou 730020, China)

**Abstract:** Objective: Optimization of tartaric acid extraction of anthocyanin from black soybean hulls. Methods: Black soybean hulls and black soybean anthocyanin content were used as raw materials and the index, the process optimization of tartaric acid extraction of black soybean anthocyanin were investigated by orthogonal experimental design. Results: The best extraction process of tartaric acid extraction of anthocyanins from black soybean hulls was the tartaric acid concentration of 40%, solid-liquid ratio 1:30 g/mL, extraction temperature of 60℃, extraction time of 150 min. According to the optimal process conditions of black soybean hulls, anthocyanin yield was 14.32 mg/g. Conclusion: The result of the experiment proves that the result is stable and has the value of production and application.

**Key words:** black soybean hulls; anthocyanin; L-tartaric acid; orthogonal experiment

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2017)13-0163-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.030

花色苷是一种水溶性天然食用色素,安全、无毒、资源丰富<sup>[1]</sup>。花色苷的苷元为花色素,但是花色素在自然状态下不稳定。因此,在植物中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<sup>[2-3]</sup>,广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根器官的细胞液中。同时还具有抗氧化、抗癌、保护视力缓解眼部疲劳、延缓衰老、降压等功效<sup>[4]</sup>。近年来,除了利用花色苷良好的着色性,开发了一些天然色素外,其潜在的生物和药理保健作用也受到人们广泛的关注,流行病学研究表明,食用花色苷或富含花色苷的食物可以降低患心血管疾病、糖尿病<sup>[5]</sup>。因此花色苷已逐步向功能性健康食品方向发展。目前在日本、韩国就已有以花色苷为主要成分的产品,用于缓解电脑诱发的眼疲劳等症状<sup>[6]</sup>。在美国,花色苷的建议摄入量为180~215 mg/d,用于抗氧化营养增补剂,产

品有片剂,每片含花色苷50 mg<sup>[7]</sup>。花色苷广泛存在于黑色谷物中,作为黑色谷物之一的黑豆,富含花色苷,并具有药食两用性。黑豆皮花色苷类化合物具有抗氧化、抗炎、调节血脂及抑制肿瘤等一系列促进人类健康和预防疾病的生理功能,具有较强清除自由基和抗氧化的能力,是一种不可多得的具有保健功效的天然食用资源。随着黑豆皮花色苷抗氧化、减肥等功效的确定,均可适用于开发成健美美容减肥的健康食品<sup>[8]</sup>。目前提取黑豆皮中的花色苷主要使用盐酸,而花色苷未来多应用于食品,酒石酸本身既是食品添加剂又是药物工业原料。鉴于目前尚未见到酒石酸提取黑豆皮花色苷的相关报道,只有酒石酸提取阴香花色苷的报道<sup>[9]</sup>。本文以黑豆皮为原料,研究酒石酸质量分数、料液比、温度、提取时间四个因素对黑豆皮花色苷含量的影响,运用正交实验

收稿日期:2016-12-23

作者简介:丁洁(1986-),硕士,工程师,从事天然产物的研究与开发工作, E-mail: dingjie860118@163.com。

\* 通讯作者:牛犇(1967-),大学,正高级工程师,从事天然产物的研究与开发工作, E-mail: lzniuben@163.com。

基金项目:甘肃省创新团队建设项目(1207TTCA011);甘肃省重点实验室专项(1606RTSA337)。

法优化酒石酸提取黑豆皮花色苷的工艺,旨在为开发黑豆皮花色苷功能性食品药品提供参考依据。矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(cyaniding-3-O-glucoside, C3G)是自然界中存在的最普遍、最典型、比较稳定、易于获得的花色苷或矢车菊素,它在水果蔬菜中的含量区别较大,在21种常见水果中,C3G分布最为普遍<sup>[10]</sup>。C3G又是黑豆皮花色苷中的主要活性成分<sup>[11]</sup>,本实验通过紫外分光光度计测定C3G含量,旨在为开发黑豆皮花色苷功能性食品药品提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

黑豆皮 购自兰州市粮油市场;纯水 自制, pH6.82, 电导率 15  $\mu\text{s}/\text{cm}$  (27  $^{\circ}\text{C}$ ); L-酒石酸 北京化工厂, 批号 830905; 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 上海安普公司, 纯度 99.05%, 批号 Z0210010。

XS225A 型电子分析天平 普利塞斯, 瑞士; 优普 UPT-1-20L 落地式纯水机 四川优普超纯科技; UV2300 II 型双光束紫外可见光光度计 上海天美科学仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 黑豆皮花色苷的提取工艺 黑豆浸泡 2 h 以上, 取黑豆皮, 烘干, 粉碎, 准确称取黑豆种皮粉末 1.000 g, 加入一定体积的酒石酸溶液, 在一定温度下加热、振荡、抽滤、定容<sup>[12]</sup>。

1.2.2 花色苷含量的测定 通过紫外分光光度计测定, 以 C3G 作为对照品, 采用标准曲线计算法计算, 花色苷含量以 C3G 计<sup>[13-16]</sup>。

花色苷的含量( $\text{mg}/\text{g}$ ) =  $n \times V \times f / M$

式中,  $n$  - 样品浓度 ( $\text{mg}/\text{mL}$ ),  $V$  - 样品体积 ( $\text{mL}$ ),  $f$  - 稀释倍数,  $M$  - 黑豆皮质量 ( $\text{g}$ )。

1.2.3 单因素实验 固定酒石酸质量分数 30%, 黑豆种皮与酒石酸溶液料液比 1:30  $\text{g}/\text{mL}$ 、温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、提取 60 min 的情况下, 改变其他因素水平, 酒石酸质量分数 ( $\text{g}/\text{mL}$ ) 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; 料液比 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50  $\text{g}/\text{mL}$ ; 温度 30, 40, 50, 60, 70  $^{\circ}\text{C}$ ; 提取时间 30, 60, 90, 120, 150 min; 进行单因素实验, 以花色苷含量为指标, 选择较优参数。

1.2.4 正交实验设计 采用 SPSS 19.0 软件, 在单因素实验基础上, 依据单因素实验结果设置水平, 以酒石酸质量分数、料液比、提取温度、提取时间 4 个因素的 3 个水平设计正交实验  $L_9(3^4)$  优化酒石酸提取黑豆皮花色苷工艺。

1.2.5 黑豆皮中花色苷含量测定 标准品溶液配制: 准确称取 C3G 标准品 (纯度 99.05%) 0.00506 g (精确到 0.0001 g)。置于 5 mL 容量瓶中, 加入甲醇制成含 C3G 1.0024  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液溶液。样品溶液配制: 准确吸取按照 1.2.1 方法下制备的样品 1 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇, 待测。

1.2.6 数据处理方法 采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据分析, 结果以平均值  $\pm$  标准误差 ( $M \pm SE$ ) 表示, 对各组结果统计学 Duncan 检验比较差异, 以不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Orthogonal factor table

水平	因素			
	A 酒石酸质量分数 (%)	B 料液比 ( $\text{g}/\text{mL}$ )	C 加热温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	D 加热时间 (min)
1	30	1:30	50	90
2	40	1:40	60	120
3	50	1:50	70	150

## 2 结果与分析

### 2.1 花色苷含量测定

2.1.1 检测波长的选择 取 C3G 标准品溶液, 进行紫外扫描, 由图 1 可知, C3G 在可见光区域 520 nm 处有最大吸收, 可见光区域 520 nm 处为其特征吸收, 所以本实验在 520 nm 波长处检测 C3G 的含量。

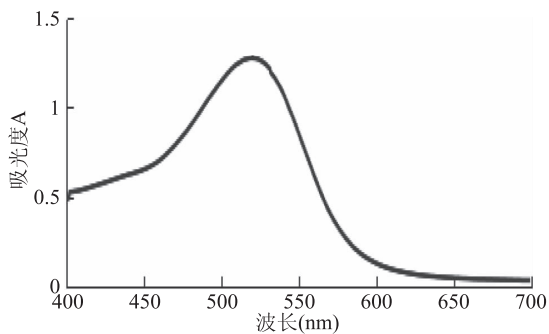


图1 全波长扫描

Fig.1 Full wavelength scanning

2.1.2 线性关系考察 分别取标准品溶液 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mL, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 进行紫外分光测定。以吸光度  $y$  对 C3G 的质量浓度  $x$  ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) 进行线性回归。结果显示 C3G 在 0~0.06  $\text{mg}$  范围内与吸光度相关性较好, 回归方程为:  $y = 28.266x - 0.0397$ ,  $R^2 = 0.9958$ 。C3G 的标准曲线如图 2 所示。

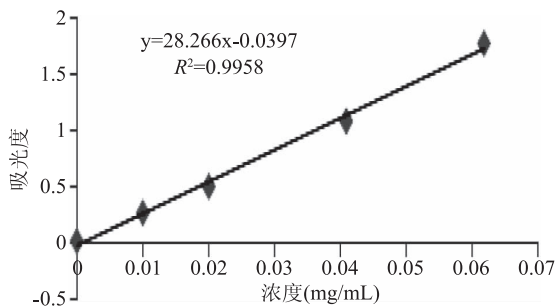


图2 标准曲线

Fig.2 Standard curve

### 2.2 单因素实验结果及分析

2.2.1 酒石酸浓度对黑豆皮花色苷含量的影响 图 3 结果显示, 其他条件不变时, 黑豆皮花色苷含量随酒石酸浓度的增加而增加。在酒石酸浓度达 40% 时, 花色苷含量最大, 这是因为花色苷在酸性条件下呈稳定的红色, 溶出率较高, 酒石酸浓度较小时, 花色苷提取不充分; 当酒石酸浓度过大, 花色苷含量有

所降低,由于酸性较强引起花色苷水解,导致含量下降<sup>[9]</sup>。在保证花色苷提取率高的前提下,还应考虑其稳定性。因此选择30%~50%质量分数的酒石酸为正交实验因素水平。

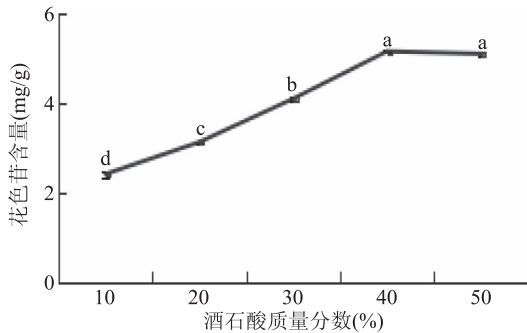


图3 酒石酸质量分数对花色苷含量的影响

Fig.3 Effect of the quality fraction of acid on the extraction rate of anthocyanin content

注:不同小写字母表示差异显著  $p < 0.05$ ,图4~图6同。

2.2.2 料液比对黑豆皮花色苷含量的影响 由图4可知,花色苷得率随着料液比提高而增加,且差异显著。当料液比为1:10 g/mL时,由于黑豆皮粉末在吸水溶胀后没有多余提取液,使花色苷溶解不完全,对花色苷含量有影响。当料液比从1:10 g/mL提高至1:20 g/mL,花色苷含量大幅提高,说明花色苷由黑豆皮向提取液扩散速率变快,充分溶解,溶解量增大。而当料液比继续增加,花色苷含量变化不大,料液比超过1:40 g/mL含量基本不变,说明花色苷溶解速率达到平衡,因此实验选择1:30~1:50 g/mL为料液比的正交实验因素水平。

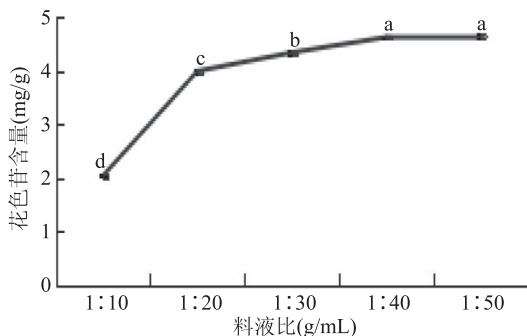


图4 料液比对花色苷含量影响

Fig.4 Effect of material-to-liquid on anthocyanin content

2.2.3 提取温度对花色苷含量的影响 由图5看出,花色苷含量随着提取温度的增长呈上升趋势。30~60℃时,温度升至60℃时,粗提液中花色苷含量最高,随着温度进一步升高,花色苷含量出现明显下降。产生这种现象的原因可能是温度低,花色苷溶出的不完全,导致含量较低,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<sup>[16]</sup>,升高到一定温度,使部分花色苷发生分解,花色苷含量降低。因此实验选择50~70℃为料液比的正交实验因素水平。

2.2.4 提取时间对花色苷含量的影响 由图6看出,随着提取时间延长,花色苷含量呈上升趋势,在30~

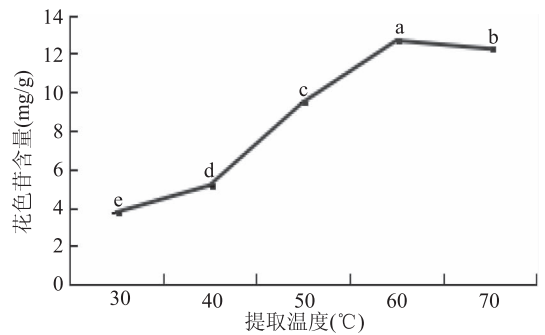


图5 提取温度对花色苷含量的影响

Fig.5 Effect of temperature on anthocyanin content

90 min内花色苷增加较快,且差异显著,超过120 min花色苷含量不再上升,说明120 min左右花色苷提取达到平台期。随着提取时间增加,花色苷被分解,花色苷含量略有下降。因此实验选择90~150 min为花色苷提取的正交实验因素水平。

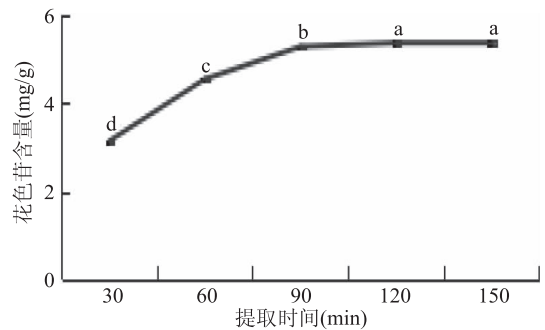


图6 提取时间对花色苷含量的影响

Fig.6 Effect of extraction time on anthocyanin content

### 2.3 正交实验

根据单因素实验结果,选择4个影响因素的3个水平设计正交实验  $L_9(3^4)$  优化酒石酸提取黑豆皮花色苷工艺,正交实验因素表见表1。考察指标为花色苷含量,正交实验结果与分析见表2,方差分析见表3。

表2 正交实验结果

Table 2 Orthogonal design results

实验号	A	B	C	D	花色苷含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	8.23
2	1	2	2	2	12.71
3	1	3	3	3	12.43
4	2	1	2	3	14.32
5	2	2	3	1	13.77
6	2	3	1	2	8.96
7	3	1	3	2	12.02
8	3	2	1	3	7.04
9	3	3	2	1	11.15
$K_1$	11.123	11.523	8.077	11.050	
$K_2$	12.350	11.173	12.740	11.230	
$K_3$	10.070	10.847	12.727	11.263	
R	2.280	0.676	4.663	0.213	

表3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	SS	f	F	显著性
A	23.478	2	176.999	**
B	2.041	2	15.390	
C	130.263	2	820.048	**
D	0.227	2	1.712	
误差	1.194			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

从表3结果可见,酒石酸提取黑豆皮中花色苷的影响因素中加热温度和酒石酸质量分数的影响极其显著,料液比和加热回流时间影响不显著。表2正交实验中直观分析和极差分析结果中得出的最佳工艺方案均是  $A_2B_1C_2D_3$ 。

## 2.4 验证实验

在酒石酸质量分数40%,料液比1:30(g/mL),加热温度60℃,加热时间150min条件下进行稳定性验证实验,计算花色苷,重复6次,花色苷含量为14.32 mg/g, RSD = 0.58% (n = 6)。

## 3 结论

本文在单因素实验基础上,运用正交实验法优化了酒石酸提取黑豆皮花色苷工艺条件。在正交实验设计所选条件范围内,加热时间对黑豆皮花色苷含量的影响最大,其次为酒石酸质量分数,然后是料液比,加热回流时间影响最小。正交实验设计确定酒石酸提取花色苷的最佳工艺参数为:酒石酸质量分数40%,料液比1:30(g/mL),加热温度60℃,加热时间150min。花色苷含量14.32 mg/g。

黑豆皮中花色苷主要作为食品药品中间体,提取多采用盐酸、冰乙酸等溶剂提取<sup>[17-18]</sup>。本实验在前期小试实验中发现无机酸的弊端在于会增加后期食品中的灰分。冰乙酸气味刺激性较大,对食品口感影响较大。酒石酸作为食品添加剂且无色无味,对后期花色苷的应用影响较小,以本实验采用酒石酸作为新的提取溶剂,旨在为黑豆皮花色苷资源的开发和利用提供新方法。目前对花色苷测定多采用pH示差法<sup>[13-14]</sup>,本实验以C3G为标准品对照,采用紫外分光光度计检测花色苷含量,C3G在紫外分光测试中在520nm下有最大吸收波长。结果显示该方法准确度、灵敏度及稳定性均较好,为课题组下一步对于花色苷单一成分质量控制提供依据。

## 参考文献

[1] 李玉美.黑豆色素的研究进展[J].安徽农学学报,2007,13

(21):37-38.

[2] Irina Tsoy Nizamutdinova. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47: 2806-2812.

[3] Kong Jinming, Chia L s, Goh N K, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins[J]. Phytochemistry, 2003, 64(5): 923-933.

[4] 王少波.黑豆皮中花色苷的提取及纯化研究[D].西安:西安理工大学,2008:36.

[5] Prior R L, WuXianli. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities [J]. Free Radical Research, 2006, 40(10): 1014-1028.

[6] Wu Xianli, Prior R L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC - ESI - MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(7): 2589-2599.

[7] Welch C R, WuQingli, SIMON J E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization [J]. Current Analytic Chemistry, 2008, 4(2): 75-101.

[8] 宋岩.黑豆皮花色苷提取、纯化及体内外抗氧化研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013:9.

[9] 张镜,刁树平.食品酸味剂、甜味剂及增稠剂对阴香花色苷稳定性的影响[J].食品工业科技,2013,34(22):266-270.

[10] World Health Organization. Globocan 2008 (IARC) section of cancer information [R]. International Agency for Research on Cancer: WHO, 2008.

[11] 马铜锁,陈连文.黑豆色素的提取及理化性质的研究[J].山西食品工业,2004,2(6):19-21.

[12] 李芳,阮长青,汤凯欣,等.黑小豆种皮花色苷的提取及体外抗氧化活性研究[J].天然产物开发与研究,2015,28: 561-567.

[13] 王艺菲,辛秀兰,陈亮,等.pH示差法测定不同种类蓝果忍冬总花色苷含量[J].食品研究与开发,2014,35(7):75-78.

[14] 翦祎,韩舜愈,张波.单一pH法、pH示差法和差减法快速测定干红葡萄酒中总花色苷含量的比较[J].食品工业科技,2012,33(23):323-325.

[15] 徐金瑞,张名位,刘兴华.黑大豆种皮花色苷的提取及其抗氧化作用研究[J].农业工程学报,2005,21(8):161-164.

[16] 董楠,雷丹丹,刘嘉,等.花色苷的热稳定性及其影响因素研究[J].天然产物开发与研究,2015,28:561-567.

[17] 宋岩,于国萍,吴昊,等.超声波酶法复合提取黑豆皮中花色苷工艺优化[J].食品工业,2013,34(1):17-20.

[18] 牛娟娟.黑米、黑豆皮花色苷提取工艺、稳定性及其生物活性的研究[D].杭州:浙江工商大学,2011:5.