

黑豆中总皂苷提取工艺的研究

孙长波, 刘宏群

(长春科技学院医药学院, 吉林 长春 130600)

摘要: 研究黑豆总皂苷的最佳提取工艺; 采用紫外分光光度法测定总皂苷提取率, 根据单因素试验考察提取体系的乙醇浓度、提取时间、液固比、提取次数以及水浴温度对总皂苷提取率的影响, 采用响应面法优化最佳提取条件。优化得到的最佳提取工艺为: 乙醇浓度 70%, 液固比 9:1 (mL/g), 提取 2 次, 提取时间 1 h、水浴温度 85 °C, 总皂苷提取率为 3.33%; 响应面法优化黑豆总皂苷提取工艺预测性好, 可信度高。

关键词: 黑豆; 皂苷; 提取; 工艺优化; 响应面法

Study on Extraction Technology of Total Saponins from Black Bean

SUN Chang-bo, LIU Hong-qun

(Medical College of Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, Jilin, China)

Abstract: The optimal extraction technology of total saponins from black bean was studied in the paper. The total saponins was determined by ultraviolet spectrophotometry. The effects of ethanol concentration, extraction time, liquid-to-material ratio, extraction times and water bath temperature on the extraction rate of total saponins were investigated through single-factor experiments. The optimal extraction condition was optimized by response surface methodology. Ultimately, the results were as follows: the ethanol concentration 70%, liquid-to-material ratio 9:1 (mL/g), extraction 2 times, extraction time 1 h, water bath temperature 85 °C. In this condition, the extraction rate of total saponins was 3.33%. The extraction technology of total saponins from black bean which was optimized through response surface methodology was in high credibility and good predictability.

Key words: black bean; saponins; extraction; optimal technology; response surface method

引文格式:

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 Changbo, LIU Hongqun. Study on Extraction Technology of Total Saponins from Black Bean[J]. Food Research and Development, 2020, 41(24): 137-141

皂苷又名皂素或皂草苷, 是螺甾烷及其生源相似的甾类化合物的寡糖苷以及三萜类化合物的寡糖苷, 植物皂苷是一种天然生物活性物质, 由糖和皂苷元组成, 大多可溶于水, 是许多中草药的有效成分, 如人参皂苷和甘草皂苷等^[1-2]。皂苷可以抑制胆固醇在肠道的吸收, 具有降低血浆胆固醇的作用^[3]; 许多皂苷还具有抗菌和抗病毒活性, 广泛应用于食品、药品以及化妆品的添加剂, 目前是我国功能性食品常用的功效成分^[4]。黑豆为豆科植物大豆的黑色种子, 黑豆营养丰富, 富含粗蛋白、不饱和脂肪酸和人体必需氨基酸, 还含有对人体健康有益的多种生理活性物质, 如低聚糖、皂

苷、异黄酮等^[5-7]。目前对黑豆的研究主要集中在对黑豆中多酚类物质、黄酮、异黄酮和豆色素等成分的提取工艺和抗氧化性研究及生物稳定性方面, 对黑豆中总皂苷的提取工艺报道极少^[8]。本试验以黑豆为主要原料, 优化黑豆总皂苷的提取工艺参数, 旨在为黑豆总皂苷的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设备

黑豆: 市售。皂苷标准品: 大连美仑生物技术有限公司。焦性没食子酸、冰乙酸、盐酸(36%~38%)、无水乙醇、甲醇、丙酮、石油醚、乙腈、乙酸乙酯(均为分析纯); 天津市科密欧化学试剂有限公司。

TU-1810 紫外可见风光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;XZ-990 旋转蒸发器:上海申生科技有限公司;KQ2200DV 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;202-0 台式电热干燥箱:中国天津泰斯特仪器有限公司;SZCL-2 数显智能控温磁力搅拌器、DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器:巩义市科瑞仪器有限公司;HH-1 数显恒温水浴锅:上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 总皂苷的提取

原料晾干、除杂、粉碎,过 40 目筛,储存于阴凉干燥处。黑豆粉 20.0 g,加入乙醇,回流提取。上清液混合,静置 12 h,过滤后旋转蒸发,真空干燥得提取物。

1.2.2 总皂苷的测定

总皂苷提取率参照石丽霞等^[9]的人参总皂苷提取工艺法测定。

1.2.3 单因素试验

分别选择乙醇浓度、提取时间、液固比、提取次数和水浴温度 5 个因素,以总皂苷提取率为指标进行单因素试验。

1.2.4 响应面优化试验

根据单因素试验结果,选取对试验影响较大的因素进行响应面优化。

1.3 数据处理

采用 Design-Expert 8.05 软件对响应面试验数据进行优化。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对总皂苷提取率的影响

准确称取样品 20.0 g,分别加入 50%、60%、70%、80%、90%乙醇 160 mL,水浴温度 85 ℃,提取时间为 1.5 h,提取 3 次,试验结果如图 1 所示。

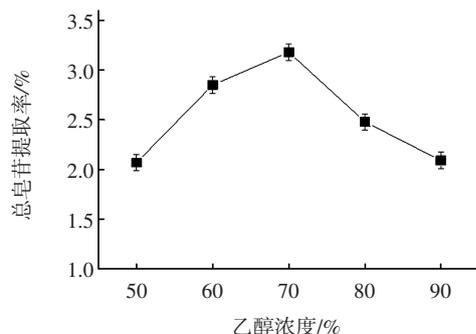


图 1 乙醇浓度对总皂苷提取率的影响

Fig.1 Influence of ethanol concentration on extraction rate of total saponins

由图 1 可知,曲线呈现先升高、后降低的趋势。当乙醇浓度为 50%时,总皂苷提取率较低,说明只提取出部分皂苷。乙醇浓度为 60%~80%,总皂苷提取率较为稳定,70%的乙醇总皂苷提取率最高。当乙醇浓度为 90%时,总皂苷提取率降低明显,可能是因为高浓度的乙醇对皂苷溶解度有影响。综上所述,选取乙醇浓度 60%、70%、80% 3 个水平优化。

2.1.2 提取时间对总皂苷提取率的影响

准确称取样品 20.0 g,加入 80%乙醇 160 mL,水浴温度 85 ℃,提取时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,提取 3 次,试验结果如图 2 所示。

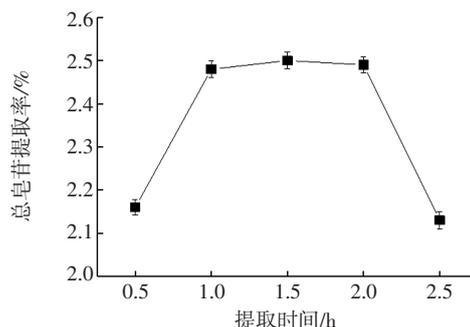


图 2 提取时间对总皂苷提取率的影响

Fig.2 Influence of extraction time on extraction rate of total saponins

由图 2 可知,提取时间对总皂苷提取率的影响比较明显,呈现升高、平稳、下降的趋势。0.5 h 时,总皂苷提取率较低。0.5 h~1.0 h,总皂苷提取率增加较多。1.0 h~2.0 h 期间,总皂苷提取率变化不大,2.0 h 之后,总皂苷提取率下降明显,可能长时间的提取,部分杂质同时被提取出来,降低了总皂苷的提取率^[10]。综上所述,选取 1.0 h 为最佳提取时间,不进行后续水平优化。

2.1.3 液固比对总皂苷提取率的影响

准确称取样品 20.0 g,分别按照液固比 4:1、6:1、8:1、10:1、12:1(mL/g)加入 80%乙醇,水浴温度 85 ℃,提取时间 1.5 h,提取 3 次,试验结果如图 3 所示。

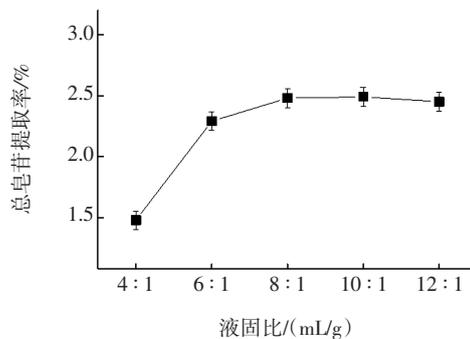


图 3 液固比对总皂苷提取率的影响

Fig.3 Influence of liquid to solid ratio on extraction rate of total saponins

由图 3 可知,当乙醇添加量逐渐增加时,总皂苷提取率也逐渐增加,特别是液固比从 4:1(mL/g)到 6:1(mL/g)时,提取率增加尤其显著,可能是因为少量的乙醇无法全部提取出皂苷类物质。液固比 6:1(mL/g)~10:1(mL/g)时曲线较为平缓,在乙醇含量达到 200 mL 之后,基本没有太大变化,说明再增加液固比,对皂苷提取意义不大。综上考虑,选取液固比 6:1、8:1、10:1(mL/g) 3 个水平优化。

2.1.4 提取次数对总皂苷含量的影响

准确称取样品 20.0 g,加入 80%乙醇 160 mL,水浴温度 85 ℃,提取时间为 1.5 h,分别提取 1、2、3、4、5 次,试验结果如图 4 所示。

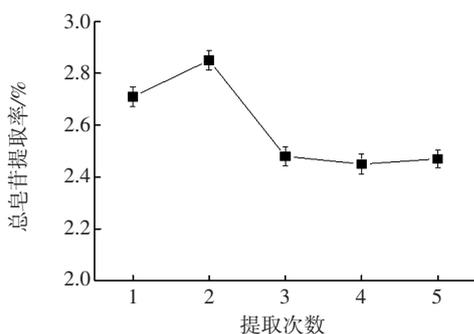


图 4 提取次数对总皂苷提取率的影响

Fig.4 Influence of extraction times on extraction rate of total saponins

由图 4 可知,曲线呈现先上升后下降最后平缓趋势。提取 1 次,总皂苷提取率低,说明 1 次提取,总皂苷提取有限。提取 2 次,总皂苷含量明显增加。3 次~5 次提取时,总皂苷提取率下降明显,说明提取次数过多,提取物不纯,降低了总皂苷提取率。综上所述,选取 1、2、3 次提取 3 个水平优化。

2.1.5 水浴温度对总皂苷提取率的影响

准确称取样品 20.0 g,加入 80%乙醇 160 mL,分别设置水浴温度 75、80、85、90、95 ℃,提取时间为 1.5 h,提取 3 次,试验结果如图 5 所示。

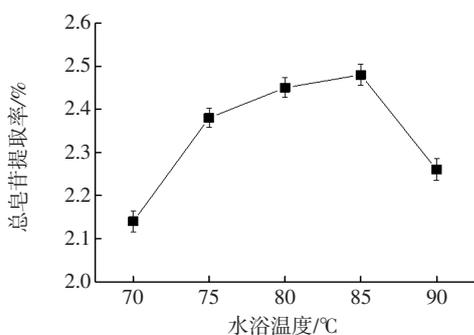


图 5 水浴温度对总皂苷提取率的影响

Fig.5 Influence of water bath temperature on extraction rate of total saponins

由图 5 可知,水浴温度对总皂苷提取率的影响呈现先升高、后降低趋势。前期随着温度的升高,总皂苷提取率增加,可能是因为温度升高,有利于皂苷类物质溶出。温度 85 ℃时,总皂苷提取率最大。当温度超过 85 ℃时,总皂苷含量开始下降,可能是因为高温促使皂苷类物质部分降解,导致总皂苷含量降低^[11-12]。综上所述,选取 85 ℃为最佳提取温度。

2.2 响应面法优化与分析

2.2.1 试验设计与结果

在单因素试验基础上,选择乙醇浓度、液固比、提取次数为影响因素,以总皂苷提取率为指标,设计三因素三水平试验,见表 1。每组试验重复 3 次,试验结果见表 2。

表 1 因素水平表

Table 1 Three factors and three levels' response surface methodology design

水平	因素		
	A 液固比/(mL/g)	B 乙醇浓度/%	C 提取次数
-1	6:1	60	1
0	8:1	70	2
1	10:1	80	3

表 2 试验设计与结果

Table 2 Analysis method and results of surface response experiment

试验号	A 液固比	B 乙醇浓度	C 提取次数	总皂苷提取率/%
1	1	-1	0	2.63
2	0	0	0	3.21
3	-1	0	1	2.18
4	0	0	0	3.12
5	0	0	0	3.31
6	1	0	-1	2.55
7	0	-1	1	3.01
8	1	0	1	2.75
9	0	0	-1	3.25
10	-1	0	-1	1.68
11	0	1	-1	2.71
12	-1	-1	0	2.18
13	-1	1	0	1.96
14	0	0	0	3.29
15	0	1	1	2.48
16	0	-1	-1	2.15
17	1	0	0	2.92

2.2.2 显著性检验及方差分析

回归模型方差分析见表 3。

应用 Design-Expert 8.05 软件对试验数据进行多元回归拟合,得到的二次回归模型为: $Y=3.24+0.36A+$

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of quadratic polynomial model

变异来源	平方和	自由度	均方	F比	P值	显著性
模型	4.07	9	0.45	134.01	<0.000 1	**
A	1.02	1	1.02	300.58	<0.000 1	**
B	1.250×10 ⁻³	1	1.250×10 ⁻³	0.37		
C	0.22	1	0.22	65.46	<0.000 1	**
AB	0.065	1	0.065	19.25	0.003 2	**
AC	0.022	1	0.022	6.66	0.036 4	*
BC	0.30	1	0.30	87.93	<0.000 1	**
A ²	1.30	1	1.30	384.65	<0.000 1	**
B ²	0.28	1	0.28	82.97	<0.000 1	**
C ²	0.64	1	0.64	190.08	<0.000 1	**
残差	0.024	7	3.378×10 ⁻³			
失拟项	9.250×10 ⁻⁴	3	3.083×10 ⁻⁴	0.054	0.981 1	不显著
纯误差	0.023	4	5.680×10 ⁻³			
总和	4.10	16				

注:*表示差异显著(P<0.05);**表示差异极显著(P<0.01)。

0.56B -0.17C +0.13AB -0.075AC -0.27BC -0.56A² -0.26B²-0.39C²。从模型得出,影响总皂苷提取率的因素大小顺序为:液固比>提取次数>乙醇浓度。

由表3方差分析可以看出,该模型差异极显著(P<0.000 1),表明方程与实际情况拟合良好;失拟项不显著(P=0.199 9>0.05),表明未知因素对试验结果干扰小;模型的R²=0.994 2,表明模型可信度良好;R²_{Adj}=0.986 8,表明98.68%的试验数据可用该模型进行解释。综上所述,该模型可以对黑豆总皂苷的提取工艺进行分析和预测。

2.2.3 响应面分析

根据回归方程绘制交互作用较为明显的响应面立体分析图和等高线图,如图6、图7和图8所示。

液固比、乙醇浓度和提取次数均对总皂苷提取率有显著影响(P<0.05)。

由图6可知,液固比对总皂苷提取率的影响比乙醇浓度大。当液固比为6:1(mL/g)时,随乙醇浓度增

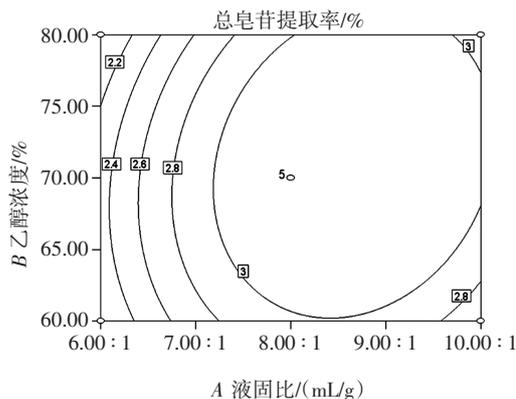
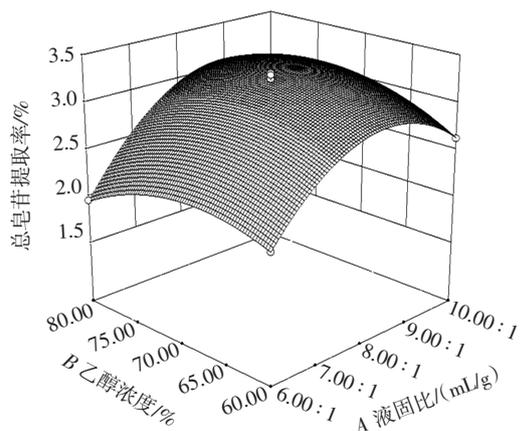


图6 液固比与乙醇浓度交互作用对总皂苷含量影响的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface graph and contour map for effects of liquid -solid rate and ethanol concentration on extraction rate of total saponins

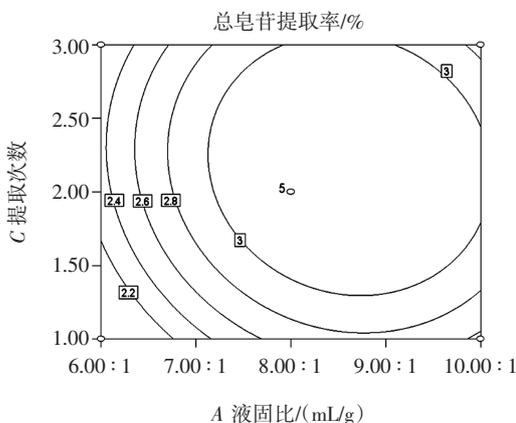
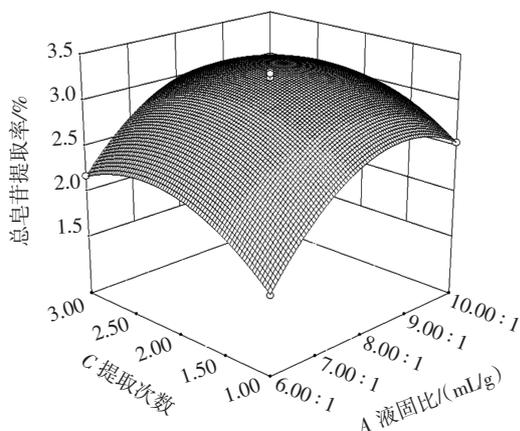


图7 液固比与提取次数交互作用对总皂苷含量影响的响应面图和等高线图

Fig.7 Response surface graph and contour map for effects of liquid -solid rate and extraction times on extraction rate of total saponins

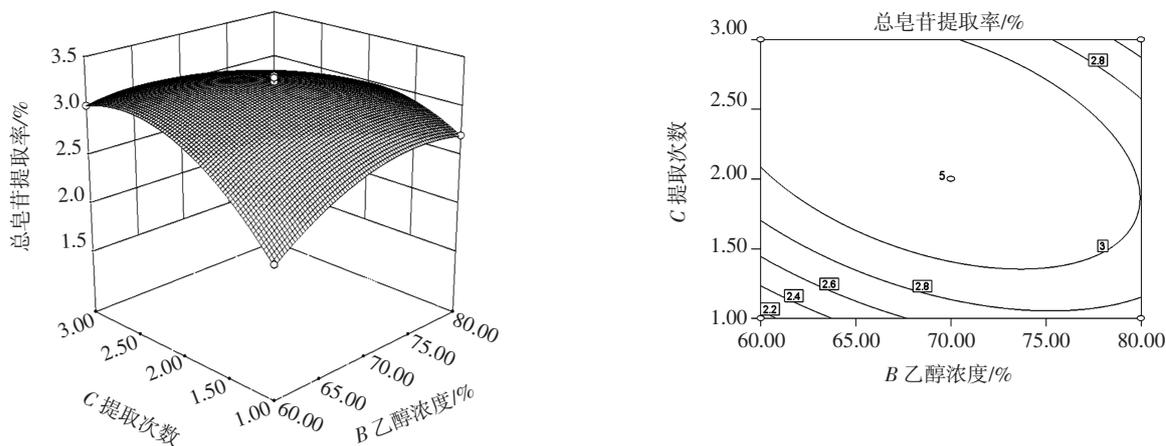


图8 乙醇浓度与提取次数交互作用对总皂苷含量影响的响应面图和等高线图

Fig.8 Response surface graph and contour map for effects of ethanol concentration and extraction times on extraction rate of total saponins

大,总皂苷提取率呈现先增高、后降低的趋势。由图6等高线形状可以确定这两个影响因素的较优水平范围为:液固比7.3:1(mL/g)~10:1(mL/g),乙醇浓度62%~80%。

由图7可知,液固比对总皂苷提取率的影响比提取次数大。当液固比为6:1(mL/g)时,随提取次数增多,总皂苷提取率呈现先增高后降低至相对稳定。由图7等高线形状可以确定这两个影响因素的较优水平范围为:液固比7.5:1(mL/g)~10:1(mL/g),提取次数1.4次~3次。

由图8可知,提取次数对总皂苷提取率的影响比乙醇浓度大。当提取次数为1次时,随乙醇浓度增大,总皂苷提取率逐渐增高。由图8等高线形状可以确定这两个影响因素的较优水平范围为:乙醇浓度60%~80%,提取次数1.6次~3次。

2.2.4 最优条件选择与验证试验

通过 Design-Expert 8.05 软件进行响应面优化,确定黑豆总皂苷提取工艺条件为:乙醇浓度70.1%,液固比8.62:1(mL/g),提取2.18次,总皂苷提取率为3.34%。考虑实际操作,调整为:乙醇浓度70%,液固比9:1(mL/g),提取2次,固定提取时间1h、水浴温度85℃,以此为提取条件,进行3次验证试验,平均总皂苷提取率为3.33%,与预测值基本一致,验证了所建模型的准确性。

3 结论

本试验主要对黑豆总皂苷的提取工艺进行研究,在单因素试验的基础上,选取对总皂苷含量影响较大的3个因素做三水平的试验设计,采用 Design-Expert

8.05 软件进行响应面优化,得出该模型可以对黑豆总皂苷提取工艺进行分析和预测。确定总皂苷最佳提取工艺为:乙醇浓度70%,液固比9:1(mL/g),提取次数2次,提取时间1h,水浴温度85℃,平均总皂苷提取率为3.33%。

参考文献:

- [1] 刘志,夏娟,李伟,等.天冬氨酸降解人参二醇组皂苷及其美拉德反应产物的抗氧化活性[J].食品科技,2018,39(7):20-26
- [2] 陈贺,宋晓琳,崔勇虎,等.微生物固体发酵提高人参药材中稀有人参皂苷的研究[J].食品科技,2015,40(12):31-34
- [3] 郭双双,杨利民,张一鸣,等.微波辅助萃取人参总皂苷与单体皂苷含量分析[J].食品科学,2015,36(2):1-6
- [4] 孙聪,曾鹏涛,李天一,等.正交试验法优选人参总皂苷提取工艺的研究[J].中国中医药大学学报,2012,28(3):53-54
- [5] 丛建民.黑豆的营养成分分析研究[J].食品工业科技,2008(4):262-264
- [6] 聂刚,刘朝霞,杜双奎,等.陕北小粒黑豆营养成分分析与评价[J].营养学报,2014,36(5):511-513
- [7] 秦琦,张英蕾,张守文.黑豆的营养保健价值及研究进展[J].中国食品添加剂,2015(7):145-150
- [8] 郭婕,刘中华,袁淑培,等.黑豆中大豆异黄酮微波提取工艺的优化[J].食品工业科技,2015,36(5):255-257
- [9] 石丽霞,耿琳.正交试验法筛选人参皂苷提取工艺的研究[J].特产研究,2006(2):18-21
- [10] 葛思琪,赵庆生,孙广利,等.芦笋总皂苷的提取纯化及抗氧化研究[J].食品研究与开发,2018,39(20):57-62
- [11] 汪建斌,邓勇.大豆多肽的生理功能及开发利用[J].广州食品工业科技,2001,17(3):52-53
- [12] 郭丹丹,成乐琴,于金龙,等.人参皂苷 Rg5 的提取制备工艺研究[J].食品研究与开发,2017,38(20):42-46

收稿日期:2019-12-20