

豆芽绿豆多糖的提取及其功效研究

孙 丽 丽, 董 银 卯, 李 丽

(中国化妆品研究中心 北京工商大学, 北京 100048)

摘 要:以豆芽绿豆为试材,在单因素试验基础上,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,研究了豆芽绿豆提取多糖的最佳工艺条件。结果表明:料液比 1:20,提取时间 2 h,提取温度 45℃,pH 为 7.0 条件下,多糖提取物含量最高,为 56.74 mg/mL;经试验分析,豆芽绿豆多糖具有很好的安全性,其抗氧化功效突出,还具有很好的体外抗过敏和保湿功效。

关键词:豆芽绿豆;多糖;提取工艺;抗氧化;抗过敏;保湿

中图分类号:TS 255.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0160-04

绿豆(Mung bean)为豆科草本植物绿豆(*Phaseolus-radiatus*)的成熟种子,又名青小豆、录豆,作为豆类中主要的粮食作物在各地被广泛种植。绿豆原产于我国,至今已有两千多年的栽培史,目前,绿豆更是以健康食品而被广泛食用,并具有很好的清热解暑的药用功效^[1-6]。

一直以来,各种植物源多糖成为学者们研究的热点^[7-9]。植物源多糖具有多种生物活性,经研究发现,它具有抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、抗病毒、抗辐射等功能,还具有降血糖、降血脂、参与免疫调节等作用^[10]。但是,国内外对豆芽绿豆多糖的研究报道较少,造成资源的很大浪费^[11]。因此该试验对绿豆多糖提取工艺及功效等进行了研究,以期对开发绿豆保健食品、功效性化妆品添加剂等提供一定的指导依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为第 3 天萌芽的绿豆烘干粉,自制。无水乙醇、浓硫酸、苯酚、碱性蛋白酶、氢氧化钠、浓盐酸、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 G-250、磷酸、去离子水,所用化学试剂均为分析纯。HHS21-41 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);FA2004 电子天平(上海精科天平公司);DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验仪器有限公司);海尔低温冰箱;BUCHI R-200 旋转蒸发仪;ALCPK121R 冷冻离心机;SIM 冷冻干燥箱;721 型分光光度计(上海精密仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 多糖提取及富集工艺 绿豆→第 3 天豆芽绿豆→烘干→多糖提取→离心取上清液→100℃煮沸 5 min→离心除沉淀→浓缩→醇沉→离心收集沉淀→冷冻干燥→绿豆粗多糖。

1.2.2 单因素试验 料液比对多糖提取的影响:用电子天平准确称取 2.000 g 第 3 天豆芽绿豆烘干粉,置于洁净的锥形瓶中,加入 0.14 g 的碱性蛋白酶,按照料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 分别加入 20、30、40、50、60 mL 蒸馏水,摇匀;在 50℃下,浸提 2 h;过滤,离心,收集上清液,分别补齐体积至 20、30、40、50、60 mL。提取时间对多糖提取的影响:用电子天平准确称取 2.000 g 第 3 天豆芽绿豆烘干粉,并置于洁净的锥形瓶中,加入 0.14 g 的碱性蛋白酶,按料液比 1:10 加入 20 mL 蒸馏水,摇匀;在 50℃下,浸提 1、2、3、4、5 h;过滤,离心,收集上清液,补齐体积至 20 mL。提取温度对多糖提取的影响:分别在 40、45、50、55、60℃的温度下提取多糖。用电子天平准确称取 2.000 g 第 3 天豆芽绿豆烘干粉,并置于洁净的锥形瓶中,加入 0.14 g 的碱性蛋白酶,按料液比 1:10 加入 20 mL 蒸馏水,摇匀;在上述温度下浸提 2 h;过滤,离心,收集上清液,补齐体积至 20 mL。pH 对多糖提取的影响:分别调节 pH 至 7、8、9、10、11 提取豆芽绿豆中的多糖。用电子天平准确称取 2.000 g 第 3 天豆芽绿豆烘干粉,并置于洁净的锥形瓶中,加入 0.14 g 的碱性蛋白酶,按料液比 1:10 加入 20 mL 蒸馏水,摇匀;在 50℃下浸提 2 h;过滤,离心,收集上清液,补齐体积至 20 mL。

1.2.3 多糖提取条件的正交优化实验 在单因素试验的基础上进行正交实验,优化提取工艺。选择料液比、提取时间、提取温度和 pH 4 个对多糖提取影响较大的因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表,因素水平见表 1。

第一作者简介:孙丽丽(1987-),女,硕士,研究方向为植物源化妆品功效添加剂的开发。E-mail:www456@126.com.

责任作者:董银卯(1963-),男,硕士,教授,研究方向为植物源化妆品功能成分研究与应用。E-mail:yndong2008@163.com.

收稿日期:2012-12-10

表 1 正交实验因素水平设计

水平	因素			
	料液比(A)	提取时间(B)/h	提取温度(C)/℃	pH(D)
1	1:20	1	40	7
2	1:25	2	45	8
3	1:30	3	50	9

1.3 项目测定

多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法^[12];蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝染色法^[13]进行。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料液比对多糖含量的影响 从图 1 可以看出,多糖含量随料液比的增加,呈先降低后升高的趋势,到达 1:25 时,多糖含量达到最大,而后再次降低。表明,料液比在 1:25 时提取的多糖含量最高。

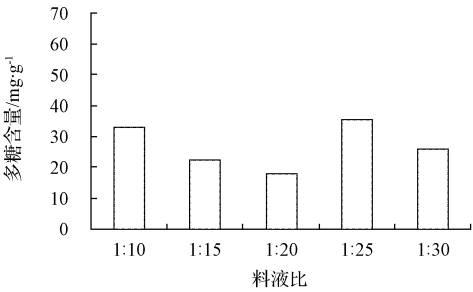


图 1 料液比对绿豆多糖含量的影响

2.1.2 提取时间对多糖含量的影响 从图 2 可以看出,随提取时间的延长,多糖含量不断降低,到达 4 h 时,多糖含量变化不明显,继续延长时间,多糖略微升高,但不明显,说明提取多糖以 4 h 为宜。

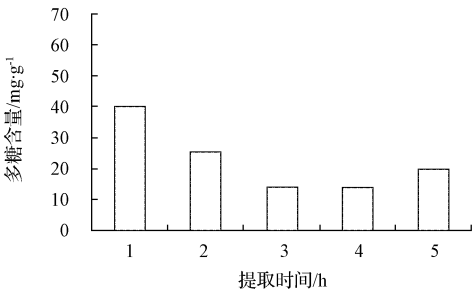


图 2 提取时间对绿豆多糖含量的影响

2.1.3 提取温度对多糖提取的影响 由图 3 可知,多糖含量随温度的升高呈先降低后升高的趋势,温度在 40℃ 时,多糖含量达到最大。说明 40℃ 是多糖提取的最佳温度。

2.1.4 pH 对多糖提取的影响 由图 4 可知,随 pH 增加,多糖含量变化不明显,总体呈先升高后降低的趋势。当 pH 达到 9 时,多糖含量最高。

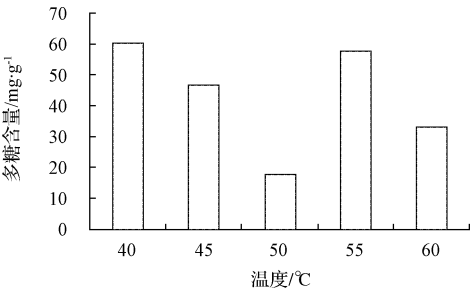


图 3 温度对绿豆多糖含量的影响

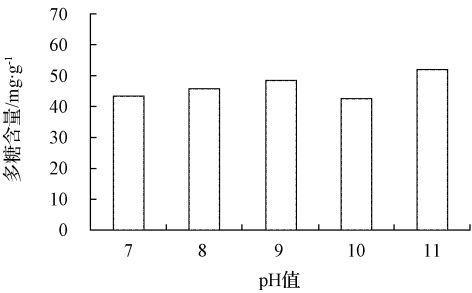


图 4 pH 值对绿豆多糖含量的影响

2.2 正交实验结果

选择料液比、提取时间、提取温度和 pH 4 个对多糖提取影响较大的因素,每个因素取 3 个水平,进行正交实验。由图 5 可知,各因素对试验指标都有影响,其主次顺序为 A>D>C>B,即料液比对绿豆多糖的提取影响最大,pH 值影响其次。提取多糖的最优化组合为 A₁B₂C₂D₁,即料液比 1:20,提取时间 2 h,提取温度 45℃,pH 值 7.0。该结果与理论的最佳工艺条件有不同之处,需要对其进行验证。采用回归方程系数的绝对值大小和极差分析,对试验结果进行验证,结果见表 3。从表 3 可以看出,多糖含量的平均值为 56.74 mg/mL,明显高于正交实验中最大组,所以该试验确定提取绿豆多糖的最佳工艺条件为料液比 1:20,提取时间 2 h,提取温度 45℃,pH 7.0。

表 2 正交实验结果

试验号	因素				多糖含量/mg·g ⁻¹
	料液比	提取时间/h	提取温度/℃	pH 值	
1	1:20	1	40	7	41.92
2	1:20	2	45	8	52.78
3	1:20	3	50	9	39.50
4	1:25	1	45	9	16.06
5	1:25	2	50	7	33.42
6	1:25	3	40	8	15.70
7	1:30	1	50	8	19.78
8	1:30	2	40	9	13.47
9	1:30	3	45	7	30.71
k ₁	44.733	25.920	23.697	35.350	
k ₂	21.727	33.223	33.183	29.420	
k ₃	21.320	28.637	30.900	23.010	
R	23.4	7.3	9.4	12.3	

表 3 验证试验结果

试验编号	料液比	提取时间 /h	提取温度 /℃	pH	多糖含量 /mg·mL ⁻¹	平均值 /mg·mL ⁻¹
1	1:20	2	45	7	56.35	56.74
2	1:20	2	45	7	57.18	
3	1:20	2	45	7	56.69	

2.3 多糖的富集

将得到的多糖提取物在 100℃ 下灭酶 5 min, 过滤取上清液, 然后对提取液进行浓缩, 醇沉, 离心后取沉淀冷冻干燥, 得到萌芽绿豆多糖冻干粉。

2.4 萌芽绿豆多糖功效的初步研究

2.4.1 萌芽绿豆多糖对 DPPH 自由基的清除效果 按照 Larrauri 等^[13]方法, 准确称取 20 mg DPPH, 用无水乙醇定容于 250 mL 容量瓶中, 得到浓度为 20 mmol/L 的 DPPH· 溶液, 将提取物样品分别用蒸馏水稀释成不同浓度的测试液。取 2.0 mL 测试液及 2.0 mL 的 20 mmol/L DPPH· 混匀后反应 30 min, 测定波长 517 nm 下吸光度的变化, 对照溶剂用无水乙醇代替, 计算其抑制率。从图 5 可以看出, 随着萌芽绿豆多糖浓度的增加, 其对 DPPH 总自由基的清除能力越来越强, 当浓度达到 4.0 mg/mL 时, 其抗氧化活性与阳性对照维生素 C 含量相当, 当浓度达到 5.0 mg/mL 时, 其抗氧化活性明显高于维生素 C 含量。

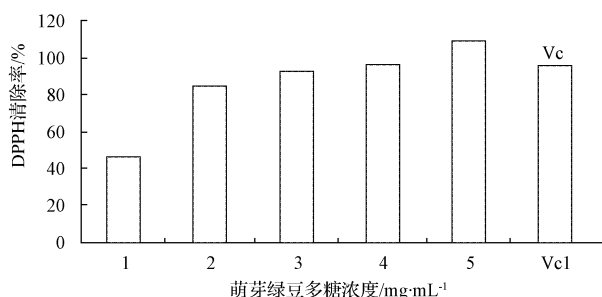


图 5 萌芽绿豆多糖抗氧化能力的测定

2.4.2 萌芽绿豆多糖对透明质酸酶的体外抑制效果 采用透明质酸酶体外抑制法^[14]测定萌芽绿豆多糖的抗过敏功效。透明质酸酶是过敏反应的参与者, 分解体内的透明质酸(HA), 使其变成低分子量的酸性刺激源, 引起组胺释放, 诱导机体产生敏感症状, 研究表明透明质酸酶与炎症、过敏有强相关性, 许多抗过敏药物有强抑制透明质酸酶活性的作用。从图 6 可以看出, 随着萌芽绿豆多糖浓度的升高, 其抑制透明质酸酶活性越来越明显, 浓度达到 5.0 mg/mL 时, 其对透明质酸酶的体外抑制率达到 69.54%, 但低于阳性对照 10 mg/mL 甘草酸二钾。

2.4.3 萌芽绿豆多糖的保湿效果 采用人体测试方式, 用水分测试仪测试皮肤的水分含量和水分散失量。选取 20 个自愿者, 自愿者男女各半。将含有 5% (质量百

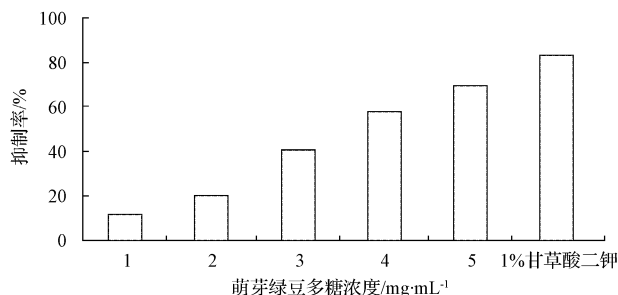


图 6 萌芽绿豆多糖体外抗敏活性的变化

分比浓度)的萌芽绿豆多糖溶液涂覆于皮肤表面, 用水做空白对照; 每 1 h 测试 1 次, 共 4 h。皮肤表面的水份含量变化的百分比随时间的变化曲线见图 7。结果表明, 与空白对照相比, 萌芽绿豆多糖提取物具有较好的保湿功效。皮肤水分散失量变化的百分比随时间的变化曲线见图 8 所示, 结果表明, 与空白样相比, 萌芽绿豆多糖提取物具有很好的锁水性能, 可长效保湿。

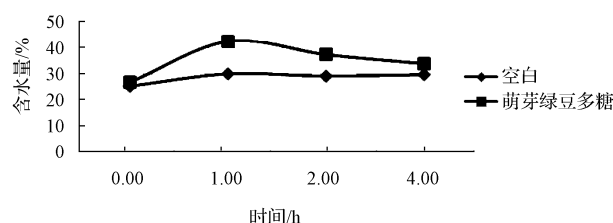


图 7 皮肤水分含量变化

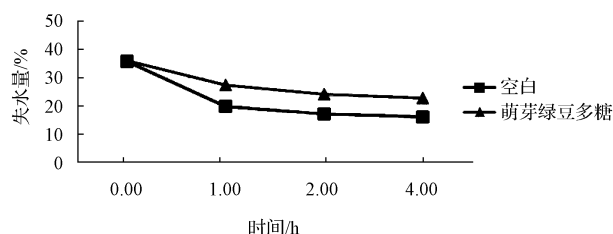


图 8 皮肤水分散失变化

2.4.4 绿豆多糖安全性检测 红细胞溶血试验(Red Blood Cell Test, RBC)是 Draize 试验替代方法之一, 基本原理是通过测定血红蛋白漏出量及变性程度来评价化学品对眼组织细胞的损伤, 国际上主要将 RBC 试验用于化妆品产品及原料等化学品的眼刺激性研究。溶血率低于 20% 时, 代表该产品其安全性很好。从表 4 可以看出, 萌芽绿豆多糖浓度达到 10 mg/mL 时, 其溶血率只有 2.34%, 远低于 20%, 表明萌芽绿豆多糖其安全性很好, 可成为化妆品、药品及保健食品安全、天然、绿色的植物功效性原料。

表 4 萌芽绿豆多糖安全性评价实验

萌芽绿豆多糖浓度/mg·mL ⁻¹	4	5	6	7	8	9	10
溶血率/%	0.23	0.73	1.08	1.51	1.61	1.89	2.34

3 结论与讨论

通过单因素试验、正交实验和验证试验,确定了萌芽绿豆多糖提取的最佳工艺条件,即料液比 1:20、提取时间 2 h、提取温度 45℃、pH 为 7.0 时萌芽绿豆多糖的提取率最高,为 56.74 mg/mL。将得到的多糖提取物进一步灭酶,醇沉,冷冻干燥,得到灰白色的多糖粉末。对萌芽绿豆多糖进行安全性评价,结果表明,萌芽绿豆多糖具有很好的安全性。

该试验探讨了萌芽绿豆多糖的功效性,测定其抗氧化、抗过敏及保湿功效。通过对 DPPH 自由基清除试验可知,萌芽绿豆多糖对 DPPH 自由基具有很好的清除作用,当浓度达到 4.0 mg/mL 时,其抗氧化活性与阳性对照维生素 C 含量相当,当浓度达到 5.0 mg/mL 时,其抗氧化活性明显高于维生素 C 含量;通过透明质酸酶体外抑制试验可知,萌芽绿豆多糖具有较好的抗过敏作用,当浓度达到 5.0 mg/mL 时,其对透明质酸酶的体外抑制率达到 69.54%;通过测定皮肤水分含量和水分散失随时间的变化中可以得出,萌芽绿豆多糖具有一定的长效保湿功效。

通过对萌芽绿豆多糖的提取和初步功效的研究发现,萌芽绿豆多糖具有很高的安全性,可作为一种天然的植物功效成分添加到化妆品、药品及保健食品中;其抗氧化功效突出,今后可以对其抗氧化作用机制及药效成分进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 张海均,贾冬英,姚开. 绿豆的营养与保健功能研究进展[J]. 食品与发酵科技,2012,48(1):7-10.
- [2] 汪少芸,叶秀云,饶平凡. 绿豆生物活性物质及功能的研究进展[J]. 中国食品学报,2004,4(1):98-102.
- [3] 樊明涛. 绿豆淀粉的提取和绿豆淀粉性质的研究[J]. 北京农学院学报,1996,11(2):57-62.
- [4] 李健,王旭,刘宁,等. 绿豆提取液的抗内毒素作用及提取工艺优化[J]. 食品工业科技,2001(3):310-311,315.
- [5] 曾维强. 绿豆综合开发及利用[J]. 粮食与油脂,2003(3):37-39.
- [6] 李敏. 绿豆化学成分及药理作用的研究概况[J]. 上海中医药杂志,2001,35(5):47-48.
- [7] 易凤英,刘素纯,李佳莲,等. 茶多糖的提取方法及其生理功能研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(6):2911-2913.
- [8] 李磊,王卫国. 真菌多糖药理作用及其提取、纯化研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2008,29(2):87-92.
- [9] 贾亮亮,袁丁,何毓敏,等. 多糖提取分离及含量测定的研究进展[J]. 食品研究与开发,2011,32(3):189-192.
- [10] 金迪,梁英,孙工兵,等. 植物多糖提取技术的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2011,23(5):76-79.
- [11] 达娃,戴岑,席美丽. 绿豆多糖的提取工艺研究[J]. 陕西农业科学,2010(1):23-25.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,1994.
- [13] Larrauri, J. A., Saez, J. M., Saura-Calixto, F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape peels[J]. Agric Food Chem, 1998, 46: 26-34.
- [14] 黄丽. 紫苏叶抗过敏活性物质的研究[D]. 南宁:广西大学,2005.

Study on Extraction and Its Efficacy of Polysaccharides from Sprouting Mungbean

SUN Li-li, DONG Yin-mao, LI Li

(Chinese Cosmetics Research Center, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract: Taking sprouting mungbean as material, based on the single factor experiment, the best extraction technology of polysaccharides from sprouting mungbean was studied. The results showed that the optimum technological conditions were solid-liquid ratio 1:20, extraction time 2 h, temperature 45℃ and pH 7. Under these conditions, the polysaccharide content was 56.74 mg/mL; the experiment proved that sprouting mungbean polysaccharide had good security, and its antioxidant effect was outstanding, and also had good allergy *in vitro* and moisturizing efficacy.

Key words: sprouting mungbean; polysaccharides; extraction technology; antioxidant; allergy; moisturizing