



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：四棱豆叶总酚提取工艺优化及抗氧化能力研究
作者：何洪鑫，孙风霞，王赫，李爱光，代理响，刘霞
DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20240057
收稿日期：2024-03-20
网络首发日期：2024-07-15
引用格式：何洪鑫，孙风霞，王赫，李爱光，代理响，刘霞. 四棱豆叶总酚提取工艺优化及抗氧化能力研究[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20240057>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240057

四棱豆叶总酚提取工艺优化及抗氧化能力研究

何洪鑫, 孙风霞, 王 赫, 李爱光, 代理响, 刘 霞

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 以超声辅助醇提四棱豆叶总酚提取量为考察指标, 在单因素实验的基础上, 通过响应面实验优化总酚的提取工艺。并以 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基清除率以及亚铁离子与三吡啶基三嗪 (FRAP 还原力) 四种抗氧化能力分析方法考察四棱豆叶总酚的抗氧化能力。结果表明: 四棱豆叶总酚的最佳提取工艺为乙醇体积分数 38%、提取温度 67 °C、料液比 1 : 26 (g/mL)、超声功率 300 W、提取时间 40 min, 在该条件下四棱豆叶总酚提取量达到 6.01 mg/g。且四棱豆叶总酚提取物对 DPPH、ABTS⁺、OH 自由基具有较强的清除作用, 其 DPPH、ABTS⁺、OH 的 IC₅₀ 分别为 2.09 mg/mL、0.39 mg/mL、0.00032 mg/mL。采用 LC-MS/MS 技术分析表明, 四棱豆叶醇提物中的酚酸类化合物成分共有 31 种, 其中邻羟基肉桂酸对其抗氧化能力提供了较大贡献。

关键词: 四棱豆叶; 总酚提取; 抗氧化能力; 成分分析

中图分类号: TS255.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Optimization of Extraction Process and Antioxidant Activity of Total Phenols from Winged Bean Leaves

HE Hongxin, SUN Fengxia, WANG He, LI Aiguang, DAI Lixiang, LIU Xia

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In the present study, the extraction of total phenols from the leaves of winged bean was investigated by ultrasound-assisted alcoholic extraction, and the extraction process of total phenols was optimised by response surface test on the basis of one-way test. And the antioxidant capacity of total phenols was investigated by four antioxidant capacity analyses, namely DPPH, ABTS⁺, OH radical scavenging rate, and ferrous ion and tripyridyltriazine (FRAP reducing power). The results showed that the optimal extraction process of total phenol was 38% ethanol volume fraction, extraction temperature of 67°C, material-liquid ratio of 1:26 (g/mL), ultrasonic power 300 W, and extraction time of 40 min, and the extracted amount of total phenol reached 6.01 mg/g under these conditions. Moreover, the extract of total phenol had a stronger scavenging effect on the DPPH, ABTS⁺, and OH free radicals, and its DPPH, ABTS⁺, and OH with IC₅₀ of 2.09 mg/mL, 0.39 mg/mL, and 0.00032 mg/mL, respectively. Analysis using LC-MS/MS showed that there were 31 phenolic acid components in the alcoholic extracts of winged bean leaves, of which o-hydroxycinnamic acid provided a greater contribution to its antioxidant capacity.

Key words: winged bean leaves; total phenol extraction; antioxidant capacity; component analysis

四棱豆, 又称翼豆, 翅豆, 四角豆等, 原产于热带, 是豆科蝴蝶形花亚科菜豆族的一种, 具备较高营养价值^[1-2]。四棱豆的嫩叶与嫩荚均可食用, 其块根富含淀粉和蛋白质, 特别是蛋白质含量高, 嫩果含蛋白质、脂肪、碳水化合物、膳食纤维、多种维生素、胡萝卜素、多种矿物质元素和氨基酸等

^[3]。四棱豆中富含的多酚类、黄酮类及多肽类物质是抗氧化和缓解脂质过氧化的重要组成部分, 具备一定的药用价值, 对冠心病、动脉硬化、不孕不育、口腔炎症、泌尿系统炎症、眼病等 19 种疾病有较好的治疗效果^[4-5]。

收稿日期: 2024-03-20; 修回日期: 2024-04-18

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2022BBF03026)

作者简介: 何洪鑫(2000—), 男, 安徽人, 硕士研究生; 通信作者: 刘 霞, 教授, liuxia831930@163.com

酚类化合物是植物在正常发育过程中合成的次生代谢物, 通常是为了应对胁迫条件。在植物中, 酚类物质可以作为植物抗毒素、抗氧化剂和紫外线防护剂等^[6-7]。化合物在抵消活性氧物质方面发挥着至关重要的作用, 从而最大限度地减少分子损伤, 即人们常说的抗氧化、抗炎、清除自由基、抗肿瘤、降血糖、降血脂等生物活性, 可应用于多种保健食品中^[8-9]。四棱豆叶作为四棱豆种植过程中可大量获得的生物量, 含有多种化学成分, 包括多糖类、总酚类、黄酮类化合物及大量微量元素等, 而总酚是其成分中的一类重要活性物质, 但目前四棱豆叶总酚的提取及抗氧化活性尚未见报道。

因此, 本实验主要以为四棱豆叶为材料, 采用超声辅助醇提法提取四棱豆叶总酚, 优化四棱豆叶总酚提取的最佳工艺条件, 并在最佳工艺条件下试制四棱豆叶总酚样品, 评价四棱豆叶总酚抗氧化活性及还原力, 检测酚酸类别, 为四棱豆叶总酚的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

四棱豆叶(星际宇航海南三号), 黑龙江星际宇航科技有限公司。选取 2 月龄的四棱豆植株进行采摘, 空运至实验室后将植株所有根茎全部剔除, 留下四棱豆叶进行后续实验。

1.2 试剂与仪器

没食子酸(99%), 上海晶纯试剂有限公司; 福林酚(1N), 北京索莱宝科技有限公司; DPPH(98%)、ABTS(98%)、碳酸钠(99.8%)、水杨酸(99%), 上海源叶生物科技有限公司; 过硫酸钾(99.5%)、铁氰化钾(99.5%)、三氯化铁(99%), 上海麦克林生化科技有限公司; 三氯乙酸(99%), 天津市津科精细化工研究所; 甲醇、甲酸、醋酸铵, 赛默飞世尔科技公司。

SB-5200DTD 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; BioTek 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司北京代表处; TGL-16M 型台式高速冷冻离心机; FA2204B 电子分析天平; Q Exactive™ HF 型质谱仪、Vanquish UHPLC 型色谱仪, 赛默飞世尔科技公司。

1.3 总酚提取工艺优化

1.3.1 总酚提取液的制备

将四棱豆叶在 50~55 °C 下烘至恒重后将其放置

在粉碎机中粉碎, 过 100 目筛, 得到实验样品, 放置保鲜袋中低温避光保存。称取 1.0 g 四棱豆叶样品于烧杯中, 按一定料液比加入不同体积分数的乙醇溶液, 在一定温度下进行超声波辅助提取, 提取完成后于 5000 r/min 离心 15 min, 结束后取上清液加水定容至一定刻度, 得样品溶液备用。

1.3.2 总酚含量的测定

参考 GAO Y^[10]的方法并略作修改, 以浓度为 200 μg/mL 没食子酸为标准溶液, 准确吸取 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 的标准溶液于试管中, 并用 60% 乙醇加至 0.5 mL。向各试管中加入 1.5 mL 10% 福林酚, 充分混匀后暗反应 20 min, 随后加入 0.5 mL 的 10% Na₂CO₃ 并暗反应 60 min, 测 755 nm 处吸光度值, 每组重复 3 次后取平均值。

样品检测按没食子酸标准曲线制备方法, 样品添加量 0.5 mL 依次添加试剂, 于 755 nm 处测量吸光度值, 根据没食子酸标准曲线并计算总酚含量, 其中回归方程为 $y=0.0102x+0.0053$ ($R^2=0.9996$), 且线性关系良好。

$$\text{总酚提取量 (mg/g)} = \frac{m \times V_1}{M \times V_2}$$

其中, m 为没食子酸质量, μg; V_1 为总提取液体积, mL; M 为样品质量, g; V_2 为测量所取样品体积, mL。

1.3.3 单因素实验

单因素实验中首先以超声功率 200 W、乙醇体积分数 50%、提取温度 60°C, 料液比 1:15, 考察不同提取时间(10、20、30、40、50 min)对四棱豆叶总酚提取率的影响; 其次固定提取时间 40 min, 考察不同超声功率(0、100、200、300、400、500 W)、乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%、80%)、提取温度(40、50、60、70、80°C)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)对四棱豆叶总酚提取量的影响。后续选取乙醇体积分数、提取温度、料液比三种因素进行响应面实验优化。

1.3.4 响应面实验工艺优化

在单因素考察基础上, 采用响应曲面分析进一步优化四棱豆叶总酚的提取工艺。依据 Design-Expert 10.0 软件中 Box-Behnken 的实验设计原则, 如表 1, 选取乙醇体积分数 40%、提取温度 70°C、料液比 1:25 为各因素的中心点, 确定最佳提取条件。

表 1 响应面因素与水平设计

Tab. 1 Response surface factors and horizontal design

水平	乙醇体积分 数% A	提取温 度/°C B	料液比 C
-1	35	65	1: 20
0	40	70	1: 25
+1	45	75	1: 30

1.4 抗氧化能力研究

1.4.1 DPPH 自由基清除能力

参考 L. Müller 等^[11]的方法并稍作修改,测定四棱豆叶对 DPPH 自由基的清除能力。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

其中, A_0 为未加样液时 DPPH 吸光度; A_j 为待测液吸光度; A_i 为加入待测液后 DPPH 吸光度。

1.4.2 ABTS⁺ 自由基清除能力

参考 Hua ZHANG^[12]、李斌等^[13]的方法并稍作修改,测定四棱豆叶对 ABTS⁺ 自由基的清除能力。

$$\text{清除率}(\%) = (1 - \frac{A_s - A_r}{A_0}) \times 100\%$$

其中, A_0 为未加样液时 ABTS 吸光度; A_r 为待测液吸光度; A_s 为加入待测液后 ABTS 吸光度。

1.4.3 羟自由基 (OH) 清除率

参考文良娟、刘苇芬^[14]的方法并稍作修改,测定四棱豆叶对羟自由基的清除能力。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$$

其中, A_0 为双蒸水代替样品测得的吸光度; A_i 为待测液吸光度; A_j 为双蒸水代替水杨酸测得的吸光度。

1.4.4 FRAP 还原力

参考李小艳等^[15]的方法并稍作修改,测定四棱豆叶对 FRAP 的还原能力。蒸馏水代替样品为空白,OD 值与还原力成正比。

1.5 酚类化合物检测及成分分析

酚类化合物采用液相色谱-质谱联用仪进行分析测定。基于高分辨质谱检测技术,非靶向代谢组可尽可能多地检测到样本中的分子特征峰。结合由标准品构建的高质量 mzCloud 数据库搭配 mzVault 及 MassList 数据库,对分子特征峰进行匹配鉴定,能够尽可能多地鉴定到生物体系中的代谢物,最大程度反映总代谢物的信息。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

不同的提取时间对四棱豆叶总酚提取量的影响如图 1A 所示,随着超声提取时间的增加,总酚的提

取率不断增加,提取时间达到 40 min 时,提取量达到最高,之后呈下降的趋势。随着提取时间的增长,四棱豆叶与溶剂相互作用,多酚类物质溶出,提取量逐渐提高。达到峰值后再继续提取,会导致酚类物质在空气中暴露的时间增长,部分物质会被逐步分解或氧化,导致提取量下降。且继续提取四棱豆叶中的其他物质也会相继溶出,不便于后续分离纯化^[16,17]。

不同超声功率对四棱豆叶总酚提取量的影响如图 1B 所示,随着超声功率的提高,总酚的提取量的不断增加,当超声功率为 300 W 时,提取量达到峰值,对比单一醇提提取量增加了 90.71%,超声功率的升高加大了其对四棱豆叶的破壁效果,促进了内容物的释放,进而提高了总酚的提取量。继续加大超声功率,总酚提取率逐渐呈下降趋势,超声功率越大,会逐渐产生热效应,继而破坏部分多酚,使得提取量下降^[18]。

不同体积分数的乙醇对四棱豆叶总酚提取量的影响如图 1C 所示,在一定范围内,总酚的提取量随着乙醇体积分数的升高而升高,当体积分数达到 40% 时,总酚的提取量最高,使用乙醇与水的混合物对酚类化合物的提取效率会更高,因为在有机溶剂中加入适量水分会使溶液极性升高,进而加速多酚类物质提取。但随着乙醇体积分数的继续增高,溶剂极性逐渐降低,导致总酚提取量下降^[19,20]。

不同提取温度对四棱豆叶总酚提取量的影响如图 1D 所示,在一定范围内,温度越高,总酚提取量越高,当温度为 70°C 时,提取量达到最高,随后开始下降。温度的不断升高会增加酚类化合物的溶解度和扩散系数,从而促进更多的传质,提高总酚的提取量^[21]。当温度过高时,酚类物质结构被破坏,平衡被打破,物质转移规律发生变化,非总酚物质析出,总酚提取量下降^[22]。

提取时间 40min、超声功率 300 W、乙醇体积分数为 40%、温度 70°C,考察不同的料液比对四棱豆叶总酚提取量的影响,结果见图 1E 所示。随着料液比的升高,总酚的提取量总体有显著的上升趋势,当料液比为 1:25 时,提取量达到最高,继续加大料液比后总酚提取量呈下降的趋势,表明此时四棱豆叶中酚类物质已溶出完全,且料液比增多也不利于后续分离纯化,因此确定料液比 1:25 进行后续优化实验^[23]。

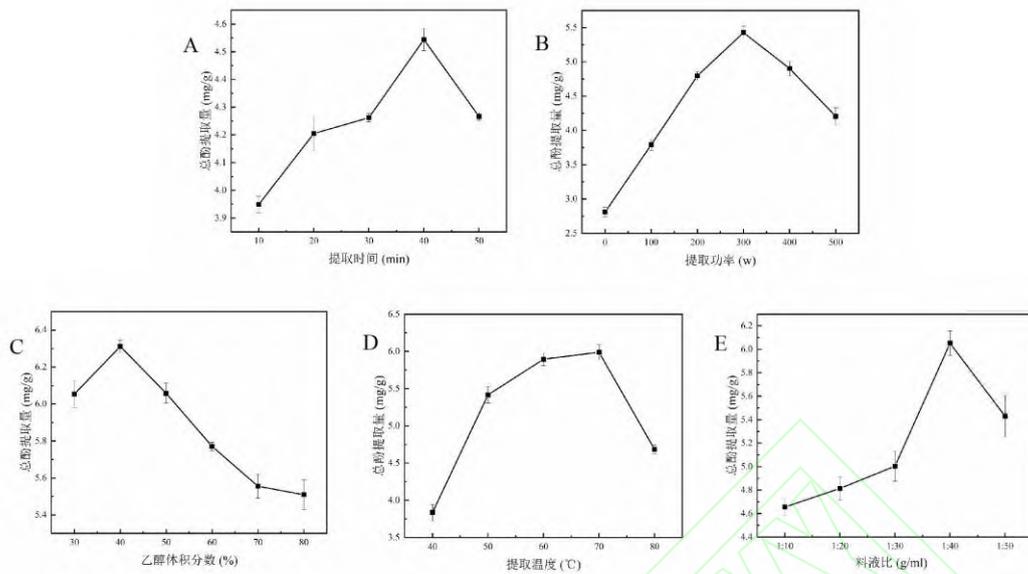


图 1 不同因素对四棱豆叶总酚提取量的影响

Fig. 1 Effect of different factors on the extraction of total phenols from the leaves of winged bean

综合以上几种单因素结果考虑，后续选取乙醇体积分数、提取温度、料液比分别作为后续响应面实验优化的三个水平。

2.2 响应面结果分析

2.2.1 模型建立及显著性分析

在单因素实验基础上，固定提取时间为 40min，运用响应面进行三因素三水平设计对四棱豆叶总酚提取工艺进行优化，得到最佳的提取参数。响应面实验设计及结果见表 2，方差分析见表 3。

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

编号	A	B	C	总酚提取量 (mg/g)
1	-1	-1	0	6.08
2	+1	-1	0	5.91
3	-1	+1	0	5.89
4	+1	+1	0	5.87
5	-1	0	-1	5.43
6	+1	0	-1	5.45
7	-1	0	+1	5.76
8	+1	0	+1	5.63
9	0	-1	-1	5.61
10	0	+1	-1	5.37
11	0	-1	+1	5.71
12	0	+1	+1	5.52
13	0	0	0	5.99
14	0	0	0	6.08

15	0	0	0	6.05
16	0	0	0	6.03
17	0	0	0	6.05

表 3 响应面回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of response surface regression

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	0.97	9	0.11	40.58	<0.0001	**
A	0.011	1	0.011	4.22	0.0790	
B	0.054	1	0.054	20.44	0.0027	**
C	0.072	1	0.072	27.10	0.0012	**
AB	5.625×10 ⁻³	1	5.625×10 ⁻³	2.11	0.1895	
AC	5.625×10 ⁻³	1	5.625×10 ⁻³	2.11	0.1895	
BC	6.25×10 ⁻⁴	1	6.25×10 ⁻⁴	0.23	0.6429	
A ²	8.059×10 ⁻³	1	8.059×10 ⁻³	3.02	0.1256	
B ²	0.015	1	0.015	5.45	0.0522	
C ²	0.77	1	0.77	290.51	<0.0001	**
残差	0.019	7	2.664×10 ⁻³			
失拟误差	0.014	3	4.75×10 ⁻³	4.32	0.0958	
纯误差	4.4×10 ⁻³	4	1.10×10 ⁻³			
总离差	0.99	16				

注：**表示差异极显著 (P< 0.01)，R²=0.9812；R²_{Adj}=0.9570；R²_{Pred}=0.7631

由表 3 可知，较高的 F 值 (40.58) 和较低的 P 值 (<0.0001) 表明回归模型显著，失拟误差不显著表明模型拟合度较好，因此认为该模型适合分析四棱豆总酚的提取。模型中 R²(0.9812)、R_{Adj}²(0.9570)、

R_{Pred}^2 (0.7631) 共同表明该模型较为可靠, 预测值与实验值之间具有较强的相关性。各因素对总酚提取量影响依次为: C (料液比) $> B$ (提取温度) $> A$ (乙醇体积分数), B 、 C 以及平方项 C^2 均影响极显著 ($P < 0.01$), 交互项影响及平方项 A^2 、 B^2 影响都不显著。

根据拟合的多元二次回归模型简化所得总酚提取量 (mg/g) 为 $w = 6.04 - 0.038A - 0.083B + 0.095C - 0.059B^2 - 0.43C^2$

2.2.2 响应面优化及模型验证

在确定最佳超声功率、提取时间的基础上, 通过响应面优化确定了四棱豆叶总酚的最佳提取条件为: 乙醇体积分数 37.61%、提取温度 67.41°C、料液比 1:25.56、超声功率 300 W、提取时间 40 min, 总酚得率为 6.09 mg/g, 为后续实验方便, 将最优条件调整为: 乙醇体积分数 38%、提取温度 67°C、料液比 1:26、超声功率 300 W、提取时间 40 min, 进行三次验证实验, 实测总酚含量平均值为 6.01 mg/g, 与预测值偏差 (1.31%) 较小, 说明该模型对四棱豆叶总酚的提取有较好的预测能力。

2.3 抗氧化能力分析

2.3.1 DPPH 自由基清除率分析

如图 2A 所示, 以 V_C 作阳性对照, 随着四棱豆叶总酚提取物浓度的增加, 提取物对 DPPH 自由基的清除率由 20.31% 增加到 82.33%, 与 V_C 溶液相比, 四棱豆叶总酚提取物对 DPPH 自由基的清除率整体低于 V_C , 但当其升高至一定浓度时, 其对 DPPH 自

由基的清除率与 V_C 相接近, 且 DPPH 的 IC_{50} 为 2.09 mg/mL。由此可见, 四棱豆叶总酚提取物浓度越高, 其对 DPPH 自由基的清除能力更强。

2.3.2 ABTS 自由基清除率分析

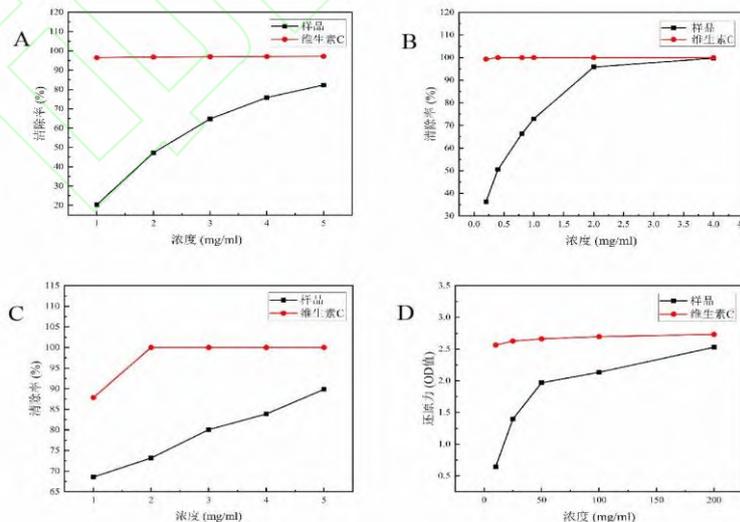
如图 2B, 随着提取物浓度的增加, 其对 $ABTS^+$ 的清除率也在增加, 当浓度为 4 mg/ml 时, 提取物对 $ABTS^+$ 的清除率高达 99.73%, 且 $ABTS^+$ 的 IC_{50} 为 0.39 mg/mL。由此可见, 当四棱豆叶总酚提取物浓度超过 4 mg/ml 时, 其与 V_C 溶液对 ABTS 自由基的清除无显著性差异。

2.3.3 羟自由基清除率分析

羟自由基是一种活性氧, 具有极强的氧化能力^[16], 四棱豆叶总酚提取物清除羟自由基能力越强, 证明其抗氧化能力越强。如图 2C 所示, 随着总酚提取物浓度的增加, 羟自由基清除率也逐渐增加, 可以看出四棱豆叶总酚抗氧化能力呈现质量浓度依赖性^[24], 通过 OH 的 IC_{50} 为 0.00032 mg/mL 可以得出, 其具备较强的羟自由基清除能力。

2.3.4 FRAP 还原力分析

FRAP 还原力是评价抗氧化能力的重要指标, 吸光度越大, 则表示物质还原力越强。四棱豆叶总酚提取物对 Fe^{3+} 有一定的还原能力, 其还原能力在一定浓度范围内呈现良好的量效关系^[25]。如图 2D 所示, 以 V_C 为阳性对照, 随着四棱豆叶总酚提取物浓度的增加, 当样品浓度为 200 mg/ml 时, 还原力 OD 值 2.53 已经极其接近 V_C 的还原力 OD 值 2.73, 由此可以证明, 四棱豆叶总酚提取物具备较强的还原力。



A DPPH 自由基清除率 B ABTS 自由基清除率 C 羟自由基清除率 D FRAP 还原力分析

图 2 四棱豆叶总酚抗氧化能力分析

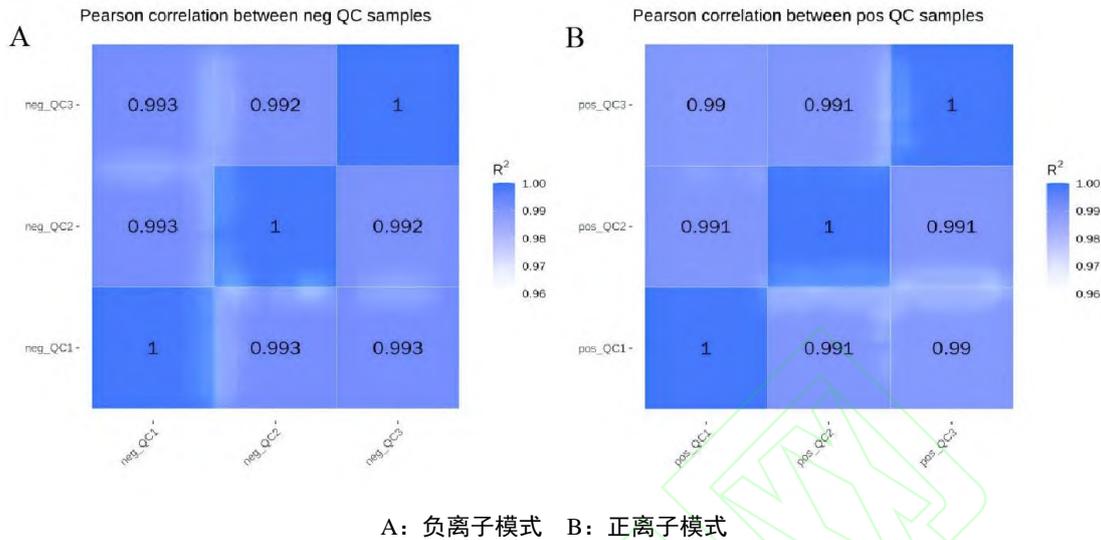
Fig. 2 Analysis of antioxidant capacity of total phenols of winged bean leaves

2.4 总酚提取物成分检测结果分析

2.4.1 QC 相关性分析

基于代谢物的相对定量值来计算样本之间的pearson 相关系数，样本相关性越高 (R^2 越接近于 1) 说明整个检测过程稳定性越好，数据质量越高。样

本的相关性如图 3 所示，两种离子模式下的 $R^2 \geq 0.99$ ，可以看出，四棱豆叶总酚提取物样品的检测过程稳定性较好，数据可靠。



A: 负离子模式 B: 正离子模式

图 3 样品相关性分析

Fig. 3 Sample correlation analysis

2.4.2 提取物成分数据分析

根据二级扫描图谱信息对提取物中化合物进行定性分析^[26]，所测得化合物成分详细信息见表 4，根据表中结果显示，四棱豆叶醇提取物中共检测出 31 种酚酸类化合物，含量较多的有奎宁酸、肉桂酸、咖啡酸、香豆素及其衍生物等。其中邻羟基肉桂酸含量占比最大，约为 68.43%，其具备一定的抗氧化能

力及抗炎作用，还具备较强的抗菌性，在多个领域都具备广泛的应用；其次占比较多的有间羟基苯甲酸、五味子丙素、10-姜酮醇、右旋奎宁酸、香豆素等，分别占比 5.35%、5.21%、4.97%、2.91%、2.39%，这些化合物都具备极强的抗炎、抗氧化性，进一步证明了四棱豆叶总酚提取液具备较强的抗氧化能力。

表 4 四棱豆叶总酚提取物成分分析

Tab. 4 Phenolic compound analysis of winged bean leaves extracts

序号	名称	分子式	相对分子质量	保留时间/min	离子模式	m/z	峰面积	百分比/%
1	右旋奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.06	1.384	[M-H] ⁻	191.0564	150079414	2.91
2	1-咖啡酰奎宁酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.09	1.411	[M-H] ⁻	353.0893	1058334	0.21
3	绿原酸甲酯	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.11	1.472	[M-H] ⁻	367.1049	21310114	0.41
4	香豆-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	324.09	1.540	[M-H] ⁻	323.0789	28319560	0.55
5	邻羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	164.05	2.397	[M+H] ⁺	165.0549	3521463104	68.43
6	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	146.04	2.454	[M+H] ⁺	147.0443	123187782	2.39
7	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	154.03	5.067	[M-H] ⁻	153.0197	62440226	1.21
8	肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₂	148.05	5.091	[M+H] ⁺	149.0601	72044794	1.40
9	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	134.04	5.098	[M-H] ⁻	133.0298	63022764	1.22
10	4-羟基-3,5-二甲氧基肉桂酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	206.06	5.103	[M+H] ⁺	207.0652	14152530	0.28
11	3-羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	118.04	5.295	[M-H] ⁻	117.0348	19820377	0.39
12	对甲氧基肉桂醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	180.08	5.320	[M+H] ⁺	163.0756	11747988	0.23
13	双羟香豆素	C ₁₉ H ₁₂ O ₆	336.06	5.325	[M+H] ⁺	337.0704	22220887	0.43
14	秦皮乙素	C ₉ H ₆ O ₄	178.07	5.374	[M-H] ⁻	177.0195	77947915	1.51
15	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.13	5.411	[M-H] ⁻	515.1193	22307561	0.43
16	6-甲基香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₂	160.05	5.492	[M+H] ⁺	161.0603	36600696	0.71

17	异嗪皮啶	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	222.05	5.533	[M-H] ⁻	221.0455	35737751	0.69
18	丹叶大黄素	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	258.09	5.555	[M+H] ⁺	259.0966	5450629	0.11
19	异阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.06	5.561	[M-H] ⁻	193.0508	34315013	0.67
20	3-对香豆酰基奎宁酸	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₃	500.15	5.619	[M-H] ⁻	499.1462	53134133	1.03
21	咖啡酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208.07	5.635	[M-H] ⁻	207.0662	14659514	0.28
22	二氢咖啡酸	C ₉ H ₁₀ O ₄	164.05	5.569	[M+H] ⁺	346.1286	5227477	0.10
23	2,4,6-三甲酚	C ₉ H ₁₂ O	136.09	5.722	[M-H] ⁻	135.0818	53845444	1.05
24	对香豆酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	192.08	5.773	[M-H] ⁻	191.0727	9079127	0.18
25	间羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	138.03	5.980	[M-H] ⁻	137.0248	275630940	5.35
26	3,4,5-三甲氧基肉桂酸	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	238.08	6.445	[M-H] ⁻	219.0666	98158501	1.91
27	五味子丙素	C ₂₂ H ₂₄ O ₆	384.16	6.582	[M+H] ⁺	385.1640	268200080	5.21
28	10-姜酮醇	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	350.25	7.019	[M-H] ⁻	349.2384	255722061	4.97
29	羟基肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₃	244.20	8.205	[M-H] ⁻	243.1967	51478310	1.00
30	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.21	9.561	[M-H] ⁻	227.2020	350178	0.01
31	丹酚酸 C	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	492.11	9.622	[M+H] ⁺	493.1128	3167867	0.06

注: Mr 为分子质量; Rt/min 为保留时间; m/z 为质核比

3 结 语

本研究先通过单因素实验确定较优的提取工艺范围, 后采用响应面实验优化四棱豆叶总酚提取工艺, 得出乙醇体积分数 38%, 超声温度 67°C, 超声功率 300 W, 超声时间 40 min, 料液比 1:26 为最佳提取工艺, 在此工艺条件下的四棱豆叶总酚量为 6.01 mg/g。通过对总酚提取物 DPPH[·]、ABTS^{·+}、OH 自由基的清除能力及 FRAP 还原力的研究, 证实了四棱豆叶总酚具有较强的抗氧化能力。

本研究通过 LC-MS/MS 分析四棱豆叶总酚提取物的成分组成, 通过数据库和二级质谱比对分析, 共鉴定出 31 种酚酸类化合物, 其中有奎宁酸、咖啡酸、肉桂酸、绿原酸、肉豆蔻酸、丹酚酸、香豆素及其衍生物等, 其中邻羟基肉桂酸含量占比最大, 约为 68.43%; 占比较多的有间羟基苯甲酸、五味子丙素、10-姜酮醇、右旋奎宁酸、香豆素等, 分别占比 5.35%、5.21%、4.97%、2.91%、2.39%。酚酸类化合物在抗炎、抗氧化、抗衰老、抗糖尿病、抗心血管疾病等方面有着较多的应用, 四棱豆叶提取物中检测出来的多种酚酸成分同样具有相似的药效及药用价值, 在四棱豆未来的应用中, 除去对四棱豆豆荚的加工应用, 四棱豆叶的有效成分提取也将大幅度提高四棱豆整体植株的利用率, 提高其应用价值, 同时为其在化妆品、医药、保健品、食品等行业的应用奠定基础, 为提高四棱豆叶利用率提供参考依据。

参考文献:

- [1] 任晓雪. 不同栽培模式对四棱豆农艺性状、净光合速率日变化及品质构成因素的影响[J]. 陕西农业科学, 2022, 68(09): 41-45.
- [2] 卢天啸. 四棱豆露地栽培技术[J]. 河北农业, 2017, 65(11): 21-22.
- [3] 刘晶, 王海燕, 刘焕云, 等. 四棱豆肽的分离鉴定及其抗疲劳特性研究[J]. 热带作物学报, 2015, 36(12): 2216-2222.
- [4] 肖正春, 袁昌齐, 束成杰, 等. 四棱豆与四翼豆的利用与传播[J]. 中国野生植物资源, 2018, 37(05): 1-3.
- [5] 邓婷婷, 叶涛, 毛春季, 等. 四棱豆养分消化特性的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(11): 48-51.
- [6] KOLEY T K, SINGH S, KHEMARIYA P, et al. Evaluation of bioactive properties of Indian carrot (*Daucus carota* L.): A chemometric approach[J]. Food Research International, 2014, 60: 76-85.
- [7] SINGH M, DUBEY R K, KOLEY T K, et al. Valorization of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) by evaluation of its antioxidant activity through chemometric analysis[J]. South African Journal of Botany, 2019, 121: 114-120.
- [8] 李达, 马聪玉, 吕青林, 等. 不同产地脱脂乳木果仁总酚含量测定及其生物活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(05): 572-579.

- [9] 王思花, 张静, 张姗姗, 等. 响应面法优化豌豆皮中的总酚提取工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(08): 110-114.
- [10] GAO Y, SHI Y, MIAO N, et al. A green ultrasound-assisted enzymatic extraction method for efficient extraction of total polyphenols from *Empetrum nigrum* and determination of its bioactivities[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2022, 109: 559-567.
- [11] MÜLLER L, FRÖHLICH K, BÖHM V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay[J]. Food Chemistry, 2011, 129(1): 139-148.
- [12] ZHANG H, YANG Y, ZHOU Z. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(1): 256-263.
- [13] 李斌, 雷月, 孟宪军, 等. 响应面实验优化超声波辅助提取蓝靛果多酚工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(22): 33-39.
- [14] 文良娟, 刘苇芬. 苦瓜黄酮的提取条件及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(09): 183-186.
- [15] 李小艳, 段鹏慧, 张兴亮, 等. 板栗果实酚类物质及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(04): 138-144.
- [16] ISMAIL B B, GUO M, PU Y, et al. Valorisation of baobab (*Adansonia digitata*) seeds by ultrasound assisted extraction of polyphenolics. Optimisation and comparison with conventional methods[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 52: 257-267.
- [17] RUDKE A R, DA SILVA M, ANDRADE C J D, et al. Green extraction of phenolic compounds and carrageenan from the red alga *Kappaphycus alvarezii*[J]. Algal Research, 2022, 67: 102866.
- [18] FERNANDES A, FERNANDES I, CRUZ L, et al. Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57 (23) : 11154-11160.
- [19] HUANG J, GUO X Y, XU T Y, et al. Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products[J]. Journal of Chromatography, 2019, 1598: 1-19.
- [20] AHMED T, RANA M R, MAISHA M R, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic content & antioxidant activity of hog plum (*Spondias pinnata* L. f. kurz) pulp by response surface methodology [J]. Heliyon, 2022, 8(10): e11109.
- [21] JANARNY G, RANAWEERA K K D S, GUNATHILAKE K D P P. Optimization of ethanol based extraction of phenolics from *Ocimum sanctum* flowers by response surface methodology[J]. Bio catalysis and Agricultural Biotechnology, 2022, 45: 102493.
- [22] 都昊贤, 王步江, 张静. 小麦麦麸中总酚提取工艺的响应面优化及油脂抗氧化应用研究[J]. 天津农业科学, 2022, 28(05): 75-80.
- [23] LIAO J, XUE H, LI J. Extraction of phenolics and anthocyanins from purple eggplant peels by multi-frequency ultrasound: Effects of different extraction factors and optimization using uniform design[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 90: 106174.
- [24] 孙天颖, 马继洋. 酸浆宿萼多酚类物质提取工艺研究及抗氧化活性评价[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(06): 87-91.
- [25] 康兆勇, 李玉霜, 吴过, 等. 厚朴叶不同极性溶剂萃取物总酚含量及体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(24): 73-79.
- [26] 陈端端. 副溶血弧菌感染对红螯螯虾肝胰腺转录组和代谢组的影响及 Relish 和 TRAF6 基因的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.