

绿豆提取液的抗内毒素作用 及提取工艺优化

李 健,王 旭,刘 宁,陈姝娟

(哈尔滨商业大学食品工程学院,黑龙江哈尔滨 150076)

摘 要:研究了绿豆提取液对细菌内毒素的清除作用,利用终点显色基质法测定内毒素的含量。结果表明,绿豆提取液在体外具有抗内毒素的作用,并以内毒素的清除率为标准,探讨了不同提取因素对提取效果的影响,最终确定提取条件为乙醇浓度 70%,温度 60℃,提取时间 2h,料液比 1:20,提取物中抗内毒素有效成分含量最高。最后通过两相萃取分离,发现绿豆中抗内毒素成分主要集中在正丁醇提取物中。

关键词: 绿豆,抗内毒素,提取

Study on anti-endotoxin of mung bean extraction and optimization of extraction processing

LI Jian,WANG Xu,LIU Ning,CHEN Shu-juan

(College of Food Engineering,Harbin Commerce University,Harbin 150076,China)

Abstract: The clearing effect of extraction from mung bean on the bacterial endotoxin was investigated in vitro. The results indicated that extraction from mung bean could clear the bacterial endotoxin in vitro with displaying color in the end. And the influences of different factors on extracted efficiency were discussed. The conditions of 60℃, 70% ethanol, solid-liquid ratio of 1:20, extracting for 2h were optimized. And it was found that the effective components existed in the extraction of chloroform through extracting in the two-phase.

Key words: mung bean; anti-endotoxin; extraction

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)03-0310-03

绿豆(Mung bean),又名青小豆、录豆、植豆,为一年生草本植物的种子。绿豆性味甘寒,具有清热解毒之功效。《开宝本草》记载^[1]:“绿豆,甘,寒,无毒。入心、胃经。主丹毒烦热,风疹,热气奔豚,生研绞汁服,亦煮食,消肿下气,压热解毒”。《精编本草纲目》云^[2]:“绿豆,消肿治痘之功虽同于赤豆,而压热解毒之力过之。且益气、厚肠胃、通经脉,无久服枯人之忌。外科治痈疽,有内托护心散,极言其效”。内毒素即脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),由保守的毒性脂质A部分、核心糖脂和特异的O侧链组成,是革兰阴性菌细胞壁的主要成分。内毒素侵入机体血流,可触发体内一系列病理生理过程而引起发热、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血以致死亡,中医把LPS

看成“热毒”“邪毒”的物质基础。现代研究认为,中药材的清热解毒功效主要集中于有效成分抗内毒素作用和抗病原微生物作用^[3]。本文主要研究了绿豆提取液的体外抗内毒素作用,并以内毒素的清除率为指标,对提取液的制备工艺进行了优化。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

绿豆 市售;无水乙醇、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等 均为国产分析纯;鲎试剂盒 厦门鲎试剂厂。

DWF-100 型植物粉碎机 温岭市林大机械有限公司; R-205 型旋转蒸发器 上海申胜生物技术有限公司; LD4-2A 型离心机 北京医用离心机厂; 721 型分光光度计 上海光谱仪器有限公司; JD5000-2 型分析天平 沈阳龙腾电子有限公司。

1.2 实验方法

收稿日期: 2010-05-27

作者简介: 李健(1956-),男,教授,主要从事食品化学方面的研究。

基金项目: 黑龙江龙泰农业股份有限公司横向课题。

的比较^[4].食品研究与开发,2008,29(3):57-60.

[7] 努尔阿米娜·阿尤甫,阿不都拉·阿巴斯.曼陀罗种子中总黄酮含量测定及提取工艺的研究^[5].食品科学,2008,29(3):260-263.

[8] 吴立军.天然药物化学[M].第五版.北京:人民卫生出版社,2007:178-181.

[9] 涂宗财,江国忠,陈钢,等.黄姜茎叶中总黄酮的提取工艺研究^[6].食品工业科技,2009,30(5):236-238.

1.2.1 工艺流程 绿豆→磨粉→过 100 目筛→70% 乙醇 60℃ 水浴回流→三层纱布过滤→滤液离心→50℃ 减压浓缩→真空干燥→绿豆总提取物→鲎实验

1.2.2 测定方法 终点显色法测内毒素的含量^[4]。

1.2.3 细菌内毒素标准曲线的绘制

1.2.3.1 浓度的稀释 取细菌内毒素工作品 1 支,用细菌内毒素工作品用水稀释为 10EU/mL 的内毒素溶液,再稀释为 1.0EU/mL 的内毒素溶液,以 1.0EU/mL 的内毒素溶液为母液依次稀释为 1.0、0.5、0.25、0.1EU/mL 的浓度梯度。

1.2.3.2 操作方法 取无热源试管,分别加入 200μL 10EU 细菌内毒素溶液和绿豆提取液,55 ± 2℃ 水浴 37min,再加入鲎试剂溶液,混匀,温浴 37min。再加入 500μL 偶氮化试剂 1 溶液,混匀。再依次加入偶氮化试剂 2 和偶氮化试剂 3 各 500μL,混匀,静置 5min,于 545nm 波长处读取吸光度值,吸光度值越小说明提取液的内毒素清除率最高。

1.2.4 绿豆提取液萃取工艺研究 以绿豆提取液的内毒素清除率为标准,探讨乙醇浓度、提取温度、时间、物料比对提取工艺的影响,确定最佳提取工艺条件。

1.2.4.1 乙醇浓度对萃取效果的影响 称取绿豆干粉 5 份,以 1:10 的比例分别加入 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇,60℃ 水浴回流提取 4h,过滤,低于 50℃ 浓缩,进行鲎实验,测吸光度值。

1.2.4.2 温度对萃取结果的影响 称取绿豆干粉 5 份,以 1:10 的比例加入 60% 的乙醇,分别在 40、50、60、70、80℃ 水浴回流提取 4h,过滤,低于 50℃ 浓缩,进行鲎实验,测吸光度值。

1.2.4.3 提取时间对萃取结果的影响 称取绿豆干粉 5 份,以 1:10 的比例加入 70% 的乙醇,60℃ 水浴回流,提取时间分别为 2、3、4、5、6h,过滤,低于 50℃ 浓缩,进行鲎实验,测吸光度值。

1.2.4.4 料液比对萃取结果的影响 称取绿豆干粉 5 份,分别以 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 的比例加入 60% 的乙醇,60℃ 水浴回流提取 4h,低于 50℃ 浓缩,进行鲎实验,测吸光度值。

1.2.5 不同溶剂萃取物对内毒素的清除作用 取乙醇提取物,用蒸馏水溶解。用石油醚萃取三次除脂类,分别用三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取三次,浓缩各部分,进行鲎实验。

2 结果与讨论

2.1 内毒素标准曲线的绘制

见图 1。

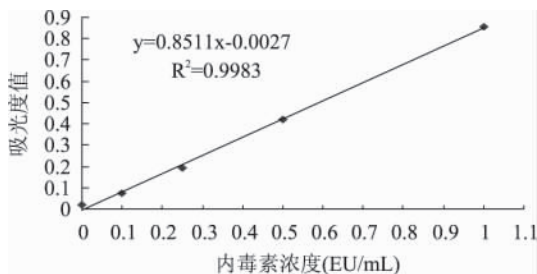


图 1 内毒素的标准曲线

2.2 乙醇浓度对萃取效果的影响

吸光度值越小,内毒素残留越少,提取物的清除内毒素作用效果越好,说明绿豆提取物中含有的抗内毒素成分就越多。由图 2 可以看出,随着乙醇浓度的不断增大,绿豆中抗内毒素活性成分呈现先增多后减少的趋势,当乙醇浓度为 70% 时,提取效果最佳。当乙醇浓度超过 70% 时,提取物中有效成分减少,这可能是由于其他醇溶性物质增加,与有效成分竞争同乙醇-水分子结合,从而导致有效成分的提取量下降。

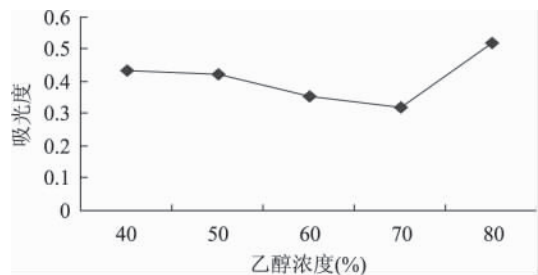


图 2 乙醇浓度对萃取效果的影响

2.3 提取温度对萃取结果的影响

温度对于提取率有非常显著的影响。由图 3 可以看出,在 40~60℃ 时,随着温度的升高,绿豆中抗内毒素成分不断地被萃取出来。当超过 60℃ 时,达到了乙醇的沸点,提取温度太高,使其中的活性成分破坏,且杂质的溶出量增加。因此,最佳萃取温度定为 60℃。

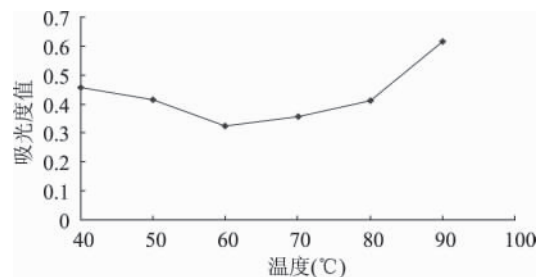


图 3 提取温度对萃取结果的影响

2.4 提取时间对萃取结果的影响

由图 4 可以看出,萃取时间越长,萃取效果越好。2h 后,曲线下下降缓慢。从综合提取效率方面考虑,提取时间定为 2h。

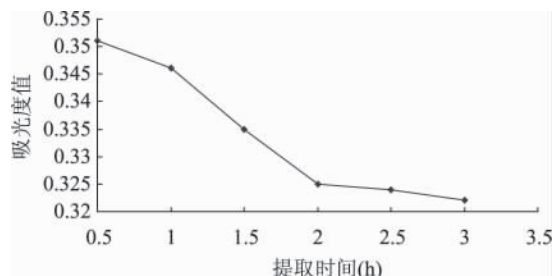


图 4 提取时间对萃取结果的影响

2.5 料液比对萃取结果的影响

乙醇能穿透绿豆粉末的细胞膜,溶解溶质,形成细胞内外溶质浓度差,将溶质渗出细胞膜,达到提取目的。料液比越大,渗透压越大,溶质更容易溶出。由图 5 可以看出,当料液比在 1:20 之后,料液比对提取效果影响不大,曲线变缓,考虑到实验条件的影

(下转第 315 页)

参考文献

- [1] 徐广顺.民族药全叶青兰[J].生命世界,1989(1):22.
 [2] 谢宗万,余友岑.全国中草药名签(上)[M].北京:人民卫生出版社,1996:13.
 [3] 中华人民共和国药典委员会编.中华人民共和国卫生部药品标准,维吾尔药分册[M].新疆科技卫生出版社,1999:73.
 [4] 谢阳,谭辉群.青兰浸膏片处方及制备工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2007(12):52-53.
 [5] 梁军,李革,焦永倩.青兰浸膏片质量标准研究[J].新疆中医药,2003(5):13-15.
 [6] 全叶青兰片治疗老年慢性气管炎病人127病例的临床观

察[J].医学研究通讯,1972,71(3):21-22.

- [7] 新疆维吾尔自治区革委会卫生局防治办公室.全叶青兰治疗393例慢性气管炎疗效分析[J].中医杂志,1973,11(1):11-12.
 [8] 中国人民解放军第十二医院慢性气管炎防治组.青兰2号治疗34例喘息病人疗效观察(摘要)[J].新医学杂志,1975(12):27-28.
 [9] 国家药典委员会.《中国药典》一部[S].1977:234.
 [10] 郭森林,刘永滢.全叶青兰中黄酮类成分的研究[J].植物学报,1980,22(3):266-269.
 [11] 凌关庭.抗氧化食品与健康[M].北京:化学工业出版社,2004:343-344.

(上接第311页)

响,确定料液比为1:20。

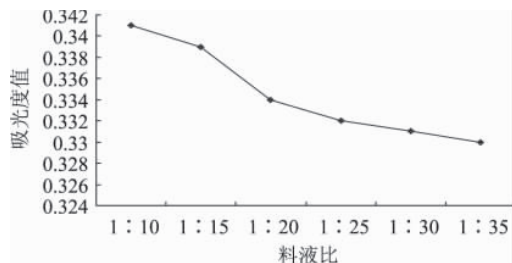


图5 料液比对萃取结果的影响

2.6 不同溶剂萃取物对内毒素的清除作用

由图6可知,乙醇提取物经过不同的溶剂萃取,正丁醇的萃取物对内毒素的清除作用最强。由此可以断定,绿豆中清除内毒素的有效成分主要集中于正丁醇萃取物中。

3 结论

绿豆提取液具有体外清除细菌内毒素的作用,不同的提取条件均能影响提取物中清除内毒素有效成分的含量。经研究利用70%的乙醇,料液比1:20,60℃条件下提取2h,绿豆中清除内毒素的有效成分

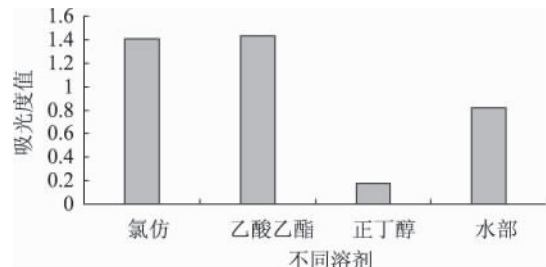


图6 不同溶剂萃取物对内毒素的清除作用

提取效果理想。通过两相萃取,证明有效成分主要集中于正丁醇提取物中。

参考文献

- [1] 赵守训,黄泰康,丁志尊.中药辞海[M].第三卷.北京:中国医药科技出版,1997:642-643.
 [2] 沈连生主编.本草纲目[M].北京:华夏出版社,2004:199.
 [3] 雷黎明,潘清平.板蓝根化学、药理、质量及提取方法的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(10):2579.
 [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].第一部.北京:化学工业出版社,2005:79.

- [5] Tomoda M, Gonda R, Shimizu N, et al. A reticuloendothelial system-activating glycan from the barks of Eucommia ulmoides[J]. Phytochemistry, 1990, 29(10):3091-3094.
 [6] 辛晓明,郭桂丽,王浩,等.杜仲多糖对环磷酰胺致小鼠毒性的影响[J].时珍国医国药,2009,20(7):1664-1665.
 [7] 秦卫东,马利华,陈学红,等.生姜多糖的提取及脱蛋白研究[J].食品科学,2008,29(4):218-220.
 [8] 刘凤,陶慧卿,何培民.条斑紫菜多糖脱蛋白方法与条件优化[J].上海水产大学学报,2007,16(2):140-143.
 [9] 张慧玲,任秀莲,魏琦峰,等.海带多糖的脱蛋白研究[J].中成药,2008,30(9):1370-1373.
 [10] 毛英丽,王忠民,李瑾瑜,等.葡萄多糖脱蛋白方法的研究[J].食品研究与开发,2008,29(4):42-44.
 [11] 李秋红,李廷利,黄莉莉,等.中药抗氧化的作用机理及评价方法研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(5):1257-1258.
 [12] 李合生,孙群,赵世杰,等.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:182-185.
 [13] 王宪泽.生物化学实验技术原理和方法[M].北京:中国农业出版社,2002:52-54.

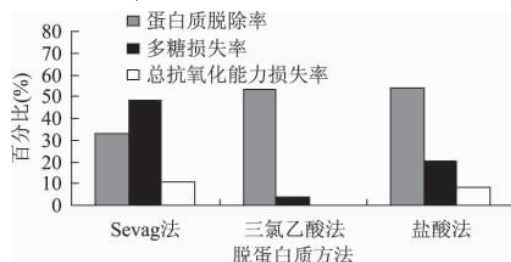


图4 三种脱蛋白方法综合比较

率最小的是三氯乙酸法。综合考虑蛋白质脱除率、多糖损失率和总抗氧化能力损失率,采用3%浓度三氯乙酸脱除杜仲粗多糖蛋白质较宜,蛋白质脱除率为53.32%,多糖损失率为3.67%,总抗氧能力此条件下无损失。

参考文献

- [1] Gonda R, Tomoda M, Shimizu N, et al. An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the bark of Eucommia ulmoides[J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(7):1966-1969.