

张虹,白红丽,张江梅,等.青叶胆不同部位总黄酮提取及其抑菌作用[J].江苏农业科学,2013,41(9):224-226.

# 青叶胆不同部位总黄酮提取及其抑菌作用

张虹<sup>1</sup>,白红丽<sup>2</sup>,张江梅<sup>1</sup>,计红旭<sup>1</sup>,王宝森<sup>3</sup>,郭俊明<sup>2</sup>

(1.红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 661100; 2.云南民族大学/民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室,云南昆明 6505002;

3.红河学院理学院,云南蒙自 661100)

**摘要:**以青叶胆为材料,采用乙醇溶剂冷浸法对青叶胆茎叶、根中的总黄酮进行提取,并研究了其抑菌作用。结果表明:对于青叶胆茎叶,采用 80% 乙醇溶液浸提 3 d,总黄酮得率最高,为 5.71%;对于青叶胆根,采用 80% 乙醇溶液浸提 2 d,总黄酮得率最高,为 5.09%;茎叶的总黄酮得率高于根。青叶胆总黄酮提取液对金黄色葡萄糖球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌都有一定抑菌作用,抑菌效果大小依次为:金黄色葡萄糖球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌。

**关键词:**青叶胆;总黄酮;提取;抑菌作用

**中图分类号:** R282.71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0224-02

青叶胆(*Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shih)为龙胆科獐牙菜属一年生直立小草本,别名肝炎草、苦胆草、弥勒獐牙菜、肝尖草等,主要分布于云南省红河州弥勒市、开远市等地<sup>[1]</sup>。青叶胆含有黄酮类、环烯醚萜苷类、内酯、齐墩果酸等化合物<sup>[2-3]</sup>,其性寒,味苦、甘;归肝、胆、膀胱经;能清肝利胆,清热利湿,是治疗肝炎的特效药<sup>[4-7]</sup>。本研究采用不同浓度乙醇对青叶胆中的总黄酮进行提取,并研究了其抑菌作用,旨在为青叶胆的进一步研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新鲜青叶胆全草购于红河州蒙自草药市场。

供试菌株包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),由红河学院生命科学与技术学院实验室提供。

### 1.2 仪器及主要试剂

仪器:UV-4802S 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)。

试剂:芸香苷标准品,乙醇、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、牛肉膏、蛋白胨、琼脂等试剂均为分析纯。

### 1.3 方法

**1.3.1 青叶胆总黄酮液的提取方法** 将新鲜全株青叶胆洗净,将茎叶、根分别剪成小段,置于电热恒温鼓风干燥箱中 80 ℃ 干燥 6 h,用高速粉碎机粉碎,备用。

**1.3.1.1 波长选择** 选取标准溶液和样品提取液进行波长扫描,结果表明标准溶液和样品提取液在 510 nm 有最大吸收

峰,故选择 510 nm 作为测定波长。

**1.3.1.2 标准工作曲线制备**<sup>[8]</sup> 称取于 120 ℃ 恒温干燥至恒重的芸香苷标准品 25.0 mg,置 100 mL 容量瓶中,加入适量 60 ℃ 的 50% 乙醇使其溶解。加 50% 乙醇定容至刻度,摇匀。此时标准品溶液浓度为 0.25 mg/mL。

分别吸取标准品溶液 0、0.5、1、2、3、4、5 mL,置于 25 mL 容量瓶中。在每个容量瓶中加入 50% 乙醇约 5 mL,摇匀。分别加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min。再加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min。加 4% NaOH 溶液 10 mL,加 50% 乙醇或甲醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min。同时以试剂空白作参比。在 510 nm 波长处测定溶液的吸光度。

以吸光度值  $D$  为纵坐标,浓度  $C$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程为  $D = 0.009C - 0.0011$ ,  $r^2 = 0.9996$ 。

**1.3.1.3 样品提取液的制备** 分别称取青叶胆茎叶、根干粉 2 g 置于 100 mL 三角瓶中,再分别加入浓度为 30%、50%、70%、80%、90% 的乙醇 50 mL,分别浸提 1、2、3、4 d,过滤,用相应浓度乙醇溶液将滤液定容至 100 mL,为样品提取液。

**1.3.1.4 青叶胆总黄酮含量的测定** 分别吸取根、茎叶样品提取液 1 mL,置于 25 mL 容量瓶中,按“1.3.1.2”方法操作,在 510 nm 波长处平行测定 3 次,同时以样品空白作参比。根据回归方程计算总黄酮含量<sup>[8]</sup>。

总黄酮得率 = [提取液浓度(mg/mL) × 稀释倍数 × 体积(mL) ÷ 样品干重(g) ÷ 1 000] × 100%

### 1.3.2 青叶胆总黄酮提取液抑菌方法

**1.3.2.1 供试菌株的活化** 无菌条件下将供试菌株接入细菌培养基上,置于(37 ± 1) ℃ 恒温培养箱内培养 18 ~ 24 h,进行菌种活化,取第 3 代备用。

**1.3.2.2 菌悬液的制备** 在相应的试管斜面培养基上取活化培养好的菌株,分别用接种环挑取少许菌体置于装有 9 mL 无菌水的试管内,摇匀,使菌悬液菌数为  $1 \times 10^8$  个/mL。

**1.3.2.3 抑菌圈测定**<sup>[9-10]</sup> 用 0.2 mL 菌悬液涂布于细菌培养基上,用已灭菌的滤纸片(直径 6 mm)分别浸在总黄酮提取率最高的提取液(80% 乙醇浓度的青叶胆茎叶总黄酮提取液)、对照液(0.9% 的生理盐水)、80% 乙醇中 12 h 后,用无

收稿日期:2013-03-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:51262031);民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室开放基金(编号:MY1105);红河学院植物保护硕士点建设项目。

作者简介:张虹(1962—),女,云南昆明人,教授,从事生物技术研究。E-mail:zh\_biology2@126.com。

通信作者:郭俊明,硕士,教授,从事无机非金属材料及生物无机化学研究。E-mail:guojunming@tsinghua.org.cn。

菌镊子夹取浸有提取液和对照液的滤纸片于平板培养基表面,置于 37 ℃ 培养 24 h,测定抑菌圈直径。

1.3.2.4 青叶胆黄酮粗提取液最小抑菌浓度 (MIC)<sup>[9]</sup> 无菌条件下,将青叶胆总黄酮提取液分别稀释成 10.00%、5.00%、2.50%、1.25%、0.63%、0.59%、0.30% 的系列溶液,分别放入 7 个灭过菌的试管中。向各平皿中分别加入不同浓度的青叶胆总黄酮提取液各 2 mL,倒入已灭菌且温度为 40 ~ 50 ℃ 的培养基,充分混匀,待培养基凝固后,分别移取各菌悬液 0.1 mL,均匀涂抹在培养基上,于 37 ℃ 恒温培养箱内培养 24 h。以不长菌的最低浓度为提取液的最小抑菌浓度,每种细菌、每个浓度设 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度和浸提时间对青叶胆总黄酮提取的影响

由图 1、图 2 可知,在相同浸提时间内,乙醇浓度为 30% ~ 80% 时,青叶胆茎叶、根的总黄酮得率均随乙醇浓度的增加而增加;乙醇浓度 90% 下的总黄酮得率略低于乙醇 80% 下的总黄酮得率,乙醇浓度为 80% 时总黄酮得率为最高,其次是乙醇浓度为 90% 的总黄酮得率,乙醇浓度为 30% 时总黄酮得率最低。

在相同乙醇浓度、不同浸提时间下青叶胆根、茎叶的总黄酮得率有差别,浸提时间为 1 d 下的总黄酮得率最低。

乙醇浓度为 30%、50% 时,青叶胆茎叶在浸提 2 d 时总黄酮得率最高;乙醇浓度为 70%、80% 时,青叶胆茎叶在浸提 3 d 时总黄酮得率最高;乙醇浓度为 90% 时,青叶胆茎叶在浸提 4 d 时总黄酮得率最高。

乙醇浓度为 30%、50%、70% 时,青叶胆根浸提 4 d 时总黄酮得率最高;乙醇浓度为 80%、90% 时,青叶胆根浸提 2 d 时总黄酮得率最高。

2.2 青叶胆总黄酮提取液对 3 种细菌的抑制效果

由表 1、表 2 可见,随着青叶胆总黄酮粗提取液浓度的增加,其抑菌作用也随之增强。金黄色葡萄糖球菌、枯草芽孢杆

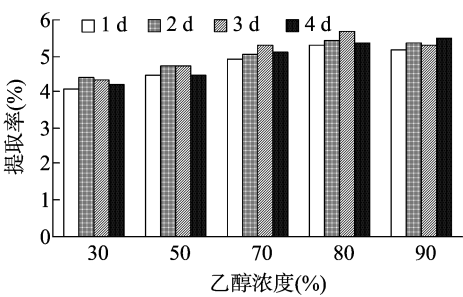


图1 乙醇冷浸提取青叶胆茎叶中的总黄酮得率

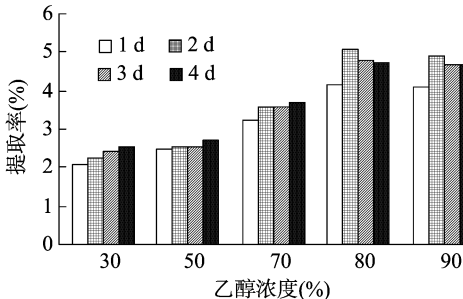


图2 乙醇冷浸提取青叶胆根中的总黄酮得率

菌、大肠杆菌的 MIC 值分别为 0.63%、2.50%、5.00%。抑菌圈测定结果表明,金黄色葡萄球菌抑菌作用最强,其次是枯草芽孢杆菌,大肠杆菌的抑菌作用最弱,表明随着总黄酮含量的增加,抑菌作用也在增加。

表 1 青叶胆黄酮粗提取液抑菌效果

菌类	抑菌圈直径 (mm)		
	总黄酮提取液	80% 乙醇溶液	0.9% 生理盐水
金黄色葡萄球菌	10.97	7.17	—
枯草芽孢杆菌	9.99	7.17	—
大肠杆菌	7.97	7.17	—

注:“—”表示无抑制作用。

表 2 青叶胆黄酮粗提取液对试验菌的最低抑制浓度

试验菌	青叶胆提取液浓度						
	10.00%	5.00%	2.50%	1.25%	0.63%	0.59%	0.30%
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	+	+++
枯草芽孢杆菌	—	—	—	+	+++	+++	++++
大肠杆菌	—	—	+	++	+++	+++	+++

注:“—”表示无菌生长;“+”表示有少量菌体生长;“++”表示有不超过 1/3 平皿面积的菌体生长;“+++”表示有不超过 1/2 平皿面积的菌体生长;“++++”表示有超过 1/2 平皿面积的菌体生长<sup>[9]</sup>。

3 结论与讨论

本研究表明,乙醇浓度为 80% 时青叶胆根和茎叶的总黄酮得率最高,茎叶浸提时间以 3 d 为宜,根浸提时间以 2 d 为宜。青叶胆茎叶、根的总黄酮得率最高值分别为 5.17%、5.07%。乙醇浓度为 30%、浸提 1 d 的总黄酮得率最低,青叶胆茎叶、根的总黄酮得率最低值分别为 4.07%、2.47%,茎叶的总黄酮提取率高于根。

青叶胆总黄酮提取液对金黄色葡萄糖球菌、枯草芽孢杆

菌、大肠杆菌都有一定抑制作用,以对金黄色葡萄糖球菌的抑制效果最强,其次是对枯草芽孢杆菌,对大肠杆菌的抑制效果最弱。这可能与革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌细胞壁结构组分不同有关,革兰氏阳性菌细胞壁化学成分主要是由肽聚糖和磷壁酸构成,结构简单;而革兰氏阴性菌细胞壁除含有少量肽聚糖外,还含有蛋白质、类脂质、脂多糖,因此一般阳性菌对理化因子的敏感性比阴性菌更强,从而受总黄酮抑制的作用更明显<sup>[10]</sup>。

祝海娟,赵晨霞,张翌楠,等. 酶法提取大麦虫蛋白质的研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):226-229.

# 酶法提取大麦虫蛋白质的研究

祝海娟<sup>1</sup>, 赵晨霞<sup>2</sup>, 张翌楠<sup>2</sup>, 刘沐阳<sup>2</sup>, 彭旭嗣<sup>2</sup>, 霍卫东<sup>2</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 843001; 2. 北京农业职业学院园艺系, 北京 102442)

**摘要:**为研究大麦虫蛋白质提取的最佳生产工艺,采用酶法从大麦虫蛹中提取大麦虫蛋白。根据碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶 5 种酶制剂对大麦虫蛋白提取率的影响,确定碱性蛋白酶为最佳酶制剂。通过单因素试验和正交试验,得到碱性蛋白酶提取大麦虫蛋白的最佳条件为加酶量(E/S)5%、pH 值 12、料液比 1 g:20 mL、提取温度 50 ℃、提取时间 2.5 h,在此条件下得到大麦虫蛋白的提取率为 86.96%,大麦虫蛋白含量 75.01%。该工艺合理,重复性好,可为大麦虫蛋白质提取工艺的确定提供试验依据。

**关键词:**酶法;大麦虫;蛹;蛋白质;提取率

**中图分类号:**TS201.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)09-0226-04

我国昆虫资源十分丰富,资源昆虫大麦虫别称麦片虫、麦谷虫或超级面包虫,它不仅是生理、遗传学的试验材料,而且是营养丰富的高蛋白质资源。据 Finke 报道,与家蝇、黄粉虫幼虫、蟋蟀、蚕蛹幼虫等比较,大麦虫的蛋白质及蛋氨酸的含量均居首位,是一种不可多得的蛋白源昆虫<sup>[1]</sup>。大麦虫的各虫态都含有较丰富的营养,其中大麦虫幼虫含蛋白质 51%,含脂肪 29%,并含有多种糖类、氨基酸、维生素、激素、酶及矿物质磷、铁、钾、钠、钙等。目前,越来越多的人选购大麦虫作为名贵观赏鱼、捕食性动物和两栖爬行类宠物的专用饵料<sup>[2]</sup>,而在食品、医药保健品及生物活性肽方面的开发利用还处于初始阶段。

蛋白质由于其特定的功能性质广泛用于食品领域<sup>[3]</sup>。近年来科学研究发现,人类摄取蛋白质后的消化产物更容易被人体吸收利用,而且具有各类生物活性,这些就是肽<sup>[4]</sup>。酶法提取蛋白质是利用蛋白酶对蛋白质的降解和修饰,使其

变成可溶肽而被抽提出来<sup>[5]</sup>。用酶提取蛋白质,反应条件温和<sup>[6-8]</sup>,副反应少,不破坏氨基酸,保证了蛋白质的质量,且不污染环境,对蛋白质有改性作用,蛋白质经酶水解有助于拓宽蛋白质的应用范围<sup>[9-10]</sup>。

大麦虫为节肢昆虫,甲壳质含量较高<sup>[11]</sup>,为了促进机体对其蛋白质的吸收及利用,并使消费者在心理上易于接受大麦虫制品,本试验采用酶法从大麦虫蛹中提取蛋白质,确定蛋白酶提取大麦虫蛋白的最佳工艺参数,以期为大麦虫蛋白质的开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 大麦虫蛹,由北京农业职业学院生物防治研究所资源昆虫研究室提供,在常规条件下饲养并适时取样。

1.1.2 试剂 中性蛋白酶:活力 $\geq 60\ 000$  U/g,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;碱性蛋白酶:活力 $\geq 100\ 000$  U/g,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;木瓜蛋白酶:活力 $\geq 0.5 \sim 2$  U/mg,生化试剂级,美国 AMRESCO 公司生产;胰蛋白酶:活力 $\geq 250$  NF/mg,生化试剂级,美国 AMRESCO 公司生产;胃蛋白酶:活力 $\geq 1\ 200$  U/g,生化试剂级,北京德诺奥生物技术有限责任公司分装;氢氧化钠、浓盐酸、36%浓硫酸、五水合硫酸铜、硫酸钾、甲基红、溴甲酚绿、95%乙醇等试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

药材,1991,14(7):15-17.

[6]杨永红,杨林福,范建,等. 青叶胆可持续利用策略研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2003(2):107-109.

[7]钟方丽,王慧竹,祝波. 青叶胆中总黄酮的提取工艺研究[J]. 吉林化工学院学报,2010,27(3):11-13.

[8]刘玉芬,夏海涛,杨树平. 紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮的含量[J]. 食品科学,2005,26(9):418-419.

[9]张益娜,翁琴. 沙棘叶总黄酮的抑菌性研究[J]. 农产品加工·学刊,2008(9):25-27.

[10]郑津辉,王威,黄辉. 苦参提取液中黄酮类化合物的抑菌作用[J]. 武汉大学学报:理学版,2008,54(4):439-442.

收稿日期:2013-02-15

基金项目:国家公益性行业科研专项(编号:200904025);北京市教育委员会科技发展计划(编号:KM200900005002);北京市农业科技项目(编号:20110115);北京市自然科学基金(编号:6122024)。

作者简介:祝海娟(1987—),女,江苏如皋人,硕士研究生,研究方向为昆虫蛋白。E-mail:119333909@qq.com。

通信作者:赵晨霞,硕士,教授,研究方向为果蔬贮藏与加工。E-mail:chenxi Zhao@sina.com。

## 参考文献:

[1]云南省药物研究所. 云南天然药物图鉴(第二卷)[M]. 昆明:云南科技出版社,2007.

[2]郭爱华,李军,付宏征,等. 青叶胆酮类化合物的成分研究[J]. 中草药,2003,34(2):107-109.

[3]李旭山,江志勇,王福生,等. 青叶胆化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(23):2790-2793.

[4]高丽. 青叶胆及民间习用品的鉴定[J]. 云南中医中药杂志,2006,27(4):65-66.

[5]宋万志. 龙胆科的资源植物——“青叶胆”和“藏茵陈”[J]. 中