

正交实验优选赤小豆萌芽工艺研究

任 晗 堃, 李 丽, 董 银 卯, 张 小 慧

(北京市植物资源重点实验室, 北京工商大学 食品学院, 北京 100048)

摘 要:以 9 个产地的赤小豆为试材, 以代表抗过敏活性的透明质酸酶抑制率为指标, 在产地筛选的基础上, 对光照、温度、水分 3 个因素通过 $L_9(3^3)$ 正交实验, 以期优化赤小豆萌芽工艺条件。结果表明: 在无光照、温度 30℃、浇灌次数 3 次/d 的萌芽条件下, 赤小豆提取物透明质酸酶抑制率为 $(90.67 \pm 4.82)\%$ 。该试验工艺设计合理、结果可靠, 为赤小豆萌芽抗敏功效研究提供了参考依据。

关键词:赤小豆; 萌芽工艺; 抗敏活性; 透明质酸酶抑制率; 正交实验

中图分类号:S 521 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0017-04

赤小豆(*Vigna umbellata*)为豆科豇豆属 1a 生直立草本植物赤小豆的种子。在全国各地应用广泛且有不同的别称, 如红豆、红小豆、猪肝赤等。原产亚洲热带地区, 朝鲜、日本、菲律宾及其他东南亚国家亦有栽培^[1], 目前我国主要在浙江、江西、湖南、广东、广西、吉林等省区(自治区)普遍栽培。赤小豆既是一种常用中药, 又是我国广泛食用的豆类, 其性味甘酸、平、无毒, 主要化学成分为糖类、三萜皂苷、多酚等, 具利尿除湿、和血排脓、消肿解毒等功效, 主治水肿、脚气、黄疸、泻痢、便血、痈肿等症^[2]。邱明义等^[3]研究表明, 麻黄连翘赤小豆汤具有保

护肥大细胞, 抑制组胺释放, 从而抗 I 型变态反应的作用。Cherng 等^[4]报道了赤小豆对人外周血单细胞(PB-MC)具有免疫调节活性。

透明质酸酶是过敏反应的参与者, 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^[5-6]。众多研究表明, 透明质酸酶体外抑制试验常作为测定抗过敏活性的方法。抗过敏活性以透明质酸酶抑制率为指标, 透明质酸酶抑制率越大则抗过敏活性越强。

我国是赤小豆的生产大国, 但对赤小豆的功能特性和开发加工缺乏完整系统的研究^[7]。因此, 该试验以抗敏活性为指标, 在赤小豆产地筛选的基础上, 研究了其优化萌芽工艺, 对赤小豆的药理活性研究和开发利用具有重要的意义。

第一作者简介:任晗堃(1989-), 男, 硕士, 研究方向为植物源化妆品功效添加剂的开发。E-mail: hankun89@163.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: ymdong2008@163.com.

收稿日期:2013-09-09

The Effects of Space Mutation Breeding on Variation of Field Characters of SP₁ Melon

WANG Yang-yang, HAN Yu, SHENG Yun-yan

(College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163000)

Abstract: Using the spacecraft carrying melon varieties of HM₁₋₃ and its control CM₁₋₃ as the materials, ten indexes of the different mutation strains of SP₁ generation after self pollination, including fruit shape index, rate of female flowers, VC content, hardness, acid contents and fruit weight, water content, sarcocarp thickness, sugar contents and leaf shape index were analyzed, the main purpose was to looking for the positive advantageous variation of mutation. The results showed that the leaf area, fruit weight, hardness, sarcocarp thickness, acid contents had significant variations, however VC content, sugar contents, water content and fruit shape index did not showed significance variance; compared with CM₁₋₃, twenty-one plants of HM₁₋₃ had moderate variation, and rate of female flowers, fruit shape index, leaf area and fruit weight of HM₁₋₃₋₄ had significance variance.

Key words: melon; spacecraft; fruit characters; analysis of variance

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为产自吉林、湖南、江西、安徽、云南、浙江、广西、广东、河北 9 个省的赤小豆样品。经北京市植物资源重点实验室董银卯教授鉴定为豆科植物赤小豆 (*Vigna umbellata* Ohwi et Ohashi) 的干燥成熟种子。

透明质酸酶 (Sigma 公司); 透明质酸钠 (Solarbio 公司, 分析纯); 甲醇、无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸、对 1-2 甲氨基苯甲醛、冰乙酸、乙酸钠结晶、无水氯化钙、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠, 均为北京化工厂生产, 国产分析纯; 乙酰丙酮 (国药集团化学试剂有限公司)。

MGC-250 光照培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司), 电子天平 (TB-2002 北京赛多利斯仪器系统有限公司), DL-101-1BS 电热鼓风干燥箱 (天津市中环实验电炉有限公司), FI-01620 酶标仪 (Thermo Science 公司), 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司), 粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司), HH · S1-M 恒温水浴锅 (北京长安科学仪器厂), 100~1 000 μL /1 000~5 000 μL 移液枪 (Eppend of Reference)。

1.2 试验方法

1.2.1 不同产地赤小豆萌芽提取物抗敏活性考察 以代表抗敏活性的透明质酸酶抑制率为抗敏活性考察标准, 对 9 个产地的赤小豆进行抗敏活性最佳产地的筛选。样品预处理: 挑选籽粒饱满、无虫蛀、无霉烂、无残破的赤小豆作为试验原料, 每 10 g 赤小豆种子为 1 个试验组; 清水冲洗赤小豆, 以 0.1% 的次氯酸钠溶液消毒; 赤小豆与去离子水比例为 1:3, 置于 26℃ 恒温培养箱中浸泡 30 h, 直至赤小豆壳破裂, 进行萌芽试验, 3 次重复。萌芽条件: 将待萌芽赤小豆种子置于 26℃ 恒温培养箱中无光照培养 4 d, 每 12 h 去离子水浇灌 1 次。供试品溶液制备: 从培养箱中取出萌芽 4 d 的豆芽, 放入干燥箱, 50℃ 干燥 24 h; 取出后粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 装入塑封袋, 4℃ 保存待用。精密称取赤小豆粉末 1.0 g, 分别加入 75% 甲醇 10 mL, 室温下超声提取 60 min, 功率为 100 W。离心后, 取上清液待透明质酸酶体外抑制试验用。

1.2.2 赤小豆萌芽工艺的正交实验设计 在产地筛选的基础上, 以透明质酸酶抑制率作为考察指标, 采用光照、温度、水分进行 $L_9(3^3)$ 3 因素 3 水平正交实验设计, 优化赤小豆抗敏活性的萌芽工艺条件, 正交实验因素与水平见表 1。

1.2.3 赤小豆萌芽提取物验证试验 根据正交实验优化的萌芽条件进行验证性试验。

1.3 项目测定

该试验透明质酸酶抑制率测定方法在 Lee 等^[8]的基础上, 稍作改动。

表 1 赤小豆萌芽工艺正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels in the orthogonal array design of

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|------------------|-----------------|--------------------------------|
| | A 光照 | B 温度 | C 水分 |
| | A Illumination/h | B Temperature/℃ | C Moisture/次 · d ⁻¹ |
| 1 | 24 | 30 | 24 |
| 2 | 12 | 25 | 6 |
| 3 | 0 | 20 | 3 |

1.3.1 溶液配制 醋酸缓冲溶液 (pH 5.6): 量取 1 155 μL 冰乙酸稀释至 100 mL 混匀后取其中 4.8 mL 为 A 溶液, 称取 2.72 g 乙酸钠结晶加水溶解并定容至 100 mL 混匀后取其中 45.2 mL 为 B 溶液, 混合 A、B 溶液, 以水定容至 100 mL。精密测定其 pH 值, 用溶液 A 或 B 调至 5.6 即可。埃尔利希试剂 (Ehrlich reagent): 称取 2.4 g 对-2 甲氨基苯甲醛溶于 45 mL 浓盐酸和 45 mL 无水乙醇中, 可保存 2 个月。乙酰丙酮溶液: 取乙酰丙酮 3.5 mL 溶于 50 mL 1.0 mol/L 的碳酸钠溶液中, 此溶液在用前 10 min 配制^[9]。

1.3.2 操作步骤 取 0.1 mL 0.25 mmol/L CaCl_2 溶液和 0.5 mL 透明质酸酶液 37℃ 保温培养 20 min; 加入样品液 0.5 mL, 继续 37℃ 保温培养 20 min; 加入 0.5 mL 透明质酸钠液 37℃ 保温 30 min, 常温放置 5 min; 加入 0.1 mL 0.4 mol/L NaOH 溶液和 0.5 mL 乙酰丙酮溶液, 置沸水浴中加热 15 min 后立即用冰水冷却 5 min; 加入埃尔利希试剂 1.0 mL 并用 3.0 mL 无水乙醇进行稀释, 放置 20 min 显色, 用酶标仪在 555 nm 波长下测定其吸光度。

1.3.3 透明质酸抑制酶抑制率计算 透明质酸酶抑制率 (100%) = $\frac{(A-B)-(C-D)}{A-D} \times 100\%$, 式中: A 为对照

溶液吸光度 (用醋酸缓冲液代替样品溶液), B 为对照空白溶液吸光度 (用醋酸缓冲液代替样品溶液及酶液), C 为试样溶液吸光度值, D 为试样空白溶液吸光度 (用醋酸缓冲溶液代替酶液)。

1.4 数据分析

该试验采用了正交实验设计方法, 数据分析采用 SPSS 17.0 软件, 标准差数据分析采用 Microsoft Excel 2007 完成。

2 结果与分析

2.1 9 种产地赤小豆透明质酸酶抑制率筛选

由图 1 可以看出, 各产地赤小豆萌芽提取物均具有一定的抗敏活性, 这与《伤寒论》记载和现代药理研究结果^[10-12]相吻合。9 种产地赤小豆萌芽抗敏效果分别为: 吉林 (抑制率 85.76%) > 湖南 (抑制率 82.89%) > 江西 (抑制率 66.51%) > 安徽 (抑制率 62.98%) > 云南 (60.07%) > 浙江 (抑制率 53.37%) > 广西 (抑制率

31.49%)>广东(抑制率 28.45%)>河北(抑制率 27.55%),其 1%甘草酸二钾(1%GD)为阳性对照。该试

验中,吉林产赤小豆萌芽提取物的抗敏活性相对较高,其透明质酸酶抑制率较高。

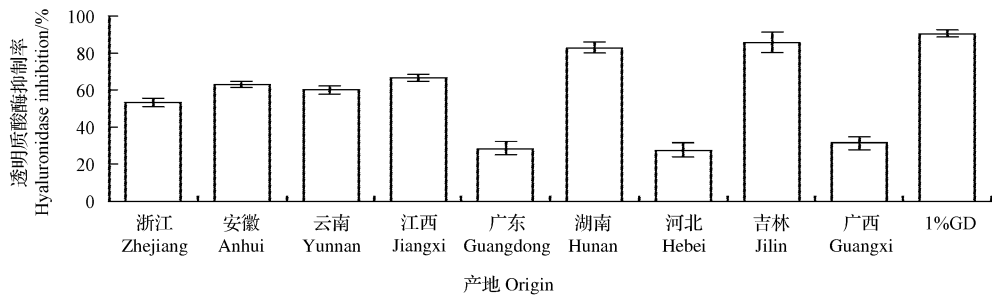


图 1 9 个产地赤小豆萌芽提取物透明质酸酶抑制率

Fig. 1 Hyaluronidase inhibition rate of *Vigna umbellata* sprout extracts from 9 origin

2.2 赤小豆萌芽工艺优化

由表 2 可以看出,不同条件下赤小豆萌芽的透明质酸酶抑制率差异较大,由直观分析可知,因素主次关系顺序是 A(光照)>C(水分)>B(温度),综合考虑各因素对赤小豆萌芽抗敏功效的影响,确定萌芽最佳萌芽工艺为 A3B1C3,即光照 0 h,温度 30℃,浇灌次数 3 次/d。

表 2 赤小豆萌芽工艺 L₉(3³)正交实验结果

Table 2 Results of germination process of *Vigna umbellata* by orthogonal test

| 因素 Factor | A 光照 Illumination /h | B 温度 Temperature /℃ | C 水分 Water /次·d ⁻¹ | 透明质酸酶抑制率 Hyaluronidase inhibition/% |
|-----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| 试验 1 Test 1 | 24 | 30 | 24 | 46.51 |
| 试验 2 Test 2 | 24 | 25 | 6 | 35.87 |
| 试验 3 Test 3 | 24 | 20 | 3 | 17.90 |
| 试验 4 Test 4 | 12 | 30 | 6 | 35.71 |
| 试验 5 Test 5 | 12 | 25 | 3 | 84.14 |
| 试验 6 Test 6 | 12 | 20 | 24 | 47.67 |
| 试验 7 Test 7 | 0 | 30 | 3 | 75.93 |
| 试验 8 Test 8 | 0 | 25 | 24 | 31.06 |
| 试验 9 Test 9 | 0 | 20 | 6 | 83.71 |
| 均值 1 Mean 1 | 33.427 | 52.717 * | 41.747 | |
| 均值 2 Mean 2 | 55.840 | 50.357 | 51.763 | |
| 均值 3 Mean 3 | 63.567 * | 49.760 | 59.323 * | |
| 极差 Range | 30.140 | 2.957 | 17.576 | |
| 最优水平 Optimal level | A3(0 h) | B1(30℃) | C3(3 次/d) | |
| 影响主次 Influence | A 光照>C 水分>B 温度 | | | |

注: * 为最佳水平。

由图 2 可以看出,在无光照时,赤小豆萌芽的抗敏活性较高,在全光照条件下,抗敏活性被显著抑制。光照是一种重要的物理因素,能够影响初级和次级代谢产物的生成^[13]。借助于光形态发生学说^[14],在全光照条件下,光合作用不断增强,初级代谢旺盛,植株所吸收的养分主要用于供给叶片的生长发育,而用于合成次级代谢的底物的积累相对较少,即此阶段初级代谢占明显优势,如多酚、皂苷等具有抗敏活性的次级代谢产物合成少于避光条件,从而导致了抗敏活性的下降^[15]。

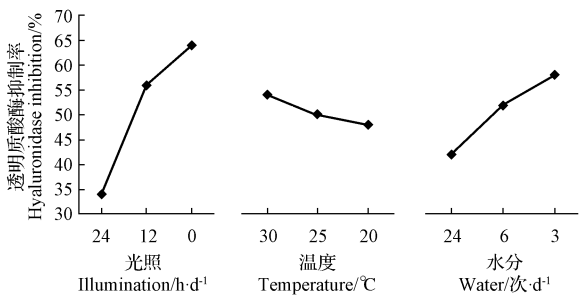


图 2 赤小豆萌芽工艺极差分析

Fig. 2 Range analysis for hyaluronidase inhibition rate in *Vigna umbellata* sprouts

温度对赤小豆萌芽抗敏活性影响不大,30℃条件下抗敏活性相对较高,可能是因为赤小豆体内与抗敏活性相关酶类的活性在此温度下最高。

水分以每天浇灌 3 次为宜,过多的浇灌可能导致赤小豆萌芽中如多糖在内的抗敏活性物质经水提作用流失,亦容易导致烂根等不利于植物正常生长的情况发生,大量试验表明,适当的干旱胁迫可刺激植物产生防御反应,激发次级代谢产物的合成,在植物防御反应过程中,激活了苯丙氨酸解氨酶(PAL),PAL 是苯丙烷类代谢途径中的关键酶,促进了酚类物质、黄酮类等重要植物次生代谢物质的合成,从而提高了赤小豆萌芽的抗敏活性^[16]。

正交实验的方差分析显示,因素 A 达到极显著水平($P<0.01$),因素 C 达到显著水平($P<0.05$),表明 A(光照)、C(水分)为主要影响因素,与极差分析结果一致。

表 3 赤小豆萌芽工艺方差分析

Table 3 Analysis of variance of *Vigna umbellata*

| 方差来源 Variance | 偏差平方和 DEVSQ | 自由度 DOF | F 比 F ratio | 显著性 Significance |
|------------------|----------------|------------|----------------|---------------------|
| A | 1 470.478 | 2 | 100.285 | ** |
| B | 14.667 | 2 | 1.000 | |
| C | 466.426 | 2 | 31.801 | * |
| 误差 Error | 14.67 | 2 | | |

注: ** 表示在 $P<0.01$ 水平上显著, * 表示在 $P<0.05$ 水平上显著。

2.3 验证试验

根据上述方差分析结果中确定的萌芽条件 A3B1C3,即光照 0 h,温度 30℃,浇灌次数 3 次/d 进行验证性试验。经体外透明质酸酶抑制试验检测,赤小豆萌芽提取物抑制率为 $(90.67 \pm 4.82)\%$ 。

3 结论与讨论

赤小豆 9 种产地筛选结果表明,全国不同产地赤小豆萌芽提取物抗敏活性存在一定差异,其原因可能与赤小豆所处的自然环境以及种植方式等不同有关^[17-18]。该试验以萌芽提取物抗敏活性为参考依据,对全国 9 个有代表性赤小豆产区进行筛选,最终确定吉林为赤小豆萌芽最佳抗敏活性产地,为今后赤小豆萌芽抗敏活性研究的原料选择提供了参考依据,也是对赤小豆地域分布与生物活性关系研究的初步探索。

正交实验结果表明,综合考虑赤小豆萌芽时所需光照、温度、水分对萌芽提取物抗敏活性影响的主次关系是光照>水分>温度,最佳萌芽工艺为光照 0 h,温度 30℃,浇灌次数 3 次/d。由试验结果可以看出,不同萌芽工艺下提取物的抗敏活性可相差 72.77%。该试验以萌芽提取物抗敏活性作为筛选标准,对萌芽工艺进行优化,试验方法可靠,测定结果较能反映客观实际,为今后赤小豆萌芽抗敏活性研究提供了参考依据。

该试验只考察了赤小豆萌芽第 4 天的抗敏活性,而随着萌芽过程的进行,赤小豆萌芽抗敏活性是否会产生变化,还有待开展进一步研究,即以初始萌发到萎蔫为一个周期,考察赤小豆萌芽抗敏活性的变化规律,同时确定周期中最佳抗敏功效萌芽天数,这将对赤小豆作为抗敏、舒敏产品原料在食品、化妆品领域的应用提供坚实的理论基础。同时,下一步工作将围绕考察赤小豆萌芽过程中抗敏活性物质的种类及含量变化规律进行研究,为赤小豆萌芽抗敏功效机理及抗敏活性物质代谢途径的研究提供科学依据。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 66 卷. 北京:

科学出版社,1977;336-338.

[2] 肖培根. 新编中药志(二)[M]. 北京:化学工业出版社,2001;248.

[3] 邱明义,李小慧,石拓,等. 麻黄连翘赤小豆汤血清对肥大细胞脱颗粒、组胺生成的影响[J]. 中药药理与临床,2003,19(5):3-4.

[4] Chheng J M, Chiang W, Chiang L C. Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2):613-618.

[5] 金云隆. 中药抗过敏实验刍议[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(1):220-220.

[6] 刘学仁,邓佑芳,吕亚新. 天然化合物抗过敏作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(1):123-127.

[7] 张波,薛文通. 红小豆功能特性研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(9):264-266.

[8] Lee K K, Choi J D. The effects of *Areca catechu* L extract on anti-aging [J]. International Journal of Cosmetic Science, 1999, 21(4):285-295.

[9] 李杨,董银卯,孟宏,等. 7 种中草药提取物抗过敏功效及刺激性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):191-194.

[10] Kale M, Misar A V, Dave V, et al. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 112(2):300-304.

[11] 陈建,刘敏,王梅,等. 麻黄连翘赤小豆汤拆方抗过敏反应作用研究[J]. 吉林中医药, 2007, 27(11):55-56.

[12] 颜兵,刘龙,岳小强,等. 浅析仲景对赤小豆的配伍运用[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 27(5):7-9.

[13] Yu K W, Murthy H N, Hahn E J, et al. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality[J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 23(1):53-56.

[14] Kendrick R E, Kronenberg G H M. Photomorphogenesis in Plants[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993.

[15] 汪海峰,鞠兴荣,何广斌,等. 不同海拔高度和生长季节对银杏叶中黄酮苷含量的影响[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(4):47-50.

[16] Kandan A, Commare R R, Nandakumar R, et al. Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against tomato spotted wilt virus in tomato[J]. Folia Microbiologica, 2002, 47(2):121-129.

[17] Tomooka N, Vaughan D, Xu R Q, et al. Japanese native *Vigna* genetic resources[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2001, 35(1):1-10.

[18] Isemura T, Tomooka N, Kaga A, et al. Comparison of the pattern of crop domestication between two asian beans, Azuki Bean (*Vigna angularis*) and Rice Bean (*V. umbellata*) [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2011, 45(1):23-30.

Study on Optimization Technology of *Vigna umbellata* Germination by Orthogonal Test

REN Han-kun, LI Li, DONG Yin-mao, ZHANG Xiao-hui

(College of Food Science, Beijing Technology and Business University, Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048)

Abstract: Taking 9 origin of *Vigna umbellata* as materials, hyaluronidase inhibition rate that represent anti-allergic effect, based on screening of origin, the factors of sunlight, temperature and moisture were investigated by $L_9(3^3)$ orthogonal test, in order to optimize the technology for *Vigna umbellata* sprouts. The results showed that, under the conditions for *Vigna umbellata* germination for at 30℃ with no illumination and irrigation 3 times/day, hyaluronidase inhibition rate reached $(90.67 \pm 4.82)\%$. The experiment method was reasonable and stable, could be provide reference for anti-allergic activity extracted from *Vigna umbellata* sprouts.

Key words: *Vigna umbellata* sprouts; germination process; anti-allergic activity; hyaluronidase; orthogonal array design