

王记莲. 超声强化提取红菊苣总黄酮及其抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 251–253.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.082

超声强化提取红菊苣总黄酮及其抑菌活性

王记莲

(盐城工业职业技术学院轻化工程系, 江苏盐城 224005)

摘要:以乙醇溶液浸提, 结合超声波辅助方法, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验研究红菊苣总黄酮的最佳提取工艺, 并采用纸片琼脂扩散法考察红菊苣提取物对几种微生物的抑制作用。结果表明, 总黄酮最佳提取工艺条件为: 料液比 1 g : 20 mL, 超声功率 200 W, 提取温度 70 ℃, 乙醇浓度 50%; 抑菌试验结果表明, 总黄酮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、青霉菌、白假丝酵母菌均有一定的抑制作用。可见, 红菊苣含有丰富的总黄酮, 具有体外抑菌活性。

关键词:红菊苣; 总黄酮; 提取工艺; 超声波辅助提取; 抗菌活性

中图分类号:S636.901; R284.1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2015)03-0251-02

红菊苣来源于菊科菊苣属中的多年生草本植物菊苣, 是维吾尔族和蒙古族习用药材, 用于治疗湿热黄疸、胃痛食少、水肿尿少, 国外常用菊苣作为食品添加剂、营养饲料、果糖原料和咖啡替代品, 20 世纪 80 年代引入我国后, 菊苣由于品质优良、饲用价值高, 现已成为最有前途的饲料和经济作物之一^[1]。现代研究表明, 菊苣中含有三萜、倍半萜、香豆素、糖类等多种成分, 具有保肝、降脂、促进消化等多种作用。总黄酮是在植物体内广泛存在的一类天然产物, 其生物活性多种多样, 如对心血管系统的作用、抗肝脏病毒、抗炎、提高机体免疫力、雌激素样作用、抗菌、抗病毒以及抗氧化作用等, 在食品和医药领域应用广泛^[2-3]。超声辅助提取是一种操作简单、效率比较高的技术^[4], 超声空化可对细胞壁产生机械的修剪力, 使细胞壁破裂, 同时超声可促进溶剂和活性成分的双向转移^[5]。超声波用于辅助从植物中提取活性物质, 可减少溶剂用量和提取时间, 降低提取温度, 有利于热敏感物质和不稳定物质的提取。本研究采用超声波强化提取红菊苣中的总黄酮, 并通过正交试验确定超声波辅助提取红菊苣中总黄酮的最佳工艺条件, 对红菊苣提取产物进行体外抑菌试验, 以期为该资源的利用和开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红菊苣采自江苏省海洋生物产业园。供试微生物菌株包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、青霉菌 (*Penicillium notatum*)、白假丝酵母菌 (*Candida spp.*), 均购于中国微生物保藏中心。

主要试剂包括芸香苷对照品, 购于国药集团; 试验用水为蒸馏水; 试验所用试剂均为分析纯。

主要仪器有 LC-5500 型高效液相色谱仪, 购于北京东西分析仪器有限公司; FW100 型高速万能粉碎机, 购于天津

市泰斯特仪器有限公司; HZT-A+X 型精密天平, 购于上海鼎拓实业有限公司; 超声仪, 购于江苏省昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为水与甲醇 (其体积比为 30 : 70), 流速为 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长 360 nm, 柱温 25 ℃, 理论塔板数按芸香苷峰计算应不低于 3 000 个。

1.2.2 芸香苷标准曲线的绘制 准确称取芸香苷 10.5 mg, 在 120 ℃ 下烘至恒质量, 用 70% 色谱级甲醇溶液溶解稀释至 50 mL, 分别量取 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用 70% 色谱级甲醇溶液稀释至 10 mL, 摇匀, 得到不同浓度梯度的标准溶液, 将各标准溶液在“1.2.1”节中所述的检测条件下测定色谱峰面积。根据标准溶液浓度和对应测得的峰面积, 制作出总黄酮含量对比基淮。

1.2.3 红菊苣总黄酮的提取及其含量的测定 采集海洋生物园的红菊苣茎、叶, 晾干, 粉碎, 80 ℃ 下干燥 2 h, 按一定固液比加入不同浓度乙醇提取溶剂, 选取不同超声提取温度和提取时间, 放入超声波仪中进行提取 (提取时加回流装置, 以防溶剂损失), 趁热抽滤, 收集提取液, 加入与乙醇提取液体积比为 1 : 1 的石油醚, 萃取 3~4 次, 脱去脂溶性杂质, 将乙醇溶液层转入大孔吸附性树脂柱, 原液与树脂量的比为 1 : 2, 依次用水、80% 乙醇洗脱至溶液由浅黄色变为无色, 收集乙醇溶液洗脱液, 将洗脱液于 50 ℃ 条件下碱液浓缩, 得到红菊苣总黄酮浸膏。取所得浸膏, 用 70% 色谱级甲醇溶液稀释成 100 mL, 摇匀, 配制成待测溶液。

将所得待测溶液在“1.2.1”节中所述的检测条件下测得待测溶液的峰面积值, 由标准曲线查得该待测溶液浓度, 即为待测液总黄酮含量, 根据稀释倍数换算出红菊苣中的总黄酮含量。

1.2.4 红菊苣总黄酮提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交法试验设计 在单因素试验的基础上, 根据正交试验设计原理, 选出对红菊苣总黄酮含量影响较大的 4 个主要试验因素, 考察红菊苣总黄酮含量。根据 $L_9(3^4)$ 正交设计方案进行试验, 确定红菊苣总黄酮的最佳提取工艺条件。

收稿日期: 2014-04-25

基金项目: 江苏省“333 工程”项目 (编号: BRA2012099)。

作者简介: 王记莲 (1979—), 女, 河南高永人, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物的开发与利用研究。E-mail: lianziv@163.com。

1.2.5 抑菌试验

1.2.5.1 红菊苣总黄酮抑菌活性的测定^[6-7] 将灭菌后的专用药敏纸片浸于 50 mL 浸提液中浸泡 24 h,使其充分吸收提取液,以灭菌水为空白对照,采用纸片琼脂扩散法测定抑菌圈直径,以反映供试品的抑菌能力。取 0.1 mL 液体培养基以活化培养好的供试菌,用无菌玻璃刮棒均匀涂布于相应的琼脂培养平板上,用无菌镊子将含有提取液的纸片贴于含菌琼脂平板表面,纸片应贴得均匀,各纸片中心距离不小于 24 mm,纸片至平板内边缘距离大于 15 mm。在放好滤纸片的含菌培养皿中恒温培养,其中细菌于 37 ℃ 培养 24 h,真菌于 28 ℃ 培养 48 h,用游标卡尺测定抑菌圈直径。

1.2.5.2 最低抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 的测定^[8] 用无菌水将红菊苣总黄酮提取液稀释,终浓度分别为 0.256、0.128、0.064、0.032、0.016 mg/mL。取 2 mL 提取稀释液至 15 mL 培养基中,混匀,倒入平板,凝固后加入 100 μL 的 100 万~1 000 万 CFU/mL 菌液,涂布均匀,放于相对湿度 37%、温度 28 ℃ 的条件下培养 24 h 后观察结果,菌落被完全抑制的最高稀释度提取物浓度即 MIC;培养 48 h 后,菌落被完全抑制的最高稀释度提取物浓度为 MBC。

2 结果与分析

2.1 芸香苷标准曲线

按照“1.2.1”节的方法绘制得到芸香苷标准曲线,由标准曲线可以得到总黄酮浓度与吸光度的回归方程: $y = 18\,893x + 38\,546$, $r = 0.997\,2$,可见在 0~150 mg/L 范围内总黄酮浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.2 红菊苣总黄酮提取工艺优化结果

在单因素试验基础上,根据正交试验设计原理,以料液比、超声功率、提取温度、乙醇浓度 4 个因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1),对总黄酮提取工艺进行优化。

表 1 红菊苣总黄酮提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

水平	A:料液比 (g : mL)	B:超声功率 (W)	C:提取温度 (℃)	D:乙醇浓度 (%)
1	1 : 15	150	60	50
2	1 : 20	200	70	55
3	1 : 25	250	80	60

由表 2 可知,4 个因素对红菊苣总黄酮提取率的影响从大到小依次为料液比>乙醇浓度>提取温度>超声功率。极差分析结果表明,超声波提取红菊苣总黄酮的最佳提取工艺为 $A_2B_2C_2D_1$,即料液比 1 g : 20 mL、超声功率 200 W、提取温度 70 ℃、乙醇浓度 50%。在此条件下,总黄酮含量为 21.042 mg/g,高于正交试验的最高值,说明最佳提取工艺条

表 2 红菊苣总黄酮提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验编号	A	B	C	D	总黄酮含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	19.235
2	1	2	2	2	19.543
3	1	3	3	3	18.908
4	2	1	2	3	20.381
5	2	2	3	1	21.032
6	2	3	1	2	19.798
7	3	1	3	2	20.054
8	3	2	1	3	19.653
9	3	3	2	1	20.156
k_1	19.229	19.890	19.562	20.141	
k_2	20.404	20.076	20.027	19.798	
k_3	19.954	19.621	19.998	19.647	
R	1.175	0.455	0.465	0.494	

件是可信的。

2.3 红菊苣总黄酮的抑菌试验结果

2.3.1 红菊苣总黄酮的抑菌活性测定结果 使用优化得到的方法提取红菊苣中的总黄酮,得到的浸提液经减压蒸发去除乙醇。采用纸片琼脂扩散法考察红菊苣总黄酮对几种模式微生物(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母、青霉菌)的抑制特性,抑菌试验结果见表 3。试验结果表明,红菊苣总黄酮对青霉菌的抑菌效果最差,对白假丝酵母有一定的抑制作用,对潜在致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有很强的抑制作用,为红菊苣药物的抗菌临床应用提供了有力的证据并且有助于红菊苣的进一步药用开发。

表 3 红菊苣总黄酮提取液的抑菌效果

供试菌种	抑菌圈直径 (mm)	
	红菊苣提取液	水
大肠杆菌	15.5	—
金黄色葡萄球菌	14.3	—
青霉菌	6.1	—
白假丝酵母	8.6	—

2.3.2 最低抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定 总黄酮具有广谱抗菌作用,能够抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的生长。红菊苣黄酮对几种模式微生物(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母、青霉菌)的最低抑菌浓度和最小抑菌的试验结果见表 4。由表 4 可以看出,红菊苣总黄酮对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白假丝酵母、青霉菌的最低抑菌浓度分别为 0.128、0.064、0.032、0.064 mg/mL,最小杀菌浓度为 0.128、0.064、0.064、0.128 mg/mL。

表 4 红菊苣总黄酮最低抑菌浓度和最小杀菌浓度

试验编号	总黄酮浓度 (mg/mL)	大肠杆菌		金黄色葡萄球菌		青霉菌		白假丝酵母	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	0.256	—	—	—	—	—	—	—	—
2	0.128	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0.064	+	+	—	—	—	—	—	+
4	0.032	+	+	+	+	—	+	+	+
5	0.016	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示发生菌体生长,“—”表示未发生菌体生长。

李 东,左 勇,祁 峰,等. 桑椹果酒稳定性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):253-255.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.083

桑椹果酒稳定性研究

李 东,左 勇,祁 峰,王小龙,江 鹏

(四川理工学院生物工程学院,四川自贡 643000)

摘要:从桑椹果酒的生物稳定性与非生物稳定性出发,对桑椹果酒易出现的氧化破败、铁破败、铜破败、生物不稳定性、色素不稳定性进行研究。结果表明:SO₂ 添加量控制在 40 mg/L 时并加以冷冻处理,可以增强桑椹果酒的稳定性。

关键词:桑椹;果酒;稳定性;氧化破败;铁破败;铜破败;二氧化硫;冷冻

中图分类号:TS262.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0253-03

桑椹是桑科桑属植物桑树的近成熟聚花果,不仅含有很高的糖,还含有丰富的有机酸、蛋白质、胡萝卜素、维生素 C 等营养元素和人体必需的铁、锌、锰、钙等矿质元素和微量元素^[1-4]。中医认为,桑椹味甘性寒,归心、肝、肾经,具有生津止渴、滋阴补血、润肠通便等功效,已被我国卫生部列入“既是食品又是药品”的名单^[5-6]。将桑椹酿制成果酒后,各种营养元素与微量元素即溶解于果酒之中,如果长期饮用可吸收到对人体有利的物质,具有保健功能。桑椹果酒具有各种香味成分,可形成独特的风格特征。桑椹酒也是一种新兴的果酒,是水果酒中的极品,具有滋补、养生及补血之功效,有极高的营养价值和保健功效,有“万寿之酒”美称^[7-8]。

提高果酒稳定性可以避免病害破败的发生,保持果酒颜

色稳定与澄清度。稳定性受破坏的果酒会出现以下几种变化:酒体颜色变褐色或酒色被破坏;酒发生雾浊或浑浊;出现沉淀;味觉及气味变化^[9]。果酒稳定性受多方面影响,主要是由生物稳定性与非生物稳定性所决定,生物稳定性主要包括果酒中所含微生物与蛋白质等有机成分的影响,非生物稳定性主要包括氧破败、铁破败、铜破败等的影响。本研究对桑椹果酒进行加速老化,监测桑椹果酒酒体变化情况,分析引起果酒不稳定的主要原因,并研究保质方法,旨在为提高果酒稳定性提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试桑椹果酒由笔者所在实验室酿制。

1.2 主要试剂

亚硫酸氢钠、硫酸溶液(1+3)、碘、10 g/L 淀粉指示液、100 g/L 磺基水杨酸溶液、氨水(1+1.5)、铁、四氯化碳、乙二胺四乙酸二钠柠檬酸铵溶液、铜、硝酸、酚酞、盐酸、碘化钾、氯化钠、硼酸钠等。

1.3 仪器与设备

UV2400 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪

收稿日期:2014-05-13

基金项目:四川省教育厅成果培育项目(编号:11ZZ016);酿酒生物技术与应用四川省重点实验室项目(编号:NJ2012-10);四川理工学院研究生创新基金(编号:y2012020)。

作者简介:李 东(1982—),男,四川德阳人,博士,讲师,主要从事食品科学研究。

通信作者:左 勇,教授,主要从事发酵工程研究。E-mail:sgzuoyong@tom.com。

3 结论

本研究采用超声波辅助提取法,以红菊苣总黄酮含量为考察指标,在单因素试验的基础上,采用正交试验法确定超声波辅助提取红菊苣总黄酮的最佳工艺提取条件为:料液比 1 g:20 mL,超声功率 200 W,提取温度 70 ℃,乙醇浓度 50%。在此条件下,总黄酮含量为 21.042 mg/g。对红菊苣总黄酮提取液的抑菌效果试验结果表明,红菊苣总黄酮具有较强的抗菌作用,对革兰氏阴性和阳性细菌具有抑制作用,为红菊苣总黄酮的开发和利用提供参考。

参考文献:

- [1]王碧珠,王文锋. 菊苣——饲料兼经济作物[J]. 中国种业,2002(6):38-39.
- [2]曹伟国,刘志勤,邵 云,等. 黄酮类化合物药理作用研究进展

- [J]. 西北植物学报,2003,23(12):2241-2247.
- [3]刘晓庆,张大勇,徐照龙,等. Cd 胁迫对大豆幼苗异黄酮合成关键酶基因表达的影响[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):974-978.
- [4]Wang J,Sun B G,Cao Y P,et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran[J]. Food Chemistry,2007,106(2):804-810.
- [5]Romdhane M,Gourdon C. Investigation in solid-liquid extraction:influence of ultrasound[J]. Chemical Engineering Journal,2002,87(1):11-19.
- [6]慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1994.
- [7]徐雅梅,呼天明,张存莉,等. 菊苣根提取物的抑菌活性研究[J]. 西北植物学报,2006,26(3):615-619.
- [8]曾超珍,刘志祥,韩 磊. 黄芩总黄酮提取技术及其抑菌活性研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1342-1343.