

郑萍,余芳,蒋彩云,等.迷迭香中抗氧化活性物质的提取及其抑菌功效[J].江苏农业科学,2016,44(8):370-373.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.107

迷迭香中抗氧化活性物质的提取及其抑菌功效

郑萍,余芳,蒋彩云,李婷

(江苏经贸职业技术学院/江苏省食品安全工程技术研发中心,江苏南京 211168)

摘要:采用超声提取法对迷迭香中的抗氧化活性物质进行了提取,并研究了该提取液的抑菌效果。通过单因素试验和正交试验,确定了提取的最佳工艺条件:提取溶剂为50%乙醇,料液比1 g:22 mL,时间1.0 h,温度40℃。此外,抑菌试验表明迷迭香提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌皆有良好的抑菌效果,其抑菌圈的平均大小分别为19.6、20.9 mm,最低抑菌浓度分别为0.782、0.391 mg/mL。

关键词:迷迭香;抗氧化;抑菌圈;最低抑菌浓度

中图分类号: R151.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0370-03

迷迭香是一种新型资源植物,所需生长条件特殊,在我国较少见,属于稀有植物。因其全身都是宝的特点,被研究和应用的也较为广泛,迷迭香不仅具有抗氧化成分,还具有抑菌功效^[1-3]。迷迭香已作为解热、镇痛、消炎的药物投放市场,同时也可以作为开发抗血栓的新药。迷迭香活性物已被广泛提取,但提取方法仍须进一步完善,以提高其应用价值^[4-5]。本研究采用超声提取法对迷迭香中的抗氧化活性物质进行了提取,同时对该提取物的天然抑菌功效进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

超声波清洗器(FA2104N)、万能高速粉碎机(FW100)、紫外分光光度计(UV-6300)、旋转蒸发仪(PE3000)、电热恒温培养箱(HG 303-4)。

1.2 试剂与材料

迷迭香、无水乙醇、1,3-丁二醇、1,3-丙二醇、正丁醇、丙三醇(甘油)、甲醇、石油醚、异丙醇、1,1-二苯基苦基苯酚(DPPH)、1,3-丁二醇,皆为分析纯,试验用水为纯净水。金黄色葡萄球菌、大肠杆菌。

培养基(牛肉营养琼脂培养基):蛋白胨10 g,牛肉膏5 g,酵母浸粉2 g,氯化钠5 g,琼脂20 g,水100 mL,调pH值至7.2~7.6。

菌种培养与纯化:将供试菌种分别挑于无菌的培养基上,倒置于37℃恒温培养箱中培养72 h,从中挑选单个菌落进行试管斜面培养,备用。取活化的斜面菌种分别用接种环挑取菌苔,用无菌水制成含菌数为10⁶ CFU/mL的菌悬液待用。

提取液的制备:将提取液进行旋转蒸发,再用1,3-丁二

醇溶解制备浓度为0.5 g/mL的迷迭香提取原液,经高压灭菌后备用。

滤纸片的制备:取直径为6 mm的圆形高压灭菌滤纸片若干,分别浸入迷迭香原液中,浸泡使其充分吸收,再烘干至干燥备用。

1.3 DPPH·法评价迷迭香提取液的抗氧化性

将提取液稀释500倍后进行以下操作:取3支比色管,精确量取提取溶剂2 mL和2 mL LDPPH·溶液到1号比色管,即为空样溶液;精确量取2 mL提取液和2 mL DPPH·溶液到2号比色管,即为反应溶液;精确量取2 mL提取液和2 mL无水乙醇溶剂到3号比色管,即为空白溶液。分别将振荡摇匀后的上述溶液置于暗处避光反应30 min后,于517 nm波长处测定吸光度(*D*)分别得到*D*_{空样液}、*D*_{反应液}、*D*_{空白液},按公式(1)进行计算。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [1 - (D_{\text{反应液}} - D_{\text{空白}}) / D_{\text{空样液}}] \times 100\% \quad (1)$$

1.4 迷迭香中活性成分的提取

将烘干至恒质量的迷迭香样品用粉碎机粉碎后,称取一定量的迷迭香粉分别放入相应的提取剂中,在不同的条件下进行提取,得到含迷迭香活性成分的提取溶液。

1.5 抑菌试验

1.5.1 抑菌活性 取0.1 mL的菌悬液,均匀涂抹在平板培养基表面,制成含菌平板。用无菌镊子小心取出干燥的滤纸片于各含菌平皿上,每皿5片(求其平均值),同时做无菌生理盐水、无菌平皿、无菌空白滤纸、50%乙醇、1,3-丁二醇、纯水和培养基对照试验。平行3次,然后将各平皿置于37℃的恒温培养箱内培养24 h,取出后测其抑菌圈直径大小并比较抑菌活性。

1.5.2 抑菌浓度 固体平板培养基稀释法^[6]:取无菌试管10支,分别加入1 mL无菌蒸馏水,取迷迭香提取物原液1.0 mL移入1号试管,混匀后,取出1.0 mL混合液移入2号试管,依次操作。从9号管取出1.0 mL弃去。迷迭香提取物原液按1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256、1/512的比例进行稀释。使1~8号管中均含有1 mL不同稀释度的提取液,9号管为无提取物对照。然后在每支试管中加入融

收稿日期:2015-07-15

基金项目:江苏省高校青蓝工程资助项目;江苏经贸职业技术学院重点项目(编号:JSJM15030);江苏经贸职业技术学院重大项目(编号:JSJM15005)。

作者简介:郑萍(1963—),女,江苏南通人,硕士,高级实验师,主要从事食品安全与营养方面的研究。E-mail:zp66878@sina.com。

通信作者:余芳,博士,教授,主要从事食品安全与营养方面的研究。E-mail:yufang6736@163.com。

化至 55 ℃ 的固体琼脂培养基 (9 mL) 充分混匀, 倾注平板 (10 mL/平皿), 形成 12.5、6.25、3.15、1.563、0.782、0.391、0.195、0.098、0 mg/mL 含迷迭香原液的普通培养基, 平板凝固后, 分别取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的菌悬液 (浓度均为 10^6 CFU/mL) 0.1 mL 涂布于平板表面, 同时做 50% 乙醇、1,3-丁二醇、蒸馏水及培养基的空白试验, 置于 37 ℃ 培养 18~24 h, 平行 3 次, 观察结果。

2 结果与分析

本试验采用二苯基苦基苯肼 (简称 DPPH) 分光光度法评价迷迭香提取物的抗氧化活性, 该方法是评价自由基清除效果和挑选天然抗氧化剂最常用的方法^[7]。通过比较紫外可见分光光度计检测 DPPH· 与提取液反应后的吸光度的变化, 从而建立了评价提取液的清除率体系, 在该评价体系的基础上, 进行单因素试验和正交试验, 从而确定最佳提取工艺。

2.1 单因素试验

2.1.1 不同提取剂对迷迭香中抗氧化物提取效果的影响

称 1.5 g 迷迭香粉末于 45 mL 溶剂中, 溶剂分别采用纯水、无水乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、1,3-丁二醇、1,3-丙二醇、正丁醇、丙三醇 (甘油)、甲醇、石油醚、异丙醇, 在 40 ℃ 下超声 1 h, 抽滤得到样品的提取液。计算提取液对 DPPH 的清除率, 结果见图 1。

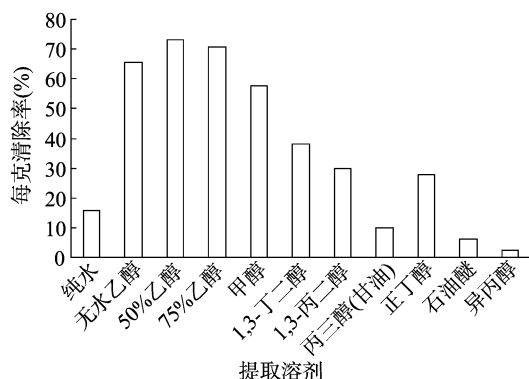


图1 不同提取剂对抗氧化物提取效果的影响

因为乙醇的提取效果良好, 考虑到经济节约的原则, 又分别采用纯水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、无水乙醇作为溶剂进行提取试验, 结果见图 2。

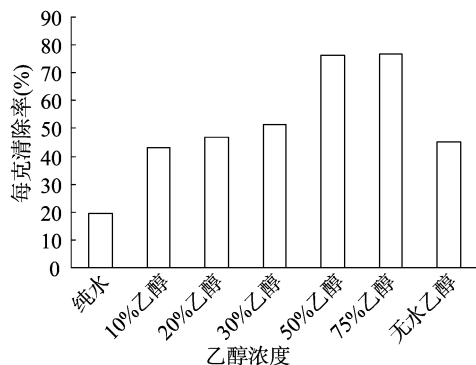


图2 不同浓度的乙醇对抗氧化物提取效果的影响

从图 2 中可以看出, 对于相同的迷迭香粉量, 用 50% 乙醇提取时, 得到的提取物抗氧化能力最强, 75% 乙醇次之, 纯

水的提取效果最差。考虑到经济, 选用 50% 乙醇最为合适。

2.1.2 不同提取方式对迷迭香中抗氧化物提取效果的影响

称 1.5 g 迷迭香粉加入到 45 mL 的 50% 乙醇中, 于 40 ℃ 下分别采用水浴振荡、搅拌、超声波辅助、微波 (2 min)、静置 5 种提取方式进行提取, 提取时间为 1 h, 抽滤得到提取液。从图 3 可知, 超声提取效果最佳, 水浴振荡次之, 微波的效果最差。

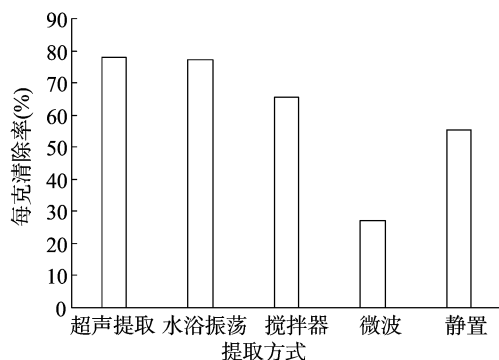


图3 不同提取方式对抗氧化物提取效果的影响

2.1.3 料液比对迷迭香中抗氧化物提取效果的影响

称 1.0 g 迷迭香粉, 在提取温度为 40 ℃, 提取液浓度为 50% 乙醇, 提取时间 1 h 的条件下, 依次在料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g:mL) 的条件下进行提取。从图 4 中可以看出, 随着料液比的增加, 提取效果先增强后降低, 当原料一定时, 溶剂用量越多原料颗粒周围浓度越低, 细胞壁内外浓度差越大, 这样有利于有效成分的溶出, 但当溶剂用量继续增加时, 因溶剂挥发带来的损失会增大, 导致提取率有所减小, 故最佳提取料液比为 1 g:20 mL。

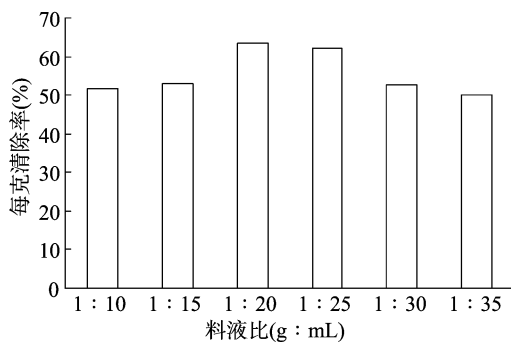


图4 不同料液比对抗氧化物提取效果的影响

2.1.4 不同提取时间对迷迭香中抗氧化物提取效果的影响

称 1.0 g 迷迭香粉在 20 mL 50% 乙醇溶液中, 温度为 40 ℃ 的条件下, 依次在 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 h 的时间下进行超声提取, 测定其抗氧化能力, 随着时间延长, 提取液的抗氧化率有所增加。随着时间的延长, 一方面, 抗氧化物浸出率增加; 另一方面, 抗氧化物被氧化的程度也相应增加。综合考虑, 提取效果较佳的时间为 1.0 h (图 5)。

2.1.5 不同提取温度对迷迭香中抗氧化物提取效果的影响

称迷迭香粉 1.0 g, 于 20 mL 提取液浓度为 50% 的乙醇溶液、提取时间为 1 h 条件下, 依次在温度为 30、40、50、60、70、80、90 ℃ 下进行提取, 提取效果随着温度的增加, 也有小幅度的上升趋势, 但是, 提取温度升高, 不仅会影响活性成分的稳

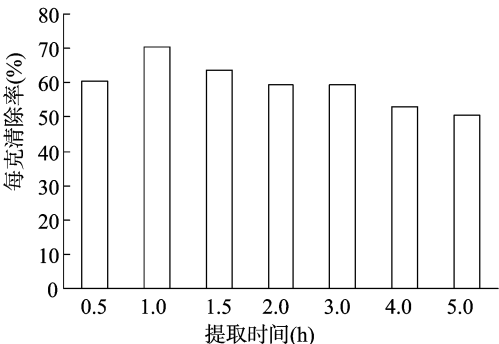


图5 不同提取时间对抗氧化物提取效果的影响

定性,同时也会导致溶剂的损失。从图 6 中可以得出最佳温度为 40 ℃。

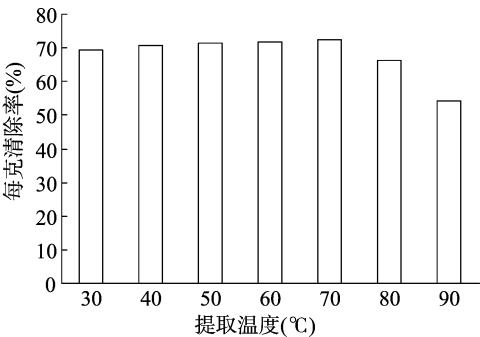


图6 不同温度对抗氧化物提取效果的影响

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,选取影响迷迭香中活性成分提取效果各因素中主要水平做正交试验,每个因素选取 3 个水平(所选取的各水平见表 1)。

表 1 迷迭香抗氧化活性物质提取正交试验因素水平设计

水平	A:提取剂	B:提取温度(℃)	C:提取时间(h)	D:料液比(g:mL)
1	45% 乙醇	35	0.5	1:20
2	50% 乙醇	40	1.0	1:22
3	60% 乙醇	45	1.5	1:25

根据所选取的因素水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验设计,对结果进行极差分析(表 2)。通过分析表明,4 因素对抗氧化率的影响顺序为提取温度 > 料液比 > 提取时间 > 乙醇溶液浓度。最佳的提取工艺条件是提取温度为 40 ℃,料液比 1 g:22 mL,提取时间为 1.0 h,提取剂为 50% 乙醇。

根据正交试验中的最佳提取条件,称 1.0 g 取 3 份迷迭香样品,分别加入 22 mL 的 50% 乙醇,并在温度为 40 ℃下,超声辅助提取 1.0 h 得到迷迭香提取液,分别测定每克清除率为 90.15%、93.0%、91.45%。即平均每克清除率 91.53%,验证了正交试验的结果是可靠的。

2.3 抑菌试验

2.3.1 抑菌活性 图 7 是迷迭香提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌活性情况,试验结果表明迷迭香提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌有抑菌作用,抑菌圈的平均大小分别为 19.6、20.9 mm。对比抑菌圈的大小可以得出,迷迭香提取液对金黄色葡萄球菌的抑制作用高于对大肠杆菌的抑制作用。

表 2 迷迭香抗氧化活性物质提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	每克清除率
1	1	1	1	1	0.60
2	1	2	2	2	0.88
3	1	3	3	3	0.72
4	2	1	2	3	0.67
5	2	2	3	1	0.86
6	2	3	1	2	0.85
7	3	1	3	2	0.64
8	3	2	1	3	0.70
9	3	3	2	1	0.84
k_1	0.733	0.637	0.717	0.767	
k_2	0.793	0.813	0.797	0.790	
k_3	0.727	0.803	0.740	0.697	
R	0.066	0.176	0.080	0.093	
因素主次					$B > D > C > A$
优选方案					$A_2B_2C_2D_2$

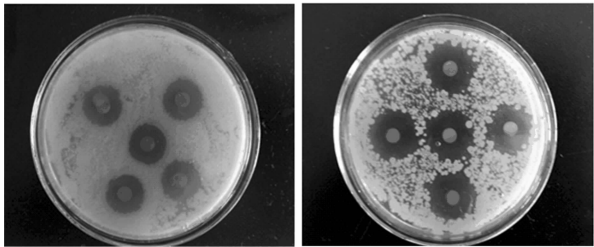


图7 迷迭香提取液对大肠杆菌(左)和金黄色葡萄球菌(右)的抑菌效果

2.3.2 最低抑菌浓度 试验中可明显观察到,随着培养基中提取物的浓度升高,细菌数量逐渐减少至无菌生长。在无提取物的培养基中,细菌生长良好。从表 3 中可知,迷迭香提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度分别为 0.782、0.391 mg/mL。

表 3 提取液对菌液的最低抑菌浓度

浓度(mg/mL)	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
12.500	-	-
6.250	-	-
3.150	-	-
1.563	-	-
0.782	-	+
0.391	+	+
0.195	+	+
0.098	++	++
0	++++	++++

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有少量细菌生长,“++”表示有中等菌生长,“+++”表示有较多菌生长,“++++”表示不计其数。

3 结论

通过超声提取法对迷迭香中的抗氧化活性物质进行提取,通过单因素试验和正交试验,考查了不同因素(如提取剂浓度、提取温度、提取时间、料液比等)对迷迭香抗氧化成分提取效果的影响,其影响主次为提取温度 > 料液比 > 提取时间 > 提取溶剂。确定了迷迭香中的抗氧化活性物质的最佳提取工艺条件为提取溶剂 50% 乙醇,料液比 1 g:22 mL,提取时间 1.0 h,温度 40 ℃。

胡静,毛罕平,胡圣尧,等.基于离子选择性微电极的黄瓜细胞内硝酸盐测量[J].江苏农业科学,2016,44(8):373-375.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.108

基于离子选择性微电极的黄瓜细胞内硝酸盐测量

胡静^{1,2},毛罕平²,胡圣尧^{2,3},温贻芳¹,于霜¹,韩绿化²,储建华¹,高新浩¹

(1.苏州工业职业技术学院,江苏苏州 215104; 2.江苏大学现代农业装备与技术教育部重点实验室,江苏镇江 212013;
3.常州工学院,江苏常州 213022)

摘要:描述了能够测量黄瓜叶片细胞内硝酸根离子活度和膜电位的双管微电极的制作和使用情况。扫描电镜显示电极尖端不易受黄瓜表皮毛的损坏并通过微操纵器的步幅来控制电极进入细胞的程度。硝酸根电极的标定曲线显示硝酸根离子选择性微电极对硝酸根离子有很好的敏感性,数据可靠。用双管电极测得的黄瓜叶片表皮细胞的硝酸根活度为 165 mmol/L。结果证实之前用于大麦叶片的离子选择性电极也能成功地用于黄瓜叶片,因此可以用微电极技术来诊断黄瓜营养。

关键词:黄瓜;硝酸盐;选择性微电极;营养诊断

中图分类号: TS207.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0373-03

在 20 世纪的最后几十年,科技发达国家的温室园艺呈现出创新和技术高速发展的特点。技术应用不仅仅在大范围和高产量上,还主要在温室产业的可持续性上。可持续发展的焦点主要在产品的质量改进和对环境影响的大大减少上。但是在温室园艺上经常会出现氮、磷、钾、钙的失调,氮是限制植物生长和产量的主要因子,氮也是作物中许多重要有机物如蛋白质、核酸、叶绿素、酶、维生素、生物碱和一些激素的主要成分。硝态氮是绝大多数植物的主要氮素来源,由于硝态氮重要的营养作用,因此细胞内硝态氮的测量就显得尤为重要。微电极是一种能够直接刺入植物细胞的微小探针,通常参考电极置于外部测量溶液中,测量电极既能置于植物表面也能直接刺入单个细胞,离子选择性微电极能用于在体内估计细

胞内的钾离子^[1-3]、硝酸根离子活度^[4]和 pH 值^[5-7]等。微电极技术能在体内测量细胞内的离子活度,然而绝大多数的测量在根部^[8-9],因为叶片是相对薄的,并且叶片表面特性更复杂,微电极用于叶片测量的植物主要有大麦和小白菜^[10-13]。黄瓜是最常见的温室作物,本研究制备了双管硝酸盐离子选择性微电极,并用它第一次测量了黄瓜叶片的细胞内硝酸盐浓度,以量化温室作物的营养需求并建立精确的温室管理模式。量化产品改进并减少环境污染是非常重要的。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试黄瓜品种为津优 1 号,在 20~25℃ 下的湿纱布上对黄瓜种子催芽 4 d 后,把大小一致的苗移栽到盆里,盆的开口径为 22 cm,高度为 20 cm,种植基质为珍珠岩。黄瓜苗生长在温室里,保持湿度(70±10)%,用山崎配方种植黄瓜,黄瓜长至 7 叶 1 心时用微电极方法进行叶片测量。

1.2 黄瓜叶片表面特性

黄瓜叶片(5 mm×6 mm)清洗后用 4% 戊二醛溶液固定,经过脱水处理后用单面刀片进行徒手切片,切成 2 mm 左右的横断面。将制备好的样品粘在导电胶上,离子溅射镀膜,喷金厚度为 20 nm,然后将其粘贴在扫描电镜样品台上,在

收稿日期:2015-07-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:61233006、31201659、31401286);“十二五”国家科技支撑计划(编号:2014BAD08B03);江苏省普通高校研究生科研创新计划(编号:CXZZ11_0581、CX-LX13_67);江苏高校优势学科建设工程(编号:苏财教[2014]37号);江苏省高校自然科学基金(编号:11KJB210001);江苏省高校自然科学研究计划项目(编号:13KJD510001)

作者简介:胡静(1984—),女,江苏连云港人,博士,主要从事作物信息检测及装备研究。Email:hujingyangran@126.com。

此外,采用滤纸片法,研究了迷迭香提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌作用,研究结果显示迷迭香活性提取物对上述 2 种细菌皆有良好的抑菌效果,其抑菌圈大小分别为大肠杆菌 19.6 mm、金黄色葡萄球菌 20.9 mm;最低抑菌浓度分别为大肠杆菌 0.782 mg/mL、金黄色葡萄球菌 0.391 mg/mL。

参考文献:

- [1]屠鹏飞,徐占辉,郑家通,等.新型资源植物迷迭香的化学成分及其应用[J].天然产物研究与开发,1998,10(3):62-68.
- [2]程伟贤,陈鸿雁,张义平,等.迷迭香化学成分研究[J].中草药,

2005,36(11):1622-1624.

- [3]吴建章,郁建平,赵东亮.迷迭香酸的研究进展[J].天然产物研究与开发,2005,17(3):383-388.
- [4]吴建章,郁建平,艾长春,等.迷迭香中微量元素与黄酮类化合物的含量分析[J].光谱实验室,2008,25(4):627-629.
- [5]张冲,冯玉红,周雪晴,等.迷迭香挥发油成分分析[J].海南大学学报:自然科学版,2008,26(1):74-77.
- [6]韩文瑜,何昭阳,刘玉斌.病原细菌检验技术[M].长春:吉林科学技术出版社,1992.
- [7]严敏,李琦,顾国贤.利用 DPPH 自由基清除率评价啤酒内源性抗氧化能力[J].食品工业科技,2005,26(8):82-84.