

杜娟,罗立,黄洁,等. 利用纳米金法评价百合总黄酮的抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):196-198.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.052

利用纳米金法评价百合总黄酮的抗氧化性

杜娟,罗立,黄洁,罗秋水

(江西农业大学食品科学与工程学院/南昌市农产品加工及质量控制重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:拟建立利用纳米金吸光度评价 3 种百合总黄酮抗氧化性的方法。以硼氢化钠还原氯金酸,生成金种子,而后加入百合总黄酮提取液,使金种子继续生长,生成酒红色的纳米金溶液,最大吸收峰位于 521 nm,吸光度与黄酮抗氧化能力成正比。以没食子酸为对照,比较了 3 种百合总黄酮化合物的抗氧化性强弱,并与 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法的试验结果进行对比。试验结果表明,与药用百合和食用百合相比,香水百合总黄酮提取物具有较强的抗氧化性,且纳米金法试验结果与 DPPH 法一致。纳米金法可作为评价黄酮抗氧化性的新方法。

关键词:百合;总黄酮;纳米金;抗氧化性

中图分类号:S682.2⁺65.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)17-0196-02

金纳米粒子因其独特的物理化学性能而在近年来得到了广泛关注,在各领域都有广泛的应用。合成金纳米粒子的方法有许多,金种子法是其中的一种。该方法以硼氢化钠为还原剂还原氯金酸制备金种子,而后加入适当的保护剂阻止其聚集形成大颗粒,形成金纳米粒子^[1]。近年来,众多报道表明植物提取液可作为保护剂用于金纳米粒子的合成,其中起主要作用的为黄酮类化合物^[2]。

黄酮类化合物是一类重要的天然有机化合物,是植物在长期自然选择过程中产生的一类次生代谢产物^[3],广泛存在于高等植物及羊齿类植物的根、茎、叶、花、果实等中,不仅数量繁多,而且结构类型复杂多样。黄酮类化合物具有多种生理功能,主要有抗氧化功能、抗心率失常功能、抗肿瘤抗癌功能、镇咳祛痰平喘功能、抗炎功能、抗菌抗病毒功能、类激素样功能及免疫调节功能等^[4-5]。其中抗氧化功能是目前的研究重点,目前检测抗氧化性的方法多为 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)法等。

香水百合花色艳丽,芳香宜人,是单子叶植物亚纲百合科(Liliaceae)百合属(*Lilium*)植物,常用于观赏。目前,对其研究多集中于组织培养和栽培栽种,对其化学成分的研究较少。前期试验表明,香水百合中总黄酮化合物的含量较高,且具有一定的抗氧化性^[6]。笔者以百合总黄酮提取物为保护剂还原金种子,建立了利用纳米金法评价百合黄酮抗氧化性的方法。以没食子酸为对照,比较了香水百合、食用百合、药用百合 3 种百合总黄酮化合物抗氧化性的强弱,并与传统的 DPPH 法得到的结果相对比。

收稿日期:2017-03-22

基金项目:江西省教育厅科学技术项目(编号:GJJ1504030);江西农业大学大学生创新创业计划(编号:201610410101)。

作者简介:杜娟(1986—),女,江西南昌人,博士,讲师,主要从事食品安全检测研究。E-mail:dujuanlulia@163.com。

通信作者:罗秋水,硕士研究生,中级实验师,主要从事食品安全检测研究。Tel:(0791)83813420;E-mail:lqsh2001@126.com。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 试剂与材料 芸香苷、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、无水乙醇、没食子酸、氯金酸、硼氢化钠、碳酸钾、浓盐酸、浓硝酸皆为分析纯,DPPH 为生化试剂,香水百合、药用百合、食用百合皆购自当地商店。

1.1.2 仪器 XY-200 型高速多功能型粉碎机;UV-9100 紫外可见分光光度计;DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱;BS224S 电子天平;HH-4 数显恒温水浴锅;SHZ-D(Ⅲ)予华牌循环水真空泵;移液枪;控温磁力搅拌器;超声波清洗器。

1.2 试验方法

1.2.1 黄酮的提取及含量测定 (1)总黄酮提取:精确称取 0.5 g 干燥后的香水百合、药用百合、食用百合粉末,以 70%乙醇水溶液为提取剂,料液比为 1 g:30 mL,在 50℃下水浴提取 1.5 h,过滤,提取液以 70%乙醇定容至 100 mL。(2)总黄酮含量测定:精确称取 205 mg 干燥至恒质量的芸香苷粉末,用 70%甲醇溶解得芸香苷储备液,使用时用 70%甲醇稀释至 0.205 mg/mL,为芸香苷稀释液。移取芸香苷稀释液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00 mL,分别放置于 50 mL 容量瓶中,加入 70%乙醇溶液至总体积为 6 mL,再分别加入 5%亚硝酸钠各 2.00 mL,振荡均匀,放置 6 min,然后加入 10%氯化铝 1.00 mL,振荡均匀,放置 6 min,最后加 4%氢氧化钠 20.00 mL,摇匀,用水定容至刻度线,放置 15 min,在 510 nm 波长处测定吸光度。以芸香苷浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。从 100 mL 各提取液中移取 1.5 mL 总黄酮提取液至 50 mL 容量瓶中,加 70%乙醇溶液至 6 mL,按测定标准曲线的方法进行测定,求得各提取液中黄酮的含量。

1.2.2 纳米金法评价百合总黄酮抗氧化性 (1)金种子的制备。取 100 mL 经 4℃冷藏的超纯水,加入 1.5 mL 1% (质量浓度) HAuCl₄ 溶液,在持续搅拌状态下加入 0.5 mL 0.2 mol/L K₂CO₃ 溶液,再加入 4.5 mL 0.5 mg/mL NaBH₄ 溶液,持续搅拌 5 min,即得酒红色金种子溶液,4℃保存。

(2)K₂CO₃-HAuCl₄ 溶液的制备。称取 50 mg K₂CO₃ 固

体,加入 100 mL 超纯水,持续搅拌 10 min,再向其中加入 1.5 mL 1% (质量浓度) HAuCl_4 溶液,继续搅拌 30 min,溶液颜色由淡黄逐渐变成无色透明,即为制备成功,4 ℃ 保存。

(3) 以没食子酸 (GA) 为保护剂的纳米金颗粒的生长。取 6 mL $\text{K}_2\text{CO}_3 - \text{HAuCl}_4$ 溶液于 50 mL 烧杯中,置于磁力搅拌器上匀速搅拌,加入 100 μL 金种子溶液,而后迅速加入 600 μL 超纯水,继续搅拌 10 min,于 521 nm 处检测其吸光度,作为空白对照。重复上述步骤,将 600 μL 超纯水分别替换为浓度为 0.2、0.1、0.06、0.02、0.008、0.004 mg/mL 的 GA 溶液,分别测定其对应的吸光度。以 GA 浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

(4) 以百合总黄酮提取液为保护剂的纳米金颗粒的生长。分别取 3 种百合总黄酮提取液各 10 mL,浓缩至 1 mL。取 6 mL $\text{K}_2\text{CO}_3 - \text{HAuCl}_4$ 溶液于 50 mL 烧杯中,置于磁力搅拌器上匀速搅拌,加入 100 μL 金种子溶液,而后迅速加入 600 μL 超纯水,搅拌 20 min 后,检测其在 521 nm 处的吸光度,作为空白对照。重复上述步骤,将 600 μL 超纯水分别换成 3 种不同类型的黄酮提取液,测定相应的吸光度,并根据上一步得到的标准曲线求得各黄酮提取液对应的 GA 当量,每个样品平行做 2 份,取平均值。

1.2.3 DPPH 法评价百合总黄酮抗氧化性^[7] 将浓度为 2.0×10^{-4} mol/L DPPH 乙醇溶液 2 mL 和各百合总黄酮提取液 2 mL 在试管中混匀,25 ℃ 下避光反应 30 min,于 517 nm 处测定吸光度。用乙醇作空白对照。以没食子酸为标准对照,DPPH 自由基清除率由下式计算,每个样品平行做 2 份,取平均值。

$$S = \left(1 - \frac{D_i - D_0}{D_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中: S 表示 DPPH 自由基清除率(%); D_i 表示 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 样品溶液混合后在 517 nm 下的吸光度; D_j 表示 2 mL 样品溶液和 2 mL 乙醇溶剂混合液在 517 nm 下的吸光度; D_0 表示 2 mL DPPH 溶液和 2 mL 乙醇溶剂混合液在 517 nm 下的吸光度。

2 结果与分析

2.1 3 种百合中的黄酮含量

分光光度法是测定黄酮含量的常用方法。黄酮分子 B 环上的 3,4-邻二苯酚羟基可与铝离子在碱性条件下络合,生成棕红色的金属络合物。以芸香苷为标准品作标准曲线,可得线性方程为 $y = 0.011x - 0.0011$,将各黄酮提取液样品测得的吸光度代入线性方程,可求得 3 种百合黄酮提取液的总黄酮平均浓度:香水百合为 10.74%、药用百合为 0.92%、食用百合为 0.14%。结果表明,香水百合中总黄酮含量远高于药用百合和食用百合。

2.2 纳米金法评价抗氧化性

没食子酸或黄酮类化合物具有抗氧化性,加入金种子溶液中可起到保护剂的作用,阻止纳米金粒子的进一步聚集,形成具有一定颗粒大小的纳米金溶液。在本试验中将不同浓度的没食子酸溶液加入金种子溶液中,观察反应后的颜色变化,结果表明,加入没食子酸之后,溶液呈酒红色,说明生成了纳米金粒子,且随没食子酸浓度的增大,溶液的颜色逐渐加深,表明生成的纳米金粒子的颗粒也越多。扫描各溶液的紫外光

谱,不同溶液的最大吸收峰位于 521 nm,为金纳米粒子的特征吸收峰,且吸光度随没食子酸浓度的增大而增大。从图 1 可以看出,在试验所选的浓度范围内(0.004 ~ 0.20 mg/mL),溶液的吸光度与没食子酸的浓度呈线性关系,线性方程为 $y = 4.6304x - 0.0011$, $r^2 = 0.997$ 。反应溶液的透射电子显微镜(TEM)结果见图 2,由 TEM 图可见纳米金粒子的生成,生成的纳米金粒子近似于球形,粒径约为 20 nm。

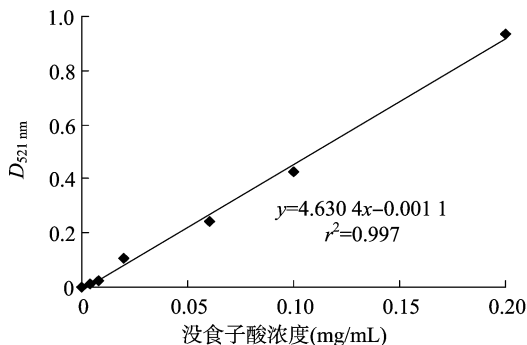


图1 以没食子酸为保护剂的金纳米颗粒生长情况

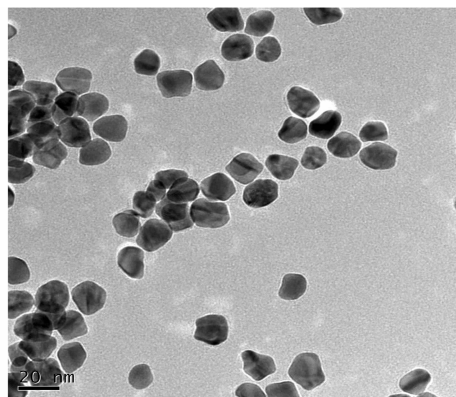


图2 以没食子酸为保护剂生成纳米金粒子的 TEM

采用同样的方法,用 3 种百合的总黄酮提取液替换没食子酸,分别进行反应,并测其吸光度。分别将其吸光度代入至没食子酸的线性方程中,求得对应的 X 值,即为抗坏血酸当量。GA 当量越大,说明该百合总黄酮提取液抗氧化性越强。根据计算可求得 3 种百合总黄酮提取液的 GA 当量:香水百合为 63.35 $\mu\text{g/mL}$ 、药用百合为 11.86 $\mu\text{g/mL}$ 、食用百合为 1.38 $\mu\text{g/mL}$ 。由 GA 当量可知,香水百合的抗氧化性最强,药用百合次之,食用百合最弱。

2.3 DPPH 法评价抗氧化性

DPPH 自由基是一种以氮为中心的单电子自由基,其结构简单,性质稳定。DPPH 自由基乙醇溶液为紫色,最大吸收波长位于 517 nm。当向其中加入自由基清除剂时,自由基清除剂能提供电子与 DPPH 自由基中的单电子配对,导致溶液颜色变浅,吸光度减弱。一般以 DPPH 自由基清除率为 50% 时的样品浓度 (EC_{50}) 来衡量样品对 DPPH 自由基的清除能力, EC_{50} 值越小,样品清除 DPPH 自由基的能力越强。3 种百合总黄酮提取液和对照品没食子酸对 DPPH 自由基的清除情况见图 3。可以看出,无论是样品还是对照品,在选定浓度区间内,对 DPPH 自由基的清除率与浓度成正比。通过各自的线性方程可以求得各自的 EC_{50} :没食子酸为 2.31 $\mu\text{g/mL}$ 、香水百合为 25.31 $\mu\text{g/mL}$ 、药用百合为 38.75 $\mu\text{g/mL}$ 、食用百合为

赖宏刚,蒋云升,张元嵩,等. 真空包装冷鲜鸡中腐败菌微生物的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):198-201.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.053

真空包装冷鲜鸡中腐败菌微生物的分离鉴定

赖宏刚¹, 蒋云升¹, 张元嵩¹, 曹 宏², 肖 欢²

(1. 扬州大学旅游烹饪学院, 江苏扬州 225127; 2. 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏扬州 225007)

摘要:为了有针对性地控制冷鲜鸡中微生物的污染,采用平板计数法进行菌相分析;采用平板划线分离法分离冷鲜鸡中主要的微生物菌群,再根据革兰氏镜检观察、菌落形态、菌体特征观察,以及16S rDNA测序的方法,对冷鲜鸡中的主要腐败菌代表菌株进行鉴定。结果表明,冷鲜鸡的腐败菌相以假单胞菌(占比51.0%)、乳酸菌(占比31.5%)为主,其次是热杀索丝菌(占比13.3%)、肠杆菌(占比4.3%)。在对应的代表性菌株方面,J1代表荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),C1代表阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),R1代表植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),S1代表热杀索丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)。

关键词:冷鲜鸡;优势微生物群;腐败菌;生理生化鉴定;16S rDNA;靶向控制;延长货架期

中图分类号: TS201.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0198-04

冷鲜鸡是指经检验检疫后屠宰得到的鸡胴体,经迅速冷却使其温度在1 h内降到0~4℃,并保持在0~4℃下加工、

流通和零售的鲜鸡肉^[1]。冷鲜鸡在生产、加工和储运过程中,不可避免地被空气、容器、包装材料、原料本身等所携带的细菌污染,又因为其营养成分丰富和含水量高^[2],一旦条件适宜,其携带的微生物就会迅速生长繁殖,出现变色、变味以及表面发黏、产生臭味等不良变化^[3],从而使其货架期缩短,这也成为限制冷鲜鸡产业发展的瓶颈。因此,建立系列的综合保鲜技术研究就成为解决冷鲜鸡及酱鸡制品发展的关键问题,而腐败菌的分离鉴定是这个问题得以解决的基础。

本研究采用平板划线分离方法分离纯化冷鲜鸡中的优势微生物菌群,再通过传统的生理生化试验及16S rDNA测序

收稿日期:2017-04-18

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(15)1009];国家科技支撑计划(编号:2014BAA0305);扬州市辐射应用技术创新公共服务平台建设(编号:YZ2016ZZZ)。

作者简介:赖宏刚(1991—),男,河南驻马店人,硕士研究生,助教,主要从事营养与食品卫生方面的研究。E-mail:lhghstc@163.com。
通信作者:蒋云升,教授,主要从事营养与食品卫生方面的研究。
E-mail:jysqd62@163.com。

109.95 μg/mL。试验结果表明,在3种百合总黄酮提取液中,香水百合清除DPPH自由基的能力最强,药用百合次之,食用百合最小。该结果与纳米金法得到的结论相一致。

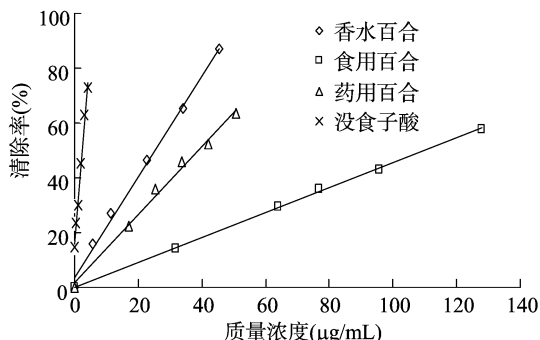


图3 3种百合总黄酮及没食子酸对DPPH自由基的清除作用

3 结论

本研究建立了利用纳米金颗粒生长评价3种百合总黄酮抗氧化性的方法。以没食子酸为对照,香水百合、药用百合、食用百合3种百合对应的没食子酸当量分别为63.35、11.86、1.38 μg/mL。结果表明,3种百合总黄酮抗氧化性的强弱依次为香水百合>药用百合>食用百合。在DPPH自由基的清除试验中,3种百合总黄酮提取液对DPPH均有一定的

清除作用,其EC₅₀如下:食用百合为109.95 μg/mL、药用百合为38.75 μg/mL、香水百合为25.13 μg/mL,清除率由强到弱依次为香水百合>药用百合>食用百合,试验结果与纳米金法一致。表明与药用百合和食用百合相比,香水百合总黄酮提取物具有较强的抗氧化性,且纳米金法试验结果与DPPH法一致。可见纳米金法可作为评价黄酮抗氧化性的新方法。

参考文献:

- [1] 鲁闻生,王海飞,张建平,等. 金纳米棒的制备、生长机理及纯化[J]. 化学进展,2015,27(7):785-793.
- [2] 陆 瑶,郭清泉,郭秋兰,等. 植物生物质合成金纳米粒子的研究进展[J]. 现代化工,2013,33(8):36-39,41.
- [3] 延 玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [4] 刘成梅,游 海. 天然产物有效成分的分离与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [5] 张 岩,曹国杰,张 燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):154-158.
- [6] 杜 娟,罗秋水,杜华英,等. 香水百合中总黄酮提取及抗氧化性[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):320-322.
- [7] 郭雪峰,岳永德,汤 锋,等. 用清除有机自由基DPPH法评价竹叶提取物抗氧化能力[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(7):1578-1582.