

高华山,陈明辉,齐光,等.金钗石斛总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J].江苏农业科学,2019,47(24):194-199.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.045

金钗石斛总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性

高华山,陈明辉,齐光,张科,佟伟霜

(平顶山学院,河南平顶山 467000)

摘要:为了提高金钗石斛中黄酮类化合物的提取得率,在料液比、提取温度、提取时间、乙醇体积分数 4 个单因素试验基础上,通过二次通用旋转组合设计试验优化金钗石斛总黄酮的超声辅助提取工艺条件,并初步评价其体外抗氧化活性。优化的金钗石斛黄酮提取条件为:提取时间 10 min、料液比 1 g : 15 mL,提取温度 75 ℃,乙醇体积分数 90%。根据修正的最佳工艺条件,进行 6 次重复试验,测得黄酮提取率的均值为(0.551 5 ± 0.000 4) mg/g,与模型预测值相符。抗氧化试验结果表明,金钗石斛总黄酮对 ABTS 自由基、DPPH 自由基有较好的清除效果,与提取液质量浓度成正比。优化的金钗石斛黄酮提取工艺合理、可行,金钗石斛黄酮具有较强的抗氧化性。

关键词:金钗石斛;黄酮;响应面法;抗氧化活性

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0194-05

金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)是兰科石斛属植物,又名金钗石、扁黄草等,是《中华人民共和国药典》^[1]收录的名贵石斛属药用植物之一,具备润肺止咳、明目强身、生津益胃等功效。金钗石斛,性微寒,味甘,用于治疗热病伤津、口干烦渴、病后虚热、目暗不明、萎缩性胃炎、浅表性胃炎、慢性结肠炎等,是石斛夜光丸、石斛明目丸、石斛浸膏溶液、石斛清胃散等制剂的重要配伍^[2]。作为传统中药,金钗石斛近年来受到国内外学者高度关注,药理研究表明,金钗石斛具有提高肠道功能^[3]、改善记忆衰退^[4]、抗肿瘤^[5]、抗诱变^[6-7]、增强机体免疫能力及降血糖等作用^[8-9]。近几十年来,国内外学者对许多种石斛的化学成分进行了研究,发现该属植物所含的化学成分种类丰富,主要包括生物碱类、多糖类、酚类、黄酮类、联苕类、倍半萜类、香豆素以及甾体糖苷类化合物等^[10],其中以生物碱和多糖为研究对象的工作较多。陈志国等对金钗石斛多糖进行了体外抗氧化活性研究,结果表明,金钗石斛粗制多糖和精制多糖均有一定的抗氧化能力^[11]。费雯等研究了金钗石斛总多酚的体外抗氧化活性,结果表明金钗石斛总多酚对 ABTS、DPPH 自由基和羟基自由基活性均有不同程度的清除作用,其清除能力与总多酚质量浓度呈正相关,具有良好的抗氧化能力^[12]。但是,目前对于其黄酮类成分的制备工艺及相关活性研究的较少。因此本试验在前期研究基础上采用超声波辅助提取法提取金钗石斛总黄酮并应用响应面法对总黄酮提取工艺影响较大的 4 个因素即料液比、提取温度、提取

时间、乙醇体积分数进行优化,从而获得经济、科学的提取条件。以维生素 C 为阳性对照,考察金钗石斛总黄酮对 ABTS、DPPH 自由基和羟基自由基的清除作用,以期为进一步探讨其药理活性和开发利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 仪器

UVmini-1240 紫外可见分光光度计,日本岛津生产;KQ3200B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产;SHB-III 型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司生产;旋转蒸发仪,上海广英公司生产;102-1 型恒温鼓风干燥箱,永兴仪器有限公司生产。

1.2 材料

金钗石斛,购自平顶山张仲景大药房,药材干燥后粉碎过 80 目筛,贮存备用;芸香苷标准品,北京中科质检技术有限公司生产;DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产;ABTS 自由基[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)],上海金穗生物科技有限公司生产;羟自由基试剂盒,南京建成生物工程研究所生产;维生素 C 标准品,北京中科质检技术有限公司生产;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 测定方法

1.3.1 金钗石斛总黄酮的提取与测定 准确量取 2.0 g 乙醇作为溶剂,在一定温度下利用超声波处理一定时间,趁热抽滤,用相应的提取溶剂补足损失,作为待测液。精确量取 1.0 mL 待测液于 10 mL 的比色管中,按标准曲线的测定方法测定待测液的吸光度,计算黄酮含量。公式如下:

$$\text{总黄酮提取量}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times N}{m}$$

式中: C 为待测液中的黄酮浓度,mg/mL; V 为黄酮提取液体积,mL; N 为待测液的稀释倍数; m 为金钗石斛样品干质量,取 2.0 g。

1.3.2 标准曲线的绘制 精确称取芸香苷对照品 20.0 mg,

收稿日期:2019-02-21

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:172102310211、182102110166、192102310087);高等学校科学技术研究重点项目(编号:18A180026);平顶山学院高层次人才启动基金(编号:PX-Y-BSQD-2018011、PX-Y-BSQD-2018010);平顶山学院培育基金(编号:PX-Y-PYJJ-2019007)。

作者简介:高华山(1983—),男,山东日照人,博士,讲师,主要从事微生物与生化药学研究。E-mail:guoqiang1206@163.com。

通信作者:佟伟霜,博士,讲师,主要从事资源植物开发与利用研究。E-mail:xiaoshuang1210@163.com。

置于 100 mL 容量瓶中,用 95% 乙醇溶解,再用 50% 乙醇稀释至 100 mL,得 0.2 mg/mL 芸香苷对照品溶液,分别量取 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 芸香苷对照品溶液于 6 个 10 mL 比色管中,分别加入 50% 乙醇溶液使之成 5 mL,加入 5% NaNO_2 溶液 0.3 mL,摇匀后放置 6 min,加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min,再加入 1 mol/L NaOH 溶液 4 mL,分别用 50% 乙醇稀释至 10 mL,摇匀后放置 15 min,用不加芸香苷对照品溶液的第 1 支管作空白,用紫外可见分光光度计在 510 nm 处测其吸光度,以吸光度为纵坐标、芸香苷浓度为横坐标,绘制标准曲线^[13],得 $y = 13.12x + 0.0426$, $r^2 = 0.9999$ 。结果表明,芸香苷在浓度 0.02 ~ 0.10 mg/mL 范围内与吸光度具有良好的线性关系。

1.4 试验方法

1.4.1 精密度、重复性、稳定性与精确度试验 精确量取供试品溶液 1 mL,按“1.3.2”节中的测定方法操作,测定吸光度,连续测 6 次,吸光度的 $RSD = 1.03\%$,说明仪器精密度较好。将供试品溶液分别放置 0、2、4、8、12、24 h 后,测定总黄酮含量,结果显示其 $RSD = 3.13\%$ ($n = 6$),说明供试品溶液在 24 h 内的稳定性较好。按“1.3.1”节中总黄酮的提取方法平行制备 6 份样品,按“1.3.2”节的测定方法操作,测定吸光度,结果吸光度的 $RSD = 2.42\%$,表明该测定方法的重复性良好。精确称取 6 份已知含量的样品粉末 2.0 g,分别加入一定量的芸香苷对照品溶液 (0.2 mg/mL),按“1.3.1”节总黄酮的提取方法制成待测液,再按“1.3.2”节的方法测定吸光度,计算含量及回收率,其平均回收率为 92.5% ($RSD = 3.60\%$, $n = 6$),表明该方法准确度良好。

1.4.2 金钗石斛总黄酮单因素试验提取工艺优化 以超声法提取金钗石斛总黄酮,考察料液比、提取温度、提取时间、乙醇体积分数对金钗石斛黄酮提取的影响。

2 结果与分析

2.1 单因素对金钗石斛黄酮提取量的影响

2.1.1 料液比对黄酮提取量的影响 准确称取金钗石斛粉末 2.0 g,以体积分数为 60% 乙醇、温度为 55 °C 条件下浸提 30 min,考察 1 g : 10 mL、1 g : 20 mL、1 g : 30 mL、1 g : 40 mL、1 g : 50 mL 5 种不同料液比条件下对黄酮提取量的影响。从图 1 - A 可以看出,金钗石斛黄酮提取量随溶剂的增加呈先增大后降低的趋势,料液比在 1 g : 20 mL 时,黄酮提取率达到最大值,之后随溶剂的增加而呈现平缓下降趋势。原因可能是料液比在 1 g : 20 mL 时,溶剂中黄酮的溶解度已经趋于饱和,即使继续增加溶剂用量,黄酮提取量也没有显著提高,故选最佳料液比为 1 g : 20 mL。

2.1.2 温度对黄酮提取量的影响 准确称取金钗石斛粉末 2.0 g,以体积分数 60% 乙醇、料液比 1 g : 20 mL 浸提 30 min,考察 45、55、65、75、85 °C 5 种不同温度条件下对黄酮提取量的影响。从图 1 - B 可以看出,在温度未达到 65 °C 时,黄酮提取量随温度升高不断升高;温度超过 65 °C 后,黄酮提取量随温度升高反而下降。这可能是由于温度小于 65 °C 时,物料的黏滞度减小,黄酮物质很容易溶解析出,黄酮提取量随温度升高而增大,至 65 °C 时达到最高,而温度超过 65 °C 时,较高的温度可能会破坏黄酮结构造成其提取量下降,故而选择提

取温度为 65 °C 左右较为合理。

2.1.3 提取时间对黄酮提取量的影响 精确称取金钗石斛粉末 2.0 g,在体积分数 60% 乙醇、料液比 1 g : 20 mL、温度 55 °C 条件下考察 10、20、30、40、50 min 5 种不同提取时间对黄酮提取量的影响。从图 1 - C 可以看出,黄酮提取量随着时间延长反而呈现逐渐下降趋势,在提取时间为 10 min 时,黄酮提取量最高;提取 20 ~ 30 min,黄酮提取量下降较快,在 30 ~ 50 min 时基本保持不变。10 min 时黄酮提取量最高且节约时间,故而选取提取时间为 10 min 左右。

2.1.4 乙醇体积分数对黄酮提取量的影响 准确称取金钗石斛粉末 2.0 g,在料液比 1 g : 20 mL、温度 55 °C 条件下浸提 30 min,考察 50、60、70、80、90% 5 种不同乙醇体积分数下对黄酮提取量的影响。从图 1 - D 可知,黄酮提取量随乙醇体积分数的增加呈现先升高再降低的趋势,在乙醇体积分数达到 80% 时达到最大。这可能是因为随着乙醇体积分数的增加,材料细胞的溶胀增强,促进提取试剂有效地向细胞内渗透,从而增加提取率^[14]。另外可能是由于金钗石斛黄酮类化合物的结构较为复杂,随着乙醇体积分数的提高,与醇类极性相似的黄酮类物质析出更多,溶剂极性过大或过小对总酚提取均有一定影响。从本试验结果来看,当乙醇体积分数为 80% 时,黄酮提取量达最大值,故选取乙醇体积分数为 80% 左右。

2.2 金钗石斛总黄酮提取响应面试验设计及优化

2.2.1 响应面试验设计 根据单因素试验结果,由 Design - Expert 8.0.6 统计分析软件设计出试验方案,以金钗石斛黄酮提取量为响应值,以料液比 (X_1)、提取温度 (X_2)、乙醇体积分数 (X_3) 为自变量,建立 4 因素 3 水平中心组合试验设计共包括 17 个试验方案,其中 12 个析因试验点、5 个中心试验点,用以计算试验误差。因素水平分析选取见表 1,试验设计及结果见表 2。

2.2.2 回归方程拟合及方差分析 应用 Design - Expert 8.0.6 对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,得到料液比 X_1 、提取温度 X_2 、乙醇体积分数 X_3 与金钗石斛总黄酮含量之间的二次多项回归方程为: $Y = 0.51 + 0.022X_1 + 0.027X_2 + 0.029X_3 - 0.045X_1^2 - 0.024X_2^2 - 0.043X_3^2 - 0.028X_1X_2 - 0.036X_1X_3 + 0.041X_2X_3$, $R^2 = 0.9956$, $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9900$,由方差分析可知回归方程模型极显著 ($P < 0.0001$),说明该模型与实际拟合良好,试验方法可靠,失拟项 P 值为 $0.0748 > 0.05$,不显著,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,可以用该回归方程代谢试验真实点对试验结果进行分析。结果表明,料液比 (X_1)、提取温度 (X_2)、乙醇体积分数 (X_3) 对总黄酮提取量的工艺影响极显著;二次项料液比、提取温度、乙醇体积分数对总黄酮提取量的曲面效应均极显著;比较各因子间料液比与乙醇体积分数交互项、提取温度与乙醇体积分数交互项对响应值影响显著,各因素对响应值显著性的排序为 $X_3 > X_2 > X_1$ 。

2.2.3 各因素的交互作用 将其中 1 个因素固定在 0 水平,经软件 Design - Expert 8.0.6 获得其他 2 个因素交互作用和对金钗石斛黄酮量的影响。“3D”图坡度越大越陡峭,说明二者交互最有越强;等高线的想着趋向于椭圆且椭圆轴线与坐标轴的角度越大,交互作用越明显。由图 2 可知,响应面坡度

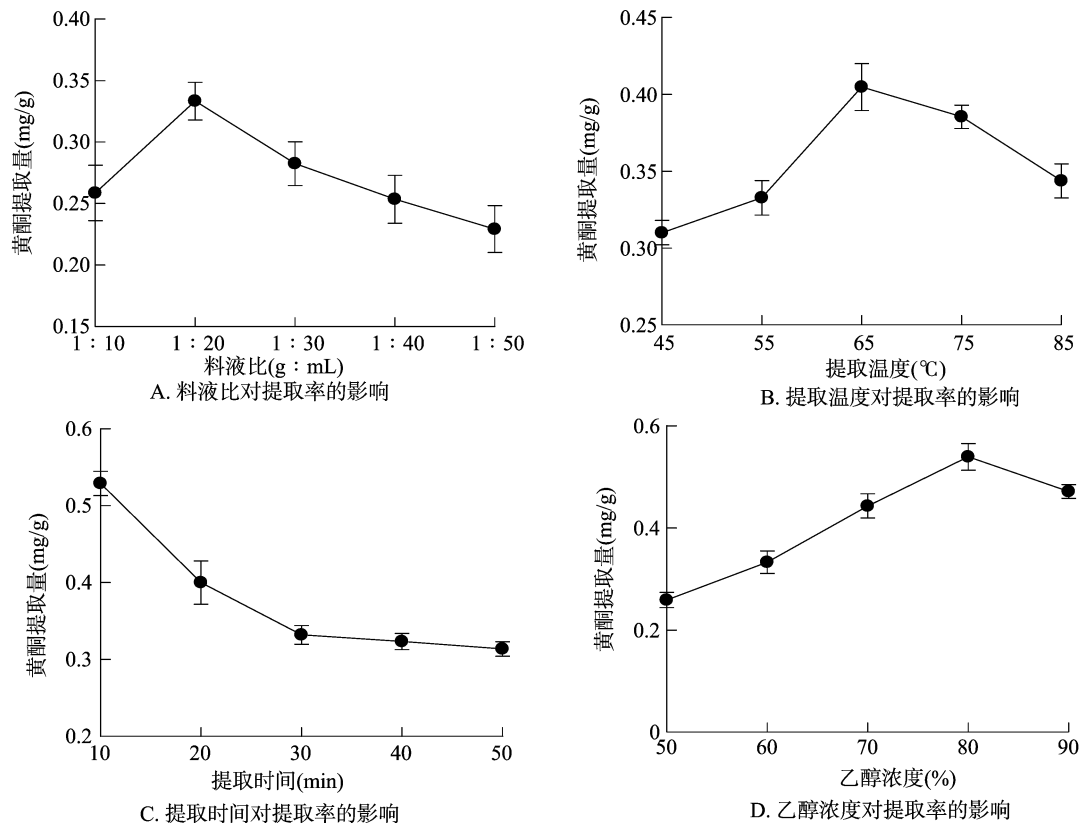


图1 不同因素影响对黄酮提取量的影响

表 1 响应面法试验因素水平编码

水平	X_1 (料液比, g/mL)	X_2 (提取温度, °C)	X_3 (乙醇体积分数, %)
-1	1 : 10	55	70
0	1 : 20	65	80
1	1 : 30	75	90

表 2 中心试验设计及试验结果

试验号	X_1	X_2	X_3	提取量 (mg/g)
1	-1	-1	0	0.371
2	1	-1	0	0.462
3	-1	1	0	0.481
4	1	1	0	0.460
5	-1	0	-1	0.333
6	1	0	-1	0.458
7	-1	0	1	0.462
8	1	0	1	0.445
9	0	-1	-1	0.430
10	0	1	-1	0.403
11	0	-1	1	0.407
12	0	1	1	0.542
13	0	0	0	0.515
14	0	0	0	0.508
15	0	0	0	0.514
16	0	0	0	0.516
17	0	0	0	0.510

陡峭,等高线呈椭圆,说明料液比(X_1)和乙醇体积分数(X_3)对黄酮提取率的影响均较大。由响应面的等高线图 2 可知,料液比 1 g : 20 mL ~ 1 g : 30 mL、乙醇体积分数 80% ~ 90% 的范围内黄酮提取量较高。料液比(X_1)和乙醇体积分数(X_3)交互作用显著,可能是因为料液比会影响溶质分子质量浓度,因而对金钗石斛黄酮的提取量产生交互影响。不同因素对金钗石斛黄酮提取量的影响非简单的线性关系。

由回归方程优化得出因素水平的最优组合,并将各因素水平转换为实际值,得到金钗石斛黄酮提取的最佳工艺参数为:料液比 1 g : 15.43 mL、提取温度 75 °C,乙醇体积分数为 89.96%。考虑到实际操作可行性,将最佳提取工艺优化为:料液比 1 g : 15 mL,提取温度 75 °C,乙醇体积分数为 90%。

2.2.4 验证试验 根据修正的最佳工艺条件,进行 6 次重复试验,测得金钗石斛中总黄酮的提取量为 0.551 5 mg/g ($RSD = 1.24\%$, $n = 6$),与预测的黄酮提取量 0.551 4 mg/g 较为接近,表明运用响应面法设计优化得到的模型参数准确可靠。

2.3 抗氧化性试验

2.3.1 ABTS 自由基清除活性 将维生素 C 标准品配制浓度为 3 000.00、1 500.00、750.00、375.00、187.50、93.75、46.875 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液。分别取维生素 C 及各样品液 0.1 mL,加入 1 mL ABTS 溶液,充分混合,室温避光放置 20 min,用紫外分光光度计在 734 nm 处测定吸光度。超纯水为空白对照用,重复 3 次^[15-16]。按下式计算清除率:

清除率 = $\frac{D_{\text{空白对照}} - D_{\text{样品}}}{D_{\text{空白对照}}} \times 100\%$ (D 为吸光度)。

表 3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.052	9	5.785×10^{-3}	177.84 **	<0.000 1
X_1	3.961×10^{-3}	1	3.961×10^{-3}	121.75 **	<0.000 1
X_2	5.832×10^{-3}	1	5.832×10^{-3}	179.29 **	<0.000 1
X_3	6.728×10^{-3}	1	6.728×10^{-3}	206.83	<0.000 1
X_1^2	8.545×10^{-3}	1	8.545×10^{-3}	262.70 **	<0.000 1
X_2^2	2.435×10^{-3}	1	2.435×10^{-3}	74.87 **	<0.000 1
X_3^2	7.803×10^{-3}	1	7.803×10^{-3}	239.89	<0.000 1
X_1X_2	3.136×10^{-3}	1	3.136×10^{-3}	96.41	<0.000 1
X_1X_3	5.041×10^{-3}	1	5.041×10^{-3}	154.97	<0.000 1
X_2X_3	6.561×10^{-3}	1	6.561×10^{-3}	201.70	<0.000 1
残差	2.277×10^{-4}	7	3.253×10^{-5}		
失拟项	1.805×10^{-4}	3	6.017×10^{-5}	5.10	0.074 8
误差	4.720×10^{-5}	4	1.180×10^{-5}		
总变异	0.052	16			

注：*、** 表示在 0.05、0.01 水平上显著、极显著。

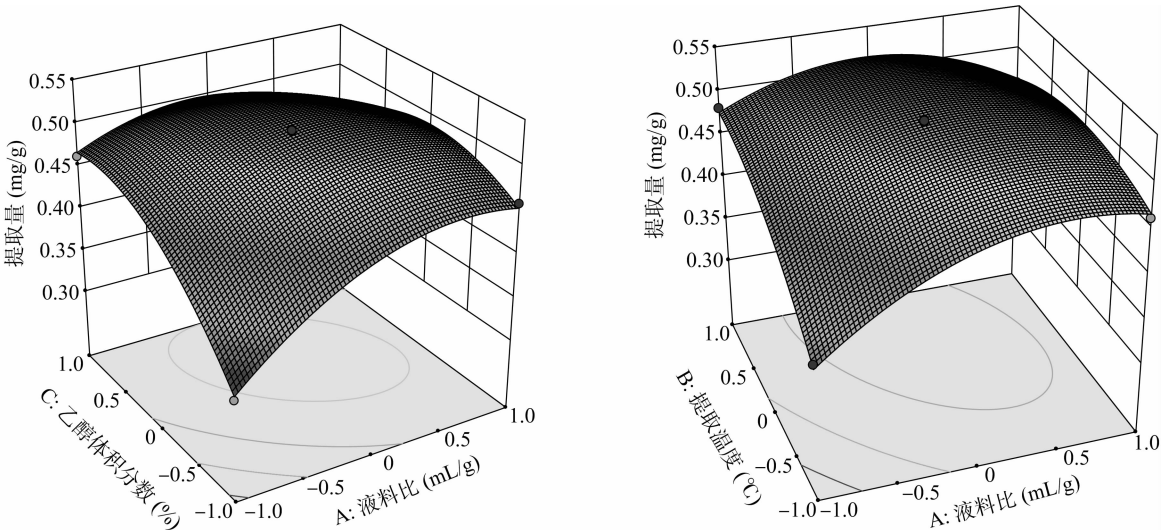


图2 料液比、提取温度及乙醇体积分数对黄酮提取量影响的响应面

样品和维生素 C 对 ABTS 自由基的清除能力见图 3 - A, 结果表明,样品对 ABTS 自由基的清除能力呈现一定的浓度依赖性,当浓度达到 1 500 $\mu\text{g/mL}$ 的时候,金钗石斛黄酮对 ABTS 自由基的清除能力接近于维生素 C,在更高浓度时 (2 000 ~ 3 500 $\mu\text{g/mL}$),其清除能力达 100%。表明金钗石斛黄酮对 ABTS 自由基有良好的清除能力。通过 SPSS 软件计算维生素 C 和金钗石斛的 IC_{50} 值分别为 343.56、684.89 $\mu\text{g/mL}$,表明金钗石斛黄酮对 ABTS 自由基的清除能力仍低于维生素 C。

2.3.2 DPPH 自由基清除活性 将维生素 C 标准品及金钗石斛黄酮提取液配制浓度为 3 000.00、1 500.00、750.00、375.00、187.50、93.75、46.875 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液。分别取维生素 C 及各样品液 0.3 mL,加入 0.9 mL DPPH 甲醇溶液 (0.1 mmol/L),室温暗反应 30 min,用紫外分光光度计在 517 nm 处测定吸光度^[17-18]。空白对照用超纯水代替样品液,重复 3 次。按下式计算:

$$\text{清除率} = \frac{D_{\text{空白对照}} - D_{\text{样品}}}{D_{\text{空白对照}}} \times 100\% \quad (D \text{ 为吸光度})。$$

样品和维生素 C 对 DPPH 自由基的清除能力见图 3 - B, 结果表明,样品对 DPPH 自由基的清除能力与其浓度呈正相关,在 0 ~ 750 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内,随着黄酮浓度的增加,对 DPPH 自由基的清除能力显著增强。当浓度达到 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时,金钗石斛黄酮对 DPPH 自由基的清除能力接近最大值,约 90%。表明金钗石斛黄酮对 DPPH 自由基有良好的清除能力。但通过 SPSS 软件计算维生素 C 和金钗石斛的 IC_{50} 值分别为 139.23、425.34 $\mu\text{g/mL}$,表明金钗石斛黄酮对 DPPH 自由基的清除能力仍低于维生素 C。

2.3.3 清除羟自由基活性 将维生素 C 标准品及金钗石斛黄酮提取物配制浓度为 3 000.00、1 500.00、750.00、375.00、187.50、93.75、46.875 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液。采用羟自由基试剂盒检测,用紫外分光光度计在 550 nm 处测定吸光度。空白对照用超纯水代替样品液,重复 3 次。计算清除率:

$$\text{清除率} = \left(1 - \frac{D_{\text{样品}} - D_{\text{空白对照}}}{D_{\text{空白对照}}} \right) \times 100\% \quad (D \text{ 为吸光度})。$$

样品和维生素 C 对羟自由基的清除能力如图 3-C, 结果表明, 维生素 C 对羟自由基有很好的清除能力, 且与其浓度呈正相关, 随着维生素 C 浓度的增加, 对羟自由基的清除能力显著增强。金钗石斛黄酮对羟自由基的清除能力也呈现一

定程度的浓度依赖性, 但其羟自由基清除能力低于阳性对照的维生素 C, 在高浓度 4 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其清除率为 51.8%, 表明金钗石斛黄酮具有一定的清除能力。通过 SPSS 软件计算维生素 C 和金钗石斛的 IC_{50} 值分别为 438.46、1 046.43 $\mu\text{g/mL}$, 表明金钗石斛黄酮对羟自由基的清除能力较对 ABTS 和 DPPH 这 2 种自由基的清除能力弱。

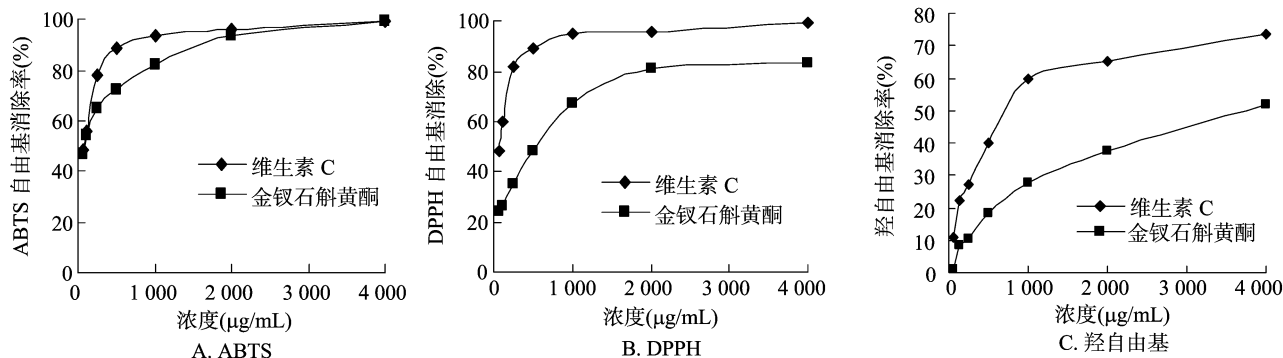


图3 维生素 C 和金钗石斛总黄酮抗氧化能力

2.4 金钗石斛黄酮对间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 的保护作用

将第 3 代的 MSC 细胞接种 96 孔板, 细胞浓度为 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}$, 每孔加入 100 μL 细胞液, 边缘孔加无均水保湿, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 换液, 每孔加入含不同浓度药物 (10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g/mL}$) 的完全培养液 100 μL , 每浓度设置 5 个复孔, 空白组和 H_2O_2 组加入 100 μL 完全培养液, 培养箱继续培养 24 h, 避光条件, 每孔加入 6 mmol/L H_2O_2 10 μL , 空白组不加 H_2O_2 , 培养 2 h 后取出, 每孔加 20 μL 细胞计数试剂盒 -8 (CCK-8), 继续培养 2 h, 与 490 nm 处酶标仪测定各孔吸光度。试验结果表明, 在 H_2O_2 能够明显引起 MSC 的伤, 与空白组相比具有显著差异 ($P < 0.001$)。与 H_2O_2 比较, 除 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组外, 金钗石斛黄酮均能不同程度地保护 MSC 免受 H_2O_2 的损伤, 黄酮浓度 20 $\mu\text{g/mL}$ 时开始有保护作用, 到 80 $\mu\text{g/mL}$ 时保护作用最强, 活性达到正常细胞的 80%, 损伤保护作用结果见图 4。

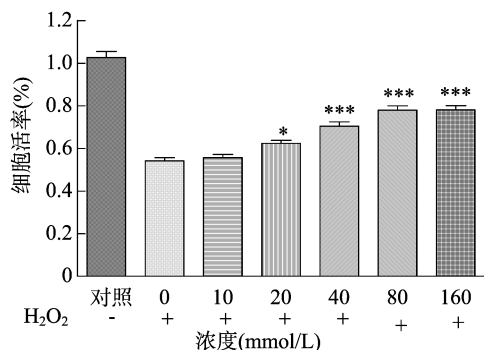


图4 总黄酮对 H_2O_2 引起的 MSC 损伤的保护作用

3 讨论与结论

采用响应面法对金钗石斛黄酮的提取条件进行优化, 建立了黄酮提取量的回归模型, 由该模型优化的黄酮提取条件

为提取时间 10 min、料液比 1 g : 15 mL, 提取温度 75 $^{\circ}\text{C}$, 乙醇体积分数为 90%。根据修正的最佳工艺条件, 进行 6 次重复试验, 测得黄酮提取量的均值为 $(0.5515 \pm 0.0004) \text{ mg/g}$, 与模型预测值相符, 进一步验证了该模型的可靠性。抗氧化活性试验表明, 金钗石斛黄酮对 ABTS 自由基、DPPH 自由基的清除作用明显, 对羟自由基有一定的清除能力。金钗石斛黄酮清除 ABTS 自由基、DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 684.89、425.34 $\mu\text{g/mL}$, 说明金钗石斛黄酮具有较好的抗氧化活性, 在天然抗氧化剂等领域具有较好的开发潜力。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 王琳, 叶庆生, 刘伟. 金钗石斛研究概况 (综述) [J]. 亚热带植物科学, 2004, 33 (2): 73-76.
- [3] 陈少夫, 李宇权, 吴亚丽, 等. 石斛对胃酸分泌及血清胃泌素、血浆生长抑素浓度的影响 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20 (3): 181-182, 193.
- [4] Yoon M Y, Hwang J H, Park J H, et al. Neuroprotective effects of SG-168 against oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Journal of Medicinal Food, 2011, 14 (1/2): 120-127.
- [5] 罗文娟, 王光辉, 张雪, 等. 金钗石斛茎提取物联苯类化合物对人肝癌高侵袭转移细胞株 FHCC-98 增殖的抑制 [J]. 中国临床康复, 2006, 10 (43): 150-152.
- [6] Miyazawa M, Shimamura H, Nakamura S, et al. Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45 (8): 2849-2853.
- [7] 邓银华, 徐康平, 谭桂山. 石斛属植物化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中药材, 2002, 25 (9): 677-680.
- [8] 李玉鹏, 蒋金和, 刘莹, 等. 金钗石斛化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (1): 39-40.
- [9] 刘春荣, 潘小炎. 石斛临床与药理研究近况 [J]. 广西中医药, 2002, 25 (2): 6-8.

孙 静,方 涛,张秀云. 姜油树脂对鲜榨苹果汁的抗菌作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):199-201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.046

姜油树脂对鲜榨苹果汁的抗菌作用

孙 静,方 涛,张秀云

(莱芜职业技术学院,山东莱芜 271199)

摘要:为防止鲜榨苹果汁受微生物污染而腐败变质,研究姜油树脂处理鲜榨苹果汁在贮藏期的 pH 值、滴定酸度、抗坏血酸含量、还原糖含量、多酚含量、微生物数量和感官特性,进而确定姜油树脂处理后鲜榨苹果汁的生物安全性。结果表明,与对照相比,冷藏温度(4℃)下贮藏 35 d,苹果汁质量稳定,抗坏血酸、多酚含量等变化不明显,菌落总数明显降低,证明姜油树脂用于鲜榨苹果汁抗菌效果好,是有效的生物防腐剂。

关键词:姜油树脂;鲜榨苹果汁;菌落总数;抗菌

中图分类号:TS275.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)24-0199-03

鲜榨苹果汁富含人体所需要的维生素、矿物质、蛋白质以及可溶性、不溶性纤维等多种营养物质,广受人们喜爱^[1]。但苹果汁榨取几个小时后由于大量致病微生物的存在和高的酶活性而变质,保质期短,破坏了果汁的感官和营养品质。传统的加热杀菌虽然可以杀灭鲜榨果蔬汁中的微生物,但不可避免地会破坏其风味,降低营养价值^[2]。

姜油树脂是用有机溶剂从生姜中萃取得到的具有芳香味的棕红色黏稠液体,具有特定的姜味和辛辣味,包含了生姜中几乎全部的香味和口味成分^[3]。研究表明,姜油树脂具有较强的抗氧化和抗菌作用,且无毒副作用,是国内外允许使用的重要天然食用色素之一,被广泛地应用于鲜肉、油脂、饮料等各类食品的贮藏和保鲜^[4-8]。

本研究将具有抗菌、抗氧化作用的姜油树脂应用于苹果汁中,研究姜油树脂对苹果汁的抗菌效果,并对抗菌效果进行评价,以期实现苹果汁饮料的保鲜,增加苹果汁的风味与营养。

收稿日期:2018-09-20

基金项目:山东省农业科技成果转化资金(编号:2014nzw33)。

作者简介:孙 静(1972—),女,山东莱芜人,硕士,副教授,研究方向为生物化工及生物化学教学及研究。E-mail: lzsyl568@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜苹果、生姜均从当地市场采购。3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂(青岛捷世康生物科技有限公司生产),平板计数琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司生产),UV-2102 PC 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司生产],FA1004 电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司生产),pH 酸度计(上海越平科学仪器有限公司生产),双人单面净化工作台、spx-150B 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂生产),XFH-30CA 电热压力蒸汽灭菌器(浙江新丰医疗器械有限公司生产),九阳榨汁机(九阳股份有限公司生产)等。

1.2 试验方法

1.2.1 姜油树脂制备 参照文献[9-10]中的亚临界流体丁烷萃取方法萃取得到姜油树脂,采用乙醇进行溶解,并于 4℃ 下保存 24 h 后过滤,滤液通过蒸发得到姜油树脂净油。

1.2.2 苹果汁的制备 选择成熟度适中,形态良好,无病虫害的苹果果实,用自来水冲洗 2~3 遍,再用蒸馏水冲洗 2~3 遍,切块,去柄,放入榨汁机中榨汁,用无菌布过滤。将溶于乙醇的不同浓度的姜油树脂加入到 10 mL 新鲜苹果汁中,进行优化研究,处理后的样品含有 0.05% 姜油树脂,于冷藏温度

[10] 张晓敏,孙志蓉,陈 龙,等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学,2014,31(7):895-899.

[11] 陈志国,叶松山,范 迎,等. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):27-32.

[12] 费 雯,淳 泽,何沁岚,等. 金钗石斛总多酚提取工艺及体外抗氧化活性[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(4):623-628.

[13] Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)[J]. Food Chemistry,2005,89(4):569-575.

[14] 罗 磊,张冰洁,朱文学,等. 响应面试验优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J]. 食品科学,2016,37(6):13-19.

[15] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity

applying an improved ABTS radical cation decolorization assay[J]. Free Radical Biology & Medicine,1999,26(9/10):1231-1237.

[16] Luo A X, Fan Y J. Antioxidant activities of berberine hydrochloride [J]. Journal of Medicinal Plant Research,2011,5(16):3702-3707.

[17] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1992,40(6):945-948.

[18] Gyamfi M A, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: thonningia sanguinea on experimentally-induced liver injuries[J]. General Pharmacology (The Vascular System),1999,32(6):661-667.