

黄芩根汉黄芩苷提取及复合保鲜液在圣女果贮藏中的应用

张晓虎, 杨风婷, 殷佳琦, 肖秦箭

(商洛学院 生物医药与食品工程学院, 陕西 商洛 726000)

摘要:利用商洛山区丰富的黄芩资源,采用微波辅助乙醇浸提正交试验确定其根部汉黄芩苷提取优化工艺条件;通过抑菌实验,确定汉黄芩苷的有效抑菌浓度;制备复合保鲜液,用于圣女果保鲜贮藏。结果表明:优化提取工艺参数为乙醇 50%、料液比 1:15、微波加热时间 8 min、微波功率 400 w 时,汉黄芩苷的提取率为 0.045%;向金黄色葡萄球菌添加浓度超过 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 汉黄芩苷、枯草芽孢杆菌和大肠埃希氏菌添加汉黄芩苷浓度超过 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,表现出抑菌效果;用 1.2% 海藻酸钠、2.0% 氯化钙、1.5% 抗坏血酸、0.5% 汉黄芩苷复合保鲜液处理后,圣女果的感官品质良好,失重率及腐烂率明显下降,效果明显优于不含汉黄芩苷的复合保鲜液。研究结果将为黄芩根中所含的汉黄芩苷作为防腐保鲜成分在果蔬保藏中的应用提供技术参考。

关键词:黄芩;汉黄芩苷;微波辅助;正交试验;保鲜

0 引言

在食品保鲜剂研究领域已广泛利用中草药等植物源中有效保鲜成分研发天然食品保鲜剂。药用植物黄芩的提取物能够有效抑制多种细菌生长,如金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、蜡样芽孢杆菌、沙门氏菌等,从黄芩中提取防腐保鲜物质并用于食品保藏已引起人们关注^[1]。

黄芩中的成分极为复杂,主要包括汉黄芩苷等在内的黄酮类物质是其发挥功效的主要活性成分^[2~4]。程存归等^[5]采用微波辅助水提或有机溶剂提取的方法研究得出黄芩中汉黄芩苷的最佳提取工艺;李芳等^[6]采用微波辅助乙醇回流联合方法从黄芩中提取汉黄芩苷;梁英等^[7]采用二次正交旋转组合试验研究乙醇回流浸提黄芩黄酮的优化工艺;王雪等^[8]采用中心组合设计一响应面法研究黄芩中抗菌有效活性成分优化提取工艺;魏长志^[9]研究比较表明黄芩对金黄色葡萄球菌和痢疾杆菌的抗菌活性的影响次于黄连而优于黄柏;霍峰岩等^[10]研究了不同浓度黄芩提取物对芒果贮藏保鲜效果的影响。但查阅文献未见有关针对黄芩根部汉黄芩苷提取物用于食品防腐保鲜的相关研究报道。

研究选取出自秦岭腹地商洛山区的量大、质优、国内知名的“五大商药”之一的黄芩^[11],采用

微波辅助乙醇浸提法从干燥的黄芩根部提取汉黄芩苷,用分光光度法测定汉黄芩苷的含量;根据单因素实验结果设计正交试验,确定最佳提取工艺;做汉黄芩苷抑菌实验,确定最佳抑菌浓度;制备复合保鲜液并用于圣女果的保鲜贮藏。研究结果将为黄芩中汉黄芩苷作为保鲜成分在果蔬保藏中的应用提供技术参考,促进商洛当地黄芩资源的综合开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 材料:两年生黄芩根(2017年9月13日采挖于陕西省商洛市商州区商洛学院中草药种植园);新鲜圣女果(2018年5月12日采摘于商州区刘湾街道办事处设施蔬菜棚区)。

试剂:汉黄芩苷标准品,无水乙醇,牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,抗坏血酸(Vc),海藻酸钠,氯化钙,酚酞,NaOH 溶液,蒸馏水等。

菌种:金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌。

1.1.2 仪器 MDS-6G 型多通量微波萃取系统,北京安和美诚科学仪器有限公司;755B 型紫外可见分光光度计,上海光学仪器仪器有限公司;SI-234 型电子分析天平,奥然科技有限公司;202 型电热恒温干燥箱,上海森信实验仪器有限

收稿日期:2019-01-16 修回日期:2019-04-08

基金项目:2016 年国家级大学生创新训练项目“黄芩有效成分的提取及抑菌效果的初步探究”(201611396012);2018 年国家级大学生创业训练项目“芩芬复方天然食品保鲜剂研发有限责任公司”(201811396002X);商洛市 2016 年科学技术研究发展计划项目“中国秦岭‘五大商药’系列专用肥配方研制”(SK2016-49);2018 年商洛市科技计划项目“秦岭‘五大商药’缓控释专用肥产业化开发与应用示范”(SK2018-23)。

第一作者简介:张晓虎(1962-),男,陕西商洛人,教授,硕士,硕士,主要从事农林生物教育与科研。

公司;HJH-DNP-9082 型恒温培养箱,广州航信科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验材料预处理 将完整挖出黄芩的根部洗净、去其皮及须根,置于烘箱中 60℃ 烘干,高速万能粉碎机粉碎,过 40 目筛,置于干燥的广口瓶内,密封保存备用。

1.2.2 汉黄芩苷标准曲线的制备 称取汉黄芩苷标准品 5 mg,放入 50 mL 容量瓶中,用 50%乙

醇定容。用移液管分别移取 1、2、3、4、5 mL 汉黄芩苷标准品溶液于 5 个 10 mL 的容量瓶中,用 50%乙醇定容,摇匀,放置 10 min,以空白乙醇溶液为对照,用紫外分光光度计在 330 nm 处测定其吸光度。每个样品测定 3 组平行,取平均值。绘制标准曲线见图 1,得到回归方程 $y = 13.757x + 0.0076$, $R^2 = 0.9947$,可以此求出汉黄芩苷的含量。

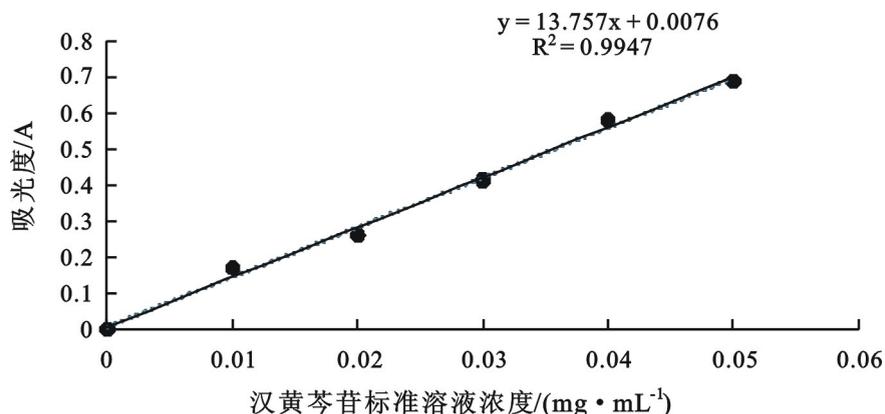


图 1 汉黄芩苷标准曲线

1.2.3 黄芩根汉黄芩苷的提取 精确称取黄芩根粉末 1 g,按一定料液比加定量乙醇,置于微波萃取系统,选择一定的微波功率进行提取,接受一定的微波辐射时间,待溶剂挥发冷凝回流后,取出冷却至室温,重新置于多通量微波萃取系统中,上述步骤重复操作以累计达到设计的总辐射时间值为至。提取完成后过滤,将上清液转入离心管中,5 400 r · min⁻¹ 离心 15 min 获取上清液,即得黄芩根提取液。

1.2.4 黄芩根汉黄芩苷提取率的测定 吸取黄芩根提取液 1 mL,以汉黄芩苷为标准,测定波长 330 nm 处的吸光度,结合 1.2.2 线性回归方程计算提取液中汉黄芩苷提取率,计算公式如下:

$$W\% = [(C \times n \times V) + M] \times 100\%$$

式中:C—提取液浓度,mg · mL⁻¹;n—稀释倍数;V—提取液体积,mL;M—所用黄芩根的质量,mg。

1.2.5 单因素实验 以黄芩根部汉黄芩苷提取率为指标,研究乙醇体积分数(40、50、60、70、80%)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)、微波功率(300、400、500、600、700 W)、微波加热时间(2、4、6、8、10 min)4 个因素对黄芩根中汉黄芩苷提取率的影响^[12]。

1.2.6 正交试验设计 依据以上 4 个考察因素,

以汉黄芩苷的提取率为指标,设计 4 因素 3 水平的正交试验^[13]。

1.2.7 抑菌效果试验 研究汉黄芩苷提取液对大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果,确定最低抑菌浓度^[14、15]。

1.2.8 复合保鲜液的配制 选用抗坏血酸、海藻酸钠、氯化钙、汉黄芩苷提取液作为保鲜液配方的组分,采用不同浓度进行试验设计,见表 1。

1.2.9 保鲜效果试验 取当日采摘的新鲜圣女果用蒸馏水冲洗干净,晾干后将配方不同保鲜液喷洒至圣女果上,放置在 20℃、相对湿度为 70% 的培养箱中进行贮藏保鲜,对照空白组用蒸馏水处理,间隔 1d 取样测定防腐保鲜效果指标^[16、17]。圣女果的感官品质、腐烂率、失重率均用全部果实测定;可滴定有机酸含量测定的圣女果,随机取样、破碎、匀浆。试验均重复 3 次,取其平均值。

感官品质:观察圣女果外观、色泽,测定硬度,评价风味与口感,判断其优劣状况。

腐烂率% = (腐烂果实质量/总果实质量) × 100%

失重率% = [(原重 - 实重)/原重] × 100%

可滴定酸含量:每组称取圣女果 100 g,去掉果皮后匀浆,量取 5 mL 浆液,蒸馏水定容至 50 mL 后过滤并收集滤液,酚酞作指示剂,用标准

NaOH 溶液滴定,以柠檬酸为折算系数,以碱液的耗量计算可滴定酸的含量。同时以蒸馏水做空白对照,此时测定的即为圣女果果肉中有机酸的含量。

表 1 汉黄芩苷复合保鲜液配方

| 复合保鲜液(编号) | Vc/% | 海藻酸钠/% | 氯化钙/% | 汉黄芩苷/% |
|-----------|------|--------|-------|--------|
| 1 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 0.25 |
| 2 | 0.5 | 1.2 | 4.0 | 0.5 |
| 3 | 0.5 | 1.4 | 6.0 | 0.75 |
| 4 | 1.0 | 1.0 | 4.0 | 0.75 |
| 5 | 1.0 | 1.2 | 6.0 | 0.25 |
| 6 | 1.0 | 1.4 | 2.0 | 0.5 |
| 7 | 1.5 | 1.0 | 6.0 | 0.75 |
| 8 | 1.5 | 1.2 | 2.0 | 0.5 |
| 9 | 1.5 | 1.4 | 4.0 | 0.25 |

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 乙醇体积分数对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响 如图 2 所示,汉黄芩苷提取率随乙醇体积分数增加而逐渐增加;达到 50%后,汉黄芩苷提取率又迅速下降,结果显示并非乙醇体积分数越高提取率越高,其作用浓度范围是一定的。究其原因:一是微波加热是直接作用于介质分子,乙醇和水都是极性分子,但两者在结构上有较大差异,须有一定比例关系才能使效果达到最佳。二是虽然乙醇溶液对汉黄芩苷具备良好的溶解性,但在一定浓度范围内,汉黄芩苷的溶解效果较好。因此,选取 50%作为较佳的乙醇体积分数。

2.1.2 料液比对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

如图 3 所示,汉黄芩苷的提取率随着料液比的增加而增加,但在料液比为 1:15 之后又开始下降,即当料液比为 1:15 时提取率最高。因此,选择 1:15 作为较佳的料液比。

2.1.3 微波功率对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

如图 4 所示,在 500W 微波功率范围内,随着微波功率的升高,提取率逐渐增大。功率 500W 时,提取率达到最大。由此可知,随着微波功率的增加,黄芩细胞破坏更充分,更多的汉黄芩苷从原料中溶出。因此,选取 500W 作为最佳的微波功率。

2.1.4 微波加热时间对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响 如图 5 所示,汉黄芩苷提取率随加热时间推移有所增加,当加热时间为 6 min 时,提取率最大。当加热时间继续上升时,提取率开始下降,这是因为微波可以瞬间产生大量热量,温度过高、加热时间过长可能会对汉黄芩苷有破坏作用。因此,选取 6 min 作为最佳加热时间。

2.2 正交试验结果与分析

选取乙醇体积分数(A)、料液比(B)、微波加热时间(C)、微波功率(D)为影响黄芩根汉黄芩苷提取率的因素,黄芩苷的提取率为指标,设计 4 因素 3 水平的正交试验。正交试验设计及结果见表 2。

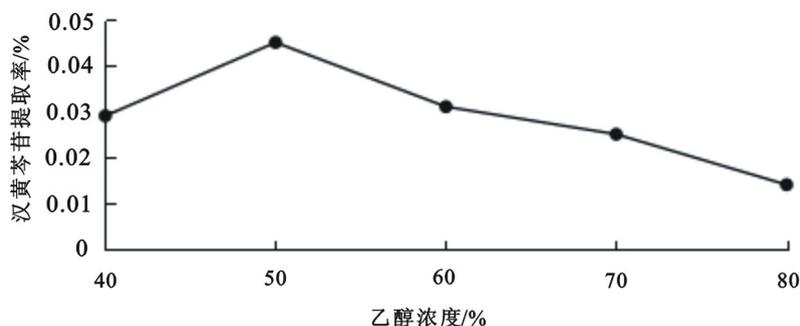


图 2 乙醇体积分数对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

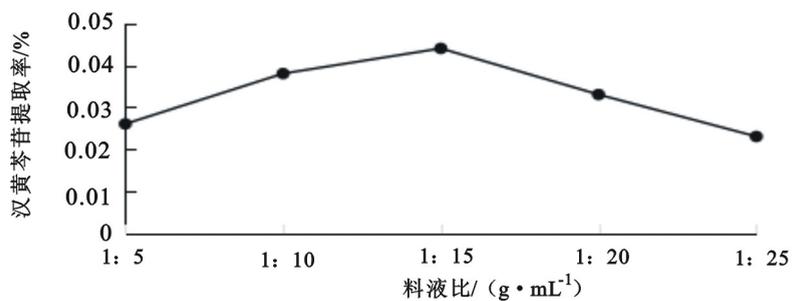


图 3 料液比对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

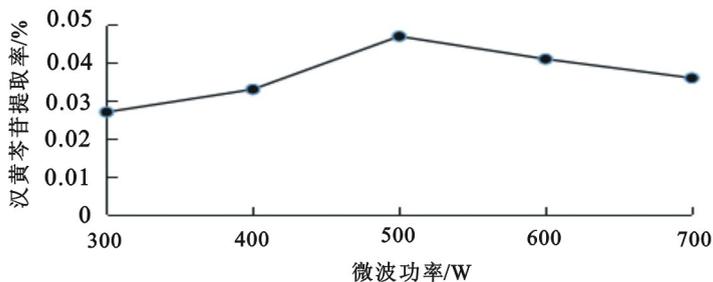


图 4 微波功率对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

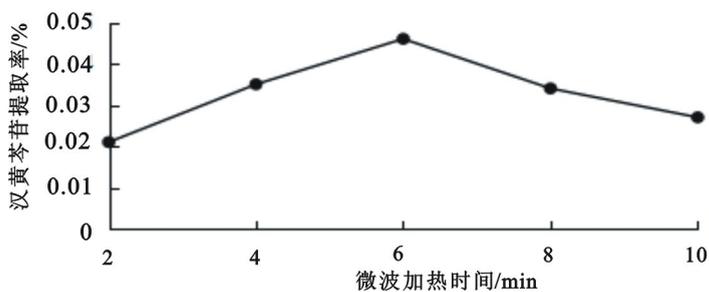


图 5 微波加热时间对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响

表 2 正交试验设计及结果

| 实验号 | 因素 | | | | 汉黄芩苷提取率/% |
|----------------|---------------|--------------------------------|-----------------|-------------|-----------|
| | A 乙醇体积分数/% | B 料液比/(g·mL ⁻¹) | C 微波加热时间/min | D 微波功率/W | |
| 1 | 1(40) | 1(1:10) | 1(4) | 1(400) | 0.020 |
| 2 | 1 | 2(1:15) | 2(6) | 2(500) | 0.026 |
| 3 | 1 | 3(1:20) | 3(8) | 3(600) | 0.036 |
| 4 | 2(50) | 1 | 2 | 3 | 0.039 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.045 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.015 |
| 7 | 3(60) | 1 | 3 | 2 | 0.025 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.029 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.040 |
| K ₁ | 0.082 | 0.084 | 0.064 | 0.105 | |
| K ₂ | 0.099 | 0.100 | 0.105 | 0.066 | |
| K ₃ | 0.094 | 0.091 | 0.106 | 0.104 | |
| k ₁ | 0.027 | 0.028 | 0.021 | 0.035 | |
| k ₂ | 0.033 | 0.033 | 0.035 | 0.022 | |
| K ₃ | 0.031 | 0.030 | 0.035 | 0.035 | |
| R | 0.017 | 0.016 | 0.042 | 0.039 | |

由表 2 结果可知,根据极差分析判定对黄芩根汉黄芩苷提取率的影响因素大小依次为:微波加热时间>微波功率>乙醇体积分数>料液比。由正交试验结果可得出最佳水平组合为

$A_2B_2C_3D_1$ 。因此,经正交设计优化后的提取条件为乙醇体积分数 50%、料液比 1:15、微波加热时间 8 min、微波功率 400 W。

2.3 抑菌试验结果与分析

表 3 汉黄芩苷对三种供试菌种的抑菌效果

| 菌种 | 汉黄芩苷浓度/(mg·mL ⁻¹) | | | | | | | 对照 |
|---------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | |
| 大肠埃希氏菌 | +++ | ++ | + | + | - | - | - | +++ |
| 枯草芽孢杆菌 | +++ | ++ | + | + | - | - | - | +++ |
| 金黄色葡萄球菌 | + | - | - | - | - | - | - | +++ |

注:表中“-”表示无菌长出;“+”表示有少量菌落长出;“++”表示有大量菌落长出;“+++”表示培养皿几乎长满菌落。

由表 3 抑菌效果分析可得:金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为 0.20 mg·mL⁻¹;枯草芽孢杆菌和大肠埃希氏菌最低抑菌浓度为 0.50 mg·mL⁻¹。

2.4 保鲜效果试验结果与分析

2.4.1 感官指标趋势分析 如图 6 所示,随着保藏时间延长,不同浓度复配保鲜液处理的圣女果的综合感官评分均为下降趋势。由实验可以看出,圣女果经复合保鲜液处理后,综合感官评分虽下降但圣女果感官出现了不同程度变化,第 8 组处理对综合感官评分变化最小,空白对照组综合感官评分下降最明显速度最快,说明复合保鲜液能明显的改善圣女果的感官品质。

2.4.2 腐烂率指标趋势分析 如图 7 所示,随着保藏时间的延长,圣女果的烂果率呈上升趋势,且于 3 d 后大幅上升;7 d 时处理 1 在抑制圣女果

腐烂方面的效果最差,烂果率已经高达 39%,而处理 8 果实的烂果率显著低于其他处理为 22%,空白对照组效果最差。

2.4.3 失重率指标趋势分析 如图 8 所示,随保藏时间延长,圣女果的失重率随之增加,其中处理 8 上升的趋势最缓慢,7 d 时失重率为 3.9%,而处理 2 已经达到 7.8%,空白对照组上升迅速,圣女果失水严重。从失重率指标可知,最佳复配组合是处理 8。

2.4.4 可滴定有机酸趋势分析 圣女果中的有机酸在贮藏期间,部分通过呼吸作用被消耗,部分在果肉内转化为糖分。如图 9 所示,在贮藏中的酸含量整体呈下降趋势,第 8 组处理下降速度稍慢,可见复配保鲜液有效延缓了圣女果贮藏期间可滴定酸含量的下降趋势,有利于提高圣女果贮藏保鲜效果。

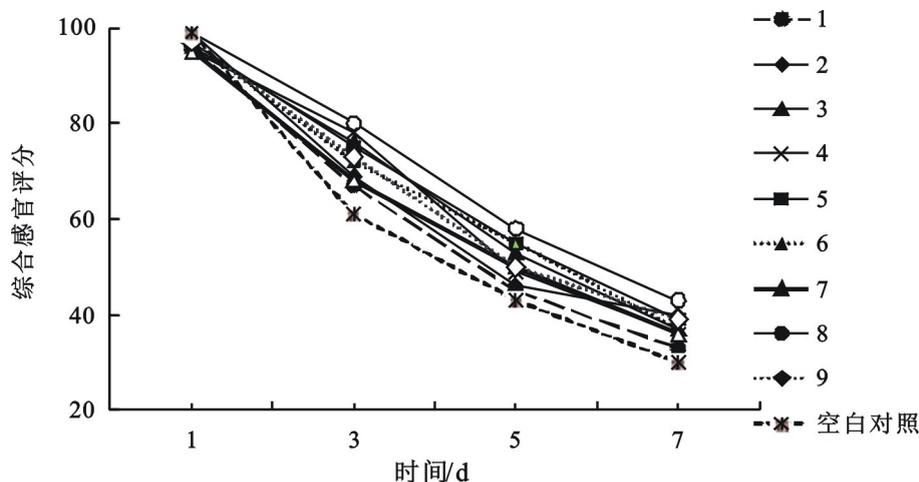


图 6 综合感官指标随保藏时间变化趋势

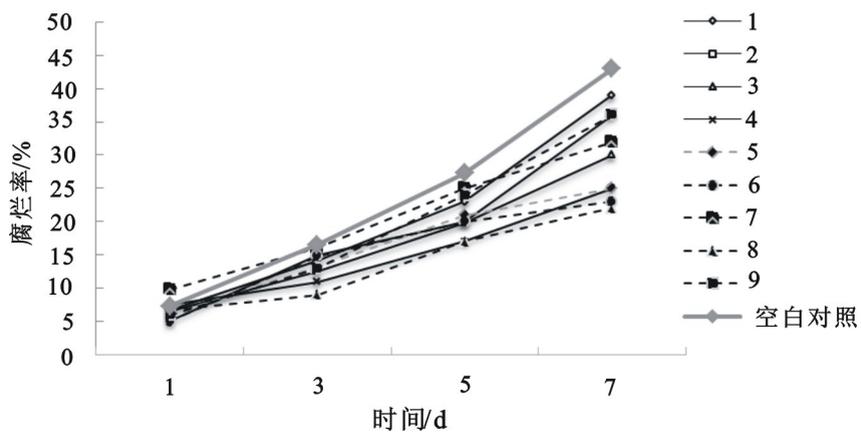


图 7 腐烂率随保藏时间变化趋势

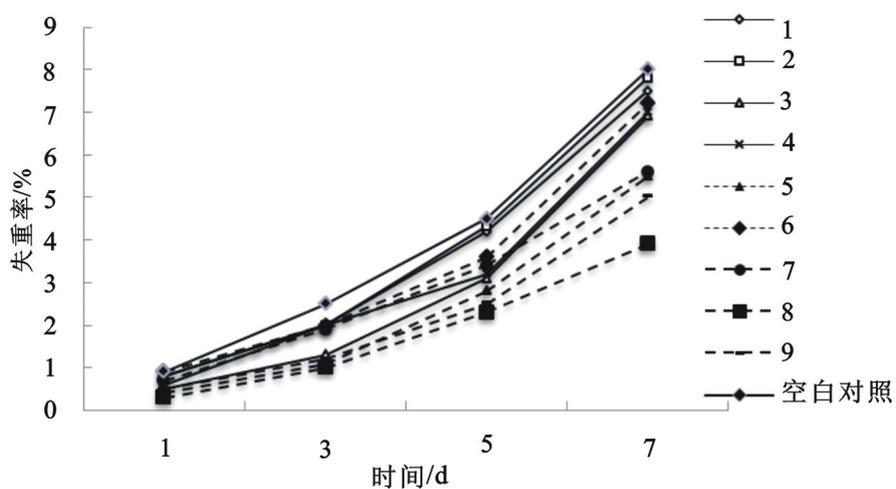


图 8 失重率随保藏时间变化趋势

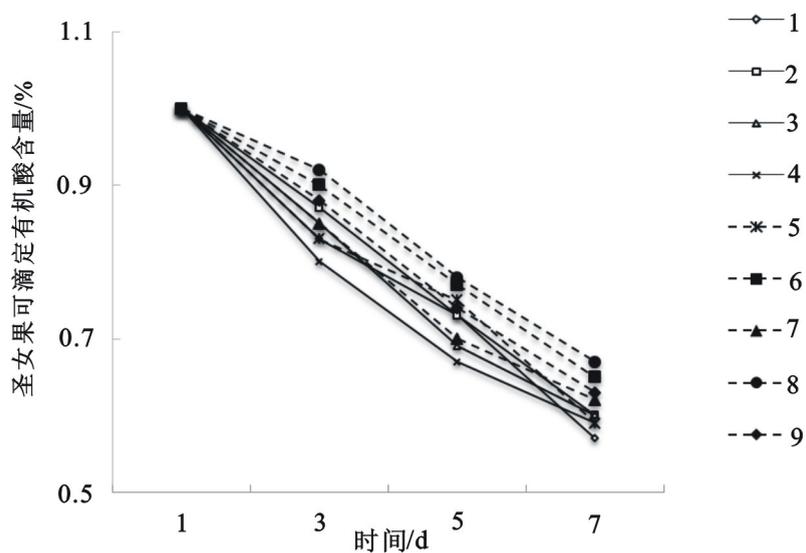


图 9 可滴定有机酸随保藏时间变化趋势

3 结论与讨论

3.1 结论

以商洛黄芩为研究对象,采用微波辅助乙醇浸提正交试验的方法优化黄芩根中汉黄芩苷的提取工艺;在汉黄芩苷抑菌实验的基础上,制备汉黄芩苷提取物与海藻酸钠、氯化钙和抗坏血酸复合保鲜液并用于圣女果保藏,得到以下结论:

(1)基于正交试验优化取得的汉黄芩苷提取工艺参数为:乙醇体积分数 50%、料液比 1:15、微波加热时间 8 min、微波功率 400 W。影响提取率的因素大小依次为微波加热时间>微波功率>乙醇体积分数>料液比。

(2)抑菌实验表明:当金黄色葡萄球菌中汉黄芩苷的添加浓度超过 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,枯草芽孢杆菌和大肠埃希氏菌添加浓度超过 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,表现出抑菌效果。

(3)制备的复合保鲜液最优配方为:海藻酸钠浓度 1.2%、氯化钙 2.0%、抗坏血酸 1.5%、汉黄芩苷 0.5%;使用该配方能有效改善圣女果贮藏期间的感官品质,抑制失重率及腐烂率的上升,延缓可滴定酸含量下降趋势,保鲜效果良好。

3.2 讨论

(1)研究采用微波辅助乙醇浸提黄芩根汉黄芩苷,微波辅助法能够破坏植物细胞壁,加速汉黄芩苷溶出,比传统方法省时省力且安全无污染,利于提高提取率。

(2)研究取得的有关黄芩根中汉黄芩苷提取工艺参数,对汉黄芩苷的抑菌效果及最低抑菌浓度进行初步研究,未对汉黄芩苷进行分离纯化处理。结果表明黄芩根汉黄芩苷对大肠埃希氏菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均有一定抑制效果,试验结果与黄芩有效抑菌成分的研究结论基本一致^[18]。

(3)建议在以后的研究中注意:适宜的微波加热时间是影响汉黄芩苷提取率的重要因素,因为微波可以瞬间产生大量热量,温度升高,加热时间过长会对汉黄芩苷有破坏作用,因此需控制微波加热时间,否则会造成有效成分流失,降低汉黄芩苷提取率。

参 考 文 献:

[1] 张晓虎. 寓药用植物食品防腐保鲜研究于创新创业

教育[J]. 广州化工, 2018, 46(06): 117-120.

- [2] 王雅芳,李婷,唐正海,等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(01): 206-211.
- [3] 陈煜娟,孙裕. 黄芩根系中黄酮类成分测定与综合利用研究[J]. 西部中医药, 2017, 30(08): 17-19.
- [4] 申云富,范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(04): 98-101.
- [5] 程存归,金文英,吴兰菊. 从黄芩中微波辅助提取黄芩苷的研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(01): 81-83.
- [6] 李芳,戴跃玲,廖克俭. 微波辅助乙醇回流法提取黄芩苷[J]. 辽宁化工, 2010, 39(01): 8-11.
- [7] 梁英,韩鲁佳,任成才,等. 黄芩黄酮浸提工艺优化研究[J]. 中成药, 2008, 30(07): 1 068-1 070.
- [8] 王雪,刘燕隔,逯家辉,等. 黄芩中抗菌有效成分提取工艺研究[J]. 生物质化学工程, 2015, 49(05): 34-38.
- [9] 魏长志. 黄芩、黄连、黄柏体外抗金黄色葡萄球菌和痢疾杆菌对比实验[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(03): 159-160.
- [10] 霍峰岩,夏宁,韦保耀,等. 黄芩提取物对芒果贮藏保鲜的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 342-346, 349.
- [11] 张晓虎,王渭玲. 商洛黄芩铁、铜、锌、锰累积规律和施肥对其影响研究[J]. 陕西农业科学, 2015, 61(10): 31-34.
- [12] 张晓虎,田西彬. 洛南连翘果实中芦丁和槲皮素提取方法研究[J]. 陕西农业科学, 2015, 61(11): 26-30.
- [13] 张明. 山楂黄酮提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(33): 11 857-11 858.
- [14] 张莉,吴润,刘磊,等. 不同提取方法对中草药抑菌效果的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(02): 25-33.
- [15] 郭爱莲,吴重华. 几种香辛料防腐作用的初步研究[J]. 食品科学, 1995, 16(05): 7-10.
- [16] 李鹏霞,张兴,刘亚敏,等. 36种精油对采后番茄防腐保鲜活性的影响[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(03): 156-159.
- [17] 陶永元,舒康云,吴加美,等. 茶多酚与壳聚糖复配对草莓保鲜效果的影响[J]. 中国食品添加剂, 2012, 35(05): 224-230.
- [18] 施高翔,邵菁,汪天明,等. 黄芩及其有效成分抗菌作用新进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3 713-3 718.