

生姜黄酮超声提取及其抑菌活性研究

姜少娟, 刘晓莉

(攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000)

摘 要:以生姜为原料,采用超声波辅助提取技术,通过单因素试验和正交实验设计优化了黄酮的提取工艺条件,同时采用滤纸片法进行了生姜黄酮抑菌活性的研究。结果表明:生姜黄酮的超声提取最佳工艺条件为 80% 的乙醇,料液比 1:12 g/mL,在 50℃ 下提取 15 min;生姜黄酮对 4 种菌均有不同程度的抑制作用,且抑制作用的强弱次序为枯草芽孢杆菌>黑曲霉>青霉菌>大肠杆菌。

关键词:生姜;超声提取;黄酮;正交实验;抑菌活性

中图分类号:S 632.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0120-04

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)属姜科(Zingiberaceae)姜属多年生宿根草本植物,是一种广为人知的药食兼用植物,在我国中部、东南部至西南部都广为栽培,具有散寒解表、温中止吐、回阳通脉、燥湿消痰的功效^[1-2]。现代研究表明,生姜中含有丰富的黄酮类物质,黄酮类化合物具有抗氧化、清除自由基、降糖降脂、抗菌消炎、抗衰老与治疗心脑血管疾病等多种药理活性^[3-4]。但目前,对生姜黄酮的提取大多仍采用常规的提取方法^[5-7],为了更好的利用生姜资源,该试验在前人研究的基础上,采用超声辅助提取方法,系统研究了生姜黄酮的提取工艺条件及其抑菌活性,以期对生姜的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试生姜购于攀枝花市九附六菜市场。去泥洗净的新鲜生姜切片后于 60℃ 下烘干,粉碎后过 60 目筛,密封备用。

培养基成分:牛肉膏、蛋白胨、琼脂、NaCl、1 mol/L NaOH、1 mol/L HCl。

菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、青霉菌(*Penicillium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

试剂:无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙酸乙酯、甲醇等试剂均为 AR 级,芦丁标准品(生化试剂,上海化学试剂公司)。

仪器:SB 120D 型超声波清洗仪,DS-200 高速组织

捣碎机,722 型可见分光光度计,DH-500AB(303_3AB)型电热恒温培养箱,SW-CJ-1C_μ 型双人单面净化工作台,YX280B 型高压蒸汽灭菌器,202 型电热恒温干燥箱,DZKW-S-6 型电热恒温水浴锅等。

1.2 试验方法

1.2.1 生姜黄酮的提取 准确称取一定量的生姜粉,加入提取溶剂超声辅助提取一定时间后,过滤,将滤液(重复提取 3 次后合并滤液)用提取溶剂定容到 50 mL 容量瓶中,待用。

1.2.2 标准曲线的制备 称取芦丁 20.00 mg,用 30% 乙醇定容到 100 mL,配成浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁标准溶液。用移液管吸取芦丁标准液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 6 个 10 mL 试管中,向每支试管中加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀后静置 6 min;再向各试管中加入 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液摇匀,静置 6 min 后加入 2 mL 4% NaOH 溶液,用 30% 的乙醇定容到 10 mL,摇匀后静置 15~20 min。以 30% 乙醇溶液作为空白溶剂,在 500 nm 处进行比色,然后以芦丁标准液浓度作为横坐标,以吸光值作为纵坐标,制作成标准曲线(回归方程为 $y=1.0927x+0.0145$, $R^2=0.9968$)。

1.2.3 黄酮含量的测定 从 1.2.1 所得提取液中吸取 1 mL,按 1.2.2 中方法处理后,于 500 nm 处测定吸光值,利用回归方程即可求得黄酮的含量。

1.2.4 单因素试验 溶剂浓度的选择:称取 2.0 g 生姜粉,置于 50 mL 三角瓶中,分别配置最佳提取溶剂乙醇的浓度为 50%、60%、70%、80%、90%,按料液比 1:8 g/mL 加入各浓度提取溶剂,在 40℃ 下超声辅助提取 10 min,平行试验 3 次,按 1.2.2 方法分别测定其吸光值,根据所测得吸光值计算黄酮的得率。料液比的选择:称取 2.0 g 生姜粉,置于 50 mL 三角瓶中,取 80%

第一作者简介:姜少娟(1979-),女,陕西西安人,硕士,讲师,现主要从事天然产物化学等研究工作。

收稿日期:2013-10-23

乙醇并分别以 1:6、1:8、1:10、1:12、1:15 g/mL 料液比往瓶中加入溶剂,在 40℃ 下,超声辅助提取 10 min,平行试验 3 次,按 1.2.2 方法分别测定其吸光值,根据所测得吸光值计算黄酮的得率。提取温度的选择:称取 2.0 g 生姜粉,置于 50 mL 三角瓶中,取 80% 乙醇按料液比 1:10 g/mL 加入溶剂,分别在 40、50、60、70、80℃ 下超声辅助提取 10 min,并按 1.2.2 方法分别测定其吸光值,根据所测得吸光值计算黄酮的得率。提取时间的选择:称取 2.0 g 的生姜粉,置于 50 mL 三角瓶中,取 80% 乙醇按照 1:8 g/mL 加入提取溶剂,在 60℃ 进行提取,分别超声提取 5、10、15、20、25 min,平行试验 3 次后,并按 1.2.2 方法分别测定其吸光值,根据所测得吸光值计算黄酮的得率。

1.2.5 正交实验设计 为系统考察提取总黄酮的工艺参数,选用溶剂浓度、料液比、提取温度、提取时间作为考察因素,以黄酮含量为考察目标,以 $L_9(3^4)$ 正交实验进行设计,并对吸光度 A 值及黄酮得率进行分析,确定最佳提取条件,正交实验因素与水平见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	A 溶剂浓度 Solvent concentration /%	B 料液比 Solid-liquid ratio /g · mL ⁻¹	C 提取温度 Extraction temperature /℃	D 提取时间 Extraction time /min
1	70	1:8	50	10
2	80	1:10	60	15
3	90	1:12	70	20

1.2.6 生姜黄酮的抑菌活性试验 取供试菌种,细菌在 37℃ 培养 24 h,真菌在 28℃ 培养 24 h 进行活化。取活化好的菌种斜面,并通过血细胞计数板计数法用无菌生理盐水配制成 10^6 cfu/mL 的菌悬液,备用。生姜黄酮的抑菌作用采用滤纸片扩散法^[8-9]:用直径为 6 mm 的滤纸片(经过干热灭菌)浸渍黄酮提取液(使用倍比稀释法将生姜黄酮提取物用丙酮倍比稀释 10%、5%、2.5%、1.25%、0.625% 系列浓度溶液),过夜,晾干备用。配制上述菌种分别所需的培养基,将培养基、培养皿等容器放入高压蒸汽锅灭菌 20 min,经灭菌后的培养基倒入培养皿中冷却。待培养基完全冷却后用无菌移液管向培养皿中分别加入 0.1 mL 菌悬液,用涂布棒涂布均匀。再用无菌镊子夹取制备好的滤纸片,放入含菌平皿中,每皿贴 3 片,另外贴 1 片纯丙酮浸泡的滤纸片为空白对照(CK),每种提取物做 3 次重复试验。细菌在 37℃ 条件下恒温培养 24~48 h,真菌在 28℃ 条件下恒温培养 48 h 后,观察抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对生姜黄酮提取效果的影响 由图 1

可知,随着乙醇浓度的增加,生姜黄酮的提取率随之增加;当乙醇浓度为 80% 时,黄酮提取率最高;当乙醇浓度超过 80% 时,黄酮提取率有所下降。说明较高浓度乙醇会增加其它醇溶性杂质的溶出,从而影响黄酮提取率。因此,乙醇浓度取 80% 左右为宜。

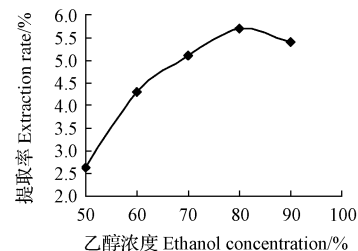


图 1 不同浓度乙醇对生姜黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of ethanol on flavonoids extraction rate

2.1.2 料液比对生姜黄酮提取效果的影响 由图 2 可知,随着料液比的增加,生姜黄酮的提取率不断增加,但当料液比大于 1:10 g/mL 以后,继续增加提取溶剂的量对生姜黄酮提取率影响不大,所以,考虑到生产成本的节约原则,料液比取 1:10 g/mL 左右为宜。

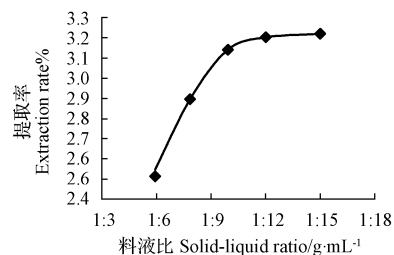


图 2 不同料液比对生姜黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio on flavonoids extraction rate

2.1.3 提取温度对生姜黄酮提取效果的影响 由图 3 可知,随着温度的升高,黄酮的得率不断增加,当浸提温度达到 60℃ 时,黄酮得率最高,这主要是因为随着温度的增加,黄酮在乙醇中的溶解度也增加,同时提取液扩散系数也增加,促使提取速度加快;但当浸提温度大于

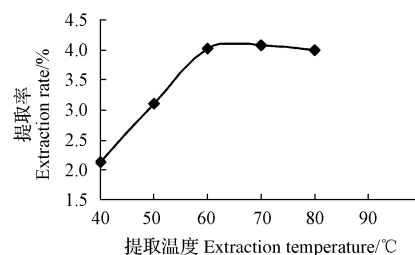


图 3 不同提取温度对生姜黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of extraction temperature on flavonoids extraction rate

60℃后,黄酮得率略有下降,这可能是由于温度太高使黄酮发生氧化结构发生破坏,且温度过高也会造成杂质溶出增多和溶剂的损失,导致黄酮得率略有下降。因此确定浸提温度以 60℃左右为最佳。

2.1.4 提取时间对生姜黄酮提取效果的影响 由图 4 可知,随提取时间的增加,黄酮提取率不断上升。当提取时间为 15 min 时,黄酮的得率最高,当提取时间超过 15 min,黄酮得率略有下降。因为在 15 min 左右时,黄酮类物质在溶液中的扩散已趋于平衡,提取时间过长,还会造成溶剂损失,杂质溶出,使得提取率降低。因此,确定最佳提取时间为 15 min 左右为最宜。

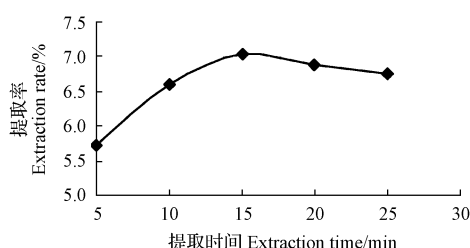


图 4 不同提取时间对生姜黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effects of extraction time on flavonoids extraction rate

2.2 正交实验结果

从表 2 可以看出,根据极差分析,各因素对提取工艺影响的大小顺序依次是 A>D>C>B,即乙醇浓度对生姜黄酮的提取率的影响最大,其次为提取时间、提取温度,料液比的影响最小。A₂B₃C₁D₂ 为生姜黄酮提取的最佳工艺组合,即用 80%的乙醇进行超声辅助提取,料液比为 1:12 g/mL,在 50℃的条件下提取 15 min。

表 2 L₉(3⁴)正交实验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal experiment

编号 No.	A 乙醇浓度 Solvent concentration/%	B 料液比 Solid-liquid ratio /g·mL ⁻¹	C 提取温度 Extraction temperature/℃	D 提取时间 Extraction time/min	黄酮提取率 Extraction rate/%
1	1	1	1	1	4.542
2	1	2	2	2	6.395
3	1	3	3	3	6.235
4	2	1	2	3	9.849
5	2	2	3	1	7.516
6	2	3	1	2	10.421
7	3	3	3	2	4.999
8	3	2	1	3	5.823
9	3	1	2	1	5.319
K ₁	5.724	6.463	6.929	5.792	
K ₂	9.262	6.578	7.188	7.272	
K ₃	5.380	7.325	6.250	7.302	
R	3.882	0.862	0.938	1.510	

2.3 生姜黄酮的抑菌活性试验结果

从表 3 可以看出,生姜黄酮对 4 种菌均有不同程度的抑制作用,抑制作用的强弱为枯草芽孢杆菌>黑曲霉>青霉菌>大肠杆菌;随着黄酮浓度的增大对 4 种菌的抑菌作用也越强,并且对黑曲霉、青霉菌、大肠杆菌以及枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别为 2.5%、5%、10%、1.25%。

表 3 生姜黄酮的抑菌活性试验结果

Table 3 Result of antibacterial activity of flavonoids from ginger

供试菌种 Pathogens	生姜黄酮浓度 Concentration of flavonoids/%					空白对照 CK
	0.625	1.25	2.5	5	10	
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	—	—	+	+	+	—
青霉菌 <i>Penicillium</i>	—	—	—	+	+	—
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	+	—
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	—	+	+	+	+	—

注:“+”表示有抑菌圈;“—”表示无抑菌圈。

Note:“+” means inhibition zone;“—” means no inhibition zone.

3 结论

该试验结果表明,生姜黄酮超声提取最佳工艺条件为生姜黄酮用 80%的乙醇进行超声辅助提取,料液比为 1:12 g/mL,在 50℃的条件下提取 15 min;且各因子对黄酮提取工艺影响的大小顺序依次为乙醇浓度>提取时间>提取温度>料液比。

生姜黄酮对 4 种菌均有不同程度的抑制作用,且抑制作用的强弱为枯草芽孢杆菌>黑曲霉>青霉菌>大肠杆菌;并且对黑曲霉、青霉菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度分别为 2.5%、5%、10%、1.25%。由此可见,生姜黄酮可作为好的抑菌剂,在植物源抑菌剂的开发和应用中具有广阔的前景。

参考文献

- [1] 郭雅翠. 溶剂热法提取生姜总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010,38(34):19371-19373.
- [2] 莫开菊,柳圣,程超. 生姜黄酮的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006,27(9):110-115.
- [3] 杨洋. 生姜黄酮的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4):45-50.
- [4] 王啸. 生姜活性部位与成分研究进展[J]. 中医研究, 2009, 22(12): 53-55.
- [5] 朱茂田,马力. 生姜黄酮的分离和纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2006,27(3):57-58.
- [6] 辛莉,黄桂东,钟先锋,等. 生姜总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材, 2008,31(5):766-768.
- [7] 杨郭,颜杰,杨虎,等. 应用二次回归正交设计优化生姜黄酮的提取工艺[J]. 云南化工, 2009,36(4):24-27.
- [8] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000:108.
- [9] 王瑞君. 几种中草药对金黄色葡萄球菌体外抑制作用的研究[J]. 现代食品科技, 2009,25(9):1104-1106.

响应面法优化新疆野酸梅果肉多酚提取工艺研究

刘伟¹, 杨如箴², 李紫薇¹, 闫丽丽¹, 许凌燕¹

(1. 伊犁师范学院 化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000; 2. 伊犁州农业技术推广总站, 新疆 伊宁 835000)

摘要:以新疆野酸梅果肉为原料,以多酚提取量为指标,在单因素试验基础上,采用3因素3水平的Box-Behnken试验设计优化新疆野酸梅果肉多酚提取工艺。结果表明:新疆野酸梅果肉多酚最佳提取工艺为乙醇体积分数39%,料液比1:35 g/mL,提取温度63.1℃,提取时间90 min,多酚提取量为13.89 mg/g,与理论预测值(13.96 mg/g)相符合。表明响应面法用于优化野酸梅果肉多酚提取工艺稳定、可行。

关键词:野酸梅(櫻桃李);响应面分析法;多酚

中图分类号:S 663.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0123-04

野酸梅学名櫻桃李(*Prunus cerasifera*),属蔷薇科落叶灌木或小乔木,是珍贵的野生小浆果种,果肉柔软多汁,果皮红色至紫黑色^[1-2]。主要分布于中亚天山、高加索、小亚细亚及巴尔干半岛,新疆伊犁地区天山地段是它分布区的东端,在我国仅分布于新疆霍城县的大西沟和小西沟,也是目前世界仅存的野生纯林^[3-4]。居住在天山大西沟的哈萨克牧民长期食用野酸梅果酱或将果实晒干泡茶饮用,高血脂及高血压患者较少,因此野酸梅被誉为“雪域珍果”^[5],具有天然的保健功能和开发前景。植物多酚是天然抗氧化物中的一大类重要物质,蓝莓、树莓、黑莓、草莓等小浆果富含天然酚类活性物质

成分^[6-7],具有很强的抗氧化和清除自由基活性以及抗癌、抗老化等功效^[8],其提取工艺的优化可为新疆野酸梅的深度开发利用创造新的途径。目前,国内外对野酸梅果肉中多酚研究鲜见报道。该试验以野酸梅果肉为原料,通过响应面法优化果肉中多酚的提取工艺,以期提高新疆野酸梅的深加工利用附加值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试野酸梅于新疆伊犁霍城县大西沟随机采摘,经伊犁师范学院资源与生态研究所赵玉副教授鉴定,去杂后挑选无伤、成熟度基本一致的剥皮、果肉冻干、粉碎后过40目筛备用;福林酚试剂:Sigma公司;没食子酸:中国药品生物制品检定所;其它试剂均为分析纯。

仪器与设备:FA2104电子天平(上海舜宇恒平科学

第一作者简介:刘伟(1985-),男,硕士,讲师,研究方向为天然产物活性成分提取分离。E-mail:nculiuwei@126.com.

基金项目:伊犁师范学院有机重点学科资助项目(2013ylsyy002)。

收稿日期:2013-10-23

Study on Ultrasonic Extraction of Flavonoids From Ginger and Antibacterial Activity

JIANG Shao-juan, LIU Xiao-li

(Department of Biology and Chemistry Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000)

Abstract: With ginger as raw material, the ultrasonic extraction of flavonoids from ginger was studied. The extraction process of flavonoids was optimized with single factor experiment and orthogonal experiment, and the antibacterial activity of flavonoids from ginger was studied by filter paper method. The results showed that the optimum extraction conditions were determined as follows: alcohol concentration 80%, solid-liquid ratio 1:12 g/mL, extraction temperature 50℃, extraction time 15 minutes. And ginger flavonoids showed different antibacterial activity for the four bacteria, the order of the strength of the inhibitory effect was *Bacillus subtilis* > *Aspergillus niger* > *Penicillium* > *Escherichia coli*.

Key words: ginger; ultrasonic extraction; flavonoids; orthogonal experiment; antibacterial activity