

甘薯叶提取物中酚类物质测定及在冷却肉保鲜中的应用

徐洪宇¹, 詹壮壮¹, 高永悦¹, 张京京¹, 董瑶¹, 崔浩²

(1. 吉林化工学院生物与食品工程学院, 吉林吉林 132022)

(2. 吉林化工学院化学与制药工程学院, 吉林吉林 132022)

摘要: 本文研究了甘薯叶粗提物中酚类物质含量、组成、抗氧化活性、抑菌活性及其处理冷却肉后对保鲜效果的影响。采用体外抗氧化法 (DPPH、ABTS 自由基清除率和总还原力) 及抑菌圈直径法评价各萃取 (余) 相的抗氧化活性和抑菌活性, 筛选出抗氧化及抑菌活性强的萃取 (余) 相; 同时通过测定 pH 值、硫代巴比妥酸反应物值 (TBARS)、肌红蛋白含量 (MetMb%)、挥发性盐基氮 (TVB-N) 及菌落总数等指标评价活性强的萃取 (余) 相对冷却肉的保鲜效果, 并利用 UPLC-DAD/ESI-TOF-MS 鉴定其主要酚类成分。结果表明: 乙酸乙酯相的总酚含量、抗氧化活性及抑菌活性均强于其它萃取 (余) 相, 与对照组相比, 1% 乙酸乙酯相能有效减缓冷却肉的 pH、TBARS 值、MetMb% 含量、TVB-N 和菌落总数的增加, 延长冷却肉的保鲜期, 乙酸乙酯相中主要含有 9 种酚类化合物。

关键词: 甘薯叶; 抗氧化活性; 抑菌活性; 冷却肉保鲜; 酚类组成

文章编号: 1673-9078(2018)06-149-156

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.020

Determination of Phenolic Composition of Active in Sweet Potato Leaves

Extracts and Their Application in the Preservation of Chilled Pork

XU Hong-yu¹, ZHAN Zhuang-zhuang¹, GAO Yong-yue¹, ZHANG Jing-jing¹, DONG Yao¹, CUI Hao²

(1. College of Food and Biological Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

(2. School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: The total content, composition, antioxidant activity, antibacterial activity of phenolics in sweet potato leaves crude extracts, and their effects on the preservation of chilled pork were investigated in this study. The antioxidant activity and antibacterial activity of crude extracts were evaluated using the method of *in vitro* antioxidant (DPPH and ABTS clearance rate and total reducing power) and inhibition-zone diameter to screen out the more strong activity extract phase. Simultaneously, the effects of the active extraction on the preservation effect of chilled pork was evaluated by determining pH, TBARS, MetMb %, TVB-N and colony count. In addition, the main composition of phenols in crude extracts were identified by UPLC-DAD/ESI-TOF-MS. The results showed that ethyl acetate fraction exhibited the highest phenols content as well as the strongest antioxidant and antibacterial activity than other fractions. Compared with the control group, ethyl acetate fraction with the concentration of 1% could effectively reduce the total plate counts, TVB-N, pH, and TBARS values of pork stored at 4 °C, and then could extend their shelf life. The ethyl acetate fraction mainly contained 9 kinds of phenolic compounds.

Key words: sweet potato leaves; antioxidant activity; antibacterial activity; meat preservation; phenolic composition

冷却肉是指严格执行兽医检疫制度屠宰后的畜禽胴体迅速进行冷却处理, 使胴体温度 (以后腿肉中心

收稿日期: 2017-12-18

基金项目: 吉林化工学院博士启动基金项目 (2016015); 吉林化工学院重大科技项目 (2016013); 2017 年吉林省“大学生创新创业训练计划”项目

作者简介: 徐洪宇 (1985-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物的提取、分离及药理活性筛选

通讯作者: 崔浩 (1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物生物活性

为测量点) 在 24 h 内降为 0~4 °C, 并在后续加工、流通和销售过程中始终保持 0~4 °C 范围内的生鲜肉, 它比冷冻肉具有更佳的口感与营养。在正常储存条件下, 肉类的腐败主要是由微生物大量繁殖和氧化作用引起^[1-4]。通过在冷却肉上喷洒具有抑菌活性和抗氧化活性的物质, 可以起到良好的保鲜作用, 从而延长货架期, 类似的研究结果也证实了这一观点。Kim 等^[5]将含有原花青素的可食性薄膜应用到冷却肉上, 研究结果表明, 可食性薄膜能抑制微生物繁殖和脂质氧化, 从而

提高存储期内冷却肉的质量和延长保质期。研究者将富含虾青素的雨生红球藻提取物,喷洒在冷却肉上,可以起到很好的保鲜作用^[6]。黑胡椒精油应用到猪肉保鲜上也取得了类似的保鲜效果^[7]。

甘薯 (*Ipomoea batatas* L.), 是世界第七大粮食作物, 也是我国主要的粮食作物之一。甘薯的块根和叶均可食用。目前主要利用甘薯嫩叶和柄烹饪菜肴、经粗加工制成甘薯叶茶, 以及制作甘薯叶浓缩蛋白粉等^[8]。但大部分茎叶被作为废弃物丢弃, 造成资源浪费和环境污染, 而甘薯叶中活性成分在很大程度上被忽略。文献报道, 甘薯中含有丰富的酚类物质^[9-11]。这些酚类物质除具有抗氧化活性和抑菌活性外, 还具有抗诱变、抗癌、抗糖尿病、抗炎及抗病毒活性, 具有促进人体健康的生理和药理功效^[12]。

本研究以甘薯叶为原料, 对甘薯叶粗提物的不同极性组分群(石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相)中酚类物质含量、抗氧化及抑菌活性进行测定; 并将活性强的组分群应用到冷却肉保鲜上; 同时利用超高效液相色谱-二极管阵列检测器/电喷雾飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-diode array detector/electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry, UPLC-DAD/ESI-TOF-MS)鉴别活性强的组分群中酚类成分。本研究旨在为甘薯叶的开发利用和深加工提供一定的理论参考和科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘薯叶粉: 品种为浙薯 75, 叶片于 2016 年 10 月中旬采自河南省新乡市原阳县。叶片采集后在 90 °C 下杀青处理 20 min, 在 60 °C 干燥箱中烘干, 粉碎, 过 20 目筛备用。

猪肉: 新鲜猪肉购买于吉林市西红柿超市, 当天宰杀。菌种: 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均由吉林化工学院生物工程实验室提供。

1,1-二苯基-2-苦肟基 (DPPH)、2,2-二氮-双(3-乙基并噻唑-6-磺酸) 铵盐 (ABTS)、Folin-Ciocalteu 试剂购自美国 Sigma 公司; 没食子酸标准品, 中国药品生物制品检定所; 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT) 购自国药集团化学试剂有限公司; 无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、三氯乙酸 (TCA)、硫代巴比妥酸 (TBA)、1,1,3,3-四乙氧基丙烷氯化铁、过硫酸钾等均为分析纯。

1.2 仪器设备

XS105DU 型分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; FW100 型高速万能粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; UPLC-Triple-TOF/MS 系统: Acquity™ ultra 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Triple TOF 5600+型飞行时间质谱(配有电喷雾离子源), 美国 AB SCIEX 公司; Eppendorf minispan 离心机, 德国 Eppendorf 公司; PP-25 型 pH 计, 美国赛多利斯公司; HS-1300-U 型洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; YXQ-LS-30SII 型立式压力蒸汽灭菌锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; SPX250B 型生化培养箱, 上海福玛实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取物的制备

称取甘薯叶粉 500 g, 加入 80% 的乙醇(料液比 1:20, *m/V*), 在 60 °C 下提取 3 次, 每次 12 h, 合并提取滤液, 45 °C 旋转薄膜蒸发浓缩, 得甘薯叶粗提物浸膏。浸膏用 500 mL 蒸馏水溶解成悬浮液, 分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 5~8 次, 将各萃取(余)相分别浓缩、干燥, 得到石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相, 并将各相配制成所需浓度, 用于总酚含量及活性测定。

1.3.2 总酚含量的测定

参考 Turkmen 等^[13]的方法并略做改动。精确吸取 40 μ L 样品, 加入 0.5 mL 0.1 mol/L Folin-Ciocalteu 试剂混匀, 静置 5 min 后加入 7.5% (*m/V*) 碳酸钠溶液 0.5 mL, 室温下避光反应 2 h, 725 nm 下测定吸光值。以没食子酸 (0.1~5.0 mg/mL) 作为标品。根据标准曲线计算总酚含量, 以每克干样品中含有的没食子酸毫克数计, 单位为 mg/g。

1.3.3 抗氧化活性测定

1.3.3.1 还原力测定

还原力的测定, 采用 Oyaizu^[14]的方法。取 1 mL 不同浓度的粗提液, 加入 2.5 mL pH 6.6 磷酸缓冲液, 加入 3 mL 1% 铁氰化钾, 50 °C 水浴 10 min, 冷却, 加入 2.5 mL 10% TCA, 振荡摇匀, 于 3000 r/min, 离心 10 min。移取上清液 2.5 mL, 加 2.5 mL 蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 三氯化铁, 室温下避光反应 20 min, 于 700 nm 处测定吸光值。

1.3.3.2 DPPH 自由基清除率的测定

DPPH 自由基清除率的测定, 采用 Brandwilliams 等^[15]的方法, 略作修改。取 1 mL 不同浓度的粗提液, 加入 3 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液, 混匀后加入 4.0 mL 乙醇溶液, 于室温下避光反应 30 min 后,

517 nm 下测定吸光度,以蒸馏水代替粗提液作为空白对照。按以下公式计算样品对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

注:式中 A_c 为空白样品的吸光值, A_s 为加入不同浓度样品后的吸光值。

1.3.3.3 ABTS 自由基清除率的测定

ABTS 自由基清除率的测定,采用 Re 等^[16]的方法,并作适当修改。将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液 10 mL,与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液 10 mL 混合,于室温、阴暗条件下放置 14~16 h,使用前用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.4) 将其稀释至吸光度为 0.72~1.2,即得到 ABTS 自由基工作液,现配现用。

取不同浓度的粗提液各 1 mL,加入 ABTS 自由基工作液 4 mL,反应 6 min 后在波长 734 nm 处,测吸光度,用蒸馏水代替粗提液做空白试验。按以下公式计算样品对 ABTS 自由基的清除率。

$$\text{清除率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

注:式中 A_c 为空白样品的吸光值, A_s 为加入不同浓度样品后的吸光值。

1.3.4 抑菌活性测定

采用抑菌圈法进行测定^[17]。将平板培养皿底以“十”字形划分成 4 等份,每一等分都标明代码。在超净工作台上用灭菌的移液管吸取 0.1 mL 的菌悬液于平板培养基上,并用刮铲将菌悬液均匀涂布。将浸过样品 (100 mg/mL) 的干燥滤纸片 (直径为 6 mm) 按一定的顺序放置于含菌平板培养基上,置于 37 °C 下培养 24 h,培养好后用直尺量取抑菌圈直径,试验重复三次。

1.3.5 猪肉保鲜试验

1.3.5.1 肉样处理

在洁净消毒的案板上将冷鲜猪里脊肉除去筋膜后,平均分成 5 组质量为 25±1 g 的肉块,分别用配制 0.5%、1% 的乙酸乙酯相、0.5% 苯甲酸钠和灭菌蒸馏水浸泡 10 min,用保鲜膜密封,放入 4 °C 冰箱中冷藏。在冷藏的 0、3、6 和 9 d 测定肉样的 pH 值、硫代巴比妥酸反应物值 (TBARS)、肌红蛋白 (MetMb%) 含量、挥发性盐基氮 (TVB-N) 及菌落总数,每组重复 3 次。

1.3.5.2 pH 值的测定

参照 GB/T 9695.5-2008 《肉与肉制品 pH 值测定》进行测定。

1.3.5.3 TBARS 的测定

取 10 g 肉样,用研钵研碎加入 10 mL 20% TCA

搅拌 10 min 常温静置 1 h, 3000 r/min 离心 10 min。移取上清液 2 mL 加入 0.02 mol/L TBA 2 mL,沸水浴 30 min,冷却,在 532 nm 处测量吸光度,标准曲线计算 TBA 反应性物质 (TBARS) 值,并表示为 mg、丙二醛 (MDA) /kg 样品。

1.3.5.4 MetMb% 含量测定

参照 Krzywicki^[18]方法,加以改进。取 5 g 搅碎的肉样置于 50 mL 已加有 5 mL 冰冷的磷酸缓冲液 (pH 值为 6.8, 40 mmol) 的聚乙烯离心管中,在 4 °C, 1000 r/min 冷冻离心 15 min,过滤上清液,测量 700、572、525 nm 的吸光值。MetMb 百分含量按下式计算:

$$\text{MetMb}\% = [1.395 - (A_{572} - A_{700}) / (A_{525} - A_{700})] \times 100\%$$

1.3.5.5 TVB-N 的测定

参考 GB/T 5009.44-2003 方法进行测定。

1.3.5.6 菌落数的测定

参照 GB 4789.2-94 方法进行测定。结果以对数 log cfu/g 表示。

1.3.6 UPLC-DAD/ESI-TOF-MS 分析条件

色谱柱为安捷伦 ZORBAX-SBC18(100 mm×2.1 mm i.d., 3.5 μm);以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A,以 0.1% 甲酸乙腈为流动相 B,线性梯度洗脱,0 min 5%B; 2 min 5%B; 15 min 30%B; 25 min 50%B; 33 min 95%B,流速为 0.8 mL/min;柱温为 35 °C;检测波长为 254 nm;进样量:5 μL。

质谱分析条件为,采用 UPLC-Triple-TOF 5600+ 飞行时间液质联用仪:正负离子扫描模式;扫描范围: m/z 100~1500;雾化气:55 psi;气帘气:35 psi;离子源温度:600 °C (正) 550 °C (负);离子源电压:5500 V (正) ~4500 V (负);一级扫描:去簇电压:100 V;聚焦电压:10 V;

二级扫描:使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据,CID 能量为 20、40 和 60 V,进样前,用 CDS 泵做质量轴校正,须使质量轴误差要小于 2×10^{-6} 。

1.4 统计分析

数据以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA) 软件进行 ANOVA 统计分析,采用 LSD 法进行显著性检验 ($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同极性组分群中酚类物质含量及其抗氧化活性

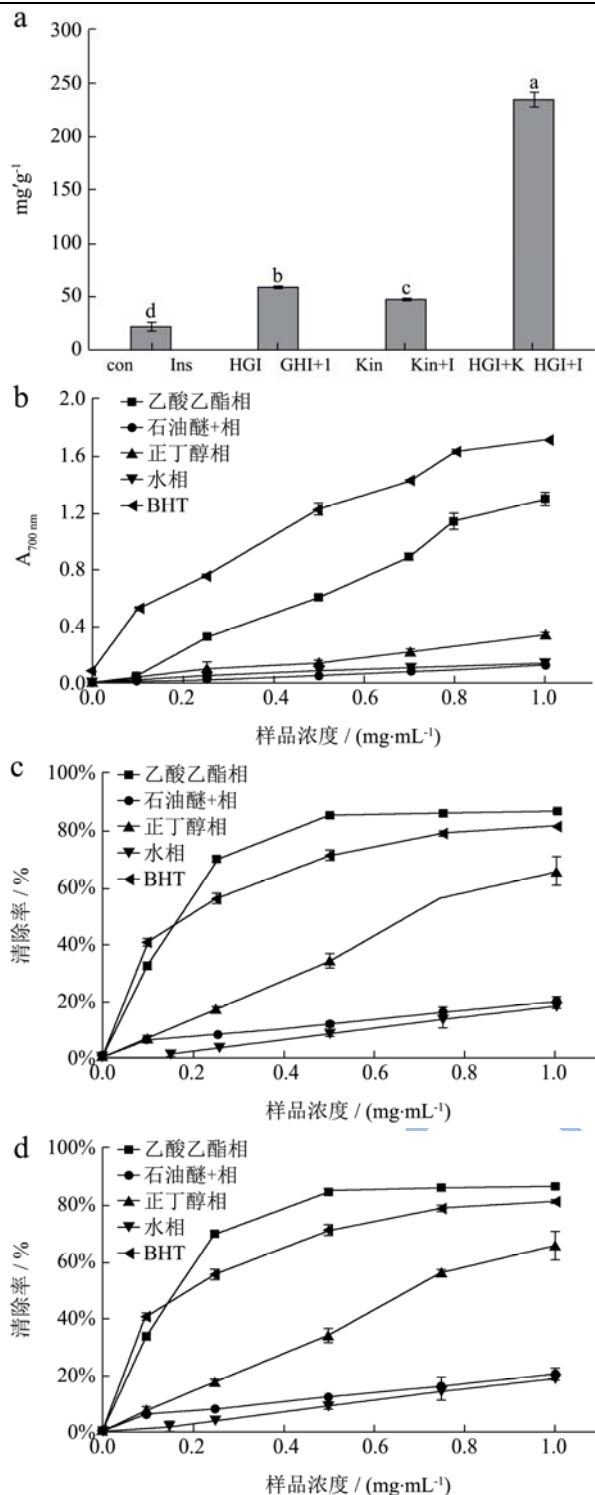


图1 总酚含量及抗氧化活性

Fig.1 Total phenolic content and antioxidant activity

注: 小写字母 (a、b、c) 表示差异显著 ($p < 0.05$)。q. 不同极性组分群的总酚含量; b. 不同极性组分群的还原力测定 c. 不同极性组分群清除 DPPH 自由基的能力; d. 不同极性组分群清除 ABTS 自由基的能力。

甘薯叶粗提物的各萃取 (余) 相中酚类物质含量及抗氧化活性 (还原力、DPPH 自由基清除率及 ABTS 自由基清除率), 如图 1a-d 所示, 乙酸乙酯相中酚类

物质含量 (232.5 mg/g) 极显著高于正丁醇相 (57.4 mg/g) 和石油醚相 (45.3 mg/g), 而水相的酚类物质含量 (19.6 mg/g) 显著低于其它相, 可见甘薯叶粗提物中所含的酚类物质极性差异较大, 酚类物质种类较多, 且主要集中于乙酸乙酯相中。质量浓度为 0.1~1.0 mg/mL 时, 各萃取 (余) 相的还原力、DPPH 自由基清除率及 ABTS 自由基清除率均以乙酸乙酯相最强, 其次为正丁醇相。

2.2 不同极性组分群抑菌活性

甘薯叶粗提物的各萃取 (余) 相: 石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相及水相, 在 100 mg/mL 浓度下对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果, 其抑菌活性以抑菌圈直径大小衡量, 如表 1 所示, 4 个极性组分群中, 乙酸乙酯相的抑菌效果 (11.8 mm、12.4 mm) 强于正丁醇相 (9.3 mm、10.3 mm)、石油醚相 (8.6 mm、8.2 mm) 及水相 (8.3 mm、7.8 mm)。可见, 甘薯叶中具于抑制大肠杆菌及金黄色葡萄球菌生长的活性成分, 主要集中在中等极性组分群的乙酸乙酯相中。

表 1 不同极性组分群的抑菌圈直径

Table 1 Inhibition zone diameters of various polar group extracts in leaves

组分	大肠杆菌/mm	金黄色葡萄球菌
水相	8.3±0.3 ^c	7.8±0.2 ^d
石油醚相	8.6±0.2 ^c	8.2±0.1 ^c
乙酸乙酯相	11.8±0.1 ^a	12.4±0.2 ^a
正丁醇相	9.3±0.2 ^b	10.3±0.2 ^b

注: 同一列中不同的小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.3 乙酸乙酯相对冷却肉保鲜的研究

甘薯叶粗提物的乙酸乙酯相具有较强的抗氧化及抑菌活性, 以 0.5%、1% 乙酸乙酯相及 0.5% 苯甲酸钠浸泡冷却肉后, 观察在存储期内, 冷却肉各项指标的变化。

2.3.1 不同处理对贮存期内冷却肉 pH 值的影响

pH 值是判定肉品新鲜度的重要指标之一。文献报道, 新鲜肉浸出液的 pH 值在 6.2 以内, 当肉腐败时, 微生物和酶分解肉中的蛋白质, 产生一系列胺和氨类的碱性物质, 使肉的浸出液慢慢趋于碱性, 也是 2.3.4 中挥发性盐基氮 (TVB-N) 值上升的原因^[19]。由图 2 可知, 在 0~9 d 内, 不同处理组 pH 值均呈上升趋势, 其中空白组上升趋势最快, 0.5% 乙酸乙酯相处理组次之, 1% 乙酸乙酯相与 0.5% 苯甲酸钠处理组较慢。在第 6 d 时空白组的 pH 值超出了新鲜肉 6.2 的范围, 在

第9 d 1%乙酸乙酯相处理组 pH 低于 0.5%苯甲酸钠处理组, 且两种处理组肉样的 pH 值均保持在新鲜肉的标准。0.5%和 1%乙酸乙酯相, 能减缓肉样 pH 值升高, 这一规律与原花青素处理肉样后实验结果相似^[5,20]。黄师荣等^[21]将九头芥梅干菜粗提物的乙酸乙酯相浸泡冷却肉后, 在一定的贮存期内, 与空白组相比, 冷却肉 pH 值增长速率较慢, 与本实验有类似结论。

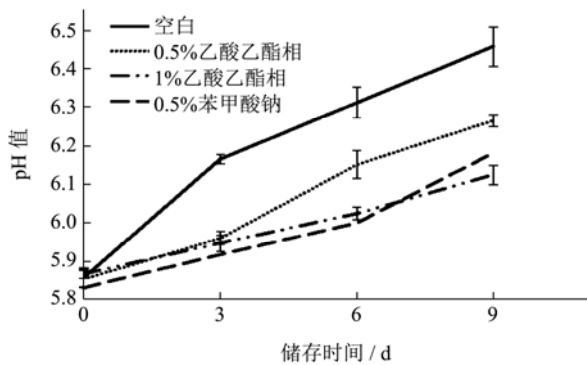


图2 不同处理组的冷却肉在贮藏期间 pH 值的变化

Fig.2 Changes of pH value of pork meat with different treatment groups during storage

2.3.2 不同处理对贮存期内冷却肉 TBARS 值的影响

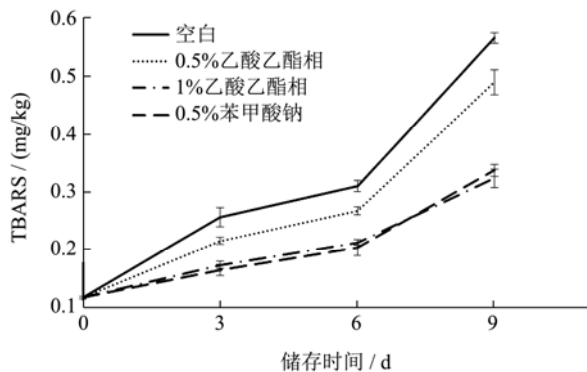


图3 不同处理组冷却肉在贮藏期间 TBARS 值的变化

Fig.3 Changes of TBARS value of pork meat with different treatment groups during storage

脂质氧化降低肉的营养价值, 以及肉制品的基本感官特性, 导致风味, 质地和颜色等改变^[22]。TBARS 值越大, 表明在存储过程中与此相关脂质氧化产物的积累程度越强^[23]。Kim 等^[24]报道, 在 4 °C 下保存 7 d, TBARS 值范围在 0.13~0.68 mg MDA/kg。

不同处理组冷却肉在冷藏期间的 TBARS 值变化如图 3 所示, 在 0~9 d, 随着贮藏时间的延长, 各处理组的 TBARS 值变总体上升, 即随着贮藏时间的延长, 冷却肉的脂肪氧化程度不断加强; 1%乙酸乙酯相处理组与 0.5%苯甲酸钠处理组 TBARS 值上升缓慢且数值接近, 冷却肉经过 1%乙酸乙酯相处理后能够缓解脂质氧化的程度。研究者发现, 肉样经抗氧化剂处

理后, 其脂质氧化程度呈剂量依赖性抑制^[25,26], 本实验结果与此结论一致。

2.3.3 不同处理对贮存期内冷却肉中 MetMb% 的影响

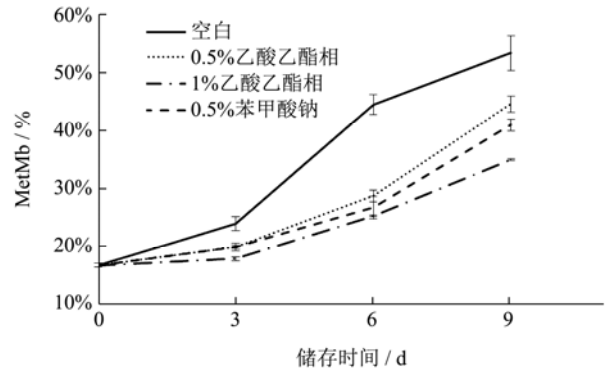


图4 不同处理组冷却肉在贮藏期间 MetMb% 值的变化

Fig.4 Changes of MetMb% value of pork meat with different treatment groups during storage

屠宰后胴体颜色变化主要是由肌红蛋白的变化引起, 高铁肌红蛋白 (MetMb) 是肌红蛋白氧化后的产物, 呈现棕褐色, 是鲜肉在储藏过程中出现的一种不良现象。MetMb% 可以作为评价鲜肉颜色的客观指标之一^[27]。由图 4 所示, 空白对照组在 4 °C 条件下, MetMb% 随时间延长均有较大的增加, 其增加速度为空白组 > 0.5% 乙酸乙酯相处理组 > 0.5% 苯甲酸钠处理组 > 1% 乙酸乙酯相处理组, 实验结果与 Zhang 等^[7]将黑胡椒精油处理冷却肉后, 其 MetMb 变化趋势一致。有研究报道, 细菌中的假单胞菌属等能加速 MetMb 的生成^[28]。由此可知, 因 1% 乙酸乙酯相中含有丰富的酚类等具有抗氧化及抑菌活性物质, 从而延缓肌红蛋白氧化成 MetMb 的速度。

2.3.4 不同处理对贮存期内冷却肉 TVB-N 的影响

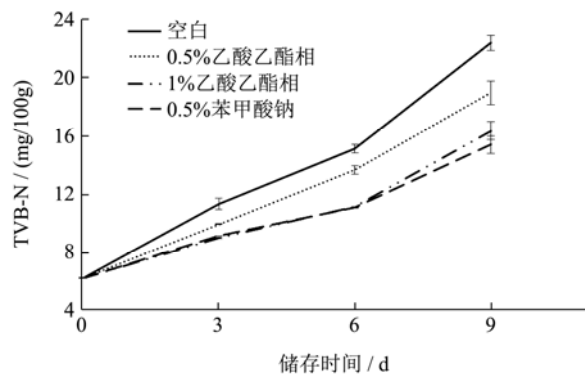


图5 不同处理组冷却肉在贮藏期间 TVB-N 值的变化

Fig.5 Changes of TVB-N value of pork meat with different treatment groups during storage

TVB-N 是评价鲜肉品质的重要指标之一。随着肉样腐败程度加深 TVB-N 值会随之增加。GB 2707-1994

猪肉卫生标准规定：鲜肉 TVB-N 值 ≤ 20 mg/100 g。

图5所示，随着贮藏时间的延长，各处理组 TVB-N 值均呈上升趋势，1%乙酸乙酯相处理组 TVB-N 值显著低于空白对照组，空白对照组在第 6 d 达到 15.1 mg/100 g，第 9 d 已达到 22 mg/100 g 左右，该值超过鲜肉的标准，而 0.5%和 1%乙酸乙酯相处理组及 0.5%苯甲酸钠处理组的 TVB-N 值第 9 d 时均小于 20 mg/100 g，冷却肉维持在鲜肉范围内。Olafsdóttir 等^[29] 研究报道，TVB-N 值与腐败菌群之间有显著的相关性。可见，抑菌活性物质的加入，可以延缓肉样腐败程度。

2.3.5 不同处理对贮存期内冷却肉菌落总数的影响

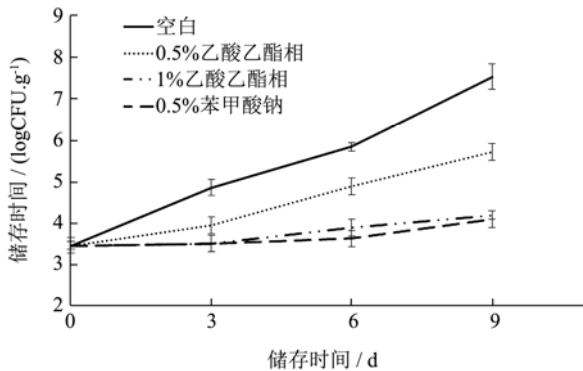


图 6 不同处理组冷却肉在贮藏期间菌落数的变化

Fig.6 Changes of colony total of pork meat with different treatment groups during storage

一般规定，一级新鲜肉菌落总数的对数值 (log cfu/g) < 4，次级新鲜肉菌落总数的对数值为 4~6，而变质肉菌落总数的对数值 > 6^[19]。不同处理对贮存期内冷却肉菌落总数的影响，由图 6 所示，实验前新鲜肉样的菌落总数的对数值为 3.5 左右，贮藏一定时间后，不同处理组的菌落总数均有升高，空白对照组的菌落总数增加较大，在第 6 d 时肉样接近变质肉菌落总数的对数值上限 6，而经过 1%乙酸乙酯相处理的菌落总数，在储藏期增长缓慢，第 9 d 菌落总数的对数值与第 0 d 的值接近。酚类物质具有较强的抑菌活性^[30]，1%乙酸乙酯相可以抑制微生物的生长，从而延长冷却肉的保质期。实验结果与 Dai 等^[31]报道相似。

2.4 UPLC-DAD/ESI-TOF-MS 分析

甘薯叶粗提物的乙酸乙酯相，抗氧化及抑菌活性测定均强于其它萃取 (余) 相，并将其应用在猪肉保鲜上，发现乙酸乙酯相中含有可以延长冷却肉储藏时间的活性成分，利用高分辨液质联用系统，在 280 nm 波长下紫外检测，根据母离子峰、碎片离子、保留时

间及紫外光谱图等信息 (图 7)，结合参考文献的报道，对其活性成分进行分析、鉴定。共检测出 8 种酚酸类化合物和 1 种黄酮类化合物 (表 2)。

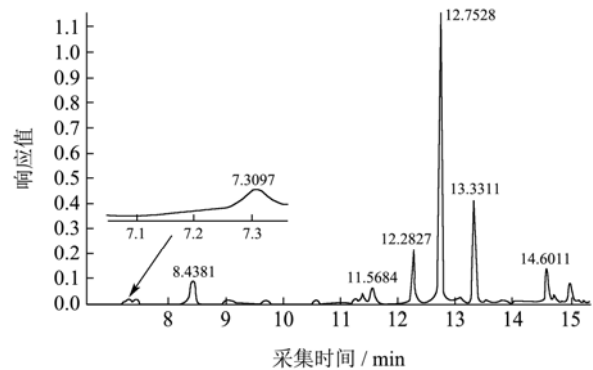


图 7 乙酸乙酯相基峰色谱图

Fig.7 Chromatograms obtained by UPLC-DAD/ESI-TOF-MS analysis of ethyl acetate fraction at 280 nm

化合物 1 出峰时间为 7.31 min, $[M-H]^-$ 为 353.0878, 主要离子碎片为 191.0560 [奎宁酸-H] $^-$, 对照相关文献, 鉴定为 1-CQA^[9-11,32,33]。化合物 2 出峰时间为 8.43 min, $[M-H]^-$ 为 179.0341, 通过比较一、二级质谱, 根据二级质谱 $[M-CO_2-H]^-$ 等碎片离子, 结构中存甲氧基, 化合物鉴定为咖啡酸。化合物 3 出峰时间为 11.57 min, $[M-H]^-$ 为 463.0896, 碎片离子中含有 m/z 301.0356、151.0034 等碎片峰, 则化合物 3 中含有槲皮素结构, $[M-Glc-H]^-$ 对应的碎片离子 m/z 301.0356 为失去 1 个质量分数为 162 (葡萄糖 Glc) 的中性碎片后生成的离子。Fabre 等^[34]表明, 在黄酮苷类化合物的 MS/MS 图谱中, 同时存在高强度的 301.0356 (Y_0^-) 和 300.0274 ($[Y_0-H]^-$) 碎片离子, 则表明糖连接在 3-OH 位。因此, 化合物鉴定为槲皮素-3-O-葡萄糖苷。化合物 4 (12.28 min)、5 (12.75 min)、6 (13.33 min), 母离子 $[M-H]^-$ 分别为 515.1191、515.1215、515.1209, 分析 MS/MS 裂解图谱及查阅文献, 它们为 diCQA 的同分异构体。主要存在以下离子碎片 353.0879 [咖啡酰奎宁酸-H] $^-$ 、191.0559 [奎宁酸-H] $^-$ 、179.0345 [咖啡酸-H] $^-$ 、173.0452 [奎宁酸-2H₂O-H] $^-$ 、135.0455 [咖啡酸-CO₂-H] $^-$ 。通过与 3,4-diCQA、3,5-diCQA 和 4,5-diCQA 的比对, 化合物 4、5、6 分别鉴定为 3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA。同理, 化合物 7、9 鉴定为三咖啡酰奎尼酸异构体 I、II^[9,35,36]。而化合物 8 (15.00 min), $[M-H]^-$ 为 529.1385, 其主要碎片离子中含有 m/z 173.0455、193.0511、191.0561、155.0349, Gu 等^[37]认为化合物结构中, 咖啡酰基与 4-OH 相连, 阿魏酰基与 3-OH 相连, 确定化合物 8 为 3-咖啡酰-4-阿魏酰奎宁酸。

表 2 UPLC-DAD/ESI-TOF-MS 鉴定乙酸乙酯相中酚类物质

Table 2 Identification of the phenolic components in ethyl acetate fraction by UPLC-DAD/ESI-TOF-MS

峰	t _R /min	[M-H] ⁻ /(m/z)	主要碎片/(m/z)	分子式	化合物
1	7.31	353.0878	191.0560	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1-CQA
2	8.43	179.0341	135.0452	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸
3	11.57	463.0896	300.0274/301.0356/271.0245/255.0298/151.0034	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素-3-葡萄糖苷
4	12.28	515.1191	173.0452/179.0345/191.0559/135.0451	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,4-diCQA
5	12.75	515.1215	191.0555/179.0346/353.0879/135.0455	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,5-diCQA
6	13.33	515.1209	191.0557/173.0448/179.0341/353.0877/135.0453	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	4,5-diCQA
7	14.60	677.1559	353.0878/497.1107/515.1218/335.0777	C ₂₇ H ₃₄ O ₂₀	三咖啡酰奎尼酸异构体 I
8	15.00	529.1385	173.0455/193.0511/191.0561/155.0349	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	3-咖啡酰-4-阿魏酰奎尼酸
9	16.41	677.1551	515.1209/353.0879/497.1099/173.0452/179.0347	C ₂₇ H ₃₄ O ₂₀	三咖啡酰奎尼酸异构体 II

3 结论

本研究以甘薯叶为材料,对其粗提物的萃取(余)相进行总酚含量、抗氧化及抑菌活性测定,筛选出抗氧化及抑菌活性强的萃取(余)相,进行冷却肉保鲜的研究,得到如下结论:

(1) 不同萃取(余)相均含有酚类物质,其中乙酸乙酯相中酚类物质含量显著高于其它萃取(余)相,为 232.5 mg/g。

(2) 四个不同极性组分群中乙酸乙酯相的抗氧化活性最强,并在一定浓度范围内强于 BHT 的抗氧化活性。

(3) 通过比较抑菌圈的大小来判断各萃取(余)相相对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性,其由强到弱为,乙酸乙酯相>正丁醇相>石油醚相>水相。

(4) 分析冷却肉在 4 °C 贮藏 0~9 d 的过程中 pH 值、TBARS 值、MetMb% 含量、TVB-N 及菌落总数的变化结果。试验得到,1% 乙酸乙酯相可以抑制脂肪氧化程度和微生物的生长,延长冷却肉的保质期。

(5) 通过 UPLC-MS/MS 技术,从甘薯叶乙酸乙酯相中鉴定出 9 个主要酚类化合物,包括 1-CQA、咖啡酸、3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、三咖啡酰奎尼酸异构体 I、3-咖啡酰-4-阿魏酰奎尼酸、三咖啡酰奎尼酸异构体 II。

参考文献

- [1] Lambert S T, Nilsson C, Brådenmark A, et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 160(1): 24-31
- [2] Choi Y M, Ryu Y C, Lee S H, et al. Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine longissimus dorsi muscle [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41(2): 317-322
- [3] Fernández López J, Zhi N, Alesoncarbonell L, et al. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs [J]. *Meat Science*, 2005, 69(3): 371-380
- [4] Mirosław Fik, Anna Leszczyńska-Fik. Microbiological and sensory changes in minced beef treated with potassium lactate and sodium diacetate during refrigerated storage [J]. *International Journal of Food Properties*, 2007, 10(3): 589-598
- [5] Kim H W, Jin Y J, Seol K H, et al. Effects of edible films containing procyanidin on the preservation of pork meat during chilled storage [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 36(2): 230-236
- [6] Pogorzelska E, Godziszewska J, Brodowska M, et al. Antioxidant potential of *Haematococcus pluvialis* extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage [J]. *Meat Science*, 2017, 135: 54-61
- [7] Zhang J, Wang Y, Pan D D, et al. Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage [J]. *Meat Science*, 2016, 117(4): 130-136
- [8] Woolfe J A. *Sweet potato: an untapped food resource* [M]. Cambridge University Press, United Kingdom, 1992
- [9] Fu Z F, Tu Z C, Zhang L, et al. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas*, L.) leaves extracted with solvents of various polarities [J]. *Food Bioscience*, 2016, 15(1): 11-18
- [10] Zhang L, Tu Z C, Wang H, et al. Comparison of different methods for extracting polyphenols from *Ipomoea batatas*, leaves, and identification of antioxidant constituents by HPLC-QTOF-MS2 [J]. *Food Research International*, 2015, 70: 101-109

- [11] Chunying L, Xixi W, Ge G, et al. Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2697-2706
- [12] Islam S. Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf: Its Potential Effect on Human Health and Nutrition [J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(2): R13-R121
- [13] Turkmen N, Sari F, Velioglu Y S. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(4): 713-718
- [14] Oyaizu M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine [J]. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 1986, 44(6): 307-315
- [15] Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28(1): 25-30.
- [16] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [17] 程丽娟,薛泉宏.微生物实验技术[M].西安:世界图书出版社,2000
CHENG Li-juan, XUE Quan-hong. Microbial experiment technology [M]. Xi'an: World Publishing House, 2000
- [18] Krzywicki K. The determination of haem pigments in meat [J]. *Meat Science*, 1982, 7(1): 29-36
- [19] 陆宽,黄运安,武剑,等.异硫氰酸烯丙酯包合物壳聚糖复合保鲜纸对冷鲜肉的保鲜效果[J].*贵州农业科学*,2013,41(4):117-119
LU Kuan, HUANG Yun-an, WU Jian, et al. preservation effect of allyl isothiocyanate inclusion compound chitosan in foil on chilled meat [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2013, 41(4): 117-119
- [20] Qin Y Y, Yang J Y, Lu H B, et al. Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 61(10): 312-316
- [21] 黄师荣,李豪杰,戴杰辉,等.九头芥梅干菜提取物抗菌活性及其在猪肉保鲜中的应用[J].*现代食品科技*,2014,10:58-62
HUANG Shi-rong, LI Hao-jie, DAI Jie-hui, et al. Antimicrobial activity of pickled and dried mustard extracts and their application in pork preservation [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 10: 58-62
- [22] Pratt D A, Tallman K A, Porter N A. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: new mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(6): 458-467
- [23] Chouliara E, Karatapanis A, Savvaidis I N, et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 degrees C [J]. *Food Microbiology*, 2007, 24(6): 607-617
- [24] Kim J, Marshall M R, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1995, 43(11): 1027-1037
- [25] Calatayud M, López-De-Dicastillo C, López-Carballo G, et al. Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 51-58
- [26] Correia A C, Jordão A M. Antioxidant capacity, radical scavenger activity, lipid oxidation protection analysis and antimicrobial activity of red grape extracts from different varieties cultivated in Portugal [J]. *Natural Product Research*, 2015, 29(5): 438-440
- [27] Ngapo T M, Martin J F, Dransfield E. International preferences for pork appearance: I. Consumer choices [J]. *Food Quality & Preference*, 2007, 18(1): 26-36
- [28] Lund B M, Baird-Parker T C, Gould G W. The microbiological safety and quality of food [M]. Aspen Publishers, 2000
- [29] Olafsdóttir G, Martinsdóttir E, Oehlenschläger J, et al. Methods to evaluate fish freshness in research and industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1997, 8(8): 258-265
- [30] Widsten P, Cruz C D, Fletcher G C, et al. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(46): 11146-11156
- [31] Dai J, Wang G, Li W, et al. High-throughput screening for anti-influenza A virus drugs and study of the mechanism of procyanidin on influenza A virus-induced autophagy [J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2012, 17(5): 605-617
- [32] 涂宗财,傅志丰,王辉,等.红薯叶不同溶剂提取物抗氧化性及活性成分鉴定[J].*食品科学*,2015,36(17):1-6
TU Zong-cai, FU Zhi-feng, WANG Hui, et al. Comparison of antioxidant activities of various solvent extracts of sweet

- potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves and identification of antioxidant constituents of the methanol extract [J]. Food Science, 2015, 36(17): 1-6
- [33] Zhu Z, Guan Q, Koubaa M, et al. HPLC-DAD-ESI-MS², analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction [J]. Food Chemistry, 2017, 215(15): 391-400
- [34] Fabre N, Rustan I, Hoffmann E D, et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry [J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001, 12(6): 707-715
- [35] Carvalho Isabels, Cavaco Teresa, Carvalho Laram, et al. Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves [J]. Food Chemistry, 2010, 118(2): 384-390
- [36] Chunying L, Xixi W, Ge G, et al. Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2697-2706
- [37] Gu D, Yang Y, Abdulla R, et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time - of - flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry Rcm, 2012, 26(1): 83-100