

藤茶泡水前后的抗菌活性和抗氧化活性比较

刘熠杭¹,马玉杰^{2*},商艳君²,尹健铎²

(1. 河北省石家庄市第一中学,河北石家庄 050010;2. 河北经贸大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050061)

摘要 [目的] 比较藤茶泡水前后乙醇提取物的抗菌活性和抗氧化活性。[方法] 采用福林酚法进行酚含量的测定,抑菌圈法进行抗菌活性测定,菌饼法进行抗真菌活性测定,并采用 DPPH 法进行抗氧化活性测定。[结果] 藤茶泡水前后乙醇提取物的多酚含量分别为 168 和 56 kg/g,藤茶泡水前乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、灰葡萄孢霉、胶孢炭疽菌和葡萄白腐病菌均有抑制作用,泡水后的乙醇提取物对枯草芽孢杆菌不再有抑制作用,对其他 5 种菌仍有抑制活性但活性均有不同程度的降低。藤茶泡水前乙醇提取物的 DPPH 清除活性 IC_{50} 分别为 5.09 和 36.01 $\mu\text{g/mL}$ 。[结论] 藤茶泡水后的残渣仍具有一定的抗菌和抗氧化活性,可被继续开发利用。

关键词 藤茶;抗菌活性;抗真菌活性;抗氧化活性;总酚含量

中图分类号 S567.9;R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)33-0113-03

Antimicrobial Activity and Antioxidant Activity Comparison of *Ampelopsis grossedentata* before and after Soaking in Water

LIU Yi-hang¹, MA Yu-jie^{2*}, SHANG Yan-jun² et al (1. Shijiazhuang No.1 High School, Shijiazhuang, Hebei 050010;2. College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061)

Abstract [Objective] To compare antibacterial activity and antioxidant activity of ethanol extracts from *Ampelopsis grossedentata* before and after soaking in water. [Method] The folin-ciocalteu method was used to make the total phenolic content, antibacterial and antifungal activities were done by the inhibition zone method and the fungus cake method respectively, and antioxidant activity was done by DPPH method. [Result] The total phenolic contents of ethanol extract of *Ampelopsis grossedentata* (EEAG) before and after soaking in water were 168 and 56 kg/g. EEAG before soaking in water showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Coniothyrium diplodiella*. EEAG after soaking in water exhibited no antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and lower antimicrobial activities against the other five microbes. The IC_{50} values of DPPH radical scavenging ability of EEAG before and after soaking in water were 5.09 and 36.01 $\mu\text{g/mL}$ respectively. [Conclusion] There are certain antimicrobial and antioxidant activities of the residue of *Ampelopsis grossedentata* after soaking in water, so it should still be exploited.

Key words *Ampelopsis grossedentata*; Antibacterial activity; Antifungal activity; Antioxidant activity; Total phenolic content

藤茶又名长寿茶,是我国民间比较广泛使用的代茶饮料,同时又是一味传统中药材,其原植物为葡萄科蛇葡萄属显齿蛇葡萄(*Ampelopsis grossedentata*)^[1-2]。作为药用植物资源,藤茶是一种极具开发潜力的中草药。藤茶中多酚含量高(在 20% 左右),多酚类化合物具有广泛的生理活性^[3]。近代医学研究表明,藤茶及其提取物具有增强和调节免疫、降血脂、降血压、降血糖、抗炎、抑菌、抗肿瘤、抗氧化、保肝、护肝以及减轻乙醇中毒等功效^[4-5]。无论作为饮品、保健品还是药用植物资源,藤茶均具有较高的开发利用价值。目前有大量关于藤茶抗菌活性和抗氧化活性的报道^[6-9],但关于藤茶泡水前后的抗菌活性和抗氧化活性比较的研究还鲜见报道。该试验通过比较藤茶泡水前后乙醇提取物的抗菌活性和抗氧化活性差异,旨在为藤茶残茶的综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材。藤茶购自市场。细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia Coli*),均来自河北经贸大学微生物学实验室。真菌:灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiel-*

la),均来自中国农业科学院植物保护研究所。

1.1.2 试剂。水杨酸、硫酸锂、钨酸钠、钼酸钠、磷酸溶液、浓盐酸溶液、 Na_2CO_3 溶液、维生素 C、95% 酒精、福林酚试剂、没食子酸、去离子水、DPPH 等。

1.1.3 仪器。旋转蒸发仪、水浴锅、超净工作台、紫外分光光度计(7230G 可见分光光度计)等。

1.2 方法

1.2.1 粗提取提取方法。泡水前后(应用后茶叶为泡水 3 次后茶叶)干燥的藤茶,用 95% 乙醇浸提 3 次,每次 1 d,合并减压蒸干得乙醇粗提取物。

1.2.2 总酚含量测定。

1.2.2.1 标准曲线的绘制。精密称取 5 mg 的没食子酸对照品,置 50 mL 容量瓶用蒸馏水溶解并定容,得 0.1 mg/mL 的标准溶液。分别取标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,加蒸馏水补至 10 mL,摇匀,再加 1 mL 的 Folin - Ciocalteu 试剂,充分摇匀。1 min 后,加入 7.5% (W/V) 碳酸钠溶液 2 mL,混匀,用蒸馏水定容,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15 min,于 765 nm 处测定吸光度^[10]。标准曲线见图 1,得出回归方程为: $y = 143.24x + 0.0378 (R^2 = 0.998)$ 。

1.2.2.2 藤茶乙醇提取物多酚含量的测定。取 1 mL 样品液加至 10 mL 比色管中,依次加入 1 mL 去离子水,后面同“1.2.2.1”方法,在 765 nm 下测定其吸光度。酚含量根据标准品没食子酸标准曲线确定的方程进行计算。

1.2.3 抗菌活性。

1.2.3.1 抑菌圈的测定。采用打孔法进行测定。每皿加入

基金项目 2016 年博士科研启动经费(0112160225);2014 省教育厅项目(2311002027)。

作者简介 刘熠杭(2000-),女,河北石家庄人,高中生。* 通讯作者,硕士研究生,研究方向:天然产物的分离与提取。

收稿日期 2016-09-30

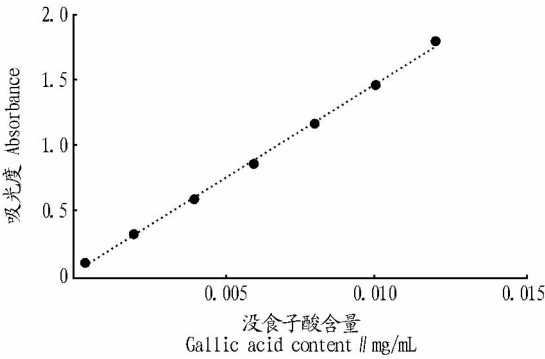


图1 总酚标准曲线

Fig.1 Calibration curve of total phenolic

约 25 mL 冷却至 50 ~ 60 ℃ 灭菌后的牛肉膏蛋白培养基,凝固后,取 0.1 mL($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL)菌悬液加到平板培养基表面,涂布均匀。用打孔器(直径为 0.8 cm)在涂布均匀的平板上打孔,无菌牙签挑取上层培养基。每孔加入 100 μ L 样品(100 mg/mL),每样品 3 个平行板,37 ℃ 倒置培养 24 h,观察抑菌圈。测量抑菌圈的直径时,十字交叉,分别测量后,取平均值。取 3 次测量的平均值。青霉素为阳性对照(5 mg/mL)。

1.2.3.2 最小抑菌浓度的测定。制备菌体浓度为 10^7 CFU/mL 的菌悬液,放置 4 ℃ 冰箱,备用。测定时,与适量的液体细菌培养基混匀至细菌终浓度约为 10^5 CFU/mL。将甲醇溶解的不同浓度的样品 100 μ L 和指示菌 100 μ L 加入 96 孔细胞板中,37 ℃ 培养 24 h,肉眼观察,无肉眼可见菌生长的最小的样品浓度即为样品对该菌的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。未加待测样品只含指示菌的为阴性对照,只含培养基的为空白对照,阳性对照用青霉素。

1.2.4 抗真菌活性。将 200 mg 提取物溶解到 1 mL 甲醇中,在 PDA 培养基冷却至 50 ~ 60 ℃,将待测溶液加入至 100 mL 培养基中,充分摇匀,迅速倒入无菌培养皿中(每皿 20 mL),放置待其凝固。将供试病原真菌接到 PDA 平板上,28 ℃ 培养 4 d,在培养皿边缘菌丝生长旺盛处用打孔器打取直径为

0.8 cm 的菌饼。待测样品对真菌的抑制作用采用菌丝生长速率法^[11]。用接种针将 0.8 cm 的菌饼接至带药培养基上,有菌丝的一面向下与培养基贴合,每个培养皿中中央接一个菌饼,28 ℃ 培养 4 d 后,用十字交叉法测菌落直径,计算相对抑制率。试验设空白对照、阳性对照(克霉唑,浓度为 0.10 mg/mL)、加药处理(泡水前后的藤茶乙醇提取物,浓度为 1 mg/mL),每个处理设 3 个重复。相对抑制率的计算公式为:

$$\text{相对抑制率} = \frac{\text{加药处理菌落平均直径} - \text{菌饼直径}}{\text{空白对照菌落平均直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

1.2.5 抗氧化活性研究。DPPH 自由基清除活性的测定参照文献[12-13],用酶标仪在 517 nm 下测量吸光度(A)。水溶性抗氧化剂 V_c 为阳性对照。DPPH 自由基清除活性计算公式^[14]如下:

$$\text{DPPH 清除率} = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

式中, $A_{\text{对照}}$ 为对照的吸光值, $A_{\text{样品}}$ 为加样品反应液的吸光值。每个样品测 3 次,取平均值。 IC_{50} 是清除率为 50% 时对应的样品浓度,值越大,表明清除活性越弱;反之,越强。

2 结果与分析

2.1 藤茶泡水前后乙醇提取物的总酚含量 泡水前后藤茶乙醇提取物的多酚含量差异比较明显,分别为 168 和 56 kg/g,表明藤茶具有较高含量的多酚,且泡水后的残茶仍有一定的多酚存在。

2.2 藤茶泡水前后乙醇提取物的抗细菌活性比较 从表 1 可看出,泡水前藤茶乙醇提取物在浓度为 100 mg/mL 时对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制活性大于浓度为 5 mg/mL 的青霉素。藤茶泡水后乙醇提取物(100 mg/mL)抑菌活性小于青霉素(5 mg/mL)。藤茶泡水前后对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有一定的抑制活性,且泡水前乙醇提取物的抑制活性大于泡水后乙醇提取物,泡水后乙醇提取物对枯草芽胞杆菌无抑制活性。

表1 藤茶泡水前后乙醇提取物抗细菌活性
Table 1 Anti-bacterial activity of the ethanol extract of Ampelopsis grossedentata before and after soaking in water

样品 Sample	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>		大肠杆菌 <i>Escherichia Coli</i>		枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	
	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone//cm	MIC mg/mL	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone//cm	MIC mg/mL	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone//cm	MIC mg/mL
泡水前乙醇提取物 Ethanol extract before soaking in water	1.93 ± 0.10	12.5	1.71 ± 0.08	25.0	1.91 ± 0.12	12.5
泡水后乙醇提取物 Ethanol extract after soaking in water	1.39 ± 0.09	100.0	1.32 ± 0.09	100.0	—	—
青霉素 Penicillin	1.81 ± 0.08	0.3	1.51 ± 0.09	0.4	2.31 ± 0.09	0.2

2.3 藤茶泡水前后乙醇提取物的抗真菌活性比较 从表 2 可看出,藤茶泡水前后对 3 种葡萄植物病原菌均有一定的抑制活性。藤茶泡水前对葡萄白腐病菌和灰葡萄孢霉有较好的抑制活性,在浓度为 1 mg/mL 时抑制率分别为 75.5% 和 82.8%,低于 0.10 mg/mL 的阳性对照制霉菌素。藤茶泡水后的乙醇提取物对葡萄白腐病菌和灰葡萄孢霉仍有很好的抑

制活性,在浓度为 1 mg/mL 时抑制率分别为 49.0% 和 55.5%。
2.4 藤茶泡水前后乙醇提取物的抗氧化活性比较 由图 2 可知,藤茶泡水前乙醇提取物具有很明显的清除作用,其 IC_{50} 值为 5.09 μ g/mL 与 V_c 差异不显著($P > 0.05$, 5.04 μ g/mL),且呈量效关系,藤茶泡水后其乙醇提取物仍具有一定的 DPPH 清除活性,其 IC_{50} 为 36.01 μ g/mL。

表 2 藤茶泡水前后乙醇提取物抗真菌活性

Table 2 Anti-fungi activity of the ethanol extracts of *A. grossedentata* before and after soaking in waer

样品 Sample	抑制率 Inhibition rate// %		
	葡萄白腐病菌 <i>Coniothyrium diplodiella</i>	灰葡萄孢霉 <i>Botrytis cinerea</i>	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
泡水前乙醇提取物 Ethanol extract before soaking in water	75.5	82.8	30.3
泡水后乙醇提取物 Ethanol extract after soaking in water	49.0	55.5	13.3
制霉菌素 Nystatin	87.1	93.8	90.0

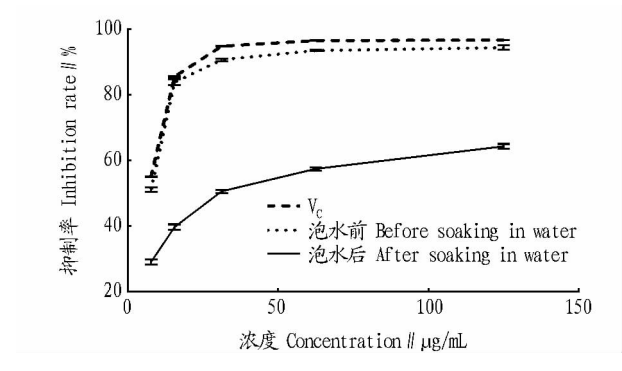


图 2 藤茶泡水前后乙醇提取物的 DPPH 自由基清除活性

Fig.2 DPPH radical scavenging ability of the ethanol extract of *Ampelopsis grossedentata* before and after soaking in water

3 结论

比较藤茶泡水前后乙醇提取物的抗菌活性和抗氧化活性发现,藤茶泡水前后乙醇提取物的多酚含量分别为 168 和 56 kg/g;藤茶泡水前乙醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、灰葡萄孢霉、胶孢炭疽菌和葡萄白腐病菌均有抑制作用,泡水后的乙醇提取物对枯草芽孢杆菌不再有抑制作用,对其他 5 种菌仍有抑制活性但活性均有不同程度的降低;藤茶泡水前乙醇提取物的 DPPH 清除活性 IC_{50} 分别为 5.09 和 36.01 $\mu\text{g/mL}$ 。表明藤茶泡水后的乙醇提取物仍

具有一定的抗菌和抗氧化活性。

参考文献

[1] 吴琰,吴彬,万婧,等. 藤茶提取物改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用[J]. 第三军医大学学报,2015,37(5):454-458.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998:48.

[3] 熊璞,姚茂君,肖凯军. 藤茶中二氢杨梅素的提取工艺研究[J]. 现代食品科技,2009,25(8):907-910.

[4] MATSUMOTO T,TAHARA S. Ampelopsin,a major antifungal constituent from *Salix sachalinensis*,and its methyl ethers[J]. Journal of the agricultural chemical society of Japan,2001,75(6):659-668.

[5] 刘畅,邓璇,刘小英,等. 藤茶生物活性成分及其制备工艺研究进展[J]. 食品工业,2015,36(4):233-237.

[6] 欧贤红,叶勇,黄秋洁,等. 藤茶抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(25):245-248.

[7] 丁友昌. 藤茶总多酚的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国公共卫生,1998,14(9):573.

[8] 曾春晖,杨柯,林启云,等. 广西藤茶提取物 APS 抗菌机制研究[J]. 山东中医杂志,2007,26(6):415-417.

[9] 曾春晖,杨柯,徐明光,等. 广西藤茶总黄酮对金黄色葡萄球菌抗菌机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):249-252.

[10] 胡君萍,杨建华,王新玲,等. 新疆沙枣果实不同部位总酚的含量测定[J]. 食品科学,2010,31(6):220-222.

[11] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:179-210.

[12] LIU K,WANG J,ZHAO L,et al. Anticancer,antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava* [J]. Food and chemical toxicology, 2013,58:375-380.

[13] 聂健,杨水莲,莫美华,等. 7 种不同来源灵芝热水提取物体外抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(18):134-136,174.

[14] TEPE B,SOKMEN M,AKPULAT H A,et al. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey [J]. Food chemistry,2005,92(1):89-92.

+++++ (上接第 85 页)

表 8 样品测定结果								
Table 8 The result of sample test								
样品批次 Sample batch	Pb	As	Cd	Cr	Hg	Cu	Zn	Se
1	0.082	0.103	0.025	0.049	0.005	4.6	18.9	ND
2	0.067	0.054	0.072	0.083	0.010	5.9	10.6	0.114
3	0.153	0.078	0.231	0.135	0.009	12.3	15.2	0.090
4	0.190	0.156	0.054	0.166	ND	2.6	24.8	ND
5	0.071	0.095	0.011	0.102	0.008	9.8	8.7	0.086

注:ND 表示未检出。
Note: ND stands for not detected.

3 结论

该试验采用微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定大米中的 Pb、As、Cd、Cr、Hg、Cu、Zn 和 Se 8 种元素含量,具有简便快速、线性范围宽和准确可靠的优点,适用于大米中 Pb、As、Cd、Cr、Hg、Cu、Zn 和 Se 元素含量的检测。对 5 批次市售大米的检测结果表明,该地区市售大米主要表现出对 Cd 和 Cu 的富集。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 食品中污染物限量:GB 2762—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

[2] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 粮食卫生标准:GB 2715—2005[S]. 北京:中国标准出版社,2005.

[3] 王英锋,施燕支,张华,等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚塑料中的铅、镉、汞、铬、砷[J]. 光谱学与光谱分析,2008,28(1):191-194.

[4] 石杰,李力,胡清源,等. ICP-MS 法同时测定烟草中的铬、镍、砷、硒、镉、汞、铅[J]. 烟草科技,2006(12):29-34,37.

[5] 赵小学,赵宗生,王玲玲,等. 微波 ICP-MS 联用快速测定小麦中砷、镉和铅[J]. 中国测试,2014,40(6):42-44.