

悬钩子属植物提取物的抑菌效果及抗氧化性研究

刘胜贵, 李路, 左清清, 刘光华

(怀化学院 生命科学系, 民族药作植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008)

摘要:以 8 种悬钩子属植物为试材, 采用药敏纸片法和二倍稀释法测定了悬钩子属植物提取物对黄色葡萄球菌、鸡沙门氏杆菌、粪肠球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌的抑菌圈直径和最小杀菌浓度的影响, 利用 Fenton 反应、邻苯三酚自氧化法, 测定植物水提取物的抗氧化能力, 研究蔷薇科悬钩子属植物的抑菌效果和抗氧化性, 以评价悬钩子属植物的抗菌活性和抗氧化活性。结果表明:悬钩子属植物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果最好, 其中山莓、插田泡和茅莓对金黄色葡萄球菌的 MBC 值达到了 37.5 mg/mL;悬钩子属植物对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基(O_2^-)均有一定的清除能力, 其中粗叶悬钩子、茅莓和山莓的清除能力较强。表明山莓、茅莓、插田泡可以作为新的抑菌药物进行开发, 粗叶悬钩子、茅莓和山莓可作为新的抗氧化药物利用。

关键词:悬钩子属;植物提取物;抑菌作用;抗氧化性

中图分类号:S 663.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)06-0128-04

悬钩子属(*Rubus* L.)是蔷薇科(Rosaceae)中的一个属, 全世界有 750 余种, 有 210 多种, 北到大兴安岭, 南至海南, 东至台湾, 西到新疆均有分布, 长江以南及西北地区多见。在我国民间, 悬钩子属果实可以食用, 种

子、根及叶均可入药, 具有悠久的药用历史^[1-2]。我国自 20 世纪 80 年代以来, 对悬钩子的研究利用引起了人们的关注, 对其果实、叶、根、茎等的活性成分进行分析, 发现悬钩子属植物含有丰富的维生素、挥发油、黄酮、萜及甾体类等活性成分。悬钩子属植物果实和根茎叶富含多酚类, 具有很强的清除自由基和抗脂质过氧化作用^[2-7]。我国对于悬钩子属植物的抑菌性和抗氧化性的研究大多只局限于少数种。该试验根据怀化市悬钩子属植物分布情况, 挑选了 8 种悬钩子属植物进行抑菌试验和清除自由基试验的研究, 以期了解悬钩子属植物抑菌

第一作者简介:刘胜贵(1965-), 男, 湖南宁乡人, 硕士, 教授, 现主要从事药用植物栽培与药理作用等研究工作。E-mail: swlsg@163.com.

基金项目:湖南省教育厅科研资助项目(11C0988);湖南省重点学科建设资助项目。

收稿日期:2013-12-10

The Inspection of UPLC-MS/MS for the Residue of Carbamate Pesticides in Vegetable

ZHANG Hai-xia¹, CHEN Qing-qi², XU Jing¹, YANG Jing¹

(1. Harbin Inspecting and Detecting Center for Agricultural Products Safety and Quality, Harbin, Heilongjiang 150070; 2. Harbin Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: Taking tomato, eggplant, summer squash, Chinese cabbage and cabbage as materials, twelve carbamate pesticides detecting methods in vegetable was established by utilizing UPLC-MS/MS technique. The results showed that the sample was extracted by acetonitri, purified by amino column and separated by water BEH T3 column. The detecting aims were determinate in multiple reaction monitoring(MRM) mode. External standard method was used to determine the residue contents. As a result, the detecting aims were with a good linear relationship($r^2 > 0.99$) in quality concentration range from 1 $\mu\text{g/L}$ to 100 $\mu\text{g/L}$, and blank sample substrate added to three levels adding standard sample trial, the recovery ranges were from 65.2% to 119.2% with the relative standard deviations(RSDs) 5%. The method is highly sensitive and precise and selective, it can be satisfied with those detecting needs for the residue of carbamate pesticide.

Key words: UPLC-MS/MS; vegetable; carbamate pesticides; vestigial

效果作用和清除羟基自由基和超氧阴离子自由基的能力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 8 种悬钩子属植物分别为灰毛泡 (*Rubus irenaeus* Focke.)、白叶莓 (*R. innominatus* S. Moore)、山莓 (*R. corchorifolius* L. f.)、插田泡 (*R. coreanus* Miq.)、茅莓 (*R. parvifolius* L.)、东南悬钩子 (*R. tsangorum* Hand. - Mazz.)、粗叶悬钩子 (*R. alceaeifolius* Poir.)、空心泡 (*R. rosaeifolius* Smith.)，均采于湖南省怀化市中方县康龙自然保护区。

供试菌种分别为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 91053)、鸡沙门氏杆菌 (*Salmonella pullorum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* O₁)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由怀化学院微生物学实验室提供。

LB 液体培养基: 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.0; LB 固体培养基: 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 16 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 植物提取物制备 植物提取物的制备根据文献 [8-10] 方法进行, 并稍加改动。将采集的植物洗净, 在室温下干燥, 60℃ 烘干至恒重, 碾成粉末。称取试验粉末 25 g 置三角烧瓶中, 再加 150 mL 溶剂, 用保鲜膜封口, 25℃、120 r/min 摇床培养 48 h。过滤得滤液, 滤渣再加入 150 mL 相同溶剂, 用同样方法再提取 48 h, 过滤得滤液。将 2 次滤液混合, 用旋转蒸发仪浓缩。分别用石油醚、乙醚、氯仿、甲醇、蒸馏水等 5 种溶剂浸提 8 种悬钩子属植物, 水提取物用真空冷冻干燥机干燥成膏状物, 其余有机溶剂提取物用风干的方式干燥成膏状物。提取率 (%) = 膏状物重量 (g) / 25 (g) × 100%。

1.2.2 菌悬液制备 试验菌培养及菌悬液制备依据文献 [11] 方法进行, 将金黄色葡萄球菌、鸡沙门氏杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌分别接种在 LB 固体培养基上, 37℃ 活化培养 24 h。挑取活化后的菌落与无菌生理盐水混合, 并用生理盐水调至 0.5 MCF 单位的标准接种物, 即为菌悬液浓度 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL。再用无菌生理盐水按 10 倍稀释法将标准接种物配制成菌悬液浓度 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL。

1.2.3 抑菌圈直径测定 采用药敏纸片法测定抑菌圈直径 [12-13], 将定性滤纸打成直径为 6 mm 的圆形滤纸片, 灭菌后干燥, 分别浸在浓度为 300 mg/L 的不同植物提取物中。将剂量为 2 mL、8 万 U 的庆大霉素溶液 (相当于 80 mg) 稀释到 2 mg/mL 的浓度, 使每片滤纸片中含有 10 μg 的庆大霉素, 以此为对照 (CK)。取出滤纸片, 晾干, 即制成药敏纸片。在无菌操作条件下将灭菌后的固体培养基倒入直径为 75 mm 的无菌培养皿中, 每皿

15~20 mL, 冷却制成平板。取 0.1 mL 浓度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL 的菌悬液, 滴加于 LB 固体培养基平板中央, 涂布均匀。将含菌平板倒置干燥约 3~5 min 后, 用无菌镊子取药敏纸片平贴在含菌平板上, 每个平板贴 4 个药敏纸片, 并做好相应标记。然后放入 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 18~24 h, 测量抑菌圈直径, 3 次重复。

1.2.4 MBC 值测定 对山莓、插田泡、茅莓、东南悬钩子等 4 种植物的提取物, 经二倍稀释法稀释后, 系列试管中植物提取物浓度分别为 300.00、150.00、75.00、37.50 mg/mL [14-15]。根据观察试管中培养物的浊度, 以肉眼观察下未见生长的药物最低浓度为最低抑菌浓度 (MIC), 但是由于提取液本身呈深棕色, 依据培养液的浊度不能判断, 因此只能进行涂布, 依据 MBC 值进一步判断悬钩子属植物提取物的抑菌效果。测定其对金黄色葡萄球菌、鸡沙门氏杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、铜绿假单胞菌的 MIC 值。在每支试管中加入 0.1 mL 浓度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ CFU/mL 的菌悬液, 然后置于 37℃ 下培养 24 h, 测定 MIC 值, 3 次重复。测定 MIC 值后, 再从每个试管中取 0.1 mL 培养液涂布在琼脂平板上, 在 37℃ 下培养 24 h, 观察有无菌落生成。以使活细菌数量减少到起始数量的 0.1% 的最低提取物浓度为最低杀菌浓度 (MBC 值)。

1.2.5 悬钩子属植物水提物清除羟基自由基能力测定

采用 Fenton 反应检测各种自由基清除剂对羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 的清除作用 [16-17]。该试验以清除羟基自由基作用呈明显量效关系的抗氧化剂硫脲作对照 (CK), 比较 8 种浓度为 100 mg/L 的悬钩子属植物水提物清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力。E = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$, 式中, E 为清除率, $A_{\text{样品}}$ 为样品组的吸光度, $A_{\text{对照}}$ 为对照品的吸光度, $A_{\text{空白}}$ 为空白组的吸光度。

1.2.6 悬钩子属植物水提物清除超氧阴离子自由基试验 利用邻苯三酚自氧化反应测定自由基清除剂对其产生的超氧阴离子自由基的清除作用 [18-19], 以维生素 C 作对照 (CK)。邻苯三酚自氧化的测定: 吸取 4.5 mL 浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.20)、4.2 mL 蒸馏水, 混匀后置 25℃ 水浴中 20 min, 立即加入在 25℃ 预热的 3 mmol/L 的邻苯三酚 0.3 mL, 立即混匀, 迅速倒入比色池中, 在 320 nm 波长下每隔 30 s 记录 1 次吸光值, 共测 5 min。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂对悬钩子属植物提取率的影响

由表 1 可知, 不同溶剂对悬钩子属植物提取率的影响较大, 蒸馏水对东南悬钩子、白叶莓、灰毛泡、插田泡、山莓 5 种植物的提取率最高; 甲醇对粗叶悬钩子、茅莓、空心泡 3 种植物的提取率最高; 石油醚对 8 种悬钩子属植物的提取率均最低。

表 1 不同溶剂对悬钩子属植物提取率的影响

溶剂	东南悬钩子	粗叶悬钩子	白叶莓	灰毛泡	茅莓	插田泡	空心泡	山莓
石油醚	1.91	0.62	0.57	1.28	0.48	0.64	1.57	0.70
乙醚	2.65	1.51	1.63	1.88	1.61	3.23	2.18	0.98
氯仿	2.15	2.91	0.82	1.90	3.59	3.69	3.19	4.17
甲醇	4.85	7.69	1.27	2.81	8.02	7.88	3.85	1.39
蒸馏水	7.89	3.42	8.64	4.70	5.87	8.10	2.75	4.41

2.2 悬钩子属植物提取物的抑菌效果

2.2.1 不同悬钩子植物提取物对 5 个菌种的抑菌圈直径的影响 由表 2 可知,8 种悬钩子属植物提取物对供

试菌种都有一定程度的抑制作用,其中山莓、插田泡、茅莓、东南悬钩子的提取物抑菌效果较好,且抑菌谱较广,茅莓的提取物对大肠杆菌的抑制作用最好。

表 2 不同悬钩子植物提取物对 5 个菌种的抑菌圈直径的影响

	大肠杆菌	粪肠球菌	金黄色葡萄球菌	鸡沙门氏菌	铜绿假单胞菌
庆大霉素	28.7	28.7	27.0	25.3	28.7
粗叶悬钩子	—	—	±	8.0	—
山莓	9.3	8.0	9.3	10.0	8.0
白叶莓	±	—	—	—	—
茅莓	18.3	8.0	9.3	14.0	±
灰毛泡	—	—	—	—	—
东南悬钩子	±	8.0	9.8	10.0	8.0
空心泡	—	—	—	—	—
插田泡	8.7	9.3	10.3	12.0	8.0

注:“—”表示无抑菌圈;“±”表示抑菌圈不明显。

2.2.2 不同悬钩子属植物提取物的最小杀菌浓度 由表 3 可知,4 种悬钩子属植物提取物均对供试菌种表现出较好的杀菌效果,其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌

的作用较强,对铜绿假单胞菌的作用较弱。其中,茅莓和山莓的抑菌效果最强。

表 3 4 种悬钩子植物提取物对 5 个菌种的 MBC 值

植物提取物	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	鸡沙门氏杆菌	铜绿假单胞菌	粪肠球菌
山莓	75.00	37.50	37.50	150.00	75.00
插田泡	37.50	75.00	75.00	300.00	150.00
茅莓	37.50	37.50	75.00	75.00	75.00
东南悬钩子	75.00	75.00	125.00	300.00	150.00

2.3 不同悬钩子属植物提取物的抗氧化性

2.3.1 不同悬钩子属植物提取物对羟基自由基清除率的影响 由图 1 可知,悬钩子属植物水提取液对羟基自由基的清除能力随浓度增大而增强,粗叶悬钩子和山莓在各浓度下其清除羟基自由基能力比对照样品硫脲强,

在较高浓度时,茅莓、白叶莓和东南悬钩子水提物清除羟基自由基能力比硫脲强。

2.3.2 邻苯三酚自氧化法测定结果 由图 2 可知,大部分悬钩子属植物水提物都能清除反应体系所产生的 O_2^- ,粗叶悬钩子在低浓度时其清除超氧阴离子自由基

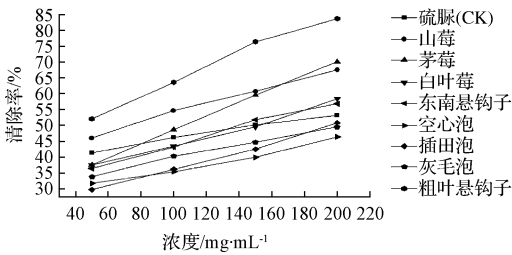


图 1 各种悬钩子属植物水提物和硫脲对羟基自由基的清除率曲线

Fig. 1 Curves of hydroxyl radicals ($\cdot OH$) scavenging rate of 8 species of *Rubus* and thiourea

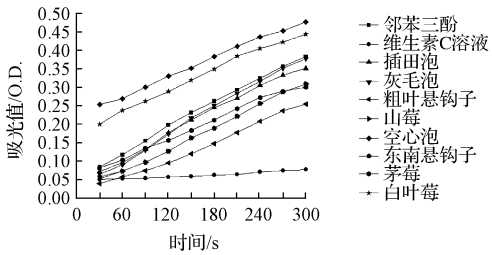


图 2 各反应体系中超氧阴离子自由基的氧化速率随时间的变化

Fig. 2 Curves of oxidation rate of superoxide radicals (O_2^-) respect to time

能力比维生素 C 略强,但在较高浓度下则比维生素 C 弱。

3 结论

该试验结果表明,悬钩子属植物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌效果最好,其中山莓、插田泡和茅莓对金黄色葡萄球菌的 MBC 值达到了 37.5 mg/mL;悬钩子属植物对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基(O_2^-)均有一定的清除能力,其中粗叶悬钩子、茅莓和山莓的清除能力较强。研究结果表明,山莓、茅莓、插田泡可以作为新的抑菌药物进行开发,粗叶悬钩子、茅莓和山莓可作为新的抗氧化药物利用;悬钩子属植物提取物具有较强的抗菌作用和抗氧化作用,且因其果实富含各种营养成分,根、茎、叶可以入药,悬钩子属植物具有很高的药用价值和保健功效,有较大的开发潜力。目前国内对悬钩子属植物的研究和利用还比较少,大都是调查资源分布情况,该文通过对抗菌活性和抗氧化性研究,可以为悬钩子属植物开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 37 卷. 北京:科学出版社, 1985.
- [2] 韩加,刘继文. 悬钩子属植物生物学作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2): 1-4.
- [3] 张继,白贞芳,邵威平,等. 甘肃省悬钩子属药用植物资源[J]. 中草药, 2001, 32(12): 1134-1136.
- [4] 林茂祥,刘正宇,韩凤,等. 金佛山悬钩子属药用植物资源调查研究[J]. 资源开发与市场, 2008, 24(8): 693-695.
- [5] 张淑芬,王敏. 树莓液对早期 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(7): 902.
- [6] 桑建忠,顾嫫. 中国东南部部分悬钩子果实的营养成分[J]. 资源开发与市场, 1995, 4(2): 22-26.
- [7] 朱映安,和加卫,杨正松,等. 贵州梵净山自然保护区悬钩子属植物资源考察及开发利用[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 504-508.
- [8] 鲁世伟,罗兰,李玲玲,等. 22 种植物乙醇提取物对植物病原菌的抑菌作用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 98-102.
- [9] Duraipandian V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2006, 6: 35-41.
- [10] Mothana R, Lindequist U, Gruenert R, et al. Studies of the in vitro anti-cancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2009, 9: 7-17.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Fifteenth informational supplement, CLSI/NCCLS document M100-S15[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne Pennsylvania, 2005, 25(1): 163-167.
- [12] 刘胜贵,陈鸿鸣,李军,等. 羊耳菊有机溶剂提取物的抑菌作用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(3): 398-400.
- [13] 肖家军,郝培应,程滨,等. 野豌豆不同提取物抑菌活性比较[J]. 生物学杂志, 2010, 27(2): 97-104.
- [14] 张霞,艾启俊,孙宝忠,等. 中草药提取物对沙门氏菌的抑菌效果研究[J]. 食品工业科技, 2010, 1(1): 88-90.
- [15] 杨艾青,艾启俊,张德权,等. 几种中草药提取液对沙门氏菌抑菌效果研究[J]. 食品科技, 2011, 37(3): 176-179.
- [16] 张爱梅,臧运波. 吡啶红荧光法检测 Fenton 反应产生的羟自由基[J]. 理化检验化学分册, 2006, 42(6): 469-470.
- [17] 李茂昌,曹秋娥,刘亚. 亮绿褪色光度法检测 Fenton 体系产生的羟自由基[J]. 云南化工, 2006, 33(4): 39-42.
- [18] 李瑜,许时婴. 蒜粉体外抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 25-28.
- [19] 静天玉,赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法[J]. 生物化学和生物物理进展, 1995, 22(1): 84-86.

Study on Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Extract of *Rubus* Spp.

LIU Sheng-gui, LI Lu, ZUO Qing-qing, LIU Guang-hua

(The Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Department of Life Sciences, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract: Taking 8 species of *Rubus* spp. as materials, disk diffusion method and tube doubling dilution method were applied to test the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* 91053, *Salmonella pullorum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* O₁ and *Pseudomonas aeruginosa*. The antioxidant activity was investigated by measuring the scavenging activity of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) produced by Fenton reaction and superoxide radicals (O_2^-) generated from the autoxidation of pyrogallol determined by colorimetry, to evaluate antimicrobial, antioxidant activities of *Rubus* spp.. The results showed that the water extracts of *Rubus* spp. showed the highest antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* 91053 and *Escherichia coli* O₁, among which *R. corchorifolius*, *R. coreanus* and *R. parvifolius* presented the lowest MBC (37.5 mg/mL); *R.* spp. in the test showed certain scavenging effect on hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and superoxide radicals (O_2^-), and the ability of *R. alceaefolius*, *R. parvifolius* and *R. corchorifolius* was highest. The results showed that *R. corchorifolius*, *R. parvifolius*, and *R. coreanus* could be studied as new antimicrobial drugs, and *R. alceaefolius*, *R. parvifolius* and *R. corchorifolius* could be used as new antioxidant drugs.

Key words: *Rubus*; plant extract; antimicrobial activity; antioxidant activity