

费菜多酚含量的测定及体外抗菌活性研究

强毅¹, 王政军¹, 陈克克², 韩军¹, 孙铁峰¹

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710062;

2. 西安文理学院生物技术学院, 陕西西安 710065)

摘要:目的: 研究药食两用植物费菜不同部位多酚含量及其 70% 甲醇提取物体外抗菌活性。方法: 采用热回流提取法 70% 甲醇提取费菜, 使用福林酚 (Folin-Ciocalteu) 法对其不同部位多酚含量进行测定; 采用牛津杯法和 96 孔板法测定抑菌圈大小、最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC), 比较费菜 70% 甲醇提取物对 10 种细菌的抑制作用。结果: 费菜地上部分和地下部分多酚含量分别为 45.59 ± 0.87 和 96.25 ± 0.47 mg/g (以没食子酸量/干材料表示), 地下部分多酚含量是地上的 2 倍多。费菜 70% 甲醇提取物对 8 种常见的细菌均表现出较强的抑菌活性, 金黄色葡萄球菌对提取物最为敏感, 其 MIC 和 MBC 分别为 6.25、25 mg/mL。

关键词: 费菜, 多酚, 抑菌活性, 最小抑菌浓度, 最小杀菌浓度

Determination of total polyphenols and antimicrobial activity of methanol extract from *Sedum aizoon* L.

QIANG Yi¹, WANG Zheng-jun¹, CHEN Ke-ke², HAN Jun¹, SUN Tie-feng¹

(1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2. School of Biological Technology, Xi'an University of Arts and Science, Xi'an 710065, China)

Abstract: Objective: To determine the content of total polyphenols in aboveground part and underground part of *Sedum aizoon* L., and to research the antimicrobial activities of the 70% methanol extract from *Sedum aizoon* L. Methods: The content of total polyphenols was determined by Folin-Ciocalteu colorimetric assay with gallic acid as reference. Heat reflux extraction was used to get 70% methanol extract, and antimicrobial activity was evaluated using the Oxford cup method and 96-well plates to measure the size of the zone of inhibition, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Results: The results showed that the contents of total polyphenols in aboveground part and underground part of *Sedum aizoon* L. were (45.59 ± 0.87) mg/g and (96.25 ± 0.47) mg/g, respectively. And the 70% methanol extract from *Sedum aizoon* L. was active against almost all tested microbial species. The *Staphylococcus aureus* was most inhibited by the methanol extract, the MIC and MBC was 6.25 and 25 mg/mL, respectively.

Key words: *Sedum aizoon* L.; total polyphenols; antimicrobial activity; MIC; MBC

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)05-0053-04

植物多酚 (Plant Polyphenols) 是多羟基酚类化合物的总称, 是植物中重要的次生代谢产物, 分子内含有多于一个或几个苯环相连的羟基化合物^[1], 具有很好的抗菌消炎、抗氧化、酶活性抑制、防辐射突变、抗衰老、降血压、增强免疫力等作用, 可预防与治疗多种疾病, 在食品工业中作为天然添加剂被广泛用作防腐剂、抗氧化剂和澄清剂等^[2-3]。费菜 (*Sedum aizoon* L) 为景天科 (*Crassulaceae*) 景天属 (*Sedum*) 多

年生草本植物, 分布于陕西、江苏、河南、湖北、宁夏和山东等多个省区, 以根及全草入药, 为秦岭“太白七药”之一, 具有散瘀止血、安神、解毒之功效, 含有黄酮与酚类、生物碱、谷甾醇、齐墩果酸、景庚糖等药用成分, 主治出血、损伤、心悸、失眠、毒虫蜇伤等症^[4]; 费菜茎叶可食, 被收于明朝朱橚所著《救荒本草》, 作为野生蔬菜具有心血管保健的功效, 被称为养心草^[5], 同时也是多酚的资源植物之一^[6]。本文使用福林酚法 (Folin-Ciocalteu, FC) 对费菜不同部位 70% 甲醇提取物中的多酚含量予以测定, 并采用牛津杯法、MIC 和 MBC 法综合评价费菜提取物对 10 种细菌的抑制作用, 以期综合开发利用费菜资源提

收稿日期: 2012-09-04

作者简介: 强毅 (1980-), 男, 在读博士, 研究方向: 植物生物技术。

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目计划 (12JK1109)。

[16] Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, et al. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats[J]. Comp Clin Path, 2005, 13: 190.

[17] 马晓翠, 沙印林, 林克椿, 等. β 1-40 对神经细胞膜通透性及胞内游离 Ca^{2+} 的影响[J]. 科学通报, 2003, 48 (8): 802-806.

供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物材料 采自陕西省西安市灞桥区,经陕西师范大学田先华教授鉴定为景天科景天属植物费菜 (*Sedum aizoon* L.),干燥后将其地上、地下部分分离,粉碎并过40目筛,保存备用;蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) A18、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) A20、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) A21、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) A70、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) A89、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*) A113、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) A119、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 26003、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 1.2429、肺炎克雷伯氏菌 (*Keleiboshijun ganran*) 1.1736 北京微生物研究所;没食子酸标准品 中国药品生物制品检定所;Folin-Ciocalteu 试剂 上海荔达生物科技有限公司;四环素 Wolsen 公司;二甲基亚砜 (DMSO) Sigma 公司;Mueller-Hinton Agar 培养基 (MHA)、MH 肉汤培养基 (MHB) 青岛高科园海博生物技术有限公司;甲醇 西安化学试剂厂;其它试剂 均为国产分析纯。

TU-1810 紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;FZI02 微型植物粉碎机 黄骅市中兴有限责任公司;Q/BKYY31-2000 型电热恒温鼓风干燥箱 上海跃进医疗器械厂;SL202N 型药物电子天平 上海明桥精密科学仪器有限公司;HH-6B 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;索氏提取装置,超净工作台,不锈钢数显卡尺等,牛津杯(内径6mm,外径7mm)。

1.2 实验方法

1.2.1 多酚含量测定

1.2.1.1 样品溶液的制备 精确称取费菜地上与地下部分植物材料各10.0g,分别使用70%甲醇100mL热回流提取两次,每次3h,过滤后合并滤液,定容至200mL,即为费菜不同部位多酚提取液。

1.2.1.2 没食子酸对照品溶液的配制 精确称取已烘干至恒重的没食子酸标准品(纯度 $\geq 95\%$)13mg,用甲醇溶解并定容至50mL,即得终浓度为0.26mg/mL没食子酸标准品溶液。

1.2.1.3 没食子酸标准曲线的制备 分别精密吸取没食子酸标准品溶液0、0.1、0.4、0.5、0.6、0.8mL置于25mL量瓶中,向量瓶中依次加入10.0mL蒸馏水,再各加入Folin-Ciocalteu显色剂2.0mL,充分振荡后静置6min,分别加入15% Na_2CO_3 溶液2.0mL,蒸馏水定容后摇匀,在室温下避光放置反应2h。以第1瓶溶液作为空白对照,于765nm波长处测定吸光度,重复3次。根据没食子酸溶液的浓度和吸光度值,绘制标准曲线。

1.2.1.4 样品的含量测定 分别取样品溶液50 μL ,按照1.2.1.3没食子酸标准曲线的制备方法进行实验,测定费菜样品中多酚的含量,重复3次。

1.2.1.5 精密度实验 分别取3份地下部分样品,参

考1.2.1.1样品溶液的制备方法,1.2.1.4样品的含量测定方法,在相同的条件下分别进行6次平行测定,检测方法的精密度。

1.2.1.6 稳定性实验 将上述样品溶液每隔1h测定1次吸光度,重复3次,连续测定4次,考察4h内的稳定性。

1.2.1.7 重复性实验 分别取3份样品,参考1.2.1.1样品溶液的制备方法平行制备,分别测定吸光度,考察其重复性。

1.2.1.8 加样回收率实验 精密吸取25 μL 已知浓度的样品溶液各3份,各组分别精密加入已知含量没食子酸标准品溶液25 μL ,按1.2.1.3没食子酸标准曲线的制备方法显色后,以不含样品的溶液作为空白对照,于765nm波长处测定吸光度,重复3次,计算加样回收率。

1.2.2 抗菌活性研究

1.2.2.1 菌悬液的制备 将供试菌在MHA斜面培养基上活化,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12h。用接种环挑取适量菌体于0.9%的生理盐水中,当 OD_{600} 值在0.15~0.25之间,其对应细菌数目应为 $10^6\sim 10^8\text{CFU/mL}$,即为实验用菌悬液。

1.2.2.2 样品溶液的制备 精确称取费菜材料50.0g,70%甲醇热回流连续提取两次,每次3h,过滤后合并滤液,干燥箱烘干(45~50 $^{\circ}\text{C}$)。提取物用DMSO溶解,配制成浓度为200mg/mL的样品溶液,同时用无菌水配制浓度为0.5mg/mL的盐酸四环素溶液作阳性对照,过滤除菌。

1.2.2.3 抗菌活性实验 抑菌圈实验采用牛津杯法测定^[7]。将已灭菌的MHA培养基倒入无菌培养皿,待培养基平板冷凝后,吸取0.1mL菌悬液滴加至平板中涂布均匀。每个培养皿放置3个牛津杯,每个牛津杯中加入100mg/mL的样品溶液50 μL ,另设阳性对照为0.5mg/mL盐酸四环素,阴性对照为DMSO溶液。将培养皿4 $^{\circ}\text{C}$ 固定2h后转入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱,12h后测定抑菌圈。每组实验重复3次。

最小抑菌浓度(MIC)采用96孔板法测定^[8]。将MHB培养基与菌悬液按20:1混匀后取100 μL 加入96孔板中,于第1孔中加入200mg/mL的样品溶液100 μL 混匀,采用倍半稀释法稀释至第11孔,并从第11孔中吸取100 μL 弃去,第12孔作为阴性对照,不含样品溶液。向每孔中分别加入5 μL 菌悬液。阳性对照组用盐酸四环素替代样品溶液。将加好样的96孔板密封后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱1h后放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱,12h后观察。以肉眼观察,无浑浊者,即为受试菌的最小抑菌浓度(MIC)。每组实验重复3次。

最小杀菌浓度(MBC)采用96孔板法测定^[9-10]。将每个MIC前(包括MIC)的混合液取5 μL ,移入100 μL 新鲜MHB培养基的96孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养24h后观察,无浑浊者即能杀死99.5%原始种入的细菌,为该菌的最低杀菌浓度(MBC)。每组实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 费菜多酚含量的测定

2.1.1 没食子酸标准曲线绘制结果 以没食子酸质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标,相应吸光度值为纵坐标,绘制没食子酸标准曲线(图1),得回归方程: $y = 0.1282x + 0.0142$,相关系数 $R^2 = 0.9985$, $RSD(n = 3) = 1.58\%$ 。实验结果表明,没食子酸标准品溶液浓度在 $1.04 \sim 8.32 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

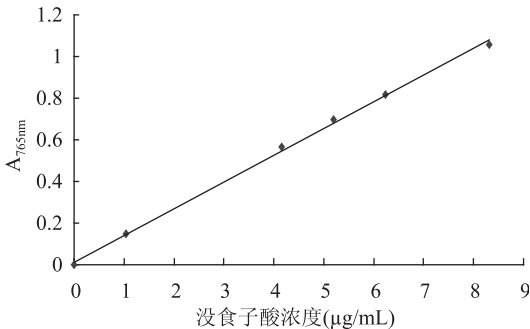


图1 没食子酸标准曲线

Fig.1 Standard curve of gallic acid

2.1.2 样品中多酚含量测定结果 根据没食子酸标准曲线的回归方程,算出费菜不同部位多酚含量。由表1可知,费菜地上部分和地下部分多酚含量分别为 45.59 ± 0.87 和 $96.25 \pm 0.47 \text{mg}/\text{g}$ (以没食子酸量/干材料表示, $n = 3$)。

表1 费菜多酚含量测定结果

Table 1 Contents of total polyphenols in *Sedum aizoon* L.

部位	组别	多酚含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均值($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
地上部分	1	44.86	45.59 ± 0.87
	2	45.37	
	3	46.55	
地下部分	1	96.14	96.25 ± 0.47
	2	95.84	
	3	96.76	

费菜作为药食两用植物,以根或全草入药,地上部分的茎叶亦可食用,一般地下部分在春秋季节采挖,全草随用随采^[11];根据测定的结果,地下部分作为费菜最重要的药用部位,其多酚含量是地上部分的两倍以上,但地上部分一年可多次采收,亩产可达 8000kg ,资源量较大,因此,开展费菜全草综合利用研究对于费菜工业化开发利用具有重要意义。

2.1.3 精密度实验结果 由表2可知,精密度实验 RSD 为 0.14% ,表明仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性实验结果 由表3可知,稳定性实验 RSD 为 0.22% ,表明待测样品溶液在 4h 内基本稳定。

2.1.5 重复性实验结果 由表4可知,重复性实验

RSD 为 0.15% ,表明方法重复性良好。

表2 精密度实验结果

Table 2 Result of precision test

样品数	吸光度						RSD (%)
1	0.644	0.643	0.644	0.644	0.643	0.643	0.14
2	0.646	0.645	0.646	0.645	0.645	0.645	
3	0.645	0.644	0.645	0.645	0.645	0.645	

表3 稳定性实验结果

Table 3 Result of stability test

时间(h)	吸光度			RSD (%)
0	0.644	0.643	0.644	0.22
1	0.643	0.643	0.642	
2	0.642	0.642	0.642	
3	0.642	0.641	0.641	
4	0.641	0.640	0.639	

表4 重复性实验结果

Table 4 Result of repetitive test

样品数	吸光度			RSD (%)
1	0.644	0.643	0.644	0.15
2	0.646	0.645	0.646	
3	0.645	0.644	0.645	

2.1.6 加样回收率实验 加样回收率实验结果见表5,加样回收率实验 RSD 为 0.75% ,表明方法的准确率较高。

2.2 抑菌活性结果与分析

费菜提取物对8种常见的细菌具有一定的抑制作用,具有广谱抗菌的效果。尤其是对于藤黄八叠球菌、白色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌,其抑菌圈大小分别为 13.97 ± 0.8 、 13.94 ± 0.4 、 13.63 ± 0.4 和 $12.39 \pm 0.5 \text{mm}$,但对表皮葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌均无抑制作用,结果见表6。

2.3 MIC 和 MBC 结果与分析

费菜提取物在较低的浓度下对金黄色葡萄球菌表现出较强的抑菌和杀菌作用,其 MIC 、 MBC 分别为 6.25 、 $25 \text{mg}/\text{mL}$ 。对于巨大芽孢杆菌和藤黄八叠球菌,费菜提取物有一定的抑菌效果,但杀菌作用不甚明显。费菜提取物对凝结芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌以及白色葡萄球菌的 MIC 大于或等于 $25 \text{mg}/\text{mL}$, MBC 大于或等于 $50 \text{mg}/\text{mL}$,说明对这5种菌均无明显的杀菌抑菌作用,实验结果见表7。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起食品污染和细菌性食物中毒的一种重要细菌,在自

表5 多酚加样回收率实验结果

Table 5 Results of recoveries tests

序号	样品溶液中没食子酸含量(mg)	标准没食子酸加入量(mg)	测得的总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD (%)
1	0.096591	0.0065	0.102641	99.56	100.42	0.75
2	0.095987	0.0065	0.103226	100.72		
3	0.096055	0.0065	0.103551	100.97		

自然界中分布广泛,其致病力主要取决于产毒素和酶的能力,主要有溶血毒素、肠毒素、血浆凝固酶和耐热核酸酶等^[12];植物多酚可以破坏金黄色葡萄球菌细胞膜的结构,导致细胞通透性增加和细胞内容物外泄,同时,通过影响细菌核酸、磷脂等细胞重要成分的合成及能量代谢,阻碍细菌蛋白正常表达,从而影响其细胞的结构组成以及酶的催化活性,最终导致细菌正常生理功能的丧失^[13]。由于多酚类物质的组成及含量差异导致不同植物来源的多酚提取物对金黄色葡萄球菌的抑制作用不同,目前,我们正在对费菜多酚的组成及其抗菌机制进行进一步研究,以期开发出新的可用于工业化应用的天然抗菌剂。

表6 费菜提取物的抑菌圈直径(mm)

Table 6 Diameter of inhibition zone of *Sedum aizoon* L. (mm)

菌种	提取物	四环素	DMSO
表皮葡萄球菌	-	14.54 ± 0.6	-
金黄色葡萄球菌	12.39 ± 0.5	15.76 ± 0.3	-
巨大芽孢杆菌	10.88 ± 0.1	18.88 ± 0.5	-
凝结芽孢杆菌	12.06 ± 0.6	17.47 ± 0.8	-
肺炎克雷伯氏菌	-	11.22 ± 0.3	-
蜡状芽孢杆菌	11.72 ± 0.3	16.59 ± 0.1	-
藤黄八叠球菌	13.97 ± 0.8	16.99 ± 0.4	-
枯草芽孢杆菌	13.63 ± 0.4	18.57 ± 0.8	-
大肠杆菌	12.32 ± 0.4	17.37 ± 0.6	-
白色葡萄球菌	13.94 ± 0.4	18.81 ± 0.7	-

注:“-”无活性;表7同。

表7 费菜提取物对10种病原菌的MIC和MBC

Table 7 MICs and MBCs of *Sedum aizoon* L. to 10 species of pathogenic microorganisms

菌种	提取物		四环素	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (μg/mL)	MBC (μg/mL)
金黄色葡萄球菌	6.25	25	1.56	6.25
巨大芽孢杆菌	12.5	>100	1.56	6.25
凝结芽孢杆菌	25	50	3.125	12.5
蜡状芽孢杆菌	50	100	1.56	12.5
藤黄八叠球菌	12.5	100	0.78	1.56
枯草芽孢杆菌	25	50	0.39	6.25
大肠杆菌	25	50	1.56	3.125
白色葡萄球菌	25	50	1.56	3.125

3 结论

3.1 植物多酚是植物主要成分之一,具有重要的生理活性,不同产地的气候与生态环境以及药用植物种质间的基因差异均会影响其形成与积累,同一植物不同部位的多酚含量也会有所差异。本实验采用的福林酚试剂法作为测定多酚含量的常规方法之一,较高锰酸钾法、酒石酸亚铁法、普鲁士兰法等方法准确度和精密度更高、稳定性更好^[14-15],可用于有效成分的检验和质量控制。实验表明费菜地上部分和地下部分多酚含量分别为 45.59 ± 0.87 、 96.25 ± 0.47 mg/g (以没食子酸量/干材料表示, $n=3$),多酚

含量较高,尤以地下部分多酚含量最高。同时,费菜是我国传统药材,其来源植物分布广泛,种植栽培容易,资源量极大,可以为工业化应用提供良好的原料保障。

3.2 实验中选取了具有代表性的微生物检测费菜提取物的抗菌活性,结果表明费菜提取物对多种细菌具有一定的抗菌效果,特别是对能引起细菌性食物中毒、易产生耐药性的金黄色葡萄球菌抗菌效果明显。

费菜作为一种药食两用植物,其多酚含量高,抗菌活性强,资源量大,可广泛用于食品、药品以及化妆品等工业生产,具有进一步开发利用的价值。

参考文献

- [1] 耿中华. 植物多酚的研究进展[J]. 广西轻工业, 2008(5): 4-6.
- [2] 尤新. 有益人类健康的植物多酚类功能性食品添加剂和配料(上)[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 18-20.
- [3] 李健, 杨昌梅, 李群梅, 等. 植物多酚的应用研究进展[J]. 广西轻工业, 2008(12): 1-3.
- [4] 中药大辞典编委会. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3316-3317.
- [5] 郭素华, 黄建福, 郑连梅, 等. 养心草及其制剂的研究[J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(4): 35-38.
- [6] 朱太平, 刘亮, 朱明. 中国资源植物[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 708.
- [7] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学出版社, 1986: 93-96.
- [8] Ebrahimabadi A H, Ebrahimabadi E H, Djafari-Bidgoli Z, et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran[J]. Food Chemistry, 2009(6): 37-42.
- [9] Visnja K, Sonja S M, Dardjela S, et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia) [J]. Food Chemistry, 2009(10): 1-9.
- [10] G More, T E Tshikalangea, N Lall, et al. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 119: 473-477.
- [11] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 765-766.
- [12] 王小红, 戚向阳, 谢笔钧, 等. 植物多酚对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2004, 25(4): 66-68.
- [13] 钱丽红, 陶妍, 谢晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628-1633.
- [14] 徐佳, 辛立方, 张瑞廷, 等. 改良的 Folin-Ciocalteu 比色法测定核桃外果皮中总多酚含量[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 60-63.
- [15] 程春龙, 李俊清. 植物多酚的定量分析方法和生态作用研究进展[J]. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2457-2460.