

莓茶活性物质提取及抑菌机制

梁馨文, 高田田, 邱敏, 张建龙, 刘强, 胡继亮, 梁耀文, 刘玮炜*

(江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 利用单因素试验、正交试验结合验证试验, 以乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)、料液比[1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g/mL)]、提取时间(20、40、60、80、100 min)筛选莓茶活性物质的最佳提取条件, 研究莓茶提取物对哈维氏弧菌抑菌活性影响; 采用牛津杯法测定最小抑菌浓度; 通过生长曲线、细胞膜完整性和通透性、细胞壁以及扫描电镜观察等方法探讨莓茶提取物的抑菌作用及机理。结果表明: 莓茶提取物最佳提取条件为乙醇浓度80%、料液比1:30 (g/mL)、提取时间60 min。基于此条件莓茶提取物对哈维氏弧菌的抑菌圈直径为(23.67±0.17) mm, 莓茶提取物的最小抑菌浓度为0.015 6 g/mL。经最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)处理后, 发现莓茶提取物对哈维氏弧菌生长曲线抑制效果好; 能够破坏菌体细胞膜完整性, 增大细胞膜的通透性, 使细胞内生物大分子渗出; 对哈维氏弧菌细胞壁有明显破坏作用; 菌体表面变粗糙, 出现裂解胞浆外流, 导致细胞边缘模糊, 这表明莓茶提取物对哈维氏弧菌具有较强抑制作用。

关键词: 莓茶; 提取工艺优化; 哈维氏弧菌; 抑菌活性; 抑菌机制

Active Substance Extraction and Inhibitory Mechanism of *Ampelopsis grossedentata*

LIANG Xinwen, GAO Tiantian, QIU Min, ZHANG Jianlong, LIU Qiang, HU Jiliang,

LIANG Yaowen, LIU Weiwei*

(School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

Abstract: Using the single factor test, the orthogonal test in combination with the verification test, the optimum extraction process of flavonoids (dihydromyricetin, myricetin, myricetin) from *Ampelopsis grossedentata* was studied in terms of the ethanol solvent concentration (50%, 60%, 70%, 80%, 90%), the solid/liquid ratio [1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 (g/mL)], extraction time (20, 40, 60, 80, 100 min). The effect of *A. grossedentata* extract on the antibacterial activity of *Vibrio harveyi* was thus investigated. The minimum inhibitory concentration was determined with the Oxford cup method. Growth curve, cell membrane integrity and permeability, cell wall, and scanning electron microscope were applied to discuss the antibacterial activity and mechanism of *A. grossedentata* extract. The result showed that the optimum extraction conditions were an ethanol concentration of 80%, a solid/liquid ratio of 1:30 (g/mL), and an extraction time of 60 minutes. Under these conditions, the diameter of the inhibitory zone of the *A. grossedentata* extract against *V. harveyi* was (23.67±0.17) mm and the minimum inhibit concentration of the *A. grossedentata* extract was 0.015 6 g/mL. After minimum inhibitory concentration (MIC) treatment, the *A. grossedentata* extract was found to have a good inhibitory effect on the growth curve of *V. harveyi*. It could destroy the integrity of the cell membrane, increase the permeability of the cell membrane, and cause the release of intracellular biomacromolecules. The cell wall of *V. harveyi* was damaged. The surface of the bacteria became rough, the lysed cytoplasm flowed out and the edge of the cells was blurred, indicating that the *A. grossedentata* extract had a strong inhibitory mechanism against *V. harveyi*.

Key words: *Ampelopsis grossedentata*; optimization of extraction process; *Vibrio harveyi*; inhibitory activity; inhibitory mechanism

基金项目: 江苏省研究生研究与实践创新项目(KYCX2022-79, KYCX2023-142, SY202306X1); 江苏省优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省苏北科技发展规划(科技富民强县)项目(SZ-LYG202129); 江苏省大学生实践创新训练计划项目(SY202111641640004)

作者简介: 梁馨文(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学。

*通信作者: 刘玮炜(1965—), 女(汉), 教授, 博士, 研究方向: 有机合成。

引文格式:

梁馨文,高田田,邱敏,等.莓茶活性物质提取及抑菌机制[J].食品研究与开发,2025,46(3):132-141.

LIANG Xinwen, GAO Tiantian, QIU Min, et al. Active Substance Extraction and Inhibitory Mechanism of *Ampelopsis grossedentata*[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 132-141.

近年来,随着经济的快速发展,中国水产养殖产量约占世界70%。水产养殖行业包含各种淡水和海洋鱼类、贝类、甲壳类和水生植物,已成为我国和全球经济中最重要的经济产业之一^[1]。但随着水产养殖行业的发展,水生污染、细菌性疾病、水产养殖物种的遗传退化等问题频发,海洋致病菌成为引起水生动物死亡及危害人类身体健康的重要原因^[2-4]。弧菌是一种普遍存在于海水养殖中的革兰氏阴性菌,主要分布在海水及水生生物中,种类繁多,如哈维氏弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌是较为常见的弧菌病原体,是导致水生动物感染及影响人类健康的主要原因^[5]。抗生素及化学合成抗菌药是目前水产养殖中应用最广泛的治疗弧菌病药物,多用于沐浴、浸泡或与饲料混合的治疗形式^[6]。最常用的抗生素及合成抗菌药包括甲氧苄啶、硫酸链霉素、氟苯尼考、四环素、喹诺酮类抗生素及磺胺类药物^[7-9]。若在水产养殖中频繁地使用抗生素,病原体会产生抗生素耐药性,而耐药菌和耐药基因会严重危害环境及人类健康^[10-11]。

中草药具有来源广泛、绿色环保、广谱抗菌等优点,可以提高水产动物非特异性免疫防治功能,所以采用中药代替抗生素药物具有较高的研究价值。莓茶(*Ampelopsis grossedentata*)系葡萄科蛇葡萄属野生藤本植物,作为药食同源草本植物,其干叶和茎是食品研究中的重要植物资源。莓茶中含有多种活性成分,包括黄酮类、多酚类、多糖类、萜类及挥发性成分^[12-18],具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血脂、抗菌等作用^[19]。冯湘沅等^[14]发现莓茶中多酚、黄酮总含量分别为468.22、266.18 mg/mL,黄酮醇类组分主要为杨梅素和槲皮素,莓茶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及痢疾杆菌均表现出较好的活性和稳定性。根据文献^[15]可知,莓茶中黄酮类化合物含量最高,主要黄酮类物质是二氢杨梅素和杨梅素及少量异二氢杨梅素、杨梅黄素等,故对莓茶中黄酮类化合物进行抑制哈维氏弧菌预试验,筛选出二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷、槲皮素4种黄酮类化合物,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷的抑菌圈直径为(18.52±0.10)、(12.35±0.35) mm和(10.87±0.13) mm,槲皮素无抑菌活性。基于此,本文以莓茶中黄酮类化合物的含量为考察指标采用单因素试验、正交试验及验证试验优化提取条件,利用牛津杯法和试管法测定最小抑菌浓度,最后通过对哈维氏弧菌生长曲线、细胞膜、细胞壁的影响和扫描电镜法研究莓茶对哈维氏弧

菌的作用机制,以期开发莓茶抗弧菌产品、防治水产养殖业中弧菌性疾病提供一定的方法与思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

莓茶:张家界君歌莓茶种植专业合作社;哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi* 1.8690):中国普通微生物菌株保藏管理中心,由江苏海洋大学海洋药物活性分子筛选重点实验室保存;无水乙醇(分析级):永大化学试剂公司;MH肉汤培养基(生物试剂)、琼脂粉(生物试剂)、海盐:乐渔科技有限公司;纯净水:杭州娃哈哈集团有限公司。

Agilent 1260型高效液相色谱仪:安捷伦公司;YMC-Pack ODS-A型(10.0 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱:日本株式会社维美希公司;YSO-LS型全自动立式压力真空灭菌锅:上海博迅实业有限公司;Regulus 8100型超高分辨场发射扫描电子显微镜:日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 莓茶活性物质提取

取干燥的莓茶粉碎后过12目筛,精密称定0.5 g于50 mL圆底烧瓶中,加入7.5 mL乙醇,密塞,称定质量,超声功率225 W,超声回流提取1 h,放冷,用乙醇补足失重,摇匀过滤,取续滤液过0.45 μm有机滤膜,即得供试品溶液。

1.2.2 色谱条件

1.2.2.1 检测波长选择

本试验检测对象二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷均为黄酮类化合物,根据这3个化合物最大吸收波长,参考易开等^[20]对二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷含量的检测方法,最终确定检测波长为292 nm。

1.2.2.2 色谱条件

色谱柱:YMC-Pack ODS-A(250 mm×10.0 mm, 5 μm);流动相:甲醇-1%磷酸水溶液,柱温:30℃;流速1 mL/min;进样量10 μL;流动相:甲醇(A)-1%磷酸水溶液(B)。0~10 min:35%(A)-65%(B),10~20 min:35%~80%(A)-65%~20%(B),20~40 min:80%(A)-20%(B),进样体积为10 μL^[16]。

1.2.3 单因素试验

利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术鉴定莓茶中主要黄酮类成分(二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷),黄酮类成分含量与峰

面积增长趋势呈正相关,故以峰面积为指标,通过单因素及正交试验来优化提取方法,考察不同单因素条件下莓茶提取物对哈维氏弧菌的抑制作用。单因素试验设置如下。

乙醇浓度:取 0.5 g 的莓茶粉末置于 50 mL 圆底烧瓶内,固定提取时间为 1 h,提取温度 70 °C,料液比 1:30 (g/mL),考察乙醇浓度(50%、60%、70%、80%、90%)对黄酮类成分含量的影响。

料液比:取 0.5 g 的莓茶粉末置于 50 mL 圆底烧瓶内,按“乙醇浓度”中筛选结果设定,固定提取时间为 1 h,提取温度 70 °C,考察料液比[1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 (g/mL)]对黄酮类成分含量的影响。

提取时间:取 0.5 g 的莓茶粉末置于 50 mL 圆底烧瓶内,按“乙醇浓度”和“料液比”中筛选结果设定,考察提取时间(20、40、60、80、100 min)对黄酮类成分含量的影响。

1.2.4 正交试验设计及验证试验

根据单因素试验结果,以 3 个水平的乙醇浓度、料液比、提取时间为考察因素,HPLC 测得的 3 个峰面积作为主要的考察指标,按表 1 的正交因素水平设计正交试验,优化提取条件;并进一步对优化条件进行验证试验,以确定提取方法的合理稳定可行。

表 1 正交试验优化莓茶中黄酮类化合物因素水平

Table 1 Orthogonal experiment optimization of the factor levels of dihydromyricetin and other compounds from *A. grossedentata* by orthogonal test

水平	因素		
	A 乙醇浓度/%	B 料液比/(g/mL)	C 提取时间/min
1	60	1:20	20
2	70	1:25	40
3	80	1:30	60

1.2.5 方法学考察

1.2.5.1 线性关系考察

精密称定二氢杨梅素 18.10 mg、杨梅素 13.60 mg、杨梅苷 8.5 mg 分别置于 50 mL 容量瓶,加入甲醇定容、摇匀,分别得到 0.362、0.272、0.170 mg/mL 的不同对照品溶液;精密吸取 200、40、600、800、1 000 μ L 定容到 10 mL,按色谱条件分别注入色谱仪,以对照品浓度为横坐标(X),以峰面积(Y)为纵坐标,分别得到二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷的回归方程和线性范围。

1.2.5.2 精密度考察

精密吸取同一供试品溶液,按色谱条件连续进样 6 次,分别计算二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷保留时间以及峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.2.5.3 重复性考察

称取莓茶粉末 0.5 g 共 6 份,制备供试品溶液,按色谱条件进行测定,分别计算二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷保留时间以及峰面积的 RSD。

1.2.5.4 稳定性试验

制备供试品溶液,按色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 注入高效液相色谱仪中,分别计算二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷保留时间以及峰面积的 RSD。

1.2.5.5 回收率试验

精密称定已知含量的莓茶粉末共 6 份,每份约 0.1 g,分别加入约相同量的二氢杨梅素、杨梅苷、杨梅素对照品,制备供试品溶液,按色谱条件进行测定,利用峰面积分别计算二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷的测得量及回收率。

1.2.6 最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration, MIC)

通过牛津杯法测定最佳提取工艺得到的莓茶提取物对哈维氏弧菌的最小抑菌浓度,精密称定 1 g 莓茶提取物溶于 30 mL 80% 乙醇中,采用二倍稀释法将样品溶液稀释成 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 3、0.015 6、0.007 8 g/mL。将 20 mL MH 肉汤培养基倒入培养皿中,待其完全凝固后用移液枪吸取 200 μ L 菌液均匀涂布在培养基上,将牛津杯放在对应标记处,加入 200 μ L 提取物待测样品,32 °C 培养 18 h,测定抑菌圈直径。

1.2.7 活性物质抗菌作用机理

1.2.7.1 对哈维氏弧菌生长曲线的影响

将 400 μ L 的哈维氏弧菌加入到含 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 莓茶提取液的 40 mL MHB 培养基中,以空白培养基为阴性对照。在 37 °C 和 160 r/min 振荡培养 14 h,在培养过程中,每隔 2 h 取样 250 μ L 添加到 96 孔微量滴定板的孔中,试验设置 3 组重复,测定 OD_{600 nm} 处的吸光度。以吸光度的平均值为纵坐标,培养时间为横坐标绘制细菌生长曲线^[21]。

1.2.7.2 对哈维氏弧菌细胞膜完整性、通透性的影响

将 400 μ L 的哈维氏弧菌加入到含 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 莓茶提取液的 40 mL MH 肉汤培养基中,以空白培养基为阴性对照。在 37 °C 和 160 r/min 振荡培养,每隔 1 h 收集细菌样品,连续监测 4 h,取得上清液在 OD_{400 nm} 处测定吸光度。试验设为 3 组平行,以吸光度平均值为纵坐标,培养时间为横坐标绘制曲线^[22]。

根据上述试验方法,取已测定吸光度的上清液约 2.0 mL,加 8.0 mL 蒸馏水,混匀测量电导率,以电导率为纵坐标,培养时间为横坐标绘制曲线。

1.2.7.3 对哈维氏弧菌细胞壁的影响

将 400 μ L 的哈维氏弧菌加入含 1/2 MIC、MIC 和 2 MIC 莓茶提取液的 40 mL MHB 培养基中,以空白培养基为阴性对照。在 37 °C 和 160 r/min 振荡培养,每隔 3 h 收集细菌样品,连续监测 12 h,取得上清液 0.1 mL

离心,分别加入 100 μL 缓冲液和基质液充分混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴加热 15 min 后加入 400 μL 显色剂混匀, 加入 96 孔微量滴定板中, 试验设为平行 3 组, 测定 510 nm 处吸光度。以吸光度平均值为纵坐标, 培养时间为横坐标绘制曲线^[22]。

1.2.7.4 对哈维氏弧菌形态的影响

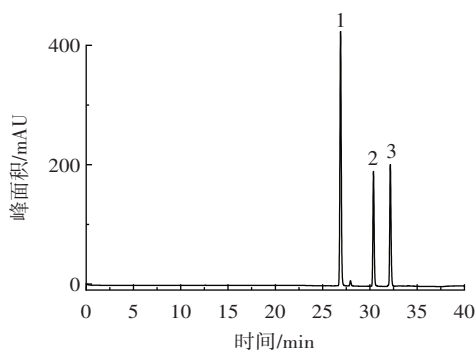
将 200 μL 哈维氏弧菌接种到含 MIC 莓茶提取液的培养液中, 以不加提取液为阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 4 h 后 6 500 r/min 下离心 10 min 去上清液, 加入磷酸盐缓冲液缓慢冲洗菌体 3 次, 添加 1 mL 4% 戊二醛放入冰箱过夜, 于 6 500 r/min 下离心 10 min 去上清液。收集下层菌体置于盖玻片上, 用乙醇脱水。样品在临界点用 CO_2 干燥、喷金, 用扫描电子显微镜进行观察^[23]。

1.3 数据分析

试验均重复 3 次, 采用 Origin 2021 软件绘图, 单因素、正交方差分析采用正交试验助手 II V3.1 分析软件。

2 结果与分析

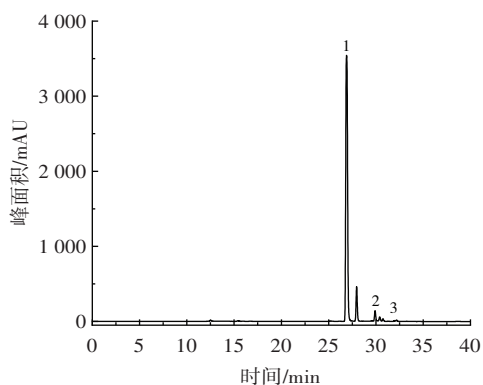
莓茶提取物及标准品液相色谱图见图 1、图 2。



1. 二氢杨梅素; 2. 杨梅素; 3. 杨梅苷。

图 1 二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷标准品混合液液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatography of standard mixture of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin



1. 二氢杨梅素; 2. 杨梅素; 3. 杨梅苷。

图 2 莓茶液相色谱图

Fig.2 Liquid chromatography of *Ampelopsis grossedentata*

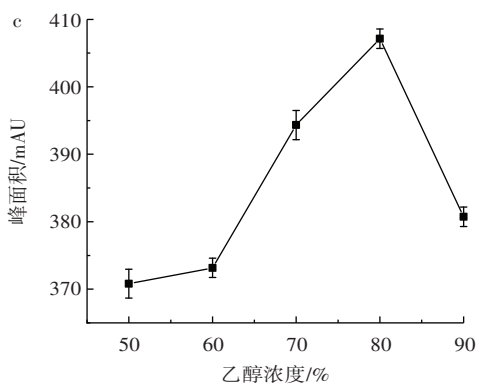
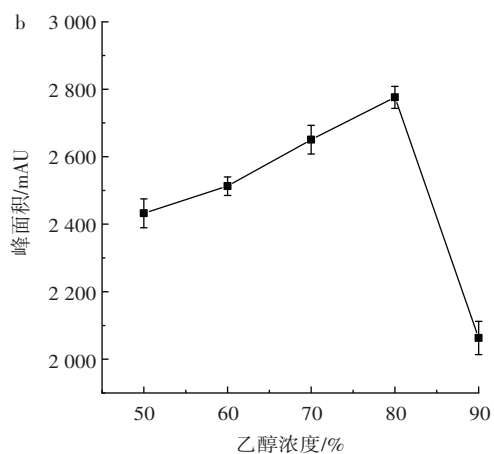
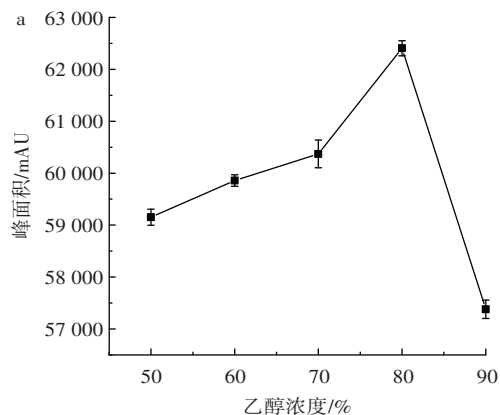
由图 2 可知, 采用 HPLC 对莓茶提取物及标准品的混合液作对照进行分析, 得到 3 个黄酮类成分, 分别

是二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷, 对应保留时间分别为 26.074、30.355、32.018 min。

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度的筛选

乙醇浓度对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷提取的影响见图 3。



a. 二氢杨梅素; b. 杨梅素; c. 杨梅苷。

图 3 乙醇浓度对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷提取的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the extraction of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin

由图 3 可知, 随着乙醇浓度增大, 3 种黄酮类化合物含量呈先增加后下降趋势, 当乙醇浓度达到 80% 时, 莓茶中各个成分达到了最大值。吕浩^[24]研究表明, 莓茶总黄酮提取率在 70% 乙醇处有明显峰值, 与本试

验相比较浓度略低,这可能是由于采用的测定方法与提取率的计算方式不同而产生差异,当乙醇浓度超过80%时,较多的杂质溶解渗出,导致3种黄酮类化合物含量下降。因此,选择80%乙醇浓度进行后续单因素试验,确定60%、70%、80%为正交试验3个水平。

2.1.2 料液比的筛选

料液比对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷峰面积的影响见图4。

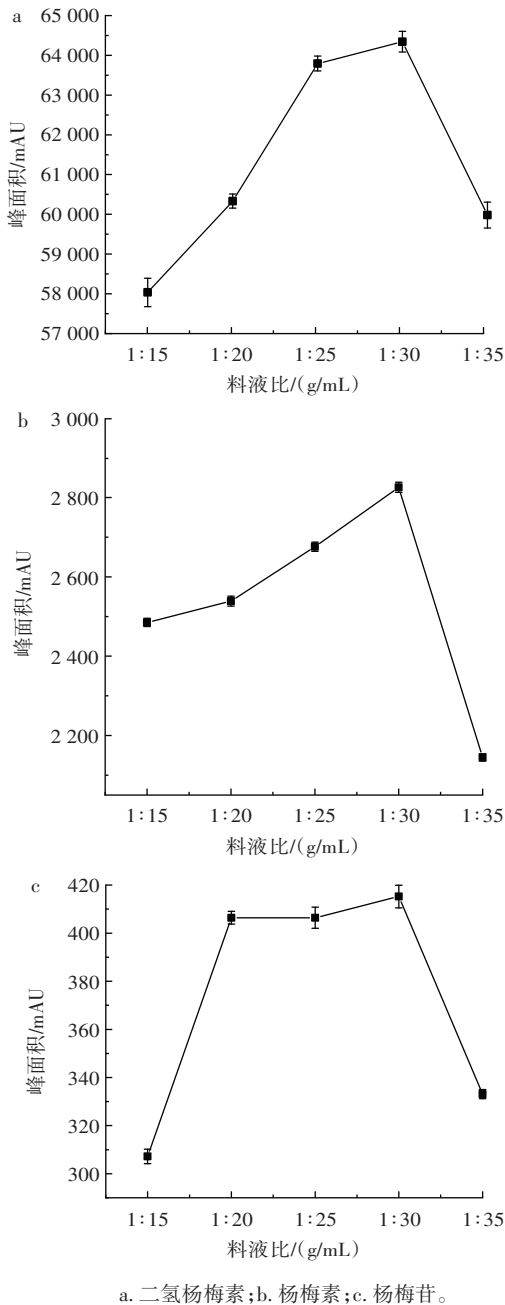


图4 料液比对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷提取的影响

Fig.4 Effect of material liquid ratio on the extraction of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin

由图4可知,莓茶中黄酮类化合物随着溶剂体积的增加峰面积呈先升高后降低趋势。这表明溶液体积

增大,溶剂对莓茶中黄酮类化合物浸提越充分,当料液比达到1:30(g/mL)时,3种黄酮类化合物的峰面积最大。然而,料液比为1:35(g/mL)时,黄酮类化合物的含量反而下降,可能是由于莓茶中有效成分与一定量的溶剂已经接触完全,增大溶剂体积后阻碍黄酮类化合物析出,从而使得含量下降。因此,选择料液比为1:30(g/mL)进行后续单因素试验,确定1:20、1:25、1:30(g/mL)为正交试验3个水平。

2.1.3 提取时间的筛选

提取时间对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷提取的影响见图5。

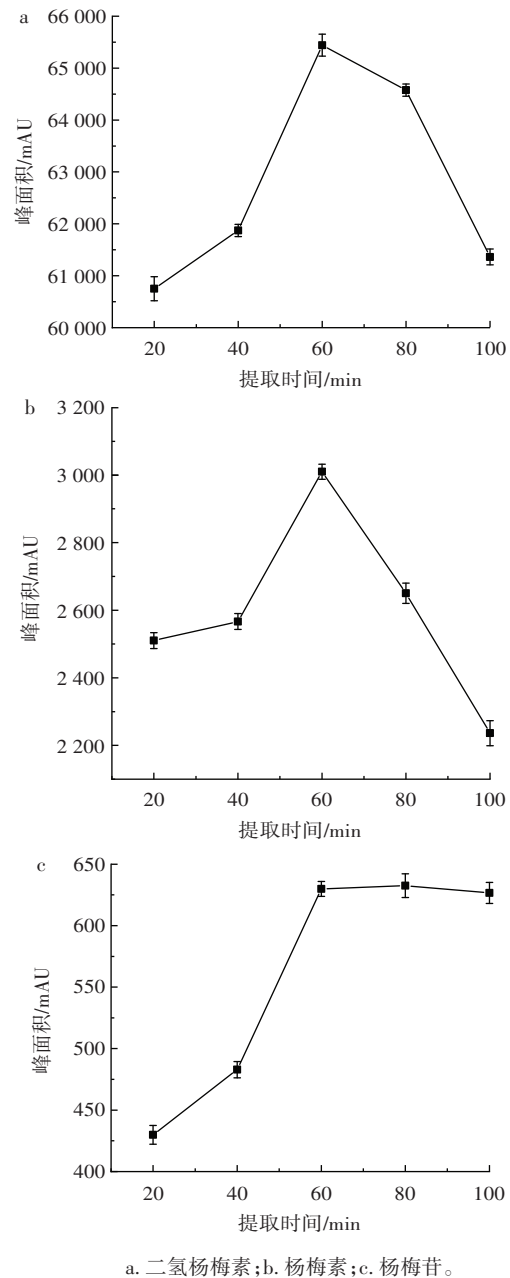


图5 提取时间对二氢杨梅素、杨梅素和杨梅苷提取的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin

由图5可知,随着提取时间的延长,莓茶中黄酮类化合物的含量逐渐上升,当提取时间达到60 min时,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷的含量最高。当提取时间小于60 min时,可能由于时间延长使得黄酮类化合物溶解速度加快;莓茶中黄酮类化合物在60 min时溶解度达到最大,提取时间再次延长导致有效成分

在溶剂中溶解速度受到限制,从而使得黄酮类化合物含量下降。因此,确定20、40、60 min为正交试验3个水平。

2.2 正交试验及验证试验

2.2.1 正交试验设计结果

正交试验分析结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 莓茶总黄酮提取方法正交试验分析

Table 2 Orthogonal analysis of extraction methods of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata*

编号	A 乙醇浓度	B 料液比	C 提取时间	峰面积			总峰面积
				二氢杨梅素	杨梅素	杨梅苷	
1	1	1	1	58 931.259 5	898.056 3	352.500 9	60 181.816 7
2	1	2	2	61 738.850 9	1 132.331 1	534.452 2	63 405.634 2
3	1	3	3	61 508.801 3	1 177.06 02	588.368 4	63 274.229 9
4	2	1	3	58 921.617 5	972.698 4	551.604 8	60 445.920 7
5	2	2	1	63 477.583 2	1 061.767 6	463.508 1	65 002.858 9
6	2	3	2	64 294.924 5	1 211.482 1	616.355 8	66 122.762 4
7	3	1	2	61 382.386 3	1 025.332 4	541.608 1	62 949.326 8
8	3	2	3	62 046.711 2	1 077.709 6	628.495 7	63 752.916 5
9	3	3	1	65 099.235 8	1 153.958 2	524.054 3	66 777.248 3
k ₁	62 287.227	61 192.355	63 987.308				
k ₂	63 857.181	64 053.803	62 491.022				
k ₃	64 493.164	65 391.414	64 159.241				
R	2 205.937	4 199.059	1 668.219				

表3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance results

因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A 乙醇浓度	7 735 387.109	2	33.962	0.029*
B 料液比	5 051 385.464	2	122.178	0.043*
C 提取时间	27 609 183.54	2	21.217	0.008**
误差	227 767.436	2		

注:*表示差异显著($P<0.05$);**表示差异极显著($P<0.01$)。

由表2可知,影响成分峰面积的各因素主次关系为料液比>乙醇浓度>提取时间,由表3得出,3个因素对三个成分峰面积的影响显著。最佳提取条件为乙醇浓度80%、料液比1:30(g/mL)、提取时间60 min。

2.2.2 验证试验

分别称取莓茶粉末5 g共3份,按照乙醇浓度80%、料液比1:30(g/mL)、提取时间60 min进行验证试验,结果见表4。验证试验结果高于正交试验结果中任意一组,说明提取方法可行。

2.3 方法学考察结果

2.3.1 线性范围考察

以进样量对峰面积进行回归处理,对照品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,分别计算二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷的标准曲线,其线性数据结果见表5。

表4 验证试验结果

Table 4 Validation test results

测定指标	试验1	试验2	试验3	平均值
二氢杨梅素峰面积	65 997.132 5	67 034.898 1	67 312.220 8	66 781.417 1
杨梅素峰面积	1 190.348 6	1 201.280 3	1 197.152 7	1 196.260 53
杨梅苷峰面积	732.436 6	736.605 9	732.334 9	733.792 5
总峰面积	67 919.917 7	68 972.784 3	69 241.708 4	68 711.470 1

表5 二氢杨梅素等化合物线性范围

Table 5 Linear range of dihydromyricetin and other compounds

化合物	回归方程	R ²	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)
二氢杨梅素	$Y=532.94X-9.268 8$	0.999 1	0.072 4~0.362 0
杨梅素	$Y=146.95X-7.970 9$	0.994 9	0.054 4~0.272 0
杨梅苷	$Y=126.28X-2.961 1$	0.999 0	0.034 0~0.170 0

2.3.2 精密度试验

精密度试验结果见表6。

由表6可知,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷3个化合物保留时间和峰面积RSD分别为0.03%~0.14%和0.13%~0.86%,表明仪器的精密度良好。

表6 精密度试验结果
Table 6 Precision test results

项目	二氢杨梅素		杨梅素		杨梅苷	
	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min
1	38 766.225 2	26.262	494.783 5	30.381	197.907 1	32.071
2	38 844.708 6	26.315	483.657 0	30.396	198.057 2	32.087
3	38 835.061 4	26.331	494.490 2	30.400	198.247 1	32.090
4	38 896.057 8	26.350	494.222 4	30.406	198.593 2	32.096
5	38 773.884 8	26.380	492.202 6	30.413	198.273 0	32.102
6	38 807.927 2	26.326	493.444 5	30.398	197.863 0	32.088
RSD/%	0.13	0.14	0.86	0.04	0.14	0.03

2.3.3 稳定性试验结果

稳定性试验结果见表7。

由表7可知,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷3个化合物保留时间和峰面积RSD分别为0.26%~1.14%和0.36%~0.58%,表明仪器的稳定性良好。

2.3.4 重复性试验结果

重复性试验结果见表8。

由表8可知,二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷3个化合物保留时间和峰面积RSD分别为0.03%~1.22%和1.01%~1.60%,表明仪器的重复性良好。

表7 稳定性试验结果
Table 7 Stability test results

项目	二氢杨梅素		杨梅素		杨梅苷	
	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min
1	40 872.984 5	26.786	494.414 1	30.837	162.357 0	32.520
2	40 778.394 3	26.644	491.165 7	30.741	163.276 1	32.434
3	40 799.481 4	26.534	490.340 8	30.673	163.696 8	32.372
4	40 661.295 4	26.261	489.585 7	30.522	164.104 1	32.488
5	40 680.089 4	26.072	489.769 6	30.410	163.822 2	32.387
6	40 460.284 4	26.090	496.580 7	30.257	164.896 2	32.288
RSD/%	0.36	1.14	0.58	0.71	0.52	0.26

表8 重复性试验结果
Table 8 Repeatability test results

项目	二氢杨梅素		杨梅素		杨梅苷	
	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min	峰面积	保留时间/min
1	40 375.530 9	26.120	497.430 5	30.311	199.932 5	32.004
2	41 438.024 8	26.074	510.160 6	30.305	195.246 5	32.998
3	40 981.115 9	26.039	496.596 5	30.298	194.555 9	32.994
4	40 071.386 1	26.017	503.466 2	30.293	191.944 6	32.991
5	41 596.316 4	26.017	499.494 1	30.292	199.842 1	32.987
6	41 448.012 0	25.992	498.559 3	30.291	197.358 0	32.968
RSD/%	1.50	0.18	1.01	0.03	1.60	1.22

2.3.5 回收率试验结果

取已知含量的莓茶粉末6份,每份0.1g,精密称定。加入约相同量的二氢杨梅素、杨梅素、杨梅苷对照品测定峰面积,计算测得量及回收率,结果见表9。

由表9可知,平均加样回收率为99.68%~101.53%,说明方法回收效果好,方法准确度高。

2.4 最小抑菌浓度

测定莓茶提取物对哈维氏弧菌的最小抑菌浓度(MIC)结果见表10。

抑菌圈直径小于9mm视为无抑菌活性。由表10可知,莓茶乙醇提取物对哈维氏弧菌的MIC值为0.0156g/mL。

表9 回收率试验结果
Table 9 Recovery test results

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/%	回收率/%	平均回收率/%
二氢杨梅素	38.19	40.65	75.63	99.02	99.68
			76.09	99.63	
			76.41	100.05	
			75.97	99.46	
			77.23	101.12	
			75.45	98.78	
杨梅苷	1.77	1.96	3.48	98.44	101.53
			3.66	103.55	
			3.65	103.36	
			3.53	99.91	
			3.51	99.24	
			3.70	104.65	
杨梅素	0.78	0.78	1.63	104.38	100.56
			1.61	103.62	
			1.53	97.90	
			1.57	100.50	
			1.53	98.04	
			1.55	98.91	

表10 莓茶乙醇提取物对哈维氏弧菌的最小抑菌浓度
Table 10 *A. grossedentata* ethanol extract on *V. harveyi* minimum inhibitory concentration

莓茶乙醇提取物的浓度/(g/mL)	哈维氏弧菌抑菌圈直径/mm
1	23.67±0.17
0.5	21.29±0.19
0.25	20.33±0.55
0.125	19.63±0.03
0.062 5	16.21±0.12
0.031 3	14.24±0.25
0.015 6	10.41±0.06
0.007 8	-

注:哈维氏弧菌抑菌圈直径表示为平均值±标准差, n=3。- 为无抑菌活性。

2.5 活性物质抗菌作用机理

2.5.1 莓茶提取物浓度对哈维氏弧菌生长曲线的影响

莓茶提取物浓度对哈维氏弧菌生长曲线的影响结果见图6。

由图6可知,对照组的菌株生长较为快速,在8 h达到稳定期。当莓茶提取物浓度为1/2 MIC和MIC时,菌株生长趋势稳步上升,细菌活性抑制不明显。当莓茶提取物浓度为2 MIC时,细菌生长处于平稳状态,这说明在2 MIC浓度下可以明显抑制哈维氏弧菌的生长。

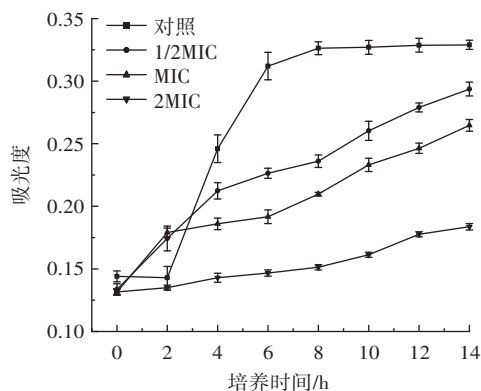


图6 不同浓度莓茶提取物对哈维氏弧菌生长曲线的影响
Fig.6 Effect of different concentrations of *A. grossedentata* extract on the growth curve of *V. harveyi*

2.5.2 莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞膜完整性、通透性的影响

莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞膜完整性及通透性的影响结果见图7、图8。

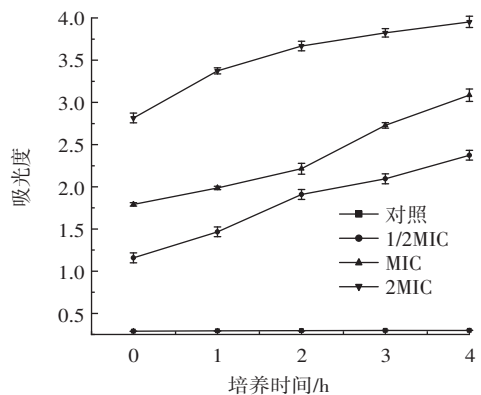


图7 不同浓度莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞膜完整性的影响
Fig.7 Effect of different concentrations of *A. grossedentata* extract on cell membrane integrity of *V. harveyi*

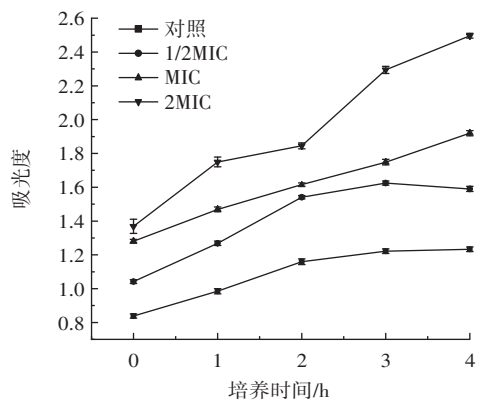


图8 不同浓度莓茶提取物对哈维氏弧菌电导率的影响
Fig.8 Effect of different concentrations of *A. grossedentata* extract on the electric conductivity of *V. harveyi*

由图7可知,对照组的吸光度几乎没有变化。随

着时间的延长,1/2 MIC、MIC、2 MIC 浓度下莓茶提取物吸光度明显增加,说明菌液中生物大分子开始发生渗透,且随着时间的延长而逐步增加。2 MIC 效果最好,MIC 吸光度高于 1/2 MIC。因此可以推测,莓茶提取物能够破坏哈维氏弧菌细胞膜完整性,使细胞内生物大分子渗出,从而起到抑制作用。

由图 8 可知,1/2 MIC、MIC、2 MIC 处理组的电导率明显高于对照组,且随着时间的延长,电导率不断上升,说明莓茶提取物能够破坏哈维氏弧菌的细胞膜,使细胞膜的通透性增大。

2.5.3 莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞壁的影响

莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞壁的影响如图 9 所示。

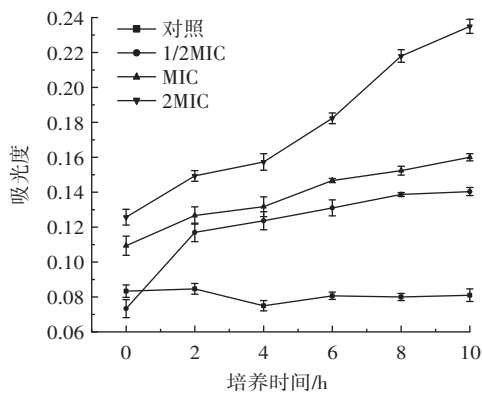


图 9 不同浓度莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞壁的影响

Fig.9 Effect of different concentrations of *A. grossedentata* extract on the phosphorus leakage of *V. harveyi*

由图 9 可知,在 0 h 时,1/2 MIC 的吸光度低于对照组数值,可能为操作误差导致,其他各组均高于对照组。随着时间的延长,1/2 MIC、MIC 呈稳定增长,2 MIC 增长幅度较大,而对对照组数值几乎无变化。因此,可以推测出加入莓茶提取物可使哈维氏弧菌中磷酸酶泄漏从而导致细胞壁破坏,而加入莓茶提取液浓度越高对弧菌细胞壁的破坏越大。

2.5.4 莓茶对哈维氏弧菌形态的影响

扫描电子显微镜观察莓茶提取物对哈维氏弧菌细胞的影响如图 10 所示。

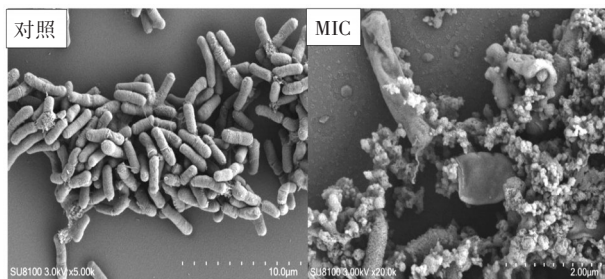


图 10 哈维氏弧菌扫描电子显微镜图

Fig.10 Scanning electron microscopy image of *V. harveyi*

由图 10 可知,对照组菌体为短杆状,末端呈椭圆形。MIC 浓度下的菌体,细胞形态异常,部分细胞破裂,边缘模糊。

3 结论

本研究以莓茶为原料,通过对比乙醇浓度、料液比、提取时间对莓茶中黄酮类化合物含量的影响,确定了最佳的莓茶提取工艺条件,并采用牛津杯法测定莓茶提取物的最小抑菌浓度,得到以下结果:莓茶提取物最佳提取条件为乙醇浓度 80%、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 60 min;在此条件下,对莓茶提取物进行抑菌试验,采用牛津杯法测定抑菌圈直径为 (23.67 ± 0.17) mm, MIC 为 0.015 6 g/mL。随着莓茶提取物浓度的增大和时间不断延长,对细菌的生长曲线抑制效果越明显,菌液细胞膜中生物大分子渗出越明显,细胞膜完整性、通透性增大。此外,磷酸酶泄漏导致细胞壁被破坏,通过扫描电镜观察细胞形态,部分细胞破裂,边缘模糊,形态异常,这表明莓茶提取物对哈维氏弧菌具有显著的破坏作用。本研究初步确定了莓茶抑制哈维氏弧菌活性成分最佳提取工艺条件,研究莓茶提取物的抑菌机制,后续可通过抗细菌生物膜、转录组学、蛋白组学等技术深入研究,为莓茶用于开发新型抗菌剂提供理论依据。

参考文献:

- [1] MANCHANAYAKE T, SALLEH A, AMAL M N A, et al. Pathology and pathogenesis of *Vibrio* infection in fish: A review[J]. Aquaculture Reports, 2023, 28: 101459.
- [2] LI Y Y, YUN H Y, CHEN R, et al. Characterization of a vibriophage infecting pathogenic *Vibrio harveyi*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(22): 16202.
- [3] GHOSH S, KAR P, CHAKRABARTI S, et al. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* and its biocontrol using bacteriophages[J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2023, 3(4): 552-570.
- [4] CHEN Q, MA B G, XU M Z, et al. Comparative proteomics study of exosomes in *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum*[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 181: 106174.
- [5] MAHADEVAIAH R, HARALURU L S, KAMALAMMA ESHWARAIAH L H K. Combustion synthesis of nano Fe₂O₃ and its utilization as a catalyst for the synthesis of N α -protected acyl thioureas and study of anti-bacterial activities[J]. Acta Chimica Slovenica, 2022, 69(1): 116-124.
- [6] CHANDRA I, KUMAR D, VERMA N K M, et al. Application of antibiotics in aquaculture: Effects on aquatic life and human health[J]. Science, 2023, 1(2): 1-7.
- [7] 梁馨文, 高田田, 邱敏, 等. 新型含酰胺基硫脲结构 1,3,4-噻二唑衍生物的合成及其抗菌活性检测[J]. 合成化学, 2024, 32(6): 501-507.
LIANG Xinwen, GAO Tiantian, QIU Min, et al. Synthesis and antibacterial activity of 1,3,4-thiadiazole derivatives containing acyl thiosemicarbazides[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2024, 32(6): 501-507.
- [8] NG W K, LIM C L, ROMANO N, et al. Lactic acid enhanced the

- growth performance and resistance to *Vibrio harveyi* infection when added in the feeds of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture Research, 2022, 53(17): 6414-6418.
- [9] SHAO Z B, JIANG K J, CAO L G, et al. Synthesis of emodin acylhydrazone derivatives and determination of *Vibrio harveyi* inhibitory activity[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2022, 58(2): 222-226.
- [10] JUSIDIN M R, OTHMAN R, SHALEH S R M, et al. *In vitro* antibacterial activity of marine microalgae extract against *Vibrio harveyi*[J]. Applied Sciences, 2022, 12(3): 1148.
- [11] ZHEN S Y, CHEN S, GENG S, et al. Ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction and bioactivities of flavonoids in *Ampelopsis grossedentata* leaves[J]. Foods, 2022, 11(5): 668.
- [12] CARNEIRO R C V, YE L Y, BAEK N, et al. Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): A review of chemical composition, functional properties, and potential food applications[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 76: 104317.
- [13] 凌伟红, 陈燕, 冯森, 等. 不同产地显齿蛇葡萄以及近缘种指纹图谱的建立及有效成分分析[J]. 中草药, 2023, 54(17): 5725-5733.
- LING Weihong, CHEN Yan, FENG Miao, et al. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Ampelopsis grossedentata* from different producing areas[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(17): 5725-5733.
- [14] 冯湘沅, 杨琦, 谢纯良, 等. 莓茶多酚、黄酮、黄酮醇类组分含量及抑菌分析[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(19): 79-86.
- FENG Xiangyuan, YANG Qi, XIE Chunliang, et al. Total content of polyphenols, flavonoids and flavonols in meitea (*Ampelopsis grossedentata*) and its antibacterial effect analysis[J]. Food Research and Development, 2022, 43(19): 79-86.
- [15] 王晓慧. 莓茶多糖的提取、纯化及特性研究[D]. 吉首: 吉首大学, 2022.
- WANG Xiaohui. Study on extraction, purification and characteristics of berry tea polysaccharide[D]. Jishou: Jishou University, 2022.
- [16] Muhammad Umair. 藤茶(*Ampelopsis grossedentata*)中新型植物化学物质的分离、鉴定、特性及其抗菌活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- MUHAMMAD Umair. Isolation, identification, characteristics and antibacterial activity of new phytochemicals from *Ampelopsis grossedentata*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- [17] 张学英. HPLC法同步测定莓茶中二氢杨梅素、杨梅苷、杨梅素含量[J]. 湖南农业科学, 2021(4): 100-104.
- ZHANG Xueyin. Synchronous detection of dihydromyricetin, myricitrin and myricetin contents in mei-tea (*Ampelopsis grossedentata*) by HPLC[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2021, 427(4): 100-104.
- [18] 张甜甜, 吴昕蓉, 银婕, 等. 茅岩莓茶中黄酮类化合物提取工艺的分析研究[J]. 精细化工中间体, 2018, 48(4): 38-41.
- ZHANG Tiantian, WU Xinrong, YIN Jie, et al. Extraction process of flavonoids in maoyan berry tea[J]. Fine Chemical Intermediates, 2018, 48(4): 38-41.
- [19] WU R R, LI X, CAO Y H, et al. China medicinal plants of the *Ampelopsis grossedentata* - A review of their botanical characteristics, use, phytochemistry, active pharmacological components, and toxicology[J]. Molecules, 2023, 28(20): 7145.
- [20] 易开, 林珠灿, 柳庆龙, 等. 闽产藤茶总黄酮提取物中三种主成分的含量测定[J]. 福建中医药, 2017, 48(2): 51-52, 55.
- YI Kai, LIN Zhucan, LIU Qinglong, et al. Determination of three main components in total flavonoids extract of rattan tea produced in Fujian Province[J]. Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 48(2): 51-52, 55.
- [21] 谢丽玲, 彭齐, 蔡链纯, 等. 黄芩醇提物对副溶血性弧菌抑制机制的研究[J]. 生物技术通报, 2015(8): 159-165.
- XIE Liling, PENG Qi, CAI Lianchun, et al. A study on antibacterial mechanisms of ethanol-extracts from *Scutellaria baicalensis* against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015(8): 159-165.
- [22] 肖苗. 麝香草酚对副溶血弧菌的抑菌机制研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2022.
- XIAO Miao. Study on bacteriostasis mechanism of thymol against *Vibrio parahaemolyticus*[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2022.
- [23] 许苗苗, 訾玉祥, 陆兆新, 等. 半乳糖基月桂酸单甘酯对短小芽孢杆菌的抑制机理[J]. 食品科学, 2020, 41(1): 33-40.
- XU Miaomiao, ZI Yuxiang, LU Zhaoxin, et al. Antimicrobial activity and mode of action of monogalactosyl monolaurate against *Bacillus pumilus*[J]. Food Science, 2020, 41(1): 33-40.
- [24] 吕浩. 藤茶总黄酮的提取分离工艺及体外抗肿瘤活性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2021.
- LÜ Hao. Study on extraction and separation technology of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and its antitumor activity *in vitro*[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2021.

加工编辑:王雪

收稿日期:2023-11-21