

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2019.05.011

# 金花小檗功效成分及其抑菌和 抗氧化活性的研究<sup>①</sup>

张倩<sup>1</sup>, 刘刚<sup>1,2</sup>, 邓钱江<sup>1</sup>, 汪淑芳<sup>1,2</sup>,  
张晓喻<sup>1,2</sup>, 李学理<sup>1</sup>, 杜娟<sup>3</sup>, 卢相<sup>1</sup>

1. 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101; 2. 四川师范大学 食品功能及加工应用研究所, 成都 610101;  
3. 四川师范大学 地理与资源科学学院, 成都 610101

**摘要:** 为充分利用川西南民族药——金花小檗, 用不同的方法对其抑菌及抗氧化活性进行了测定. 用酸性染料比色法、HPLC 法测定了金花小檗根、茎、醇提物、萃取部位的功效组分含量, 发现生物碱集中于正丁醇部位和水部位中, 小檗碱在醇提物、萃取部位中的含量都最多, 巴马汀最少. 测定其根、茎、醇提物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌作用可知: 与 75%乙醇相比, 金花小檗根、茎、醇提物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果为低敏; 而与 75%乙醇相比, 金花小檗根、茎、醇提物对大肠杆菌的抑菌效果为中敏. 用 DPPH·清除率法、总还原力法测定其醇提物和萃取部位的抗氧化活性, 结果相似: 正丁醇部位、水相部位的抗氧化活性较强, 石油醚萃取部位的抗氧化活性最低. 用金花小檗醇提物、正丁醇-水部位分别饲喂小鼠 30 d 测定小鼠血清 MDA 和 T-SOD 值, 所得结果与正常组比较, 试验组小鼠 T-SOD 值显著降低, MDA 值显著升高, 说明金花小檗有显著的抗氧化活性. 因此, 金花小檗提取物、萃取部位不仅有显著的抑菌活性, 而且也有较高的体、内外抗氧化活性.

**关键词:** 金花小檗; 抑菌; 醇提物; 萃取部位; 抗氧化活性; HPLC

**中图分类号:** Q949.746.8

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-5471(2019)05-0056-11

金花小檗(*Berberis wilsonae* Hemsl)是小檗科小檗属植物<sup>[1]</sup>, 可作黄连的代用品, 主要分布在云南、贵州、四川和甘肃等地. 其中, 四川小檗属植物共有 40 种、5 变种<sup>[2]</sup>, 是川西南地区民族习用的药食同源植物. 在藏药和中药中, 常以小檗属植物作为药用原料<sup>[3]</sup>. 小檗属植物全株均含生物碱, 如小檗碱、药根碱、巴马汀等. 这些成分具有多种生理活性, 如: 小檗碱抗菌抗炎、抗氧化应激效果强<sup>[4-5]</sup>, 还有抗肿瘤及免疫调节<sup>[6]</sup>、治疗糖尿病等<sup>[7]</sup>作用. 巴马汀抗氧化活性好<sup>[8]</sup>, 药根碱降糖活性好<sup>[9]</sup>. 除此之外, 小檗属植物与罂粟科角茴香属植物角茴香在植物抑菌方面也有相似作用<sup>[10]</sup>. 除药用外, 它的花、果实和枝叶都极具观赏价值<sup>[11]</sup>, 可作为一种观赏植物, 其果实可直接食用<sup>[12]</sup>, 亦可制作野生水果饮料、果醋等<sup>[13]</sup>.

刘燕<sup>[14]</sup>、史娟<sup>[15]</sup>等的研究证明生物碱对 DPPH·, O<sup>2-</sup>, ·OH 均有一定的清除效果, 并且清除效果与生物碱浓度有剂量依赖效应. 该属植物还能通过抗氧化能力对肾脏疾病<sup>[16]</sup>、消化道、尿道疾病<sup>[17]</sup>进行有效改善. Malayeri<sup>[18]</sup>在对大鼠结肠癌的试验中, 也发现该属提取物有有效的抗氧化作用.

① 收稿日期: 2018-01-17

基金项目: 四川省教育厅科研项目(17ZB0353); 四川省西昌市教育和科学技术局 2014 年产学研合作项目; 四川师范大学大精设备开放基金项目(DJ2015-21); 四川省教育厅重点项目(17ZA0328).

作者简介: 张倩(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物学、植物学等方面的研究.

通信作者: 刘刚, 副教授.

本研究先对金花小檗提取物和萃取部位的功效成分进行了测定, 分析比较生物碱各组分含量的差异; 之后, 以金花小檗为材料, 乙醇提取后, 用滤纸片扩散法、比浊法及二倍稀释法测定其抑菌性; 然后用 DPPH· 自由基清除法、总还原力法等体外抗氧化活性测定方法研究金花小檗醇提取物及萃取部位的抗氧化活性, 用体内抗氧化活性的测定方法研究其对小鼠血清 MDA、T-SOD 值的影响. 目前, 关于金花小檗醇提取物的抑菌活性及体内外抗氧化活性的研究尚未见文献报道, 本研究旨在为金花小檗的利用提供理论依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

金花小檗采自四川省冕宁县, 经西昌学院的罗强教授鉴定确认(图 1). 样品采集后将根、茎分开, 分别阴干, 粉碎过 4 号筛, 备用.



图 1 金花小檗的植株、花、茎叶、果实和根

昆明小鼠, 来自成都达硕实验动物有限公司; 95%乙醇、甲醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇、磷酸二氢钠、铁氰化钾、三氯乙酸, 均为分析纯, 成都市科龙化工试剂厂生产; 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH·), Sigma 公司生产; 芦丁标准品(质量分数 $\geq 98\%$ ), 四川省维克奇生物科技有限公司生产; MDA 和 T-SOD 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所生产; 牛肉膏蛋白胨培养基, 杭州微生物试剂有限公司生产; 乙醇、甲醇、DPPH、ATBS, 成都市长征化玻有限公司生产; 测试菌种金黄色葡萄球菌和大肠杆菌, 由四川师范大学生命科学学院实验室提供.

R-1005 型旋转蒸发器, 上海予华仪器设备有限公司生产; SHB-B95 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司生产; HH. W21 型恒温水浴锅, 北京中兴伟业仪器有限公司生产; LDZX-50KB 型立体压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂生产; DZF-6050 型真空干燥箱、DHP-9082 型电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司生产; SW-CJ-2F 型超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司生产; DHG-9240 型电热鼓风干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司生产; UV-2600 型紫外可见分光光度计, 日本岛津科学仪器公司生产; Biomate-3S 型紫外分光光度计, Thermo Scientific 公司生产; ESJ220-4B 型天平, 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司生产; AM-75E 型制冰机, HOSHEZAKI(日本)生产; LH-08B 中药粉碎机, 浙江温岭市创立药材器械厂生产.

### 1.2 样品和标准品的制备

提取物的制备: 称取金花小檗 25.00 g, 按 1:20 比例加入 75%乙醇, 60℃水浴回流提取 1 h, 重复 2 次, 过滤, 合并过滤液, 去除乙醇后浓缩至 50 mL(以生药量计 500 mg/mL), 冷藏备用.

萃取部位的制备: 取金花小檗的根、茎若干, 分别粉碎过 80 目筛, 用 95%乙醇提取, 提取液喷干得到醇提取物, 备用. 再取金花小檗的根、茎, 分别用 95%乙醇浸泡提取, 浓缩得浸膏后用水萃取, 再与水等体积的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇分别依次萃取, 各部分分别浓缩干燥得到 4 个萃取部位, 冷藏, 备用.

DPPH· 溶液: 精确称取 8.0 mg 干燥后的 DPPH· 粉末, 用甲醇溶解定容至 100 mL, 获得质量浓度 80  $\mu\text{g/mL}$  的 DPPH· 溶液, DPPH· 溶液现配现用.

芦丁对照液: 取 20.0 mg 芦丁标准品用甲醇溶解定容至 100 mL, 得到 200  $\mu\text{g/mL}$  芦丁对照品溶液.

菌悬液: 参照文献的方法<sup>[14]</sup>制备菌悬液, 分别取出大肠杆菌、金黄色葡萄球菌各 0.1 mL, 接种到 20 mL 牛肉膏蛋白胨琼脂固体培养基上, 37 °C 恒温培养 24 h, 挑选生长健壮的菌落, 再接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基上, 培养 24 h 活化菌种, 备用. 分别取活化菌种各 0.1 mL, 置于 20 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基上, 37 °C 恒温培养 48 h, 紫外可见分光光度计 625 nm 处测定 OD 值, 加无菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 调节菌悬液浓度, 使其 OD 值在 0.08 至 0.13 之间, 此时的菌悬液浓度为  $10^8$  CFU/mL. 测定时, 菌悬液稀释到  $10^5$  CFU/mL.

标准品溶液: 取一定量的药根碱、巴马汀和小檗碱的标准品, 分别用甲醇溶解、定容, 二倍稀释法稀释至初始浓度的  $2^{-8}$ .

### 1.3 功效成分的测定

用酸性染料比色法<sup>[19]</sup>测定总生物碱的比例, 用 HPLC 法测定其组分的比例. HPLC 的参数: 色谱柱 Platisil C<sub>18</sub> ODS 柱(250 mm×4.6 mm×5 μm), 流动相为乙腈和水(含磷酸二氢铵 0.01 mol/L, 用磷酸调 pH 值至 2.8), 柱温 25 °C, 流速 0.8 mg/mL, 检测波长 345 nm, 进样量 10 μL, 用梯度洗脱程序.

### 1.4 测定金花小檗提取物的抑菌活性

#### 1.4.1 滤纸片扩散法

参照文献的方法<sup>[20]</sup>, 根据有无抑菌圈、抑菌圈直径判定提取物的抑菌活性. 用打孔器制备 5 mm 滤纸圆片, 灭菌后烘干. 分别将 10 μL 一定浓度的醇提取物滴在各滤纸圆片上, 以 75% 乙醇为阳性对照, 以蒸馏水为空白对照. 分别移取 0.1 mL 菌悬液, 用灭菌的涂布棒均匀涂布到牛肉膏蛋白胨琼脂固体培养基上, 用无菌镊子夹取各处理过的滤纸片, 置于培养基上. 每皿贴 4 张, 37 °C 培养 24 h, 测定抑菌圈直径, 重复 3 次.

#### 1.4.2 比浊法

参照文献的方法<sup>[21]</sup>, 测定醇提取物的抑菌活性. 以 75% 乙醇为阳性对照, 以只加 0.10 mL 菌悬液和 4.90 mL 培养基为空白对照. 将醇提取物稀释成不同的浓度, 各浓度吸取 0.10 mL, 分别加入装有 4.8 mL 无菌液体培养基的试管, 再加入 0.10 mL 菌悬液, 塞上棉塞, 振荡混匀, 在 37 °C 条件培养 24 h. 用液体培养基调零, 600 nm 处测定各个试管的 OD 值, 重复 3 次.

#### 1.4.3 二倍稀释法

参照文献的方法<sup>[22]</sup>, 采用试管二倍稀释法测定醇提取物的最小抑菌浓度. 取 2 组各 9 支无菌试管, 每管各加 2.00 mL 灭菌培养基, 先在第 1 支试管中加醇提取物 2.00 mL, 混匀后吸出 2.00 mL 置于第 2 支试管, 混匀后再吸取 2.00 mL 至第 3 支试管, 如此连续稀释至第 7 管, 混匀后弃去 2.00 mL; 第 8 支试管不加提取物, 作为空白对照; 第 9 支试管不加细菌只加提取物 2.00 mL, 混匀后弃去 2.00 mL, 观察提取物是否有污染. 2 组第 1—7 支试管, 分别加入 0.1 mL 的  $10^5$  CFU/mL 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的菌悬液, 混匀, 37 °C 培养 24 h, 观察结果. 与第 8 和第 9 支试管比较, 第 1—7 支试管中不发生混浊变化的最高提取物稀释倍数的浓度, 即为 MIC 值, 重复测定 3 次.

### 1.5 测定金花小檗提取物和萃取部位的体外抗氧化活性

用 DPPH·清除法和总还原力法评价金花小檗提取物和萃取部位的体外抗氧化活性, 以测定动物血清的 MDA、T-SOD 变化评价其提取物和萃取部位的体内抗氧化活性.

#### 1.5.1 DPPH·清除法

参考李春阳<sup>[23]</sup>的 DPPH·清除法, 并稍作改进. 空白组: 0.2 mL 甲醇+3.8 mL DPPH·溶液, 室温摇匀, 置于避光处 60 min 后, 在 515 nm 处测定吸光度( $A_0$ ). 样品对照组: 0.2 mL 样品+3.8 mL 甲醇, 室温下充分摇匀, 置于黑暗条件反应 60 min, 在 515 nm 处测定吸光度( $A_j$ ). 试验组: 精确量取各样品 0.2 mL, 置于具塞试管, 然后加入 3.8 mL 的 DPPH·溶液, 黑暗条件反应 60 min, 在 515 nm 处测得吸光值( $A_i$ ).

试验平行测定 3 次, 按下列公式, 计算各样品对 DPPH·的清除率:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

### 1.5.2 总还原力法

参照刘刚等的方法<sup>[24]</sup>, 稍作改进. 精密吸取 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 的芦丁标准液, 相应分别加入 0.9, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mL 甲醇溶液至 1 mL, 得到芦丁质量浓度 20, 40, 80, 120, 160  $\mu\text{g/mL}$ , 以 1.0 mL 甲醇为空白对照. 各试管顺序加入 2.5 mL 磷酸缓冲液和 2.5 mL 1% 铁氰化钾溶液, 混合均匀封口, 置 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min, 冰块迅速冷却, 再各加入 2.5 mL 的 10% 三氯乙酸溶液, 混合摇匀, 4 000 r/min 离心 10 min. 取离心上清液 2.5 mL 至新试管, 顺序加入 2.5 mL 蒸馏水和 1.0 mL 的 0.1% 三氯化铁溶液, 混合摇匀, 静置 10 min. 700 nm 波长测定吸光光度值, 平行测定 3 次, 以芦丁的质量浓度  $X(\mu\text{g/mL})$  为横坐标, 吸光光度值为纵坐标 ( $Y$ ), 线性拟合得到芦丁标准曲线为:  $Y = 0.0041X + 0.0168$ ,  $R^2 = 0.9995$ . 在质量浓度为 20~160  $\mu\text{g/mL}$  范围内, 吸光光度值与质量浓度有良好线性关系, 见图 2.

根据芦丁标准曲线, 按前述方法步骤, 测定吸光值, 记录各样品的芦丁质量浓度, 并换算成芦丁质量浓度, 即为芦丁当量 (g/g).

### 1.6 测定金花小檗提取物的体内抗氧化活性

雄性小鼠共 120 只, 每只体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 按体质量随机分为 10 组. 根和茎提取物的高 (1 000 mg/kg)、中 (500 mg/kg)、低 (250 mg/kg) 剂量各 1 组 (共 6 组), 再加上茎的正丁醇萃取部位组 (1 000 mg/kg)、根的正丁醇萃取部位组 (1 000 mg/kg)、空白组和模型组, 共 10 组, 每组 12 只小鼠. 在 ( $23 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$  温度条件下, 每日光照和黑暗各 12 h, 早上 8 点停止光照, 自由饮水、进食, 试验开始前适应性喂养 3 d, 试验处理 30 d. 从小鼠的眼球取血 1~2 mL, 静置 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集 80~150  $\mu\text{L}$  血清, 立即放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 用试剂盒测定血清的 MDA, T-SOD 含量.

### 1.7 统计与分析

用 SPSS 17.0 的方差分析、Probit 回归分析法<sup>[17]</sup>, 比较各样品组的 DPPH  $\cdot$  清除率差异性, 计算出各组的  $\text{SC}_{50}$  值, 用 Origin 8.0 软件绘制图形.

## 2 结果与分析

### 2.1 测定根、茎提取物及其萃取部位的药效成分

称取金花小檗的干燥根和茎各 300 g 分别粉碎后, 用 95% 乙醇提取 2 次, 处理后各得浸膏 24.22 g 和 12.39 g, 再分别依次使用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 计算各萃取部位的萃取率 (表 1).

从表 1 可看出, 金花小檗根、茎的萃取物主要集中于正丁醇部位、水部位中. 根的正丁醇部位萃取率为 25.4%, 根的水部位萃取率为 65.8%; 茎的正丁醇部位萃取率为 39.7%, 茎的水部位萃取率为 46.3%. 石油醚部位、乙酸乙酯部位萃取率都较低, 说明金花小檗根、茎提取物中的组分物质主要集中于正丁醇部位和水部位中.

表 1 金花小檗根、茎萃取部位的萃取率 ( $n=3$ )

项 目	石油醚部位	乙酸乙酯部位	正丁醇部位	水部位
根	6.0 $\pm$ 0.001	2.8 $\pm$ 0.001	25.4 $\pm$ 0.001	65.8 $\pm$ 0.001
茎	7.0 $\pm$ 0.001	7.0 $\pm$ 0.001	39.7 $\pm$ 0.001	46.3 $\pm$ 0.001

用酸性染料比色法、HPLC 法测定金花小檗根茎和其提取物、萃取部位的总生物碱及其组分的比例, 结果见图 3.

从图 3 可以看出: 金花小檗的根和茎中, 除了正丁醇部位中小檗碱比例小于药根碱外, 各组分的生物

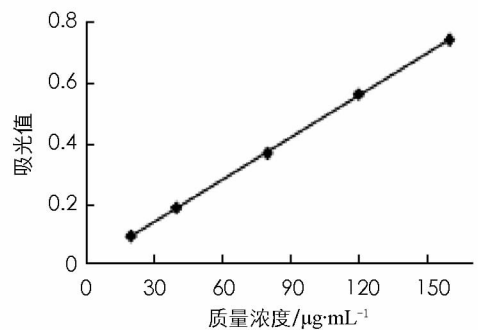
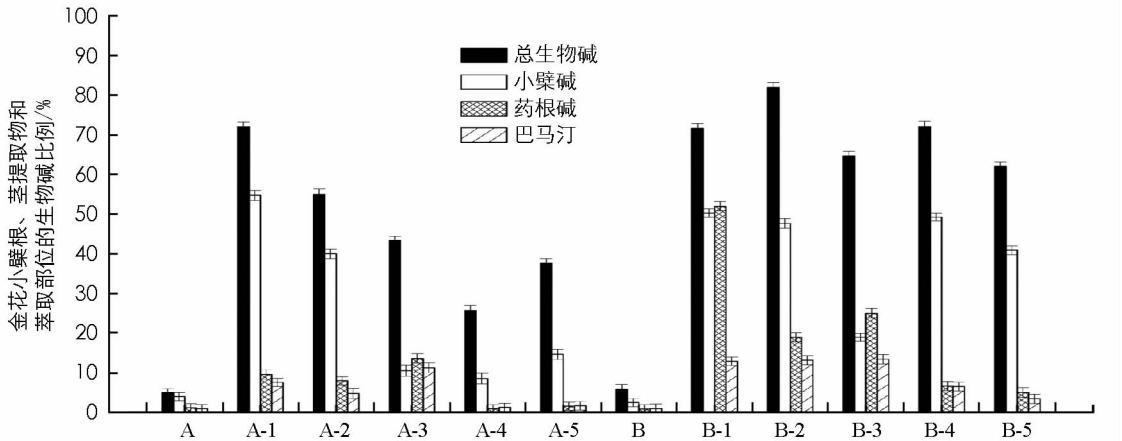


图 2 芦丁标准曲线

碱比例顺序从大到小为总生物碱、小檗碱、药根碱、巴马汀。根中小檗碱的比例比茎中高,根中药根碱、巴马汀的比例比茎中的低。金花小檗根、茎的萃取部位中均含有 3 种生物碱,其主要分布在水和正丁醇部位,乙酸乙酯部位和石油醚部位生物碱较少。3 种生物碱中,小檗碱在提取物、萃取部位中的比例都最多,茎的提取物中为 50.25%,根的提取物中为 54.72%;药根碱在茎的正丁醇部位最高,为 25.00%,其次是茎的水部位中(18.95%),最低是茎的乙酸乙酯部位中(6.67%);巴马汀在茎的正丁醇部位最高,为 13.41%,其次是茎的水部位中(13.16%),最低是茎的石油醚部位中(3.45%)。

根据文献的结果<sup>[25]</sup>,黄连中的总生物碱质量分数为 0.112 5 g/g,盐酸小檗碱在 4.176~16.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围呈线性关系,其结果与本研究测定的金花小檗总生物碱比例相对比较一致。



A: 根; A-1: 根的提取物; A-2: 根的水片段; A-3: 根的正丁醇片段; A-4: 根的乙酸乙酯片段; A-5: 根的石油醚片段  
B: 茎; B-1: 茎的提取物; B-2: 茎的水片段; B-3: 茎的正丁醇片段; B-4: 茎的乙酸乙酯片段; B-5: 茎的石油醚片段。

图 3 金花小檗根、茎及其提取物、萃取部位的总生物碱及其组分的比例 (n=3)

## 2.2 金花小檗醇提取物的抑菌活性

### 2.2.1 滤纸片扩散法测定的抑菌活性

采用滤纸片扩散法,在牛肉膏固体培养基上分别测定金花小檗根和茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌活性,结果见表 2。

从表 2 可知,无菌水空白对照的抑菌圈为 0.00 mm,75%乙醇对大肠杆菌的抑菌圈为 6.59 mm,而对金黄色葡萄球菌的抑菌圈为 6.47 mm。与无菌水空白比较,金花小檗根和茎的醇提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都有一定的抑制作用,其中,对金黄色葡萄球菌的抑菌效果为低敏,而对大肠杆菌的抑菌效果为中敏。与 75%乙醇比较,金花小檗根和茎的醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为 8.57 mm 和 7.46 mm,较 75%乙醇的抑菌圈(6.47 mm);而对大肠杆菌的抑菌圈分别为 10.23 mm 和 11.32 mm,比 75%乙醇的抑菌圈(6.59 mm)更大。试验结果表明,对  $G^+$  和  $G^-$  菌的抑制作用,金花小檗根和茎的醇提取物抑菌效果明显高于 75%的乙醇。

表 2 金花小檗醇提取物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果(抑菌圈直径)

mm

项 目	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
无菌水	0.00(-)	0.00(-)
金花小檗根的醇提取物	8.57±0.403(+)**#	10.23±0.514(++)**##
金花小檗茎的醇提取物	7.46±0.303(+)**#	11.32±0.324(++)**##
75%乙醇(v/v)	6.47±0.167(+)**	6.59±0.234(+)**

注:“-”表示抑菌圈直径小于 6 mm,判定无抑菌效果;“+”表示抑菌圈直径 6~10 mm,为低敏;“++”表示抑制圈直径 10~13 mm,为中敏(区间取值范围包括前值)。与无菌水比较,“\*”表示差异有统计学意义( $p<0.01$ );“#”表示与 75%乙醇比较差异有统计学意义( $p\leq 0.05$ );“##”表示差异有统计学意义( $p<0.01$ )。

### 2.2.2 比浊法测定的抑菌活性

采用比浊法测定金花小檗根和茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌作用, 结果见表 3。

从表 3 可知, 与空白对照比较, 金花小檗根、茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果显著; 与 75% 乙醇比较, 金花小檗根、茎的醇提取物的抑菌率显著升高, 同时, 随醇提取物浓度的增加, 抑菌率都增大。

对大肠杆菌的抑菌率, 75% 乙醇为 2.65%, 最低浓度 125 mg/mL 的金花小檗根、茎的醇提取物的抑菌率达到 21.95% 和 20.91%; 而对金黄色葡萄球菌, 75% 乙醇的抑菌率为 2.53%, 最低浓度 125 mg/mL 的金花小檗根、茎的醇提取物的抑菌率达到 19.43% 和 20.45%。因此, 最低浓度 125 mg/mL 的金花小檗根、茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制率, 都是明显高于 75% 的乙醇。金花小檗根、茎的醇提取物浓度 500 mg/mL 时对大肠杆菌的抑菌率为 90.76% 和 89.56%, 而对金黄色葡萄球菌的抑菌率为 91.48% 和 90.48%。因此, 金花小檗根、茎的醇提取物对两类细菌的抑制率均大于 90%。

表 3 金花小檗根和茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制率

项 目	质量浓度/mg · mL <sup>-1</sup>	对大肠杆菌的抑制率/%	对金黄色葡萄球菌的抑制率/%
空白对照	0	0	0
金花小檗根的醇提取物 1	500	90.76±3.62**##	91.48±5.16**##
金花小檗根的醇提取物 2	250	72.33±15.45**##	78.57±5.76**##
金花小檗根的醇提取物 3	125	21.95±3.56**##	19.43±13.76**##
金花小檗茎的醇提取物 1	500	89.56±2.61**##	90.48±3.16**##
金花小檗茎的醇提取物 2	250	73.34±13.46**##	77.67±5.66**##
金花小檗茎的醇提取物 3	125	20.91±3.36**##	20.45±12.75**##
75% 乙醇 (v/v)		2.65±0.78**	2.53±1.54**

注: “\*\*”表示与空白对照比较差异有统计学意义( $p < 0.01$ ); “##”表示与乙醇比较差异有统计学意义( $p < 0.01$ )。

### 2.2.3 二倍稀释法测定的抑菌活性

采用试管二倍稀释法测定金花小檗根、茎的醇提取物抑菌活性, 以 MIC 值表示, 结果见表 4。

结果表明: 金花小檗根、茎的醇提取物, 对金黄色葡萄球菌的最低抑菌质量浓度为 63.62 mg/mL, 对大肠杆菌的最低抑菌质量浓度为 125 mg/mL。结果提示, 金花小檗醇提取物对 G<sup>+</sup> 菌的 MIC 值比对 G<sup>-</sup> 的 MIC 值小, 结果可能是两类细菌的抑制作用机理差异所致。

表 4 金花小檗根和茎的醇提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度 (MIC) ( $n=3$ )

试管组号	提取物质量浓度 (以生药计, mg/mL)	金花小檗根的醇提取物		金花小檗茎的醇提取物	
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
1	250.00	—	—	—	—
2	125.00	—	—(MIC)	—	—(MIC)
3	63.62	—(MIC)	++	—(MIC)	++
4	31.25	+	++	+	++
5	15.63	++	++	++	++
6	7.82	++	+++	++	+++
7	3.91	+++	+++	+++	+++

注: “—”表示溶液清澈, 无菌生长; “+”表示有少量细菌生长, “++”表示有较多细菌生长; “+++”表示溶液混浊, 细菌正常生长, 无抑菌效果。

## 2.3 根、茎的提取物及其萃取部位对 DPPH· 的清除率

按 1.4.1 的方法, 测定金花小檗的根、茎提取部位对 DPPH· 的清除, 结果见图 4。

由图 4A 可知, 除根的石油醚部位外, 金花小檗根、茎的其他部位对 DPPH· 的清除能力的变化趋势大致相同, 各部位中的乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位对 DPPH· 清除的能力相近, 并且均大于石油醚片段。根的乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位, 质量浓度小于 300  $\mu\text{g/mL}$  时, 对 DPPH· 的清除率增加均明显, 质量浓度超过 300  $\mu\text{g/mL}$  后, 对 DPPH· 清除率的增长不明显。由图 4B 可知, 茎的 4 种部位对

DPPH· 的清除能力的变化趋势大致相同, 在萃取部位质量浓度小于 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 DPPH· 的清除率增加明显, 质量浓度超过 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后, 对 DPPH· 清除率的增长不明显。

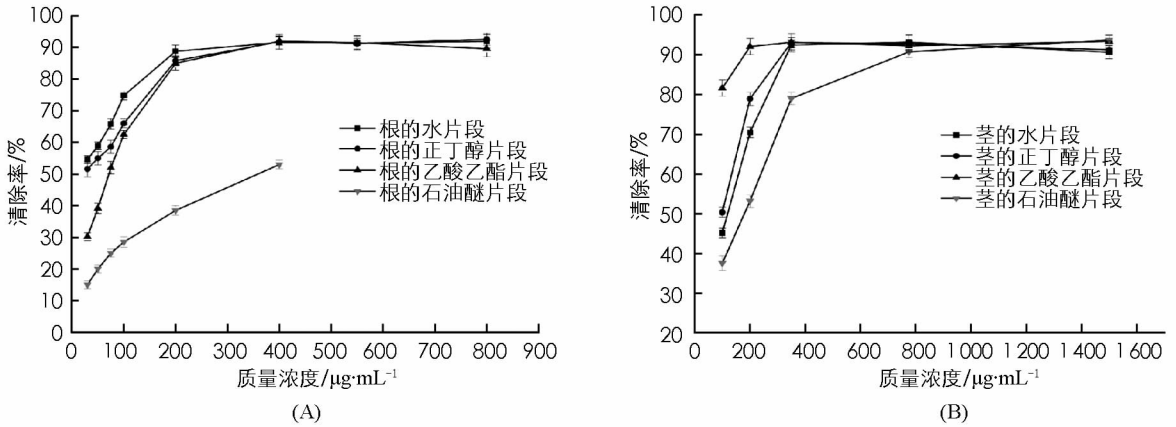


图 4 金花小檗根、茎的萃取部位对 DPPH· 的清除作用

按 1.4.1 的方法, 测定金花小檗的根、茎提取物对 DPPH· 的清除效果, 结果见图 5。

从图 5 可以看出, 根、茎提取物对 DPPH· 有清除率随质量浓度的增加逐渐增大, 增加较为平滑, 根、茎的提取物对 DPPH· 清除率的影响差异性不大。

#### 2.4 根、茎的提取物及其萃取部位清除 DPPH· 的 $\text{SC}_{50}$ 值

对清除 DPPH· 的结果进行 SPSS 回归分析, 求出各样品提取物和萃取部位的浓度与 DPPH· 清除率的回归方程和决定系数, 结果见表 5。

由表 5 可知, 金花小檗的根、茎提取物的浓度与 DPPH· 清除率有线性关系, 各萃取部位对 DPPH· 的清除率都与浓度有明显的线性关系, 决定系数  $R^2$  为 0.993~0.997。

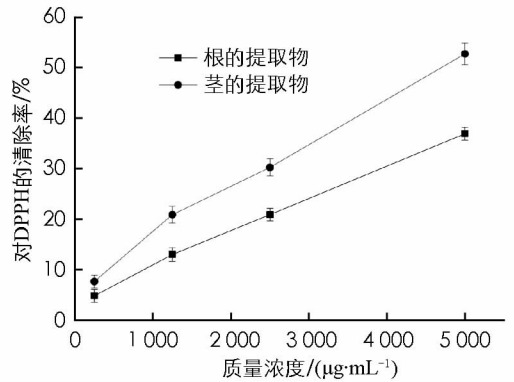


图 5 金花小檗根和茎的醇提取物对 DPPH 清除作用

表 5 金花小檗的根、茎提取物和萃取部位的浓度与 DPPH· 清除率回归方程和决定系数 ( $R^2$ )

部位	提取物	水萃取部位	正丁醇萃取部位	乙酸乙酯萃取部位	石油醚萃取部位
茎	$Y=1.158X+1.519$ ( $R^2=0.994$ )	$Y=1.168X+1.719$ ( $R^2=0.996$ )	$Y=1.383X+1.717$ ( $R^2=0.993$ )	$Y=1.710X+1.768$ ( $R^2=0.995$ )	$Y=1.886X+1.559$ ( $R^2=0.997$ )
根	$Y=1.067X+1.739$ ( $R^2=0.993$ )	$Y=1.311X+2.040$ ( $R^2=0.997$ )	$Y=1.691X+1.861$ ( $R^2=0.994$ )	$Y=1.216X+2.104$ ( $R^2=0.996$ )	$Y=0.548X+0.176$ ( $R^2=0.995$ )

进一步用 Probit 法计算 DPPH· 清除率为 50% 时的样品体积质量分数, 得到各样品清除率 DPPH· 的  $\text{SC}_{50}$  值, 结果见表 6。

由表 6 可知, 根的提取物和各个提取部位,  $\text{SC}_{50}$  值从大到小排序是: 石油醚部位、提取物、正丁醇部位、乙酸乙酯部位、水部位, 最小的是根乙酸乙酯部位, 其  $\text{SC}_{50}$  值为 29.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最大的是根石油醚部位, 其  $\text{SC}_{50}$  值为 477.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

茎的提取物和各个提取部位,  $\text{SC}_{50}$  值从大到小排序是: 石油醚部位、提取物、正丁醇部位、水部位、乙酸乙酯部位, 最小的是茎乙酸乙酯部位, 其  $\text{SC}_{50}$  值为 18.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最大的是茎石油醚部位, 其  $\text{SC}_{50}$  值为 144.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

因此, 根的水部位对 DPPH· 的清除能力 ( $\text{SC}_{50}$  值为 28.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 最强, 而正丁醇部位 ( $\text{SC}_{50}$  值为 56.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和乙酸乙酯部位 ( $\text{SC}_{50}$  值为 29.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的清除效果较好。茎的乙酸乙酯部位对 DPPH· 的清除能

力(SC<sub>50</sub> 值为 18.7 μg/mL)最强, 水部位(SC<sub>50</sub> 值为 21.1 μg/mL)和正丁醇部位(SC<sub>50</sub> 值为 65.0 μg/mL)的清除效果较好。

表 6 金花小檗的根、茎提取物与萃取部位 DPPH·清除效果的 SC<sub>50</sub> 值

部位	提取物	水相萃取部位	正丁醇萃取部位	乙酸乙酯萃取部位	石油醚萃取部位
根	134.4±0.2	28.0±0.2	56.0±0.3	29.0±0.2	477.0±0.2
茎	93.0±0.3	21.1±0.1	65.0±0.2	18.7±0.1	144.9±0.2

## 2.5 根、茎的提取物及其萃取部位的总还原力

按 1.4.2 的方法, 测定金花小檗的根、茎提取物及其萃取部位的抗氧化活性强弱, 结果见表 7。

由表 7 可知, 各提取物部位均有一定的抗氧化性, 其能力没有达到芦丁的水平, 最高的接近芦丁抗氧化能力的一半多点。根的乙酸乙酯部位总还原力最大, 为 0.525 g/g(芦丁当量); 正丁醇部位为 0.492 g/g(芦丁当量), 水部位为 0.469 g/g(芦丁当量), 这两个部位的总还原力较好。茎的乙酸乙酯总还原力最大, 为 0.517 g/g(芦丁当量), 正丁醇部位和水部位总还原力较好。该结果与 DPPH·清除试验的结果相似。与小檗属其他物种的研究比较, 金花小檗的抗氧化活性相似, 都存在明显的剂量依赖性<sup>[26-27]</sup>。

综上所述, 用 DPPH·清除法、SC<sub>50</sub> 值和总还原力法, 衡量金花小檗的根、茎提取物与萃取部位, 体外抗氧化活性的强弱, 正丁醇部位和水部位的抗氧化活性较强, 石油醚的抗氧化活性最低。

表 7 金花小檗的根、茎提取物与萃取部位的总还原力测定结果

部位	提取物	水相萃取部位	乙酸乙酯萃取部位	正丁醇萃取部位	石油醚萃取部位
根	0.426±0.04	0.469±0.05	0.525±0.06	0.492±0.05	0.075±0.01
茎	0.510±0.05	0.439±0.06	0.517±0.07	0.507±0.05	0.106±0.01

## 2.6 根、茎的提取物及其萃取部位对血清 MDA 和 T-SOD 含量的影响

正丁醇部位和水部位的抗氧化活性较强, 而且它们的提取率最高, 动物试验中将正丁醇部位和水部位合并, 按试验设计方案分别用金花小檗的根、茎提取物及其正丁醇-水部位饲养小鼠 30 d, 断尾取血后测定小鼠血清的 MDA, T-SOD 含量, 结果见表 8。

从表 8 可以看出: 与正常组比较, 模型组的 T-SOD 显著降低, MDA 水平显著升高, 表明模型组动物的体内抗氧化活性显著降低。与正常组比较, 除茎的正丁醇-水部位组外, 根正丁醇-水部位组的 T-SOD 显著升高, 不同剂量的根、茎提取物组 T-SOD 也显著升高; 与正常组比较, 高剂量的根提取物组 MDA 显著降低, 茎的中低剂量提取物组 MDA 有不同程度地降低, 其他组的 MDA 无显著变化。与模型组比较, 除茎的正丁醇-水部位组外, 根正丁醇-水部位组和高中低剂量的根、茎提取物组的 T-SOD 显著升高, 而全部试验处理组的 MDA 均显著减少。

表 8 金花小檗提取物及其正丁醇-水萃取部位对小鼠血清 MDA 和 T-SOD 的影响

分 组	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	小鼠数/只	T-SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	0.0	12	119.99±28.36	9.77±0.52
根的高剂量提取物组	1 000.0	12	203.52±28.20**##	5.12±0.43***
根的中剂量提取物组	500.0	12	223.99±23.82**##	9.61±1.42**
根的低剂量提取物组	250.0	12	210.32±58.67**##	9.49±0.87**
茎的高剂量提取物组	1 000.0	12	204.97±37.30**##	9.41±0.67**
茎的中剂量提取物组	500.0	12	226.74±43.22**##	7.72±1.43***
茎的低剂量提取物组	250.0	12	231.97±10.03**##	7.62±0.74***
根的正丁醇-水萃取部位组	21.0	12	154.65±43.73**##	9.31±1.19**
茎的正丁醇-水萃取部位组	16.4	12	108.79±32.80	8.88±0.86**
模 型 组	0.0	12	64.40±13.12**	13.10±0.97*

注: “\*\*”表示与正常组比较差异有统计学意义( $p < 0.01$ ); “\*”表示差异有统计学意义( $p < 0.05$ ); “##”表示与模型组比较差异有统计学意义( $p < 0.01$ )。

因此, 体内抗氧化试验证明, 金花小檗提取物及正丁醇-水部位对小鼠血清 MDA 和 T-SOD 的影响明显, 对小鼠体内抗氧化活性有显著改善。根据文献研究结果<sup>[28-29]</sup>, 与小檗属其他物种的体内抗氧化活性进行比较, 金花小檗根和茎的提取物、正丁醇-水部位抗氧化活性的较一致, 均有提高抗氧化活性的功能。



### 3 结 论

小檗属的物种多达 450~500 种<sup>[30]</sup>, 是一种常用的抗菌消炎中药和民族药<sup>[31]</sup>, 多为常绿或落叶灌木, 一般高 1~5 m, 有刺, 其茎、根可提炼黄色染料, 有些种的果实富含维生素 C, 可以食用. 小檗属植物功能多样、功效成分丰富, 其主要的功效成分是生物碱且作用靶点多, 现对其功能研究方兴未艾. 当前, 对小檗属物种的更多功能研究有待深入. 本试验对金花小檗的研究有如下结论:

(1) 以酸性染料比色法测定金花小檗根和茎提取物及萃取部位的总生物碱, 根、茎的总生物碱比例为 4.90%~5.82%, 根、茎乙醇提取物的总生物碱比例达 69.57%~72.09%. 以 HPLC 法测定 3 种生物碱, 其中金花小檗根、茎中小檗碱比例最高, 其值均大于 0.6%. 3 种生物碱组分中, 根、茎提取物和水部位中小檗碱比例最高, 巴马汀比例最低; 在根、茎的正丁醇部位中, 药根碱比例较高, 但小檗碱与巴马汀比例都较低; 在根、茎的乙酸乙酯部位和石油醚部位中, 小檗碱比例最高, 药根碱与巴马汀的比例很低. 因此, 金花小檗根、茎提取物和萃取部位中, 功效物质主要集中于正丁醇部位和水部位中.

(2) 在金花小檗抑菌活性试验中, 采用滤纸片扩散法、比浊法和二倍稀释法, 以抑菌圈、MIC 为评价指标, 测定金花小檗醇提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制效果. 滤纸片扩散法的结果表明, 金花小檗醇提物对  $G^+$  和  $G^-$  两类细菌的抑菌效果有显著差异; 比浊法的结果表明, 质量浓度为 500 mg/mL 的金花小檗醇提物, 对  $G^+$  和  $G^-$  两类细菌的抑制率都达到 90% 以上; 金花小檗醇提物对大肠杆菌的 MIC 值为 125 mg/mL, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 63.62 mg/mL. 因此, 金花小檗醇提物具有显著的抑菌活性, 为进一步研究金花小檗的抑菌成分、抑菌机理等奠定了理论基础.

(3) 通过 DPPH·清除法、总还原力法等体外抗氧化活性的测定方法, 对金花小檗根、茎、提取物及萃取部位进行还原力分析, 发现两种测定方法的结果一致. 结果表明: 金花小檗根和茎的提取物及正丁醇部位和水部位的抗氧化活性较强, 石油醚部位的抗氧化活性最低. 因此, 醇提物及萃取部位都具有体外抗氧化活性.

(4) 用金花小檗根、茎、醇提物和萃取部位饲喂处理小鼠 30 d, 分别测定各组小鼠的血清 MDA、T-SOD 含量, 结果表明, 金花小檗提取物及正丁醇-水萃取部位对小鼠血清 MDA、T-SOD 的影响显著, 对小鼠的体内抗氧化活性具有显著的改善作用. 因此, 提取物及正丁醇-水萃取部位在小鼠体内具有抗氧化活性.

通过试验发现, 金花小檗根和茎的功效成分丰富且主要集中在根上, 这与藏药马尿泡茎段快繁体系及分化过程体内生物碱变化研究中用 HPLC 法测定试管苗不同部位 4 种生物碱量的结果相似, 即: 根中总生物碱量最高<sup>[32]</sup>. 金花小檗醇提物通过滤纸片扩散法、比浊法、二倍稀释法均表明, 金花小檗醇提物对  $G^+$  和  $G^-$  两类细菌的抑菌效果显著, 此结果与云南民族药臭灵丹在抗菌消炎、抑菌、祛痰、镇痛、抗肿瘤等方面均有着一定的药理活性结果相似<sup>[31]</sup>. 正丁醇-水部位体内外抗氧化活性的研究结果均表明, 金花小檗根和茎都具有较强的抗氧化活性, 黄连素治疗阿尔茨海默病的研究进展中也发现黄连素具有较好的抗氧化应激作用<sup>[5]</sup>.

因此, 本试验通过对金花小檗抑菌、功效成分、抗氧化作用等的测定, 进一步巩固和提升了其在中药及藏药中的地位.

#### 参考文献:

- [1] 隗 丽, 朱美玲, 董月柳, 等. 盐酸小檗碱在黄连水煎液中的生物药剂学分类系统属性研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1192-1197.
- [2] 李江陵, 舒光明, 肖小河. 四川省小檗属植物物种资源及其分布规律研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1997, 22(4): 385-391.
- [3] 才让南加, 多吉仁青, 索朗曲美. 植物类藏药材的命名概述 [J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(1): 39-40.
- [4] 陈 凯, 王月亮, 王佳奇, 等. 黄连乙醇提取物与盐酸小檗碱体外抗炎对比研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(5): 684-687.
- [5] 左 茹, 曹雪滨, 张文生. 黄连素治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1184-1187.

- [6] 陈坚,刘杰.小檗碱的临床新用途及其作用机制研究进展[J].上海医药,2016,37(3):26-30.
- [7] 舒何晶,李学刚,史青,等.黄连生物碱治疗糖尿病——解偶联蛋白2[J].西南师范大学学报(自然科学版),2013,38(6):54-57.
- [8] 朱姮,文蕾,耿岩玲,等.功劳木中生物碱类成分抗氧化活性研究[J].山东科学,2016,29(5):24-28.
- [9] 魏世超,邹欣,姜淑君,等.小鼠肝细胞对黄连粉末中小檗碱、药根碱及单体化合物的吸收[J].中华中医药学刊,2017,35(7):1647-1650.
- [10] 张瑞飞,查色,尹旭,等.藏药角茴香及同属植物的化学成分和药理活性研究进展[J].中草药,2016,47(7):1217-1224.
- [11] 杨丽丽,郭海,杨君芳.红叶小檗育苗技术[J].现代农业科技,2017(9):163,166.
- [12] 滕云,张进.黑果小檗红色素的提取与食用安全性[J].食品与生物技术学报,2007,26(4):46-50.
- [13] 邸翔.红果小檗果醋、果酒的研制及其色素的初步研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2010.
- [14] 刘燕,刘艳,马宇颖,等.鸡骨草叶总生物碱的含量测定及其体外抗氧化活性研究[J].中国医药导报,2016,13(28):25-27,55.
- [15] 史娟,李江,葛红光.金钩如意草总生物碱抗氧化活性及稳定性研究[J].粮食与油脂,2016,29(11):82-85.
- [16] 吴铎,赵汝霞,吕俊华.小檗碱对高脂高糖饮食与链脲佐菌素联合诱导糖尿病大鼠肾脏损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2012,32(9):1878-1880.
- [17] ZAREI A, CHANGIZI-ASHTIYANI S, TAHERI S, et al. A Quick Overview on some Aspects of Endocrinological and Therapeutic Effects of *Berberis Vulgaris* L [J]. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2015, 5(6): 485-497.
- [18] MALAYERI M R M, DADKHAH A, FATEMI F, et al. Chemotherapeutic Effect of *Berberis Integerrima* Hydroalcoholic Extract on Colon Cancer Development in the 1, 2-Dimethyl Hydrazine Rat Model [J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2016, 71(7-8): 225-232.
- [19] 徐国良,熊友文,孙立波,等.酸性染料比色法测定黄连中总生物碱的含量[J].江西中医院学报,2010,22(4):32-34.
- [20] 章斌,侯小桢,秦轶,等.柠檬果皮精油的化学组成、抗氧化及抑菌活性研究[J].食品工业科技,2015,36(5):126-131.
- [21] 翁佩芳,江华珍,冯凤琴,等.酶标比浊法评价月桂酸单甘油酯对肉葡萄球菌的抑菌活性[J].中国食品学报,2012,12(5):188-194.
- [22] 肖杭,黎云祥,蔡凌云,等.白筋叶总黄酮的提取和纯化及其抑菌试验初探[J].光谱实验室,2010,27(6):2130-2134.
- [23] 李春阳,许时婴,王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力 [J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(2): 102-106.
- [24] 刘刚,方玉,杨妍,等.青刺尖茶抑菌作用的初步研究[J].食品工业科技,2014,35(14):114-117.
- [25] 陈红英.黄连化学成分的分离及其降糖活性研究[D].重庆:西南大学,2012.
- [26] 秦铭铭,耿燕,栾雪,等.药食用真菌提取物抗氧化活性研究[J].食品与生物技术学报,2017,36(1):80-86.
- [27] 黄优生,谢明勇,聂少平,等.山楂提取物的抗氧化活性研究[J].食品与生物技术学报,2010,29(2):189-192.
- [28] 霍文兰.桑果红色素的提取及性能[J].食品与生物技术学报,2006,25(1):74-78.
- [29] 张荣媛,尚爱加,段秋华,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后不同时间血清SOD和MDA的变化[J].军医进修学院学报,2007,28(6):428-429.
- [30] 潘天春.四川攀西地区小檗属植物资源及利用价值[J].技术与市场,2013,20(5):314-315,318.
- [31] 李光富,卞富永.云南民族药臭灵丹临床应用研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(18):27-28.
- [32] 雷天翔,王环,陈世龙,等.藏药马尿泡茎段快繁体系及分化过程体内生物碱变化研究[J].中草药,2015,46(20):3086-3090.

# On Effect of *Berberis wilsonae* Functional Components and Antimicrobial and Antioxidant Activities

ZHANG Qian<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1,2</sup>,  
DENG Qian-jiang<sup>1</sup>, WANG Shu-fang<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-yu<sup>1,2</sup>,  
LI Xue-li<sup>1</sup>, DU Juan<sup>3</sup>, LU Xiang<sup>1</sup>

1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China;

2. Food Function and Application Research Institute, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China;

3. College of Geography and Resource Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

**Abstract:** In order to make full use of southwest minority medicinal plant, *Berberis wilsonae*, in Sichuan Province, its extracts and fragments were tested for antibacterial and antioxidant activity. It was determined by the acidic dye spectrophotometry or HPLC for the function composition in *B. wilsonae* root and stem, extracts and fragments. The alkaloids were mainly in the 1-butanol segment and water segments. Berberine was most rich in the alcohol extracts but Bamatin was least. Compared with 75% alcohol, the inhibitory effects of *B. wilsonae* rhizome and the extract on *Staphylococcus aureus* were significantly inhibited and antibacterial effect was low sensitivity. Compared with 75% alcohol, the inhibitory effects of *B. wilsonae* rhizome and the extract on the *E. Coli* were extremely remarkable and antibacterial effect was medium sensitivity. The antioxidation activity of the *B. wilsonae* extracts and fragments was determined by DPPH and total reduction method. The results obtained by the two methods were similar. It shows that the anti-oxidative activity of 1-butanol and water fragment was stronger, and the antioxidant activity of petroleum ether fragment was the lowest. The mice serum MDA and T-SOD value were determined by using *B. wilsonae* extracts and 1-butanol-water segment respectively to feed mice 30 d. The result of the experiment was the case that compared with the normal group, the experimental group T-SOD value decreased significantly and the MDA level increased significantly. This test shows that the extract treatment could substantially improve the antioxidant activity of mice. Therefore, *B. wilsonae* extract, fragments have significant inhibitory activity, but also has high antioxidant activity, both in vivo and in vitro.

**Key words:** *Berberis wilsonae*; alcohol extract; fragment; antibacterial; antioxidant; HPLC

责任编辑 王新娟