

# 艾叶水提物和酸提物的抗氧化及抗菌活性比较

何柳, 王云鹏, 谢卫红, 张毅\*

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室, “111 计划” 学科创新引智基地, 湖北武汉 430068)

**摘要:** 为比较研究艾叶水提物和酸提物抗氧化及抗菌的作用。分别采用去离子水和柠檬酸溶液提取艾叶, 得到两种提取物, 测各自的总黄酮、总多酚和多糖含量; 通过 DPPH 自由基、羟自由基及 ABTS 自由基来评价提取物的抗氧化能力; 利用牛津杯法测定提取物的抑菌活性, 并探讨其抑菌机制。结果表明: 艾叶水提取物中总黄酮、总多酚及多糖含量分别为 208.03、51.77 和 398.72 mg/g, 艾叶酸提取物分别为 80.39、25.44 和 453.45 mg/g。在一定浓度范围内, 艾叶水提取物和艾叶酸提取物均有较强抗氧化能力, 对 DPPH 自由基清除率的半数抑制浓度 (median inhibition concentration,  $IC_{50}$ ) 分别为 33.10 和 54.52  $\mu\text{g/mL}$ ; 对羟自由基清除率的  $IC_{50}$  值分别为 2.92 和 1.63 mg/mL; 对 ABTS 自由基清除率的  $IC_{50}$  值分别为 0.17 和 0.32 mg/mL。艾叶水提取物无明显抑菌效果; 但艾叶酸提取物对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、沙门氏菌具有显著抑菌活性, 最小抑菌浓度分别为 0.10、0.10 和 0.20 g/mL。通过测定抑菌动力学、细胞膜通透性实验证实酸提物能有效抑制致病菌生长、改变细胞膜通透性; 扫描电镜和聚丙烯酰胺凝胶电泳证实酸提物能破坏细菌细胞壁形态、抑制细菌的蛋白质合成。柠檬酸溶液提取法比水提法更适用于艾叶活性成分的提取, 艾叶酸提取物更具有食品防腐剂和抗氧化剂的潜力。

**关键词:** 艾叶; 提取方法; 抗氧化活性; 抑菌活性; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2021)10-205-213

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0092

## Comparative of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous and Acidic Extracts from *Artemisia argyi*

HE Liu, WANG Yun-peng, XIE Wei-hong, ZHANG Yi\*

(College of Bioengineering and Food, Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, "111 Plan" Discipline Innovation and Intelligence Introduction Base, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:** In order to compare the antioxidant and antibacterial effects of the aqueous extract and acidic extract of *Artemisia argyi*. Deionized water and citric acid solution were used to obtain two extracts from *Artemisia argyi*, and the contents of total flavonoids, total polyphenols and polysaccharides in these extracts were measured. The antioxidant capacity of each extract was evaluated by the DPPH, hydroxyl and ABTS radical scavenging assays. The Oxford cup method was used to determine the antibacterial activity of the extract and examine the underlying antibacterial mechanism. The results showed that the contents of total flavonoids, total polyphenols and polysaccharides were 208.03, 51.77 and 398.72 mg/g, respectively, in the aqueous extract of *Artemisia argyi*, and 80.39, 25.44 and 453.45 mg/g, respectively, in its acidic extract. Within a certain concentration range, both the aqueous extract and acidic extract of *Artemisia argyi* had strong antioxidant capacities, with their median inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) values 33.10 and 54.52  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, for DPPH radical, 2.92 and 1.63 mg/mL, respectively for hydroxyl radical, 0.17 and 0.32 mg/mL, respectively, for ABTS radical. The aqueous extract of *Artemisia argyi* exhibited insignificant antibacterial effect; whilst the acidic extract exerted significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Shigella* and *Salmonella*, with the minimum inhibitory concentration being 0.10, 0.10 and 0.20 g/mL, respectively. The examinations of antibacterial

引文格式:

何柳,王云鹏,谢卫红,等.艾叶水提物和酸提物的抗氧化及抗菌活性比较[J].现代食品科技,2021,37(10):205-213

HE Liu, WANG Yun-peng, XIE Wei-hong, et al. Comparative of antioxidant and antibacterial activities of aqueous and acidic extracts from *Artemisia argyi* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 205-213

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2016CFB105)

作者简介: 何柳 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然药化研究, E-mail: 1531994187@qq.com

通讯作者: 张毅 (1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然药化研究, E-mail: zhang000yi@126.com

kinetics and cell membrane permeability confirmed that the acidic extract could effectively inhibit the growth of pathogenic bacteria and change the cell membrane permeability. Scanning electron microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis experiments revealed that the acidic extract can destroy the morphology of bacterial cell walls and inhibit bacterial protein synthesis. The extraction using the citric acid solution is more suitable for the extraction of the active ingredients from *Artemisia argyi* than the aqueous extraction, and the acidic extract has a greater potential as food preservatives and antioxidants.

**Key words:** *Artemisia argyi*; extraction method; antioxidant; antibacterial; antibacterial mechanism

艾蒿 (*Artemisia argyi* Levl. et Van) 又名艾草, 艾蒿等, 为菊科多年生草本植物, 是中国传统的天然植物资源。该植物作为药物始载于《名医别录》<sup>[1]</sup>, 味苦而辛, 无毒, 具有清热止痰、温经止血等功效。我国艾蒿植物资源丰富, 种类繁多, 主要有蕲艾、赣艾、北艾、祁艾及海艾<sup>[2]</sup>, 不同地区来源的艾叶微量元素含量相似, 其中钾、钙、镁、铁含量较高<sup>[3,4]</sup>。艾叶为艾蒿的干燥成熟叶子, 含有多糖类<sup>[5]</sup>、酚酸类<sup>[6]</sup>、黄酮类<sup>[7]</sup>、精油<sup>[8]</sup>、萜类<sup>[9]</sup>等多种活性物质, 具有抗氧化<sup>[10]</sup>、抑菌<sup>[11]</sup>、抗疟药<sup>[12]</sup>等功效, 有较好的研究价值以及较广泛的应用。

目前, 因食源性致病菌引起的食物中毒事件频繁发生, 食品腐败现象普遍存在, 金黄色葡萄球菌产生的肠毒素是引起急性中毒的原因, 志贺氏菌引起的食物中毒在夏、秋两季多见, 中毒食品以冷盘为主。沙门氏菌极易引起人食物中毒, 中毒食品以蛋类、肉类及奶类为主; 这三种细菌为常见的食源性致病菌, 对人和动物危害大。人工合成抑菌剂的使用会导致耐药菌的产生<sup>[13]</sup>; 以及慢性疾病的早期发生与人体内部的抗氧化水平密切相关, 经人工合成的抗氧化剂可能致癌或者产生副作用。因此, 一种安全、无毒的天然抗氧化剂、抑菌剂意义重大。

近年来, 对天然植物活性成分的提取, 一般采用水提法<sup>[14]</sup>、有机溶剂提取法<sup>[15]</sup>、酸碱提取法<sup>[16]</sup>; 而对艾叶活性成分的提取, 通常采用水提法<sup>[17]</sup>、醇提法<sup>[18]</sup>, 酸提法未见报道。本研究以艾叶为原料, 采用柠檬酸溶液和去离子水作为溶剂, 得到艾叶酸提物和艾叶水提物; 测各自的总黄酮、总多酚和多糖含量。比较两种艾叶提取物对 DPPH 自由基、羟自由基及 ABTS 自由基的清除能力; 再探究两种艾叶提取物对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌及沙门氏菌的抑菌效果, 从而筛选出抗氧化活性较高、抑菌效果较好的艾叶提取物。以期艾叶有效成分的提取提供技术支持。此外, 有关艾叶提取物的抑菌机理研究较少, 本研究将从细胞膜完整性、菌体表面微观结构及蛋白质合成等方面来研究艾叶提取物的抑菌机理, 为进一步开发艾叶新型功能性产品提供理论依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料与试剂

以湖北蕲春地区的艾蒿干燥叶子为原材料; 以金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)、沙门氏菌 (*Salmonella* CMCC 21513)、痢疾志贺氏菌 (*Syngassia* CMCC(B) 51105) 作为供试菌, 由湖北省药检院赠与。

培养基: 营养琼脂或 Luria-Bertani 培养基。

试剂: 柠檬酸、无水乙醇、甲醇、氯化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、2.5%戊二醛, 均属分析纯; 1,1-二苯-2-三硝苯肼 (DPPH) (D807297), 纯度 96%、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) (A800764), 纯度 98%, 购自上海源叶生物科技有限公司; 钙离子试剂盒 (C004-2-1), 南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器与设备

KQ5200 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; R-1001VN 旋转蒸发器, 郑州长城科工贸有限公司; YM100 立式压力蒸汽灭菌器, 上海三申医疗器械有限公司; ZXSD-B1270 生化培养箱, 上海智诚分析仪器制造有限公司; EPOCH 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; JSM-6390LV 扫描电子显微镜, 日本电子; Chemi XL1.4 高灵敏度化学发光成像系统, 英国 Syngene 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 两种艾叶提取物的制备

艾叶水提物的制备: 将干燥的艾叶采用高压粉碎机粉碎, 过 200 目筛, 密封贮存备用。准确称取 20 g 艾叶样品, 加入 600 mL 的去离子水, 浸泡过夜, 先采用 200 W 超声提取 30 min 后, 再水浴加热 2 h, 水浴温度为 80 °C, 趁热纱布过滤, 抽滤取上清液, 真空冷冻干燥后, 密封保存。

艾叶酸提物的制备: 准确称取 20 g 艾叶, 加入 600 mL 的去离子水, 再用柠檬酸溶液调至 pH 4.0, 浸泡过夜; 后续步骤与艾叶水提物相同。

#### 1.3.2 总黄酮、总多酚及多糖含量的测定

##### 1.3.2.1 总黄酮含量测定

采用亚硫酸钠-硝酸铝显色法<sup>[19]</sup>测定总黄酮含量,精密吸取艾叶提取物 0.5 mL,依次加入 0.15 mL 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液,静置 6 min 后加入 0.15 mL 10% AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶液,静置 5 min 再加入 2 mL 4% NaOH 溶液,最后加入 2.2 mL 蒸馏水,使用酶标仪测量 510 nm 处的吸光值以芦丁为标准品,在 0~0.0416 mg/mL 浓度范围内,获得标准曲线方程:  $Y=4.3693X-0.0003$  ( $R^2=0.9992$ )。将结果换算为每克干基中所含的总黄酮相当于芦丁的毫克数 (mg RE/g DW)。

### 1.3.2.2 总多酚含量测定

采用 Folin-Ciocalteu 法<sup>[20]</sup>测定总多酚含量,精密吸取艾叶提取物 1 mL,依次加入 1 mL Folin-Ciocalteu 显色剂及 2 mL 12% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液,用水定容至 10 mL,室温避光反应 1 h 后,使用酶标仪测量 765 nm 处的吸光值,以没食子酸为标准品,在 0~0.015 mg/mL 浓度范围内,获得标准曲线方程:  $Y=38.681X+0.008$  ( $R^2=0.9991$ )。将结果换算为每克干基中所含的多酚相当于没食子酸的毫克数 (mg GAE/g DW)。

### 1.3.2.3 多糖含量测定

采用蒽酮-硫酸法<sup>[21]</sup>测定多糖含量,精密吸取艾叶提取物 1 mL,再加入 4 mL 0.2% 蒽酮硫酸溶液,沸水浴 10 min,冰水浴 5 min。使用酶标仪测量 585 nm 处的吸光值,以葡萄糖为标准品,在 0~0.1 mg/mL 浓度范围内,得到回归方程为:  $Y=1.6081X-0.0003$  ( $R^2=0.9993$ )。将结果换算为每克干基中所含的多糖相当于葡萄糖的毫克数 (mg DE/g DW)。

## 1.3.3 抗氧化能力测定

### 1.3.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

DPPH 自由基清除能力的测定参考周庆光等<sup>[22]</sup>、Chen 等<sup>[22]</sup>方法,稍作修改。精密吸取不同质量浓度的样品溶液 100 μL 于 96 孔板中,分别加入 0.2 mmol/L 的 DPPH-甲醇溶液 100 μL;避光反应 30 min,使用酶标仪测量 517 nm 处的吸光值。空白组以 100 μL 的去离子水代替样品溶液,本底组为甲醇,抗坏血酸 (Vc) 用作阳性对照。

$$\cdot\text{DPPH清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

$A_0$ ——空白管吸光度;

$A_s$ ——测定管吸光度;

$A_c$ ——测定管本底吸光度。

### 1.3.3.2 羟自由基清除能力的测定

羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 清除能力的测定参照文献<sup>[24]</sup>。精密吸取不同质量浓度的样品溶液 1 mL,依次加入 1 mL 9 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液、1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇

溶液、1 mL 9 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,于 37 °C 水浴 30 min 后,取出,精密吸取 200 μL 测定液于 96 孔板中,使用酶标仪测定 510 nm 处吸光值。空白组为去离子水代替样品溶液,本底用超纯水代替 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液。抗坏血酸 (Vc) 用作阳性对照。

$$\cdot\text{OH清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

$A_0$ ——空白管吸光度;

$A_s$ ——测定管吸光度;

$A_c$ ——测定管本底吸光度。

### 1.3.3.3 ABTS 自由基清除能力的测定

ABTS 自由基清除能力的测定参考文献<sup>[25]</sup>。将 7 mmol/L ABTS 溶液和 4.95 mmol/L 过硫酸钾溶液等体积混合,在室温下避光反应 14 h 后,用 PBS 溶液稀释至 OD<sub>734</sub> 为 0.70±0.02。精密吸取 50 μL 不同质量浓度的样品溶液于 96 孔板中,加入 200 μL ABTS-过硫酸钾溶液,混匀,室温反应 6 min;使用酶标仪测定 734 nm 处吸光值。抗坏血酸 (Vc) 用作阳性对照。

$$\text{ABTS}^+\cdot\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_c}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:

$A_0$ ——空白管吸光度;

$A_s$ ——测定管吸光度;

$A_c$ ——测定管本底吸光度。

## 1.3.4 抑菌活性的测定

### 1.3.4.1 菌悬液的制备

分别将金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、志贺氏菌 (*Syngassis*) 接种到 Luria-Bertani 培养基中,37 °C 摇床培养 12 h,用 Luria-Bertani 培养基稀释,使菌悬液浓度约为 1×10<sup>7</sup> CFU/mL,备用。

### 1.3.4.2 抑菌效果与最小抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 的测定

采用牛津杯法<sup>[26]</sup>对抑菌效果及 MIC 进行测定。在无菌环境中,向含有营养琼脂培养基的平皿中加入 100 μL 浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL 的菌悬液,涂抹均匀,每个平皿等距放 3 个牛津杯 (直径为 8 mm),每个牛津杯中加入 200 μL 不同质量浓度的样品溶液;以 pH 4.0 柠檬酸溶液为对照组,于 37 °C 培养 8~12 h 后,测量抑菌圈大小。

## 1.3.5 抑菌机制的测定

### 1.3.5.1 抑菌动力学的测定

将菌悬液与样品溶液的等体积混合,使样品溶液终浓度分别为 MIC、2×MIC,将混合物于 (37 °C、180

r/min) 下孵育 0、1、2、4、6、10、24 h。以 pH 4.0 柠檬酸溶液为对照组, 用酶标仪测量上清液的 OD<sub>600</sub> 值, 并根据吸光度值绘制曲线<sup>[27,28]</sup>。

### 1.3.5.2 细胞膜通透性的测定

将菌悬液与样品溶液的等体积混合, 使样品溶液终浓度为 MIC, 以 pH 4.0 柠檬酸溶液为对照组; 将混合物于 (37 °C、180 r/min) 下孵育 0、1、2、4、6 h。离心 (5000 g, 10 min) 取上清液; 使用钙离子试剂盒测量上清液的 OD<sub>610</sub> 值, 并根据吸光度值绘制曲线<sup>[29]</sup>。

### 1.3.5.3 菌体显微结构的观察

参照 Zhou 等<sup>[30]</sup>实验方法: 将菌悬液与样品溶液的等体积混合, 使样品溶液终浓度为 MIC, 对照组为 pH 4.0 柠檬酸溶液。将混合物于 (37 °C、180 r/min) 下孵育 8 h, 离心 (8000 g, 15 min), 收集细胞沉淀, 用 2.5%戊二醛溶液固定过夜, PBS 清洗 2 次, 再用梯度乙醇 (30%、70%、90%、100%) 脱水, 离心取沉淀, 加入 0.5 mL 无水乙醇溶液, 真空冷冻干燥后, 喷金处理, 扫描电镜观察。

### 1.3.5.4 菌体蛋白质合成的测定

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 测定蛋白含量<sup>[31,32]</sup>。将 1 mL 艾叶酸提取物与 1 mL 菌悬液等体积混合, 置于 (37 °C、180 r/min) 摇床中孵育 6 h, 对照组为 pH 4.0

的柠檬酸溶液; 离心取沉淀, PBS 重悬, 再加入 10 μL 5×蛋白 Loading Buffer, 沸水浴 5~10 min, 取出, 4 °C 保存, 备用。安装好电泳装置后, 每孔 3 μL 点样, 调电压至 80 V 开始电泳, 待溴酚蓝进入分离胶后 120 V 跑至胶底, 将胶块放置纯水中, 摇床脱色两次; 直到条带清晰后使用化学发光成像系统拍照记录结果。

## 1.4 数据处理与统计分析

采用 excel 统计软件进行数据分析, 所有实验均重复三次取其平均值; 采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析 ( $p < 0.05$  表示差异显著); 采用 Origin 9.0 软件对实验结果作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 总黄酮、总多酚及多糖含量

由表 1 可知, 艾叶酸提取物与艾叶水提取物中总黄酮、总多酚及多糖含量均具有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。艾叶酸提取物中总黄酮、总多酚和多糖含量分别是艾叶水提取物的 38.64%、49.14%、113.73%; 即艾叶酸提取物中总黄酮、总多酚含量均低于艾叶水提取物, 但多糖含量高于水提取物。李美萍<sup>[33]</sup>测得艾叶水提取物中总黄酮含量为  $12 \pm 2.52$  mg RE/g DW, 总多酚含量为  $40 \pm 1.53$  mg GAE/g DW, 本研究艾叶水提取物中总黄酮和总多酚含量比其高。

表 1 两种艾叶提取物的总黄酮、总多酚及多糖含量

Table 1 Contents of total flavonoids, total phenols and amylose of two *Artemisiae argyi* extracts

提取物	总黄酮含量/(mg RE/g DW)	总多酚含量/(mg GAE/g DW)	多糖含量/(mg DE/g DW)
艾叶酸提取物	80.39±0.25 <sup>b</sup>	25.44±0.55 <sup>b</sup>	453.45±2.50 <sup>a</sup>
艾叶水提取物	208.03±1.01 <sup>a</sup>	51.77±0.43 <sup>a</sup>	398.72±2.48 <sup>b</sup>

## 2.2 体外抗氧化能力

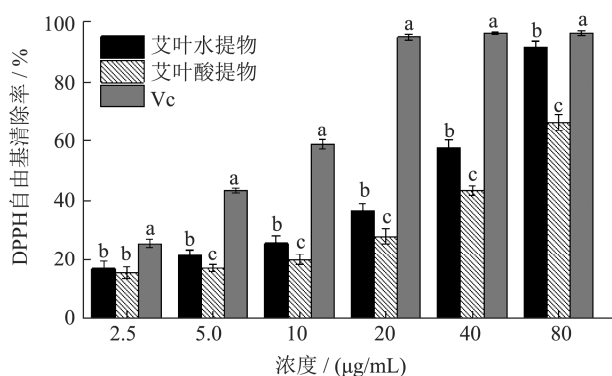


图 1 两种艾叶提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.1 DPPH radical scavenging ability of two *Artemisiae argyi* extracts

注: 不同小写字母表示样品间差异显著 ( $p < 0.05$ ), 下同。

### 2.2.1 DPPH 自由基清除能力分析结果

如图 1 所示, 在 2.5~80 μg/mL 质量浓度范围内, 两种艾叶提取物的 DPPH 自由基的清除能力随浓度的增加而增大。当浓度为 80 μg/mL 时, 艾叶水提取物、艾叶酸提取物和 Vc 对 DPPH 自由基清除率分别为 91.40%、66.05%和 96.28%, IC<sub>50</sub> 值分别为 33.10、54.52 和 6.25 μg/mL, 对 DPPH 自由基清除能力大小依次为: Vc > 艾叶水提取物 > 艾叶酸提取物。即艾叶水提取物对 DPPH 的清除效果强于艾叶酸提取物, 这可能与水提取物中含有更多的黄酮类及酚类化合物有关。

### 2.2.2 羟自由基清除能力分析结果

如图 2 所示, 在 0.08~5.12 mg/mL 的质量浓度范围内, 随着浓度的增大, 两种艾叶提取物对·OH 的清除能力也增大, 呈现出剂量依赖性。Liu 等<sup>[34]</sup>研究证实了样品浓度与抗氧化活性具有显著相关性。当浓度

为 0.64 mg/mL 时,艾叶水提取物和酸提取物的·OH 清除率分别为 18.37%和 29.24%,远小于 Vc 在 0.64 mg/mL 时的·OH 清除率 (99.83%,  $p<0.01$ )。艾叶水提取物、艾叶酸提取物和 Vc 的·OH 清除率 IC<sub>50</sub> 值分别为 2.92、1.63 和 0.19 mg/mL,对羟自由基清除能力大小依次为:Vc>艾叶酸提取物>艾叶水提取物。这可能与艾叶酸提取物中多糖含量较高有关,也可能是酸提取物中含有其他活性物质。

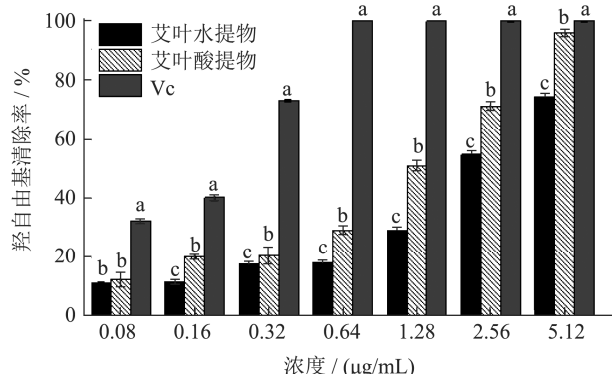


图2 两种艾叶提取物对羟自由基的清除能力

Fig.2 Hydroxyl radical scavenging ability of two *Artemisiae argyi* extracts

### 2.2.3 ABTS 自由基清除能力分析结果

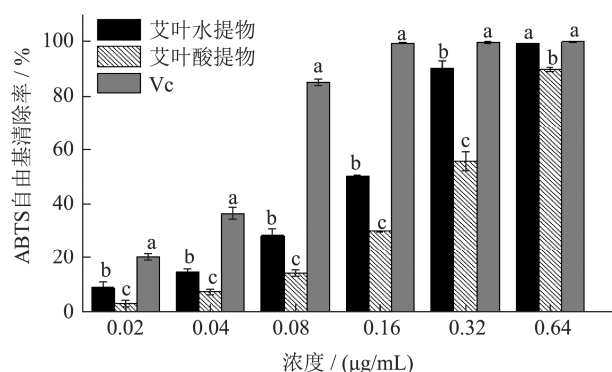


图3 两种艾叶提取物对 ABTS 自由基的清除能力

Fig.3 ABTS radical scavenging ability of two *Artemisiae argyi* extracts

如图3所示,在 0.08~5.12 mg/mL 的质量浓度范围内,两种艾叶提取物对 ABTS 自由基清除率随浓度增加而增大,当浓度为 0.32 mg/mL 时,艾叶水提取物、艾叶酸提取物和 Vc 的 ABTS 自由基清除率分别为 90.22%、55.91%和 99.71%;此浓度下,两种艾叶提取物对 ABTS 自由基的清除率差异显著 ( $p<0.01$ )。艾叶水提取物、艾叶酸提取物和 Vc 的 ABTS 自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.17、0.32 和 0.049 mg/mL,对 ABTS 自由基清除能力大小依次为:Vc>艾叶水提取物>艾叶酸提取物。这可能与水提取物中含有更多的黄酮类及酚类化合物有关,与上述两种艾叶提取物的 DPPH 自由基清除能力相同。

### 2.3 艾叶提取物的抑菌活性

由表2可知,两种艾叶提取物抑菌效果存在显著差异 ( $p<0.05$ ),艾叶水提取物对3种食源性致病菌无明显抑制作用,艾叶酸提取物对3种食源性致病菌有显著抑菌活性。

表2 艾叶提取物的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of inhibition zone of *Artemisiae argyi* extracts

供试致病菌	抑菌圈直径/mm		
	艾叶酸提取物	艾叶水提取物	阴性对照
金黄色葡萄球菌	18.47±0.15 <sup>a</sup>	-	-
沙门氏菌	15.11±0.11 <sup>c</sup>	-	-
志贺氏菌	16.19±0.17 <sup>b</sup>	-	-

注:“-”表示无抑菌圈。



图4 艾叶酸提取物的抑菌效果图

Fig.4 The antibacterial effect diagram of *Artemisiae argyi* acid extract

注: a: 金黄色葡萄球菌; b: 沙门氏菌; c: 志贺氏菌。

图5、6同。

如图4所示,艾叶酸提取物对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、沙门氏菌均有较强的抑制作用,且对照组无明显抑制作用;可能是酸提取物中含有特殊的活性成分,或者与酸提取物中多糖类物质含量较高有关。当浓度为 0.4 g/mL 时,艾叶酸提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 18.47 mm,对沙门氏菌的抑菌圈直径为 15.11 mm,抑菌效果为:金黄色葡萄球菌>志贺氏菌>沙门氏菌;表明艾叶酸提液对革兰氏阳性菌的抑菌效果强于革兰氏阴性菌;可能与革兰氏阴/阳性菌的细胞壁结构不同有关。甘昌胜等人<sup>[17]</sup>表明艾叶水提液抑菌效果一般;毛跟年等人<sup>[35]</sup>表明野艾蒿水相组分没有抑菌活性;与本研究结果一致。

### 2.4 艾叶酸提取物的抑菌机理

#### 2.4.1 艾叶酸提取物的最小抑菌浓度

基于两种艾叶提取物的抑菌效果,进一步探讨了艾叶酸提取物的最小抑菌浓度 (MIC) 及抑菌机制。由表3可知,艾叶酸提取物对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌的 MIC 均为 0.1 g/mL,对沙门氏菌的 MIC 为 0.2 g/mL,且抑菌效果随艾叶酸提取物浓度的增加而增加 ( $p<0.05$ )。Yuan 等<sup>[29]</sup>研究证明了抑菌效果与提取物

浓度呈正相关。

表3 艾叶酸提取物对细菌的最小抑菌浓度

Table 3 MIC of the *Artemisiae argyi* acid extract on bacteria

艾叶酸提取物 浓度/(g/mL)	供试致病菌抑菌圈直径/mm		
	金黄色葡萄球菌	志贺氏菌	沙门氏菌
0.1	10.12±0.12 <sup>c</sup>	8.51±0.18 <sup>c</sup>	-
0.2	13.28±0.08 <sup>b</sup>	12.08±0.08 <sup>b</sup>	11.49±0.09 <sup>b</sup>
0.4	18.47±0.15 <sup>a</sup>	16.19±0.17 <sup>a</sup>	15.11±0.11 <sup>a</sup>

注：“-”表示无抑菌圈。

### 2.4.2 艾叶酸提取物的抑菌动力学结果

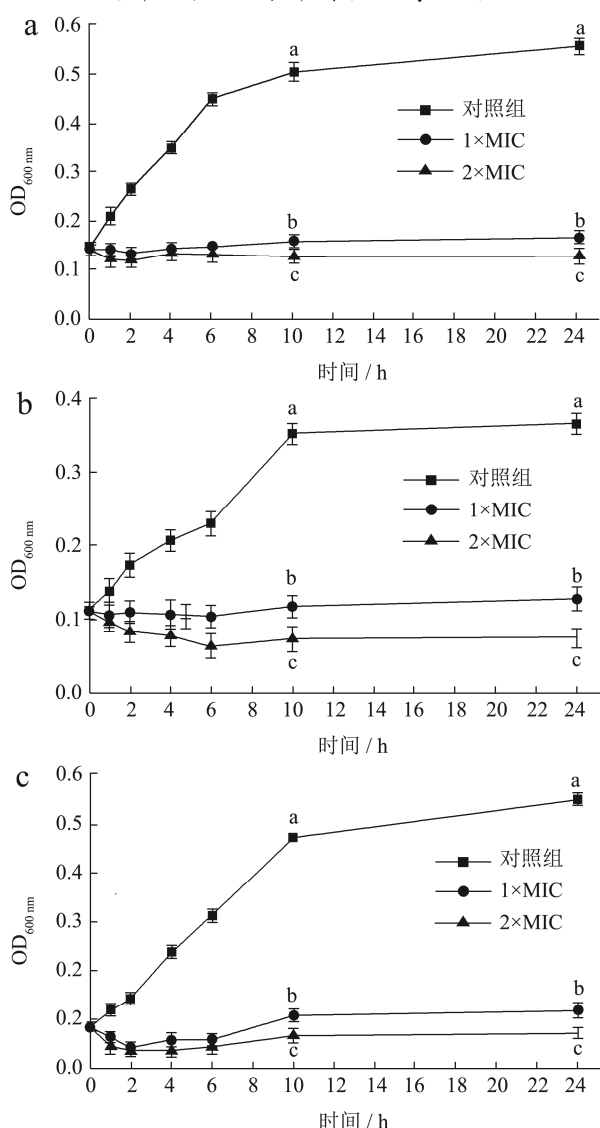


图5 艾叶酸提取物对细菌的抑菌动力学图

Fig.5 Antibacterial dynamics of *Artemisiae argyi* acid extract on bacteria

由图5可知,当艾叶酸提取物作用细菌24h后, MIC组、2×MIC组中3种细菌的OD<sub>600</sub>均小于对照组;与0h相比,3种细菌的OD<sub>600</sub>均无明显变化;表明MIC、2×MIC浓度的艾叶酸提取物都能有效抑制金黄色葡萄球菌、沙门氏菌及志贺氏菌的生长繁殖。艾叶酸

提取物浓度越大,抑制效果越好。

### 2.4.3 艾叶酸提取物对致病菌细胞膜通透性的影响

Ca<sup>2+</sup>是维持细菌细胞膜渗透压平衡的重要电解质,细胞膜被破坏,会导致细菌体内电介质的泄露,上清液中Ca<sup>2+</sup>含量变化可反映细菌细胞膜通透性的改变<sup>[29]</sup>。如图6所示,在0~6h范围内,随培养时间的增加,对照组中3种菌体上清液的OD<sub>610</sub>无明显变化( $p < 0.05$ ),表明菌体细胞内Ca<sup>2+</sup>含量保持稳定,而1×MIC组OD<sub>610</sub>有显著增大趋势,说明上清液中Ca<sup>2+</sup>含量增加,上述结果表明艾叶酸提取物对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌的细胞膜都造成了不同程度的破坏,使细胞膜原有的功能降低或者丧失,流动性降低,通透性增加,细胞内Ca<sup>2+</sup>等电解质泄露。Zhang等<sup>[29]</sup>研究证实了Ca<sup>2+</sup>的释放量与样品浓度呈正相关。

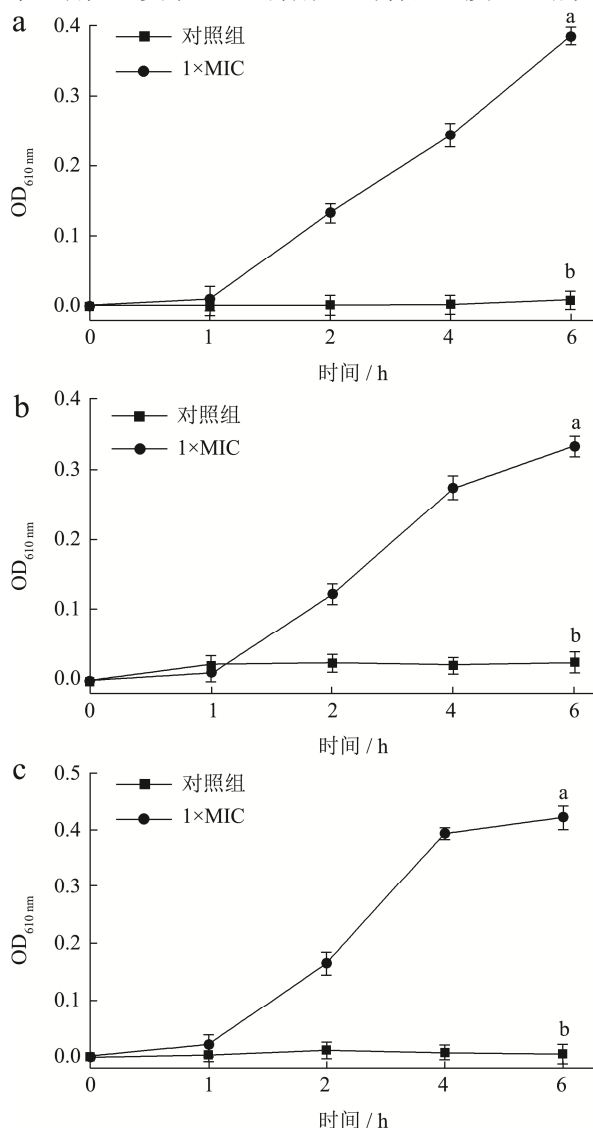


图6 艾叶酸提取物对细菌体内Ca<sup>2+</sup>含量的影响

Fig.6 The effect of *Artemisiae argyi* acid extract on the content of Ca<sup>2+</sup> in bacteria

#### 2.4.4 艾叶酸提取物对菌体细胞显微特征的影响

如图7所示,用艾叶酸提取物处理过的细菌细胞壁形态与对照组相比,差异显著。对照组中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌细胞形态完整,表面光滑,分散均匀,细胞壁界限清晰;MIC组中3种致病菌形态不完整,菌体断裂、破碎、残缺、大量内容物流出,由上述结果表明,艾叶酸提取物能对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌的细胞质膜和细胞壁产生严重影响。

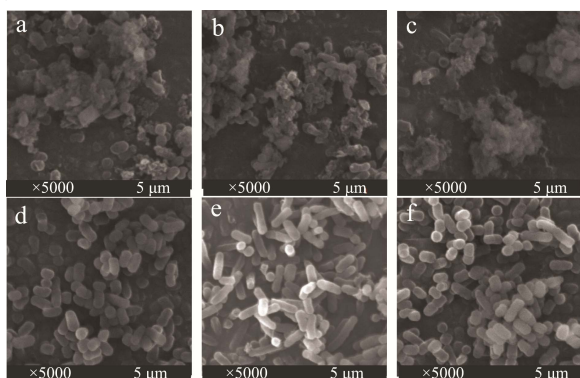


图7 经艾叶酸提取物处理后细菌的扫描电镜图

Fig.7 SEM of bacteria treated with *Artemisiae argyi* acid extract

注: a: 金葡+艾叶酸提取物 (MIC); d: 金葡对照组; b: 沙门+艾叶酸提取物 (MIC); e: 沙门对照组; c: 志贺+艾叶酸提取物 (MIC); f: 志贺对照组。

#### 2.4.5 艾叶酸提取物对致病菌细胞蛋白质合成的影响

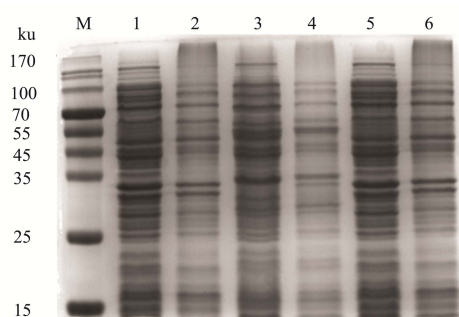


图8 艾叶酸提取物对细菌细胞蛋白质合成的影响

Fig.8 Effect of *Artemisiae argyi* acid extract on protein synthesis of bacterial cells

注: M: Marker; 1: 金葡对照组; 2: 金葡+艾叶酸提取物 (MIC); 3: 沙门对照组; 4: 沙门+艾叶酸提取物 (MIC); 5: 志贺对照组; 6: 志贺+艾叶酸提取物 (MIC)。

如图8所示,经艾叶酸提取物处理过的细菌蛋白质谱与对照组存在显著差异。对照组(1、3、5)蛋白质条带清晰明亮、灰度很深;经1×MIC艾叶酸提取物处理后的蛋白质条带(2、4、6)整体灰度明显变浅、模糊暗淡,表明蛋白质浓度降低;这可能是因为艾叶酸提取物对菌体内蛋白质的合成有抑制作用,也可能是因为

其抑制了细菌的生长繁殖,而导致蛋白质含量变少。Zhou等<sup>[30]</sup>利用SEM和SDS-PAGE证实了栎木的缬草和贝壳对细胞质膜的破坏性作用;与本研究的扫描电镜和凝胶电泳结果相似,表明细胞膜和细胞壁的完整性是影响细菌正常生长和代谢的重要因素。

### 3 结论

3.1 本研究表明艾叶水提取物和酸提取物的成分组成、体外抗氧化及抗菌作用存在差异,艾叶酸提取物更具有作为天然食品防腐剂和抗氧化剂的潜力。艾叶酸提取物中总黄酮、总多酚和多糖含量分别是艾叶水提取物的38.64%、49.14%和113.73%。艾叶水提取物和艾叶酸提取物均有较强抗氧化能力,对DPPH自由基清除率的 $IC_{50}$ 值分别为33.10和54.52  $\mu\text{g/mL}$ ;对羟自由基清除率的 $IC_{50}$ 值分别为2.92和1.63  $\text{mg/mL}$ ;对ABTS自由基清除率的 $IC_{50}$ 值分别为0.17和0.32  $\text{mg/mL}$ 。

3.2 艾叶水提取物无明显抑菌效果,而艾叶酸提取物具有显著抑菌作用,对金黄色葡萄球菌、志贺氏菌的MIC均为0.1  $\text{g/mL}$ ,对沙门氏菌的MIC为0.2  $\text{g/mL}$ ;抑菌效果为:金黄色葡萄球菌>志贺氏菌>沙门氏菌。抑菌机制研究表明:艾叶酸提取物可改变细胞膜的通透性,破坏细胞壁的完整性,抑制菌体蛋白质的合成,从而破坏菌体细胞结构,导致细菌不能正常生长繁殖。

3.3 本研究为提取艾叶活性成分开辟了新途径,克服了艾叶水提取物无明显抑菌效果的问题。后续我们将深入研究艾叶酸提取物中具体的有效成分,进一步分离纯化,并鉴定艾叶酸提取物中抗氧化及抗菌的活性物质,从而更深层次揭示酸提法对艾叶活性功能的影响,为进一步开发艾叶新型功能性产品提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 陶弘景,尚志钧.名医别录[M].北京:人民卫生出版社,1986: 155  
TAO Hong-jing, SHANG Zhi-jun. A Record of Famous Doctors [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986: 155
- [2] 张元,康利平,郭兰萍,等.艾叶的本草考证和应用研究进展[J].上海针灸杂志,2017,36(3):245-255  
ZHANG Yuan, KANG Li-ping, GUO Lan-ping, et al. Research progress in the textual research and application of *Artemisia argyi* materia medica [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2017, 36(3): 245-255
- [3] Culiță Sirbu, Oprea A. New records in the alien flora of Romania (*Artemisia argyi*, *A. lavandulaefolia*) and Europe (*A. lancea*) [J]. Turkish Journal of Botany, 2011, 35(6): 717-728

- [4] Jin R, Yu M M, Zhao B X, et al. Determination of the trace elements of *Artemisia argyi* from different origin by ICP-MS [J]. Globalize Traditional Chinese Medicine, 2011, 32(6): 117-114
- [5] Bao X L, Yuan H H, Wang C Z, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 1236-1243
- [6] Hajdú Zsuzsanna, Hohmann Judit, Forgo Peter, et al. Antiproliferative activity of *Artemisia asiatica* extract and its constituents on human tumor cell lines [J]. Planta Medica, 2014, 80(18): 1692-1697
- [7] Lv J L, Li Z Z, Zhang L B, et al. Two new flavonoids from *Artemisia argyi* with their anticoagulation activities [J]. Natural Product Research, 2018, 32(6): 632-639
- [8] Huang Huey-chun, Wang Hsiao-fen, Yi Kuang-hway, et al. Dual bioactivities of essential oil extracted from the leaves of *Artemisia argyi* as an antimelanogenic versus antioxidant agent and chemical composition analysis by GC/MS [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(11): 14679-14697
- [9] Wang S, Li J, Sun J, et al. NO inhibitory guaianolide-derived terpenoids from *Artemisia argyi* [J]. Fitoterapia, 2013, 85: 169-175
- [10] Lan M B, Zhang Y H, Zhang Y, et al. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from moxa (*Artemisia argyi*) leaf [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(6): 1463-1469
- [11] 吴朝霞,夏天爽,李琦,等.同时蒸馏法提取艾叶挥发油及其抑菌性研究[J].食品研究与发,2010,31(8):19-22  
WU Zhao-xia, XIA Tian-shuang, LI Qi, et al. Extraction of volatile oil from mugwort by simultaneous distillation and its antibacterial activity [J]. Food Research and Development, 2010, 31(8): 19-22
- [12] Kim Jong-han, Kim Hae-kyung, Jeon Sun-bok, et al. New sesquiterpene-monoterpene lactone, artemisolide, isolated from *Artemisia argyi* [J]. Tetrahedron Letters, 2002, 43(35): 6205-6208
- [13] 刘井波.抗菌药物从发现到耐药[J].中国医学前沿杂志, 2013,5(1):20-23  
LIU Jing-bo. Antibacterial drugs from discovery to resistance [J]. Chinese Journal of Medical Frontiers, 2013, 5(1): 20-23
- [14] 李婷,杨舒然,陈敏,等.姜厚朴水提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[J].现代食品科技,2016,32(2):84-92  
LI Ting, YANG Shu-ran, CHEN Min, et al. Study on the antibacterial mechanism of the aqueous extract of *Magnolia officinalis* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 84-92
- [15] 李婧雯,包怡红.不同溶剂的蒲公英根提取物的抗氧化活性及降糖能力比较分析[J].现代食品科技,2020,36(5):64-72  
LI Jing-wen, BAO Yi-hong. Comparative analysis of antioxidant activity and hypoglycemic ability of dandelion root extracts with different solvents [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 64-72
- [16] 王艺涵,吴琴,迟原龙,等.酸碱法和酶法辅助提取银耳粗多糖的特性研究[J].食品科技,2019,44(4):200-204  
WANG Yi-han, WU Qin, CHI Yuan-long, et al. Study on the characteristics of acid-base and enzymatic methods for extracting crude polysaccharides from *Tremella* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(4): 200-204
- [17] 甘昌胜,尹彬彬,张靖华,等.艾叶精油蒸馏制取对相应水提液活性成分的影响及其抑菌性能比较[J].食品与生物技术学报,2015,34(12):1327-1331  
GAN Chang-sheng, YIN Bin-bin, ZHANG Jing-hua, et al. The effect of the distillation of mugwort essential oil on the active ingredients of the corresponding water extracts and the comparison of their antibacterial properties [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2015, 34(12): 1327-1331
- [18] 李小姐,陈志坚,关强强,等.艾叶提取物对大肠杆菌抑菌活性的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2019,6:140-142,173  
LI Xiao-niu, CHEN Zhi-jian, GUAN Qiang-qiang, et al. Study on the antibacterial activity of wormwood extract against *Escherichia coli* [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 6: 140-142, 173
- [19] Andriyani R, Budiati T A, Pudjaraharti S. Effect of extraction method on total flavonoid, total phenolic content, antioxidant and anti-bacterial activity of *Zingiberis officinale* rhizome [J]. Procedia Chemistry, 2015, 16: 149-154
- [20] Dorman H J D, Peltoketo A, Hiltunen R, et al. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs [J]. Food Chemistry, 2003, 83(2): 255-262
- [21] 曾婷,周芳,汤嫣然,等.紫外-可见分光光度法测定多花黄精多糖含量[J].湖南中医杂志,2018,34(9):167-169  
ZENG Ting, ZHOU Fang, TANG Yan-ran, et al. Determination of *Polygonatum* polysaccharides content by ultraviolet-visible spectrophotometry [J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 34(9): 167-169



- [22] 周庆光,杨丽,何军伟,等.玉簪花中 1 个新黄酮苷类化合物及其抗氧化活性研究[J].中国中药杂志,2019,44(15):3312-3315  
ZHOU Qing-guang, YANG Lin, HE Jun-wei, et al. A new antioxidant flavonoid glycoside from flowers of *Hosta plantaginea* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(15): 3312-3315
- [23] Chen F, Huang G L. Extraction, derivatization and antioxidant activity of bitter melon polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141
- [24] Bi H T, Gao T T, Li Z H, et al. Structural elucidation and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from the fruit bodies of *Bulgaria inquinans* (Fries) [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1470-1475
- [25] Ma J S, Liu H, Han C R, et al. Extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Pouteria campechiana* seed [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 229: 115409
- [26] 柳成东,于晓东,王乙茹,等.凝结芽孢杆菌药敏实验的研究[J].饲料工业,2020,41(14):35-39  
LIU Cheng-dong, YU Xiao-dong, WANG Yi-ru, et al. Study on the drug sensitivity test of *Bacillus coagulans* [J]. Feed Industry, 2020, 41(14): 35-39
- [27] Ou P, Sun M, He X, et al. Sclareol protects *Staphylococcus aureus* - induced lung cell injury via inhibiting alpha-hemolysin expression [J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2016, 27(1): 19-25
- [28] Yuan Z W, Ou P, Gu K X, et al. The antibacterial mechanism of oridonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 710-716
- [29] Zhang Y T, Feng R Z, Li L X, et al. The antibacterial mechanism of terpinen-4-ol against *Streptococcus agalactiae* [J]. Current Microbiology, 2018, 75(9): 1214-1220
- [30] Zhou D, Liu Z H, Wang D M, et al. Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of valonia and shell from *Quercus variabilis* Blume (Fagaceae) against *Salmonella paratyphi* A and *Staphylococcus aureus* [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019, 19(1)
- [31] 宁亚维,苏丹,付浴男,等.抗菌肽 brevilaterin 与  $\epsilon$ -聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌的协同抑菌机理[J].食品科学,2020,41(5):15-22  
NING Ya-wei, SU Dan, FU Yu-nan, et al. Cooperative antibacterial mechanism of antimicrobial peptide brevilaterin and  $\epsilon$ -polylysine against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science, 2020, 41(5): 15-22
- [32] Ning H Q, Li Y Q, Tian Q W, et al. The apoptosis of *Staphylococcus aureus* induced by glycinin basic peptide through ROS oxidative stress response [J]. Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie, 2019, 99: 62-68
- [33] 李美萍,王微,张婕,等.艾叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用及对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用[J].现代食品科技,2019,35(1):22-30  
LI Mei-ping, WANG Wei, ZHANG Jie, et al. Inhibition of mugwort leaf extract on xanthine oxidase and uric acid-lowering effect on hyperuricemia mice [J]. Modern Food Technology, 2019, 35(1): 22-30
- [34] Liu J, Zhang J F, Lu J Z, et al. Astragalus polysaccharide stimulates glucose uptake in L6 myotubes through AM PK activation and AS160/TBC1D4 phosphorylation [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2013, 34(1): 137-145
- [35] 毛跟年,胡家欢,刘艺秀.野艾蒿提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制研究[J].食品科技,2019,44(5):242-247  
MAO Gen-nian, HU Jia-huan, LIU Yi-xiu. Study on the antibacterial mechanism of the extract of wormwood against *Staphylococcus aureus* [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(5): 242-247

---

(上接第 331 页)

- [8] Bao Y P, Wei T F, Lefebvre P A. Detection of protein analytes via nanoparticle-based bio-bar codes technology [J]. Anal Chem, 2006, 78(6): 2055-2059
- [9] Georganopoulou D G, Chang L, Nam J M, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(7): 2273-2276
- [10] Nam J M, Thaxton C S, Mirkin C A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins [J]. Science, 2003, 301(5641): 1884-1886