

杨国慧,范婷婷,陈效杰,等. 树莓叶果中水杨酸含量测定及其抑菌性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):181-183.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.051

树莓叶果中水杨酸含量测定及其抑菌性分析

杨国慧¹, 范婷婷¹, 陈效杰², 史影肖¹, 吕孟杰¹, 王昱文¹, 赵琚祺¹, 韩德果¹

(1. 东北农业大学园艺学院农业部东北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 黑龙江省农业职业技术学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要:为了解树莓叶、果中水杨酸含量变化及其抑菌性能,采用高效液相色谱法测定 6 个不同树莓品种不同生长期和不同成熟度果实中的水杨酸含量,并以现保存菌种番茄灰霉病菌和大肠杆菌为材料分析其真菌、细菌抑菌性。结果表明,夏果型品种结果枝叶片水杨酸含量最高期出现在 5 月末,秋果型品种则出现在 6 月末,最高含量分别为 2.032、2.157 mg/g;树莓果实成熟期水杨酸含量最高为 1.390 mg/g;树莓叶片和果实中水杨酸对番茄灰霉病菌和大肠杆菌的抑菌率最高分别为 35.83%、81.72%。树莓叶、果中水杨酸含量叶片高于果实,对大肠杆菌抑制效果强于番茄灰霉病菌的抑菌效果。

关键词:树莓;水杨酸含量;果实;叶片;抑菌性;高效液相色谱法

中图分类号: S663.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0181-03

树莓(*Rubus idaeus* L.)为近年寒地发展较快的一种特色小浆果果树,其叶中富含微量元素、没食子酸、水杨酸等具有保健功能的活性物质^[1]。果实属聚合小核果,有红色、金色、紫色、黑色,色泽艳丽、香气浓郁,并富含花青素、鞣花酸及具有减肥功能的树莓酮等多种生理活性物质,被誉为“黄金水果”“植物界阿司匹林”^[2-4]。水杨酸(salicylic acid,简称 SA)是植物体内产生的简单酚类化合物,作为精细有机合成中间体,可以用于香料、化妆品、防腐剂、配制动物性香精等^[5-8];同时水杨酸具有消炎、抗风湿、解热止痛的功效,对青霉、灰霉、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等多种菌类具有抑制作用,为化工医药工业的重要原料^[9-10]。现有资料报道,树莓叶片和果实中均含有丰富的水杨酸,含量可达 1.434 mg/g^[11-13]。但树莓不同品种之间、同一品种不同生长期叶片和不同成熟度果实中水杨酸含量存在多大差异,树莓叶片和果实中水杨酸抑菌性如何,尚未有报道。

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)目前被广泛用于检测食品和药品中的水杨酸含量。本研究以树莓的不同品种为材料,利用高效液相色谱法,测定其不同发育时期叶片、不同成熟期果实中水杨酸的含量,并利用实验室现保存菌种番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)分析其抑菌效果,探讨树莓叶、果中水杨酸的生理活性性能,为今后树莓叶、果的工业化利用提供依据。

收稿日期:2017-07-19

基金项目:黑龙江省应用技术与开发计划(编号:GC13B110);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(编号:12541044);黑龙江省高校科技成果转化前期研发项目(编号:1253CGZH31)。

作者简介:杨国慧(1969—),女,黑龙江伊春人,博士,教授,主要从事小浆果种质资源与栽培生理研究。E-mail:xiaoxixeb@163.com。

通信作者:韩德果,博士,副教授,主要从事果树逆境生理与分子生物学研究。E-mail:deguohan@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以黑龙江地区广泛种植的三年生树莓栽培品种为材料,采用夏果型品种:美 22(American Twenty-two)、DNS22、费尔杜德(Fertod Zamatos);秋果型品种:秋福(Autumn Bliss)、金秋(Fall Gold)、哈瑞太兹(Heritage)。于 2013 年 5、6、7、8、9 月末分别采集上述品种结果枝成熟叶片以及不同成熟期(绿果期、转白期、成熟期、过熟期)的果实,浇上液氮,-80℃保存备用^[14]。

1.2 方法

1.2.1 水杨酸的提取 水杨酸提取参照张卫等的方法^[15]。具体过程如下:取叶 1.0 g 或果 2.0 g,研磨匀浆,20 mL 90% 甲醇,10 000 r/min 离心 30 min,重复 2 次,合并上清液,旋转蒸干,15 mL 5% 三氯乙酸加 40 mL 体积比 1:1 乙酸乙酯:环己烷混合液萃取 2 次,合并下层水相,15 mL 8 mol/L HCl 密封,80℃恒温水浴 60 min,40 mL 体积比 1:1 乙酸乙酯:环己烷混合液萃取 2 次,合并上层有机相,旋转蒸干,30 mL 80% 色谱级甲酸溶解,20% (0.2 mol/L, pH 值为 5.5) 乙酸钠定容,0.45 μm 微孔过滤,滤液置于冰箱冷藏层保存。

1.2.2 水杨酸含量的测定 Waters2695 色谱仪,色谱柱型号依利特 SinoChrom C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 柱,流动相甲醇:乙酸钠(0.2 mol/L pH 值为 5.5) 体积比 6:4 混合液,进样 10 μL,流速 0.5 mL/min,紫外吸收波长 296 nm,水杨酸标样来自坛墨质检标准物质中心,甲醇(色谱级)来自生工生物工程(上海)股份有限公司。

水杨酸的计算公式:

$$\text{叶片 } y = 30x/1\ 000; \text{果实 } y = 30x/2\ 000。$$

式中: x 表示水杨酸浓度,μg/mL; y 表示水杨酸含量,mg/g。

1.2.3 水杨酸抑菌性分析 使用实验室现保存菌种,真菌为番茄灰霉病菌,细菌为大肠杆菌。真菌抑菌性分析采用十字交叉法,PDA 培养基培养,将 6 mm 菌饼接入 60% 水杨酸提取

液抑菌平板的中央,26℃恒温培养,5 d 后调查菌落直径;细菌抑菌性分析采用菌落计数法,将供试菌种接种到 LB 液体培养基中,置于摇床中于 30℃培养 48 h,稀释 10^7 后吸取 200 μ L 涂抹到制成的抑菌平板上,48 h 后进行菌落记数。上述试验均以加入 60% 甲醇的平板为对照,每个处理 3 次重复。

真菌抑菌率 $SA = [(A_0 - 6) - (A_1 - 6)/(A_0 - 6)] \times 100\%$;细菌抑菌率 $SA = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100\%$ 。

式中: A_0 为空白对照(60% 甲醇流动相)真菌菌落直径(mm)或细菌菌落数; A_1 为加入水杨酸提取液的真菌菌落直径(mm)或细菌菌落数。

1.3 数据分析

采用 SPSS 与 Excel 分析数据。

2 结果与分析

2.1 树莓结果枝叶片不同时期水杨酸含量变化

美 22、DNS22、费尔杜德属夏果型品种,结果后结果枝叶片易干枯脱落,因此美 22、DNS22 在 9 月末未采集到叶片,而费尔杜德 8 月末就没有采集到叶片。由图 1 可见,夏果型树

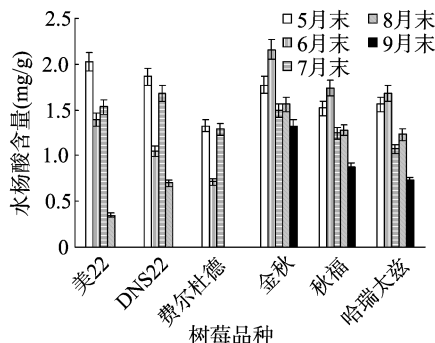


图1 不同生长季节结果枝叶片水杨酸含量

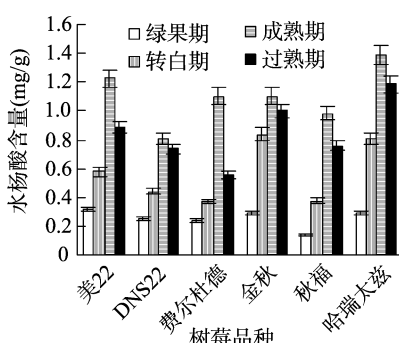


图2 不同成熟期果实水杨酸含量

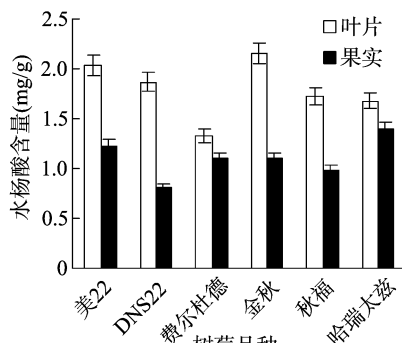


图3 树莓品种叶片和果实水杨酸含量

2.4 树莓水杨酸提取液的抑菌能力

6 个树莓品种不同月份叶片和不同发育时期果实水杨酸提取液对番茄灰霉病菌和大肠杆菌均有一定的抑制作用,其中 DNS22 在 5 月末的叶片和哈瑞太兹在绿果期的果实中水杨酸提取液对番茄灰霉病抑菌率最高,抑菌率分别为 25.89%、35.83% (图 4、图 5);金秋在 8 月末的叶片和转白期的果实中水杨酸提取液对大肠杆菌抑菌率最高,抑菌率分别为 81.72%、78.38% (图 6、图 7)。但不同品种、不同生长发育时期的果实和叶片水杨酸提取液对番茄灰霉病菌和大肠杆菌的抑制能力没有和其水杨酸含量表现出一致的相关关系。

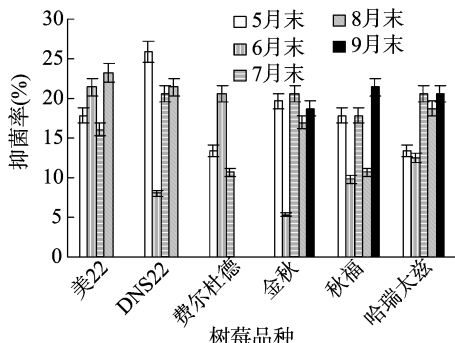


图4 树莓叶片水杨酸提取液对番茄灰霉病菌抑制能力

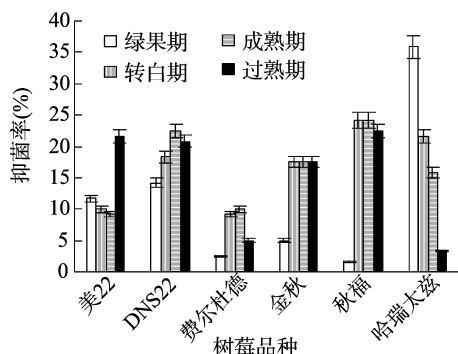


图5 树莓果实水杨酸提取液对番茄灰霉病菌抑制能力

3 结论与讨论

试验中采用 HPLC 法测定树莓叶片水杨酸含量在 0.350 ~ 2.157 mg/g 之间,果实中水杨酸含量为 0.142 ~ 1.390 mg/g,且叶片中水杨酸含量高于果实中。年四辉等测得不同厂家板蓝根药材中的水杨酸含量,最高为 0.131 4 mg/g^[16];黄智鸿等测得不同时期榆钱中总水杨酸的含量最高为 0.176 mg/g^[17];刘绍欢等测得不同地区透骨香中水杨酸最高含量为 0.205 mg/g^[18]。和其他植物种类相比,树莓中的水杨酸含量

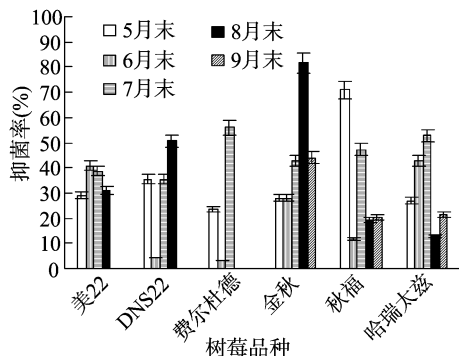


图6 树莓叶片水杨酸提取液对大肠杆菌抑制能力

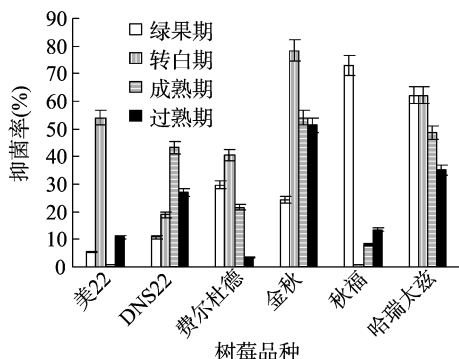


图7 树莓果实水杨酸提取液对大肠杆菌抑制能力

较高,尤其是树莓叶片。

本研究结果中不同类型树莓品种结果枝叶片中水杨酸含量高峰值出现时间不同:夏果型水杨酸5月含量最高,而秋果型品种水杨酸含量6月达到最大,这可能和不同类型品种的生长特性以及生产中采用的栽培措施有关。夏果型品种结果枝为二年生枝条,其上叶片萌发早,所以叶片水杨酸含量高峰期出现也早一些。果实成熟采摘后,结果枝上的叶片逐渐衰老、水杨酸含量显著降低;秋果型品种一年生枝条为主要结果枝,春季萌芽前进行平茬,叶片萌发较晚,水杨酸含量的高峰值出现时间也晚一些。严涵薇等采用 HPLC 法测定了 5 种玉米自交系玉米种水杨酸含量,显示自交系间水杨酸含量大致相同,在 $1.36 \sim 1.51 \mu\text{g/g}$ 之间^[19]。可能玉米中水杨酸仅作为一种调节因子,微量即可调节植物生长。试验中同时测定了 3 种颜色不同果实(红树莓:费尔杜德、秋福、哈瑞太兹;黄树莓:DNS22、金秋;紫树莓美 22),发现水杨酸含量和果实色泽关系不大,主要和果实成熟度有关,成熟期果实含量最高。

水杨酸对真菌、细菌等具有一定的抑制作用。申晓慧等研究了水杨酸细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌的抑制作用,对 3 种菌抑制效果均表现明显,且抑菌效果随水杨酸浓度的增加而增强^[20]。郑国兴等测得水杨酸对白色假丝酵母(*Canidia albicans*)、黑曲霉(*Aspergillus nige*)的抑菌率可分别达到 75%、60%^[21]。本研究结果显示,树莓叶片、果实提取液对真菌、细菌均有一定的抗性,最高分别达到 35.83%、81.72%,对大肠杆菌抑制效果强于对番茄灰霉病菌的抑菌性。水杨酸

HPLC 法测定分析与抑菌性试验表明,树莓水杨酸含量丰富,且叶片含量高于果实,6 个树莓品种中,哈瑞太兹绿果期果实和金秋 8 月末叶片提取水杨酸抑菌性较高,可以作为医药工业的理想原材料。

参考文献:

- [1] 宣景宏,孟宪军,刘春菊,等. 树莓的主要功效成分及开发利用前景[J]. 中国果业信息,2007,24(1):26-28.
- [2] Kim M J, Sutton K L, Harris G K. Raspberries and related fruits[J]. Reference Module in Food Science, 2016:586-591.
- [3] 黎庆涛,王远辉,王 丽. 树莓功能因子研究进展[J]. 中国食品添加剂,2011(2):172-177.
- [4] Kumari P, Barman K, Patel V B, et al. Reducing postharvest pericarp browning and preserving health promoting compounds of litchi fruit by combination treatment of salicylic acid and chitosan[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 197(14):555-563.
- [5] 刘洪蛟,雷 鸣,胡艳丽,等. HPLC 法测定链荚豆根中水杨酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(5):356-358.
- [6] 薛 峰,林毅侃,马跃龙,等. 食品中水杨酸含量测定方法的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(14):429-431.
- [7] 董风强,周国俊,蒋 健,等. 高效液相色谱法测定香香料中的水杨酸[J]. 广州化工,2009,37(4):139-140.
- [8] 季丹丹,刘艳红,祝 钧. 化妆品用水杨酸酯类衍生物的制备及应用进展[J]. 日用化学工业,2015,45(11):648-652.
- [9] 王若兰,杨 超,赵 妍,等. 水杨酸处理对草莓采后品质及灰霉病害的影响[J]. 河南工业大学学报,2013,34(5):24-28.
- [10] 葛 瞰,杨双双,陈全战,等. 金属-水杨酸及其衍生物的配合物的合成及抗真菌性能[J]. 生物学通报,2013,48(6):50-54.
- [11] Mullen W, Yokota T, Lean M E J, et al. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ[J]. Phytochemistry, 2003, 64(2):617-624.
- [12] 杜龙飞,李 洁,杨 龙,等. 覆盆子的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26:1957-1960.
- [13] 赵伟伟,李爱民,张 正,等. 海蓬藜悬钩子水杨酸提取工艺及含量变化研究[J]. 北方园艺,2014(16):127-130.
- [14] 葛秋来. 树莓果实成熟软化机理的初步研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [15] 张 卫,孙国新,徐玉新,等. 植物体内水杨酸分析方法的探讨及其应用[J]. 生态毒理学报,2009,4(6):889-897.
- [16] 年四辉,李 萍,刘丽敏,等. HPLC 测定板蓝根及其制剂中水杨酸、苯甲酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):92-95.
- [17] 黄智鸿,史宝林,高宝嘉. HPLC 测定榆钱中水杨酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):112-114.
- [18] 刘绍斌,梁光平,漆珍珍,等. 不同产地透骨香叶挥发油中水杨酸甲酯的含量测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(30):18498-18500.
- [19] 严涵薇,朱苏文,江海洋. HPLC 法分析玉米自交系水杨酸含量[J]. 安徽农业科学,2010,38(22):11710-11711,11718.
- [20] 申晓慧,姜 成. 水杨酸对食品中常见污染细菌的抑制作用研究[J]. 中国农学通报,2009,25(9):55-57.
- [21] 郑国兴,张春乐,黄 浩,等. 水杨酸的抑酶与抑菌作用[J]. 厦门大学学报,2006,45(5):19-22.