

山茱萸抑菌活性成分提取分离与检测

赵淑艳^a,呼世斌^a,吴焕利^b,唐艳^a,刘娟^a

(西北农林科技大学 a 理学院, b 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了确定山茱萸的抑菌活性成分,以几种常见的食品微生物为供试菌种,采用生物活性追踪法对山茱萸抑菌活性成分进行了初步分离与鉴定。结果表明,山茱萸体积分数70%乙醇粗提液和乙酸乙酯萃取物对供试细菌、霉菌均有较好的抑菌活性,对酵母菌的抑菌活性不明显;利用大孔吸附树脂柱层析和薄层层析对抑菌活性较强的乙酸乙酯组分进一步分离,得到2个活性组分,经化学定性检识,初步判定山茱萸抑菌活性成分为酚酸类化合物。

[关键词] 山茱萸;抑菌活性;分离检测;有效成分;食品防腐剂

[中图分类号] R284.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0223-04

Studies on extraction and isolation of bacteriostatic active composition from Fructus Corui

ZHAO Shu-yan^a, HU Shi-bin^a, WU Huan-li^b, TANG Yan^a, LIU Juan^a

(a College of Science, b College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: To study the antibacterial activity of extracts from Fructus Corui, antimicrobial activities of Fructus Corui extracts with ethanol against food spoilage were tested in this paper. Its functional compositions were preliminarily identified. The result showed that the ethyl acetate extract of Fructus Corui extracted by 70% ethanol showed stronger antifungal activities against bacteria and mold, but insidiously against yeast; two fractions were researched after separation by macroporous adsorption resin and silica-gel thin layer chromatograph, and the chemically identified results showed that the bacteriostatic active eluates were composed of phenolic acid.

Key words: Fructus Corui; bacteriostatic activity; extract and isolate; effective components; food preservative

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,于秋末冬初果皮变红时采收,用文火烘或置沸水中略烫后及时除去果核,干燥而得。山茱萸的化学成分主要为挥发性成分、糖苷类、鞣质、有机酸等,具有补益肝肾,涩精敛汗,固虚脱之功能^[1-2]。山茱萸主要以果肉直接入药,用途比较单一。已经上市的产品无论是数量还是品种都不能满足国内外市场的需求^[2-5]。目前,国

内外对山茱萸的研究主要集中在药效成分的提取及纯化方面,而对其抑菌活性成分的研究鲜有详细报道^[6]。由于化学合成防腐剂的安全性问题,人们越来越注重天然防腐剂的研究^[7-8]。因此,本试验以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等9种常见的食品微生物为供试菌种,采用生物活性追踪法对山茱萸抑菌活性成分进行了初步分离与鉴定,旨在为山茱萸的综合利用及新型安全天然食品防腐剂的研究提供依据。

†收稿日期] 2006-07-21

[作者简介] 赵淑艳(1981-),女,黑龙江齐齐哈尔人,在读硕士,主要从事资源清洁利用研究。E-mail: bessie20052005@163.com

[通讯作者] 呼世斌(1955-),男,陕西延安人,教授,博士生导师,主要从事资源清洁利用研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 山茱萸采自陕西武功县当年产的新鲜山茱萸果实,选择干净、无霉烂的去核干果肉,破碎备用。

1.1.2 供试菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、桔青霉(*Penicillium citrinum*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、假丝酵母(*Candida sp.*),均由西北农林科技大学生命科学学院微生物实验室提供。

1.1.3 试剂 大孔吸附树脂(D101),上海摩速科学器材有限公司;硅胶(GF254),青岛海洋化工有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基和查氏培养基;制备无菌试管斜面、平板备用^[9]。

1.1.5 仪器设备 DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、R-200 型旋转蒸发仪、LDZX-40AI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器、CO₂ 恒温培养箱、超净工作台、721 分光光度计。

1.2 方法

1.2.1 山茱萸粗提液的制备 称取山茱萸干样品 8 份,每份 10 g,分别加入 50 mL 石油醚、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇、体积分数 95% 和 70% 乙醇、蒸馏水、50 g/L 氢氧化钠回流提取 2 h,抽滤,合并滤液,并将 50 g/L 氢氧化钠提取液用 5% HCl 溶液调至中性,各提取液均定容至 25 mL,备用。

1.2.2 山茱萸浸膏的制备 称取山茱萸干样品 500 g,加入 2 500 mL 体积分数 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h。抽滤,合并滤液,在 45 ℃ 下减压浓缩得到黑红色膏状物,然后加入 5 倍量的蒸馏水以除去水不溶性杂质,抽滤,滤液在 45 ℃ 下减压浓缩得到黑红色膏状物。

1.2.3 山茱萸不同溶剂粗提物的抑菌活性^[10] 将供试菌种接于无菌试管斜面,在 37 ℃ 培养 24 h,重复 2 次活化菌种。取 0.1 mL 菌悬液置于培养基平板上, L 型玻棒涂布均匀。将 6 mm 无菌滤纸片置于山茱萸不同溶剂粗提液中浸湿,取出挥干溶剂,等距离平铺于含菌培养皿中,在适宜温度下培养一定时间(细菌 37 ℃、12 h,霉菌 28 ℃、48 h,酵母菌 28 ℃、24 h)后,测定抑菌圈直径。

1.2.4 山茱萸不同溶剂萃取物的抑菌活性^[11] 将山茱萸浸膏用蒸馏水悬浮,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,均萃取至有机溶剂层澄清无色为止,浓缩合并提取液得石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取物,分别测定 4 种萃取物对供试菌种的抑菌活性,方法同 1.2.3。

1.2.5 山茱萸柱层析洗脱液的抑菌活性 对抑菌活性较好的乙酸乙酯萃取物进行进一步分离,利用大孔吸附树脂,分别以水、体积分数 30%、50%、70% 和 90% 乙醇洗脱,收集洗脱液,测定不同洗脱液对金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌和米曲霉的抑菌活性,方法同 1.2.3。

1.2.6 山茱萸抑菌活性部分的薄层层析 将山茱萸大孔吸附树脂水洗部分用甲醇溶解,在硅胶板上点样后用展开剂(环己烷 氯仿 乙酸乙酯 甲酸 体积比为 10 4 30 1.3)展开,于室温下将溶剂自然挥发至干,待检。参照刘欣等^[12]的方法,在无菌条件下将制备好的金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌和米曲霉菌悬液($10^6 \sim 10^7$ mL⁻¹)各 0.1 mL 分别加入到 100 mL 牛肉膏蛋白胨培养基和查氏培养基中,摇匀后倾注平皿,每个培养皿倒入培养基约 30 mL。待培养基凝固后将已层析完并挥去展开剂的硅胶板贴于培养基上,盖好平皿,静置一段时间使抑菌活性物质扩散到培养基中,然后将硅胶板轻轻揭下,平皿置于培养箱中(细菌 37 ℃、24 h,霉菌 28 ℃、48 h)培养。在培养后的平皿中加入 1% 碱性品红溶液(刚好布满培养基表面即可),染色 2 min,倒掉碱性品红溶液,用蒸馏水冲洗至洗出液无色为止。拍照,取滤纸(剪成相应形状)放于培养基表面摊平(注意不能留有气泡),待充分接触后取出滤纸,则滤纸上印有抑菌圈,晾干,用透明纸拓印下抑菌斑,描绘成图。

1.2.7 化学定性检识^[13] 薄层层析组分采用文献[12]的方法,用盐酸+镁粉、溴甲酚绿溶液和三氯化铁-铁氰化钾溶液进行化学定性检识,为其进一步分离纯化研究提供依据。

2 结果与分析

2.1 山茱萸不同溶剂粗提液的抑菌活性

由表 1 可以看出,山茱萸石油醚、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇、体积分数 95% 和 70% 乙醇、蒸馏水、50 g/L 氢氧化钠粗提液对各种供试菌种的抑菌活性不同,其中石油醚、50 g/L 氢氧化钠粗提液对所有供试菌种均无抑菌活性;乙酸乙酯粗提物对杆菌和桔青霉

均表现出抑菌活性;丙酮粗提物对金黄色葡萄球菌、杆菌、米曲霉均有抑菌活性,对啤酒酵母的抑菌活性不明显;正丁醇、体积分数 95 %乙醇粗提液对所供试细菌均有抑菌活性,而对真菌无抑菌活性;体积分

数 70 %乙醇粗提液对所有供试菌种均有抑菌活性,但对酵母菌的抑菌活性不明显;除酵母菌外蒸馏水粗提液对其他菌种均有抑菌活性。以上结果表明,体积分数 70 %乙醇粗提液具有较好的抑菌活性。

表 1 山茱萸不同溶剂粗提液的抑菌活性

Table 1 Bacteriostatic activities of Fructus Corui extracted by different solvents

菌种 Microbial strains	抑菌圈直径/ mm Bacteriostatic zone diameter							蒸馏水 Distilled water	50 g/L NaOH
	石油醚 Ligroin	乙酸乙酯 Ethyl acetate	丙酮 Acetone	正丁醇 N-butyl alcohol	体积分数 95 %乙醇 95 % ethanol	体积分数 70 %乙醇 70 % ethanol	50 g/L NaOH		
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	18.25	12.45	13.50	20.03	11.12	-	
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	12.21	15.34	13.23	12.41	28.31	15.32	-	
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	14.32	14.86	11.47	12.30	30.06	15.47	-	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	14.25	12.52	10.42	10.12	22.60	13.18	-	
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	-	14.50	14.31	11.25	12.36	17.47	12.06	-	
桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i>	-	8.24	-	-	-	23.56	10.01	-	
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	12.20	-	-	11.60	9.07	-	
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	*	-	-	*	-	-	
假丝酵母 <i>Candida sp.</i>	-	-	-	-	-	*	-	-	

注:“-”表示无抑菌活性;“*”表示抑菌圈不明显。表 2 和 3 同。

Note:“-”stands for without bacteriostatic activities;“*”stands for insidious bacteriostatic diameter. The same as table 2 and 3.

2.2 山茱萸不同溶剂萃取物的抑菌活性

表 2 结果表明,山茱萸不同溶剂萃取物对供试菌种的抑菌活性不同,其中石油醚萃取物无抑菌活性;氯仿萃取物仅对枯草芽孢杆菌、桔青霉有抑菌活性;乙酸乙酯萃取物对所有供试菌种均有抑菌活性,

但对酵母菌抑菌活性不明显;正丁醇萃取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌和米曲霉均有抑菌活性;萃取后剩余水相中仍然含有抑菌活性成分,与正丁醇萃取物相似。

表 2 山茱萸不同溶剂萃取物的抑菌活性

Table 2 Bacteriostatic activities of Fructus Corui extracted by different organic solvents

菌种 Microbial strains	抑菌圈直径/ mm Bacteriostatic zone diameter					萃取后剩余水相 Water phase
	石油醚 Ligroin	氯仿 Chloroform phase	乙酸乙酯 Ethyl acetate phase	正丁醇 N-butyl alcohol phase	50 g/L NaOH	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	31.21	10.21	12.06	
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	8.10	32.45	10.32	11.23	
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	31.40	12.46	12.10	
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-	38.20	9.12	10.34	
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	-	-	35.14	-	-	
桔青霉 <i>Penicillium citrinum</i>	-	10.32	36.17	-	-	
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	30.25	11.54	15.20	
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	*	-	-	
假丝酵母 <i>Candida sp.</i>	-	-	*	-	-	

2.3 山茱萸乙酸乙酯萃取物柱层析洗脱液的抑菌活性

表 3 结果表明,大孔吸附树脂水洗脱液对金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌和米曲霉均有抑菌活

性,体积分数 30%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌和苏云金芽孢杆菌均有抑菌活性,说明其中可能含有少量的抑菌成分,而体积分数 50%、70%、90%乙醇洗脱液均无抑菌活性。

表 3 山茱萸乙酸乙酯萃取物柱层析洗脱液的抑菌活性

Table 3 Bacteriostatic activities of each eluate from the ethyl acetate extract of Fructus Corui

菌种 Microbial strains	抑菌圈直径/mm Bacteriostatic zone diameter				
	水 Water	体积分数 30%乙醇 30% ethanol	体积分数 50%乙醇 50% ethanol	体积分数 70%乙醇 70% ethanol	体积分数 90%乙醇 90% ethanol
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	35.17	14.25	-	-	-
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	33.05	18.32	-	-	-
米曲霉 <i>Aspergillus oryzae</i>	16.47	-	-	-	-

2.4 山茱萸抑菌活性成分薄层层析结果

将山茱萸大孔树脂水洗脱液经薄层层析,生物自显影和染色后,得到 1、2 和 3 个组分,其中组分 1 对金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌和米曲霉均无抑菌活性,组分 2 和 3 对金黄色葡萄球菌和苏云金芽孢杆菌有较好的抑菌活性,组分 1 对米曲霉有较强的抑菌活性(图 1)。

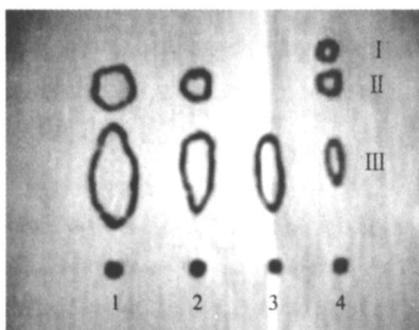


图 1 山茱萸抑菌活性成分生物自显影结果

1. 金黄色葡萄球菌; 2. 苏云金芽孢杆菌; 3. 米曲霉; 4. 薄层层析谱;

1、2、3 分别代表薄层层析的 3 个组分

Fig. 1 Bioautography of effective fractions

1. *Staphylococcus aureus*; 2. *Bacillus thuringiensis*;

3. *Aspergillus oryzae*; 4. Chromatogram of TLC; 1, 2, 3,

respectively represent three constituents of TLC

2.5 山茱萸抑菌活性成分化学检识结果

用不同试剂分别对组分 1、2 和 3 进行化学检识,结果见表 4。表 4 表明,组分 1 的盐酸 + 镁粉反应为阳性,表明组分 1 为黄酮类化合物;组分 2 和 3 遇溴甲酚绿溶液显黄色,说明组分 2、3 为羧酸类化合物,遇三氯化铁-铁氰化钾溶液显蓝色,示有酚羟基,说明 2、3 两个有效成分均为酚酸类化合物。

表 4 山茱萸抑菌活性成分化学检识结果

Table 4 Chemically identified results of bacteriostatic active fractions

组分 Fractions	盐酸 + 镁粉 Hydrochloric acid + magnesium	溴甲酚绿溶液 Bromocresol green	三氯化铁-铁氰化钾溶液 Ferric chloride-potassium ferricyanide
1	粉红色 Pink	-	蓝色 Bluness
2	-	黄色 Yellowness	蓝色 Bluness
3	-	黄色 Yellowness	蓝色 Bluness

注:“-”表示无明显反应。

Note:“-”stands for insidious chemical reaction.

3 结 论

本研究结果表明,山茱萸体积分数 70%乙醇粗提液和乙酸乙酯萃取物对供试细菌、霉菌均有较好的抑菌活性,对酵母菌的抑制活性不明显;对抑菌活性较强的乙酸乙酯部分利用大孔吸附树脂和薄层层析分离得到 2 个抑菌组分,经化学试剂检识为酚酸类化合物。作为中草药研究开发的基础,有效单体成分的研究具有重要的科研价值。尽管有关山茱萸抑菌成分的报道已有不少,但具体分离抑菌活性成分的研究尚未见报道。本试验初步得到了山茱萸 2 个有抑菌活性的组分,为山茱萸药用价值的进一步开发利用提供了新的参考资料,但有关其抑菌有效成分的纯化与结构鉴定还有待进一步深入研究。

(下转第 231 页)

- ment of heteroatoms[J]. J Pharm Sci, 1976, 65 (12): 1806-1809.
- [3] Seybold P G, May M, Bagal U A. Molecular structure-property relationships[J]. J Chem Educ, 1987, 64(7): 575-581.
- [4] 许 禄. 化学计量学方法[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 309-311.
- [5] 王连生, 韩朝暎. 分子结构、性质与活性[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997: 340-347.
- [6] 冯长君, 沐来龙. 边价连接性指数及其应用[J]. 化学通报, 2003, 66(2): 125-133.
- [7] 蒋玉仁, 刘志国, 刘景亚, 等. 一个新的分子拓扑指数[J]. 物理化学学报, 2003, 19(3): 198-202.
- [8] 杨 锋, 王振东, 周培疆, 等. 分子连接性指数的新定义[J]. 化学学报, 2003, 61(4): 481-486.
- [9] 张玉林, 郭满才. 烷基苯标准生成焓与分子价连接性指数 mX^* 的关系[J]. 化学通报, 2003, 66(4): 281-286.
- [10] 张玉林, 高锦明, 郭满才. 分子连接性指数 mX^* 与不饱和链烃沸点的定量关系研究[J]. 有机化学, 2003, 23(9): 1039-1048.
- [11] 杨道武, 余训民. 新定义的价格连接性指数与有机物理化活性的相关性研究[J]. 有机化学, 2004, 24(5): 525-536.
- [12] 堵锡华. 结构信息连接性指数用于取代芳烃生物毒性与性质的研究[J]. 化学通报, 2005, 68(3): w032.
- [13] 张玉林. 一个新的分子连接性指数(mZ^b)用于取代芳烃的定量构效关系研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 109-115.
- [14] 张玉林, 张 巍. 卤代苯的沸点与分子结构的定量关系[J]. 有机化学, 2004, 24(增刊): 303.
- [15] Weast R C. CRC handbook of chemistry and physics[M]. 63rd ed. Boca Raton Florida: CRC Press Inc. 1982-1983: c-130-c-141.

(上接第 226 页)

[参考文献]

- [1] 张兰桐, 袁志芳, 杜英峰, 等. 山茱萸的研究近况及开发前景[J]. 中草药, 2004, 35(8): 952-955.
- [2] 刘 洪, 许惠琴. 山茱萸及其主要成分的药理学研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(4): 254-255.
- [3] 周京华, 李春生, 李电东. 山茱萸活性成分的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11): 808-812.
- [4] 王勇亮. 山茱萸保健功能及其加工技术研究现状[J]. 食品工程, 2006(1): 10-13.
- [5] 呼世斌, 冯贵颖, 曹社会. 山茱萸的营养成分及保健作用[J]. 西北农业大学学报, 1996, 24(6): 108-110.
- [6] 胡青平, 徐建国, 朱志敏, 等. 山茱萸总皂甙的抑菌作用研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 162-164.
- [7] 王 燕, 车振明. 食品防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(5): 167-169.
- [8] Galal M, Bashir A K, Salih A M, et al. Activity of water extracts of *Albizia anthelmintica* and *A. lebbek* backs against experimental *Hymenolepis diminuta* infection in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1991, 33: 333-337.
- [9] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [10] 袁剑刚, 刘 昕, 汤展球. 橄榄的抑菌效应及其药效成分的初步研究[J]. 食品科学, 2001, 22(3): 82-84.
- [11] 卢成英, 徐东翔, 杜 勇, 等. 檫木叶抑菌活性成分提取分离与检测[J]. 中成药, 2006, 28(1): 132-134.
- [12] 刘 欣, 郝淑贤, 赵力超, 等. 葶苈英抑菌成分活性跟踪方法的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 78-81.
- [13] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2004.