

酸浆宿萼总皂苷体外抑菌效果研究

孟庆然, 李立博, 王晓闻*

(山西农业大学食品科学与工程学院, 山西 太谷 030801)

摘要:目的: 研究酸浆宿萼总皂苷的体外抑菌效果。方法: 以大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌为受试菌, 以抑菌圈直径、最小抑菌质量浓度(MIC)和最小杀菌质量浓度(MBC)为检验指标, 研究酸浆宿萼总皂苷的体外抑菌活性。结果: 酸浆宿萼总皂苷对4种受试菌都有较强的抑菌效果, MIC值在2.5~20mg/mL之间; MBC值在5~20mg/mL之间; 酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌能力大于山梨酸钾; 对福氏志贺氏菌的抑菌能力与苯甲酸钠相当。结论: 酸浆宿萼总皂苷对食品腐败细菌具有较明显的抑制作用。

关键词: 酸浆宿萼; 总皂苷; 抑菌效果

Antimicrobial Effect of Total Saponins from *Physalis alkekengi* Calyx

MENG Qing-ran, LI Li-bo, WANG Xiao-wen*

(College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The antimicrobial effect of total saponins from *Physalis alkekengi* Calyx against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* was evaluated through measuring antimicrobial diameter, minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The results showed that total saponins from *P. alkekengi* had a strong inhibitory effect against four tested bacteria with MIC of 2.5 to 20 mg/mL and MBC of 5 to 20 mg/mL. The antimicrobial activity of the total saponins against *S. typhimurium* was stronger than potassium sorbate, and the same antimicrobial activity against *Shigella flexneri* was observed as sodium benzoate.

Key words: *Physalis alkekengi* Calyx; saponins; antimicrobial effect

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)19-0084-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201319019

酸浆(*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast) Makino)为茄科酸浆属多年生草本植物, 又名红姑娘、锦灯笼等^[1], 是一种营养丰富稀特蔬菜, 广泛分布于我国东北、西北、山西等地。此外, 中华人民共和国药典(一部)中规定酸浆宿萼为药用部位^[2]。

酸浆宿萼含有黄酮类^[3-6]、多糖类^[7-8]、皂苷类、苦素类^[9-10]等生物活性物质及氨基酸类、色素类、无机元素等化学成分^[3-4], 且含量丰富。目前国内外对酸浆苦素的研究较多, 已报道从酸浆宿萼中分离鉴定出一系列酸浆苦素类化合物及其衍生物, 其中一些具有明显的生物活性。Zhang Chunhua等^[11]从酸浆宿萼中分离的酸浆苦素对人前列腺癌PC-3细胞和前列腺癌LNCaP细胞株具有较强的细胞毒性; Ji Long等^[12]分离出的酸浆苦素A具有明显的抗炎效果。除酸浆苦素外, 酸浆宿萼中所含有的其他化学成分亦有较明显的生物活性, 酸浆宿萼中所含的多糖

具有显著的降糖效果^[13]; 酸浆木犀草素对心血管系统、祛痰及体外抗柯萨奇均具较好疗效^[14-15]; 酸浆宿萼总皂苷和氯仿提取物具有明显的降糖效果等^[13,16]。然而有关酸浆宿萼总皂苷抑菌活性的研究尚未见报道。本研究以酸浆宿萼为实验材料, 测试酸浆宿萼总皂苷的抑菌活性, 为开发天然食品防腐抑菌剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸浆宿萼粉末: 原料于2012年10月采自山西省阳高县王官屯镇, 经山西农业大学动物科技学院温伟业教授鉴定为酸浆属植物(*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast) Makino)。将去除萼内浆果的原料于60℃条件下烘干, 经粉碎、40目过筛后得酸浆宿萼粉末样品。

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 山西省科技攻关计划项目(20100311073)

作者简介: 孟庆然(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: kingstone116@163.com

*通信作者: 王晓闻(1968—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: wwxxw11@163.com

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, 菌号: 44102)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, 菌号: 50115)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*, 菌号: 51571)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria Monocytogenes*, 菌号: 54001)均购于中国药品生物制品检定所。培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

D101型大孔吸附树脂 天津海光化工有限公司; 硅胶板 青岛胜海化工有限公司; 薯蓣皂苷标准品(生产批号: SUZGY-20120305, 纯度>98%) 天津马克生物技术有限公司; 营养琼脂 北京奥博星生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-LS-30紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; LD4-2A低速离心机 北京雷勃尔离心机有限公司; JDG-0.2真空冻干试验机 兰州科近真空冻干技术有限公司; BS210S电子天平 德国Sartorius公司; 可调式微量移液器 德国Eppendorf公司; YXQ-LS-75S II立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司; BCN-1360型医用型超净工作台 北京哈东联公司。

1.3 方法

1.3.1 酸浆粗皂苷的提取

称取1kg的酸浆宿萼粉末, 置于80%乙醇中浸泡24h; 60℃水浴回流提取2h, 提取3次; 合并滤液并过滤, 3500r/min离心10min, 取上清; 将上清减压蒸干; 加入一定量的蒸馏水溶解减压浓缩后的残留物, 然后用等体积的石油醚和水饱和正丁醇各萃取3次; 合并正丁醇相并减压蒸干, 用甲醇溶解沉淀; 加8倍体积乙醚洗涤, 3000r/min离心10min, 洗涤数次至上清无色; 将沉淀溶于蒸馏水, 用真空冷冻干燥机干燥即得酸浆宿萼粗皂苷^[17]。

1.3.2 酸浆宿萼粗皂苷的纯化与鉴定

上样: 将酸浆宿萼粗皂苷配制成10mg/mL的水溶液, 上样于D101型大孔吸附树脂色谱柱(3cm×60cm), 静置24h后进行洗脱。

洗脱: 首先用蒸馏水洗脱至薄层色谱(TLC)检测无显色反应(薄层色谱方法: 展开剂: 乙酸乙酯-甲醇-水体积比10:2:1; 显色剂: 2%对二甲氨基苯甲醛的40%硫酸溶液; 显色温度: 100℃; 显色时间: 3min)^[18], 然后用80%的乙醇溶液进行洗脱, 至洗脱液三氯醋酸检测无反应。

合并洗脱液并减压蒸干, 加蒸馏水溶解残留物, 真空冷冻干燥即得纯化后的酸浆宿萼总皂苷。

参照文献[19]报道的方法对酸浆宿萼总皂苷进行鉴定, 采用分光光度法^[17]测定总皂苷含量。

1.3.3 酸浆宿萼总皂苷抑菌活性的测定

将已灭菌的培养基冷却至50℃, 按1%接种量接入 10^7 CFU/mL供试菌菌悬液。取已灭菌的培养皿, 每皿倒入上述培养基约20mL, 在距离培养皿边缘3个等距离方

向上放置内径为6mm的牛津杯。待培养基完全凝固后, 取出牛津杯。每孔加入酸浆宿萼总皂苷100μL(80mg/mL)。将平板置于37℃培养24h后测量抑菌圈直径, 实验重复3次。同时设置灭菌蒸馏水阴性对照和苯甲酸钠阳性对照^[20-21]。

1.3.4 酸浆宿萼皂苷最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度测定

采用二倍稀释法将800mg/mL的酸浆宿萼总皂苷稀释成800、400、200、100、50、25mg/mL 6个质量浓度梯度。在培养皿中加入2mL不同质量浓度稀释液和18mL已灭菌的培养基, 充分混匀。待培养基冷却后, 每皿加入浓度为 10^7 CFU/mL供试菌菌悬液50μL并涂布均匀^[20]。将平板置于37℃培养24h后观察菌体生长情况, 无菌平板的最低样品质量浓度即为最低抑菌质量浓度(MIC)。实验重复3次。

将酸浆宿萼皂苷质量浓度高于和等于MIC的培养皿继续培养24h, 观察菌体的生长情况。以无菌生长的最低样品质量浓度为酸浆宿萼总皂苷的最低杀菌质量浓度(MBC)值^[20]。

1.3.5 酸浆宿萼总皂苷与山梨酸钾、苯甲酸钠抑菌能力的比较

参照1.3.4节的方法进行实验, 使得两种药物的终质量浓度与酸浆宿萼皂苷的终质量浓度相同。测定山梨酸钾和苯甲酸钠的MIC, 比较酸浆宿萼总皂苷与山梨酸钾和苯甲酸钠的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 酸浆宿萼总皂苷鉴定及含量测定

酸浆宿萼皂苷经醋酸-浓硫酸、三氯醋酸、氯仿-浓硫酸等显色均呈现绿色, 证实酸浆宿萼总皂苷为甾体皂苷。

以薯蓣皂苷为标准品, 全波长扫描得薯蓣皂苷在464nm有最大吸波长, 采用香草醛-高氯酸显色法, 通过绘制标准曲线测得酸浆宿萼总皂苷的纯度为71.32%。

2.2 酸浆宿萼总皂苷抑菌实验结果

表1 酸浆宿萼总皂苷对供试菌的抑菌圈直径
Table 1 Antimicrobial diameters of total saponins from *Physalis alkekengi* Calyx against tested strains

供试菌	酸浆宿萼总皂苷	mm	
		阳性对照组(CK ₁)	阴性对照组(CK ₂)
大肠埃希氏菌	19.67±0.23	—	—
鼠伤寒沙门氏菌	18.48±0.14	—	—
福氏志贺氏菌	20.22±0.32	—	—
单核细胞增生李斯特菌	15.38±0.41	—	—

注: —, 没有抑菌圈。

培养24h后, 酸浆宿萼总皂苷对大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌的抑菌圈平均直径如表1所示, 阳性和阴性对照组均无抑菌

圈出现。酸浆宿萼总皂苷对革兰氏阳性菌(单核细胞增生李斯特菌)和革兰氏阴性菌(大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌)均有抑制效果,可得酸浆宿萼总皂苷具有良好的抑菌效果。

2.3 酸浆宿萼总皂苷的MIC

表2 酸浆宿萼总皂苷的MIC
Table 2 MIC of total saponins from *Physalis alkekengi* Calyx against tested organisms

供试菌	酸浆宿萼总皂苷质量浓度/(mg/mL)							
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625
大肠埃希氏菌	—	—	—	—	++	+++	+++	+++
鼠伤寒沙门氏菌	—	—	—	—	—	—	++	+++
福氏志贺氏菌	—	—	—	—	—	+	++	+++
单核细胞增生李斯特菌	—	—	—	+	++	+++	+++	+++

注:—, 无菌生长; +, 菌落较少; ++, 菌落较多; +++, 菌落很多。

由表2可知,酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌的MIC最低,为2.5mg/mL,其次是福氏志贺氏菌,为5mg/mL;对单核细胞增生李斯特菌的MIC最高,为20mg/mL。所有供试细菌中,酸浆宿萼总皂苷对革兰氏阴性菌的抑制效果要好于对革兰氏阳性菌的抑菌效果。

2.4 酸浆宿萼总皂苷的MBC

表3 酸浆宿萼总皂苷的MBC
Table 3 MBC of total saponins from *Physalis alkekengi* Calyx against tested organisms

供试菌	大肠埃希氏菌	鼠伤寒沙门氏菌	福氏志贺氏菌	单核细胞增生李斯特菌
MBC/(mg/mL)	10	5	5	20

由表3可知,酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌的MBC相同,均为5mg/mL;对单核细胞增生李斯特菌的MBC最高,为20mg/mL。所有供试细菌中,酸浆宿萼总皂苷对革兰氏阴性菌的杀菌效果要明显好于对革兰氏阳性菌的杀菌效果。

2.5 酸浆宿萼总皂苷与山梨酸钾和苯甲酸钠抑菌能力的比较

表4 酸浆宿萼总皂苷、山梨酸钾和苯甲酸钠的MIC
Table 4 MIC of total saponins from *Physalis alkekengi* Calyx, sodium benzoate and potassium sorbate against tested organisms

供试菌	MIC/(mg/mL)		
	酸浆宿萼总皂苷	苯甲酸钠	山梨酸钾
大肠埃希氏菌	10	5	5
鼠伤寒沙门氏菌	2.5	1.25	5
福氏志贺氏菌	5	2.5	5
单核细胞增生李斯特菌	20	5	5

由表4可知,酸浆宿萼总皂苷、苯甲酸钠和山梨酸钾对鼠伤寒沙门氏菌的MIC分别为2.5、1.25、5mg/mL,可得酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌能力大于山梨酸钾;酸浆宿萼总皂苷对福氏志贺氏菌的抑菌能力与苯甲酸钠相当,MIC均为5mg/mL。酸浆宿萼总皂苷对大

肠埃希氏菌和单核细胞增生李斯特菌的抑制能力则不如山梨酸钾和苯甲酸钠。

革兰氏阳性菌的细胞壁较厚,为20~80nm,同时含有占细胞壁干质量达40%~95%的肽聚糖,这些肽聚糖相互交联,形成了坚固致密的三维立体网状结构,这使得革兰氏阳性菌膜转运通道少;虽然革兰氏阴性菌细胞壁较薄,所含有的肽聚糖仅占细胞壁干质量的5%~20%,物质的转运通道多,但是革兰氏阴性菌的化学组成和结构更为复杂,细胞壁为双层,外壁层所含有的基质蛋白以三聚体的形式构成充水孔道,使得分子质量较小的亲水营养物质,如双糖、二肽、三肽和无机离子等能够进入^[22],而皂苷等大分子物质进入细胞质膜则比较困难。这一特征说明了有时革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌的耐药更强的原因。酸浆宿萼总皂苷对革兰氏阴性和阳性菌都具有一定的抑制效果,但对革兰氏阴性菌的抑菌能力要强于对革兰氏阳性菌,与一些文献报道的皂苷对革兰氏阳性菌的抑菌能力要强于对革兰氏阴性菌^[21,23]不同,这提示不同植物来源的皂苷类化合物的种类、分子结构和含量各有不同,作为目的研究物,各类植物提取物中往往同时含有目的产物以外的其他化合物,这些化合物不仅成分复杂,且与皂苷之间的相互作用亦十分复杂,这些可能导致了研究结果的差异性^[24]。

3 结 论

酸浆宿萼总皂苷对大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生李斯特菌等4种常见的食品腐败细菌均有抑菌作用,提取物质量浓度为80mg/mL时,抑菌圈平均直径分别为(19.67±0.23)、(18.48±0.14)、(20.22±0.32)、(15.38±0.41)mm;酸浆宿萼总皂苷对4种供试菌的MIC值分别为:鼠伤寒沙门氏菌2.5mg/mL、福氏志贺氏菌5mg/mL、大肠埃希氏菌10mg/mL、单核细胞增生李斯特菌20mg/mL;MBC值分别为:鼠伤寒沙门氏菌5mg/mL、福氏志贺氏菌5mg/mL、大肠埃希氏菌10mg/mL、单核细胞增生李斯特菌20mg/mL。酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌能力大于山梨酸钾;对福氏志贺氏菌的抑菌能力与苯甲酸钠相同,MIC均为5mg/mL。

天然防腐剂往往不具有广谱的抗菌特性,这是导致目前合成类防腐剂仍占主导地位的主要原因。本研究选择了具有代表性的苯甲酸钠和山梨酸钾为对照,酸浆宿萼总皂苷对鼠伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌的抑制效果与山梨酸钾对二者的抑制效果相当,略逊于苯甲酸钠的抑制效果;而酸浆宿萼总皂苷对另外两种菌的抑制效果则不如对照组。苯甲酸钠和山梨酸钾为酸性防腐剂^[25],这使得二者在食品抗菌防腐方面存在一定的不足。此

外, 随着社会发展水平的不断提高, 人们的健康饮食意识也在不断加强, 人们越来越倾向于天然防腐抑菌剂加工和贮藏的食品。因此, 从酸浆中提取具有抑菌活性化合物更是突显现实意义。

参考文献:

- [1] 王晓闻, 张鲁, 任石涛. 酸浆宿萼抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4): 136-140.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 250-251.
- [3] 王家东, 王晓闻. 酸浆营养成分的分析[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2005, 25(4): 377-379.
- [4] 赵倩, 邱莉, 卜光明, 等. 酸浆宿萼的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3): 151-155.
- [5] 邱莉, 姜志虎, 刘红霞, 等. 酸浆宿萼的黄酮苷类化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(12): 744-747.
- [6] 赵跃刚, 程东岩, 范艳君. 酸浆不同药用部位中总黄酮的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2781-2782.
- [7] 刘俊花, 孙勇民. 酸浆宿萼水溶性多糖纯化及结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 94-98.
- [8] 孙勇民. 酸浆宿萼水溶性多糖的分离纯化及理化性质分析[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(7): 118-121.
- [9] 张初航, 孙启时, 王峥涛, 等. 酸浆中苦素类化学成分的分离于结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(12): 774-818.
- [10] ZHENG Yunliang, LUAN Lianjun, CHEN Yong, et al. Characterization of physalins and fingerprint analysis for the quality evaluation of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* by ultra-performance liquid chromatography combined with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 71: 54-62.
- [11] ZHANG Chuhan, WANG Zhengtao, YANG Yiping, et al. A novel cytotoxic neophysalin from *Physalis alkekengi* var. *franchetii*[J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20: 1327-1330.
- [12] Ji Long, YUAN Yonglei, LUO Liping, et al. Physalins with anti-inflammatory activity are present in *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and can function as Michael reaction acceptors[J]. Steroids, 2012, 77: 441-447.
- [13] 刘雅丽, 韩书影, 赵后, 等. 锦灯笼宿萼皂苷降血糖作用研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2010, 42(2): 105-109.
- [14] VESSAL M, MEHRANI H A, OMRANI G H. Effects of an aqueous extract of *Physalis alkekengi* fruit on estrus cycle, reproduction and uterine creatine kinase BB-isozyme in rat[J]. J Ethnopharmacol, 1991, 34(1): 69-78.
- [15] VESSAL M, RASTI M, KOOSHESH F. Modulation of the pituitary and basomedial hypothalamic lysyl-aminopeptidase activities by β -estradiol and/or an aqueous extract of *Physalis alkekengi* fruits[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1996, 115(2): 267-271.
- [16] KANG H, KWON S R, CHOI H Y. Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* extract and its chloroform fraction on LPS or LPS/IFN- γ -stimulated inflammatory response in peritoneal macrophages[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135: 95-101.
- [17] 孟庆然, 耿红兰, 任石涛, 等. 锦灯笼酸浆宿萼皂苷提取工艺的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2012, 32(4): 341-345.
- [18] 马长雨. 柴胡皂苷分离纯化研究[D]. 天津: 天津大学, 2005: 30.
- [19] 曹虎灵. 酸浆宿萼皂苷对小鼠免疫活性和小鼠胃癌细胞MFC生长抑制的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2011: 14.
- [20] 吴少辉, 叶伟娟, 赵婷, 等. 南五味子乙醇提取物对食品腐败细菌的抑菌活性研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(8): 104-109.
- [21] 廖建良, 揭育霞. 三叉苦叶提取物的抑菌活性研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(19): 90-92.
- [22] 江汉湖. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 69-72.
- [23] 陈丽艳, 施晓光, 付玉杰, 等. 甘草根茎乙醇提取物抗菌活性研究[J]. 植物研究, 2006, 26(2): 229-232.
- [24] 张锡彬. 红薯茎叶多糖和黄酮提取物的抗菌及降血糖功能研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2008: 16-21.
- [25] 郝利平, 聂乾忠, 陈永泉, 等. 食品添加剂[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 36-41.