

# 山茱萸提取物抑菌活性成分稳定性的研究

赵淑艳<sup>1</sup>, 呼世斌<sup>1</sup>, 吴焕利<sup>2</sup>, 唐艳<sup>1</sup>, 王显蕾<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100 2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 本实验主要对山茱萸抑菌性能进行研究, 结果表明, 山茱萸提取物具有强抑菌活性, 在 pH < 7 的条件下提取物对细菌具有较好的抑菌效果, 明显强于山梨酸钾。同时以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 研究山茱萸提取物活性成分的稳定性, 结果表明提取物经过酸、碱处理后只有在酸性条件下具有一定的抑菌活性, 碱处理使其抑菌活性减弱, 甚至消失; 温度、紫外照射及常见金属离子(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>)对其稳定性几乎没有影响。

**关键词:** 山茱萸; 抑菌; 稳定性

Study on Stability of Bacteriostatic Active Compositions Extracted from *Fructus Corni*

ZHAO Shu-yan<sup>1</sup>, HU Shi-bin<sup>1</sup>, WU Huan-li<sup>2</sup>, TANG Yan<sup>1</sup>, WANG Xian-lei<sup>1</sup>

(1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Resources and Environmental Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Antimicrobial activities of *Fructus Corni* extracted with ethanol were tested in this study. The results showed that *Fructus Corni* extracts show strong antibacterial activities. Further more study revealed that the *Fructus Corni* extract plays a stronger antimicrobial activity against the tested bacterial *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* than potassium sorbate. Extract of *Fructus Corni* was also studied for its stability to temperature, acid ultraviolet or metal ions. The results showed that the extract is very stable to temperature and ultraviolet. After treated with alkaline, the extract showed loss of antibacterial activity when pH passed 7. The metal ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) show also little effect on the extract antimicrobial activity.

**Key words** *Fructus Corni* bacteriostatic stability

中图分类号: Q949.763.4 TS202.3

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0098-04

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进行采收, 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, 医疗上广泛用于腰膝酸痛、眩晕、耳鸣、遗精、尿频、肝虚寒热、虚汗不止、心摇脉散、神经衰弱、月经不调等症。历来, 山茱萸的主要用途是果肉直接入药, 比较单一, 已经上市的产品无论数量还是品种都不能满足国内外市场的需求。目前, 国内外对山茱萸化学成分及其理化性质的研究报道较多, 而对其抑菌作用的研究鲜有报道。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, 因此, 本实验旨在探讨山茱萸提取物的抑菌作用及其影响因素, 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一定的依据, 为山茱萸抑菌活性物质的开发

利用提供参考<sup>[1-3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 山茱萸

本实验所用山茱萸, 采自陕西武功县当年产的新鲜山茱萸果实, 选择干净、无霉烂的去核果肉, 破碎备用。

#### 1.1.2 实验菌种

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.), 以上菌种由本校微生物实验室提供。供试菌株活化两代后分别接入试管

收稿日期: 2006-11-30

作者简介: 赵淑艳(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事资源清洁利用研究。E-mail: bessie20052005@163.com

斜面培养基备用。

### 1.1.3 试剂

实验试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.1.4 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基；查氏培养基；制备无菌试管斜面、平板备用。

### 1.1.5 仪器设备

DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 金坛市岸头国瑞实验仪器厂；SFW-400A 倾斜式高速万能粉碎机北京中兴伟业仪器公司；HB-B95 型循环水式多用真空泵、R-200型旋转蒸发仪 瑞士布奇公司；Heating-Bath B-490 水浴锅；PHS-3C 酸度计；LDZX-40AI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂；CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 香港Head Force发展有限公司；超净工作台苏州安泰空气技术有限公司；721 分光光度计 上海第三分析仪器厂；102 型新华滤纸；LIBRORIB-280 型电子天平。

## 1.2 方法

### 1.2.1 山茱萸浸膏的制备

称取山茱萸样品 500g，按 1:5 的比例(样品/提取溶剂，W/V)加入 2500ml 70%(体积分数)乙醇，回流提取三次，每次 2h。抽滤，合并滤液，在 45℃ 下减压浓缩得到黑红色膏状物，加入 5 倍量的蒸馏水沉淀除去水不溶性杂质，抽滤，滤液在 45℃ 下减压浓缩得到黑红色膏状物。

### 1.2.2 抑菌实验<sup>[4]</sup>

试验菌种接于试管斜面，37℃ 培养 24h，重复两次活化菌种。取 0.1ml 菌悬液置于平板上，L 型玻璃棒涂布均匀。将 Ø6mm 无菌滤纸片在一定浓度的待测液中浸湿，取出挥干溶剂，隔一定距离平铺于含菌培养皿中，在适宜的温度下培养一定时间(细菌 37℃，12h；霉菌 28℃，48h；酵母菌 28℃，24h)后，测定抑菌圈直径。

### 1.2.3 山茱萸提取物抑菌谱的确定——滤纸片法<sup>[5]</sup>

参考程丽娟等的方法。取菌悬液 0.5ml 加入到培养基中(15ml)，摇匀后倾注平皿，将滤纸片在一定浓度的待测液中浸湿，取出晾干，最后将已晾干的滤纸片隔一定距离平铺于已倒好的培养皿中，以上操作均在无菌条件下进行。将培养皿在适宜的温度下培养一定时间(细菌 37℃，12h；霉菌 28℃，48h；酵母菌 28℃，24h)后，测定抑菌圈直径。实验重复三次。

### 1.2.4 最低抑菌浓度(MIC)——平板涂布法

将不同浓度的抑菌剂溶液定量地加入到熔化的培养基中，使提取物的浓度分别为 8%、4%、2%、1%、

0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%、0.03125%、0.015625%，充分混合均匀，倾注平皿。待培养基冷却后，用接种针于各培养基中依次涂供试菌液，在一定温度下培养 48h，观察菌体的生长情况，从无菌生长的培养基中找出提取物浓度最低的培养基，即为该抑菌剂的最低抑菌浓度。

### 1.2.5 与山梨酸钾抑菌能力比较

用 1.2.4 的方法测定山梨酸钾的最小抑制浓度(MIC)。

### 1.2.6 山茱萸提取物稳定性的研究<sup>[6-7]</sup>

#### 1.2.6.1 提取物温度稳定性的研究

取山茱萸提取物用无菌水稀释成质量浓度为 80mg/ml 的溶液，作为原液。取部分原液分别置于 4、30、60、80、100℃ 水浴和 121℃ 湿热条件下各处理 30min，以金色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌，用抑菌圈直径法测定处理前后样品的抑菌状况。实验重复三次。

#### 1.2.6.2 提取物对酸碱稳定性的研究

介质的酸碱度会影响培养基的电位势，从而影响防腐剂的稳定性，进而可能影响其抑菌活性。取部分提取物，用不同 pH 值的缓冲液将其稀释成质量浓度为 80mg/ml 的溶液，各溶液的 pH 值为 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 和 12.0 七个梯度，并以不同 pH 的缓冲溶液原液为对照。以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌，用抑菌圈直径法测定其抑菌活力。

#### 1.2.6.3 提取物对紫外稳定性的研究

取上述部分原液，分别将待测物置于紫外光下照射 5、10、15、20、25min 后，以原液作为对照，以金色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌，用抑菌圈直径法测定处理前后样品的抑菌状况。实验重复三次。

#### 1.2.6.4 提取物对金属离子稳定性的研究

分别配制 1N 的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 五种金属离子溶液，取该溶液若干浸泡待测物，浸泡时间为 12h，其中待测物浓度 80mg/ml，以原液作为对照。以金色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌，用抑菌圈直径法测定处理前后样品的抑菌状况。实验重复三次。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取物抑菌谱的确定

从表 1 可知，粗提物对所选细菌的抑菌效果好，且抑菌活性具有量效关系，特别是对细菌中的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性最为显著，当添加量为 50% 时抑菌活性明显高于同条件下浓度为 50% 的山梨酸钾。但是，山茱萸粗提物除了对青霉和曲霉有效外，对啤酒酵母及假丝酵母均不显示抑菌活性。

表1 山茱萸粗提取物对常见污染菌的抑菌状况(抑菌圈直径: mm)

Table 1 Effects of *Fructus Corni* extract concentration on its antimicrobial potency (bacteriostatic zone diameter: mm)

实验菌种	山茱萸粗提取物添加量(%)					50% 山梨酸钾	C K
	50	25	12.5	6.25	3.13		
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	34.2	24.0	23.7	13.6	12.2	14.1	—
枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	28.4	20.6	16.2	10.8	8.5	7.2	—
苏云金杆菌( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	20.0	14.3	11.7	8.7	8.0	8.5	—
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	30.0	20.2	18.5	12.7	9.5	8.9	—
蜡状芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	29.1	20.5	10.1	8.2	7.8	11.2	—
桔青霉( <i>Penicillium citrinum</i> )	20.3	13.0	10.3	8.0	—	24.5	—
米曲霉( <i>Aspergillus oryzae</i> )	28.5	16.4	12.3	9.5	8.0	16.5	—
啤酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	—	—	—	—	—	11.2	—
假丝酵母( <i>Candida sp.</i> )	—	—	—	—	—	11.6	—

表2 山茱萸提取物对食品中常见污染菌的最低抑菌浓度

Table 2 MIC of *Fructus Corni* extract against food bacteria

实验菌种	抑菌浓度(%)													C K
	山茱萸提取物							山梨酸钾						
	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.063	4	2	1	0.5	0.25	
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	—	—	—	—	—	—	++	+++	—	+++	+++	+++	+++	+++
枯草芽孢杆菌( <i>Bacillus subtilis</i> )	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
苏云金杆菌( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	—	—	—	—	—	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	—	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
蜡状芽孢杆菌( <i>Bacillus cereus</i> )	—	—	—	—	—	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
桔青霉( <i>Penicillium citrinum</i> )	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	+++	+++	+++	+++
米曲霉( <i>Aspergillus oryzae</i> )	—	—	—	—	++++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
啤酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	+++
假丝酵母( <i>Candida sp.</i> )	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	+++	+++

注: CK 为无菌蒸馏水; “—”表示无菌生长; “+”表示菌生长较弱; “++”表示菌生长较强; “+++”表示菌生长强(以下符号意义与此相同)。

2.2 提取物对供试菌的 MIC 的确定

由表 2 可知, 山茱萸提取物对细菌的抑菌能力大于酵母菌和霉菌, 其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌浓度可低至 0.25%, 对枯草芽孢杆菌、苏云金杆菌和蜡状芽孢杆菌的抑菌浓度为 0.5%。而山梨酸钾的结果正好相反, 对酵母和霉菌的最低抑菌浓度明显低于山茱萸粗提取物, 只有当山梨酸钾的浓度达到 4% 时, 对细菌才显示抑菌活性, 而对酵母菌和霉菌在 0.25% 时即有活性, 这一结果与前述滤纸片法的结果相吻合。

2.3 山茱萸抑菌活性成分稳定性的研究

2.3.1 热处理对山茱萸提取物抑菌活性的影响

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 测定不同温度下山茱萸提取物的抑菌活性。结果见图 1。由图 1 可以看出, 山茱萸提取物经不同温度处理后仍然保持原有的抑菌活性, 即使在 121℃ 处理 30min 后仍具有较高的活性。这表明山茱萸提取物的抑菌活性具有较好的热稳定性。

2.3.2 pH 值对山茱萸提取物抑菌活性的影响

以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 研究不同 pH 值对山茱萸提取物抑菌活性的影响, 结果见图 2。

由图 2 可看出, 随 pH 值的升高, 山茱萸提取物对

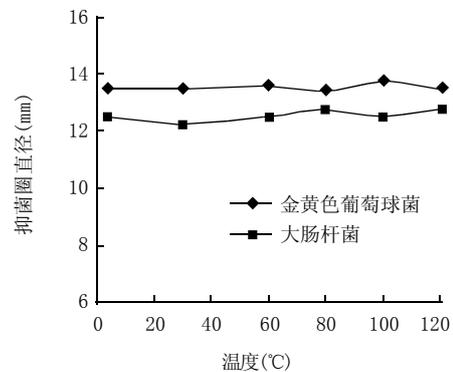


图1 热处理对山茱萸提取物抑菌活性的影响  
Fig.1 Effects of temperature on antimicrobials activity of *Fructus Corni* extract

抑菌能力下降。酸性条件下抑菌活性强, 在 pH6~7 之间变化最大, 且 pH 在 7 之后无抑菌活性, 原因可能是提取物经碱处理后使某些抑菌成分与溶液中的碱发生反应, 从而使该物质的抑菌性消失。缓冲液本身对供试菌无抑菌活性。

2.3.3 紫外光对山茱萸提取物抑菌活性的影响

将山茱萸提取物经紫外光处理后, 以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为指示菌, 测定其抑菌活性, 结果见图 3。

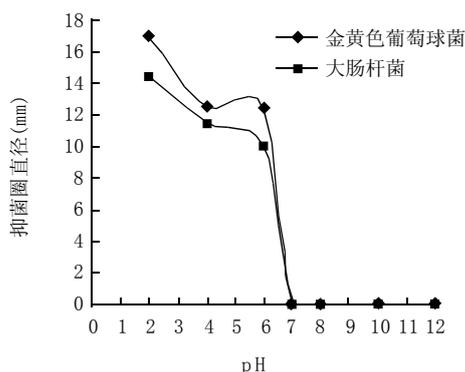


图2 pH值对苦瓜提取物抑菌活性的影响  
Fig.2 Effects of pH on antimicrobials activity of *Fructus Corni* extract

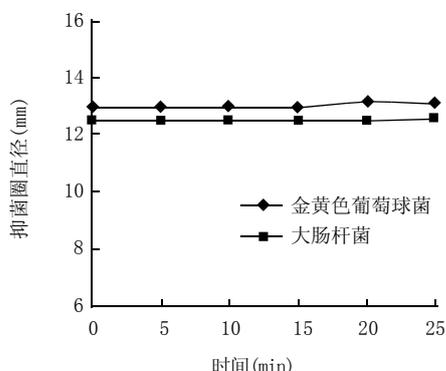


图3 紫外光对山茱萸提取物抑菌活性的影响  
Fig.3 Effects of ultraviolet on antimicrobials activity of *Fructus Corni* extract

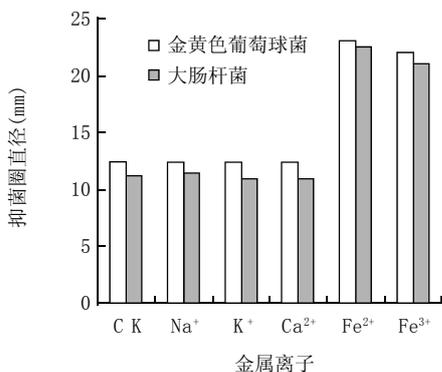


图4 金属离子对粗提取物抑菌活性的影响  
Fig.4 Effects of metal ion on antimicrobials activity of *Fructus Corni* extract

图3表明,随紫外光处理时间的变化,提取物的抑菌活性基本保持不变。由此可见山茱萸提取物对紫外光具有极高的稳定性。

#### 2.3.4 无机盐对山茱萸提取物抑菌活性的影响

由图4可见粗提取物经Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>三种离子处理后,抑菌活性基本操持不变。但经Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>处理后

的粗提取物的抑菌活性明显高于对对照,其中可能的原因有两种:一是金属离子本身对菌体的生长存在抑制作用;二是金属离子与抑菌成分发生螯合作用,从而提高其抑菌效力。

#### 2.3.5 山茱萸提取物抑菌活性成分的初步分析

通过对山茱萸成分粗测,发现在提取液中加入三氯化铁-铁氰化钾乙醇溶液1~2滴,有蓝色反应产生,表明含有酚性成分;此外通过测定山茱萸水提取液的pH值发现溶液呈酸性,加入溴甲酚绿有黄色反应产生,由此可见,活性成分中可能含有羧酸。酚羟基及羧基经碱处理会发生不同程度的转化,从而导致整体的抑菌活性降低甚至消失。运用生物自显影技术对抑菌活性成分进行跟踪,通过进一步的分离纯化,初步确定其主要的抑菌活性成分为一种酚酸类物质<sup>[8-9]</sup>。

### 3 结论

3.1 山茱萸提取物对不同菌种都具有抑制作用,其中对细菌的抑菌能力大于霉菌和酵母菌,特别是对细菌中的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌活性最为显著。在滤纸片实验中,提取物浓度为3.135%时就具有抑菌现象。但是,山茱萸粗提物除了对曲霉和青霉有效外,对啤酒酵母及假丝酵母均不显示抑菌活性。而山梨酸钾的结果正好相反可见二者存在复配提高抑菌活性及抑菌范围的可能性,但其实际应用还有待于进一步研究。

3.2 山茱萸提物对温度、紫外照射及金属离子都具有良好的稳定性。山茱萸粗品提取物经过酸、碱处理后只有在酸性条件下存在抑菌活性,经过碱处理,提取物抑菌活性明显下降,抑菌活性消失。

#### 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] 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.
- [4] 卢成英,徐东翔,杜勇,等. 榧木叶抑菌活性成分提取分离与检测[J]. 中成药, 2006, 28(1): 132-134.
- [5] 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.
- [6] 郝淑贤,刘欣,赵力超,等. 荸荠提取物抑菌成分稳定性的探讨[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 71-74.
- [7] 王杰,张名位,刘兴华. 苦瓜提取物抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品科技, 2004(4): 71-74.
- [8] 刘欣,郝淑贤,赵力超,等. 荸荠提取物抑菌成分活性跟踪方法的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 78-81.
- [9] 高锦明. 植物化学[M]. 北京:科学技术出版社, 2004.