

乌梅乙醇提取物抑菌作用及其抑菌成分分析

刘梦茵^{1,2}, 刘芳¹, 周涛², 诸永志^{1,*}, 王道营¹, 徐为民¹

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014; 2.南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

摘要: 研究乌梅乙醇提取物(以下简称醇提物)的抑菌活性以及热处理和 pH 值对抑菌活性的影响, 并通过薄层层析-生物自显影技术对醇提物的主要抑菌成分进行分析。结果表明: 乌梅醇提物对蜡状芽孢杆菌和假单胞菌等有很强的抑制作用, 最小抑菌质量浓度(MIC)在 2.5~5.5mg/mL 之间, 最适 pH 值为 5~6, 对热稳定。当薄层层析的展开剂为氯仿-甲醇(体积比 5:1)时, 通过与柠檬酸、碱中和为 pH7 的乌梅醇提物比较, 初步确定乌梅醇提物中起主要抑菌作用的是有机酸。

关键词: 乌梅; 抑菌活性; 薄层层析; 生物自显影

Antibacterial Activity and Composition of Ethanol Extract from *Fructus Mume*

LIU Meng-yin^{1,2}, LIU Fang¹, ZHOU Tao², ZHU Yong-zhi^{1,*}, WANG Dao-ying¹, XU Wei-min¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The antibacterial activity of absolute ethanol extract from *Fructus Mume* and its resistance to pH and temperature were investigated in this study. Its major antibacterial composition was preliminarily analyzed by thin layer chromatography/bioautography method using chloroform-methanol (5:1, V/V) as the development solvent. The results showed that the extract had strong inhibitory effect against *Bacillus cereus* and *Pseudomonas*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was in the range of 2.5–5.5 mg/mL. The optimal medium pH was 5–6. Meanwhile, the ethanol extract was stable to temperature. Organic acids were initially identified as the major antibacterial components in the ethanol extract based on comparisons with citric acid and its alkali neutralized counterpart.

Key words: *Fructus Mume*; antibacterial activity; thin-layer chromatography (TLC); bioautography

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0190-04

乌梅由蔷薇科植物梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)的成熟的果实青梅经干燥而成^[1]。乌梅药食兼用, 资源丰富且应用范围极广, 具有极大的开发价值。乌梅的主要成分为有机酸、氨基酸、糖类、挥发油、脂类、甾醇类、生物碱^[2]、黄酮类^[3]等。近年来对于乌梅提取物的抑菌作用已有报道, 但是其抑菌成分的分析研究较少。

薄层层析-生物自显影法(TLC-bioautography)是一种将薄层色谱和生物活性测定相结合的检测方法^[4-6]。利用薄层色谱的分离能力将少量混合物(如植物提取物、微生物代谢产物等)在薄层板上通过展开剂分离后, 使薄层板与含有供试微生物的培养基相接触, 在一定条件下

培养一段时间后, 非活性部位会被生长出的指示微生物覆盖而呈现背景色; 活性部位由于抗菌成分的存在使得指示微生物的生长受到抑制而呈现抑菌斑点, 这样就可以初步了解混合物抗菌活性成分的相对极性, 为活性单体化合物的分离提供依据。本实验研究乌梅乙醇提取物(以下简称醇提物)对蜡状芽孢杆菌、假单胞菌、肠杆菌等的抑菌效果及其抑菌特性, 利用薄层析-生物自显影法对乌梅醇提物的主要抑菌成分进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料与菌种

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目(CX(09)627; CX(10)230);

江苏省科技支撑计划项目(BE2010428); 国家农业科技成果转化项目(2010GB2C100156)

作者简介: 刘梦茵(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物及生物技术。E-mail: liumengyin19861201@163.com

* 通信作者: 诸永志(1975—), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向为肉品加工与质量控制。

E-mail: yongzhizhu2003@yahoo.com.cn

乌梅购自南京开心大药房。

营养琼脂 北京陆桥技术有限责任公司；其余试剂为分析纯。

成团泛生菌 N2(*Pantoea agglomerans*)、产气肠杆菌 V9(*Enterobacter aerogenes*)、假单胞菌 P3(*Pseudomonas sp.*)、荧光假单胞菌 S1(*Pseudomonas fluorescens*)、类芽孢杆菌 N3(*Paenibacillus sp.*)、蜡状芽孢杆菌 N4(*Bacillus cereus*)由江苏省农业科学院农产品加工所畜禽加工研究室提供。

1.2 乌梅醇提物的制备

乌梅粉碎(过30目筛),称取20g乌梅加入200mL 95%乙醇70℃浸提10h,真空过滤,旋转蒸发仪浓缩至20mL,制成原液^[7](此处原液指:1mL提取液中含有1g乌梅的醇提物)。原液经0.2mm微孔除菌膜过滤除菌后,4℃条件下保存备用^[8]。

1.3 抑菌实验

抑菌实验采用打孔法^[7]。具体操作步骤为:用打孔器在含菌营养琼脂平板上打出直径为5mm的圆孔,用微量移液器注射30μL乌梅醇提物于圆孔中,重复3次,1%硫酸链霉素为对照。倒置平皿37℃培养18h后,用游标卡尺量取抑菌直径。

抑菌圈直径/mm=抑菌直径-5mm

最小抑菌质量浓度(MIC)采用逐步稀释法进行测定。具体操作步骤为:将制备好的乌梅醇提物按比例加入50℃左右的营养琼脂培养基,最终培养基含有醇提物的质量浓度分别为6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、1.25mg/mL,倒平板,以不添加乌梅醇提物的平板作对照。将菌种涂布于各平板,37℃培养18h,进行菌落计数。同对照比较,添加有醇提物的平板的菌落数比对照平板菌落数减少90%即为MIC^[9]。

1.4 pH值对乌梅醇提物抑菌性的影响

用酸、碱溶液调节营养琼脂培养基的pH值,制成pH值分别为5、6、7、8、9的培养基。参照1.3节的方法,测定乌梅醇提物的抑菌圈直径。

1.5 加热处理对乌梅醇提物抑菌性的影响

乌梅醇提物分别在60、70、80、95℃加热30min。参照1.3节的方法,测定处理样品的抑菌圈直径。

1.6 薄层色谱分离-生物自显影分析主要抑菌成分

用铅笔在105℃活化1h后的硅胶板下端1cm处划一平行线,等距离标志点样点。点样采用5μL毛细管,点样直径小于2mm。选择薄层层析的展开剂为氯仿、甲醇(体积比5:1),先向展开室注入展开剂,静置30min,使展开槽内部充满饱和气体,之后将硅胶板迅速放入,进行线性上行展开。层析结束时取出硅胶板,及时用铅笔标记溶剂前沿,于室温条件下将溶剂自然挥发至干。

移液枪吸取适宜浓度的菌悬液0.1mL加入平皿中,倒入温度为50~60℃的培养基,摇匀。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,将硅胶板轻轻揭下,平皿倒置于培养箱中37℃培养18h,观察抑菌结果。

将乌梅醇提物分别与柠檬酸以及被碱中和成pH7的乌梅醇提物进行薄层层析-生物自显影实验,观察抑菌结果,研究乌梅的主要抑菌成分。

1.7 数据统计分析

采用SPSS 17.0进行数据处理,ANOVA方差分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 乌梅醇提物的抑菌作用

表1 乌梅醇提物的抑菌作用

Table 1 Inhibitory activity of ethanol extract from *Fructus Mume*

样品	抑菌圈直径/mm					
	蜡状芽孢杆菌N4	成团泛生菌N2	类芽孢杆菌N3	产气肠杆菌V9	荧光假单胞菌S1	假单胞菌P3
1%硫酸链霉素	21.16	21.08	23.14	16.42	12.36	14.52
乌梅醇提物	16.54	18.84	27.00	19.30	15.04	15.53

从表1可以看出,乌梅醇提物对成团泛生菌、产气肠杆菌、假单胞菌、荧光假单胞菌、类芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌均有较强的抑制作用。其中对类芽孢杆菌的抑菌圈直径达到27.00mm,对荧光假单胞菌和假单胞菌的抑制效果不及其他细菌,抑菌圈直径分别为15.04mm和15.53mm。

表2 乌梅醇提物的最小抑菌质量浓度

Table 2 MIC of ethanol extract from *Fructus Mume*

菌名称	乌梅醇提物质量浓度/(mg/mL)									
	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	1.25	
成团泛生菌 N2	—	—	—	+	+	+	+	+	+	
类芽孢杆菌 N3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	
蜡状芽孢杆菌 N4	—	—	—	—	—	+	+	+	+	
产气肠杆菌 V9	—	—	+	+	+	+	+	+	+	
荧光假单胞菌 S1	—	—	—	—	—	—	+	+	+	
假单胞菌 P3	—	—	—	—	—	—	+	+	+	

注: +.有菌落生长; —.无菌落生长。

2.2 乌梅醇提物最小抑菌质量浓度的确定

从表2可以看出,乌梅醇提物对不同菌的最小抑菌质量浓度不同,通常在2.5~5.5mg/mL之间。其中对类芽孢杆菌N3的抑菌效果最明显,最小抑菌质量浓度为2.5mg/mL,对产气肠杆菌V9的抑菌效果较不明显,最小抑菌质量浓度达5.5mg/mL。

2.3 pH 值对乌梅醇提物抑菌性的影响

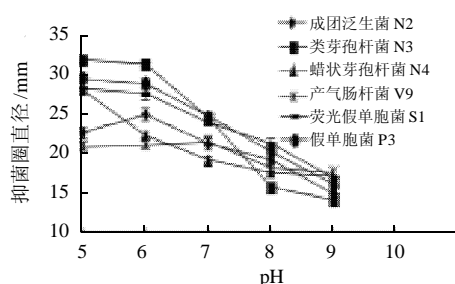


图1 pH 值对乌梅醇提物抑菌性的影响

Fig.1 Effect of pH on antibacterial activity of ethanol extract from *Fructus Mume*

由图1可以看出,乌梅醇提物对类芽孢杆菌N3、蜡状芽孢杆菌N4、荧光假单胞菌S1、假单胞菌P3的抑菌活性在培养基pH5时最强。显著性分析发现,除蜡状芽孢杆菌N4外,乌梅醇提物对类芽孢杆菌N3、荧光假单胞菌S1、假单胞菌P3的抑菌圈直径在培养基pH5时与培养基pH6时没有显著差异($P > 0.05$);对成团泛生菌N2的抑菌活性在培养基pH6时最强;对产气肠杆菌V9的抑菌活性在培养基pH7时最强,但与pH5和pH6时的抑菌圈直径没有显著差异($P > 0.05$)。因此总体看来,乌梅醇提物在培养基pH5和pH6时抑菌活性较强。

2.4 加热处理对乌梅醇提物抑菌性的影响

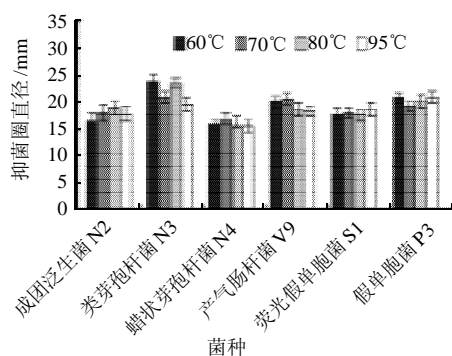
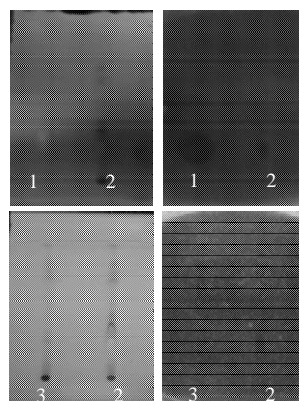


图2 加热处理对乌梅醇提物抑菌性的影响

Fig.2 Effect of temperature on antibacterial activity of ethanol extract from *Fructus Mume*

由图2可以看出,温度的增高对乌梅醇提物的抑菌作用影响不大。除类芽孢杆菌N3外,不同温度处理的乌梅醇提物对其他菌的抑菌圈直径无显著性差异($P > 0.05$)。温度对提取液抑菌效果的影响,可能是提取液受热浓缩或提取液中的有效物质挥发或是分解,从而导致提取液抑菌作用的增大或减弱。Hsieh^[10]研究发现肉桂乙醇提取物在100℃条件下处理20min,其抑菌作用略有增强,将其原因归结为高温处理时提取物的水分会挥发,导致提取物浓度的增大,从而使抑菌作用增强。

2.5 薄层析-生物自显影确定乌梅醇提物的主要抑菌成分



1.柠檬酸; 2.乌梅醇提液; 3.被碱中和成pH7的乌梅醇提液。

图3 薄层层析-生物自显影结果

Fig.3 TLC-bioautographic images of different samples

由图3可见,乌梅醇提物的Rf值为0.186~0.286的组分有抑菌作用,与柠檬酸的自显影结果相同。为进一步验证主要抑菌成分是否为有机酸类,把乌梅醇提液用NaOH中和到pH7,自显影结果显示抑菌作用消失,因此初步推断乌梅醇提物的主要抑菌成分是有有机酸类。

3 讨论

乌梅醇提物对成团泛生菌、产气肠杆菌、假单胞菌、荧光假单胞菌、类芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌有较强的抑菌作用。陈战国等^[11]建立的RP-HPLC同时测定乌梅中8种有机酸成分,包括草酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸、乳酸、醋酸、柠檬酸和琥珀酸,发现柠檬酸的含量最高,达到16%。有学者认为多数致病菌在pH6~8范围内生长最好,酶的活性度高,生长繁殖旺盛,若将其置于pH值小于4的环境下,则大多数致病菌难以存活^[12],因此酸性环境对细菌具有一定的抑制作用。沈红梅等^[13]对乌梅水提物抗6种常见肠道致病菌的作用进行了体外实验研究,并比较了乌梅中主要有机酸及其中性盐的抑菌效果,体外抑菌实验证实乌梅所含有机酸的抑制作用强于有机酸盐,但从乌梅水溶液总的作用来看,乌梅的总酸度只是影响抑菌作用的一个方面,可能还有别的化学成分协同作用,如5-羟基-2-呋喃醛^[14]、苦味酸^[15]等。本实验通过薄层层析-生物自显影法初步确定乌梅醇提物的主要抑菌成分为有机酸类,但是乌梅醇提物的其他抑菌成分有哪些,各抑菌成分之间的相互作用还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 阮毅铭. 乌梅的化学成分及药理作用概述[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(5): 793-794.

- [2] 任少红, 付丽娜, 王红, 等. 乌梅中生物碱成分的分离与鉴定[J]. 中药材, 2004, 27(12): 917-918.
- [3] 郭长海, 候雪, 王红, 等. 乌梅中黄酮成分的分离与鉴定[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1613-1614.
- [4] CORRADO M, RODRIGUES K F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by entophytic strains of *Phomopsis* sp.[J]. Basic Microbiol, 2004, 44: 157-160.
- [5] CHOMA M, CHOM A, STASZCZUK K. Determination of flumequine in milk by thin layer chromatograph chromatography -bioautography[J]. Journal of Liquid Chromatography Related Technologies, 2002, 25(10): 1579-1587.
- [6] WEDGE D E, NAGLE D G. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens[J]. Nat Prod, 2000, 63(8): 1050-1054.
- [7] 郑钧镛, 王光宝. 药品微生物学及检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [8] 吴周和, 徐燕, 吴传茂. 八角中天然防腐剂的提取方法及其抑菌作用研究[J]. 中国调味品, 2003(9): 18-21.
- [9] 冯仁丰. 食品实用医学检验学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1996.
- [10] HSIEH P C. Antimicrobial effect of cinnamon extract[J]. Taiwanese Journal of Agriculture Chemistry and Food Science, 2000, 38: 184-193.
- [11] 陈战国, 恩伯提, 张志琪. RP-HPLC 同时测定乌梅中 8 种有机酸含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1783-1785.
- [12] 张健, 焦东桂. 5 例中药的酸性与其药理作用的关系[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(2): 23.
- [13] 沈红梅, 乔传卓, 苏中武, 等. 采收、加工、植物基原对乌梅抑菌作用的影响[J]. 中药材, 1994, 17(8): 25-28.
- [14] 范崔生. 中药采收鉴别应用全书[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1995: 384.
- [15] 龚勇. 乌梅干的药用[J]. 国外医药: 植物药分册, 1991, 6(1): 45-46.