

石榴皮单宁的提取、纯化及 抑菌作用的研究

徐云凤, 李光辉, 梁秀君, 沙影, 陆继源, 夏效东*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:石榴皮中含有丰富的单宁类物质,具有良好的抑菌活性。以丙酮为提取溶剂,采用超声波辅助法对石榴皮单宁进行提取,并用Amberlite XAD-16大孔吸附树脂纯化,经高效液相色谱对其组分进行分析后,采用琼脂稀释法做最小抑菌浓度实验,结果表明:石榴皮提取物的主要成分为安石榴苷,纯化后质量浓度由12.3%提高到64.2%;石榴皮粗提物对金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度分别为0.312、10、0.625mg/mL和大于10mg/mL,纯化物对四种菌的最小抑菌浓度分别为0.156、5、0.625、10mg/mL。

关键词:石榴皮单宁,纯化,高效液相色谱,抑菌作用

Study on extraction, purification and antimicrobial activity of pomegranate peel tannins

XU Yun-feng, LI Guang-hui, LIANG Xiu-jun, SHA Ying, LU Ji-yuan, XIA Xiao-dong*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Pomegranate peel is rich in tannins which have a good antibacterial activity. Pomegranate peel tannins were extracted by acetone in ultrasonic-assisted extraction method. After that they were purified by Amberlite XAD-16 macroporous resin. Then high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was taken to determine the components and agar dilution method was adopted to test the minimal inhibitory concentration (MIC). The results indicated that the concentration of punicalagin, the main component of pomegranate peel extract, increased from 12.3% to 64.2% after purification. The MICs of pomegranate peel crude extract on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *E. coli* were 0.312, 10, 0.625mg/mL and larger than 10mg/mL, while the MICs of purified extract for these four kinds of bacteria were 0.156, 5, 0.625 and 10mg/mL respectively.

Key words: pomegranate peel tannins; purification; HPLC; antimicrobial activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)02-0083-04

石榴 (*Punica granatum* L.) 为石榴科 (Punicaceae) 石榴属 (*Punica* L.) 落叶灌木或小乔木, 原产于地中海至非洲西部, 主要分布于亚热带及温带地区^[1]。我国的石榴资源丰富, 种类众多, 是国内重点发展的水果之一。石榴果实不仅营养丰富, 而且多个部位都具有较为广泛的药用价值。其中药用价值最为突出的是石榴果皮, 为《中国药典》历版所记载, 其功效为涩肠止泻、止血、驱虫, 在中国和其他国家传统医药中可用于治疗腹泻、痢疾等肠道疾病^[2]。

目前控制食品中致病菌主要采用化学防腐剂。随着近年来对合成的化学防腐剂的安全性不断提出质疑, 同时人们对食品添加剂有着天然、营养和功能化的三大要求, 寻求安全、高效的天然食品防腐剂已

成为食品领域的一个研究热点^[3], 探索天然抗菌物质对于预防和控制食源性致病菌的感染有着重要的意义。石榴皮富含酚类物质, 体外研究已发现, 石榴皮提取物对一些常见的致病微生物有一定的抑制作用^[4-6], 且其中的单宁类物质被认为是发挥抑菌作用的主要物质。然而, 很多关于石榴皮提取物的功能性研究中, 并未对其组分进行分析, 亦或只是测定了其中总黄酮或总多酚等的含量^[7-9]。因此, 本实验旨在对石榴皮中的单宁类物质进行提取、纯化及液相分析, 确定其组分及含量, 并对比粗提物与纯化物对四种常见食源性致病菌的抑菌效果, 为石榴皮资源的开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

峰城软籽石榴 产自陕西省临潼区, 采摘后当天运回实验室, 除去病果和裂果, 洗净, 手工取皮, 并置于50℃下恒温烘干, 粉碎后过60目筛, 粉末置于密封袋中避光备用; 供试菌株 分别为单核细胞增生

收稿日期: 2013-06-24 * 通讯联系人

作者简介: 徐云凤(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事天然植物提取物抑菌方面的研究。

基金项目: 国家自然科学基金(31101347)。

李斯特氏菌CMCC 54004、金黄色葡萄球菌ATCC 25923、沙门氏菌SL1344和大肠杆菌ATCC 25922;安石榴昔(纯度98%)、没食子酸(纯度99.5%) 成都曼思特生物科技有限公司;鞣花酸(纯度98%) 天津一方科技有限公司;磷酸(优级纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯) 美国TEDIA公司;Amberlite XAD-16大孔吸附树脂 美国SIGMA公司;LB琼脂、LB肉汤 北京陆桥技术有限责任公司;其他试剂 分析纯,为市售。

DGG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司;KQ5200DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;RE-52AA型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;超净工作台、LGJ型冷冻干燥机 北京亚泰科隆仪器技术有限公司;超纯水制造系统 成都越纯科技有限公司;Waters 600E型高效液相色谱仪 美国WATERS公司;AL204型电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;细菌培养箱 上海福玛实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 石榴皮单宁的提取 用60%丙酮作为提取溶剂,按照料液比为1:10,在40℃下,采用超声波辅助法进行提取,超声时间为10min,用真空泵抽滤后,将滤渣在相同条件下进行二次提取,合并提取液,50℃旋转蒸发,得到浓缩液。

1.2.2 石榴皮单宁的纯化

1.2.2.1 大孔吸附树脂的预处理 Amberlite XAD-16大孔吸附树脂的预处理方法参照朱静等^[9]的方法。将大孔吸附树脂用无水乙醇浸泡24h后,用水冲洗至无醇味;用3% HCl处理3h,用水洗至中性;然后用3% NaOH浸泡3h,用水洗至中性;再用3% HCl处理3h,用水洗至中性后浸泡在无水乙醇中或直接使用。

1.2.2.2 单宁的纯化 取一定量树脂,采用湿法装柱(柱长径比为6:1),将提取物浓缩液过柱。上样量为200mL浓缩液/500g树脂,用大量水洗脱去糖(约4L),直到流出液澄清为止,用100%甲醇洗脱单宁(约800mL),收集洗脱液于50℃旋转蒸发,再进行真空冷冻干燥,得到浅棕色粉末状的纯化物^[10]。

1.2.3 液相色谱分析

1.2.3.1 标准样品的配制 准确称取没食子酸、安石榴昔、鞣花酸各0.002g,用甲醇溶解,分别用容量瓶定容至10mL,配制成0.2mg/mL的标准储备液,-20℃保存。临用前精密量取没食子酸储备液0.8mL,安石榴昔储备液2.4mL,鞣花酸储备液0.8mL,混合均匀,作为最高浓度混合标准溶液,上样前用0.45μm滤膜过滤。

1.2.3.2 样品溶液的配制 准确称取粗提物、纯化物各0.002g,用甲醇溶解,分别定容至10mL,上样前用0.45μm滤膜过滤。

1.2.3.3 色谱条件和洗脱程序 色谱柱为Diamondsil C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm),柱温30℃,紫外检测器,波长280nm,流动相为0.1%磷酸水溶液(A液)和0.1%磷酸乙腈溶液(B液),线性梯度洗脱,流速为1.0mL·min⁻¹,进样量10μL。梯度洗脱程序:0~10min 5%~40% B,10~20min 40%~55% B,20~25min 55%~60% B,25~30min 60%~90% B,30~35min 90%~5%

B,35~45min 5% B。

1.2.4 抑菌效果研究

1.2.4.1 菌悬液的制备 将四种菌从-80℃冰箱取出后,在LB琼脂培养基上活化,再分别挑取单菌落于LB肉汤中培养18h,4000r/min离心10min,用PBS洗一遍,再用PBS将菌悬液吸光度调至0.5左右,稀释100倍(约含菌10⁶CFU/mL)备用。

1.2.4.2 最小抑菌浓度(MIC)实验 采用琼脂稀释法,向灭菌后冷却至50℃的LB培养基中加入石榴皮粗提物与纯化物,使其终浓度分别为10、5、2.5、1.25、0.625、0.312、0.156、0.078mg/mL,各倒入两个培养皿中做平行实验。待冷却凝固后,将平板平均划分为四个区域,用于接种四种细菌。使用移液枪在每个区域的琼脂表面滴加2μL菌悬液,各加3滴作为3个平行,待干燥后将平板置于37℃恒温培养箱中倒置培养24h,观察细菌生长情况。以不加石榴皮单宁的平板为阳性对照。确定无菌生长的最低稀释浓度为石榴皮提取物的最小抑菌浓度。

2 结果与分析

2.1 液相色谱检测石榴皮提取物的成分及含量

图1A说明,在1.2.3所指定的色谱条件下,混合标样中四种标样达到了基线分离,效果良好。其中,1为没食子酸,2为安石榴昔α,3为安石榴昔β,4为鞣花酸,安石榴昔α和安石榴昔β为安石榴昔的两个同分异构体。图1B和图1C分别为粗提物与纯化物的高效液相色谱图。

根据保留时间进行定性,根据不同组分的峰面积与其含量的线性关系,利用单点校正法进行定量。可知,粗提物中没食子酸质量分数为0.1%,安石榴昔α、β同分异构体质量分数合计为12.3%,鞣花酸质量分数为0.7%;经大孔吸附树脂纯化后,没食子酸未检出,安石榴昔质量分数升高到64.2%,鞣花酸质量分数升高到2.1%。

2.2 抑菌效果评价

最小抑菌浓度实验表明,石榴皮粗提物对金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度分别为0.312、10、0.625mg/mL和大于10mg/mL;石榴皮纯化物对四种菌的最小抑菌浓度分别为0.156、5、0.625、10mg/mL。石榴皮粗提物与纯化物均对金黄色葡萄球菌ATCC 25923的抑菌效果最好,对大肠杆菌ATCC 25922的抑菌效果最差。石榴皮纯化物的抑菌效果明显优于粗提物的抑菌效果。

2.3 讨论

2.3.1 大孔吸附树脂由于其具有比表面积大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和、容易再生等诸多优点,近年来在天然产物分离纯化中的应用越来越多^[11]。石榴皮多酚主要为鞣花单宁,分子中虽含多个酚羟基,但酰基和鞣花酰基等结构的存在使其具有一定的疏水性^[12];Amberlite XAD-16是一种非离子型多聚吸附树脂,其吸附的特性主要是由于独特的大孔网络结构、高的比表面积和其表面芳香环的独特结构,可用于吸附极性溶剂中的疏水分子,国内外均有采用Amberlite XAD-16纯化石榴皮多酚的报

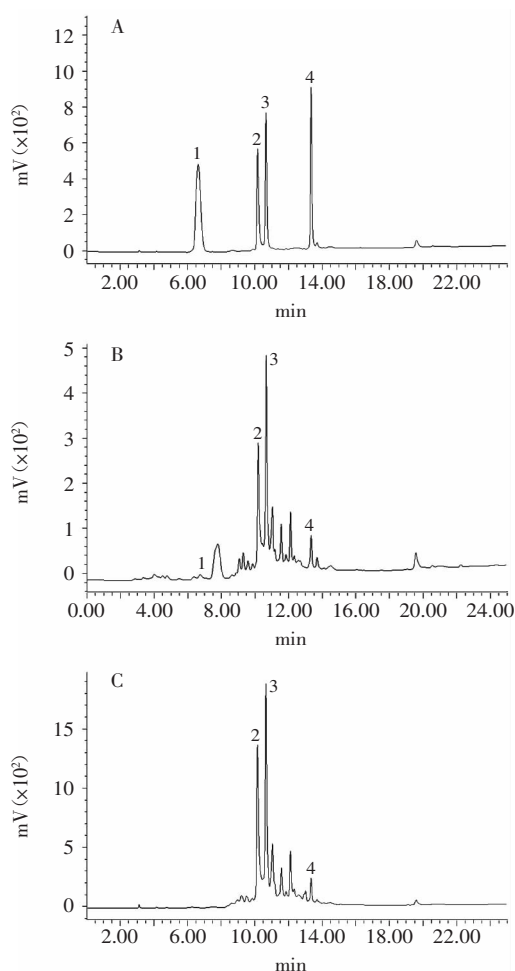


图1 标准品、粗提物及纯化物液相色谱图

Fig.1 The chromatogram of standards, crude and purified extracts

注: A: 标准品, B: 粗提物, C: 纯化物, 1. 没食子酸, 2. 安石榴苷 α , 3. 安石榴苷 β , 4. 鞣花酸。

道^{9-10, 13}], 因此本研究选择XAD-16大孔吸附树脂对石榴皮单宁进行纯化, 并得到了理想的纯化效果。

2.3.2 流动相的选择是建立HPLC方法的关键, 酚类物质的液相分析一般采用乙腈-水或甲醇-水作为流动相, 进行梯度洗脱。同时为了防止酚酸类化合物电离而影响实验结果, 常需在流动相中加入酸性抑制剂, 增大其分布系数, 从而改善色谱峰的峰形和分离度^[14]。通过实验和对比分析^[15-17], 选用0.1%磷酸乙腈-0.1%磷酸水作流动相, 可以达到基线分离。没食子酸在270nm、鞣花酸在254nm、安石榴苷在258、378nm下有较强的吸收峰, 综合考虑选择280nm作为检测波长。经优化梯度洗脱程序, 建立了能很好的将待检测成分分离的色谱条件。

2.3.3 天然植物提取物抑菌实验一般采用扩散或稀释的方法, 前者包括纸片扩散法与孔扩散法, 常以抑菌圈直径表示; 后者又包括琼脂稀释法、肉汤稀释法与肉汤微量稀释法^[18]。但是目前对这些方法所得的实验结果尚没有统一的判断标准, 主观性比较强, 不同研究人员对结果的判断会有较大误差。本实验采用琼脂稀释法, 参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)关于微生物耐药性实验的方法, 以有无细菌生长为判断指标来表示抑菌效果。

2.3.4 石榴皮单宁是由安石榴苷、没食子酸、鞣花酸等组成的混合物, 经Amberlite XAD-16树脂纯化后安石榴苷的纯度显著提高, 其表现出的体外抑菌活性也随之增强。因此, 我们推测安石榴苷是石榴皮多酚中起主要抑菌作用的一种物质。

3 结论

Amberlite XAD-16大孔吸附树脂可有效提高石榴皮丙酮提取物中总单宁的含量, 其主要成分安石榴苷的质量分数由12.3%提高到了64.2%。同时, 最小抑菌浓度实验表明, 石榴皮提取物对金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性, G⁺)的抑菌效果最好, 其次为沙门氏菌(革兰氏阴性, G⁻), 对大肠杆菌(G⁻)的抑菌效果最差; 纯化物对四种常见食源性致病菌的抑菌效果明显优于粗提物的抑菌效果。

表1 粗提物抑菌效果

Table 1 Antibacterial effects of crude extract

受试菌	不同浓度(mg/mL)下细菌生长情况								
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	CK
单增李斯特菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	+	+	+
大肠杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
沙门氏菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有细菌生长;表2同。

表2 纯化物抑菌效果

Table 2 Antibacterial effects of purified extract

受试菌	不同浓度(mg/mL)下细菌生长情况								
	10	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	CK
单增李斯特菌	-	-	+	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	+	+
大肠杆菌	-	+	+	+	+	+	+	+	+
沙门氏菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+

参考文献

- [1] 何锦,李勇. 石榴化学成分及其保健功能的研究进展[J]. 粮油食品科技,2012,20(2):42-45.
- [2] 董周永,郭松年,赵国建,等. 石榴果皮提取物抑菌活性研究[J]. 西北植物学报,2008,28(3):582-587.
- [3] Tiwari B K, Valdramidis V P, O' Donnell C P, *et al.* Application of natural antimicrobials for food preservation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(14):5987-6000.
- [4] 乔树华. 石榴皮抑菌活性的初步研究[D]. 北京:中国农业科学院,2009.
- [5] Kanatt S R, Chander R, Sharma A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products[J]. International Journal of Food Science & Technology,2010,45(2):216-222.
- [6] Al-Zoreky N S. Antimicrobial activity of pomegranate(*Punica granatum* L.) fruit peels[J]. International Journal of Food Microbiology,2009,134(3):244-248.
- [7] Hayrapetyan H,Hazeleger W C,Beumer R R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate(*Punica granatum*) peel extract in meat pate at different temperatures[J]. Food Control,2012,23(1):66-72.
- [8] 李巨秀,张小宁,李伟伟. 不同品种石榴花色苷、总多酚含量及抗氧化活性比较研究[J]. 食品科学,2011,32(23):143-146.
- [9] 朱静,陆晶晶,袁其朋. 大孔吸附树脂对石榴皮多酚的分离纯化[J]. 食品科技,2010,35(1):188-193.
- [10] Seeram N, Lee R, Hardy M L, *et al.* Rapid large scale

- purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry[J]. Separation and Purification Technology,2005,41(1):49-55.
- [11] 赵艳红,李建科,李国荣. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学,2010,31(11):31-37.
- [12] 张茜,贾冬英,姚开,等. 大孔吸附树脂纯化石榴皮多酚[J]. 精细化工,2007,24(4):345-349.
- [13] Aqil F,Munagala R,Vadhanam M V,*et al.* Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk[J]. Food Research International,2012,49(1):345-353.
- [14] 焦中高,刘杰超,周红平,等. 枣果中酚类物质的高效液相色谱分析[J]. 食品与发酵工业,2008,34(3):133-136.
- [15] 曲文娟,张渭洁,徐敏瑶,等. 高效液相色谱测定石榴皮水提取物中4种多酚化合物的含量[J]. 分析测试学报,2011,30(12):1425-1429.
- [16] 赵海燕,杨永红,刘泰然,等. 高效液相色谱法同时测定保健食品中的安石榴甙和鞣花酸[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(4):333-335.
- [17] Zhou Honghao, Yuan Qipeng, Lu Jingjing. Preparative separation of punicalin from waste water of hydrolysed pomegranate husk by macroporous resin and preparative high-performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry,2011,126(3):1361-1365.
- [18] Klanecnik A, Piskemik S, Jergek B, *et al.* Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts[J]. Journal of Microbiological Methods,2010,81(2):121-126.

(上接第82页)

他霉素的包埋常数分别为 3.803×10^{-5} 和 1.362×10^{-3} ;虽然 γ -CD无法计算其包埋常数,但在低浓度时就表现出明显优于 α -、 β -环糊精的包埋特性。

3.2 饱和的 α -、 β -、 γ -环糊精水溶液能够分别使纳他霉素的溶解度增加4.8、15.5、104倍,而复合环糊精能够使纳他霉素的溶解度增加约157倍。

3.3 复合环糊精包埋纳他霉素的包埋率为57.15%,在60℃下储藏6d后发现,经复合环糊精包埋的纳他霉素的保留率高达98.8%以上,表明复合环糊精对于增加纳他霉素的储藏稳定性及热稳定性具有较好的作用。

3.4 复合环糊精作为廉价的原料,为提高纳他霉素的溶解度,进而增加其在食品中的应用范围提供依据。

参考文献

- [1] Natamycin. Code of federal regulations[M]. USA:Federal Register,2001.
- [2] Stark J. Permitted preservatives-natamycin[M]. USA:Academic Press,2000.
- [3] Schaffner CP, Mechlinski W. Polyene macrolide derivatives. II. Physical-chemical properties of polyene macrolide esters and their water soluble salts[J]. The Journal of Antibiotics,1972,25:259-260.
- [4] Korteweg G C J, Szabo K L H, Rutten A M G, *et al.* Some

pharmacological properties of pimaricin and possible clinical application of this antifungal antibiotic[M]. In International Symposium of Chemotherapy,1963:261-272.

- [5] 金征宇,徐学明,陈寒青,等. 环糊精化学——制备与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [6] 金征宇,顾正彪,童群义,等. 碳水化合物化学——原理与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007:142-150.
- [7] John L, Koonts J E. Formation of natamycin:cyclodextrin inclusion complexes and their characterization[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,2003,51:7106-7110.
- [8] Wang J, Jin Z, Xu X. Gamma-cyclodextrin on enhancement of water solubility and store stability of nystatin[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry:DOI:10.1007/s10847-012-0281-y.
- [9] 王贵芳,赵少华. 那他霉素的特性及其在食品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2006(2):145-149.
- [10] Koontz J L, Marcy J E, Barbeau W E, *et al.* Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(24):7111-7114.
- [11] Higuchi T, Connors K A. Phase-solubility techniques[J]. Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation,1965(4):117-212.