

核桃青皮提取物的抑真菌活性研究

丁存宝¹, 吴尚卓², 李桂秋³, 贾长虹¹, 常丽新¹

(1. 河北联合大学生命科学学院, 河北唐山 063009) (2. 河北联合大学化学工程学院, 河北唐山 063009)

(3. 遵化市西郊医院, 河北遵化市 064200)

摘要: 核桃青皮中含有种类较为丰富对供试真菌具有抑菌活性的次生代谢物质。以核桃青皮为原料, 乙醇、石油醚、正丁醇、乙酸乙酯以作为提取剂进行浸提, 得到核桃青皮的提取液, 选取酵母菌、青霉、木霉、马拉色菌、脚气真菌作为供试菌种, 通过实验观察不同溶剂提取液对供试菌种的抑制作用, 研究核桃青皮提取物对真菌的抑制作用。核桃青皮中含有胡桃醌、多糖、黄酮等多种活性成分, 利用分光光度法测定黄酮、胡桃醌、多糖的吸光值, 通过吸光值计算提取物中各成分的质量浓度。结果表明: 核桃青皮不同极性溶剂的浸提液对酵母菌、青霉、木霉均有抑制效果。核桃青皮 95% 乙醇浸提液对脚气真菌的抑制效果显著, 抑菌率为 59.64%; 正丁醇核桃青皮浸提液对脚气真菌、马拉色菌有抑制效果。通过核桃青皮不同极性溶剂浸提液抑菌率的比较, 和核桃青皮中所含三种活性物质的浓度与抑菌机制可知, 核桃青皮不同极性溶剂的浸提液中主要起抑菌作用的是胡桃醌。

关键词: 抑真菌活性; 核桃青皮; 胡桃醌; 黄酮; 多糖

文章编号: 1673-9078(2013)4-722-724

Anti-fungal Activity of Walnut Green Husk Extracts

DING Cun-bao¹, WU Shang-zhuo², LI Gui-qiu³, JIA Chang-hong¹, CHANG Li-xin¹

(1. Hebei United University, College of Life Sciences, Tangshan, 063009, China) (2. Hebei United University, College of Chemical Engineering, Tangshan 063009, China) (3. Zunhua Xijiao Hospital, Tangshan 063009, China)

Abstract: Walnut green husk contains abundant types of secondary metabolites with antibacterial activity against fungi. Using walnut green husk as raw materials and organic solvent (ethanol, petroleum ether, butanol or ethyl acetate) as extraction reagent, walnut green husk extracts was obtained and their inhibition effect on selected yeasts (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Malassezia* and athlete's foot fungus) were investigated. Results showed that walnut green husk contained several kinds of active ingredients, such as juglone, polysaccharides and flavonoids. The concentration of each component in the extract was determined by spectrophotometer. Walnut green husk extracts by different solvents showed inhibitory effect on yeast, *Penicillium* and *Trichoderma*. Ethanol (95%) extracts of walnut green husk had significant inhibitory effect on athlete's foot fungus with inhibitory rate being of 59.64%. Butanol walnut green husk extract had inhibitory effects on the athlete's foot fungus and *Malassezia*. Comparative analysis of the anti-fungal activity and concentrations of active substances in walnut green husk extracts showed that juglone was the main active components in walnut green husk extracts.

Key words: anti-fungal activity; juglone; walnut green husk; flavonoids; polysaccharides

核桃青皮为核桃属核桃 (*Juglans regia* L.) 和核桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim.) 的未成熟外果皮。性味苦、涩、平, 多以其清热解毒、祛风疗癣、止痛止痢功效入药。为了充分利用核桃青皮这一资源, 已有学者对核桃青皮提取物的除草、杀虫以及抗病毒等药物活性做了研究, 但对其抑菌活性方面的研究和应用报道较少^[1]。

本实验主要用核桃青皮不同极性溶剂的浸提液进行抑真菌实验, 通过实验证明核桃青皮不同极性溶剂的浸提液有抑真菌效果, 并通过分光光度法测定核桃

青皮不同极性溶剂浸提液中所含主要活性成分的质量浓度, 通过比较几种主要活性成分抑菌机制和各浸提液的抑菌率, 推测浸提液中主要的活性抑菌物质是胡桃醌类成分。从植物中提取的胡桃醌是纯天然物质, 具有抗菌、消炎、低毒、无残留等特点, 具有合成食品添加剂或抑菌剂无法比拟的优点, 人们越来越倾向于选择天然物质作为抑菌防腐剂^[2]。

1 材料方法

1.1 实验材料及试剂

核桃青皮取自河北遵化市核桃产区, 先用自来水洗净, 再用蒸馏水冲洗两遍并用剪刀剪成均匀的小块, 放入电热鼓风干燥箱中, 在 60~65 °C 烘干至脆。将已

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 河北联合大学博士科研启动基金

作者简介: 丁存宝(1976-), 男, 博士, 副教授

烘干的核桃青皮粉碎，储存备用。

酵母菌、青霉、木霉、脚气真菌、马拉色菌为本室保存。

常规分析纯试剂购自天津市永大化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃浸提液的制备

采用平行提取法^[3]，称取准备好的核桃青皮粉末5份，每份50 g，分别装于1000 mL的具塞三角瓶中，加入250 mL的不同提取溶剂石油醚、正丁醇、乙酸乙酯、95%乙醇，在常温摇床上浸提3次，每次静置2 h，摇动2 h。将提取液过滤，浓缩，放置4 °C冰箱内待用。

1.2.2 PDA 培养基配制及菌种的培养

PDA 培养基的制备，取 200 g 去皮马铃薯，切成小块后加 1 L 水，沸水煮 30 min，双层纱布过滤，滤液加 20 g 葡萄糖、15 g 琼脂粉，用蒸馏水定容至 1 L，调整 pH 值到 5.6~6.0。取 500 mL 锥形瓶分装，作为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)，于 121 °C 高温湿热灭菌 20 min，倒平板，每皿约 15 mL，静置直至培养基凝固，将所有菌种，酵母菌、青霉、木霉、脚气真菌、马拉色菌接种，置于 27 °C 下培养 24~48 h。菌种培养好后置于 5 °C 冰箱内保存待用。

1.2.3 抑菌活性试验

将核桃青皮95%乙醇、乙酸乙酯、正丁醇、石油醚浸提液分别倒入灭菌后的培养皿中，再分别放入已灭菌的滤纸片，滤纸片直径为10 mm，让滤纸片浸泡30 min。再将灭菌好的PDA培养基倒入平板，每培养皿大约15 mL，待凝固后，进行编号，将0.5 mL真菌菌种酵母菌、青霉、木霉、脚气真菌、马拉色菌的菌悬液分别接入相应的培养皿中，然后用无菌涂布棒涂布均匀。之后将充分吸收不同溶剂的滤纸片轻轻移取到不同的培养基上，每皿放三片用同一浸提液浸泡的滤纸片，置于27 °C恒温培养箱中培养24~72 h。观察抑菌圈大小，用字交叉法测量抑菌圈直径，取其平均值作为试验结果。以各提取液的溶剂纯溶液做阴性对照，以恩诺沙星（1 mg/mL）作为阳性对照。

1.2.4 黄酮、胡桃醌、多糖质量浓度的测定

参照文献，分别绘制黄酮^[4]、胡桃醌^[5]及多糖^[6]的标准曲线，采用分光光度法测定各成分的质量浓度，核桃青皮中多糖、黄酮和胡桃醌的最大吸收波长分别为490 nm、510 nm和426 nm。

2 结果及讨论

2.1 核桃青皮浸提液中胡桃醌、黄酮、多糖有效成分的质量浓度

根据上述方法分别测定各浸提液吸光值，计算各成分含量如图1所示。

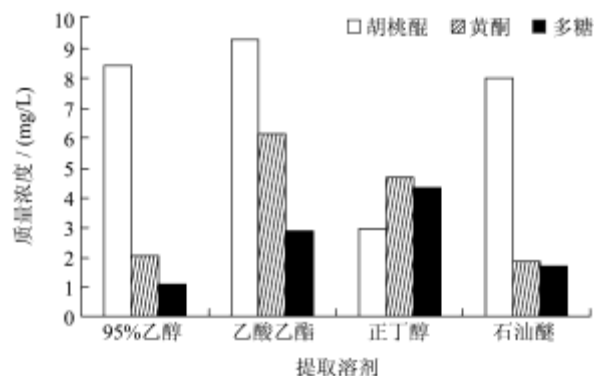


图1 各活性物质质量浓度

Fig.1 The quality of the active substance concentration

由上图可得：核桃青皮浸提液中胡桃醌质量浓度顺序为：乙酸乙酯>95%乙醇>石油醚>正丁醇，核桃青皮乙酸乙酯浸提液中胡桃醌的质量浓度最高，核桃青皮正丁醇浸提液中胡桃醌质量浓度最低。核桃青皮浸提液中黄酮质量浓度顺序为：乙酸乙酯>正丁醇>95%乙醇>石油醚。核桃青皮浸提液中多糖质量浓度顺序为：正丁醇>乙酸乙酯>石油醚>95%乙醇。

2.2 核桃青皮浸提液抑菌活性

根据抑菌实验，测定各溶剂提取液的抑菌活性，如下图所示。

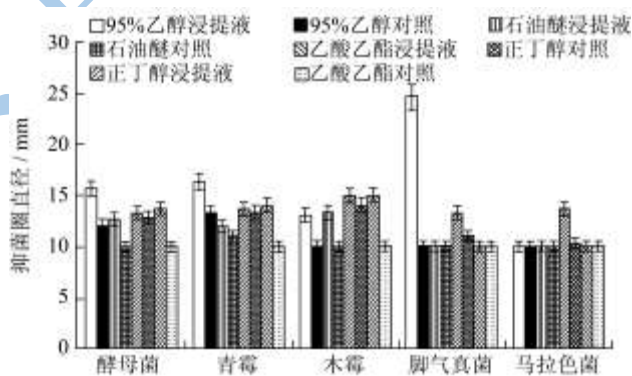


图2 不同极性核桃青皮浸提液抑菌效果

Fig.2 Anti-fungal effects of extracts in different polarity from walnut Peel

核桃青皮 95% 乙醇浸提液对酵母菌、青霉、木霉抑制作用效果显著，对脚气真菌有非常显著的效果，而对马拉色菌无抑制作用。核桃青皮石油醚浸提液对酵母菌、青霉、木霉抑制作用效果显著，而对脚气真菌和马拉色菌无抑制作用。核桃青皮正丁醇浸提液对五种菌均有抑制作用，且对木霉的抑制作用效果最为显著。核桃青皮乙酸乙酯浸提液对酵母菌、青霉、木霉的抑制作用效果显著，对脚气真菌和马拉色菌无抑制作用。

2.3 不同核桃青皮浸提液抑菌率

抑菌率计算公式:

抑菌率=[(浸提液抑菌圈直径-阴性对照抑菌圈直径)/浸提液抑菌圈直径]×100%

浸提液抑菌率如图3所示。

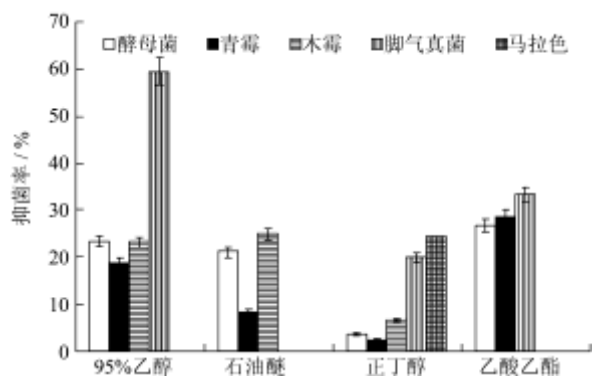


Fig.3 Anti-fungal rate of various solvent extracts

乙酸乙酯核桃青皮浸提液对酵母菌、青霉、木霉的抑制效果最好，对脚气真菌、马拉色菌无明显抑制效果；各溶剂的浸提液对酵母真菌、青霉、目霉均有抑制效果；对脚气真菌有抑制效果的是95%乙醇浸提液和正丁醇浸提液，且95%乙醇浸提液对脚气真菌的抑制效果高达59.46%；对马拉色菌有抑制效果的仅有正丁醇浸提液。

2.4 胡桃醌对五种真菌的最低抑菌浓度的测定

根据上述结果，将95%乙醇浸提液浓缩后，以胡桃醌含量为标准配制成6种浓度，就其对5种真菌的抑菌活性进行研究，结果见图4。

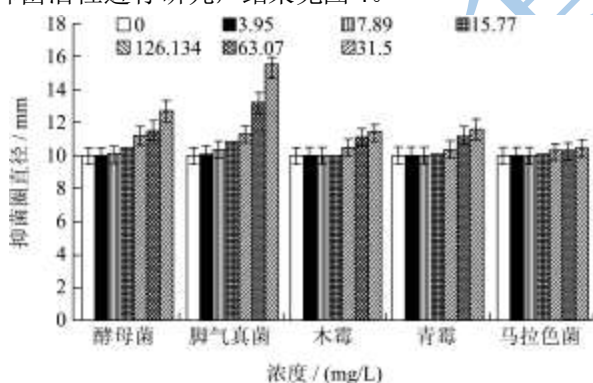


图4 胡桃醌提取成分对五种真菌的最小抑菌浓度

Fig.4 Minimum inhibitory concentration(MIC) of juglone to five fungi

由图4可以看出，随着核桃青皮乙醇浸提液中胡桃醌浓度的降低，对5种供试真菌的抑制显著降低。在胡桃醌浓度为126.13 mg/L、63.07 mg/L时，均能抑制五种真菌的生长。在胡桃醌浓度为31.54 mg/L时，仍能抑制酵母菌、脚气真菌及木霉的生长。在胡桃醌为15.77 mg/L时，对五种供试细菌的抑制效果稍微降低，但仍能达到抑菌效果，表现出广谱的抑菌活性。

由图4还可看出，在胡桃醌浓度为7.89 mg/L时，对脚气真菌存在有效的抑制作用，即胡桃醌对脚气真菌的最低抑菌浓度为7.89 mg/L。同理可知，胡桃醌对酵母菌的最低抑菌浓度为15.77 mg/L。对木霉和青霉的最小抑菌浓度为31.54 mg/L。由此可知，本实验中胡桃醌对于五种试验菌的抗菌活性由大到小的循序是：脚气真菌，酵母菌，木霉，青霉，马拉色菌。

3 结论

3.1 核桃青皮中含有种类较为丰富的对供试真菌具有抑菌活性的次生代谢物质，如酚类、黄酮类、生物碱、萜类、皂苷和有机酸等。胡桃醌的抑菌效果主要表现在细菌生长的对数期，并可能通过破坏菌体的细胞壁或细胞膜结构来抑制细菌的生长^[7]；黄酮的抑菌性和杀菌功能与其对金黄色葡萄球菌细胞和细胞壁结构的破坏直接相关^[4]；多糖对大肠杆菌的抑制作用到一定时间会解除，使细胞壁褶皱、粗糙、失去原有的规则性，同时证明，核桃树皮多糖对大肠杆菌的作用是抑制而不是杀死^[6]。

3.2 核桃青皮95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯的浸提液对酵母菌、青霉、木霉的抑制作用效果显著，而核桃青皮正丁醇浸提液对酵母菌、青霉、木霉的抑制作用效果不显著。同时，核桃青皮95%乙醇、石油醚、乙酸乙酯的浸提液中胡桃醌的质量浓度高，而核桃青皮正丁醇浸提液中胡桃醌的含量相对于黄酮与多糖的质量浓度低。对于胡桃醌质量浓度最高的核桃青皮乙酸乙酯浸提液也是抑菌率最高的浸提液。黄酮与多糖质量浓度偏高的核桃青皮正丁醇浸提液对以上三种菌的抑制作用效果不显著。结合以上胡桃醌、黄酮、多糖的抑制作用机制得出对酵母菌、青霉、木霉起主要抑制作用的是胡桃醌，通过最低抑菌浓度测定，也证明随着胡桃醌浓度降低，其抑菌活性也随之降低，这也与Kong等研究一致^[8]。目前本室正在优化胡桃醌的提取工艺、纯品的抗真菌活性及应用的研究。

3.3 胡桃醌类成分作为天然抗真菌活性成分，应用于具有合成食品添加剂或抑菌剂无法比拟的优点。本实验仅限于对核桃青皮粗提物的抑菌活性，活性有效成分浓度的粗测定，但其作用方式和抑菌机理尚不清楚，还需更深入细致地研究和探讨。若加大对核桃青皮低极性部位抑菌活性的研究，从分子水平上阐明其药效物质基础和作用机理，在食品药品防腐剂、广谱抗生素及农业生产等领域将有巨大的应用潜力^[9]。

参考文献

[1] 李海洋,韩军岐,李志西.核桃青皮有效化学成分提取分离

- 研究综述.现代园艺[J].2012,5(15):9-11
- [2] 温文兵,刘淑萍.青龙衣中胡桃醌的研究进展.河北理工大学学报(自然科学版)[J].2011,4(1):141-144
- [3] 龚斌荣,刘华英,司杰.核桃青果皮系统溶剂提取物抑菌作用研究.天津农业科学[J].2012,6(2):46-48
- [4] 丁存宝,刘海燕,李桂秋.月季果黄酮的提取及抑菌作用研究.食品工业[J].2012,3(1):107-110
- [5] 孙墨珑,袁海舰,宋湛谦.分光光度法测定核桃楸树皮中胡桃醌的含量.东北林业大学学报[J].2007,7(6):37-38
- [6] 刘安军,李海燕,王云霞.核桃种皮多糖抑制大肠杆菌的研究.现代食品科技[J].2011,8(1):29-31
- [7] 乔永刚,牛颜冰,乔木.核桃青皮提取物对4种植物枯萎病菌的抑菌作用研究.农学学报[J].2011,7(7):9-12
- [8] Kong YH, Zhang L, Yang ZY. Natural product juglone targets three key enzymes from *Helicobacter pylori*: inhibition assay with crystal structure characterization. *Acta Pharmacol Sin* [J]. 2008, 29(7): 870-6
- [9] Xu HL, Yu XF, Qu SC. Juglone, from *Juglans mandshurica* Maxim, inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Food Chem Toxicol* [J]. 2012, 50(3-4): 590-6