

水蒸气蒸馏法提取茜草精油抑菌活性及其机理的研究

权美平^{1,2,3}, 田呈瑞^{*1}

(1. 陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119; 2. 陕西省河流湿地生态与环境重点实验室, 陕西 渭南 714000; 3. 渭南师范学院 化学与生命科学学院, 陕西 渭南 714000)

摘要: 以滤纸片及刃天青法测定受试菌抑菌圈直径及 MIC、MBC, 为水蒸气蒸馏法提取所得茜草精油的抑菌活性提供依据; 另外, 通过受试菌在受到精油作用后生长曲线、电导率及表面超微结构的变化初步研究了精油的抑菌机理。抑菌圈、MIC 和 MBC 结果表明: 精油对 G⁺(表面葡萄球菌) 和 G⁻(痢疾杆菌) 效果较强; 对 G⁺(枯草芽孢杆菌) 和 G⁻(大肠杆菌) 效果较弱。生长曲线、细胞膜通透性及细菌细胞超微结构的研究结果表明: 抑菌机理可能源于茜草精油能有效地抑制细菌的对数生长期分裂速度, 导致细胞膜渗透性的增加。

关键词: 茜草; 精油; 抑菌活性; 刃天青法

中图分类号: R 284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)08-0843-06

Study on the Antibacterial Activity and Its Mechanism of Essential Oil from Madder (*Rubia cordifolia* L.) Extracted by Hydrodistillation

QUAN Meiping^{1,2,3}, TIAN Chengrui^{*1}

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Key Lab of Ecology and Environment of River Wetland of Shaanxi province, Weinan 714000, China; 3. College of Chemistry and Life Science, Weinan Normal University, Weinan 714000, China)

Abstract: Diameter of inhibition zones (DIZ), MIC & MBC detection via filter paper disk and Resazurin method were investigated on essential oil from the the *Rubia Cordifolia* L. (REO) to provide a scientific basis for the antibacterial activity of REO. In addition, change on growth curve, conductivity and cell surface ultra-microstructure of the tested bacteria treated with REO were also studied to explore the antimicrobial mechanism. The results of DIZ, MIC & MBC showed that REO was more sensitive to G⁺ (*Staphylococcus albus*) and G⁻ (*Shigella dysenteriae*) than G⁺ (*Bacillus subtilis*) and G⁻ (*Escherichia coli*). The results of growth curve, membrane permeability and cell ultrastructure of tested bacteria showed that antibacterial mechanism may due to inhibition split speed of bacterial exponential phase and leading to the increase inpermeability of cell membranes.

Keywords: *Rubia cordifolia*, essential oil, antimicrobial activity, resazurin

收稿日期: 2015-06-10

基金项目: 渭南师范学院化学校级特色学科建设项目(14TSXK04); 2017 年度陕西省教育厅科学研究项目(17JK0274)。

* 通信作者: 田呈瑞(1955—), 男, 陕西周至人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事植物资源开发与利用的研究。E-mail: qmp78@163.com

引用本文: 权美平, 田呈瑞. 水蒸气蒸馏法提取茜草精油抑菌活性及其机理的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(08): 843-848.

茜草(*Rubia cordifolia* L.)俗称红根草、血茜草、活血草、土丹参、血见愁等,是茜草科茜草属多年生攀援草本植物^[1]。茜草的干燥根及根茎,为传统常用中药,始载于《神农本草经》,名为“茜根”,列为上品。茜草自古就被作为天然染料、化妆品和食品的着色剂和药用植物使用^[2-3],具有重要的经济和药用价值。由于茜草干根及茎自古代就作为天然染料、食品的着色剂和药用植物使用,它的化学成分、药理和临床作用被深入系统的研究^[4-5]。其味苦,性寒,归肝、心经,具有凉血、止血、祛瘀、通经之功效,主治吐血、衄血、崩漏、外伤出血、经闭瘀阻、关节痹痛、跌扑肿痛等^[6];亦具抗菌^[7]、抗癌^[8]、增强免疫^[9]、护肝^[10]和抗氧化^[11-12]等生物活性。作为一种中国传统中药材,它有着悠久的历史;而且茜草具有特殊的芳香气味,但到目前为止还未见茜草挥发性成分精油抑菌活性的研究报道。本研究中以水蒸气蒸馏法提取的精油对易引起的食源性疾病的几种常见的食品腐败菌进行抑菌活性研究,并对茜草精油的抑菌机理进行了初步探索,期望可为茜草这一天然植物资源进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

茜草干根:购于西北中药材市场(陕西渭南南源采药者提供),粉碎过40目筛,低温密闭保存备用。

供试菌种:革兰氏阴性菌:*Escherichia coli*(大肠杆菌)、*Shigella dysenteriae*(痢疾杆菌)、*Salmonella typhimurium*(鼠伤寒沙门氏菌);革兰氏阳性菌:*Bacillus cereus*(蜡状芽孢杆菌)、*Staphylococcus aureus*(金黄色葡萄球菌)、*Staphylococcus albus*(表皮葡萄球菌)、*Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌);均由山西师范大学生命科学学院微生物实验室提供。

主要试剂:刃天青(Resazurin),Sigma公司产品;庆大霉素(8万单位),郑州卓峰制药厂产品;牛肉膏、蛋白胨、肉汤培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司产品;其余所用化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

挥发油提取器:西安红伟化玻仪器设备公司产品;Multiskan Go全波长酶标仪:热电公司产品;DDS-307电导率仪:上海精密科学仪器有限公司产品;S-3400N扫描电子显微镜:日本日立公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 茜草精油的提取与制备 采用常规水蒸气蒸馏法提取茜草精油。具体操作如下:粉碎至40目的茜草干粉40g浸泡4h,加水500mL,加热回流提取至精油量不再增加,停止加热;正己烷萃取收集合并挥发油,以无水硫酸钠干燥,得黄色结晶片状固态精油,-40℃保存以备分析。精油的稀释与准备:精确称取80mg的挥发油,加入10mL DMSO,配制成初始质量浓度8mg/mL,然后用倍半法稀释为系列浓度,精油的浓度范围0.0313~8mg/mL。

1.3.2 抑菌活性及机理的测定

1) 抑菌圈的测定:在无菌条件下,参考高春燕等^[13]的方法并略作修改。

2) 刃天青法测定MIC和MBC^[14-15]:将各种菌悬液调节至浓度为 10^7 CFU/mL,混匀取70μL加入到96孔板中,无菌对照组不添加;取等量肉汤培养基和质量浓度为0.02g/dL的刃天青指示剂储备液混匀,将此混匀液取100μL加入到96孔板中;取各质量浓度的茜草精油样品(初始质量浓度为8mg/mL,以两倍稀释法稀释的系列浓度)10μL,依次加入至96孔板中,同时设置无菌对照孔(含有指示剂的混匀液)、阴性对照孔(溶剂对照,含菌种无精油)和阳性对照孔(精油以庆大霉素代替)。将96孔板置于37℃恒温培养,每5~6h观测一次,有细菌生长的孔会逐渐由蓝色变粉色,其中无菌对照孔为蓝色,以发生颜色变化的前一孔为最低抑菌浓度(MIC)。最低抑菌浓度(MIC)确定后,吸取所有未变色浓度的样品5μL,加入到100μL的培养基与刃天青指示剂贮备液中,同样的条件培养24h,仍旧不见颜色变化的管中,最小样品浓度即为MBC。

3) 茜草精油对微生物生长曲线的影响:参考高春燕等^[13]的方法并略作修改。

4) 茜草精油对微生物细胞膜通透性的影响^[16]:取活化后的菌液浓度为 10^7 CFU/mL的菌悬液200mL,以3000r/min离心15min;用质量分数5%的葡萄糖溶液洗3遍,使得菌体的菌悬液与5%的葡萄糖电导率相近。取3个100mL的锥形瓶,各加入上述菌悬液50mL,分别加入1×MIC的精油1mL,以溶剂代替提取液作空白。摇匀后,立即测定电导率值,记为 L_1 。置于室温下,每隔一定时间间隔1、2、4、6、8h取出测定电导率值,记为 L_2 ;实验结束后,取一定量空白组的菌悬液,沸水浴10min,冷却后

测定其电导率,记为 L_0 ;测定质量分数 5%葡萄糖的电导率,记为 L_0' 。电导率的计算方法如下:

相对电导率= $(L_2-L_1)/(L_1-L_0') \times 100$ (1)

(5) 茜草精油对微生物超微结构的影响:按 Kockro 等人的方法并略作修改^[10]。

1.4 统计学处理

实验数据以平均值±标准差表示,数据统计采用 DPS 软件分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈直径测定结果

茜草精油、阴性对照和庆大霉素对食品中常见的 7 种微生物包括 4 种革兰氏阳性菌和 3 种革兰氏阴性菌的抑制作用,结果见表 1。

表 1 茜草精油对微生物的抑菌圈直径(DIZ)

Table 1 Diameter of inhibition zones(DIZ) of essential oil from *R. cordifolia* root

供试微生物	抑菌圈直径/mm		
	二甲基亚砷 (阴性对照)	茜草精油	庆大霉素 (阳性对照)
革兰氏阳性菌			
金黄色葡萄球菌	—	10.67±2.5	29.45±1.8
表皮葡萄球菌	—	14.33±2.1	23.05±0.7
蜡状芽孢杆菌	—	13.00±1.7	24.65±2.3
枯草芽孢杆菌	—	7.40±0.5	19.35±0.9
革兰氏阴性菌			
鼠伤寒沙门氏菌	—	11.33±2.1	21.40±2.3
大肠杆菌	—	6.17±0.2	24.13±0.7
痢疾杆菌	—	10.57±0.4	25.15±0.9

注:“—”表示未检出

茜草精油的抑菌作用以产生的抑菌圈直径(inhibitory zone diameter, IZD)包括原始滤纸片直径大小来判断。据文献中抑菌试验的判断标准^[17]:最敏感为 IZD>15 mm, 中敏感 15 mm≥IZD≥10 mm, 低敏感 9 mm≥IZD≥7 mm, 无抑菌圈为不敏感。由表 1 可知, 阳性对照的最小 IZD 19.35 mm>15 mm, 而阴性对照表现为无抑菌圈形成, 可判定庆大霉素对测试的 7 种微生物很敏感, 都表现出很强的抑制作用;然而作为精油溶剂的二甲基亚砷(DMSO)对所试微生物不敏感, 没有表现出任何抑菌作用。茜草精油对 G⁺菌中的金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌和表皮葡萄球菌的 IZD 分别为 10.67、13.00 mm 和 14.33 mm;对 G⁻菌中的痢疾杆菌和鼠伤寒沙门氏菌的 IZD 分别为 10.57 mm 和 11.33 mm;精油对这 5 种菌种有较好的抑菌效应, 属于中敏感。综合来看, 就对 4 种 G⁺细菌抑制作用而言, 茜草精油对枯草芽孢杆菌抑制效果较差, 而对表皮葡萄球菌和蜡状芽孢杆菌表现出较强的抑制作用;就对 3 种 G⁻细菌的抑制作用而言, 茜草精油表现出对于鼠伤寒沙门氏菌和痢疾杆菌较敏感的抑制活性, 而对大肠杆菌的效果较差, 可见茜草精油对不同微生物的生长的抑制作用有明显的差异。

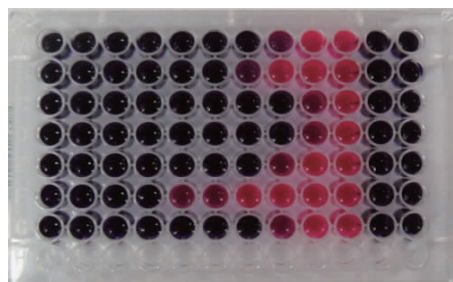
2.2 茜草精油抑菌活性 MIC 和 MBC 的测定结果

为了进一步明确茜草精油的抑菌活性, 刃天青法测定了茜草精油抑菌作用的最小抑菌浓度(MIC)和最小致死浓度(MBC)。MIC 和 MBC 值越小, 抑菌效果越好, 说明在较低的质量浓度下, 就可以抑制微生物的生长或几乎完全杀灭微生物。茜草精油抑菌活性的 MIC 及 MBC 结果见表 2 和图 1。

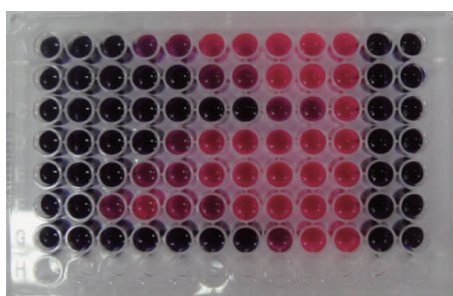
表 2 茜草精油抑菌作用的 MIC 和 MBC

Table 2 MIC and MBC of the essential oil from *R. cordifolia* root mg/mL

供试微生物	MIC/(mg/mL)			MBC/(mg/mL)		
	二甲基亚砷 (阴性对照)	茜草精油	庆大霉素 (阳性对照)	二甲基亚砷 (阴性对照)	茜草精油	庆大霉素 (阳性对照)
G ⁺						
金黄色葡萄球菌	变红	0.062 5	≤0.062 5	变红	1.0	≤0.062 5
表皮葡萄球菌	变红	0.06 25	≤0.062 5	变红	0.125	≤0.062 5
蜡状芽孢杆菌	变红	0.125 0	≤0.062 5	变红	2.0	≤0.062 5
枯草芽孢杆菌	变红	0.250 0	≤0.062 5	变红	0.5	≤0.062 5
G ⁻						
鼠伤寒沙门氏菌	变红	0.125 0	≤0.062 5	变红	2.0	≤0.062 5
大肠杆菌	变红	1.000 0	≤0.062 5	变红	4.0	≤0.062 5
痢疾杆菌	变红	0.125 0	≤0.062 5	变红	0.125	≤0.062 5



(a)茜草精油的MIC



(b)茜草精油的MBC

第1—7行菌种分别为:蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌和痢疾杆菌;第1—9列分别为:茜草精油的最高—最低倍半稀释浓度(8~0.031 25 mg/mL);10—12列分别为:阴性对照孔(溶剂对照孔)、无菌对照孔(刃天青指示剂的混匀液)和阳性对照孔(庆大霉素)。

图1 茜草精油抑菌作用的MIC/(mg/mL)

Fig.1 MIC of the essential oil from *R. cordifolia* root(mg/mL)

试验采用刃天青显色法测定了茜草精油的MIC和MBC,研究表明^[14,18]刃天青指示剂法与传统的试管稀释法测定MIC及MBC的结果具有良好的一致性;与稀释法相比较,刃天青法具有操作过程耗用试剂及样品量少,结果直观稳定,方法灵敏可靠的优点。所以,对植物提取分离终产品稀少且价值较高的样品,此方法具有重要的借鉴价值。由表2和图1的数据可以看出,阴性对照二甲基亚砜(DMSO)对所测试的微生物未表现出任何抑制或杀灭作用,而阳性对照庆大霉素对测试微生物抑菌活性的MIC和MBC都是小于或等于0.062 5 mg/mL,表现出很强的抑制和杀灭作用。茜草精油对测试微生物都起到了一定程度地抑制和杀灭的效果,抑菌活性的MIC和MBC范围分别为0.062 5~1.000 0 mg/mL和0.125 0~4.000 0 mg/mL。茜草精油对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的MIC(0.062 5 mg/mL)比别的受试菌种的都低,这与与本文抑菌圈研究结果一致。

2.3 茜草精油对微生物生长曲线的影响

试验以G⁺蜡样芽孢杆菌为受试菌种测定了茜草精油对其生长曲线的影响,结果见图2。

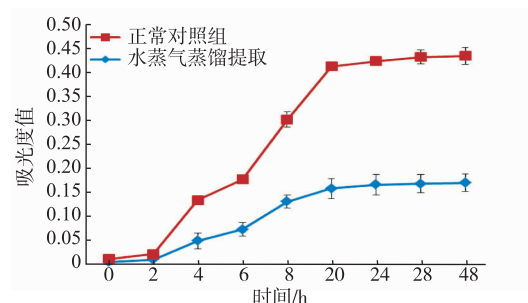


图2 茜草精油对微生物生长曲线的影响

Fig. 2 Effect of essential oil from *R. cordifolia* root on the growth curve of microorganisms

微生物生长的快慢以菌悬液体系的浊度体现即以检测中的吸光度值表示,吸光度值越大,说明菌体繁殖和生长的越快。由图2可知,与正常对照组相比,培养液中加入茜草精油后,在测定时间内,样品组的吸光值均低于对照组,说明微生物的生长受到明显的阻滞作用,而且微生物的对数生长期呈现缩短趋势。茜草精油抑菌效应的产生,应与茜草精油具有能够抑制受试菌菌体生长和分裂的能力应该有密切关系。

2.4 茜草精油对微生物细胞膜通透性的影响

试验中测定了茜草精油对G⁺蜡样芽孢杆菌细胞膜通透性的影响,结果见图3。

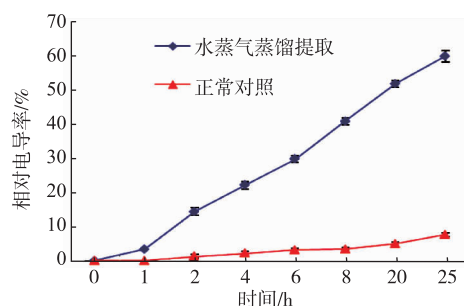


图3 茜草精油对微生物细胞膜通透性的影响

Fig. 3 Effect of essential oil from *R. cordifolia* root on the impermeability of cell membrane of tested microorganisms

为进一步验证茜草精油对于食源性病原菌的抗菌作用方式,以细菌膜的渗透性即电解质漏渗率或称为相对电导率来表征。细胞膜是细菌的保护屏障,当细菌遇到强抑菌剂而使细胞膜遭到破坏时,

菌体的保护屏障被打破,使其内部电解质外泄至培养液中,进而使培养液的电导率上升。因此,菌液电导率的变化反映了细菌细胞膜通透性的变化^[19]。由图3可知,茜草精油对菌种作用的前2 h内,相对电导率的变化不显著,随后电导率的变化增幅明显,原因可能就是源于细菌的正常细胞溶解和死亡导致溶液电导率的增加;随着作用时间的延长,茜草精油对细胞膜逐渐产生破坏作用,导致细菌细胞膜渗透性增强,进而导致细胞内成分如 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 等电解质的泄露,致使菌液的电导率逐渐上升,这与Diao等^[16]关于茴香精油对痢疾杆菌的作用机制中电导率的研究一致。所以,茜草精油的抑菌效果应该与其能破坏微生物的细胞膜具有密切关系。

2.5 茜草精油对微生物超微结构扫描电镜的观察结果

微生物超微结构的观察便于进一步研究茜草精油抑菌活性的机理。试验中观察了茜草精油处理前后微生物细胞的形态变化,扫描电镜微生物超微结构的观察结果见图4。

图4的扫描电镜的观察结果进一步证实:与对照组相比,茜草精油处理后的微生物细胞的表面结构均发生了不同程度的损伤和破坏。经茜草精油处理后,微生物细胞外层的保护性组织如细胞壁和细胞膜遭受了一定程度的损伤,所以导致细胞原始形态发生了巨大的变化,如发生了发生变形、破碎和断裂(图(b)和图(d)),而未经茜草精油处理的正常对照微生物细胞完整、饱满,且表面光滑(图(a)和(c))。茜草精油可以导致微生物出现物理性的损伤和形态学上的改变,进而容易导致细胞内容物泄露、受损和发生代谢紊乱和死亡。这些损伤性的变化可能成为抑制微生物生长和导致微生物的死亡的根本原因。

3 结 语

通过测定水蒸气蒸馏法提取的茜草精油对不

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:218.
- [2] CAI Y Z, SUN M, XING J, et al. Antioxidant phenolic constituents in roots of *rheum officinale* and *rubia cordifolia*; structure radical scavenging activity relationships[J]. *Agricultural Food Chemistry*, 2004, 52(26): 7884-7890.
- [3] YANG Dongjie, ZHENG Guanghong. Application of *Rubia cordifolia* L. on the dyeing of native cellulosic fibers [J]. *Chinese Silk*, 2000(12): 19-21. (in Chinese)

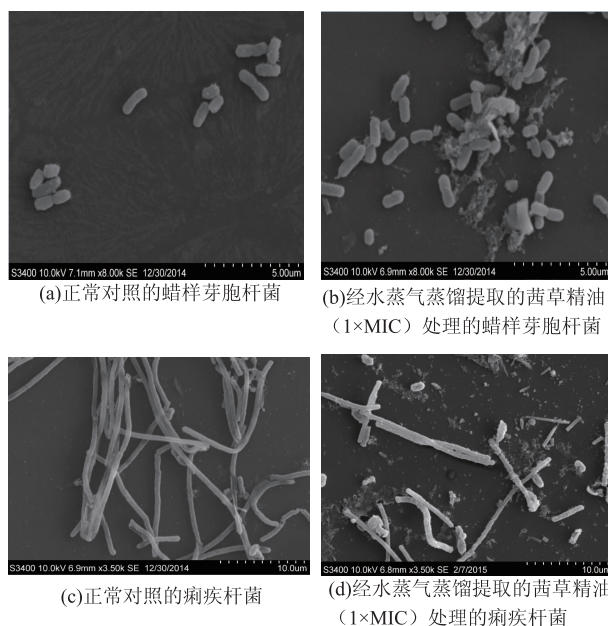


图4 微生物扫描电镜观察图
Fig. 4 Scanning electron microscope observations of the tested bacteria

同受试菌种的抑菌圈直径、刃天青法测定MIC和MBC,并以MIC为基础,研究了茜草精油对蜡样芽孢杆菌的生长曲线,菌液电导率变化及微生物的超微结构影响的结果表明,茜草精油对 G^+ 中的表皮葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌及金黄色葡萄球菌效果较好,对 G^- 中的鼠伤寒沙门氏菌和痢疾杆菌效果较好。通过微生物生长曲线、细菌膜通透性及微观结构的观察表明,茜草精油主要缩短细菌的对照生长期而有效的抑制了细菌的增长;且抑制作用可能源于茜草精油中的抑菌活性成分作用于菌种细胞壁和细胞膜系统,破坏了细胞的完整性,导致微生物细胞内容物的大量损失和细胞的自溶现象,从而抑制微生物的生长,导致微生物的死亡^[19]。

- [4] WANG Suxian, HUA Huiming, WU Lijun, et al. Studies on anthraquinones from the roots of *Rubia cordifolia* L. [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1992, 27(10): 743-747. (in Chinese)
- [5] HUA Huiming, WANG Suxian, WU Lijun, et al. Studies on naphthoic acid esters from the roots of *Rubia cordifolia* L. [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1992, 27(4): 279-282. (in Chinese)
- [6] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 298.
- [7] QIAO Yafang, WANG Suxian, WU Lijun. Studies on antibacterial constituents from the roots of *Rubia cordifolia* L. [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 1990, 25(11): 834-839. (in Chinese)
- [8] ADWANKAR M K, CHITNIS M P. In vivo anti-cancer activity of RC-18; a plant isolate from *Rubia cordifolia*, Linn. against a spectrum of experimental tumour models[J]. **Chemotherapy**, 1982, 28(4): 291-293.
- [9] CAI Guanhua. Increase of leukocyte count by Rubidate during therapy for neoplasms in 36 patients [J]. **New Drugs and Clinical Remedies**, 1986, 5(2): 78-79. (in Chinese)
- [10] GUNTUPALLI M, MOHANA R, CHANDANA V R. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006, 103(3): 484-490.
- [11] YANG Honghong, FU Yueguan, XIAO Feng, et al. Separation and antioxidant activities of ethyl acetate extraction from *Rubia Cordifolia* L.[J]. **Journal of Wuhan Institute of Technology**, 2010, 32(12): 1-5. (in Chinese)
- [12] TRIPATHI Y B, SHUKLA S, SHARMA M, et al. Antioxidant property of *Rubia cordifolia* extracts and its comparison with vitamin E and parabenzoquinone[J]. **Phytother Res**, 1995, 9(6): 440-443.
- [13] GAO C Y, TIAN C R, LU Y H, et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related bacteria[J]. **Food Control**, 2011, 22(3-4): 517-522.
- [14] ABDULLAH I H, FAROOQ A, POONAM S N, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2011, 44(4): 1199-1206.
- [15] 张敏. 山莓叶有效成分分离、解析及其生物活性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [16] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) [J]. **Food Control**, 2014, 35(1): 109-116.
- [17] LI Chunmei, DU Jing, XIE Bijun. Antibacterial activity of Shaddock Peels Extract [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2004, 30(1): 38-41. (in Chinese)
- [18] SATYAJIT D S, LUTFUN N, YASHODHARAN K. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals [J]. **Methods**, 2007, 42(4): 321-324.
- [19] XING K, CHEN X G, KONG M, et al. Effect of oleoylchitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2009, 76(1): 17-22.