

山茱萸药材加工过程废弃物制备木醋液的化学成分分析及抑菌活性评价

张浩宽¹, 郭盛^{1*}, 尚尔鑫¹, 张森¹, 严辉¹, 钱大玮¹, 高松², 李俊科², 段金廛^{1*}

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏 南京 210023
2. 河南宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 473000

摘要: 目的 探究不同热解温度山茱萸 *Cornus officinalis* 果核木醋液化学成分及其抑菌活性, 筛选出最优热解温度, 为山茱萸果核资源的开发与利用提供理论依据。方法 采用干馏法 (306~600 °C) 制取山茱萸果核木醋液, 温度每升高 50 °C 收集 1 次; 采用气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术对其进行定性定量分析; 通过滤纸片法测定不同热解温度山茱萸果核木醋液对大肠杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制效果, 采用微量肉汤稀释法对抑菌活性最优热解温度木醋液进行最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定。结果 共收集到 6 个热解温度木醋液, 通过 GC-MS 分析鉴定出 62 种化合物, 对其中 10 种相对含量较高的化合物 (乙酸、糠醛、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、正戊酸、愈创木酚、甲基环戊烯醇酮、2,6-二甲氧基苯酚) 进行定量分析, 结果 10 种化合物除糠醛外均以热解温度 506~556 °C 收集的木醋液样品 (W₅₀₆₋₅₅₆) 中质量浓度最高, 其中丙酸质量浓度高达 45.07 mg/mL; 抑菌实验显示, W₅₀₆₋₅₅₆ 抑菌效果最佳, 其对大肠杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 0.781 25%、0.781 25% 和 1.562 50%。相关性分析结果显示山茱萸果核木醋液的抑菌活性与其有机酸类和酚类物质的质量浓度密切相关。结论 不同热解温度山茱萸果核木醋液化学组成及含量存在差异, 以热解温度为 506~556 °C 所得木醋液具有较好的抑菌活性; 山茱萸果核木醋液可作为其资源利用的新途径。

关键词: 山茱萸; 山茱萸果核; 木醋液; 化学成分分析; 抑菌活性; 气相色谱-质谱联用

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)05-1372-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.012

Chemical constituent analysis and antibacterial activity evaluation of wood vinegar prepared from waste produced in the processing of *Corni Fructus*

ZHANG Hao-kuan¹, GUO Sheng¹, SHANG Er-xin¹, ZHANG Sen¹, YAN Hui¹, QIAN Da-wei¹, GAO Song², LI Jun-ke², DUAN Jin-ao¹

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/ National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine/ Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Henan Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Nanyang 473000, China

Abstract: Objective The chemical compositions and antibacterial activities of the wood vinegar of *Cornus officinalis* fruit core with different pyrolysis temperatures were evaluated, and the optimal pyrolysis temperature was screen out, so as to provide theoretical basis for the development and utilization of *sC. officinalis* fruit core resources. **Methods** The dry distillation method (306—600 °C) was used to prepare wood vinegar from *C. officinalis* fruit core, and the vinegar samples were collected every time the temperature rises by 50 °C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used for qualitative and quantitative analysis their compositions. The inhibition effect of *C. officinalis* fruits core wood vinegar on *Escherichia coli*, *Shigella dysentery* and *Staphylococcus aureus* was

收稿日期: 2021-10-25

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYYCXTD-D-202005); 江苏省“六大人才高峰”项目 (YY-026); 现代农业产业技术体系项目 (CARS-21)

作者简介: 张浩宽 (1994—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: zhk18795862381@163.com

*通信作者: 郭盛, 男, 副研究员, 主要从事中药资源化学与资源循环利用研究。E-mail: guosheng@njucm.edu.cn

段金廛, 男, 教授, 主要从事中药资源化学与资源循环利用研究。E-mail: dja@njucm.edu.cn

determined by filter paper method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of wood vinegar obtained with optimal temperature was determined by broth dilution method. **Results** A total of 62 compounds in the wood vinegar were identified by GC-MS analysis. Among them, 10 compounds (acetic acid, furfural, propionic acid, isobutyric acid, n-butyric acid, isovaleric acid, n-valeric acid, guaiacol, cyclotene, 2,6-dimethoxyphenol) with relatively high content were quantitatively analyzed. The results showed that the contents of 10 compounds except furfural were the highest in wood vinegar ($W_{506-556}$) collected at 506—556 °C, and the content of propionic acid was up to 45.07 mg/mL; The results of bacteriostatic test showed that $W_{506-556}$ had the best bacteriostatic effect on *E. coli*, *S. dysentery* and *S. aureus*, and the MICs were 0.781 25%, 0.781 25% and 1.562 50%, respectively. Correlation analysis showed that the antibacterial activity of *C. officinalis* fruit core wood vinegar was closely related to the contents of organic acids and phenols. **Conclusion** There were differences in chemical composition and content of *C. officinalis* fruit core wood vinegar pyrolyzed at different temperatures. The wood vinegar obtained at 506—556 °C had better antibacterial activity. The wood vinegar can be used as a new way of resource utilization for *C. officinalis* fruit core.

Key words: *Corni Fructus*; *Cornus officinalis* fruit core; wood vinegar; chemical constituents; content determination antimicrobial activity; GC-MS

山茱萸为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 的干燥果肉^[1], 具有补益肝肾、涩精固脱之功, 是我国中医临床常用中药。据不完全统计, 2019 年全国山茱萸种植面积已超过 2.6 万 hm^2 , 其年产量以干货计约 6 万 t。山茱萸果核是山茱萸产地加工过程中产生的主要副产物, 其重量约占全果的 2/3^[2]。近年来, 虽有报道从山茱萸果核中提取浅色栲胶或利用其制备活性炭^[3-4], 但并未实现产业化, 多数山茱萸果核的处理方式仍为集中堆放或焚烧处理, 不仅是浪费资源, 也加大了环境承载压力。因此, 亟需开展山茱萸果核潜在价值挖掘及资源化利用研究。

木醋液又称植物酸, 是木材在干馏后导出的蒸汽气体混合物经冷凝分离后得到的一种红褐色液体, 具有醋酸的酸味和烟熏气味。随着炭化工业的发展, 除木材外, 其他生物质材料, 如竹、果壳、果核等也可作为热解原材料生产相似的木醋液。大量研究表明, 木醋液具有较好的抑菌活性^[5-7], 已在国内外获得了广泛应用, 并根据其精制程度的不同用于农业生产、食品加工、医药保健等领域^[8]。随着畜禽养殖行业“禁抗、减抗”政策的出台, 木醋液作为天然抑菌剂, 应用前景将更为广阔, 原料需求也将逐年增加。因此, 寻找可用于高抑菌活性木醋液制备的新原料已成为相关领域研究的热点。近年来, 已有枣核、山楂核、山杏壳、杜仲枝等中药材产地加工过程产生的副产物用于制备木醋液的研究报道^[9-12], 其中山楂核木醋液更是“红核妇洁洗液”产品的主要组分。此外, 本课题组前期也对益母草茎叶、黄蜀葵茎叶、甘草药渣、丹参药渣等中药固体废物进行了热解炭化制备木醋液研究^[13]。目前, 尚

未见利用山茱萸果核制备木醋液的相关研究报道。

基于此, 本研究以山茱萸果核为原料, 采用干馏法制取木醋液, 利用气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 技术对不同热解温度所得木醋液的化学成分进行分析鉴定, 并评价其抑菌活性, 以期如山茱萸果核资源的潜在价值发现及资源化利用提供理论依据。

1 材料

1.1 材料与试剂

1.1.1 山茱萸果核 山茱萸果核由河南宛西制药股份有限公司提供。2020 年 11 月采自河南省南阳市西峡县米坪镇, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *C. officinalis* Sieb. et Zucc 的成熟果核, 样品采集后自然风干。

1.1.2 供试菌种 大肠杆菌 *Escherichia coli* (CICC20658)、痢疾志贺氏菌 *Shigella dysenteriae* (CICC23829)、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), 购于广东省微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂

HZ01 型干馏釜 (溧阳市海佐机械制造有限公司), DHG-9023 型鼓风干燥培养箱 (太仓市华利达实验设备有限公司), UV-5100 型紫外可见分光光度计 (上海元析仪器有限公司), QUITIX125D 型电子天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司), IS-RDV1 型恒温振荡器 (美国精骐有限公司), LRH-150 型液晶生化培养箱 (太仓市华利达实验设备有限公司), S-B50L 型立式压力蒸汽灭菌器 (江苏省金坛市医疗器械厂), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), 气相色谱-四极杆串联质谱仪 (Clarus SQ 8T, 美国 PerkinElmer 公司)。

酵母粉(批号 LP0021, 英国 OXOID 公司), 胰蛋白胨(批号 LP0042, 英国 OXOID 公司), MH 肉汤培养基(批号 HB6231, 青岛海博生物技术有限公司); 乙酸(批号 H1808008)、丙酸(批号 A1903124)、异丁酸(批号 k1822187)、丁酸(批号 d1917157)、异戊酸(批号 C1919091)、戊酸(批号 g1818016), 对照品均购自于 Aladdin 公司(德国 Darmstadt); 糠醛(批号 DST201201-149)、愈创木酚(批号 DST201125-369)、甲基环戊烯醇酮(批号 DSTDJ027501)、2,6-二甲氧基苯酚(批号 DST201109-120)对照品均购自于成都德思特生物技术有限公司; 水杨酸甲酯(批号 110707-201614)购于中国食品药品检定研究院; 正构烷烃混标 C₇~C₄₀(批号 397593)购于美国 O2si smart solutions 公司。各对照品质量分数均≥98%, 醋酸乙酯为分析纯, 红核妇洁洗液(批号 200736)购于山东步长神州制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 山茱萸果核木醋液制备与精制

称取 795 g 山茱萸果核粉末(40 目筛)置于密闭式干馏釜中, 以 5 °C/min 的升温速率将材料从室温升至目标温度 600 °C, 到达温度后保温 30 min。在冷凝装置中通入冷却水, 冷凝干馏时产生的气体, 从开始馏出液体时记录为初始温度(306 °C), 温度每升高 50 °C 收集 1 次馏份, 共收集到 6 份馏出液。参照枣核木醋液制备方法^[14], 将收集的馏出液放入 4 °C 冰箱静置 30 d, 木醋液分离为 3 层, 上层为少量油状物, 中层为澄清木醋液, 下层为粘稠的木焦油等, 采用虹吸法获取中层的木醋液, 加入 5% 粉末状活性炭, 常温下恒温振荡器振荡 1 h (300 r/min), 静置 3 d, 抽滤, 得精制山茱萸果核木醋液。不同热解温度木醋液产量及精制得率见表 1。

表 1 不同热解温度山茱萸果核木醋液产量及精制得率
Table 1 Yield and refining yield of wood vinegar *Cornus officinalis* fruit core at different temperatures

温度/°C	质量/g		精制得率/%
	精制前	精制后	
306~356	6.27	5.89	93.94
356~406	29.85	27.41	91.83
406~456	53.27	44.27	83.10
456~506	59.16	44.17	74.66
506~556	59.44	40.18	67.60
556~600	47.84	33.75	70.55

由表 1 可知, 山茱萸果核木醋液以高于 406 °C 为主要馏出温度段。精制处理后各热解温度木醋液的得率随热解温度的升高而降低, 这是由于随着温度的升高, 木醋液中木焦油的含量也越高, 经过精制后, 木焦油被除去, 故得率降低。因热解温度 306~356 °C 所得木醋液(W_{306~356})产量较低, 难以进行后续实验, 故将其与热解温度 356~406 °C 所得木醋液(W_{356~406})合并。

2.2 山茱萸果核木醋液组成成分分析

2.2.1 GC-MS 定性分析条件 色谱条件: 色谱柱为 DB-FFAP 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样口温度为 250 °C, 进样量为 0.5 μL, 采用分流进样, 分流比为 30:1, 氦气作为载气, 体积流量 1.00 mL/min; 柱温 60 °C, 恒温 3 min 后, 以 5 °C/min 的速率升温至 240 °C, 恒温 10 min。

质谱条件: EI 源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 150 °C, 传输线温度 200 °C, 质量扫描范围为 m/z 35~400, 溶剂延迟 2 min。质谱标准库: NIST17。

2.2.2 保留指数 (retention index, RI) 的测定 取正构烷烃混合对照品(C₇~C₄₀) 0.1 mL 溶于 1 mL 醋酸乙酯, 取适量备用, 按照 2.2.1 项下色谱条件进行分析, 记录保留时间, 运用单一线性升温公式(1)计算各待测化合物的 RI^[15]。

$$RI = 100n + 100[\alpha(x) - \alpha(n)] / [\alpha(n+1) - \alpha(n)] \quad (1)$$

α 代表保留时间, x 表示待分析化合物, n 和 $n+1$ 分别表示正构烷烃的碳原子数。且 $\alpha(n) < \alpha(x) < \alpha(n+1)$

2.2.3 样品溶液制备及分析测定 分别精密量取各精制木醋液 1 mL 置于 5 mL 具塞玻璃试管中, 精密加入 2 mL 醋酸乙酯振荡萃取, 4 °C 静置过夜, 取上层醋酸乙酯萃取液, 按上述试验方法和条件进行 GC-MS 分析, 获得不同热解温度山茱萸果核木醋液 GC-MS 总离子流图(图 1)。

按上述 GC-MS 条件测定, 5 个热解温度山茱萸果核木醋液挥发性成分的总离子流图如图 1 所示, 除 W_{306~406} 所检测到成分较少外, 其余热解温度木醋液所含成分较为相似, 但其相对含量有所差异。所有色谱峰信息依据 NIST17 标准谱库检索和人工解析, 从匹配度、质谱图相似度等方面比较, 计算待测组分的 RI, 与 NIST Chemistry WebBook 数据库中保留指数文献值(RI*)对比进行定性, 确定物质种类, 并根据峰面积归一化法确定物质的相对含量, 结果见表 2。在 5 个热解温度所得木醋液样品中分别鉴定出 22、47、57、62、60 种组分。其中共

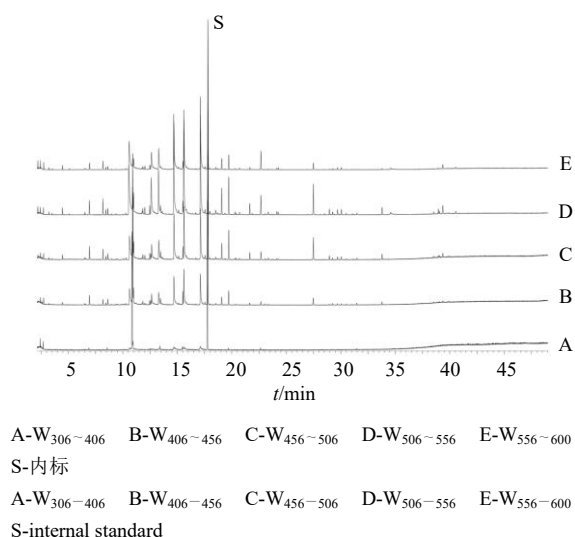


图 1 不同热解温度山茱萸果核木醋液 GC-MS 总离子流图
Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of wood vinegar from *Cornus officinalis* fruit core at different temperatures

有组分主要为有机酸类、酚类、醛类和酮类，有机酸类主要包括乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、正戊酸等；酚类主要包括愈创木酚、苯酚等；醛类主要包括糠醛和 5-羟甲基糠醛等；酮类主要包括乙酰氧基-2-丙酮、2,5-己二酮等。采用面积归一化法计算由低至高 5 个不同热解温度木醋液中共有组分相对含量，结果显示，总有机酸相对含量分别为 24.09%、51.18%、54.82%、66.82%和 67.04%；总醛类相对含量分别为 65.38%、24.41%、12.11%、5.33%和 3.26%；总酚类相对含量分别为 1.69%、3.82%、5.75%、5.28%和 7.37%。总酮类相对含量分别为 6.16%、5.59%、4.84%、3.84%和 4.18%。此外尚有少量的醇类、酯类、烷类和含氮类化合物。

2.3 主要成分的含量测定

通过 GC-MS 分析 W_{506~556} 鉴定出 62 种化合物，根据峰面积筛选出相对含量较高的前 10 种化合物

表 2 山茱萸果核木醋液 GC-MS 成分鉴定及相对含量分析结果
Table 2 Results of GC-MS analysis of wood vinegar from *Cornus officinalis* fruit core

序号	RI	RI*	化合物名称	分子式	质谱相似度值	相对含量/%				
						A	B	C	D	E
1	1115	—	3,4-二羟基-1-丁烯	C ₄ H ₈ O ₂	856	—	0.16	0.21	0.16	0.27
2	1132	1006	3-甲基-3-丁烯-2-酮	C ₅ H ₈ O	894	—	0.11	0.12	0.12	0.12
3	1192	1091	顺芷醛	C ₅ H ₈ O	766	—	0.48	0.64	0.48	0.63
4	1227	1243	2-甲基吡啶	C ₆ H ₇ N	920	—	—	—	0.11	0.24
5	1290	1281	3-羟基-2-丁酮	C ₄ H ₈ O ₂	939	—	0.24	0.29	0.22	0.24
6	1308	—	乙酰氧肟酸	C ₂ H ₅ NO ₂	884	1.12	1.93	1.81	1.16	1.11
7	1325	—	三乙二醇	C ₆ H ₁₄ O ₄	723	—	0.09	0.05	0.04	0.04
8	1334	1398	(E,E)-2,4-己二烯醛	C ₆ H ₈ O	794	—	—	—	0.04	0.05
9	1345	—	1,2-二甲氧基丙烷	C ₅ H ₁₂ O ₂	796	—	—	0.09	0.07	0.08
10	1360	1372	2-环戊烯酮	C ₅ H ₆ O	967	0.28	1.21	1.60	1.22	1.63
11	1371	1381	2-甲基-2-环戊烯-1-酮	C ₆ H ₈ O	961	—	—	0.51	0.44	0.50
12	1379	—	2-乙基己酸叔丁酯	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	837	0.96	1.17	0.92	0.57	0.62
13	1393	—	1-甲氧基乙酸乙酯	C ₅ H ₁₀ O ₃	785	—	—	0.14	0.09	0.10
14	1411	1439	四氢-2H-吡喃-3-酮	C ₅ H ₈ O ₂	955	—	—	0.14	0.10	0.13
15	1447	—	2-氧代戊酸	C ₅ H ₈ O ₃	906	—	0.27	0.30	0.19	0.19
16	1455	1452	乙酸	C ₂ H ₄ O ₂	909	4.31	7.94	8.17	12.13	11.09
17	1473	1473	糠醛	C ₅ H ₄ O ₂	975	63.05	22.28	10.35	3.60	1.98
18	1476	—	过氧化乙酰丙酮	C ₅ H ₈ O ₃	919	4.67	3.11	2.18	1.34	1.51
19	1510	1505	2,5-己二酮	C ₆ H ₁₀ O ₂	939	0.24	0.20	0.23	0.21	0.19
20	1511	—	2-乙基-5-甲基呋喃	C ₇ H ₁₀ O	871	—	0.72	0.76	0.59	0.52
21	1520	1513	3-甲基-2-环戊烯-1-酮	C ₆ H ₈ O	878	—	0.35	0.66	0.58	0.69
22	1539	—	1-丙酰基乙酸乙酯	C ₇ H ₁₂ O ₃	793	0.37	0.92	0.96	0.75	0.81
23	1543	1553	2-氧代丁基乙酸酯	C ₆ H ₁₀ O ₃	953	—	0.59	0.71	0.44	0.56

续表 2

序号	RI	RI*	化合物名称	分子式	质谱相似值	相对含量/%				
						A	B	C	D	E
24	1546	1547	丙酸	C ₃ H ₆ O ₂	995	1.33	3.29	5.04	7.17	6.25
25	1571	1571	异丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	986	1.36	3.56	3.67	5.75	5.46
26	1580	1582	5-甲基呋喃醛	C ₆ H ₆ O ₂	928	1.72	1.19	0.88	1.14	0.82
27	1588	—	4-甲氧基吡啶	C ₆ H ₇ NO	907	—	0.17	0.31	0.32	0.12
28	1632	1628	丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	970	5.51	12.05	11.81	12.79	14.94
29	1653	—	5-庚烯-2-酮	C ₇ H ₁₂ O	768	0.27	0.52	0.39	0.29	0.40
30	1670	1666	糠醇	C ₅ H ₆ O ₂	979	1.32	2.24	1.63	0.78	1.29
31	1672	1667	异戊酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	986	4.89	11.32	11.85	12.27	12.84
32	1685	—	2,5-二甲基-2,3-二氢呋喃	C ₆ H ₁₀ O	805	—	0.43	0.67	0.46	0.55
33	1724	1726	3-甲基-2(5H)-呋喃酮	C ₅ H ₆ O ₂	863	—	0.17	0.05	0.18	0.21
34	1742	1733	正戊酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	992	5.57	11.09	12.47	13.83	15.35
35	1763	—	2-甲基-2-丁烯醛	C ₅ H ₈ O	828	0.26	0.53	0.61	0.35	0.38
36	1787	1788	乙酰胺	C ₂ H ₅ NO	880	—	—	0.23	0.26	0.25
37	1809	1809	4-甲基戊酸	C ₆ H ₁₂ O ₂	918	—	0.41	0.48	0.52	0.44
38	1835	1830	甲基环戊烯醇酮	C ₆ H ₈ O ₂	977	—	1.74	2.60	2.12	2.13
39	1866	1867	愈创木酚	C ₇ H ₈ O ₂	988	0.87	3.05	4.38	3.34	2.83
40	1915	1910	N-甲基丁二酰胺	C ₅ H ₇ NO ₂	894	—	—	0.20	0.24	0.37
41	1962	1960	4-甲基愈创木酚	C ₈ H ₁₀ O ₂	983	—	0.45	1.06	0.93	0.44
42	2013	2008	苯酚	C ₆ H ₆ O	980	0.82	0.77	1.37	1.90	4.54
43	2055	2048	2-吡咯烷酮	C ₄ H ₇ NO	958	—	0.20	0.31	0.24	0.18
44	2090	2089	4-甲基苯酚	C ₇ H ₈ O	941	—	—	0.16	0.30	0.38
45	2097	2053	邻甲酚	C ₇ H ₈ O	896	—	0.08	0.16	0.31	0.52
46	2280	2276	2,6-二甲氧基苯酚	C ₈ H ₁₀ O ₃	981	—	1.62	3.45	2.67	1.55
47	2340	—	6-氮杂脲嘧啶	C ₃ H ₃ N ₃ O ₂	908	—	—	0.10	0.14	0.13
48	2365	—	4-甲氧基-2-硝基苯胺	C ₇ H ₈ N ₂ O ₃	902	—	0.18	0.61	0.54	0.14
49	2382	—	3-甲基-2,4-戊烷二酮	C ₆ H ₁₀ O ₂	787	0.42	0.31	0.28	0.27	0.27
50	2411	—	1,4:3,6-二脱水- α -D-吡喃葡萄糖	C ₆ H ₈ O ₄	935	—	0.28	0.51	0.58	0.62
51	2433	—	3-羟基吡啶	C ₅ H ₅ NO	959	—	0.32	0.56	0.59	0.54
52	2460	—	2,6-二甲基-4-吡喃酮	C ₇ H ₈ O ₂	793	0.28	0.24	0.16	0.21	0.18
53	2498	—	5-(羟基甲基)二氢呋喃-2(3H)-酮	C ₅ H ₈ O ₃	910	—	—	0.08	0.10	0.09
54	2521	2528	5-羟基甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	797	0.35	0.41	0.27	0.38	0.08
55	2670	—	4-丁基-2-甲氧基苯酚	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	906	—	0.64	0.87	0.70	0.25
56	2720	2661	邻苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	971	—	—	—	1.23	0.32
57	3005	2980	二氢松伯醇	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	831	—	0.27	0.38	0.32	0.10
58	3034	—	3,5-二羟基甲苯	C ₇ H ₈ O ₂	929	—	—	0.35	0.44	0.20
59	3046	—	1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)丙-2-酮	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	814	—	0.27	0.39	0.23	—
60	3064	—	对苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	814	—	0.44	0.81	0.95	1.06
61	3108	—	2-甲基丁基乙酸酯	C ₇ H ₁₄ O ₂	947	—	—	—	0.16	—
62	3141	—	间苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂	879	—	—	—	0.36	0.49

“—”表示无或未检测到 A-W₃₀₆₋₄₀₆ B-W₄₀₆₋₄₅₆ C-W₄₅₆₋₅₀₆ D-W₅₀₆₋₅₅₆ E-W₅₅₆₋₆₀₀

“—” indicates none or not detected A-W₃₀₆₋₄₀₆ B-W₄₀₆₋₄₅₆ C-W₄₅₆₋₅₀₆ D-W₅₀₆₋₅₅₆ E-W₅₅₆₋₆₀₀

乙酸、糠醛、丙酸、异丁酸、正丁酸、异戊酸、正戊酸、愈创木酚、甲基环戊烯醇酮、2,6-二甲氧基苯酚,以该 10 种成分作为主要成分对不同解热温度山茱萸果核木醋液进行定量分析。

2.3.1 内标溶液的制备 精密取水杨酸甲酯 20.80 mg,置于 10 mL 量瓶中,加醋酸乙酯溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密量取各精制木醋液 1 mL 置于 5 mL 具塞玻璃试管中,精密加入 2 mL 醋酸乙酯振摇萃取,4 ℃静置过夜,取上层醋酸乙酯萃取液,即得供试品溶液。

2.3.3 对照品储备液制备 取适量对照品,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加醋酸乙酯溶解并稀释至刻度,配制成质量浓度分别为乙酸 54.29 mg/mL、丙酸 46.27 mg/mL、异丁酸 54.87 mg/mL、丁酸 50.38 mg/mL、正戊酸 42.02 mg/mL、异戊酸 41.36 mg/mL、糠醛 25.81 mg/mL、愈创木酚 4.65 mg/mL、甲基环

戊烯醇酮 8.47 mg/mL 和 2,6-二甲氧基苯酚 4.54 mg/mL 的混合对照品储备液。继以醋酸乙酯分别等比稀释 2、4、8、16、32、64、128 倍,即得不同质量浓度的混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密量取适量混合对照品溶液,置于 10 mL 量瓶中,分别精密加入内标溶液 1 mL,再加醋酸乙酯稀释至刻度,摇匀。以各待测化合物与内标的峰面积比值为纵坐标 (y),各待测化合物质量浓度为横坐标 (x),进行线性回归,得回归方程。各化合物线性关系考察,结果见表 3。各化合物 R^2 在 0.992 3~0.999 3,表明线性良好。

2.4.2 精密度试验 取“2.3.3”项下方法制备的混合对照品储备液,连续进样 6 次,按照“2.2.1”项下及表 3 中定量离子条件测定,结果表明,10 种待测成分的质量分数 RSD 值均小于 1.48%,说明仪器的精密度良好。

表 3 线性关系和加样回收率考察结果

Table 3 Linear relationship and recovery results of 10 results of targeted standards

化合物	定量离子 (m/z)	回归方程	R^2	线性范围/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加样回收率 ($n=6$)	
					平均值/%	RSD/%
乙酸	43	$y=0.123\ 5\ x-0.149\ 7$	0.999 0	0.848 3~27.145 0	98.12	1.46
丙酸	74	$y=0.046\ 2\ x-0.098\ 5$	0.992 3	1.445 3~23.125 0	99.43	0.88
异丁酸	43	$y=0.192\ 9\ x-0.628\ 0$	0.995 3	1.714 7~27.435 0	99.22	0.72
丁酸	60	$y=0.201\ 2\ x-0.276\ 2$	0.995 7	0.787 2~25.190 0	99.60	1.39
正戊酸	60	$y=0.209\ 5\ x-0.126\ 1$	0.999 3	0.656 6~21.010 0	98.24	2.14
异戊酸	60	$y=0.318\ 2\ x-0.302\ 9$	0.998 0	0.646 3~20.680 0	102.13	0.97
甲基环戊烯醇酮	112	$y=0.368\ 1\ x+0.006\ 6$	0.995 2	0.065 0~4.240 0	101.14	1.68
糠醛	95	$y=0.417\ 9\ x+0.156\ 6$	0.996 5	0.201 6~12.905 0	97.65	1.53
愈创木酚	124	$y=0.631\ 2\ x+0.030\ 7$	0.998 0	0.036 3~2.325 0	99.08	0.52
2,6-二甲氧基苯酚	154	$y=0.923\ 4\ x-0.027\ 5$	0.996 4	0.035 5~2.268 8	97.39	1.62

2.4.3 重复性试验 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.2.1”项下色谱、质谱条件分别进样,结果表明,按表 3 中定量离子进行分析,10 种待测成分质量分数的 RSD 值均小于 1.36%,表明方法的重复性良好。

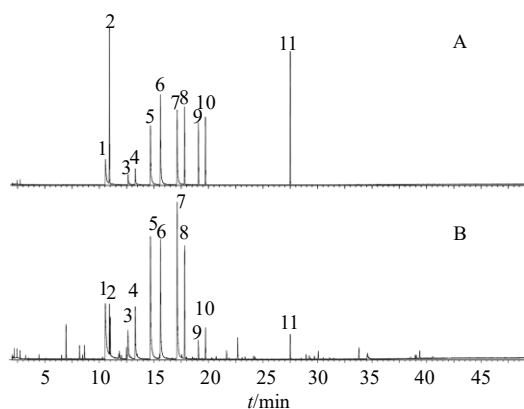
2.4.4 稳定性试验 取供试品溶液,依据“2.2.2”项下色谱及质谱条件在 0、1、2、4、6、8 h 取样测定,结果表明,10 种待测成分质量分数的 RSD 值均小于 1.78%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定的木醋液样品,分别加入适量对照品溶液,进样测定,计算各被测成分的加样回收率和 RSD 值,结果见表 3,10 种对

照品的平均回收率在 97.39%~102.13%,RSD 值均小于 2.14%,表明方法的准确性较好。

2.4.6 样品含量测定 取各解热温度木醋液 3 份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,取 100 μL 供试品溶液加入 100 μL 内标溶液,混匀,按上述实验条件进行测定,进样量为 0.5 μL ,分流比为 30:1。混合对照品及样品的 GC-MS 总离子流图见图 2。记录峰面积,以各化合物与内标的峰面积比值按内标法计算样品质量浓度,结果见表 4。

由表 4 可知,除糠醛外,其余 9 种成分质量浓度均随热解温度的升高呈先升高后降低的趋势,而糠醛质量浓度随温度升高呈降低趋势。9 种成分均



1-乙酸 2-糠醛 3-丙酸 4-异丁酸 5-丁酸 6-异戊酸 7-正戊酸 8-水杨酸甲酯(内标) 9-甲基环戊烯醇酮 10-愈创木酚 11-2,6-二甲氧基苯酚
1-acetic acid 2-furfural 3-propionic acid 4-isobutyric acid 5-butyric acid 6-isovaleric acid 7-valeric acid 8-methyl salicylate 9-cyclotene 10-guaiacol 11-2,6-dimethoxyphenol

图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (W₅₀₆₋₅₅₆, B) 的 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 GC-MS TIC chromatograms of mixed reference substances (A) and W₅₀₆₋₅₅₆ (B)

表 4 不同温度山茱萸果核木醋液主要化学成分质量浓度

Table 4 Content of 10 compounds in wood vinegar from *Cornus officinalis* fruit core at different temperatures

主要成分	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)				
	W ₃₀₆₋₄₀₆	W ₄₀₆₋₄₅₆	W ₄₅₆₋₅₀₆	W ₅₀₆₋₅₅₆	W ₅₅₆₋₆₀₀
乙酸	4.92	11.02	17.42	40.65	18.61
丙酸	9.37	14.60	18.19	45.07	22.07
异丁酸	13.15	15.91	18.70	27.37	18.27
丁酸	5.57	11.09	18.20	37.01	16.61
异戊酸	3.84	7.80	12.66	21.30	9.59
正戊酸	3.64	8.95	16.70	37.74	17.04
糠醛	6.67	6.02	3.06	1.72	0.90
愈创木酚	—	0.25	0.76	1.27	0.34
甲基环戊烯醇酮	—	0.28	0.69	1.12	0.29
2,6-二甲氧基苯酚	—	0.17	0.54	0.86	0.19

“—”表示未检测到

“—” indicates no detection

解温度木醋液均设 3 个重复。将细菌平板倒置于 37 °C 生化培养箱, 培养 24 h, 十字交叉法测量其抑菌圈直径, 参照药物敏感试验判定标准(表 5), 判断不同解热温度山茱萸果核木醋液抑菌活性强弱。结果见表 6。

由表 5、6 可知, 406~600 °C 的木醋液对供试菌种均有一定的抑制效果, 敏感度在中敏到高敏之间, 3 种供试菌对于有效木醋液的敏感顺序为: 痢疾杆菌>大肠杆菌>金黄色葡萄球菌; 不同解热温度山茱萸果核木醋液对于供试菌种的抑制效果强弱顺序为 W₅₀₆₋₅₅₆>W₄₅₆₋₅₀₆>W₅₅₆₋₆₀₀>W₄₀₆₋₄₅₆。对

在 W₅₀₆₋₅₅₆ 中达到最高, 6 种有机酸类物质总质量浓度为 209.14 mg/mL, 约占该木醋液样品总质量的 20%, 其中丙酸质量浓度最高, 达 45.07 mg/mL。

2.5 抑菌活性及相关性分析

2.5.1 抑菌圈直径的测定 采用滤纸片法测定不同热解温度所得山茱萸核木醋液对大肠杆菌、痢疾杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径。分别用接种环刮取已活化好的大肠杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌单菌落, 接种于 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中, 于 37 °C 振荡培养 12 h, 通过测量吸光度(A)值, 用无菌水制成含菌数为 1×10⁶ CFU/mL 的菌悬液。LB 固体培养基灭菌后倾倒在直径 90 mm 的培养皿中, 吸取配制好的菌悬液 100 μL, 加入 LB 固体培养基中, 用涂布棒将菌液涂布均匀。取高压灭菌后直径 6 mm 的空白药敏纸片, 分别加入 20 μL 各热解温度木醋液原液, 空白对照组加入 20 μL 无菌水, 阳性药组加入 20 μL 红核妇洁洗液。将加好木醋液的药敏纸片贴于已涂菌的培养基表面, 各热

于大肠杆菌和痢疾杆菌, W₅₀₆₋₅₅₆ 的抑菌效果与其他解热温度木醋液和红核妇洁洗液组均具有极显著性差异, 对于金黄色葡萄球菌, W₅₀₆₋₅₅₆ 的抑菌效果与 W₅₅₆₋₆₀₀ 和 W₄₀₆₋₄₅₆ 组具有极显著性差异。此外, W₄₅₆₋₅₀₆ 与 W₅₀₆₋₅₅₆ 的产量都很大, 并且两者对于供试菌的抑制效果相近, 提示在以后的工业生产中可将 2 段合并利用。山茱萸果核木醋液整体上对革兰阴性菌的抑制效果优于革兰阳性菌, 对痢疾杆菌的抑制作用最强。

2.5.2 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定 参照美国临床标准协

表 5 药物敏感试验判定标准

Table 5 Criteria for determining drug sensitivity tests

抑菌圈直径/mm	敏感度
>20	极敏感
15~20	高敏感
10~14	中敏感
<10	低敏感
<6	不敏感

表 6 抑菌圈测量结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Measurement result of bacteriostatic zone ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	抑菌圈直径/mm		
	大肠杆菌	痢疾杆菌	金黄色葡萄球菌
W _{306~406}	—	—	—
W _{406~456}	11.60±0.97 ^c	12.23±0.75 ^d	10.82±0.46 ^b
W _{456~506}	14.93±0.82 ^b	17.10±0.54 ^b	14.48±0.91 ^a
W _{506~556}	16.83±0.75 ^a	18.80±0.65 ^a	14.87±1.62 ^a
W _{556~600}	11.93±1.02 ^c	12.90±1.16 ^d	11.73±1.51 ^b
红核妇洁洗液	12.63±1.27 ^c	15.75±0.92 ^c	13.75±1.56 ^a
空白	—	—	—

—表示无抑菌效果；同列间标不同字母表示具有极显著性差异 ($P<0.01$)—means no bacteriostatic effect; Different letters in the same column indicate extremely significant differences ($P<0.01$)

到各行第 3 孔,依次进行梯度稀释,最后吸取 100 μ L 制备好的菌悬液加入 96 孔板中,混合均匀,使木醋液浓度为 25%~0.048 83%。阳性对照组、空白对照组同上。置于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱培养 24 h,用肉眼观察可 100%抑制细菌生长的浓度为 MIC。实验重复 3 次,以红核妇洁洗液作为阳性对照,无菌水作为空白对照,结果见表 7。W_{506~556} 对大肠杆菌和痢疾杆菌的 MIC 为 0.781 25%,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 1.562 50%。

2.5.3 相关性分析 选取不同热解温度木醋液相对含量较高的 10 种成分(正戊酸、丁酸、异戊酸、乙酸、丙酸、异丁酸、糠醛、愈创木酚、2,6-二甲氧基苯酚、甲基环戊烯醇酮),采用 SPSS 22.0 软件,以抑菌圈直径为自变量(Y),成分含量为因变量(X)进行相关分析,建立 10 个成分质量浓度与其药效学的 Pearson 相关系数,见表 8。

表 8 显示,山茱萸果核木醋液抑菌效果与糠醛质量浓度呈负相关,与其他 9 种成分呈正相关。3 种供试

表 7 MIC 测量结果

Table 7 Results of minimum inhibitory concentration

样品	MIC/%		
	大肠杆菌	痢疾杆菌	金黄色葡萄球菌
W _{506~556}	0.781 25	0.781 25	1.562 50
红核洗液	1.562 50	1.562 50	1.562 50

会(CLSI) M07-A9 微量肉汤稀释法^[16],选取抑菌效果最明显的 W_{506~556} 进行 MIC 的测定。在超净工作台中吸取 100 μ L MH 依次加入灭菌 96 孔板的第 1、2、3 行木醋液组的 2~12 列中,第 4、5、6 行阳性药组的 2~12 列中,第 7、8 行空白对照组的 1~12 列中;吸取木醋液 100 μ L 加入第 1、2、3 行的第 1 列孔中,混合均匀后吸取 100 μ L 加入到第 1、2、3 行的第 2 列孔中,混合均匀后再吸取 100 μ L

表 8 主要化学成分质量浓度与抑菌强度 Pearson 相关系数

Table 8 Pearson correlation coefficient between contents of 10 principal components and bacteriostatic zone diameter

编号	化学成分	Pearson 相关系数		
		大肠杆菌	痢疾杆菌	金黄色葡萄球菌
1	乙酸	0.761	0.769	0.710
2	丙酸	0.703	0.708	0.646
3	异丁酸	0.783	0.792	0.733
4	丁酸	0.780	0.791	0.730
5	异戊酸	0.826	0.840	0.780
6	正戊酸	0.771	0.780	0.722
7	糠醛	-0.657	-0.659	-0.676
8	愈创木酚	0.790	0.813	0.746
9	甲基环戊烯醇酮	0.697	0.722	0.647
10	2,6-二甲氧基苯酚	0.645	0.671	0.606

菌的抑菌圈直径与所测 10 种成分质量浓度的相关性均为强相关,6 种酸类成分中异戊酸相关性最高,酚类中愈创木酚相关性最高,这提示山茱萸果核木醋液的抑菌活性与其酸类和酚类物质协同作用密切相关。

3 讨论

随着畜禽养殖行业“禁抗、减抗”政策的出台,市场对于天然抑菌剂的需求显著增加。木醋液因其

抑菌作用明确,已广泛用于天然抑菌剂的开发。本课题组前期基于文献报道及课题组研究实践,提出了基于热解炭化技术的中药资源固体废物生物炭及木醋液资源化利用策略^[13]。中药山茱萸作为我国大宗药材之一,其采收加工过程中产生大量的果核资源如何资源化利用已成为山茱萸产业亟待解决的问题。为充分利用山茱萸果核资源,减少药材生产过程中的浪费和排放,本研究采用热解炭化技术制备了山茱萸果核木醋液,考察了不同热解温度山茱萸果核木醋液的组成成分及质量浓度,并对其针对大肠杆菌、痢疾杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性进行了评价,结果显示山茱萸果核木醋液具有良好的抑菌活性,提示其可作为开发利用山茱萸果核资源的一种途径。

近年来,国内外学者对木醋液发挥抑菌活性的化学组成进行了研究,但研究结果尚不一致。有研究表明,木醋液有机酸的含量与其抑菌活性直接相关^[5-6];也有研究表明木醋液中酚类物质对其抑菌活性起决定性作用^[17-18]。为明确山茱萸木醋液中发挥抑菌活性的主要物质基础,本研究选取抑菌效果较好的 W_{506~556} 对其主要活性组分进行了分析,其醋酸乙酯萃取液中共鉴定出 62 种化合物,面积归一化法计算其相对含量较高的为有机酸类,占 66.98%,其次为酚类、醛类和酮类等成分。有研究在枣核木醋液中鉴定出 35 种化合物^[9],在杜仲枝木醋液中鉴定出 33 种化合物^[12],对比分析发现各类木醋液中所含化合物类型基本相似,主要为有机酸类、酚类、醛类、酮类、醇类和酯类等,仅为具体占比有所差异,其可能与热解原材料、热解工艺及精制方法等不同有关。此外,采用外标法对山茱萸果核木醋液的 10 种主要成分进行了含量测定,10 种成分中除糠醛外均在 W_{506~556} 中质量浓度达到最高,W_{506~556} 中有机酸含量可达 20% 以上。通过将不同解热温度木醋液样品 10 种主要组质量浓度与其抑菌活性进行相关性分析,结果发现抑菌效果与有机酸质量浓度整体呈正相关,而与糠醛质量浓度呈负相关。也有研究报道,糠醛可用于农药的生产,具有杀虫杀螨的作用,但糠醛有剧毒,也被世界卫生组织列入 3 类致癌物清单中。上述结果提示,相较于其他热解温度所得木醋液,W_{506~556} 在具有良好抑菌活性的同时安全性也更高。

综上所述,山茱萸果核木醋液作为天然抑菌剂具有较好的应用潜力。本研究结果为山茱萸果核木

醋液作为抑菌剂开发提供了理论基础,也为山茱萸果核的资源化利用提供了新的途径。此外,在制备山茱萸果核木醋液的同时也形成了生物炭,其在土壤改良、环境污染治理等方面有着广阔的应用前景,倘若将其用于山茱萸种植产业,不仅会提升山茱萸果核资源利用效率,也有助于构建山茱萸资源循环经济产业链,促进山茱萸产业绿色发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 29.
- [2] 南美娟,唐凯,崔银萍,等. 山茱萸果核的研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2018, 41(5): 149-151.
- [3] 郝舒炜,王鑫,王炳华. 一种从山茱萸果核中提取浅色栲胶的方法: 中国, CN 107760207 A [P]. 2018-03-06.
- [4] 陈登宇. 一种山茱萸果核改性活性炭净水剂及其制备方法: CN103566872A [P]. 2017-08-18.
- [5] Wei Q, Ma X H, Dong J E. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyrolygneous acids from walnut tree branches [J]. *J Anal Appl Pyrolysis*, 2010, 87(1): 24-28.
- [6] Oramahi H A, Yoshimura T. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl [J]. *J Wood Sci*, 2013, 59(4): 344-350.
- [7] Soares W N C, Lira G P O, Santos C S, et al. Pyrolygneous acid from *Mimosa tenuiflora* and *Eucalyptus urograndis* as an antimicrobial in dairy goats [J]. *J Appl Microbiol*, 2021, 131(2): 604-614.
- [8] 潘琴,江洁,许英梅,等. 木醋液的制备及其应用研究进展 [J]. 大连民族大学学报, 2020, 22(1): 9-15.
- [9] 肖水水,董秀萍,李江阔,等. 不同精制程度枣核木醋液挥发性成分分析 [J]. 食品工业, 2016, 37(6): 264-268.
- [10] 温娜,刘妍如,陆世海,等. 山楂核干馏油 GC-MS 主要成分分析及含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 990-996.
- [11] 寇成,徐岩岩,于文清,等. 山杏壳木醋液的精制及抑菌活性研究 [J]. 林业工程学报, 2016, 1(6): 64-69.
- [12] 胡瑞瑞,朱铭强,梁军,等. 不同热解温度下杜仲枝粗木醋液抗氧化及抑菌活性研究和成分分析 [J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 220-226.
- [13] 郭盛,段金殿,鲁学军,等. 中药固体废弃物的热解炭化利用策略与研究实践 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1665-1671.
- [14] 张立华,王丹,宫文哲,等. 枣核木醋液化学成分分析及其抑菌活性 [J]. 食品科学, 2016, 37(14): 123-127.

- [15] He M, Zhou Y. How to identify “Material basis-Quality markers” more accurately in Chinese herbal medicines from modern chromatography-mass spectrometry data-sets: Opportunities and challenges of chemometric tools [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(1): 2-16.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically-ninth edition: approved standard M07-A9 [S]. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012: 18-19.
- [17] Baimark Y, Niamsa N. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets [J]. *Biomass Bioenergy*, 2009, 33(6/7): 994-998.
- [18] Yang J F, Yang C H, Liang M T, *et al.* Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activity of wood vinegar from *Litchi chinensis* [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1150.

[责任编辑 王文倩]