

· 论著 ·

山楂饮片及类黑素对双歧杆菌和大肠杆菌体外生长的影响

王 云¹, 吕 敏¹, 梁 杰¹, 孙 华¹, 张梦琪¹, 兰泽伦², 万 军¹, 周 霞¹ (1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 国家中医药管理局中药炮制技术重点研究室, 成都 610036)

[摘要] 目的 考察山楂饮片及类黑素对双歧杆菌和大肠杆菌体外生长的影响。方法 参照 2015 版《中国药典》方法炮制焦山楂, 通过大孔吸附树脂提取工艺对焦山楂中的类黑素进行分离提纯, 紫外分光光度法检测类黑素; 气相色谱法检测生山楂、焦山楂和类黑素对双歧杆菌和大肠杆菌生长期、稳定期和衰亡期乙酸含量的影响。结果 初期生山楂和焦山楂对细菌的影响大于类黑素, 中后期类黑素通过改变乙酸的生成抑制大肠杆菌生长代谢, 以及改变双歧杆菌生长代谢规律, 促进乙酸生成, 调节肠道菌群。结论 生山楂、焦山楂和类黑素均通过促进肠道菌群生长代谢, 促进消化。其中, 焦山楂对肠道菌群效果较好。

[关键词] 类黑素; 焦山楂; 气相色谱; 双歧杆菌; 大肠杆菌

[中图分类号] R96

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)02-0135-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201904129

Effects of hawthorn and melanoidins on the in-vitro growth of Bifidobacterium and E.coli

WANG Yun¹, LU Min¹, LIANG Jie¹, SUN Hua¹, ZHANG Mengqi¹, LAN Zelun², WAN Jun¹, ZHOU Xia¹ (1. Life Science & Engineering College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Key Research Room of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610036, China)

[Abstract] **Objective** Effect of hawthorn and melanoidins on the in-vitro growth of Bifidobacterium and E.coli. **Methods** According to methods of the Chinese pharmacopoeia (2015), the charred hawthorn was prepared. The melanoidins in charred hawthorn were separated and purified by the macroporous resin extraction process. Ultraviolet spectrophotometry was used to detect melanoidins. The gas chromatography was used to detect the effects of hawthorn, charred hawthorn and melanoidins on the content of the acetic acid in Bifidobacterium and E.coli during growth, stable and decay period. **Results** In the early stage, the effects of hawthorn and charred hawthorn on bacteria were greater than melanoidins. In the middle and late stage, melanoidins inhibited the growth and metabolism of E.coli by changing the generation of acetic acid, and contributed to that of Bifidobacterium and also promoted the generation of acetic acid and regulate the intestinal flora. **Conclusion** Hawthorn, charred hawthorn and melanoidins all promote digestion by promoting the growth and metabolism of intestinal flora. Among them, charred hawthorn has a better effect on intestinal flora.

[Key words] melanoidins; charred hawthorn; gas chromatography; Bifidobacterium; E.coli

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 焦山楂为其炒制品^[1]。现代药理研究证明, 焦山楂抑菌作用强于生山楂, 而某些特定菌群与消化功能密切相关^[2]。而山楂炒

焦后产生新的物质——类黑素, 类黑素是在食品热处理过程中形成的。目前, 类黑素的抗菌活性已得到证实。大多数类黑素对微生物作用的研究都是在特定的微生物生长培养基中进行的, 这些研究表明类黑素可以刺激微生物生长^[3], 也可以抑制微生物生长^[4-5]。肠道菌群与人体健康密切相关, 药物和功能食品可能通过调节肠道微生物来改善胃肠功能, 帮助消化^[6-7]。双歧杆菌和大肠杆菌是典型的有益菌和有害菌, 双歧杆菌常被加入酸奶饮品中帮助消化。乙酸是双歧杆菌的主要代谢物质, 随着乙酸的增多, pH 值降低从而抑制大肠杆菌的生长繁殖。

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(81603295); 四川省中医药管理局项目资助(2018JC026)

[作者简介] 王 云, 硕士研究生, 研究方向: 中药炮制与制剂, Email: wangyun@163.com

[通讯作者] 周 霞, 副教授, 研究方向: 中药炮制与制剂, Email: wwyangyidi@126.com

本实验通过研究山楂、焦山楂以及焦山楂炒制过程中产生的类黑素对大肠杆菌、双歧杆菌以及其代谢物乙酸的影响,探究“山楂炒焦长于消食导滞”的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器

低温培养箱(美墨尔特有限公司,德国),生物安全柜(赛默飞世尔科技公司,美国),高压灭菌锅(三洋公司,日本),纯水机(密理博公司,美国),厌氧罐(北京陆桥技术股份有限公司,北京);紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司,上海);7890B 型气相色谱仪(安捷伦科技有限公司,美国);HP-FFAP 型毛细管柱(货号:19091F-413,安捷伦科技有限公司,美国);GM900 型非接触红外测温仪(深圳聚茂源科技有限公司,深圳)。

1.1.2 实验试剂

MRS 固体培养基、PYG 液体培养基、厌氧产气袋和厌氧指示剂(北京陆桥技术股份有限公司);蛋白胨、酵母粉(英国 OXOID 公司);乙酸(98.85%,国药集团化学试剂有限公司,中国);其余试剂均为分析纯。

1.1.3 山楂和实验菌株

净山楂饮片(四川同善堂中药饮片有限责任公司,批号:180501);双歧杆菌(GDMCC1.1258)、大肠杆菌(ATCC25922)(中国科学院微生物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 焦山楂的炮制

参照 2015 版《中国药典》一部山楂项下制备焦山楂。取生山楂 150 g,中火(380~420)℃炒制 10 min,至药材表面呈焦黄或焦褐色,内部颜色加深,并具有焦香气味,取出,常温封存,即得。

1.2.2 生山楂、焦山楂和类黑素浸膏的制备

(1)生山楂和焦山楂浸膏的制备

取生山楂和焦山楂各 100 g 进行水浸提,料液比为 1:15,浸提 8 h,浸提 2 次。生山楂和焦山楂浸提液分别在 4℃下以 3 600 r/min 离心 10 min,取上层清液各 1 000 ml。将 500 ml 上层清液进行蒸发浓缩至胶状,停止加热,余温使其自然干燥,得生山楂浸膏 13.75 g,焦山楂浸膏 14.02 g。

(2)焦山楂中类黑素的提取

取焦山楂 100 g,按照“1.2.2”项中(1)的方法提取得到 1 000 ml 上层清液。取 500 ml 上层清液蒸发浓缩得棕褐色浓缩液 50 ml,进行大孔树脂吸附,

室温吸附流速 1.5 ml/min,60%乙醇作为洗脱剂,洗脱至色谱柱上无棕色为止,收集洗脱液 500 ml。洗脱液蒸发浓缩至胶状,停止加热,余温使其自然干燥,得焦山楂类黑素浸膏 13.12 g。

(3)类黑素的紫外检测

取类黑素浸膏 1 g,蒸馏水溶解定容至 100 ml,取 10 ml 溶液,分别定容至 50 ml;因波长 420 nm 处是类黑素的特征吸收波长,测其特征吸收下的吸光度值,焦山楂类黑素浸膏吸光度值为 0.492,说明焦山楂中类黑素提取成功。

1.2.3 山楂炮制品及类黑素对肠道菌群生长繁殖的影响

(1)双歧杆菌测试菌液的制备

以接种环自双歧杆菌标准菌种管挑取菌种,划线接种至 MRS 固体培养基,36℃厌氧培养 48 h,挑取单菌落接种至 PYG 液体培养基,36℃厌氧培养 48 h,以生理盐水调整浓度至 1.0 麦氏浓度,作为受试菌初始菌液,按 10:1 浓度加入试验体系。

(2)大肠杆菌测试菌液的制备

以接种环自大肠杆菌标准菌种管挑取菌种,划线接种至 LB 固体培养基(配方:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,琼脂粉 15 g,加入 1 L 蒸馏水,以 5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.0,121℃高压灭菌 15 min 备用),36℃有氧培养 24 h,挑取单菌落接种至 LB 液体培养基(配方:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,加入 1 L 蒸馏水,以 5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.0,121℃高压灭菌 15 min 备用),36℃有氧培养 6 h,以生理盐水调整浓度至 0.5 麦氏浓度,作为受试菌初始菌液,按 10:1 浓度加入试验体系。

(3)样本药液的处理

准确称取生山楂、焦山楂和类黑素浸膏各 10 g,加入 100 ml 去离子水,超声振荡处理,期间手动震荡数次,直至样本完全溶解,配制 10% 母液,并经 115℃高压灭菌处理 15 min 后 4℃保存备用。

(4)乙酸含量测定

①样本前处理:将经过微生物培养的溶液 1 ml,经过高速离心机 4 000 r/min 离心,之后再过 0.2 μm 有机相滤头于进样瓶,样品量大于 0.5 ml,或者使用内插管,上机测定。

②标准溶液及标准曲线:称取 60.05 g 乙酸于 100 ml 容量瓶,用一级水定容至刻度,摇匀,作为储备标准溶液,浓度为 101.33 mmol/L。将标准储备溶液依次稀释 1、3、10、20、100、200 倍得标准工作溶液。

③色谱条件:洗针液为甲醇,进样量 0.5 μL ,进样口温度 240 $^{\circ}\text{C}$;压力 6.1219 psi;分流比 10:1,流量为 1.0 ml;升温程序:初始温度:100 $^{\circ}\text{C}$,保持 0 min;梯度一:以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 120 $^{\circ}\text{C}$,保持 0 min;梯度二:以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 200 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min;总运行时间:18 min;检测器(FID)温度:240 $^{\circ}\text{C}$;空气流量:300 ml/min;氢气流量:33 ml/min;尾吹氮气流量:20 ml/min;数据采集频率/峰宽:20 Hz/0.01 min。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 22.0 进行独立样本 t 检验,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 乙酸标准曲线的建立

乙酸浓度在 0.51 ~ 101.33 mmol/L 线性关系良好。以乙酸峰面积(Y)为纵坐标,乙酸含量(X)为横坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程为 $Y=3.6705X-4.3008$, $r=0.9990$,残留标准误差为 6.6442,如图 1 所示。

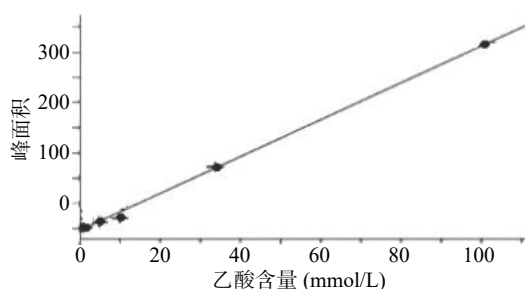


图 1 乙酸标准曲线

2.2 山楂饮片及类黑素对双歧杆菌体外生长的影响

生山楂和焦山楂加速生长期双歧杆菌的生长繁殖,达稳定期后,由于生山楂中多种物质被分解,菌群产生大量代谢废物,于衰亡期加速双歧杆菌的衰亡;由于焦山楂中多种物质被分解,菌群产生大量代谢废物,于衰亡期加速双歧杆菌的衰亡;但因焦山楂中存在类黑素且其他物质较少,衰亡速率慢于生山楂组;类黑素加速生长期双歧杆菌的生长繁殖,但由于无其他物质,其生长速率慢于生山楂组,但在衰亡期中明显改变双歧杆菌生长规律,使生长期延长(生长速率变缓),双歧杆菌衰亡延后,如图 2。

2.3 山楂饮片及类黑素对大肠杆菌体外生长的影响

生山楂促进大肠杆菌生长期前期的生长繁殖,但由于代谢废物的逐渐增加,乙酸堆积,使生长速率逐渐变缓;焦山楂促进大肠杆菌生长期前期的生

长繁殖,但由于类黑素及代谢废物的影响使生长期变短,稳定期提前;类黑素对大肠杆菌生长期前期无明显影响,但生长期后期明显促进大肠杆菌的生长繁殖,如图 3 所示。

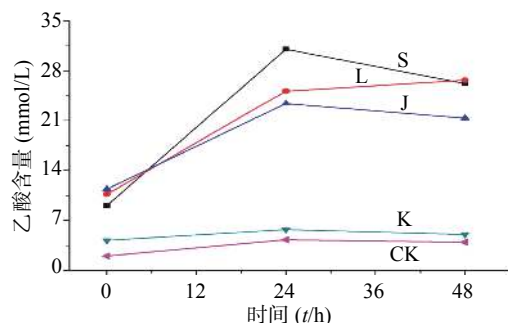


图 2 对双歧杆菌体外培养乙酸代谢的影响

S:生山楂, L:类黑素, J:焦山楂, K:生理盐水加菌组, CK:生理盐水处理组

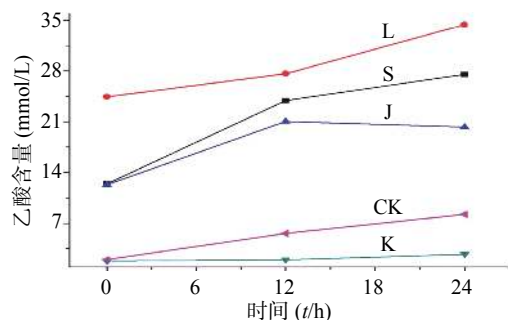


图 3 对大肠杆菌体外培养乙酸代谢的影响

S:生山楂, L:类黑素, J:焦山楂, K:生理盐水加菌组, CK:生理盐水处理组

3 讨论

3.1 焦山楂炮制工艺研究

《中国药典》一部中对焦山楂炮制方法为:取净山楂,中火条件下炒至药材表面焦褐色,内部焦黄色,并具有焦香气味。因无可控工艺参数,焦山楂炮制过程中易出现饮片表面以及内部颜色不均一,山楂炒制成品质量不稳定等情况。结合课题组前期实验,采用分别 100、150、200 和 250 g 净山楂为炮制对象,中火条件为(340 ~ 380) $^{\circ}\text{C}$ 、(380 ~ 420) $^{\circ}\text{C}$ 和(420 ~ 460) $^{\circ}\text{C}$,炮制时间为 8、10、12 和 14 min;不同质量同一批号的净山楂在不同的中火条件下炮制不同的时间,采用非接触式红外测温仪检测炒制温度,并以炒锅初温和山楂药材炒制末温辅助控温。实验筛选出 150 g 净山楂中火条件(380 ~ 420) $^{\circ}\text{C}$ 下炒制 10 min,可得到质量稳定,颜色均一的焦山楂。

3.2 焦山楂类黑素提取工艺研究

类黑素的提取方法主要是水浸提法, Borrelli 等^[8]在 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,采用 1:6 料液比,对咖啡中的

(下转第 165 页)

- 53.
- [5] 刘立萍. 灵芝多糖的药理学作用(摘要)[C]//中华中医药学会 2014 第七次临床中药学术研讨会论文集. 重庆, 2014: 129-130.
- [6] 张云峰, 叶小芳. 牛膝多糖的生物学功能研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2007, 26(4): 29-30.
- [7] 蔡小辉, 曾棋平, 王艺红, 等. 星点设计-效应面法优化镰形棘豆多糖的提取工艺[J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(6): 427-431.
- [8] 王庆芬. 刺参中多糖的提取分离、结构表征及其核苷类物质的分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2017.
- [9] 宋佳, 张振秋, 李峰. 柱前衍生 HPLC 对鹿茸多糖中单糖组成的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(9): 2227-2230.
- [10] 张华锋, 张杰, 刘炯, 等. 首乌藤多糖的分离纯化及初步结构解析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 5-8.
- [11] 夏洁, 舒畅, 王庆, 等. 合欢皮多糖提取工艺的优化及抗氧化研究[J]. *武汉轻工大学学报*, 2018, 37(5): 89-94.
- [12] 徐丽媛, 李志猛, 杨蕾, 等. 菟丝子多糖含量测定方法的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(8): 548-551.
- [13] 王艳杰, 吴勃岩, 梁颖, 等. 五味子多糖提取、含量测定及多糖组分分析[J]. *中医药信息*, 2009, 26(6): 30-32.
- [14] 李秋红. 菟丝子等十三味中药最佳炒制工艺研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009: 24-60.
- [15] 孙晓春, 颜军, 何钢, 等. 川芎多糖的分离纯化及其单糖组成测定[J]. *四川农业大学学报*, 2011, 29(1): 56-60.
- [收稿日期] 2019-08-06 [修回日期] 2019-12-11
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 137 页)

类黑素进行水提; Langner 等^[9] 在室温条件下采用 1:12 料液比, 水浸提 1 h, 提取到土豆类黑素粗制品。类黑素成分复杂, 提纯困难。目前, 主要的纯化方法有大孔树脂、超滤和凝胶层析等方法。何健^[10] 等发现 X-5 大孔树脂是曲霉型豆豉类黑素的最佳吸附树脂。秦礼康等^[11] 利用 S-8 树脂分离得到豆豉两个类黑素组分。本实验在水浸提法的基础上进行改良, 最终获得最优提取工艺。结果显示类黑色素在 420 nm 处有较强吸收^[12]。

3.3 气相色谱条件的筛选

实验采用气相色谱法检测菌群代谢物乙酸的含量。参照文献^[13-14], 结果显示其色谱条件对于本样品分析效果不佳; 在柱温选择中, 恒温法对乙酸检测效果不理想, 峰形不稳定, 因此实验采取梯度升温。经反复试验, 最终获得正文中的检测参数, 分离效果好, 可作为本实验乙酸检测条件。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 31.
- [2] 赵重博, 吴建华, 曾媛媛, 等. 山楂饮片体外抗菌实验研究[J]. *现代中医药*, 2017, 37(3): 82-83, 88.
- [3] JEMMALI M. Influence of the maillard reaction products on some bacteria of the intestinal flora[J]. *J Appl Bacteriol*, 1969, 32(2): 151-155.
- [4] EINARSSON H, SNYGG B G, ERIKSSON C. Inhibition of bacterial growth by maillard reaction products[J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(5): 1043-1047.
- [5] STECCHINI M, GIAVEDONI P, SARAIS I, et al. Antimicrobial activity of maillard reaction products against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Ital J Food Sci*, 1993, 5(2): 147-150.
- [6] CHANG C J, LIN C S, LU C C, et al. Corrigendum: *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut Microbiota[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16130.
- [7] 吴建华, 孙净云. 山楂有机酸部位对胃肠运动的影响[J]. *陕西中医*, 2009, 30(10): 1402-1403.
- [8] BORRELLI R C, VISCONTI A, MENNELLA C, et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(22): 6527-6533.
- [9] LANGNER E, NUNES F M, POŻAROWSKI P, et al. Melanoidins isolated from heated potato fiber (Potex) affect human colon cancer cells growth via modulation of cell cycle and proliferation regulatory proteins[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 57: 246-255.
- [10] 何健, 黄占旺, 史杰, 等. 大孔树脂对曲霉型豆豉类黑素的精制研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(4): 156-159.
- [11] 秦礼康, 丁霄霖. 陈窖豆豉类黑精提取及骨架肽段氨基酸组成分析[J]. *食品科学*, 2006, 27(1): 125-129.
- [12] RUFIÁN-HENARES J A, MORALES F J. Antimicrobial activity of melanoidins[J]. *J Food Qual*, 2007, 30(2): 160-168.
- [13] 宋菲. 香菇多糖对双歧杆菌和大肠杆菌体外生长的影响[J]. *中国医学创新*, 2013, 10(24): 145-147.
- [14] 王广, 马淑霞, 胡新俊, 等. 党参多糖对双歧杆菌和大肠埃希菌体外生长的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(3): 199-201.
- [收稿日期] 2019-04-25 [修回日期] 2020-02-18
[本文编辑] 陈盛新