

北五味子乙素体外抗氧化 及抑菌作用的研究

商红军,孟宪军*,李 斌,朱力杰,吴 倩,李元魁,汪艳群
(沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110161)

摘 要:对北五味子乙素进行抗氧化及体外抑菌实验。结果表明:北五味子乙素对自由基的清除效果明显,其中对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用大于相同浓度的 V_c ,其半数清除浓度为 $0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;对 $\text{O}_2^-\cdot$ 清除作用小于 V_c ,其半数清除浓度为 $0.24\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。北五味子乙素提取液对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、沙门氏菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑制作用,其中对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,最低抑菌浓度为 $0.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,对根霉、黑曲霉、南阳酵母无明显抑菌活性。

关键词:北五味子,乙素,抗氧化,抑菌

Antioxidation and antimicrobial activity of the schisandrin B extraction from *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill

SHANG Hong-jun, MENG Xian-jun*, LI Bin, ZHU Li-jie, WU Qian, LI Yuan-su, WANG Yan-qun

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Antioxidation and antimicrobial activities of the schisandrin B extraction from *Schisandra chinensis*(Turcz.) were studied. The results showed that schisandrin B had effective scavenging effect on the hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$) and the super oxide anion radical ($\text{O}_2^-\cdot$). Scavenging effect of $\cdot\text{OH}$ ($\text{IC}_{50}=0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was higher than that of the same concentration of V_c . Scavenging effect of $\text{O}_2^-\cdot$ ($\text{IC}_{50}=0.24\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was less than that of V_c . Schisandrin B had a certain activity against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Salmonella*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*. The activity against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* was the strongest with minimum inhibitory concentration of $0.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. There was no activity on *Rhizopus*, *Aspergillus niger* and *Nanyang yeast*.

Key words: *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill; schisandrin B; antioxidation; antimicrobial

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)02-0170-04

五味子为木兰科植物五味子(*Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill)的果实,习称“北五味子”。《中华人民共和国药典》中规定其果实、种子、藤茎均可入药^[1]。其广泛分布于我国东北部山区,它的干燥成熟果实为临床常用的滋补性中药,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心的功效^[2]。木脂素类成分是五味子的主要药用成分^[3-5],主要具有抗肿瘤、抗病毒、保肝、抗衰老^[6]等作用。五味子乙素作为五味子木脂素的主要活性成分之一^[7],伴随着人们对木脂素的研究而备受关注。近年来研究表明,五味子乙素具有保肝、抗癌、抗溃疡等药理作用,已经被应用到医药、食品、化妆品等领域中^[8-9]。但国内外目前对于五味子乙素单体的抗氧化研究多集中在体内组织抗氧化能力上^[10],而对体外抗氧化能力研究的相关报道较少;关于五味子提取物抑菌作用研究,多在五味子总木脂素混合物的抑菌作用研究上^[11],其中木脂素单体

的抑菌作用和机理研究较少。本实验对超临界萃取五味子粉末,液相色谱制备后的五味子乙素提取液进行抗氧化及抑菌作用的研究^[12-16],为开发北五味子深加工产品提供依据,也为五味子乙素的研发提供新的可利用资源。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

五味子 样品于2009年10月采于辽宁省新宾县,由辽宁中医药大学赵百锁副教授鉴定为北五味子;五味子乙素标准品 纯度 $\geq 98\%$;细菌 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、沙门氏菌(*Salmonella*);真菌 南洋酵母(*Nanyang Yeast*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、根霉(*Rhizopus*);培养基 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基、马铃薯蔗糖琼脂培养基,以上均由本院微生物教研室提供;磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、硫酸亚铁、邻菲罗琳、抗坏血酸、邻苯三酚、浓硫酸、浓盐酸、双氧水、无水乙醇、甲醇、三羟甲基氨基甲烷/tris 均为分析纯,沈阳化学试剂厂。

UV-1600 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分

收稿日期:2010-12-21 * 通讯联系人

作者简介:商红军(1969-),男,副教授,博士在读,研究方向:食品深加工及综合利用。

基金项目:沈阳农业大学青年教师基金项目(20101007)。

表1 反应液加入顺序(mL)
Table 1 The order of reactivity liquor(mL)

	磷酸缓冲液 (pH=7.4)	邻菲罗啉-甲醇溶液 (7.5mmol · L ⁻¹)	去离子水	FeSO ₄ 溶液 (7.5mmol · L ⁻¹)	样品	双氧水 (0.03%)
A ₀	2.0	2.0	1.8	2.0	0	0
A ₁	2.0	2.0	0.8	2.0	0	1.0
A _{样品}	2.0	2.0	0	2.0	1.0	1.0

注:清除率计算: $I = (A_{\text{样品}} - A_1) / A_0 \times 100$, 其中 I: 样品对羟基自由基的清除率(%); A₀ 不含样品和双氧水的吸光度; A₁ 不含样品只含双氧水的吸光度; A_{样品} 含样品和双氧水的吸光度。

析仪器公司; 电热恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; 电子分析天平 上海天平仪器厂; Hzp-250 型全温振荡培养箱 上海精宏实验设备有限公司; FT-IR200型傅立叶变换红外光谱仪 美国 THERMO 公司; 5890 高效液相色谱仪 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 采用超临界 CO₂ 提取五味子粉末, 在压力 30MPa, 温度 40℃, 粒度 40 目, 时间 2h 条件下, 得到五味子乙素的提取率为 3.519mg/g, 采用制备液相 Symmetry C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-水为流动相, 配比 70:30 洗脱, 收集 31.2~32.4min 五味子乙素提取液。稀释收集的五味子乙素提取液, 使五味子乙素的浓度分别为: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg · mL⁻¹, 另配制相同浓度梯度的抗坏血酸溶液作比较。

1.2.2 五味子乙素提取液结构鉴定 五味子乙素提取液冻干后, 称取 2mg, 在玛瑙研钵中研细, 再加入 100mg 磨细干燥的 KBr 粉末, 将二者充分混合均匀, 放入烘箱中干燥 20min。干燥后取出装入压片模具中, 置于压力机下, 边抽气边施加压力, 在 8000kg/cm² 保持 5min。制成一定直径和厚度的透明片, 将制得的薄片放入仪器中进行测定。同时将收集的五味子乙素提取液进行 HPLC 测定, 根据目标成分峰面积的百分比得出其纯度。

1.2.3 五味子乙素提取液抗氧化性质研究

1.2.3.1 五味子乙素提取液消除羟基自由基(·OH)的研究 参照 fenton 反应体系按照表 1 的顺序依次加入反应液。反应体系置于 37℃ 恒温水浴锅中, 准确反应 90min, 立即取出并迅速测定其在 536nm 处吸光度(OD 值)(蒸馏水作参比, 便于提高精度, 测三次, 取平均值)。

1.2.3.2 五味子乙素提取液清除超氧阴离子(O₂⁻·)的研究 样品制备: 稀释分离纯化后的五味子乙素提取液, 使五味子乙素的浓度分别为: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg · mL⁻¹, 另配制相同浓度梯度的抗坏血酸溶液作比较。具体方法: 取 4.8mL Tris-HCl 缓冲液于试管中, 再加入 0.8mL 蒸馏水, 混匀, 4min 后加入 1 滴浓盐酸溶液, 然后于 325nm 处测得吸光度值(A₀₀)。取 4.8mL Tris-HCl 缓冲液于试管中, 再加入 0.2mL 蒸馏水, 混匀, 加入 0.6mL 邻苯三酚溶液, 混匀, 4min 后加入 1 滴浓盐酸, 然后于 325nm 处测得吸光度值(A₀₁)。取 4.8mL Tris-HCl 缓冲液于试管中, 加入 0.2mL 样液, 再加入 0.6mL 蒸馏水, 混匀, 4min 后加入 1 滴浓盐酸, 然后于 325nm 处测得吸光度值(A₁₀)。取 4.8mL Tris-HCl 缓冲液于试管中, 加入 0.2mL 样液, 混匀, 再加入 0.6mL 邻苯三酚溶液, 混匀, 4min 后加入 1 滴浓盐酸, 然后于 325nm 处测得吸

光度值(A₃₂₅)。

抑制率(%) = $(1 - \frac{A_{325} - A_{10}}{A_{01} - A_{00}}) \times 100\%$

1.2.4 五味子乙素提取液抑菌研究

1.2.4.1 药液制备 将分离纯化后的五味子乙素冻干粉末, 用乙醇配制成浓度为 0.25、0.5、1、2、4、8mg · mL⁻¹, 备用。

1.2.4.2 菌种活化 将融化的培养基装入试管, 灭菌后摆斜面。在无菌条件下用划线法将供试菌种移接入相应的斜面培养基上, 于 37℃ 下培养 18~24h, 进行菌种斜面活化。

1.2.4.3 供试菌株悬浮液的制备 将活化好的菌种, 在无菌条件下, 每种分别挑取两环菌苔, 各用无菌水稀释, 制成一定浓度的菌悬液。

1.2.4.4 含菌平板制作 将新鲜配制的培养基于 121℃ 条件下灭菌, 当培养基冷至 50~60℃ 时, 于超净工作台上将培养基倒入灭菌的 φ90mm 培养皿中, 每皿 15~20mL 培养基, 待平板冷却后, 每皿中加入 0.5mL 菌悬液, 用三角玻璃涂棒均匀涂成薄板备用。

1.2.4.5 抑菌作用测定 参照管碟法, 在已放至室温的培养基上等距均匀放 3 个已灭菌的牛津杯, 在其中两个牛津杯内用微量移液器加入等量不同浓度的五味子乙素提取液, 另外一个作为对照, 加入等量乙醇溶液, 每个浓度重复三次, 37℃ 培养 24h, 观察并测量抑菌环直径, 比较抑菌效果。(注: 抑菌圈在 15mm 以上, 抑菌能力强; 抑菌圈在 10~15mm, 抑菌能力较强; 抑菌圈在 10mm 以下, 抑菌能力弱。)

2 结果与分析

2.1 五味子乙素提取液抗氧化性质研究

2.1.1 五味子乙素提取液结构鉴定 图 1 为经 HPLC 纯化后五味子乙素提取液经冻干后的五味子乙素的红外光谱图, 图 1 经解析: 样品在 2959cm⁻¹ 处有吸收峰, 为 -CH₂ 伸缩振动峰, 说明乙素结构中有烷基的存在。样品在 1619cm⁻¹ 处有吸收峰, 为芳环骨架振动引起的很强的吸收峰, 说明了乙素结构中有苯环的存在。样品在 1418cm⁻¹ 处有吸收峰, 为羧基的 C=O 的伸缩振动峰, 说明了乙素结构中有羧基的存在。样品在 1329cm⁻¹ 处有吸收峰, 为羧基的 C=O 的对称伸缩振动峰, 说明了乙素有羧基的存在。样品在 1046cm⁻¹ 处有吸收峰, 为羟基的 -OH 的变角振动峰, 说明了乙素结构中有羟基的存在。鉴定后的基团与图 2 中五味子乙素结构符合, 基本判定样品为五味子乙素。图 4 为五味子乙素的 HPLC 图与图 3 五味子乙素标准品的 HPLC 对照, 根据五味子乙素成分的峰面积的百分比得出其纯度(纯度 ≥ 98%)。

2.1.2 五味子乙素提取液清除羟基自由基(·OH)

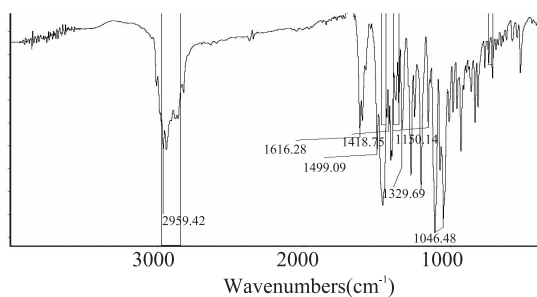


图1 五味子乙素的红外光谱图

Fig.1 The infrared scan chart of Schisandrin B

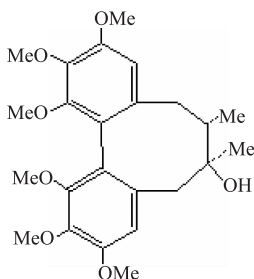


图2 五味子乙素结构

Fig.2 The structure of Schisandrin B

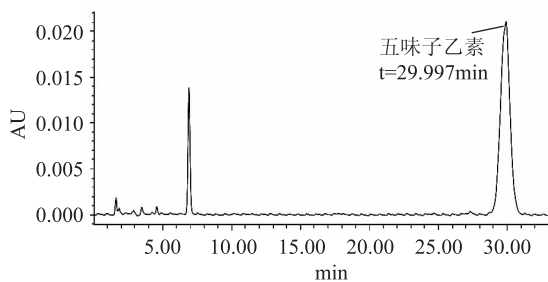


图3 五味子乙素标准品 HPLC 图

Fig.3 The HPLC chart of Schisandrin B standards

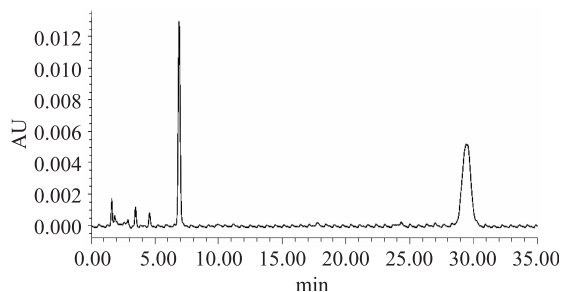
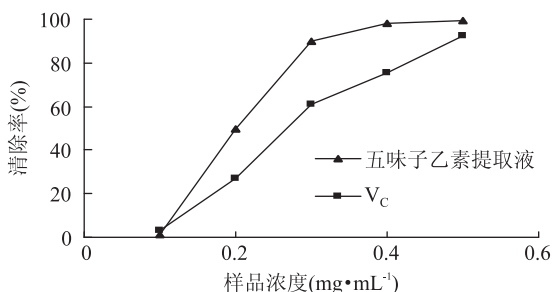


图4 五味子乙素提取液 HPLC 图

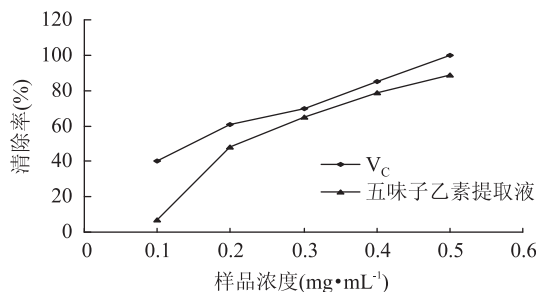
Fig.4 The HPLC chart of extraction of Schisandrin B

的研究 不同浓度的五味子乙素提取液和抗坏血酸溶液对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用见图5。在 $0.1\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,二者对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用较好,并且其清除效果都与浓度有一定的关系,随浓度的增加,对自由基的清除效果增强。另外,总体上五味子乙素提取液对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用大于 V_C ,其半数清除浓度为 $0.2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,当浓度为 $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,其清除率接近100%,而抗坏血酸的半数清除浓度为 $0.26\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.3 五味子乙素提取液清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的研究 不同浓度的五味子乙素提取液和抗坏血酸溶液对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用见图6。在

图5 清除 $\cdot\text{OH}$ 能力比较Fig.5 The comparison of ability to remove $\cdot\text{OH}$

$0.1\sim 0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,二者对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用较好,清除效果也都与浓度有一定的关系,随浓度的增加,对自由基的清除效果增强。抗坏血酸对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 清除作用总体上大于五味子乙素提取液,其半数清除浓度为 $0.16\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,而五味子乙素提取液的半数清除浓度为 $0.24\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图6 清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 能力比较Fig.6 The comparison of ability to remove $\text{O}_2^{\cdot-}$

2.2 五味子乙素提取液抑菌研究

由表2可知,五味子乙素提取液在一定的浓度范围内对供试的几种细菌都有抑菌活性,其中对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,最低抑菌浓度为 $0.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,对沙门氏菌和大肠杆菌的抑制作用最弱,最低抑菌浓度为 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时根据抑菌圈的变化,五味子乙素提取液对供试菌的抑制作用与浓度也有一定的关系,总体上随着其浓度的提高,抑菌作用增强。

表2 不同浓度的五味子乙素提取液对细菌生长的抑制

Table 2 Antibacterial activities of different concentration of Schisandrin B

供试细菌	五味子乙素浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)						最低抑制浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
	0.25	0.5	1	2	4	8	
大肠杆菌	—	—	5	7	8.5	11	1
白色念珠菌	5	7	9	12	13.5	16	0.25
金黄色葡萄球菌	7	8.5	11	14	16	17.5	0.25
沙门氏菌	—	—	5	6.5	8	10	0.5
枯草芽孢杆菌	—	5	7	8.5	10	12	1

五味子乙素提取液对真菌的抑制作用见表3,在 $0.25\sim 8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内,对供试的三种真菌抑菌活性较弱,特别是两种霉菌,基本没有抑菌圈的出现,虽然南阳酵母在五味子乙素浓度为 $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时产生抑菌圈,但抑菌圈较小,抑制能力较弱。

(下转第217页)

达到小于1%的低脂冰淇淋的要求,且蛋白质含量比对照样增加21.5%,经感官品尝,虽然低脂冰淇淋入口融化较慢,但香味明显、质构细腻、口感润滑、无冰晶感。因此以糯米糖浆替代奶油制作低脂冰淇淋不仅可以降低脂肪的摄入,还可提高蛋白质的摄入量,且膨胀率及抗融性优于传统冰淇淋,感官评分与传统冰淇淋接近。

3 结论

3.1 应用响应面设计法优化糯米粉酶解的最佳工艺条件为酶用量为0.71g/L、酶解时间为29.26min、酶解温度为75.31℃,平均DE值为7.14%,与预测值7.08%相对误差仅为0.85%。由此证实,响应曲面设计可靠并切合实际。

3.2 以该糯米糖浆替代7%奶油制作的低脂冰淇淋脂肪含量小于1%,蛋白质含量增加超过20%,膨胀率及抗融性优于传统冰淇淋,感官评分与传统冰淇淋接近。因此酶法水解的糯米糖浆可用于制作低脂冰淇淋。

参考文献

[1] 杨月欣,王光亚,潘兴昌.中国食物成分表[M].北京:北京

大学医学院出版,2002:28.
[2] 杨玉玲,许时婴.粳米为基质脂肪替代品的组分含量分析与测定[J].中国粮油学报,2009,24(5):127-130.
[3] Kim H Y L, Hyeon W Y, Lim H S, et al. Replacement of shortening in yellow layer cakes by corn dextrins [J]. Cereal Chemistry, 2001, 78(3): 267-270.
[4] 胡勇刚,邓静.分子蒸馏单甘酯的分子结构对低脂冰淇淋质构的影响[J].食品工业科技,2007,28(11):197.
[5] 中华人民共和国国内贸易行业标准 SB/T10013-2008.冷冻饮品冰淇淋[S].北京:中国标准出版社,2009.
[6] 贝惠玲,黄建蓉,王一凡.添加大米粉的冰淇淋的研制[J].食品工业科技,2009,30(7):238-240.
[7] Lumdubwong M, Serib P A. Low - and medium - DE maltodextrins from waxy wheat starch: preparation and properties [J]. Starch, 2001, 53: 605-615.
[8] 李福谦,李望,唐书泽,等.以大米淀粉为原料的酶法制备低DE值麦芽糊精的研究[J].食品与发酵工业,2006,32(5):71.
[9] 高群玉,黄立新,黄农荣,等.耐高温α-淀粉酶作用于谷物粉液化水解性质研究[J].中国粮油学报,2001,16(12):3.

(上接第172页)

表3 不同浓度的五味子乙素提取液对真菌生长的抑制
Table 3 The result of MIC of Schisandrin B against tested bacteria

供试细菌	五味子乙素浓度(mg · mL ⁻¹)					
	0.25	0.5	1	2	4	8
根霉	—	—	—	—	—	—
黑曲霉	—	—	—	—	—	—
南阳酵母	—	—	—	—	5	7

3 结论

3.1 五味子乙素提取液抗氧化效果明显,其中对·OH清除作用大于相同浓度的V_c,其半数清除浓度0.2mg · mL⁻¹;对O₂⁻清除作用小于V_c,其半数清除浓度0.24mg · mL⁻¹。

3.2 五味子乙素提取液对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、沙门氏菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有一定的抑制作用,其中对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,最低抑菌浓度为0.25mg · mL⁻¹,对根霉、黑曲霉、南阳酵母无明显抑菌活性。

参考文献

[1] 国家药典委员会,中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005.
[2] 王振中.五味子的药理研究进展[J].时珍国药研究,1996,7(2):119.
[3] 李国成,邱凯峰,刘恩桂,等.北五味子藤茎的化学成分研究[J].中药材,2006,29(10):1045-1047.
[4] Gu Wei, Wei Nanyu, Wang Zhezhi. LC analysis of lignans from schisandra sphenanthera Rehd. et Wils [J]. Chromatographia, 2008, 67(11-12): 979-983.
[5] Y H Choi, J Kim, S H Jeon, et al. Optimum SFE condition for lignans of schisandra chinensis fruits [J]. Vieweg Verlag, 2006, 48(9-10): 695-699.

[6] Deng Xinxiu, Chen Xiaohui, Cheng Weiming, et al. Simultaneous LC-MS quantification of 15 lignans in schisandra chinensis (Turcz.) baill fruit [J]. Chromatographia, 2008, 67(7-8): 559-566.
[7] 仰榴青,徐佐旗,吴向阳,等.薄层扫描法同时测定南、北五味子提取物中四种木脂素的含量[J].食品科学,2006,27(11):401-403.
[8] 王英范,郜玉刚,刘雅婧,等.五味子乙素抗梅花鹿源BVDV的实验研究[J].特产研究,2006(2):5-8.
[9] 孙成仁,彭正松.北五味子的抑菌作用[J].四川师范学院学报:自然科学版,1993,314(3):200-202.
[10] 高连用.五味子乙素对小鼠肝谷光甘肽抗氧化系统的作用[J].中草药,1996,27(4):251-252.
[11] 刘华英.北五味子木脂素提取工艺及提取物抑菌作用的研究[D].吉林:吉林农业大学,2006.
[12] 郭春梅.不同产地的五味子中五味子乙素含量测定[J].黑龙江医药,2003,16(1):6-7.
[13] Peng JY, Fan GR, Qu LP, et al. Application of preparative high-speed counter chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisins from schisandra chinensis [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1082(2): 203-207.
[14] Schwarzwinger C, Kranawetter H. Analysis of the active compounds in different parts of the schisandra chinensis plant by means of pyrolysis - GC/MS [J]. Monatshefte für Chemie Chemical Monthly, 2004, 135: 1201-1208.
[15] Tian K, Qi SD, Chen YQ, et al. Separation and determination of lignans from seeds of schisandra species by micellar electrokinetic capillary chromatography using ionic liquid as modifier [J]. Chromatography A, 2005, 1078(1/2): 181-187.
[16] Zhang Shouqin, Zhu Junjie, Wang Changzhen. Novel high pressure extraction technology [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 27(8): 471.