

· 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实验室, 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150g, 中火(380~420)℃炒制10min, 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100g进行水浸提, 料液比为1:15, 浸提8h, 浸提2次。生山楂和焦山楂浸提液分别在4℃下以3600r/min离心10min, 取上层清液各1000ml。将500ml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13.75g, 焦山楂浸膏14.02g。

(2) 焦山楂中类黑素的提取

取焦山楂100g, 按照“1.2.2”项中(1)的方法提取得到1000ml上层清液。取500ml上层清液蒸发浓缩得棕褐色浓缩液50ml, 进行大孔树脂吸附,

室温吸附流速1.5ml/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500ml。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13.12g。

(3) 类黑素的紫外检测

取类黑素浸膏1g, 蒸馏水溶解定容至100ml, 取10ml溶液, 分别定容至50ml; 因波长420nm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48h, 挑取单菌落接种至PYG液体培养基, 36℃厌氧培养48h, 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10g, 酵母粉5g, 氯化钠10g, 琼脂粉15g, 加入1L蒸馏水, 以5mol/L氢氧化钠调节pH至7.0, 121℃高压灭菌15min备用), 36℃有氧培养24h, 挑取单菌落接种至LB液体培养基(配方: 蛋白胨10g, 酵母粉5g, 氯化钠10g, 加入1L蒸馏水, 以5mol/L氢氧化钠调节pH至7.0, 121℃高压灭菌15min备用), 36℃有氧培养6h, 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10g, 加入100ml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15min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1ml, 经过高速离心机4000r/min离心, 之后再过0.2μm有机相滤头于进样瓶, 样品量大于0.5ml, 或者使用内插管, 上机测定。

②标准溶液及标准曲线: 称取60.05g乙酸于100ml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101.33mmol/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。

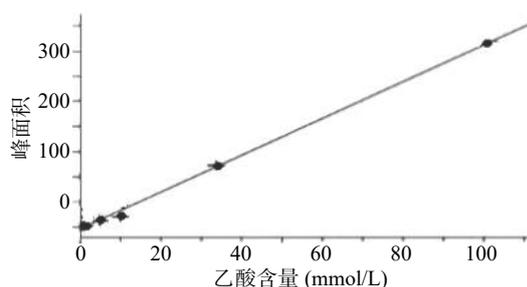


图 1 乙酸标准曲线

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。

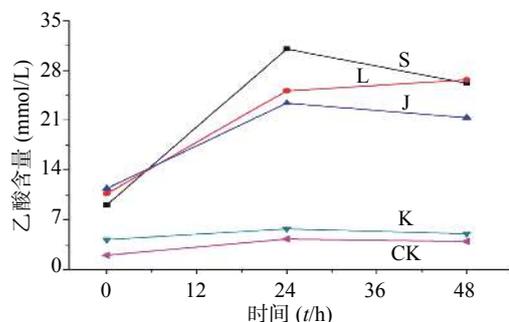


图 2 对双歧杆菌体外培养乙酸代谢的影响

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

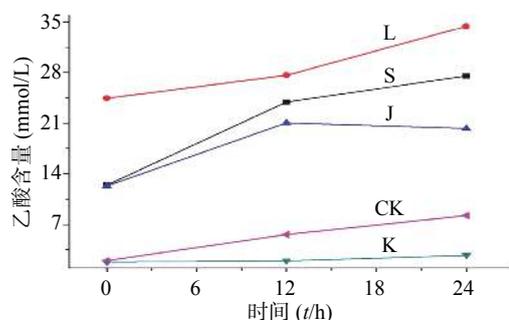


图 3 对大肠杆菌体外培养乙酸代谢的影响

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)