

文章编号:1001-6880(2014)Suppl-0096-05

青翘精油的抑菌及抗氧化性能研究

石海燕,曹志钦,周娅静,王青,马雪梅*

中北大学化工与环境学院化学工程系,太原 030051

摘要:采用超临界 CO_2 流体萃取技术提取青翘精油,通过体外试验研究青翘精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最低抑菌浓度(MIC)以及研究温度、pH 对精油抑菌效果的影响。同时采用羟基自由基清除、DPPH 自由基清除、磷钼络合物法以及硫氰酸铁法四种体外抗氧化方法,以合成抗氧化剂 BHT 和天然抗氧化剂 V_C 作对照,评价青翘精油的抗氧化活性。实验结果表明,青翘精油的抑菌效果随 pH 的减小而增大,随温度的升高而增强。同时,青翘精油在不同的抗氧化评价方法中均体现出一定的抗氧化活性,但总体抗氧化能力要弱于 BHT。

关键词:青翘精油;抑菌;抗氧化

中图分类号:R284.1;Q946.8

文献标识码:A

Study on the Bacteriostasis and Antioxidant Activities of Green Fructus Forsythiae Essential Oil

SHI Hai-yan, CAO Zhi-qing, ZHOU Ya-jing, WANG Qing, MA Xue-mei*

Department of chemical engineering, School of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China

Abstract: Green Fructus forsythiae essential oil was extracted by supercritical carbon dioxide extraction(SCDE) technique. The minimum inhibitory concentration(MIC) of the essential oil were determined by the test in vitro on the tested strains(*Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus* and *Bacillus Subtilis*). The effects of temperature and pH on bacteriostasis of the essential oil were also studied. Hydroxyl radical scavenging method, DPPH radical scavenging method, phosphomolybdenum complex assay and ferric thiocyanate method were used to evaluate antioxidant activities of *Green Fructus forsythiae* essential oil and the results were compared with those of antioxidants such as butylated hydroxytoluene(BHT) and ascorbic acid(V_C). The experimental results showed that the antibacterial effect of *Green Fructus forsythiae* essential oil enhanced with pH decreasing or with the increase of temperature. Results also showed that *Green Fructus forsythiae* essential oil in different antioxidant evaluation methods were reflected with certain antioxidant activities, but the overall antioxidant capacity was weaker than BHT.

Key words: Green Fructus forsythiae essential oil; bacteriostasis; antioxidation

连翘为木犀科植物 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,主要产于山西、河南、陕西、辽宁等地,在民间已有 2400 余年的药用历史^[1]。具有抗菌、强心、利尿、镇吐等药理作用,其中挥发性部分为主要有效成分之一^[2,3]。随着人们对食品安全的日益重视,连翘精油因其良好的生理活性已逐渐引起人们的关注,将连翘精油作为食品添加剂成为了一个热门研究课题。

连翘药材分为“青翘”和“老翘”,果实初熟尚带

绿色时采收,晒干,习称“青翘”;果实熟透时采收,晒干,习称“老翘”。而临床多习惯用老翘,对连翘的研究也集中于对老翘的研究^[4],对青翘的研究较少。本实验以超临界 CO_2 流体萃取技术提取青翘精油,探究青翘精油的抑菌及抗氧化活性,为其开发与利用提供科学参考数据,且对青翘精油的入药以及食品应用具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Spe-ed SFE-2 超临界萃取仪(美国应用分离公司);SW-CJ-IFD 型净化工作台(苏州净化设备有限公司);LRH-150-B 型生化培养箱(广东省医疗器械

厂);DSX-280A型高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂);UV757紫外可见分光光度计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试剂

青翘(山西中医学院薛慧清教授提供,采自山西泽连翘GAP种植基地);金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(以上三个菌种由山西中医学院实验中心提供)。

牛肉膏(BR),蛋白胨(BR),BHT,V_C、结晶紫、DPPH、无水乙醇、浓硫酸、磷酸钠、钼酸铵、磷酸、FeSO₄、H₂O₂、NH₄SCN、亚油酸等(以上试剂均为AR级)。

2 方法

2.1 精油萃取

参考有关资料^[5]设计萃取条件是:萃取压力为30 MPa,温度35℃,CO₂流量为20 kg/h,萃取时间为3 h,粉碎度0.55 mm。

2.2 抑菌活性测定

2.2.1 培养基和菌悬液的制备

制备牛肉膏蛋白胨培养基若干,待用。将所选的菌种进行活化,制成一定浓度的菌悬液,采用平板计数法进行浓度估算,最终将菌悬液的浓度调节为10⁶~10⁷/mL,备用。

2.2.2 滤纸片法

用打孔器制备直径为6 mm的圆形滤纸片,灭菌后在青翘精油中浸泡3 h。取菌悬液150 μL在固体培养基上涂抹均匀,将浸泡过青翘精油的滤纸片贴在含菌平板上,每皿均匀地贴3片。细菌平板置于培养箱中37℃下培养24 h,选取抑菌圈比较明显的平板测定抑菌圈直径,结果取三次重复实验的平均值^[6]。

2.2.3 最低抑菌浓度(MIC)的测定^[7]

将精油样品按不同梯度进行稀释,与灭菌后的融化培养基按1:9的比例进行混合,混匀后在培养皿中制成固体平板,然后对平板进行接种。细菌在37℃下培养24 h,观察细菌生长情况,以培养皿中不长菌者的最低浓度为样品的MIC值,数值取3组平行试验的平均值。

2.2.4 pH对精油的抑菌活性影响

调节培养基的pH为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0六个梯度,用无菌水作对照,进行抑菌圈测定(方法同2.2.2)。

2.2.5 温度对精油抑菌活性的影响

将精油分别放置在37、100、150℃下处理30 min,然后测其抑菌圈直径(方法同2.2.2)。

2.3 抗氧化能力测定

2.3.1 清除羟基自由基能力的测定—结晶紫法^[8]

配制1.0 g/L的青翘精油溶液、BHT溶液、V_C溶液作为样品储备溶液。将储备液分别稀释成质量浓度分别为1.0×10⁻⁴ g/L、2.0×10⁻⁴ g/L、3.0×10⁻⁴ g/L、4.0×10⁻⁴ g/L、5.0×10⁻⁴ g/L的溶液。在比色管中分别加入0.4 mmol/L结晶紫溶液0.3 mL,1.0 mmol/L FeSO₄溶液1.2 mL,2.0 mmol/L H₂O₂溶液0.6 mL,调pH到4.0并定容到10 mL,放置30 min后,在580 nm处测其吸光度A_b。空白溶液为不加H₂O₂的混合液,在580 nm处测其吸光度A_o。

在上述体系加入H₂O₂之前分别加入1 mL各梯度的样品溶液,在580 nm处测定其吸光度为A_s,则表观羟基自由基氧化率S可以按下式进行计算:

$$S = \frac{A_s - A_b}{A_o - A_b} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.2 清除DPPH自由基能力的测定^[9-11]

将三种样品储备液分别稀释为0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L,取1.5 mL的样品溶液和1.0×10⁻⁴ mol/L的DPPH·溶液1.5 mL,混合均匀后在暗处放置30 min,在517 nm处测定其吸光度值为A,同样方法测定样品溶液1.5 mL与1.5 mL无水乙醇混合后在517 nm处的吸光度值A_o,再测定1.5 mL的DPPH·溶液与1.5 mL无水乙醇混合液在517 nm处的吸光度值A₁,则清除率可按下式计算:

$$\text{清除率} = \left\{ 1 - \frac{A - A_0}{A_1} \right\} \times 100\% \quad (2)$$

2.3.3 磷钼络合物法测定总抗氧化活性^[12,13]

将三样品种储备液分别稀释为0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 g/L。在比色管中分别加入4 mL磷钼试剂(0.6 mol/L浓硫酸、28 mmol/L磷酸钠、4 mmol/L钼酸铵)和0.4 mL样品溶液,置于95℃水浴中恒温90 min,在695 nm处测其吸光度值A,所有测定平行进行3次,取均值。

2.3.4 硫氰酸铁法(FTC)测定抑制脂质过氧化物的能力^[14]

用1.0 g/L的青翘精油溶液、BHT的储备液作为样品溶液,取样品溶液4.0 mL,加0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH=7.0)8.0 mL、2.5%亚油酸4.1 mL和蒸馏水3.9 mL,以无水乙醇作为空白对照,放置

于40℃恒温培养箱中培养。每隔24 h取0.1 mL培养液,加入0.1 mL 30% NH₄SCN溶液、0.1 mL 0.02 mol/L FeSO₄溶液和9.7 mL 75%乙醇溶液,暗处反应3 min,在500 nm处测其吸光度值,所有测定平行进行三次,取均值。

表1 青翘精油对三种供试菌的MIC值
Table 1 MIC of three bacteria against Forsythia essential oil

供试菌种 Test bacterium	培养温度 culture temperature (℃)	培养天数 cultivated days (d)	MIC值 MIC value (mg·mL ⁻¹)
大肠杆菌 Escherichia coli	37	2	4.0
金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	37	2	4.4
枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis	37	2	2.2

通过表1可得出结论,青翘精油对不同菌种表现出了不同的抑菌活性,并且青翘精油对枯草芽孢杆菌的抑制力更强,此结果与表2中pH=7时青翘

3 结果与讨论

3.1 抑菌实验

3.1.1 最低抑菌浓度(MIC)的测定

精油对枯草芽孢杆菌的抑菌圈最大保持一致。

3.1.2 pH对精油抑菌效果的影响

表2 不同pH下精油对3种供试菌种的抑菌圈直径

Table 2 Diameter of inhibition cycle of essential oil on three bacteria under different pH value

供试菌种 Test bacterium	pH					
	4	5	6	7	8	9
大肠杆菌 Escherichia coli	-	17.0	12.5	11.0	9.2	15.0
金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	-	23.2	13.2	10.7	10.0	11.5
枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis	-	-	12.2	11.2	11.7	12.2

注:“-”为培养基中未长出菌落。

Note: “-” No colonies in the medium.

抗菌素抑菌实验结果的判定标准是:抑菌圈直径>15 mm为最敏感,10~15 mm为中度敏感,7~9 mm时为低度敏感,无抑菌者为不敏感^[6]。根据该标准,由表2可以看出在6≤pH≤9时,青翘精油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径都在10~15 mm之间,属于中度敏感。当pH=5时,青翘精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径都大于15 mm,属于高度敏感,枯草芽孢杆菌由于环境过酸,未长出菌落,没有形成抑菌圈。从整体来看,当pH逐渐变大时,抑菌圈直径先变小后变大,且酸性环境能更大程度地促进精油的抑菌作用。

3.1.3 温度对精油抑菌效果的影响

由图1可以看出,精油经过不同温度的热处理,抑菌效果有明显差异,从之前的中度敏感(10~15 mm)达到了最敏感(>15 mm)。同时也可以看出,青翘精油中的成分并不稳定,温度升高,某些成分转化成为了抑菌性的物质,从而导致抑菌效果显著提高。

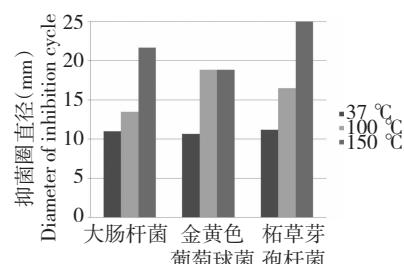


图1 不同温度处理后精油对细菌的抑菌圈直径变化图
Fig. 1 Diameter of inhibition cycle of essential oil on three bacteria under various heat treatment temperature

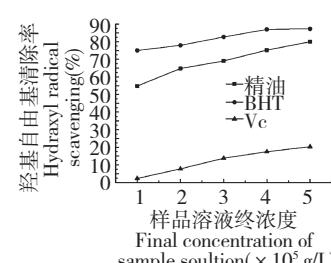


图2 羟基自由基的清除率与样品浓度的关系

Fig. 2 Relationship between hydroxyl radical scavenging and sample concentration

3.2 抗氧化实验

3.2.1 清除羟基自由基

由图2可得出结论:消除羟基自由基的能力顺序为BHT>精油> V_c ,样品清除羟基自由基的能力随浓度的增大而增强。青翘精油清除自由基的能力随浓度的变化非常明显,而且浓度相同的情况下青翘精油和BHT清除羟基自由基的能力远大于 V_c 。

3.2.2 清除DPPH自由基

DPPH·是一种稳定的自由基,其醇溶液呈深紫色,在517 nm处有一吸收峰。当反应系统中存在自由基清除剂时,它可以和DPPH·的单电子配对而使517 nm处的吸收峰渐渐消退。而且,这种颜色变浅的程度与配对电子数成化学计量关系^[15]。

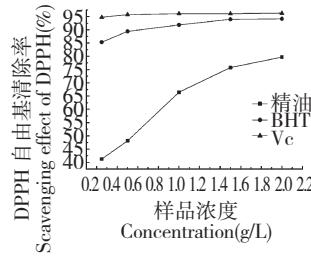


图3 DPPH自由基清除率与样品浓度的关系

Fig. 3 Relationship between DPPH radical scavenging and sample concentration

图3表明,清除DPPH自由基的能力顺序为 V_c >BHT>精油,BHT和 V_c 具有良好的清除DPPH自由基的能力,其清除率可以达到94.10%和96.26%。青翘精油清除DPPH自由基的能力随浓度变化显著,且随着浓度的增大与BHT以及 V_c 的清除能力差异减小。

3.2.3 磷钼络合物法测定抗氧化活性

磷钼络合物法测定的原理是抗氧化物质中的氢或电子转移到Mo(VI)将其还原生成绿色的Mo(V)络合物,其最大吸收波长为695 nm^[16]。其测定的吸光度越大,表示抗氧化物质活性越强。

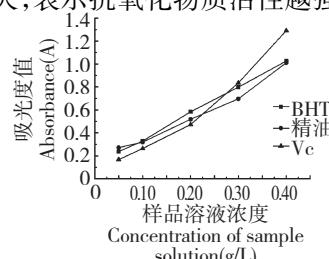


图4 络合物吸光度值与样品浓度关系

Fig. 4 Relationship between absorbance value of complex compound and sample concentration

从图4可以看出,随着样品浓度的增大,其吸光度值均相应地增大。三种样品的吸光度数值相差不大,而且曲线增长趋势相同,说明青翘精油、BHT和 V_c 的抗氧化能力相当。

3.2.4 硫氰酸铁法测定抑制脂质过氧化物的能力

硫氰酸铁法常用来测量抗氧化剂减少脂质过氧化物生成的能力,脂质过氧化物可以将Fe²⁺氧化为Fe³⁺,Fe³⁺能与硫氰酸铵生成血红色的络合物,且其最大吸收波长为500 nm,测定的吸光度值可以反映脂质过氧化物的生成量,即吸光度值越大,体系产生的脂质过氧化物越多。由于 V_c 和铁离子的系对亚油酸的氧化有促进作用,故此法不应用于 V_c 。

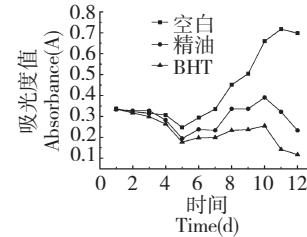


图5 络合物吸光度值与时间的关系

Fig. 5 Relationship between absorbance value of complex compound and time

图5表明,从第6天开始空白组的吸光度值明显升高,即亚油酸体系开始被氧化,而加入精油以及BHT的体系吸光度值随时间变化平缓,则体系的氧化得到了抑制。同时,通过图表可以看出BHT抑制脂质过氧化物产生的能力大于青翘精油。

4 结论

在中性环境下,青翘精油对不同菌种表现出不同的抑菌活性,对枯草芽孢杆菌的抑制力最强(MIC值最低)。pH逐渐从酸性变为碱性时,抑菌活性先变弱后变强,且酸性环境能更大程度地促进精油的抑菌作用。精油经过不同温度(37、100、150 °C)的热处理,抑菌效果有明显差异,青翘精油中的成分并不稳定,温度升高(尤其升至150 °C后),某些成分转化成为了抑菌性的物质,从而导致抑菌效果显著提高。青翘精油在不同的抗氧化评价方法中均体现出一定的抗氧化活性,但总体抗氧化能力要弱于BHT。

参考文献

- 1 Wu JJ(吴晶晶), He YX(何宇新), Li L(李玲). 贯叶连翘的研究进展. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2009, 20:404-405.

(下转第120页)