

不同水解方法对藜麦皂苷抑菌活性及酪氨酸酶抑制作用的影响

嵇丽红¹, 薛军², 赵雷¹, 丁葵英³, 徐方舟¹, 李岳¹, 史龙龙¹, 王志新¹, 薛鹏¹

(1. 潍坊医学院公共卫生与管理学院, 潍坊市食品营养与安全重点实验室, 山东潍坊 261053)

(2. 潍坊高新双语学校, 山东潍坊 261061) (3. 中国海关潍坊出入境检验检疫局, 山东潍坊 261041)

摘要: 本实验以藜麦麸皮为材料, 通过双相酸水解法、直接酸解法、酶解法三种方法去处理藜麦麸皮, 并利用正丁醇萃取获得藜麦低级性皂苷。经过最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)、最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 及纸片法测定抑菌活性; 并用酪氨酸酶抑制实验推测其抑制黑色素作用。最后用液相色谱质谱/质谱联用法 (liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 来对抑菌和抑制酪氨酸酶活性效果最好的化合物进行定性定量分析。结果表明: 经过双相酸水解转化的化合物活性最好, 对金黄色葡萄球菌和沙氏肠炎杆菌的 MIC=0.60 mg/mL, MBC=1.20 mg/mL, 对表皮葡萄球菌的 MIC=0.30 mg/mL, MBC=1.20 mg/mL; 对铜绿假单胞菌有一定的抑制作用。0.5 mg/mL 的转化物对酪氨酸酶的抑制率达到 68.09%。根据 LC-MS/MS 及 HPLC 可知, 经正丁醇萃取的水解后的化合物为皂苷。经过两相酸解后, 部分皂苷发生了水解反应, 造成了化合物极性的降低。利用双相酸水解法从藜麦麸皮中萃取藜麦皂苷元提高了化合物的活性, 增强了皂苷的抑菌和酪氨酸酶抑制作用, 并且提取率明显高于直接酸解法和酶解法。

关键词: 藜麦皂苷元; 水解方法; 抑菌; 酪氨酸酶抑制

文章编号: 1673-9078(2019)010-196-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.027

Effects of Different Hydrolysis Methods on Antibacterial Activity and Tyrosinase Inhibition of Buckwheat Saponins

JI li-hong¹, XUE Jun², ZHAO Lei¹, DING Kui-ying³, XU Fang-zhou¹, LI Yue¹, SHI Long-long¹, WANG Zhi-xin¹, XUE Peng¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety of Weifang School of Public Health and Management, Weifang Medical University, Weifang 261053, China) (2. Weifang High-tech Bilingual School, Weifang 261053, China)

(3. Weifang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, China Customs, Weifang 261041, China)

Abstract: A large amount of saponins in quinoa bran was found to have biologically active. The activity of tyrosinase inhibition and bacteriostatic of less polar saponins in quinoa bran were investigated by different hydrolysis methods, such as biphasic acid hydrolysis method, direct acid hydrolysis and enzyme hydrolysis bran. Their active component was been speculated and conducted qualitatively and quantitatively. Bacteriostatic activity was determined by minimum bacteriostatic concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and paper disk method. The whitening effect of tyrosinase inhibition was evaluated. LC-MS/MS and HPLC were used to identify the active compounds qualitatively and quantitatively. The results showed that the compounds that hydrolyzed and converted by bipolar acid had the best activities with MIC of 0.60 mg/mL, MBC of 1.20 mg/mL for *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*, MIC of 0.30 mg/mL, MBC of 1.20 mg/mL for *Staphylococcus epidermidis*. It also had certain inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibition rate of 0.5 mg/mL of the conversion compounds to tyrosinase reached 68.09%. According to LC-MS /MS and HPLC analysis, some saponins were hydrolyze after two-phase acid decomposition, resulting in the decrease of the polarity of the compounds. Extraction of saponins from quinoa bran by biphasic

收稿日期: 2019-05-17

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2019PH043)

作者简介: 嵇丽红 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能性成分研究

通讯作者: 薛鹏 (1989-), 男, 博士, 研究方向: 加工副产物功能性成分研究, 中药化学

acid hydrolysis could improve the activity of compound and enhance the function of the inhibitory on bacteria and rosinase activity. The extraction rate was significantly higher than that of direct acid hydrolysis and single enzyme hydrolysis.

Key words: quinoa saponin; hydrolysis method; bacteriostatic; tyrosinase inhibition

随着藜麦开始进入公众视线,与藜麦相关的研究也在国内陆续进行。目前我国已在西藏、湖南、山西、山东等地大量种植藜麦。藜麦作为古代玛雅文化的主粮,在世界各地发展迅速,在引种栽培、化学成分、遗传谱系、抗虫抗病基因、产品开发与利用等研究方面取得了一定的进展,但是需要研究的问题依然很多,比如在生产过程中,大部分藜麦麸皮会被视为废料直接遗弃,并未使其得到充分利用,造成了潜在的资源浪费和一定的环境污染^[1]。

麸皮是谷物加工的副产物,麸皮主要由皮层和糊粉层所组成,麸皮约占籽粒重量的 20%左右^[2]。藜麦麸皮具有含量很高的活性物质,如多酚类,黄酮类,皂苷类物质;实验室前期发现藜麦麸皮中含有大量皂苷,含量可达 20%~30%^[3],且具有生物活性。皂苷又称为皂角苷,近年来研究发现皂苷对人体健康有益,许多中药的有效成分都是皂苷,皂苷可以降低人体胆固醇水平,抵抗真菌、微生物及病毒感染,抑制血小板凝聚以及抗癌等多种功效^[4]。藜麦中皂苷味道苦涩,作为一种抗营养物质,可以抵御鸟类,啮齿类动物对藜麦籽粒的损害,近期有学者发现藜麦可以研发成一种生物农药用于抵御福寿螺侵袭水稻作物^[5]。更有学者发现藜麦皂苷具有抗炎,抗菌活性^[6,7]。目前,国内对藜麦皂苷的研究,多数为藜麦皂苷的提取工艺研究^[8-10]。对不同处理方式特别是酸处理对皂苷结构和功能影响的研究较少。

麦皂苷属于五环三萜类的齐墩果烷型的皂苷,由苷元和糖链组成,根据皂苷的母核结构上 C-23 与 C-30 上连接的官能团的不同可以分为不同的苷元,苷元 C-3 与 C-28 上会有不同数量以及结构的糖链取代 H⁺,形成不同的皂苷^[11]。皂苷在加工或处理过程中,会造成糖链的水解,从而使得藜麦皂苷降低。低极性的人参皂苷元、薯蓣皂苷元等次生级皂苷活性均要优于转化前的总皂苷^[12]。对于藜麦皂苷而言,采用直接碱处理后会使得皂苷上糖链水解,从而降低藜麦皂苷的极性,使得皂苷更易与微生物的膜系统结合,从而增加了抗真菌及抗口腔致病菌的活性^[13,14]。

实验室前期通过对藜麦不同极性部位的探究发现正丁醇层提取物质有一定的抑菌效果及酪氨酸酶抑制作用,根据 LC-MS/MS 及 HPLC 可知其有效物质为皂苷类物质。目前,尚未采用酸法特别是两相酸水解对藜麦极性皂苷水解到低极性皂苷以及水解前后皂苷活

性变化的研究。本文以藜麦麸皮中的皂苷为研究对象,通过研究不同水解方法转化的藜麦皂苷对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、沙氏肠炎杆菌 (*Paratyphoid*)、铜绿假单胞菌 (*P. Aeruginosa*) 四种常见菌的体外抑菌实验,以及对酪氨酸酶的抑制活性,探究藜麦皂苷转化前后活性的变化,并对转化后的皂苷进行定性定量分析。为提高藜麦皂苷的处理方法提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藜麦麸皮,山西省静乐县山西亿隆藜麦有限公司。硫酸,科密欧试剂;无水乙醇、石油醚(30~60 沸程),铁塔试剂;无水碳酸钠,沪试;乙腈(色谱纯),TEDIA;正丁醇(分析纯)、甲醇(分析纯),北联试剂;普通肉汤培养基、琼脂,青岛高科园海博生物技术有限公司;直径 5 mm 的纸片,实验室打孔机制备;头孢克肟、青霉素(80 万单位),山东鲁抗医药股份有限公司;左旋多巴(Levodopa, L-DOPA),上海浩然生物公司;酪氨酸酶(ACT=570 u/mg),上海拜朗生物科技有限公司;纤维素酶(ACT=50000 u/g),太阳永耀生物科技有限公司;D101 大孔树脂(工业级),天津市南开大学化工厂。

1.2 仪器与设备

PALL cascade 超纯水制备机,济南东岱科学器材有限公司;多功能粉碎机,广州大祥电子机械设备有限公司;RE-201D 旋转蒸发器,郑州长城科工贸有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;AR224CN 电子天平,常州奥豪斯仪器有限公司;KQ-500DE 数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;酶标仪,Thermo Fisher Scientific Oy;安捷伦高分辨液相质谱联用仪(Agilent 1260,热电 Thermo scientific Exactive orbitrap)美国;SZF-06A 脂肪测定仪,上海昕瑞仪器仪表有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;YXQ-LS-70A 立式压力蒸汽灭菌锅,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;BPMJ-150F 细菌培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;高效液相色谱仪(Shimadzu LC-20AT),日本岛津;SBS-100 数控计滴自动部分收集器、HL-2

恒流泵、层析图谱采集分析仪、HD-3 紫外检测仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司; 高速冷冻离心机, 德国 Sigma。

1.3 方法

1.3.1 藜麦麸皮前处理

称取 500 g 藜麦麸皮烘干, 置于多功能粉碎机中打磨 1 min, 收集过 40 目筛。准确称取一定量的藜麦麸皮粉末置于圆底烧瓶中加入 150 mL 石油醚 (30~60 °C) 60 °C 索氏抽提 8 h, 回收溶剂并收集剩余脱脂藜麦麸皮粉置于干燥皿中保存。

1.3.2 藜麦总皂苷的提取

通过查阅文献^[15]制定提取步骤。称取藜麦麸皮粉 100 g, 加入 800 mL 75% 的乙醇提取, 超声震荡 40 min, 静置 2 h 后, 用纱布过滤; 向剩余的滤渣内加入 600 mL 75% 的乙醇进行第二次提取, 超声震荡 40 min, 静置 2 h 后, 用纱布过滤, 将上清液抽滤除去渣滓; 合并提取液, 并浓缩; 随后用正丁醇萃取 2~3 遍; 合并萃取液旋转蒸发, 回收正丁醇 (60 °C), 蒸干浓缩液正丁醇提取的藜麦总皂苷。

1.3.3 三种水解方法处理藜麦麸皮

1.3.3.1 双相酸水解

取藜麦麸皮 10 g, 加入 10 倍量 2 mol/L 硫酸溶液后, 再加入 20 倍量的饱和正丁醇水溶液。超声震荡混合液 40 min, 采用布氏漏斗进行抽滤。获取正丁醇层, 用饱和的 Na_2CO_3 洗至中性后, 用 3 倍量的蒸馏水洗三次。将洗涤后正丁醇层置于 60 °C 旋蒸瓶中, 浓缩干燥后获得粗皂苷^[16]。

1.3.3.2 直接酸水解

取藜麦麸皮 10 g, 加入 10 倍量 2 mol/L 硫酸溶液, 超声震荡混合液 40 min 后, 采用布氏漏斗进行抽滤。去除残渣, 取上清液, 用正丁醇萃取三次, 合并上清液。用饱和的 Na_2CO_3 洗至中性后, 后用 3 倍量的蒸馏水洗三次。将洗涤后正丁醇层置于 60 °C 旋蒸瓶中, 浓缩干燥后获得粗皂苷。

1.3.3.3 复合酶酶水解

取藜麦麸皮粉末 2 g, 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 15 倍量去离子水和酶制剂(总酶用量为 1.5%, 以藜麦种皮粉质量为基准, 下同)[m(纤维素酶):m(果胶酶)=3:2], 调节体系 pH 为 5.0, 电磁搅拌在 50 °C 下酶解 0.5 h; 待酶解完成后, 90 °C 下 30 s 灭酶; 后采用正丁醇萃取三次, 浓缩干燥后获取酶解后的粗皂苷^[17]。

1.3.3.4 重量法计算粗提率

采用干基重量法计算三种水解方法的粗提取率, 即称量干燥后的提取物的重量比上水解前的藜麦麸皮

的重量可得皂苷粗提取率。

1.3.4 抑菌活性的测定

1.3.4.1 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、沙氏肠炎杆菌 (*Salmonella enteritidis*) 购自广东省微生物菌种保藏中心; 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的耐药菌株由潍坊医学院附属医院检验科提供。

1.3.4.2 试剂配制

双相酸水解: 取双相水解提取的化合物 4.8 mg, 溶解于 2 mL 的甲醇中, 浓度为 2.4 mg/mL;

直接酸水解: 取直接水解法提取的化合物 4.3 mg, 溶解于 2 mL 的甲醇中, 浓度为 2.15 mg/mL;

酶水解: 取酶解法提取的化合物 4.0 mg, 溶解于 2 mL 的甲醇中, 浓度为 2.0 mg/mL;

标准对照品: 1 mg/mL 的青霉素、1 mg/mL 的头孢克肟。

1.3.4.3 细菌制备

从活化好的金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、沙氏肠炎杆菌和铜绿假单胞菌, 分别取 20 μL 细菌液加入到 800 μL 的生理盐水中摇匀, 倒入制好的固体培养皿中, 用棉签涂匀, 用签字笔在培养皿盖上作好标记; 使用无菌生理盐水将菌苔洗下并校正菌液浓度为 0.5 麦氏比浊标准, 再用普通肉汤培养基分别稀释至含菌量约为 1.5×10^8 cfu/mL, 即为受试菌种的菌悬液, 稀释后的菌悬液在 15 min 内接种。

1.3.4.4 纸片法

不同水解方法获得藜麦皂苷元的抑菌试验依据参考文献利用纸片法进行^[18]。一种细菌内放 5 张纸片(直径 5 mm), 分别在纸片上用铅笔标上 1、2、3、4、5, 取 10 μL 的打到 1 号纸片上, 待纸片晾干后再次取 10 μL 双相酸水解提取的化合物药液打上去, 共打 5 次; 直接酸水解和酶水解提取的化合物操作相同, 依次打到 2 号、3 号纸片上各 5 次; 取 10 μL 的头孢克肟打到 4 号纸片上, 取 10 μL 的青霉素打到 5 号纸片上, 将纸片依次有间距的放到一种细菌上。把制好的培养皿放到 36 °C 的培养箱内培养 8~10 h, 观察纸片周围有无抑菌圈并测定抑菌圈的直径。

1.3.4.5 MIC、MBC 的测定

采用二倍稀释法^[19]将三种水解方法转化的藜麦皂苷依次稀释为 1.20、0.60、0.30、0.15、0.075、0.0375 mg/mL 的浓度梯度, 青霉素和头孢克肟依次稀释成 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 mg/mL。利用 96 孔板在超净工作台进行实验操作, 平行做 3 组实验, 实验结果数据取平均值。

向1号板的A1-5、B1-5、C1-5、D1-5、E1-5、F1-3(阳性对照)号孔中分别加100 μL金黄色葡萄球菌,向A7-11、B7-11、C7-11、D7-11、E7-11、F7-9(阳性对照)号孔中分别加100 μL表皮葡萄球菌。向2号板的A1-5、B1-5、C1-5、D1-5、E1-5、F1-3(阳性对照)号孔中分别加100 μL沙氏肠炎杆菌,向A7-11、B7-11、C7-11、D7-11、E7-11、F7-9(阳性对照)号孔中分别加100 μL铜绿假单胞菌。A、B、C三行为平行组,依次浓度梯度添加100 μL样品稀释液,D、E行分别为青霉素和头孢克肟,依次浓度梯度添加100 μL稀释液。将样品于36 °C培养箱中放置12 h,以肉眼未见生长的最低药物浓度为皂苷溶液对受试菌种菌的MIC,记录数据。继续将样品放于36 °C恒温培养箱中培养24 h后观察,以不生长菌落的最低药物浓度为皂苷溶液对受试菌种的MBC,记录数据。

1.3.5 酪氨酸酶抑制的测定

1.3.5.1 试剂配制

酪氨酸酶: 300 u/mL; L-Dopa: 2 mmol/L; 磷酸缓冲液: 25 mmol/L、pH=6.8; 不同水解方法提取物: 0.10 g样品先溶解于1 mL DMSO,随后用蒸馏水定容到100 mL,制备成1 mg/mL的母液。精密对照品水溶性维生素C 100 mg蒸馏水定容至100 mL制备成1 mg/mL的母液,现配现用。工作液采用二倍稀释法获取为五个浓度梯度。

1.3.5.2 实验步骤

表1 试验反应体系组成

Table 1 Test reaction system composition

试验号	反应液组成与体积/mL				
	磷酸缓冲液	样品	酪氨酸酶	L-Dopa	总计
A	0.8	0	0.1	0.1	1
B	0.9	0	0	0.1	1
C	0.6	0.2	0.1	0.1	1
D	0.7	0.2	0	0.1	1

不同水解方法提取藜麦皂苷元的酪氨酸酶抑制试验依据参考文献^[19]。根据表1的反应体系,在37 °C水浴锅中反应15 min后,取200 μL反应液加入到96孔板中,用酶标仪在475 nm下检测各萃取层的吸光度。不同浓度的Vc溶液作为阳性对照,实验进行三次求平均值,计算水解后提取的藜麦皂苷元对酪氨酸酶的抑制率来表示抑制作用,公式如下:

$$\text{抑制率}/\%=[1-(C-D)/(A-B)]\times 100\%$$

式中:A为含有酪氨酸酶、L-Dopa的测活体系的吸光度值;B为含有L-Dopa、但不含酪氨酸酶的测活体系的吸光度值;C为含有样品、酪氨酸酶、L-Dopa的测活体系的吸光度值;D为含有样品、L-Dopa、但不含酪氨酸酶的测活体系的吸光度值。

1.3.6 HPLC分析藜麦总皂苷及双相联合酸水解提取的皂苷元

1.3.6.1 试验品配制

将水解前用正丁醇萃取的藜麦皂苷及三种不同水解方法获得的皂苷元:分别准确称取10 mg用乙腈溶解后定容至10 mL的容量瓶中待用,溶液浓度为0.1 mg/mL。

1.3.6.2 化合物HPLC分析

色谱柱: YMC ODS-Pack (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A(水), B(乙腈); 洗脱条件(泵B的浓度): 5 min 10%; 10 min 15%; 15 min 20%; 35 min 28%; 50 min 40%; 60 min 60%; 70 min 70%; 80 min 70%; 90 min 10%; 柱温: 30 °C; 检测波长: 202 nm; 流速: 1 mL/min^[19]。

1.3.6.3 LC-MS/MS定性分析不同水解方法提取的藜麦皂苷元

准确称取10.8 mg的双相酸水解法的提取物用乙腈定容于10 mL的容量瓶中,溶液浓度为1.08 mg/mL。准确称取12.1 mg的直接酸水解法的提取物用乙腈定容于10 mL的容量瓶中,溶液浓度为1.21 mg/mL。准确称取11.8 mg的酶解法的提取物用甲醇定容于10 mL的容量瓶中,溶液浓度为1.18 mg/mL。

液相色谱条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18柱(100 mm×3 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 流动相A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相B: 甲醇; 梯度洗脱: 0~5 min, 流动相B从0线性变化到5%, 5 min~10 min, 流动相B从5%变化到90%, 10 min~15 min, 流动相B从90%变化到98%, 15 min~30 min, 流动相B从98%降到5%, 流速为0.3 mL/min。

质谱条件: 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描模式: 正离子(ESI⁺); 解离方式: 碰撞诱导解离; 载气(N₂); 鞘气流速: 35 arb; 辅助气流速: 10 arb; 毛细管电压5000 V; 毛细管温度: 320 °C; 电喷雾电压3500 V; 分辨率: 50000; 离子源温度: 200 °C。

1.3.7 数据统计分析

为了减小实验误差,每组实验重复3~4次,然后采用SPSS 17.0处理分析数据。计量资料用平均值±标准差来表示。实验数据采用单因素方差分析的LSD进行两两比较,以p<0.05为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 三种水解方法的提取率

如表2所示,两相酸水解的粗得率要明显高于直

接酸解法这种传统萃取苷元的方法,酶解法虽然较为清洁但得率要比酸解法低得多。主要可能为藜麦中的皂苷多为含有三个糖以上极性皂苷,水溶性较强^[20]。水溶性的强弱直接影响到正丁醇的萃取效率。实验室前期实验验证,不经过水解处理,依次萃取藜麦提取物,正丁醇层藜麦皂苷的提取量为 $7.52\% \pm 0.85\%$ ^[7]。

表2 不同水解方法的粗提率

Table 2 Crude extraction rate of different hydrolysis methods

项目	双相酸水解法	直接酸水解法	酶解法
藜麦麸皮/g	2.0±0.15	1.9±0.09	2.1±0.12
萃取量/g	0.42±0.024	0.29±0.012	0.12±0.022
粗提率/%	8.84±0.27**	5.76±0.15*	2.4±0.09

注: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ 。

双相水解可以避免皂苷与强酸长时间反应而导致的结构裂解;采用纤维素酶理论可以水解藜麦麸皮及藜麦皂苷,麸皮降解从而使皂苷释放。但是实验过程中发现,直接采用酶水解藜麦麸皮,会造成反应体系的粘度增加,这种粘度的提高更不利于皂苷的释放与萃取。

2.2 藜麦麸皮各提取层的抑菌效果

2.2.1 抑菌圈实验结果

三种水解方法的提取物的抑菌效果见图1和表3。由图1和表3可知,经过双相酸水解提取的化合物对

四种菌有不同程度的抑制作用,抑菌圈直径由大到小依次是:表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、沙氏肠炎杆菌、铜绿假单胞菌。经过直接酸水解提取的化合物对铜绿假单胞菌和沙氏肠炎没有抑制效果,对金黄色葡萄球菌的抑制效果要优于对表皮葡萄球菌的抑制。经过酶水解的化合物只对沙氏肠炎杆菌有抑制作用。

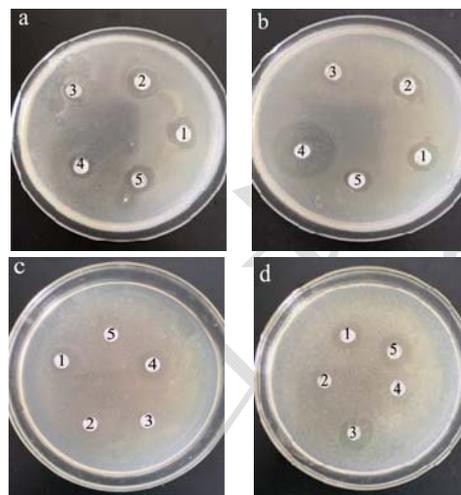


图1 不同水解方法提取物的抑菌情况

Fig.1 Antibacterial activity of extracts from different hydrolysis methods

注: a: 对金黄色葡萄球菌的抑制情况, b: 对表皮葡萄球菌的抑制情况, c: 沙氏肠炎杆菌的抑制情况, d: 铜绿假单胞菌的抑制情况。

表3 不同水解方法提取的化合物对微生物的抑菌圈直径

Table 3 Inhibition ring diameter of microorganisms extracted by different hydrolysis methods

微生物	双相酸水解法	直接酸水解法	酶解法	水解前皂苷
金黄色葡萄球菌	13.28±1.06	14.02±0.79	-	13.54±0.82
表皮葡萄球菌	14.57±0.85	12.96±1.02	-	12.17±1.05
沙氏肠炎杆菌	10.01±0.24	-	12.01±0.43	-
铜绿假单胞菌	7.83±0.32	-	-	-

注: “-”表示无抑菌圈。表4同。

2.2.2 MIC、MBC 测定结果

与纸片得出结论一致的是,经过双相酸水解的化合物对金黄色葡萄球菌和沙氏肠炎杆菌的 MIC 均为 0.6 mg/mL ;在浓度为 0.3 mg/mL 时只对表皮葡萄球菌有抑制作用,经过直接酸水解的化合物对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 均高于双相酸水解,分别为 1.20 mg/mL 、 2.40 mg/mL 。酶水解的化合物只对沙氏肠炎杆菌有抑制作用, MIC 值为 1.20 mg/mL , MBC 为 2.40 mg/mL 。在三种化合物中只有双相酸水解的化合物对铜绿假单胞菌起了一定的抑制作用,但在当前浓度下对其没有杀灭作用。由于青霉素是一种仅对革兰阳性菌表现出杀菌效果的广谱抗生素,所以加入另一种抗生素头孢克肟来增强对照,头孢克肟属于三代头孢类

抗生素,对部分革兰阴性菌也存在杀菌效果,结合两种对照品,可以使实验结果更加可靠。

由表4结果可知,双相酸水解法与直接酸水解法水解得到的提取物对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌都有抑制作用,但 MIC 和 MBC 的结果表明双相酸水解的提取物抑制效果要优于直接酸水解法的提取物。三种水解方法中只有双相酸水解的化合物对铜绿假单胞菌有微弱的抑制作用,由于药液的浓度较低,所以对其抑制效果不明显。酶解法提取的化合物只对沙氏肠炎杆菌有抑制作用,原因可能是酶解法可以酶解麸皮中的纤维素而无法水解皂苷上的糖链,使得抑菌效果较弱^[17]。

藜麦皂苷具有天然表面活性剂作用特征,可降低

微生物的细胞膜的表面张力,从而导致膜稳定性降低,进一步促进生物体凋亡^[21]。藜麦皂苷的抑菌活性的强弱与其结构有密切关系,经过碱处理后的皂苷表现出更强的抑真菌活性,这可能与极性变低皂苷甙体成分与细胞膜结合更加紧密有关^[22]。此外,经过热水解反应后,极性降低的人参稀有皂苷也展现出来更强的抑菌作用^[23]。与此发现一致的是,经过水解后藜麦麸皮皂苷对革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌及表皮金葡萄球菌抑制作用作用增强^[21]。研究表明^[24],人参皂苷 Rb1 没有体外的抑菌作用但是经过转化之后的人参低极性皂苷原人参二醇却有很强的抑菌活性,与本文结果相符;另外,红参经过转化后对于金黄色葡萄球菌的抑制性也会增强^[25]; Lee M R 发现,人参经过转化后,具备了较强的 CHs 的抑制作用以及抗氧化能力^[26]。双相酸水解法操作相对简单并且提取率高,是一种实用的提取工艺,为藜麦低极性皂苷的开发提供了研究依据。

2.3 不同水解方法提取藜麦皂苷的酪氨酸酶抑制结果

藜麦皂苷本身具有一定抗氧化性,与前期实验相比,经过双相酸水解和直接酸解的同等浓度的皂苷对酪氨酸酶的抑制率分别在 68%和 53%左右,有较好的抑制作用,效果均高于水解前的藜麦皂苷^[7];经过酶解后的藜麦皂苷元在较低浓度时也表现出对酪氨酸酶活性较高的的抑制率,说明经过不同方法水解后得到的低极性分子对酪氨酸酶活性的抑制效果得到增强。利用 LSD 方差分析对抑制率进行两两比较, p 值均小于 0.05,说明经过不同水解方法转化的萃取物对于酪氨酸酶的抑制率之间的差异具有统计学意义,经过双相酸水解转化的萃取物对于酪氨酸酶的抑制作用最好且相对稳定。说明经过双相酸水解后的藜麦皂苷有很好的利用价值。

表 4 MIC、MBC 测定结果

Table 4 MIC, MBC measurement results (mg/mL)

供试品	金黄色葡萄球菌		表皮葡萄球菌		沙氏肠炎杆菌		铜绿假单胞菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
双相酸水解	0.60	1.20	0.30	1.20	0.60	1.20	1.20	>1.20
直接酸水解	1.20	>1.20	0.60	1.20	-	-	-	-
酶解	-	-	-	-	1.20	>1.20	-	-
青霉素	0.125	0.25	0.0625	0.125	0.125	0.25	-	-
头孢克肟	-	-	0.125	0.25	-	-	0.25	>0.25

表 5 各提取物对酪氨酸酶的抑制率均值/%

Table 5 Mean value of inhibition of tyrosinase by each extract (n=3)

浓度/(mg/mL)	水解方法				阳性对照 Vc
	双相酸水解	直接酸水解	酶解	总皂苷	
0.5	68.09±0.11	53.36±0.09	45.70±0.37	46.13±0.42	94.00±0.04
0.25	64.45±0.28	43.29±0.15	40.51±0.29	23.34±0.03	92.56±0.01
0.125	57.13±0.17	40.13±0.06	39.17±0.10	15.49±0.24	91.48±0.01
0.0625	50.29±0.07	38.21±0.10	23.00±0.09	2.75±0.09	87.65±0.02
0.0313	39.16±0.18	27.17±0.05	25.72±0.91	-	70.73±0.02

2.4 HPLC 分析

2.4.1 两相酸水解前后物质变化

经过前期抑菌实验和酪氨酸酶抑制实验发现经过双相酸水解和直接酸解提取的化合物抑菌效果要高于酶解产物,并且经过双相酸水解的酪氨酸酶活性抑制率最高,由此推断经过双相酸水解提取的化合物活性得到了提高,取双相酸水解后的皂苷元进行定性定量分析。本实验采用的是反相色谱柱,分析物质出峰的顺序与其极性有关,极性越大,出峰时间越早。如图

2 所示,用 HPLC 在 202 nm 下检测到藜麦皂苷水解前的物质相对保留时间(RT)主要集中在 47 min、52~53 min、54 min。如图 3 所示,经过两相酸水解后,出峰时间主要集中在 72 min; 47 min、52~53 min、54 min 等处的极性显著降低,推测出极性大的化合物含量显著减低,极性小的化合物明显提高。直接水解法对皂苷影响较大,碎片较多,无法分析,酶水解皂苷图谱与原图谱基本一致,故液相图谱没在此文出现。总之,图谱说明经过两相酸解后,部分皂苷发生了水解反应,造成了化合物极性的降低。两相水解法可以控制实验

流程,降低了皂苷在酸溶液中的暴露时间,较好的保护了皂苷的结构^[27]。

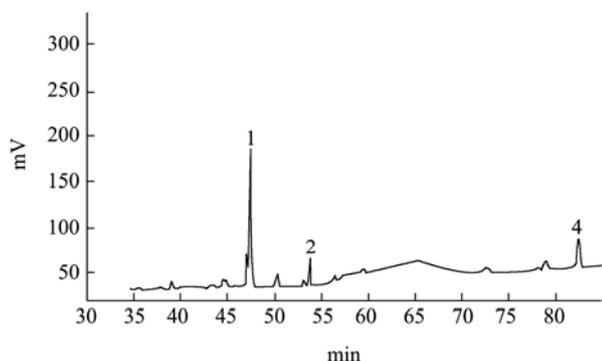


图2 HPLC 测定水解前总皂苷

Fig.2 HPLC profiles of total saponin before hydrolysis

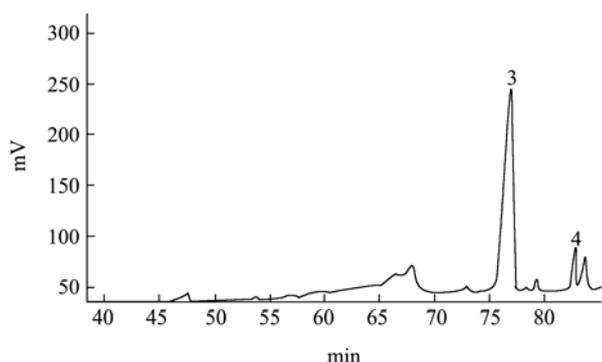


图3 双相酸水解后的皂苷

Fig.3 HPLC profiles of saponins after biphasic acid hydrolysis

2.5 LC-MS/MS 定性分析萃取物结果

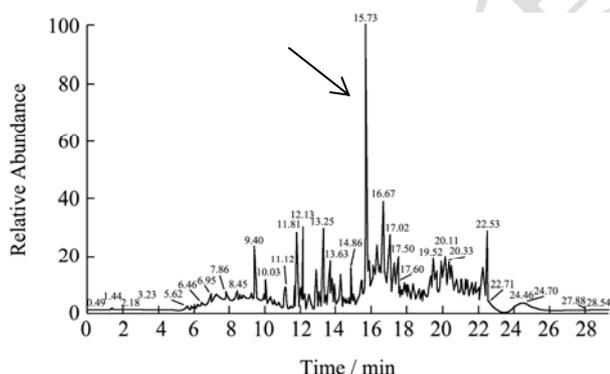


图4 双相酸水解萃取物的总离子流图

Fig.4 Total ion chromatogram of biphasic acid hydrolysis extract

为了进一步研究,水解前后化合物结构的变化,采用 MS-Tof 对水解前后化合物进行定性研究。在 T.Kuljanabagavad 等^[21,22,28,29]的研究中发现,皂苷根据苷元结构的不同可以分为四类,如图4、5所示,分别是 Oleanolic acid(OA)型、Phytolaccagenic acid(PA)型、Hederagenin (Hed) 型、serjanic acid (SA) 型,而 PA 型皂苷、OA 型皂苷、Hed 型皂苷为藜麦中最为

主要的三萜皂苷^[30]。目前 Madl 利用质谱 (mass spectrum, MS)法鉴定的皂苷总数有 87 种。每种类型的皂苷的碎片离子峰皆有不同。皂苷属五环三萜类的齐墩果烷型皂苷,由甾体或三萜皂苷与一个或多个糖基组成。

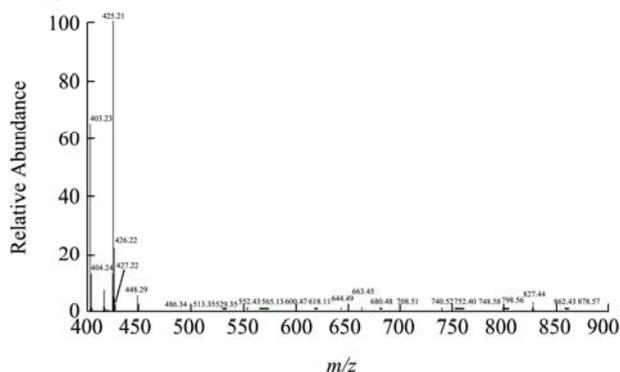


图5 双相酸水解萃取物的离子碎片峰 (RT 15.73)

Fig.5 Ion fragment peak of biphasic acid hydrolysis extract

根据文献^[31]中的分析以及离子碎片的裂解规律,四种苷元的母核荷质比 m/z 分别为 OA ($m/z=456$)、Hed ($m/z=472$)、PA ($m/z=516$)、SA ($m/z=500$),其可能存在的离子峰碎片可能有多种,例如 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M+2Na-H]^+$ 、 $[M+H-Hex]^+$ 、 $[M+H-Pent]^+$ 、 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-COOH]^+$ 、 $[M+H-OCH_3]^+$ 等。水解前藜麦麸皮皂苷中,高分辨质谱中主要离子碎片离子峰为 $679[M+H]^+$ 、 $517[M+H-Pent]^+$ 、 $499[M+H-Pent-H_2O]^+$ 、 $481[M+H-2H_2O]^+$ 为典型的 PA 型皂苷^[7]。根据峰型大小可以判断出此峰对应图2中的1号峰,即1号峰为PA型皂苷。经过两相酸水解后6~10 min图4的含量明显降低,RT=15.73的峰值最高,其裂解规律为 $468[517-O-CH_3-H_2O]^+$ 、 $425[468-C=O-CH_3]^+$,与文献^[32]研究一致。根据 OA 可能存在的 $m/z=456$ 、491、588、654等; Hed 可能存在的 $m/z=472$ 、411、674、927等。图5中水解后主峰也为PA类,为1号峰的水解峰。

3 结果

本研究通过三种不同的水解方法对藜麦麸皮中的皂苷进行转化,双相水解法再获得最高的得率的同时,提高了皂苷的抑菌和酪氨酸酶抑制作用。通过 LC-MS/MS 对转化物进行了定性分析,结合水解前后 HPLC 图谱,发现经过双相酸解后极性小的皂苷含量明显增加。活性实验表面,低级性皂苷的活性高于极性皂苷,其原因可能低为级性皂苷可能更易与微生物的生物膜系统结合,导致膜系统的表面张力发生变化从而进一步导致了病原菌的凋亡。总之,鉴于两相酸水解后皂苷的得率和活性的突出,为藜麦皂苷的进一

步加工利用提供了新的途径。

参考文献

- [1] 陈光,孙旸,王刚,等.藜麦全植株的综合利用及开发前景[J].吉林农业大学报,2018,40(1):1-6
CHEN Guang, SUN Yang, WANG Gang, et al. Comprehensive utilization and development prospect of whole-plant *Chenopodium quinoa* [J]. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, 2018, 40(1): 1-6
- [2] 李文多.黑小麦麸皮非淀粉多糖制备及水解特性研究[D].太原:山西大学,2012
LI Wen-duo. Preparation and hydrolysis properties of non starch polysaccharides from black-grained wheat bran [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2012
- [3] 赵雷,丁葵英,郑星,等.藜麦麸皮不同极性部位的抑菌及酪氨酸酶抑制活性研究[J].食品工业科技,2019,40(6):82-88, 94
ZHAO Lei, DING Kui-ying, ZHENG Xing, et al. Bacteriostatic and tyrosinase inhibitory activities of different polar sites from quinoa bran [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 82-88, 94
- [4] 杜静婷,陈超,范三红.响应面法优化藜麦糠皂苷的提取及抗氧化活性[J].山西农业科学,2016,44(7):932-937
DU Jing-ting, CHEN Chao, FAN San-hong. Optimization of extraction conditions for saponins from *Chenopodium quinoa* bran by response surface method and its antioxidant activities [J]. Shanxi Agricultural Science, 2016, 44(7): 932-937
- [5] Castillo-Ruiz M, Cañon-Jones H, Schlotterbeck T. Safety and efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins derived molluscicide to control of *Pomacea maculata* in rice fields in the Ebro Delta, Spain [J]. Crop Protection, 2018, 111: 42-49
- [6] Yao Y, Yang X, Shi Z, et al. Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(5): H1018-H10
- [7] Park J H, Lee Y J, Kim Y H, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds cultivated in Korea [J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2017, 22, 195-202.
- [8] 杨洁,高凤祥,杨敏,等.藜麦皮总皂苷微波辅助提取工艺及其抗氧化活性研究[J].食品与机械,2017,33(12):148-153, 185
YANG Jie, GAO Feng-xiang, YANG Min, et al. Study on microwave-assisted extraction and antioxidant activity of total saponins from *Chenopodium quinoa* peel [J]. Food and Machinery, 2017, 33(12): 148-153, 185
- [9] 黄金,秦礼康,石庆楠,等.藜麦皂苷提取及萌芽对皂苷含量的影响[J].中国粮油学报,2017,32(11):34-39,46
HUANG Jin, QIN Li-kang, SHI Qing-nan, et al. Effect of quinoa saponins extraction and sprouting on saponins content [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(11): 34-39, 46
- [10] 梁霞,周柏玲,刘森,等.响应面法优化藜麦总皂苷提取工艺研究[J].中国粮油学报,2017,32(11):40-46
LIAN Xia, ZHOU Bai-ling, LIU Sen, et al. Extraction of total saponins of quinoa by response surface methodology [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(11): 40-46
- [11] Youdim K A, Martin A, Joseph J A. Essential fatty acids and the brain: Possible health implications [J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2000, 18(4): 383-399
- [12] 孙健.提取与加工方法对菜豆中主要皂苷的影响[J].中国粮油学报,2010,25(12):96-100
SUN Jian. Effects of extracting and processing methods on saponin content in *Phaseolus vulgaris* seed products [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(12): 96-100
- [13] Stuardo M, San Martín R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea* [J]. Industrial Crops and Products, 2008, 27, 296-302
- [14] Sun X, Yang X, Xue P, et al. Improved antibacterial effects of alkali-transformed saponin from quinoa husks against halitosis-related bacteria [J]. Complementary and Alternative Medicine, 2019, 19, 46-54
- [15] 任卓伟,倪文杰,刘森.藜麦皂甙的测定研究[J].山西农业科学,2015,43(8):932-935
REN Zhuo-wei, NI Wen-jie, LIU Sen. Determination of quinoa saponins [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2015, 43(8): 932-935
- [16] 杨欢,杨克迪,陈钧.双相酸水解法提取薯蓣皂苷元的研究[J].中国现代应用药学,2005,4:270-272
YANG Huan, YANG Ke-di, CHEN Jun. The research on two-phase acid hydrolysis of extracting diosgenin [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2005, 4: 270-272
- [17] 雷蕾,张炜,刘龙,等.复合酶协同超声提取藜麦皂苷及其抗氧化性[J].精细化工,2019,36(3):469-474,493
LEI Lei, ZHANG Wei, LIU Long, et al. Complex enzyme

- assisted ultrasonic extraction of saponins from quinoa husk and its antioxidant activity [J]. *Fine Chemicals*, 2019, 36(3): 469-474, 493
- [18] 陈静,冷鹏,杨喜爱,等.麻叶提取物对金黄色葡萄球菌的体外抑制初步研究[J].*中国麻业科学*,2018,40(1):17-21
CHEN Jing, LENG Juan, YANG Xi-ai, et al. A preliminary study on antibacterial activities of bast fiber crop leaves extracts against *S. aureus in vitro* [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2018, 40(1): 17-21
- [19] Xue P, Yao Y, Yang X S, et al. Improved antimicrobial effect of ginseng extract by heat transformation [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2017, 41(2): 180-187
- [20] Kuljanabagavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, et al. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(9): 1919-1926
- [21] Kuljanabagavad T, Wink M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2009, 8(2): 473-490
- [22] Quan K, Liu Q, Wan J Y, et al. Rapid preparation of rare ginsenosides by acid transformation and their structure-activity relationships against cancer cells [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 8598-8604
- [23] Xue P, Yang X, Sun X, et al. Antifungal activity and mechanism of heat-transformed ginsenosides from notoginseng against *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, and *Trichophyton mentagrophytes* [J]. *RSC Advance*, 2017, 7(18): 10939-10946
- [24] Bae E A, Han M J, Kim E J, et al. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside rh 2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, 27(1): 61-67
- [25] Sung W S, Lee D G. The combination effect of korean red ginseng saponins with kanamycin and cefotaxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(8): 1614-1617
- [26] Lee M R, Yun B S, Sung C K. Comparative study of white and steamed black panax ginseng, *P. quinquefolium*, and *P. notoginseng* on cholinesterase inhibitory and antioxidative activity [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2012, 36(1): 93-101
- [27] 沈玉萍,尹华武,刘瀛浣,等.双相联合酸水解法从黄姜中萃取薯蓣皂苷元的研究[J].*中成药*,2013,35(10):2272-2274
SHEN Yu-ping, YIN Hu-wu, LIU Ying-huan, et al. The research on two-phase acid hydrolysis of extracting diosgenin from dioscoreae zingiberensis [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2013, 35(10): 2272-2274
- [28] Meza I G M, Aluwi N A, Saunders S R, et al. GC-MS profiling of triterpenoid saponins from 28 quinoa varieties (*Chenopodium quinoa* Willd.) grown in Washington state [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(45): 8583-8591
- [29] Woldemichael G M, Wink M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(5): 2327-2332
- [30] Verza S G, Silveira F, Cibulski S, et al. Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(12): 3113-3118
- [31] Nickel J, Spanier L P, Botelho F T, et al. Effect of different types of processing on the total phenolic compound content, antioxidant capacity, and saponin content of *Chenopodium quinoa* Willd. grains [J]. *Food Chem.* 2016, 20(9): 139-143
- [32] Brittany L, Graf M. Innovations in health value and functional food development of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015, 14(4): 431-445