

## 微生物发酵炮制对红花抗氧化活性的影响

冯志华<sup>1</sup>, 孙启玲<sup>1\*</sup>, 米 坤<sup>1</sup>, 罗 强<sup>2\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064; 2. 乐山师范学院 环境与生命科学系, 四川 乐山 614004)

**摘要:** 目的 研究地衣芽孢杆菌 C2-13 发酵炮制对红花抗氧化活性的影响。方法 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法测定羟自由基清除率, 比色法测定红细胞的溶血作用、肝脂质过氧化物含量, HPLC 法分析发酵产物。结果 红花经 C2-13 的发酵炮制其抗氧化功效显著提高, HPLC 分析还观察到红花中一些成分发生了改变。结论 红花中一些有效成分可能是经 C2-13 的生物转化提高了其抗氧化功效。

**关键词:** 红花; 地衣芽孢杆菌; 发酵; 炮制; 抗氧化

中图分类号: R286.02; R286.75

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0630-04

### Effect on antioxidative activities of dried flower of *Carthamus tinctorius* processed by microbes fermentation

FENG Zhi-hua<sup>1</sup>, SUN Qi-ling<sup>1</sup>, MI Kun<sup>1</sup>, LUO Qiang<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Department of Environment and Life Science, Leshan Normal College, Leshan 614004, China)

**Abstract:** **Object** Effects of *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester C2-13 on antioxidative activities of dried flower of *Carthamus tinctorius* L. (DFCT) were studied. **Methods** Clearance of hydroxyl radical was determined by 1, 10-phenanthroline-Fe<sup>2+</sup> oxidative assay. The hemolysis of red blood cells, MDA production in hemacytolysis liver homogenate were measured by colorimetric assay. Products of fermentation were analyzed by HPLC. **Results** C2-13 can increase greatly antioxidative activities of DFCT. Using HPLC assay, it is observed that the fermentation and processing by the strain can improve the effective components of DFCT. **Conclusion** Some effective components of DFCT may be biotransformed by C2-13, so that the antioxidative activities are promoted.

**Key words:** the dried flower of *Carthamus tinctorius* L. (DFCT); *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester; fermentation; processing; antioxidation

微生物由于自身存在丰富的酶系而有着在温和条件下分解转化物质的能力。通过微生物与中药共发酵来进行中药炮制可以比一般的物理化学手段更大幅度地改变药性, 提高药效, 降低毒副作用, 扩大适应症。近年利用微生物发酵这一途径来炮制中药已经成为中药研究的新领域<sup>[1]</sup>。

红花系菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 在我国已有 2 100 多年的栽培与用药历史, 为传统常用中药, 是活血通络、祛瘀止痛之良药。近年来广泛用于多种瘀血阻滞, 血行不畅之症。药理研究表明红花具有降血脂和抗血栓等作用, 有报道红花水溶性成分还具有较强的抗氧化作用<sup>[2]</sup>。随着自由基研究的发展, 发现自由基反应在许多血液循环障碍中起了重要的损伤作用。本实验利用一株具

有较丰富酶系尤其是糖苷水解酶系的地衣芽孢杆菌与红花共发酵, 研究了微生物发酵炮制对红花抗氧化活性的影响, 并对其机制进行了探讨。

#### 1 材料和方法

1.1 材料: HP1100 高效液相色谱仪(惠普), Tu-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

菌种为本实验室从自然界分离得到, 经鉴定是一株地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester, 编号为 C2-13。昆明种雌性小鼠, 购于四川大学华西实验动物中心。

红花购于成都同仁堂药店, 经四川大学生命科学学院许介眉教授鉴定系菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 四乙氧基丙烷(Sigma)、硫代

\* 收稿日期: 2003-09-19

基金项目: 四川省中医药管理局基金资助项目(200214)

作者简介: 冯志华(1977—), 男, 河南三门峡人, 四川大学生命科学学院 2001 级硕士研究生, 主要从事微生物转化中药的研究。

Tel: (028) 85410165 E-mail: riset8848@hotmail.com

\* 通讯作者

巴比妥酸(上海化学试剂公司),其他试剂均为市售分析纯。

种子培养基为LB培养基;发酵培养基以蔗糖和玉米粉为主要碳源,以酵母膏为主要氮源,还包括K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>等无机盐类。

1.2 方法

1.2.1 共发酵方法:将红花全花40 g下干燥,粉碎过120目筛,根据需要按比例加入到发酵培养基中,121℃灭菌20 min,将C2-13种子液按接种量3.5%的比例接种到发酵培养基,44℃,180~200 r/min振荡摇瓶培养48 h。根据研究,培养基中红花在0~30 g/L时,对这一株地衣芽孢杆菌有促进其生长的作用,大于30 g/L时对其生长有抑制作用,因此在研究中红花的比例均控制在0~30 g/L。

1.2.2 羟自由基清除率测定:邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>氧化法<sup>[3]</sup>。终体积为50 mL的反应液中含邻二氮菲0.75 mmol/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.75 mmol/L, pH 7.4的PBS 0.15 mol/L和不同浓度的待测样品,最后加入0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 37℃水中振荡孵育1 h后,立即在536 nm下测吸光度(A)值。利用比色测定法,通过A<sub>536</sub>变化反映羟自由基的氧化作用。按下式计算样品中羟自由基的清除率,其中药未损管为不加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加有相应药品的样品,药损管为加药和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的样品,未损管为不加药,也不加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的样品,损管为不加药但加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的样品。

$$\text{羟自由基清除率} = (1 - \frac{A_{\text{药未损}} - A_{\text{药损}}}{A_{\text{未损}} - A_{\text{损}}}) \times 100\%$$

1.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的红细胞溶血作用的测定<sup>[4]</sup>:小鼠眼眶取血,以肝素抗凝,用0.01 mol/L pH 7.4的PBS配成5%红细胞悬液。取此悬液1 mL,加入100 μL样品或生理盐水,混匀后37℃温育5 min,加入终浓度为100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>启动反应,37℃温育1 h后3 000 r/min离心7 min,取上清液用0.01 mol/L pH 7.4的PBS稀释5倍,测定540 nm的A值。以不加样品和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为比色空白样,以不加样品,加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为对照样,按下式计算样品的溶血抑制率。

$$\text{溶血抑制率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.2.4 小鼠肝自发性脂质过氧化作用的测定<sup>[4]</sup>:小鼠禁食16 h,眼眶放血后迅速取出肝脏,用4℃预冷的0.01 mol/L pH 7.4的PBS洗涤并配成5%的匀浆。取该匀浆1 mL,加入30 μL样品或生理盐水,于37℃温育2 h,加入20%三氯乙酸1 mL终止反应,3 500 r/min离心10 min,取上清液1.8 mL加入0.67%硫代巴比妥酸(TBA) 1 mL,95℃水浴15

min,取出后流水冷却,于532 nm下测定A值。以不加肝匀浆和样品为比色空白样,以加有肝匀浆,不加样品为对照样,以四乙氧基丙烷(TEP)为标准品绘制标准曲线,计算脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,并按下式计算脂质过氧化物(LPO)的清除率。

$$\text{LPO 清除率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的小鼠肝脂质过氧化作用的测定<sup>[2]</sup>:按1.2.4项下方法制备5%的肝匀浆,取该匀浆1 mL,加入30 μL样品或生理盐水,37℃温育5 min后加入0.25% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μL,37℃温育1 h,以三氯乙酸沉淀蛋白。按1.2.4项下方法计算MDA的含量及LPO抑制率。

1.2.6 CCl<sub>4</sub>诱导的小鼠肝脂质过氧化作用的测定:各管中加入5%肝匀浆1 mL及样品或生理盐水30 μL,混匀后37℃温育10 min,再向各管中加入CCl<sub>4</sub> 15 μL,继续温育50 min。按1.2.4项下方法计算MDA含量及LPO抑制率。

1.2.7 HPLC法分析发酵产物:色谱柱:C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:25℃;流动相:乙醇-水(1.24:8.76);流速:0.3 mL/min;检测波长:340 nm;进样量:1 μL。

1.2.8 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用t检验

2 结果

2.1 C2-13发酵炮制对红花抗羟自由基氧化作用的影响:选取不同浓度红花与C2-13共发酵,同时以相应浓度的红花水浸液作为对照(下同),比较发酵液和水浸液的抗羟自由基氧化活性,见表1。当羟自由基清除率C<sub>n</sub>-C<sub>0</sub>>H<sub>n</sub>时,就认为C2-13提高了红花的抗氧化活性。其中C<sub>0</sub>为没有加红花但经过C2-13发酵的样品;C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>为加有相应质量浓度(10, 20, 30 g/L)红花且经过C2-13发酵的样

表1 发酵炮制对红花抗羟自由基氧化活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of DFCT processed by fermentation on antioxidative activities of hydroxyl radical ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别             | 羟自由基清除率/%     | 组别             | 羟自由基清除率/%  |
|----------------|---------------|----------------|------------|
| C <sub>0</sub> | 42.3 ± 0.7    |                |            |
| C <sub>1</sub> | 56.6 ± 0.9**  | H <sub>1</sub> | 11.5 ± 0.3 |
| C <sub>2</sub> | 72.6 ± 0.3*** | H <sub>2</sub> | 21.3 ± 0.3 |
| C <sub>3</sub> | 98.7 ± 0.6*** | H <sub>3</sub> | 32.1 ± 0.4 |

与C<sub>0</sub>组比较: \* P < 0.05 \*\* P < 0.01 \*\*\* P < 0.001 (下同)

\* P < 0.05 \*\* P < 0.01 \*\*\* P < 0.001 vs C<sub>0</sub> group (Following Tables are same)

品;H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>为相应浓度的红花水浸液(下同)。

红花在 0~ 30 g/L, 经发酵炮制的红花比发酵前清除羟自由基能力有较大幅度提高, 且有明显的量效关系。在 30 g/L 时, 羟自由基清除率达 75.5%。

2.2 C2-13 发酵炮制对红花抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的红细胞溶血作用的影响: 见表 2。发酵后红花对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的红细胞溶血的抑制作用得到显著提高且有明显的量效关系。在 30 g/L 时, 发酵后红花的红细胞溶血抑制率达到 89.60%, 较发酵前提高 43.75%。

2.3 C2-13 发酵炮制对红花抑制小鼠肝脂质过氧化作用的影响: 见表 3。不同浓度红花水浸液在体外能非常显著的抑制小鼠肝脂质过氧化物的产生, 经 C2-13 发酵炮制后的红花抑制小鼠自发性肝脂质过

氧化, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝脂质过氧化, CCl<sub>4</sub> 诱导的肝脂质过氧化作用得到进一步提高, 且作用强度在 0~ 30 g/L 具有剂量依赖性。

表 2 发酵炮制红花对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的红细胞溶血作用的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Inhibition of DFCT processed by fermentation on hemolysis of erythrocytes induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别             | 溶血抑制率/%         | 组别             | 溶血抑制率/%      |
|----------------|-----------------|----------------|--------------|
| C <sub>0</sub> | 4.82 ± 0.72     | H <sub>1</sub> | 36.47 ± 6.37 |
| C <sub>1</sub> | 66.86 ± 6.61*   | H <sub>2</sub> | 49.26 ± 7.05 |
| C <sub>2</sub> | 77.11 ± 5.79*** | H <sub>3</sub> | 60.33 ± 8.53 |
| C <sub>3</sub> | 89.60 ± 9.91*   |                |              |

表 3 C2-13 发酵炮制对红花抑制小鼠肝脂质过氧化的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Inhibitory effects of DFCT processed by fermentation on liver MDA levels ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别             | 自发性                         |                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 诱导 |                 | CCl <sub>4</sub> 诱导         |                 |
|----------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
|                | MDA/(nmol·g <sup>-1</sup> ) | 抑制率/%           | MDA/(nmol·g <sup>-1</sup> )      | 抑制率/%           | MDA/(nmol·g <sup>-1</sup> ) | 抑制率/%           |
| C <sub>0</sub> | 119.03 ± 9.74               | 3.42 ± 0.33     | 153.68 ± 10.05                   | 5.78 ± 0.45     | 87.79 ± 8.32                | 2.14 ± 0.28     |
| C <sub>1</sub> | 87.21 ± 7.10                | 29.24 ± 3.72*** | 123.17 ± 9.85                    | 24.49 ± 2.06**  | 69.87 ± 7.09                | 22.12 ± 1.60*** |
| C <sub>2</sub> | 69.25 ± 6.37                | 43.38 ± 5.87**  | 95.91 ± 7.90                     | 41.20 ± 3.82*** | 50.65 ± 6.49                | 43.54 ± 4.81*** |
| C <sub>3</sub> | 54.11 ± 4.23                | 56.09 ± 4.38**  | 64.87 ± 6.18                     | 60.23 ± 4.11**  | 32.27 ± 4.71                | 64.88 ± 6.41**  |
| 对照             | 123.25 ± 7.01               | 0               | 163.11 ± 11.28                   | 0               | 89.71 ± 6.41                | 0               |
| H <sub>1</sub> | 105.17 ± 6.03               | 14.67 ± 1.68    | 139.19 ± 9.40                    | 14.66 ± 1.48    | 78.15 ± 5.54                | 12.88 ± 1.40    |
| H <sub>2</sub> | 89.51 ± 6.85                | 27.38 ± 3.32    | 117.33 ± 9.09                    | 27.07 ± 2.09    | 63.09 ± 5.43                | 29.67 ± 3.02    |
| H <sub>3</sub> | 70.47 ± 6.29                | 42.82 ± 3.82    | 93.83 ± 8.59                     | 42.47 ± 4.98    | 50.87 ± 4.83                | 43.29 ± 4.16    |

2.4 发酵产物的 HPLC 分析结果: 共对 5 种样品进行了 HPLC 检测, 分别是未经 C2-13 发酵, 未加红花的发酵液 (I); 经过 C2-13 的发酵, 未加红花的发酵液 (II); 未经 C2-13 发酵, 加 30 g/L 红花的发酵液 (III); 经 C2-13 发酵, 加 30 g/L 红花的发酵液 (IV); 30 g/L 红花水浸液 (V)。连续 3 次发酵, 每次设置 3 个平行对照。I, II 样品在 340 nm 下经 HPLC 检测后并没有明显的特征吸收峰, 而 V 样品在此波长下则有明显的吸收峰, 因此培养基中成分对分析红花中有效成分发酵前后的变化并无影响。对比 III, IV 色谱图 (图 1) 可以看出发酵后, 红花中有一个保留时间为 7.642 min 的吸收峰消失, 还有一些新的吸收峰出现, 这证明了 C2-13 对红花有效成分的发酵炮制作用。

### 3 讨论

利用微生物发酵炮制中药古已有之, 且是一种相当重要的炮制加工方法之一。从某种意义上讲, 虫草是蝙蝠蛾幼虫经虫草菌、僵蚕是家蚕经白僵菌感染发酵而成。其他如淡豆豉、半夏曲、红曲、麦芽也都是通过发酵而形成的药物。现代发酵工程证实微生物具有酯化, 氧化, 乙酰化, 还原化, 甲基化, 羟基化和羰基化等多种能力, 此外微生物还具有催化立体

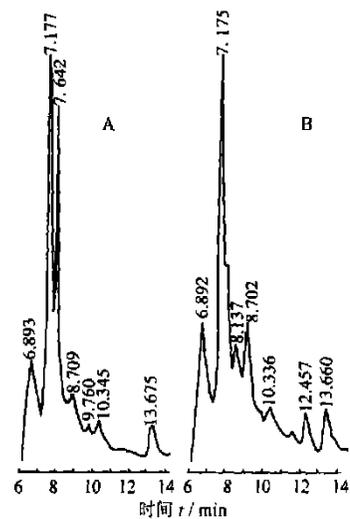


图 1 发酵前(A)后(B)红花的 HPLC 图

Fig 1 HPLC of DFCT processed by fermentation before (A) and after (B)

专一反应和区域专一反应的能力。因此利用微生物发酵炮制中药实际上是一种生物转化反应。

红花作为一味活血通络, 祛瘀止痛的传统中药在近期的研究中发现具有较强的抗氧化活性。红花中抗氧化的有效成分是具有酚羟基的黄酮类化合物, 如红花黄色素、红花素、槲皮素等。本研究通过体

外实验得到了 C2-13 发酵炮制红花提高了其抗羟自由基氧化活性,提高了其对小鼠肝脂质过氧化的抑制作用的结果。由红花中各有效成分结构可以看出,发酵后红花抗氧化活性的提高可能与 C2-13 所产生的各种糖苷水解酶有关。红花中有许多糖苷类化合物,其中很多糖苷是酚羟基与葡萄糖缩合而成。如新红花苷、6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷、6-羟基山柰酚-7-O-葡萄糖苷、槲皮苷等。当糖苷水解酶将这些糖苷键上的葡萄糖水解掉后,就会使酚羟基的数目大幅度提高,可进一步提高红花的抗氧化性,此外水解后产生的苷元比相应的糖苷容易吸收,生物利用率更高,更有利于发挥其药理作用。

通过 HPLC 法检测了 C2-13 发酵红花对其有效成分的炮制,发现了一些特征吸收峰的消失和一

些新的吸收峰的出现,这可能与发酵后红花降血清总胆固醇和抗羟自由基氧化能力提高这一现象有关。为了从机制上解释这一现象,还需要利用核磁共振、液质联用等进行深入的研究。

References:

[1] Weng X H, Li Q, Cao Q L. New field for study of TCM through fermentation by microbe [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 267-268.  
 [2] Jing M, Li J R, Cai Y X, et al. Antioxidative effect of aqueous components of flower *Carthamus tinctorius* L. [J]. *J Cardiovasc Publ Dis* (心肺血管病杂志), 1998, 17(4): 277-279.  
 [3] Jin M, Cai Y X, Li J R. 1, 10-Phenanthroline-Fe<sup>2+</sup> oxidative assay of hydroxyl radical produced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理学进展), 1996, 23(5): 553-555.  
 [4] Huang X Q, Jiang H D, Xu Q, et al. Studies on the effect of Chinese beauty berry (*Callicarpa cathayana*) on antilipid peroxidation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(4): 246-249.

## 血竭的超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取工艺研究

俞蔚, 雍克岚\*

(上海大学生命科学学院, 上海 200436)

**摘要:** 目的 研究超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取(SFE-CO<sub>2</sub>)血竭中抑制 α-葡萄糖苷酶有效成分的工艺条件。方法 采用单因素法,探讨了压力、温度、时间和 CO<sub>2</sub> 流量对血竭萃取率和抑制 α-葡萄糖苷酶活力提高率的影响。结果 最佳工艺条件为萃取压力 15M Pa, 温度 45℃, CO<sub>2</sub> 流量为 30 kg/h, 时间 2 h。优于传统的索氏抽提。结论 SFE-CO<sub>2</sub> 工艺用于血竭中有效成分提取, 萃取率和抑制 α-葡萄糖苷酶活力提高率均有较大程度提高。

**关键词:** 血竭; α-葡萄糖苷酶; 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253 - 2670(2004)06 - 0633 - 03

## Technology of supercritical CO<sub>2</sub> extraction process of Dragon's Blood

YU Wei, YONG Ke-lan

(School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200436, China)

**Abstract:** **Object** To study the technology of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of effective components from Dragon's Blood which has the inhibiting function on α-glucosidase. **Methods** The influence of the extraction pressure, temperature, time and fluid velocity on surplus extraction rate and the improvement of inhibition was mainly discussed. **Results** The optimal experimental parameters were 15M Pa extraction pressure, 45℃ extraction temperature, 30 kg/h fluid velocity and 2 h extraction time. **Conclusion** The results show that SFE-CO<sub>2</sub> can enormously increase the surplus extraction rate and the inhibitory activities on α-glucosidase.

**Key words:** Dragon's Blood; α-glucosidase; SFE-CO<sub>2</sub>

血竭(Dragon's Blood)被誉为“活血之圣药”,主要来源于百合科龙血树属藤本植物龙血树 *Draconcaena draco* L. 的树脂及同属植物果实中溶出或分

泌的红色树脂。性甘、温、咸、平,具活血化瘀、消肿止痛、止血补血之功效。现代医学研究表明,血竭具有改善机体微循环,调整新陈代谢,改善免疫功能等作

\* 收稿日期: 2003-07-11

基金项目: 上海市科技发展基金资助项目(02DZ9118)

作者简介: 俞蔚(1978—),女,上海人,硕士,主要从事天然活性物质的分离与分析。Tel: (021) 66134078 Fax: (021) 66132177

E-mail: joy518@sina.com

\* 通讯作者