研究论文

葡萄籽中多酚类化合物对口腔致病菌的抑制作用

张　卉[1]，　吴大茹[2]，　尤晓娟[1]，　陈莉娜[*1]

（1. 西安交通大学 医学院，陕西 西安 710061；2. 美国伊利诺伊大学 芝加哥分校牙科医学院，芝加哥 60612）

摘要：研究葡萄籽中多酚类化合物对口腔致病菌（致龋病菌和牙周病菌）的抑制作用，比较它们的作用强弱，对其构效关系进行初步推测。通过光密度法（optical density，OD）检测细菌培养物的生长情况，以最小抑制浓度（Minimum inhibition concentration，MIC）表示被测组分和化合物对细菌的抑制能力，通过比较加样组与空白组以及加样组之间的 MIC 值来确定被测组分及化合物的抑菌能力。结果显示，水溶性高极性组分具有较好的抑菌活性，其中以含有邻苯三酚结构的小分子化合物抑菌能力最佳。表明对于葡萄籽提取物而言，多酚类化合物较其它类化合物具有更好的抑制口腔致病菌的作用，邻苯三酚结构是发挥这种作用的主要成分，而并非人们所预期的花青素类化合物。

关键词：葡萄籽提取物；多酚；致龋病菌；牙周病菌；光密度法；最小抑制浓度

中图分类号：TS 202.3；R 780.2　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689（2013）05—0551—05

Evaluation of the Antimicrobial Properties of Grape Seed Extract and Its Polyphenol Components Against Oral Pathogenic Bacteria

ZHANG Hui[1]，　*WU Da-ru*[2]，　*YOU Xiao-juan*[1]，　*CHEN Li-na*[*3]

（1. Medical School of Xi'an Jiaotong University，Xi'an 710061，China；2. Department of Peiodontics，College of Dentistry，University of Illinois at Chicago，Chicago 60612，USA）

Abstract：To study the antibacterial activity of grape seed extract (GSE) constituents (most of them are polyphenolic compounds) against periodontitis and cariogenic bacterial, the relationship between the structures and the antibacterial activities was investigated with optical density (OD) test and the minimum inhibition concentration(MIC) as index. As the result, the fraction with high polarity which is very dissoluble in water has stronger inhibition ability than other fractions with lower polarity. Among the water dissoluble fraction, those compounds with three consecutive hydroxyl groups seems to be very important to antibacterial activity. That is to say, the inhibition factors in the GSE are those phenolic compounds with three consecutive hydroxyl groups but not the procyanidins as what we expect.

Keywords：grape seed extract，polyphenolic compounds，cariogenic bacterial，periodontitis，optical density，minimum inhibition concentration

收稿日期：2013-03-06

基金项目：陕西省科技统筹创新工程计划项目（2011KTCL03-20）。

作者简介：张　卉（1979—），女，陕西西安人，讲师，主要从事天然活性成分研究。

*通信作者：陈莉娜（1975—），女，湖北洪湖人，副教授，主要从事药物活性检测及研究。E-mail：chenlin@ mail.xjtu.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

葡萄籽提取物(Grape seed extract,GSE)是目前风靡世界的一种食品添加剂和保健品。在美国、日本和欧洲,GSE 成为人们日常生活中最常使用的天然保健品,是目前美国天然植物提取物 10 大畅销品种之一。在日本的年销量达到每年 100 000 kg[1],具有巨大的市场潜力和开发价值。GSE 的最大功用在于其中富含多酚类化合物,其中花青素类是目前为止发现的最高效的氧自由基清除剂,具有极强的抗氧化作用,其抗氧化活性为维生素 E 的 50 倍、维生素 C 的 20 倍,它能有效清除人体内多余的自由基,具有超强的延缓衰老和增强免疫力的作用,被广泛应用于治疗心血管疾病、癌症、眼科疾病以及化妆品等领域[2-6]。然而对于其中多酚类化合物(包括原花青素以及其它多酚)的抗菌作用的研究报道较少,特别是应用于口腔健康领域的研究并不多见。但是已有研究表明,GSE 中的多酚类成分具有抑制口腔致病菌的作用,法国的 Bonnaure-Mallet Martine 等发明了以原花青素低聚体或单体为活性成分(≥1%)治疗牙周病的制剂[7],并获得了专利保护。因此,在美国伊利诺伊大学芝加哥分校牙科医学院的资助下,作者进行了 GSE 中多酚类化合物对口腔致病菌的抑制作用的研究。

1 材料与方法

1.1 葡萄籽提取物

实验中使用的葡萄籽提取物来源于美国 Polyphenolics 公司(Madera,CA 93639,USA)。

1.2 微生物及培养条件

实验中使用的口腔致病菌包括致龋病菌变异链球菌 *Streptococcus mutans*(ATCC 10449)和戈登链球菌(*Streptococcus gordonii challis*)以及牙周病菌具核梭杆菌 *Fusobacterium nucleatum*(ATCC 10953),这些菌种均保存于美国伊利诺伊大学芝加哥分校牙科医学院的菌种库中。实验中使用的培养基包括脑心浸液培养基(Difco,Sparks,MD)和厌氧培养基(Oxoid Ltd,Basingstoke,Hampshire,England)。培养条件为 37 ℃,于普通培养箱(对于变异链球菌和戈登链球菌)或厌氧培养箱(对于具核梭杆菌)中培育 24~48 h。

1.3 试剂

实验中使用的色谱填料有:大孔树脂 HP-20,购于 Supelco 公司(Bellefonte,PA,USA);Sephadex LH-20,购于 GE Healthcare 公司。其它化学试剂均购于 Fisher 公司(Fair Lawn,NJ,USA)。

1.4 仪器

光密度测试使用 Power Wave 200 微板扫描分光光度仪(Bio-Tek Instruments Inc.,Winooski,VT,USA)。

1.5 最小抑制浓度法(MIC Assay)

在 96 孔微量滴定板中加入待测试的样品溶液和相应的培养基。取相应的测试菌株进行复苏培养(12 h)后,将培养液离心(10 000 r/min,10 min),吸取上层清液并用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 6.8)洗涤两次,而后将菌落混悬于 PBS 中。测试菌落混悬液的光密度值(OD),并对其进行相应的稀释,将混悬液加入已经准备好的 96 孔微量滴定板中,使其终浓度达到 5×10^5(变异链球菌和戈登链球菌)或 5×10^6(具核梭杆菌) CFU/mL。阴性对照组加入与测试样品溶液等体积的生理盐水,阳性对照组加入葡萄糖酸洗必泰溶液(chlorhexidine gluconate,CHX),其对于 3 种细菌的 MIC 值分别为 1.25 μg/mL(变异链球菌)、2.5 μg/mL(戈登链球菌)和 2.5 μg/mL(具核梭杆菌)。所有的培养平板均置于 37 ℃相应的培养箱(普通培养箱用于培养变异链球菌和戈登链球菌,厌氧培养箱用于培养具核梭杆菌)中,培养 24~48h。而后将培养平板置于光密度测试仪上读取培养液的 OD 值。通过比较 OD 值的大小判断微生物的生长情况,OD 越大说明微生物生长越多,从而推测被测组分的最小抑制浓度。

1.6 GSE 的分离

将 60 g 葡萄籽提取物溶解于 300 mL 蒸馏水中,加样于大孔吸附树脂柱,分别以水、20%,40%,60%,80%系列体积分数的甲醇/水和纯甲醇依次洗脱,分为 6 个组分,分别记为 PA-1~PA-6。对这些组分的 MIC 进行测试后发现 PA-1 的最小抑制浓度较其它各组分为低,因而对其采用Sephadex LH-20 柱色谱进行了进一步的分离,分别以 10%,15%,20%,30%,50%,80%,90%系列体积分数甲醇/水和纯甲醇进行洗脱,获得 13 个组分,分别标记为 PA-1-1~PA-1-13。继续采用 MIC 进行活性追踪,对 PA-1-7 采用硅胶柱色谱分离,以 *V*(甲苯):*V*(丙酮):*V*(乙酸)=5:1:0.1 和 3:1:0.1 作为流动相,获得化合物 1(没食子酸);对 PA-1-10 采用硅胶柱色谱分离,以 *V*(甲苯):*V*(丙酮):*V*(乙酸)=3:1:0.1 和 3:3:0.1

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作为流动相,获得化合物 3(原儿茶酸);对 PA-1-11 采用 Sephadex LH-20 柱色谱进行分离,以体积分数 75%、80%甲醇/水及纯甲醇为流动相,获得化合物 2(邻苯三酚);对 PA-1-12 采用硅胶柱色谱分离,以 V(甲苯):V(丙酮):V(乙酸)=3:1:0.1,3:3:0.1,3:5:0.1 和 3:7:0.1 作为流动相,获得化合物 4(表儿茶素)。

2 结果与讨论

2.1 活性追踪分离获得的 4 种多酚类化合物结构确证

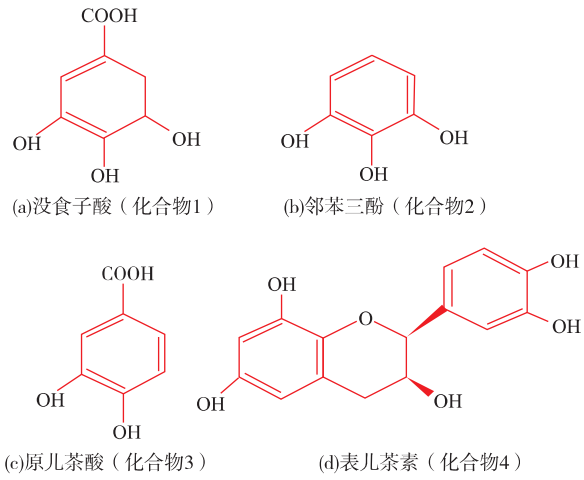
化合物 1:白色针晶(丙酮),^{1}H NMR (360 MHz, DMSO-d_6) δH 6.95 (2H,s,H-2 及 H-6);^{13}C NMR (80 MHz,DMSO-d_6) δ_c 109.6 (C-2 及 C-6),121.4 (C-1),138.9(C-4),146.4(C-3 及 C-5),168.5(C-7);HR -ESIMS:m/z 169.0139 [M -H] $^-$($C_7H_6O_5$,calcd 169.014 2)。通过波谱解析并与文献对比[8],确定其为没食子酸。

化合物 2:白色针晶(丙酮),^{1}H NMR(360 MHz, DMSO-d_6) δ_H 6.27 (2H,d,J=7.2 Hz,H-4 及 H-6), 6.45(1H,dd,J= 8.5,8.5 Hz,H-5);^{13}C NMR(80 MHz, DMSO-d_6) δ_c 108.0 (C-4 及 C-6),119.4 (C-5), 134.0 (C-2),147.2 (C-1 及 C-3);HR-ESIMS:m/z 125.0238 [M-H]$^-$ ($C_6H_6O_3$,calcd 125.022 6)。通过波谱解析并与文献对比[8],确定其为邻苯三酚。

化合物 3:白色针晶(丙酮),^{1}H NMR(360 MHz, acetone -d_6) δ_H 6.89 (1H,d,J =8.2 Hz,H -5),7.47 (1H,dd,J=8.2,2.0 Hz,H-6),7.52 (1H,d,J=2.0 Hz, H-2);^{13}C NMR (80 MHz,acetone-d_6) δ_c 115.3 (C-5),117.1(C-2),123.2(C-6),124.5(C-1),141.6(C-3),146.5 (C -4),159.7 (C -7);HR -ESIMS:m/z 153.0185 [M-H]$^-$ ($C_7H_6O_4$,calcd 153.017 2)。通过波谱解析并与文献对比[8],确定其为原儿茶酸。

化合物 4:白色粉末(甲醇),^{1}H NMR(360 MHz, acetone -d_6) δ_H 2.49 (1H,dd,J =16.1,8.7 Hz,H -4axi),2.89 (1H,dd,J =16.1,5.6 Hz,H -4eq),3.96 (1H,m,H -3),4.51 (1H,d,J =7.9 Hz,H -2),5.85 (1H,d,J=2.3 Hz,H-8),6.00(1H,d,J=3.2 Hz,H-6), 6.72 (1H,dd,J=8.1,1.9 Hz,H-6'),6.78 (1H,d,J= 8.1 Hz,H -5'),6.88 (1H,d,J =1.9 Hz,H -2');^{13}CNMR (80 MHz,acetone-d_6) δ_c 27.8 (C-4),67.2 (C-3),81.6(C-2),94.1(C-8),95.0(C-6),99.4(C-4a),114.2(C-2'),114.5(C-5'),118.8(C-6'),130.8 (C-1'),144.6(C-3'),144.7(C-4'),155.7(C-8a), 156.2(C-5),156.7(C-7);ESIMS m/z 288 [M-H]$^-$。通过波谱解析并与文献对比[9],确定其为表儿茶素。

如图 1 所示。



(a)没食子酸(化合物1) (b)邻苯三酚(化合物2)

(c)原儿茶酸(化合物3) (d)表儿茶素(化合物4)

图 1 葡萄籽提取物经活性追踪分离获得的 4 种多酚类化合物结构

Fig. 1 Chemical structures of the 4 polyphenol compounds isolated from GSE with bioactivity guide

2.2 葡萄籽提取物不同极性部分的抑菌活性

葡萄籽提取物经大孔吸附树脂柱分离后,水洗部分(PA-1)对所测试的 3 个菌种的最小抑制质量浓度分别为 0.5 mg/mL(变异链球菌)、2 mg/mL(戈登链球菌)和 0.25 mg/mL(具核链球菌),相对于其它醇洗部分具有较好的抑菌活性(见表 1)。由此可以推测葡萄籽提取物中的极性较大,在大孔吸附树脂柱上容易被水洗脱的化合物(初步推断为多酚类化合物)具有良好的抑制致龋病菌和牙周病菌的作用。

2.3 大极性部分中不同分子量部分的抑菌活性

将 PA-1 部分于葡聚糖凝胶色谱柱上进行进一步的分离后,对所获得的组分进行了抑菌活性测定。结果表明,洗脱流分 PA-1-11 对所测试的 3 个菌种具有较好的抑制活性,最小抑制质量浓度分别为 0.125 mg/mL(变异链球菌)、0.25 mg/mL(戈登链球菌)和 0.031 25 mg/mL(具核梭杆菌)(见表 2)。由于葡聚糖凝胶色谱柱主要是依照分子量大小进行分离的,因此可以推测产生较好抑菌效果的并非具有较大分子量的花青素类化合物,而是一些小分子多酚类化合物,这也与法国学者的研究结果相一致[7]。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 PA-1~PA-6 对 3 种口腔致病菌的最小抑制浓度 mg/mL

Table 1 MIC of fraction PA-1 to PA-6 against 3 kinds of periodontitis or cariogenic bacterial

菌 种	GSE	PA-1	PA-2	PA-3	PA-4	PA-5	PA-6
变异链球菌	2	0.5	2	4	4	2	2
戈登链球菌	2	2	4	4	4	2	2
具核梭杆菌	1	0.25	1	2	2	1	2

表 2 PA-1-1~PA-1-13 对三种口腔致病菌的最小抑制浓度 mg/mL

Table 2 MIC of fraction PA-1-1 to PA-1-13 against 3 kinds of periodontitis or cariogenic bacterial

菌 种	PA-1-1	PA-1-2	PA-1-3	PA-1-4	PA-1-5	PA-1-6	PA-1-7	PA-1-8	PA-1-9	PA-1-10	PA-1-11	PA-1-12	PA-1-13
变异链球菌	2	2	2	2	2	2	0.25	2	2	2	0.125	2	2
戈登链球菌	2	4	2	2	4	4	0.25	2	4	2	0.25	4	4
具核梭杆菌	4	1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.0625	0.125	0.125	0.125	0.03125	0.125	0.125

2.4 几种小分子多酚类化合物的抑菌活性

根据上述活性测试的结果,对抑菌活性较强的 PA-1-7、PA-1-10、PA-1-11 和 PA-1-12 进行了进一步硅胶柱色谱的分离,获得化合物 1~4,并测定了它们对致龋病菌和牙周病菌的最小抑制质量浓度(表 3)。由结果可知,化合物 2,即邻苯三酚,对致龋病菌和牙周病菌的抑制作用最强, 其次是化合物 1(没食子酸)。这两个化合物均含有 3 个邻位酚羟基, 提示这一结构对于口腔致病菌的抑制作用最强,而羧基的引入(化合物 1)不仅没有增加抑菌活性,反而有所减弱。化合物 3 仅含有 2 个邻位酚羟基,并具有羧基,其抑菌作用大大降低。化合物 4(表儿茶素) 作为花青素类化合物的基本结构单元,对牙周病菌具有一定的抑制活性,但对致龋病菌作用较弱,进一步证实了花青素类成分抗菌活性较差的推断。

表 3 化合物 1~4 对三种口腔致病菌的最小抑制浓度

Table 3 MIC (mg/mL) of comp. 1-4 against 3 kinds of periodontitis or cariogenic bacterial mg/mL

菌 种	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4
变异链球菌	0.5	0.125	2	2
戈登链球菌	2	0.25	2	2
具核梭杆菌	0.25	0.0625	2	0.5

3 结 语

综上所述,可以推断葡萄籽提取物对于保护口腔健康是非常有利的,而其中能够抑制致龋病菌和牙周病菌的化学成分并非抗氧化活性较好的且具有较高聚合度的花青素类化合物, 而是其低聚物、单体或分子量更小的多酚类化合物,其中以含有邻苯三酚结构的化合物抑菌活性最佳,当酚羟基减少或结构中增加羧基时,抑菌活性降低,其中酚羟基数目的影响大于羧基的影响。

参考文献:

[1] Market view. Antioxidant foodstuffs[J]. **Nikkei Bio-business**, 2001(11): 129-130.

[2] Ammar E M, Said S A, El-Damarawy S L, et al. Cardioprotective effect of grape-seed proanthocyanidins on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats[J]. **Pharm Biol**, 2013, 51: 339-344.

[3] Gollucke A P B, Aguiar O, Barbisan L F, et al. Use of grape polyphenols against carcinogenesis: putative molecular mechanisms of action using in vitro and in vivo test systems[J]. **J Med Food**, 2013, 16: 199-205.

[4] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, et al. Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR / f) rats[J]. **J Agric Food Chem**, 2002, 50: 4983-4988.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] 吴嘉慧,袁春龙,宋洋波. 葡萄籽功能性成分及其应用[J]. 日用化学工业,2011,41:216-228.
WU Jia-hui,YUAN Chun-long,SONG Yang-bo. Functional components of grape seed and its application[J]. **China Surfactant Detergent & Cosmetics**,2011,41:216-228.(in Chinese)
[6] 彭亮,傅伟忠,姚思宇,等. 葡萄籽粉对自然衰老大鼠的抗氧化作用研究[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22:2376-2378.
PENG Liang,FU Wei-zhong,YAO Si-yu,et al. Study on the antioxidant effect of grape seed powder in natural aging rats[J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**,2012,22:2376-2378.(in Chinese)
[7] Jolivet-Gougeon A,Sixou Jean-Louis,Tamanai-Shacoori Z,et al. Antimicrobial treatment of capnocytophaga infections[J]. **International Journal of Antimicrobial Agents**,2007,29:367-73.
[8] Haddock E A,Gupta R K,Al-Shafi S M K,et al. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations[J]. **Phytochemistry,**1982(5):1049-1062.
[9] Richard F C,Goupy P M,Nicolas J J,et al. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning 1 Isolation and characterization of addition-compounds formed during oxidation of phenolics by apple polyphenol oxidase[J]. **J Agric Food Chem**,1991,39:841-847.

科 技 信 息

欧盟食品安全局发布谷物及谷物制品中黄曲霉毒素报告

2013 年 3 月 22 日,欧盟食品安全局就谷物以及谷物制品中黄曲霉毒素(B1,B2,G1,G2)的含量发布了报告。

数据显示,2007-2012 年间数据库中共计有 2183 份与黄曲霉毒素(B1,B2,G1,G2)相关的食品样品分析数据,其中 1341 件为谷物及其碾磨制品,842 件为谷物加工产品。大米(636 件)、早餐麦片(346 件)是受检样品当中数量最多的产品。所有样品当中有 1964 件(90%)样品未检出黄曲霉毒素。

在谷物及其碾磨制品中,黄曲霉毒素含量最低的是未标明谷物种类的碾磨品样本 2.21 μg/kg;而燕麦碾磨品当中的含量最高,为 2.60 μg/kg。

在谷物制品中,黄曲霉毒素检出值最低为精制焙烤食品 0.45 μg/kg,最高为生意大利面条 1.87 μg/kg。

[信息来源]EFSA. Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products [EB/OL]. (2013-3-22). http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/406e.htm.

美国研究植物提取物对绿叶蔬菜中致病菌的杀菌效果

2013 年 3 月美国 FDA 网站介绍了一项利用植物提取物作为杀菌剂,对绿叶蔬菜中的致病菌进行处理的研究。

该研究选择 oregano、lime 等 41 种植物提取物,研究了它们对香菜、欧芹、菠菜中沙门氏菌、大肠杆菌 O157、志贺氏菌的灭菌效果。

在试验中,将测试用的植物使用乙醇提取,测定提取物的最低杀菌浓度,选择杀菌效果最强的提取物做进一步研究。将新鲜蔬菜的叶片用无菌水清洗后晾干,浸没在两种不同浓度的致病菌悬液中进行接种,之后晾干,储存在 4℃下备用。再将接种过的绿叶蔬菜分别浸没在氯、硫脲杀菌剂及植物提取物溶液中分别在 4℃下储藏 0、1、5、7 天测试杀菌效果。

研究发现,通过对 41 种植物提取物的测试,oregano 提取物及 lime 果皮与果肉提取物的杀菌强度与氯或硫脲杀菌剂接近,均可降低蔬菜中致病菌的含量,因此可作为天然可食用的杀菌剂来降低致病菌的污染风险。

[信息来源] 食品伙伴网. 美国研究植物提取物对绿叶蔬菜中致病菌的杀菌效果 [EB/OL]. (2013-4-19). http://www.foodmate.net/news/keji/2013/04/229712.html.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net