

白毛夏枯草及其复方次生代谢产物含量与抑菌活性相关性研究

高晓君, 管敏, 周琴妹* (南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

摘要: 目的 比较白毛夏枯草饮片及其 2 种复方汤剂的次生代谢产物含量与抑菌活性的相关性, 为合理配伍提供依据。方法 采用牛津杯琼脂扩散法测定抑菌圈大小, 利用分光光度法测定次生代谢产物(总黄酮、总皂苷、环烯醚萜类和总生物碱)含量, 并进行抑菌活性相关性和通径分析, 确定目标化合物。结果 总黄酮、总皂苷和环烯醚萜类含量: 复方 1> 复方 2>单方, 总生物碱含量: 复方 2>单方~复方 1。2 种复方抑菌强度基本相同且显著高于单方, 4 种次生代谢产物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性均起正相关作用, 总环烯醚萜直接通径系数最大。结论 白毛夏枯草复方次生代谢产物含量和抑菌活性均高于单方, 影响其抑菌活性的成分主要是环烯醚萜类与皂苷类。

关键词: 白毛夏枯草; 次生代谢产物; 抑菌活性; 相关性

中图分类号: R289.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)05-0568-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.012

Correlation Between the Contents of Secondary Metabolites and Anti-bacterial Activity of *Ajuga Decumbens* Thunb and Its Two Compounds

GAO Xiaojun, GUAN Min, ZHOU Qinmei* (Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the contents of secondary metabolites and anti-bacterial activity of *Ajuga decumbens* Thunb and its two compounds, and provide a basis for reasonable compatibility of herbs. **METHODS** A oxford cup agar diffusion method was used to measure the anti-bacterial activity. The contents of secondary metabolites(flavonoids, saponins, iridoid and alkaloids) were determined by spectrometry. The correlation and path analysis were used to identify the goal compound. **RESULTS** The contents of flavonoids, saponins and iridoid were: compound 1>compound 2>*Ajuga decumbens* Thunb. The content of alkaloids was compound 2>*Ajuga decumbens* Thunb~compound 1. The anti-bacterial activity of the two compounds was similar and significantly higher than *Ajuga decumbens* Thunb. The anti-bacterial activity of the 4 secondary metabolites was positive to *Staphylococcus aureus*. The direct path coefficient of total iridoid was the highest of the secondary metabolites. **CONCLUSION** The contents of the secondary metabolites and anti-bacterial activity of the two compounds are higher than *Ajuga decumbens* Thunb. Iridoid and saponins are main components of antibacterial activity.

KEY WORDS: *Ajuga decumbens* Thunb; secondary metabolites; anti-bacterial activity; relativity

唇形科(Labiatae)筋骨草属(*Ajuga*)植物为一年生或多年生草本, 全世界有 40~50 种, 分布于东半球温带地区。我国有 18 种, 主要集中于南部地区^[1], 包括苞叶筋骨草(*Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth.)、金疮小草(*Ajuga decumbens* Thunb.)、紫背金盘(*Ajuga nipponensis* Makino)、痢止蒿(*Ajuga Forrestii* Diels)等。本属植物作为传统中草药具有止咳化痰、清热凉血、解毒消肿的功效。筋骨草属植物的研究热潮始于 20 世纪 50 年代植物来源的昆虫蜕皮激素类物质的发现。20 世纪 70 年代末期, 又在该属植物中分离得到昆虫拒食活性的新克罗烷型二萜化合物, 从而再度引起研究热潮^[2]。白毛夏枯草为唇形科植物金疮小草全草, 民间用于治

疗上呼吸道感染引起的急慢性咽炎、支气管炎、扁桃体炎、肺炎、疔疮、跌打损伤等^[1], 其化学成分有二萜、环烯醚萜、植物甾酮、黄酮等。药理研究表明白毛夏枯草具有抗菌、抗病毒、保肝、抗肿瘤等作用^[2-3]。现有资料尚未系统研究白毛夏枯草的抑菌活性, 其抗菌的活性与药物中环烯醚萜、总黄酮、总鞣质、总生物碱的含量相关性研究尚未见报道。因此, 本研究以白毛夏枯草及 2 种以白毛夏枯草为主药的利咽方为对象, 以金黄色葡萄球菌为例, 比较白毛夏枯草及 2 种复方中次生代谢产物含量及抑菌活性的差异, 分析两者相关性, 确定抑菌的有效组分, 为进一步开发利用白毛夏枯草汤提供基础资料。

基金项目: 江苏省政府财政专项(省直中医 II)

作者简介: 高晓君, 女, 硕士生, 中药师 Tel: (025)86619821
药师 Tel: (025)86529291 E-mail: zhoumeizi0917@163.com

E-mail: gaoxiaojun88@126.com *通信作者: 周琴妹, 女, 主任中

1 仪器与试剂

UV755B 紫外可见分光光度计(上海分析仪器总厂); BP-211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司); DNP-9082 电热恒温培养箱和 MJX-150 霉菌培养箱(上海申贤仪器设备厂); YXQ.SG41.280 手提式消毒锅(上海医用核子仪器有限公司)。对照品槲皮素(批号: 0081-9304, 纯度: 98.0%)、菝葜皂苷元(批号: 110744-200509, 纯度: 98.0%)、乙酰哈巴昔(批号: 111925-201001, 纯度: 97.0%)、盐酸小檗碱(批号: 110713-200208, 纯度 \geq 98.0%)均购自中国药品生物制品检定所。实验菌株金黄色葡萄球菌由江苏省药品检验所提供。

2 方法

2.1 菌液制备

斜面菌种接入营养肉汤液体培养基中, 30 °C 活化 24 h, 再以 1% 的接种量接入营养肉汤液体培养基中 30 °C 培养。活化后的菌液贮存于冰箱(4 °C)中备用。培养 6 h, 取出稀释涂平板, 30 °C 倒置培养 24 h, 计算菌落形成单(colony forming unit, cfu)。

2.2 供试品溶液的制备

单方(白毛夏枯草 10 g)、复方 1(白毛夏枯草、沙参、射干、甘草各 10 g)、复方 2(白毛夏枯草、山豆根、射干、甘草各 10 g)、白毛夏枯草、沙参、射干、甘草药材均购于南京市药材公司, 经江苏省中医院主任中药师宋金斌鉴定。药材加适量水浸泡 1 h, 煎煮 2 次, 每次煮沸 1 h 后过滤, 合并 2 次滤液, 静置沉淀、过滤, 滤液用旋转蒸发仪浓缩至适量, 搅匀、静置 24 h 后过滤, 滤液用蒸馏水调整至含白毛夏枯草饮片 1 g·mL⁻¹, 101 kPa 灭菌 30 min, 置冰箱(4 °C)中保存备用。

各组方药液用蒸馏水稀释至 10 mg·mL⁻¹, 总皂苷测定时, 各供试液用蒸馏水稀释至 0.2 mg·mL⁻¹ (粉末: 提取液), 4 000 r·min⁻¹ 离心, 取上清液用于次生代谢产物含量的测定, 每个样品重复测定 3 次。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取菝葜皂苷元、乙酰哈巴昔、槲皮素对照品 0.746, 5.19, 11.34 mg 于 10 mL 量瓶中, 分别加甲醇溶解稀释至刻度, 制成浓度分别为 0.074 6, 0.519, 1.134 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密称取盐酸小檗碱对照品 9.3 mg 于 25 mL 量瓶, 加甲醇稀释定容制成浓度为 0.93 mg·mL⁻¹ 对照品溶液。

2.4 总环烯醚萜的含量测定

精密吸取对照品溶液、供试品溶液及甲醇各 1 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 3 mL, 置 90 °C 水浴保温 15 min, 放冷, 加二硝基苯胍乙醇试液 0.5 mL, 置 90 °C 水浴保温 30 min, 放冷, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠甲醇水溶液(4 g NaOH, 20 mL 水, 80 mL 甲醇)4 mL, 摇匀, 常温放置 2 h, 以上述甲醇反应液为空白, 乙酰哈巴昔为对照品, 在 586 nm 处测定吸光度。标准曲线为 $Y=0.000\ 408\ 76X-0.001\ 682$, $r=0.999\ 0$, 乙酰哈巴昔在 16.22~259.5 μ g 内线性关系良好。

2.5 总黄酮的含量测定

精密吸取对照品溶液、供试品溶液及纯化水各 1 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 加 4 mL 0.1 mol·L⁻¹ 三氯化铝-甲醇溶液, 摇匀, 在 420 nm 处测定吸光度, 以槲皮素为对照品。标准曲线为 $Y=12.47X-0.017$, $r=0.999\ 9$, 槲皮素在 17.72~283.5 μ g 内线性关系良好。

2.6 总生物碱的含量测定

取样品溶液 8 mL, 加入 4 mL 氯仿, 再加溴甲酚绿(pH=7.6)缓冲溶液 4 mL, 振摇 1 min, 静置 2 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 立即取出氯仿层于 417 nm 处测定吸光度, 以盐酸小檗碱为对照品。标准曲线为 $Y=0.01075X-0.0186$, $r=0.999\ 9$, 盐酸小檗碱在 11.625~46.5 μ g 内线性关系良好。

2.7 总皂苷的含量测定

精密吸取对照品溶液、供试品溶液及甲醇各 1 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 挥去溶剂, 加入 0.2 mL 香草醛冰醋酸溶液, 再加入 0.8 mL 高氯酸, 70 °C 水浴加热 20 min, 取出, 冷却, 加 5 mL 冰醋酸, 于 543 nm 处测定吸光度, 以菝葜皂苷元为对照品。标准曲线为 $Y=0.008\ 4X+0.076\ 3$, $r=0.996\ 6$, 菝葜皂苷元在 15.28~76.4 μ g 内, 线性关系良好。

2.8 抑菌圈大小的测定

以牛津杯琼脂扩散法测定各样品对金黄色葡萄球菌的抑菌效果。将计数后的菌液稀释后, 控制菌液浓度为 10⁵ cfu·mL⁻¹, 取 1 mL 菌液涂平板。将灭菌后的牛津杯(直径为 6 mm)放在上述已涂布细菌的营养琼脂培养基上, 每种提取物放置 3 个杯子, 在杯中加入 0.2 mL 的药液, 置于 37 °C 恒温箱中培养 24~48 h, 测量抑菌圈直径, 同时设立蒸馏水阴性对照。

2.9 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentra-

tion, MIC)的测定

以试管 2 倍稀释法测定各样品对金黄色葡萄球菌的 MIC, 以蒸馏水为阴性对照。

2.10 通径分析

以 4 种次生代谢产物含量为自变量, 以金黄色葡萄球菌的抑菌圈大小为因变量, 采用 DPS 软件进行通径分析。

2.11 数据处理

试验处理及数据测定均重复 3 次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 次生代谢产物含量与抑菌活性之间的相关分析和通径分析利用 DPS 7.05 统计软件完成。

3 结果

3.1 次生代谢产物含量分析

不同组方的次生代谢产物含量差异较大, 总黄酮和总皂苷含量以复方 1 最高、复方 2 次之、单方最低, 各样品间差异具有统计学意义; 总生物碱含量以复方 2 最高、单方与复方 1 含量相当, 无显著性差异, 这也说明生物碱主要存在于山豆根饮片中, 其余组方药材不含或较少含有生物碱类成分, 与文献[8]报道一致; 总环烯醚萜以复方 1 中最高, 复方 2 次之, 单方最低, 2 种复方间不存在显著性差异, 与单方间存在显著性差异。从文献[8]资料可知, 白毛夏枯草的成分为环烯醚萜类成分, 理论上单方中环烯醚萜类成分应该最高, 试验数据却显示最低, 说明方中其他饮片中也含有此类成分, 或者是其他饮片成分对此类成分的测定有影响; 从 4 种次生代谢产物总量来看, 3 个样品间差异显著; 2 种复方含量均高于单方。结果见表 1。

表 1 次生代谢产物测定结果表($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The result of the total contents of secondary metabolites($n=3, \bar{x} \pm s$) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

次生代谢产物	单方	复方 1	复方 2
总黄酮	1.133±0.003	3.404±0.009	2.717±0.006
总环烯醚萜	16.543±0.444	17.862±0.090	17.754±0.487
总皂苷	2.289±0.23	14.461±0.31	9.857±0.45
总生物碱	0.086±0.04	0.086±0.052	1.586±0.078

3.2 单方与复方的抑菌活性

单方的抑菌活性最低, 2 种复方抑菌强度基本一致且高于单方, 差异具有显著性。从抑菌圈大小来看, 单方和复方对金黄色葡萄球菌的抑菌效果均>12 mm, 为中性抑菌; 从 MIC 来看, 以每毫

升药液相当于白毛夏枯草饮片量比较, 单方对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 $37.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 复方均为 $31.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。复方的抑菌效果优于单方。结果见表 2。

表 2 抑菌活性测定结果表

Tab. 2 The result of the anti-bacterial activity

组别	抑菌圈/mm	最低抑菌浓度/ 相当于白毛夏枯草饮片 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
单方	16.3±0.9	37.5
复方 1	22.2±1.2	31.5
复方 2	20.6±1.3	31.5

3.3 次生代谢产物与抑菌活性的相关性分析

总环烯醚萜、总皂苷、总黄酮、总生物碱的含量对金黄色葡萄球菌的抑菌活性均起正相关作用, 其相关系数分别为 1.000(与最低抑菌浓度相比 $P<0.05$), 0.93, 0.96(与最低抑菌浓度相比 $P<0.01$) 和 0.5。

3.4 次生代谢产物含量与抑菌活性的通径分析

影响 3 种组方对金黄色葡萄球菌的抑菌活性的次生代谢产物主要是总环烯醚萜, 其次是总皂苷。总环烯醚萜直接通径系数最大, 对抑菌活性起直接作用, 总皂苷其次, 总黄酮、总生物碱对金黄色葡萄球菌的抑菌活性相似, 作用较小。结果见表 3 和图 1。

表 3 与抑菌圈大小的通径分析结果表

Tab. 3 The result of correlation and path analysis

次生代谢产物	间接通径系数				
	直接通径系数	总黄酮	总环烯醚萜	总皂苷	总生物碱
总黄酮	0.122 6	-	2.028 2	0.280 6	0.010 6
总环烯醚萜	0.926 1	3.152 3	-	13.391 6	0.079 9
总皂苷	0.361 5	0.982 1	6.417 1	-	0.573 1
总生物碱	0.166 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	-

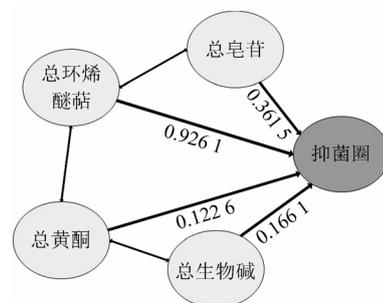


图 1 各类成分与抑菌圈大小的相关性分析图

Fig. 1 The correlation analysis figure of contents and inhibition zone

4 讨论

白毛夏枯草药用成分往往是一些次生代谢产物,如黄酮、生物碱、皂苷等^[4]。从4种次生代谢产物总量来看,3种组方差异显著,对于每一种次生代谢产物而言,总环烯醚萜、总黄酮、总鞣质的含量差异显著。同样,3种组方的抑菌活性也有明显差异,总体来说,复方1最高,复方2次之,单方最低。虽然单方饮片中的次生代谢产物总量低于其他2种复方组方,但其抑菌活性却处于中等水平。

急慢性咽炎主要由金黄色葡萄球菌等病原体引起,本病的病因与感受邪毒、五志过极、先天禀赋不足等有关。病机则可归纳为阴虚火旺、肝郁痰阻、气滞血瘀3方面。白毛夏枯草民间用于急慢性咽炎效果显著,其主要功效为止咳化痰,清热,凉血,消肿,解毒。临床主要治气管炎,咽喉肿痛,现代研究发现^[5]其主要有效成分为环烯醚萜类成分。本研究中2种复方均以白毛夏枯草为君药,使药分别用沙参和山豆根,沙参主要功效为清热养阴,润肺止咳,主治气管炎,百日咳,肺热咳嗽,咯痰黄稠,具有一定的抗菌作用^[6];山豆根大苦大寒,功善清肺火、解热毒,利咽消肿,为治疗咽喉肿痛的要药^[7]。结果显示,2种复方对金黄色葡萄球菌的抑菌活性基本一致,均明显高于单方,而生物碱的抑菌作用与含量的相关性较

小,说明皂苷类成分与环烯醚萜类成分对抗菌活性起协同作用。总黄酮的抑菌作用与含量的相关性分析,其相关系数仅为0.1226,说明总黄酮的抑菌作用很小。本研究对临床如何组方选方,提高对慢性咽炎的治疗效果具有一定的参考价值。

REFERENCES

- [1] GUO X D, HUANG Z S, BAO Y D, et al. Chemical constituents of *Ajuga decumbens* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(5): 646-648.
- [2] LI Z H, LI P, SUN X J. White prunella different harvest period of luteolin [J]. Guid J Tradit Chin Med(中医药导报), 2010, 16(10): 88-90.
- [3] WANG B, WANG X N, SHEN T, et al. Rearranged abietane diterpenoid hydroquinones from aerial parts of *Ajuga decumbens* Thunb [J]. Phytochemistry Lett, 2012, 5(2): 271-275.
- [4] SONG T, LIU S J, FANG C W, et al. Preliminary bioactivity-screening and characterization of anti-tussive and expectorant constituents of *Ajuga decumbens* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2010, 12(5): 20-24.
- [5] 李东, 姜森. 中药白毛夏枯草水提液体外抗肿瘤研究[J]. 吉林中医药, 2009, 29(5): 434-435.
- [6] YUAN Z, ZHAO M F, CHEN F K, et al. Chemical constituents from root and rhizome of *Glehnia littoralis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(12): 1063-1065.
- [7] DENG Y H, XU K P, ZHANG W, et al. Chemical study on *Sophora tonkinensis* [J] Nat Prod Rese Dev(天然产物研究与开发), 2005, 17(2): 172-174.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2010: 80-81, 92, 267-268, 325-326.

收稿日期: 2014-08-26

MTT 比色法与相对增殖度法对输液用包装材料的细胞毒性检测结果的比较

桑晶, 朱社敏, 匡荣* (浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 比较四唑盐(MTT)比色法和相对增殖度法对4种输液用包装材料细胞毒性检查结果的相关性, 评价2种方法在检测药包材体外细胞毒性作用上的优缺点。为建立快速有效的药包材检测新标准提供有力依据。方法 L-929细胞分别采用MTT法和细胞增殖度法对4种包装材料的浸提液进行细胞毒性研究, 比较材料对细胞的毒性等级, 算出细胞的相对增殖度, 分析比较2种方法相关性。结果 在同样实验条件下, 4种药品包材表现出对L-929细胞不同的细胞毒性。与细胞增殖度法比较, MTT法与细胞增殖法检测结果具有很好的相关性 $r=0.966(P<0.05)$ 。结论 与相对增殖度法相比, MTT比色法由于实际检测所需的细胞量相对较少、试验步骤相对简便、检测周期短, 因此具有一定的优越性, 值得推荐作为细胞毒性检测方法。

关键词: 药包材; 细胞毒性作用; MTT法; 细胞计数法

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 桑晶, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)86457970 E-mail: oliver169@163.com *通信作者: 匡荣, 男, 博士, 主任药师 Tel: (0571)86457970 E-mail: kuangrong@zjyj.org.cn