

补骨脂提取物的体外抑菌活性研究

王秀云^{1*}, 徐丽¹, 陆赢², 曾建国^{3,4#}[1.深圳市南山区蛇口人民医院药剂科, 广东深圳 518067; 2.深圳市第二人民医院中心实验室, 广东深圳 518035; 3.湖南农业大学国家中药材(湖南)技术中心, 长沙 410128; 4.湖南省中药提取工程研究中心, 长沙 410301]

中图分类号 R282.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4382-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.19

摘要 目的: 研究补骨脂提取物对9种可能引起细菌性腹泻的病原菌的体外抑菌活性。方法: 采用药敏滤纸片法、试管稀释法测定补骨脂提取物(含60%补骨脂酚)对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、猪链球菌、单增李斯特菌、副伤寒沙门氏菌、蜡样芽孢杆菌等病原菌的敏感度、最低抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。结果: 体外抑菌试验中补骨脂提取物对蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌、多杀性巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌有较强的抑菌作用, 均为中度敏感, 其MIC分别为3.9、25、50、125、250 μg/ml, MBC分别为7.8、50、100、125、500 μg/ml; 对副伤寒沙门氏菌无任何抑制作用; 对其他菌株的MIC、MBC均大于1 000 μg/ml。结论: 含60%补骨脂酚的补骨脂提取物对多种细菌性腹泻病原菌具有体外抑菌活性, 补骨脂酚在其中可能发挥了主要作用。

关键词 补骨脂提取物; 细菌性腹泻; 补骨脂酚; 体外抑菌; 最低抑菌浓度; 最低杀菌浓度

Study on *in vitro* Bacteriostatic Activity of *Psoralea corylifolia* Extract

WANG Xiuyun¹, XU Li¹, LU Ying², ZENG Jianguo^{3,4}[1.Dept. of Pharmacy, Shenzhen Nanshan District Shekou People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518067, China; 2.Center Laboratory, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035, China; 3.National Chinese Medicinal Herbs (Hunan) Technology Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4.Hunan Research Center for Traditional Chinese Medicine Extraction Technology, Changsha 410301, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To study *in vitro* bacteriostatic activity of *Psoralea corylifolia* extract (containing 60% bakuchiol) to 9 pathogens which may induce bacillary diarrhea. METHODS: Drug sensitivity filter disk method and tube dilution method were used to determine sensitivity, MIC and MBC of *P. corylifolia* extract to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella pullorum*, *Bacillus expneumoenteritidis suis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus paratyphosus* and *Bacillus cereus*. RESULTS: In the *in vitro* bacteriostatic tests, *P. corylifolia* extract strongly inhibited *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *P. multocida*, *S. aureus* and *E. coli*, belonging to medium sensitive; MICs were 3.9, 25, 50, 125, 250 μg/ml and MBCs were 7.8, 50, 100, 125, 500 μg/ml, respectively. *B. paratyphosus* didn't influenced by *P. corylifolia* extract; MICs and MBCs were more than 1 000 μg/ml in other bacterial species. CONCLUSIONS: *P. corylifolia* extract containing 60% bakuchiol shows *in vitro* bacteriostatic activity to various pathogens, in which the bakuchiol may play a major role.

KEYWORDS *Psoralea corylifolia* extract; Bacillary diarrhea; Bakuchiol; *in vitro* bacteriostatic; MIC; MBC

补骨脂为豆科植物补骨脂(*Psoralea corylifolia* L.)的干燥成熟果实, 具有温肾壮阳, 温补脾肾之功效, 内用于阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻的治疗; 外用于白癜风和斑秃的治疗^[1]。补骨脂含有呋喃香豆素、黄酮类成分、单萜酚类成分等。对补骨脂及其复方制剂的质量控制常以补骨脂素和异补骨脂素为指标成分^[2], 目前, 对属单萜酚结构的另一主要成分补骨脂酚(Bakuchiol)的研究引起了业界关注。补骨脂酚常温下为浅黄色油状液体, 脂溶性较强, 据报道, 其在补骨脂中的含量可达1%~7%^[3]。现代药理研究表明补骨脂酚在体外有很强的抑菌^[4]、抗炎、退热^[5]等作用。有专利将其制成药物, 用于治疗乳腺癌和骨质疏松^[6]。

鉴于中药补骨脂的广泛应用, 其主要成分之一的补骨脂酚的含量远高于补骨脂素和异补骨脂素含量的总和。研究显

示, 补骨脂酚对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌的生长均有明显抑制作用^[7-8]。在本研究中, 笔者采用含60%补骨脂酚的补骨脂提取物对可引起细菌性腹泻的病原菌的体外抑菌活性进行研究, 旨在为补骨脂酚的进一步应用提供依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

补骨脂提取物(湖南美可达生物资源有限公司, 批号: BG-ZF11-3, 纯度: 含60%补骨脂酚)。二甲基亚砜、氢氧化钠和乙酸乙酯等均为分析纯(国药集团上海试剂公司)。

1.2 指示菌种

大肠杆菌(菌株编号: CMCC44717)、金黄色葡萄球菌(菌株编号: CMCC56002)、鸡白痢沙门氏菌(菌株编号: CVCC-518)、猪霍乱沙门氏菌(菌株编号: CVCC504)、多杀性巴氏杆菌(菌株编号: CVCC2117)、猪链球菌(菌株编号: CVCC 3307)、单增李斯特菌(菌株编号: CVCC53004)均由中国兽医菌种保藏中心提供; 副伤寒沙门氏菌(中国药品生物制品检定所菌种中

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0755-21606999。E-mail: wangxiu.yun@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 天然药物开发。电话: 0731-84686560。E-mail: ginkgo@world-way.net

心,菌株编号:CMCC50094);蜡样芽孢杆菌(华南微生物资源中心,菌株编号:ACCC11109)。

1.3 培养基

大肠杆菌、芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌用水解酪蛋白(MH)肉汤培养基(上海顺勃生物工程技术有限公司),其余菌株用添加5%胎牛血清的MH肉汤培养基。

2 方法

2.1 补骨脂提取物抑菌药液的制备

按抑菌药物贮存液质量浓度不低于1 000 $\mu\text{g/ml}$ 或10倍于最高测定浓度的要求^[9],在补骨脂提取物中加入适量20%二甲亚砜溶液,使其质量浓度达到2 000 $\mu\text{g/ml}$ 。同时,单独取20%二甲亚砜溶液进行体外抑菌试验,判断其是否有抑菌效果,以排除溶剂的影响。

2.2 抑菌圈测定

取定性滤纸,用打孔机打成直径为7 mm的圆纸片,取50片圆纸片放入清洁干燥的青霉素空瓶中,瓶口以单层牛皮纸包扎,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌20~30 min后,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱中至完全干燥。在该青霉素空瓶内加入“2.1.1”项下制备的补骨脂提取物抑菌药液适量,并翻动纸片,使各纸片充分浸透(翻动纸片时注意勿将纸片捣烂)。同时,在瓶口上记录药物名称,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内过夜,干燥后立即密封,切勿受潮,置阴暗干燥处存放,备用。在无菌条件下,倾倒相应的菌种对应的培养基平板,表面涂布相应的菌种接种物,待平板凝固后,贴加浸药滤纸片,用无菌镊子使纸片和平板结合紧密,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,测量抑菌圈大小,并判断敏感度。抑菌圈直径 ≥ 20 mm为高度敏感;抑菌圈直径15~ < 20 mm为中度敏感;抑菌圈直径10~ < 15 mm为中介敏感;抑菌圈直径 < 10 mm为耐药;抑菌圈直径为0 mm表示该浓度的药物对这种细菌无任何抑制作用,为完全长菌^[10]。

2.3 最低抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)的测定

采用常量肉汤稀释法测定抑菌药物MIC和MBC^[11]。用接种环在待测菌平板上挑取4~5个直径1 mm左右的单菌落,接种于4~5 ml相应MH肉汤中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养6 h。增菌后的对数生长期菌液用生理盐水或MH肉汤校正浓度至0.5麦氏比浊标准,约含 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个菌集落形成单位(CFU)/ml。取无菌试管11支排成一排,每管先加入1 ml用MH肉汤稀释1 000倍的菌液,之后向第1管中加入1 ml药液,然后吸取1 ml至第2管,混匀后再吸取1 ml至第3管,如此连续倍比稀释至第10管,并从第10管中吸取1 ml弃去,第11管为不含药物的菌液作为生长对照。于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,以无细菌生长的最低浓度为MIC;将高于且包含MIC浓度的试管继续于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h,以不长菌的试管浓度作为MBC浓度。

3 结果

补骨脂提取物对9种指示菌的抑菌圈直径及MIC、MBC测定结果详见表1。

由表1可知,补骨脂提取物对除副伤寒沙门氏菌外的8种细菌有不同程度的抑菌作用,其中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、鸡白痢沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、单增李斯特菌、蜡样芽孢杆菌的抑菌圈直径在15~20 mm之间,为中度敏感;以上菌种中,除鸡白痢沙门氏菌外,补骨脂提取物对其余的菌种均有很好的抑菌效果,MIC在3~250 $\mu\text{g/ml}$ 之间、MBC在7.8~500 $\mu\text{g/ml}$ 之间,尤其是对蜡样芽孢杆菌(MIC、MBC为3.9、7.8

$\mu\text{g/ml}$)、单增李斯特菌(MIC、MBC为25、50 $\mu\text{g/ml}$)的抑菌效果极强。在MIC、MBC试验时,同时使用20%二甲亚砜不加药液作为空白溶液对各个菌株进行比对试验,发现菌株在空白溶液中生长良好,证明20%二甲亚砜对各菌株无抑菌作用。

表1 补骨脂提取物对9种指示菌的抑菌圈直径及MIC、MBC
Tab 1 Diameter of inhibition zone, MIC and MBC of *P. cor-ylifolia* extract to 9 pathogens

菌种	抑菌圈直径,mm	敏感度判断	MIC, $\mu\text{g/ml}$	MBC, $\mu\text{g/ml}$
大肠杆菌	17.7	中度敏感	250	500
金黄色葡萄球菌	19.0	中度敏感	125	125
鸡白痢沙门氏菌	15.1	中度敏感	$> 1\ 000$	$> 1\ 000$
猪霍乱沙门氏菌	7.0	耐药	$> 1\ 000$	$> 1\ 000$
多杀性巴氏杆菌	18.2	中度敏感	50	100
猪链球菌	12.6	中介敏感	$> 1\ 000$	$> 1\ 000$
单增李斯特菌	18.8	中度敏感	25	50
副伤寒沙门氏菌	0	无抑制作用	$> 1\ 000$	$> 1\ 000$
蜡样芽孢杆菌	16.3	中度敏感	3.9	7.8

4 讨论

补骨脂酚来源丰富,具有降糖、降血脂、抗炎、抗氧化、抗抑郁、抗癌等多种药理活性。从补骨脂属植物*Psoralea glandulosa*叶中提取分离的补骨脂酚具有抗炎活性^[12]。目前,对于补骨脂酚的来源、理化性质、药理作用等方面的研究虽已取得一些成果^[13-14],但补骨脂酚抗菌、抗氧化、抗癌等的作用机制尚不明确,有关补骨脂中补骨脂酚活性研究及作用机制尚待进一步深入研究。

本研究为初步了解补骨脂提取物的抑菌活性,采用体外抑菌试验方法,对能引起腹泻的菌种进行研究。根据《中华人民共和国动物防疫法》附件中“人畜共患传染病中相关规定”,选择了本研究中的9种细菌性腹泻病原菌为试验对象。通过试验可知补骨脂提取物对多种指示菌有不同程度的抑菌作用。除副伤寒沙门氏菌外,含量为60%的补骨脂酚对其余的菌种都有很好的抑菌效果(MIC ≥ 3.9 $\mu\text{g/ml}$ 、MBC ≥ 7.8 $\mu\text{g/ml}$),尤其对蜡样芽孢杆菌的MIC为3.9 $\mu\text{g/ml}$,抑菌效果最强。试验结果表明,补骨脂提取物对菌性腹泻病原菌有一定的抑制作用,是一种天然的抑菌剂。考虑补骨脂提取物中补骨脂酚含量为60%,结合已有补骨脂酚的抑菌活性研究推断,本试验中可能是补骨脂提取物中的补骨脂酚发挥了主要抑菌作用^[12-14],这对于补骨脂酚的进一步开发利用具有重要意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:187.
- [2] 关丽杰,赵礼慧,邵双,等. 补骨脂抑菌活性成分分析及鉴定[J]. 中国生物防治学报,2013,29(4):655.
- [3] 姚三桃,杨滨. 补骨脂中补骨脂酚的含量测定[J]. 中国中药杂志,1995,20(11):681.
- [4] 关丽杰,董瑞芳. 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2016(1):160.
- [5] Backhouse CN, Delporte CL, Negrete RE, et al. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with anti-inflammatory and antipyretic activities[J]. *J Ethnopharmacol*,2001,78(1):27.
- [6] 林汉钦,丁秀玉,张温良,等. 包含补骨脂酚的用于治疗妇女乳腺癌的医药组合物:中国,CN1827091A[P]. 2009-

构树果实化学成分分离与鉴定

庞素秋^{1,2*}, 王国权¹, 孙爱静²(1. 华侨大学生物医学学院, 福建泉州 362021; 2. 解放军第180医院临床药学科, 福建泉州 362000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4384-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.20

摘要 目的: 对构树果实进行化学成分分离及鉴定。方法: 将构树果实的95%乙醇提取物经不同极性溶剂(石油醚、乙酸乙酯)依次萃取, 萃取部位再经硅胶柱层析、薄层层析、Sephadex LH-20柱层析和重结晶等方法进行分离纯化, 根据化合物的理化性质和光谱数据鉴定其化学结构。结果: 从各萃取部位中分离鉴定出了11个化合物, 分别为化合物1(大黄素甲醚)、2(芹菜素)、3(芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷)、4(槲皮素)、5(β-胡萝卜苷)、6(胡萝卜苷棕榈酸酯)、7(棕榈酸乙酯)、8(δ-生育酚)、9(亚油酸)、10(叶绿醇)、11(棕榈酸)。其中, 化合物2~4、7~11均为首次从构树果实中分离得到。结论: 本研究进一步明确了构树果实的化学成分, 可为中药楮实子药理活性的物质基础研究提供科学依据。

关键词 构树果实; 化学成分; 分离; 萃取; 鉴定; 黄酮; 芹菜素

Separation and Identification of Chemical Constituents of *Broussonetia papyrifera* Fruits

PANG Suqiu^{1,2}, WANG Guoquan¹, SUN Aijing¹ (1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Fujian Quanzhou 362021, China; 2. Dept. of Clinical Pharmacy, No. 180 Hospital of PLA, Fujian Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and identify the chemical constituents of *Broussonetia papyrifera* fruits. METHODS: 95% ethanol extracts from *B. papyrifera* fruits were extracted with different polar solvents as aether petroleum and ethyl acetate in turn. The extract parts were isolated and purified by various chromatographic methods including silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and recrystallization. The chemical structure of them were identified according to physicochemical property and spectral data. RESULTS: Eleven compounds isolated from 95% ethanol extracts were identified as compound 1 (physcion), compound 2 (apigenin), compound 3 (apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside), compound 4 (quercetin), compound 5 (β-daucosterol), compound 6 (daucosterol palmitate), compound 7 (palmitic acid ethyl ester), compound 8 (δ-tocopherol), compound 9 (linoleic acid), compound 10 (phytol) and compound 11 (palmitic acid). Compound 2-4 and compound 7-11 were all isolated from *B. papyrifera* fruits for the first time. CONCLUSIONS: The study further confirms the chemical constituents of *B. papyrifera* fruits, and can provide scientific evidence for material base of pharmacological activity of *B. papyrifera*.

KEYWORDS *Broussonetia papyrifera* fruits; Chemical constituents; Separation; Extraction; Identification; Flavones; Apigenin

构树 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 为桑科构属直立落叶乔木, 其果实、树叶、枝条、茎皮部乳汁和根皮均可入药, 有补肾利尿、健胃、消炎、凉血止血之功效^[1-2]。构树的干燥成熟果实为传统中药楮实子 (*Broussonetiae Fructus*), 以补肾入药应

用已有几千年的历史, 在《神农本草经》《名医别录》中均将其列为上品^[3]。在我国中医临床治疗史上, 楮实子用于治疗老年痴呆症有较好疗效; 实验也证明其水溶性粗提取物能显著改善衰老模型小鼠的学习记忆能力^[4]。前期笔者已对构树果实

=====

- 04-22.
- [7] 贾琦, 洪梅芬. 补骨脂酚的组合物及其制备方法: 中国, CN101217968[P]. 2008-07-09.
- [8] Hsu PJ, Miller JS, Berger JM. Bakuchiol, an antibacterial component of *Psoralidium tenuiflorum*[J]. *Nat Prod Res*, 2009, 23(8): 781.
- [9] 康伟松, 程辟, 曾建国. 血根碱、白屈菜红碱离子对化合物的体外抗菌活性研究[J]. *中南药学*, 2014, 12(5): 406.
- [10] 徐丽, 曾建国, 程辟, 等. 血根碱-黄芩苷、白屈菜红碱-黄芩苷离子对化合物体外抗菌活性和急性毒性研究[J]. *中*
- 南药学, 2012, 10(1): 10.
- [11] 杨元娟, 杨元梅, 夏之宁. 板蓝根注射液抗菌活性的研究[J]. *中国医药指南*, 2008, 6(10): 19.
- [12] Ferrándiz ML, Gil B, Sanz MJ, et al. Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48(9): 975.
- [13] 吴疆, 魏巍, 袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 217.
- [14] 曹金一, 刘京晶, 黄文华, 等. 补骨脂药理作用与临床应用研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(6): 89.

* 副主任药师, 博士。研究方向: 医院药学。电话: 0595-28299781。E-mail: 1074730795@qq.com

(收稿日期: 2016-05-10 修回日期: 2016-09-12)
(编辑: 刘明伟)