

文章编号: 1674-8085(2018)04-0076-05

半枝莲抗菌活性及其有效部位研究

郑丽娟, 刘 兵, 彭姣阳, 谭雨琪, *宋明霞

(井冈山大学医学院, 江西, 吉安 343009)

摘 要: **目的** 研究半枝莲不同粗提物的体外抗菌活性, 并初步确定其抗菌活性有效部位。 **方法** 采用甲醇冷浸法、乙醇热回流法及微波萃取法提取粗提物, 96 孔板培养法测定不同粗提物对的体外抑菌活性; 将提取物分别用石油醚、乙酸乙酯和水萃取得到不同极性的萃取物组分, 通过比较其抑菌活性初步确定半枝莲的抗菌有效部位。

结果 三种提取方法中, 微波萃取法浸膏得出率最高; 半枝莲的各粗提物对普通菌在 2 mg/mL 下未见抑制活性, 但对耐甲氧西林金葡菌(ATCC 33591 和 43300)半数抑制浓度(MIC 值)达到 2 mg/mL; 粗提物的萃取组分尤其是乙酸乙酯相, 表现出广谱抗菌活性, 其对各种菌株的半数抑制浓度大多在 0.5~2 mg/mL 范围, 石油醚相对变异链球菌的抑菌活性较强, MIC 值达到 0.125 mg/mL。 **结论** 半枝莲具有广谱的抗菌活性, 尤其是对耐药菌表现出较好的抗菌活性, 并且初步确定抗菌有效部位为乙酸乙酯相, 这为半枝莲抗菌应用的下一步研究奠定了基础。

关键词: 半枝莲; 粗提物; 抗菌活性; 耐药菌; 有效部位

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2018.04.013

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND ACTIVE FRACTION OF *SCUTELLARIA BARBATA*

ZHENG Li-juan, LIU Bing, PENG Jiao-yang, TAN Yu-qi, *SONG Ming-xia

(School of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract **Objective:** To research the antibacterial activity of different crude extracts of *Scutellaria barbata* *in vitro* and determine its antibacterial fraction. **Methods:** The crude extracts were extracted by methanol cold leaching, ethanol thermal reflux and microwave extraction. The antibacterial activity of different crude extract pairs were determined by 96-well plate culture method. The extracts were suspended in water and extracted by petroleum ether and ethyl acetate in sequence. The extracts with different polarities were obtained and the antibacterial activity of these fractions was preliminarily determined to emerge the antibacterial fraction. **Results:** Among the three extraction methods, the extraction rate of microwave extraction was the highest; the crude extracts of *S. barbata* had no inhibitory activity against common bacteria at 2 mg/mL, but be effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 and 43300) with a half inhibitory concentration (MIC value) of 2 mg/mL. The extract components of the crude extract, especially the ethyl acetate phase, exhibited a broad-spectrum antibacterial activity, and its MIC value against various strains were mostly ranged from 0.5 to 2 mg/mL. The petroleum ether fraction showed excellent antibacterial activity against *Streptococcus mutans* with the MIC value of 0.125 mg/mL. **Conclusion:** *S. barbata* has broad-spectrum

收稿日期: 2018-03-05; 修改日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560561)

作者简介: 郑丽娟(1980-), 女, 江西吉安人, 实验师, 硕士, 主要从事天然产物的提取与活性筛选(E-mail: 690109174@qq.com);

刘 兵(1966-), 女, 江西吉安人, 实验师, 主要从事天然产物的提取与活性筛选(E-mail: 1277544374@qq.com);

彭姣阳(1997-), 女, 湖南邵东人, 井冈山大学医学部药学专业 2015 级本科生(E-mail: 1019454417@qq.com);

谭雨琪(1997-), 女, 湖南株洲人, 井冈山大学医学部药学专业 2015 级本科生(E-mail: 1368171129@qq.com);

*宋明霞(1983-), 女, 山西介休人, 副教授, 博士, 主要从事抗菌化合物的设计、合成及其活性研究(E-mail: freexiaoxiao83@aliyun.com)

antibacterial activity, especially against resistant bacteria, and it is preliminarily confirmed that the effective antibacterial fraction is ethyl acetate phase. This work lays a foundation for the next step of antibacterial application of *S. barbata*.

Key words: *Scutellaria barbata*; crude extract; antibacterial activity; drug-resistant bacteria; active fraction

自发现青霉素以来,人类在对抗细菌感染方面取得了重大的突破,许多严重的细菌感染性疾病都得到了有效的控制与治疗。然而,随着近年来对抗生素的不合理使用导致耐药菌的不断增加,甚至出现对多种药物都耐受的多重耐药菌,迫使我们必须以新的思路和新的理念开辟抗细菌性感染治疗的新方法和新途径^[1-4]。中草药作为天然来源的物质,几千年来为人类在预防和控制细菌性感染方面发挥了积极作用,故从天然药物中寻找高效低毒的抗菌药物将会是解决细菌耐药的新途径^[5-7]。

半枝莲(*Scutellaria barbata* D.Don)为唇形科植物的干燥全草,味辛、苦,性寒,具有清热解毒、化瘀止痛的功效。它的主要成分为黄酮^[8-11],而有文献^[12-14]研究证实了黄酮类化合物对于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有明显的抑制作用,并广泛用于抗菌药物的研究。现代药理研究^[15-16]表明半枝莲的粗提物及其有效部位、有效单体具有抗突变、抗炎症、解热、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多方面的药理活性,且半枝莲作为临床上的常用药,已广泛用于抗肿瘤、降压及消炎等方面,但目前对于它在抗菌方面^[17-19]的研究甚少。

本实验拟研究其抗菌活性,基于半枝莲的主要成分和物质基础,对其抗菌活性部位进行追踪,初步获得其有效部位,比较不同提取方式对抗菌活性成分的提取优劣,从而确定半枝莲最有效的提取方式,为后续抑菌中药的开发及应用研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SSW-420-2S 型电热恒温水槽(上海博讯有限公司),WT30001B 电子天平(常州万泰天平仪器有限公司),ZNHW 型电热套(上海羌强仪器设备有限公司),MAS-II 微波提取器(上海新仪微波化学科技有限公司),旋转蒸发器 RE-3000(上海亚荣生化仪器厂),DHG-9075A 电热鼓风干燥箱(上海

一恒科学仪器有限公司),iMark 酶标仪(美国伯乐公司),ST2100 实验室 PH 计(奥豪斯仪器(常州)有限公司),SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(普通型,苏州净化设备有限公司),HZQ-F100 全温振荡培养箱(江苏太仓市华美生化仪器厂),GRP-9080 隔水式恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司),KXQ-LS 高压灭菌仪(上海博讯有限公司)。

1.2 试剂与材料

半枝莲(购自江西樟树药材市场,经井冈山大学药学系梁兆昌教授鉴定为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* 的干燥全草),G116212 甘油(阿拉丁试剂公司,500 mL),CM1135 BRAIN HEART INFUSION(BHI)(英国 OXOID 公司,500g makes 13.5 litres),CM1168 NUTRIENT BROTH(英国 OXOID 公司,500g makes 38.4 litres),TRYPTONE SOYA BROTH(TSB)(英国 OXOID 公司),二甲亚砜(国药集团化学试剂有限公司,分析纯 AR 500 mL);金葡菌 CMCC(B) 26003、金葡菌 CMCC 25923、枯草芽孢杆菌 CMCC 63501、粪肠球菌 CMCC 29212、变异链球菌 BNCC 336931、大肠杆菌 CMCC 44568、大肠杆菌 CMCC 25922、铜绿假单胞菌 CMCC 10104、铜绿假单胞菌 CMCC 27853、金葡菌 ATCC 33591、金葡菌 ATCC 43300、铜绿假单胞菌 ATCC BAA-2111、大肠杆菌 ATCC BAA-196,以上菌种购自中国科学院微生物研究所与北纳生物科技有限公司。

2 方法

2.1 半枝莲不同溶剂提取物的制备

2.1.1 甲醇冷浸法

称取半枝莲粉末 50 g,用 70%的甲醇按料液比 1:10 (m/v) 浸泡 24 h,滤渣依次再用 1:10 (m/v) 的 90%甲醇溶液浸提,连续 3 次,合并 3 次滤液减压浓缩成浸膏,回收甲醇。称取 0.1 g 甲醇冷浸所

得浸膏于离心管中备用,将剩余浸膏按 1:10 (m/v) 溶于水中,再分别用 1:20 (m/v) 料液比的石油醚、乙酸乙酯萃取三次,合并萃取液,得石油醚相萃取物、乙酸乙酯相萃取物、水相萃取物,浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[17-19]。

2.1.2 乙醇热回流法

称取半枝莲粉末 50 g,用 70%的乙醇按料液比 1:10 (m/v) 于圆底烧瓶中加热回流每次 1 h,过滤,滤渣依次再用 1:10 (m/v) 的 70%乙醇溶液加热回流 1 h,连续 3 次,合并 3 次滤液减压浓缩得浸膏,回收乙醇。称取 0.1 g 乙醇加热回流所得浸膏于离心管中备用,将剩余浸膏按 1:10 (m/v) 溶于水中,分别用 1:20 (m/v) 料液比的石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次,获得石油醚相萃取物、乙酸乙酯相萃取物、水相萃取物,浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[20-21]。

2.1.3 微波萃取法

称取半枝莲粉末 50 g,使用微波合成仪用 70%的乙醇按料液比 1:10 (m/v),微波功率 400 W,温度 60 °C 条件萃取 10 min,稍冷,过滤,滤渣再通过 1:10 (m/v) 的 70%乙醇溶液按微波功率 400 W,温度 70 °C 条件进行微波萃取 30 min,连续两次,合并三次滤液减压浓缩得浸膏,回收乙醇。称取 0.1 g 浸膏于离心管中备用,将剩余浸膏按 1:10 (m/v) 溶于水中,分别用 1:20 (m/v) 料液比的石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次,获得石油醚相萃取物、乙酸乙酯相萃取物、水相萃取物,浓缩溶剂后得到各自的浸膏^[12]。

2.2 抗菌实验

2.2.1 待测物的处理

将三种提取方法所得的 0.1 g 粗提浸膏,石油醚相萃取物、乙酸乙酯相萃取物、水相萃取物浸膏作为抗菌实验对象溶解于 1.0 mL 二甲基亚砷 (DMSO) 中,得菌液浓度为 0.1 g/mL,4 °C 保存备用。

2.2.2 菌液制备

将金葡菌 CMCC(B) 26003、金葡菌 CMCC 25923、枯草芽孢杆菌 CMCC 63501、粪肠球菌 CMCC 29212、变异链球菌 BNCC 336931,大肠杆菌 CMCC 44568、大肠杆菌 CMCC 25922、铜绿假单胞菌 CMCC 10104、铜绿假单胞菌 CMCC 27853 以及金葡菌 ATCC 33591、金葡菌 ATCC 43300、铜

绿假单胞菌 ATCC BAA-2111、大肠杆菌 ATCC BAA-196 按 1:1000 接种于 Mueller-Hinton broth (MHB) 或者 Tryptone Soya Broth (TSB) 或者 Brain Heart Infusion(BHI)培养液中 37 °C 条件下摇瓶培养 24 h,取菌落用培养液稀释成 10^5 CFU/mL。

2.2.3 化合物 MIC 值的测定

2.2.3.1 初筛

在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 培养液、4 μ L 化合物和 100 μ L 菌液,得化合物浓度为 2 mg/mL,在 37 °C 下培养 24 h,使用酶标仪测量在 630 nm 下培养前后的吸光度,根据吸光度的变化计算得到抑制率。若化合物抑制率大于 75%,则选出进行后续实验。

2.2.3.2 连续稀释

将选出的化合物通过连续稀释法获得一系列浓度 1~7.8 μ g/mL,在 37 °C 下培养 24 h,使用酶标仪测量在 630 nm 下培养前后的吸光度,根据吸光度的变化计算得到最低抑菌浓度即 MIC 值(抑制率超过 75%的最小浓度为最低杀菌浓度,即 MIC 值)。

$$\text{抑制率} = 1 - \Delta\lambda / \Delta\lambda_{\text{空白}} \quad (1)$$

注: $\Delta\lambda$ =培养后每组数据的平均值—培养前每组数据的平均值; $\Delta\lambda_{\text{空白}}$ =培养后空白组的平均值—培养前空白组的平均值

3 结果与讨论

3.1 三种提取方法提取率比较

表 1 三种提取方法的提取率比较 (%) a

Table 1 Comparison of extraction rates for three extraction methods (%)

萃取部位	甲醇冷浸法	乙醇回流法	微波萃取法
粗提取物	19.14	23.34	27.96
石油醚萃取物	0.2	0.26	0.38
乙酸乙酯萃取物	1.04	1.7	4.00
水萃取物	12.92	19.68	14.88

a 提取率 = 浸膏质量/提取所用药材粉末质量*100%

如表 1 所示,通过比较三种提取方式,微波萃取的提取率要明显高于甲醇冷浸法和乙醇回流法的提取率。这表明对于半枝莲,微波萃取法是一种高效的提取方法。微波萃取时,高频电磁波可以穿透萃取介质到达被萃取物料的内部,使得细胞内部的温度快速升高,当细胞内部的压力达到某一零界点时,细胞就会破裂,有效成分流出并溶解于萃取介质。

3.2 三种提取方法所得粗提物抑菌活性比较

表 2 甲醇冷浸法、乙醇回流法和微波萃取法所得粗提物抑菌活性比较 (MIC 值, mg/mL)

Table 2 Comparison of antibacterial activity of crude extracts obtained by cold methanol leaching, ethanol refluxing and microwave extraction

菌株	甲醇	乙醇	微波
	冷浸法	回流法	萃取法
金葡菌 CMCC(B) 26003	> 2	> 2	> 2
金葡菌 CMCC 25923	> 2	> 2	> 2
枯草芽孢杆菌 CMCC 63501	> 2	> 2	> 2
粪肠球菌 CMCC 29212	> 2	> 2	> 2
变异链球菌 BNCC 336931	> 2	> 2	> 2
大肠杆菌 CMCC 44568	> 2	> 2	> 2
大肠杆菌 CMCC 25922	> 2	> 2	> 2
铜绿假单胞菌 CMCC 10104	> 2	> 2	> 2
铜绿假单胞菌 CMCC 27853	> 2	> 2	> 2
金葡菌 ATCC 33591	2	2	2
金葡菌 ATCC 43300	2	2	2
铜绿假单胞菌 ATCC BAA-2111	> 2	> 2	> 2
大肠杆菌 ATCC BAA-196	> 2	> 2	> 2

如表 2 所示,在三种提取方式所得的粗提物中,在 2 mg/mL 浓度下半枝莲对大部分的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌未显示出抗菌活性,而对于耐药金葡菌,则表现出一定的活性。

3.3 三种粗提物不同溶剂萃取物抗菌活性比较

表 3 三种粗提物不同溶剂萃取物对革兰氏阴性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

Table 3 Antibacterial activity of three different crude extracts against Gram-negative bacteria

提取方法	萃取物	大肠杆菌 44568	大肠杆菌 25922	大肠杆菌 25922	铜绿假单胞菌 27853
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	> 2	> 2	> 2	2
	乙酸乙酯萃取物	2	2	2	1
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2
	乙酸乙酯萃取物	> 2	> 2	2	0.5
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2
微波萃取法	石油醚萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2
	乙酸乙酯萃取物	> 2	2	2	1
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2

通过将三种提取方式所得粗提物依次进行石油醚和乙酸乙酯萃取,分别得到石油醚相、乙酸乙

酯相和水相 9 个萃取组分。如表 3 所示,乙酸乙酯相萃取物对革兰氏阴性菌的抗菌活性明显优于石油醚相萃取物和水相萃取物的抗菌活性;三种提取方式所得的乙酸乙酯相萃取物均对于革兰氏阴性菌具有较好的抑菌活性,且对铜绿假单胞 CMCC 27853 的抑菌活性最好,通过乙醇回流法所得乙醇乙酸乙酯相的萃取物的抑菌浓度为 0.5 mg/mL。

表 4 三种粗提物不同溶剂萃取物对革兰氏阳性菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

Table 4 Antibacterial activity of three different crude extracts against Gram-positive bacteria

提取方法	萃取物	金葡菌 26003	金葡菌 25923	枯草芽孢杆菌 63501	粪肠球菌 29212	变异链球菌 336931
		26003	25923	63501	29212	336931
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	> 2	2	> 2	> 2	0.25
	乙酸乙酯萃取物	1	2	2	2	2
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2	2	> 2	> 2	1
	乙酸乙酯萃取物	> 2	2	1	> 2	> 2
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
微波萃取法	石油醚萃取物	> 2	2	> 2	> 2	0.125
	乙酸乙酯萃取物	> 2	2	> 2	> 2	> 2
	水萃取物	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2

9 个萃取组分对革兰氏阳性菌的抗菌活性也被测定。由表 4 可知,不同粗提物对于革兰氏阳性菌都具有一定的抑菌活性,同样以乙酸乙酯相萃取物对各革兰氏阳性菌的抑菌活性最好,对大部分菌株的 MIC 值达到 2 mg/mL。此外,甲醇冷浸法和微波萃取法所得的石油醚萃取物对变异链球菌表现出了较强的抑菌活性,微波萃取法所得的石油醚相萃取物的抑菌浓度可达 0.125 mg/mL。

表 5 三种粗提物不同溶剂萃取物对耐药菌的抗菌活性 MIC 值 (mg/mL)

Table 5 Antibacterial activity of different extracts of three crude extracts against resistant bacteria MIC value

提取方法	萃取物	金黄色葡萄球菌 33591	金黄色葡萄球菌 43300	铜绿假单胞菌 BAA-2111
甲醇冷浸法	石油醚萃取物	2	2	> 2
	乙酸乙酯萃取物	0.5	1	> 2
	水萃取物	2	> 2	> 2
乙醇回流法	石油醚萃取物	> 2	> 2	> 2
	乙酸乙酯萃取物	2	1	> 2
	水萃取物	2	2	> 2
微波萃取法	石油醚萃取物	2	2	> 2
	乙酸乙酯萃取物	2	2	2
	水萃取物	2	2	> 2

除了临床常见普通菌株,耐药菌的抗菌活性也被测定。如表5所示,各粗提物对于耐药细菌具有普遍抑菌效果,抑菌浓度普遍达到2 mg/mL,且对耐药革兰氏阳性菌的抑菌活性强于对耐药革兰氏阴性菌的抑菌活性,其中以对耐药金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好,甲醇冷浸法所得的乙酸乙酯相萃取物的抑菌浓度为0.5 mg/mL。

4 小结

半枝莲作为临床上常用的中草药,其在抗高血压和抗肿瘤方面具有开阔的研发前景。通过研究半枝莲在拓宽方面的作用,不仅促进了半枝莲全面开发,也拓宽了中草药抗菌的途径。通过上述实验,发现半枝莲对于普通革兰氏阳性菌,革兰氏阴性菌及耐药菌都有很好的抑菌活性,尤其以对耐药金葡萄菌具有较明显的抑菌效果。而从提取方法而言,半枝莲微波萃取法提取效率最高。通过比较不同部位的抗菌活性,确定了乙酸乙酯相为抗菌活性部位,说明抗菌有效成分大多分布在该相,这之前文献报道的黄酮类化合物为半枝莲的抗菌活性组分是吻合的。此外,实验过程中发现,采用不同的提取方法,即使是相同的萃取部位,对某一种细菌也表现出不同的抗菌活性。如乙醇回流法与甲醇冷浸法获得的乙酸乙酯层,其对抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC 33591 的 MIC 值分别是 2.0、0.5 mg/mL,这说明不同的提取方法获得的有效成分具有一定差异。总之,通过以上研究为半枝莲在抗菌应用方面奠定了一定基础。

参考文献:

- [1] 崔煦然,赵京霞,郭玉红,等. 细菌耐药背景下中药抗菌作用研究进展[J].世界中医药,2016,11(10): 1940-1944.
- [2] 张民. 细菌耐药背景下的中药抗菌作用探析[J].西部中医药,2013,26(6):122-124.
- [3] 战旗,王蕊,李爽,等. 中药抗菌作用研究现状[J].山东中医杂志,2014,33(8):697-698.
- [4] 蔡燕,邢艳,谢文光. 中药抗菌作用研究进展[J].中国医药导报,2011,8(6):9-10.
- [5] 方有仪. 中药抗菌作用研究进展[J].中兽医医药杂志,2012,31(5):20-21.
- [6] 殷建玲. 中药抗菌研究进展[J].北方药学,2014,11(4): 111.
- [7] 曾春兰,钟振国. 中药抗菌作用的研究进展[J].广西中医学院学报,2006,9(1):51-53.
- [8] 任强. 半枝莲化学成分及药理作用研究进展[J].济宁医学院学报,2014,37(3):157-161.
- [9] 刘婷,王晓妍,曹志群. 半枝莲药理作用及临床应用研究进展[J].河南中医,2013,33(3):424-426.
- [10] 林靖怡,刘韶松,明艳林. 半枝莲化学成分及药理活性研究进展(综述)[J].亚热带植物科学,2015,44(1):77-82.
- [11] 郑永红,韦晓瑜,龙继红. 半枝莲的研究进展[J].中草药,2010,41(8):1406-1408.
- [12] 杨连梅,刘量,胡荣,等. 半枝莲化学成分的提取和含量测定方法研究[J].江苏中医药,2010,42(2):78-80.
- [13] 戴一,宋祖荣,李静. 冬凌草茶中多糖、总黄酮及冬凌草甲素浸出特性研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2015,36(3):90-98.
- [14] 许瑞波,杨雯雯,万蓓蓓. 连云港山楂叶黄酮的超声提取及体外活性研究[J].井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(6):24-29.
- [15] 蔡震峰,任凤莲,申定珠,等. 中草药半枝莲的研究进展[J].广州化学,2006,31(4):55-60.
- [16] 肖海涛,李锐. 半枝莲化学成分和药理活性研究进展[J].中药研究与信息,2005,7(4):20-22+25.
- [17] 傅若秋,余琼,孟德胜,等. 21 种中草药提取物对 MRSA 的抗菌作用研究[J].中国药房,2011, 22(43): 4056-4058.
- [18] 金航. 从生药成分中开发抗 MRSA 感染的药物:关于半枝莲的抗菌活性成分[J].国外医学(中医中药分册),1998, 20(2):46-47.
- [19] 尹璐,胡仁火,丘日光,等. 7 种中草药醇提取物抑菌杀菌作用的研究[J].安徽农业科学,2014,42(28): 9722-9724.
- [20] 刘英勃. 半枝莲提取工艺及化学成分研究[D]. 北京:首都师范大学,2005.
- [21] 陈建福,林洵,林萍萍,等. 响应面法优化白兰叶总黄酮的提取工艺研究[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(6):30-35.