

广防风体外抑菌活性及其稳定性研究

林大都^{1,2}, 张宽云¹, 张莹³, 罗晓东¹, 张声源^{1,2*}, 张鲁斌^{1,2}

(1. 嘉应学院, 广东 梅州 514031; 2. 广东省山区特色农业资源保护与精准利用重点实验室, 广东 梅州 514031; 3. 广州中医药大学青蒿研究中心, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 研究广防风体外抑菌活性及其稳定性。方法 采用K-B纸片法测定乙醇提取物、水提取物、不同极性部位对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、宋内志贺菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌的抑制作用, 测定最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC), 考察pH、紫外线、金属离子对正丁醇部位抑菌稳定性的影响。结果 不同样品对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有不同程度的抑制作用, 以正丁醇部位更明显。正丁醇部位抑菌活性在紫外照射下具有良好的稳定性, 在碱性条件下增强($P<0.01$), K^+ 、 Na^+ 、 Fe^{3+} 条件下减弱($P<0.01$)。结论 广防风正丁醇提取物有一定的体外抑菌活性, 本实验可为该药材进一步开发利用提供科学依据。

关键词: 广防风; 体外抑菌活性; 稳定性

中图分类号: R282

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0605-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.052

广防风 *Anisomeles indica* (L.) Kuntze 为唇形科广防风属植物, 又名防风草、土防风、抹草等^[1], 民间以全草入药, 常用于治疗皮肤湿疹^[2]、瘙痒、癞疮、毒虫咬伤^[3], 含有挥发油、生物碱、黄酮、降倍半萜、二萜、三萜、黄酮苷、苯乙醇苷类等化合物^[4], 具有抗炎抗氧化、镇痛、抗病毒等药理活性^[5-8], 但其抑菌活性鲜有报道。因此, 本实验采用K-B纸片法考察广防风乙醇提取物、水提取物、不同极性部位对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、宋内志贺菌的抑制作用, 微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(MIC), 琼脂培养基平板法测定最低杀菌浓度(MBC), 并探讨其抑菌稳定性的影响因素, 以期为该药材后期开发利用提供科学参考。

1 材料

1.1 仪器 BSC-1100Ⅱ A2 超净工作台(济南鑫贝西生物技术有限公司); WGZ-XT 细菌浊度仪(杭州齐威仪器有限公司); FA7004 电子天平(上海天美天平仪器有限公司); DH-9162B 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); WFH-203B 三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司); PHSJ-4A 实验室 PH 计(上海精密科学仪器有限公司); RT-6000 酶标分析仪(深圳雷社生命科学股份有限公司)。

收稿日期: 2020-11-01

基金项目: 国家中医药管理局全国中药资源普查项目(GZY-KJS-2018-004); 2018年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社〔2018〕43, 财社〔2019〕39); 广东省高等教育“冲补强”提升计划重点建设学科(农业资源与环境)建设项目(粤教科函〔2018〕181); 2019广东省中医药局中药资源普查专项(20196011); 梅州市医药卫生科研项目(2019-B-14); 嘉应学院科研项目(2018KJM04)

作者简介: 林大都(1988—), 男, 硕士, 讲师, 从事天然药物化学及中药资源开发研究。Tel: (0753) 2200262, E-mail: 2016387980@qq.com

*通信作者: 张声源(1983—), 男, 博士, 副教授, 从事天然产物研究与开发工作。Tel: (0753) 2200262

1.2 试剂与药物 广防风(地上部分)采自广东省梅州市大埔县高陂镇五家村, 经嘉应学院医学院翟明讲师鉴定为唇形科广防风属植物广防风 *Anisomeles indica* (L.) Kuntze, 晒干后粉碎。95%乙醇(批号2006051)、石油醚(批号2008051)、乙酸乙酯(批号1901011)、正丁醇(批号2008051)、丙酮(批号2011021)、盐酸(批号0804131)等为分析纯, 均购自西陇化工股份有限公司; 氢氧化钠(批号20170103)、氯化钾(批号20180103)、氯化铁(批号20180102)、氯化钠(批号20180107)均购自天津市福晨化工试剂厂。普通琼脂培养基(批号20180907)、肉汤液体培养基(批号20180903)均购自江门凯林贸易生物公司。

1.3 菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC-25923)、枯草芽孢杆菌(ATCC-6633)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(ATCC-43300)、宋内志贺菌(ATCC-25931)、大肠埃希菌(ATCC-25922)、表皮葡萄球菌(ATCC-12228)均由嘉应学院医学院微生物实验室提供。

2 方法

2.1 供试液制备 取药材粗粉80g, 加800mL蒸馏水煎煮30min, 滤过, 滤渣重复上述操作2次, 合并滤液, 减压浓缩得到水提取物(6.5g)。

另取药材粗粉1kg, 加10L95%乙醇超声提取30min,

抽滤得滤液，滤渣重复上述操作2次，合并滤液，减压浓缩得到乙醇提取物(108.1g)。取100.4g，加适量蒸馏水超声形成混悬液，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次，减压浓缩，分别得到石油醚部位(13.6g)、乙酸乙酯部位(5.5g)、正丁醇部位(10.2g)、水部位(59.1g)。

将上述提取物及不同极性部位用50%丙酮超声溶解，制成质量浓度为100mg/mL(以提取物计)的药液，0.22μm滤膜过滤除菌，即得。

2.2 细菌培养及菌液配制 参考文献[9]报道，将金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、宋内志贺菌从斜面培养基上挑出长势良好者，置于无菌液体培养基中振摇均匀，在37℃培养箱中培养18~24h，采用麦氏比浊仪测定菌悬液浓度，并调整为0.5麦氏点，细菌密度约为 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ cfu/mL。

2.3 抑菌活性测定 采用K-B法^[10-11]，将无菌直径为6mm的滤纸片分别浸泡于“2.1”项下供试液及50%丙酮(对照)中30~60min，取出晾干。取100μL“2.2”项下菌悬液，注到琼脂平板上，无菌棉签涂布均匀，平铺于平板中，以亚胺培南为阳性对照，室温下静置30min后置于37℃恒温培养箱中培养18~24h，测定抑菌圈直径，平行3次，取平均值。

2.4 MIC、MBC测定 采用微量肉汤稀释法^[12]测定MIC。取96孔微量板，第2~11孔加入100μL肉汤液体培养基，第12孔加入肉汤液体培养基200μL，留作不加药液和菌液的正常生长对照。将100μL药液加至第1、2孔，吹打均匀后从第2孔转移100μL至第3孔吹打均匀，以此类推，依次递倍稀释，至第10孔吹打均匀后弃100μL，第11孔作阴性对照。最后吸取100μL菌悬液依次加入第1~11孔，振荡混匀，置于37℃恒温培养箱中培养18~24h后观察生长情况，以培养基澄清透明或无沉淀为无菌生长，无菌生长试验孔中的最低生药浓度即为MIC。

取上述96孔微量板，从每个无菌生长孔中吸取100μL培养液至普通琼脂培养基上，置于37℃恒温培养箱中培养18~24h，平均菌落数小于5个所对应孔的药物浓度即为MBC^[13]。

2.5 正丁醇部位抑菌稳定性评价

2.5.1 pH值 参考文献[14]报道，用1mol/LHCl或NaOH溶液分别调节100mg/mL正丁醇供试液pH至1、3、5、7、9、11、13，以未经处理的供试液为对照，按

“2.3”项下法测定抑菌活性。

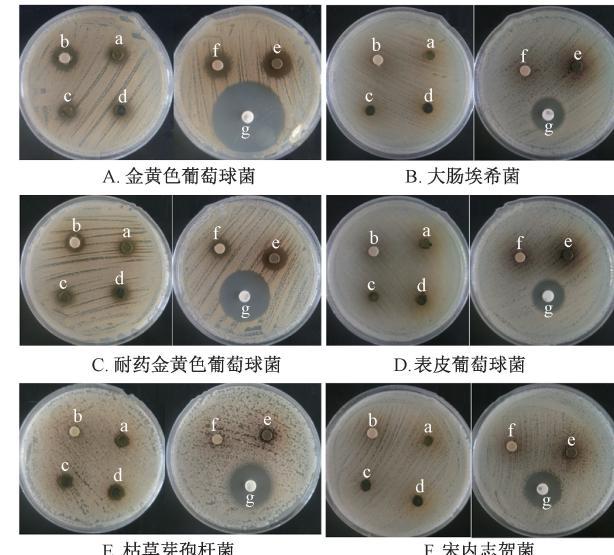
2.5.2 紫外光照射时间 参考文献[15]报道，将100mg/mL正丁醇供试液在紫外光下照射5、10、15、20、25、30、60min，以未经处理的正丁醇供试液为对照，按“2.3”项下法测定抑菌活性。

2.5.3 金属离子种类 参考文献[16]报道，在100mg/mL正丁醇供试液中分别加入氯化钠、氯化钾和氯化铁，配制成含0.05mol/L Na⁺、K⁺、Fe³⁺的混合液，静置3h，以未经处理的正丁醇供试液作为对照，按“2.3”项下法测定抑菌活性。

2.6 统计学分析 通过SPSS 22.0软件进行处理，结果以($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用ANOVA单因素方差分析、Duncan多重比较检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 抑菌活性 图1、表1显示，乙醇提取物、水提取物、不同极性部位对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌均表现出不同程度的抑制作用，其中正丁醇部位最强；水提取物、水部位对枯草芽孢杆菌的抑制作用不明显，而其他供试液均表现出一定活性，强弱依次为乙酸乙酯部位>石油醚部位>正丁醇部位>乙醇提取物；所有供试液对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、宋内志贺菌均无明显抑制作用。



注：a~g分别为乙醇提取物、水提取物、石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位、水层部位、亚胺培南。

图1 各供试液对供试菌的抑制作用

表1 各供试液对供试菌的抑菌圈直径(mm, $\bar{x}\pm s$)

供试液	金黄色葡萄球菌	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌	表皮葡萄球菌	宋内志贺菌
乙醇提取物	10.67±0.34	9.54±0.79	8.07±0.41	—	—	—
水提取物	14.69±0.91	11.48±0.26	—	—	—	—
石油醚部位	10.71±0.57	9.35±0.82	9.32±0.85	—	—	—
乙酸乙酯部位	9.87±0.35	9.98±0.62	9.63±0.26	—	—	—
正丁醇部位	17.54±1.50	14.94±0.36	8.68±0.27	—	—	—
水部位	14.30±0.37	11.08±0.56	—	—	—	—
亚胺培南	39.26±2.02	29.14±1.20	25.76±1.81	16.84±0.94	17.16±1.90	18.12±2.09
50%丙酮	—	—	—	—	—	—

注：所有数据都包括6.00mm的滤纸片直径，—表示无抑菌圈。

3.2 MIC、MBC 表2显示,乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的MIC在1.56~3.12 mg/mL之间,MBC为6.25 mg/mL,均优于水提取物,但对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌和宋内志贺菌的抑制作用均不理想;正丁醇部位对金黄色葡萄球菌的抑制作用最

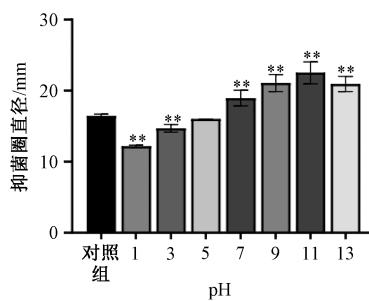
强,其次是石油醚部位;正丁醇、石油醚部位对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑制作用最强,其次是乙酸乙酯部位;各供试液对枯草芽孢杆菌的抑制作用依次为乙酸乙酯部位>石油醚部位>正丁醇部位>水部位;各供试液对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、宋内志贺菌的抑制作用均不理想。

表2 各供试液 MIC、MBC 测定结果 (mg/mL)

供试液		金黄色葡萄球菌	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	大肠埃希菌	表皮葡萄球菌	宋内志贺菌
乙醇提取物	MIC	3.12	3.12	1.56	>50.00	>50.00	>50.00
	MBC	6.25	6.25	6.25	>50.00	>50.00	>50.00
水提取物	MIC	12.50	12.50	25.00	50.00	50.00	>50.00
	MBC	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00	>50.00
石油醚部位	MIC	1.56	1.56	0.78	50.00	25.00	>50.00
	MBC	6.25	6.25	6.25	>50.00	>50.00	>50.00
乙酸乙酯部位	MIC	3.12	3.12	0.78	50.00	50.00	50.00
	MBC	3.12	6.25	3.12	50.00	50.00	50.00
正丁醇部位	MIC	0.78	1.56	12.50	50.00	50.00	50.00
	MBC	1.56	6.25	12.50	>50.00	50.00	50.00
水部位	MIC	25.00	25.00	50.00	50.00	50.00	50.00
	MBC	>50.00	>50.00	50.00	50.00	50.00	50.00

3.3 正丁醇部位抑菌稳定性(金黄色葡萄球菌)

3.3.1 pH值 图2显示,除pH为5外,pH为7、9、11、13时的抑菌圈直径大于对照组($P<0.01$),为11时最强,并且抑制作用随着其数值降低而有所下降,这可能是由于在酸性条件下正丁醇部位活性成分发生变化或与酸性成分发生反应而被破坏所致。因此,正丁醇部位在碱性条件下能更好地发挥作用。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

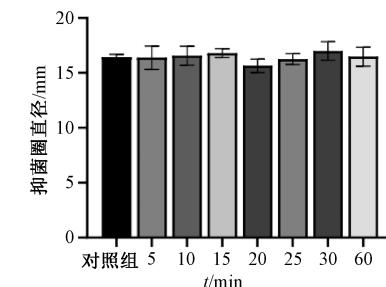
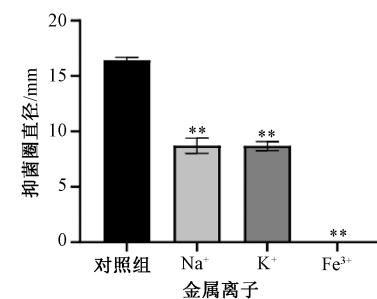
图2 pH对正丁醇部位抑菌稳定性的影响 ($n=3$)

3.3.2 紫外光照射时间 图3显示,紫外光照射不同时间后对正丁醇部位的抑菌活性均无明显影响($P>0.05$),表明抑菌活性成分对紫外光稳定。

3.3.3 金属离子种类 图4显示,在金属离子存在的情况下正丁醇部位抑菌活性均受到不同程度的抑制($P<0.01$),其中 Fe^{3+} 最明显,其原因可能是金属离子与活性成分发生反应所致。

4 讨论

前期报道,从广防风中分离得到的ovatodiolide具有明确的抗幽门螺杆菌活性,表明该药材在抑菌方面具有一定的研究意义^[17]。本实验发现,广防风乙醇提取物、水提取物、不同极性部位均对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌有一定的抑制作用,以正丁醇部位更明显;除

图3 紫外光照射时间对正丁醇部位抑菌稳定性的影响 ($n=3$)

注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图4 金属离子种类对正丁醇部位抑菌稳定性的影响 ($n=3$)

了水提取物和水部位外,各样品对枯草芽孢杆菌也有效果。同时,稳定性试验结果表明,紫外灯照射对广防风正丁醇部位体外抑菌活性的影响较小,在碱性条件下能显著提高其活性,而金属离子的存在一定程度上抑制其活性,表明活性成分能与碱和金属离子发生反应,导致活性增减影响。广防风中酚酸、苯乙醇苷、黄酮苷是主要大极性成分^[4],均具有较强的抗菌活性^[18-20],这与其正丁醇部位表现出较强的体外抑菌活性有一定相关性。整体而言,广防风在抑菌方面具有不错的开发利用前景,后期可通过其他抑菌试验来扩大其抗菌谱,尤其是对皮肤癣菌的抑制作用,并且

其正丁醇部位可进行更深入的抑菌相关研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志(第六十六卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977; 41-42.
- [2] Kao M T. Popular herbal remedies of Taiwan [M]. Taipei: SMS Publishing Inc, 1985; 91.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977; 988.
- [4] 陈彩华. 广防风地上部分的化学成分研究 [D]. 烟台: 鲁东大学, 2016.
- [5] Lien H M, Wang C Y, Chang H Y, et al. Bioevaluation of *Anisomeles indica* extracts and their inhibitory effects on *Helicobacter pylori*-mediated inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 397-401.
- [6] Maqbool M, Umar M, Iqbal M, et al. In vitro assessment of antioxidant activity of *Anisomeles indica* [J]. *Int J Biochem*, 2016, 14(4): 1-7.
- [7] Rao Y K, Fang S H, Hsieh S C, et al. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(2): 292-296.
- [8] Acebey-Castellon I L, Voutquenne-Nazabadioko L, Doan Thi Mai H, et al. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(2): 163-168.
- [9] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008; 7-12.
- [10] 杜银香, 张建伟, 胡泽华, 等. 华中枸骨叶总黄酮超声提取工艺的优化及其抑菌作用 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2200-2203.
- [11] 马文兵, 李红鹏. 连翘叶体外抑菌作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 379-380.
- [12] 肖倩, 王展强, 吴行贵, 等. 黄芪、穿心莲单独或与抗菌肽 LL-37 联合应用对铜绿假单胞菌生物膜的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(4): 562-568.
- [13] 曾红. 茼蒿子挥发油抗真菌活性及其作用机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [14] 赵磊, 林文轩, 迟茜, 等. 甜叶菊废渣提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究 [J]. 食品工业科技, 2016, 37(24): 168-172.
- [15] 段伟丽, 刘艳秋, 包怡红. 艾蒿精油的抑菌活性和稳定性 [J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(12): 1332-1337.
- [16] 张媛媛, 冯亚净, 李书国. 五味子乙醇提取物的抑菌稳定性及抑菌机理研究 [J]. 粮油食品科技, 2016, 24(1): 55-60.
- [17] Lien H M, Wu H Y, Hung C L, et al. Antibacterial activity of ovatodiolide isolated from *Anisomeles indica* against *Helicobacter pylori* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4205.
- [18] 靖会, 佐建锋, 李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 440-441.
- [19] 王宗成, 龙燕萍, 彭延波, 等. 响应面优化油茶叶黄酮提取工艺及抑菌活性研究 [J]. 中国油脂, 2017, 42(4): 123-126; 130.
- [20] 陈向阳, 穆爱洁, 汪蒙蒙, 等. 蛋白桑叶多酚提取工艺的优化及其抗氧化、抑菌活性 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2259-2265.