

金银花抑制大肠埃希菌生物膜活性部位的 化学成分研究

徐多多¹, 姜翔之², 高阳¹, 郑炜¹, 何敏¹, 高其品^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130033)

[摘要] 目的: 研究金银花抑制细菌生物膜有效部位中的化学成分。方法: 采用微量板方法对金银花的有效部位进行追踪, 并利用硅胶柱色谱等手段分离化学成分, 并研究它们对细菌生物膜的影响。结果: 乙醇洗脱部位为有效部位, 并分离得到了 15 个化合物, 分别为大豆脑苷 II (1)、5-O-咖啡酰基奎宁酸丁酯(2)、白果醇(3)、獐牙菜苷(4)、7-表断马钱子苷半缩醛内酯(5)、十八烷醇(6)、二十八烷醇(7)、原儿茶醛(8)、原儿茶酸(9)、肉桂酸(10)、咖啡酸(11)、熊果酸(12)、槲皮素(13)、齐墩果酸(14)、阿魏酸(15)。在质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 化合物 4, 5, 12 对大肠埃希菌生物膜的抑制率分别为 36.16%, 37.16%, 46.18%。结论: 化合物 1 首次从金银花中分离到, 化合物 4, 5, 12 对大肠埃希菌生物膜有一定的抑制作用。

[关键词] 细菌生物膜; 大肠埃希菌; 金银花

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0122-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1129.051.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 11:29

Studies on Chemical Constituents of Effective Fraction of Honeysuckle on Inhibition of *Escherichia coli* Biofilms

XU Duo-duo¹, JIANG Xiang-zhi², GAO Yang¹, ZHENG Wei¹, HE Min¹, GAO Qi-pin^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin University Sino-japanese Fellowship Hospital, Changchun 130033, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effective fraction and compounds from Honeysuckle on inhibition of bacterial biofilms. **Method:** The micro-plate method was used as bioassay-guided and compounds were isolated from effective fraction by repeated silica gel column chromatography. Research their effect of bacterial biofilms. **Result:** The ethanol extract fraction was active site and 15 compounds were obtained from it. Soya-cerebroside II (1), 5-o-caffeoyl quinic acid butyl ester (2), ginnol (3), sweroside (4), 7-epi-vogeloside (5), stearyl (6), octacyl alcohol (7), protocatechuic aldehyde (8), protocatechuic (9), cinnamic acid (10), caffeic acid (11), ursolic acid (12), quercetin (13), oleanolic acid (14), ferulic acid (15). When the concentration was $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibition rates of compound 4, 5, 12 were 36.16%, 37.16% and 46.18% separately. **Conclusion:** Compound 1 isolated from Honeysuckle for the first time. The compound 4, 5, 12 had certain inhibition on bacterial biofilms of *Escherichia coli* biofilms.

[Key words] bacterial biofilm; *Escherichia coli*; Honeysuckle

慢性感染是临床常见疾病, 而一旦产生这样的 感染, 通常无法得到有效地治疗, 常见的抗生素不能

[收稿日期] 20120511(003)

[基金项目] 吉林省科技厅青年基金项目(201101107)

[第一作者] 徐多多, 助理研究员, 从事天然药物化学研究, Tel: 0431-86172046, E-mail: czxuduoduo@163.com

[通讯作者] * 高其品, 教授, 从事天然药物化学研究, Tel: 0431-86172070, E-mail: gaoqipin@sina.com

根本上治疗慢性感染^[1]。近年来,由于研究和诊断技术的进步,激光扫描共聚焦显微镜以及电子显微镜的诞生,发现大多数细菌在生长中为了适应周围环境而形成细菌生物膜(bacterial biofilm, BBF),它是指细菌吸附于惰性物体或机体黏膜表面后,分泌多糖基质、纤维蛋白、脂蛋白等多糖蛋白复合物,使细菌相互粘连并将其自身克隆、聚集、缠绕其中形成的膜样物^[2]。它可保护细菌逃逸宿主免疫和抗菌药物的杀菌作用,常导致感染的迁延和抗感染治疗失败^[3],可见 BBF 引起的感染是威胁人类健康的严重问题。中医药在治疗慢性感染方面有独特的疗效,但其抗菌机制尚未明确。本文选用抗菌中药金银花^[4-7]为研究对象,通过本实验室建立的 BBF 模型作为抗菌药物的筛选模型^[8],筛选中药金银花中的有效部位,并从有效部位中分离得到 15 个化合物,其中大豆脑苷为首次从金银花中分离到。獐牙菜苷、7-表断马钱子苷半缩醛内酯、熊果酸对大肠 BBF 有一定的抑制作用。

1 材料与试剂

DHP-9025 型电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),SW-CJ-2D 型双人工作净化台(苏州净化设备有限公司),MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司),96 孔细菌培养板(海门市天龙实验仪器制造厂),D-101 型大孔树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司),其他试剂均为分析纯。金银花购自同仁堂大药房(2009 年),经鉴定教研室鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。

2 方法

2.1 BBF 活性的测定方法

将大肠埃希菌(*Escherichia coli*)于 NB 液体培养基中培养(菌液的麦氏比浊度达到 0.5 CFU),将菌液稀释 100 倍加入 96 孔板中,每孔 100 μL 。将菌液 80 μL 与待测样品 20 μL 共同加入首行,其余各行倍比稀释。以单独菌液培养作为空白。将上述 96 孔板置于恒温培养箱中培养 24 h,将 96 孔板中液体倾出,用蒸馏水清洗后加入 0.2% 结晶紫溶液 150 μL 染色 30 min,弃去,加入脱氧胆酸钠溶液 150 μL 脱色 30 min 后,置酶标仪上于 600 nm 处测吸光度(A)。该值大小代表 BBF 的生长情况。计算样品对 BBF 抑制率,公式如下:

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

$A_{\text{空白}}$: 不加样品只加菌液培养后的 A, $A_{\text{样品}}$: 菌液和样品共同培养后的 A。

2.2 金银花有效部位的提取

金银花 5 kg,加 95% 乙醇回流提取得乙醇提取物(A)。药渣加水煎煮得水提取物(B)。将 A 用水分散,用水饱和正丁醇萃取得正丁醇萃取物(C)及水层部分(D)。萃取物经 D101 大孔树脂,分别用 40%,95% 乙醇洗脱,得(E-F)洗脱部分,浓缩干燥。以上各部分各取 10 mg,溶于 10 mL 水中。按照 2.1 项下考察 BBF 活性。

2.3 活性部位的分离

有效部位(120 g)通过硅胶 G 色谱,流动相氯仿-甲醇(100:1 ~ 100:100)洗脱,合并为 10 份(Fr1 ~ Fr12)。Fr4 经硅胶柱色谱,正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱,Sephadex LH-20(氯仿-甲醇 1:1)纯化得化合物 2(14 mg),3(12 mg),8(10 mg),10(14 mg),11(9 mg)。Fr5 经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇梯度洗脱,得化合物 6(9 mg),7(18 mg)。Fr6 经硅胶柱色谱,正己烷-乙酸乙酯-甲酸梯度洗脱,重结晶得化合物 4(15 mg),5(22 mg),9(15 mg),12(9 mg)。Fr7 经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇-甲酸梯度洗脱,Sephadex LH-20(甲醇)纯化,得化合物 13(10 mg),14(13 mg),15(11 mg)。Fr8 有析出物,经甲醇反复洗,得到化合物 1(8 mg)。各单体化合物经 IR,NMR,MS 等方法鉴定其化学结构。

2.4 单体化合物抑制 BBF 的活性

按照 2.1 项下考察各单体化合物抑制 BBF 的活性。

3 结果

3.1 金银花各提取部分对细菌生物膜的活性

95% 乙醇洗脱液部分(F)为金银花抑制 BBF 的活性部位。见表 1。

表 1 金银花各提取部位对大肠埃希菌 BBF 的活性 %

提取部位	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.003 125
A	66.49	37.37	32.43	27.93	30.79	20.98
B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	57.70	49.42	25.88	24.09	16.18	14.32
D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	2.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
F	61.50	61.17	41.39	44.97	25.49	26.51

3.2 活性部分单体化合物的结构鉴定

活性部位中分离得到了 17 个单体化合物,分别为大豆脑苷 II、5-O-咖啡酰基奎宁酸丁酯、胡萝苷、 β -谷甾醇、槲皮素、齐墩果酸、阿魏酸、十八烷醇、二十八烷醇、原儿茶醛,其中大豆脑苷为首次从金银花中分离到。

化合物 1 白色无定形粉末,5% 硫酸-乙醇显

色为蓝色, Molish 反应呈阳性。 m/z [M-H] 712。¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD 3:2) δ : 68.9 (C-1), 53.8 (C-2), 72.5 (C-3), 131.5 (C-4), 134.2 (C-5), 33.0 (C-6), 32.6 (C-7), 129.6 (C-8), 129.5 (C-9), 32.3 (C-10), 32.6 (C-11), 30.2-29.7 (C-12-17), 14.3 (C-18), 175.3 (C-1'), 74.0 (C-2'), 35.1 (C-3'), 23.0-33.0 (C-4'-15'), 14.3 (C-16'), glucose moiety: 103.6 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.8 (C-3''), 70.6 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.0 (C-6'')。该化合物的波谱数据与文献[9]报道的数据基本一致,故该物质鉴定为大豆脑苷 II。

化合物 2 白色粉末,三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性。ESI-MS m/z [M + H] 411。¹³C-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 76.04 (C-1), 37.97 (C-2), 70.53 (C-3), 72.78 (C-4), 72.49 (C-5), 38.34 (C-6), 175.34 (C-7), 66.66 (C-8), 31.93 (C-9), 20.38 (C-10), 14.29 (C-11), 168.55 (C-1'), 115.43 (C-2'), 147.50 (C-3'), 127.95 (C-4'), 115.36 (C-5'), 147.17 (C-6'), 150.00 (C-7'), 116.83 (C-8'), 126.26 (C-9')。该化合物的波谱数据与文献[10]报道的数据基本一致,故该物质鉴定为 5-O-咖啡酰基奎宁酸丁酯。

化合物 3 白色粉末(氯仿)。EI-MS m/z : 406.6 [M-18]⁺,由质谱信息含有多个 CH₂ 及 CH₃ (CH₂)_n 碎片表明化合物为长链烷醇类化合物。¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 72.04 为与 OH 所在的 C 信号, 37.49, 31.90 为与 OH 所在的碳相连的邻碳信号, 29.69, 29.35, 29.32, 25.65, 22.68 为 -CH₂ 的碳的化学位移, 14.10 为 -CH₃ 的碳的化学位移, 综合各光谱数据与文献[11]对比数据基本一致, 鉴定化合物 3 为白果醇(ginnol)。

化合物 4 淡黄色结晶(氯仿), Molish 反应呈阳性。EI-MS m/z : 359.2 [M + H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.609 (1H, d, $J = 2.4$ Hz) 为裂环环烯醚萜 H-3 特征烯氢的质子信号, 5.426 (1H, dd), 5.380 (2H, dd), 端基烯烃信号, 5.660 (1H, d, $J = 1.6$, H-1) 和 4.784 (1H, d, $J = 8.0$, H-1') 两处的氢质子信号表明此处的氢所在的碳原子连有吸电子基, 应为化合物结构中两个缩醛质子的信号, 3.795 ~ 3.774 为糖中 H 质子信号。¹³C-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 168.79 为羰基信号峰, 154.24 (C-3), 105.74 (C-4) 为两烯碳信号, 另有 133.64 (C-8), 121.09 (C-10) 两个烯碳信号, 100.04 (C-1'), 78.70 (C-5'), 78.22 (C-3'), 75.04 (C-2'), 71.85 (C-4'),

62.98 (C-6') 为糖上的碳信号。综合数据与文献[12]化合物 sweroside 基本一致, 鉴定化合物 4 为 sweroside。

化合物 5 白色结晶(甲醇), Molish 反应呈阳性。¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.711 (1H, d, $J = 2.4$ Hz) 为裂环环烯醚萜特征烯氢的质子信号 (H-3)。¹³C-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 167.75 为羰基碳, 154.77 (C-3), 105.65 (C-4) 133.65 (C-8), 121.35 (C-10) 均为烯碳信号峰, 121.35 (C-10) 应分别为裂环环烯醚萜上 C-8, C-10 两端基烯炔上的碳信号, 100.62 (C-1'), 78.67 (C-5'), 78.20 (C-3'), 74.91 (C-2'), 71.76 (C-4'), 62.96 (C-6') 为糖的碳信号, 其波谱数据与文献[13]基本一致, 鉴定化合物 5 为 7-epi-vogeloside。

化合物 6 ~ 15 分别与相应对照品作 TLC 对照, 经 3 个不同溶剂系统展开, R_f 均一致, 混合熔点不降低, 故鉴定为十八烷醇(6)、二十八烷醇(7)、原儿茶醛(8)、原儿茶酸(9)、肉桂酸(10)、咖啡酸(11)、熊果酸(12)、槲皮素(13)、齐墩果酸(14)、阿魏酸(15)。

3.3 化合物对大肠埃希菌 BBF 的抑制作用 在样品质量浓度为 1 g·L⁻¹ 时, 獐牙菜苷、7-表断马钱子苷半缩醛内酯、熊果酸对大肠埃希菌生物膜的抑制率分别为 36.16%, 37.16%, 46.18%, 有一定的抑制作用。

4 小结与讨论

关于 BBF 的研究国外早已开展, 而国内开展的则很少, 本课题旨在建立一种更加准确的模拟了细菌在人体内的存在状态模型。

本文考察了金银花抑制细菌生物膜的活性部位及活性单体。金银花的抑菌作用研究很多, 但其治疗慢性感染的机制、物质基础尚不清楚, 也明显影响了它的临床应用。我们采用细菌生物膜模型这一新的方法, 对其进行了筛选, 从金银花的活性部位中分离出单体成分, 为了解其治疗慢性感染的机制和药效物质基础打下基础。

[参考文献]

- [1] 汪长中. 中药抗菌生物膜研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 521.
- [2] Barraud N, Hassett D J, Hwang S H, et al. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 2006, 188(21): 7344.
- [3] 邬强, 马郁芳. 细菌生物膜耐药机制与相关感染的治疗[J]. 现代预防医学, 2007, 34(24): 4667.

气相色谱法同时测定莲菊感冒胶囊中 16 种有机残留溶剂

刘丽娜¹, 樊燕², 郑林¹, 李勇军¹, 刘童¹, 兰燕宇¹, 王爱民^{1*}

(1. 贵阳医学院药学院、贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;

2. 贵阳护理职业学院, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立以气相色谱法测定莲菊感冒胶囊中正己烷、苯和甲苯等 16 种残留有机溶剂的方法。方法: 采用内标法直接进样, 色谱柱为 AT-624 大口径毛细管柱(0.53 mm × 30 m, 3 μm), 检测器为 FID, 载气为氮气, 二氯甲烷为溶解介质, 醋酸丁酯为内标。结果: 正己烷、苯、甲苯、乙苯、间二甲苯、苯乙烯、异丙苯、正癸烷、正丁基苯、十一烷、二乙烯苯、十二烷、萘、十三烷、十四烷和十五烷在 1 ~ 32 mg·L⁻¹, 苯在 0.2 ~ 6.4 mg·L⁻¹ 均呈现良好的线性关系($r \geq 0.9984$)。平均回收率在 87.2% ~ 116.9%, RSD ≤ 10% (n = 9)。结论: 该方法简单、准确、灵敏度高, 适用于莲菊感冒胶囊中 16 种残留溶剂的同时检测。

[关键词] 莲菊感冒胶囊; 气相色谱法; 残留溶剂测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0125-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1213.057.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:13

Simultaneous Determination of Sixteen Kinds of Residual Organic Solvents in Lianju Ganmao Capsule by GC

LIU Li-na¹, FAN Yan², ZHENG Lin¹, LI Yong-jun¹, LIU Tong¹, LAN Yan-yu¹, WANG Ai-min^{1*}

(1. School of Pharmacy, Guiyang Medical University; Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation, Guiyang 550004, China; 2. Nursing Vocational College Guiyang City, Guiyang 550004, China)

[收稿日期] 20120608(001)

[基金项目] 贵州省中药现代化项目(黔科合中药字[2011]5081)

[第一作者] 刘丽娜, 讲师, 硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 0851-6908468, E-mail: gylln815@126.com

[通讯作者] * 王爱民, 教授, 从事中药新药研究及质量分析, Tel: 0851-6908468, E-mail: gywam100@163.com

- [4] 刘杰. 金银花提取物在小鼠体内抑菌及抗炎作用实验研究[J]. 中国现代医药杂志, 2009, 11(3): 127.
- [5] 杨欣, 李洪波, 陈诚. 金银花药性与功效的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 220.
- [6] 高红宁. 微滤-超滤法精制金银花水提液[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 54.
- [7] 蔡清宇, 郝特, 李曼玲, 等. 27 份不同产地金银花质量初步调查[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 246.
- [8] 徐多多, 潘志, 高阳, 等. 细菌生物膜模型的建立及注射用双黄连对细菌生物膜形成的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(5): 667.
- [9] 杨雪琼, 李美红, 杨亚滨, 等. 二蕊荷莲豆中的两个化合物[J]. 中草药, 2005, 36(6): 808.
- [10] 张卫东, H A. ThiBangTan. 灯盏花中新的酚酸类化合物的结构及活性研究[J]. 药学学报, 2001, 36(5): 360.
- [11] 唐于平, 楼凤昌, 王景华, 等. 银杏叶中黄酮类成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(4): 231.
- [12] Recio-Iglesias M, Marston A, Hostettmann K. Xanthenes and secoiridoid glucosides of *Halonia campanulata* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(4): 138.
- [13] 贺清辉, 田艳艳, 李会军, 等. 红腺忍冬藤茎中环烯醚萜苷类化合物的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(9): 656.

[责任编辑 邹晓翠]