

· 实验研究 ·

南板蓝根不同提取物中靛蓝、靛玉红和色胺酮含量及其抑菌活性的研究[※]

● 孙媛^{1,2,3*} 田秀秀^{1,2,3} 丁江生^{1,2,3}

摘要 目的:研究南板蓝根不同提取物的抑菌活性与其中靛蓝、靛玉红和色胺酮的相关性。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱为ECOSIL 120-5-C18柱(4.6×250 mm, 5.0 μm),乙腈:水=70:30为流动相,柱温25 ℃,流速1.0 mL·min⁻¹,进样量10 μL,检测波长289 nm。测定南板蓝根不同提取物中靛蓝、靛玉红和色胺酮对应的生药材得率,并采用微孔稀释法测定南板蓝根不同提取物对丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果:南板蓝根乙酸乙酯提取物中靛蓝和靛玉红对应的生药材得率最高;80%乙醇提取物中色胺酮对应的生药材得率最高。南板蓝根乙酸乙酯提取物对丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌有明显抑制作用,MIC分别为0.155 mg/mL和0.310 mg/mL;80%乙醇提取物对白色念珠菌有抑制作用,MIC为0.750 mg/mL。结论:质量评价指标合理,测定方法方便、稳定、高效,南板蓝根乙酸乙酯提取物抑菌活性最佳,抑菌活性与靛蓝、靛玉红和色胺酮有一定相关性。

关键词 南板蓝根;靛蓝;靛玉红;色胺酮;高效液相色谱;最小抑菌浓度

南板蓝根来源于爵床科植物马蓝[Baphicacanthus cusia (Nees) Bremek.]的干燥根茎和根,味苦,性寒,具有清热解毒、凉血消斑等功效,可用于瘟疫时毒、发热咽痛、温毒发斑等,已被广泛应用于各种制剂中。现代研究证明,南板蓝根含有多种化学成分,如(R,S)-告衣春、腺苷、靛蓝、靛玉红、多糖、色胺酮等;具有良好的抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗炎等方面的药理活性,包括灭活甲型流感病毒,延长流感病毒FM1株感染小鼠的平均存活天数,抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和皮肤真菌,治疗慢性粒细胞性白血病,抑制一般癌肿细胞生长和扩散程度等。其中抗病毒、抗肿瘤等方面研究报道较多,但抗菌方面的许多作用机理仍待考察。本中心根据前期研究结果,拟将

其组方开发为治疗痤疮的外用产品。

然而,南板蓝根作为常用中药,虽大众接受度高,但在不同产地、野生和栽培品种、不同溶剂提取物之间质量差异明显。同时,《中国药典》南板蓝根项下,未见对其质量指标成分的定量控制。为进一步研究南板蓝根成分与抑菌活性的相关性,采用高效液相色谱法,以南板蓝根主要成分靛蓝、靛玉红和色胺酮为指标,对南板蓝根水、醇等不同溶剂提取物的指标成分含量情况和对丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌的体外抑菌情况进行考察,为该药规范质量,优化提取溶剂,拓宽使用范围,开发外用抑菌产品研究提供依据^[1-10]。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1100高效液相色谱仪(美国安捷伦);KQ5200DE数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BSA224S-CW电子天平[赛多利斯科学仪器(化学)有限公司];JJ-2000型电子天平(江苏常熟市双杰测试仪器厂);BCD-208K/A海尔冰箱(青岛海尔股份有限公司);DZTW调温电热套(北京市永光明医

※基金项目 云南省科技厅“创新引导与科技型企业培育计划——科研院所技术开发研究专项”(No.2018DC002)

* 作者简介 孙媛,女,高级工程师。主要从事新药制剂研究。

• 作者单位 1.云南省药物研究所(云南昆明 650111);2.云南白药集团创新研发中心(云南昆明 650111);3.云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室(云南昆明 650111)

疗仪器有限公司);DZKW-S-6电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗);BPZ-6210LC型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);THZ-D型台式恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂);Thermo Multiskan GO全波长酶标仪(美国BIO-RAD公司);GNP-9270隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂 靛蓝对照品(北京世纪奥科,批号170404,编号482-89-3,HPLC \geq 98%);靛玉红对照品(中国食品药品检定研究院,批号110717-200204);色胺酮对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号M1008L45439,编号S31557,HPLC \geq 98%);南板蓝根(昆明市官渡区千草源中药材经营部,批号20170527);美罗培南[佳友制药(苏州)有限公司,批号20161204];乙腈(色谱纯,默克股份);水为高纯水;N,N-二甲基甲酰胺、95%乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷均为分析醇;酵母提取物(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England,批号LP0021);胰蛋白胨(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England,批号LP0042);氯化钠(上海试四赫维化工有限公司,批号1306101);MUELLER-HINTON(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England,批号CM0405);沙氏葡萄糖液体培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司,产品批号HB0253-7);琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号20091102)。

1.3 供试菌种 丙酸杆菌 *Propionibacterium acnes* ATCC11827;金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC29213;白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC10231均购自美国特种物品贮藏中心(ATCC),接种、传代后于4℃保存。

2 方法与结果

2.1 南板蓝根不同溶剂提取物的制备 称取相同重量的南板蓝根药材,分别加入10倍量的水、甲醇、50%乙醇、80%乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮溶剂,分别加热回流提取2次,每次2h,过滤提取液,60℃真空浓缩,干燥,即得南板蓝根不同溶剂提取物。密封阴凉保存,备用。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 ECOSIL 120-5-C18色谱柱(5.0 μm , 4.6 \times 250 mm,广州绿百草),乙腈:水=70:30为流动相,柱温25℃,流速1.0 mL \cdot min $^{-1}$,进样量10 μL ,检测波长289 nm。

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称取靛蓝、靛玉

红和色胺酮对照品2.060 mg、2.520 mg、10.112 mg,置50 mL容量瓶中,加N,N-二甲基甲酰胺溶解并定容至刻度,超声(150 W,40 kHz)5 min,摇匀,即得。

2.2.3 样品溶液制备 分别精密称取2.1项下的南板蓝根不同溶剂提取物0.5 g,置于50 mL容量瓶中,加N,N-二甲基甲酰胺40 mL,超声20 min,放冷,N,N-二甲基甲酰胺定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

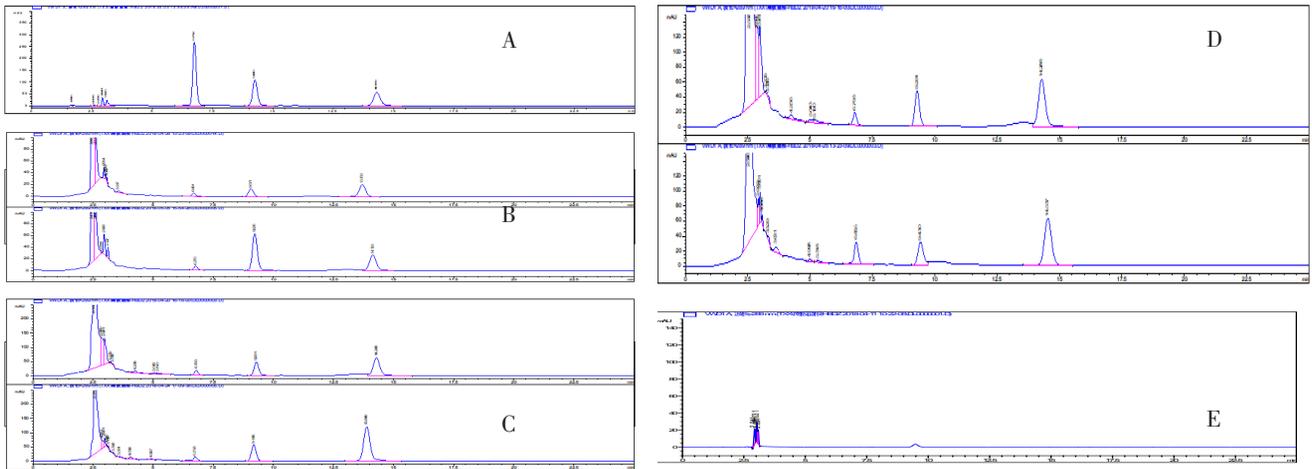
2.2.4 专属性试验 取2.2.2项下的对照品溶液,取N,N-二甲基甲酰胺为空白溶液,按2.2.3项下的制备方法,取南板蓝根80%乙醇提取物,制备样品溶液;并分别加入靛蓝、靛玉红和色胺酮对照品,制备对照及样品混合溶液。按上述色谱条件进行测定,记录色谱图。此条件下靛蓝、靛玉红和色胺酮分离良好,无干扰。见图1。

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取2.2.2项下靛蓝、靛玉红和色胺酮混合对照品溶液1.0,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0 mL置于10 mL容量瓶中,加N,N-二甲基甲酰胺定容,摇匀,分别得到靛蓝浓度为:4.12,8.24,16.48,24.72,32.96,41.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;靛玉红浓度为:5.04,10.08,20.16,30.24,40.32,50.40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;色胺酮浓度为:20.22,40.45,80.90,121.34,161.79,202.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,0.45 μm 滤膜过滤,按2.2.1项下色谱条件测定,记录峰面积。以对照溶液浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果见表1。

2.2.6 精密度试验 精密量取2.2.5项下混合对照品溶液,按上述色谱条件,连续进样6次,记录峰面积,并计算RSD值。结果表明,靛蓝、靛玉红和色胺酮的日内精密度RSD值分别为1.41%(n=6)、0.77%(n=6)、1.62%(n=6),表明日内精密度良好。连续进样3天,记录峰面积,并计算RSD值。结果表明,靛蓝、靛玉红和色胺酮的日间精密度RSD值分别为1.46%(n=6)、0.81%(n=6)、0.71%(n=6),表明日间精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一份样品溶液,分别于0,2,4,6,10,12 h按上述色谱条件测定,记录峰面积,并计算RSD值。结果表明,靛蓝、靛玉红和色胺酮的稳定性RSD值分别为2.90%(n=6)、2.24%(n=6)、1.39%(n=6),表明样品溶液在12 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取0.5 g南板蓝根80%乙醇提取物6份,按2.2.3项下要求,配制样品溶液,按上述色谱条件测定,记录峰面积,并计算RSD值。结果表明,靛蓝、靛玉红和色胺酮的重复性RSD值分别



注：A:对照品溶液(由左至右依次为色胺酮、靛蓝、靛玉红);B:样品溶液和靛蓝对照及样品混合溶液;C:样品溶液和靛玉红对照及样品混合溶液;D:样品溶液和色胺酮对照及样品混合溶液;E:空白溶液

图1 专属性实验HPLC图

表1 靛蓝、靛玉红和色胺酮线性关系(n=6)

名称	回归方程	R ² 值	线性范围(μg·mL ⁻¹)
靛蓝	Y = 55.837X + 11.83	0.9995	4.12 ~ 41.20
靛玉红	Y = 57.458X + 21.609	0.9998	5.04 ~ 50.40
色胺酮	Y = 14.369X + 2.112	0.9999	20.22 ~ 202.24

表2 加样回收率试验结果(n=9)

名称	原有量(μg)	加入量(μg)	实测量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
靛蓝	160.67	79.00	242.39	103.44	100.33	2.58
	159.96	79.00	241.31	102.98		
	160.11	79.00	242.21	103.92		
	160.01	156.90	311.12	96.31		
	160.24	156.90	314.38	98.24		
	160.36	156.90	316.09	99.25		
	159.99	240.00	397.35	98.90		
	160.09	240.00	400.30	100.09		
	160.07	240.00	399.59	99.80		
靛玉红	232.14	96.40	329.39	100.88	98.88	2.35
	232.13	96.40	328.31	99.77		
	232.26	96.40	331.23	102.67		
	231.21	192.80	416.22	95.96		
	231.27	192.80	417.10	96.39		
	230.37	192.80	415.50	96.02		
	229.21	289.20	516.13	99.21		
	229.26	289.20	518.39	99.98		
	229.04	289.20	515.47	99.04		
色胺酮	120.77	50.30	170.15	98.17	101.93	1.96
	120.79	50.30	171.47	100.76		
	120.81	50.30	171.82	101.41		
	122.77	100.50	227.70	104.41		
	122.46	100.50	224.78	101.81		
	122.53	100.50	227.70	104.65		
	122.91	150.80	277.88	102.77		
	122.87	150.80	277.60	102.61		
	122.82	150.80	274.82	100.80		

为2.36%(n=6)、1.29%(n=6)、1.39%(n=6),表明重复性良好。

2.2.9 回收率试验 精密称取已知含量的南板蓝根提取物,分别按含量的50%,100%,150%精密加入靛蓝、靛玉红和色胺酮对照品,按2.2.3项制备样品溶液,每个浓度平行制备3份,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表2。

2.2.10 得率测定 分别精密称取0.5g南板蓝根不同溶剂提取物,按2.2.3项制备样品溶液,并根据线性范围适当稀释,每个样品平行制备2份,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算含量,并结合提取率,计算各提取物在生药材中对应靛蓝、靛玉红和色胺酮的得率。结果提示,南板蓝根乙酸乙酯提取物中靛蓝和靛玉红对应的生药材得率最高,分别为0.6702 mg/g和0.2353 mg/g;80%乙醇提取物中色胺酮对应的生药材得率最高,为0.1017 mg/g。见表3。

2.3 体外抑菌活性测定

2.3.1 菌种培养 从菌落平板上挑选丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌分别接种于已灭菌的MH、LB、沙氏液体培养基中,37℃,100 rpm/min振荡培养24 h。活化后,按1:100接种,以37℃、200 rpm/min

表3 南板蓝根不同溶剂提取物得率测定结果

成分	样品名称	峰面积	含量(%)	提取率(%)	生药材得率(mg/g)
靛蓝	南板蓝根水提取物	—	—	18.40	—
	南板蓝根甲醇提取物	699.20	0.12	4.83	0.0593
	南板蓝根50%乙醇提取物	123.73	0.02	13.85	0.0278
	南板蓝根80%乙醇提取物	1337.73	0.24	9.72	0.2305
	南板蓝根乙酸乙酯提取物	3259.70	3.87	1.73	0.6702
	南板蓝根二氯甲烷提取物	1513.33	1.79	2.15	0.3852
	南板蓝根丙酮提取物	1738.07	2.08	1.00	0.2076
靛玉红	南板蓝根水提取物	—	—	18.40	—
	南板蓝根甲醇提取物	1758.90	0.30	4.83	0.1457
	南板蓝根50%乙醇提取物	267.60	0.04	13.85	0.0594
	南板蓝根80%乙醇提取物	1196.03	0.20	9.72	0.1984
	南板蓝根乙酸乙酯提取物	1195.07	1.36	1.73	0.2353
	南板蓝根二氯甲烷提取物	903.40	1.02	2.15	0.2198
	南板蓝根丙酮提取物	1208.07	1.39	1.00	0.1387
色胺酮	南板蓝根水提取物	—	—	18.40	—
	南板蓝根甲醇提取物	231.93	0.16	4.83	0.0771
	南板蓝根50%乙醇提取物	—	—	13.85	—
	南板蓝根80%乙醇提取物	152.60	0.10	9.72	0.1017
	南板蓝根乙酸乙酯提取物	84.80	0.38	1.73	0.0663
	南板蓝根二氯甲烷提取物	102.27	0.46	2.15	0.0998
	南板蓝根丙酮提取物	75.60	0.34	1.00	0.0343

振荡培养 12 h。其中丙酸杆菌、白色念珠菌全程厌氧。

2.3.2 最小抑菌浓度(MIC)测定 96孔细胞培养板经紫外线照射 30 min后,采用连续二倍微孔稀释法,以美罗培罗为阳性对照,同时设立受试样品(其中极性偏大的提取物,如水、甲醇、50%乙醇、80%乙醇提取物样品浓度为 15.00 mg/mL;极性偏小的提取物,如乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮提取物样品浓度为 6.20 mg/mL)、菌液对照、培养基对照和溶媒对照。调整菌浓度至含 1×10^6 CFU/mL活菌,每排第一孔内加入 190 μ L菌液,第二至第十二孔内均加入 100 μ L菌

液。分别将受试样品 10 μ L加入第一孔中,混匀后吸取 100 μ L菌液加入第二孔中,继续混匀后再吸取 100 μ L菌液加入第三孔。依次操作,最后,第十二孔内溶液混匀后吸取 100 μ L弃去。37 $^{\circ}$ C,培养 24 h,其中丙酸杆菌、白色念珠菌全程厌氧培养。未见混浊的最低样品浓度即为最小抑菌浓度。结果表明,南板蓝根乙酸乙酯提取物对丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌有明显抑制作用,MIC分别为 0.155 mg/mL和 0.310 mg/mL;80%乙醇提取物对白色念珠菌有抑制作用,MIC为 0.750 mg/mL。见表4。

表4 南板蓝根不同溶剂提取物抑菌作用结果

受试样品	丙酸杆菌的MIC	金黄色葡萄球菌MIC	白色念珠菌的MIC
南板蓝根水提取物	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL
南板蓝根甲醇提取物	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL
南板蓝根50%乙醇提取物	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL
南板蓝根80%乙醇提取物	>0.750 mg/mL	>0.750 mg/mL	0.750 mg/mL
南板蓝根乙酸乙酯提取物	0.155 mg/mL	0.310 mg/mL	>0.310 mg/mL
南板蓝根二氯甲烷提取物	>0.310 mg/mL	>0.310 mg/mL	>0.310 mg/mL
南板蓝根丙酮提取物	>0.310 mg/mL	>0.310 mg/mL	>0.310 mg/mL
空白溶媒	>1/20原药浓度	>1/20原药浓度	>1/20原药浓度
美罗培罗	0.500 μ g/mL	0.250 μ g/mL	0.500 μ g/mL

3 讨论

南板蓝根作为历史悠久的中药,分布及使用范围广泛,化学成分复杂。我中心拟将南板蓝根与重楼等不同抑菌机理的中药组合,开发用于痤疮治疗的外用制剂。因此,本研究选用丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌为菌种进行评价,并优先探索南板蓝根成分报道较集中的靛蓝、靛玉红和色胺酮在不同溶剂提取物中的生药材得率及活性情况。本研究结果表明,南板蓝根以乙酸乙酯为提取溶剂效果更佳。

实验结果表明,南板蓝根乙酸乙酯提取物对丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌均有明显抑制作用,其中对丙酸杆菌作用略强。同时发现,南板蓝根乙酸乙酯提取物中靛蓝、靛玉红对应的生药材得率也高于其它提取物,分别为 0.6702 mg/g 和 0.2353 mg/g。此外,南板蓝根 80% 乙醇提取物对白色念珠菌有抑制作用,其余提取物均未出现,对比得率,发现其色胺酮对应的生药材得率最高,为 0.1017 mg/g。因此,推测南板蓝根的抑菌活性与靛蓝、靛玉红和色胺酮有一定相关性。

研究发现,不同来源的南板蓝根采用同一溶剂提取,提取率和指标成分含量差异明显。因此,评价南板蓝根不同溶剂提取物中靛蓝、靛玉红和色胺酮的含量,以最终可从生药材中获得的得率为指标,更具实

用和指导意义。

参考文献

[1]孙小兵,盛家荣,王定培.南板蓝根化学成分及药理作用研究[J].广西师范学院学报(自然科学版),2008,25(4):66-69.
 [2]肖元,钟鸣.南板蓝根的化学成分、药理作用研究进展[J].河南中医,2006,25(8):78-80.
 [3]方建国,汤杰,杨占秋,等.板蓝根体外抗单纯疱疹病毒 I 型作用[J].中草药,2005,36(2):242-244.
 [4]HONDA G,TABATA M. Isolation of antifungal principle tryptanthrin, from *Strobilanthes cusia* O. Kuntze.[J]. *Planta medica*,1979, 36(1):85-90.
 [5]徐小飞,张慧焯,邓乔华,等.不同采收期板蓝根核苷类及(R,S)-告依春含量变化研究[J].现代中药研究与实践,2014,28(2):19-21.
 [6]杨秀贤,吕曙华,吴寿金.马蓝叶化学成分的研究[J].中草药,1995,26(12):622.
 [7]国家药典委员会.中华人民共和国药典(2015年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:245.
 [8]胡兴昌,程佳蔚,刘士庄,等.板蓝根凝集素效价与抑制感冒病毒作用关系的实验研究[J].上海中医药大学学报,2001,15(3):56-57.
 [9]李玲,董同义,李修禄,等.大青叶类药材及其制剂质量控制的研究[J].药学学报,1994,29(2):128-131.
 [10]魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2001:1435-1439.

(收稿日期:2020-05-25)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第 62 页)

治疗中,具有临床价值,今后可增加观察例数及疗效评测指标,进一步探讨可能的机制。

参考文献

[1]林昌松,李楠,姜玉宝,等.类风湿关节炎的中西医结合治疗研究进展[J].中华中医药杂志,2017,32(11):5020-5023.
 [2]ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. *Arthritis Rheum*. 2010, 62(9):2569-81.
 [3]SENGUI I, AKCAY-YALBUZDAG S, INCE B, et al. Comparison of the DAS28-CRP and DAS28-ESR in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2015, 18(6):640-645.
 [4]BRUCE B, FRIES JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(1):167-78.
 [5]于峰. C 反应蛋白与血沉在类风湿性关节炎中的应用价值[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(1):67-68.
 [6]FELSON DT, ANDERSON JJ, BOERS M, et al. American College of

Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1995, 38(6):727-35.
 [7]金香花,戴冰冰,张昊. 探讨羟氯喹及甲氨蝶呤在类风湿性关节炎治疗中的应用效果[J]. 中国实用医药, 2020, 15(23):132-134.
 [8]李定忠,李秀章. 中医经络探秘[M]. 北京:解放军出版社, 2003:82.
 [9]李定忠,傅松涛,李秀章. 经络调控是能量信息系统与物质系统的沟通与连动:关于经络的理论及临床应用研究之五[J]. 中国针灸, 2005, 25(3):187-190.
 [10]林慧燕. 关节操在类风湿关节炎患者中的运用价值研究[J]. 黑龙江医学, 2015, 39(9):1084-1085.
 [11]潘国雄. 除湿通络汤治疗类风湿关节炎湿热痹阻证的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2020.
 [12]郭红卫,郝飞. 皮肤 HPA 轴的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(12):841-843.
 [13]吴莉萍,张子云,李晓倩,等. 活动期类风湿关节炎患者关节功能锻炼的延续护理[J]. 护理学杂志, 2017, 32(7):83-85.

(收稿日期:2021-01-09)

(本文编辑:蒋艺芬)