

- [5] 丁东宁,刘志玺,靳菊情. 两种地衣多糖组分测定. 西北药学杂志,1992,7(3):35-37.
- [6] 阮期平. 附子多糖的分离纯化及部分理化性质研究. 天然产物研究与开发,1999,12(5):46-47.
- [7] 张惟杰主编. 复合多糖生化技术. 上海:上海科技出版社,1987:209-212,110,65-68.
- [8] 方积年. 多糖的分离、纯化及其纯度鉴别与分子量测定. 药学通报,1984,19(10):46-48.
- [9] 陈玉香,张丽萍,梁忠岩,等. 沙棘果皮水溶性多糖 Hn 的结构研究. 分子科学学报,2000,16(1):19-22.
- [10] 聂凌鸿,宁正祥. 广东淮山水溶性多糖的分离纯化及体外抗氧化活性的研究. 食品科学,2003,24(11):129-132.
- [11] 程荷凤,李小凤,东野广智. 化橘红水溶性多糖的化学及体外抗氧化活性的研究. 化学世界,2002,2:91-93.
- [12] 土建华,张民. 枸杞多糖体内抗羟基自由基氧化作用. 食品科学,2001,22(1):11-12

(2005-07-11 收稿)

### Study on the Purification and Scavenging Free Radical Activity of Water Soluble Polysaccharide of Leave in *Hippohae rhamnoides* L.

LIU Chun-lan, LIU Hai-qing, DENG Yi-hong, LIU Ming-liang

(College of Life and Environmental Science, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China)

**Abstract** The crude polysaccharide was extracted from Leave in *Hippohae rhamnoides* L. with hot water, and precipitated by ethanol. The crude polysaccharide has been fractionated by acidic ethanol. Three fractions (SJ<sub>1</sub>, SJ<sub>2</sub>, SJ<sub>3</sub>) were got respectively. SJ<sub>2</sub> deproteinization by the combined methods of enzyme and Seveage, purified by DEAE-Sephadex A-25 gel filtration. PC analysis indicated that SJ<sub>2</sub> is composed of Xyl, Ara, Glc, Gal, GaL A. The identification of purify by Sepharose CL-4B, paper chromatography and cellulose acetate electrophoresis showed it was homogeneous. Typical absorption of polysaccharides was shown in its IR spectrum. It contained  $\alpha$ -glucosidic bonds by IR analysis. It had typical absorption of protein by UV scanning. SJ<sub>2</sub> is first isolated from Leave in *Hippohae rhamnoides* L. Scavenging free radical experiment showed that SJ<sub>2</sub> was effective in scavenging superoxideradical and hydroxylradical, but only a little effective in scavenging lipid radical.

**Key words** Leave in *Hippohae rhamnoides* L.; Polysaccharide; Isolation purification; Free radical

## 枯草芽孢杆菌对 50 种中药的发酵及抗菌活性检测

李国红<sup>1</sup>, 张克勤<sup>1</sup>, 沈月毛<sup>2</sup>

(1. 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 云南大学, 云南昆明 650091; 2. 中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用重点实验室, 云南昆明 650204)

**摘要** 用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对 50 种中药进行发酵,检测发酵产物与原料对结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和赭色青霉(*Penicillium avellaneum*)的抗菌活性。结果表明:部分中药的发酵产物抗菌活性增加,而部分中药的发酵产物抗菌活性降低,部分中药的活性不变。说明微生物发酵中药的过程中,两者发生相互作用导致发酵前后中药成分发生变化,从而抗菌活性发生变化。

**关键词** 枯草芽孢杆菌; 中药; 发酵; 抗菌活性

**中图分类号**:R282.7 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2006)02-0154-04

微生物具有非常丰富的酶系统,有强大的分解、转化物质的能力。用微生物发酵中药,可能对中药化学成分进行生物转化,产生新的化合物或引起中药中一些成分含量的变化。另外,微生物发酵中药的过程中,中药中的一些成分可能诱导微生物的某些代谢途径发生变化,从而产生新的化合物。这些

都将为活性化合物的筛选提供丰富的资源。微生物发酵中药应成为中药研究的新内容<sup>[1]</sup>。

实验中,用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对包括人参、西洋参、红参、党参等在内的 50 种中药进行发酵,检测了他们的发酵产物对结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和赭色青霉菌(*Penicillium*

基金项目:国家自然科学基金(20362010)

作者简介:李国红,助理研究员,主要从事中药的发酵研究,Email:Ligh@ynu.edu.cn

*avellaneum*) 的抑制作用, 结果表明微生物与中药之间是相互作用的, 因为部分中药的发酵产物抗菌活性增加, 而部分中药的发酵产物抗菌活性降低, 原因可能是一方面中药诱导菌体产生更多的活性物质或菌体产生的抑菌物质与中药中的抑菌活性成分一起产生更强的抑菌作用以及微生物将中药中的部分非抑菌物质转化为活性的化合物, 而另一方面, 菌体可能对中药中的抑菌活性成分进行转化生成非活性成分, 导致发酵产物活性降低。这些都表明发酵产物的成分与原料比较发生了变化。

## 1 材料和方法

1.1 材料 菌株: 结核分支杆菌 (*M. tuberculosis*) 保存于云南省生物资源保护与利用重点实验室; 棕色青霉菌 UC-4376 (*P. avellaneum*) 保存于中国科学院昆明植物研究所。

中药: 葛根、鸦胆子、芦根、淡豆豉、牛蒡子、苍耳子、火麻仁、炒栀子、黄连、白藜、草豆蔻、莲子、龟板、建菖蒲、杏仁、白芷、茯苓、草果、升麻、连翘、苦参、土茯苓、银柴胡、防己、苏子、香附、槟榔、山楂、芦子、柏子仁、延胡、女贞子、五味子、枸杞、小红参、重楼、党参、当归、白毛根、西青果、车前子、锁阳、人参、西洋参、天麻、白附片、半夏、射干、王不留行、桑椹子共 50 种中药购买自昆明市药材市场。

1.2 方法 发酵: 将中药切片剪碎后, 各取 5 g 于 50 ml 的三角瓶内, 加入 30 ml 自来水, 121℃ 灭菌 30 min。每瓶加入在麦芽汁培养基中培养了 48 h 的枯草芽孢杆菌菌液 1.5 ml, 30℃ 静止培养 10 天。同时做三种对照, 一种用麦芽汁培养基代替自来水加入到中药里, 另一种为中药里加入麦芽汁培养基, 但不接种枯草芽孢杆菌, 第三种为枯草芽孢杆菌的正常发酵。即有四组实验: I 中药 + 水 + 菌; II 中药 + 培养基 + 菌; III 中药 + 培养基; IV 培养基 + 菌。

样品处理: 不同中药的发酵物及各组对照培养 10 天后, 每一个样品中加入 30 ml 甲醇提取, 滤纸过滤, 滤液浓缩干后用甲醇溶解, 将甲醇溶解物取出过滤到样品瓶内, 定容至 5 ml。使用时直接取 100 μl 进行活性检测。

抑菌实验(纸片扩散法): 取 200 μl 活化 12~16 h 的结核分支杆菌液涂布于直径为 9 cm 的牛肉膏蛋白胨培养基平板中, 直接在涂布有病原菌的培养基上放上含有测试样品的纸片, 37℃ 培养。24 h 后, 观察是否有抑菌圈生成。有抑菌圈生成的测量抑菌圈的直径(包括纸片直径 0.6 cm)。棕色青霉菌 UC-4376 接棕色青霉菌 UC-4376 接入培养皿中培养至大量孢子形成后, 用吐温 80 将孢子洗下, 制成孢

子悬液, 加入到棕色青霉菌固体培养基中, 制成棕色青霉菌平板。将含 100 μl 样品的纸片挥干溶剂后放置棕色青霉菌平板上, 42℃ 培养, 36 h 观察结果, 测量抑菌圈大小。

## 2 结果

观察不同中药各组处理的样品所做的抑菌实验结果, 有抑菌圈产生的测量抑菌圈的大小, 没有抑菌圈生成的认为该处理在此剂量下没有抑菌作用, 抑菌圈直径小于 0.7 cm 的认为只有微弱活性。

抑菌实验结果表明, 槟榔、白芷、当归、牛蒡子、茯苓、桑椹子、龟板、防己、草果、芦根、锁阳、红参、枸杞、银柴胡和天麻 15 种中药的各种处理对结核分支杆菌和棕色青霉菌都没有明显抑制作用; 黄连、西洋

表 1 发酵前后抑菌活性不变的中药

中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉菌	中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉菌
槟榔	I	-	-	黄连	I	1.0	2.0
	II	-	-		II	1.0	2.0
	III	-	-		III	1.0	2.0
当归	I	-	-	白芷	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
茯苓	I	-	-	牛蒡子	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
草豆蔻	I	<0.7	-	桑椹子	I	-	-
	II	<0.7	-		II	-	-
	III	<0.7	-		III	-	-
草果	I	-	-	龟板	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
防己	I	-	-	芦根	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
锁阳	I	-	-	山楂	I	0.8	-
	II	-	-		II	0.8	-
	III	-	-		III	0.8	-
红参	I	-	-	枸杞	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
天麻	I	-	-	银柴胡	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	-	-		III	-	-
半夏	I	<0.7	-	正常发酵	IV	<0.7	<0.7
	II	<0.7	-				
	III	<0.7	-				

- 没有抑制作用, 下表皆同。

参、建菖蒲、射干、柏子仁 5 种中药的各种处理对两种病原菌都有不同程度的抑制作用,香附、连翘、土茯苓、白附片和人参的同一处理对这两种菌也具有抑制作用;有的中药的各种处理只对结核分支杆菌有抑制作用,如苦参、山楂、淡豆豉、半夏、草豆蔻。从以上结果可知,中药中存在有抗菌活性成分的种类较多,有的活性较强,如已知的抗菌药黄连对细菌和真菌,建菖蒲对细菌、芦子对真菌都具有较强的活性,从中药中寻找抗菌活性成分是可行的。

表 2 发酵后抑菌活性增强的中药

中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉	中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉
连翘	I	0.9	<0.7	杏仁	I	-	-
	II	0.9	<0.7		II	1.6	-
	III	-	-		III	-	-
土茯苓	I	-	-	白附片	I	0.8	<0.7
	II	<0.7	<0.7		II	1.1	1.0
	III	-	-		III	-	-
射干	I	<0.7	1.0	火麻仁	I	-	-
	II	<0.7	1.5		II	-	0.8
	III	<0.7	0.7		III	-	-
淡豆豉	I	<0.7	-	芦子	I	<0.7	1.6
	II	1.0	-		II	0.8	1.6
	III	<0.7	-		III	-	1.6
王不留行	I	-	<0.7	苏子	I	-	<0.7
	II	-	1.1		II	1.6	1.0
	III	-	-		III	-	-
西青果	I	1.6	1.1	柏子仁	I	<0.7	<0.7
	II	1.6	1.4		II	<0.7	1.0
	III	<0.7	-		III	<0.7	0.8

表 3 发酵后抑菌活性降低的中药

中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉	中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉
白茅根	I	-	-	西洋参	I	1.2	0.9
	II	-	-		II	0.8	0.9
	III	-	0.8		III	1.3	1.3
苦参	I	<0.7	-	建菖蒲	I	1.5	<0.7
	II	0.7	-		II	1.5	1.2
	III	1.0	-		III	1.8	1.2
车前子	I	-	-	人参	I	-	-
	II	-	-		II	-	-
	III	0.7	-		III	0.7	0.7
葛根	I	-	-	炒栀子	I	-	<0.7
	II	-	-		II	-	-
白藜	III	-	<0.7	III	<0.7	-	
	II	-	-				
	III	0.7	-				

枯草芽孢杆菌的正常培养提取物对两种病原菌都有微弱的抑制作用(表 1),经微生物发酵后的中药提取物对病原菌的抑制作用可分为以下几种情况:1. 部分中药的各种处理都没有抑菌活性或抑菌活性不变,如前面提到的 15 种不具有抑菌作用的中药以及黄连、山楂、半夏、草豆蔻,部分原因可能是枯草芽孢杆菌在部分中药上不能生长(表 1);2. 有的只有在接种枯草芽孢杆菌的处理中出现抑菌活性或接种枯草芽孢杆菌的处理中活性高于未接种的中药提取物,如连翘、白附片、苏子、西青果、芦子、王不留行,可能是菌体在中药上生长并产生了抑菌活性成分,使其抑制作用强于中药单纯提取物,有的活性高于菌体正常发酵的提取物,说明中药成分对菌体产生抑菌活性成分有诱导作用,或菌体与中药本身的抑菌成分一起增强了抑菌作用,或菌体将中药中的部分非抑菌成分转化为活性成分,且有的在第二组处理,即加培养基和中药接种菌体的处理中抑菌活性更强,可能是加入培养基更有利于菌体的生长,从而产生更多抑菌活性成分的缘故,如射干、淡豆豉、芦子、柏子仁、杏仁、火麻仁(表 2);3. 有的中药在接入菌体的处理中抑菌活性低于未接种中药的处理,如西洋参、白茅根、苦参、建菖蒲、人参、车前子、葛根、白藜以及炒栀子的抑制细菌活性,原因可能是菌体将中药中的部分抑菌活性成分转化为非抑菌活性成分的缘故(表 3);4. 有的中药的发酵结果无规律,如香附、重楼、五味子、女贞子、苍耳子、延胡、莲子、鸦胆子、党参以及升麻抑制细菌的活性(表 4),对这些结果还没有合理的解释,但可能与样品处理

表 4 发酵后结果无规律的中药

中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉	中药	实验组	结核分支杆菌	棕色青霉
香附	I	-	-	重楼	I	-	-
	II	<0.7	<0.7		II	0.7	1.3
	III	<0.7	0.9		III	0.9	-
五味子	I	1.2	-	女贞子	I	0.8	-
	II	<0.7	-		II	-	-
	III	0.8	<0.7		III	-	-
升麻	I	-	0.7	苍耳子	I	-	-
	II	0.8	0.7		II	1.3	-
	III	0.8	0.7		III	<0.7	-
延胡	I	1.1	-	莲子	I	-	-
	II	-	-		II	1.3	-
	III	0.7	-		III	<0.7	-
鸦胆子	I	-	<0.7	党参	I	1.0	-
	II	1.6	0.8		II	-	-
	III	<0.7	-		III	0.8	-

过程中造成的误差有关。

### 3 讨论

以上实验表明,微生物在大部分中药中均能生长,说明中药能提供微生物生长的必需营养条件和生理调节因子。以抑菌活性为指标,结果表明部分中药发酵后活性提高,可能是由于中药化学成分对微生物产生抑菌活性成分有诱导作用,或微生物将中药的非活性成分转化为抑菌活性成分,或者微生物分解了中药中可能促进微生物生长的生理调节因子,这三种途径都将可能导致发酵产物抑菌活性的增强,另外,也不能排除微生物化学成分与中药成分有协同抑菌作用。除增效作用以外,实验也表明,部

分中药的发酵产物活性降低,可能是中药中的部分抑菌成分被微生物转化为非活性成分。因此,微生物对中药的发酵结果是不同的,既能增效,也能降低活性,或者不变,说明中药经微生物发酵后成分发生了变化,这些可为活性化合物的筛选提供丰富的资源,微生物在中药中的应用是可行的。

### 参 考 文 献

- [1] 王兴红,李旗德,曹秋娥. 微生物发酵中药应成为中药研究的新内容. 中草药,2001,32(3):267-268.

(2005-08-01 收稿)

## The Fermentation of 50 Kinds of TCMs by *Bacillus subtilis* and the Assay of Antibacterial Activities of Fermented Products

LI Guo-hong<sup>1</sup>, ZHANG Ke-qin<sup>1</sup>, SHEN Yue-mao<sup>2</sup>

(1. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, Yunnan University, Kunming 65009, China; 2. The State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

**Abstract** 50 Traditional Chinese medicines (TCMs) were fermented by *Bacillus subtilis* and the antimicrobial activities of the fermented products were assayed against *Mycobacterium tuberculosis* and *Penicillium avellaneum*. The results showed that some products of them had stronger antimicrobial activities, but some weaker than the corresponding raw materials, still some had no change, which indicated that microorganism and TCM can effect each other during fermentation.

**Key words** *Bacillus subtilis*; TCM; Fermentation; Antimicrobial activities

## PVP 包覆 $\beta$ -榄香烯口服脂质体大鼠体内药物动力学研究

张修宇,邓英杰\*,赵春杰,王秀敏,李 喆,高晓非

(沈阳药科大学药学院,辽宁沈阳 110016)

**摘要** 目的:研究 PVP 包覆的  $\beta$ -榄香烯口服脂质体在大鼠体内的药物动力学行为。方法:建立了血浆中  $\beta$ -榄香烯的分析方法,将三种药物对大鼠一次性灌胃后在不同时间眼眶取血。乙醚提取后以气相色谱法定量分析血药浓度,用统计矩方法计算药物动力学参数。结果:PVP 包覆  $\beta$ -榄香烯口服脂质体的药物动力学参数如下: $T_{1/2}$  (95.07  $\pm$  20.46) min, AUC (348.72  $\pm$  32.49)  $\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{ml}$ ,  $C_{\text{max}}$  (4.39  $\pm$  0.33)  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $T_{\text{max}}$  (60) min。结论:以普通脂质体为参比制剂时 PVP 包覆的  $\beta$ -榄香烯口服脂质体相对生物利用度为 (140.2  $\pm$  7.5)%。

**关键词** PVP(聚维酮); $\beta$ -榄香烯;脂质体;药物动力学

**中图分类号**:R285.6 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2006)02-0157-04

$\beta$ -榄香烯 ( $\beta$ -elemene,) 是从温莪术 (*Curcuma wenyujin* Chen et C. Ling) 的根茎中分离提取得到的抗癌有效单体,属于倍半萜烯类成分,具有抗肿瘤和提高机体免疫力的作用,是一种高效、低毒、有别于

传统化疗药的新型抗癌药。但现有制剂生物利用度低(腹腔注射仅为 8.49%)、刺激性较大、且口服用药时会产生胃肠道反应,影响了该药的广泛应用。脂质体作为药物的载体具有靶向性和免疫辅佐功

**基金项目**:国家新药研究基金项目(94-97-20);辽宁省教育厅重大项目计划(202043233)

**作者简介**:张修宇(1981-),男,在读硕士

\* 通讯作者:邓英杰,女,研究员,博士生导师,主要从事药物新剂型的研究。Tel:(024)23917603, E-mail:dengyingjie 45 @ yahoo. com. cn