

毛冬青中有效成分的分离及其对两种主要口腔致病菌的抑制作用

林丽萍^{1,2}, 梁敬钰², 吕 晔^{1*}

1. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 观察、追踪毛冬青抑制口腔常见致病菌(变形链球菌和具核梭杆菌)的有效部位和成分。方法 通过系统溶剂萃取、大孔树脂及硅胶柱色谱分离等方法以及质谱和核磁共振等鉴定技术, 结合液体二倍稀释法, 研究毛冬青不同部位及单体对变形链球菌和具核梭杆菌的最低抑菌浓度(MIC), 1%玉洁纯作为阳性对照药。结果 毛冬青三萜总皂苷和冬青素对两种主要口腔致病菌均具有一定的抑制作用, 特别对变形链球菌具有显著地抑制效果。结论 毛冬青三萜总皂苷和冬青素对变形链球菌具有很强的抑制作用, 具有开发成为抗龋齿的保健牙膏或药品的潜力。

关键词: 毛冬青; 三萜皂苷; 冬青素; 变形链球菌; 具核梭杆菌

中图分类号: R284.2 R988.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)06-0435-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.008

Inhibition of *Ilex pubescens* against growth of two major oral pathogens

LIN Li-ping^{1,2}, LIANG Jing-yu², LV Ye¹

1. Jiangsu Center for Research & Development of Medicinal Plants, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To study and explore the inhibitory effects of the active fractions and compounds from *Ilex pubescens* on the growth of two major oral pathogens *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) and *Streptococcus mutans* (S.m.) *in vitro*. **Methods** The *I. pubescens* extract was prepared by organic solvent method and then was separated by macroporous resin and silica gel column chromatograph methods. Sequently, the compounds were identified by the mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) methods. Finally, F.n. and S.m. were chosen as the experimental bacterial strains. The liquid media two-fold dilution method was used to study the minimum inhibitory concentration (MIC) of active fractions and compounds from *I. pubescens* with 1% triclosan as the positive control. **Results** Both the total triterpenoid saponins and ilexgenin A showed the effects on the two oral pathogens for some extent, and especially had significant inhibitory activity against S.m. **Conclusion** The total triterpenoid saponins and ilexgenin A show the significant inhibitory effect on S.m., and may develop into the toothpastes or drugs with anti-caries function.

Key words: *Ilex pubescens* Hook. et Arn.; total triterpenoid saponins; ilexgenin A; *Streptococcus mutans*; *Fusobacterium nucleatum*

牙周病和龋病都是以细菌感染为主的多因素影响下的进行性、破坏性疾病。与牙周病和龋病发生发展密切相关的细菌被称为牙周致病菌和致龋菌。重要的牙周致病菌包括: 伴放线放线杆菌(Aa)、牙龈卟啉单胞菌(Pg)、福赛坦菌(Tf)、具核梭杆菌(Fn)、中间普菌(Pi)和变黑普菌(Pn)、粘放线菌(Av)以及齿垢密螺旋菌(Td)。其中Fn是一

种专性厌氧杆菌, 常可在眼上、下的菌斑、牙周病灶以及感染根管、尖周病灶中检测到。近年来对Fn的研究逐渐深入, 一些现象也得到了解释, 同时也渐渐显露出它在尖周病, 尤其是牙周病中的重要性^[1]。此外, 多年的研究已经证实, 变形链球菌(*S. mutans* ATCC 25175, Sm)是人类龋病的始发因素, 是目前公认的最重要的致龋菌, 其在唾液和菌斑中

收稿日期: 2013-08-09

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2012378); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CX09B_284Z)

作者简介: 林丽萍(1979—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然活性成分的研究与开发。

Tel: 13851687028 Fax: (025)84347076 E-mail: llp790720@yeah.net

*通信作者 吕 晔 Tel: (025)84347076 E-mail: 1020915216@qq.com

的水平与龋的发生有高度的正相关关系^[2]。

毛冬青为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属植物 *Ilex pubescens* Hook. et Arn., 别名乌尾丁、六月霜、细叶冬青、山冬青、毛披树、水火药、火烙木等。生于山野坡地、丘陵等灌木丛中。主产广东、广西、福建、江西等地。毛冬青作为中药使用历史悠久, 曾收载于《中国药典》1977 年版。毛冬青的制剂毛冬青注射剂和毛冬青片剂曾被收载于中药部颁标准, 为心血管疾病用药, 有扩张血管及抗菌消炎作用^[3-4]。根据文献报道, 毛冬青中主要化学成分包括三萜皂苷类、酚性化合物和木脂素类、环烯醚萜类以及黄酮类, 其他成分报道较少^[5-14]。毛冬青对两种主要的致龋菌——Fn 和 Sm 是否有作用, 国内外尚鲜有报道。为此, 本实验研究了毛冬青提取物及其三萜类化合物对 Fn 和 Sm 的抑制作用, 以探讨其是否能够有效地调节口腔的菌群生态平衡, 并采用活性追踪的方法获得其中有效单体成分。

1 仪器与材料

AVANCE AV—500 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); AVANED AV—300 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Agilent 1100 LC/DAD/MSD 液质联用仪; 8 通道移液器 (德国宝格公司); 96 孔平底板 (上海坤肯生物化工有限公司); Elx808 酶标仪 (美国博腾仪器有限公司), CO₂ 培养箱 (北京中科环试仪器有限公司)。

毛冬青药材采自福建省南平地区, 由中国药科大学宋学华副教授鉴定为毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn.。玉洁纯 (Triclosan, 2, 4, 4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether) 购自 Sigma 公司; DMSO 为分析纯。

2 方法和结果

2.1 毛冬青提取物的制备

2.1.1 毛冬青提取物提取方法优化 为了优化提取方法, 以冬青素为指标性成分对其制备方法进行了对比优化, 见表 1, 实验均取毛冬青根 1 kg。结果表明 70%乙醇 80 °C 回流提取 3 h, 提取物中冬青素量最高, 为最佳工艺。

2.1.2 毛冬青提取物及部位制备 取毛冬青的根, 用 70%乙醇 80 °C 回流提取 3 h, 提取物经 D101 大孔树脂用不同比例的乙醇-水梯度洗脱, 减压浓缩, 分别得到 30% (MR-30)、50% (MR-50)、70% (MR-70) 和 95% (MR-95) 部位。

表 1 毛冬青提取物制备优化条件和结果

Table 1 Optimization of conditions and results for preparing extract of *I. pubescens*

乙醇/%	料液比/(kg·L ⁻¹)	温度/°C	时间/h	冬青素/%
50	1:1	50	1	10
60	1:10	60	5	13
70	1:3	80	3	16

2.2 毛冬青有效部位及单体的制备

得到的 MR-70 部位经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 得到毛冬青三萜总皂苷 (MG-10, 氯仿-甲醇 10:1), 其中冬青素的质量分数为 50%。再用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和反相色谱分离, 并采用质谱和核磁共振技术进行鉴定, 得到 3 个单体化合物, 分别为: 毛冬青皂苷 B₁ (MR-1)、毛冬青皂苷 B₂ (MR-2)、冬青素 (MR-3)。

2.3 单体化合物鉴定

MR-1: 无色针状结晶 (MeOH), Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阳性, 高效原位薄层酸水解检出葡萄糖和木糖; ESI-MS *m/z* 801.6 [M+Cl]⁻、765.5 [M-H]⁻, 相对分子质量为 766。¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 5.54 (1H, *t*-like, 12-H), 5.33 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1 of glc), 4.80 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1 of xyl), 4.96 (1H, s, 19-OH), 3.66 (1H, dd, *J* = 4.0, 11.7 Hz, H-3), 0.88 (3H, s), 1.07 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.11 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.25 (3H, s), 1.41 (3H, s) 和 1.72 (3H, s); ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 180.7 (C-28), 139.5 (C-13), 127.3 (C-12), 106.1 (C-1 of glc), 105.7 (C-1 of xyl), 88.8 (C-3), 71.7 (C-19), 29.8 (C-29), 28.1 (C-23), 24.4 (C-27), 17.3 (C-26), 16.7 (C-30), 16.1 (C-25), 15.5 (C-24)。综合以上信息, 经文献检索发现化合物 MR-1 与文献报道的毛冬青皂苷 B₁ 的理化和光谱数据^[15]一致, 确定化合物 MR-1 为毛冬青皂苷 B₁。

MR-2: 无色方晶 (MeOH-CH₃COCH₃), Liebermann-Burchard 反应呈阳性, Molish 反应呈阳性, 高效原位薄层酸水解检出鼠李糖、葡萄糖和木糖; ESI-MS *m/z* 935 [M+Na]⁺, 相对分子质量为 912。¹H-NMR 谱 (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.13 (1H, br s, H-12), 5.03 (1H, br s, H-1 of rha), 4.80 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1 of glc), 4.15 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-1 of xyl), 0.70 (3H, s), 0.75 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.89 (3H, d, *J* = 7.2 Hz), 1.01 (3H, s), 1.03 (3H, s), 1.27 (3H, s) 和 1.09 (3H, d, *J* = 6.2 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz,

Pyridine- d_5) δ : 180.7 (C-28), 139.5 (C-13), 127.3 (C-12), 105.7 (C-1 of xyl), 102.4 (C-1 of glc), 102.0 (C-1 of rha), 89.5 (C-3), 73.4 (C-19), 29.8 (C-29), 28.4 (C-23), 24.4 (C-27), 19.0 (C-6 of rha), 17.3 (C-26), 16.8 (C-30), 16.1 (C-25), 15.5 (C-25)。综合以上信息, 经文献检索发现化合物 MR-2 与文献报道的毛冬青皂苷 B₂ 的理化和光谱数据^[16]一致, 确定化合物 MR-2 为毛冬青皂苷 B₂。

MR-3: 白色无定形粉末 (CHCl₃·CH₃OH), Liebermann-Burchard 反应阳性, Molish 反应阴性, ESI-MS m/z 501 [M-H]⁻, 相对分子质量为 502, 以及高分辨质谱 HR-ESI-MS m/z 525 [M+Na]⁺ 给出化合物分子式为 C₃₀H₄₆O₆。¹H-NMR (500 MHz, Pyridine- d_5) δ : 5.61 (1H, *t*-like, H-12), 3.05 (1H, s, H-18), 3.35 (1H, dd, *J* = 4.4, 12.0 Hz, H-3), 1.13 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.45 (3H, s), 1.75 (3H, s), 1.71 (3H, s), 1.11 (3H, d, *J* = 6.6 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, Pyridine- d_5) δ : 180.6 (C-24), 180.8 (C-28), 140.0 (C-13), 128.2 (C-12), 78.4 (C-3), 72.7 (C-19), 24.5 (C-23), 17.2 (C-26), 24.7 (C-27), 27.2 (C-29), 16.8 (C-30), 13.9 (C-25)。经文献检索发现化合物 MR-3 与文献报道的冬青素的理化和光谱数据^[17]一致, 确定化合物 MR-3 为冬青素。

2.4 抑菌效果测试

2.4.1 实验菌株及菌液的制备 受试菌 Sm、Fn 从

-75 °C 的冰箱中取冻存管菌种进行活化培养 24 h。MIC 起始浓度: 0.5~1 ng/L。

2.4.2 培养基配制 胰蛋白胨磷酸盐肉汤和胰蛋白胨磷酸盐营养肉汤、生理盐水制备参照《中国药典》2010 年版二部。

2.4.3 MIC 测定方法 配制 1% 的待测活性物质溶液, 采取液体试管二倍稀释法^[18]稀释制备样品。以 DMSO 作为溶剂, 同时也为实验的阴性对照。以含 1% 玉洁纯 (Triclosan) 的 DMSO 溶液作为阳性对照。将经过培养的细菌用相应的已经高温高压灭菌的液体培养基稀释, 将细菌的菌液密度调节到 1.0×10^8 CFU/mL 并加入到相应的样品中去。然后将 96 孔板置于合适的培养箱中培养, Sm 是兼性厌氧菌置于 CO₂ 培养箱中培养, Fn 是专性厌氧菌则需置于厌氧培养箱或厌氧培养盒中培养。培养温度均为 37 °C, 培养 24 h, MIC 值 ≤ 500 表示对细菌具有一定的抑制效果。数据均为 3 次测试结果的平均值, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 SPSS 11.0 统计软件中的独立样本 *t* 检验。

2.5 抑菌实验结果

由表 2 可知, 毛冬青 MR-70 和 MG-10 (毛冬青三萜总皂苷) 对两种主要口腔致病菌的抑制效果最好, 为毛冬青抑制口腔菌的有效部位。而分离得到的 3 种单体成分中冬青素的抑菌效果最好, 为毛冬青抑制口腔菌的有效成分。

表 2 毛冬青各部位及单体对 Sm 和 Fn 的最低抑菌浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 MIC of active fractions and monomer compounds from *I. pubescens* ($\bar{x} \pm s$)

样品	MIC / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)		样品	MIC / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	Sm	Fn		Sm	Fn
MR-1	>500	>500	MR-50	>500	>500
MR-2	462.0* $\pm$ 0.02	>500	MR-70	214.5** $\pm$ 0.03	326.1** $\pm$ 0.03
MR-3	7.8** $\pm$ 0.07	145.0** $\pm$ 0.10	MR-95	456.4* $\pm$ 0.05	500.3* $\pm$ 0.02
MR-30	>500	>500	MG-10	12.5** $\pm$ 0.07	298.7** $\pm$ 0.09
阳性对照	5.3** $\pm$ 0.03	28.1** $\pm$ 0.05	阴性对照	>500	>500

与阴性对照组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs negative control group

3 讨论

通过研究, 确认了毛冬青的有效部位为毛冬青三萜总皂苷。其中 MG-10 与 MR-70 相比, 皂苷得到进一步富集, 因此活性也更好。以 MG-10 为起点, 发现其中含量最高且活性最好的抑菌有效成分 MR-3 是毛冬青抑菌的物质基础, 可以作为毛冬青抑制口腔细菌有效部位质量监控的指标性成分。

龋病是最常见的口腔疾病之一, 已经证明, 菌斑微生物是龋病的主要致病因素, 因此, 减小或去除菌斑在预防或降低龋病中必不可少^[19]。早在 20 世纪 80 年代初期, 日本学者 Namba 等^[20]对常见的中草药进行了大量筛选, 并作了一系列研究, 发现黄连、厚朴、日本厚朴、五倍子等对变形链球菌有明显的抑菌作用, 从此为中药防龋研究开辟了广阔

的前景。而本研究的意义在于进一步拓展了中药防龋资源,并为毛冬青的进一步开发利用提供理论和物质基础。

参考文献

- [1] 倪龙兴, 李洁, 史俊南. 具核梭杆菌 [J]. 口腔医学, 1994, 14(3): 160.
- [2] 洪潇, 胡德渝. 变形链球菌检测技术新进展 [J]. 广东牙病防治, 2009, 17(11): 565-568.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 2006.
- [4] 熊天琴, 陈元元, 李红侠, 等. 毛冬青皂苷 B3 的抗血栓作用研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1785-1788.
- [5] 曾陇梅, 苏镜娱, 张树德. 毛冬青苷甲的结构研究 (I) [J]. 高等学校化学学报, 1984, 5(4): 503-508.
- [6] 蒋仲芳, 黄柔湘, 秦国伟, 等. 毛冬青化学成分的研究 III. 四种三萜皂苷的分离和鉴定 [J]. 中草药, 1991, 22(7): 291-294.
- [7] Wang J R, Zhou H, Jiang Z H, et al. Two new triterpene saponins from the anti-inflammatory saponin fraction of *Ilex Pubescens* root [J]. *Chem Biolodiv*, 2008, 5(7): 1369-1373.
- [8] 冯峰, 朱明晓, 谢宁. 毛冬青化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 732-734.
- [9] 姜一平, 冯峰, 谢宁, 等. 毛冬青的化学成分 [J]. 药学与临床研究, 2008, 16(3): 163-165.
- [10] Feng F, Zhu X M, Liu W Y, et al. Two new triterpene saponins from the root of *Ilex Pubescens* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(1): 71-75.
- [11] Zhang C X, Lin C Z, Xiong T Q, et al. New triterpene saponins from the root of *Ilex pubescens* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 788-792.
- [12] Wang J R, Zhou H, Jiang Z H, et al. *In vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of purified saponin fraction derived from the root of *Ilex pubescens* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 643-650.
- [13] 赵钟祥, 曾瑞鑫, 金晶, 等. 毛冬青根中的新三萜皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1267-1269.
- [14] 张倩. 毛冬青茎的化学成分研究 [D]. 南京: 中国药科大学, 2010.
- [15] 尹文清, 周中流, 邹节明, 等. 毛冬青根中化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 995-997.
- [16] Hidaka K, Ito M, Matsuda Y, et al. New triterpene saponins from *Ilex pubescens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(2): 524-529.
- [17] Hidaka K, Ito M, Matsuda Y, et al. A triterpene and saponin from roots of *Ilex Pubescens* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(7): 2023-2027.
- [18] 李仲兴. 临床细菌学 [M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [19] Joann L D, Sigmund S S. Comparative *in vitro* activity of sanguinarine against oral microbial isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985, 27(4): 663-665.
- [20] Namba T, Tsunozuka M, hattori M. Dental caries prevention by traditional Chinese medicines part II. Potent antibacterial action of magnoliae cortex extracts against *Streptococcus mutans* [J]. *Planta Med*, 1982, 44: 100-106.