

文章编号:1001-6880(2016)5-0707-06

# 基于成分敲除/敲入研究广藿香油抗菌主要药效物质

赵思蕾<sup>1,2</sup>,熊亮<sup>1,2</sup>,王振强<sup>1,2</sup>,林美斯<sup>1</sup>,杨华蓉<sup>2</sup>,林大胜<sup>1,2\*</sup>,傅超美<sup>1\*</sup><sup>1</sup>成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地,成都 611137;<sup>2</sup>成都华神集团股份有限公司,成都 610075

**摘要:**为研究广藿香油抗菌主要药效物质,遵循成分敲除/敲入研究模式,以百秋季醇与广藿香酮为目标成分,用广藿香油制备百秋季醇与广藿香酮不同含量比例的样品;采用琼脂平板二倍稀释法,分别测定各样品对6种革兰氏阳性菌种及5种革兰氏阴性菌种的最低抑菌浓度(MIC);采用SAS 9.2软件对所得数据进行一元方差分析,并采用SNK法(*q*检验)联合析因设计进行两两比较分析。实验结果表明广藿香油抗菌效果显著优于敲除目标成分后的阴性样品,但阴性样品仍具有一定的抗菌效果;广藿香油与阳性对照样品(单体百秋季醇:广藿香酮=2:1)、百秋季醇单体、广藿香酮单体之间,其整体抗菌效果基本相当;但百秋季醇对革兰氏阳性菌的抑制作用均优于广藿香酮,广藿香酮对革兰氏阴性菌的抑制作用均优于百秋季醇;且两目标成分不同比例配伍的广藿香油对不同菌种的抗菌效果略有差异。由此可见,百秋季醇与广藿香酮为广藿香油的主要抗菌活性物质,百秋季醇、广藿香酮对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌抑制作用有所差异,且两者比例差异对广藿香油抗菌作用有一定影响,随着广藿香酮比例的增加,对革兰氏阳性菌抗菌活性有下降趋势,对革兰氏阴性菌的抗菌活性有增加趋势。

**关键词:**广藿香油;敲除/敲入;百秋季醇;广藿香酮;抗菌

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.012

## Analysis of Main Antibacterial Components in Patchouli Oil Based on Constituent Knock-out/Knock-in

ZHAO Si-lei<sup>1,2</sup>, XIONG Liang<sup>1,2</sup>, WANG Zhen-qiang<sup>1,2</sup>, LIN Mei-si<sup>1</sup>,  
YANG Hua-rong<sup>2</sup>, LIN Da-sheng<sup>1,2\*</sup>, FU Chao-mei<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China;<sup>2</sup>Chengdu Huasun Group Company Limited, Chengdu 610075, China

**Abstract:** To analysis the main antibacterial components in patchouli oil, based on the principle of Knock-out/Knock-in, aiming at the two targeted components (patchouli alcohol and patchoulenone), different samples containing different content and proportion of patchouli alcohol and patchoulenone were prepared. Minimal inhibitory concentration (MIC) of the samples against 6 gram-positive bacteria and 5 gram-negative bacteria were detected by standard ager dilution method. SAS 9.2 software was adopted to do univariate ANOVA, and each different two groups of data were compared by SNK method (*q*-test) combined with factorial design. The results showed that antibacterial effect of original patchouli oil were significantly better than the knocked-out negative sample; the knocked-out negative sample still remained a certain of antibacterial effect though the effect was decreased to some degree; the original patchouli oil, the positive sample (patchouli alcohol: patchoulenone = 2:1), patchouli alcohol and patchoulenone had almost the same effect; the antibacterial effect of patchouli alcohol against gram-positive bacteria was better than patchoulenone, while patchoulenone showed better effect than patchouli alcohol against gram-negative bacteria; patchouli oil with different proportion achieved quit different

antibacterial effect. In conclusion, although other unknown components remain a certain degree of antibacterial effect, patchouli alcohol and patchoulenone were the main antibacterial components of patchouli oil; the two targeted compounds performed quite different activity against gram-positive bacteria and gram-negative bacteria; the effect of pat-

收稿日期:2015-11-04

接受日期:2016-01-12

基金项目:四川省重大科研支撑项目(2012JY114);四川省教育厅  
自然科学重点项目(15ZA0084);四川省杰出青年基金  
(2015JQ0030)\*通讯作者 Tel: 86-013608016081; E-mail: hoistlds@vip.sina.com;  
chaomeifu@126.com

chouli oil slightly changed by adjust the proportion between the two targeted compounds; with the proportion of patchoulenone increasing, the antibacterial effect trend to decrease for gram-positive bacteria and trend to increase for gram-negative bacteria.

**Key words:** patchouli oil; Knock-out/Knock-in; patchouli alcohol; patchoulenone; antibacterial

广藿香药材为唇形科植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分,为临床常用的芳香化湿药,具有芳香化浊,和中止呕,发表解暑的功效<sup>[1]</sup>。广藿香油为广藿香干燥地上部分经水蒸气蒸馏提取的挥发油<sup>[1]</sup>,现代研究表明,广藿香油具有抗菌<sup>[2,3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>等药理作用,《中国药典》2015 版一部及部颁中成药标准中共收载 18 个以广藿香油入药品种,其中包括畅销中成药“藿香正气口服液”、“藿香正气水”、“藿香正气软胶囊”等<sup>[6]</sup>。同时,广藿香油还作为生产配料被广泛运用于化妆品、杀虫剂等日常生活用品<sup>[7]</sup>。广藿香油具有明显的抗菌效果<sup>[8]</sup>,百秋季醇(即广藿香醇)和广藿香酮是广藿香油中的主要组分<sup>[9]</sup>,研究表明两者均具有一定的抗菌活性<sup>[10,11]</sup>,但目前尚缺乏相关研究证明百秋季醇与广藿香酮是否为广藿香油抗菌主要药效物质。借鉴“基因敲除/敲入”策略,“成分敲除/敲入”采用活性成分逐步敲除敲入方式以中药整体为研究对象,通过确立的经济、灵敏、高通量的药效评价模式对敲出的目标成分、阴性样品与中药整体的生物活性进行评价,辨识中药关键药效组分,并探寻各成分之间存在的相互作用关系<sup>[12]</sup>。本实验遵循“成分敲除/敲入”研究模式,以百秋季醇与广藿香酮为目标成分,探究其在广藿香油中所发挥的整体抗菌药效作用,为研究广藿香油中主要抗菌药效物质提供科学依据,旨在以物质基础与药理作用相结合的方式,为广藿香药材及广藿香油质量控制开辟新思路,同时为开发高效、低毒、天然的广藿香油抗菌药物提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 主要仪器

气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890A/5975C);多点接种仪(MIT-P型,日本佐久间制作所),比浊仪(BioMérieux Inc., DensiChek),上海申安立式自动电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-40SBI),二氧化碳培养箱(MOC-15A,SANYO),节能净化工作台(成都新光非兰特净化工程有限公司)。

### 1.2 试药与试剂

广藿香油(成都华神集团股份有限公司制药厂

提供,批号:20131127);百秋季醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110772201407);广藿香酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111822201102);百秋季醇单体(实验室自制,99.92%),百秋季醇单体(实验室自制,99.97%);正己烷(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);二甲基亚砜(成都贝斯特试剂有限公司);吐温-80(四川金山制药有限公司);生理盐水(实验室自制)。

### 1.3 菌种及培养基

菌种:①标准株:大肠埃希菌标准株 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923,由四川抗菌素工业研究所提供;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌标准株 ATCC43300,购自美国临床实验室标准化协会(CLSI)。②临床分离株:金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、肠球菌、嗜麦芽假单胞菌、沙门菌、变形杆菌、支气管败血鲍特菌,于 2013 年 1 月~2014 年 6 月由成都中医药大学附属医院临床科室分离所得。试验菌株种类、编号及数量见表 1。

培养基:Mueller-Hinton agar(OXOID),营养琼脂。

## 2 实验方法

### 2.1 敲除敲入法制备试验样品

百秋季醇、广藿香酮的敲除及广藿香油阴性样品制备:取广藿香油 10.0 g,按照文献方法<sup>[13]</sup>得到广藿香酮单体 1.4 g,再将不含广藿香酮的广藿香油通过柱色谱分离,得到百秋季醇单体 2.1 g,将不含有百秋季醇和广藿香酮的广藿香油合并,得到广藿香油阴性样品 5.9 g。

不同比例配伍的广藿香油样品制备:根据含量测定结果,在广藿香油阴性样品中按比例敲入百秋季醇与广藿香酮单体,使目标成分达到所需比例(百秋季醇:广藿香酮 = 2:1、1:1、1:2),且目标成分总含量达到 60 ± 3%。

阳性对照样品:由百秋季醇与广藿香酮单体按 2:1 比例混合即得(通过查阅文献资料与前期试验研究发现,广藿香油中百秋季醇与广藿香酮含量比例因产地、采收季节、提取部位等因素变化而变化,

表 1 试验菌株种类、拉丁名、编号及数量

Table 1 Species, latin name, number and amount of tested strains

| 试验菌种<br>Experimental strains | 拉丁名<br>Latin name  | 菌株编号<br>No. | 株数<br>Amount |
|------------------------------|--|-------------|--------------|
| 革兰氏阳性菌 G +                   | 耐甲氧西林金葡菌标准株<br><i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> Rosenbach( MRSA) | 1           | 2            |
|                              | 金葡菌标准株<br><i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach                                   | 2           | 2            |
|                              | 金葡菌分离株<br><i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach                                   | 3           | 6            |
|                              | 腐生葡萄球菌分离株<br><i>Staphylococcus saprophyticus</i>                                   | 4           | 2            |
|                              | 表皮葡萄球菌分离株<br><i>Staphylococcus epidermidis</i>                                     | 5           | 2            |
|                              | 肠球菌分离株<br><i>Enterococcus</i>  | 6           | 3            |
| 革兰氏阴性菌 G -                   | 大肠埃希菌标准株<br><i>Escherichia coli</i>  | 7           | 2            |
|                              | 沙门菌分离株<br><i>Salmonella enterica</i>   | 8           | 2            |
|                              | 嗜麦芽假单胞菌分离株<br><i>Pseudomonas maltophilia</i>                                       | 9           | 2            |
|                              | 变形杆菌分离株<br><i>proteusbacillus vulgaris</i>   | 10          | 2            |
|                              | 支气管败血鲍特菌分离株<br><i>Bordetella bronchiseptica</i>                                    | 11          | 2            |

其变化范围一般为 2:1~1:2 之间,但其比例主要集中在 2:1 左右,因此选用 2:1 作为阳性对照样品比例)。

## 2.2 含量测定方法

色谱条件:色谱柱为 HP-5 石英毛细管色谱柱 (30 m × 320 mm, 0.25 μm), 溶剂延迟 4 min; 进样口温度 250 °C; 流速 1.2 mL/min; 分流比 100:1; 程序升温: 起始 130 °C, 2 °C/min 升温至 140 °C, 1 °C/min 升温至 160 °C, 再以 20 °C/min 升温至 230 °C; 进样量 0.2 μL; 载气为高纯度氦气。

质谱条件: EI 源, 轰击电压 70 eV; 离子源温度 250 °C, 采用全扫描方式获得混合标准溶液的总离子流色谱图, 确定各目标化合物的保留时间和特征离子; 再进行选择离子检测(SIM)定量, 定量检测选择离子: 百秋季醇( $m/z$  222.2, 138.1, 83.1); 广藿香酮( $m/z$  224.1, 168.1, 153.0); 正十八烷( $m/z$  254.3, 71.1, 57.1)。以内标法同时测定百秋季醇与广藿香酮含量。

## 2.3 体外抗菌试验方法

采用琼脂平板二倍稀释法, 分别测定所得试验样品对受试菌株的体外抑菌效果, 以最低抑菌浓度(MIC)作为其抑菌效果的判定标准。具体方法参考美国临床实验室标准化协会(CLSI, 2006 年版)抗微生物药物敏感性试验执行标准<sup>[14]</sup>。

含药平板制备: 分别量取各个试验样品 1 mL, 分别加入 1 mL 吐温-80 进行稀释, 按二倍稀释法分

别将药物稀释成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 共 11 个梯度, 在一次性无菌培养皿中分别加入不同浓度梯度的稀释药液 1 mL 和 14 mL 灭菌的 MH 培养基, 充分混匀, 使药物在平板中的浓度为 1/30, 1/60, 1/120, 1/240, 1/480, 1/960, 1/1920, 1/3840, 1/7680, 1/15360, 1/30720, 平板自然干燥后备用; 分别称取单体 1 g, 加入 1 mL 二甲基亚砜进行稀释, 同法制备含不同浓度梯度的单体平板。平板内分别用无菌生理盐水、吐温-80 和二甲基亚砜各 1 mL 代替药物制备溶剂对照平板。

菌液配置: 将各标准株和临床分离株用无菌生理盐水调至菌液浓度  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL。

最低抑菌浓度(MIC)测定及结果判定: 采用多点接种仪将菌液加入不同浓度梯度的含药平板, 并以生理盐水代替菌液作阴性对照平板。37 °C 恒温培养 18~24 h, 观察各菌株在含不同浓度梯度药物平板中的生长情况。以无细菌生长平板内药物的最小浓度为药物对该菌株的 MIC。

## 3 结果与分析

### 3.1 目标成分相对含量测定结果

广藿香油样品及所制得的 7 个试验样品分别采用 GC-MS 内标法测得百秋季醇与广藿香酮的含量, 其结果见表 2, 样品 GC-MS 总离子流图见图 1。

表 2 试验样品含量测定结果  
Table 2 Content determination of test samples

| 试验样品<br>Tested samples  | 相对百分含量 Relative content(%) |                       |  |
|---|----------------------------|-----------------------|--|
|   | 百秋季醇<br>Patchouli alcohol  | 广藿香酮<br>Patchoulenone | 百秋季醇 + 广藿香酮<br>Patchouli alcohol + Patchoulenone |
| 阳性对照样品(百:广 = 2:1)<br>Positive control group(Patchouli alcohol: Patchoulenone = 2:1) | 66.70                      | 33.30                 | 100.00   |
| 百秋季醇<br>Patchouli alcohol   | 99.92                      | 0                     | 99.92  |
| 广藿香酮<br>Patchoulenone   | 0                          | 99.97                 | 99.97  |
| 广藿香油<br>Patchouli oil   | 20.71                      | 15.32                 | 36.03  |
| 阴性样品(敲除后)<br>Negative sample(knock-out)   | 0.00                       | 0.00                  | 0.00   |
| 2:1 配伍广藿香油<br>2:1 matched patchouli oil   | 39.10                      | 20.05                 | 59.15  |
| 1:1 配伍广藿香油<br>1:1 matched patchouli oil   | 32.73                      | 29.33                 | 62.06  |
| 1:2 配伍广藿香油<br>1:2 matched patchouli oil   | 19.44                      | 39.78                 | 59.22  |

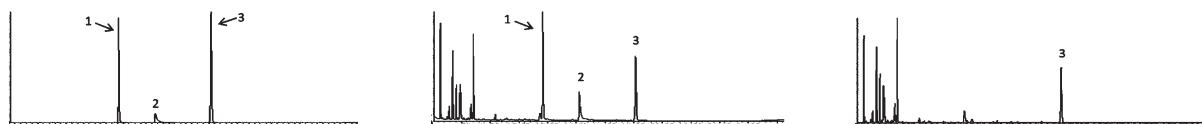


图 1 阳性对照样品(A)、广藿香油(B)及阴性样品(C)的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of positive sample(A), patchouli oil sample(B) and negative sample(C)

注:1号峰为百秋季醇,2号峰为广藿香酮,3号峰为内标物正十八烷

Note: peak 1 was patchouli alcohol, peak 2 was patchoulenone, peak 3 was octadecane as the internal standard

### 3.2 体外抗菌作用

试验样品的体外抑菌实验分别测得的 MIC 值,结果见表 3。

### 3.3 数据统计结果

采用 SAS 9.2 软件对所测得的 MIC 值进行一元方差分析,结果见表 3,采用 SNK 法(*q* 检验)联合析因设计进行两两比较,结果见表 4。

结果表明,广藿香油抗菌效果显著优于阴性样品,两者对 2 ( $P < 0.001$ )、3 ( $P < 0.05$ )、4 ( $P < 0.001$ )、5 ( $P < 0.001$ )、6 ( $P < 0.001$ )、10 ( $P < 0.001$ )、11 ( $P < 0.01$ ) 号菌株的 MIC 平均值有统计学差异,广藿香油对 7 号菌株具有一定的抗菌活性 ( $MIC = 2.95 \pm 1.39 \text{ mg/mL}$ ),而阴性样品对 7 号菌株未检测出抗菌活性。阳性对照样品与广藿香油抗菌效果基本相当,除 8 号菌株外,对其它 10 种菌株的 MIC 平均值无统计学差异。百秋季醇与广藿香

酮两单体之间,整体抗菌效果基本相当,两者对 11 种菌株 MIC 平均值无统计学差异;但百秋季醇对 6 种阳性菌株的 MIC 平均值均小于广藿香酮,广藿香酮对 7 种阴性菌株的 MIC 平均值均小于百秋季醇。在不同比例配伍样品中,2:1 样品与 1:1 样品抗菌效果基本相当,两者 MIC 平均值无统计学差异;2:1 样品对 2 ( $P < 0.01$ )、3 ( $P < 0.01$ )、5 ( $P < 0.001$ ) 号菌株的抗菌效果优于 1:2 样品,其 MIC 平均值有统计学差异;1:1 样品对 2 ( $P < 0.05$ )、3 ( $P < 0.01$ )、5 ( $P < 0.001$ ) 号菌株的抗菌效果优于 1:2 样品,其 MIC 平均值有统计学差异。

### 4 结论与讨论

本试验首次采用成分“敲除/敲入”模式,以百秋季醇与广藿香酮为目标成分,通过琼脂平板二倍稀释体外抗菌试验,研究广藿香油主要抗菌药效物

表 3 8 种样品 MIC 平均值及标准差

Table 3 The average value and standard deviation of MIC of 8 samples

| 菌种编号<br>No. | Mean ± SD (MIC)   |                           |                       |                       |                                |   |   |   |             |
|-------------|---|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|---|---|---|-------------|
|             | 阳性对照样品<br>(百:广=2:1)   |                           |                       |                       | 阴性样品<br>(敲除后)                  |   |   |   |             |
|             | Positive control<br>(Patchouli alcohol:<br>Patchoulenone = 2:1) | 百秋李醇<br>Patchouli alcohol | 广藿香酮<br>Patchoulenone | 广藿香油<br>Patchouli oil | Negative sample<br>(knock-out) | 2:1 配伍<br>广藿香油<br>2:1 matched patchouli oil | 1:1 配伍<br>广藿香油<br>1:1 matched patchouli oil | 1:2 配伍<br>广藿香油<br>1:2 matched patchouli oil |             |
| 革兰氏阳性菌 G +  | 1   | 0.13                      | 0.13                  | 0.52                  | 0.62 ± 0.52                    | 1.47 ± 0.69                                 | 0.52  | 0.78 ± 0.37                                 | 1.59 ± 0.75 |
|             | 2   | 0.13                      | 0.10 ± 0.05           | 0.39 ± 0.18           | 0.37 ± 0.17                    | 1.96  | 0.52  | 0.78 ± 0.37                                 | 1.59 ± 0.75 |
|             | 3   | 0.13                      | 0.10 ± 0.04           | 0.39 ± 0.34           | 0.74 ± 0.38                    | 1.31 ± 0.51                                 | 0.52  | 0.61 ± 0.21                                 | 1.19 ± 0.78 |
|             | 4   | 0.13                      | 0.13                  | 1.03                  | 0.98                           | 11.73 ± 5.53                                | 1.29 ± 1.09                                 | 0.78 ± 0.37                                 | 2.12        |
|             | 5   | 0.13                      | 0.06                  | 0.52                  | 0.98                           | 3.91  | 0.52  | 0.52  | 1.59 ± 0.75 |
|             | 6   | 0.13                      | 0.11 ± 0.04           | 0.43 ± 0.15           | 0.65 ± 0.28                    | 5.97 ± 0.94                                 | 0.69 ± 0.29                                 | 0.69 ± 0.30                                 | 1.06        |
| 革兰氏阴性菌 G -  | 7   | 1.60 ± 0.76               | 2.05                  | 0.78 ± 0.36           | 2.95 ± 1.39                    | -   | 5.16 ± 4.38                                 | 3.11 ± 1.47                                 | 2.65 ± 2.24 |
|             | 8   | 4.26                      | 4.10                  | 2.06                  | -                              | -   | 20.62 ± 17.49                               | 6.22 ± 2.93                                 | -           |
|             | 9   | 0.20 ± 0.10               | 0.51                  | 0.20 ± 0.09           | 3.93                           | 5.87 ± 2.76                                 | 4.12  | 1.04  | 3.12 ± 1.49 |
|             | 10  | 4.26                      | 6.15 ± 2.89           | 0.52                  | 11.78 ± 5.55                   | 31.28                                       | 12.37 ± 5.83                                | 4.15  | 6.35 ± 2.99 |
|             | 11  | 0.20 ± 0.10               | 0.51                  | 0.26                  | 0.98                           | 5.87 ± 2.76                                 | 1.55 ± 0.73                                 | 0.52  | 1.06        |

表 4 SNK 法联合析因设计两两比较结果

Table 4 The compared analysis results of SNK method combined with factorial design

| 菌种编号<br>No. | 阳性对照样品<br>(百:广=2:1)   |                           |                       |                       | 阴性样品<br>(敲除后)                  |   |   |   |         |
|-------------|---|---------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|---|---|---|---------|
|             | Positive control<br>(Patchouli alcohol:<br>Patchoulenone = 2:1) | 百秋李醇<br>Patchouli alcohol | 广藿香酮<br>Patchoulenone | 广藿香油<br>Patchouli oil | Negative sample<br>(knock-out) | 2:1 配伍<br>广藿香油<br>2:1 matched patchouli oil | 1:1 配伍<br>广藿香油<br>1:1 matched patchouli oil | 1:2 配伍<br>广藿香油<br>1:2 matched patchouli oil |         |
|             |   | A                         | A                     | A                     | A                              | A   | A   | A   |         |
| 革兰氏阳性菌 G +  | 2   | B                         | B                     | B                     | B                              | A * * *                                     | B   | B   | A▲▲■    |
|             | 3   | C                         | C                     | B C                   | B                              | A *   | B C   | B C   | A▲▲■■   |
|             | 4   | B                         | B                     | B                     | B                              | A * * *                                     | B   | B   | B       |
|             | 5   | C                         | C                     | C                     | C B                            | A * * *                                     | C   | C   | B▲▲▲■■■ |
|             | 6   | B                         | B                     | B                     | B                              | A * * *                                     | B   | B   | B       |
|             | 7   | A                         | A                     | A                     | A                              | -   | A   | A   | A       |
| 革兰氏阴性菌 G -  | 8   | A                         | A                     | A                     | -                              | -   | A   | A   | -       |
|             | 9   | B                         | B                     | B                     | A B                            | A   | A B   | B   | A B     |
|             | 10  | B                         | B                     | B                     | B                              | A * * *                                     | B   | B   | B       |
|             | 11  | B                         | B                     | B                     | B                              | A * *                                       | B   | B   | B       |

注:相同字母的组间差别没有统计学意义,不包含相同字母的组间差别有统计学意义;其中阴性样品与广藿香油比较结果“\*”代表  $P < 0.05$ ,“\*\*”代表  $P < 0.01$ ,“\*\*\*”代表  $P < 0.001$ ;1:2 配伍与 2:1 配伍比较结果“▲”代表  $P < 0.05$ ,“▲▲”代表  $P < 0.01$ ,“▲▲▲”代表  $P < 0.001$ ;1:1 配伍与 2:1 配伍比较结果“■”代表  $P < 0.05$ ,“■■”代表  $P < 0.01$ ,“■■■”代表  $P < 0.001$

Note: groups with same letter indicated no statistical significance among them, different letter indicated statistical significance exist; the comparing result between negative sample and patchouli oil: “\*” represented  $P < 0.05$ , “\*\*” represented  $P < 0.01$ , “\*\*\*” represented  $P < 0.001$ ; the comparing result between 1:2 matched and 2:1 patchouli oil: “▲” represented  $P < 0.05$ , “▲▲” represented  $P < 0.01$ , “▲▲▲” represented  $P < 0.001$ ; the comparing result between 1:1 matched and 2:1 patchouli oil: “■” represented  $P < 0.05$ , “■■” represented  $P < 0.01$ , “■■■” represented  $P < 0.001$ .

质,该模式能较好地体现中医药的整体观、系统观以及多成分协同或拮抗作用的特点<sup>[12]</sup>。由试验结果分析可见:首先,与广藿香油相比,敲除百秋李醇和

广藿香酮后的广藿香油阴性样品抗菌活性明显下降,证明两者不仅是广藿香油中的主要组成部分,同时也是主要抗菌药效物质;其次,敲除目标成分后的

广藿香油阴性样品依然具有一定的抗菌活性,证明除百秋李醇与广藿香酮以外,广藿香油中其它成分或组分也具有一定的抗菌活性;第三,百秋李醇与广藿香酮的抗菌效果整体上基本相当,但百秋李醇对革兰氏阳性菌的抑制作用优于广藿香酮,广藿香酮对革兰氏阴性菌的抑制作用优于百秋李醇;第四,在广藿香油的基础上,敲入百秋李醇与广藿香酮,随着含量比例的变化,整体抗菌效果差异不大,但是随着广藿香酮含量比例的增加,对革兰氏阳性菌抗菌效果有下降趋势,对革兰氏阴性菌抗菌效果有增加趋势,此趋势与结论三相符合;第五,广藿香油对革兰氏阳性菌的抗菌效果强于对革兰氏阴性菌的抗菌效果,与文献<sup>[15]</sup>所报道的试验结果一致。

《中国药典》2015 版一部中“广藿香药材”及“广藿香油”<sup>[1]</sup>药品标准中均仅以百秋李醇作为含量指标进行质量控制。根据本次研究结果,百秋李醇与广藿香酮均为广藿香油中主要抗菌药效物质,提示对广藿香药材、广藿香油的质量控制,应当建立百秋李醇与广藿香酮双含量控制标准。此原则对制定广藿香药材、广藿香油药品标准,以及广藿香油有关药物的研究开发都具有重要的科学指导意义。由于试验中敲除目标成分后的广藿香油阴性样品仍然具有一定的抗菌活性,因此,项目组目前正采用植化分离分析与药理活性示踪相结合的方法,继续探寻广藿香油中其它未知的抗菌活性成分,以期为广藿香药材及广藿香油相关药物开发奠定更多的科学基础。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I ,45,397.
- 2 Abe S,Sato Y,Inoue S,et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 2003 ,44:285-291.
- 3 Dai M,Peng C,Wan F, et al. Antibacterial activity and mechanism of *Pogostemon cablin* against bacteria from milk of dairy cows suffering with mastitis. *J Anim Vet Adv*,2012, 11:3289-3297.
- 4 Wei XL(魏晓露),Peng C(彭成),Wan F(万峰). Study on the effect of anti-respiratory viruses of patchouli oil *in vitro*. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床),2012, 28:65-68.
- 5 Hussin N,Mondello L,Costa R,et al. Quantitative and physical evaluation of patchouli essential oils obtained from different sources of *Pogostemon cablin*. *Nat Prod Commun*, 2012,7:927.
- 6 Chen MW,Zhang JM,Lai YF,et al. Analys is of *Pogostemon cablin* from pharmaceutical research to market performances. *Expert Opin Investig Drugs*,2013 ,22:245-257.
- 7 Jia XL(贾旭玲),Xu S(徐三),Shi F(施芬),et al. Research progress of *Pogostemon cablin*. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊),2010,28:2442-2444.
- 8 Wan F(万峰),Peng C(彭成),Cao XY(曹小玉),et al. Antibacterial activity and mechanism of essential oil from *Pogostemon cablin* against *Staphylococcus aureus*. *Chin Tradit Patent Med*(中成药),2014,36:1376-1381.
- 9 Wei G(魏刚),Fu H(符红),Wang SY(王淑英),et al. Study on characteristic fingerprint of volatile oil of *Pogostemon cablin*(Blanco) Benth by GC-MS. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2002,24:407-410.
- 10 Mirko W,Anja S,Bockmuehl AB,et al. Agents agaains micro-organisms containing patchouli oil, patchouli alcohol and/or the derivatives. US:0134239 A1 ,2006-6-22.
- 11 Li YC,Liang HC,Chen HM,et al. Anti-candida albicans activity and pharmacokinetics of pogostone isolated from *Pogostemonis Herba*. *Phytomedicine*,2012 ,20:77-83.
- 12 Xiao XH(肖小河),Yan D(鄢丹),Yuan HL(袁海龙),et al. The novel patterns of efficient constituent recognition and quality control for Chinese medicines based on component knock-out & knock-in. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药), 2009,40:1345-1488.
- 13 Li XH(李小红),Peng C(彭成),Zhou QM(周勤梅),et al. A method of rapid isolation and purification of patchouli alcohol and pogostone from patchouli oil. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药与临床),2013 ,4:4-6.
- 14 Sun CG(孙长贵). M100-S16 抗微生物药物敏感性试验执行标准;第十六版信息增刊. 临床试验标准化协会,2006。
- 15 Dai M(代敏),Peng C(彭成),Wan F(万峰),et al. 5 味化湿药对奶牛乳腺炎病原菌体外抗菌活性的比较. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学),2011 ,39:240-244.