

禹州漏芦抗炎和抑菌有效部位的筛选

李喜凤, 张伟晓, 王优滢, 安硕, 朱艳琴*
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**研究禹州漏芦不同提取部位对小鼠耳肿胀的抗炎及其抑菌作用,进而对有效部位进行筛选。**方法:**对禹州漏芦进行乙醇回流提取,所得浸膏依次用石油醚,三氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇萃取得各部位浸膏,将小鼠随机分为模型组,阿司匹林组(0.11 g·kg⁻¹)和不同溶剂萃取部位高、低剂量组,采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型,考察禹州漏芦不同溶剂萃取部位的抗炎作用;采用试管二倍稀释法,用划线法确定最低抑菌浓度(MIC),考察不同部位提取物对金黄色葡萄球菌,大肠埃希氏菌,枯草芽孢杆菌,伤寒沙门氏菌,铜绿假单胞菌的抑菌作用。**结果:**与模型组比较,禹州漏芦三氯甲烷萃取部位的高、低剂量组对小鼠耳廓肿胀的抑制率均高于60%($P < 0.01$),其他部位的抑制率较低;乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位对5种菌种均有抑制作用,乙酸乙酯萃取部位对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的MIC最低,正丁醇萃取部位对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的MIC最低,均为312.5 g·L⁻¹。**结论:**禹州漏芦抗炎的有效部位是三氯甲烷萃取部位,抑菌的有效部位是乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位,为禹州漏芦的进一步开发利用提供依据。

[关键词] 禹州漏芦; 抗炎; 抑菌; 有效部位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0138-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030138

Screening Effective Part of Echinopsis Radix via Bacteriostasis and Anti-inflammatory Activities

LI Xi-feng, ZHANG Wei-xiao, WANG You-xu, AN Shuo, ZHU Yan-qin* (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the effective parts of Echinopsis Radix through bacteriostasis and anti-inflammatory activities. **Method:** Echinopsis Radix was firstly extracted by ethanol, and followed by petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol to obtain the different parts of extraction. Mice were randomly divided into blank group, aspirin group (0.11 g·kg⁻¹), and high-, low-dose of different extraction parts groups. The anti-inflammatory activity of different solvent extraction parts of Echinopsis Radix was examined by xylene-induced ear swelling mice. The effects against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas aeruginosa* were examined by scraping line method and tube dilution method. **Result:** The chloroform extraction part of Echinopsis Radix showed an inhibition rate of higher than 60% in ear swelling mice, while the effect of the other extraction parts was very weak. The ethyl acetate extraction part showed the lowest MIC against *S. aureus* and *B. subtilis* (312.5 g·L⁻¹), while the n-butanol extraction part showed the lowest MIC against *S. aureus* and *P. aeruginosa* (312.5 g·L⁻¹). **Conclusion:** It shows that the chloroform extraction is the anti-inflammatory part of Echinopsis Radix, the ethyl acetate extraction and n-butanol extraction are the bacteriostatic parts. It provides the evidence for the further development and utilization of Echinopsis Radix.

[Key words] Echinopsis Radix; anti-inflammatory; bacteriostasis; effective part

禹州漏芦^[1]为菊科植物蓝刺头或华东蓝刺头的干燥根。其味苦、性寒、归胃经,具有清热解毒、排脓止血、消痈下乳的功效,用于治疗诸疮痈肿,乳痈

肿痛,乳汁不通,瘰疬疮毒等。关于禹州漏芦化学成分的研究已有报道^[2],但关于其抗炎抑菌有效部位的研究较少。本文以二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型考

[收稿日期] 20140609(023)

[基金项目] 河南省科技厅重点科技攻关项目(122102310185)

[第一作者] 李喜凤,教授,从事中药新药及质量标准研究,Tel:13783632576,E-mail:lx_f52@yeah.net

[通讯作者] *朱艳琴,教授,从事肿瘤病理研究,Tel:15038096960,E-mail:7921083@qq.com

察禹州漏芦不同提取部位的抗炎作用,采用试管二倍稀释法考察不同提取部位的抑菌作用,为进一步的研究工作提供依据。

1 材料

1.1 动物及菌株 昆明种小鼠,体重(20±2)g,雄性,(20±2)℃的动物实验管理中心,专人饲养和管理。实验鼠饲料为标准全价饲料,均购自河南省实验动物中心,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。菌种包括:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*,批号 CMCC(B)26003,大肠埃希菌 *Escherichia coli*,批号 CMCC(B)44102,枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*,批号 CMCC(B)10211,伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*,批号 CMCC(B)50094,铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*,批号 CMCC(B)10104,均由河南中医学院第一附属医院药学部提供,购自中国药品生物制品检定所。

1.2 药物及试剂 禹州漏芦(*Radix Echinopsis*)购自亳州药材市场,经河南中医学院董诚明教授鉴定为菊科植物蓝刺头 *Echinops latifolius* 的干燥根。样品收集后去泥、洗净、晾干,用万能粉碎机粉碎并过 45 目筛,放入 4℃冰箱中保存备用。阿司匹林肠溶片(西安利君制药股份有限公司,批号 201112515),二甲苯(天津科密欧化学试剂开发中心,批号 20100604),MH 琼脂培养基、MH 肉汤培养基(北京三药科技开发公司,批号分别为 100611,100428),其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 YUEPINGFA2004b 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司),FW-100 型超速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),SW-CJ-1B 型无菌操作台(苏州亿达净化设备有限公司),LMQ-R 型立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司),301AB-1 型隔水式培养箱(上海申光仪器仪表有限公司),倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 阿司匹林的配制 取阿司匹林 1 片,研磨粉碎,用蒸馏水配至 40 mL,用前摇匀,放置 4℃冰箱中冷藏备用。

2.1.2 禹州漏芦药材总提取物的制备 称取干燥粉碎并过 45 目筛的禹州漏芦药材,用 95% 乙醇回流提取 3 次,时间分别是 3,3,2 h,溶剂倍量分别是 10,8,6 倍量,过滤,合并滤液,减压浓缩得总提取物浸膏。参照《中国药典》2010 年版规定的禹州漏芦的常用剂量为 5~10 g,取 10 g,按人平均体重

60 kg 计算,则人的常用剂量为 0.17 g·kg⁻¹,以人用剂量的 7.5,15,30 倍分别作为小鼠给药的低,中,高剂量组,即分别为 1.25,2.5,5 g·kg⁻¹。将总提取物浸膏用 5‰ 的 CMC-Na 溶液溶解,配制成定量的供试液,备用。

2.1.3 禹州漏芦药材不同溶剂部位的制备 称取干燥粉碎并过 45 目筛的禹州漏芦药材 200 g,用 95% 乙醇回流提取 3 次,时间分别是 3,3,2 h,溶剂倍量分别是 10,8,6 倍量,过滤,合并滤液,减压浓缩;浸膏用 100 mL 水分散,依次用石油醚,三氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇各 100 mL 萃取 3 次,各萃取液及水溶液减压浓缩,得到各部位浸膏,各部位提取率见表 1。

表 1 禹州漏芦药材不同溶剂萃取部位得率

Table 1 Different solvent extraction yield of Radix Echinopsis

溶剂萃取部位	浸膏质量/g	得率/%
石油醚部位	3.49	1.74
三氯甲烷部位	1.83	0.92
乙酸乙酯部位	1.60	0.80
正丁醇部位	4.80	2.40
水部位	7.03	3.52

2.2 抗炎实验

2.2.1 禹州漏芦总提取物对二甲苯引起小鼠耳廓肿胀的影响^[3] 将小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为模型组、禹州漏芦高、中、低剂量组、阿司匹林组,连续给药 7 d,于最后一次给药后 1 h,将 25 μL 二甲苯滴于小鼠右耳,左耳作为对照。1 h 后将小鼠颈椎脱臼处死,沿耳廓基线剪下两耳,用直径为 8 mm 的打孔器分别在左、右耳同一部位打下圆耳片,称重。以左右耳质量之差为其肿胀程度。

$$\text{肿胀率} = \frac{\text{肿胀度}}{\text{左耳片质量}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{空白组肿胀度均数} - \text{受试组肿胀度均数})}{\text{空白组肿胀度均数}} \times 100\%$$

2.2.2 禹州漏芦不同溶剂萃取部位对二甲苯引起小鼠耳廓肿胀的影响 将小鼠 120 只,随机分为 12 组,每组 10 只,模型组,阿司匹林组,禹州漏芦石油醚部位高、低剂量组,三氯甲烷部位高、低剂量组,乙酸乙酯部位高、低剂量组,正丁醇部位高、低剂量组,水部位高、低剂量组,给药及处理见 2.2.1。测定各组小鼠的耳肿胀程度,肿胀百分率,受试组抑制率。

2.3 体外抑菌实验最低抑菌浓度(MIC)测定^[3,5,7]

称取禹州漏芦药材粉末 50 g,用 95% 乙醇回流提取 3 次,时间分别是 3,3,2 h,溶剂倍量分别是 10,

8,6 倍量,过滤,合并滤液,减压浓缩;浸膏用 20 mL 水分散,依次用石油醚,三氯甲烷,乙酸乙酯,正丁醇各 20 mL 萃取 3 次,各萃取液及水部位减压浓缩,挥干溶剂,用 0.5% 聚山梨酯-80 将各部位提取物定容至 25 mL。无菌微孔滤膜过滤除菌,备用。取无菌试管(13 mm × 100 mm)10 支,排成一排,每管加入 MH 肉汤 2 mL,在第 1 管加入抗菌药物原液(1 g · mL⁻¹)2 mL 混匀,然后吸取 2 mL 至第 2 管,混匀后再吸取 2 mL 至第 3 管,如此连续倍比稀释至第 9 管,并从第 9 管中吸取 2 mL 弃去,第 10 管为不含药物的生长对照。用移液枪在已稀释好药物浓度的试管内加入上述制备好的接种物各 100 μL,其中第 9 管不加菌液做阴性对照。将接种好的稀释管塞好塞子,置 35 °C 普通空气孵箱中孵育 16 ~ 20 h,在营养琼脂培养基平板上,用划线法确定 MIC。该实验平行做 3 次,以 2 或 3 次相同结果为准。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件统计,实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组比较均选用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 禹州漏芦总提取物对二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀的影响 禹州漏芦高、中剂量组及阿司匹林组能明显降低二甲苯所致小鼠耳肿胀的程度,与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),中剂量组效果更明显($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 禹州漏芦总提取物对二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of total extract of Radix Echinopsis on mouse ear auricle swelling induced by xylene($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	肿胀度 /mg	肿胀率 /%	肿胀抑制率/%
模型	-	15.03 ± 1.97	123.00	-
阿司匹林	0.11	8.97 ± 2.21 ²⁾	69.67	40.32
禹州漏芦总提取物	1.25	14.37 ± 3.17	116.00	4.39
	2.5	10.02 ± 2.86 ²⁾	74.28	33.33
	5	13.25 ± 3.25 ¹⁾	92.33	11.84

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 禹州漏芦不同溶剂萃取物对二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀的影响 三氯甲烷部位高、低剂量组,乙酸乙酯部位低剂量组,正丁醇部位高、低剂量组,水部位低剂量组对二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀均有一定的抑制作用,与模型组相比有统计学差异($P < 0.01$),其中三氯甲烷萃取部位效果更好,低剂量组

效果要优于高剂量组,与阿司匹林组无差异。见表 3。

表 3 禹州漏芦不同溶剂萃取物对二甲苯诱发小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effects of different solvents extraction of Radix Echinopsis on mouse auricle swelling induced by xylene($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	肿胀度 /mg	肿胀率 /%	肿胀抑制率/%
模型	-	9.65 ± 1.91	122 ± 25	-
阿司匹林	0.11	5.71 ± 2.29	73 ± 22	40.8
石油醚部位	0.087	9.26 ± 3.40	119 ± 30	4.0
	0.044	8.15 ± 3.34	107 ± 22	15.5
三氯甲烷部位	0.046	3.47 ± 1.11 ²⁾	48 ± 13	64.0
	0.023	3.45 ± 1.13 ²⁾	46 ± 36	64.3
乙酸乙酯部位	0.040	8.27 ± 3.05	100 ± 35	14.3
	0.020	4.78 ± 1.82 ²⁾	63 ± 20	50.5
正丁醇部位	0.120	5.89 ± 2.05 ²⁾	85 ± 33	39.0
	0.060	5.51 ± 2.06 ²⁾	734 ± 29	42.9
水部位	0.176	9.62 ± 2.86	136 ± 39	0.3
	0.088	5.02 ± 2.17 ²⁾	66 ± 32	48.0

3.3 禹州漏芦不同萃取部位抑菌实验 MIC 结果

禹州漏芦药材石油醚萃取部位对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有抑制作用, MIC 为 78.125 g · L⁻¹,其他 3 种受试菌种没有抑制作用。禹州漏芦药材三氯甲烷萃取部位对枯草芽孢杆菌有抑制作用, MIC 为 1 250 g · L⁻¹,对其他 4 种受试菌种没有抑制作用。禹州漏芦药材乙酸乙酯萃取部位对 5 种受试菌均有抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用最强, MIC 为 312.5 g · L⁻¹,对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌抑制作用次之, MIC 为 625 g · L⁻¹,对伤寒沙门氏菌的抑制作用最弱, MIC 为 1 250 g · L⁻¹。正丁醇萃取部位对 5 种受试菌均有抑制作用,其中对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑制作用最强, MIC 为 312.5 g · L⁻¹,对另外 3 种受试菌的 MIC 也达到了 625 g · L⁻¹。禹州漏芦药材水部位只对金黄色葡萄球菌有抑制作用, MIC 为 1 250 g · L⁻¹。见表 4。

4 讨论

炎症分不同的时期:前期表现为红、肿、热、痛,病理表现为毛细血管扩张,渗出增加;中期表现为白细胞的游走;后期表现为瘢痕与粘连的形成^[5-6]。不同的药物抗炎的机制不同和针对作用的炎症分期

表 4 禹州漏芦不同萃取部位抑菌实验 MIC 结果
Table 4 Different extraction MIC bacteriostasis experiment results of Radix Echinopsis

组别	g·L ⁻¹				
	金黄色 葡萄球菌	大肠 埃希菌	伤寒 沙门氏菌	枯草 芽孢杆菌	铜绿 假单胞菌
醇提总部位	500	500	-	625	250
石油醚部位	78	-	-	78	-
三氯甲烷部位	-	-	-	1 250	-
乙酸乙酯部位	313	625	1 250	313	625
正丁醇部位	313	625	625	625	313
水部位	1 250	-	-	-	-

也不同^[7], 中药中清热解毒药主要作用于炎症的早期, 故本实验选择二甲苯致小鼠耳廓肿胀的病理模型。在抗炎实验中, 总部位的高、中、低剂量组实验是用于筛选一个最佳的药效剂量, 其中中剂量组活性更明显; 不同部位的高、低剂量是以总部位的中剂量组为参考设置, 结果显示三氯甲烷提取部位的低剂量组活性最好。受试药物的灭菌时间、温度高低可能会导致药物中热敏感化学成分的改变, 因此, 对于不同溶剂萃取物采用微孔滤膜除菌的方法, 实验中要注意无菌操作。制备菌悬液时, 先采用血球计数仪, 用显微镜直接计数法测定菌体个数, 调至所需浓度, 因为浓度过低, 接种菌量少, 抑菌环常因之增大; 浓度过高, 接种量过多, 抑菌环则可减小。测定最低抑菌浓度时, 应注意稀释样品的顺序, 每稀释一个浓度都要更换移液管, 尽可能的减小误差。在抑菌实验中, 不同溶剂萃取出的物质, 其抑菌能力有一定的差异性, 这和不同溶剂萃取出的化学物质有关。抑菌实验母液一般选择为 1 g·mL⁻¹, 在此基础上测定 MIC, 但本实验测定药物的 MIC 较大^[8], 因为抑菌效果与药物的浓度, 培养基的厚度, 药物的溶解性等有很大关系。如培养基的厚度越大药物的抑菌效果越好; 溶解性小的药物不能够完全扩散到培养基中, 导致该药物的抑菌效果低于真实值, 而有些药物

需要体内进一步分解或转化后才能发挥抗菌作用。1992 年 Lin^[9] 报道了华东蓝刺头根的抗炎活性, 发现华东蓝刺头甲醇提取物中正己烷萃取部分 (40, 200 mg·kg⁻¹)、三氯甲烷萃取部分 (20, 40, 200 mg·kg⁻¹) 及乙酸乙酯萃取部分 (20, 40, 200 mg·kg⁻¹) 能明显改善角叉菜胶所致的小鼠足部肿胀, 研究证明华东蓝刺头抗炎成分集中于三氯甲烷萃取部分。本实验证明了三氯甲烷萃取部位的抗炎作用最好, 但是体外抑菌效果最差, 可能与其所含的主要化学成分含量不同有关, 或是禹州漏芦中发挥抗炎与抑菌作用的成分不同有关, 有待进一步的研究, 以明确其药效和作用机制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 244.

[2] 汪毅, 李铨, 张鹏. 禹州漏芦化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(2): 309-311.

[3] 张大方, 孟宪丽, 吴清和, 等. 药理与中药药理实验[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 93-96.

[4] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 119-121.

[5] 刘胜贵, 许方美, 张兰兰, 等. 植物提取物体外抑菌试验的方法研究[J]. 怀化学院学报, 2006, 25(2): 65-68.

[6] 杨婧, 杨丽珍, 王亚贤, 等. 不同制备工艺葛根苓连汤抗炎抑菌作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 224-226.

[7] 邢文善, 李艳华, 朱玉花, 等. 玉叶金花提取液对动物模型抗炎抑菌作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 267-270.

[8] 张静雅. 苦瓜活性物质提取分离与抑菌作用研究[D]. 南宁: 广西大学, 2013: 39-41.

[9] Lin C C, Lin C, Chiu H F, et al. The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (VII): The anti-inflammatory effect of Echinops grjiiisii[J]. Am J Chin Med, 1992, 20(2): 127-131.

[责任编辑 周冰冰]