

## 黄芩苷-冰片联合应用对表皮葡萄球菌的抑菌作用

于悦<sup>1</sup>, 王亚静<sup>1\*</sup>, 皮佳鑫<sup>1</sup>, 王东恒<sup>2</sup>, 轩肖玉<sup>1</sup>, 郑银<sup>1</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193;

2. 天津中一制药有限公司, 天津 300193)

**[摘要]** **目的:**研究黄芩苷-冰片配伍使用对表皮葡萄球菌生长的抑制作用。**方法:**采用比浊法,在600 nm下测定加入不同浓度黄芩苷、冰片和黄芩苷-冰片混合物后菌液的吸光度,以不同剂量药物对表皮葡萄球菌生长的抑制率为指标比较各组的抑菌效果。**结果:**加入冰片后,不同浓度黄芩苷溶液的抑菌率均有显著提高;黄芩苷、冰片质量浓度分别为1200、600 mg·L<sup>-1</sup>时,两药单独使用的抑菌率分别为49.78%、13.41%,而两药合用的抑菌率为78.15%,在此浓度下,两药抑菌效果提升最为显著。**结论:**黄芩苷-冰片配伍使用对表皮葡萄球菌生长有协同抑制作用,能够显著增强两药对表皮葡萄球菌的抑菌能力。

**[关键词]** 黄芩苷; 冰片; 表皮葡萄球菌; 抑菌作用; 比浊法

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0191-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013100191

## Anti-bacterial Synergistic Effects of Baicalin and Borneol on *Staphylococcus epidermidis*

YU Yue<sup>1</sup>, WANG Ya-jing<sup>1\*</sup>, PI Jia-xin<sup>1</sup>, WANG Dong-heng<sup>2</sup>, XUAN Xiao-yu<sup>1</sup>, ZHENG Yin<sup>1</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Zhongyi Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this paper is to estimate the anti-bacterial effects of baicalin and borneol on *Staphylococcus epidermidis*. **Method:** A modified turbidimetry, which referred to the solution absorbance assay at 600 nm, was applied to determine the inhibition ratio of *S. epidermidis* growth by adding different concentrations of baicalin, borneol and baicalin-borneol mixed solutions. **Result:** The inhibition ratios of *S. epidermidis* growth of different baicalin concentration solutions with borneol added showed significant increase compared with blank baicalin solutions. The inhibition ratios were 49.78% with 1 200 mg·L<sup>-1</sup> baicalin solution, and 13.41% with 600 mg·L<sup>-1</sup> borneol solution, separately. The significant inhibition ratio which indicated the synergistic effect was 78.15% under the mixed solution with the baicalin concentration of 1200 mg·L<sup>-1</sup> and borneol 600 mg·L<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The compatibility of a certain amount of baicalin and borneol, which significantly enhanced the anti-bacterial effects of two compounds separately, indicated the outstanding synergistic effect on the inhibition of *S. epidermidis* growth.

**[Key words]** baicalin; borneol; *Staphylococcus epidermidis*; anti-bacterial effects; turbidimetry

**[收稿日期]** 20121120(007)

**[基金项目]** 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项  
(2012ZX09103201-046, 2012ZX09101212)

**[第一作者]** 于悦, 硕士研究生, 从事药物新制剂研究, E-mail:  
yuyue-good@163.com

**[通讯作者]** \* 王亚静, Tel: 022-59596169, E-mail: yajing022@  
163.com

黄芩苷(baicalin)为中药黄芩(*Scutellariae Radix*)的主要活性成分。现代药理学研究表明,其具有抗菌、抗炎镇痛<sup>[1]</sup>、抗氧化<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、治疗缺血性脑损伤<sup>[4]</sup>等多种药理活性,在临床中广泛用于治疗痤疮、湿疹等皮肤病<sup>[5]</sup>。抗菌活性是黄芩苷外用发挥药效的主要药理活性之一,研究表明其对痤疮丙酸杆菌<sup>[6]</sup>、耐药性金黄色葡萄球菌<sup>[7]</sup>、大肠

杆菌<sup>[8]</sup>等多种致病菌均有一定的抑制作用。

冰片是中医药中一味常用佐药,中医认为其有开窍醒神、清热止痛、生肌之效,广泛应用于中药复方中,与多种药物配伍外用,在促进主要活性成分经皮吸收<sup>[9]</sup>的同时,也发挥着抗炎镇痛<sup>[10-11]</sup>、抗菌<sup>[12]</sup>、抗血栓<sup>[13]</sup>等作用。

基于两药在抑菌方面的确切作用,本研究考虑将两药配伍使用,以临床上皮肤病常见的致病菌之一表皮葡萄球菌为检测菌株,通过体外抗菌活性实验,研究两药协同抑菌情况,以期在具有显著抑菌效果的同时,减少用药剂量,增强用药有效性和安全性,为今后两药复方制剂的开发提供研究依据。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 黄芩苷提取物(天津中新药业研究中心,纯度 $\geq 94.0\%$ );冰片(江西恒城天然香料油有限公司);营养肉汤培养基(北京三药科技开发公司,批号 100628);氯化钠(天津北方天医化学试剂厂),磷酸二氢钾(天津市光复科技发展有限公司),氢氧化钠(天津化学试剂批发公司),无水乙醇(天津市康科德科技有限公司),聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80,天津北方天医化学试剂厂)等,均为分析纯。

**1.2 菌株** 表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* (广东省微生物研究所,ATCC 12228)。

**1.3 仪器** LS-B-50L 立式圆形压力蒸气灭菌器(上海医用核子仪器厂),净化工作台(苏州净化设备厂),TK-20B 型透皮扩散实验仪(上海铂凯科技贸易有限公司),UV-2800H 紫外分光光度计(上海尤尼柯公司)。

## 2 方法

**2.1 检测菌液的制备** 用灭菌接种环挑取适量菌株至营养肉汤培养基,34℃培养 18~24 h。灭菌生理盐水将肉汤培养物分别稀释至  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,依次得检测菌液 A1, A2, A3。

**2.2 表皮葡萄球菌生长曲线的测定** 移取 5 mL 肉汤培养基置西林瓶中,加入上述检测菌液 50  $\mu\text{L}$ ,封口,于 37℃,200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下恒温培养,测定 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 菌液在 600 nm 处吸光度(A),绘制表皮葡萄球菌生长的吸光度-时间曲线。

**2.3 黄芩苷溶液的配制** 精密称取黄芩苷 0.08 g,加入 PBS6.5 缓冲液使其完全溶解,并逐级稀释至 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  系列溶液。

**2.4 标准曲线的绘制** 分别量取上述不同浓度的黄芩苷溶液和空白对照溶液 1 mL,置西林瓶中,加

入 4 mL 营养肉汤培养基和 50  $\mu\text{L}$  工作菌液 A1 后,混匀,封口,在 37℃,200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下恒温培养 8 h,测定空白对照组和不同浓度药物组的菌液在 600 nm 处 A。每个浓度平行测定 3 份样品。以 8 h 菌液吸光度对数值为纵坐标,黄芩苷浓度为横坐标,绘制标准曲线,并拟合回归方程,计算相关系数。

**2.5 黄芩苷-冰片联合应用对表皮葡萄球菌的抑菌作用的测定**

**2.5.1 检测菌液的制备** 取 2.1.1 项下菌液 A1 作为检测菌液。

**2.5.2 黄芩苷溶液和冰片溶液的配制** 按 2.3 配制 6  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的黄芩苷母液,采用 2 倍稀释法将其稀释至质量浓度分别为 3, 1.5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。

取冰片适量,精密称定,加入无水乙醇使其完全溶解,分别配制质量浓度为 120, 60, 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。

**2.5.3 黄芩苷、冰片单用及联合应用对表皮葡萄球菌抑制能力的测定** 移取 4 mL 营养肉汤培养基置西林瓶中,分别加入上述不同浓度的黄芩苷溶液 1 mL(终质量浓度分别为 1 200, 600, 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及 50  $\mu\text{L}$  无水乙醇,依 2.4 项下操作,计算抑菌率,考察不同浓度黄芩苷的抑菌作用;另取 4 mL 营养肉汤培养基和 1 mL PBS6.5 缓冲液置西林瓶中,分别加入不同浓度的冰片乙醇溶液 50  $\mu\text{L}$ (终浓度分别为 1 200, 600, 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),依 2.4 项下操作,计算抑菌率,考察不同浓度冰片的抑菌作用;

移取 4 mL 营养肉汤培养基置西林瓶中,分别加入上述不同质量浓度的黄芩苷溶液 1 mL(终浓度分别为 1 200, 600, 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及不同质量浓度的冰片乙醇溶液 50  $\mu\text{L}$ (终质量浓度分别为 1 200, 600, 300  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),依 2.4 项下操作,计算抑菌率,考察黄芩苷-冰片合用的抑菌作用;另取培养基加入 1 mL PBS6.5 缓冲液及 50  $\mu\text{L}$  的无水乙醇,作为正常培养条件下细菌生长对照。抑菌率通过如下公式计算<sup>[14]</sup>。

$$\text{抑菌率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{试验组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

## 3 结果

**3.1 表皮葡萄球菌生长曲线的测定** 不同浓度菌液(A1, A2, A3)经不同时间培养后的吸光度-时间曲线见图 1。由图中趋势线可以看出,表皮葡萄球菌经过 4 h 的迟缓期后,在 6 h 左右进入对数生长期,经过约 4 h 的几何倍数快速繁殖后,随即进入稳定期,因此,本实验选择 6~10 h 作为细菌培养时间的选择范围。

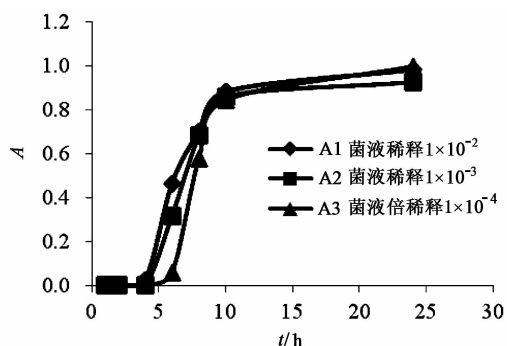
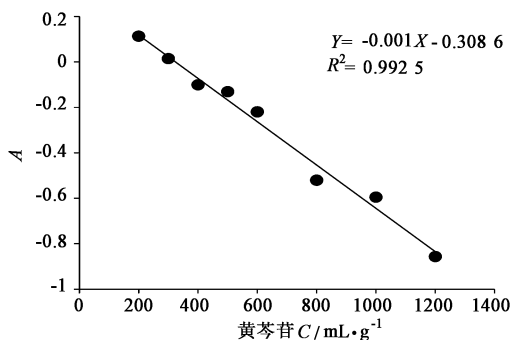


图1 不同浓度菌液的细菌生长曲线

**3.2 菌液浓度的选择** 从表1中不同浓度菌液达到对数生长期后的 $A$ 看, $1 \times 10^{-2}$ , $1 \times 10^{-3}$ 稀释2组, $A$ 差异不大,较 $1 \times 10^{-4}$ 稀释组更适合检测。基于减小误差和操作便捷的考虑,确定细菌稀释1:100作为工作菌液浓度。

**3.3 细菌培养时间的选择** 不同终质量浓度黄芩苷与供试菌液在培养6,8,10 h后绘制 $A$ -药物浓度曲线。可见菌液加入不同浓度药物后,培养时间控制在对数生长期,均可观测到菌液吸光度的降低,当培养时间为8 h时,从 $312 \sim 1\,250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,曲线的斜率较大,且吸光度介于 $0.2 \sim 0.7$ ,可以保证检测的灵敏度以及测定结果的准确性和可靠性。因此,选择8 h作为细菌培养时间。

**3.4 标准曲线的绘制** 以供试菌液吸光度对数值( $\lg A$ )为纵坐标,黄芩苷浓度( $C$ )为横坐标进行线性回归,回归方程为: $Y = -0.001X + 0.3086$  ( $r = 0.9925$ ),标准曲线见图2。黄芩苷在 $200 \sim 1\,200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , $\lg A$ 与其呈良好的线性关系。表明比浊法能够较准确的测定黄芩苷对表皮葡萄球菌的抑制能力。

图2 吸光度对数值( $\lg A$ )-黄芩苷浓度( $C$ )标准曲线

**3.5 黄芩苷-冰片联合应用对表皮葡萄球菌的抑菌作用**

**3.5.1 黄芩苷单用对表皮葡萄球菌的抑菌作用** 黄芩苷由 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $1\,200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑菌率由 $14.37\%$ 显著提高至 $49.78\%$ ,表明黄芩苷对

表皮葡萄球菌具有明显的抑菌作用,具有一定的量效关系。见表1。

**3.5.2 冰片单用对表皮葡萄球菌的抑菌作用** 冰片由 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $1\,200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑菌率由 $5.93\%$ 显著提高至 $94.07\%$ ,表明冰片对表皮葡萄球菌具有明显的抑制作用,具有一定的量效关系。当溶液中冰片为 $1\,200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显示出极强的抗菌活性。见表1。

表1 黄芩苷、冰片溶液的不同质量浓度对表皮葡萄球菌的抑菌率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

药物溶液	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	抑菌率/%
黄芩苷	300	$14.37 \pm 3.80$
	600	$25.04 \pm 1.51$
	1 200	$49.78 \pm 1.76$
冰片	300	$5.93 \pm 1.80$
	600	$13.41 \pm 4.05$
	1 200	$97.07 \pm 1.58$

**3.5.3 黄芩苷-冰片联合应用对表皮葡萄球菌的抑菌作用** 不同浓度的黄芩苷溶液加入冰片后,抑菌率均有显著提高。当冰片终质量浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,混合溶液的抑菌率由单用黄芩苷时的 $14.37\%$ , $25.04\%$ , $49.78\%$ 分别提高到 $45.41\%$ , $63.41\%$ , $78.15\%$ ,表明冰片的加入显著提高了黄芩苷的抑菌能力。溶液中冰片浓度由 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $1\,200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,混合溶液的抑菌率由 $22.74\%$ 提高至 $95.48\%$ ,表明冰片对黄芩苷抑菌的增强作用具有良好的量效关系,见表2。

溶液中含黄芩苷和冰片各 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑菌率为 $63.41\%$ ,与等浓度下单用黄芩苷( $25.04\%$ )和单用冰片( $13.41\%$ )的抑菌率代数和相比,有明显提高,可推知2药合用具有较明显的协同增效作用<sup>[15]</sup>。在本实验条件下,黄芩苷和冰片质量浓度分别为 $1\,200, 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二药合用的抑菌率达 $78.15\%$ ,分别较单用时抑菌率( $49.78\%$ 和 $13.41\%$ )提高了 $1.57, 5.83$ 倍,协同抑菌效果最好,能够显著增强二药特别是黄芩苷对表皮葡萄球菌的抑菌能力。见表2。

## 4 讨论

表皮葡萄球菌是医院感染中最常见的病原菌,可引起败血症、呼吸道感染、尿路感染、骨髓炎、伤口感染等多种疾病<sup>[16]</sup>,也是痤疮、毛囊炎等皮肤疾病发生发展的致病原。因此,选择表皮葡萄球菌作为试验菌株,具有一定临床指导意义。

表 2 黄芩苷溶液中加入不同量的冰片后对表皮葡萄球菌的抑菌率 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

黄芩苷终质量 浓度/mg·L <sup>-1</sup>	加入冰片的抑菌率			
	0	300/mg·L <sup>-1</sup>	600/mg·L <sup>-1</sup>	1 200/mg·L <sup>-1</sup>
0	0	5.93 ± 1.80	13.41 ± 4.05	97.07 ± 1.58
300	14.37 ± 3.80	22.74 ± 4.50	45.41 ± 5.05 <sup>2)</sup>	95.48 ± 0.56 <sup>2)</sup>
600	25.04 ± 1.51	30.37 ± 2.02 <sup>1)</sup>	63.41 ± 4.89 <sup>2)</sup>	96.07 ± 0.68 <sup>2)</sup>
1 200	49.78 ± 1.76	55.85 ± 6.29	78.15 ± 4.23 <sup>2)</sup>	97.48 ± 1.30 <sup>2)</sup>

注:与单用黄芩苷(不加入冰片)组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

本文采用改良比浊法,通过测定细菌培养液的吸光度来确定药物的抗菌活性,相比于传统方法,如平板菌落计数法,抑菌圈直径测定法等,具有简便,准确,操作性强的优点<sup>[17]</sup>。

由药理学定义可知,两药合用的效应大于两药个别效应的代数和,即为增效作用<sup>[15]</sup>,本实验初步揭示了黄芩苷-冰片联合应用可以显著增强两药对表皮葡萄球菌的抑菌能力。究其原因,可能是两者分别抑制了细菌生长的不同环节,从而在更多阶段干扰细菌的代谢过程,影响了细菌结构与功能,从而达到协同抑菌的效果<sup>[18]</sup>。因此,临床上应充分重视和发挥复方配伍的优势,设计并优化制剂的处方组成,在保证药效的前提下,减少药物的用量,从而达到复方配伍减毒增效的目的。

[参考文献]

[ 1 ] 王玉秀,王玉璧,张虹. 黄芩苷滴丸抗炎镇痛作用研究[J]. 中国药事, 2012, 26(5): 446.  
 [ 2 ] 郭少英,程发峰,钟相根,等. 黄芩苷的体外抗氧化研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 9.  
 [ 3 ] 张珍,闵玮,林秉奖,等. 黄芩苷对 HaCaT 细胞影响的蛋白组学研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2011, 10(2): 83.  
 [ 4 ] 史亚军,施俊辉,陈世彬,等. 黄芩苷治疗缺血性脑损伤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 218.  
 [ 5 ] 张建军,林清,李伟,等. 黄柏黄芩与五倍子配伍外用治疗急性湿疹的药效研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(10): 690.  
 [ 6 ] 夏明静,曹煜,杨捷,等. 22 种抗菌消炎中药有效成分对痤疮丙酸杆菌的抑制作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2001, 34(6): 435.  
 [ 7 ] 孙冬梅,邝枣园,李岩,等. 黄芩苷对耐药性金黄色

葡萄球菌的抑菌作用研究[J]. 吉林医学, 2011, 32(13): 2587.  
 [ 8 ] 张涛,张爽,胡格,等. 盐酸小檗碱绿原酸和黄芩苷对大肠杆菌的体外抑菌作用[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 42.  
 [ 9 ] 王宏,王俊芳,谢海林,等. 冰片对中药复方制剂中大黄酚的鼻黏膜与皮肤透过吸收作用研究[J]. 现代中医药, 2008, 28(1): 51.  
 [10] 蔡瑞宏,姚宏,张亚锋,等. 芦荟冰片烧伤膏的生肌、镇痛及抗炎作用[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(2): 170.  
 [11] 孙晓萍,欧立娟,宓穗卿,等. 冰片抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 353.  
 [12] 黄晓敏,廖玲军,曾松荣,等. 梅花冰片 3 种剂型体外抗菌活性研究[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(1): 63.  
 [13] 杨蕾,李伟荣,宓穗卿,等. 冰片对三氯化铁诱导的大鼠动脉血栓形成的抑制作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 164.  
 [14] 尹美珍,张倩,王静晖,等. 艾叶水溶性部位及其分离组分的抑菌活性研究[J]. 黄石理工学院学报, 2011, 27(5): 44.  
 [15] 李端. 药理学. 5 版[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:53.  
 [16] 官妍,徐元宏,汪长中,等. 临床分离的表皮葡萄球菌产膜株检出方法及耐药性比较[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(7): 626.  
 [17] 苏云,刘克忠,孙艳辉,等. 比浊法羧甲基壳聚糖抑菌性能的研究[J]. 滁州学院学报, 2008, 10(3): 96.  
 [18] Qiu J, Niu X, Dong J, et al. Baicalin protects mice from Staphylococcus aureus pneumonia via inhibition of the cytolytic activity of  $\alpha$ -hemolysin [J]. J Infect Dis, 2012, 206(2): 292.

[责任编辑 聂淑琴]