

# 不同制备工艺葛根芩连汤抗炎抑菌作用比较

杨婧<sup>1</sup>, 杨丽珍<sup>1</sup>, 王亚贤<sup>1</sup>, 赵瑛<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

**[摘要]** **目的:**对混煎液、分煎液、有效成分提取物3种不同制备工艺制备的葛根芩连汤进行抗炎、抑菌作用实验研究, 对比其抗炎抑菌作用的异同。**方法:**二甲苯致小鼠耳肿胀实验:昆明种小鼠, 随机分为混煎液组、分煎液组、有效部位提取物组及生理盐水组, ig 给药  $1.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续7 d。含药血清体外抑菌试验: ig 给药  $20.475 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续7 d, 采集分离大鼠血清。以二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型以及含药血清体外抑菌实验模型, 评价其三者的抗炎、抑菌作用。**结果:**与混煎液和分煎液比较, 有效成分提取物 ( $1.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 明显缓解了小鼠耳廓肿胀 ( $P < 0.01$ ), 其含药血清对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及伤寒沙门菌等10种菌具有明显的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。**结论:**葛根芩连汤有效成分提取物对化学刺激所致炎症的缓解作用及其含药血清的体外抑菌作用, 优于混煎液和分煎液。

**[关键词]** 葛根芩连汤; 制备工艺; 抗感染; 血清药理学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0224-03

## Comparative Study on Anti-inflammatory and Antibacterial Effects of Different Preparation Technology of Gegen Qinlian Decoction

YANG Jing<sup>1</sup>, YANG Li-zhen<sup>1</sup>, WANG Ya-xian<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>2\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;  
2. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-inflammatory and antibacterial effects of Gegen Qinlian decoction prepared by different technology. **Method:** The swelling of ear induced by xylene in mice was employed to evaluate the anti-inflammatory effects of Gegen Qinlian decoction prepared by different technology. Additionally, the model of bacteriostasis *in vitro* by the serum with drug was used to examine the antibacterial activities of those. **Result:** Compared with mixed decoction and separated decoction, extract of active ingredients ( $1.95 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) strongly inhibited swelling of ear in mice ( $P < 0.01$ ). The serum with extract of active ingredients significantly inhibited 10 kinds of strains such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*, etc. ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Extract of active ingredients can exert significant inhibitory action against inflammation caused by chemical agents, and the serum with extract of active ingredients also has strong antibacterial activity.

**[Key words]** Gegen Qinlian decoction; preparation process; anti-infection; serum pharmacology

葛根芩连汤出自医圣张仲景的《伤寒论》, 由葛

根、黄芩、黄连、甘草4味药组成。具有解表清里、升清止痢等功效。临床常用来治疗急性肠炎、细菌性痢疾等<sup>[1]</sup>。本文对3种制备工艺的葛根芩连汤制剂进行抗炎、抑菌作用实验研究, 对比其抗炎抑菌作用的异同。

### 1 材料

**1.1 药品及试剂** 葛根、黄芩、黄连、甘草(购自哈尔滨哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司); 葛根芩连汤混煎液: 4味药材饮片, 按葛根: 黄芩:

**[收稿日期]** 20120702(013)

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金(D200916)

**[第一作者]** 杨婧, 硕士研究生, 讲师, 从事中西医结合基础研究, Tel: 0451-82195940, E-mail: yangjingdx@sina.com

**[通讯作者]** \*赵瑛, 博士研究生导师, 教授, 从事药理学、中药药理学教学及中医药防治重大疾病的研究, E-mail: zhaoy219@163.com

黄连:甘草 15:9:9:6比例投药,传统水煎(自制<sup>[2]</sup>);分煎液:药物组成与比例同上,方中4味中药分煎后混匀(自制<sup>[2]</sup>);有效成分提取物:4味药材按比例投药,用动态多功能提取罐加压提取并减压浓缩(哈尔滨商业大学提供)。

**1.2 仪器** 双人超净工作台(上海净化设备厂);AB204-N分析天平(上海精科实业有限公司);BRANSON BS3200S-T型超声振荡仪(西安康明超声波仪器设备有限公司);微量移液器(瑞士 Hamilton 公司)。

**1.3 动物** SPF级健康 Wistar 大鼠 32只,雌雄各半,体重(200±20)g;SPF级昆明种小鼠 32只,雌雄各半,体重(20±2)g。由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

**1.4 菌种** 大肠杆菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、白色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌共10种,由黑龙江中医药大学基础医学院微生物实验室提供。

## 2 方法

**2.1 改善局部炎症实验<sup>[3-5]</sup>** 将32只小鼠随机分为4组,分别为混煎液组、分煎液组、有效部位提取物组及生理盐水组,每组8只。每天ig给药2次,连续7d。末次给药1h后,在每只小鼠右侧耳廓正反面各滴入二甲苯0.04mL,以左耳作对照,致炎后1h断颈处死,用直径8mm打孔器将双耳相同部位等面积切下,分析天平称量,计算肿胀度、肿胀率。

肿胀度 = 右耳片质量 - 左耳片质量

肿胀率 = (右耳质量 - 左耳质量) / 左耳质量 × 100%

## 2.2 血清药理学实验

**2.2.1 含药血清的制备** 参考文献方法制备含药血清<sup>[6-8]</sup>。将32只大鼠随机分4组,分别为混煎液组、分煎液组、有效部位提取物组及生理盐水组,每组8只。各组药物用量为20.475g·kg<sup>-1</sup>,每天分2次ig给药,连续7d。最后1次灌胃后1h,取血量约为6~10mL,分离血清。将每组8只鼠血清混合,避免个体差异。56℃恒温水浴灭活30min,0.22μm微孔滤膜过滤,放置于冰箱4℃保存待用。

**2.2.2 含药血清抑菌实验** 在中药抗菌实验试管法的基础上,经改进后进行抑菌实验<sup>[9-10]</sup>。首先,活化菌种,分别接种于琼脂斜面培养基,37℃恒温培养24h,然后接种于肉汤培养基中37℃恒温培养18h,取出后振荡均匀,用接种环加入新的肉汤培养基中,37℃恒温培养6h,用微量移液器取0.1mL

菌液,再加入100mL肉汤,将菌液稀释1000倍,待用。取小试管300支(使用前用去污粉将试管刷洗干净,用干热灭菌器160~170℃灭菌2~4h),分30组,每组第1管加肉汤培养基1.5mL,后面9管各加肉汤培养基1mL,第1管加含药血清0.5mL,混匀后,取1mL至第2管,以此类推,从第9管抽取1mL,弃去。使1~9管均含有倍比稀释的含药血清(即1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256,1:512,1:1024)。第10管不加含药血清。第1,2,3,4,5,6,7,8,10管每管加菌液0.05mL,加完上述各种实验材料充分混匀,经过37℃恒温培养24h,观察实验结果。含药血清对照管第9管无细菌生长,菌液对照管第10管有细菌生长,实验方为有效。以抑制实验菌生长的含药血清最高稀释度为该中药对该实验菌的抗菌效价。以能抑制实验菌生长的最高稀释度为最低抑菌浓度(MIC)。

## 3 结果

**3.1 改善局部炎症实验** 与生理盐水组比较,3种制备工艺葛根芩连汤均对二甲苯致炎的小鼠耳廓炎症有明显的缓解作用,降低肿胀度及肿胀率( $P < 0.01$ )。与混煎液组比较,分煎液组对二甲苯致小鼠耳肿胀有明显的抑制作用( $P < 0.05$ ),有效成分提取物组对二甲苯致小鼠耳肿胀有明显的抑制作用( $P < 0.01$ ),说明有效成分提取物对改善局部炎症作用较另两种工艺更强。见表1。

表1 3种制备工艺葛根芩连汤对二甲苯致炎的小鼠耳廓的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	肿胀度 /mg	肿胀率 /%
生理盐水	-	4.06 ± 0.52	25.14 ± 3.43
混煎液	1.95	3.27 ± 0.37 <sup>1)</sup>	19.61 ± 3.83 <sup>1)</sup>
分煎液	1.95	2.65 ± 0.27 <sup>1,2)</sup>	16.51 ± 1.91 <sup>1,2)</sup>
有效成分提取物	1.95	1.86 ± 0.39 <sup>1,3)</sup>	11.41 ± 2.69 <sup>1,3)</sup>

注:与生理盐水组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与混煎液组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 含药血清抑菌实验** 生理盐水组血清无抑菌作用。应用SPSS 16.0统计软件做多个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis H检验),3种制备工艺的葛根芩连汤给大鼠灌胃后获得的含药血清对10种细菌的作用不同,存在极显著差异( $P < 0.01$ )。分煎组与混煎组抑菌作用差异无统计学意义;提取物组抑菌作用大于混煎液组和分煎液组( $P < 0.05$ )。见表2。

表 2 3 种制备工艺葛根芩连汤血清抑菌作用的对比 效价

菌种	生理盐水组	混煎液组	分煎液组	有效成分提取物组
大肠杆菌	0	8	16	32
福氏志贺菌	0	8	8	16
痢疾志贺菌	0	4	8	16
伤寒沙门菌	0	0	0	4
乙型副伤寒沙门菌	0	8	8	32
变形杆菌	0	0	4	8
金黄色葡萄球菌	0	4	8	16
柠檬色葡萄球菌	0	4	4	4
白色葡萄球菌	0	0	4	8
乙型溶血性链球菌	0	4	8	32

注:表内数字代表抗菌效价,以能抑制试验菌生长的最高稀释度为最低抑菌浓度 MIC。如 64 表示将 100% 含药血清稀释成 1:64 时该药的 MIC 为 64,该药仍具有抗菌作用。0 表示血清在浓度为 0.25 g·mL<sup>-1</sup> 无抑菌作用。

#### 4 讨论

实验结果表明,在二甲苯致小鼠耳廓肿胀的抗炎模型中,3 种制备工艺的葛根芩连汤对二甲苯致炎的小鼠耳廓的肿胀度及肿胀率均有缓解作用,对局部炎症缓解的作用强弱依次为现代工艺提取物、分煎液、混煎液;在含药血清抑菌试验中,体外抑菌作用强弱也依次为现代工艺提取物、分煎液、混煎液。究其原因,课题组认为,以采用现代提取设备制备成的提取物,因提取时对压力、温度、加水量的合理控制,使其在对应生药量相同时,所得到的葛根素、小檗碱、黄芩苷、甘草酸等有效成分的种类、含量等较传统提取方式更佳,进而在抗炎抑菌实验中呈现了更好的药效,而分煎液优于混煎液,概因其避免

了混煎时不同药物的相互作用导致有效成分的损失所致。这一点为今后临床更好的选择制备工艺提供思路,也为经方的二次开发提供理论和实践依据。

#### [参考文献]

[1] 周仕昌. 葛根芩连汤加减治疗急性肠炎 120 例[J]. 蛇志, 2008, 20(2): 106.

[2] 何瑶, 傅超美, 毛茜, 等. 四物汤不同提取工艺对血虚模型小鼠造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 198.

[3] 于晓敏, 刘玉玲, 刘永平, 等. 满药赤芍根总皂苷抗炎作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 227.

[4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1860.

[5] 令红艳. 不同板蓝根制剂腺苷含量测定及其抗炎作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 143.

[6] 韩俭, 于红娟, 吴勇杰, 等. 中药血清药理学方法学研究—抗菌试验含药血清处理方案的研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 47.

[7] 陈艳芬, 刘伟民, 江滨, 等. 不同工艺决明子配方颗粒与传统饮片的药效学比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 161.

[8] 高学敏, 钟赣生. 实用中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 180.

[9] 郭涛. 药物研究与开发[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 226.

[10] 许颖, 郭婧玉, 刘学, 等. 飞龙掌血乙醇提取物对白色念珠菌抑菌作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 270.

[责任编辑 聂淑琴]