

5种中药醇提物体外抑制2种革兰阳性菌的活性

林楠¹, 董银卯¹, 时宇静², 孟宏^{3*}

(1. 北京工商大学, 北京 100048; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究丹参、丁香、厚朴、金银花、大黄这5种中药醇提物对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活力, 进而通过正交试验考察不同配比对这2种革兰阳性菌的抑菌作用。方法: 丹参、丁香、厚朴、金银花、大黄醇提物浓缩至 $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 通过测量抑菌圈直径考察不同中药醇提物与醇提物配伍后对这2种细菌的抑菌效果。结果: 痤疮丙酸杆菌对丹参醇提物为高度敏感, 抑菌圈直径为 $(23.27 \pm 3.68)\text{ mm}$, 对丁香、厚朴醇提物为中度敏感, 为 (18.82 ± 2.27) , $(17.78 \pm 1.88)\text{ mm}$; 金黄色葡萄球菌对丁香和厚朴醇提物为高度敏感, 抑菌圈直径分别为 (21.94 ± 0.74) , $(19.52 \pm 1.09)\text{ mm}$, 对大黄和丹参为中度敏感, 抑菌圈直径为 (14.43 ± 2.24) , $(16.01 \pm 0.88)\text{ mm}$ 。丹参、厚朴、丁香醇提物最佳复配比例为1:1:1, 其对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 (20.07 ± 1.26) , $(20.57 \pm 0.38)\text{ mm}$ 。结论: 丹参、厚朴、丁香的醇提物对这2种菌的抑菌活力均为高度敏感, 抑菌作用最佳。丹参、厚朴、丁香的醇提物对2种菌抑菌活性的最佳配比为1:1:1。

[关键词] 中药醇提物; 痤疮丙酸杆菌; 金黄色葡萄球菌; 体外抑菌; 正交试验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0206-04

Effect *in vitro* Inhibition of Five Ethanol-extractions from Traditional Chinese Medicine on Two Kinds of Gram Positive Bacteria

LIN Nan¹, DONG Yin-mao¹, SHI Yu-jing², MENG Hong^{3*}

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Institute of

Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Acupuncture and Moxibustion China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of ethanol-extractions of *Salvia miltiorrhiza*, *Syzygium aromaticum*, *Magnolia officinalis*, *Louicera japonica*, *Rheum palmatum* this 5 kinds of traditional Chinese medicine on bacteriostasis activity to *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*, and then investigate different proportion of the ethanol-extractions by orthogonal test on antimicrobial effect of both Gram positive bacteria. **Method:** The ethanol-extractions of *S. miltiorrhiza*, *S. aromaticum*, *M. officinalis*, *L. japonica*, *R. palmatum* were enriched to $0.2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Inhibition zone diameters were measured to evaluate the bacteriostatic effects and the different ethanol-extraction compatibility. **Result:** *Propionibacterium acnes* was highly sensitive to *S. miltiorrhiza* ethanol-extraction with the inhibition zone diameter of $(23.27 \pm 3.68)\text{ mm}$. It showed moderate sensitivity to *Syzygium aromaticum* and *Magnolia officinalis* ethanol-extractions, the inhibition zone diameters were (18.82 ± 2.27) and $(17.78 \pm 1.88)\text{ mm}$ accordingly. *Staphylococcus aureus* was highly sensitive to *S. aromaticum* and *M. officinalis* ethanol-extractions, the inhibition zone diameters were (21.94 ± 0.74) and $(19.52 \pm 1.09)\text{ mm}$ respectively. It showed moderate sensitivity to *R. palmatum* and *S. miltiorrhiza* ethanol-extractions, the inhibition zone diameters were (14.43 ± 2.24) and $(16.01 \pm 0.88)\text{ mm}$. The best mixed proportion of alcohol extract of *S. miltiorrhiza*,

[收稿日期] 2011-09-16

[第一作者] 林楠, 硕士研究生, E-mail: lin.nan2008@163.com

[通讯作者] * 孟宏, 副教授, 从事中医药对损容性疾病的作用研究及对相关优势病种的作用研究, Tel: 010-68987110, E-mail: menghong2000@163.com

M. officinalis and *S. aromaticum* was 1:1:1. The inhibition zone diameters of the compound to *Propionibacterium acne* and *Staphylococcus aureus* were (20.07 ± 1.26) and (20.57 ± 0.38) mm respectively. **Conclusion:** Alcohol extracts of *S. miltiorrhiza*, *M. officinalis*, *S. aromaticum* have high antibacterial activity to two species of bacteria. The best mixed proportion for alcohol extracts of *S. miltiorrhiza*, *M. officinalis*, *S. aromaticum* on antibacterial activity to two bacteria appears to be 1:1:1.

[**Key words**] ethanol-extraction of traditional Chinese medicine; *Propionibacterium acne*; *Staphylococcus aureus*; bacteriostatic effect *in vitro*; orthogonal test

痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌是皮肤表面2种常见的致病菌,它们都属于革兰阳性菌,它们产生透明质酸酶等成分可刺激皮肤,导致炎症,尤其是导致痤疮发生的重要原因^[1]。丹参中的丹参酮、丁香中的丁香酚、金银花的绿原酸、厚朴中的厚朴酚、大黄中的大黄素均有很好的抑菌效果。本实验选取丹参、丁香、金银花、厚朴、大黄醇提物,用牛津杯法^[2](也叫管碟法)分别考察他们对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活力。

1 材料

1.1 供试菌种 痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*, 编号 ATCC 11827),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 编号 ATCC 12228)均由北京工商大学中国化妆品研究中心提供。

1.2 药品 丹参、丁香、厚朴、金银花、大黄均购自同仁堂国药店,脑心浸液琼脂(北京陆桥技术有限公司),营养肉汤(北京陆桥技术有限公司)。

1.3 仪器 RE-2000型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),SZCL-L型数显智能控温磁力搅拌器、SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(均为巩义市予华仪器有限责任公司),mini-V/PCR型超净工作台(Telstar 西班牙),SHP-150型生化培养箱(上海森信实验仪器责任有限公司),YQX-II型生化厌氧培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),YX280D型手提式压力蒸气灭菌器(合肥华泰医疗设备有限责任公司)。

2 方法

2.1 提取方法 丹参以95%乙醇1:10料液比进行80℃回流1h提取^[3]。丁香以95%乙醇1:10料液比回流提取30min^[4]。金银花以70%乙醇料液比1:10加热回流2次,每次浸提1.5h^[5]。厚朴以65%乙醇料液比1:40提取1h^[6]。大黄以5倍量的乙醇回流,萃取4次,每次0.5h^[7]。将这5种中药醇提物,除去乙醇,并浓缩至 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加入等体积的丙二醇,使其更好的溶解,最终各中药的醇提物浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 单味中药醇提物对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌实验 痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌临用前分别接种于脑心浸提琼脂和营养肉汤培养基中,分别于厌氧生化培养箱和普通生化培养箱中37℃传代培养24h,将经培养基传代的各菌种于试管壁上研磨并溶于2mL生理盐水中,配制成相当于0.5麦氏比浊管浓度的菌悬液。将培养皿分成2份,分别向其中倒入预先融化好、并灭菌处理过的培养基,冷却,凝固。分别取2种细菌的菌悬液300μL于相应培养基(痤疮丙酸杆菌悬液移至含有脑心浸提琼脂的培养皿中,金黄色葡萄球菌悬液移至含有营养肉汤的培养皿中),均匀涂布,在每个培养皿上方均匀摆放3个牛津杯,杯中注入200μL同种中药提取液,作为3个平行。将放有痤疮丙酸杆菌的培养皿放入37℃厌氧生化培养箱中,放有金黄色葡萄球菌的培养皿放入37℃生化培养箱中,均培养48h后取出,观察,拍照,测量抑菌圈大小,体外抑菌定性结果的判定标准:抑菌圈直径<8mm为不敏感(-),8~13mm为低度敏感(+),13~19mm为中度敏感(++),>19mm为高度敏感(+++)^[8]。

2.3 中药醇提物配伍后抑制2种革兰阳性菌活性实验 将上述实验作为单因素试验,选出3种抑菌效果较好的中药醇提物,通过正交试验进行优化,将不同的配比继续进行抑菌实验,观察配比样品的抑菌活力,选择最佳比例。

3 结果

3.1 单味中药醇提物对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用 从表1可见,痤疮丙酸杆菌对丹参醇提物为高度敏感,对丁香、厚朴醇提物为中度敏感,对大黄醇提物为低度敏感,对金银花醇提物不敏感,金黄色葡萄球菌对丁香和厚朴醇提物为高度敏感,对大黄和丹参为中度敏感,对金银花醇提物为低度敏感。

3.2 正交试验优化中药醇提物的配伍对2种细菌的抑菌作用 从3.1可以看到,对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌作用最强的3种中药醇提物分

别是:丹参、厚朴、丁香。将这 3 种醇提物,即 A:丹参,B:厚朴,C 丁香,以所占比例为水平。

表 1 5 种中药醇提物对 2 种革兰阳性菌的
抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	痤疮丙酸杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm
大黄	9.40 ± 2.74	14.43 ± 2.24
丹参	23.27 ± 3.68	16.01 ± 0.88
厚朴	17.78 ± 1.88	19.52 ± 1.09
金银花	7.82 ± 0	10.65 ± 2.15
丁香	18.72 ± 2.27	21.94 ± 0.74

从表 2 可见,3 因素中 A 因素即丹参对实验结果的影响最大,为主要影响因素,B 因素最小,故将 B 作为误差进行方差分析,结果见表 3。通过方差分析可以看出 3 个因素对实验结果均无显著性影响,选择 ABC 3 个因素均占最大比例,故确定最佳中药配伍为 A₁B₁C₁,即丹参:厚朴:丁香 1:1:1。

表 2 正交试验优化中药醇提物不同配伍对痤疮
丙酸杆菌的抑制活力($\bar{x} \pm s, n=3$)

序号	A	B	C	抑菌圈直径 /mm
实验 1	1	1	1	20.07 ± 1.26
实验 2	1	2	2	18.63 ± 1.19
实验 3	2	1	2	7.80 ± 0
实验 4	2	2	1	15.31 ± 1.71
均值 1	19.35	13.94	17.69	
均值 2	11.56	16.97	13.22	
极差	7.80	3.04	4.48	

表 3 中药醇提物正交试验对痤疮丙酸杆菌抑制活力的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F
A	60.76	1	6.60
B	9.21	1	1.00
C	20.02	1	2.17
误差	9.21	1	

注: $F_{0.05} = 161.00$ 。

从表 4 可见,C 因素即丁香对实验结果影响最大,A 因素影响最小,以 A 作为误差,进行方差分析,见表 5。通过方差分析可以看出 3 个因素的 F 远远小于临界值 $F_{0.05}$,即对实验结果均无显著影响。选择 3 个因素均占最大比例即 A₁B₁C₁ 为最佳配伍。

通过正交试验得出不论是对痤疮丙酸杆菌还是对金黄色葡萄球菌,最佳复配比均为丹参:厚朴:丁香 = 1:1:1,该配伍对上述 2 种细菌的抑菌活力均为高度敏感。

表 4 正交试验优化中药醇提物不同配伍对
金黄色葡萄球菌的抑菌活力($\bar{x} \pm s, n=3$)

序号	A	B	C	抑菌圈直径 /mm
实验 1	1	1	1	20.57 ± 0.38
实验 2	1	2	2	15.46 ± 0.8
实验 3	2	1	2	15.88 ± 1.45
实验 4	2	2	1	16.26 ± 3.74
均值 1	18.01	18.22	18.42	
均值 2	16.07	15.86	15.67	
极差	1.94	2.36	2.74	

表 5 中药醇提物不同配伍对金黄色葡萄球菌抑制活力的方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F
A	3.78	1	1.00
B	5.59	1	1.48
C	7.54	1	1.99
误差	3.78	1	

注: $F_{0.05} = 161.00$ 。

4 讨论

研究表明,对于痤疮丙酸杆菌,短期使用抗生素导致耐药菌株发生率为 6.25%,长期使用抗生素,则高达 21.6%,其中对红霉素耐药菌株最为常见,其次是四环素类^[9],而且痤疮丙酸杆菌对红霉素和四环素的耐药基因已经找到,其耐药机制也越来越清晰^[10-11]。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)导致的院内感染和社区感染在逐年增加,美国每年有 29.2 万人因金黄色葡萄球菌感染而去医院治疗,这些患者中 40% 由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染^[12]。

中草药在抗菌消炎方面一直发挥着重要作用,与抗生素不同,细菌很少对中草药产生耐药性,研究发现,黄芩中的黄芩苷对耐药性金黄色葡萄球菌活性有较好的抑制作用^[11]。因此研究和开发抑制耐药性菌株的中药或中药醇提物,对于防止耐药菌株产生或者防治耐药性菌株引起的疾病具有重大意义。

本实验进行了单种中药和中药配伍后的体外抑菌实验,得到了对痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌均有很好抑菌作用的中药配伍。结果显示:大黄、金银花、丹参、厚朴、丁香醇提物对于痤疮丙酸杆菌的抑菌活力为丹参 > 丁香 > 厚朴 > 大黄 > 金银花,而对金黄色葡萄球菌的抑菌活力则为:丁香 > 丹参 > 厚朴 > 大黄 > 金银花,其中丹参、丁香、厚朴对这 2

种菌的抑菌活力同时具有高度敏感。通过正交试验得出对这2种菌共同产生抑菌活性的最佳配比例为丹参:厚朴:丁香=1:1:1,抑菌活力为高度敏感。丹参:厚朴:丁香的醇提物比例为2:1:2时,对于痤疮丙酸杆菌的抑制效果大大减小,结果为不敏感。中药间的相互作用与构效关系还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李继安. 痤疮病因的研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2000,3(7):677.
- [2] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品科学, 2006,27(3):110.
- [3] 宋小妹,唐志书. 中药化学成分提取分离与制备[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:136.
- [4] 张宏波,洪波. 乙醇回流提取丁香酚的新方法[J]. 吉林大学自然科学学报, 2001,4(2):677.
- [5] 李莉. 金银花提取工艺的研究[D]. 天津:天津大学化工学院, 2007: 46.
- [6] 张朝晖,王秋兰,姚茂君. 厚朴枝中厚朴酚及和厚朴酚提取工艺比较[J]. 食品科学, 2010,31(6):32.

- [7] 李红霞,王坤杰. 大黄最佳提取方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2008,36(29):12753.
- [8] 秦文艳,赵金明,齐越,等. 射干醇提物体内体外抑菌作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(4):147.
- [9] Eady E A. Bacterial resistance in acne [J]. Dermatology, 1998, 196:59.
- [10] West H H, Hougaard D M, Vuust J, et al. Prevalence of erm gene classes in erythromycin-resistant staphylococcus aureus strains isolated between 1959 and 1988 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(2):369.
- [11] Roberts M C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution [J]. Fems Microbiol Rev, 1996, 19:1.
- [12] 孙冬梅,邝枣园. 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.

[责任编辑 何伟]

作者更正

论文题目〈大蒜3个有效部位联合应用对人胃癌 MKN45 细胞的杀伤作用〉,发表在本刊 2011 年 7 月第 17 卷第 14 期 152~155 页上。其内容“3 个有效部位组合最佳配比为大蒜油:大蒜多糖:大蒜总皂苷 1:2:1”的比值,由于作者书写错误,应改为“1:20:10”。特此更正。

作者:薛欣