

不同剂型中草药抑菌水平的分析

王永立, 樊淑华, 许爱红

(周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466001)

摘要: 为观察中草药提取物的体外抑菌效果, 按常规法制备中草药复方 A (黄芩、连翘、大黄、蒲公英) 和复方 B (白头翁、黄连、黄柏、秦皮) 的水提取物、醇提取物, 利用管碟法和试管 2 倍稀释法测定中草药提取物抑菌圈的大小和对大肠杆菌的最低抑菌浓度 (MIC)。结果表明, 2 种中草药复方对大肠杆菌均有一定的抑制作用, 并且醇提取物的抑菌效果均优于其水煮提取物 ($P < 0.05$)。其中复方 A 的醇提取物和水煮提取物的 MIC 分别是 15.625 mg/mL 和 31.25 mg/mL; 复方 B 的醇提取物和水煮提取物的 MIC 分别是 31.25 mg/mL 和 62.5 mg/mL。

关键词: 中草药; 提取物; 最小抑菌浓度

中图分类号: S853.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)06-0158-03

Analysis of the Antibacterial Effects of Different Dosage Forms of Chinese Herbal Medicine

WANG Yong-li, FAN Shu-hua, XU Ai-hong

(Department of life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Water-and ethonal-extracts from two kinds of Chinese herbal medicine compound A (*Scutellaria*, *Forsythia*, *Rhubarb*, *Dandelion*) and B (*Anemone*, *Berberine*, *Cortex phellodendri*, *Cortex fraxini*) were obtained using normal methods and their *in vitro* antibacterial effects on *Escherichia coli* and the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by the method of agar cup-plate and two-fold tube dilution. The results showed that all the two kinds of Chinese herbal preparation extracts have dramatically antibacterial effects on *E. coli* and the ethanol extracts on the antibacterial activity were better than theirs boiling water extracts ($P < 0.05$). In compound A, the MIC of the alcohol and boiled extract was 15.625 mg/mL and 31.25 mg/mL, respectively. In compound B, the MIC of the alcohol and boiled extracts was 31.25 mg/mL and 62.5 mg/mL, respectively.

Key Words: Chinese herbal medicine; extraction; minimum inhibitory concentration (MIC)

近年来, 由于在动物疫病防治中过度使用抗菌药物, 兽医临床上病原菌耐药性问题日趋严重, 同时药物残留和药物毒副作用所导致的畜产品安全问题也愈发凸显^[1]。因此, 研发既能有效防治细菌性疾病又能解决病菌耐药性且残留较低的药物迫在眉睫。临床实践表明, 中草药作为我国特有的中医药理论与实践的产物, 其品种多样、资源丰富、价格低廉、疗效明显、毒副作用小、易于代谢, 并且以其富含多种活性成分、抗菌机制特殊、逆转细菌耐药等独特优势, 被广泛用于动物疫病防治, 成为替代抗生素解决抗药性和药残的方向之一^[2]。

本试验选取 8 味中草药配制成 2 种复方制剂, 采用不同方法提取其有效成分, 通过不同提取物对大肠杆菌体外抗菌活性的比较研究, 以期筛选出高抗活性的中草药制剂, 为大肠杆菌病的治疗和中草药有效成分的提取提供理论依据, 并为中草药抑制剂的筛选和添加剂量提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试中药 黄芩、连翘、秦皮、蒲公英、大黄、白头翁、黄连、黄柏, 均购于周口市同和堂大药店。

收稿日期: 2011-11-14

基金项目: 周口师范学院青年科研基金资助项目 (zknuqn201101)

作者简介: 王永立 (1978-), 男, 河南西平人, 讲师, 硕士, 主要从事动物疫病防治研究。E-mail: wangylixiaohe@yahoo.com.cn

根据中药组方的原则,即药性的四气五味,药物间的相须、相使等^[3],将 8 味中药进行组方,分别为复方 A:黄芩、连翘、大黄、蒲公英;复方 B:白头翁、黄连、黄柏、秦皮。

1.1.2 供试菌种 大肠杆菌由周口师范学院生命科学系微生物实验室提供。

1.1.3 培养基 LB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基均按常规方法配制。

1.2 试验方法

1.2.1 复方中草药提取物的制备

1.2.1.1 水煮法提取中草药 称取复方 A、B 中的药材各 50 g,分别加水 400 mL 浸泡 2 h 后,文火煎煮 2 h,8 层纱布过滤药液;药渣加水 200 mL 煮沸后煎煮 1.5 h,过滤药液;药渣再加水 100 mL,煮沸后煎煮 40 min,合并 3 次药液文火浓缩至 50 mL(药液中生药含量为 1.0 g/mL)。1 000 r / min 离心 10 min,取上清液,调 pH 值至 7.4~7.6 灭菌备用。

1.2.1.2 乙醇抽提法提取中草药 将复方 A、B 中药材粉碎,分别称取中药粉末各 50 g,以 95%的乙醇浸泡,首次用 400 mL 乙醇浸泡 24 h 后用抽滤机抽提,药渣加 200 mL 乙醇浸泡 12 h 后再次抽提,第 3 次药渣加 100 mL 乙醇浸泡 10 h 后抽提,弃去药渣,合并 3 次提取液,用文火蒸发浓缩至 50 mL(药液中生药含量为 1.0 g/mL)。1 000 r / min 离心 10 min,取上清液,调 pH 值至 7.4~7.6 灭菌备用。

1.2.2 待测菌液的制备 在无菌条件下,用接种环将贮存的大肠杆菌用平板划线法接种于牛肉膏蛋白胨培养基中,37℃下培养 24 h 复壮;取复壮后菌种再接种于 LB 培养基,制成菌悬液,37℃培养 24 h,待用。

1.2.3 供试中草药抑菌活性测定 无菌条件下,将 100 μL 菌液均匀涂布在牛肉膏蛋白胨培养基平板上,待平板表面水分吸收后,将牛津杯放在培养基平板上,在牛津杯中加入 100 μL 供试药,并同时作培养基对照和空白对照试验。置 37℃下恒温培养箱中培养 24 h,记录抑菌圈直径,求其平均值。用此法分别测定 4 种提取药物抑菌圈直径。

1.2.4 最小抑菌浓度(MIC)测定 采用试管 2 倍稀释法^[4]。取 9 支无菌试管,前 8 支每管加入 5 mL LB 培养基,然后在第 1 管加入 5 mL 灭菌的中药提取物,混匀后吸取 5 mL 加入第 2 管中,混匀后吸取 5 mL 加入第 3 管中,依次类推,对药液进行 2 倍倍比稀释,直至第 7 管,第 7 管吸取 5 mL 弃去,使药液质量浓度为 500~7.812 5 mg/mL;第 8 管仅加菌液作为对照,以观察细菌的生长情况;第 9 管仅加受试中草药提取物 5 mL,以便观察受试中草药是否被

污染。取培养好的菌液 100 μL 接种于前 7 支试管中,37℃下培养 24 h 观察结果。以无菌生长的最低稀释度为 MIC(本试验中,由于药液颜色较深不易观察,所以取各个稀释度的培养液 50 μL 均匀涂布牛肉膏蛋白胨培养基平板,置 37℃下恒温培养箱中培养 20 h 观察结果,以确定在某个质量浓度下大肠杆菌是否生长)^[5]。用此法分别测定 4 种药液的 MIC 值。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析处理。结果用平均数±标准差表示,对不同提取方法的抑菌圈直径用方差分析进行显著性检验。

1.2.6 标准曲线的制作 以不同药液的稀释度为横坐标,以各个稀释度所测的抑菌圈直径为纵坐标,制作 4 种药物的标准曲线,以判定药物浓度与抑菌效果的相关性。

2 结果与分析

2.1 供试中草药抑菌活性测定结果

由表 1 可知,4 种中草药药液均有明显的抑菌作用,对大肠杆菌均有较高的敏感性,复方 A 的水煮液和醇提液呈高度敏感,复方 B 的醇提液也呈高度敏感,复方 B 的水煮液呈中度敏感。其中复方 A、B 的醇提液抑菌效果均优于其水煮液,且 A 药液整体上比 B 的抑菌效果好。

表 1 4 种药液对大肠杆菌的抑菌圈直径 mm

| 药液 | 次数 | | | | 平均值 |
|----------|----|----|----|----|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 复方 A 醇提液 | 25 | 28 | 26 | 25 | 26±1.414 |
| 复方 A 水煮液 | 19 | 17 | 19 | 17 | 18±1.155 |
| 复方 B 醇提液 | 24 | 22 | 21 | 21 | 22±1.414 |
| 复方 B 水煮液 | 15 | 14 | 13 | 14 | 14±0.816 |

2.2 MIC 测定结果

结合各个稀释度培养液中大肠杆菌在牛肉膏蛋白胨培养基平板上的生长情况,本研究中 MIC 测定结果表明,2 种中药混合物的醇提物抑菌效果均优于对应的水煮提取物抑菌效果。其中,A 醇提液的 MIC 为 15.625 mg/mL,A 水煮液的 MIC 为 31.25 mg/mL;B 醇提液的 MIC 为 31.25 mg/mL,B 水煮液的 MIC 为 62.50 mg/mL(表 2)。

表 2 不同药液的 MIC mg/mL

| 药液 | MIC |
|----------|--------|
| 复方 A 醇提液 | 15.625 |
| 复方 A 水煮液 | 31.25 |
| 复方 B 醇提液 | 31.25 |
| 复方 B 水煮液 | 62.50 |

2.3 4 种药液不同稀释度与其抑菌圈的标准曲线

4 种药液的不同稀释度与其抑菌圈直径的相关性都较好, R^2 均达到 0.97 以上, 结果如图 1、2、3、4 所示。

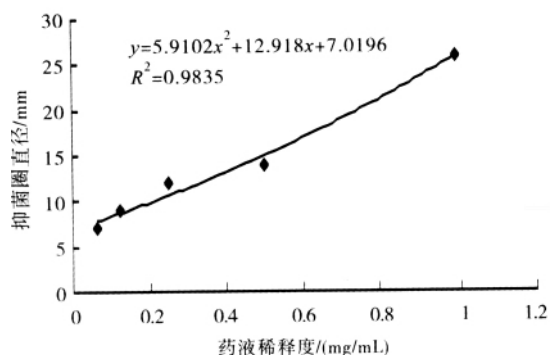


图 1 复方 A 醇提取物的抑菌圈曲线

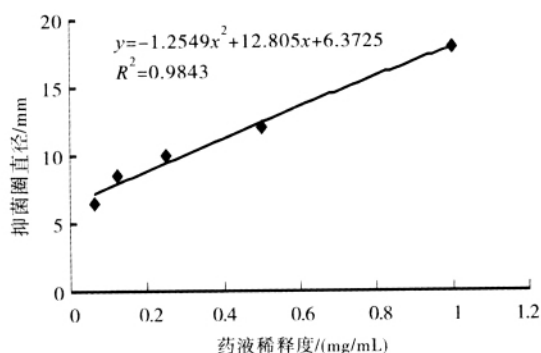


图 2 复方 A 水煮液提取物的抑菌圈曲线

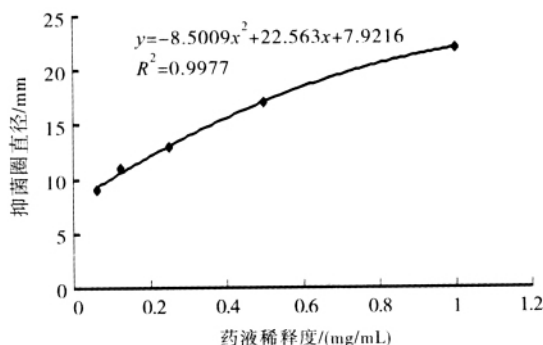


图 3 复方 B 醇提取物的抑菌圈曲线

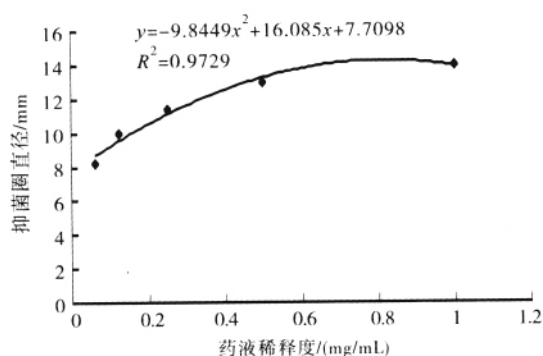


图 4 复方 B 水煮液提取物的抑菌圈曲线

3 结论与讨论

3.1 不同中草药对大肠杆菌的影响

本次试验结果表明, 复方 A、B 均对大肠杆菌有较好的抑制效果, 说明采用这 2 种中草药制剂治疗大肠杆菌病都具有一定的可行性。分析发现, 黄芩、连翘、大黄、蒲公英等 4 种中药混合物的抑菌效果明显优于秦皮、白头翁、黄连、黄柏(白头翁散)等 4 种混合物的药效 ($P < 0.05$)。然而, 中草药成分复杂, 抗菌机制特殊, 体外抑菌试验与体内试验结果并不完全一致^[6]。复方 A 能否在畜禽体内达到有效抗菌浓度而发挥疗效, 有待进一步研究。

3.2 不同提取方法对 MIC 的影响

本研究结果表明, 不同提取方法对中草药的 MIC 影响较大, 2 种复方中草药醇提取物的抑菌效果均好于水煮液, 这可能与中草药的有效成分有关。研究发现, 中药中抗菌的有效成分主要是生物碱、有机酸、蒽类、黄酮、醌类等^[7]。所以, 在醇提过程中, 这些物质更易溶于乙醇中。而水煮法中, 部分化学物质难溶于水或对热敏感, 具有挥发性, 因此, 在煎煮过程中, 抑菌活性有效成分不能充分释放出^[8], 从而影响抑菌效果, 导致某些药物的 MIC 值偏高。另外, 所试药物还进行了高压灭菌, 这也可能会导致某些中草药制剂的药理活性降低, 从而影响其抑菌效果^[8]。

中草药以其兼有药物性和营养性被广泛用于病原微生物疾病的防治, 具有良好的开发前景和应用价值。本研究采用常规法验证了复方 A 的抑菌效果明显优于复方 B, 该结果可以为防治畜禽大肠杆菌病提供用药依据。但条件受限, 该复方的体内及临床试验效果如何, 还需建立合适的试验方法和准确高效的检验体系, 结合体内、体外及临床疗效进行全面评估, 为开发和综合利用该资源提供科学依据。

参考文献:

- [1] 秦四海. 自拟中草药复方防治蛋雏鸡大肠杆菌病的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(8): 41-46.
- [2] 鞠洪涛, 韩文瑜, 压世若, 等. 大肠杆菌耐药基因定位及耐药质粒消除[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(6): 561-564.
- [3] 李淑梅, 杨帆. 中草药提取物对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 621-622.
- [4] 张为民, 邢福珊, 徐永平, 等. 2 株奶牛乳房炎分离菌的耐药性检测及中草药体外抑菌试验[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 7-11.
- [5] 陈虹, 刘磊, 吴润, 等. 12 种中草药对 8 种畜禽肠道病原菌的体外抑菌试验[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(3): 26-30.
- [6] 赵恒章, 李国旺, 徐之勇, 等. 60 种中草药对猪源致病性大肠杆菌体外抑菌试验[J]. 河南农业科学, 2008(10): 129-131.
- [7] 刘华钢, 申庆荣, 刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 463-465.
- [8] 司红彬, 陈鹏举, 赵瑞丽, 等. 用改进的方法测中草药对细菌的体外抑菌试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(9): 75-76.