

本文引用:张晓青,惠华英,李斌,陈伶俐.五味消毒饮中大孔树脂分离部位的体外抗菌活性研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):858-861.

## 五味消毒饮中大孔树脂分离部位的体外抗菌活性研究

张晓青,惠华英,李斌,陈伶俐\*  
(湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 检测五味消毒饮不同分离部位的体外抗菌活性,为五味消毒饮的二次开发提供实验依据。方法 本研究将五味消毒饮水煎液用NKA-9大孔树脂进行吸附分离得到不同部位的洗脱液,用牛津杯法测定其抑菌圈,并用试管稀释法检测洗脱液对细菌的最低抑菌浓度(MIC)。**结果** 各分离部位对不同菌株的抑菌效果有显著差异,30%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌和志贺氏痢疾杆菌的抑制效果最好,MIC分别为0.055 g/mL和0.150 g/mL;而水洗液对肺炎链球菌的抑制效果最佳,MIC为0.184 g/mL,对金黄色葡萄球菌和志贺氏痢疾杆菌没有抑制作用;水洗液、10%乙醇洗脱液、30%乙醇洗脱液对绿脓杆菌几乎没有抑制效果,极性稍小的50%乙醇洗脱液、70%乙醇洗脱液、90%乙醇洗脱液对绿脓杆菌有较弱的抑制效果。**结论** 五味消毒饮的不同分离部位对不同细菌的抑制效果不同,为经典方剂“五味消毒饮”的二次开发提供了理论依据和数据支持。

**〔关键词〕** 五味消毒饮;NKA-9大孔树脂;最低抑菌浓度;洗脱液

**〔中图分类号〕**R285.5;R284.2

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.08.004

### *In vitro* Antibacterial Activity of the Part of Wuwei Xiaodu Decoction Separated by Macroporous Resin

ZHANG Xiaoqing, HUI Huaying, LI Bin, CHEN Lingli\*

(School of Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the *in vitro* antibacterial activity of different separated parts of Wuwei Xiaodu Decoction, and to provide an experimental basis for the secondary development of Wuwei Xiaodu Decoction. **Methods** The water extract solution of Wuwei Xiaodu Decoction was absorbed and separated by NKA-9 macroporous resin to obtain the eluent of each part. The Oxford cup method was used to measure the inhibition zone, and the tube dilution method was used to measure the minimal inhibitory concentration (MIC) of the eluent. **Results** There was a significant difference in antibacterial effect on different strains between the separated parts. The 30% ethanol eluent had the best inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Shigella dysenteriae*, with an MIC of 0.055 g/ml and 0.150 g/ml, respectively. The water extract had the best inhibitory effect on *Streptococcus pneumoniae*, with an MIC of 0.184 g/ml, while it had no inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Shigella dysenteriae*. The water extract, 10% ethanol eluent, and 30% ethanol eluent had little inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*, and 50% ethanol eluent with less polarity, 70% ethanol eluent, and 90% ethanol eluent had a weak inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusion** Different separated parts of Wuwei Xiaodu Decoction have a different inhibitory effect on different bacteria, which provide a theoretical basis and data support for the secondary development of the classic prescription Wuwei Xiaodu Decoction.

**〔Keywords〕** Wuwei Xiaodu Decoction; NKA-9 macroporous resin; minimal inhibitory concentration; eluent

**〔收稿日期〕**2017-12-14

**〔基金项目〕**国家自然科学基金项目(81703985);湖南省教育厅科研项目(14C0860)。

**〔作者简介〕**张晓青,女,硕士,副教授,研究方向:生物传感器在中药学领域的应用研究。

**〔通讯作者〕**\* 陈伶俐,女,硕士研究生导师,教授,E-mail:28394325@qq.com。

五味消毒饮是出自清代名著《医宗金鉴》的经典名方,由金银花、野菊花、蒲公英、紫花地丁、紫背天葵子组成,具有清热解毒、消散疔疮等功效,具有广谱抗菌作用,在临床上被广泛应用于临床各科中属于热毒所致的疾患,如内科泌尿系统、消化系统、呼吸系统、心脑血管系统等多种疾病,广泛用于多种炎症感染性疾病,如急性泌尿系统感染、带状疱疹、痤疮或外科疮痍疔肿等热毒炽盛的疾病,均有良好效果<sup>[1-4]</sup>。

目前对五味消毒饮中单味药的成分<sup>[5-6]</sup>,以及用大孔树脂对君药成分的吸附效果都已进行了深入研究,据报道 NKA-9 型大孔树脂的吸附效果较好<sup>[7-8]</sup>。现代药理学研究表明,五味消毒饮有广谱抗菌作用<sup>[9]</sup>,并具有对细菌耐药性低、调节免疫<sup>[10]</sup>等功效。

依据五味消毒饮的临床应用研究<sup>[11-13]</sup>,本实验研究了五味消毒饮水煎液的抗菌活性物质。我们选用于人类重要的革兰氏阳性病原菌黄色葡萄球菌、最为常见的人类细菌性痢疾病原菌革兰氏阴性杆菌志贺氏痢疾杆菌、能引起急性肠胃炎的乙型副伤寒杆菌、伤口感染较常见的绿脓杆菌以及对多种抗生素具备耐受性分布于人类上呼吸道、胃肠道、泌尿道及生殖道中的常见细菌肺炎链球菌共五种代表菌株。用 NKA-9 大孔树脂对五味消毒饮的水提液进行分离,得到不同部位的洗脱液,研究其对五种代表菌株的抗菌活性,为五味消毒饮经典复方抗菌药物的二次开发提供理论基础和实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要试剂与菌株

NKA-9 型大孔树脂,购自天津欧瑞生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC25923)、痢疾杆菌(*Shigelladysenteriae*, ATCC12022)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC27853)、乙型副伤寒杆菌(*Bacillus paratyphosus*, CMCC50094)和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, ATCC49619),以上菌种均由湖南中医药大学病原免疫实验室提供。

### 1.2 主要药材

金银花 20 g,野菊花、蒲公英、紫花地丁、紫背天葵子各 15 g。处方中金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thumb. 的干燥花蕾或带初开的花;蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. 的干燥全草;野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序;紫花地丁为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino

的干燥全草;紫背天葵子为毛茛科物天葵 *Semiaquilegia adoxioides* (DC.) Makino 的块根。以上各药材均购自老百姓大药房,经湖南中医药大学药学院周日宝教授鉴定。

## 2 方法

### 2.1 固体培养基的制备

营养琼脂培养基的制备:MH 琼脂高压灭菌后倾注于 90 mm 平皿,每个约 25 mL,备用。

血平板培养基的制备:每 500 mL 双蒸水中加入 20 g 营养琼脂,高压灭菌后,冷至 56 °C 加入无菌绵羊血 25 mL,混匀后倾倒入 70 mm 平皿中,备用。

### 2.2 大孔树脂预处理

将 NKA-9 大孔树脂用无水乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,加入乙醇清洗至洗出液无白色浑浊后,并加入蒸馏水洗至无乙醇。加入 2 倍树脂柱体积(2BV)的 5%NaOH 溶液浸泡 3 h,蒸馏水清洗至洗出液呈中性。最后加入 2BV 的 5%盐酸水溶液浸泡 3 h,用蒸馏水清洗至洗出液呈中性后备用。

### 2.3 五味消毒饮水提液的制备

按 5 付方剂量称取五味消毒饮生药材(不粉碎),共计 400 g,加入 10 倍量蒸馏水浸泡 60 min,煎煮 30 min,然后加入 8 倍量蒸馏水煎煮 20 min,最后再加入 6 倍量蒸馏水煎煮 20 min,合并 3 次滤液,65 °C 减压浓缩至 400 mL,得浓缩液(浓度为 1 g/mL,每毫升溶剂含生药材 1 g),备用。

### 2.4 五味消毒饮各洗脱液的制备

将预处理好的 NKA-9 大孔树脂 10 g 湿法装柱,用 95%乙醇和适量蒸馏水洗脱柱子,直至洗脱液无白色浑浊为止,水洗至无醇味。将五味消毒饮的浓缩液上柱吸附 2 h,依次用 2BV 的蒸馏水,10%、30%、50%、70%、90%的乙醇进行洗脱,将洗脱液减压浓缩,得到各浓缩液的浓度依次为 1.47、2.60、3.49、1.20、3.62、2.70 g/mL(即每毫升溶剂含有的生药材量)。

### 2.5 抑菌活性的测定

2.5.1 牛津杯法测定抑菌圈 将浓度为  $1 \times 10^6$  cfu/mL 的待检菌液均匀涂布于固体培养基上,金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和志贺氏痢疾杆菌使用营养琼脂平板,而肺炎链球菌和乙型副伤寒杆菌则均匀涂布于血平板上。将灭菌牛津杯用无菌镊子夹出,先置于酒精灯火焰上迅速过一下火,垂直放置于培养基表面,轻轻按压,使杯底与培养基之间无缝隙。每个平板放置 4 个牛津杯。每个牛津杯注入 200  $\mu$ L 浓缩洗脱液,37 °C 培养 24 h,量取抑菌圈的大小。

2.5.2 试管稀释法测定5种细菌的最低抑菌浓度 每支无菌试管中加肉汤培养基1 mL,第1管加所试药液混匀后,使1~9管均含有倍比稀释的洗脱液的比例分别为1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256,1:512,1:1024,每管加菌液0.05 mL( $1 \times 10^6$  cfu/mL),并设阴性对照组(MH液体培养基)和阳性对照组(加菌,不加药液)。37℃条件下培养24 h,以不生长菌落的最高药物稀释浓度为对该种细菌的最低抑菌浓度(MIC)。

## 2.6 统计方法

五味消毒饮不同分离部位的抑菌圈数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间数据的采用SPSS 19.0软件进行 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 抑菌圈法定性检测五味消毒饮分离部位的抗菌效果

从抑菌圈直径分析,五味消毒饮不同分离部位对同一菌株的抑菌圈直径存在很大差异,其中30%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌的抑制效果最强,结果如表1所示。对金黄色葡萄球菌:30%、10%、90%的乙醇洗脱液表现出明显的抑菌活性,其中30%的乙醇洗脱液最强,而水洗液及50%、70%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌无抑制作用;对志贺氏痢疾杆菌:除水洗液及90%乙醇洗脱液外的其它分离部位都表

现出抑菌活性( $P < 0.05$ ),其中30%乙醇洗脱液最强,而水洗液及50%、70%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌无抑制作用;对志贺氏痢疾杆菌:除水洗液及90%乙醇洗脱液外的其它分离部位都表现出抑菌活性,其中30%乙醇洗脱液的抑菌活性最强,而10%和50%乙醇洗脱液相差不大,且强于70%乙醇洗脱液;对肺炎链球菌:只有90%乙醇洗脱液没有抑制作用,其它分离部位的抑菌活性显著( $P < 0.05$ );对乙型副伤寒杆菌:水洗液、50%和30%乙醇洗脱液的抑菌圈直径相差不大;对绿脓杆菌:70%乙醇洗脱液的抑制效果较好,但其抑菌圈较小实际意义不大。

同一分离部位对不同菌株的抑菌圈分析可知,30%乙醇洗脱液的对不同菌株的抑制效果差异最大:金黄色葡萄球菌>志贺氏痢疾杆菌>肺炎链球菌>乙型副伤寒杆菌>绿脓杆菌。而10%乙醇洗脱液的抑制效果:金黄色葡萄球菌>志贺氏痢疾杆菌(肺炎链球菌)>乙型副伤寒杆菌(绿脓杆菌)。水洗液对肺炎链球菌和乙型副伤寒杆菌的抑制效果较好。50%乙醇洗脱液对志贺氏痢疾杆菌、肺炎链球菌、乙型副伤寒杆菌的抑制作用没有明显差异,但强于对绿脓杆菌的抑制作用。70%乙醇洗脱液对志贺氏痢疾杆菌和肺炎链球菌的抑制效果相差不大,但强于对绿脓杆菌的抑制效果。90%乙醇洗脱液只对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌有抑制作用,且对前者的抑制作用明显强于后者。

表1 五味消毒饮不同分离部位的抑菌圈直径

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

菌株	不同浓度乙醇洗脱液的抑菌圈直径/mm					
	水洗液	10%乙醇	30%乙醇	50%乙醇	70%乙醇	90%乙醇
金黄色葡萄球菌	0	17.52±0.12*	22.05±0.48	0	0	15.63±0.28
志贺氏痢疾杆菌	0	11.46±0.10	20.09±0.28	11.66±0.50	10.99±0.38* <sup>△</sup>	0
肺炎链球菌	11.81±0.20	11.35±0.17 <sup>△</sup>	11.60±0.10	11.60±0.30	11.10±0.18* <sup>△</sup>	-
乙型副伤寒杆菌	10.86±0.21*	-	10.65±0.38* <sup>△</sup>	11.71±0.11	-	-
绿脓杆菌	0	0	0	9.08±0.10	9.66±0.20*	8.63±0.25 <sup>△</sup>

注:“-”表示无抑菌圈。五味消毒饮的不同分离部位在抑制同一菌株中比较差别有统计学意义,\* $P < 0.05$ ;同一分离部位对不同菌株的抑菌圈比较,差异有统计学意义, $\Delta P < 0.05$ 。

### 3.2 MIC定量比较五味消毒饮分离部位的抗菌效果

依据“3.1”项的实验结果,对抑菌效果较好的分离部位用试管稀释法确定其MIC,每个实验重复5次,结果如表2所示。MIC数据显示,每种分离部位对不同菌株的抑制作用不同,水洗液对肺炎链球菌的抑制效果强于对乙型副伤寒杆菌的抑制作用( $P < 0.05$ )。10%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌、志贺氏痢疾杆菌的抑制作用强于对肺炎链球菌和乙型

副伤寒杆菌,但效果明显小于30%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌、志贺氏痢疾杆菌的抑制作用,后者MIC分别为0.055 g/mL、0.109 g/mL。50%乙醇洗脱液对志贺氏痢疾杆菌的MIC为0.150 g/mL,抑制作用强于对其它菌株的抑制作用( $P < 0.05$ )。70%乙醇洗脱液的抗菌活性明显较差( $P < 0.05$ ),其中对志贺氏痢疾杆菌的MIC最小,为0.453 g/mL。90%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌有抗菌效果较明显,MIC为

0.338 g/mL。

表 2 五味消毒饮不同分离部位的 MIC 比较 (n=10)

菌株	不同浓度乙醇洗脱液的 MIC					
	水洗液	10%乙醇	30%乙醇	50%乙醇	70%乙醇	90%乙醇
金黄色葡萄球菌	-	0.325	0.055* <sup>△</sup>	-	-	0.338
志贺氏痢疾杆菌	-	0.325 <sup>△</sup>	0.109	0.150	0.453* <sup>△</sup>	-
肺炎链球菌	0.184*	0.650	0.436	0.600*	1.810	1.350
乙型副伤寒杆菌	0.668	1.300	0.436 <sup>△</sup>	0.600	1.810	0.675

注：“-”表示无抑菌作用。五味消毒饮的不同分离部位的对同一菌株的 MIC 的差异比较有统计学意义,\* $P<0.05$ ; 同一分离部位对不同菌株的 MIC 的差异比较有统计学意义, $\Delta P<0.05$ 。

## 4 讨论

五味消毒饮中的君药为金银花,具有清热解毒、消散痈肿的功效。紫花地丁、紫背天葵子具有清热解毒、消散疔疮的作用,蒲公英、野菊花具有清热解毒、消散痈肿的功效,这四味均为辅佐药,各药合用,增强清热解毒的功效。本实验中复方水煎液的 30%乙醇洗脱液对金黄色葡萄球菌的抗菌效果最强,文献报道金银花单味药的黄酮成分金丝桃苷,对于金黄色葡萄球菌的作用很强<sup>[14]</sup>。而且金丝桃苷只有一个六元糖极性较大,所有在五味消毒饮中 30%乙醇洗脱液中的含量相对较高,所以对金黄色葡萄球菌的抗菌效果最强,充分说明君药金银花在复方中起的重要作用。绿原酸是金银花的主要抗菌成分,其对绿脓杆菌藻酸盐的大量产生,降低生物膜的复杂性,并减小生物膜的产生。与抗生素联合使用效果更加,能明显减小绿脓杆菌耐药性的产生<sup>[15]</sup>。而在本实验中由于提取浓缩五味消毒饮时间较长,可能会破坏其绿原酸的结构,从而导致各提取部位对绿脓杆菌的抑制效果很差。

实验结果证明,同一分离部位对不同菌株,以及不同分离部位对同一菌株,均有差异。其中,30%乙醇洗脱液的对金黄色葡萄球菌和志贺氏痢疾杆菌抗菌效果最好,抑菌效果随药液浓度的增大而增强。对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 0.055 g/mL,对志贺氏痢疾杆菌的 MIC 为 0.109 g/mL。湿疹患者的患部大多数(80%)细菌培养阳性,并且全部是葡萄球菌属<sup>[16]</sup>,其中金黄色葡萄球菌最多,因此五味消毒饮的 30%乙醇洗脱液分离部位有希望开发为治疗湿疹的药物。而

极性较大的水洗液部位对金黄色葡萄球菌抗菌、志贺氏痢疾杆菌、绿脓杆菌没有抑菌效果,对乙型副伤寒杆菌效果较好,对肺炎链球菌的抑制效果最佳,随浓度升高抑菌效果增强, MIC 为 0.184 g/mL,因此五味消毒饮的大孔树脂水洗液部位更利于抗呼吸系统和消化系统感染药物的开发。五味消毒饮复方水煎液各分离部位的具体抗菌成分及抗菌机制有待深入研究。

## 参考文献:

- [1] 郁韶明.五味消毒饮临床新应用[J].中华现代中医学杂志,2010,6(1):38-40.
- [2] 向敏,王建梅,顾瑶华.加味五味消毒饮提取物对小鼠角叉菜胶炎症模型的作用[J].中国现代医学杂志,2011,21(12):1462-1465.
- [3] 游俊,王英夫.五味消毒饮内服外敷治疗寻常性痤疮 35 例临床观察[J].中国医院药学杂志,2012,32(8):626-627.
- [4] 郭丽娜.五味消毒饮合仙方活命饮耳鼻喉科疾病的体会[J].时珍国医国药,2009,20(8):2068-2068.
- [5] 陈雅文.浅谈金银花的化学成分、药理作用和实用价值[J].中药研究,2013,21(5):70-71.
- [6] 毕跃峰,潘成学,王普菊,等.野菊花化学成分的研究[J].中国药理学杂志,2009,44(12):894-897.
- [7] 向福,冯鹏,刘亮,等.大孔树脂对罗田金银花叶中绿原酸的分离研究[J].食品与机械,2013,29(4):141-144.
- [8] 张默,霍清.利用大孔树脂提取绿原酸的研究[J].安徽农业科学,2009,37(17):8167-8168,8192.
- [9] 张世华,曾秀,付丽芝,等.五味消毒饮及各味药物对化脓性细菌的抑菌试验与病理模型疗效观察[J].畜禽业,2000(6):22-24.
- [10] 李永梅.金银花的抗腺病毒作用研究[J].华西药理学杂志,2001,16(5):327-329.
- [11] 黄水仙,田道法,江志超.五味消毒饮治疗大鼠实验性急性鼻咽炎的疗效观察[J].中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2006,14(1):11-13.
- [12] 王芝英,肖榕,张林,等.五味消毒饮对化脓性细菌的抑菌试验[J].四川畜牧兽医,2003,30(6):20-21.
- [13] 孔宪琴,梁航,杨国胜.五味消毒饮对猪链球菌病原体的体外抑菌试验[J].中兽医学杂志,2009(3):10-13.
- [14] 唐敏,刘耀,王渝,等.金银花总黄酮粗提物体外抑菌作用研究[J].中国药房,2008,19(30):2321-2323.
- [15] 吴海英.绿原酸对粘液型铜绿假单胞菌生物膜的干预以及对左氧氟沙星增效作用[D].南宁:广西医科大学,2011.
- [16] 赵行才,陈晓.50 例湿疹患者皮损部位定植细菌及其药敏试验分析[J].浙江临床医学,2009,11(2):138-139.

(本文编辑 苏维)