

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.02.006

金银花和野菊花乙醇提取物抑菌作用比较

杨海霞 张孝侠 程晓平 翟景花 方召阳

(济宁医学院法医学与医学检验学院, 济宁 山东 272067)

摘要 目的 研究金银花和野菊花乙醇提取物抑菌作用的差异。**方法** 采用抑菌环试验对它们的抑菌作用进行观察比较。**结果** 生药含量为 492mg/ml 金银花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌环直径均大于 8mm,而对枯草杆菌的抑菌环直径小于 8mm;生药含量为 1035mg/ml 野菊花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌的抑菌环直径均大于 8mm,而对大肠杆菌的抑菌环直径小于 8mm;金银花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌抑菌作用较强,两种菌的最低抑菌浓度皆为 1:8,对大肠杆菌的最低抑菌浓度为 1:4;野菊花乙醇提取物对大肠杆菌抑菌作用最强,最低抑菌浓度为 1:64;对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为对枯草杆菌的最低抑菌浓度为 1:16;对枯草杆菌的抑菌作用最弱,最低抑菌浓度为 1:4。**结论** 金银花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌有抑菌作用,而对大肠杆菌无抑菌作用;野菊花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌有抑菌作用,而对枯草杆菌无抑菌作用。

关键词 金银花乙醇提取物;野菊花乙醇提取物;抑菌作用

中图分类号:R282 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-9760(2013)04-097-04

Comparative study on bacteriostatic efficacy of honeysuckle and wild chrysanthemum

YANG Hai-xia, ZHANG Xiao-xia, CHENG Xiao-ping, et al

(Department of Forensic and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective The bacteriostatic efficacy of alcohol extract of honeysuckle and wild chrysanthemum were investigated in this work. **Methods** Their reaction was observed and compared by experiments with Paper Dish methods. **Results** The diameters of bacterial inhibition zones of two bacteria such as Staphylococcus aureus and Subtilis Bacillus to the ethanol extract containing honeysuckle crude drug 492mg/ml were larger than 8mm, but the diameters of bacterial inhibition zones of Escherichia coli and Bacillus to the ethanol extract containing honeysuckle crude drug 492mg/ml were smaller than 8mm. The diameters of bacterial inhibition zones of two bacteria such as Staphylococcus aureus and Escherichia coli and Bacillus to the ethanol extract containing wild chrysanthemum drug 1035mg/ml were larger than 8mm, but the diameters of bacterial inhibition zones of Subtilis Bacillus to the ethanol extract containing wild chrysanthemum drug 1035mg/ml were smaller than 8mm. The minimal inhibitory concentration was 1:8, such as honeysuckle alcohol extract to Staphylococcus aureus and Subtilis Bacillus. The minimal inhibitory concentration was 1:4 such as honeysuckle alcohol extract to the E. coli. The minimal inhibitory concentration was 1:64 such as wild chrysanthemum alcohol extract to the E. coli. The minimal inhibitory concentration was 1:16 such as wild chrysanthemum alcohol extract to the Staphylococcus aureus. The minimal inhibitory concentration was 1:4 such as wild chrysanthemum alcohol extract to the Subtilis Bacillus. **Conclusion** The honeysuckle extract has obvious bacteriostatic effect to Staphylococcus aureus and Subtilis Bacillus, but the honeysuckle extract has no inhibitory effect to Escherichia coli and Bacillus. The wild chrysanthemum extract has obvious bacteriostatic effect to Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Bacillus, but the honeysuckle extract has no inhibitory effect to Subtilis Bacillus.

Key words: Honeysuckle extract; Wild chrysanthemum extract; Bacteriostatic efficacy

金银花,为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾,具有清热解毒、凉风散热的功效,其主要有效成分为绿原酸,有抗菌消炎的作用^[1]。野菊花系菊科植物野菊、北野菊或岩香菊的干燥头状花序^[2],具有清热

解毒、疏风平肝之功效,在我国民间药用历史悠久,中国药典(2005 年版)收载其栓剂用于抗菌消炎^[3]。近年来,国内外学者运用现代理论知识做了大量的临床药理工作,从中医科学的角度证实了金

银花、野菊花具有广谱抗菌的药理作用,本实验通过对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌的体外抑菌试验的研究,了解金银花、野菊花的抗菌效果,并对其进行比较,从而为临床合理用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 金银花叶 采于济宁医学院盆景园;野菊花采于济宁市动植物园。

1.1.2 菌株 金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(ATCC8099)、枯草杆菌(ATCC9372)标菌株由济宁医学院医学检验实验室冻存。

1.1.3 试剂 牛肉浸膏、蛋白胨、氯化钠、营养琼脂粉、蒸馏水、生理盐水、无水乙醇

1.1.4 仪器 数显电热培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂 型号 HPX-9272MBE);电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂 型号 LDZX-30FB);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂 型号 RE-52AA);恒温水浴锅

1.2 方法

1.2.1 金银花乙醇提取物的制备 将采集的金银花用蒸馏水冲洗干净,然后放到干燥箱中烘干、粉碎。取 9.7g 金银花用无水乙醇浸泡过夜,用恒温水浴锅加热回流,倒出滤液后,残渣继续用无水乙醇浸泡过夜,重复操作两次。用旋转蒸发器将滤出的液体浓缩至生药含量为 492mg/ml。

1.2.2 野菊花乙醇提取物的制备 将采集的野菊花用蒸馏水冲洗干净,然后放到干燥箱中烘干、粉碎。取 50g 野菊花用无水乙醇浸泡过夜,用恒温水浴锅加热回流,倒出滤液后,残渣继续用无水乙醇浸泡过夜,重复操作两次。用旋转蒸发器将滤出的液体浓缩至生药含量为 1035mg/ml。

1.2.3 培养基的制备 取营养琼脂粉 9g 于三角烧瓶中,加蒸馏水 200ml,用酒精灯加热使其全部溶解,经 121℃ 高压灭菌 20min,然后分装到无菌平皿和试管中,制成平板培养基和斜面培养基,冷却后 4℃ 冷藏备用。

1.2.4 配制营养肉汤 取蛋白胨 2.002g、牛肉浸膏 1.005g、氯化钠 1.003g 于三角烧瓶中,加 100ml 的蒸馏水,摇晃使其全部溶解,用 2mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.2,经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30min,冷却后 4℃ 冷藏备用。

1.2.5 3 种细菌繁殖体悬液的制备^[4] 分别取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌冷冻菌株管,室温使其融化分散。取含 5.0~10.0ml 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18~24h,分别用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,于 37℃ 培养 18~24h,挑取第 2 代培养物中的典型菌落,接种于营养琼脂斜面,于 37℃ 培养 18~24h,即为第 3 代培养物。然后用 5ml 的稀释液将第 3 代营养琼脂培养基斜面新鲜菌苔洗下,制备成初步的菌悬液,再进行系列稀释,制成含菌量为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/ml 的实验菌悬液。

1.2.6 滤纸片的制备 将定性滤纸用打孔器制成 6mm 直径的圆片,经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后,干燥保存备用。

1.2.7 抑菌环的测定 在无菌营养琼脂平板表面分别均匀涂抹 3 种实验菌悬液并置室温干燥 5min,然后在每个平板表面周边距中心 25mm 等距离贴 4 片 4 层滤纸片,中心贴 1 片 4 层滤纸片,其中周边 4 片加 20 μ l 金银花乙醇提取物,中间 1 片加 20 μ l 无水乙醇作为阴性对照,然后将其置于 37℃ 温箱培养 24h,观察结果。用数显游标卡尺测量抑菌环的直径(包括贴片)并记录测量数据。重复试验 4 次。用同样的方法做野菊花乙醇提取物抑菌环的测定。

判定标准:以抑菌环直径大于 8mm 者判为有抑菌作用,抑菌环小于或等于 8mm 者判为无抑菌作用,4 次重复试验均达到有抑菌作用者,判为合格。阴性对照组应无抑菌环产生,否则实验无效。

1.2.8 金银花与野菊花乙醇提取物对 3 种细菌的最低抑菌浓度测定 将金银花乙醇提取物倍比稀释成 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256 8 个浓度各 2.5ml,并设不含药物的双倍营养肉汤培养基作阳性对照。然后向各管中分别加入配好的菌悬液(金黄色葡萄球菌)100 μ l,混匀后放入 37℃ 培养箱中培养,48h 后确定是否有细菌生长。大肠杆菌、枯草杆菌的最低抑菌浓度测定方法同金黄色葡萄球菌。以药物抑制细菌生长的最低浓度为最小抑菌浓度(MIC)。

野菊花乙醇提取物对 3 种细菌的最低抑菌浓度测定方法同上。

2 结果

2.1 金银花乙醇提取物抑菌试验结果

实验结果表明,生药含量为 492mg/ml 的金银花乙醇提取物,在营养琼脂平板上对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌的抑菌环直径均大于 8mm,显示出良好的抑菌效果,而对大肠杆菌的抑菌环直径小于 8mm,说明对其无抑菌作用。见表 1。

表 1 金银花乙醇提取物抑菌环试验结果

试验 序号	各试验菌抑菌环直径(mm)		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草杆菌
1	9.83	7.88	9.11
2	9.81	7.85	9.17
3	9.84	7.86	9.15
4	9.86	7.83	9.13

注:所有阴性对照均无抑菌环产生。

2.2 野菊花乙醇提取物抑菌试验结果

实验结果表明,生药含量为 1035mg/ml 野菊花乙醇提取物,在营养琼脂平板上对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌环直径均大于 8mm,显示出良好的抑菌效果,而对枯草杆菌的抑菌环直径小于 8mm,说明对其无抑菌作用。见表 2。

表 2 野菊花乙醇提取物抑菌环试验结果

试验 序号	各试验菌抑菌环直径(mm)		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草杆菌
1	9.26	11.02	7.12
2	9.29	11.05	7.15
3	9.30	11.09	7.11
4	9.27	11.07	7.18

注:所有阴性对照均无抑菌环产生

2.3 金银花与野菊花乙醇提取物对三种细菌的最低抑菌浓度测定

见表 3、表 4。

表 3 金银花乙醇提取物不同稀释度抑菌效果测定

药物稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	+	+	+	+
大肠杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+
枯草杆菌	-	-	-	-	+	+	+	+

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有细菌生长。

表 4 野菊花乙醇提取物不同稀释度抑菌效果测定

药物稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	+	+	+	+
大肠杆菌	-	-	-	-	-	-	+	+
枯草杆菌	-	-	+	+	+	+	+	+

注:“-”表示无细菌生长,“+”表示有细菌生长。

由表 3 可见金银花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌抑菌作用较强,两种菌的最低抑菌浓度皆为 30.75mg/ml,对大肠杆菌的最低抑菌浓度为 123mg/ml。

由表 4 可见野菊花乙醇提取物对大肠杆菌抑菌作用最强,最低抑菌浓度为 16.17mg/ml;对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为对枯草杆菌的最低抑菌浓度为 64.69mg/ml;对枯草杆菌的抑菌作用最弱,最低抑菌浓度为 258.75 mg/ml。

由表 1、2、3、4 可见,金银花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌作用最强,对大肠杆菌作用最弱;野菊花乙醇提取物对大肠杆菌作用最强,金黄色葡萄球菌次之,对枯草杆菌作用最弱。

3 讨论

现代药理研究表明,金银花内含有丰富的木草黄素、肌醇、皂苷、鞣酸等有效成分,因为它们含有大量的还原基因,所以对多种致病菌有抑制作用。由表 1 的抑菌环试验的测定结果可见,金银花乙醇提取物对革兰阳性菌(金黄色葡萄球菌、枯草杆菌)有明显的抑菌作用,而对革兰阴性菌(大肠杆菌)则没有抑菌作用。管仲莹等^[5]人研究发现金银花提取物具有一定的抑菌作用,与本试验中的抑菌范围较接近,这可能与金银花提取物的工艺及质量、产地有关。

革兰阳性菌与革兰阴性菌的细胞壁结构显著不同,革兰阳性菌细胞壁较厚,肽聚糖层可达 50 层,革兰阴性菌细胞壁较薄,肽聚糖层仅有 1~2 层,使两者在抗原性及药物敏感性方面有很大的差异。本试验结果表明金银花乙醇提取物具有很强的破坏细菌细胞壁的肽聚糖层的能力,进一步说明了其抑制细菌生长的作用很强。

现代药理研究表明,野菊花含有挥发油,具有广谱的抗菌作用。现有研究认为挥发油是菊花发挥抑菌作用的物质基础,其中的樟脑、龙脑是其发挥抑菌作用的主要成分^[6]。由表 2 的抑菌环试验的测定结果可见,野菊花乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌有明显的抑菌作用,而对枯草杆菌则没有抑菌作用。曾帅等^[7]人研究发现野菊花水煎液对多种细菌均有较强的抑菌作用,与本试验中的抑菌范围较接近,这可能与野菊花的提取方式不同有关。有报道显示^[8],相同的中药采用不同的提取方式,其提取物的抑菌活性会有显著差别。

(下转第 105 页)

积导体的量,在体时则为心脏周围组织液的量能够影响 R 波的大小。当心脏周围的某些病变如胸腔积液、心包炎致心包积液等,若改变了心脏周围的组织液的量或质时可能出现 R 波的改变。

参考文献:

[1] 朱大年.生理学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:86-98.

[2] 黎萌.电偶极子与模拟心电测量[J].大学物理,1994,13(8):29-30.
[3] 周翔.心脏周围组织内心电场传播的衰减[J].第一军医大学学报,2001,21(9):653-654.
[4] Stinstra JG. The volume conductor may act as a temporal filter on the ECG and EEG[J]. Med Biol Eng Comput,1998,36(6):711-716.

(收稿日期 2013-01-15)

(上接第 99 页)

本次实验所用的是乙醇萃取剂,而乙醇本身的抑菌作用不能忽视,尤其是本次实验药物稀释前后抑菌环直径不是成比例的缩小,在一定程度上体现出了乙醇是本次实验的一个重要影响因素。但乙醇易挥发,作用不稳定,所以在一般的实验中很少涉及关于乙醇的空白实验。近年来中药提取物对细菌的抑制作用研究较多,而中药抑菌作用的研究也是开发利用中药资源的一个重要组成部分。本实验只是对金银花和野菊花进行了粗提,因此,不能确定到底是哪种具体成分具有抑菌作用。下一阶段的研究任务是采用不同的分离方法分离金银花和野菊花的具体成分,以便确定到底是哪种成分具有抑菌作用。

参考文献:

[1] 任爱农,王志刚,卢振初,等.金银花抑菌和抗病毒作用实验研究[J].药物生物技术,1999,6(4):241.
[2] 南京中医药大学.中药大辞典[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2006:2144.
[3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2005 年版[M].一部.北京:化学工业出版社,2005:596.
[4] 消毒产品检验消毒技术规范[S].北京:中华人民共和国卫生部,2002:83-93.
[5] 管仲莹,赵金明,林巧智.金银花提取物抑菌作用的实验研究[J].辽宁省中医药研究院,2009,47(15):150-152.
[6] 张清华,张玲.菊花化学成分及药理作用的研究进展[J].食品与药品,2007,2:60-63.
[7] 曾帅,王子寿,贾俊.野菊花水煎液体外抗菌作用实验研究[J].中国中医急救,2008,7(17):971.
[8] 高静,龙伟.中药提取技术的研究进展[J].医学导报,2007,26(9):1058-1060.

(收稿日期 2013-02-04)

(上接第 102 页)

以外,还具有抑制 VCAM-1 的表达,可能是其抗 AS 的机制之一。然而这些有益的影响的确切机制尚不清楚,还需进一步的研究。

参考文献:

[1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med,1999,340(2):115-126.
[2] 吴萍,黄引平,叶笃筠,等.青心酮活血化瘀作用机制的研究进展[J].中草药,2001,32(3):277-279.
[3] 黄引平,叶笃筠,马庭元,等.青心酮对妊高征患者胎盘血管壁一氧化氮合成酶和血浆内皮素的影响[J].中华妇产科杂志,1996,31(11):667-669.

[4] Li H,Cybulsky MI,Gimbrone MA Jr,et al. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma[J]. Am J Pathol,1993,143(6):1551-1559.
[5] Hackman A,Abe Y,Insull W Jr,et al. Levels of soluble adhesion in patients with dyslipidemia[J]. Circulation,1996,93(7):1334-1338.
[6] 冯宗忱.动脉粥样硬化-血管壁的慢性炎症[J].中华心血管病杂志,2005,33(5):393-394.
[7] Larsson PT,Hallerstam S,Rosfors S,et al. Circulating markers of inflammation are related to carotid artery atherosclerosis[J]. Int Angiol,2005,24(1):43-51.

(收稿日期 2013-02-11)