

## 中药研究

# 中草药提取物体外抗菌活性测定方法的初步探讨

俞晓丽 王君 阚平

(江苏大学附属人民医院检验科, 江苏省镇江市电力路8号, 212002)

**关键词** 中草药提取物; 体外抗菌

中药药敏试验方法有纸片琼脂扩散法、试管稀释法、平板稀释法、打洞法、挖沟法等, 目前我国尚无统一完整的中药药敏试验方法, 这给从事中药新药鉴定工作者带来困惑。我们对几种药敏实验方法进行了探讨, 并力图寻找一个像西药纸片琼脂扩散法——Kirby-Bauer法一样的一个统一且比较完善、理想的方法。

### 1 材料与方

1.1 材料 1) 菌种: 临床分离大肠杆菌、金黄色葡萄球菌各一株。2) 中药: 大蒜素获自黑龙江宝岛制药有限公司, 黄芩素获自美国 SIGMA 公司, 胡桃楸提取物<sup>[1]</sup> (本实验室自制)。3) 培养基: 试验中所用 MH 液体培养基和 MH 琼脂培养基均为杭州天和微生物试剂有限公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 管碟法 将试验菌株接种于营养琼脂平板, 37℃培养 18h 后, 用生理盐水洗下, 用比浊法配成  $10^5$  CFU/mL 菌液, 用棉签涂抹于营养琼脂平板, 放上特制钢杯, 钢杯内径 0.5cm, 高 0.8cm, 盛入不同浓度上述各种中药原液 0.157mL, 37℃培养 24h, 测量抑菌圈大小。

1.2.2 标准稀释法<sup>[2]</sup> 在试管中用 MH 液体培养基将各种中药原液稀释为 1/2、1/4、1/8, 然后加入  $10^5$  CFU/mL 菌液 0.1mL, 同时设不加中药的阳性对照管, 37℃培养 18h 观察, 以 MH 液体培养基混浊, 无沉淀管判为阴性。

1.2.3 平板稀释法 取无菌 9cm 平皿 9 个, 每个加无菌生理盐水 2mL。根据培养皿底面上注明的药物稀释度, 在第一个平皿原药液 2mL, 混匀, 取倍比稀释药液 2mL 至第二个平皿, 以此类推至第 8 个平皿。第 9 个平皿不加药做阴性对照。在上述的每个平皿中加入试管中的 60℃培养基 18mL, 倒入培养基上摇匀, 摇匀为顺/逆时针 7 次, 摇匀后, 平放, 冷凝。使药液浓度为 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280; 用标准接种环取 1 环受试菌液 (1MacFarland 单位) 划

线接种于平皿内, 于 32℃温箱培养 48h, 以能抑制细菌生长的最低药物浓度为该药物的最低抑菌浓度 (MIC), 重复 3 次试验, 以 3 次或 2 次结果相同者为报告依据<sup>[3]</sup>。9 号平板为阴性对照。

1.2.4 活菌计数法 将各种中药配制为原液、1/2 液, 以 0.5mL/管分装在有盖塑料离心管中, 然后在每管中加入已配好的  $10^5$  CFU/mL 菌液 0.1mL, 同时设生理盐水对照。试验管和对照管置 4℃冰箱保存。参照简易式倾注平板法的计数方法<sup>[4]</sup>, 即将作用后的标本稀释为不同浓度, 每个浓度取  $10\mu\text{L}$  充分涂抹于琼脂平板, 37℃培养 18~24h, 计数菌落数, 换算为每毫升含有的活菌数。对照管在试验前, 试验管和对照管在保存不同时间后, 用加样器取 4℃下作用后的试验液  $10\mu\text{L}$  于营养琼脂平板, 用接种环充分涂抹, 37℃培养 24h 后用光电菌落计数器计数菌落数。

1.2.5 刃天青微孔板显色法 在 96 孔微孔板 (Costar USA) 上实验组加入上述细菌悬液  $100\mu\text{L}/\text{well}$ , 再加入不同稀释度的中药液 ( $100\mu\text{L}/\text{well}$ ), 设不加药的细菌对照组和无细菌的空白对照组, 每个培养条件设 3 个复孔。置 35℃孵箱培养 18h, 每孔加入刃天青溶液 (5mg/mL)  $10\mu\text{L}$ , 继续培养 2h 后在全自动酶标仪上以 492nm 波长测定实验组与对照组的吸光度 (A 值), 按下式计算: 细菌细胞存活率<sup>[5]</sup> = 实验组 A 值/药物阴性对照组 A 值  $\times 100\%$ 。结果判定: 根据刃天青微孔板显色法的活菌计数, 细菌存活率可套用上述公式。

细菌存活率  $< 30\%$  则对该药为高度敏感 (S); 细菌存活率  $30\% \sim 50\%$  则对该药为中度敏感 (MS); 细菌存活率  $> 50\%$  则对该药为不敏感 (R)。

### 2 结果与评价

纸片琼脂扩散法中由于中药的煎剂及其他剂型做成的液体都是悬液, 药物在固体培养基上扩散受到限制, 效果不好, 不易得出准确的结果; 试管稀释法是一个比较好的方法, 但具有试验工作量大, 操作繁琐, 一个系列稀释度含药培养基只能测一种菌, 营养要求高的菌无法培养等弊端, 难以推广; 打洞法同纸片扩散

# 鱼金清解口服液的处方筛选研究

赵涛 张晓红 卢露 党艳妮 谢伟 南景一

(陕西步长制药有限公司,陕西省咸阳市渭阳路西延段123号,712000)

**关键词** 鱼金清解口服液;处方筛选

鱼金清解口服液是在国家药品标准“鱼金注射液”处方组成基础上<sup>[1]</sup>,由鱼腥草、金银花2味药材经提取制成的口服液体剂,临床疗效确切,主要用于热毒内盛而致的上呼吸道感染、支气管肺炎、化脓性疾病、妇科炎症与术后发热的病症。鱼金清解口服液包含了挥发性成分和水溶性成分<sup>[2-3]</sup>,这些成分在水中稳定性好,适合于做成口服液制剂。众所周知,中药制剂疗效与处方组成、剂量等因素有关,我们结合鱼金清解口服液的功能主治,通过体内、外抗菌试验筛选出处方的最佳配比,为该制剂的临床疗效奠定了基础。

## 1 仪器与试药

1.1 仪器 AE100 电子分析天平(瑞士梅特勒公司);电热恒温培养箱(上海医疗器械七厂);压力蒸汽灭菌器(上海医用核子仪器厂);电热蒸馏水器(北京市医疗设备厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);无菌净化工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 试药 大肠埃希菌 ATCC25922 株,金黄色葡萄

球菌 ATCC25925 株,绿脓假单胞菌 ATCC27853 株,表皮葡萄球菌 ATCC26069 株,甲型溶血性链球菌 32209 株,乙型溶血性链球菌 32210 株,肺炎球菌 31001 株,流感嗜血杆菌 58535 株,肺炎克雷伯菌 46104 株,白色假丝酵母菌 85021 株;鱼金清解口服液处方 1、2 和 3 的试验制剂,由陕西步长制药有限公司生产提供。

## 2 方法与结果<sup>[4-5]</sup>

2.1 体外抗菌试验方法与结果 1)药液的配制:移取鱼金清解口服液处方 1、2、3 分别 10mL,与 90mL 肉汤混匀后,用孔径 0.22 $\mu$ m 超微滤器过滤除菌,无菌药液置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。2)菌液配制:将 37 $^{\circ}$ C、24h 培养的实验菌接种于肉汤,置普通培养箱 37 $^{\circ}$ C、24h 培养,比浊法进行细菌计数,用肉汤调配成 10<sup>6</sup>CFU/mL 菌液备用。3)MIC、MBC 测定:将药液用肉汤由 10% 为起点进行连续二倍梯度稀释,依次加到 96 孔细胞培养板上,0.2mL/孔。再加入浓度为 10<sup>6</sup>CFU/mL 的实验菌液 0.01mL/孔。同时设立细菌以及培养基对照。置 4 $^{\circ}$ C 作用 12h,于普通培养箱 37 $^{\circ}$ C、48h 培养,观察结

法,也因中药煎剂都是悬液,颗粒较粗,扩散受到限制,实验结果难以控制,而在临床上不能作为一个标准方法推广;平板稀释法,只需制成两个系列稀释度含药平板,一个稀释度可同时测多种细菌,操作简便,结果准确;采用活菌计数法,用中药原液可以测出用管碟法所不能测出的中药抑菌作用。在 1/2 浓度中,试管法只能测出 20% 试验药的抑菌作用,而活菌计数法则能测出所有试验药对细菌的作用。但采用活菌计数法进行实验,在试验前需对试验菌在生理盐水中存活情况进行测定,对厌氧性的菌、营养要求高的菌如肺炎球菌、脑膜炎球菌等显然不能使用此法。试管法、平板法、管碟法抑菌效果有差异,试管法因为中药颜色深,最不准确;平板法不能最大限度提高中药浓度,对于高 MIC 中药测定不利;管碟法结合了试管法浓度高、准确和平板法显示稳定的优点,比较适合中药 MIC 的测定。

刃天青微孔板显色法利用活细胞线粒体酶可以将

蓝色的刃天青还原为粉红色的原理,测定细胞的代谢活性及增殖反应,刃天青显色法以其简便、快速、灵敏等优点,愈来愈多地应用于检测各种细菌对化学药物的敏感性<sup>[5]</sup>,是以上方法中较为理想的一种方法。

## 参考文献

- [1] 阎平,陈蕾.胡桃椒提取物对白念珠菌生长的抑制作用.中国微生物学杂志,2005,17(5): 335-338.
- [2] NCCLS/CLIS. Perfrom ance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing, fifteenth informational supplement M 100 - S15, 125 (1): 44 - 52.
- [3] 杨致邦.引起医院内感染暴发流行的马红球菌的生物学特征.中国人兽共患病杂志,1997,12(3): 17-19.
- [4] 村中幸二.尿的定量的细菌检查法.临床检验,1996,30:587.
- [5] Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate - based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods, 2007, 42: 321 - 4.

(2011-10-11 收稿)