

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.19.009

复方芙蓉花叶提取物体外抑菌作用研究*

张容, 杨芳, 李益麟, 李春花, 梁志, 刘少琼[△]

(南华大学附属第一医院肛肠科, 湖南 衡阳 421000)

摘要:目的 比较复方芙蓉花叶不同提取方法提取物的体外抑菌作用。方法 采用乙醇、乙酸乙酯及水分别对复方芙蓉花叶进行提取,再用二倍稀释法将提取物对大肠埃希菌和表皮葡萄球菌进行体外抑菌试验。结果 乙醇提取方法的提取率为26.60%,对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)分别为68.18 g/L和34.09 g/L;乙酸乙酯萃取方法的提取率为1.40%,对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌的MIC分别为4.26 g/L和1.07 g/L;水提取方法的提取率为30.40%,对大肠埃希菌、表皮葡萄球菌的MIC分别为68.18 g/L和4.26 g/L。结论 3种提取方法提取复方芙蓉花叶所得提取物对大肠埃希菌及表皮葡萄球菌均有明显抑菌效果,但乙酸乙酯萃取的提取物抑菌效果最佳。

关键词:复方芙蓉花叶;乙醇提取;乙酸乙酯萃取;水提取;抑菌作用;最低抑菌浓度

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)19-0033-03

Bacteriostatic Effect of Compound *Hibiscus Mosaic* Extract In Vitro

ZHANG Rong, YANG Fang, LI Yilin, LI Chunhua, LIANG Zhi, LIU Shaoqiong

(Department of Proctology, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan, China 421000)

Abstract: Objective To compare the bacteriostatic effect of different extraction schemes of compound *Hibiscus mosaic* in vitro. Methods Ethanol, ethyl acetate and water solvent were used to extract compound *Hibiscus mosaic*, and then the extract was used to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* in vitro. Results The extraction rate of ethanol extraction was 26.60%, the minimum inhibitory concentration(MIC) of *Escherichia coli* was 68.18 g/L, and the MIC of *Staphylococcus epidermidis* was 34.09 g/L. The extraction rate of ethyl acetate extraction was 1.40%, the MIC of *Escherichia coli* was 4.26 g/L, and the MIC of *Staphylococcus epidermidis* was 1.07 g/L. The extraction rate of water extraction program was 30.40%, the MIC of *Escherichia coli* was 68.18 g/L, and the MIC of *Staphylococcus epidermidis* was 4.26 g/L. Conclusion The three extract methods of compound *Hibiscus mosaic* can all produce obvious antibacterial effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, but the optimal extraction method for obtaining the best bacteriostatic effect is ethyl acetate extraction.

Key words: compound *Hibiscus mosaic*; ethanol extraction; ethyl acetate extraction; water extraction; bacteriostatic effect; minimum inhibitory concentration

中医理论认为,肛门手术损伤致局部气血瘀滞,经脉阻塞,不通则痛,创面失于濡养,则愈合慢^[1]。复方芙蓉花叶膏为外用于肛肠病术后促进伤口愈合的制剂^[2],抑菌作用明显^[3]。复方芙蓉花叶膏是由芙蓉花叶、黄柏、地榆炭、大黄组方,按1.7:1:1:1的配比炼制而成,炼制过程较复杂。作为中药复方制剂,因缺乏基础研究和理论支持,其推广应用受到了限制。本研究中探讨了复方芙蓉花叶不同提取物的体外抑菌作用,为进一步开发复方芙蓉花叶新药提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌种

仪器:DF-101D型集热式恒温加热磁力搅拌器, SZCL-2型数显智能控温磁力搅拌器, YRE-2000A型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);JA2003型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司,精度为

1 mg); YXQ-50S II型立式压力蒸汽灭菌器、GZX-9070MBE型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); BDS60型电热三用水箱(北京市医疗设备厂); UV-2800A型紫外可见分光光度计(尤尼柯<上海>仪器有限公司); SPX-70B III型生化培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司); BSW-850H型水平层流净化工作台(苏州洁净技术研究所); 350 μ L石英微量比色皿; 35 mm玻璃培养皿; 250 mL索氏提取器。

试剂:地榆炭(湖南省衡东县中药饮片厂); 芙蓉花叶、黄柏、大黄均购自湖南馨恒堂中药科技有限公司,干燥,粉碎,备用; Mueller-Hinton琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司); 其余试剂均为国产分析纯。

菌种:大肠埃希菌 *Escherichia coli*、表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* 均由南华大学病原生物学研究所提供。

*基金项目:2019年度湖南省中医药科研计划项目[201960]。

第一作者:张容,女,在读硕士研究生,住院医师,研究方向为中医肛肠学,(电子信箱)842941649@qq.com。

[△]通信作者:刘少琼,女,大学本科,主任医师,副教授,研究方向为中医肛肠学,(电子信箱)Liushaoqiong861224@126.com。

1.2 方法

1.2.1 供试液制备

乙醇提取物制备:取混合药材粉末(芙蓉花叶 9.04 g, 黄柏 5.32 g, 大黄 5.32 g, 地榆炭 5.32 g) 25 g, 精密称定, 用滤纸装好, 置 250 mL 索氏提取器中。用 8 倍量 70% 乙醇在 100 °C 左右油浴锅中冷却回流 3 h, 过滤, 收集滤液, 将滤渣用 6 倍量 70% 乙醇依法再提取 2 次, 收集 3 次的混合滤液; 用旋转蒸发器浓缩, 温度控制在 65 °C, 浓缩至 50 mL 时将浓缩液置电热套中蒸发浓缩至糊状, 再放入干燥箱中干燥至恒重。以上操作重复多次。

乙酸乙酯萃取物制备:取乙醇提取物适量, 溶于约 100 mL 蒸馏水中, 制成混悬液, 加入石油醚去除色素、油脂等杂质, 萃取多次, 直至石油醚层透亮和颜色不再变化为止。移去石油醚层, 留下水相加入 1.5 倍量的乙酸乙酯连续萃取多次, 每次留下乙酸乙酯层, 直至乙酸乙酯层不再变色为止。收集乙酸乙酯层, 置旋转蒸发器中进行浓缩, 温度控制在 55 °C, 蒸发至固体状。取出, 置干燥箱中, 干燥至恒重。以上操作重复多次。

水提取物制备:取混合药材粉末(芙蓉花叶 9.04 g, 黄柏 5.32 g, 大黄 5.32 g, 地榆炭 5.32 g) 25 g, 精密称定, 置 500 mL 烧瓶中, 加 8 倍量蒸馏水, 在温度调至 145 °C 左右的电热套中回流煎煮 3 h, 过滤, 收集滤液, 常温保存。回收滤渣, 置于 500 mL 烧瓶中, 加入 6 倍量蒸馏水, 用酒精灯煎煮 2 h, 过滤, 收集滤液, 以上操作重复 2 遍。合并 3 次收集的滤液, 置于烧杯中, 置电热套中蒸发浓缩, 电热套温度调至 100 °C 左右, 浓缩呈膏状, 置干燥箱中, 干燥至恒重。以上操作重复多次。

供试液制备:分别取适量乙醇提取物、乙酸乙酯萃取物和水提取物, 用 0.9% 氯化钠溶液配制成质量浓度为 0.5 g/mL 的提取物溶液, 灭菌, 备用。

1.2.2 MH 培养基制备

将 MH 琼脂培养基与蒸馏水按 42:1 000 的比例配制, 121 °C 高压灭菌 20 min, 置 50 °C 恒温水浴箱中, 备用。

1.2.3 菌液制备

取 2 只无菌培养皿, 装入融化的无菌培养基, 待培养基凝固后, 在无菌条件下将大肠埃希菌与表皮葡萄球菌用划线法分别接种到不同培养皿的培养基上。放入 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h, 置 4 °C 冰箱中冷藏; 取出活化好的菌种, 在无菌环境下, 用无菌接种环吸取适量大肠埃希菌, 置装有 2 mL 无菌 0.9% 氯化钠溶液的试管中, 吸取适量, 置比色皿中, 采用分光光度计测细菌 OD 值法, 配制大肠埃希菌和表皮葡萄球菌的浓度在 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL 范围内。

1.2.4 抑菌试验

取 11 只直径为 3.5 cm 的无菌培养皿, 分别标记为

1~11 号, 用标记笔将培养皿划分为 I 区(大肠埃希菌区域)和 II 区(表皮葡萄球菌区域)。采用二倍稀释法, 往 2~11 号培养皿中加入 1.5 mL 灭菌 0.9% 氯化钠溶液, 往 1 号培养皿中加入 1.5 mL 药物质量浓度为 0.5 g/mL 的乙醇提取物, 往 2 号培养皿中加入 1.5 mL 药物质量浓度为 0.5 g/mL 的乙醇提取物, 充分混匀, 再从 2 号培养皿中吸取 1.5 mL 混合液加入 3 号培养皿, 充分混匀, 再从 3 号培养皿中吸取 1.5 mL 混合液加入 4 号培养皿, 依法直至加入至 9 号培养皿, 再从 9 号培养皿中弃去 1.5 mL 混合液。最后往 1~9 号培养皿中均加入 4 mL 无菌水解酪蛋白琼脂(MHA)培养基, 迅速混匀, 冷却凝固, 制成药物质量浓度分别为 136.36, 68.18, 34.09, 17.05, 8.52, 4.26, 2.13, 1.07, 0.53 g/L 的营养琼脂平板。第 10 号培养皿仅加入 4 mL 无菌 MHA 培养基, 作为阴性对照。用无菌接种环通过划线法分别接种大肠埃希菌及表皮葡萄球菌于 1~10 号培养皿相对应区域。第 11 号培养皿不加提取药物且不接种细菌, 作为空白对照。再将 11 只培养皿一同放入 37 °C 恒温培养箱中培养 18~24 h。以上操作均严格遵守无菌操作原则。同法操作乙酸乙酯萃取物及水提取物, 且每种提取物对 2 种细菌分别做 3 次重复试验。观察不同提取物及其不同药物质量浓度对大肠埃希菌及表皮葡萄球菌的抑制作用, 并记录最低抑菌浓度(MIC)值, 即在体外培养细菌 18~24 h 后能抑制培养基内病原菌生长的最低药物质量浓度。

2 结果

2.1 药物提取率

结果见表 1。

表 1 3 种提取方法的药物提取率比较

提取方法	原药(g)	提取物(g)	提取率(%)
乙醇提取	25	6.65	26.60
乙酸乙酯萃取	25	0.35	1.40
水提取	25	7.60	30.40

2.2 对大肠埃希菌及表皮葡萄球菌的体外抑菌效果

3 种方法的提取物均能对大肠埃希菌和表皮葡萄球菌产生较明显的抑菌效果, 详见表 2。其中, 阴性对照组有大肠埃希菌及表皮葡萄球菌生长, 空白对照组无细菌生长, 且 3 次重复抑菌试验结果一致。乙醇、乙酸乙酯及水提取方案对大肠埃希菌的 MIC 分别为 68.18, 4.26, 68.18 g/L; 对表皮葡萄球菌的 MIC 分别为 34.09, 1.07, 4.26 g/L。可见, 乙酸乙酯萃取提取的复方芙蓉花叶提取物的抑菌作用最强, 详见表 3。

3 讨论

复方芙蓉花叶是一种外用于促进肛肠疾病术后伤口愈合的制剂, 其为芙蓉花叶、黄柏、地榆炭和大黄配伍

表2 3种提取方法的复方芙蓉花叶提取物体外抑菌效果比较

提取物质量 浓度(g/L)	乙醇提取物		乙酸乙酯萃取物		水提取物	
	I	II	I	II	I	II
136.36	-	-	-	-	-	-
68.18	-	-	-	-	-	-
34.09	+	-	-	-	+	-
17.05	+	+	-	-	+	-
8.52	+	+	-	-	+	-
4.26	+	+	-	-	+	-
2.13	+	+	+	-	+	+
1.07	+	+	+	-	+	+
0.53	+	+	+	+	+	+

注: I 为大肠埃希菌, II 为表皮葡萄球菌; + 表示细菌生长, - 表示细菌不生长。

表3 3种提取方法的复方芙蓉花叶提取物对试验菌的 MIC(g/L)

提取物	大肠埃希菌	表皮葡萄球菌
乙醇提取物	68.18	34.09
乙酸乙酯萃取物	4.26	1.07
水提取物	68.18	4.26

而成。芙蓉花叶味辛,性平,无毒,具有凉血、解毒、消肿、止痛等功效^[4-5],且芙蓉花和叶均具有抗菌作用^[6]。黄柏味苦,性寒,具有清热解暑之功效,现代药理学研究证实其具有抗菌、镇咳、降血压、修复溃疡、改善免疫功能等作用,其抗菌有效成分是小檗碱^[7-8]。地榆炭味苦,性凉,具有凉血止血之功效^[9-10]。大黄味苦,性寒,具有泻下攻积、泻火解毒、活血祛瘀及清泄湿热等功效,现代药理学研究证实,大黄不仅具有泻下、利胆、保肝的作用,还有止血、抗感染的作用^[11]。大黄抗菌有效成分是大黄酸、大黄素、芦荟大黄素,其抗菌作用机制是影响叶酸的酶系统,抑制细菌核酸和蛋白质合成,抑制细菌生物氧化酶系统,诱导干扰素^[12-13]。因此,无论从中医理论,还是现代药理学角度来看,复方芙蓉花叶均能有效抗菌和促进伤口愈合。此外,复方芙蓉花叶膏在肛周疾病及肛周术后的临床应用中,也证实了其具有较强的抗菌和促进伤口愈合的作用。

本研究结果显示,经水提取的提取率最高,其抑菌作用较乙醇提取强;经乙酸乙酯萃取尽管提取率最低,但其抑菌作用最强。应用挥发性有机溶剂提取中药,能有效、快速地提取有效成分。应用乙醇有机溶剂提取,不仅能快速去除水溶性杂质,还能保证有效成分的完整性^[14-15]。乙酸乙酯萃取是在乙醇提取基础上进一步萃取,进一步浓缩有效成分。3种提取方案均是为了浓缩有效成分,去除杂质。

复方芙蓉花叶提取物对大肠杆菌及表皮葡萄球菌的体外抑菌试验结果表明,3种提取方案对大肠埃希菌

和表皮葡萄球菌均有明显的抑菌效果,但对表皮葡萄球菌的抑菌效果优于大肠埃希菌,这可能是复方芙蓉花叶中某一种物质对表皮葡萄球菌有特异性抑菌活性。3种提取物的 MIC 表明,乙酸乙酯萃取物对大肠埃希菌及表皮葡萄球菌的 MIC 最小,尽管乙酸乙酯萃取过程较其他2种方法复杂,提取率也最低,但抑菌效果最佳。

综上所述,乙醇提取、乙酸乙酯萃取及水提取复方芙蓉花叶的提取物均能对大肠埃希菌和表皮葡萄球菌产生抑菌作用,其中抑菌效果最佳的提取方法是乙酸乙酯萃取。

参考文献:

- [1] 刘菡莹. 复方芙蓉花叶栓对大鼠肛肠术后血清 IL-6 和 TNF- α 的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [2] 刘亚. 复方芙蓉花叶膏促进大鼠肛周创面修复的机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [3] 刘少琼, 李朝员, 李国生. 复方芙蓉花叶栓治疗肛门病 210 例[J]. 湖南中医杂志, 2001, 17(4): 39-40.
- [4] 鄢科, 卢立琼. 木芙蓉叶的药理研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 37-38.
- [5] 李昌灵, 刘胜贵, 吴 楠, 等. 木芙蓉叶提取物的抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(11): 97-98.
- [6] 夏晓旦, 黄 婷, 薛 媛, 等. 木芙蓉化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2017, 39(11): 2356-2360.
- [7] 胡俊青, 胡 晓. 黄柏化学成分和药理作用的现代研究[J]. 当代医学, 2009, 15(7): 139-141.
- [8] 唐 爽, 李修洋, 邸 莎. 黄柏的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2019, 39(8): 1008-1012.
- [9] 孙立立, 仲 英, 夏红旻, 等. 地榆炭化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(6): 646-650.
- [10] 张益赫. 地榆炭镇痛物质基础及作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [11] 于建玉, 廖 欣, 丁厚伟, 等. 中药大黄药理作用研究进展及其临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(11): 286-287.
- [12] 刘 明. 大黄素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体内、外抗菌作用及机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [13] 傅兴圣, 陈 菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1534-1538.
- [14] 曾晓芳, 黄 显, 游枫慧. 木芙蓉根提取物的体外抑菌作用研究[J]. 中国药业, 2011, 20(2): 29-30.
- [15] WANG SG, YAO JY, ZHOU B, et al. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(1): 68-78.

(收稿日期: 2019-11-17; 二次修回日期: 2020-04-18)