

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.038

## · 药学 ·

## 青天葵体外抑菌活性研究

熊 敏<sup>1</sup> 江 玉<sup>2</sup> 梁多芳<sup>1</sup> 张宜金<sup>1</sup> 刘 军<sup>2</sup>

(1 隆昌县中医院药剂科 四川 内江 642150; 2 泸州医学院药学院 四川 泸州 646000)

**摘要 目的:**研究青天葵水提取液、醇提取液和水醇提取液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、伤寒沙门菌、绿脓杆菌、黑曲霉菌 6 种菌株的抑菌效果。**方法:**制备青天葵 3 种提取液,采用试管两倍稀释法测定 3 种提取液对金黄色葡萄球菌等 6 种菌株的最低抑菌浓度(MIC)。**结果:**青天葵水提取液对伤寒沙门菌的抑菌作用较强(MIC 为 12.5%),对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和黑曲霉菌的抑菌作用较弱(MIC 为 50%);醇提取液对伤寒沙门菌和绿脓杆菌都有很强的抑菌作用(MIC 为 6.25%),对金黄色葡萄球菌也有较强的抑菌活性(MIC 为 12.5%),对大肠杆菌的抑菌作用较弱(MIC 为 50%);水醇提取液的抑菌活性与醇提取液相当。**结论:**青天葵对金黄色葡萄球菌等 6 种菌株表现出不同程度的抑制活性。

**关键词:** 青天葵; 体外抑菌; 两倍稀释法

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)14-2753-04

## Antibacterial Activity of Folium Nerviliae in Vitro

XIONG Min<sup>1</sup>, JIANG Yu<sup>2</sup>, LIANG Duo-fang<sup>1</sup>, ZHANG Yi-jin<sup>1</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>

(1 Department of pharmacy, Longchang Traditional Chinese Medicine Hospital, Neijiang, Sichuan, 642150, China;

2 School of pharmacy, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan, 646000, China)

**ABSTRACT Objective:** To study The inhibitory effect of Folium Nerviliae water extract, Alcohol extract, Hydroalcoholic extract to the 6 kinds of bacterial: Staphylococcus aureus, escherichia coli, staphylococcus aureus, salmonella typhosa, pseudomonas aeruginosa and aspergillus niger. **Methods:** Three kinds of Folium Nerviliae extract were prepared, two times dilution method was used for determinating MIC of three kinds of extract to 6 kinds of bacterial. **Results:** Folium Nerviliae Water extract showed strong antibacterial activity to salmonella typhosa (MIC was 12.5%), showed weak antibacterial activity to staphylococcus aureus, escherichia coli, pseudomonas aeruginosa and aspergillus niger (MIC was 50%), alcohol extract showed strong antibacterial activity to salmonella typhosa and pseudomonas aeruginosa (MIC was 6.25%), showed relative strong antibacterial activity to staphylococcus aureus (MIC was 12.5%), showed weak antibacterial activity to escherichia coli (MIC was 50%), water-alcohol extract's antibacterial activity was similar to alcohol extract. **Conclusion:** Folium Nerviliae shows different degrees of inhibitory activity to 6 strains.

**Key words:** Folium Nerviliae; Antibacterial *in vitro*; Double dilution method

**Chinese Library Classification(CLC):** R285 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)14-2753-04

## 前言

青天葵别名众多,分别为天葵、独叶莲、独脚莲、独脚天葵、珍珠叶、珍珠草、坠千金、山米子、铁帽子、假天麻、小胖药、提心吊胆等,首载于《岭南采药录》,为广西、广东特产药材,主要生长于海拔 400~600 m 的山林阴湿处、田边等地。青天葵性寒味甘,具有润肺止咳、清热解毒、散瘀止痛之效,主治肺癆咯血、肺热咳嗽、口疮、咽喉肿痛、跌打损伤等症<sup>[1-4]</sup>。在我国两广地区和东南亚地区,青天葵常用来作凉茶饮。药理研究证实<sup>[5-7]</sup>,青天葵对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、聚团杆菌和幽门螺旋杆菌等具有较明显的抗菌作用,为全面挖掘青天葵的抗菌谱,本研究选取金黄色葡萄球菌等 6 种菌株,考察青天葵 3 种提取液对菌株的生长抑制作用,对青天葵的抗菌活性进行探究。

## 1 资料与方法

## 1.1 供试菌株

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、白色念珠菌 *Candida albicans*、伤寒沙门菌 *Salmonella typhosa*、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、黑曲霉菌 *Aspergillus niger*,以上实验菌株购自卫生部临床检验中心。

## 1.2 试药

青天葵购于南宁万寿堂药业有限公司,由广西中医药大学韦松基教授鉴定为兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia fordii* (Hance) Schltr 的干燥全草或块茎。乙醇(天津富宇精细化工有限公司);蒸馏水(自制)。

## 1.3 仪器

JJ-CJ-2FD 洁净工作台(吴江市净化设备总厂); YXQ-LS-50S II 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); LRH-150B 型生化培养箱(上海一恒科技有限公司); YP1000 型电子天平(上海平轩科学仪器有限公司);

作者简介:熊敏(1968-),女,大专学历,主管药师,从事药剂方面的研究, E-mail: wlj9588@126.com

(收稿日期:2013-11-24 接受日期:2013-12-20)

KDM 型调温电热套(山东省甄城永兴仪器厂);PHS-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

## 2 结果

### 2.1 药液制备

制备 3 种不同提取液:①水提取液:取青天葵 100 g,加 100 mL 蒸馏水,煮沸 30 min,过滤;药渣再加 100 mL 蒸馏水,煮沸 30 min,过滤,合并 2 次滤液,浓缩至 10 mL(即药液浓度为 1 g/mL),调节 pH 为 7.0,灭菌后冰箱贮存备用。②醇提取液:取青天葵 100 g,加 100 mL 95%乙醇,回流 30 min,过滤;药渣再加 100 mL 95%乙醇,回流 30 min,过滤,合并 2 次滤液,浓缩至 10 mL(即药液浓度为 1 g/mL),调节 pH 为 7.0,灭菌后冰箱贮存备用。③水醇提取液:各取青天葵 50 g,按①、②法制备,合并滤液,浓缩至 10 mL(即药液浓度为 1 g/mL),调节 pH 为 7.0,灭菌后冰箱贮存备用。

### 2.2 菌株活化<sup>[8-10]</sup>

将上述试验菌株转种至血平板,37 ℃ 培养 24 h,观察菌落

形态鉴定后备用。

### 2.3 菌液配制<sup>[11-12]</sup>

将经过 37 ℃ 活化的上述试验菌株分别接种于肉汤,置 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,比浊法进行计数,至浓度相当于 0.5 麦氏比浊管。

### 2.4 抑菌实验<sup>[13-18]</sup>

取各试验菌株,分别接种于肉汤培养基内,37 ℃ 培养 6 h,使生长浊度达  $9 \times 10^8$ 。以无菌肉汤将其稀释成 1:100000 的菌液。然后取具棉塞的无菌试管 20 只,平均分成 2 组,每组 10 只。每只试管中先加无菌肉汤 0.5 mL,再以无菌肉汤稀释药液至一定浓度。用无菌刻度吸管吸取此含药肉汤液 0.5 mL 置于第一组试管的第 1 管中,混匀,再吸出 0.5 mL 加于同一排的第 2 管中,如此释至第 8 管,混匀后弃去 0.5 mL。第 9、10 两只试管不加药液。每只试管中各加入上述试验菌液 0.5 mL,第 9 管加入菌液作为阳性对照,第 10 管不加菌液作为阴性对照。37 ℃ 培养 24 h 观察抑菌结果,能抑制细菌生长的最大稀释度为最低抑菌浓度(MIC)。结果见表 1~3。

表 1 青天葵水提取液体外抑菌试验结果

Table1 Antibacterial Activity Result *in vitro* of Nerviliae fordii Water Extract

| 菌株<br>Strain                         | 青天葵药液管<br>Tube of medical solution |     |       |       |        | 阴性管           | 阳性管           |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----|-------|-------|--------|---------------|---------------|
|                                      |                                    |     |       |       |        | Negative tube | Positive tube |
|                                      | 50%                                | 25% | 12.5% | 6.25% | 3.125% |               |               |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | -                                  | +   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>         | -                                  | +   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>        | -                                  | -   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 伤寒沙门菌 <i>Salmonella typhosa</i>      | -                                  | -   | -     | +     | +      | -             | +             |
| 绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | -                                  | +   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 黑曲霉菌 <i>Aspergillus niger</i>        | -                                  | +   | +     | +     | +      | -             | +             |

注:“-”表示敏感;“+”表示不敏感。

Note:“-”Represents sensitive;“+”Represents insensitive.

表 2 青天葵醇提取液体外抑菌试验结果

Table2 Antibacterial Activity Result *in vitro* of Nerviliae fordii Alcohol Extract

| 菌株<br>Strain                         | 青天葵药液管<br>Tube of medical solution |     |       |       |        | 阴性管           | 阳性管           |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----|-------|-------|--------|---------------|---------------|
|                                      |                                    |     |       |       |        | Negative tube | Positive tube |
|                                      | 50%                                | 25% | 12.5% | 6.25% | 3.125% |               |               |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | -                                  | -   | -     | +     | +      | -             | +             |
| 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>         | -                                  | +   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>        | -                                  | -   | +     | +     | +      | -             | +             |
| 伤寒沙门菌 <i>Salmonella typhosa</i>      | -                                  | -   | -     | -     | +      | -             | +             |
| 绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | -                                  | -   | -     | -     | +      | -             | +             |
| 黑曲霉菌 <i>Aspergillus niger</i>        | -                                  | -   | +     | +     | +      | -             | +             |

注:“-”表示敏感;“+”表示不敏感。

Note:“-”Represents sensitive;“+”Represents insensitive.

表 3 青天葵水醇提取液体外抑菌试验结果

Table3 Antibacterial Activity Result *in vitro* of Nerviliae fordii water-alcohol Extract

| 菌株<br>Strain                         | 青天葵药液管<br>Tube of medical solution |     |       |       |        | 阴性管<br>Negative tube | 阳性管<br>Positive tube |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----|-------|-------|--------|----------------------|----------------------|
|                                      | 50%                                | 25% | 12.5% | 6.25% | 3.125% |                      |                      |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> | -                                  | -   | -     | +     | +      | -                    | +                    |
| 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>         | -                                  | +   | +     | +     | +      | -                    | +                    |
| 白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>        | -                                  | -   | -     | +     | +      | -                    | +                    |
| 伤寒沙门菌 <i>Salmonella typhosa</i>      | -                                  | -   | -     | -     | +      | -                    | +                    |
| 绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | -                                  | -   | -     | +     | +      | -                    | +                    |
| 黑曲霉菌 <i>Aspergillus niger</i>        | -                                  | -   | +     | +     | +      | -                    | +                    |

注:“-”表示敏感;“+”表示不敏感。

Note:“-”Represents sensitive;“+”Represents insensitive.

### 3 讨论

青天葵不同提取液对 6 种菌株表现出不同的抑菌活性,水提取液对伤寒沙门菌的抑菌作用较强,MIC 均达到 12.5%,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和黑曲霉菌的抑菌作用较弱,MIC 为 50%;醇提取液对伤寒沙门菌和绿脓杆菌都有着很强的抑菌作用,MIC 达到了 6.25%,对金黄色葡萄球菌也表现出较强的抑菌活性(MIC 为 12.5%),对大肠杆菌的生长抑制作用较弱,MIC 为 50%;水醇提取液的抑菌活性与醇提取液相当,对白色念珠菌的抑菌活性略强于水提取液,对绿脓杆菌的作用略弱于水提取液。

综上所述,青天葵不同提取液对 6 种菌株的抑制作用不同,以水醇提取液的抑菌活性最强,说明水醇提取液中含有抑菌的主要活性物质,为今后青天葵抗菌开发和深入研究的主要部位;综合分析,青天葵对金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌及绿脓杆菌的生长抑制活性较强,对大肠杆菌和黑曲霉菌的抑制作用较弱。

青天葵具有显著的抗菌活性,具有广阔的开发和应用前景,但目前关于青天葵的研究报道较少。中草药在抗菌方面具有作用范围广,不易产生耐药性等优点,可以作为抗菌西药的有效替代品或补充品<sup>[9]</sup>。抗菌(中医称为清热解毒)中草药的应用历史悠久,但对抑菌活性成分、抑菌谱、活性成分的结构与功效的关系等研究比较匮乏<sup>[20]</sup>。随着科技的进步,科研人员认识的提高,加强中草药及其有效成分抗菌作用机理的研究势在必行。

#### 参考文献(References)

- [1] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药材标准(第一册)[S].广州:广东科技出版社,2004: 122  
Guangdong Provincial Food and Drug Administration. Standard for the traditional Chinese medicine in Guangdong Province (Volume 1) [S]. Guangzhou: Guangdong science and Technology Press, 2004: 122
- [2] 张丽,赵钟祥,林朝展,等.青天葵化学成分的研究[J].中药新药与临床药理,2012;23(4):453-455,479  
Zhang Li, Zhao Zhong-xiang, Lin Chao-zhan, et al. Studies on Chemical Constituents from Whole Plants of Nervilia fordii (Hance) Schltr
- [J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2012, 23(4):453-455,479
- [3] 黄培倩,黄敏琪,甄丹丹,等.青天葵质量分析的探讨[J].中国民族民间医药,2012,(14):53-55  
Huang Pei-qian, Huang Min-qi, Zhen Dan-dan, et al. Analysis of the quality of Nervilia fordii [J]. Chinese journal of ethnomedicine and ethnopharmacy, 2012,(14):53-55
- [4] 陈蔚文,徐鸿华.岭南道地药材研究[M].广州:广东科技出版社,2007: 326-351  
Chen Wei-wen, Xu Hong-hua. South of the Five Ridges famous-region drug research [M]. Guangzhou: Guangdong science and technology press, 2007: 326-351
- [5] 梅全喜.青天葵的化学成分药理作用与临床应用研究进展[J].中华中医药学刊,2008,26(10):2239-2241  
Mei Quan-xi. Advance in the Research of Chemical Constituent Pharmacologic Action and Clinical Application of Herba Nerviliae Plicatae [J]. Chinese archives of traditional Chinese medicine, 2008,26(10): 2239-2241
- [6] 王振华,杜勤,张奉学.青天葵抗甲、乙型流感病毒作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(12):2940-2941  
Wang Zhen-hua, Du Qin, Zhang Feng-xue. Study on the Antiviral action of Nervilia fordii against Influenza Virus [J]. Lishizhen medicine and materia medica research, 2007, 18(12):2940-2941
- [7] 邱莉,徐灵源,缪建华,等.青天葵植物化学成分和药理活性研究进展[J].时珍国医国药,2011,22(9):2258-2260  
Qiu Li, Xu Ling-yuan, Miao Jian-hua, et al. Study Advances on Chemical Constituents from Nervilia fordii (Hance) Schltr and its Bioactivities [J]. Lishizhen medicine and materia medica research, 2011, 22(9): 2258-2260
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学,第3版[M].北京:人民卫生出版社,2001: 1352  
Xu Shu-yun, Bian Ru-lian, Chen Xiu. Methodology of pharmacological experiment, the third edition [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 1352
- [9] 覃艳华,谢和,胡萍,等.原料奶中金黄色葡萄球菌分离鉴定及产毒菌株的快速检测[J].贵州农业科学,2011,39(5):140-143  
Qin Yan-hua, Xie He, Hu Ping, et al. Identification of Staphylococcus

- aureus and rapid detection of toxigenic strains in raw milk [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(5):140-143
- [10] 朱良全, 李聪研, 蒋玉文, 等. A 型产气荚膜梭菌合成培养基使用参数及培养毒素浓缩工艺研究 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(9): 34-37
- Zhu Liang-quan, Li Cong-yan, Jiang Yu-wen, et al. The Research between the Application Parameter in the Synthesized Culture Medium of *Clostridium perfringens* A Type and the Ultrafiltration of Cultured Toxin[J]. Chinese journal of veterinary drug, 2012, 46(9):34-37
- [11] 崔锐, 杨涛, 柳爱青, 等. 万古霉素和肝素混合液的稳定性及体外抗菌活性的研究[J]. 中国血液净化, 2012, 11(10): 537-540
- Cui Rui, Yang Tao, Liu Ai-qing, et al. In-vitro stability and antimicrobial activity of vancomycin solution mixed with heparin [J]. Chin J Blood Purif, 2012, 11(10):537-540
- [12] 姜美蓉, 肖雨清, 张晓燕, 等. 两种工艺制备的前愈颗粒抑菌效果的比较[J]. 中国药师, 2008, 11(4):422-423
- Jiang Mei-rong, Xiao Yu-qing, Zhang Xiao-yan, et al. Comparison of two kinds of process for preparation of antimicrobial effect of Qianyu granules [J]. China pharmacist, 2008, 11(4):422-423
- [13] 万琳琳, 张振秋, 王永强, 等. 香连丸中黄连、木香配伍比例的最佳优选[J]. 中药材, 2008, 31(12):1898-1900
- Wan Lin-lin, Zhang Zhen-qiu, Wang Yong-qiang, et al. The best compatibility proportion selection of *Coptis chinensis* and *Radix Aucklandiae* in Xianglian pills [J]. Journal of Chinese medicinal materials, 2008, 31(12):1898-1900
- [14] 李世传, 熊建华, 罗秋水, 等. 不同干燥方法对金银花叶成分和抑菌效果的影响[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 78-83
- Li Shi-chuan, Xiong Jian-hua, Luo Qiu-shui, et al. Effects of Different Drying Methods on the Effective Ingredients and Antibacterial Activity from *Lonicera Japonica* Leaves [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(12):78-83
- [15] 杨丽敏, 马睿婷, 乔俊缠, 等. 线叶菊总黄酮抗细菌性感染实验研究[J]. 中草药, 2012, 43(12):2471-2473
- Yang Li-min, Ma Rui-ting, Qiao Jun-chan, et al. Inhibition of total flavonoids from *Filifolium sibiricum* on bacterial infection [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(12): 2471-2473
- [16] 范华倩, 沈志滨, 陈艳芬, 等. 香鳞毛蕨不同提取液体外抗真菌作用研究[J]. 中药材, 2012, 35(12): 1981-1985
- Fan Hua-qian, Shen Zhi-bin, Chen Yan-fen, et al. Study on Antifungal Susceptibility of Different Extract of *Dryopteris fragrans* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 35(12):1981-1985
- [17] 袁佳妮, 杨倩, 王四旺, 等. 精参颗粒的主要药效学实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(28):5443-5450, 5459
- Yuan Jia-ni, Yang Qian, Wang Si-wang, et al. Pharmacodynamics Research of Jingshen Particles [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(28): 5443-5450, 5459
- [18] 杨林, 周本宏. 石榴皮中鞣质和黄酮类化合物抑菌作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10):2335-2336
- Yang Lin, Zhou Ben-hong. An Experimental Study on the Antibacterial Activity of the Tannin and Flavonoid in *Punica granatum* L. [J]. Lishizhen medicine and materia medica research, 2007, 18(10): 2335-2336
- [19] 傅文栋. 中草药及其有效成分体外抗菌抗病毒研究进展 [J]. 中兽医医学杂志, 2006, 25(5):66-67
- Fu Wen-dong. Progress in study of antiviral effect of Chinese herbal medicine and its effective components of antibacterial in vitro [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2006, 25(5): 66-67
- [20] 崔建军, 刘文陆, 傅磊, 等. 四氮唑类化合物的合成及体外抑菌活性研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(18):3478-3482
- Cui Jun-jun, Liu Wen-lu, Fu Lei, et al. Synthesis and Antibacterial Activity in Vitro of Tetrazoles [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(18):3478-3482