

论著

中药奇蒿提取物体外抗菌活性的实验研究

谭蔚锋^a, 王靖^b, 邢新^b, 秦路平^c (第二军医大学, a 东方肝胆外科医院胆道一科; b 第二军医大学长海医院; c 药学院生药教研室; 上海 200433)

[摘要] 目的 研究中药奇蒿 80% 乙醇粗提取物及其石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇提取物对临床常见菌种的抗菌活性。方法 对中药奇蒿进行系统性分离提取, 以 80% 乙醇粗提取物和石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇提取物进行体外药敏实验, 序贯使用纸片扩散法和常量肉汤稀释法, 选用临床常见的致病菌株, 包括金黄色葡萄球菌 (标准型 ATCC25923)、大肠埃希氏菌 (标准型 ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (标准型 ATCC27853)、无乳链球菌 (临床型)、粪肠球菌 (临床型)、福氏志贺菌 (临床型) 和痢疾志贺菌 (临床型)。结果 奇蒿 80% 乙醇粗提取物对痢疾志贺菌的最小杀菌浓度 (MBC) 为 25 mg/ml 奇蒿氯仿提取物对大肠埃希氏菌的 MBC 为 6.25 mg/ml 对金黄色葡萄球菌的 MBC 为 12.5 mg/ml 奇蒿乙酸乙酯提取物对福氏志贺菌、痢疾志贺菌、无乳链球菌的 MBC 均为 6.25 mg/ml 对金黄色葡萄球菌的 MBC 为 12.5 mg/ml 奇蒿正丁醇提取物对无乳链球菌的 MBC 为 12.5 mg/ml 对痢疾志贺菌的 MBC 为 25 mg/ml 石油醚提取物未对测试的细菌表现出明显的抗菌活性。结论 奇蒿不同提取物对临床多种致病菌表现出了良好的杀菌作用, 在抗感染治疗领域具有较好的开发和应用前景, 其有效单体及杀菌机制有待进一步研究发现。

[关键词] 奇蒿; 提取物; 体外抗菌实验; 最小杀菌浓度

[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)02-0101-04

Antibiotic tests of different polar extracts of *Artemisia anomala* in vitro

TAN Weifeng^a, WANG Jing^b, XING Xin^b, QIN Luping^c (Second Military Medical University a Department of Biliary Tract Surgery Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital Shanghai 200438, China b Changhai Hospital c Department of Pharmacognosy School of Pharmacy, Shanghai 200433 China)

[Abstract] Objective The antibiotic tests of different polar extracts of *Artemisia anomala* S Moore in vitro. Methods The antibiotic tests of different polar extracts of AASM in vitro were performed by using Kirby-Bauer method and broth dilution method. Results The minimal bactericidal concentration (MBC) of 80% ethyl alcohol extract of *Artemisia anomala* S Moore is 25 mg/ml for *Shigella dysenteriae*. The MBC of chloroform extract is 6.25 mg/ml for *Escherichia coli*. The MBC of chloroform extract is 12.5 mg/ml for *Staphylococcus aureus*. The MBC of acetone extract is 6.25 mg/ml for *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus agalactiae*. The MBC of acetone extract is 12.5 mg/ml for *Staphylococcus aureus*. The MBC of butanol extract is 12.5 mg/ml for *Streptococcus agalactiae*. The MBC of butanol extract is 25 mg/ml for *Shigella dysenteriae*. Petroleum ether extract did not show significant antibacterial activity. Conclusion Different polar parts of *Artemisia anomala* S Moore on a variety of clinical pathogenic bacteria showed good bactericidal effect in vitro. Thus, at the anti-infective therapeutic areas there are great prospects for development and application. The effective monomer of *Artemisia anomala* and its bactericidal mechanism needs further study.

[Key words] *Artemisia anomala*; extracts; antibiotic test; minimal bacterial concentration (MBC)

菊科艾属植物奇蒿 *Artemisia anomala* S Moore 的地上干燥部分, 又名南刘寄奴、金寄奴、六月霜 (浙江、江西)、野马兰头 (浙江)、九牛草 (湖南)、苦速婆/苦婆菜 (福建)、六月雪/六月霜 (安徽、江西、湖南)、大叶蒿、铁杆茵陈 (江苏), 其性味辛、苦、平。始载于南北朝的《雷公炮制论》, 以后历代主要本草如《唐本草》、《证类本草》、《本草纲目》和《中华本

草》等均有记载。中医认为奇蒿具有清利湿热、活血化瘀、通经止痛、解毒消肿的功效。现代临床实践发现奇蒿可治疗急性细菌性痢疾^[1]、烧伤^[2]、跌打损伤、蛇咬伤^[3]、早期乳癌^[4]等疾病, 这些提示奇蒿可能对多种致病菌具有抑制作用, 可以预防和治疗感染。既往采用奇蒿全草入药 (水煎液或者浓缩片剂) 进行临床治疗和抗菌实验, 难以分析奇蒿的有效抗菌成分的来源, 因此, 笔者对奇蒿进行系统性分离提取, 然后以 80% 乙醇提取物及各极性部位进行体外抗菌实验, 分析奇蒿有效抗菌成分的来源, 为

[基金项目] 军队/十五青年基金资助项目 (01Q085)1

[作者简介] 谭蔚锋 (1972), 男, 硕士, 讲师。E-mail: wfl231@263.net

[通讯作者] 秦路平 E-mail: qinluping@126.com

下一步提取有效单体建立基础。

1 仪器与试剂

多功能渗漉提取器(常州市新祥天然产物分离设备有限公司), 电热恒温培养箱(上海益恒实验仪器有限公司 DHP29272型)。

中药奇蒿道地药材购于浙江临安; 80%乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为分析纯, 购自上海市第一试剂厂; 羧甲基纤维素钠购自上海赫力思特化工有限公司。

金黄色葡萄球菌(标准型 ATCC25923)、大肠埃希氏菌(标准型 ATCC25922)、铜绿假单胞菌(标准型 ATCC27853)、无乳链球菌(临床型)、福氏志贺菌(临床型)、痢疾志贺菌(临床型)、粪肠球菌(临床型), 水解络蛋白琼脂(MuellerHinton, MH)培养基, MH培养液。金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌均由温州市康泰生物科技有限公司提供。无乳链球菌(临床型)、福氏志贺菌(临床型)、痢疾志贺菌(临床型)、粪肠球菌(临床型)来源于长海医院检验科临床分离获得的致病菌株。

2 方法与结果

2.1 奇蒿 80%乙醇提取物(粗提物) 40 kg干燥奇蒿原药材, 粉碎后浸泡在 80%乙醇中, 65 e 渗漉提取, 先后使用 80%乙醇 200 L, 提取结束后薄膜蒸发, 干燥后待用。

2.2 奇蒿不同极性提取物 取 80%乙醇提取物干燥粉末约 1 kg 用石油醚浸泡 24 h 过滤, 滤液浓缩并干燥后得到石油醚提取物。滤渣干燥后以氯仿浸泡 24 h 过滤, 滤液浓缩得氯仿提取物, 滤渣干燥后用乙酸乙酯浸泡 24 h 过滤, 滤液浓缩得乙酸乙酯提取物, 滤渣干燥后用正丁醇浸泡 24 h 过滤, 滤液浓缩得正丁醇提取物。

2.3 体外抗菌实验 分别取奇蒿 80%乙醇提取物

和不同极性部位提取物各 5 g 其中石油醚提取物、氯仿提取物及乙酸乙酯提取物溶解时分别加入助溶剂羧甲基纤维素钠 0.5 g 采用灭菌蒸馏水溶解, 加至 50 ml 配制成浓度为 10% 的药液。首先将加有 20 L 原始浓度药液(100 mg/ml)的圆纸片放在含标准量细菌接种物的 MH 琼脂板上(无乳链球菌需要加入血液培养), 35 e 培养 18 h, 根据药敏纸片周围显出的抑菌圈大小来判断抗菌作用的强弱, 通过此法初步筛选敏感细菌谱, 以待进一步测定最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC), 设置灭菌蒸馏水及助溶剂对照组(助溶剂羧甲基纤维素钠 0.5 g 采用灭菌蒸馏水溶解, 加至 50 ml), 将纸片扩散法中证实抑菌圈在 9 mm(包括 9 mm, 纸片直径 6 mm)以上的抗菌谱, 进一步采用常量肉汤稀释法测定 MBC, 用生理盐水洗下实验菌苔, 配制成约为 3.0×10^8 个/ml 的细菌肉汤悬液备用(无乳链球菌需要加入血液培养), 排列 8 个试管, 每管中加入预备的菌液 1 ml 第一管中加入药物原液 1 ml (100 mg/ml)和菌液混匀, 该管药物浓度 50 mg/ml 然后从第一管中吸取 1 ml 液体, 加入第二管中, 混匀, 该管药物浓度 25 mg/ml 然后从第二管中吸取 1 ml 液体加入第三管, 依次类推至第七管, 各管终浓度依次为 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.79 mg/ml 第八管为阳性对照组(1 ml 菌液, 不加药物)。每种提取物和其相关的每一种敏感细菌均同时进行 3 组共 24 管实验。由于奇蒿提取物有颜色, 影响准确判断结果, 35 e 恒温箱培养 48 h 后, 将每一管中含有不同浓度药物的菌液分别接种到 MH 培养基上(平板划线法, 无乳链球菌需要加入血液培养), 接种后经 35 e 恒温箱继续培养 24 h 后, 根据划线处细菌生长情况判断该种药物的最小杀菌浓度。

2.4 纸片扩散法实验结果 每组提取物和细菌配比均进行了 3 次实验以取平均值获得结果, 结果详见表 1。

表 1 奇蒿不同提取物纸片扩散法抑菌试验结果

菌株	抑菌圈直径 (mm) ¹⁾						
	80%乙醇提取物	石油醚提取物	氯仿提取物	乙酸乙酯提取物	正丁醇提取物	蒸馏水对照组	助溶剂对照组
金黄色葡萄球菌 (标准型 ATCC25923)	7	8	18 ²⁾	18 ²⁾	10 ²⁾	6	6
大肠埃希氏菌 (标准型 ATCC25922)	7	6	10 ²⁾	8	6	6	6
铜绿假单胞菌 (标准型 ATCC27853)	7	6	6	8	7	6	6
无乳链球菌(临床型)	6	7	8	10 ²⁾	10 ²⁾	6	6
粪肠球菌(临床型)	6	7	7	6	6	6	6
痢疾志贺菌(临床型)	9 ²⁾	6	6	12 ²⁾	11 ²⁾	6	6
福氏志贺菌(临床型)	6	6	6	15 ²⁾	13 ²⁾	6	6

¹⁾纸片直径为 6 mm, ²⁾抑菌圈直径 \ 9 mm

2.5 常量肉汤稀释法实验结果 纸片扩散法实验中抑菌圈直径\ 9 mm的配对进一步测定最小杀菌浓度, 每一个配对同时进行 3组实验取平均值。奇蒿氯仿提取物对大肠埃希氏菌的最小杀菌浓度为 6.25

mg/ml; 乙酸乙酯提取物对福氏志贺菌、痢疾志贺菌和无乳链球菌的最小杀菌浓度均为 6.25mg/ml; 氯仿提取物和乙酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌的最小杀菌浓度均为 12.5 mg/ml。试验结果详见表 2。

表 2 奇蒿不同提取物常量肉汤稀释法抑菌试验结果

提取物	菌株	稀释度 (mg/ml)								MIC (mg/ml)
		50	25	12.5	6.25	3.13	1.57	0.79	对照	
80%乙醇	痢疾志贺菌(临床型)	-	-	+	+	+	+	+	+	25
氯仿	大肠埃希氏菌(标准型 ATCC25922)	-	-	-	-	+	+	+	+	6.25
	金黄色葡萄球菌(标准型 ATCC25923)	-	-	-	+	+	+	+	+	12.5
乙酸乙酯	金黄色葡萄球菌(标准型 ATCC25923)	-	-	-	+	+	+	+	+	12.5
	福氏志贺菌(临床型)	-	-	-	-	+	+	+	+	6.25
	痢疾志贺菌(临床型)	-	-	-	-	+	+	+	+	6.25
	无乳链球菌(临床型)	-	-	-	-	+	+	+	+	6.25
正丁醇	金黄色葡萄球菌(标准型 ATCC25923)	-	+	+	+	+	+	+	+	50
	福氏志贺菌(临床型)	-	+	+	+	+	+	+	+	50
	痢疾志贺菌(临床型)	-	-	+	+	+	+	+	+	25
	无乳链球菌(临床型)	-	-	-	+	+	+	+	+	12.5

注: + 细菌生长, - 细菌未生长

3 讨论

3.1 奇蒿乙酸乙酯提取物富集了对志贺菌属(*Shigella*)具有杀菌作用的有效成分, 而且对大肠埃希氏菌无明显抑制作用。细菌性痢疾主要是由志贺菌属引起的一种急性肠道传染病。水和食物污染引起的暴发时有发生, 其重症者可出现中毒症状, 甚至危及生命, 我国近 10年每年死亡病例数在 144 ~ 521 例之间^[5]。容远明等^[1]用奇蒿水煎液浓缩制成片剂后口服治疗急性细菌性痢疾, 获得良好的疗效, 他们还以不同浓度的奇蒿水煎液进行了体外抗菌实验, 实验结果提示奇蒿水煎液对宋内氏痢疾杆菌、福氏志贺菌、大肠埃希氏菌等 3个菌种 7个菌株具有抑制作用。笔者实验发现奇蒿不同提取物的抗菌谱有明显的差异, 对志贺菌属具有杀菌作用的有效成分位于乙酸乙酯提取物内, 而对大肠埃希氏菌具有杀菌作用的有效成分则位于氯仿提取物内。近年来, 志贺氏菌属耐药比例急剧升高^[6, 7]。李威等^[6]分析 70株志贺菌属后发现多重耐药率达到 77.1%。游升荣等^[7]对武汉地区社区获得性腹泻患者中志贺菌的感染耐药状况分析后发现: 耐药模式多达 20种, 最多为 12种联合耐药。虽然, 志贺氏菌属对部分头孢类抗生素敏感率仍在 90%以上, 但是, 头孢类广谱抗生素的应用, 易抑制肠道正常寄殖的大肠埃希氏菌, 从而导致球/杆比例失调或者真菌二重感

染。因此, 开发敏感性强、抗菌谱窄的新型抗生素, 成为目前治疗细菌性痢疾的迫切需要, 本实验结果为开发所需抗生素提供了一定的线索。

3.2 氯仿提取物对大肠埃希氏菌具有较好的杀菌作用。大肠埃希菌是在人体肠道内的正常寄殖菌, 当人体抵抗力下降时, 可引起消化系统以及呼吸、泌尿、血液、生殖等其它系统的感染, 是临床上最常见的机会性致病菌之一。笔者所在单位资料显示: 大肠埃希菌是院内感染病原菌检出率最高的菌种, 约占院内感染检出细菌株总数的 28.3% ~ 34.6%; 而在胆道感染中所占的比例更高, 检出率在 50%以上。近年来, 由于抗生素的不合理使用, 大肠埃希菌耐药性逐渐成为突出性问题^[8]。Garau等^[9]对健康人群粪便中耐氟喹诺酮类大肠埃希菌(*Fluoroquinolone Resistant Escherichia coli* FREC)携带率的研究发现: 24%的成人及 26%的儿童粪便中携带 FREC。程训民等^[10]在 124株大肠埃希菌中共检出 54株(43.5%)产超广谱 B内酰胺酶(*extended spectrum B lactamase* ESBLs)。氯仿提取物对大肠埃希菌的最小杀菌浓度为 6.25 mg/ml, 而其它提取物均未显示杀菌活性, 因此, 可以推测对大肠埃希菌具有杀菌作用的化合物集中在氯仿提取物中, 进一步对氯仿提取物进行分析, 有望从中开发出对大肠埃希菌具有良好杀菌作用的新型窄谱抗生素。

3.3 氯仿和乙酸乙酯提取物中均富集了对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* SA) 杀菌作用的有效成分。SA 是院外感染的常见致病菌种, 可引起局部和全身感染, 例如: 外伤创面感染, 急性乳腺炎, 肺炎, 伪膜性肠炎等。SA 同时也是院内感染的重要原因之一^[11]。本项研究发现, 氯仿提取物和乙酸乙酯提取物对 SA 的最小杀菌浓度均为 12.5 mg/ml。笔者拟根据这一特征, 进一步分离、提纯和鉴定氯仿提取物和乙酸乙酯提取物中的化合物, 以期从中发现对 SA 具有高效杀菌作用的单体。

3.4 对无乳链球菌具有杀菌作用的有效成分主要存在于乙酸乙酯提取物中, 在正丁醇提取物中亦有分布。无乳链球菌通常被称为 B 群链球菌 (group B streptococcus GBS), 属条件性致病菌。妊娠期妇女生殖泌尿系统感染 GBS 可引发胎膜早破、早产、死胎、宫内感染等一系列妊娠并发症, 产妇感染 GBS 可导致产后子宫内膜炎、盆腔炎乃至败血症^[12]; 新生儿感染 GBS 可导致肺炎、败血症和脑膜炎^[13]。目前, 治疗 GBS 感染, 可供选择的药物较多^[14]。然而, 在特殊情况下, 例如发生大规模自然灾害或者爆发战争, 导致抗生素紧缺, 在奇蒿分布的华东、中南和西南地区^[15], 可以考虑采用奇蒿救治受到 GBS 感染的围产期妇女和新生儿。同样原理, 亦可采用该法应急治疗志贺菌属所致的细菌性痢疾。

3.5 近年来, 新型抗生素虽然不断出现, 但是往往由国外公司开发研制, 售价昂贵, 超过我国人民承受能力, 因此, 需要开发具有自主知识产权的高效、低毒、价廉的抗生素, 从祖国医学中药开发新型药物也是重要途径之一。本实验结果提示: 奇蒿不同提取物在体外实验中对临床多种常见致病菌表现出了良好的杀菌作用, 为开发相应的新型抗生素提供了线索, 显示出较好的开发和应用前景。然而, 体外实验结果尚不能完全代表体内过程, 因此, 需要深入开展研究, 以期发现有效单体并阐明其杀菌机理。

参考文献

- [1] 容远明, 叶琦莉, 何善明. 用中药刘寄奴治疗急性细菌性痢疾 34 例 [J]. 上海中医药杂志, 1983, (1): 21.
- [2] 北医附属三院外科教研组 1 药房. 中药刘寄奴治疗烧伤初步总结 [J]. 北京医学院学报, 1959, 1: 136
- [3] 谌莉媚, 熊学平, 徐琛. 中药熏蒸法治疗蝮蛇咬伤后肿胀 50 例 [J]. 蛇志, 2007, 19(1): 43
- [4] 邓存国. 刘寄奴治疗早期乳痈效佳 [J]. 中医杂志, 2008, 49(9): 820
- [5] 赵慧玲, 霍汉玲, 郭本德, 等. 150 例细菌性痢疾临床诊治分析 [J]. 临床荟萃, 2008, 5(8): 977
- [6] 李威, 栗绍刚, 郑晓燕, 等. 70 株志贺菌属血清分型及耐药分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(11): 14551
- [7] 游升荣, 孙自镛. 社区获得性腹泻患者中志贺菌的感染耐药状况及基因分型 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2007, 36(5): 6581
- [8] 文细毛, 任南, 徐秀华, 等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(4): 2411
- [9] Garau J, Xercavins M, Rodriguez Carbalreira M, et al. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(11): 27361
- [10] 程训民, 李敏, 徐元宏, 等. 产超广谱 B 内酰胺酶大肠杆菌耐药性及基因型检测 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 16851
- [11] 茆海丰, 刘洪书, 赵勇, 等. 医院感染的金黄色葡萄球菌耐药性与耐药基因检测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(7): 7901
- [12] 朱敏, 范建霞, 程利南. 围产期 B 族链球菌感染的研究进展 [J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(2): 137.
- [13] 申阿东, 杨永弘. 新生儿 B 族链球菌感染 27 例临床分析 [J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(2): 691
- [14] 郭素芳, 张迎华, 周敏, 等. 泌尿生殖道分离无乳链球菌药物敏感性分析 [J]. 检验医学, 2008, 23(6): 6121
- [15] 年 华, 郑汉臣, 秦路平, 等. 奇蒿的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2002, 20(5): 305

[收稿日期] 2009205204

[修回日期] 2009212224

(上接第 87 页)

- [25] 郭颖, 肖颖歆, 郭宗儒, 等. 苯并异噻唑酮磺酰胺衍生物对环氧酶的抑制作用 [J]. 药化学报, 2001, 36(10): 735.
- [26] 郭颖, 程桂芳, 张成义, 等. 苯并异噻唑酮磺酰胺类化合物的抗炎作用 [J]. 药化学报, 2000, 35(7): 484
- [27] 郭颖, 肖颖歆, 郭宗儒, 等. 依布罗林衍生物对白三烯 B 生物合成抑制作用及其构效关系 [J]. 药化学报, 1999, 34(9): 652
- [28] 孙青葵, 姜远英, 吴秋业, 等. 2 取代噻唑基苯并异噻唑 (2H) 酮衍生物的合成及抗真菌活性 [J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(12): 709
- [29] Xue Z, Hou AX, Danniell KW, et al. Novel cobalt porphyrin conjugates: Synthesis and nucleic acid interaction study [J].

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17: 4266.

- [30] Xu XJ, Xue Z. Antibacterial activities of manganese (II) cobalt porphyrin conjugate and its free components on *Staphylococcus aureus* investigated by microcalorimetry [J]. Thermochimica Acta, 2008, 476: 33.
- [31] 厉斌, 李莉, 刘育, 等. 含苯并异噻唑酮 B- 环糊精衍生物的合成及其 SOD 类酶研究 [J]. 高等学校化学学报, 2000, 21: 1234
- [32] Messali M, Leon E, Alshahhat SF, et al. Synthesis of 4H2 benzo[e][2,12] selenazain[2,4] one derivatives: a new heterocyclic ring system [J]. Tetrahedron Letters, 2007, 48: 7448.

[收稿日期] 2009209201

[修回日期] 2009212202