

枇苳颗粒剂体外抑制金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的作用

王庆芬, 杨育儒, 沈秋莲, 张荣* (中国人民解放军第一七五医院, 厦门大学附属东南医院制剂科, 福建 漳州 363000)

摘要: 目的 研究枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的体外抑制作用。方法 采用滤纸片或牛津杯的琼脂扩散法观察枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的体外抑菌作用, 同时定量测定枇苳颗粒剂对这 2 种菌的最低抑菌浓度。结果 枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌均有明显抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度为 $0.05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对痤疮丙酸杆菌最低抑菌浓度为 $0.10 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌均具有明显的抑制作用。

关键词: 枇苳颗粒剂; 金黄色葡萄球菌; 痤疮丙酸杆菌; 体外抑菌

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)12-1457-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.011

Bacteriostatic Action of Piqin Granules Against *Staphylococcus Aureus* and *Propionibacterium Acnes* in Vitro

WANG Qingfen, YANG Yuru, SHEN Qiulian, ZHANG Rong* (Department of Pharmacy, 175 Hospital of PLA, The Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study effect of Piqin granules on bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* in vitro. **METHODS** The effect on bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* were cultured by plating method and oxfordcup, and then by test tube continuously dilution in order to observe their minimal inhibitory concentration(MIC). **RESULTS** Piqin granules were highly sensitive to *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* in vitro. The MIC was $0.05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against *Staphylococcus aureus*; and the MIC was $0.10 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against *Propionibacterium acnes*. **CONCLUSION** Piqin granules show satisfactory bacteriostatic action against the *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*.

KEY WORDS: Piqin granules; *Staphylococcus aureus*; *Propionibacterium acnes*; bacteriostatic action in vitro

痤疮是一种累及毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病, 好发于青春期, 因此也被称为“青春痘”。痤疮多发生在面部和胸背等皮脂溢出部位, 常表现为黑白粉刺、丘疹、脓疱、结节、瘢痕, 病因比较复杂^[1]。病原学分析认为痤疮的严重程度与痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌的增殖有关^[2-4], 因此目前抗痤疮药物活性评价主要考察对这 2 种菌的抑菌作用。

现代西医治疗痤疮主要以口服抗菌药物、激素以及维 A 酸类药物及外用消炎药为主, 疗程较长、病情易复发、且易导致细菌耐药性等问题。近年来中医药治疗痤疮的研究逐步深入, 为痤疮的治疗提供了丰富的手段^[5]。与西医治疗相比, 纯中药制剂应用中医药理论, 从患者的病因、病机及具体的临床表现进行由表及里、由内到外的辨证论治, 达到标本兼治的目的, 且不良反应小、

细菌不易产生耐药。

枇苳颗粒剂是中国人民解放军第一七五医院皮肤科依据中医辨证理论基础提出的, 主要用于治疗寻常痤疮的纯中药复方制剂。该制剂主要成分为枇杷叶、黄芩、白花蛇舌草、大黄等。药理研究表明, 处方中枇杷叶中的三萜酸类^[6-7]、黄芩中的黄芩苷^[8]、大黄中的大黄素^[9]等都各有不同程度抑制金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的作用。为进一步探讨该药治疗痤疮的作用效果, 本实验进行了该制剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的体外抑菌作用研究, 以期为该制剂的动物药效学和临床用药提供参考。

1 仪器与试药

SHJ 型净化工作台(上海上净净化设备有限公司); HWS-400 型恒温恒湿箱(上海精宏恒温设备有限公司); 厌氧菌产气袋、厌氧指示剂(日本三

基金项目: 中国人民解放军第一七五医院青年苗圃基金资助项目(13Y016)

作者简介: 王庆芬, 硕士生, 主管药师 Tel: 13559693060 E-mail: maopeizhi@163.com *通信作者: 张荣, 女, 副主任药师 Tel: 13806904618 E-mail: lianfamily175@126.com

菱瓦斯化学株式会社); LDZH-150kbs 型立式压力蒸气灭菌器(上海申安医疗设备公司); 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003, 批号: A0180B], 痤疮丙酸杆菌(GIM1.162, 批号: 20140331), 菌株均由广东环凯微生物科技有限公司提供; MRS 肉汤培养基, (批号: 3103379)和 MRS 琼脂培养基(批号: 3103480)均为广东环凯微生物科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用

2.1.1 琼脂扩散法——滤纸片扩散法 ①金黄色葡萄球菌的菌液制备。取金黄色葡萄球菌接种至营养肉汤培养基中, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液进行不同浓度稀释, 37 °C 培养 48 h, 挑选稀释级别为每 1 mL 含菌数 50~100 cfu, 备用。

②供试品溶液的制备。取枇苳颗粒剂 1 g, 用灭菌注射用水溶解至 10 mL, 备用。

③金黄色葡萄球菌的抑菌效果的测定。取上述制好的新鲜菌液 1 mL 注入经灭菌后的平皿内, 每个菌株平行制备 2 个平皿, 立即倾注预先融化好、并灭菌处理过的营养琼脂培养基, 待培养基凝固后, 取直径 7 mm 的圆形滤纸片浸透药液后均匀地贴在平板培养基上, 其中阴性对照组滤纸片蘸无菌盐水贴于平皿正中央; 阳性对照组滤纸片上蘸有枇苳颗粒剂供试品溶液; 同时设不贴滤纸片的空白对照, 分别做 3 次重复实验, 每次 3 个培养皿, 37 °C 培养 72 h 后, 观察抑菌效果并用游标卡尺测定抑菌圈直径大小。

2.1.2 定量测定的稀释法 取枇苳颗粒剂, 用灭菌注射用水分别溶解至 0.2 g·mL⁻¹(1 倍), 再取其分别稀释 2, 4, 8, 16, 32 倍, 备用。取新鲜菌液 1 mL 分别接种于营养肉汤培养基中, 加入上述不同浓度枇苳颗粒剂药液, 同时设立阳性对照组(不加入枇苳颗粒剂药液), 置普通培养箱 37 °C 培养 72 h。

2.2 枇苳颗粒剂对痤疮丙酸杆菌的体外抑菌作用

2.2.1 琼脂扩散法——牛津杯法 ①痤疮丙酸杆菌的菌液制备: 取痤疮丙酸杆菌液接种至 MRS 肉汤培养基中, 立即放入厌氧产气袋中(并用厌氧指示剂指示厌氧情况), 37 °C 培养 48 h, 挑选稀释级别为每 1 mL 含菌数 50~100 cfu, 备用。②供试品溶液的制备: 取枇苳颗粒剂 1 g, 用灭菌注射用水分别溶解至 10 mL, 备用。③痤疮丙酸杆菌的抑菌

效果的测定: 取经灭菌处理过的培养皿, 倒入经融化 MRS 琼脂培养基, 冷却, 凝固。取痤疮丙酸杆菌菌悬液约 0.1 mL 注入 MRS 琼脂培养基上, 用涂布环涂布均匀, 再在培养基表面放置 1 个牛津杯(内径 6 mm, 高 10 mm), 轻轻加压, 使其与培养基接触无空隙。杯中注入约 0.2 mL 枇苳颗粒剂供试品溶液, 立即放入厌氧菌培养袋中, 37 °C 培养 72 h, 观察抑菌效果并用游标卡尺测定抑菌圈直径大小。

2.2.2 定量测定的稀释法 取菌液 1 mL 分别接种于 MRS 肉汤培养基中, 加入按“2.1.2”项下方法制备的不同浓度枇苳颗粒剂药液, 同时设立阳性对照组(不加入枇苳颗粒剂药液), 立即放入厌氧菌培养袋中, 37 °C 培养 72 h, 观察结果。

2.3 判定标准

中药体外抑菌圈的等级划分, 目前尚无统一标准, 但可参照相应抗菌药物标准。抑菌环直径 > 20 mm 为高敏、抑菌环直径 10~20 mm 为中敏、抑菌环直径 < 10 mm 为耐药^[10]。

定量稀释法结果判定: 培养基混浊者表示有菌生长, 药液无抑菌作用; 培养基透明者表示无菌生长, 药液有抑菌作用。最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)即为抑制细菌生长的药液最大稀释倍数时的浓度。

2.4 测定结果

枇苳颗粒剂供试品溶液对金黄色葡萄球菌有明显的抑菌圈, 抑菌圈直径为(27±1.89)mm, 表明其对金黄色葡萄球菌均有明显抑菌作用; 对痤疮丙酸杆菌有的抑菌圈为(13±2.52)mm, 表明对痤疮丙酸杆菌的体外抑菌效果为中度敏感。结果见图 1 和图 2。

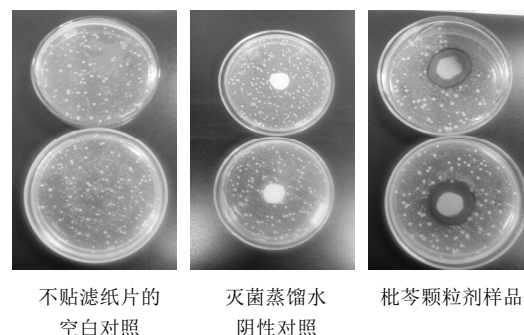


图 1 供试品溶液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果图

Fig. 1 The effect on bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus*



不贴滤纸片的空白对照 灭菌蒸馏水阴性对照 枇苳颗粒剂样品

图2 供试品溶液对痤疮丙酸杆菌的抑菌效果图

Fig. 2 The effect on bacteriostatic action against *Propionibacterium acnes*

枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌 MIC 为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对痤疮丙酸杆菌 MIC 为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见表 1。

表 1 枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的 MIC 的测定

Tab. 1 The minimum inhibitory concentrations(MIC) of Piqin granules on *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* in vitro

菌 种	稀释倍数						阳性对照
	1	2	4	8	16	32	
金黄色葡萄球菌	—	—	—	+	+	+	+
痤疮丙酸杆菌	—	—	+	+	+	+	+

注：“—”试管澄清，无菌生长；“+”试管混浊，有菌生长。

Note: “—” means no growth; “+” means growth.

3 讨论

中药体外抑菌试验方法主要分为两大方面：定性鉴别的抑菌环实验、定量测定的稀释法^[11]。定性鉴别的抑菌环实验的具体方法包含片扩散法^[12]、牛津杯法^[13]、挖沟法^[14]等等。本实验采用滤纸片琼脂扩散法考察枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌的抑菌效果，虽然滤纸片上的装载量小，但是本实验抑菌效果明显，结果直观，易于判断；采用牛津杯法考察枇苳颗粒剂对痤疮丙酸杆菌的抑菌效果，载药量较多，可作为抑菌效果敏感中等的制剂抑菌效果的考察。

稀释法可定量测定中药对细菌的 MIC 用以评价该药的抑菌性能。在本次试验时，由于供试品溶液颜色较深，接入肉汤培养基培养后，肉眼不易分辨是否有效，可取出转种适当的琼脂平板，培养后观察有无细菌生长加以区别。

本实验采用本品的一次口服剂量作为金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的体外抑菌试验。体外抑菌浓度可作为下一步动物药效学和临床体内实验的参考，体内枇苳颗粒剂浓度与本研究中得到

的最低抑菌浓度的关系，需进行下一步的动物药效学和临床体内实验研究，需在后续试验中解决。

痤疮是一种累及毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病，痤疮的发病环节与痤疮丙酸杆菌和金黄色葡萄球菌关系紧密。采用枇苳颗粒剂对金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的体外抑菌作用试验表明，该制剂抑菌效果明显。但体外实验结果与临床应用效果还存在一定差异，因此本实验结果仅仅是在一定条件下药物的抑菌作用，有待进一步验证。

REFERENCES

- [1] HUANG Y, LI L Q. Etiology and pathogenesis of acne and research progress on traditional therapy [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med(云南中医中药杂志), 2014, 35(6): 83-86.
- [2] JIANG L, SHAN P P, SHEN G Q, et al. Antimicrobial activities of traditional Chinese medicines in vitro [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2014, 22(4): 315-318.
- [3] LI X, QIN G M. Studies on the antibacterial effect of Aloes-Salvia miltiorrhizagelatum of compound against main pathogenic bacterium of acne [J]. Med Innov China(中国医学创新), 2014, 11(26): 104-106.
- [4] HUANG M K, TAN D Q. Observation on the curative effect of Lidocaine in the treatment of neurodermatitis [J]. Med Innov China(中国医学创新), 2013, 10(2): 42-43.
- [5] WANG P. Modern research and situation by traditional Chinese medicine of acne [J]. Guangming J Chin Med(光明中医), 2014, 29(7): 1573-1574.
- [6] CHEN J, ZHAO L, LI Y J. Study on ultrasonic-assisted extraction technology of total flavones from eriobotryajaponica leave and its antibacterial effect [J]. Hubei Agr Sci(湖北农业科学), 2013, 52(10): 2383-2388.
- [7] XIAO X S, LIN Q Y. Bacteriostatic effects of loquat leaf extract [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2010, 26(1): 59-62.
- [8] CHEN G R, JIANG H S, XIE S Q, et al. Studying on different extraction technologies of baicalin and anti-inflammatory bioactivity [J]. Guangzhou Chem Indust(广州化工), 2013, 41(3): 81-82.
- [9] LI Y K. Experimental Methodology of Traditional Chinese Medical Pharmacology(中药药理实验方法学) [M]. 2th Ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006: 756.
- [10] LIN N, DONG Y M, SHI Y J, et al. Effect in vitro inhibition of five ethanol-extractions from traditional Chinese medicine on two kinds of gram positive bacteria [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(1): 206-209.
- [11] ZHANG X P, ZHU S S, LIU J, et al. Research progress in evaluation on Chinese materia medica in vitro bacteriostasis methods [J]. Drug Eva Res(药物评价研究), 2014, 37(2): 188-192.
- [12] FU T T, WU J Y, WANG L, et al. Study on the Chinese herbal formula for treatment of vaginitis and the antimicrobial activity in murine models [J]. Chin Med Mater(中药材), 2006, 29(9): 931-935.
- [13] CHEN Z R, DONG Y M, MENG H, et al. Antimicrobial

水杨酸片溶出度测定的不确定度及 Z 比分数研究

夏佳, 付珣, 陈志禹, 席时东(宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315000)

摘要: 目的 比较、分析水杨酸片溶出度测定的不确定度及 Z 比分数法。方法 按照中国药典 2010 年版溶出度测定法先对溶出仪进行性能确认, 再分别对水杨酸片 A、B 样进行溶出度篮法和桨法的测定。考察各影响因素, 计算不确定度, 取包含因子 $k=2$ (对应的置信水平为 95%), 得扩展不确定度。用 Z 比分数法统计参加此次能力验证的 205 家实验室的结果。结果 A 样篮法和桨法溶出度分别为 23.75%, 23.65%; B 样篮法和桨法溶出度分别为 23.49%, 24.46%。Z 比分数法统计结果满意。结论 通过 2 种方法的比较, 可以对溶出度有更全面的认识。

关键词: 水杨酸片溶出度; 不确定度; Z 比分数

中图分类号: R917.105

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)12-1460-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.012

Study on the Uncertainty and the Z Score for the Determination of Dissolution Rate of Salicylic Acid Tablets

XIA Jia, FU Xun, CHEN Zhiyu, XI Shidong(Ningbo Institute of Drug Control, Ningbo 315000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare and analyze the uncertainty and the Z score for the determination of dissolution rate of salicylic acid tablets. **METHODS** To confirm the performance of dissolution tester according to the dissolution method of Ch.P 2010 Vol II. To test the dissolution of salicylic acid tablets A and B using dissolution method 1 and 2. The factors influenced upon the measurement were inspected and the uncertainty of each factor was calculated, then the expanded uncertainty was obtained by using a coverage factor $k=2$ (confidence of approximately 95%). Analyzed the results of 205 labs participating in this ability verification by the use of the Z score. **RESULTS** The dissolution of salicylin acid tablets A using dissolution method basket and paddle was 23.75, 23.65%. The dissolution of salicylin acid tablets B using dissolution method basket and paddle was 23.49%, 24.46%. The statistical results of the Z score were satisfying. **CONCLUSION** By comparing these two methods, more comprehensive knowledge about the dissolution can be get.

KEY WORDS: dissolution rate of salicylic acid tablets; uncertainty; the Z score

溶出度系指活性药物从片剂、胶囊剂或颗粒剂等制剂在规定条件下溶出的速率和程度^[1]。它是药品的重要评价指标之一, 在很大程度上影响了药品在人体内的吸收及利用, 因而需要严格加以控制。然而, 溶出度的测定受很多因素影响, 使结果偏差很大, 为了提高结果的可靠性, 引入不确定度以及 Z 比分数法, 对相关数据进行分析、评价。将这 2 种方法同时应用于溶出度测定的文献尚未见报道。

不确定度的定义是根据所获信息, 表征赋予被测量值分散性的非负参数^[2]。标准不确定度是以

标准差表示测量不确定度。测量不确定度的 A 类评定, 简称 A 类评定, 是对在规定测量条件下测得的量值, 用统计分析的方法进行的测量不确定度分量的评定。而对于一些测量工作中, 不能进行或不需要重复测量的情况则采用测量不确定度的 B 类评定, 简称 B 类评定, 是对现有信息进行非统计方法的评定。合成标准不确定度是由在一个测量模型中各输入量的标准测量不确定度获得的输出量的标准不确定度, 它是测量结果标准差的估计值。扩展不确定度是合成标准不确定度与一个 >1 的数字因子(包含因子)的乘积。包含因子