

大蒜超临界萃取物体外抗真菌活性研究

桂蜀华^{1*}, 王贵均², 李业荣¹, 梁远园¹, 黄琳¹, 张言¹

- (1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006;
2. 广州中医药大学第三临床医学院, 广州 510006)

〔摘要〕 目的:研究大蒜超临界萃取物体外抗真菌活性。方法:采用培养基药物浓度稀释法测试大蒜超临界萃取物对 15 株皮肤癣菌(上海株:断发毛癣菌、大脑状毛癣菌、石膏样小孢子菌、红色毛癣菌、石膏样毛癣菌、羊毛状小孢子菌、絮状表皮癣菌;武汉株:红色毛癣菌、须毛癣菌、石膏样毛癣菌、无色红毛癣菌、犬小孢子菌、羊毛状小孢子菌、絮状毛癣菌、白色念珠菌)的最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)。结果:大蒜超临界萃取物对上海株(断发毛癣菌)、武汉株(须毛癣菌、羊毛状小孢子菌及无色红毛癣菌)4 株菌株的 MIC 为 3.13 mg·L⁻¹,对上海株(石膏样小孢子菌、羊毛状小孢子菌)及武汉株(羊毛状小孢子菌)3 株菌株的 MIC 为 1.56 mg·L⁻¹,对上海株(大脑状毛癣菌、红色毛癣菌、石膏样毛癣菌)、武汉株(红色毛癣菌、石膏样毛癣菌、犬小孢子菌及白色念珠菌)7 株菌株的 MIC 均小于 0.78 mg·L⁻¹。杀菌实验结果显示对上海株(石膏样小孢子菌、絮状表皮癣菌)、武汉株(猴毛癣菌、絮状表皮癣菌)4 株菌株的 MBC 为 6.25 mg·L⁻¹,对上海株(断发毛癣菌、羊毛状小孢子菌)、武汉株(红色毛癣菌、无色红色毛癣菌及犬小孢子菌)5 株菌株的 MBC 为 3.13 mg·L⁻¹,对大脑状毛癣菌上海株的 MBC 为 1.56 mg·L⁻¹,对上海株(红色毛癣菌、石膏样毛癣菌)、武汉株(石膏样毛癣菌、白色念珠菌)4 株菌株的 MBC 均小于 0.78 mg·L⁻¹。结论:大蒜超临界萃取物对 15 株皮肤癣菌有较强的体外抗真菌活性。

〔关键词〕 大蒜;超临界萃取;皮肤癣菌

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2011)06-0225-04

Antifungal Action *in vitro* of Extracts from Garlic
by Supercritical Fluid Extraction

GUI Shu-hua^{1*}, WANG Gui-jun², LI Ye-rong¹, LIANG Yuan-yuan¹, HUANG Lin¹, ZHANG Yan¹

- (1. New Drug Research & Development Department in Guangzhou University
of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Third College of Clinic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study antifungal action *in vitro* of extracts from Garlic by supercritical fluid extraction (SFE). **Method:** The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of SFE extract of Garlic against 15 strains dermatophytes were determined by media dilution method. **Result:** MIC of SFE of garlic to Shanghai strain (*Trichophyton tonsurans*) and Wuhan strains (*Trichophyton mentagrophytes*, *Wool microsporum canis*, *Achromatium trichophyton rubrum*) were 3.13 mg·L⁻¹, MIC to Shanghai strains(*Plaster microsporum canis*, *Wool microsporum canis*)and Wuhan strain(*Wool microsporum canis*) were 1.56 mg·L⁻¹, MIC of SFE to Shanghai strains (*Trichophyton cerebriforme*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton gypsum*) and Wuhan strains (*Trichophyton gypsum*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*) were less than 0.78 mg·L⁻¹. MBC values were different. Apart from MBC of SFE of garlic to Shanghai strains(*Plaster microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*) and Wuhan strains (*Trichophyton mentagroph*, *Epidermophyton floccosum*) were 6.25 mg·L⁻¹, MBC to Shanghai strains (*Trichophyton tonsurans*, *Wool microsporum canis*) and

〔收稿日期〕 20101109(018)

〔通讯作者〕 * 桂蜀华,副研究员,从事中药活性筛选及机制研究, Tel:13631396525, E-mail: guiguishuhua@163.com,

Wuhan strains (*Trichophyton rubrum*, *Achromatium trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*) were $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC to *Trichophyton cerebriforme* (Shanghai strain) was $1.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MBC to Shanghai strains (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton gypserum*) and Wuhan strains (*Trichophyton gypserum*, *Candida albicans*) were less than $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The SFE extract of Garlic showed strong antifungal effect in vitro.

[Key words] garlic; supercritical fluid extraction; dermatophytes

大蒜是百合科葱属植物蒜 *Allium sativum* L. 的地下鳞茎^[1], 被誉为“天然广谱抗生素”, 大蒜或其制剂临床常见用于治疗手癣、脚癣、体癣和防治植物病虫害^[2], 抗真菌活性的实验室研究主要以大蒜挥发油为主, 大蒜超临界萃取物的抗真菌活性未有文献报道。为此, 本课题采用 15 株皮肤癣菌, 测定大蒜超临界萃取物对上述菌种的最低抑菌浓度 (MIC) 和杀菌浓度 (MBC), 以探讨大蒜超临界萃取物的体外抗真菌作用。

1 材料

1.1 药物 大蒜超临界萃取物, 由广州中医药大学新药开发研究中心制剂室采用超临界萃取法 (SFE- CO_2) 萃取所得, 大蒜粉购自全福香料有限公司, 批号 20090811。达克宁, 购自广东省药检所, 批号 20090301。

1.2 试剂与仪器 沙保弱氏培养基 (SDA) (广东环凯微生物科技公司, 批号 200902035); 液体培养基 ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖), 115°C 灭菌 15 min 后分装试管各 2 mL 备用; SHP-250 生化培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); SYQ-DSX-280A 不锈钢手提式灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 5L-SFE 超临界 CO_2 萃取装置 (美晨集团股份有限公司、广州市轻工工业研究所制造); CO_2 (广州气体厂提供)。

1.3 菌种 15 株菌种分别由上海华山医院皮肤科真菌室以及武汉同济医科大学医院真菌室提供。上海株: 断发毛癣菌、大脑状毛癣菌、石膏样小孢子菌、红色毛癣菌、石膏样毛癣菌、羊毛状小孢子菌、絮状表皮癣菌; 武汉株: 红色毛癣菌、须毛癣菌、石膏样毛癣菌、无色红毛癣菌、犬小孢子菌、羊毛状小孢子菌、絮状表皮癣菌、白色念珠菌。

2 方法

2.1 超临界 CO_2 流体萃取 精密称取大蒜 1 kg 粉, 装入萃取釜中, 对萃取釜、解离釜 I、解离釜 II 进行加热, 当达到所选定的温度时, 开启 CO_2 瓶, 通过高压泵对系统加压, 当萃取釜、解离釜 I、解离釜 II 压力分别达到所设定的压力时, 调节 CO_2 的流量到一

定量, 保持恒温恒压。当达到所选定的萃取时间后, 从解离釜 I 和解离釜 II 出口口出料, 分别收集保存。

2.1 培养基配制

2.1.1 沙保弱氏培养基 称取 SDA 45.57 g , 加入蒸馏水 700 mL , 115°C 灭菌 15 min, 置 55°C 水浴备用。

2.1.2 液体培养基 精密称取蛋白胨和葡萄糖, 加入蒸馏水配制终浓度分别为 $20, 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的杀菌培养基, 115°C 灭菌 15 min 后, 分装小试管各 2 mL 备用。

2.2 药基配制 参考文献[3] 将大蒜超临界萃取物、达克宁分别用培养基倍比稀释, 使其终浓度依次为 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, $0.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 7 个质量浓度, 分装试管各 2 mL, 置斜面, 对照管为不加药物的沙氏培养基 2 mL。

2.3 菌液制备 从保藏菌种管中挑取 1 块菌落 (约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), 放入消毒乳钵中, 加入 0.5 mL 生理盐水, 研磨成真菌混悬液, 再用生理盐水调整菌液密度到 $1 \times 10^5 / \text{mL} \sim 1 \times 10^6 / \text{mL}$ 。

2.4 菌液接种 对照管和试验管每管均用划线法接种 1 白金耳, 置 28°C 恒温箱中培养, 每日观察实验结果。观察 7 d 后, 以有无菌生长为判断标准, 与对照组 (菌落生长正常) 比较, 有肉眼可见菌落生长者为无抑菌作用, 无菌落生长者的药物最低浓度为药物的最低抑菌浓度 (MIC)^[3]。

2.5 杀菌试验 将上述培养未生长的菌落接种至液体培养基, 继续孵育 12 d, 每天观察实验结果。观察 12 d 后, 如果液体培养基混浊, 表示有真菌生长, 液体培养基清亮, 表示无真菌生长, 液体培养基中仍无真菌生长的浓度判断为药物的 MBC^[3]。

3 结果

3.1 大蒜超临界萃取物 从解析釜中得淡黄色油状物, 萃取条件为: 萃取温度 35°C , 萃取压力 20 MPa , 萃取时间 3 h。在该条件下, 大蒜油的提取率为 0.350%。

3.2 抑菌实验 对照组试管均在接种 1~3 d 后菌

落开始正常生长,含药基试管与对照组比较均明显生长缓慢,大蒜超临界萃取物有较好的抑菌活性。大蒜超临界萃取物对断发毛癣菌上海株等4株菌株MIC为 $3.13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对石膏样小孢子菌上海株等3株菌株MIC为 $1.56\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对其他菌种的MIC均小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。达克宁对各菌株的MIC均小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,结果见表1。

表1 大蒜超临界萃取物对15种真菌的MIC和MBC

mg·L ⁻¹			
来源	菌种	MIC	MBC
上海	断发毛癣菌	3.13	3.13
	大脑状毛癣菌	<0.78	1.56
	石膏样小孢子菌	1.56	6.25
	红色毛癣菌	<0.78	<0.78
	石膏样毛癣菌	<0.78	<0.78
	羊毛状小孢子菌	1.56	3.13
	絮状表皮癣菌	<0.78	6.25
武汉	红色毛癣菌	<0.78	3.13
	须毛癣菌	3.13	6.25
	石膏样毛癣菌	<0.78	<0.78
	无色红毛癣菌	3.13	3.13
	犬小孢子菌	<0.78	3.13
	羊毛状小孢子菌	1.56	1.56
	絮状表皮癣菌	3.13	6.25
	白色念珠菌	<0.78	<0.78

3.3 杀菌实验 接种到液体培养基后,再培养的菌落,生长十分缓慢,尤其是从高浓度药基接种的菌落,说明大蒜超临界萃取物有明显的杀菌作用。从表中看,大蒜超临界萃取物对石膏样小孢子菌上海株等4株菌株的MBC为 $6.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对断发毛癣菌上海株等5株菌株的MBC为 $3.13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对大脑状毛癣菌上海株的MBC为 $1.56\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对其他菌种的MBC均小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。达克宁对各菌株的MBC均小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,结果见表1。

4 讨论

大蒜是百合科葱属植物蒜*A. sativum* L.的地下鳞茎,具有温中行滞、解毒、杀虫的功效,现代药理研究发现大蒜具有抗氧化、抗肿瘤、抗感染的作用以及对心脑血管的保护作用等^[4]。本实验结果显示大蒜超临界萃取物具有较强的抗真菌活性,除对断发毛癣菌上海株等4株表皮真菌的MIC为 $3.13\text{ mg}\cdot$

L^{-1} ,对石膏样小孢子菌上海株、羊毛状小孢子菌上海株、羊毛状小孢子菌武汉株3株真菌的MIC为 $1.56\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 外,对其他菌种的MIC与达克宁相仿,均小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而MBC的结果显示大蒜超临界萃取物对上述15株菌株呈现杀菌活性,对15株真菌的MBC范围在 $6.25\sim0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其中对白色念珠菌等4株真菌MBC小于 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与达克宁一致,相比于其他实验室报道的大部分的中药有效部位或成分的MBC为 $>1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1[5]}$,土槿皮乙酸MIC $64\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1[6]}$,大蒜超临界萃取物的最小杀菌浓度为 $6.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,活性相对比较强且抗真菌谱广,值得进一步深入研究。

大蒜的有效成分主要为含硫化合物。各国科学家从大蒜中相继提取和分离出蒜氨酸(alliin)、大蒜辣素(allycin)、二烯丙基三硫化物(大蒜新素,allitridin)、阿霍烯(ajoene)、环蒜氨酸(cycloalliin)等二十多种化学成分,其中大蒜素(大蒜辣素)是目前研究最多的大蒜中的主要有效成分,大蒜素以其前体蒜氨酸的形式存在于大蒜中,蒜氨酸较稳定,在将大蒜粉碎压榨时,蒜氨酸与同样存在于大蒜中的蒜酶(Allinase)作用,生成大蒜素。大蒜素不稳定,特别是在热和碱性环境中易分解,当温度上升到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或pH大于8.0时,大蒜素分解速度加快^[7]。有文献报道大蒜制剂中如果避免加热的影响,其抑菌作用可以提高3~6倍^[8]。

超临界流体萃取技术可以在较低温度下对中药挥发油进行萃取分离,特别适合于那些含热敏性组分的物质的萃取^[9]。应用超临界CO₂萃取大蒜有效成分,与水蒸气蒸馏法相比可以避免大蒜素等有效成分被破坏,是一种较为理想的方法。

目前临床上由于自身免疫病、器官移植、糖尿病和某些病毒性疾病如爱滋病(AIDS)导致患者免疫功能受损,使得机会性真菌感染发病率大大增加,往往使患者病情加重甚至死亡,而西药氟康唑等治疗毒副作用较大,从中草药中开发高效、低毒的抗真菌药物具有重要的意义。大蒜在我国具有资源丰富、成本低廉的优势,同时具有广谱的抗真菌活性。如果能提高其制剂稳定性将其开发为真菌感染治疗药物将具有广泛的前景。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:23.

青鹏软膏治疗大鼠佐剂性关节炎作用初探

李慧敏, 李宝丽*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

[摘要] 目的:探讨外用藏药奇正青鹏软膏局部应用治疗大鼠佐剂性关节炎的作用及特点。方法:50 只大鼠随机抽取 10 只作为正常组,其余 40 只注射弗氏完全佐剂造模后分为模型组、青鹏膏高剂量组(1.6 g·kg⁻¹)、青鹏膏低剂量组(0.4 g·kg⁻¹)。治疗组根据体重分别按 1.6,0.4 g·kg⁻¹剂量将药物涂抹于右后肢踝关节周围,连续用药 4 周。观察青鹏软膏不同剂量对佐剂性关节炎大鼠右后肢肿胀率,血清一氧化氮(NO)、白介素-1β(IL-1β)含量的影响,HE 染色镜下观察大鼠踝关节滑膜病理改变。结果:外用藏药青鹏软膏组与模型组比较,大鼠的足肿胀率明显降低($P<0.05$),血清 NO 水平显著降低($P<0.05$),病理研究表明青鹏软膏有效抑制佐剂性关节炎大鼠关节滑膜损伤程度,但对血清 IL-1β 水平没有明显影响。结论:青鹏软膏局部外用对大鼠佐剂性关节炎具有治疗作用。

[关键词] 青鹏软膏;大鼠佐剂性关节炎;一氧化氮;白介素-1β

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0228-04

Experimental Research on Effect of Qingpeng Paste Treating
Adjuvant Arthritis in Rats

LI Hui-min, LI Bao-li*

(Traditional Medicine Department, General Hospital Affiliated to Tianjin
Medical University, Tianjin 300052, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of local application of Qingpeng Paste for treating adjuvant arthritis (AA) in rats. **Method:** Ten rats was eandomly selected form fifty rats as the normal control, the other rats were used to made the adjuvant arthritis model. The model was induced by injection of Freund's complete adjuvant. Then, the fourty rats were divided into model group, Qingpeng Paste high dose group (1.6 g·kg⁻¹) and Qingpeng Paste low dose group (0.4 g·kg⁻¹). The influence on swelling of the rear leg, the serum nitric oxide

[收稿日期] 20100914(004)
[第一作者] 李慧敏,硕士研究生,从事中西医结合内科(消化、免疫疾病),Tel:13821756307,E-mail:lihuimin7782195@163.com
[通讯作者] *李宝丽,硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事消化、免疫类疾病的中西医结合治疗及实验研究,E-mail:li3106@sina.com

[2] Aki Osami. A study of bath preparations containing the garlic extract-Vt B1 complex [J]. Fragrance J, 1993, 21 (2):47.

[3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1991:187.

[4] 罗丹,方峰. 大蒜有效成分的药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2004, 23(6):379.

[5] 宫毓静,安汝国,虞慧,等. 164 种中草药乙醇提取物抗真菌作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1):42.

[6] 董小青,刘丽英,陈虹,等. 土槿乙酸抗白色念珠菌的敏

感性及作用机理的电镜研究[J]. 天津药学, 2008, 20 (2):1.

[7] Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic [J]. Microbes and Infection, 1999, 1 (2):125.

[8] 苏桂兰. 大蒜制剂工艺及质量研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(1):32.

[9] 张忠义,邹恒琴,黄昌全. 超临界流体技术在中药化学成分研究中的应用[J]. 中成药, 1997,19(1):45.

[责任编辑 聂淑琴]