

基于抗菌效价检测的 板蓝根药材品质评价方法的研究*

□ 魏 丽 李 远 李寒冰 孙 琴 罗 云

(解放军 302 医院全军中药研究所 北京 100039)
(成都中医药大学药学院 成都 611137)

金 城 鄢 丹 肖小河** (解放军 302 医院全军中药研究所 北京 100039)

孟宪丽 (成都中医药大学药学院 成都 611137)

摘 要:目的:建立板蓝根抗菌效价生物测定的方法,为探索建立基于抗菌效价检测的板蓝根品质评价方法提供技术支持。方法:以管碟法的抑菌圈直径的大小为指标,通过单因素考察菌浓度、培养时间、细菌传代数对板蓝根抗菌效价的影响,选择适宜条件建立板蓝根抗菌效价的测定方法,并采用该方法检测来自 GAP 种植基地不同批次、其他不同产地不同来源板蓝根药材的抗菌效价。结果:管碟法测定板蓝根药材抗菌生物效价的适宜条件为:以药典规定的管碟法条件基础上,菌浓度为 0.38MCF,培养时间为 15h,细菌传代数为 3 代或 4 代金黄色葡萄球菌;测定的同一 GAP 种植基地不同批次板蓝根药材的抗菌效价差别不大(3.80U 左右),其他不同产地的则差别明显(从 0.83U 到 6.77U 不等)。结论:所建立了板蓝根抗菌效价生物测定方法,该方法可用于板蓝根的品质评价和质量控制。

关键词:板蓝根 品质评价 生物测定 抗菌效价 方法学

中药质量生物控制已成为中药质量控制研究发展的趋势^[1],《中华人民共和国药典》(2010 年版)的编写大纲的主要任务中已明确提出:“中药的质量标准要逐步由单一指标成分定性定量测定,向活性有效成分及生物测定的综合检测过渡。”

为了探索建立基于生物效价检测的中药品质评价新方法,本文选择临床应用广泛^[2]、疗效确切,

但药效物质不明确,现无行之有效的方法进行质量控制的板蓝根作为模式药物,首先尝试从抗菌生物活性方面进行研究^[3],为完善现行的板蓝根质量控制标准提供技术支持。同时本文采用建立的方法对 GAP 种植基地的不同批次及不同地理分布的板蓝根药材样品进行生物效价检测,旨在验证所建立方法是否可用来评价不同产地来源板蓝根的品质优劣,也为从来源上保证板蓝根药材的品质稳定提供参考。

收稿日期:2008-02-26

修回日期:2008-03-13

* 国家“十一·五”科技支撑计划重点项目(2006BAI08B03):中药复方质量控制与评价技术研究,负责人:肖小河;国家杰出青年科学基金项目(30625042):中药鉴定学,负责人:肖小河。

** 联系人:肖小河,教授,研究员,博士研究生导师,主要研究方向:中药药性及质量控制, Tel: 010-66933322, E-mail: pharmacy302@126.com。

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 33

一、材料与仪器

303-3 型水夹套恒温培养箱,上海树立仪器仪表有限公司;WGZ-2 型(细菌)浊度仪,上海昕瑞仪器仪表有限公司;牛津杯(内径 6.0 mm±0.1 mm,高 10.0 mm±0.1mm,外径 7.8 mm±0.1mm)、玻璃双碟(直径 90mm,高 16~17mm)、陶瓦圆盖均购于北京先驱威锋技术开发公司。

抗生素检定培养基 II 号(批号 060306;pH7.9±0.1)购于北京三药科技开发公司;庆大霉素(批号 130326-200314;638 U/mg)中国药品生物制品检定所提供;板蓝根药材:1-5 号(批号:06001-06005)产自安徽省阜阳市 GAP 基地,6-10 号分别产自河北省安国市、内蒙古自治区赤峰市、甘肃省武都市、黑龙江省佳木斯市,安徽省亳州市,经解放军 302 医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)的干燥根。金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26003]标准菌株由中国药品生物制品检定所提供。

二、方法

1. 板蓝根供试品溶液的制备

精密称取样品约 100 g,加入 80%乙醇 2500 mL,超声提取 30 min,滤过,减压回收乙醇并浓缩至 100 mL,离心(10000 r/min)10 min,取上清液,灌装于安瓿瓶,密封备用。临用前以灭菌水配制所需浓度,100℃流通蒸汽灭菌 30 min,冷却,0.22 μm 滤器滤过,取续滤液备用。

2. 硫酸庆大霉素标准品溶液的制备^[4]

精密称取庆大霉素粉末(638 U/mg)约 209 mg,用灭菌磷酸缓冲盐溶液(pH 7.8)溶解并定容至 100 mL,得 2.09 mg/mL(1320 U/mL)硫酸庆大霉素液溶,取上述溶液 100 μl(约 132 U/mL),用磷酸缓冲液溶解并定容至 50 mL,得 2.64 U/mL 的庆大霉素母液,冷冻保存备用。临用时用灭菌磷酸缓冲盐溶液稀释至所需浓度。

3. 不同因素对抑菌圈直径影响的方法学考察^[5]

照《中国药典》2005 年版二部附录 XIA 抗生素微

生物检定法管碟法^[6]进行。采用单因素方法对菌浓度、培养时间、细菌传代数进行考察,操作步骤如下:

取双碟,分别注入加热融化的培养基 20mL,使在碟底内均匀摊布,放置水平面上使凝固,作为底层。用灭菌水将金黄色葡萄球菌斜面培养物的菌苔洗下,用浊度仪测定稀释调整至所需浊度,作为菌悬液。另取培养基适量加热融化后,放冷至 56℃,加入占 1%培养基体积的菌悬液,迅速摇匀,在每 1 双碟中分别加入 5mL,使在底层上均匀摊布,作为菌层。放置在水平台上冷却后,在每 1 双碟中以等距离均匀安置牛津杯 6 个(方法学考察)或 4 个(效价测定),在牛津杯中分别滴加供试品溶液(方法学考察采用 2 号样品(浓度 1g/mL)制备的供试品溶液)和标准品溶液,,用陶瓦圆盖覆盖。37℃培养适宜时间后,取出用游标卡尺量取抑菌圈直径。

(1) 菌浓度的考察^[7]

参照管碟法操作步骤,对 4 代金黄色葡萄球菌斜面培养物 0.17 MCF、0.38 MCF、0.57 MCF、0.79 MCF、1.60 MCF 浊度的菌悬液分别平行三个碟进行试验,培养时间为 15.5 h,结果见图 1。

(2) 培养时间的考察

参照管碟法操作步骤,制备 1.10MCF 浊度的 4 代金黄色葡萄球菌斜面培养物的菌悬液,对 14.0 h、14.5 h、15.0 h、15.5 h、16.0 h 五个培养时间分别平行三个碟进行试验,结果见图 2。

(3) 细菌传达数的考察

参照管碟法操作步骤,制备 1.10 MCF 浊度的 1 代、2 代、3 代、4 代、5 代金黄色葡萄球菌斜面培养物的菌悬液,对每一传代数平行三个碟进行试验,培养时间为 15.5 h,结果见图 3。

4. 不同批次、不同产地来源板蓝根药材抗菌效价的测定

采用 2.3 筛选的适宜试验条件,按管碟法操作步骤,以庆大霉素为标准品,按《中国药典 二部》(2005 年版)附录生物检定项下(2·2)法,对 10 个板蓝根供试品进行抗菌效价测定,供试品浓度(0.69 g/mL、0.48 g/mL),庆大霉素标准品浓度(2.64 U/mL、1.85 U/mL),结果见图 4。

三、结果

1. 菌浓度的考察结果(见图 1)

由图 1 可知:与其余菌浓度的抑菌圈直径相比较,0.38 MCF 菌浓度的抑菌圈直径最大,因此 0.38 MCF 为适宜的菌浓度。

2. 培养时间的考察结果(见图 2)

由图 2 可知:与其余培养时间的抑菌圈直径相比较,15.0 h 培养时间的抑菌圈直径最大,所以 15.0 h 为适宜的培养时间。

3. 细菌传代数的考察结果(见图 3)

由图 3 可知:由于 1 代、2 代细菌处于复苏初期;5 代细菌处于活力衰退期,且抑菌圈不清晰,且 1 代、2 代、5 代细菌活力均不稳定,3 代、4 代细菌处于活力旺盛期,且这两代细菌的抑菌圈直径相差不大,能保证试验结果的稳定性和重现性,3 代、4 代细菌为适宜细菌传代数。

综上所述:板蓝根的抗菌效价测定适宜条件为:菌浓度:0.38 MCF,培养时间:15 h,细菌传代数:3 代或 4 代金黄色葡萄球菌。

4. 不同批次、不同产地来源板蓝根药材抗菌效价的测定结果(见图 4)

由图 4 可知:1-5 号为 GAP 基地不同批次的药材,其抗菌效价差别不大,在 3.80 U 左右;6-10 号样品为其他产地药材,抗菌效价差别明显,从 1.320.83 U 到 6.77 U 不等。

四、结 语

本文将生物效价检测方法用于板蓝根质量控制和品质评价是一个新的尝试,首次建立了板蓝根的抗菌效价测定方法。研究发现,细菌传代数、菌浓度、培养时间等因素对管碟法测定板蓝根抗菌效价影响较大。通过较系统的考察和筛选,得出检测板蓝根抗菌效价的最佳条件为:以药典规定的管碟法条件为基础,细菌传代数为 3 代或 4 代,菌浓度为 0.38 MCF 浊度,培养时间为 15 h。

研究表明,不同来源的板蓝根药材品质差异明显:来源于同一 GAP 种植基地不同批次的药材抗菌

效价差别不大,约为 3.80 U 左右,提示实行 GAP 规范化种植、管理,有利于保证不同批次药材品质的稳定;而来源于不同产地的药材抗菌效价差别较大,从 0.83 U 到 6.77 U 不等,且随纬度增加呈下降趋势,提示日照时间长短对药材的抗菌品质有影响。综合不同来源的板蓝根药材抗菌效价测定结果,提示应选

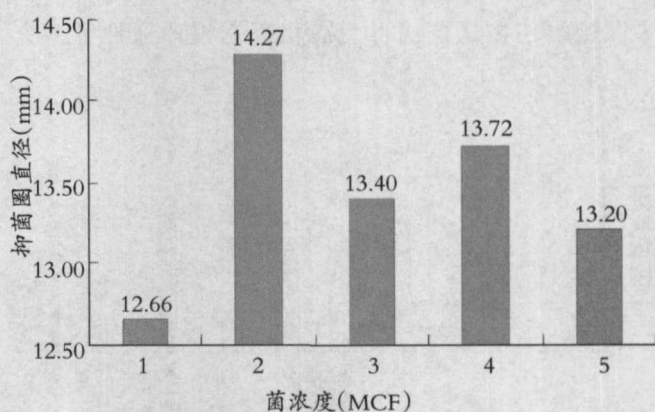


图 1 菌浓度对抑菌圈直径的影响

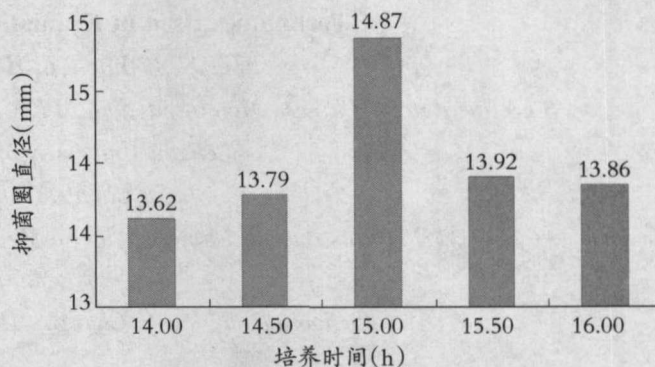


图 2 培养时间对抑菌圈直径的影响

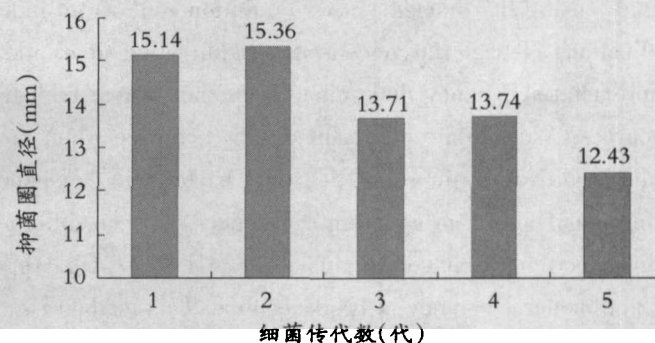


图 3 细菌传代数对抑菌圈直径的影响

择适宜产地,对板蓝根药材实行 GAP 规范化种植、管理,以保证其品质均一、稳定。

本文建立的抗菌效价生物测定方法,较现行药典板蓝根仅以精氨酸为定性检查的质控方法具有现实意义和优势,客观灵敏、简便易行、利于推广,特别是直接关乎其有效性,可为临床合理用药提供参考。

抗菌活性为板蓝根的生物活性之一,笔者所在的课题组还在从抗病毒、抗炎、其它抗菌活性等多方

面进行探索,以期从中选择一到多个行之有效的生物效价测定方法。相关文章将陆续报道。

参考文献

- 1 肖小河,金城,赵中振,等.论中药质量控制与评价模式的创新与发展.中国中药杂志,2007,38(7):1~5.
- 2 赵军.板蓝根的药理作用及其临床应用.时珍国医国药,2003,14(4):241.
- 3 Zhao Zhao Yan-ling L.,QU Qu Fen,Xiao Xiao Xiao-he H. Thermodynamic Study on Antibacterial Effect of Different Extracts from Radix Isatis.Chinese Journal of Integrative Medicine,2006;12(1)(1):42.
- 4 李榆梅主编.药品生物检定技术.北京:化学工业出版社,2004,65.
- 5 黄英.管碟法测定抗生素效价的影响因素分析.中国药师,2005,8(8):689.
- 6 国家药典委员会主编.中华人民共和国药典(二部).北京:化学工业出版社,附录 111.
- 7 姬文英,张宏莲.抗生素效价测定中试用菌应注意的问题.西北药学杂志,2005,20(1):29.
- 8 周海钧主编.药品生物检定.北京:人民卫生出版社,2005,440.

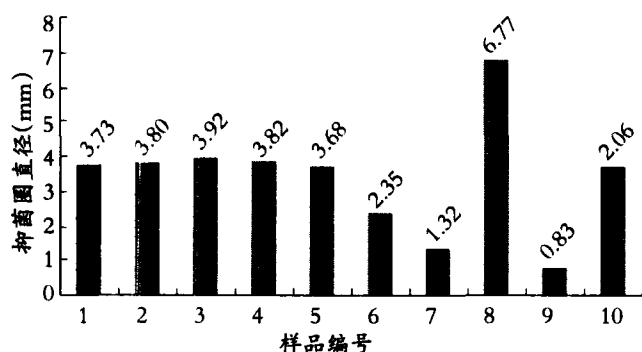


图4 不同批次、不同产地来源板蓝根抗菌效价测定结果

Techniques Used in Evaluating the Quality of Radix Isatidis

Wei Li, Li Yuan, Li Hanbing, Sun Qin, Luo Yun

(PLA Institute of Chinese Materia Medica, PLA 302 Hospital, Beijing 100039, School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137)

Jin Cheng, Yan Dan, Xiao Xiaohe

(PLA Institute of Chinese Materia Medica, PLA 302 Hospital, Beijing 100039)

Meng Xianli

(School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137)

This paper introduces a method for evaluating the quality of Radix Isatidis, based on antibacterial potency. In the study, using the diameter of an inhibition zone as an index, a single-factor examination was made to evaluate the implications of bacteria concentration, cultivating time, and bacteria generation, based on the antibacterial potency. An antibacterial potency determination method was established, and was used to detect the Radix Isatidis from different sources. A desirable test result can be achieved when the following conditions are met: bacteria concentration at 0.38 MCF, cultivating time for 15 h, and bacteria in 3rd generation or 4th generation. Antibacterial potency of Radix Isatidis has showed no apparent differences between different batches of GAP (about 3.80 U), though with a noticeable difference in terms of origins (0.83 U–6.77 U). Apparently, optimized conditions are needed to determine the antibacterial potency of Radix Isatidis. This method can be used for quality control and evaluation of Radix Isatidis.

Keywords: Radix Isatidis; quality evaluation; bioassay; antibacterial potency; methodology

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:邹春申)