

中藥處方之抗菌活性解析

第一報 黃連解毒湯

楊玲玲 許信義 官明志 顏焜熒

近年來，醫藥品藥效之再評價與醫藥品製造及品質管制之基準（G.M.P.），實施有關中藥及中藥製劑之品質評價法和試驗法之問題漸受重視。同時基於開發傳統中藥之現代科學考證及應用為目的，乃收集臨床中醫常用之解毒處方，首作黃連解毒湯對臨床化膿症分離之金黃葡萄球菌及綠膿菌之抗菌活性，本處方對金黃葡萄球菌有明顯之抑制作用，對綠膿菌則無抑制作用。同時，分離主成分小藥鹼鹽酸鹽（berberine-HCl），以此成分為抗菌活性準繩，討論處方中各組成中藥間之複合作用。

前 言

中藥之有效性與安全性之再評價，為目前醫藥品研究之重要課題，關於此方面之文獻很少。雖然神農本草經及歷代本草書中記載有藥效與藥能，由於缺少臨床前檢討，以致無法廣加正確之利用。

近年來，由於合成藥物之藥害日趨呈現；致使藥性緩和、毒性少之中藥，倍受世人矚目。而中藥之異於合成藥物，乃一般為組合作用，而有關一個一個中藥材之藥能與全體處方之藥效，有待研究檢討。最近由於新的藥理、生物檢定、免疫學等技術之引入，使向來許多藥效、成分未詳之中藥，亦利用種種之試驗法，解明其生理活性、成分；由於藥效之裏證，更增加新藥之利用。甚且有關重要中藥材之一之黃連栽培、分布、藥理作用、生合成⁽¹⁾、定量法已有報告，尤其抗菌作用亦有許多報告⁽²⁾，不過都屬片斷之報告。而有關中藥處方中與黃連共同使用，研究其抗菌性之影響報告則未見。

因此著者等首先就臨床中醫師常用解毒、治膿血、丹毒之黃連解毒湯，研究該處方對臨床化膿症分離之金黃葡萄球菌及綠膿菌之抗菌活性，並以小藥鹼（berberine）為主要抗菌活性成分⁽³⁾，來討論方劑中複合作用之理論。同時將含小藥鹼之處方及藥材作一定量，由本研究結果發現處方調劑方法之不同將影響其抗菌效果。即黃連解毒湯四構成藥材以（1:1:1:1）比例混合後抽取之P.C.S.G*。與將各藥材分別抽取後依（1:1:1:1）混合之P+C+S+G之二種製劑，其抗菌作用，後者顯示有較強之抗菌效果，特別是對葡萄球菌感染症。

本報之抗菌活性解析結果，可供臨床選藥，以及科學化中藥製劑選擇高效能製法之參考。

* P: 黃柏, C: 黃連, S: 黃芩, G: 山梔子

材料與實驗方法

1. 中藥材料

- 黃連 *Coptidis Rhizoma* (*Coptis teeta* Wallich) *Ranunculaceae*
- 黃芩 *Scutellariae Radix* (*Scutellaria baicalensis* Georgi) *Labiatae*
- 黃柏 *Phellodendri Cortex* (*Phellodendron wilsonii* Hay.) *Rutaceae*
- 山梔子 *Gardeniae Fructus* (*Gardenia jasminoides* Ellis) *Rubiaceae*

以上四種藥材各取乾品 300 公克。

2. 抽取方法

將各中藥及黃連解毒湯⁽⁴⁾ (根據外台秘要之組成以 1:1:1:1 調製) 依下法抽取:

各中藥及處方分別磨碎、乾燥各精秤 100 公克於 70° C 下加蒸餾水 1 公升抽取 3 次, 每次 6 小時, 濾液合併於 40° C 下減壓濃縮至 250 ml, 然後冷凍乾燥。

3. 試驗菌株

(1) 臨床分離菌株: 1978 年夏由國泰綜合醫院、馬階醫院分離化膿症病人之金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 10 株, 白色葡萄球菌 1 株 (*Staphylococcus albus*) 及綠膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 10 株, 各菌株與臨床常用抗生素均已產生不同程度之抗藥性。

(2) 試驗標準菌株:

- (a) 副傷寒菌 A *Salmonella paratyphi* A 41 - H - 22
- (b) 副傷寒菌 B *Salmonella paratyphi* B 41 - H - 6
- (c) 鼠傷寒菌 *Salmonella typhimurium* (156) 10953
- (d) 黃色八聯球菌 *Sarcina lutea* 9341
- (e) 大腸菌 *Escherichia coli* K - 12
- (f) 皮垢桿菌 *Mycobacterium smegmatis* 607
- (g) 金黃葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

4. 試料之調製

每一構成中藥及黃連解毒湯之冷凍乾燥物, 分別作成 4000 μg/ml 之儲存液, 並經間歇滅菌。

5. 抗菌活性檢測

(a) 檢測方法: 係利用 Broth double dilution serial tube method⁽⁵⁾。各試驗藥材之最高濃度為 1000 μg/ml⁽⁸⁾。

(b) 檢測之培養基: Tryptic soy agar (Gibco)、Tryptic soy broth (Gibco)

(c) 菌液之配製: 每一菌株取新鮮培養之菌落 5 個於 5 ml 之 Tryptic soy broth 中培養 18—24 小時, 37° C, 稀釋培養隔夜之菌液至每 ml 為 10⁵⁻⁶ organisms⁽⁶⁾。

6. 中藥成分之初步檢測

黃連解毒湯及各組成中藥材之凍結乾燥物溶於蒸餾水中, 於 1000 μg/ml 濃度 (有意義濃度⁽⁶⁾) 下測其 pH 值, 氯化鐵反應、苛性鈉反應, 類黃鹼反應, Mayer's 反應以及 Liebermann Burchard's 反應⁽⁷⁾。

7. 小葉鹼鹽酸鹽之抽取分離

黃柏 100 公克用酒精 1 公升回流抽取 3 次, 濾液合併濃縮至 80 毫升加水 10 倍稀釋, 濾去沉澱, 再加 10% 鹽酸, 則有小葉鹼鹽酸鹽之粗結晶析出, 加壓過濾分離, 再用酒精再結晶⁽⁹⁾。

8. 小葉鹼之定量法

含有小葉鹼之藥材 (黃柏、黃連) 及不同調製法之黃連解毒湯處方製劑, 分別依中華藥典第二版 (P. 235) 之 Acetone berberine 法作其含量測定。

結果與討論

1. 處方及各組成中藥對臨床化膿症分離之金黃葡萄球菌及綠膿菌之抗菌結果如 Table 1 所示。黃連及其構成處方之黃連解毒湯水抽

Table 1. Antibacterial activity of Huang-lian-ziee-dwu-tang to clinical isolates of *Staphylococcus*

Drugs	Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P.C.S.G.)		i	i	i	i	i	1000	1000	i	i	i	i
Coptidis Rhizoma		31.5	i	i	1000	500	125	125	250	250	250	250
Phellodendri Cortex		i	i	i	i	1000	250	i	1000	1000	1000	i
Scutellariae Radix		i	i	i	i	1000		i	i	i	i	i
Gardeniae Fructus		i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P+C+S+G)		125	i	i	i	1000	500	500	1000	500	500	500
Berberine-HCl		62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5

Medium: Tryptic soy broth (Gibico)

Concentration: The highest level test was 1000 $\mu\text{g/ml}$; i = inactive > 1000 $\mu\text{g/ml}$

取物對綠膿菌均無抑制作用，而對金黃葡萄球菌則以黃連、黃柏、黃連解毒湯（P+C+S+G）較具明顯之抗菌活性。而其主成分均為小蘗鹼，因此本報尚由黃柏中分離出小蘗鹼之塩酸塩結晶測定其對本次由臨床分離 11 個葡萄球菌均有抑制作用（MIC = 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ），所以有關黃連解毒湯之抗菌活性評估，本論文以小蘗鹼含量為準則加以討論之。

2. 由 Table 1 所示結果，黃連解毒湯配合中藥之黃芩與山梔子對臨床分離之金黃葡萄球菌及綠膿菌幾乎無抑制效果。同時，黃連解毒湯因調製法不同之 P.C.S.G. 與 P+C+S+G 所呈之抗菌力有顯著之差異，P+C+S+G 較 P.C.S.G. 顯示較強之抗菌作用。

3. 處方調製法之不同影響藥效之力價，為進一步探討其原因為何？乃進而作其初步成分檢測，結果如 Table 2 所示。P.C.S.G. 於最高試驗濃度（1000 $\mu\text{g/ml}$ ）下 Mayer's 反應呈陰性反應，而 P+C+S+G 於相同條件下呈陽性反應，由此可推定 P+C+S+G 含高

量之活性成分。且除去小蘗鹼之母液已被證明沒有抗菌效果⁽¹⁰⁾。其次復利用 Acetone berberine 法作小蘗鹼含量之測定，結果如 Table 3 所示。P+C+S+G 確實較 P.C.S.G 中含量為高，因此抗菌力價亦大。

4. 調製法之不同，除影響藥效力價外，對有效成分之抽取率有顯著之差異。此可能因含小蘗鹼中藥與他種中藥混合抽取時，受其他中藥之吸收而防礙小蘗鹼之抽取？抑或與其他成分產生沉澱反應？其機理尚未詳。然而由此結果，可推知有關中藥處方之抽取方法，順序均循處方特有藥性而選用適當之方法，對今後科學化中藥製劑之改良上均十分重要。

5. 含小蘗鹼之中藥及處方對標準菌株：*Staphylococcus aureus* 209 P, *Salmonella paratyphi* A 41-H-22, *Salmonella paratyphi* B 41-H-6, *Salmonella typhimurium* (156) 10953, *Sarcina lutea* 9341 及 *E. coli* K-12 之抗菌結果如 Table 4 所示。小蘗鹼之塩酸塩對以上各菌有

Table 2. Preliminary Test of Huang-lian-ziee-dwu-tang

Drugs	Test	FeCl ₃	NaOH	Flavone	Mayer's	Liebermann Burchard's
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P.C.S.G.)		-	-	-	-	+(brown)
Coptidis Rhizoma		-	-	-	+(yellowish)	+(brown)
Scutellariae Radix		+	+	+	-	+
Gardeniae Fructus		-	-	-	-	-
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P+C+S+G)		+	+	+	+	+
Berberine-HCl		-	-	-	+	-

concentration in 1000 μ g/ml

"+" positive

"- " negative

Table 3. Berberine Contents in Tested Drugs

Crude Drugs	A (ml)	B(mg)	Berberine (mg)
Huang-lian-ziee-dwu-tang(P.C.S.G.)	138.6	5.5	18.8
Huang-lian-ziee-dwu-tang(P+C+S+G)	138.0	7.5	20.54
Coptidis Rhizoma	128.5	119.3	129.98
Phellodendri Cortex	147.0	79.6	86.18

$$\text{Berberine (mg)} = A \times 0.100 + B \times 0.898$$

不同之抗菌活性。對 *Salmonella paratyphi A* 無效，對 *Salmonella paratyphi B* 及 *Salmonella typhimurium* 顯示弱之抗菌作用。然而對 *E. coli* 及 *Sarcina lutea* , *Staphylococcus aureus* 顯示較強之抗菌活性。

6. 黃連於中藥臨床上用於解毒、除燥濕；且已由藥理實驗證實有鎮痛、消炎、鎮靜、stress 潰瘍預防作用⁽²⁾。然而有關配合處方之抗菌作用迄今未見報告。本報首作配合臨床

中醫常用治療各種熱毒症如疔毒內攻、敗血症、膿毒血症、赤痢等之黃連解毒湯，對此類疾病之可能病原菌之抗菌活性解析。由以上之結果，證實若診斷係金黃葡萄球菌感染，則可適用本處方，若為綠膿菌感染病症則本處方無效。

7. 中藥在治療上異於合成藥物者，乃因其並非單一個體，而是複合體。單一藥材中所含之成分不止一種而有多種，此多種成分複合而

Table 4. Antibacterial Activity to Standard Strains

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						
	1	2	3	4	5	6	7
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P.C.S.G.)	i	i	i		4	i	i
Huang-lian-ziee-dwu-tang (P+C+S+G)	i	i	i	250	4	i	500
Coptidis Rhizoma	i	i	i	62.5	4	250	250
Phellodendri Cortex	i	i	i	125	4	500	1000
Berberine HCl	i	500	500	4	4	62.5	62.5

1. *Salmonella paratyphi* A 41-H-22

2. *S. paratyphi* B 41-H-6

3. *S. typhimurium* (156) 10953

4. *Sarcina lutea* 9341

5. *Escherichia coli* K-12

6. *Mycobacterium smegmatis* 607

7. *Staphylococcus aureus* 209P

* the highest level tested was $1000\mu\text{g/ml}$, i = inactive $> 1000\mu\text{g/ml}$

發揮一藥材之藥效，此乃異於合成藥物之複合作用⁽¹¹⁾。關於中藥複合作用之理論已確立有二說⁽¹²⁾，其一：天然之複合，如前所述單一之藥材，其二：人為的，乃臨床調配之處方，此為集各單味中藥複合作用再組合而產生之作用，即異種藥材所含成分間之複合作用。本報以金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 209

P) 之抗菌效果為例，討論黃連解毒湯之複合作用。

Table 1 所示黃芩、山梔子對以上之病原菌均無抗菌效果，却配合於處方中，此乃中藥處方配合之奧妙處。綜合 Table 3 及 Table 4 的結果以下表 Table 5 討論之。

Table 5. Compare the Berberine Content and MIC

drugs	MIC	content berberine
P+C+S+G	$500\mu\text{g/ml}$	$10.28\mu\text{g/ml}$
Coptidis Rhizoma	$250\mu\text{g/ml}$	$16.20\mu\text{g/ml}$
Berberine HCl	$62.5\mu\text{g/ml}$	$56.25\mu\text{g/ml}$
Phellodendron Cortex	$1000\mu\text{g/ml}$	$86.80\mu\text{g/ml}$

由上表可見同一條件下，黃連之最低抑菌濃度 (MIC) 雖較小葉鹼鹽酸鹽之 MIC 為大，但實際上小葉鹼之含量，黃連較小葉鹼鹽酸鹽

之含量為低 (前者 $10.28\mu\text{g/ml}$ ，後者為 $56.25\mu\text{g/ml}$)。此可證實黃連中之抗菌成分除小葉鹼外，尚有其他成分與其產生複合作

用，此為植物體中天然配合之複合作用。另 P+C+S+G 與黃連之最低抑菌濃度相比雖高，但實際上 P+C+S+G 中含小蘗鹼之量較黃連低，此乃除黃連外，經配合其他三種藥材（黃柏、黃芩、山梔子）所產生之複合作用，而發揮其抗菌效果所致。此乃中藥間複合作用之奧妙！

誌 謝

本研究承蒙預防醫學研究所長楊照雄教授賜予菌株，國泰綜合醫院及馬階醫院實驗診斷科協助收集檢體，以及本學院微生物學科王正怡副教授之助言，得以順利完成，在此一併致謝。

參考文獻

1. 三鍋昌俊：藥草黃連之研究，日本東京，風間書房，(1970)。
2. 顏焜熒：常用中藥之藥理，台北，國立中國醫藥研究所，合訂版，pp.221 (1974)。
3. Amin, A. H., T. V. Subbaiah and K. M. Abbasi: Berberine Sulfate: Antimicrobial activity, bioassay, and mode of action, *Can. J. Microbiol.*, 15; 1067, 1969.
4. 中國方藥學，台北、啓業書局，pp.239 (1976)
5. Rondall, W. A., C. W. Price and H. Welch: The estimation of penicillin in body fluids, *Science*, 101; 365, 1945.
6. John, E. Blain, Edwin H., Lenne TTE. and Joseph, P. Trunt: *Manual of Clinical Microbiology*, U.S.A. p. 305-309, 1970.
7. 顏焜熒、楊玲玲：植物化學實驗書，台北，國立中國醫藥研究所，pp. 1, 1973.
8. Mitscher, L. A., R. P. Lee, M. S. Bathala and J. L. Peal: Antimicrobial agents from higher plants II, *Lloydia*, 35(2); 157, 1972.
9. 顏焜熒、楊玲玲：植物化學實驗書，台北，國立中國醫藥研究所，pp.167(1973)
10. 許鴻源：黃連、黃芩、葛根湯之研究，*台灣藥學雜誌*，6(1)；2 (1954)
11. 木村正康：漢方研究，日本，第8期，pp. 239(1967)
12. 顏焜熒：常用中藥之藥理，台北，國立中國醫藥研究所，vol. 1, pp. 1-2. (1974)

Studies on the Antibacterial Evaluation of Chinese Medicine Prescriptions I. "Huang-lian-ziee-dwu-tang"

LING-LING YANG, SHIN-YE HSU, MING-ZU GUAN, AND KUN-YING YEN

"Huang-lian-ziee-dwu-tang" (黃連解毒湯) is one of the famous antitoxic prescription. It is practically used in the clinical field as the therapeutic agent for toxemia, septicemia, bacteremia and suppurative inflammations . . . etc. by Chinese medical doctor. In this paper, we want to confirm the effect and more accurate therapeutical results in the preclinical test. These are methods carried out by physio-chemical and clinical microbiological evaluation. The mainly test strains are clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from the pus of patients. Otherwise, the antibacterial activity to *Staphylococcus aureus* 209P, *Salmonella paratyphi A-41-H-22*, *S. paratyphi B 41-H-6*, *S. typhimurium* (156) 10953, *Sarcina lutea* 9341, *Escherichia coli* K-12 will be also explained in this paper.

The antibacterial activity of the prescription and each compositive drugs are summarized as following:

1. "Huang-lian-ziee-dwu-tang" is effective to against inhibit all *Staphylococcus aureus*, but not to all *Pseudomonas*. *Coptidis Rhizoma* (黃連) is the most active drugs. *Gardeniae Fructus* (山梔子) and *Scutellariae Radix* (黃芩) are almost inactive to all tested strains. However, the combined effects of the prescription and each drugs will be discussed in this paper.
2. The dispensing methods will influence the antibacterial activity.

Department of Pharmaceutical Phytochemistry, Taipei Medical College
Received for Publication: September 1980