

七种鞣质类中药提取物的抗菌作用

王万骞*, 黄 晨, 陈本龙

(天津出入境检验检疫局动物与食品检验检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 研究五倍子、石榴皮、虎杖、大黄、黄芩、生地榆、柯子等7种中药材提取物对从养殖病鳃中分离得到的12株常见病原菌的抑菌作用。**方法** 采用索氏提取法和超声提取法,以水和乙醇为提取溶剂分别萃取7种中药的有效组分,采用平板稀释法对12种菌株开展药物敏感实验,测定各种中药提取物对12种致病菌的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。**结果** 7种中药提取物对12种菌都有不同程度的抑制作用。对于五倍子、石榴皮、大黄、虎杖4种药,索氏提取效果比超声提取效果好;对于生地榆和柯子,超声提取效果比索氏提取效果好。超声醇提五倍子抑菌效果最好。**结论** 7种中药提取物单用对病原菌均有不同程度的抑制作用,不同乙醇体积分数,提取中药与溶剂的比例对抑菌效果影响显著。

关键词: 鞣质; 中药; 病原菌; 抑菌作用

Antibacterial effects of 7 Chinese tannin extracts

WANG Wan-Qian*, HUANG Chen, CHEN Ben-Long

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To study antibacterial activity of extracts from Chinese herbs including *Rhus chinensis* Mill, *Punica granatum* Linn, *Rheum palmatum* Linn, *Rhizoma polygoni* Cuspidati, *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Radix Sanguisorbae*, and *Terminalia chebula* Retz against 12 pathogenic bacteria isolated from eels. **Methods** The method of Soxhlet extraction and ultrasonic extraction was used to extract active ingredients from 7 kinds of Chinese medicine with water and alcohol as the extraction solvents respectively. The method of plate dilution was adopted for the drug sensitive test of the 12 bacterial strains to determine minimum bacteriostatic concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of each extract against the 12 kinds of pathogenic bacteria. **Results** Extracts from these Chinese herbs had antibacterial effect in different extents on the 12 bacteria. For *Rhus chinensis* Mill, *Punica granatum* Linn, *Rheum palmatum* Linn, and *Rhizoma polygoni* Cuspidati, the effect of Soxhlet extraction was better than that of ultrasonic extraction. For *Radix Sanguisorbae* and *Terminalia chebula* Retz, the effect of ultrasonic extraction was better than that of Soxhlet extraction. Extracts from *Rhus chinensis* Mill by ultrasonic ethanol extraction had the best antibacterial activity. **Conclusion** Single application of extract from 7 Chinese herds exhibits antibacterial activity in different extents. The volume fraction of ethanol and the ratio of extract to solvent have significant influence on antibacterial effects.

KEY WORDS: tannin; Chinese herbs; pathogenic bacteria; antibacterial activity

*通讯作者: 王万骞, 助理兽医师, 主要研究方向为动物及动物产品兽药残留检测。E-mail: wangwq@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: WANG Wan-Qian, Assistant Veterinarians, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.158 Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: wangwq@tjciq.gov.cn

1 引言

近年来,细菌的抗药性和药物残留问题成为威胁我国动物源性食品安全的主要因素之一,也是世界性攻关难题。为了解决该问题,世界各国均投入了大量资金进行相关研究,一方面制定了相关制度,另一方面,加紧研制和开发低毒、低残留、无不良反应和不产生抗药性的兽医专用新型药品和制剂,以确保动物源性食品安全生产。

中草药是我国传统兽医药学的宝贵遗产,长期以来为防治养殖动物疾病做出了不可磨灭的贡献,应用中草药防治水生动物疾病也有着悠久的历史。中草药不但可以解决实用化学药物造成的耐药性和药物残留超标的问题,而且符合发展无公害水产养殖业、生产绿色水产品的疾病防治原则。随着我国加世界贸易组织(WTO),兽药实施药品生产质量管理规范(GMP)管理后,国内外的药物,尤其是动物饲料和实用性动物药品,正在向低毒、无残留、高效方向转变,因此,在水产养殖上大力开发应用中草药具有十分广阔的前景^[1-4]。

中药鞣质类成分是自然界广泛分布的一类结构复杂的多元酚类化合物,具有结构类型的多样性和生物活性的广泛性^[5]。其在医药、食品、农业、材料、化工等多学科领域得到广泛的应用,已引起国内外研究者的普遍关注。鞣质作为一类储量丰富、可再生的绿色资源,随着其他一次性资源的逐渐消耗以及环保要求的提高,将成为人类利用的最重要的资源宝库之一。近20年来,随着结构鉴定技术的进步和新的分离技术的天然产物结构化学方面的应用,人类已经从植物中分离、鉴定了近千种鞣质化合物单体,并进行了广泛的药理活性研究,发现鞣质具有多方面的药理作用,除常见的收敛、抗菌消炎、止血、驱虫、止泻外,还表现出抗肿瘤、抗突变、抗脂质过氧化、抗变态反应、抗病毒、抗炎抑菌等多种生物活性^[6,7]。目前世界上形成了以日本冈山大学奥田拓男等为代表的鞣质专门研究室,使得鞣质成为十分活耀的研究领域。至今已分离鉴定鞣质化合物400多种,新发现的化合物数量之多、类型之广,都超过了以往的总和^[8]。

本实验选用7种含有鞣质的中药药材,针对养殖鳊鱼的主要病原菌,采用不同中药提取技术,通过琼脂平板稀释法比较鞣质类中药提取液的抑菌效果,

以期获得较优的提取方法和萃取条件,为高效预防和控制鳊鱼细菌性疾病爆发,提高养鳊业的经济效益,确保鳊鱼产品的安全,提供科学理论依据^[9-12]。

2 材料与方法

2.1 菌株

12株病原菌由福建集美大学水产学院养殖场病鳊中分离得到(G1-1、G1-2、G1-5、G1-6、Sh2-2、Sh2-8、Sh2-9、Sh2-11、Sh2-12、Sh2-13、S4-4、F3-4),其中Sh2-13、S4-4、F3-4为气单胞菌,G1-2、Sh2-2为迟钝爱德华菌。

2.2 药材及前处理

药材:五倍子(*Rhus chinensis* Mill)、石榴皮(*Punica granatum* Linn)、大黄(*Rheum palmatum* Linn)、虎杖(*Rhizoma polygoni Cuspidati*)、黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)、生地榆(*Radix Sanguisorbae*)、柯子(*Terminalia chebula* Retz),均来厦门中药厂有限公司。将所选的药材用中药粉碎机(FW177,天津市泰斯特仪器有限公司)粉碎,然后放入超微粉碎机(YSC-701,北京燕山正德机械设备有限公司)进一步粉碎,收集超微药粉,然后用200目的筛网过滤,收集过筛后的中药备用。

2.3 试验仪器

冷冻超微粉碎机(YSC-701,北京燕山正德机械设备有限公司)、索氏提取仪(GUIGO-6A,上海桂戈公司)、超声波破碎仪(Xinyi-IID,济南信仪公司)、超净工作台(JB-CJ-1FX,苏州佳滤公司)、灭菌锅(ST-50G,南京杰奥特公司)、电子天平(Mettler公司)、细菌培养箱(MJ-250-I,苏州江东公司)、酶标仪(美国Thermo公司)、烘箱(KH-55A,广东BOZAO公司)、细菌培养基(陆桥公司)、琼脂(奥博星公司)、牛肉浸膏、M-H肉汤(桥公司)等等。

2.4 中药提取

2.4.1 中药索氏提取

称取所选中药15g,用150mL 70%乙醇浸泡30min,然后用索氏提取仪提取,提取条件为热量级12,提取时间60min,淋洗条件为热量级12,淋洗时间为10min,提取后的药液放于4℃冰箱保存备用。

2.4.2 中药超声提取

称取所选中药15g,用150mL 70%乙醇溶液浸

泡 30 min, 然后在超声提取仪下提取 30 min, 条件为变幅杆 20 mm, 超声功率 720 W, 温度 50 °C, 超声 3 s, 间歇 5 s, 提取后离心取上清液, 放于 4 °C 冰箱保存备用。

2.5 菌悬液的制备

从保种斜面上挑取菌落, 划线接种于 M-H 琼脂平板, 于 28 °C 恒温培养 24 h; 挑取单个菌落划线至新鲜斜面上, 于 28 °C 恒温培养 24 h 后, 调菌。

调菌: ① 在超净工作台, 紫外 20 min 后, 将 5 mL 的离心管摆放在试管架上, 进行编号, 分 A、B 两组, 并要有空白。② 取 2 mL 的生理盐水加在 A 离心管中, 空白可加 4 mL。③ 用 2 mL 的生理盐水将斜面上的菌冲洗下来, 并倒到 B 离心管中。④ 从 B 离心管中取 200 μ L 菌液加在 A 离心管中。⑤ 从 A 离心管中取 200 μ L 带菌的生理盐水加在酶标板上, 第 1 个为空白, 测 OD 值, 调菌浓度。⑥ OD₆₂₀ 值范围为 0.18~0.30。若菌浓度不在标准值范围内, 需加菌悬液或生理盐水, 直至将菌浓度调至标准值范围内为止, 表明此时菌浓度已校正为 10⁸ CFU/mL。⑦ 将已校正的 10⁸ CFU/mL 菌液用生理盐水稀释 10 倍, 则菌浓度调至 10⁷ CFU/mL, 放入冰箱保存, 即可作为药敏试验接种的菌悬液。

2.6 药敏试验

取已制备好的菌悬液 2 μ L, 点种于经过 121 °C 20 min 灭菌后的药敏培养基平板上, 每个药物浓度梯度做 2 组平行, 于 28 °C 恒温分别培养 24 h 后, 观察药板上菌落的生长情况。以 24 h 无菌落形成的最低浓度作为中药对该菌株的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。对无细菌生长的平板, 于 28 °C 培养箱中连续培养 24 h, 以不出现菌落的平板内药物的最小浓度为最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。

2.7 药敏培养基的配制

提取药液药敏培养基的配制: 采用琼脂稀释法, 以提取中药的药液为溶质, M-H 培养基为溶剂, 根据药性不同配置浓度不同。五倍子配制出 0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的药敏培养基平板。石榴皮、虎杖、大黄、黄芩分别配制 0.375、0.75、1.5、3.0、6.0、12.0 mg/mL 的药敏培养基平板。生地榆、柯子分别配制 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL

的药敏培养基平板。

2.8 正交实验设计

2.8.1 正交实验的意义

开展一个 3 因素 3 水平的实验, 按全面实验要求, 须进行 3³=27 种组合的实验, 且尚未考虑每一组合的重复数。若按 L₉(3³) 正交表安排实验, 只需作 9 次, 按 L₁₈(3⁷) 正交表进行 18 次实验, 大大减少了工作量。

2.8.2 黄芩正交实验设计

优化黄芩提取条件, 如表 1 设计正交试验^[13,14]。

表 1 黄芩正交实验设计

Table 1 Orthogonal experimental design for *Scutellaria baicalensis* Georgi

水平	因素		
	乙醇体积分数 A	料液比 B	提取时间 C
1	60%	8	1h
2	70%	10	2h
3	80%	12	3h

设置不同的乙醇体积分数、料液比、提取时间, 分别编号 A、B、C。分别配制 0.375、0.75、1.5、3.0、6.0、12.0 mg/mL 的药敏培养基平板。

3 结果与分析

3.1 7 种中药提取物对 12 株病原菌的抑菌作用

表 2~表 8 结果表明: 不同方法提取的五倍子、大黄、虎杖等 7 种中药提取物对 12 株常见病原菌均有一定的抑制作用, 但最低抑菌浓度和最低杀菌浓度均差异明显。醇提效果明显比水提效果好; 索氏一次醇提效果比二次醇提效果好; 五倍子索氏一次醇提抑菌作用最强, MIC<2.000 mg/mL; 对于五倍子、石榴皮、大黄、虎杖、黄芩五种药, 索氏提取效果比超声提取效果好; 对于生地榆和柯子, 超声提取效果比索氏提取效果好。

根据表 2~表 6, 发现水提效果明显不如醇提效果好, 于是生地榆和柯子只用了 70% 醇提的方法做药敏试验。

3.2 黄芩正交试验

表 9 结果表明: 第 3、7、9 号试验抑菌效果最好, 在以后的实验中可取用之。表 10 结果表明: 提取时中药与溶剂的比例(料液比)对抑菌效果的影响最为显著。

表2 五倍子中药提取物对12株病原菌体外抑杀菌的最低浓度
Table 2 MIC and MBC of *Rhus chinensis* Mill against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏水提(1)		索氏水提(2)		索氏醇提(1)		索氏醇提(2)		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	1.000	0.500	0.500	0.500	0.0625	0.0625	>2.000	>2.000	>2.000	2.000
G1-2	1.000	0.500	0.500	0.500	0.0625	0.0625	>2.000	>2.000	2.000	2.000
G1-5	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
G1-6	2.000	1.000	>2.000	>2.000	1.000	1.000	>2.000	>2.000	2.000	>2.000
Sh2-2	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.0625	0.0625	>2.000	>2.000	2.000	>2.000
Sh2-8	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
Sh2-9	>2.000	>2.000	2.000	>2.000	0.500	0.500	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
Sh2-11	2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.250	0.250	>2.000	>2.000	>2.000	>2.000
Sh2-12	2.000	>2.000	>2.000	>2.000	0.0625	0.0625	>2.000	>2.000	2.000	>2.000
Sh2-13	2.000	>2.000	2.000	1.000	0.500	0.500	2.000	>2.000	1.000	>2.000
S4-4	2.000	>2.000	2.000	2.000	0.500	0.500	2.000	>2.000	0.500	2.000
F3-4	2.000	>2.000	2.000	2.000	0.500	0.500	2.000	>2.000	1.000	2.000

表3 石榴皮中药提取物对12株病原菌体外抑杀菌的最低浓度
Table 3 MIC and MBC of *Punica granatum* Linn against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏水提(1)		索氏水提(2)		索氏醇提(1)		索氏醇提(2)		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	>12.000	3.000	6.000	6.000	3.000	0.750	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
G1-2	12.000	1.500	6.000	3.000	3.000	3.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
G1-5	3.000	>12.000	12.000	12.000	6.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
G1-6	>12.000	>12.000	12.000	12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	6.000	3.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-8	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-9	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-11	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-12	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	1.500	6.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-13	12.000	>12.000	6.000	12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
S4-4	12.000	>12.000	6.000	12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
F3-4	12.000	>12.000	6.000	12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000

表 4 大黄中药提取物对 12 株病原菌体外抑杀菌的最低浓度
Table 4 MIC and MBC of *Rheum palmatum* Linn against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏水提(1)		索氏水提(2)		索氏醇提(1)		索氏醇提(2)		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	12.000	12.000	6.000	12.000
G1-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	12.000	>12.000	6.000	12.000
G1-5	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	12.000	>12.000	12.000	12.000
G1-6	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000
Sh2-8	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-9	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-11	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-12	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-13	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	3.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
S4-4	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	12.000	12.000	6.000	12.000
F3-4	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	6.000	12.000	>12.000	12.000	12.000

表 5 虎杖中药提取物对 12 株病原菌体外抑杀菌的最低浓度
Table 5 MIC and MBC of *Rhizoma polygoni* Cuspidati against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏水提(1)		索氏水提(2)		索氏醇提(1)		索氏醇提(2)		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	>12.000	>12.000	MIC	MBC	12.000	1.500	>12.000	>12.000	12.000	12.000
G1-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	1.500	>12.000	>12.000	12.000	12.000
G1-5	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
G1-6	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-8	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-9	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-11	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-12	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000	>12.000	>12.000	12.000	>12.000
Sh2-13	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	6.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000
S4-4	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000	>12.000	>12.000	6.000	>12.000
F3-4	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	6.000	>12.000	>12.000	12.000	12.000

表6 黄芩中药提取物对12株病原菌体外抑杀菌的最低浓度
Table 6 MIC and MBC of *Scutellaria baicalensis* Georgi against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏水提(1)		索氏水提(2)		索氏醇提(1)		索氏醇提(2)		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	3.000	3.000	>12.000	>12.000	0.750	0.750	>12.000	>12.000	6.000	12.000
G1-2	3.000	3.000	>12.000	>12.000	0.750	0.750	>12.000	>12.000	6.000	12.000
G1-5	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	3.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000
G1-6	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	3.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000
Sh2-2	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	0.750	0.750	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-8	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	3.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000
Sh2-9	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	1.500	1.500	>12.000	>12.000	12.000	12.000
Sh2-11	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	1.500	1.500	>12.000	>12.000	6.000	12.000
Sh2-12	3.000	>12.000	>12.000	>12.000	3.000	1.500	>12.000	>12.000	6.000	12.000
Sh2-13	>12.000	>12.000	>12.000	>12.000	1.500	1.500	>12.000	>12.000	6.000	12.000
S4-4	3.000	3.000	>12.000	>12.000	1.500	3.000	6.000	>12.000	6.000	6.000
F3-4	3.000	3.000	>12.000	>12.000	1.500	3.000	>12.000	>12.000	6.000	12.000

表7 生地榆中药提取物对12株病原菌体外抑杀菌的最低浓度

Table 7 MIC and MBC of *Radix Sanguisorbae* against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏醇提		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	2.000	2.000	1.000	1.000
G1-2	2.000	2.000	1.000	1.000
G1-5	4.000	>4.000	2.000	2.000
G1-6	4.000	>4.000	2.000	2.000
Sh2-2	>4.000	>4.000	1.000	1.000
Sh2-8	>4.000	>4.000	4.000	4.000
Sh2-9	>4.000	>4.000	4.000	4.000
Sh2-11	>4.000	>4.000	2.000	2.000
Sh2-12	2.000	2.000	1.000	2.000
Sh2-13	4.000	4.000	2.000	2.000
S4-4	4.000	>4.000	2.000	2.000
F3-4	4.000	>4.000	2.000	2.000

表8 柯子中药提取物对12株病原菌体外抑杀菌的最低浓度

Table 8 MIC and MBC of *Terminalia chebula* Retz against the 12 pathogenic bacteria (mg/mL)

病原菌	索氏醇提		超声醇提	
	MIC	MBC	MIC	MBC
G1-1	2.000	>4.000	2.000	4.000
G1-2	>4.000	>4.000	2.000	4.000
G1-5	4.000	4.000	2.000	2.000
G1-6	4.000	>4.000	2.000	4.000
Sh2-2	>4.000	>4.000	4.000	4.000
Sh2-8	>4.000	>4.000	>4.000	>4.000
Sh2-9	>4.000	>4.000	4.000	4.000
Sh2-11	>4.000	>4.000	4.000	4.000
Sh2-12	4.000	>4.000	2.000	2.000
Sh2-13	4.000	>4.000	2.000	2.000
S4-4	4.000	>4.000	2.000	2.000
F3-4	4.000	>4.000	2.000	2.000

表 9 黄芩正交设计表及以 G1-1 菌为例的数据分析
Table 9 Orthogonal design table for *Scutellaria baicalensis* Georgi and data analysis using G1-1 bacteria as an example (mg/mL)

试验号	乙醇体积分数	料液比	提取时间	抑制 G1-1 菌浓度 (mg/mL)
1	1	1	1	6
2	1	2	2	6
3	1	3	3	0.75
4	2	1	2	6
5	2	2	3	6
6	2	3	1	1.5
7	3	1	3	0.75
8	3	2	1	6
9	3	3	2	0.75
T1	12.75	12.75	13.50	$\sum x = 33.75$
T2	13.50	18	13.75	$\sum x^2 = 183.9375$
T3	7.50	3	7.50	$C = 126.5625$
R	6	15	6.25	$SS_{总} = 57.375$
S	6.708	38.625	8.347	$S_{误差} = 3.695$

表 10 方差分析表
Table 10 Analysis of variance table (mg/mL)

方差来源	方差	自由度	均方	F 值
乙醇体积分数	6.708	2	3.354	8.1685
料液比	38.625	2	19.3125	47.0348
提取时间	8.347	2	4.1735	10.1644
误差	3.695	9	0.4106	

4 结 论

研究五倍子、石榴皮、虎杖、大黄、黄芩、生地榆、柯子等 7 种中药用不同方法提取的提取物单用对 12 种常见病原菌的抑制效果。7 种中药提取物单用对病原菌均有不同程度的抑制作用。其中, 醇提效果比水提效果好; 索氏一次醇提效果比二次醇提抑菌效果好; 索氏 70%醇提的五倍子的抑菌效果最好, 其次是索氏 70%醇提的黄芩和超声 70%醇提的生地榆和柯子。黄芩正交试验中, 选取索氏提取的方法, 当乙醇体积分数为 60%, 料液比为 12:1, 提取时间为 3 h,

表 11 黄芩正交设计试验结果
Table 11 Orthogonal design test results for *Scutellaria baicalensis* Georgi (mg/mL)

菌株	G1-1	G1-2	G1-5	G1-6	Sh2-2	Sh2-8	Sh2-9	Sh2-11	Sh2-12	Sh2-13	S4-4	F3-4	
1	MIC	6	3	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6
	MBC	6	6	6	6	6	6	6	6	12	6	6	6
2	MIC	6	6	6	6	6	3	3	3	3	3	3	3
	MBC	6	6	6	6	6	3	3	3	6	3	3	3
3	MIC	0.75	1.5	3	3	0.75	3	3	1.5	3	1.5	1.5	3
	MBC	0.75	1.5	3	3	0.75	3	3	3	3	1.5	3	12
4	MIC	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	3	3
	MBC	6	3	6	6	6	6	6	6	6	3	6	6
5	MIC	6	1.5	6	6	6	6	3	3	6	3	3	3
	MBC	6	6	6	6	6	6	3	3	12	3	3	3
6	MIC	0.75	1.5	3	3	0.75	3	3	1.5	3	1.5	1.5	3
	MBC	0.75	1.5	3	3	0.75	3	3	3	3	1.5	3	12
7	MIC	0.75	1.5	3	3	1.5	3	3	3	1.5	3	3	3
	MBC	1.5	1.5	3	3	3	3	3	3	12	3	3	3
8	MIC	6	6	12	6	12	12	6	6	6	6	6	6
	MBC	6	6	6	6	12	12	6	6	12	6	6	6
9	MIC	0.75	1.5	3	3	1.5	6	3	3	3	3	3	6
	MBC	1.5	3	6	3	3	6	3	3	6	3	3	6

和乙醇体积分数为 80%，料液比为 8:1，提取时间为 2 h 时黄芩提取物的抑菌效果最好。当乙醇体积分数为 80%，料液比为 12:1，提取时间为 2 h 时黄芩提取物的抑菌效果最差。所以，不是乙醇体积分数越大抑菌效果越好，也不是提取时间越长抑菌效果越好。要经过多次试验优化条件：(1)中草药抑菌活性成分提取：唐艳等^[15]报道了 12 种中草药的抑菌作用，结果表明 95%乙醇提取物的抑菌效果最强，比本实验以乙醇为溶剂的最佳抑菌浓度高，这可能是采用的提取方法不同造成的。(2)中药中的有效成分：聂颀蓉等^[16]报道了中药中多种有效成分对病原菌抑制作用的比较，发现没食子酸 > 槲皮素 > 黄芩苷 > 大黄酸 > 盐酸小檗碱 > 大黄素甲醚 > 1,8 - 二羟基蒽醌 > 甘草酸 > 芦荟大黄素 > 虎杖苷 > 苦参碱 > 芦丁，其中没食子酸、槲皮素、黄芩苷、大黄酸、盐酸小檗碱、大黄素甲醚等极为敏感。(3)鞣质类中药对病原菌产生抑制作用的原因：用中药防治鱼病在中国已有几千年的历史，积累了大量的临床实践经验。鞣质和鞣酸是大部分中药中的有效抑菌成分。鞣质可与蛋白质结合，使细胞内的蛋白质凝固，通过抑制细菌代谢酶的活性而发挥抑菌作用；鞣酸具有较强的酸性，可以改变细菌膜的通透性，促进细胞内外物质的交换，故鞣质类中药对病原菌均有抑制作用。鞣质类中药大黄的有效抑菌成分有大黄素和大黄酸，大黄素可以引起细菌 DNA 单链突变，造成 DNA 损伤，从而抑制细菌生长；大黄酸可以抑制细菌菌体糖和糖代谢中间产物的氧化和脱氢，并与 DNA 结合，干扰蛋白质的合成^[17,18]。(4)正交试验设计的应用：用正交试验得出的最优条件是相对于被选取的因素和水平而言的，切不可误解为绝对的最优^[19-23]。实际工作中往往要同时考虑几个试验指标的正交试验这些试验结果的分析较复杂一些，要综合考虑各指标的最优条件，权衡利弊，得出总的最优条件。另外，从理论上得出的最优条件应在实际工作中检验。

参考文献

- [1] 吕永辉, 王玉堂. 渔药中的中草药[J]. 中国水产, 2006, 7(7): 91-94.
Lv YH, Wang YT. Fishery drugs of Chinese herbal medicine [J]. Chin Aquat Prod, 2006, 7(7): 91-94.
- [2] 王文博, 汪建国, 李爱华 等. 中草药应用于水产养殖的研究概况[J]. 中国水产, 2006, 9(7): 60-61.
Wang WB, Wang JG, Li AH, et al. The general situation of the study of Chinese herbal medicine used in aquaculture [J]. Chin Aquat Prod, 2006, 9(7): 60-61
- [3] 陆文永, 王传慧, 常泰. 中草药在水产养殖中的实际应用[J]. 北京水产, 2006, 6(5): 54-55.
Lu WY, Wang CH, Chang T. Chinese herbal medicine in aquaculture application [J]. J Beijing Aquat Prod, 2006, 6(5): 54-55.
- [4] 韩娜. 中草药在防治鱼病中的应用[J]. 黑龙江水产, 2006, 11(4): 29.
Han N. Chinese herbal medicine in the prevention and control of the application of fish disease [J]. J Heilongjiang Aquat Prod, 2006, 11(4): 29
- [5] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科技出版社, 2002
Xiao CH. Chinese medicine chemistry [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002
- [6] 尹胜利, 浦益琼, 杨骏, 等. 中药鞣质成分的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2009, 12(1): 165-167
Yi SL, Pu YQ, Yang J, et al Chinese medicine research progress of tannic acid composition [J]. Chin J Med Guide, 2009, 12(1): 165-167
- [7] 胡小刚, 李继革, 郭书好. 鞣质分析研究进展[J]. 新疆中医药, 2001, 19(3): 781
Hu XG, Li JG, Guo SH. Tannins analysis research progress [J]. J Tradit Chin Med Xinjiang, 2001, 19(3): 781
- [8] 邢晶晶, 曹婷婷, 杨帆. 鞣质类化合物研究的进展情况[J]. 黑龙江医药, 2011, 24(5): 776-780
Xing JJ, Cao TT, Yang F. The progress of tannins compounds research [J]. Heilongjiang Med, 2011, 24(5): 776-780
- [9] Lee HB, JC, Lee SM. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspicic acids AB and PB, from *Dryopteris dryopteris crassirhizoma* [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(5): 655-659.
- [10] 李瑞, 白东清, 郭永军, 等. 9 种中草药及 17 种组方对迟钝爱德华菌的体外抑制试验[J]. 水利渔业, 2008, 28(7): 4
Li R, Bai DQ, Guo YJ, et al. 9 kinds of Chinese herbal medicine and 17 kinds of formula for slow Edward bacteria inhibition test in vitro [J]. Water Fish, 2008, 28(7): 4
- [11] 马玉哲, 张俊杰, 李红霞. 中药有效成分提取分离技术最新进展[J]. 河北理工大学学报: 自然科学版, 2009, 1:3
Ma YZ, Zhang JZ, Li HX. The latest progress in extraction and separation of Chinese medicine effective component [J]. J Hebei Univ Sci Technol: Nat Sci, 2009, 1: 3
- [12] 李忠琴, 关瑞章, 汪黎虹, 等. 中药对鳗鲡病原菌的体外抑制作用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(3): 306-311
Li ZQ, Guan RZ, Wang LH, et al. Traditional Chinese medicine in vitro inhibitory effect of eels pathogen [J]. J Hunan Agric Univ (Nat Sci Ed), 2011, 37(3): 306-311

- [13] 郭澄, 张纯, 林厚文, 等. 正交试验在中药制剂研究中的应用[J]. 时珍国医国药, 2000, 4(11): 360-362
Guo C, Zhang C, Lin HW *et al.* Orthogonal test in research in the application of TCM [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2000, 4(11): 360-362
- [14] 徐仲安, 王天保, 李常英, 等. 正交试验设计法简介[J]. 科技情报开发与经济 2002, 5(12): 148-150
Xu ZA, Wang TB, Li CY, *et al.* The orthogonal experiment design method introduction [J]. Intell Dev Sci Technol Econ, 2002, 5(12): 148-150
- [15] 唐艳, 张宾, 霍健聪, 等. 12 种中草药抑菌作用研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2012, 31(2): 147-152
Tang Y, Zhang B, Huo JC, *et al.* 12 kinds of Chinese herbal medicine bacteriostasis research [J]. J Zhejiang Ocean Univ: Nat Sci Ed, 2012, 31(2): 147-152
- [16] 聂颀蓉, 郑曙明, 仇登高. 12 种中药有效成分对 3 株水产致病菌体外抑菌试验[J]. 重庆水产, 2010, (3): 17-20
Ne LR, Zheng SM, Chou DG. 12 kinds of Chinese herbal medicine effective components of 3 strains aquatic pathogenic bacteria in vitro bacteriostasis experiment [J]. Chongqing Aquat, 2010, (3): 17-20
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
Chen Q. Traditional Chinese medicine pharmacology research methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [18] 张海晖, 裘爱泳, 刘军海, 等. 中药大黄提取物对几种畜禽致病菌的抑菌作用研究[J]. 饲料工业, 2004, 25(11): 24-26.
Zhang HH, Qiu AY, Liu JH, *et al.* Traditional Chinese medicine (TCM) to study the bacteriostatic action of rhubarb extracts of several animal pathogenic bacteria research [J]. J Feed Ind, 2004, 25(11): 24-26.
- [19] 乔树华, 蒋红云, 张燕宁, 等. 石榴皮抑菌活性物质的初步研究[J]. 农药, 2009, 48(4): 299-303.
Qiao SH, Jiang HY, Zhang YN, *et al.* Pomegranate rind bacteriostatic active substances of preliminary study [J]. J Pestic, 2009, 48(4): 299-303.
- [20] 姚敬明, 张李俊. 石榴皮、五倍子中鞣质的提取及测定试验[J]. 中兽医学杂志, 2004(3): 4-6.
Yao JM, Zhang LJ. Pomegranate husk, gallnut tannins in the extraction and determination of test [J]. J Vet Med, 2004 (3): 4, 6.
- [21] Sotohy SA, Muller W, Ismail AA. In vitro effect of Egyptian tannin-containing plants and their extracts on the survival of pathogenic bacteria [J]. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 1995, 102(9): 344-350.
- [22] 杨进, 陈建. 用正交试验法研制盐酸洛美沙星滴耳剂[J]. 中国医学杂志, 1997, 32(8): 477-479.
Yang J, Chen J. Developed by orthogonal experiment method maintain hydrochloride ear drops [J]. Chin J Med, 1997, 32(8): 477-479.
- [23] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9): 52-55
Liu RJ, Zhang YW, Wen CW, *et al.* The orthogonal experiment design and analysis method study [J]. Exp Technol Manag, 2010, 27(9): 52-55

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王万骞, 助理兽医师, 主要研究方向为动物及动物产品兽药残留检测。
E-mail: wangwq@tjciq.gov.cn