

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0226-06

五倍子分离组分抑制无乳链球菌的热动力学研究

郑梦珍,翟少伟,赖晓健,江兴龙,李忠琴*

集美大学水产学院,鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心,厦门市渔用药物工程技术研究中心

摘要:为了评价五倍子各分离组分对无乳链球菌的抑制作用,以期在实践中更高效地利用五倍子,本实验利用已优化过的乙酸乙酯-乙醇-水(5:1:5,v/v/v)分离溶剂体系,应用高速逆流色谱法分离五倍子各组分。通过微量热法检测五倍子粗提物和各分离组分对无乳链球菌 TN3L 的热力学作用,计算得出五倍子各分离组分对无乳链球菌的半数抑制浓度。研究表明,五倍子可分离出 5 个组分(W_1, W_2, W_3, W_4, W_5) ;组分 W_1 对无乳链球菌无抑制作用,五倍子粗提物及其他分离组分的 IC_{50} 分别为 2.229 4 mg/mL, 0.257 0 mg/mL, 0.668 7 mg/mL, and 0.175 0 mg/mL, 抑菌强度依次为 $W_2 < W_4 < W_3 < W_5 <$ 粗提物, 其中组分 W_5 和 W_3 抑菌效果明显, 推测 W_5 和 W_3 为五倍子对无乳链球菌的主要抑制成分。

关键词:五倍子;高速逆流色谱法;无乳链球菌 TN3L;微量热法;半数抑制浓度

中图分类号:S853.72

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.036

The Thermodynamic Study of the Extract from *Galla chinensis* on *Streptococcus agalactiae*

ZHENG Meng-zhen, ZHAI Shao-wei, LAI Xiao-jian, JIANG Xing-long, LI Zhong-qin *

Fisheries College of Jimei University, Engineering Research Centre of Eel Modern Industrial Technology,
Ministry of Education; Fishery Pharmaceutical Engineering and Technological Research Center of Xiamen

Abstract: In order to evaluate the inhibitory effect of *Galla chinensis* isolates on *Streptococcus agalactiae* and to utilize gallnut more effectively in practice, *Galla chinensis* was separated by using high-speed counter current chromatography (HSCCC), for which the optimal separation solvent system was confirmed to be ethyl acetate, ethanol and water (with a volume ratio of 5:1:5). The in vitro antibacterial effects of the crude extract and the separate components on the *Streptococcus lactis* TN3L was detected by microcalorimetry, and the half inhibitory concentration of the ingredients of the Chinese gall group on *Streptococcus lactis* was calculated to evaluate. The study shows that the Chinese gall can separate 5 components (W_1, W_2, W_3, W_4, W_5). The W_1 fraction had no inhibitory effect on *S. agalactiae* TN3L. The IC_{50} of W_2-W_5 fractions were found to be 2.229 4 mg/mL, 0.257 0 mg/mL, 0.668 7 mg/mL, and 0.175 0 mg/mL. The inhibitory effect of component W_5 and W_3 was obvious. W_5 and W_3 were deduced the main antibacterial fractions of *G. chinensis* on *S. agalactiae* TN3L.

Key words: *Galla chinensis*; HSCCC; *Streptococcus agalactiae* TN3L; microcalorimetry; half inhibitory concentration

在各类病害中,细菌性疾病仍是主要的问题,其中无乳链球菌不仅感染多种养殖鱼类,如尼罗罗非鱼、斑马鱼等^[1,2],而且还能感染人类和哺乳动物^[3,4],造成极大的经济损失。抗生素等化学药物虽是细菌性疾病的主要防治手段,但长期使用会出

现致病菌耐药性增强、药物残留、环境污染等问题,这使得人们不断寻求更加安全绿色的防治手段。我国中草药储备非常丰富,其中许多种类具有毒副作用小、抗病毒、抑菌、纯天然等优点,在治疗疾病中有显著的疗效,拥有广阔的开发前景^[5]。

五倍子是瘿绵蚜科蚜虫刺伤漆树科漆树属盐肤木的叶或叶柄而形成的囊状虫瘿。五倍子主要有效组分为鞣质、没食子酸等。其中鞣质是五倍子的主要组分,含量可达 60% ~ 70%^[6]。研究表明,五倍子具有抗菌、抗寄生虫、抗氧化、止泻等生物活性^[7-10]。五倍子是水产养殖中用于防治细菌性疾病

收稿日期:2018-02-11 接受日期:2018-11-27

基金项目:“十三五”国家海洋经济创新发展示范项目(16CZB020SF11),现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-46),花鳗鲡低碳养殖产业化关键技术研发与示范(2016N3002),鳗鲡现代产业技术教育部工程中心开放基金(RE201606, RE201607)

*通信作者 Tel:86-015859287619;E-mail:zhqinli@jmu.edu.cn

的重要药材。Jian Wu^[11] 和马玉和^[12] 的研究表明,五倍子对副溶血弧菌和单核细胞增生李斯特菌、迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌的生长均有明显抑制作用。中草药的成分复杂,在渔业病害防治工作中很难做到高效利用,因此,在开发新型高效的渔用药物过程中,对中药的活性物质进行分离和药效分析必不可少。

本实验采用高速逆流色谱法从五倍子粗提物中,分析及分离出五倍子活性组分^[13],分离五倍子的溶剂体系通过检测器时,其不同极性的组分会产生不同大小的信号,进而分离制备。采用了根据生物热动力学参数和热谱图比较分析药物药效作用的微量热法^[14],测定五倍子粗提物和各分离组分对无乳链球菌的体外抑制效果,表现为随时间变化所放出的全部热量,根据五倍子各组分对无乳链球菌的半数抑制浓度,筛选出具有较好抑制作用的五倍子组分,在制药过程中去除五倍子无效组分,提高药效,降低用药量,为渔用中药制剂在水产养殖中的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

五倍子(*Galla Chinensis*),购于福建铭远制药有限公司。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae* sp. TN3L)为本实验室分离鉴定保藏菌株。

1.2 仪器与试剂

无水乙醇(西陇科学股份有限公司,中国,批号170215),乙酸乙酯(西陇科学股份有限公司,中国,批号20170405);二甲基亚砜(国药集团化学试剂有限公司,中国,分析纯,批号170314);脑-心浸出液肉汤(广东环凯微生物科技公司,中国,批号3104034),琼脂粉(广东环凯微生物科技公司,中国,批号3204042)。

大容量高速冷冻离心机(北京昊诺斯科技有限公司,中国,RC-6 Plus型);超声波粉碎仪(南京先欧仪器制造有限公司,中国,X0DL-1000N);多样品平行蒸发仪(瑞士BUCHI,旋转蒸发仪R-215);分析型高速逆流色谱(上海同田生化技术有限公司,中国,TBE-20A);制备型高速逆流色谱(上海同田生化技术有限公司,中国,TBE-300B);离心浓缩仪(Labconco CentriVap,美国);灭菌锅(AUTOCLAVE,美国,G154DS型);酶标仪(Thermo Scientific,美国,

1510-00669C);生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,中国,LRH-250);微量热仪(Waters LC,美国,TAM III)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备五倍子粗提物

精确称取五倍子药粉(粒径约100目),以料液比1:5与70%乙醇进行混合,浸泡30 min后,在超声破碎仪下提取30 min,重复提取两次后于大容量高速冷冻离心机中3 000 rpm离心,取上清液用旋转蒸发仪在70 °C条件下蒸发获得浸膏。将所得浸膏烘干后研磨,得到五倍子醇提物药粉,4 °C保存备用。

1.3.2 HSCCC 分析和分离提取五倍子粗提物各组分

通过五倍子组分的结构性质和溶剂极性大小确定溶剂最佳分离体系为:乙酸乙酯-乙醇-水(5:1:5,v/v/v),可分离5个峰^[15]。使用分析型HSCCC(TBE-20A)测试并验证实验条件,记录并根据公式计算固定相保留率。

$$\text{固定相保留率} = (\text{色谱柱线圈体积} - \text{固定相被推出的体积}) / \text{色谱柱线圈体积}$$

利用分析型HSCCC的实验条件,将已确定的溶剂体系在制备型HSCCC上进行放大,将五倍子的不同组分分离提取出。将收集分离提取物蒸发干燥后保存备用。

1.3.3 微量量热法测定五倍子对无乳链球菌TN3L的生物活性

使用TAM III六通道微量热仪测定五倍子各组分及其粗提物对无乳链球菌的体外抑制作用。精确称取制备的五倍子醇提物及分离的五个组分药粉,选用1 mL 5% DMSO作为溶剂对其进行溶解。将六管已经过高压灭菌的安瓿瓶进行编号,在无菌条件下,向各安瓿瓶中分别加入液体培养基2.25 mL,并接种10⁷ CFU/mL的菌液100 μL;在编号为2~5管的安瓿瓶中加入不同体积的药液以制成具有浓度梯度的处理组,编号1和编号6管安瓿瓶分别设置为空白对照组和溶剂对照组,结束操作后密封。提前设置仪器工作温度为28 °C,后按编号将安瓿瓶分别放入微量量热仪的六个通道中,记录试验,得到关于细菌生长代谢的热功率随时间变化的关系(P-t)曲线。

1.3.4 细菌生长代谢受药物作用影响下的热动力学研究

微生物的指数生长期中产热功率Pt与速率常

数 k 之间存在如下关系式^[16]：

$$P_t = P_0 \exp(kt)$$

$$\text{或 } \ln P_t = \ln P_0 + kt$$

P_0 为细菌指数生长期起始点的热功率, t 为指
数生长期中某一对应的 t 时刻。

在热谱曲线上, 取指数生长期的一段 P_t 与 t 的
数值, 代入上述公式中, 并运用 Matlab 进行计算, 得
到 k 值, 再与药物浓度拟合成 k 与 c 的曲线方程。

为了定量描述各组分对细菌的抑制效果, 通常
定义抑制率 I 如下:

$$I = (k_0 - kc) / k_0 \times 100\%$$

k_0 为空白组安瓿瓶中菌株生长速率常数, kc 为
药浓为 c 时菌的生长速率常数。一定浓度下, 抑制
率 I 值越大, 表明抑菌能力越强, 当抑制率为 50%
时, 对应的药物浓度为半数抑制浓度 IC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 HSCCC 分离制备五倍子各组分

根据分析型 HSCCC 对五倍子组分的分离体系
研究, 结果表明, 体系乙酸乙酯-乙醇-水 (5:1:5, v/v)

v/v) 的分离效果良好, 在该体系下分离, 可得到五个
峰(图 1), 固定相保留率约为 36%, 满足逆流色谱的
分离要求。

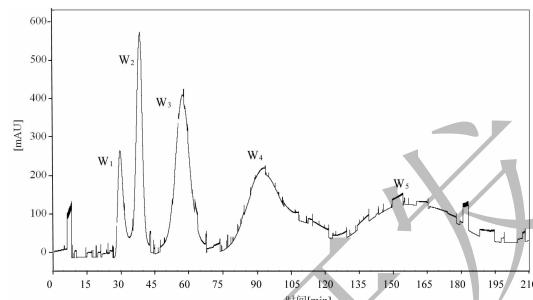


图 1 分析型 HSCCC 分离五倍子图谱

Fig. 1 Chromatogram of separating *Galla chinensis* by the analytical HSCCC.

依据分析型 HSCCC 的实验条件, 将确定溶剂体
系按比例扩大, 在制备型 HSCCC 上进行分离。图谱
见图 2, 详细的分离结果见表 1, 可看出该体系溶剂
在制备型 HSCCC 上也可以分离得到 5 个峰 (W_1 ~
 W_5)。

表 1 制备型高速逆流色谱分离五倍子各组分的分析结果

Table 1 Analysis of the separated components from *Galla chinensis* by the preparative HSCCC

峰名 Name of the peak	时间 Time (min)	峰高 Height of the peak (μV)	峰面积 Peak area	含量 Content (%)
W_1	102.707	672 617.313	347 450 080	8.381
W_2	203.840	723 098.625	1 685 356 800	33.652
W_3	430.373	638 719.875	1 993 208 224	41.079
W_4	673.040	762.178	219 034	1.218
W_5	923.907	1 793.500	24 668 743	15.670
总计 Total		1 314 616.850	4 036 503 881	100

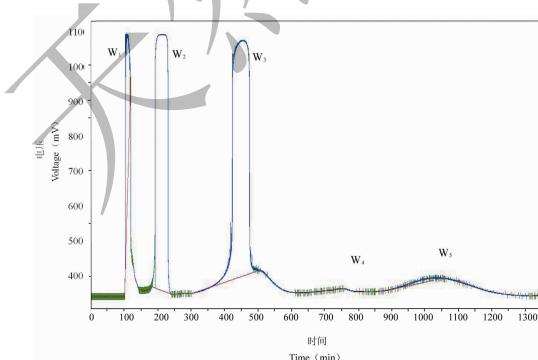


图 2 制备型 HSCCC 分离五倍子图谱

Fig. 2 Chromatogram of separating *Galla chinensis* by the preparative HSCCC.

2.2 五倍子分离组分对无乳链球菌 TN3L 的生物活性测定

表 3 为 TN3L 在不同药物浓度五倍子粗提物及
各分离组分作用下的微量热生长代谢热谱曲线, 从
各热谱图中正常代谢曲线 1 可以看出无乳链球菌
TN3L 的生长阶段分别为延滞期、指数生长期、稳定
期和衰减期。1 号空白对照组与 6 号溶剂对照组的
菌株生长曲线差异不大, 可知用于溶解五倍子的
5% 二甲基亚砜对无乳链球菌生长过程的影响不大,
因此影响菌株生长的因素只有药物浓度的大小。2-
5 号曲线为加入不同体积药液的生长曲线, 除组分

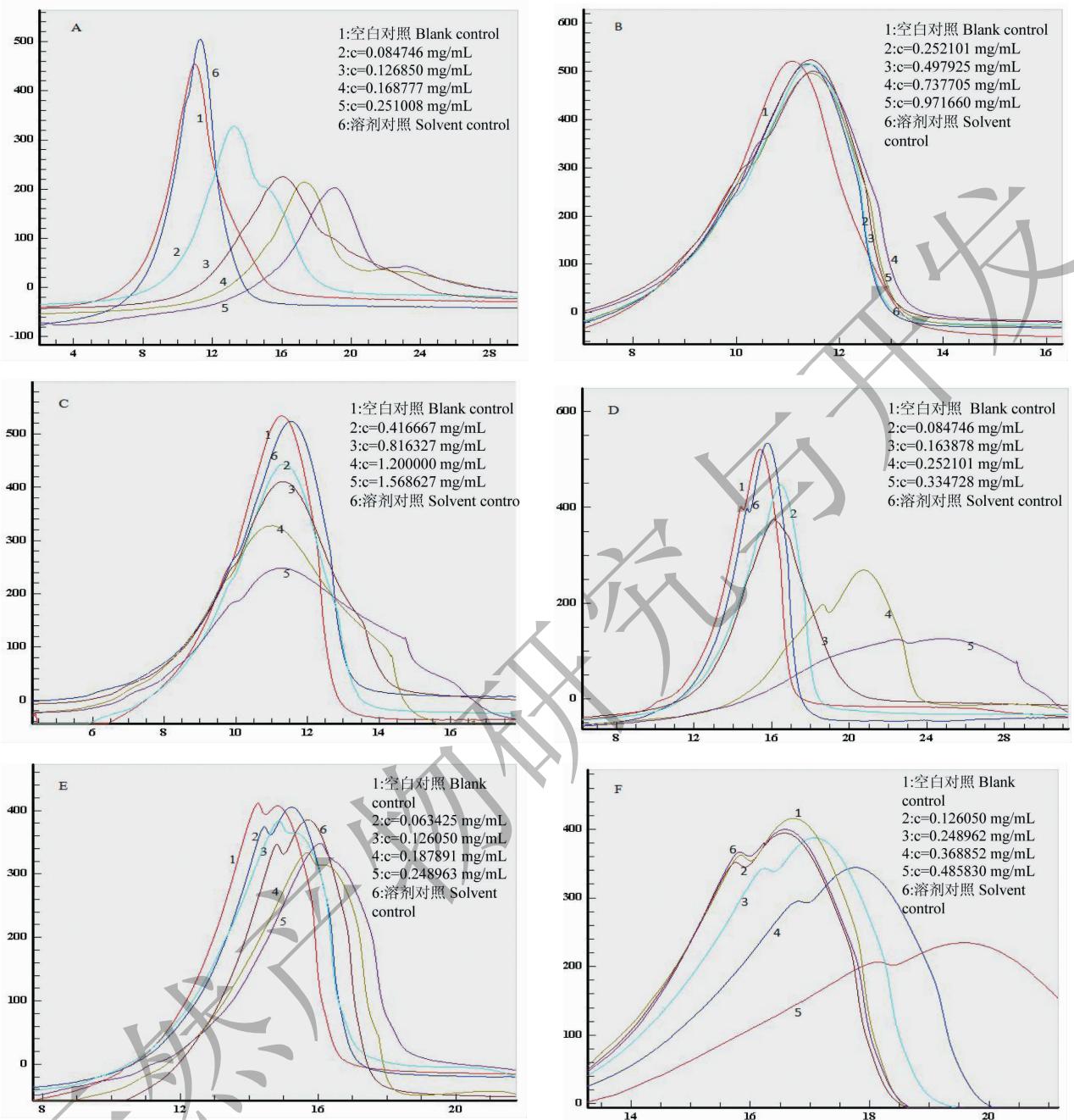


图3 TN3L在五倍子的各分离组分作用下,测得在不同浓度药液下的生长代谢热谱曲线

Fig. 3 The Power-Time curves of TN3L growth in the presence of the components from *Galla chinensis* at various concentrations

W_1 外,均表现出一定的差异性,曲线的指数生长期出现越晚, P_i 峰值越低,表明细菌的生长活力越低,药物对细菌的抑制效果越佳。取图中的各曲线指数生长期的 P_i-t 数据,按照 1.3.4 的计算方法,得出药液浓度与无乳链球菌 TN3L 生长速率 k 的拟合方程和半数抑制浓度(表 2)。由热谱图 B 可见,2-5 曲

线与 1、6 曲线基本重叠,且不能计算出半数抑制浓度,故五倍子组分 W_1 对 TN3L 没有抑制效果。根据计算出的 IC_{50} ,得出其他组分与粗提物的抑菌强度依次为 $W_2 < W_4 < W_3 < W_5 <$ 粗提物,其中组分 W_3 和 W_5 的抑菌效果明显,推测为五倍子对 TN3L 的主要抑菌组分。

表2 五倍子各主要分离组分浓度c与TN3L生长速率k的拟合方程及半数抑制浓度

Table 2 The relationship between the concentrations of the components separated from *Galla chinensis* and growth rate constant of TN3L, and the half inhibitory concentrations.

五倍子组分 Components of <i>Galla chinensis</i>	拟合公式 Fitting formula	相关系数 Correlation coefficient	IC ₅₀ (mg/mL)	热谱图 Power-Time curves
粗提物 Crude abstract	$k = 4.6657c^3 - 1.711c^2 + 0.1151c + 0.0097$	1.000	0.1234	A
W ₁	$k = -0.0009c^3 + 0.0014c^2 - 0.0006c + 0.0095$	1.0000	-	B
W ₂	$k = -0.0016c^3 + 0.0019c^2 - 0.0005c + 0.0094$	0.9636	2.2294	C
W ₃	$k = 0.2742c^3 - 0.1598c^2 + 0.0044c + 0.0095$	1.0000	0.2570	D
W ₄	$k = -0.0363c^3 + 0.0445c^2 - 0.0235c + 0.0134$	0.9980	0.6687	E
W ₅	$k = 0.1225c^3 - 0.0181c^2 - 0.0263c + 0.009$	0.9980	0.1750	F

3 讨论

本研究采用生物热动力学的方法初步探讨五倍子粗提物及其分离组分对无乳链球菌 TN3L 的抑菌效果,筛选出具有较好抑制作用的五倍子分离组分,为渔用中药制剂在水产养殖中的开发利用提供科学依据。在乙酸乙酯-乙醇-水(5:1:5, v/v/v)的溶剂分离体系下,固定相的保留率为36%,体系稳定且分离效果良好,符合实验要求,可以作为分离五倍子成分的溶剂体系进行制备。但是由于五倍子成分复杂,在应用HSCCC分离组分时,极性相似的物质在该体系下可能无法有效分开。通过微量热法检测五倍子各分离组分对无乳链球菌 TN3L 的具体作用,发现在同一分离组分水平上,药物浓度越高,细菌的生长代谢热谱曲线越平缓,生长速率常数k值越低,即药物抑菌作用越强。在不同药物水平上,药物对菌株的半数抑制浓度越低,抑菌效果越好。TN3L 在五倍子分离组分 W₁ 的处理下生长趋势没有明显变化,说明 TN3L 对五倍子组分 W₁ 不敏感,而组分 W₂ 的抑菌效果远低于 W₃-W₅,抑菌效果不佳,其他3个成分均对 TN3L 存在明显的抑制作用,根据 IC₅₀的结果,组分 W₃ 和 W₅ 的抑菌效果极明显,尤其是组分 W₅,接近于粗提物,推测 W₃ 和 W₅ 为五倍子对 TN3L 的主要抑菌组分,在粗提物中 W₃-W₅ 表现出相互促进的作用,抑菌效果比组分单独使用要好。因此,在配伍五倍子的实际应用中,可以适当剔除 W₁ 和 W₂ 组分,保留 W₃-W₅,保留率约为58%,以达到减少用药量,有效地进行疾病防治,降低养殖成本的目的。

参考文献

- 1 Saad MZ, Amal MN, Abdullah SZ, et al. Control and prevention of Streptococcosis in cultured tilapia in Malaysia: a re-

view [J]. *JTAS*, 2014, 37: 389-410.

- Patterson H, Saralahti A, Parikka M, et al. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2012, 38: 447-455.
- Chen M, Wang R, Luo FG, et al. *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human and cow are able to infect tilapia [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 180: 129-135.
- Ren SY, Geng Y, Wang KY, et al. *Streptococcus agalactiae* infection in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2014, 61(6): 92-95.
- Wang QK, Chen CX, Guo YJ, et al. Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus* [J]. *Aquacult Int*, 2011, 19: 945-956.
- Lin QS (林启寿). The Chemical Components of Chinese Herbal Medicine [M]. Beijing: Science Press, 2007: 168-172.
- Ho TY, Lo HY, Li CC, et al. *In vitro* and *in vivo* bioluminescent imaging to evaluate anti-*Escherichia coli* activity of *Galla Chinensis* [J]. *BioMedicine*, 2013, 3: 160-166.
- Zhang QZ, Xu DH, Klesius PH. Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. *Vet Parasitol*, 2013, 198 (1-2): 45-53.
- Sun ZW, Eunson HW, Lee HJ, et al. Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice [J]. *J Nat Med*, 2015, 69: 22-34.
- Chen JC, Ho TY, Chang YS, et al. Anti-diarrheal effect of *Galla Chinensis* on the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and ganglioside interaction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 103: 385-391.
- Wu J, Jahncke ML, Eifert JD, et al. Pomegranate peel(*Punica granatum L*) extract and Chinese gall(*Galla chinensis*) extract inhibit *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* on cooked shrimp and raw tuna [J]. *Food Control*, 2016, 59: 695-699.

(下转第 120 页)