

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00057

复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究

郑曙明 黄建军 吴青 沙莎

(西南大学鱼类繁育与健康养殖研究中心, 重庆 402460)

摘要: 对渔用抗菌剂复方五倍子有效成分进行薄层色谱与柱层析分离检测, 以鉴定出复方中的各种有效成分; 选用几种水产动物常见致病菌进行体外抑菌和联合用药试验, 以确定各有效成分抑菌活性强弱和各成分间的药物关系, 为分析复方五倍子抗菌剂的药物作用机理奠定理论基础, 并为其质量控制提供参考依据。用薄层析硅胶 GF254 制板, 以苯:乙醇:甲酸(7:3:1)为展开剂, 用氨熏-三氯化铁显色, 日光下观察层析结果; 通过干法装柱, 以苯:乙醇:甲酸(7:3:1)作为洗脱液进行洗脱, 分离得到各单体, 参照理化性质分析及薄层分析, 鉴定出复方五倍子抗菌剂总有效成分。结果表明: 复方五倍子抗菌剂有效成分为鞣质、没食子酸、槲皮素、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素和 1,8-二羟基蒽醌, 其中没食子酸含量最大, 紫外分光光度法测定为 10.47%。用复方的各有效成分分别对温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、迟缓爱德华菌和柱状黄杆菌进行抑菌试验, 以温和气单胞菌为菌种将复方主要有效成分两两配对进行体外联合抑菌试验, 得出复方五倍子各有效成分抑菌活性顺序为: 没食子酸>蒽醌(含 1,8-二羟基蒽醌、大黄素、芦荟大黄素)>黄芩苷>槲皮素>鞣质。没食子酸和蒽醌具有协同作用, 没食子酸和黄芩苷、没食子酸和槲皮素、蒽醌和黄芩苷三组同属于累加作用。

关键词: 复方五倍子; 有效成分; 薄层层析; 柱层析; 抑菌活性

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0057-08

近年来许多专家学者开展了中草药防治水产动物疾病的系列研究, 得出蒲公英、连翘、山楂、穿心莲能有效抑制嗜水气单胞菌、金黄色葡萄球菌的生长, 而对枯草芽孢杆菌影响较小^[1]; 甘草粗提物对鲫血清杀灭 *Aeromonas hydrophila* 菌起到了很好的促进作用^[2]; 测定了 10 种中草药沸水提取物的抗菌活性和最低抑菌浓度, 结果表明五倍子、黄柏、大黄、野菊抑菌性强, 抑菌效果好, 缺点是药力减退快^[3]; 研究了五倍子对 3 种致病菌的体外抑菌和急性毒性试验, 得出五倍子具有较强的抑菌杀菌效果, 安全浓度为 0.1102 g/kg^[4]; 进行五倍子对鲤鱼细菌性败血症的药效研究, 发现用温和气单胞菌攻毒后其预防组和治疗组死亡率较对照组降低^[5]。复方五倍子抗菌剂是根据中兽医理论、中药药理学原理和单味中药的中药学特性, 由本课题组通过体外抑菌

和药效学试验相结合, 组方出的以五倍子、大黄和黄芩等组成的渔用抗菌中药复方, 其中五倍子为君药。进行复方五倍子的热稳定性研究, 得出采用超声法制备其口服液的有效期为 82d^[6]。中药复方有效成分是其发挥治疗作用的物质基础, 但因其成分复杂, 分析难度大, 研究十分薄弱, 尚未见有关渔用抗菌中药(单、复方)有效成分分离鉴定和中药有效成分联合抑菌作用的研究报道。为此本文对复方五倍子抗菌剂有效成分进行薄层色谱(TLC)与柱层析分离检测, 选用几种水产动物常见致病菌进行体外抑菌和联合用药试验, 以分离鉴定出复方中的各种有效成分, 确定各有效成分抑菌活性强弱和各成分间的药物关系, 为分析复方五倍子抗菌剂的药物作用机理奠定理论基础, 并为其质量控制提供参考依据。

收稿日期: 2008-06-02, 修订日期: 2009-03-16

基金项目: 重庆市教育委员会自然科学基金(KJ070618)资助

通讯作者: 郑曙明(1957—), 女, 江苏南京人; 教授, 硕士; 主要从事水产动物疾病研究。Tel: 023-46751115; E-mail: zhsm22@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

中药材和标准品 五倍子、大黄、黄芩购自四川省中医药研究所; 没食子酸、1,8-二羟基蒽醌、大黄素、芦荟大黄素、黄芩苷、槲皮素等标准品购于中国药品生物制药检定所。

试验菌种 柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 购自中国科学院水生生物研究所; 温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、豚鼠气单胞菌 (*A. caviae*) 和迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 由西南大学荣昌校区微生物教研室分离鉴定。

培养基 用牛肉膏(5 g)、氢氧化钠(5 g)、蛋白胨(10 g)配制普通培养基, 用于温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌和迟缓爱德华菌的培养。用胰胨(0.5 g)、醋酸钠(0.2 g)、牛肉浸出粉(0.2 g)、酵母膏(0.5 g)配制胰胨培养基, 用于柱状黄杆菌的培养。煮沸药品, 使各成分充分溶解, 冷却至常温后, 用一定浓度的氢氧化钠和盐酸调整 pH 为 7.6—7.8。固体培养基则加入琼脂 1.5%, 以 115℃ 灭菌 30min。

1.2 方法

样品液的制备 总有效成分样品液的制备: 称取 2 g 复方五倍子抗菌剂粗粉置于索氏提取仪中, 加 70% 的乙醇 16 mL, 用盐酸调节 pH 为 2, 76℃ 回流提取 90min, 提取 3 次, 合并提取液, 挥发至无醇味, 滤液加水至 100 mL, 摇匀, 取出, 室温下用无水乙醚萃取 3 次, 合并萃取液, 并于通风处挥发乙醚, 剩余结晶物质用无水乙醇溶解定溶到 10 mL, 既为样品液。单方五倍子、大黄和黄芩样品液的制备同复方。

各单体成分样品液的制备: 用上法制备的复方样品液通过柱层析方法得到各单体成分, 合并相关成分, 水浴蒸发溶剂, 得到各结晶单体, 后用蒸馏水溶解, 合并相关单体, 加蒸馏水定溶到 10 mL, 得到蒽醌样品液(包含 1,8-二羟基蒽醌、大黄素、芦荟大黄素)、黄芩苷样品液、槲皮素样品液、没食子酸样品液、鞣质样品液。高温灭菌, 置于 4℃ 冰箱中保存, 备用。

菌液的制备: 在普通液体培养基中接种温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌和迟缓爱德华菌, 在胰胨液体培养基中接种柱状黄杆菌。将接种好的各培养皿置于 35℃ 恒温箱中培养 24h, 通过比浊法, 用无菌 0.9% 氯化钠溶液配成 1.5 亿/mL 菌液, 低温保存

备用。

复方有效成分的薄层分析 取各单方样品液进行薄层分析, 对比复方样品 R 值判断有无新物质产生和消失。取复方提取液进行薄层分析, 对比复方中各样品点和标准品 R 值确定样品成分。

薄板的制备: 选用 10 cm×20 cm 的薄层分析用玻璃板, 用洗液浸泡, 洗净, 烘干, 铺板于 939 全自动薄层制板器上, 用前用 95% 乙醇擦拭一遍。称取硅胶 GF254 15 g 放入研钵中, 加适量 0.5% 的羧甲基纤维素钠研匀, 调成稀糊状后在薄层制板器上铺板, 厚度为 0.3 mm, 晾干, 后于 110℃ 活化 0.5h, 放入干燥器中备用。

点样: 底边 2 cm 的平行线上确定点样点, 相距 1.5 cm 左右从左到右依次点取样品。微量点样器轻轻接触硅胶板面, 形成的点样点直径不超过 2—3 mm, 点样后样品自然风干,

层析: 用苯、乙醇、甲酸、乙酸乙酯、吡啶的不同药物和比例组合出 9 种展开剂, 最后选用效果最好的薄层展开剂, 即苯: 乙醇: 甲酸(7: 3: 1)。将展开剂加入展层缸 20 mL, 摇匀。在层析缸的四壁贴上浸有层析剂的滤纸, 饱和层析缸。将薄板有样品的一端放入层析缸中, 稍倾斜, 盖好层析盖, 室温下上行展层。当展层剂距薄板前沿 1—2 cm 时停止层析, 取出薄板, 标记展层前沿, 自然风干。

显色: 氨熏-三氯化铁显色。用浓氨水喷撒薄层板, 然后再用 1% 三氯化铁乙醇溶液喷撒薄层板, 在日光下显色, 显色后测量各成分点的比移值 R_f。

柱层析分离复方有效成分 样品制备: 取复方粉末 2.0 g, 同上法制备, 保留结晶样品备用。

装柱: 干法装柱, 取约 30 g 的柱层析硅胶, 用漏斗装入柱层析管, 同时不停地轻敲柱壁, 以使装柱均匀, 备用。

上样: 取制备好的干燥样品, 加入 2.0 g 的柱层析硅胶, 用配好的洗脱剂溶解, 然后放入烘箱干燥, 干燥好的样品硅胶用漏斗装入柱层析管, 并在其上再塞一团棉花防止样品漂浮。

洗脱: 用前面选择出的薄层展开剂, 即苯: 乙醇: 甲酸(7: 3: 1)为洗脱剂洗脱。

收集: 用自动收集仪收集, 每间隔一分钟收集一个样品, 且用 TLC 跟踪检测, 同时合并相同斑点的洗脱液。

体外抑菌试验 各成分的抑菌试验: 用无菌棉签把浓度为 1.5 亿/mL 的温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌和迟缓爱德华菌液均匀涂布于普通固体培养基上, 把柱状屈挠杆菌涂布于固体胰酪培养基上, 然后用直径为 6 mm 的无菌圆形玻璃管打孔, 用微量移液器吸取药液 30 μ L 注入孔中。再将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24h, 取出观察, 用卡尺测量抑菌圈的直径。取重复 3 次的平均值。

联合药敏试验: 用无菌棉签把浓度为 1.5 亿/mL 的温和气单胞菌液均匀涂布于普通固体培养基上, 然后用直径为 6 mm 的无菌圆形玻璃管打孔在固体培养基上并排打孔, 用微量移液器吸取各成分对应药液 30 μ L 注入孔中。再将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 24h, 取出观察联合用药后两成分抑菌环交界处形状。两药抑菌交界区平直为协同作用, 两药抑菌交界区钝角为累加作用, 两药抑菌交界角尖锐为无关作用, 两药抑菌区交界呈切割状为拮抗作用。

2 结 果

2.1 有效成分的薄层分析

如图 1 所示, 从各单方样品点中可以看出五倍子中主要有 3 个成分显现, 大黄也是 3 个成分显现, 而黄芩只有一个成分显现, 并且所有单方成分都能在复方中找到所对应成分点。复方成分除了单方所表达的成分外没有新成分点出现, 说明本提取工艺能够很好的提取出复方中各成分, 并且薄层分析图谱中所分析到的成分能够代表复方的主要成分。

如图 2 所示, 标准品和复方样品液薄层分析中, 能够很好的分离各成分, 并且各斑点清晰, 标准品和复方各成分点所对应的 R 结果一致, 符合 TLC 分析中成分判断标准。按 R 值大小排列分别为鞣质、没食子酸、槲皮素、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素和 1,8-二羟基蒽醌。并且从斑点颜色深浅和大小可以看出没食子酸所含份量最大。

2.2 柱层析分离鉴定复方有效成分

复方五倍子抗菌剂有效成分选用硅胶柱层析分离, 苯: 乙醇: 甲酸(7: 3: 1)为其洗脱剂洗脱, 能很好的分离开各成分。用自动收集仪每间隔 1min 收集一个样品, TLC 跟踪检测, 共收集到 93 个样品(图 3)。A-G 是标准品, 对比可知样品 1—11 是 1,8

二-羟基蒽醌、12—15 是大黄素、17—21 是芦荟大黄素、24—30 是黄芩苷、33—47 是槲皮素、49—77 是没食子酸、80—93 是鞣质。从收集的量比较没食子酸最多, 这与复方薄层分析中各成分斑点大小反映的含量大小相符合。

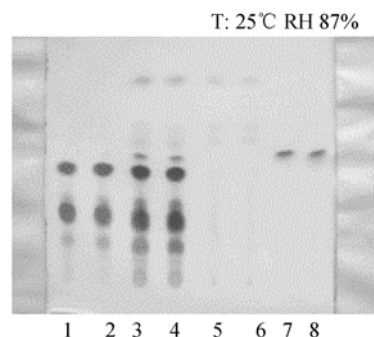


图 1 各单方和复方 TLC 图谱

Fig. 1 The singles and the compound TLC chart

1, 2. 五倍子; 3, 4. 复方五倍子; 5, 6. 大黄; 7, 8. 黄芩
1, 2. Chinese nutgall; 3, 4. Chinese compound nutgall; 5, 6. Rhubarb; 7, 8. Scutellaria

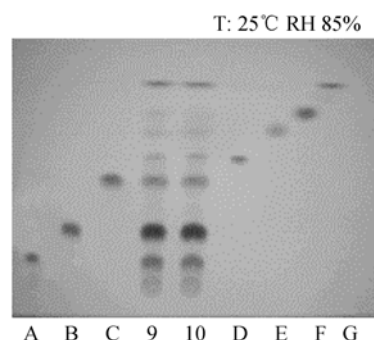


图 2 复方五倍子 TLC 图谱

Fig. 2 Chinese compound nutgall TLC chart

A. 鞣质; B. 没食子酸; C. 槲皮素; D. 黄芩苷; E. 芦荟大黄素; F. 大黄素; G. 1,8-二羟基蒽醌
A. Tannins; B. Gallic acid; C. Quercetin; D. Baicalin; E. Aloe emodin; F. Emodin; G. 1,8-2 Hydroxy anthraquinone

2.3 各有效成分的体外抑菌活性

体外抑菌环大小(表 1)。结果表明: 复方五倍子抗菌剂中的蒽醌、黄芩苷、槲皮素和没食子酸对温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、迟缓爱德华菌和柱状屈挠杆菌均有抑制作用, 其中迟缓爱德华菌最敏感, 豚鼠气单胞菌耐药性最强。各有效成分中没食子酸的抑菌活性最强, 蒽醌略强于黄芩苷, 而鞣质没有抑菌环出现, 并且总有效成分的抑菌活性又分别大于各单体成分(图 4、5)。复方五倍子各有效成分抑菌活性顺序为: 没食子酸>蒽醌(包含 1,8-二羟基蒽醌、大黄素、芦荟大黄素)>黄芩苷>槲皮素>鞣质。

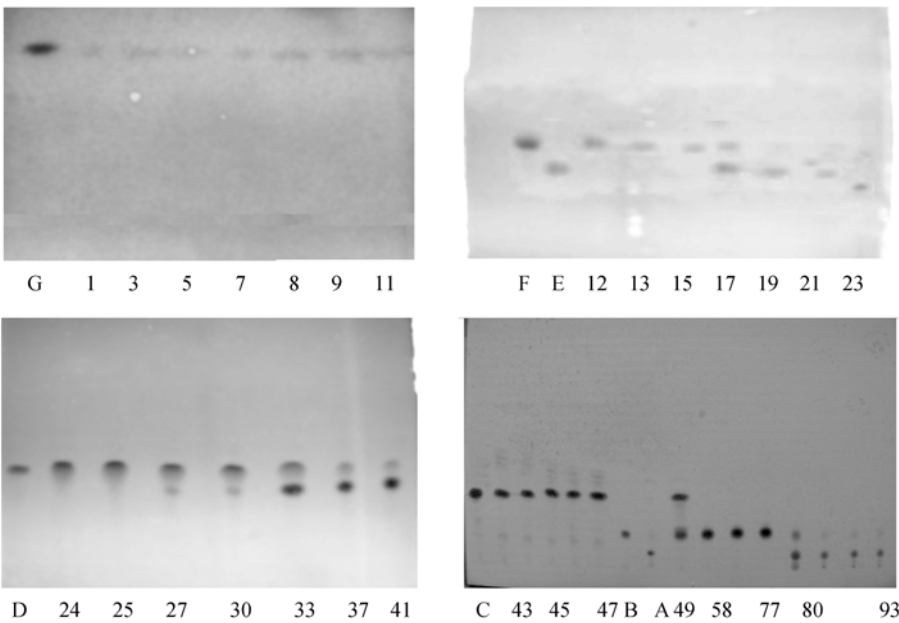


图 3 柱层析分离各管样品的 TLC 检测结果

Fig. 3 Result of the separation samples by column chromatography with TLC detection

- G. 标准品的 1,8-二羟基蒽醌

D. 标准品的黄芩苷

C. 标准品的槲皮素

B. 标准品的没食子酸

A. 标准品的鞣质

G. Standard 1,8-2 hydroxy anthraquinone

D. Standard baicalin

C. Standard quercetin

B. Standard gallic acid

A. Standard tannins
- 1—11. 分离样品的 1,8 -二羟基蒽醌

24—30. 分离样品的黄芩苷

37—47. 分离样品的槲皮素

49—77. 分离样品的没食子酸

80—93. 分离样品的鞣质

1—11. Separation sample 1, 8-2 hydroxy anthraquinone

24—30. Separation sample baicalin

37—47. Separation sample quercetin

49—77. Separation sample gallic acid

80—93. Separation sample tannins

表 1 复方五倍子抗菌剂各有效成分的抑菌作用

Tab. 1 Antibacterial action of the effective components of Chinese compound nutgall

菌种 Germ	抑菌圈 Antibacterial ring (mm)					复方五倍子 Chinese compounds nutgall
	蒽醌 Anthraquinone	黄芩苷 Quercetin	槲皮素 Quercetin	没食子酸 Gallic acid	鞣质 Anthraquinone	
温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobria</i>	18	16	10	28	0	30
豚鼠气单胞菌 <i>Aeromonas caviae</i>	16	15	8	25	0	28
迟缓爱德华菌 <i>Edwrdsieda tarda</i>	20	18	13	30	0	35
柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	17	17	10	26	0	30

2.4 各有效成分联合用药效果

没食子酸和蒽醌联合抑菌结果：没食子酸和蒽醌联合抑菌区交界处出现平直现象(图 6)，表明没食子酸和蒽醌联合用药有协同作用。

没食子酸和黄芩苷联合抑菌结果：没食子酸和黄芩苷联合抑菌区交界出现钝角现象(图 7)，表明没

食子酸和黄芩苷联合用药有累加作用。

没食子酸和槲皮素联合抑菌结果：没食子酸和槲皮素联合抑菌区交界出现钝角现象(图 8)，表明没食子酸和槲皮素联合用药有累加作用。

蒽醌和黄芩苷联合抑菌结果：蒽醌和黄芩苷联合抑菌区交界出现钝角现象(图 9)，表明蒽醌和黄芩

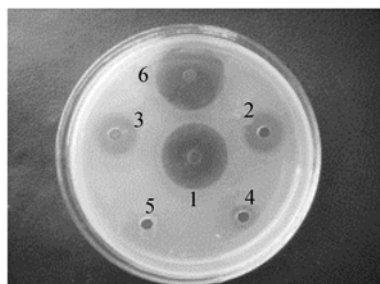


图 4 复方五倍子各成分对温和气单胞菌抑菌效果

Fig. 4 Antibacterial effect of the components of Chinese compound nutgall to *Aeromonas sobria*

1. 没食子酸; 2. 蒽醌; 3. 黄芩苷; 4. 槲皮素; 5. 鞣质; 6. 复方五倍子; 7. 五倍子

1. Gallic acid; 2. Anthraquinone; 3. Baicalin; 4. Quercetin; 5. Tannins; 6. Chinese compound nutgall; 7. Chinese nutgall; the same as follows

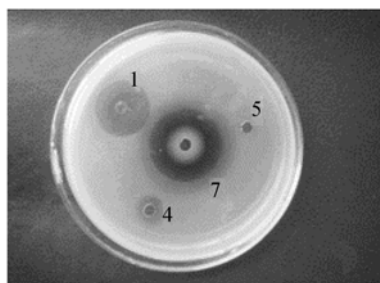


图 5 五倍子各成分对温和气单胞菌抑菌效果

Fig. 5 Antibacterial effect of the components of Chinese nutgall to *Aeromonas sobria*

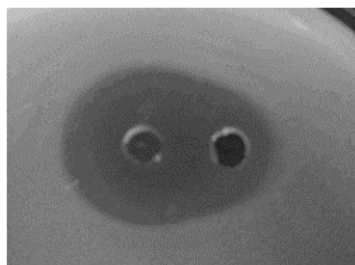


图 6 没食子酸和蒽醌联合抑菌结果

Fig. 6 Antibacterial result of gallic acid and anthraquinones

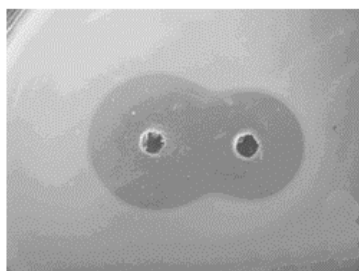


图 7 没食子酸和黄芩苷联合抑菌结果

Fig. 7 Antibacterial result of gallic acid and baicalin

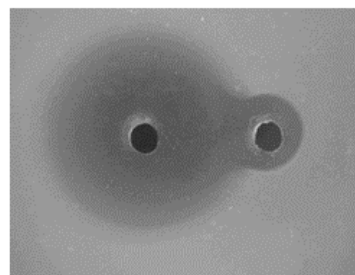


图 8 没食子酸和槲皮素联合抑菌结果

Fig. 8 Antibacterial result of allic acid and quercetin

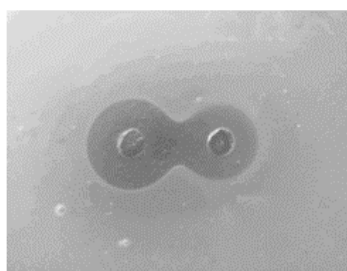


图 9 蒽醌和黄芩苷联合抑菌结果

Fig. 9 Antibacterial result of anthraquinones and baicalin

苷联合用药有累加作用。

3 讨 论

3.1 复方五倍子抗菌剂有效成分及作用机理分析

中药的药理活性与其有效成分密切相关, 研究发现中药的主要有效成分是生物碱、黄酮类、蒽醌类、挥发油、活性多糖、有机酸等^[8]。抑菌试验显示复方五倍子抗菌剂有效成分为鞣质、没食子酸、槲皮素、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素和 1,8-二羟基蒽醌。薄层分析表明复方五倍子中的没食子酸、鞣质和槲皮素均来源于五倍子, 因在其单方和复方中都检验出这几种有效成分。五倍子乙醇提取物对金黄色葡萄球菌(84 株 MRSA 和 28 株 MSSA)具有较强的抑菌活性^[9], 比较抑菌效果可见没食子酸为五倍子(单、复方)中最主要的有效成分, 经测定复方五倍子抗菌剂中没食子酸的含量达到 10.47%, 没食子酸具有抑菌、抗病毒, 清除自由基和抗氧化作用。五倍子鞣质亦称鞣酸, 根据鞣质的结构可分为水解鞣质和缩合鞣质两类, 水解鞣质具有甙式或酯式, 大多数由没食子酸或其衍生物与葡萄糖结合而成, 糖上的每一个羟基都与没食子酸上的羟基结合成酯, 可被酸、碱、酶水解^[8]。本试验中鞣质的抑菌环直径为零, 表明五倍子的水解鞣质可能无抑菌作用。

当提取过程中鞣质用酸水解时,可以分解出糖与没食子酸,因而使其表现出抑菌效果。

复方五倍子抗菌剂中其次的主要有效成分是黄酮类中的槲皮素和黄芩苷,黄芩苷的抑菌效果大于槲皮素,分离出的槲皮素来源于五倍子,黄芩苷来源于复方中的黄芩,黄酮类含量占复方的 4.2%。进行槲皮素等 28 种中药成分对 8 种口腔致病菌抑制作用的筛选实验^[9],表明松萝酸和槲皮素有较强的抑菌作用,槲皮素的 MIC 值在 0.3125—0.125 mg/mL 之间。黄芩苷与羟氨苄青霉素合用能有效提高对耐青霉素酶金黄色葡萄球菌的抗菌效价^[10],黄芩苷减轻金黄色葡萄球菌外毒素诱发的病理损害可能是通过阻断细胞的信号通讯通路而发挥作用^[11]。在复方五倍子和大黄中都检测出 1,8-二羟基蒽醌、大黄素、芦荟大黄素三种蒽醌类的有效成分,蒽醌类含量占复方的 1.51%,其抑菌效果大于黄芩苷。大黄的抗菌活性成分主要是蒽醌衍生物,其机制可能是它与 DNA 结合抑制了 DNA 和蛋白质的结合,从而抑制细菌生长^[12]。大黄素能使肝细胞损伤减轻,其机制可能是通过抑制肝星状细胞的活化与增殖^[13]。采用本工艺条件分离鉴定出复方五倍子中各有效成分在保证其药效的物质基础,此薄层分析结果能够用于复方五倍子抗菌剂定性检测的质量控制。

中药有效成分间的药物关系还少有报道。松萝酸和槲皮素联用时对表皮葡萄球菌有协同抑制作用,对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌、乙型链球菌、变形链球菌有相加抑制作用^[9]。本试验是在提取复方有效成分基础上通过柱层析分离得到的单体有效成分,再通过两两配对联合抑菌,研究其对水产动物病原菌的抑菌活性。结果显示两药合用后其抑菌能力较单一成分发生显著变化,这些变化与药物配伍有明显关系,可能还与药物之间的化学反应以及各成分不同抑菌作用有关。药液配对的不同显示了不同的联合作用,其中没食子酸和蒽醌配对联合抑菌出现了协同作用,没食子酸和槲皮素、没食子酸和黄芩苷以及蒽醌和黄芩苷分别配对联合抑菌均出现了累加作用,各成分间未出现拮抗作用。由此,显示了复方五倍子抗菌剂组方的合理性,为复方药效的更好发挥提供了理论依据。

3.2 薄层色谱分析条件的确定

关于薄板的制备,我们比较了匀浆器和研钵混和吸附剂与黏合剂的效果,结果发现采用匀浆器混

匀吸附剂与黏合剂的效果很差,其原因是吸附剂与黏合剂凝固过快,匀浆器无法及时混合吸附剂与黏合剂;相对而言采用研钵能较好的混匀吸附剂与黏合剂,薄层制板效果也较好,因此建议薄层制板时最好选择研钵混匀吸附剂与黏合剂。有人提出中药薄层分析中选用薄板厚度为 5 mm 和 4 mm,但我们在试验中发现薄板太厚影响展开速度,容易拖尾,选用厚度 3 mm 能够加快展开速度并且各成分更容易展开。

薄层层析是一种使化学组分在两相间进行微分配分离法,两相中一相为固定相,另一相为转移介质^[14]。关于展开剂的确定,在试验预试阶段,参考有关资料选取了多种展开剂进行比较^[15]。发现选用苯:乙醇:甲酸(7:3:1)作为展开剂分离复方五倍子提取物效果最好,在此条件下其薄层色谱斑点清晰,展开速度较快,成分分离完全。用苯或乙醇单一溶剂分离效果不好,展开速度慢、各成分分不开;用苯:吡啶(7:3)或乙酸乙酯(7:3)药物不能完全分开,斑点少,拖尾严重,效果不好;用不同比例的苯:乙醇(分别为 1:1、6:4、7:3)作展开剂,恩醌随着苯的比例增加斑点分开更加明显,但其他成分依旧拖尾,效果也不好;用苯:乙醇:甲酸(分别为 7:3:1 和 7:3:0.5)时混合溶剂比例不同,效果也不同,从最佳分离效果的展开剂苯:乙醇:甲酸(7:3:1)中可以看出展开剂极性偏小但酸性较强,这可能是和复方五倍子成分极性以及薄层层析特性有关。

在薄层层析中,药物的分离取决于各成分在固定相中的迁移速度,在选择固定相与流动相时,必须考虑被分离药物的成分、固定相、流动相三者的极性大小,合理处理三者的关系。若固定相、被分离物质极性都强,两者吸附牢固,欲将其解附,必须用极性大的洗脱剂,此时被分离物质无差别地解吸附,达不到分离的目的。本试验中用苯作单一展开剂时复方成分极性太强达不到分离目的,而用乙醇做单一溶剂时,展开剂极性太强,各成分无差别的展开,达不到分离效果。对比各展开剂可以看出加酸的效果明显比不加酸的效果好,这可能与复方五倍子成分中含大量没食子酸有关,加酸有利于酸性物质分离,因此最佳展开剂酸的用量较大。由复方五倍子有效成分各单体分子结构式可知,其分子极性由强到弱依次为:鞣质→没食子酸→槲皮素→

黄芩苷→芦荟大黄素→大黄素→1, 8-二羟基恩醌, 根据薄层特性, 极性大的化合物被牢固吸附, 迁移慢; 极性小的化合物被吸附弱, 迁移快, 与此顺序相对的是 R 值大小应该和分子极性由强到弱的次序正好相反, 这与本试验得到的 R 值相吻合。试验鉴定的成分无论从理化性质、薄层对比以及分子极性大小判断都是理论和实际相一致, 表明鉴定结果真实可靠。

3.3 柱层析分离条件的选择

比较湿法和干法装柱, 发现用湿法装柱, 乙醇冲洗柱后换洗脱剂上柱时, 由于柱子中残留乙醇极性太大, 各成分会被无差别的洗脱下来, 达不到分离目的, 并且在洗脱柱子的过程中很耗时间和药品; 而选用干法装柱则可以减少此不利因素, 获得好的分离效果。关于洗脱剂的选择, 在预试时采用氯仿→苯→乙醚→乙醇等溶剂由极性从小到大梯度洗脱时, 发现由极性小的洗脱剂换到极性大的洗脱剂过程中柱子容易起泡产生空气, 毁坏柱子致使洗脱过程失败。分析这可能是溶剂极性不同影响了溶剂在固定相硅胶中的迁移速度, 通常极性大的化合物被牢固吸附, 迁移慢; 极性小的化合物被吸附弱, 在硅胶固定相中迁移速度就快。洗脱剂极性由小换到大的过程中柱子下面的洗脱剂极性和硅胶吸附力就小, 在硅胶中的流动速度就快, 这样在不同极性洗脱剂的结合面上由于速度不同, 溶剂补充不及时, 导致柱子出现空隙, 断柱层面出现, 使洗脱失败。当选用薄层层析摸索出的展开剂, 苯: 乙醇: 甲酸(7: 3: 1)作为混合洗脱剂, 不仅能克服柱子出现断层气泡问题, 而且在洗脱过程中还可以不用更换溶剂就能有效地分离各成分。在预试时还发现样品上柱时如果样品位置不能控制在一个水平面, 容易导致洗脱结果出现样品成分交叉, 影响单体收集纯度, 所以在上样时动作要轻、快、准并且上完样后在上面加一小团棉花, 防止加洗脱剂过程中影响样品水平位置。最终柱层析选用干法装柱, 苯: 乙醇: 甲酸(7: 3: 1)作为混合洗脱剂, 用自动收集仪收集, TLC 跟踪检测。此法具有样品回收率高、纯度高、耗时少和操作简单等优点, 为中药复方药物成分的分离鉴定打下了坚实的物质基础。

参考文献:

[1] Li Q, Zhang Y J, Hua R Q, et al. Antibacterial experiment of

- 23 Chinese medicinal herbs and compound prescriptions on 3 bacteria from the gut of *Carassius auratus in vitro* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2007, 37(4): 7—11 [李茜, 张懿瑾, 华汝泉, 等. 23 种中草药及复方对鲫肠道 3 种细菌的体外抑菌试验. 淡水渔业, 2007, 37(4): 7—11]
- [2] Wang W B, Fang P, Lin X T, et al. The immunoregulative effects of liquorice extract on crucian [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(5): 654—660 [王文博, 方平, 林小涛, 等. 甘草粗提物对鲫的免疫调节作用. 水生生物学报, 2007, 31(5): 654—660]
- [3] Zhang H B, Zhang S X. Primary studies on the drug resistance of *Aeromonas Sobria popoff* and *veron* to 10 kinds of Chinese herbs [J]. *Journal of Xinyang Normal University*, 2003, 16(1): 39—41 [张海宾, 张书霞. 温和气单胞菌对 10 种中草药耐药性的初步研究. 信阳师范学院学报(自然), 2003, 16(1): 39—41]
- [4] Jiang L, Zheng S M. Inhibition and toxicity of gall to 3 species bacteria [J]. *Reservoir Fisheries*, 2005, 25(6): 89—90 [姜蕾, 郑曙明. 五倍子对 3 种致病菌的体外抑菌和急性毒性试验. 水利渔业, 2005, 25(6): 89—90]
- [5] Jiang L, Zheng S M. Pharmacodynamic study on Chinese nutgall against bacterial septicemia of Carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(5): 460—464 [姜蕾, 郑曙明. 五倍子对鲤鱼细菌性败血症的药效试验初报. 中国农学通报, 2006, 22(5): 460—464]
- [6] Zhou Y, Zheng S M. Study of thermostability of compound galla oral liquid by classical homeothermia [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2006, 28(6): 961—965 [周园, 郑曙明. 经典恒温法对复方五倍子口服液的热稳定性研究. 西南农业大学学报(自然), 2006, 28(6): 961—965]
- [7] Li Z X, Wang X H, Zhang M M, et al. *In vitro* antibacterial activity of ethanol-extract of *Galla chinensis* against *Staphylococcus aureus* [J]. *Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology*, 2005, 16(2): 103—105 [李仲兴, 王秀华, 张明明, 等. 五倍子乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的体外抗菌研究. 中药新药与临床药理, 2005, 16(2): 103—105]
- [8] Shi B, Di Y, He Y J, et al. Pharmacology activation of tannins [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1998, 29(7): 487—490 [石碧, 狄莹, 何有节, 等. 鞣质的药理活性. 中草药, 1998, 29(7): 487—490]
- [9] Wang X P, Zhen L, Zhou Z T, et al. Effects of the compositions of 28 Chinese herbs on the 8 bacteria in oral cavity [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2005, 6(6): 240—244 [王小平, 甄蕾, 周曾同, 等. 槲皮素等二十八种中药成分对 8 种口腔致病菌抑制作用的筛选实验. 中华中西医杂志, 2005, 6(6): 240—244]
- [10] Liu I X, Durham D G, Richards R M. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other beta-lactam-resistant strains of *S. aureus* [J]. *Pharmacy and Pharmacology*, 2000, 52(3):

- 361—366
- [11] Krakauer T, Li B Q, Young H A. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines [J]. *FEBS Letters*, 2001, **500**(1—2): 52—55
- [12] Li S J, Dong X H, Wu H X, *et al.* Progress for research of pharmacology effect of rhubarb and active ingredient [J]. *Medical Recapitulate*, 2005, **11**(1): 76—79 [李淑娟, 董晓华, 武海霞, 等. 大黄及其有效成分药理作用研究进展. 医学综述, 2005, **11**(1): 76—79]
- [13] Woo S W, Nan J X, Lee S H, *et al.* Aloe emodin suppresses myofibroblast differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, **90**(4): 193—198
- [14] Xie P S, Yan Y Z. Optimization of the TLC of protoberberine alkaloids and fingerprint valuation of the cortidis rhizome [J]. *Planar Chromatography Modern TLC*, 1992, **5**(5): 302—307
- [15] Pharmacopoeia committee of The People's Republic of China Health Department. Chinese Pharmacopoea TLC ATLAS of Traditional Chinese Herb Drugs [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Publishing House Press. 1993, 12—16 [中华人民共和国卫生部药典委员会编著. 中华人民共和国药典中药薄层色谱彩色图集 [M]. 广州: 广东科技出版社. 1993, 12—16]

STUDIES ON SEPARATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE EFFECTIVE COMPONENTS OF CHINESE HERBAL COMPOUNDS GALLNUT FOR FISHERY ANTIMICROBIAL AGENT

ZHENG Shu-Ming, HUANG Jian-Jun, WU Qing and SHA Sha

(Fish Breeding and Healthy Culture Research Center, Southwest University, Chongqing 402460)

Abstract: The effective components of Chinese Herbal Compounds Gallnut for fishery antimicrobial agent are separated and identified by thin-layer chromatography and column chromatography. Through antibacterial test and joint drug test of several aquatic animal pathogens *in vitro*, the antibacterial strength of active ingredients of the compound and the inter-relationship between the drug components are determined. The mechanism of Chinese Herbal Compounds Gallnut is supplied with the theoretical basis and the quality control is provided for its reference. The lamina is made with silica gel GF254 and the developing agent is spread with benzene: ethanol: formic acid (7:3:1). Moreover, it is colorized with $\text{NH}_3\text{-FeCl}_3$ and the result should be observed under sunlight. The monomer is isolated through dry silicon column loaded and it is eluted with benzene: ethanol: formic acid (7:3:1). The active ingredients of Chinese Herbal Compounds Gallnut are identified for physical and chemical properties and by thin-layer chromatography analysis. The results shows that the effective components of Chinese Herbal Compounds Gallnut are tannins, gallic acid, quercetin, baicalin, aloe emodin, emodin, 1, 8-2 hydroxy anthraquinone. The most content monomer is gallic acid by UV spectrophotometry for 10.47%. The antibacterial action for *Aeromonas sobria*, *A. caviae*, *Edwardsiella ictaluri* and *flavobacterium columnare* is tested. *Aeromonas sobria* selected as the object and the main active ingredients for two matched, antibacterial action *in vitro* is tested. Antibacterial order of the active ingredients is as follows: gallic acid > anthraquinone > baicalin > quercetin > tannide. There is synergy between gallic acid and anthraquinone, there is cumulative effect between gallic acid and baicalin, gallic acid and quercetin, anthraquinone and baicalin, respectively.

Key words: Chinese compound gallnut; Effective component; Thin-layer chromatography; Column chromatography; Antibacterial activity