

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.08

翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌体外抑菌活性及小鼠感染模型的防治效果研究

高艳^{1,2}, 郝宝成², 吴金措姆³, 格桑卓嘎³, 拉巴次旦³, 班旦³,
四郎玉珍³, 邢小勇¹, 梁云⁴, 杨志伟⁴, 胡永浩^{1*}, 梁剑平^{1,2*}

(1.甘肃农业大学动物医学院 甘肃兰州 730070; 2.中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,农业部兽用药物创制重点实验室,甘肃省新兽药工程重点实验室,甘肃兰州 730050; 3.西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所,西藏拉萨 850009; 4.兰州市肺科医院,甘肃兰州 730046)

[收稿日期] 2018-08-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0057-10 [中图分类号] S853.7

[摘要] 研究翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌的体外抑菌活性及小鼠感染模型的防治效果。利用传统水煎法制备翼草景香水煎液,用 HPLC 方法测定翼草景香水煎液中红景天苷浓度,并用红景天苷浓度标定翼草景香水煎液药物浓度,分别采用牛津杯法和试管 2 倍稀释法测定翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌抑菌圈直径和最小抑菌浓度(MIC),通过建立死亡率为 75%的多杀性巴氏杆菌体内感染小鼠模型,测定翼草景香水煎液浓度为 0.12316 mg/mL 时,在感染前和感染后给药方式下,分别给与 0.1、0.3、0.5 mL 药物时对小鼠的体内感染防治作用。结果表明,当翼草景香水煎液浓度为 0.49263 mg/mL 时,抑菌圈平均直径为 28.5 mm;MIC 值为 0.00385 mg/mL,经病理解剖、细菌镜检、全自动微生物鉴定及药敏系统(VTEK 2 COMPACT)系统细菌鉴定,表明死亡率为 75%的多杀性巴氏杆菌体内感染小鼠模型建立成功,当水煎液浓度为 0.12316 mg/mL 时,0.1、0.3、0.5 mL 预防组和治疗组小鼠死亡率分别依次为 50%、41.7%、81.8%、66.7%、50%和 75%。因此,翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌具有良好的体内、外抑菌活性,且其预防作用较治疗作用明显。

[关键词] 翼草景香;多杀性巴氏杆菌;最小抑菌浓度;感染模型;抑菌活性

Study on the Antibacterial Activity of Yicaojingxiang Decoction against *Pasteurella multocida* in vitro and the Prevention and Treatment Effect of Mouse Infection Model

GAO Yan^{1,2}, HAO Bao-cheng², WUJIN Cuo-mu³, GESANG Zhuo-ga³, LABA Ci-dan², BAN Dan³,
SILANG Yu-zhen³, XING Xiao-yong¹, LIANG Yun⁴, YANG Zhi-wei⁴, HU Yong-hao^{1*}, LIANG Jian-ping^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Key Laboratory of New Animal Drug Project, Gansu Province · Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutical Development of Ministry of Agriculture, Lanzhou Institute of Husbandry

基金项目: 西藏自治区财政厅专项:抗菌藏兽药的研发与示范(2017);中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-04)

作者简介: 高艳,硕士研究生,从事兽用天然新兽药研制方向研究。

通讯作者: 梁剑平, E-mail: liangjp100@sina.com; 胡永浩, E-mail: yhh0817@126.com

and Pharmaceutical Sciences of Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730050, China; 3. Tibet Livestock Research Institute, Tibet academy of agriculture and animal husbandry sciences, Lasa 850009, China; 4. Lanzhou Pulmonary Hospital, Lanzhou 730046, China)
Corresponding author: LIANG Jian-ping, E-mail: liangjp100@sina.com; HU Yong-hao, E-mail: yhh0817@126.com

Abstract: To clarify the antibacterial activity of the Yicaojingxiang decoction on *Pasteurella multocida* *in vitro* and prevention and treatment of infection *in vivo*. Extracting the effective components with water-extracting in the compound, the content of Salidroside in Yicaojingxiang decoction were measured by HPLC method, and its content indicates the drug concentration of Yicaojingxiang decoction. The antibacterial ring diameters and minimal inhibitory concentration (MIC) were determined by Oxford plate assay system and tube dilution. Establishing the model that lethality rate is 75% of *Pasteurella multocida* infection in mice and measuring the prevention and treatment of infection *in vivo* in different doses of the experimental group when the decoction concentration is 0.12316 mg/mL. When Yicaojingxiang decoction concentration is 0.49263 mg/mL, the average diameter of antibacterial rings was 28.5mm, and the MIC was 0.00385 mg/mL. Pathological examination, bacterial microscopy, VITEK 2 COMPACT identification after infection showed that the mice infected with *Pasteurella multocida* model was successfully established. When the concentration of decoction was 0.12316 mg/mL, the mortality of the 0.1, 0.3, 0.5 mL prevention group and the treatment group were 50%, 41.7%, 81.8%, 66.7%, 50% and 75%, respectively. Comprehensive test results, Yicaojingxiang decoction have a good antibacterial activity on *Pasteurella multocida* *in vitro* and *in vivo*, and its preventive effect is more obvious than the therapeutic effect.

Key words: Yicaojingxiang; *Pasteurella multocida*; minimal inhibitory concentration; infection model; antibacterial activity

牛出血性败血症,简称“牛出败”,是由多杀性巴氏杆菌引起的牛急性热性败血性传染病^[1],该病原是条件致病菌,机体抵抗力降低时病菌即可侵入体内大量繁殖^[2],除内源性感染发病外,也经呼吸道,消化道以及损伤皮肤和粘膜感染。易感动物为牛^[3],猪^[4]等动物,发病死亡率高达 80%以上,痊愈牛虽可产生免疫力,但其生产性能出现一定幅度下降^[5]。西藏牧区内,牛出败常地方流行或零星散发,根据临床症状,分为肺炎型、浮肿型和败血型^[6],此病潜伏期为 2~5 d,多见犏牛^[7],发病牛多呈急性经过,死亡率高达 40%~50%^[8],如芒康县,林芝地区^[9-10]等。近年来,西藏、青海^[11]等主要牧区发病呈现上升态势,不仅带来巨大的经济损失,且对草场和水源造成二次污染。

近年来,抗生素滥用导致临床分离到的牛源多杀性巴氏杆菌耐药菌株不断增多,临床抗感染治疗

效果越来越差,新疫苗研制开发周期较长,这些因素严重影响了对牛出血性败血症的临床预防治疗。有研究表明中药或天然植物提取物可发挥对病原菌直接杀灭作用而不产生耐药性或提高其对抗生素的敏感性^[12-15],如中药“连黄”可降低巴氏杆菌的耐药性^[16]。利用中药或天然植物提取物用于临床疾病防治已逐渐成为研究热点。藏药因其生长环境得天独厚,药用成分含量高,药性纯正副作用低,临床治疗效果较好,已得到很多研究者的认可^[17]。试验利用该复方对引起牛出败的多杀性巴氏杆菌进行体外抑菌活性研究及体内防治实验,以期为临床治疗提供参考依据。

1 材 料

1.1 药材与菌种 铁棒锤、诃子、藏木香、安息香、翼首草、兔耳草、草果、红景天,均购自西藏亚郎藏药材销售有限公司。

多杀性巴氏杆菌(编号:CVCC1659),购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基 MH 琼脂培养基(Mueller-Hinton Agar, MHA), MH 肉汤培养基(Mueller-Hinton broth, MHB)均购自北京奥博星生物技术有限责任公司;LS4509 增菌培养基,批号 ZBAP-170716D,购自广州市迪景微生物科技有限公司。

1.3 实验动物 SPF 级昆明(KM)小鼠共计 240 只,雌雄各半,体重(18 ± 2) g,购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心,批号为 SCXK(甘)2015-0001,连续饲喂 7d,自由采食,饮水,观察小鼠适应环境情况。

1.4 仪器和试剂 生物安全柜(HFsafe-1500,上海力申科学仪器有限公司);Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);恒温培养振荡器(HNYC-202T,天津欧诺仪器股份有限公司);VITEK 2 COMPACT 仪器(梅里埃生物公司);沃特浦制水机(四川沃特爾水处理有限公司);CO₂ 培养箱(TABAI ESPEC CORD, Japan);革兰氏阴性细菌鉴定卡(产品批号 2410112103,梅里埃诊断产品(上海)有限公司);注射用硫酸链霉素(产品批号:170103,合肥强力动物药品有限责任公司);注射用青霉素钠(产品批号:16050905-1,哈药集团);红景天苷对照品(购自于中国食品药品检定研究院,含量以 98.8% 计,批号为 110818-201708);甲醇(色谱纯)。

2 方 法

2.1 翼草景香水煎液的制备 准确称取各组分药材,加 10 倍体积超纯水水浸泡 2 h,大火煮沸后连续煎煮 2 h,四层纱布过滤,收集滤液,药渣中再加入 8 倍体积超纯水,大火煮沸后连续煎煮 2 h,加四层纱布过滤,合并两次滤液,烘干备用。

取 9 支 10 mL 无菌离心管,用二倍稀释法将药液分别稀释为生药浓度为 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.8, 3.91, 1.95 mg/mL, 标记为 2-1~2-9, 4℃ 保存,以备牛津杯法中使用。

2.2 HPLC 测定翼草景香中红景天苷方法

2.2.1 色谱条件 kromasil-sb-c18 色谱柱(4.6

mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇:水 = 15 : 85, 柱温为 30℃, 检测波长 275 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取红景天苷对照品,溶于 50% 甲醇,配制成浓度为 0.5615 g/L 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取复方提取物 4.00098 g,置具塞锥形瓶中,加入 10 mL 甲醇,超声处理 30 min,离心取上清,重复一次,合并两次上清于 25 mL 容量瓶,甲醇定容至刻度,再将其转移到 50 mL 容量瓶,用水定容至刻度,经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

2.2.4 标准曲线 将红景天苷对照品分别稀释为 0.56150000、0.28075000、0.14037500、0.07018750、0.03509375 g/L 的工作标准液,经 0.22 μm 滤膜过滤后待进样。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,求其回归方程及相关系数。

2.2.5 精密度试验 取浓度为 0.14037500 g/L 的工作标准液重复进样 6 次,测定其峰面积的 RSD。

2.2.6 稳定性试验 取一供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测定其峰面积的 RSD,考察样品的稳定性。

2.2.7 重复性试验 取同一批次样品六份,按 2.2.3 制备供试液,按色谱条件进样,计算样品含量,峰面积 RSD 值。

2.2.8 加样回收率试验 取已知浓度的样品 1 mL, 分别在其中加入不同体积的工作标准液(浓度为 0.56150000 g/L) 1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mL,按色谱条件计算供试液回收率及 RSD 值。

2.3 菌悬液的计数和制备 将原菌液进行 7 次 10 倍稀释,吸取 100 μL 稀释液于 MHA 平皿涂布均匀,重复 3 次,37℃ 恒温培养箱中培养 18 h,对菌落进行计数,求平均值,将菌液稀释为 1×10^6 CFU/mL,现用现配。

2.4 牛津杯法测定翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌抑菌作用 按向双云等^[18]做牛津杯的方法进行试验,对照组为无菌水,每个药液浓度重复 3 次,4℃ 冰箱放置 2h,37℃ 恒温培养 18 h,测量抑菌圈

直径,取平均值。

2.5 翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌的 MIC 值根据美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute) 制定的微生物临床检验标准,取 12 支试管,依次标记为 1~12,按向双云等^[18]利用试管 2 倍稀释法测定 MIC 值,试管 1~10 生药浓度依次为 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.8, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49 mg/mL。试管 11 为阴性对照,12 为空白对照,37 °C 摇床培养 18 h,将培养物接种于 MHA 培养基,平板标记为 2-1~2-11,37 °C 恒温培养 18 h,并设 3 个重复平行组。

2.6 小鼠体内感染多杀性巴氏杆菌模型的建立将 SPF 级昆明小鼠 132 只,随机分 11 组,A~K 组每组 12 只,雌雄各半。将原菌液 10 倍稀释为 $10^8 \sim 10^2$ CFU/mL,A-G 组依次腹腔注射菌液浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ CFU/mL 100 μ L,H 组腹腔注射浓度 1×10^2 CFU/mL 菌液 50 μ L,连续观察 3 d。并将菌液浓度为 1×10^2 CFU/mL 50 μ L 进行 3 次重复,统计小鼠死亡率。

试验结束后,将存活小鼠处死并解剖,观察病理变化,并取一部分小鼠肺脏组织做细菌涂片染色,镜检。同时将病料接种于 MHA 培养基中,划线挑取单个菌落,将其配制为 0.50~0.63 麦氏浓度的菌悬液,利用全自动微生物鉴定及药敏系统 (VTEK 2 COMPACT) 进行细菌鉴定。

2.7 翼草景香水煎液对小鼠体内感染多杀性巴氏杆菌防治作用 将 SPF 级昆明小鼠 108 只,雌雄各半,随机分为 9 组,分别为预防组 1~3、治疗组 1~3、阳性对照组、阴性对照组、空白对照组。预防组 1~3 分别连续 5 d 灌服 0.1、0.3、0.5 mL 生药浓度为 125 g/L 藏药复方水煎液,在第 5 d 给药后 1 h,每只小鼠腹腔注射 50 μ L 多杀性巴氏杆菌菌液;治疗组每只小鼠腹腔注射 50 μ L 多杀性巴氏杆菌菌液,感染 1 h 后,分别灌服 0.1、0.3、0.5 mL 生药浓度为 125 g/L 藏药复方水煎液 1 次;阳性对照组感染多杀性巴氏杆菌 1 h 后按每千克体重肌肉注射 2 万单位青链霉素混合药液治疗 1 次;阴性对照组在感

染细菌 1 h 后,灌服 0.5 mL 无菌水 1 次;空白组灌服 0.5 mL 无菌水 1 次,正常采食,饮水。将各试验组小鼠饲喂于相同环境中,观察统计 3 d 内小鼠精神状况及死亡情况。

3 结果与分析

3.1 HPLC 法测定翼草景香红景天苷含量结果

3.1.1 标准曲线 按色谱条件进样求出其回归方程为 $y = 3281.6x + 3.965$, $r^2 = 0.9999$,红景天苷进样量在 0.03509375~0.56150000 g/L 之间峰面积与进样量呈良好线性关系,见图 1。

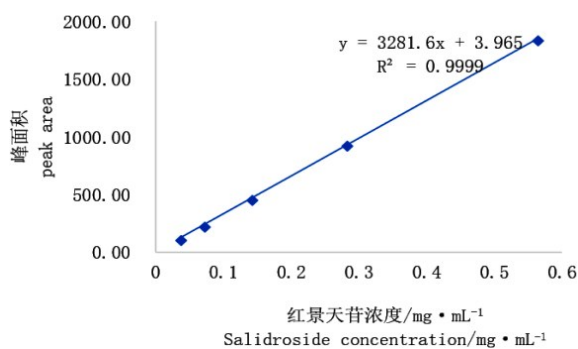


图 1 红景天苷的标准曲线

Fig 1 The standard curve of salidroside

3.1.2 精密度试验 取浓度为 0.14037500 g/L 的工作标准液重复进样 6 次,其平均峰面积为 927.1369833, $RSD = 0.17\%$,表明仪器的精密度良好。

3.1.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定,供试品溶液 RSD 值在 0~8 h 内为 1.82%, 0~24 h 内为 13.30%,故样品在 8 h 内基本稳定,这时其峰面积为 730.49461,供试品浓度为 0.2214 g/L,则翼草景香水煎液中红景天苷含量为 2019.78 mg。

3.1.4 重复性试验 取同一批次样品六份,按色谱条件进样,其平均峰面积为 732.8506267, $RSD = 2.65\%$,表明样品重复性良好。

3.1.5 加样回收率试验 由表 1 可知,红景天苷的平均回收率为 90.99%, RSD 为 4.35%。

3.1.6 复方浓度对应关系 结果见表 2。

表 1 加样回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery rate test							
化学成分 Chemical component	组别 Groups	样品浓度 /(mg · mL ⁻¹) Sample concentration	加标浓度 /(mg · mL ⁻¹) Concentration	实测浓度 /(mg · mL ⁻¹) Measured concentration	回收率 Recovery	平均回收率 Average recovery	RSD
红景天苷 Salidroside	第一组 Group 1	0.0912	0.2808	0.3421	91.74%	90.99%	4.35%
	第二组 Group 2	0.1013	0.2495	0.3280	90.87%		
	第三组 Group 3	0.1139	0.2106	0.3039	90.20%		
	第四组 Group 4	0.1302	0.1604	0.2835	95.56%		
	第五组 Group 5	0.1519	0.0935	0.2408	95.06%		
	第六组 Group 6	0.1657	0.0510	0.2090	84.90%		

表 2 复方生药浓度与以红景天苷标定复方浓度关系

Tab 2 The relationship between the concentration of compound crude drug and Salidroside			
生药浓度 g/L Raw drug concentration	500	125	3.91
标定浓度 g/L Calibration concentration	0.49263	0.12316	0.00385

3.2 牛津杯法测定翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌抑菌作用 翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌抑菌圈大小随生药浓度变化见图 2。当翼草景香水煎液浓度为 0.49263 g/L 时,对多杀性巴氏杆菌的抑菌圈平均直径为 28.5 mm,当翼草景香水煎液浓度大于等于 0.00385 g/L 时对多杀性巴氏杆菌有抑菌效果。

3.3 翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌的 MIC 值测定 结合图 2、表 2 及表 3,翼草景香水煎液浓度大于 0.00385 g/L 时,培养皿中无细菌生长,小于 0.00385 g/L 时培养皿中均有细菌生长。因此,翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌的 MIC 值为 0.00385 g/L。且由表 3 可看出,其最小杀菌浓度也是 0.00385 g/L。

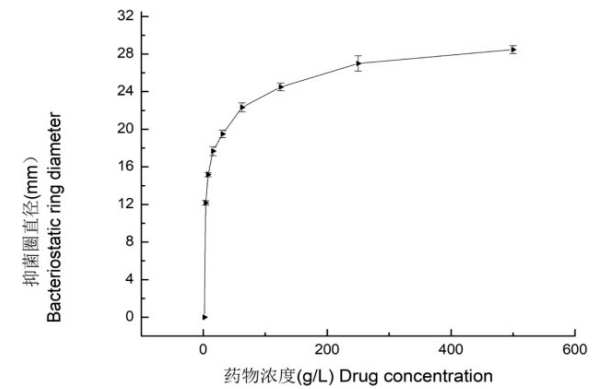


图 2 抑菌圈直径大小随药物浓度的变化

Fig 2 The diameter of bacteriostatic circle varies with the drug concentration

表 3 不同药物浓度下的菌落生长数目

Tab 3 The number of colonies at different drug concentrations		
平板标记	药物浓度/g/L	菌落数目/个
2-1	250	0±0
2-2	125	0±0
2-3	62.5	0±0
2-4	31.25	0±0
2-5	15.63	0±0
2-6	7.8	0±0
2-7	3.91	0±0
2-8	1.95	2.33±1.53
2-9	0.97	5.3×10 ⁵ ±4.5×10 ⁵
2-10	0.48	1.8×10 ⁸ ±2.9×10 ⁷

3.4 小鼠体内感染多杀性巴氏杆菌模型的建立
感染多杀性巴氏杆菌后,小鼠出现精神沉郁,被毛逆立,食欲下降。感染试验结束后各组试验小鼠死亡统计情况如表 4。小鼠剖检可见肺脏有明显点状淤血、坏死,心脏血管明显充血,肝脏上有散在的白色坏死点,肠道有鼓气现象,取肺部组织做细菌涂片,革兰氏染色菌体为紫红色(图 3),初步鉴定为

革兰氏阴性菌;利用全自动微生物鉴定及药敏系统(VTEK 2 COMPACT)进行鉴定,结果表明,分离鉴定获得细菌为多杀性巴氏杆菌的可信性为 97%。并将菌液浓度为 1×10^2 CFU/mL 50 μ L 注射感染小鼠,经 3 次重复平行试验,SPF 级昆明(KM)小鼠腹腔注射死亡率均为 75%,表明致死率为 75%的小鼠体内感染多杀性巴氏杆菌模型的建立成功。

表 4 小鼠感染不同浓度菌液的死亡率

Tab 4 Mortality in mice infected with different concentrations of bacteria								
组别	A	B	C	D	E	F	G	H
菌液浓度/ CFU/mL	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^2
注射体积/ μ L	100	100	100	100	100	100	100	50
小鼠死亡数/只	12	12	12	12	12	12	11	9
小鼠死亡率	100%	100%	100%	100%	100%	100%	91.7%	75%

3.5 翼草景香水煎液对小鼠体内感染多杀性巴氏杆菌防治作用
预防组不同剂量小鼠死亡率为 50%,41.7%,81.8%,治疗组小鼠死亡率为 66.7%,50%,75%,阴性对照组小鼠死亡率为 75%,阳性和空白对照组死亡率为 0。如图 4 所示,该翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌有一定防治作用,当给予每只小鼠含红景天苷 0.0369mg 的复方时,具有显著的预防作用,能明显降低死亡率 33%。

4 讨论与结论

4.1 翼草景香组方
藏医经典著作《四续》及《四部医典》均详细的记载了“对治”是藏药治疗疾病的基本原则,是药味、性、效配方的理论依据。藏药方剂组方主要遵循“主仆原则”,具体组方时又有君王、大臣、王妃、士兵药的不同,与中药的“君臣佐使”有所不同,藏医多以药效强弱来区别“君王、大臣”。藏医组方时,对疾病的诊断需准确,明确疾病属性和药性之间的关系,藏药药性理论与中医不同^[19],见表 5。

牛出血性败血症在中医辨证上属于疫病之病,临床上常以败血为主要症状,属于热性病。藏医上,该病是因为赤巴紊乱造成的热性疾病,根据“对治”原则,治疗该病应该选用具有寒、凉性质的药物。翼草景香复方有八味药组成,分别为翼首草,

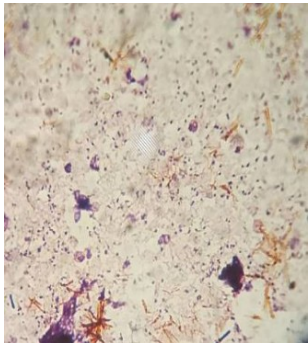


图 3 菌体革兰氏染色结果(1000×)
Fig 3 Cell Gram stain results

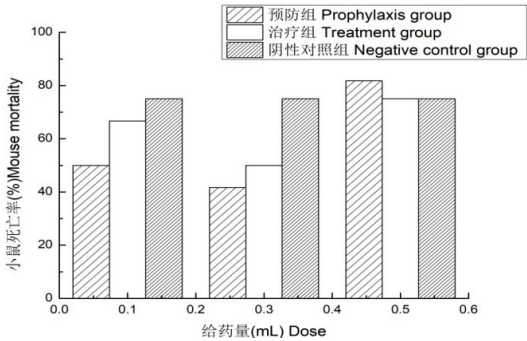


图 4 小鼠死亡率随复方剂量的变化
Fig 4 mice mortality varies with the compound dose

兔耳草,诃子,红景天,安息香,草果,铁棒锤,藏木香,在西藏牧区已用于牛出血性败血症临床防治。

其组方中翼首草含量最多,属苦、寒药物,是翼草景香复方的主药,其水提物具有很好的抑菌效果^[20];《四部医典》将兔耳草列为草药类之首,味苦性寒,藏医中兔耳草,诃子也多用于治疗赤巴病^[21-22],此两味药含量虽少于翼首草,亦是翼草景香复方的主药,铁棒锤亦属苦、寒药物,虽具有毒性,但与诃子

配伍使用能有效降低其毒性^[23]。翼草景香复方使用翼首草,兔耳草,诃子清热解毒,结合安息香,藏木香,草果等缓解症状,利用红景天提高机体免疫力,组方组成符合疾病“对治”原则,遵循“主仆”原则,且试验结果表明,翼草景香水煎液对牛出血性败血症致具有防治作用。

表 5 藏医五元、六味、八性、十七效与疾病对治简表

五元	土	水	火	风	空	
六味	水土偏盛:甘	火土偏盛:酸	火水偏盛:咸	水风偏盛:苦	火风偏盛:辛	土风偏盛:涩
八性	重(腻)润	凉、钝	锐、轻、糙、热	轻、凉		
十七效	柔、重、稳、温、润	柔、重、稳、寒、稀、凉、钝、软	热、锐、干、燥、轻、浮	凉、稀、干、轻、浮、糙、燥	轻、虚	
三因素(三邪)	隆:糙、轻、凉微、坚、动	赤巴:腻、锐、热轻、臭、泄、湿	培根:腻、寒、重钝、柔、稳、粘			
对治疾病	隆病	赤巴病	培根病	赤巴培根合病	多种疾病	

表中五元与八性非对应关系

4.2 高效液相色谱法测定翼草景香水煎液中红景天苷含量 超高效液相色谱凭借其选择性高,分离效果好,检测灵敏度高等优点被运用于多个领域中,如化学分析,环境分析,药物分析,食品分析^[24]等,药材的化学成分含量测定方法有薄层色谱法、气相色谱法、高效毛细管电泳法、HPLC^[25]等。

红景天是复方主要药材之一,红景天苷作为红景天的主要成分,其不具备抑菌作用,但可提高机体免疫力。因此,本文利用 HPLC 测定翼草景香水煎液中红景天苷的浓度,并以此来标定该翼草景香水煎液浓度。利用 100% 甲醇溶解红景天苷标品时,出现两个相连的峰,经液相全波长扫描及分光光度计全波长扫描,确定其为一种物质,经试验,利用 50% 甲醇溶解对照品时其峰形最对称。在该色谱条件下,标准曲线、仪器精密度、样品稳定性及重复性 RSD 值都良好,加样回收率为 90.99%,偏低, RSD 值为 4.35%,偏高,可能是由于该溶液为复方提取物,成分众多,不同浓度下,中药成分发生的相互作用程度不一。

4.3 翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌体外抑菌作用 研究中利用牛津杯法和试管二倍稀释法测定翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌的体外抑菌活性,当翼草景香水煎液浓度为 0.49263 g/L 时抑

菌圈平均直径为 28.5 mm,表明翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌高度敏感,且其 MIC 值为 0.00385 g/L,比吕彪、曲径等^[26-27]研究的单味中草药抑菌效果更显著。

4.4 翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌感染模型小鼠治疗效果 实验动物疾病模型已被广泛应用于医学生物学的研究领域中,本文通过成功建立多杀性巴氏杆菌感染小鼠模型,研究了翼草景香水煎液对巴氏杆菌的体内防治作用,经观察,小鼠感染巴氏杆菌后,20 h 后无死亡情况,故治疗及对照组均给药 1 次,预防及治疗的高剂量组 0.5 mL 反而出现治疗组死亡率较高现象,可能由于感染细菌后小鼠的免疫力降低所致,当给予 0.3 mL 复方水煎液时,预防组降低死亡率 33%,治疗组降低死亡率 25%。

目前,国内外对于牛出败多采用疫苗预防^[28-29],但由于多杀性巴氏杆菌的荚膜型和血清型众多,疫苗免疫具有特异性不能全面覆盖^[30],或基层兽防人员缺乏技术培训采取不正确的接种方式,接种剂量^[31-32]等,牛出败依旧每年发生,临床上治疗巴氏杆菌病多采用抗生素类药物,多连续用药 3 d,长时间使用效果降低,中药多作为后期护理使用或不用,使用藏药复方防治更是未找到相关报道。因此,本文复方以翼首草作为主药,其可入血成分有

绿原酸、獐牙菜苷等,有文献报道绿原酸具有抑菌作用^[33],但在此复方是否为主要有效成分尚需进一步研究确定;红景天与诃子中都含有没食子酸,具有抗菌作用^[34-35]。文中翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌感染小鼠具有明显的防治作用,且预防作用强于治疗作用。

4.5 结论 翼草景香为藏药复方,在西藏部分牧区已用于牛出血性败血症临床防治,本文通过液相定量复方中红景天苷浓度为 0.2214 g/L,体外及体内试验证明翼草景香水煎液对多杀性巴氏杆菌具有良好的体内、外抑菌活性,且其预防作用较治疗作用明显,这为牛出血性败血症的临床药物防治提供新的选择。

参考文献:

- [1] Harper M, Boyce J D, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 265 (1): 1-10.
- [2] 方仁东,雷桂花,杜慧慧,等. 多杀性巴氏杆菌毒素的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(11): 1990-1996.
Fang R D, Lei G H, Du H H, *et al.* Research progress on the *Pasteurella multocida* toxin[J]. *Chinese Veterinary Medicine*, 2016, 36(11): 1990-1996.
- [3] 格日多杰,华青多杰. 牛肺疫的治疗与防治[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2016, 32(9): 180.
Geriduojie, Huaqingduojie. Cattle pulmonary disease treatment and prevention[J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2016, 32(9): 180.
- [4] 彭忠,王庚,吴广敬,等. 猪源多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(9): 943-951.
Peng Z, Wang G, Wu G J, *et al.* Isolation and identification of *Pasteurella multocida* from swine[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(9): 943-951.
- [5] 高长青,张熙艳,赵攀峰. 牛出血性败血症病例报告[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2012, 28(4): 151.
Gao C Q, Zhang X Y, Zhao P F. Bovine Hemorrhagic Septicemia case report [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2012, 28(4): 151.
- [6] 斯郎曲措. 牛巴氏杆菌病的诊治[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2017, 33(7): 179.
S L Q C. Diagnosis and treatment of cattle pasteurellosis [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2017, 33(7): 179.
- [7] Yagoub M M, Suleiman K M. Serological study on mucosal response of cattle to haemorrhagic septicaemia vaccine[J]. *Global*

Journal of Animal Scientific Research, 2016, 2(4): 332-336.

- [8] 张国珣. 牛出败病的综述[J]. *当代畜牧*, 2015, (11): 51-52.
Zhang G J. A review of Bovine Hemorrhagic Septicemia [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2015, (11): 51-52.
- [9] 卫东. 芒康县牛出败的治疗与预防对策[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2016, 32(8): 176.
Wei D. The treatment and prevention of Bovine Hemorrhagic Septicemia in Markam County [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2016, 32(8): 176.
- [10] 张丽鸿,张红亮,田发益. 西藏林芝地区黄牛多杀性巴氏杆菌病的流行病学调查及鉴定[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2014, 44(11): 44-46+50.
Zhang L H, Zhang H L, Tian F Y. Epidemiological investigation and identification of *Pasteurella multocida* in cattle in Nyingchi region of Tibet [J]. *Gansu Animal Husbandry*, 2014, 44(11): 44-46+50.
- [11] 更桑达哇. 高原牦牛出血性败血症的防治[J]. *湖北畜牧兽医*, 2017, 38(8): 17.
G S D W. Prevention and treatment of Hemorrhagic Septicemia in plateau yak [J]. *Hubei Animal Husbandry*, 2017, 38(8): 17.
- [12] 辛任升,刘宇,郝宝成,等. 苦豆子及其复方药对奶牛子宫内膜炎 5 种致病菌的体外抑菌活性研究[J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(4): 636-639.
Xin R S, Liu Y, Hao B C, *et al.* Effect of total alkaloids of *Sophoraalopecurioides* and compound preparation against five pathogens of cow endometritis [J]. *Chinese Veterinary Medicine*, 2015, 35(4): 636-639.
- [13] 游锡火. 我国中兽药产业发展战略研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2014, 50(8): 8-10+15.
You X H. Study on the Development Strategy of Chinese Veterinary Drug Industry in China [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2014, 50(8): 8-10+15.
- [14] 吴涛,石镜明,孙正启. 藏药红景天抗氧化作用在阿尔兹海默病中的研究进展[J]. *中国民族医药杂志*, 2017, 23(7): 65-68.
Wu T, Shi J M, Sun Z Q. Advances in research on antioxidation of Tibetan medicine *Rhodiola rosea* in Alzheimer's disease [J]. *Chinese National Medicine Journal*, 2017, 23(7): 65-68.
- [15] 马玉林. 藏药镰形棘豆对缺氧·复氧 H_{9c2} 心肌细胞损伤的保护作用[D]. 青海大学, 2017.
Ma Y L. Protective Effect of Tibetan Medicine *Oxytropis falcata* Bunge on Hypoxia/Reoxygen (H/R) Injury in H_{9c2} Cardiomyocytes [D]. Qinghai University, 2017.
- [16] 苗春光,鞠玉琳,高威,等. 中药“连黄”对巴氏杆菌耐药性的影响[J]. *延边大学农学报*, 2009, 31(3): 172-175+188.
Miao C G, Ju Y L, Gao W, *et al.* Effect of "Lianhuang" of Traditional Chinese Medicine on *Pasteurella* spp. Resistance [J]. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, 2009, 31(3): 172-175+188.

- [17] 杨文婷,张 伟,杨一丁,等. 红景天化学成分研究[J]. 首都食品与医药,2015(22):90-91.
Yang W T,Zhang W,Yang Y D,*et al.* General situation research progress on *Rhodiola rosea* chemical composition [J]. Capital Food and Medicine,2015(22):90-91.
- [18] 向双云,周珍辉,李玉冰,等.8 种中草药对大肠杆菌的体外抑菌试验[J].黑龙江畜牧兽医,2016(10):167-169.
Xiang S Y,Zhou Z H,Li Y B,*et al.* *in vitro* antibacterial test of 8 Chinese herbal medicines against *Escherichia coli* [J]. Heilongjiang animal husbandry and veterinary, 2016(10):167-169.
- [19] 任小巧,王明强,毛 萌,等.基于藏药药性理论的藏药方剂组方规律探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(05):894-897.
Ren X Q,Wang M Q,Mao M,*et al.* Discuss the prescription of Tibetan medicine based on its theory [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica,2016,18(05):894-897.
- [20] 张雪梅. 藏药翼首草化学成分及质量评价方法研究[D].重庆大学,2013.
Zhang X M. Study on the chemical constituents and quality evaluation method for *pterocephalus hookeri* [D]. Chongqing University,2013.
- [21] 聂 佳,杨文娟,张 雯,等.基于数据挖掘技术分析含“三果”藏药配伍规律[J].辽宁中医杂志,2018,45(03):508-511.
Nie J,Yang W J,Zhang W, Analysis on Tibetan medicine three fruits compatibility law by data Mining method [J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine,2018,45(03):508-511.
- [22] 杨文娟,泽翁拥忠,张 艺,等.基于数据挖掘技术的含诃子藏药组方规律分析[J].中国中药杂志,2017,42(06):1207-1212.
Yang W J,ZEWENG Y Z,Zhang Y,*et al.* Analysis on composition principles of Tibetan medicine containing *Terminalia chebula* by data mining[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2017,42(06):1207-1212.
- [23] 王嘉伦,王培杰,易智威,等.诃子的化学成分、药理作用及炮制配伍应用研究进展[J]. 中医药信息,2016,33(3):123-126.
Wang J L,Wang P J,Yi Z W,*et al.* Chemical constituents, pharmacological effects and application of processing and preparation of *gardenia* [J]. Information on Chinese medicine,2016,33(3):123-126.
- [24] 徐 永,寿林飞,虞 森,等.超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用法测定水果中多效唑、氯吡脞和咪鲜胺的残留[J].农药学报,2012,14(1):61-66.
Xu Y,Shou L F,Yu M,*et al.* UPLC-MS/MS method for determination of paclobutrazol,forchlorfenuron and prochloraz residues in fruits [J]. Chinese Journal of Pesticide Science,2012,14(1):61-66.
- [25] 陈 瑶. 关黄柏药材化学特性与环境因子的相关性研究[D]. 北京协和医学院,2017.
Chen Y. Correlation Study on Chemical Characteristics of *Phellodendri amurensis* and environmental factors [D]. Beijing Union Medical College,2017.
- [26] 吕 彪,宋志元,储君,等.20 种中草药提取物对 4 种常见病原菌体外抑菌试验[J].中兽医学杂志,2016,(04):4-6.
Lv B,Song Z Y,Chu J,*et al.* *in vitro* antibacterial test of 20 kinds of Chinese herbal medicine extracts against 4 common pathogenic bacteria [J]. Chinese Journal of Traditional Veterinary Science, 2016,(04):4-6.
- [27] 曲 径,殷中琼,贾仁勇,等.艾叶等 20 种中药对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌活性[J].华中农业大学学报,2015,34(02):91-94.
Qu J,Yin Z Q, Ji R Y,*et al.* Antibacterial activity of crude extract from twenty traditional Chinese medicines like *Artemisia argyi* against *Pasteurella multocida in vitro* [J]. Journal of hua-zhong agricultural university,2015,34(02):91-94.
- [28] 马建伟,杜慧慧,吉佳乐,等.牛源多杀性巴氏杆菌 pm0979-ompH 融合表达及免疫效果[J]. 中国兽医学报,2016,36(1):30-34.
Ma J W,Du H H, Ji J L,*et al.* Expression of the fusion gene pm0979-ompH of *Pasteurella multocida* and its immunoprotection [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016,36(1):30-34.
- [29] H Du,C Wu,C Li,*et al.* Two novel crossprotective antigens for bovine *Pasteurella multocida*. [J]. Molecular Medicine Reports, 2017,16(4):4627-4633.
- [30] 牛思博,姜志刚,德艳艳,等.重组牛源荚膜 A 型多杀性巴氏杆菌脂蛋白 E 的免疫保护性研究[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(5):401-404.
Niu S B,Jiang Z G,De Y Y,*et al.* Protective immunity induced by recombinant lipoprotein E (PlpE) of bovine *Pasteurella multocida* type A [J]. Chinese Journal of Preventive Veterin,2013,35(5):401-404.
- [31] Crawshaw W M,Caldow G L. Field study of pneumonia in vaccinated cattle associated with incorrect vaccination and *Pasteurella multocida* infection. [J]. Veterinary Record,2015,176(17):434.
- [32] Ahmed G,Qadeer M A,Oduqbo M O,*et al.* Haemorrhagic septicaemia outbreaks in cattle with high mortality following wrong vaccinations in Adamawa and Taraba States, Nigeria [J]. International Journal of Livestock Production,2016,7(1):1-4.
- [33] 胡居吾,韩晓丹,付建平,等. 三种绿原酸提取物的抑菌和抗氧化效果比较[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(11):1928-1933.
Hu J W,Han X D, Fu J P,*et al.* Antimicrobial and Antioxidant Effects of 3 Chlorogenic Acid Extracts [J]. Nat Prod Res Dev, 2017,29(11):1928-1933.
- [34] 康云雪,王 艳,王毓杰,等.诃子制铁屑炮制原理的初步研究[J].中草药,2018,49(04):835-839.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.02.09

磺胺类药物代谢与残留消除以及检测方法研究进展

孙亚奇^{1,2}, 郭京超^{1,2}, 潘源虎^{1,2}, 刘振利^{1,2*}, 王旭^{1,2*}, 袁宗辉^{1,2}

(1.华中农业大学动物医学院,武汉 430070;2.华中农业大学国家兽药残留基准实验室(HZAU)、农业部食品兽药残留检测重点实验室,武汉 430070)

[收稿日期] 2018-10-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 02-0066-10 [中图分类号] S859.796

[摘要] 对磺胺类药物在动物和人体内的代谢与残留消除规律以及残留检测方法进行综述,并展望磺胺类药物的代谢研究方向以及残留检测技术的发展,以期开发新的磺胺类药物残留检测方法提供技术支持和参考。

[关键词] 磺胺类药物;代谢;残留消除;检测方法

Research Progress on the Metabolism, Residue Elimination and Detection Methods of Sulfonamides

SUN Ya-qi^{1,2}, GUO Jing-chao^{1,2}, PAN Yuan-hu^{1,2}, LIU Zhen-Li^{1,2*}, WANG Xu^{1,2*}, YUAN Zong-hui^{1,2}

(1.College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues (HZAU), MOA Key Laboratory for the Detection of Veterinary Drug Residues in Foods, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: LIU Zhen-Li, E-mail:liuzhli009@mail.hzau.edu.cn; WANG Xu, E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn

Abstract: This paper summarized metabolism and residue elimination and residue detection methods of sulfonamides. Finally, the research direction of sulfonamides metabolism and residues detection technology was discussed. It is expected to provide technical support and reference for the development of new detection methods for sulfonamides residues.

Key words: sulfonamides; metabolism; residue elimination; detection method

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)通常是指一类在其化学结构中含有对氨基苯磺酰胺结构的人工合成抗菌药物,用于治疗 and 预防人类及动物的感染

性疾病。磺胺类药物通过干扰敏感菌的叶酸代谢而抑制细菌的生长繁殖,由于具有抗菌谱广、性质稳定、价格低廉、便于大量生产等优点,已被广泛应

基金项目: 国家重点研发计划资助(2017YFD0501405)

作者简介: 孙亚奇,硕士研究生,从事兽医药理学与毒理学研究。

通讯作者: 王旭, E-mail:wangxu@mail.hzau.edu.cn; 刘振利, E-mail:liuzhli009@mail.hzau.edu.cn

Kang Y X, Wang Y, Wang Y J, *et al.* Study on principle of scrap iron processing by Terminalia chebula[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(04): 835-839.

Zhu X Y, Luo X P, Chen L R, *et al.* Determination of gallic acid in Rhodiola by High Performance Capillary Electrophoretic Analysis [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2005(03): 443-444.

[35] 祝馨怡, 罗兴平, 陈立仁, 等. 高效毛细管电泳法测定红景天中没食子酸的含量[J]. 中草药, 2005(03): 443-444.

(编辑:陈希)