

大黄多糖超声波提取工艺及抗新城疫病毒活性试验

王春花^{1,2}, 付云威³, 张秀英¹

(1. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江农业经济职业学院制药工程系, 黑龙江 牡丹江 157000; 3. 东北农业大学医院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:本试验就超声波法提取大黄多糖工艺,以时间、温度、料液比和 pH 值 4 个因素进行单因素观察,在此基础上进行正交设计优化提取工艺,并对纯化后大黄多糖进行抗新城疫病毒活性试验。结果显示,超声波提取大黄多糖的最佳工艺条件是时间 50 min,温度 40℃,料液比 1:40,pH 值 9.0,提取率及多糖含量为 42.27%和 13.11%,显著高于传统法的 38.10%与 5.06%,且提取率及含量稳定性高。体外抗病毒试验显示,两种作用方式下,治疗指数均可达 4,说明大黄多糖具有较强抗新城疫病毒作用。

关键词:大黄多糖;超声波;提取;新城疫病毒

中图分类号:S853.74

文献标识码:A

文章编号:0529-6005(2011)12-0070-03

Study on Rheum tanguticum polysaccharide ultrasonic extraction and anti-Newcastle disease virus(NDV) activities

WANG Chun-hua^{1,2}, FU Yun-wei³, ZHANG Xiu-ying¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Agricultural Economy

Vocational College, Mudanjiang 157000, China; 3. Northeast Agricultural University Hospital, Harbin 150030, China)

Abstract: The study on ultrasonic extracting way of Rheum tanguticum polysaccharide (RTP) was carried out based on the extraction time, temperature, material-fluid ratio, and pH value as the single factor, respectively. And then orthogonal design was used to optimize the extraction way. Finally, the antiviral activity of purified RTP against NDV was analyzed. Our results showed that the optimal conditions are: 50 min, 40℃; material-fluid ratio 1:40, and pH 9.0. Using the optimal extraction condition, the ratio and the content of RTP were 42.27%, and 13.11%, respectively, which was significantly increased when compared with the number 38.10%, and 5.06% gained by traditional way. In-vitro experiment showed that the therapeutic index reached 4, indicating that RTP had anti-NDV activity.

Key words: RTP; ultrasonic; extract; NDV

Corresponding author: ZHANG Xiu-ying

中药大黄(Rheum tanguticum Maxim.)为蓼科植物的根茎,成分丰富,20世纪大黄的研究主要集中于蒽类,近年研究发现,曾被忽视的成分大黄多糖(rheum tanguticum polysaccharide, RTP)具有广泛的生物活性,大黄多糖具有降血糖、治疗结肠炎、脑保护、抗肿瘤、增强免疫力及降低细胞内游离钙离子浓度的作用。但大黄多糖提取优化工艺的试验报道少,超声波提取工艺的试验仍为空白,并且其抗病毒活性研究报道也甚少。新城疫是对养鸡业危害较严重的传染病之一,给养禽业造成了严重的经济损失,而目前能有效低毒的防治新城疫病毒性疾病的药物

缺乏。本试验以大黄多糖为研究对象,对大黄多糖超声波法提取工艺进行优化,并对纯化后大黄多糖的抗新城疫病毒活性进行观察试验,确定了大黄多糖最佳提取工艺,为防治新城疫病毒性疾病提供科学依据,报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与病毒 唐古特大黄购于哈尔滨世一堂药店;病毒唑购于东北制药总厂;所用试剂均为国产分析纯;F9E48新城疫病毒由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽病实验室提供;9周龄 SPF 鸡胚由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.2 多糖含量测定方法^[1] 采用苯酚-硫酸法对多糖含量进行测定,多糖提取率及含量的换算公式如下:

多糖占粗提物的比率(多糖提取率) = 糖重量(经 OD 值换算)/多糖测样质量 × 100%

中药中多糖含量(多糖含量) = 多糖提取率 × 提取粗多糖重量/中药总重量 × 100%

收稿日期:2010-12-31

基金项目:黑龙江对外合作项目(wb08b01)

作者简介:王春花(1984-),女,助教,硕士,研究方向为药理与毒理学,E-mail: flower13580@126.com

通讯作者:张秀英,E-mail: zxy0451@hotmail.com

1.3 传统法提取大黄多糖 准确称取 5 g 大黄(大黄提取前需经干燥粉碎,回流提取,过滤干燥处理),分 3 次加蒸馏水达样品量的 20 倍、10 倍、10 倍,各煮沸 1 h,合并提取液过滤、浓缩和醇沉,干燥得大黄多糖,称重,计算多糖提取率及多糖含量。

1.4 大黄多糖超声波法提取工艺的优化 以提取时间、温度、料液比、pH 值为单因素考察对象(表 1),以多糖含量及多糖提取率为多糖提取效果指标,优化超声波法提取大黄多糖的单因素参数。采用正交试验法优化提取工艺(表 2)。将最优提取参数下大黄多糖提取与传统提取方法比较。

表 1 单因素考察

考察因素	提取时间(min)	温度(°C)	料液比	pH 值
1	20	40	1:15	3.0
2	40	50	1:20	5.0
3	60	60	1:25	7.0
4	80	70	1:30	9.0
5	100	80	1:35	11.0

表 2 正交设计试验因素水平

因素水平	时间 (min)	温度(°C)	料液比	pH 值
1	40	40	1:30	7.0
2	50	50	1:35	8.0
3	60	60	1:40	9.0

1.5 大黄多糖抗新城疫病毒活性检测 本试验选择体外跟踪法,以鸡胚成纤维细胞为平台对大黄多糖抗新城疫病毒进行研究,细胞培养方法参照殷震^[2],接种倍比稀释 NDV 病毒液,培养,观察记录,根据 Reed-Muench 公式计算 TCID₅₀ 值。

设定两种加药方式,先加大黄多糖再作用病毒组与先作用病毒后加多糖组,测定多种多糖对新城疫病毒的影响。细胞病变(CPE)、紫外吸光度值(OD 值)及选择指数(TI)比较法综合评价抗病毒效果, TI=最大无毒浓度/最小有效浓度。

1.6 数据处理 数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示,试验数据用 SPSS13.0 统计分析软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 单因素对多糖提取的影响 见图 1~4。

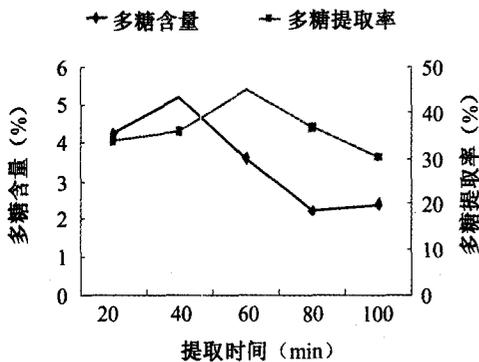


图 1 提取时间的影响

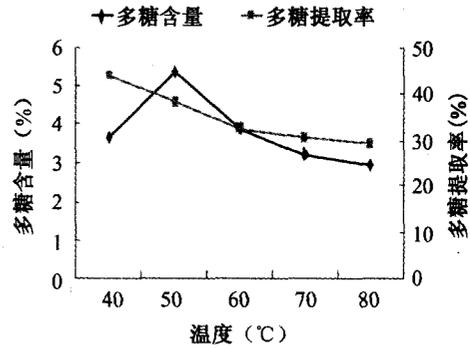


图 2 提取温度的影响

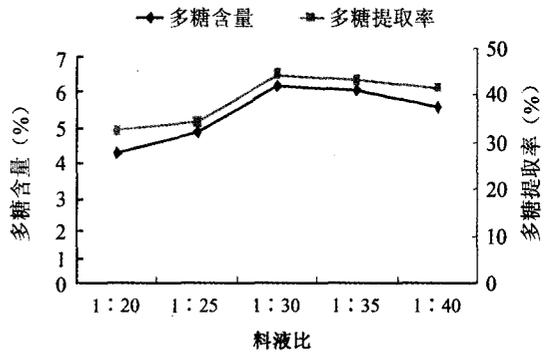


图 3 提取料液比的影响

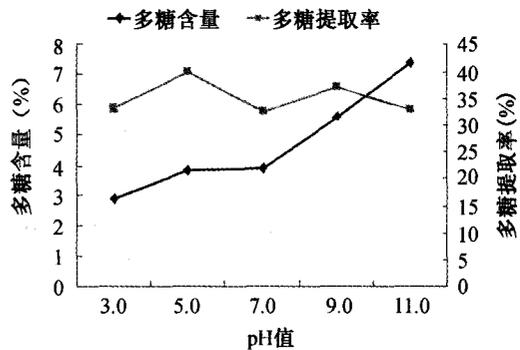


图 4 提取 pH 值的影响

2.2 超声波法正交设计试验结果 见表 3~5。

表 3 超声波法提取大黄多糖正交设计试验因素水平 L₉(3⁴)

水平	因素			
	A: pH 值	B: 料液比	C: 温度(°C)	D: 时间(min)
1	7	1:30	40	40
2	8	1:35	50	50
3	9	1:40	60	60

根据 R 值,影响多糖提取率及多糖含量的主次关系依次是温度(C)>料液比(B)>pH 值(A)>时间(D);料液比(B)>pH 值(A)>温度(C)>时间(D)。方差分析显示,B 因素及 A 因素即料液比和 pH 值对多糖含量试验结果影响显著。综合考虑正交试验结果,推定超声波提取大黄多糖的最佳工艺条件是 A₃B₃C₁D₂,即 pH 值为 9.0,料液比为 1:40,温度为 40°C,时间为 50 min。条件下提取率及多糖

含量为 42.27%, 13.11%, 均高于传统提取法 38.10%, 5.06%。

表 4 超声波法提取正交试验结果

组别	A	B	C	D	多糖提取率(%)	多糖含量(%)
1	1	1	1	1	44.30	3.69
2	1	2	2	2	39.58	5.01
3	1	3	3	3	31.17	8.41
4	2	1	2	3	38.11	5.39
5	2	2	3	1	33.02	4.13
6	2	3	1	2	38.43	7.82
7	3	1	3	2	42.66	6.70
8	3	2	1	3	42.53	8.18
9	3	3	2	1	39.79	12.80
多糖提取率	K1	115.05	125.07	125.26	117.11	349.59(K)
	K2	109.56	115.13	117.48	120.67	
	K3	124.98	109.39	106.85	111.81	
	R	5.14	5.23	6.13	2.95	
多糖含量	K1	17.11	15.78	19.69	20.62	62.13(K)
	K2	17.34	17.32	23.2	19.53	
	K3	27.68	29.03	19.24	21.98	
	R	3.53	4.42	1.32	0.82	

表 5 超声波法正交试验方差分析

指标	方差来源	SS	df	MS	F	显著水平
多糖提取率(%)	A	40.72	2	20.36	3.07	$P>0.05$
	B	41.96	2	20.98	3.17	$P>0.05$
	C	56.94	2	28.47	4.30	$P>0.05$
	D	13.25	2	6.63		
	总变异	152.87	8			
多糖含量(%)	A	24.30	2	12.15	24.19	$P<0.05^*$
	B	35.01	2	17.50	34.85	$P<0.05^*$
	C	3.13	2	1.57	3.12	$P>0.05$
	D	1.00	2	0.50		
	总变异	63.44	8			

注: $F_{0.05}(2,2)=19.0$; $F_{0.01}(2,2)=99.0$; 1) 表示误差项, * 表示差异显著

2.3 大黄多糖抗 NDV 作用结果

2.3.1 TCID₅₀ 与 大黄多糖安全浓度 NDV 的 TCID₅₀ 为 $10^{-6.56}$, 大黄多糖的安全浓度为 1 mg/mL。

2.3.2 大黄多糖抗 NDV 活性结果 大黄多糖抗 NDV 活性的细胞病变观察结果与 MTT 测定结果一致, 多糖浓度为 $1/2^1$ mg/mL, 抗病毒作用最大, 与病毒对照组差异极显著 ($P<0.01$), 抗 NDV 活性低于阳性对照药, 治疗指数均达 4, 体外试验表现一定细胞保护作用 and 抗 NDV 作用(见表 6)。

3 讨论

根据大黄药材目的多糖高温易变性的特点, 通过先粉碎中药再超声波提取的方法, 可低成本获得高含量、高稳定性、低杂质的大黄多糖。试验发现, 通过调节提取液酸碱度可促进大黄多糖的浸出, 碱度越大, 大黄多糖含量越高, 结合赵燕等^[3]阿拉伯

糖、葡萄糖、半乳糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸 5 种单糖组成推测, 此现象是由于大黄多糖中含有糖醛酸及酸性多糖所导致, 但碱浓度过高会导致有些多糖在水解, 不利于活性的研究。试验发现, 多糖颜色与提取 pH 值呈正相关, pH 值越大颜色越深, 这是由于大黄色素更易溶于碱性溶液中, pH 值的增高促进了大黄中色素的溶解, 增加了后期除色素的困难。

表 6 RTP 和 sRTP 各组细胞 CPE 和 OD 值的变化

浓度 (mg/mL)	多糖-病毒组		病毒-多糖组	
	OD ₅₉₅	CPE	OD ₅₉₅	CPE
1	0.138±0.027	+++	0.120±0.018	+
1/2 ¹	0.176±0.019	++++	0.148±0.015	++
1/2 ²	0.147±0.017 [#]	++++	0.125±0.010 [#]	+++
1/2 ³	0.121±0.022	++++	0.108±0.017	++++
1/2 ⁴	0.109±0.016	++++	0.100±0.009	++++
1/2 ⁵	0.107±0.011	++++	0.094±0.011	++++
1/2 ⁶	0.101±0.019	++++	0.097±0.013	++++
病毒对照	0.099±0.012	++++	0.099±0.012	++++
病毒唑对照	0.249±0.023	+	0.249±0.023	+
细胞对照	0.347±0.021	-	0.347±0.021	-
治疗指数	4		4	

超声波提取大黄多糖的最佳工艺条件为 pH 值 9.0, 料液比 1:40, 温度 40℃, 时间 50 min, 这一推定参数没在正交试验表中, 后经验证, 参数下提取大黄多糖提取率及多糖含量为 42.27%, 13.11%, 均高于正交试验组与传统法提取组。传统法获得数据 38.10%, 5.06%, 与倪受东^[4]研究中多糖含量 6.54% 接近。超声波法优于纪耀华等^[5]研究的微波法提取大黄多糖的工艺, 微波法大黄多糖的最佳工艺条件为提取时间 3 min, 微波功率 400 W, 料液比 1:10, pH 值为 10。

大黄多糖抗 NDV 活性试验, 根据新城疫病毒性疾病的发病特点, 结合可能出现的用药时机, 排除了中药与病毒自然环境下作用后再作用细胞的临床发生可能, 设定两种给药方式, 一种先加大黄多糖作用 12 h, 再加入病毒吸附作用, 目的是观察药物能否进入细胞或吸附于细胞表面, 以阻止病毒的吸附与侵入^[6], 另一种先加病毒吸附作用后, 再加入大黄多糖, 目的是观察药物能否对已进入细胞内的病毒起作用, 抑制其生物合成及成熟释放^[6]。通过 MTT 检测细胞活性结合 CPE 的方法发现, 大黄多糖在两种作用方式下对 DNV 均有抑制作用, 先加大多糖组抗 NDV 活性略高于先加病毒组, 治疗指数均为 4, 高于抗病毒药物研究效果评价中治疗指数大于 2 的标准。这两种加药方式从不同侧面探讨了中药的直接抗病毒机理, 结果表明大黄多糖在这两

广东地区发病猪群猪链球菌感染监测及药敏试验

臧莹安¹, 卢 颀¹, 胡 波¹, 宋 帅², 李 森², 李春玲²

(1. 仲恺农业工程学院动物科学系, 广东 广州 510225; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要:本试验通过对广东部分地区发病猪群猪链球菌可疑菌进行分离细菌的形态观察、生化试验、PCR检测、动物试验等, 综合判定: 此20株分离菌均为猪链球菌。攻毒试验显示, 攻毒后的小鼠, 剖检病变明显。药敏试验结果表明, 85%菌株对阿莫西林等药敏感, 45%菌株对先锋霉素V、先锋霉素VI等中度敏感。85%以上的菌株对大环内酯类、磺胺类、氯霉素类、喹诺酮类、林可胺类和四环素类等不敏感。

关键词:猪链球菌; PCR检测; 药敏试验; 动物试验

中图分类号: S852.61+1 文献标识码: B 文章编号: 0529-6005(2011)12-0073-03

猪链球菌病(Swine streptococcosis)是由多种链球菌感染引起的危害养猪业的一种国家规定的二类动物疫病。链球菌虽然抵抗力不强, 但由于抗生素的滥用, 易产生耐药性, 导致治疗失败^[1-2]。所以, 本试验通过对广东部分地区发病猪群猪链球菌可疑菌进行分离鉴定, 进而对其进行药敏试验, 为各猪场合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 HZQ-X100 振荡培养箱, 购自哈尔滨市东明医疗仪器厂; 电热恒温培养箱, 购自上海跃进医疗器械一厂; 基因扩增仪, 购自杭州博日科技有限公司; 稳压稳流电泳仪, 购自北京市六一仪器厂; 紫外透射分析仪, 购自珠海星马医学仪器有限公司。

1.2 试剂 新生牛血清, 托-休二氏液体培养基(THB), 托-休二氏培养基(THA), 细菌微量生化反应管, 药敏纸片和质控菌株, 均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.3 实验动物 18~20 g 雄性昆明系小鼠, 购自

广东省医学实验动物中心。

1.4 细菌分离培养 将疑似猪链球菌菌株 S1~S20 接种在 THB 培养基中, 置于 37℃ 振荡培养箱中培养 16~18 h 后, 在超净工作台中采用划线分离培养法用接种环挑取菌液接种于血平板上, 37℃ 培养 14~16 h, 经培养无杂菌者, 选取 α 溶血、光滑圆形、半透明、直径 1~2 mm 的小菌落, 每个样品挑去 3~6 个疑似菌落, 分别接种 3 mL THB 培养基中, 37℃ 培养 16~18 h 后, 仔细观察分离菌经培养后的生长情况, 并挑取单个可疑菌落和液体培养物分别作革兰染色镜检。

1.5 生化特性分析 无菌操作, 用移液枪分别吸取上述的各分离菌液各 100 μL 于 3 mL THB 培养液中, 置于 37℃ 振荡培养箱中培养 16~18 h 后, 分别做生长基水解试验和糖发酵试验。

1.6 药敏试验 按照纸片扩散法^[8]操作。对照质控菌株接种于 TSB 培养基中培养 OD₆₀₀ 值在 0.08~0.1 左右时进行药物敏感试验。

1.7 动物试验 将 70 只清洁级小鼠平均分为 7 组, 其中一组为生理盐水对照组。随机抽取 6 个分离株先接种普通血平板, 37℃ 培养 24 h 后, 挑取单菌落接种含 5% 犊牛血清的 THB 培养基中, 37℃ 培养 16 h。各菌平板法计数后, 调整菌液浓度至 3×10⁸ CFU/mL。每组腹腔接种 0.5 mL/只。观察记

收稿日期: 2010-12-29

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项项目(20080316); 国家自然科学基金联合资助基金重点项目(U0931002)

作者简介: 臧莹安(1971-), 女, 教授, 博士, 主要从事兽医临床及兽药研发教学与科研工作, E-mail: zya616@163.com

通讯作者: 李春玲, E-mail: lclclare@163.com

种抗病毒途径中均发挥了较好的作用, 关于大黄多糖抗 NDV 研究的仍无报道, 但与任宇皓等^[7]人对黄芪多糖, 淫羊藿多糖抗 NDV 活性评价比较, 大黄多糖抗 NDV 的治疗指数 4 高于黄芪、淫羊藿多糖先加多糖组的 3, 说明大黄多糖体外抗 NDV 活性很高, 具有研究价值。

参考文献:

- [1] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
[2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 3版. 北京: 北京科学出版社,

1997.

- [3] 赵燕, 刘莉, 杨兴斌, 等. 中药大黄多糖中单糖组成的毛细管区带电泳分析[J]. 分析化学研究简报, 2006(34): 255-258.
[4] 倪爱东, 严德江, 徐先祥. 大黄多糖的提取及含量测定[J]. 中国药业, 2007, 16(13): 10-13.
[5] 纪耀华, 纪跃芝, 马爱民, 等. 微波法提取大黄多糖最佳工艺优化研究[J]. 中药材, 2009, 9: 118-120.
[6] 李凡, 易世红, 赵春艳, 等. 双黄连粉针剂抗病毒作用[J]. 中草药, 2002, 33(1): 52-54.
[7] 任宇皓, 胡元亮. 黄芪多糖、淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮对 NDV, IBDV 活性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2000.