



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102038781 B

(45) 授权公告日 2012. 01. 11

(21) 申请号 201010553714. 7

(22) 申请日 2010. 11. 19

(83) 生物保藏信息

4274 2010. 10. 28

(73) 专利权人 北京市水产科学研究所

地址 100068 北京市丰台区永外角门路 18  
号

(72) 发明人 马志宏 罗琳 李铁梁 姜娜  
邢薇

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理  
有限公司 11006

代理人 梁挥 赵雁

(51) Int. Cl.

A61K 36/739 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

A61K 35/64 (2006. 01)

审查员 翟羽

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于抑菌的药物组合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于抑菌的药物组合物及其制备方法,其是由包括下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 1 ~ 5 份、地锦草 4 ~ 12 份、连翘 1 ~ 8 份。该组合物可有效地抑制致病性维罗纳气单胞菌,从而可用于该菌引起的鱼类细菌病的预防和治疗。本发明还提供了所述药物组合物在制备用于抑制维罗纳气单胞菌的药物中的应用。

1. 一种用于抑菌的药物组合物,主要由下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 1 ~ 5 份、地锦草 4 ~ 12 份、连翘 1 ~ 8 份。
2. 权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所用的原料药还选自 1 ~ 10 重量份的艾叶、黄连、大黄以及黄芩中的一种或多种。
3. 权利要求 1 或 2 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物是由包括下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。
4. 权利要求 1、2 或 3 所述药物组合物的制备方法,包括如下步骤:
  - 1) 将所述原料药粉碎后按比例混合;或者制备包含所述原料药的有效成分的醇提取液或者水提取液,然后按比例混合;以及
  - 2) 制成药学上可接受的制剂。
5. 权利要求 4 所述的制备方法,其中,在步骤 1) 中,将所述原料药微粉化后按比例混合。
6. 权利要求 1、2 或 3 所述的药物组合物在制备用于抑制维罗纳气单胞菌的药物中的应用。
7. 权利要求 1、2 或 3 所述的药物组合物在制备用于预防和 / 或治疗维罗纳气单胞菌感染引起的淡水水产动物细菌病的药物中的应用。
8. 权利要求 7 所述的应用,其中,所述淡水水产动物为淡水鱼类。
9. 权利要求 8 所述的应用,其中,所述淡水鱼类为鲟鱼。

## 用于抑菌的药物组合物及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及种药物组合物及其制备方法,尤其涉及种用于抑菌的药物组合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 鲟鱼属于目前地球上最古老和最原始的辐鳍鱼类,既是具有经济价值的优质珍稀鱼类,同时又具有重要的科研价值。西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 隶属于鲟科 (*Acipenseridae*) 鲟属 (*Acipenser*),是现存 26 种鲟类中的一种,主要分布于俄罗斯西部的鄂毕河至东部的科雷马河之间的西伯利亚各河流之中。西伯利亚鲟具有生长速度快、适应性强、肉质好、鱼籽酱品质高等优点,自 1996 年首次被中国引进后,目前其养殖量居中国鲟鱼养殖产量的第 2 位。

[0003] 鲟鱼养殖业近几年来发展非常迅猛,池塘养殖、网箱养殖和流水养殖都形成了一定规模。但随着鲟鱼集约化程度不断加强,养殖密度越来越大,高密度养殖不可避免地影响养殖对象的健康,使其感染疾病的机率大大增加,导致养殖病害频发,造成大量死亡,过高的死亡率还导致鲟鱼苗种价格过高,不但极大地提高了鲟鱼的养殖成本,还严重影响了鲟鱼养殖业的发展。随着鲟鱼养殖集约化程度越来越高,水质环境越来越差等诸多原因,北京、河北等地先后出现了西伯利亚鲟鱼和与其杂交的杂交鲟鱼的爆发性鱼病,该病主要发生在 6 ~ 9 月份,患病鲟鱼大量死亡,死亡率高达 65% 以上,且死亡速度较快。

[0004] 在导致鲟鱼死亡的原因中,存在着细菌感染、营养不均衡、养殖密度过高、养殖水质恶化、以及遗传等多种原因,其中细菌性疾病是引发鲟鱼爆发性鱼病的重要原因之一,对鲟鱼养殖业危害极大。马志宏等人(西伯利亚鲟致病性维氏气单胞菌的分离鉴定,微生物学报,2009,49(10):1289-1294)的研究表明,维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*,也称为维罗纳气单胞菌)为主要致病因子。目前大多采用各种化学药物治疗该病,然而化学药物不仅容易导致病原菌产生耐药性,而且因药物蓄积而导致的鱼体药物残留及水环境污染。

[0005] 中草药是我国特有的天然资源,是指对人、动物体具有治病作用的天然物。天然物中草药具有无毒、无副作用、无残留、无“三致”、无污染环境的优势,且具有抑菌杀菌、清热解毒、促进康复、增强非特异性免疫功能等作用(谢仲权等,天然物中草药饲料添加剂大全,学苑出版社,3-21)。中草药所含成分十分复杂,常用的提取方法(如煎煮法、回流法、浸渍法等)在提取有效成分方面,存在着损失大、周期长、工序多、提取率不高等缺点。近年来,在中药提取方面出现了许多新工艺<sup>[10]</sup>,这些新工艺的应用,使得中草药提取既符合传统的中医理论,又能达到提高有效成分的收率和纯度的目的。中药提取新工艺对提高中药制剂的质量,加快新药开发起着至关重要的作用,因此应根据不同中药的成分选择合适的提取工艺将会更好的发挥药效。

[0006] 建立在传统中医药理论和现代药剂学基础上的天然中草药,具有原料多样,成分复杂的特点。其中既有蛋白质、氨基酸、糖类、脂类、维生素和微量元素等营养物质,又含有生物碱类、黄酮类、挥发油类、鞣质、色素、皂甙等多种生物活性物质。因此,既有营养功能,

又具有促进机体糖代谢、蛋白质和酶的合成、提高抗原抗体反应,调节免疫机能、缓解应激、改善体内色素和风味物质沉积,以及特异和非特异抑菌杀菌等功能,中草药不但在体外显示了对细菌有很强的杀灭作用,而且在体内也可以通过提高机体的免疫力,间接地杀灭病原体。这种多成分、多功能特点使得天然中草药添加剂更能符合动物机体脏腑功能的相互协调和整体统一规律,其作用的全面性比其他单一化学添加剂不能比拟的。

[0007] 国内已有学者研究过中草药对人类和畜禽常见致病菌的抑菌试验,证明了中草药具有不同程度的抑菌作用(李建志,刘旭红,杨丽珍等,11种中草药抗菌作用实验研究,中医药信息,200926(3):82-83;姜新发,中草药提取物对水生动物常见病原菌的体外抑菌试验,饲料工业,200526(22):28-29;高汉娇,陈昌福,21种中草药对嗜水气单胞菌的试管内抑菌作用,水利渔业,1996(4):16~17;夏薛梅,裴春,中草药对大肠埃希氏菌的抑菌试验,中兽医学杂志,1998(3):5-7)。但是关于中草药提取物对鲟鱼维罗纳气单胞菌的抑菌效果研究报道很少。

[0008] 中国专利申请 200910264841.2 公开了一种抑制嗜水气单胞菌的植物提取物组方。该组方包括五倍子提取物(50%-80%)、茶多酚(10%-30%)、大黄提取物(5%-15%)。

[0009] 中国专利申请 200610095165.7 公开了一种复方五倍子渔用抗菌剂配方,其组分及含量为:五倍子 20 份、穿心莲 20 份、苦参 15 份、黄柏 15 份。该药剂具有广谱抗菌作用,有效防治温和气单胞菌等常见致病菌引起的水产动物细菌性疾病。

[0010] 目前为止,尚未见到关于抑制鲟鱼维罗纳气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的中草药组合物的研究报道。

## 发明内容

[0011] 针对现有技术存在的问题,本发明的一个目的在于提供一种用于抑菌的有效中草药药物组合物,该组合物可有效地抑制致病性维罗纳气单胞菌(*Aeromonas veronii*),从而可用于该菌引起的鱼类细菌病的预防和治疗。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供所述药物组合物的制备方法。

[0013] 本发明的还一个目的在于提供所述药物组合物在制备用于抑制维罗纳气单胞菌的药物中的应用。

[0014] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种用于抑菌的药物组合物,其是由包括下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 1~5 份、地锦草 4~12 份、连翘 1~8 份。

[0015] 所述药物组合物还可进一步包括适量重量份(例如,1~10 重量份)的以下原料药中的一种或多种:艾叶、黄连、大黄以及黄芩。

[0016] 在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合物是由下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。

[0017] 由于体外抗菌试验表明该药物组合物对维罗纳气单胞菌有明显的抑制作用,因此该药物组合物可用于该菌引起的淡水水产动物细菌病的预防和治疗。

[0018] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了所述药物组合物的制备方法,其包括如下步骤:

[0019] 1) 将所述原料药粉碎后按比例混合 ;或者制备包含所述原料药的有效成分的提取液,然后按比例混合 ;以及

[0020] 2) 制成药学上可接受的制剂。

[0021] 在上述方法中,优选在步骤 1) 之前进一步包括如下步骤 :

[0022] 采用维罗纳气单胞菌 (*Aeromonas veronii*, CGMCC4274) 来筛选所述原料药的比例。

[0023] 在上述方法中,在步骤 1) 中,优选将所述原料药微粉化后按比例混合。

[0024] 根据本发明的还一个方面,本发明提供了所述药物组合物在制备用于抑制维罗纳气单胞菌的药物中的应用。

[0025] 本发明还提供了所述药物组合物在制备用于预防和 / 或治疗维罗纳气单胞菌感染引起的淡水水产动物细菌病的药物中的应用。

[0026] 本发明具有以下优点 :采用本发明的药物组合物得到的中草药提取物,分别对维罗纳气单胞菌的体外抑菌活性进行了研究,并筛选出优势组方,提供了一种有效应用于水产动物养殖病害防治的中药组合物,该组合物可特别应用于鲟鱼细菌病的防治,由此降低水产动物细菌性疾病给渔业生产造成的危害以及经济损失。

## 附图说明

[0027] 图 1 :预防性实验 10 日攻毒累计成活率比较图。

[0028] 以下具体实施方式是对本发明的进一步解释与阐明,并不限制本发明的范围。

## 具体实施方式

[0029] 本发明人选择大量单味中药进行鱼类细菌性疾病的抑菌试验,从中获得抑菌效果好的单味药,用其不同种类、数量、比例进行组方,再采用抑菌效果试验从多种复方中筛选出抑菌效果最好的复方。本发明人还进行了本发明组合物的体内药效学和毒理试验,因此提高了其在生产应用中的有效性和安全性。

[0030] 本发明所提供的用于抑菌的药物组合物是由包括下列重量份的原料药制备得到 :五倍子 1 份、地榆 1 ~ 5 份、地锦草 4 ~ 12 份、连翘 1 ~ 8 份。

[0031] 优选地,本发明所提供的用于抑菌的药物组合物是由包括下列重量份的原料药制备得到 :五倍子 1 份、地榆 1 ~ 3 份、地锦草 6 ~ 10 份、连翘 2 ~ 6 份。

[0032] 五倍子,又名百虫仓、百药煎、楸子,为同翅目蚜虫科的角倍蚜或倍蛋蚜雌虫寄生于漆树科植物“盐肤木”及其同属其他植物的嫩叶或叶柄,刺伤而生成种囊状聚生物虫瘿,经烘倍干燥后所得。

[0033] 地榆,又名黄瓜香、山地瓜、猪人参、血箭草,为蔷薇科地榆属植物地榆的干燥根。

[0034] 地锦草,又名草血竭、血见愁草、小虫儿卧单等,为大戟科植物地锦,夏、秋二季采收,除去杂质,晒干。主治 :清热解毒 ;利湿退黄 ;活血止血。主痢疾 ;泄泻 ;黄疸 ;咳血 ;吐血 ;尿血 ;便血 ;崩漏 ;乳汁不下 ;跌打肿痛及热毒疮疡等。

[0035] 连翘,又名黄花条、连壳、青翘、落翘、黄奇丹等,果实入药。连翘是清热解毒的中药,主治热病初起,风热感冒,发热,心烦,咽喉肿痛,急性肾炎等。

[0036] 体外抑菌效果试验结果表明,本发明的复合方剂的抑菌活性和 MIC 较单味药均有

不同程度的增强,这表明这四味药在抗菌活性方面具有协同作用。

[0037] 体外抑菌效果试验结果还表明,中草药抑菌效果最好的是五倍子,其 MIC 是  $0.97 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。其次是地榆和黄芩,两者的 MIC 均是  $1.95 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。艾叶、黄连、大黄、地锦草和连翘的抑菌效果次之,它们的 MIC 均为  $7.81 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。因此,本领域技术人员可以理解,本发明的药物组合物还可进一步包括适量重量份(例如,1~10 重量份)的以下原料药中的一种或多种:艾叶、黄连、大黄以及黄芩。

[0038] 本发明的药物组合物可与其它种类的中药组合使用,或者与诸如抗生素的西药组合使用,以在实际生产中达到更好的治疗或者预防效果。

[0039] 根据实际需要,本发明的药物组合物可有选择地与适当的辅料相混合,进一步制成合适的剂型,例如颗粒剂、片剂等。

[0040] 在本发明的一个优选实施方案中,所述药物组合物是由下列重量份的原料药制备得到:五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。该比例的组方对维罗纳气单胞菌有明显的抑制作用,可有效地应用于防治水产养殖病害。

[0041] 由于体外抗菌试验表明该药物组合物对维罗纳气单胞菌有明显的抑制作用,因此该药物组合物可用于该菌引起的淡水水产动物细菌病的预防和治疗。

[0042] 本发明所提供的所述药物组合物的制备方法包括如下步骤:

[0043] 1) 将所述原料药粉碎后按比例混合;或者制备包含所述原料药的有效成分的提取液,然后按比例混合;以及

[0044] 2) 制成药学上可接受的制剂。

[0045] 在步骤 1 之前还可包括采用维罗纳气单胞菌 (*Aeromonas veronii*, CGMCC4274) 来筛选所述原料药的比例的步骤。

[0046] 所述粉碎可为粗粉碎,例如粉碎至 80 目,或者可为微粉化粉碎,达到 300 目以上。

[0047] 在上述方法中,所述提取液可为醇提取液或者水提取液,优选为水提取液。

[0048] 所述药学上可接受的制剂可为固体制剂,例如颗粒剂、微粉化制剂等。

[0049] 可将原料药粉碎或微粉化后按比例直接混合。例如,所述微粉化制剂可采用以下方法制备:用球磨粉碎机把各种中草药分别进行微粉化处理,达到 300 目以上,按比例进行混合。

[0050] 或者,可首先用各原料药分别制备包含有效成分的各提取液,然后将所述各提取液按对应的原料药的重量比例进行混合,利用现有技术中的工艺进行浓缩、干燥,获得干燥提取物。

[0051] 所述水提取液可采用以下方法制备:取中草药各 50g 分别加入 500ml 无菌蒸馏水,浸过中药液面,浸泡 30min 后,煮沸,沸后用文火再煮 1h,过滤药液,收集滤液。药渣加水 500ml,煮沸后煎 30min,过滤药液;合并 2 次药液,文火浓缩至 50ml。

[0052] 在用于鱼病预防或治疗时,例如,可将各中药的粗粉碎颗粒(例如 80 目)或微粉(例如 200 目以上)按总比例拌料投喂,例如添加量 5%。每天投喂两次药饵,上下午各 1 次,连喂 7 天,7 天为一个疗程。

[0053] 本发明的药物组合物可应用于制备用于抑制维罗纳气单胞菌的药物,因此可应用于制备用于预防和/或治疗维罗纳气单胞菌感染引起的淡水水产动物细菌病的药物。所述淡水水产动物包括淡水鱼类等,例如鲟鱼。

[0054] 以下为本发明的优选实施例,其中所用原材料如无特别说明,均为市售购买产品。

[0055] 制备实施例 1 药物组合物的制备

[0056] 1、处方:

[0057] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。

[0058] 2、工艺:

[0059] 用球磨粉碎机把各种原料药分别进行微粉化处理,达到 200 目,按比例进行混合。

[0060] 制备实施例 2 药物组合物的制备

[0061] 1、处方:

[0062] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。

[0063] 2、工艺:

[0064] 用球磨粉碎机把各种原料药分别进行微粉化处理,达到 300 目,按比例进行混合。

[0065] 制备实施例 3 药物组合物的制备

[0066] 1、处方:

[0067] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 1 份、地锦草 4 份、连翘 1 份。

[0068] 2、工艺:

[0069] 同制备实施例 2。

[0070] 制备实施例 4 药物组合物的制备

[0071] 1、处方:

[0072] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 5 份、地锦草 12 份、连翘 8 份。

[0073] 2、工艺:

[0074] 同制备实施例 2。

[0075] 五倍子 1 份、地榆 1 ~ 5 份、地锦草 4 ~ 12 份、连翘 1 ~ 8 份。

[0076] 制备实施例 5 药物组合物的制备

[0077] 1、处方:

[0078] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 3 份、地锦草 6 份、连翘 4 份。

[0079] 2、工艺:

[0080] 同制备实施例 2。

[0081] 制备实施例 6 药物组合物的制备

[0082] 1、处方:

[0083] 原料药(重量份):五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。

[0084] 2、工艺:

[0085] 取上述原料药各 50g 分别加入 500ml 无菌蒸馏水,浸过中药液面,浸泡 30min 后,煮沸,沸后用文火再煮 1h,过滤药液,收集滤液。药渣加水 500ml,煮沸后煎 30min,过滤药液;合并 2 次药液,文火浓缩至 50ml,得到各提取液。将各提取液按体积比 1 : 2 : 8 : 4(对应于各原料药的重量比)混合,浓缩、喷雾干燥,获得干燥提取物。

[0086] 效果实施例 1 体外抑菌实验

[0087] 1 材料和方法

[0088] 1.1 材料

[0089] 1.1.1 试验选取的中药材:生艾叶、柴胡、黄连、五倍子、马齿苋、贯众、青蒿、生山

楂、蒲公英、白头翁、黄柏、杜仲、大青叶、双花、陈皮、栀子、生地榆、鱼腥草、大黄、苦参、龙胆草、乌梅、山豆根、黄芩、三棵针、地锦草、穿心莲、知母、黄芪、连翘、板兰根、甘草、石菖蒲等中草药,购自北京金象大药房。

[0090] 1.1.2 试验菌种:维罗纳气单胞菌 (*Aeromonas veronii*)X-1-06909(保藏号:CGMCC. No. 4274,保藏日期:2010年10月28日,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)),以下简称维罗纳气单胞菌 CGMCC4274。已对菌种进行了形态、染色性、生理生化反应和 16S rRNA 基因序列分析等鉴定(参见:西伯利亚鲟致病性维氏气单胞菌的分离鉴定,微生物学报,2009,49(10):1289-1294)。

[0091] 1.1.3 主要试剂和仪器:普通营养琼脂培养基、普通营养肉汤培养基购自于北京奥博星生物技术有限公司。NaCl 购自于北京化学试剂公司。微波炉(G80F23N1P-M8CS0 格兰仕)。高压灭菌锅(YXQ-LS-50S 上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。生化培养箱(HPS-280 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。冰箱(BCD-215KAGA 海尔)。摇床(THZ-C 江苏太仓市实验设备厂)。电炉(3593 天津市泰斯特仪器有限公司)。纯水器(F6EN61663 法国 MILIPORE)。电子天平(1712 德国 Sartorius)。烘箱(101 型北京利康)。生物安全柜(96220 美国 BAKER)及玻璃器皿等。

[0092] 1.2 中草药提取物的制备:取上述 33 种中草药各 50g 分别加入 500ml 无菌蒸馏水,浸过中药液面,浸泡 30min 后,煮沸,沸后用文火再煮 1h,用 4 层纱布过滤药液,收集滤液。药渣加水 500ml,煮沸后煎 30min,过滤药液;合并 2 次药液,文火浓缩至 50ml(此时中草药原药浓度为 1g/ml),即为 100% 中药原液。高压灭菌后置 4℃ 冰箱中保存待用。

[0093] 1.3 体外抑菌试验

[0094] 1.3.1 制备菌悬液:用接种针挑取 1 环琼脂固体培养基上的维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 到 5ml 营养肉汤培养基中,37℃ 180rpm,恒温振荡培养过夜。然后取经过夜培养的菌液 5 $\mu$ l 加到 5ml 营养肉汤培养基中(即菌液浓度 1:1000 稀释),37℃,180rpm,恒温振荡培养 6h,即可做为试验菌。同时,用 0.7% 无菌生理盐水进行 10 倍稀释菌液,分别取 10<sup>-6</sup>,10<sup>-7</sup> 和 10<sup>-8</sup> 浓度的稀释菌液 0.1ml 涂布,做三个平行,37℃ 倒置培养过夜,进行菌落计数。最后计算出试验菌的浓度约在 4.6x 10<sup>9</sup>cfu/ml。

[0095] 1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定:采用中药抗菌实验试管法,见实验方法列表 1。取无菌试管 44 支,分成 4 组,每组 11 支。每种中草药做 3 组平行试验和 1 组阴性对照组(即只加药不加菌)。前 3 组每管加营养肉汤培养基 2.5ml,第 1 管加所 2.5ml 试药液混匀后,使 1-10 管均含有倍比稀释的药液(即 1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256,1:512,1:1024,1:2048)。第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、11 管每管加菌液 125 $\mu$ l,加完上述各种实验材料后充分混匀,然后放入恒温振荡培养箱中,经 37℃,180rpm,恒温振荡培养 24h。观察实验结果。药液对照管以第 10 管无细菌生长,菌液对照管第 11 管有细菌生长,实验方为有效。以抑制试验菌生长的药液最高稀释度为该中药对该试验菌的抗菌效价。以能抑制试验菌生长的最高稀释度为最低抑菌浓度 MIC。

[0096] 表 1 中药抗菌试验

[0097]



成分与 药品含 量	试管号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
含药肉 汤 (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
各管中 含中药 原液稀 释度	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	0
含药量 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.97	0.48	0
菌液 ( $\mu\text{l}$ )	125	125	125	125	125	125	125	125	125	0	125

[0098] 1.3.3 组方试验:传统中药按君、臣、佐、使不同药效将多种原料进行组方,使各种药材的有效成分联为一体,发挥整体复合作用,以达到中医整体治疗的目的。按中药配伍原则,并根据中草药提取物对维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 的最低抑菌浓度 (MIC) 的结果,我们最后实验筛选出五倍子、地榆、地锦草和连翘四种中药。按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,各因素和水平见表 2。抑菌试验采用打孔法。试验菌培养方法如 1.3.1,经计算试验菌浓度为  $4.3 \times 10^8 \text{cfu/ml}$ 。在灭菌好的营养琼脂培养基上加 0.1ml 维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 菌液,用涂布棒均匀涂布在培养基表面。然后每个平板打 3 个直径 6mm 的圆孔。往每个圆孔里滴加 0.1ml 不同浓度的组方药物。30℃ 培养 24h 后,测量平板上中药抑菌圈直径的大小。每个试验组方设计 6 个重复,结果取平均值。

[0099] 表 2 正交试验因素水平表

[0100]

水平	因素			
	A	B	C	D
1	1×MIC	1×MIC	1×MIC	1×MIC
2	2×MIC	2×MIC	2×MIC	2×MIC
3	4×MIC	4×MIC	4×MIC	4×MIC
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

[0101] 2 结果

[0102] 2.1 中草药提取物的最低抑菌浓度

[0103] 结果见表 3。从试验结果可以看出:33 种中草药提取物对维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 均表现出不同的抑菌活性,且 MIC 为  $0.97\text{--}250\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。其中中草药抑菌效果最好的是五倍子,其 MIC 是  $0.97\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。其次是地榆和黄芩,两者的 MIC 均是  $1.95\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。艾叶、黄连、大黄、地锦草和连翘的抑菌效果次之,它们的 MIC 均为  $7.81\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。而马齿苋和苦参的 MIC 最低,仅为  $250\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

[0104] 表 3 中草药提取物对维罗纳气单胞菌的最小抑菌浓度的检测结果

[0105]

中草药	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$								
	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.97
生艾叶	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++
柴胡	---	---	-+_	+++	+++	+++	+++	+++	+++
黄连	---	---	---	---	---	---	+__	+++	+++
五倍子	---	---	---	---	---	---	---	---	---
马齿苋	---	+++	-++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
贯众	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
青蒿	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
生山楂	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++
蒲公英	---	---	---	---	++_	+++	+++	+++	+++
白头翁	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
黄柏	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
杜仲	---	---	---	---	++_	+++	+++	+++	+++
大青叶	---	---	---	++_	+++	+++	+++	+++	+++
双花	---	---	---	---	_++	+++	+++	+++	+++
陈皮	---	---	---	_+-	+++	+++	+++	+++	+++
栀子	---	---	-++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
地榆	---	---	---	---	---	---	---	---	+++
鱼腥草	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
大黄	---	---	---	---	---	---	+++	+++	+++
苦参	---	+++	-++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
龙胆草	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++	+++
乌梅	---	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++
山豆根	---	---	---	---	+++	+++	+++	+++	+++

[0106] “+”表示有细菌生长“-”表示无细菌

[0107] 2.2 优化组方结果:采用正交设计,确定四种中草药的最佳组合,结果见表 4。由表 4 可以看出,对维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 抑制效果影响因素的排序为  $A > B > D > C$ , 因素 A 和 B 在复方中对维罗纳气单胞菌的抑制作用起着主要作用。综合考虑各因素水平,确定抑制维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 的最优配方组合为:  $A_3B_3D_2C_3$ 。

[0108] 表 4L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 中草药对维罗纳气单胞菌的抑制效果的正交试验结果

[0109]

试管号	A	B	C	D	
	五倍子	地榆	连翘	地锦草	抑菌圈直径
	( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	(mm)
1	0.97	1.95	7.81	7.81	
2	1.95	3.91	15.63	15.63	
3	3.91	7.81	31.25	31.25	
1	1	1	1	1	12.16
2	1	2	2	2	13.67
3	1	3	3	3	15
4	2	1	2	3	14.5
5	2	2	3	1	14.67
6	2	3	1	2	15.83
7	3	1	3	2	17
8	3	2	1	3	16.33
9	3	3	2	1	17
K <sub>1</sub>	40.83	43.66	44.32	43.83	
K <sub>2</sub>	45	44.67	45.17	46.5	
K <sub>3</sub>	50.33	47.83	46.67	45.83	
k <sub>1</sub>	13.61	14.55	14.77	14.61	
k <sub>2</sub>	15	14.89	15.06	15.5	
k <sub>3</sub>	16.78	15.94	15.56	15.28	
R	3.17	1.39	0.79	0.89	

[0110] 3 讨论

[0111] 本发明采用水煎煮法提取天然物中草药有效成分,采用试管法测定各提取物对维罗纳气单胞菌的最低抑菌浓度,最后通过正交试验确定了 4 种中草药提取物体外抑菌的最优组方。结果表明 33 种中草药提取物对维罗纳气单胞菌均表现出不同的抑菌活性,其中中草药抑菌效果最好的是五倍子,其 MIC 是  $0.97 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。其次是地榆和黄芩,两者的 MIC 均是  $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。而马齿苋和苦参的 MIC 最低,仅为  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。抑制维罗纳气单胞菌的最优组方为五倍子、地榆、地锦草和连翘的比是 1 : 2 : 4 : 8。因此,五倍子、地榆、地锦草和连翘的组方对维罗纳气单胞菌有明显的抑制作用,可进一步应用于中草药防治水产养殖病害。

[0112] 利用试管稀释法,不仅可以看出较精细的测得某种药物的药性强,还可看出同种药物在某个浓度下对维罗纳气单胞菌抑制和杀伤作用最强。而在以前纸片扩散法中,抑菌

圈的直径受纸片所含药量的影响,使得不同药物之间的抑菌圈直径大小的比较存在一定的局限性。相比较而言,试管稀释法更具有准确性。在测定 MIC 时,由于中药原液有颜色,清晰度差,容易影响试验结果的判断,本试验中所设的阴性对照并非常规的培养基对照而是含有药液的培养基,以消除上述不利因素的影响,确保结果判断的准确性。

[0113] 从所得的结果中可以看出,五倍子、地榆、黄芩、连翘、地锦草、艾叶、黄连和大黄的抑菌圈直径大,最小抑菌浓度低,其 MIC 为  $0.97-7.81 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。按照中药配伍原则,我们选用以五倍子为主设计了五种组方,按照正交试验设计进行上述组方的抑菌试验,根据试验结果,筛选得到由五倍子、地榆、地锦草、连翘组成的复合方剂。此复合方剂的抑菌活性和 MIC 较单味药均有不同程度的增强。这表明这四味药在抗菌活性方面具有协同作用。

[0114] 效果实施例 2 本发明中药组合物对鲟鱼细菌病的预防或治疗效果试验

[0115] 1.1 微粉化制剂的制备

[0116] 准备以下重量比的原料药:五倍子 1 份、地榆 2 份、地锦草 8 份、连翘 4 份。用球磨粉碎机把各种中草药原料分别进行微粉化处理,达到 300 目以上。各中药微粉按占总饵料重量的 5% 添加比例拌料投喂。

[0117] 1.2 中草药制剂在鲟鱼暴发性细菌病防治中使用的有效性评价

[0118] 1.2.1 预防性试验:

[0119] 1.2.1.1 试验方法

[0120] 实验分为 3 个处理:对照组 (C),添加中草药粉碎粒度 80 目 (F-80) 和 300 目 (F-300) 组,添加量 5% 重量,替代对照组中的面粉。每个处理 4 个重复,每桶 15 尾鲟鱼,初始体重 150g 左右。每天投喂两次药饵,上下午各 1 次,连喂 7 天,7 天为一个疗程。隔一个星期后(期间喂对照组饲料),再进行一个疗程的投喂。两个疗程结束后取样测定生长指标和非特异性免疫指标。两个疗程结束取样后,剩下的鱼用维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 进行背鳍基部攻毒,测定中草药对其抗病力的影响。

[0121] 1.2.1.2 试验结果与结论

[0122] 实验结果见表 5 和图 1。图 1 为示出预防性实验 10 日攻毒累计成活率的比较图表。

[0123] 表 5 预防性实验结果

[0124]

项目	饲料 (Diets)		
	C	F-80	F-300
感染成活率 Survival Rate (%)	$86.67 \pm 2.72^a$	$96.67 \pm 1.92^b$	$98.33 \pm 1.67^b$
溶菌酶 (LYZ,U/ml)	$366.67 \pm 81.01$	$327.50 \pm 67.23$	$321.67 \pm 66.02$
补体(C3,U/ml)	$239.98 \pm 19.36$	$237.71 \pm 48.60$	$236.16 \pm 45.62$
NBT(OD Value)	$0.36 \pm 0.01^b$	$0.34 \pm 0.01^{ab}$	$0.32 \pm 0.01^a$
髓过氧化物酶 MPO(U/L)	$527.53 \pm 109.46^a$	$895.46 \pm 73.71^b$	$300.15 \pm 55.86^a$

[0125] 注:每一行上标字母不同表示有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

[0126] 从表 5 中结果可见,各组的非特异性免疫指标间差异不大,说明各组在接触到致

病菌之前处于免疫稳态,但从感染后的成活率来看,添加中草药组合物的实验组的成活率要高于对照组,且 F80 和 F300 组与对照组之间有显著差异,说明该中草药组合物对鲟鱼维罗纳气单胞菌病有一定的保护力,且 F300 的作用强于 F80。

[0127] 1.2.2 治疗性试验:

[0128] 1.1.2.1 试验方法

[0129] 实验分为 3 个处理:对照组 (C),添加中草药粉碎粒度 80 目 (F-80) 和 300 目 (F-300) 组。每个处理 4 个重复,每桶 20 尾鲟鱼,初始体重 150g 左右。所有实验鱼均先用维罗纳气单胞菌 CGMCC4274 进行感染,感染浓度为  $3.7 \times 10^5$  CUF/ml,注射剂量 0.2ml,期间饲喂对照组饲料,观察 10 日后,取肝脏样品分离菌种,保存在试管中待鉴定。存活的鱼就在实验桶中开始投喂各组试验饲料。添加量 5% 重量,每天投喂两次药饵,上下午各 1 次,连喂 7 天,7 天为一个疗程。隔一个星期后(期间喂对照组饲料),再进行一个疗程的投喂。两个疗程结束后,每个重复取鱼 3 尾测定生长指标和非特异性免疫指标。

[0130] 1.2.2.2 试验结果与结论

[0131] 实验结果见表 6。

[0132] 表 6 治疗性实验结果

[0133]

饲料编号			
项目	C	F-80	F-300
终末存活率	33.33 ± 13.88 <sup>a</sup>	53.33 ± 7.70 <sup>b</sup>	45.00 ± 8.33 <sup>b</sup>
溶菌酶 (LYZ,U/ml)	571.11 ± 86.61	470.00 ± 64.26	651.11 ± 415.7
补体(C3,U/ml)	250.61 ± 49.90	226.45 ± 48.39	208.18 ± 28.05
NBT(OD Value)	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.01
髓过氧化物酶MPO(U/L)	531.80 ± 207.94	1058.08 ± 521.56	631.64 ± 315.51

[0134] 注:每一行上标字母不同表示有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

[0135] 从表 6 中结果可见,各组的非特异性免疫指标之间均无显著差异,但对于一个药物的评价,最有力的证据就是感染后的存活率。在用致病菌感染并经过两个疗程的治疗后,中草药组的终末存活率明显高于对照组,因此说明该中草药组合物对鲟鱼的维罗纳气单胞菌病有一定的治疗效果。

### 预防性实验10日攻毒累计成活率

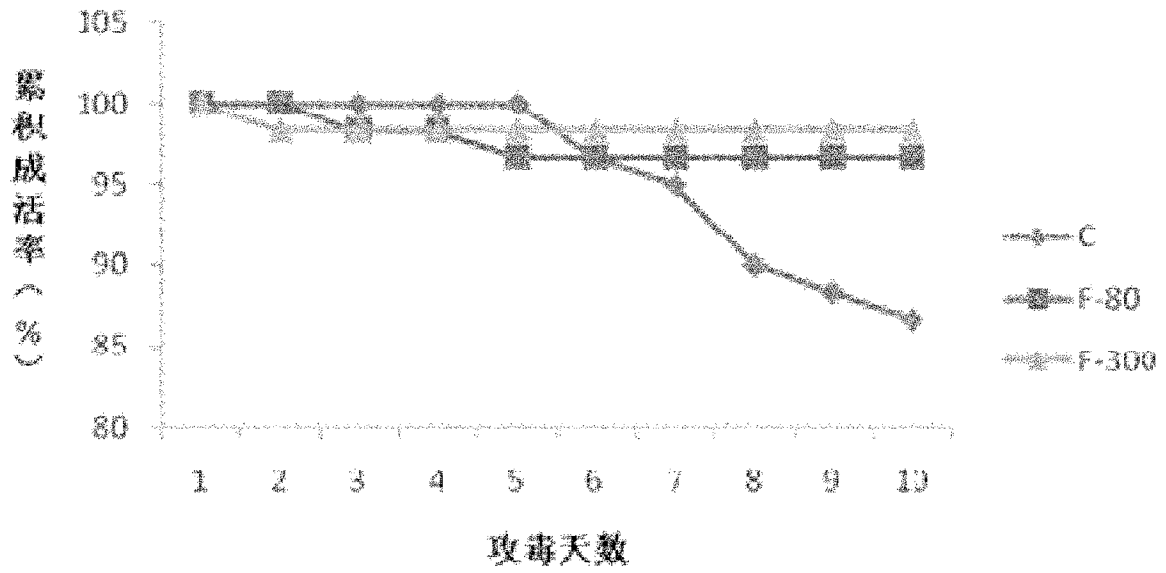


图 1