

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.08

穿梅三黄散超微粉和极细粉显微特征 及药效学比较研究

喻运珍^{1,2}, 余少梅², 张立强^{1,2}, 李娟³, 邓平^{1,2}, 罗杨志¹, 高银爱², 丁运敏⁴

(1. 武汉市农业科学院, 武汉 430207; 2. 武汉中博水产生物技术有限公司, 武汉 430207;

3. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 4. 武汉市武湖农业发展有限公司, 武汉 430334)

[收稿日期] 2019-07-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 12-0038-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了考察穿梅三黄散超微粉和极细粉的显微特征及药效区别, 通过生物显微镜和扫描电镜对超微粉和极细粉显微特征进行观察, 通过体外抑菌试验和饲喂试验对药效进行考察。穿梅三黄散经超微粉碎后, 粉末粒径更小, 失去常见的显微鉴别特征; 超微粉对 3 种水产致病菌(嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌和肠型点状气单胞菌)的最小抑菌浓度(MIC)均小于极细粉; 穿梅三黄散能够降低试验草鱼血清中 AST、ALT 酶活性及肝组织中 MDA 含量, 提高试验草鱼肝组织中 CAT、SOD 及 GSH-PX 酶活性, 且作用效果优于极细粉($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。穿梅三黄散超微粉能够显著提高抑菌能力及鱼类肝脏抗损伤能力。

[关键词] 穿梅三黄散; 超微粉; 显微特征; 最小抑菌浓度(MIC); 肝脏抗损伤能力

Comparative Study on the Microscopic Characteristics and Efficacy between Ultrafine and Very Fine Powder of Chuanmei Sanhuang San

YU Yun-zhen^{1,2}, ZHANG Li-qiang^{1,2}, LI Juan³, DENG Ping^{1,2}, LUO Yang-zhi¹,
GAO Yin-ai², DING Yun-min⁴, YU Shao-mei^{1*}

(1. Wuhan Academy of Agriculture Science & Technology, Wuhan 430207, China;

2. Wuhan Chopper Fishery Bio-Tech Co., Ltd., Wuhan 430207, China;

3. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

4. Wuhan Wuhu Agricultural development CO., Ltd., Wuhan 430207, China)

Abstract: The study was aimed to compare the microscopic characteristics and efficacy between ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San. The microscopic characteristics were observed with microscope and scanning electron microscope. And the efficacy were investigated by vitro antibacterial experiment and feeding experiment. The powder size of ultrafine powder was smaller and the common characteristics of microscopic identification disappeared. Ultrafine powder had smaller MIC on *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*

基金项目: 武汉市农科院财政示范项目(Czsf201803)。

作者简介: 喻运珍, 正高职高工, 从事中草药鱼药研发工作。

and *Aeromonas punctata f. intestinalis*. The activities of ALT, AST and the level of MDA were decreased significantly, and the activities of SOD, CAT, GSH - Px were increased significantly compared with the blank control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and ultrafine powder had better effects than the very fine powder. Ultrafine powder of Chuanmei Sanhuang San could improve the antibacterial activity and protection of hepatic tissue of fish.

Key words: Chuanmei Sanhuang San; ultrafine powder; microscopic characteristic; MIC; protection of hepatic tissue

穿梅三黄散是由大黄、黄芩、黄柏、穿心莲、乌梅五味药材粉碎加工而成的,具有清热解毒功能,用于治疗鱼类细菌性败血症、肠炎、烂鳃与赤皮病^[1]。通常产品是经普通粉碎,粉末粒度在 80 ~ 120 目(150 ~ 180 μm)之间。中草药极细粉粉末粒度在一般在 150 目(90 μm)在 200 目(75 μm)之间^[2]。超微粉一般指细胞级微粉,利用机械或流体动力方法,将 3 mm 以上的中草药颗粒,加工成 30 μm 以下粒径的粉散剂,一般粒径为 5 ~ 47 μm ,细胞破壁率达 95% 以上。与传统粉散剂比较,中草药超微粉具有有效成分释放快、生物利用率高、临床作用效果显著等特点^[3]。研究以穿梅三黄散为研究对象,比较了 1000 目超微粉和 200 目极细粉之间显微特征及药效学差异,旨在为穿梅三黄散超微粉应用提供试验数据参考。

1 材 料

1.1 药材 大黄、黄芩、黄柏、穿心莲、乌梅,均购自安徽旭松中药饮片有限公司,经公司质检部门按照《中华人民共和国兽药典 2015 年版二部》鉴定合格。穿梅三黄散由以上 5 种药材按比例粉碎混合而成,穿梅三黄散超微粉,委托山东埃尔派粉体科技股份有限公司生产,过 1000 目筛;穿梅三黄散极细粉为本公司自行粉碎生产,过 200 目筛。

1.2 菌株 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)和肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata f. intestinalis*)为实验室保存菌种。

1.3 试验动物 草鱼,购置于江夏山坡某养殖户,50 $\pm$ 5 g,置于网箱中暂养一周。

1.4 试验试剂 营养肉汤培养基和 Shieh 营养肉汤培养基购自青岛高科园海博生物技术有限公司。

1.5 主要仪器 BM1000 生物显微镜(南京江南永新光学有限公司);JFC - 1600 真空离子溅射镀膜仪、JSM - 6510LV 扫描电镜(日本电子公司);Chemray 240 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技);2HP - 100 生化培养箱(上海苏进仪器设备厂)。

2 方 法

2.1 显微观察 生物显微镜观察:取少量粉末,水合氯醛透化,于生物显微镜下观察粉末特点^[4]。

电镜观察:取适量样品,用导电银胶粘在样品台上,经镀膜仪喷金后,于扫描电子显微镜下观察^[5]。

2.2 抑菌试验^[6-7]

2.2.1 菌液配制 将嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌和肠型点状气单胞菌分别接种于营养肉汤培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,取培养液配制成 0.5 麦氏浊度的菌液备用。将柱状黄杆菌接种于 Shieh 营养肉汤培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h,取培养液配制成 0.5 麦氏浊度的菌液备用。

2.2.2 药液配制 采用倍比稀释法。将穿梅三黄散紫外照射灭菌后,用无菌水配制 768 mg/mL 母液。取 9 支灭菌试管,第 1 管中加入 5 mL 肉汤培养基,2 ~ 8 管加入 3 mL;取 1 mL 母液至第 1 管中,混匀后吸取 3 mL 至第 2 管,混匀吸取 3 mL 至第 3 管,依次类推至第 7 管,混匀后,吸取 3 mL 弃去。1 ~ 7 管穿梅三黄散浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2 mg/mL。第 8 管为肉汤对照,第 9 管为药液对照。

2.2.3 最小抑菌浓度(MIC)测定 分别吸取 100 μL 菌液加至 1 ~ 8 管中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察,没有细菌生长的最小浓度为最小抑菌浓度(MIC)。每种试验药物设 3 组平行,MIC 结果取其平均值。

2.3 饲喂试验

2.3.1 试验分组及处理 试验在 2 m×2 m×1.5 m 网箱中进行,分为三组,对照组、超微粉组和极细粉组,每组投放 30 尾草鱼。对照组投喂普通市售饲料,用药组投喂拌药饲料,饲料添加量为 20 g/kg,每日投喂 3 次,连续投喂 10 d。

2.3.2 样品采集及指标测定^[8] 试验结束时,每组取草鱼 6 尾,尾静脉采血,4 ℃ 下静置 1 h 后 3000 r/min 离心 10 min,取上清得到血清;取肝脏制成 10% 组织匀浆。血清用于测定谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 含量;肝组织匀浆用于测定

过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH - PX) 含量。AST、ALT 采用自动生化测定仪进行测定,组织中 CAT、MDA、SOD、GSH - PX 采用南京建成试剂盒测定。

3 结果与分析

3.1 显微观察 穿梅三黄散极细粉在生物显微镜下可以观察到五味药材的各种特有特征 (图 1a - g),而超微粉几乎观察不到任何细胞形态 (图 1h),其药物特有的特征均消失。

在扫描电镜下可以观察到,穿梅三黄散超微粉 (图 2b) 粉体粒径更小,粒径分布更加均匀。

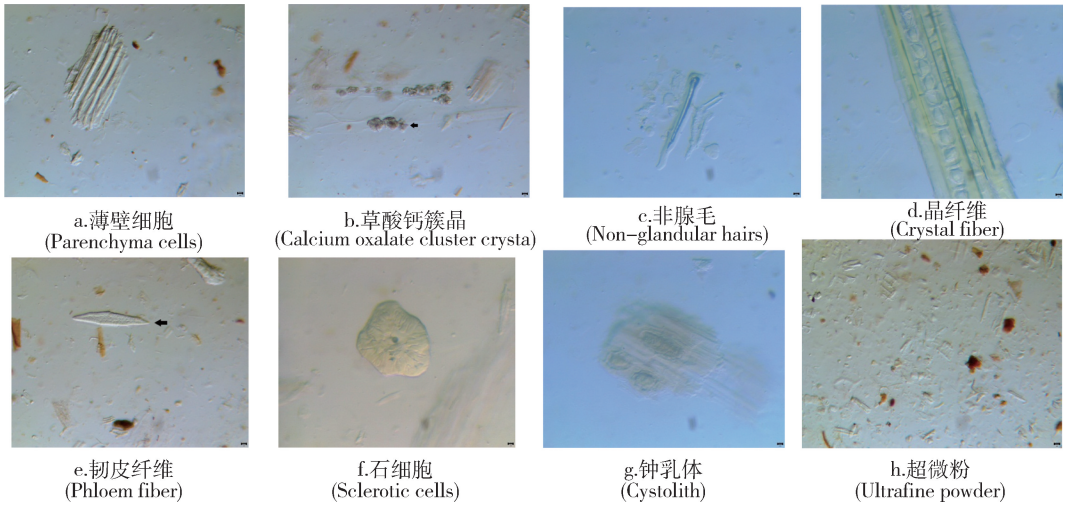
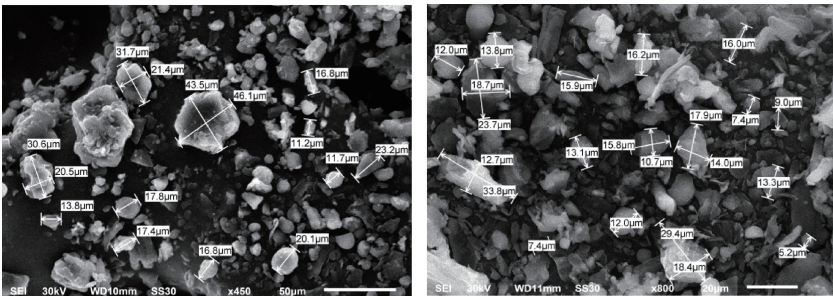


图 1 穿梅三黄散超微粉和极细粉普通显微镜观察 (×100)

Fig 1 Microscopic characteristics of ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San observed by microscope (×100)



a: 极细粉样品 (×450) a: Very fine powder (×450); b: 超微粉样品 (×800) b: Ultrafine powder (×800)

图 2 穿梅三黄散超微粉和极细粉扫描电镜观察

Fig 2 Microscopic characteristics of ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San observed by scanning electron microscope

3.2 抑菌试验 由表 1 可以看出,穿梅三黄散超微粉和极细粉对嗜水气单胞菌的 MIC 分别为 32 和 64 mg/mL,柱状黄杆菌为 32 和 64 mg/mL,肠型点状气单胞菌为 8 和 32 mg/mL,超微粉对各致病菌的 MIC 均小于极细粉,其中对嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌的 MIC 是极细粉的 1/2,对肠型点状气单胞菌的 MIC 是极细粉的 1/4。说明穿梅三黄散超微粉浸出液对 3 种致病菌的抑菌效果优于极细粉。

表 1 穿梅三黄散超微粉和极细粉对 3 株细菌的最小抑菌浓度 (MIC)

Tab 1 MIC of ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San on three bacteria			
分组 Group	最小抑菌浓度 mg/mL MIC		
	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium cloumnare</i>	肠型点状气单胞菌 <i>Aromonas punctata f. intestinalis</i>
超微粉 Ultrafine powder	32	32	8
极细粉 Very fine powder	64	64	32

3.3 饲喂试验 由表 2 及表 3 可以看出,拌饲投喂穿梅三黄散后,血清中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、丙二醛 (MDA) 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中超微粉组小于极细粉组,具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明饲喂穿

梅三黄散能够降低试验草鱼血液中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 酶活性及肝组织中丙二醛 (MDA) 含量。

过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH - PX) 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中超微粉组显著高于极细粉组 ($P < 0.05$),表明饲喂穿梅三黄散能够提高试验草鱼肝组织中过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH - PX) 酶活性。

表 2 穿梅三黄散超微粉和极细粉对血清中 AST 和 ALT 影响

Tab 2 Effects of ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San on AST and ALT in serum		
组别 Group	AST (U/L)	ALT (U/L)
对照组 Control	125.42 ± 15.26 ^{aA}	32.86 ± 5.85 ^{aA}
极细粉组 Very fine powder	100.30 ± 13.84 ^{bA}	24.52 ± 4.66 ^{bAB}
超微粉组 Ultrafine powder	80.08 ± 13.93 ^{cB}	15.98 ± 2.66 ^{cB}

注: 同一列中上标字母表示显著性,小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$),大写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$),字母相同表示无显著性差异。下表同。
Note: In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$). Values with same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as bellow.

表 3 穿梅三黄散超微粉和极细粉对肝脏组织中 SOD、CAT、GSH - PX 和 MDA 的影响

Tab 3 Effects of ultrafine and very fine powder of Chuanmei Sanhuang San on liver tissue SOD, CAT, GSH - Px, MDA				
组别 Group	MDA (nmol/mgprot)	CAT (U/mgprot)	SOD (U/mgprot)	GSH - PX (U/mgprot)
对照组 Control	1.12 ± 0.31 ^{aA}	0.58 ± 0.26 ^{cB}	211.57 ± 50.54 ^{cB}	369.11 ± 14.55 ^{cB}
极细粉组 Very fine powder	0.73 ± 0.22 ^{bAB}	1.14 ± 0.49 ^{bAB}	302.71 ± 63.84 ^{bAB}	421.63 ± 47.59 ^{bAB}
超微粉组 Ultrafine powder	0.44 ± 0.19 ^{cB}	1.82 ± 0.48 ^{aA}	437.19 ± 106.53 ^{aA}	523.17 ± 84.46 ^{aA}

4 讨论与结论

穿梅三黄散超微粉对 3 种鱼类致病菌的最小抑菌浓度均小于极细粉, 抑菌作用显著优于极细粉。这是因为药物粒子的大小和粉体的结构是影响药物溶出度的重要因素。穿梅三黄散经超微粉碎, 粉碎更充分, 粉末粒径更小(图 2), 有效成分更易溶出。一般情况下, 中草药中有效成分需要经过浸润、溶胀、渗透和分散才能溶出, 采用超微粉碎工艺消除阻力能够加快溶出速率、溶出量^[9]。蔡萍等研究发现, 超微粉碎技术可以显著加快五苓散中桂皮醛的体外溶出率^[10]。张国祖等在研究中发现, 在相同浸泡条件下, 扶正解毒散超微粉中, 淫羊藿苷的浸出量比普通粉平均提高了 115%, 水溶性浸出物提高了 17%, 总糖提高 31%^[11]。研究中, 体外抑菌试验间接反映了穿梅三黄散有效抑制菌成分溶出度高于极细粉, 与以上研究结果一致。

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是肝细胞受到损伤的敏感指标, 肝细胞受损时, 血液中酶活性升高; 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - PX)是机体内重要的抗氧化酶, 肝细胞受损时, 酶活性降低; 而丙二醛(MDA)是脂质过氧化的终产物, 其含量变化间接反映了机体脂质过氧化水平和肝细胞损伤程度, 肝细胞受到损伤时, 丙二醛(MDA)含量升高^[12]。研究中发现穿梅三黄散能够降低谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)酶活性, 降低丙二醛(MDA)含量, 提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - PX)酶活性, 说明穿梅三黄散能够改善鱼类的肝脏状况, 提高肝脏抗损伤能力, 其中超微粉作用效果优于极细粉。

中草药经过细胞破壁后有效成分完全释放出来, 由于超微粉颗粒粒径小, 因此具有表面效应、体积效应等特性, 对物质的吸附性增大, 有利于畜禽机体对药物的吸收利用, 因而治疗效果有质的飞跃^[13]。顾建明等^[14]研究发现, 0.5% 中药超微粉能显著促进肉鸡免疫器官发育, 提高机体免疫功能, 且可达到 1% 中药粗粉的效果。李荣誉等^[15]分别

观察了三七、元胡、大黄超微粉对小白鼠的凝血、镇痛和肠蠕动作用的影响, 超微粉作用效果优于普通粉, 均得出本研究相似结论。

综上所述, 穿梅三黄散超微粉能够显著提高抑菌能力及鱼类肝脏抗损伤能力。由于大多数水生动物没有胃, 肠道相对较短, 简单粉碎的中草药在水生动物体内留存时间短, 利用率低, 有的药材有效成分还没有释放出来就被排出体外, 造成极大的浪费。经超微粉碎后, 药物粉体活性进一步增强, 溶出率提高, 有效成分能够较快的进入鱼体, 发挥作用, 药效增强。因此, 中草药超微粉在水生动物疫病防治上具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二部, 2015 年版[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The second volume of Veterinary Pharmacopoeia of The People's Republic of China, 2015 Edition[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二部, 2015 年版, XI[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The second volume of Veterinary Pharmacopoeia of The People's Republic of China, 2015 Edition, XI[S].
- [3] 金尔光, 陈洁, 何斌, 等. 中草药超微粉在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(9): 60 - 64. Jin E G, Chen J, He B, et al. Research advances in herbal superfine powder on animal production[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(9): 60 - 64.
- [4] 刘永录, 张国祖, 李宇伟, 等. 大黄超微粉和普通粉显微特征比较研究[J]. 中兽医医药杂志, 2010, 4: 20 - 22. Liu Y L, Zhang G Z, Li Y W, et al. Comparative study on the microscopic characteristics of ultrastructural powder and common grinding powder of Rhubarb[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2010, 4: 20 - 22.
- [5] 李莎, 程灿, 马晓晶, 等. 九香虫及相似品的对比鉴别研究[J]. 中药材, 2019, 42(3): 536 - 541. Li S, Chen C, Ma S J, et al. Comparative identification of *Aspongopus chinensis* dallas and its similar substances[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(3): 536 - 541.
- [6] 陈福艳, 黄婷, 张彬, 等. 氟苯尼考单用及联用对爱德华氏菌的体外抑菌试验[J]. 广西农业科学, 2010, 41(8): 841 - 844. Chen F Y, Huang T, Zhang B, et al. In vitro inhibition of flor-

- fenicol against *Edwardsiella ictaluri* alone and in combination with other drugs[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(8): 841–844.
- [7] 聂颢蓉,郑曙明,仇登高. 12 种中药有效成分对 3 株水产致病细菌体外抑菌试验[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(6): 141–144.
- Nie L R, Zheng S M, Qiu D G. Antibacterial experiment of 12 Chinese herbs active ingredient on 3 bacteria from the aquatic products *in vitro*[J]. Journal of Hydroecology, 2010, 3(6): 141–144.
- [8] 杜金梁,贾 睿,曹丽萍,等. 虎杖提取物对 CCl₄致建鲤肝损伤抗氧化系统的影响[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(5): 1008–1013.
- Du J L, Jia R, Cao L P, *et al.* Effects of antioxidant system of polygonum cuspidatum extract against CCl₄ – induced liver injury in Jian Carp[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(5): 1008–1013.
- [9] 李 伟,李 茜,张海英. 不同粒径参芎散超微粉和细粉溶出度比较[J]. 中医药导报, 2016, 22(6): 58–62.
- Li W, Li Q, Zhang H Y. Comparison of dissolution of Shenli Powder fine powder and its different particle size ultrafine powder[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2016, 22(6): 58–62.
- [10] 蔡 萍,严方艳,肖 娟,等. 五苓散细粉与超微粉的质量控制及溶出度对比研究[J]. 中药制剂与分析, 2015, 35(6): 14–16.
- Cai P, Yan F Y, Xiao J, *et al.* The comparative studies of quality control and dissolution rate between superfine powder and fine powder of Wuling San[J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2015, 35(6): 14–16.
- [11] 张国祖,王 林,于 瑞,等. 不同条件对扶正解毒散及其超微粉有效成分溶出影响的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医科技版, 2013, 6: 148–150.
- Zhang G Z, Wang L, Yu R, *et al.* Effects of different conditions on the dissolution of effective components in Fuzheng Jiedu powder and its ultrafine powder[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013, 6: 148–150.
- [12] 熊文静,余少梅,袁改玲,等. 姜黄浸膏散对 CCl₄所致小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(2): 425–427.
- Xiong W J, Yu S M, Yuan G L, *et al.* Protective effect of extract powder of turmeric on CCl₄ induced acute hepatic injury in mice[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(2): 425–427.
- [13] 连晓娟. 穿心莲超微粉的质量标准及稳定性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- Lian X J. The study on quality standard and stability of *Andrographis* Ultrafine Powders[J]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [14] 顾建明,王巧红,吕朝辉,等. 复方中药超微粉对肉鸡免疫功能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2015, 6: 43–46.
- Gu J M, Wang Q H, Lv Z H, *et al.* Effect of traditional Chinese medicine compound superfine powder on immune function of broilers[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2015, 6: 43–46.
- [15] 李荣誉,张国祖,杨彩霞,等. 3 种中药超微粉的药理作用观察[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(12): 134–136.
- Li R Y, Zhang G Z, Yang C X, *et al.* The observation on pharmacological action of three Chinese herbal ultra – fine powder[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2008, 35(12): 134–136.

(编辑:陈 希)