

银杏酚酸杀灭鱼类病原菌和指环虫的研究^{*}

王高学¹, 赵云奎¹, 姚嘉赞¹, 申烨华², 郑伟², 王建华¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西北大学 化学系, 陕西 西安 710069)

[摘要] 提取银杏外种皮中的银杏酚酸, 测定了其含量, 并对其杀灭鱼类病原菌和指环虫的活性进行了研究。结果表明, 分离物中银杏酚酸的总含量为 867 mg/g, 各单体 C₁₅-1, C₁₇-1, C₁₃-0, C₁₅-0, C₁₇-2 的相对含量分别为 499, 226, 201, 32 和 29 mg/g; 银杏酚酸对鱼害粘球菌的最低抑菌浓度 (MIC) 和最低杀菌浓度 (MBC) 均为 7.81 μg/mL, 对鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌 3 株病原菌无明显的抑制效果, 其 MIC 和 MBC 值均大于 1 000 μg/mL; 银杏酚酸对指环虫的最佳杀虫浓度为 1.70 mg/L, 48 h 杀灭率达 95%~100%; 其质量浓度为 3.5 mg/L 时试验金鱼开始出现中毒现象, 48 h 的死亡率为 60%。

[关键词] 银杏酚酸; 抑菌活性; 指环虫; 杀虫活性

[中图分类号] S943

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)10-0011-05

银杏外种皮是银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 果仁的皮层, 由于其开发利用不足而被大量废弃, 造成了资源的浪费。银杏外种皮与银杏果、银杏叶所含成分相似, 主要有银杏酚酸、银杏黄酮、银杏内酯、多糖以及氨基酸等^[1-2], 其中以银杏酚酸含量略高。有研究表明, 银杏酚酸具有较强的抑菌和杀菌作用^[3], 能杀灭部分农业害虫^[4-5], 并对某些农作物致病细菌、真菌具有抑制作用^[6-7]。所以, 目前银杏外种皮提取物主要应用于生物农药领域, 国内外目前尚无应用于水产领域的报道。为了充分利用银杏外种皮资源, 本试验对银杏酚酸类物质杀灭鱼类病原菌和指环虫 (*Dactylogyrus*) 的活性进行了研究, 以期为进一步分离有效活性单体和开发无公害新渔药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品 银杏外种皮采自江苏省泰兴市, 在 60℃ 干燥粉碎后 4℃ 保存备用。

1.1.2 供试菌种和动物 鱼害粘球菌 (柱状黄杆菌) (*Flavobacterium columnare*, 编号 G4)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*, 编号 E-3-11)、点状产气单胞菌点状亚种 (*Aeromonas punctata* sub. *punctata*, 编号 XP91-4-1)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, 编号 ST78-3-3) 均由中国科学院水生生物研究所

鱼病室细菌组提供; 动物寄主模型金鱼 (*Carassius auratus*), 体重小于 3 g; 寄生虫模型为中型指环虫 (*D. intemedius*), 由西北农林科技大学鱼病实验室分离、金鱼活体保存。

1.1.3 主要试剂及仪器 银杏酚酸标准品购于中国药品生物制品检定所, 银杏总酚酸含量为 99%, 组成为 C₁₃-0, C₁₅-1, C₁₇-2, C₁₅-0 和 C₁₇-1; 薄层层析硅胶 GF₂₅₄ (化学纯, 青岛海洋化工有限公司); 柱层析硅胶 (分析纯, 50~75 μm 和 75~150 μm, 青岛海洋化工有限公司); 大连依利特 230 高效液相色谱仪及紫外可见检测器; RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 回流提取装置。

1.2 方法

1.2.1 银杏酚酸的分离 取银杏外种皮粉 2 kg, 用工业酒精在 75℃ 条件下热回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩, 常温蒸干, 得银杏外种皮粗提物 664 g。再将所得粗提物用石油醚反复萃取, 合并萃取液, 减压浓缩, 常温蒸干, 得石油醚萃取物浸膏 327.6 g。取浸膏 100 g, 湿法装柱, 干法上样, 用玻璃柱进行硅胶 (50~75 μm) 柱层析分离, 以氯仿/甲醇 (体积比) 梯度洗脱, 收集 (每 200 mL 1 个流份)、合并主要在 254 nm 处显强蓝紫色荧光的流份^[8], 减压浓缩后将合并物再用玻璃柱进行硅胶 (75~150 μm) 柱层析分离, 以石油醚/乙酸乙酯 (体积

^{*} [收稿日期] 2006-07-31

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目 (2002B08); 陕西省山川秀美办公室世行贷款项目区专项

[作者简介] 王高学 (1965-), 男, 副教授, 在读博士, 主要从事生物工程制药研究。E-mail: wanggaixue@126.com

比)梯度洗脱,每100 mL 收集1个流份,用薄层层析色谱(TLC)法,以银杏酚酸标准品为对照,以 V (石油醚) V (乙酸乙酯) V (醋酸)=70 30 1的混合液作为展开剂进行鉴别,合并与银杏酚酸标准品图谱一致的流份,挥干备用。

1.2.2 银杏酚酸的定性鉴别 采用高效液相色谱(HPLC)法对柱层析分离物和银杏酚酸标准品进行定性鉴别。采用优化的色谱流动相,组成为 V (甲醇)

V (4% HAc 溶液)=93 5 6 5,色谱柱为Hyper ODS-2 C_{18} (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μ m)柱,紫外检测波长310 nm,流速3.0 mL/min,柱温35 $^{\circ}$ C。

1.2.3 银杏酚酸的含量测定 准确称取银杏酚酸标准品40 mg,用无水甲醇溶解定容至10 mL,用0.45 μ m Whatman 一次性针头过滤器过滤,再分别配制成浓度为4,3,2,2,4,1.6和0.8 mg/L 的标准溶液进行HPLC 分析,色谱条件同1.2.2,每个标准溶液平行测定3次。

图谱数据采用N 2000 型色谱工作站数据处理系统(浙江大学智能信息研究所研制)进行处理,求其峰面积平均值,得标准曲线(图1),其线性回归方程为 $Y = 311.93X + 205.12$ ($r^2 = 0.9991$)。

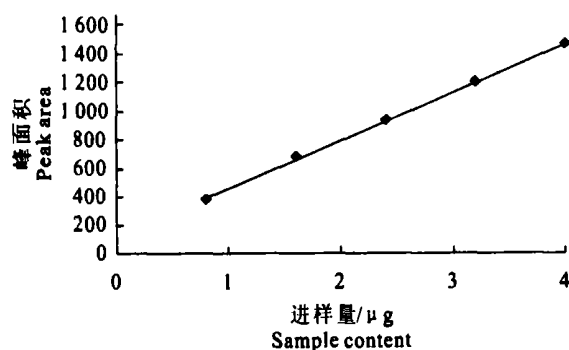


图1 银杏酚酸标准回归曲线

Fig 1 Standard curve of ginkgolic acids

准确称取0.38 mg 分离的银杏酚酸,用无水甲醇溶解,定容至100 mL,经0.45 μ m Whatman 一次性针头过滤器过滤后进行HPLC 分析,进样量为20 μ L,平行测定3次,求其峰面积平均值,根据标准曲线求出银杏酚酸的总含量和各个组分相对含量。

1.2.4 银杏酚酸抑菌活性测定 以甲醇为溶剂溶解银杏外种皮提取物、石油醚萃取物和分离的银杏酚酸,分别配制成1 000 μ g/mL 的药液。鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌均采用普通营养肉汤培养,鱼害粘球菌采用粘细菌培养基培养,

试验前调节4株菌的菌悬液浓度为 10^5 /mL。

采用试管连续倍比稀释法^[8]测定3个样品对4株病原菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。其判定标准为:24 h 后肉汤没有浑浊的试管中的样品浓度为该样品对试验细菌的最低抑菌浓度;48 h 后肉汤没有浑浊的试管再分别取样,接种于琼脂平皿中,25 $^{\circ}$ C 培养,若无菌落生长,则该试管样品浓度为该样品对试验细菌的最低杀菌浓度。并设阳性、阴性和甲醇对照组。

1.2.5 银杏酚酸杀灭指环虫活性的测定 采用文献[9]方法进行指环虫杀灭活性测定。在5 L 的塑料盆中盛入充分暴气的地下水,其pH 为7.0~7.5,控制水温为(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C;用甲醇分别溶解银杏外种皮粗提物、石油醚萃取物和分离的银杏酚酸,均配成50 mg/L 的药液,按浓度梯度设置测试的样品浓度,分别加入盛有5 L 水的盆中,混匀;当预先感染了中型指环虫的金鱼鳃部平均寄生50个寄生虫时,随机捞取10尾分别投放入加药的水盆中;在48 h 时制片、显微观察,并统计中型指环虫的消失、脱落数量(视为死亡),与对照组比较计算出寄生虫平均杀灭率。

金鱼用药后如果出现侧身游、沉底、浮头、反应迟钝乃至死亡现象,视为药物中毒。试验重复3次,并设空白对照组。

2 结果与分析

2.1 银杏酚酸的定性鉴定

HPLC 分析结果表明,柱层析分离物HPLC 色谱图(图2)与银杏酚酸标准品HPLC 色谱图(图3)基本一致,均含有5种银杏酚酸单体物质,出峰顺序分别为 C_{13-0} , C_{15-1} , C_{17-2} , C_{15-0} 和 C_{17-1} ,证实分离物为银杏酚酸。此外,样品图中除银杏酚酸峰外,几乎没有杂峰出现,说明硅胶柱层析基本可以将银杏酚酸与其他物质分开,且分离效果较好。

2.2 银杏酚酸的含量测定

通过HPLC 对分离的银杏酚酸进行分析,将所得的峰面积平均值代入回归方程,求得分离物中银杏酚酸的总含量为867 mg/g,各单体的相对含量分别为: C_{15-1} 499 mg/g, C_{17-1} 226 mg/g, C_{13-0} 201 mg/g, C_{15-0} 32 mg/g, C_{17-2} 29 mg/g。

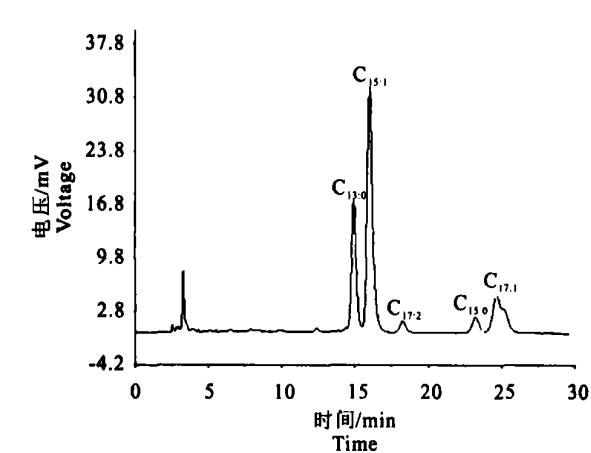


图 2 银杏酚酸样品的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC analysis of purified ginkgolic acids from exopleura of *Ginkgo biloba*

2 3 银杏酚酸的抑菌活性测定

银杏外种皮提取物、石油醚萃取物和分离的银杏酚酸对 4 株细菌的抑制效果见表 1。由表 1 可知, 银杏外种皮提取物、石油醚萃取物和分离的银杏酚酸对鱼害粘球菌具有很好的抑制作用, 银杏外种皮提取物的最低抑菌浓度 (MIC) 为 18.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最低

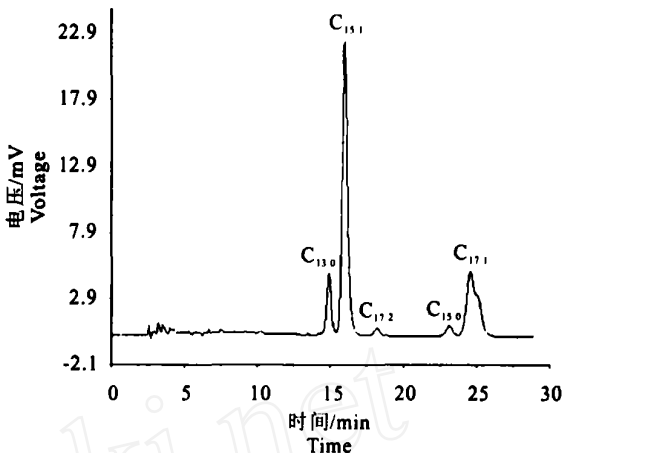


图 3 银杏酚酸标准品的 HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC analysis of standard ginkgolic acids

杀菌浓度 (MBC) 为 37.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 石油醚萃取物的 MIC 和 MBC 均为 13.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 分离的银杏酚酸样品的 MIC 和 MBC 也相同, 均为 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 但其对鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌 3 株病原菌无明显的抑制效果, MIC 和 MBC 值均大于 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 银杏酚酸对 4 株细菌的抑菌效果

菌株 Pathogens	Table 1 Antibacterial effects of ginkgolic acids $\mu\text{g}/\text{mL}$					
	银杏外种皮提取物 Crude extract from <i>Ginkgo biloba</i>		石油醚萃取物 Extract of petroleum ether		银杏酚酸样品 Purified ginkgolic acids	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
鱼害粘球菌 <i>Flavobacterium columnar</i>	18.75	37.50	13.28	13.28	7.81	7.81
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000
点状产气单胞菌点状亚种 <i>Aeromonas punctata</i> sub. <i>punctata</i>	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000	> 1 000

2 4 银杏酚酸杀灭指环虫活性测定结果

从表 2 知, 银杏外种皮提取物、石油醚萃取物和银杏酚酸 3 种样品杀灭指环虫的最低有效浓度范围分别为 2.0~4.0, 2.0~3.0, 0.0~0.5 mg/L ; 对试验金鱼的致毒浓度分别为 16.0, 8.0 和 3.5 mg/L , 金鱼 48 h 的致死率分别为 10%, 20% 和 60%; 3 种样品杀灭指环虫的最佳浓度范围分别为 10.0~12.0, 5.0~6.0 和 1.5~2.5 mg/L 。

按照表 2 结果, 对 3 种样品进一步进行了药效测定试验, 以确定杀灭指环虫的最低有效浓度和最佳浓度。3 种样品最低有效浓度测定时, 银杏外种皮提取物设定的浓度水平为 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 和 4.0

mg/L , 石油醚萃取物为 2.3, 2.5, 2.7 和 2.9 mg/L , 银杏酚酸为 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 和 0.50 mg/L 。测定结果表明: 银杏外种皮提取物杀灭指环虫的最低有效浓度为 3.0 mg/L , 在该浓度下其 48 h 的杀灭率为 10%; 石油醚萃取物的最低有效浓度为 2.5 mg/L , 杀灭率达 30%; 银杏酚酸样品的最低有效浓度为 0.25 mg/L , 杀灭率达 20%。

在 3 种样品杀灭指环虫最佳浓度测定时, 银杏外种皮提取物设定的浓度水平为 10.5, 11.0, 11.5 和 12.0 mg/L , 石油醚萃取物为 5.1, 5.3, 5.5, 5.7 和 5.9 mg/L , 银杏酚酸样品为 1.5, 1.7, 1.9, 2.1, 2.3 和 2.5 mg/L 。测定结果表明: 银杏外种皮提取物的

最佳杀虫浓度为 11.0 mg/L , 48 h 杀灭率达 100%; 灭率为 98%~100%; 银杏酚酸样品的最佳杀虫浓度为 5.5 mg/L , 48 h 杀灭率为 95%~100%。

表2 各样品 48 h 对中型指环虫的杀灭效果

Table 2 Killing effect of plants extraction on the *D. intemedius*

药品 Drug	试验浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Tested concentration	寄生虫杀灭率/% Killing rate	鱼中毒平均死亡率/% Heaverage death rate of toxic fish
银杏外种皮提取物 Extract from <i>Ginkgo biloba</i>	2.0	0	0
	4.0	25	0
	6.0	52	0
	8.0	70	0
	10.0	95	0
	12.0	100	0
	14.0	100	0
	16.0	100	10
石油醚萃取物 Extract of petroleum ether	1.0	0	0
	2.0	0	0
	3.0	35	0
	4.0	68	0
	5.0	95	0
	6.0	100	0
	7.0	100	0
	8.0	100	20
银杏酚酸样品 Purified ginkgolic acids	0.5	30	0
	1.0	60	0
	1.5	95	0
	2.0	98	0
	2.5	100	0
	3.0	100	0
	3.5	100	60
	4.0	100	100
	4.5	100	100

3 讨 论

本试验采用硅胶柱层析法对银杏外种皮提取物中的银杏酚酸进行了分离, 通过 HPLC 对分离样品进行了纯度检测和含量测定。结果表明, 所分离的银杏酚酸与银杏酚酸标准品液相色谱图一致, 其含量可达 867 mg/g , 说明该方法进行银杏酚酸的分离是可行的, 并且可以获得大量高纯度的银杏酚酸, 以便于对其进行生物活性的测定。

银杏外种皮提取物、石油醚萃取物和分离的银杏酚酸样品的抑菌、杀虫试验结果表明, 酚酸样品的抑菌、杀虫活性明显高于银杏外种皮提取物和石油醚萃取物, 说明银杏酚酸是银杏外皮中的主要活性成分, 此结果拓宽了银杏酚酸的利用领域。

通过对水产动物 4 株病原菌的抑菌试验发现, 银杏酚酸对鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种和嗜水气单胞菌无抑制作用, 而对鱼害粘球菌的抑制作用较强。鱼害粘球菌主要引起鱼的烂鳃病, 烂鳃病是水产动物的主要病害之一, 给渔业生产造成了很大

的经济损失, 测试结果表明, 银杏酚酸对鱼粘球菌的 MIC 为 $7.81 \mu\text{g/mL}$, 其浓度为 $3.5 \mu\text{g/mL}$ 时金鱼开始出现中毒现象。但在实际生产中, 福建福清市养殖鳊鱼时使用银杏外种皮提取物制剂, 当银杏酚酸浓度为 $1 \sim 2.5 \mu\text{g/mL}$ 时, 其能够有效预防鳊鱼烂鳃病, 这可能是由于在该浓度范围内, 银杏酚酸首先杀灭了鱼鳃部的寄生拟指环虫, 避免了鱼鳃部病理现象的发生及其继发性细菌感染的缘故。

本研究结果表明, 银杏酚酸对鱼类的中型指环虫具有显著的杀灭作用, 其杀灭指环虫的最低有效剂量为 0.25 mg/L , 而最佳杀虫浓度为 1.70 mg/L , 杀灭率达 95%~100%, 且杀虫浓度与鱼出现中毒浓度的差距较大, 表明银杏酚酸是一种应用前景良好的生物杀虫渔药。

银杏酚酸具有较强的生物活性, 其是 6-烷基或 6-烯基水杨酸的衍生物, 主要有 C_{13-0} , C_{15-1} , C_{17-2} , C_{15-0} 和 C_{17-15} 5 种组分, 有必要进一步分离出这 5 种成分, 测定其杀菌、杀虫活性, 从而为开发新的渔药提供研究资料。

[参考文献]

- [1] 唐于平, 楼凤昌, 王 欢, 等. 银杏外种皮的化学成分和药理作用[J]. 药学进展, 2000, 24(3): 152-155
- [2] 臧 丽, 李英华, 倪力军, 等. 银杏酚酸的研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(7): 331-333
- [3] 赵成林. 银杏外种皮中酸性成分的提取及药用探讨[J]. 中草药, 1997, 28(4): 250-251
- [4] 王 杰, 祝树德, 余碧钰, 等. 银杏外种皮提取物对菜青虫抑制生长与拒食活性的研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 23(1): 72-72
- [5] 郭春霞, 傅大熙, 周铜水, 等. 银杏外种皮中银杏酚酸对小菜蛾幼虫的拒食及毒杀作用[J]. 复旦大学学报: 自然科学版, 2004, 43(2): 255-259, 266
- [6] 倪学文, 杨志坚, 吴谋成. 银杏外种皮中银杏酚酸的分离和抑菌试验[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(6): 30-32
- [7] 吴向阳, 仰榴青, 陈 钧, 等. 银杏酸单体制备及其抗菌活性[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(4): 17-21
- [8] Gelleman J L, Schlenk H. Methods for isolation and determination of anacardic acids[J]. Analytical Chemistry, 1968, 40(4): 739-743
- [9] 王高学, 徐 钰, 王建华, 等. 29 种天然植物提取物对指环虫杀灭作用的研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(3): 3-8

Study on killing activity of ginkgolic acids to pathogen and dactylogyrus of fish

WANG Gao-xue¹, ZHAO Yun-kui¹, YAO Jia-yun¹, SHEN Ye-hua², ZHENG Wei², WANG Jian-hua¹

(1 College of Animal Science and technology, Northwest A & F University, Shaanxi, Yangling 712100, China;

2 Department of Chemistry, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: Ginkgolic acids was obtained from exotesta of *Ginkgo biloba* by means of silica gel column chromatogram, and its contents were detected by HPLC. The results show that the content of ginkgolic acids was 867 mg/g in the purified substance, and the relative percentage contents were respectively 201, 499, 29, 32 and 266 mg/g for C₁₃, C₁₅, C₁₇, C₁₉ and C₂₁. The measured results of biologic activity indicated that both MIC and MBC of purified ginkgolic acids were 7.81 μg/mL to *Flavobacterium columnare*, there were no obvious interfering effects of ginkgolic acids on *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas punctata* sub. and *Aeromonas hydrophila*, its MIC and MBC were over 1 000 μg/mL. The best killing concentration of ginkgolic acids was 1.70 mg/L, the killing rate was from 95% to 100% in 48 hours, but when its concentration was over 3.5 mg/L, *Carassius auratus* tested appeared toxic, and the death rate attained 60% in 48 hours.

Key words: ginkgolic acids; antibacterial activity; dactylogyrus; killing activity