

博落回生物碱的抑菌作用研究

赵东亮, 郁建平*, 周晓秋, 孟祥斌, 吴建章
(贵州大学生化营养研究所, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以20%的甲醇作溶剂, 盐酸小檗碱及青霉素做对照, 将博落回碱, 盐酸血根碱, 盐酸小檗碱配成9600 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 并测定了这三种物质对常见的5种细菌的抑菌效力(抑菌圈直径)及最低抑菌浓度(MIC)。结果表明, 这三种物质具有不同程度的抑菌效力, 其中盐酸血根碱具有很强的广谱抑菌作用。

关键词: 盐酸血根碱; 博落回碱; 盐酸小檗碱; 青霉素; 抑菌活性

Antibacterial Effect of the Sanguinarine Hydrochloride and Bocconoline from *Macleaya cordata*

ZHAO Dong-liang, YU Jian-ping*, ZHOU Xiao-qiu, MENG Xiang-bin, WU Jian-zhang
(Institute of Biochemistry and Nutrient, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The antibacterial effects of sanguinarine hydrochloride, bocconoline and berberine hydrochloride from *Macleaya cordata* were studied. With the five species of bacterium, the antibacterial effects were tested for the minimal inhibitory concentration (MIC) and the antibacterial effects (the diameter of the antibacterial circle) of the three materials from *Macleaya cordata*. The results showed that the three materials had antibacterial effect on the tested five bacterium, but sanguinarine hydrochloride had far more strong and extensive antibacterial effect.

Key words: sanguinarine hydrochloride, bocconoline, berberine hydrochloride, Penicillin, antibacterial effect

中图分类号: Q946.88

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)01-0045-03

食品安全问题是关系到人民健康和国计民生的重大问题。我国在基本解决食物量的同时, 食物质的安全越来越引起全社会的关注。食品安全已经成为影响农业和食品工业健康发展的关键因素, 在某种程度上已约束了我国农业和农村经济产品结构和产业结构的战略性调整。为此, 国家非常重视, 将“食品安全关键技术”列为“十五”重大科技专项。以提高食品质量、保障人民健康、提高我国农业和食品工业的市场竞争力为目标, 采取自主创新和积极消化吸收引进成果并重的原则, 重点研究我国食品安全中的技术标准、关键检测、监测和控制等方面的科技问题, 大力促进食品安全相关研究和新产品的研究开发和产业化。

为促进无公害农产品的发展, 提高农产品的卫生质量, 保证人民身体健康, 增强我国农产品的国际市场竞争力, 针对农药残留作为农产品国际贸易中技术壁垒的作用越来越明显, 已经影响到我国茶叶等优势农产品的出口, 因此, 农药的科研及农药企业正面临产品结构的调整以及新的高毒农药替代品的研制开发。

生物农药是近十年来大力开发的农药, 生物农药包括微生物、昆虫病原性线虫、植物源农药(植物性药材)、微生物次生代谢产物(抗生素)等, 由于生物农药的使用安全、有效、低毒副作用、环境相容性好, 因此对生物农药的研制以及产业化正越来越被人们所重视^[1~5]。

博落回(*Macleaya cordata*(wild)R.B[Bocconia cordata])又名筒杆, 系罂粟科博落回属多年生植物, 全株可入药。博落回植物在我国分布广泛, 民间作为杀虫农药以及使用博落回治疗疥癣、疗毒及杀虫灭蛆等在我国有悠久的历史。作为植物源农药, 博落回活性有效成分是天然物质, 使用后易降解, 对环境污染小, 其成分多元化, 作用机理独特, 病虫害对其不产生抗性, 开发和利用成本较低。

国内外研究表明博落回含有血根碱(sanguinarine)、小檗碱(berberine)、博落回碱(bocconoline)、白屈菜红碱(Gelerythrine)、甲氧基白屈菜红碱(Chelilutine)、乙氧基白屈菜红碱(Ethoxychelerythrine)、白屈菜如宾碱(Chelirubine)、沙明碱(Gorysamine)、原阿片碱(Protopine)、别隐品碱

收稿日期: 2004-08-10

*通讯作者

基金项目: 贵州省农业和社会发展攻关课题(黔科合 2003NGY008)

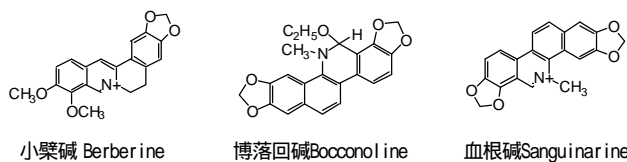
作者简介: 赵东亮(1976-), 男, 硕士研究生, 研究方向为活性成分分离及检测技术。

(Allocriptopine)、氧化血根碱(Oxysanguinarine)、黄连碱(Coptisine)、去氢紫堇碱(Dehydrocicanthifoline)等多种生物碱^[6~9], 这些生物碱均为异喹啉衍生物^[10], 具有多种药理作用及用途, 但对于提纯物血根碱、博落回碱是否具有抗菌作用尚未见报道。为了寻找新的杀菌成分及先导化合物, 本文对血根碱、小檗碱、博落回碱的抑菌作用进行了研究, 以期获得抗菌谱系, 为生物农药博落回的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血根碱盐酸盐(sanguinarine hydrochloride)为自制, 纯度: 95%左右, 结构已经四谱鉴定; 盐酸小檗碱(berberine hydrochloride)为自制, 纯度: 95%左右, 结构已经四谱鉴定; 博落回碱(bocconoline)为自制, 纯度: 90%左右; 注射用青霉素钠(460mg/80万单位, 哈药集团制药总厂生产), 为实验用生物碱的结构如下:



血根碱分离工艺: 采用酸水浸提, 其工艺流程如下:

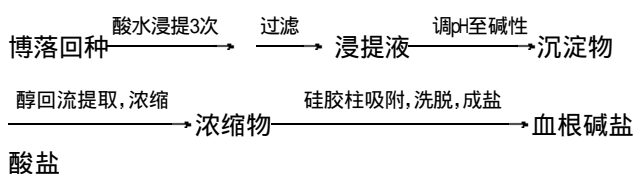


图1 血根碱分离提取工艺流程图

1.1.2 实验菌种(由我校微生物及动物微生物教研室提供)

细菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 四连球菌(*Tetracoccus*), 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

1.1.3 基础培养基

细菌采用牛肉膏琼脂培养基: 蛋白胨 10g, 牛肉膏 5g, 氯化钠 5g, 琼脂 15~20g, 水 1000ml, 灭菌前调 pH7.2~7.4, 121℃灭菌 30min。

1.2 方法

1.2.1 待测物的配制

将博落回碱、盐酸血根碱、盐酸小檗碱配成

9600μg/ml 的溶液, 青霉素钠配成 4800μg/ml, 溶剂为 20% 的甲醇。

1.2.2 菌悬液的制备

将已活化的细菌菌种分别接种于试管斜面培养基, 于 37℃恒温培养箱内培养 24h。用接种环挑取一环菌体放入装有玻璃珠的生理盐水里, 充分振摇, 用血球记数板记数, 调至 $10^7 \sim 10^8$ 个/ml 左右。

1.2.3 抑菌实验

定性实验: 琼脂扩散纸片法^[11]: 倒好平板后, 用灭菌棉签沾取菌悬液, 涂满整个平板, 倒置, 干 20min。用镊子夹取滤纸片(已干热灭菌、直径 7mm)在待测液中浸湿, 吸去多余的液体, 顺次放在含菌平板上, 每平板各种待测物滤纸片各一片, 20% 甲醇溶剂对照滤纸片一片。细菌于 37℃培养 18~24h, 重复四次, 取平均值。

最低抑菌浓度(MIC)测定: 琼脂平板稀释法^[12]: 将浓度为 9600μg/ml 的博落回碱、血根碱、盐酸小檗碱用 20% 的甲醇分别稀释成 9600、4800、2400、1200、600μg/ml 的溶液(青霉素钠稀释成 1200、600、300、150、75μg/ml), 各吸取 1ml 分别加入培养皿中。将融化好的琼脂培养基各加 14ml 于每个培养皿中, 摇动平皿, 使药物与培养基充分混匀, 则最终浓度为 640、320、160、80、40μg/ml(青霉素钠为 80、40、20、10、5μg/ml)。第六个培养皿加 1ml 生理盐水及 14ml 琼脂, 第七个培养皿加 1ml 浓度为 20% 的甲醇及 14ml 琼脂, 作为对照。用灭菌棉签分别蘸取各种菌液, 按顺序接种于平板, 于 37℃培养 16~24h, 重复四次, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 盐酸血根碱、博落回碱、盐酸小檗碱、青霉素钠的抑菌效力比较

按琼脂扩散纸片法试验, 所得三种待测物及青霉素的抑菌效力(抑菌圈直径: mm)如下表 1:

表 1 三种待测物及青霉素的抑菌效力(抑菌圈直径: mm, $\bar{x} = \sum x_i / n$, $n=4$)

Table 1 The antimicrobial effects of the compounds from *Macleaya cordata*

待测物	试 验 菌 种				
	Bc	Te	Bs	Sa	Ec
青霉素钠	/	/	/	34	37
盐酸血根碱盐	19	18	19	24	12
博落回碱	12	16	15	15	/
盐酸小檗碱	10	10	9	14	/

注: Sa - 金黄色葡萄球菌, Bc - 蜡样芽孢杆菌, Ec - 大肠杆菌, Te - 四连球菌, Bs - 枯草芽孢杆菌。

由表1中结果可知,血根碱除对大肠杆菌的抗菌作用稍弱之外,对其余菌具有很强的抗菌作用。博落回碱对金黄色葡萄球菌、四连球菌、枯草芽孢杆菌具有较强抗菌作用,对大肠杆菌无作用。盐酸小檗碱对金黄色葡萄球菌具有较强抗菌作用,对蜡样芽孢杆菌、四连球菌、枯草芽孢杆菌的抗菌作用较弱,对大肠杆菌无作用,而青霉素对蜡样芽孢杆菌、四连球菌、枯草芽孢杆菌无作用,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抗菌作用强。这两种提纯物中,血根碱的抑菌效力明显,大于博落回及盐酸黄连素,但对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌作用小于青霉素,而对其余三种菌的效果大于青霉素。

2.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定

按琼脂平板稀释法,测定待测物最低抑菌浓度(MIC),测定结果见下表2:

表2 三种提纯物对5种试验菌的MIC(MIC₅₀= $\sum x_i/n$, n=4)

Table 2 The MIC test for 5 kind of bacterium by the compounds from *Macleaya cordata*

待测物	浓度(μg/ml)	试 验 菌 种				
		Bc	Te	Bs	Sa	Ec
盐 酸 血 根 碱	640	-	-	-	-	-
	320	-	-	-	-	+
	160	-	-	-	-	++
	80	-	-	-	-	+++
	40	+	+	-	-	+++
盐 酸 小 檗 碱	640	-	-	-	-	++
	320	-	-	-	-	+++
	160	+	-	-	+	+++
	80	+++	++	++	+	+++
	40	+++	+++	+++	++	+++
博 落 回 碱	640	+	+	+	+	+++
	320	++	++	++	++	+++
	160	+++	+++	+++	++	+++
	80	+++	+++	+++	+++	+++
	40	+++	+++	+++	+++	+++
青 霉 素 钠	160	++	+++	-	-	-
	80	+++	+++	++	-	-
	40	+++	+++	+++	-	-
	20	+++	+++	+++	-	-
	10	+++	+++	+++	+	+
CK1	5	+++	+++	+++	++	++
	CK1	+++	+++	+++	+++	+++
CK2		+++	+++	+++	+++	+++

注: CK1-20% 甲醇对照, CK2- 生理盐水对照, - 为无菌生长, + 少量菌生长, +++ 菌大量生长。

由表2可知,血根碱对大肠杆菌的抗菌活性小,其余菌的抗菌作用较强,对四连球菌、蜡样芽孢杆菌的最低抑菌浓度为80 μg/ml,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的最低抗菌浓度小于40 μg/ml,作为植物源天然抗菌剂,其抗菌谱宽,效果明显。盐酸黄连素亦有较低抗菌浓度,但效果不如血根碱。博落回碱抗菌效果相对较弱,从上表还可以看到,血根碱对四连球菌、蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌的抗菌活性强于青霉素,而CK1, CK2的结果均为菌大量生长,说明这三种待测物的抗菌活性来自于它们本身的活性成分。

3 讨 论

血根碱、博落回碱都具有不同程度的抗菌活性,其中血根碱的抗菌效力强,抗菌谱广,对球菌和杆菌、革兰氏阳性和阴性都有抗菌活性,且对有些菌的活性强于常用药盐酸小檗碱及青霉素。在博落回植物中,血根碱含量丰富,提取方便,因此利用贵州丰富的博落回资源提取天然抗菌剂不失为增加农民收入的好途径。同时它也为新药合成提供了一个很好的前体,作为生物农药开发,开发和利用前景广阔。

参考文献:

- [1] 徐汉奴, 安王兴. 生物农药的发展动态与趋势展望[J]. 农药科学与管理, 2001, 22(1): 32-34.
- [2] 桂永珠, 池景良. 生物农药的研究应用现状及前景[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(2): 48.
- [3] 朱吕雄, 蒋细良. 我国生物农药的研究进展及未来发展[J]. 农药快讯, 2003, 19: 18.
- [4] 马建利, 白海燕. 中国植物性农药利用的现状与对策[J]. 农药快讯, 2003, 18.
- [5] 王崎. 我国生物农药的发展现状[J]. 中国微生物学杂志, 2001, 13(3): 177.
- [6] 谷千秋, 高尾樽雄. 博落回植物碱的研究[J]. 药学杂志(日), 1962, 82: 755.
- [7] 胡之壁, 徐垠, 冯胜初, 等. 博落回果实中有效成份的研究[J]. 药学报, 1979, 14(9): 53-57.
- [8] Ishii Hisashi. Studies on the chemical constituents of Rutaceous plants[J]. Chem Pharm Bull, 1978, 26(1): 166.
- [9] 高尾樽雄, 安本幸, 等. 罂粟科植物博落回生物碱的研究[J]. 药学杂志(日), 1973, 93: 242.
- [10] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977. 721.
- [11] 郑钧镛, 王光宝. 药品微生物学及检测技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989.
- [12] 戴自英. 临床抗菌药[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.