

小果博落回总生物碱的抑菌活性研究

胡海军^a, 李晓惠^a, 李福华^a, 李兴科^b, 周 乐^a, 王建福^c

(西北农林科技大学 a 理学院, b 生命科学学院, c 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】获得抑菌活性更强的小果博落回的生物碱成分。【方法】采用 4 种亲核性溶剂(甲醇、乙醇、丙酮和饱和 Na₂CO₃ 碱溶液)和 1 种非亲核性溶剂(四氢呋喃),分别从吸附了小果博落回总生物碱的 D₁₀₁ 树脂上洗脱生物碱,用薄层层析法(TLC)进行成分分析,以金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、大肠杆菌、肠形点状产气单胞菌、嗜水气单胞菌、巴氏杆菌、蜡样芽孢杆菌和鳃弧菌等 8 种菌株为供试菌,采用药敏纸片法进行抑菌活性测定,研究小果博落回在不同溶剂处理下所得的总生物碱成分和抑菌活性的变化。【结果】TLC 分析结果表明,经过乙醇、甲醇、碱溶液和丙酮作用后,所得总生物碱(分别为 S_{EtOH}、S_{MeOH}、S_{base} 和 S_{acetone})与直接用酸提取的总生物碱(S_{aw})在成分上存在差异;5 种总生物碱均具有抑菌活性,其抑菌活性依次表现为 S_{MeOH} > S_{EtOH} ≈ S_{acetone} ≈ S_{base} > S_{aw}。【结论】提取过程中使用亲核性溶剂,可引起小果博落回总生物碱成分的变化和抑菌活性的改变,其中以甲醇提取的总生物碱的抑菌活性较强。

【关键词】小果博落回;生物碱;抑菌活性

【中图分类号】 S482.3⁺9;R285.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)04-0208-05

Antibacterial activity of the total alkaloids from
Macleaya microcarpa

HU Hai-jun^a, LI Xiao-hui^a, LI Fu-hua^a, LI Xing-ke^b, ZHOU Le^a, WANG Jian-fu^c

(a. College of Science, b. Life of Science, c. College of Animal Sci-Tech, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to obtain stronger anti-bacterial alkaloids activity, and the changes of both the components and the antibacterial activity of the different total alkaloids (TAs) from *Macleaya microcarpa* dealt with different solvents were studied. 【Method】 The different TAs were obtained from the same TAs absorbed on D₁₀₁ macroporous resin eluted by four different nucleophilic solvents (methanol, ethanol, acetone and saturated Na₂CO₃ aqueous solution) and one nonnucleophilic solvent (tetrahydrofuran). The components of all TAs were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). The antibacterial activity of the TAs was assayed by drug sensitive slips method *in vitro* against *Staphylococcus aureas*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Aeromonas Punctat fintestinalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella multocida*, *Bacillus cereus* and *Vibrio anguillarum*. 【Result】 The result showed that there was a difference between the components of the TAs extracted by acid solution (S_{aw}) and those of the ones reacted with ethanol (S_{EtOH}), methanol (S_{MeOH}), alkali solution (S_{base}) and acetone (S_{acetone}), respectively. All the five TAs showed the antibacterial activity against all the tested bacteria, and the order of the activity was S_{MeOH} > S_{EtOH} ≈ S_{acetone} ≈ S_{base} > S_{aw}. 【Conclusion】 Using the nucleophilic solvents in the extraction process, the components and the antibacterial activity of the total alkaloids of *Macleaya microcarpa* were changed.

* [收稿日期] 2008-05-22
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30771454;30571402)
[作者简介] 胡海军(1981—),男,陕西杨凌人,硕士,主要从事天然产物化学研究。E-mail:birecool@hotmail.com
[通信作者] 周 乐(1965—),男,陕西蒲城人,教授,博士生导师,主要从事有机合成和天然产物化学研究。
E-mail:betterzl@163.com

And the TAs extracted by methanol possessed stronger anti-bacterial activity.

Key words: *Macleaya microcarpa*; alkaloid; antibacterial activity

小果博落回(*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde)系罂粟科博落回属大型草本植物,作为中草药其具有抑菌、杀虫、抗肿瘤等多种生物活性^[1]。临床上主要用于治疗指疔、脓肿及一些恶疮和皮肤病等^[1-3]。小果博落回果实及全草中含有丰富的异喹啉类生物碱,主要有血根碱(Sanguinarine)、白屈菜红碱(Chelerythrine)、原阿片碱(Protopine)、别隐品碱(Allocryptopine)等^[4-5],其中含有 C=N⁺ 离子型双键(iminium)的生物碱,如血根碱和白屈菜红碱,能够与很多亲核试剂在室温下发生亲核加成反应,生成一系列血根碱和白屈菜红碱的衍生物^[4,6]。血根碱和白屈菜红碱的结构如图 1 所示。在提取和分

离过程中,一些常用的亲核性溶剂可能会与血根碱和白屈菜红碱等发生作用,进而得到一系列相应的“人工产物(Artifact)”^[7],但至今未见相应的文献证明。目前已有研究发现,小果博落回乙醇提取液及水提取液具有抑菌活性^[1],并且证明起作用的是其中的总生物碱。但迄今对不同溶剂提取的小果博落回总生物碱抑菌活性的比较研究尚属空白。为此,本研究系统考察了不同提取溶剂对小果博落回生物碱成分及其抑菌活性的影响,以期获得具有更强抑菌活性的小果博落回生物碱成分,并为其生物活性成分的深入研究奠定基础。

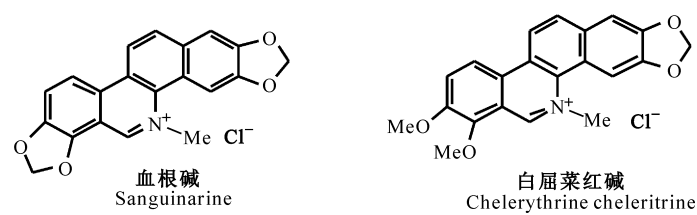


图 1 血根碱和白屈菜红碱的结构
Fig. 1 Structures of sanguinarine and chelerythrine

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 供试植物材料于 2006-07~08 采自陕西杨凌渭河滩,经西北农林科技大学生命科学学院苗芳副教授鉴定为小果博落回(*Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde)。将采集的小果博落全草风干后粉碎备用。

1.1.2 供试菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureas*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠形点状产气单胞菌(*AeromonasPunctat f. intestinalis*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*),均由西北农林科技大学动物科技学院王高学副教授提供。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪 器 SHB-III 循环式多用真空泵,郑州长城科贸有限公司生产;JA3003 型电子天平,上海精科天平仪器厂制造;RE-32AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;玻璃仪器气流烘干机,长城科

贸有限公司生产;HPS-250 生化培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司生产;超净工作台,苏净集团安泰公司生产。

1.2.2 试 剂 盐酸、碳酸钠、碘化钾、次硝酸铋、乙醇、甲醇、丙酮、四氢呋喃、氯仿、石油醚、乙酸乙酯等,均为国产分析纯;薄层层析硅胶 GF₂₅₄,青岛海洋化工厂生产;D₁₀₁ 型大孔树脂,南开大学生产。另有牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、磷酸二氢钾等。

1.3 方 法

1.3.1 小果博落回总生物碱的提取 称取 200 g 小果博落回粗粉,以 0.1 mol/L 盐酸水溶液为溶剂^[8-9],采用渗漉法提取总生物碱,用碘化铋钾检测流出液至呈阴性。将所得提取液均分为 5 份,每份提取液流经编号分别为 A、B、C、D、E 的 5 根装有预处理好的 D₁₀₁ 大孔树脂柱子^[10](每根 D₁₀₁ 大孔树脂用量为 80 g),将各柱子用去离子水洗脱至流出液呈中性,再按下面方法分别处理各柱子:

(1) 柱 A 的处理。用含 0.1 mol/L 盐酸体积分数 80% 的四氢呋喃水溶液洗脱至无生物碱流出(碘化铋钾试验),合并含生物碱的洗脱液,减压蒸除溶剂后,得酸水提取的总生物碱 S_{aw}。

(2) 柱 B 的处理。先用体积分数 95%乙醇慢速洗脱,流速 ≤ 0.5 BV/h,待流出液中生物碱很少时,改用体积分数 80%的四氢呋喃水溶液洗脱至流出液中无生物碱,合并含生物碱的洗脱液,减压蒸除溶剂,得相当于乙醇提取的总生物碱 S_{EtOH} 。

(3) 柱 C 的处理。先用甲醇代替柱 B 处理中的体积分数 95%乙醇进行慢速洗脱,后续操作同柱 B 处理,得相当于甲醇提取的总生物碱 S_{MeOH} 。

(4) 柱 D 的处理。先用饱和的 Na_2CO_3 水溶液浸泡 1 d,然后用去离子水洗脱至中性,最后用含 0.1 mol/L 盐酸体积分数为 80%的四氢呋喃水溶液洗脱,得相当于“酸提 $\rightarrow$ 碱沉 $\rightarrow$ 萃取”法所提取的总生物碱 S_{base} 。

(5) 柱 E 的处理。先用丙酮浸泡 1 d,后用丙酮洗脱,待流出液中生物碱很少时,改用体积分数的 80%的四氢呋喃水溶液洗脱,得相当于用丙酮提取的总生物碱 $S_{acetone}$ 。

1.3.2 小果博落回总生物碱的 TLC 分析 (1) 溶液的配制。将 S_{aw} 用 pH 6.0 甲醇溶液溶解,其他 4 种总生物碱用甲醇溶解。5 种总生物碱都配制成相当于原干材料 100 mg/mL 的药物浓度(即原生药浓度)。(2) 薄层层析(TLC)检测。将各样品溶液用毛细管分别等量(均为 0.5 mm 点样毛细管半管)单行地点在 5 cm $\times$ 10 cm 的硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,分别用石油醚-乙酸乙酯混合溶剂(V (石油醚): V (乙酸乙酯)=2:1)和氯仿-甲醇混合溶剂(V (氯仿): V

(甲醇)=3:1)为展开剂进行展开,用碘化铯钾显色剂喷雾显色,观察生物碱单体成分的数量,并依据各样品斑点的位置判断生物碱成分的变化。

1.3.3 抑菌活性的测定 采用药敏纸片法^[11],选用金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、大肠杆菌、肠形点状产气单胞菌、嗜水气单胞菌、巴氏杆菌、芽胞杆菌和鳗弧菌 8 种菌,检测 S_{aw} 、 S_{base} 、 S_{MeOH} 、 S_{EtOH} 、 $S_{acetone}$ 抑菌活性的大小,同时以各自溶剂作为空白对照(CK)。

2 结果与分析

2.1 5 种总生物碱成分的 TLC 检测

5 种总生物碱的 TLC 检测结果见图 2。图 2-a 中 R_f 值分别为 0.222 和 0.367 的 2 个生物碱,与图 2-b 中 R_f 值分别为 0.856 和 0.911 的 2 个的生物碱是相同的,并且含量最多,根据本研究所分离出来的生物碱对照及文献[12],确定这 2 种生物碱分别为血根碱和白屈菜红碱(可见光下分别为橘红色和黄色),可见血根碱和白屈菜红碱是小果博落回中的主要生物碱成分;依据本实验室以前鉴定的生物碱对照,可以确定图 2-b 中 R_f 值为 0.078,0.111 和 0.244 的 3 个生物碱分别为 α 型、 β 型别隐品碱和原阿片碱。除这 5 种相同的成分及图 2-a 中 S_{aw} 与 S_{base} $R_f=0.533$ 的生物碱成分可能相同外,5 种总生物碱中再没有其他相同的生物碱成分;图 2-b 中其余成分均不相同。

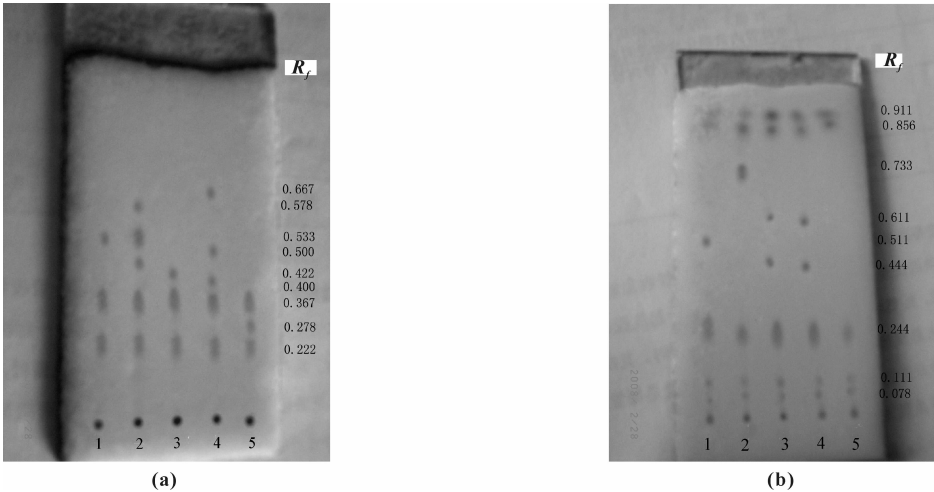


图 2 小果博落回 5 种总生物碱的 TLC 检测

a,b. 石油醚-乙酸乙酯(V (石油醚): V (乙酸乙酯)=2:1)、氯仿-甲醇(V (氯仿): V (甲醇)=3:1)为展开剂展开后的显色结果;1~5. S_{aw} 、 S_{base} 、 S_{MeOH} 、 S_{EtOH} 、 $S_{acetone}$

Fig. 2 TLC detection results of the five total alkaloids

a,b. Results of developing by petroleum ether-ethyl acetate(V (petroleum ether): V (ethyl acetate)=2:1) and chloroform-methanol (V (chloroform): V (methanol)=3:1), respectively;1-5. S_{aw} 、 S_{base} 、 S_{MeOH} 、 S_{EtOH} and $S_{acetone}$, respectively

S_{aw} 能够保持提取的生物碱结构不会发生变化,与 S_{aw} 相比,其他 4 种总生物碱分别均存在不同的生物碱成分,而这 4 种总生物碱之间的差别也很明显。 S_{base} 、 S_{MeOH} 、 S_{EtOH} 和 $S_{acetone}$ 相当于 S_{aw} 经碱溶液、甲醇、乙醇和丙酮进行处理后得到的总生物碱,其之间的差异很可能是由小果博落回中的血根碱和白屈菜红碱与以上 4 种不同溶剂反应引起的,因为到目前为止,有关博落回属的研究均证明只有这两种生物碱才表现出这方面的特性。

2.2 5 种总生物碱的抑菌效力

有研究表明,抑菌圈直径大于 6 mm(药敏纸片直径)表示有抑菌作用,且抑菌圈直径越大,抑菌活性越强^[11]。

5 种总生物碱对 8 种细菌的抑制活性见表 1。由表 1 可以看出,5 种总生物碱对金黄色葡萄球菌、

无乳链球菌、大肠杆菌和肠形点状产气单胞菌的抑制作用较强,其抑菌圈直径均接近或超过 10 mm;5 种总生物碱对巴氏杆菌、蜡样芽孢杆菌、嗜水气单孢菌及鳃弧菌的抑制作用较弱,且抑菌圈不透明。8 种供试菌株中,除蜡样芽孢杆菌和鳃弧菌外,其他 6 种菌株均对 S_{MeOH} 最为敏感,如其对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径达到 16.0 mm,对无乳链球菌的抑菌圈直径达到 17.0 mm,对肠形点状产气单胞菌的抑菌圈直径达到 21.7 mm,在 5 种总生物碱中抑菌作用表现最强;5 种生物碱中, S_{aw} 的抑菌效力最差,其对巴氏杆菌、蜡样芽孢杆菌和鳃弧菌均无抑制作用;其他 3 种总生物碱的抑菌作用处于这 2 种总生物碱之间。5 种总生物碱对 8 种供试菌的抑菌作用表现为: $S_{MeOH} > S_{EtOH} \approx S_{acetone} \approx S_{base} > S_{aw}$ 。

表 1 5 种总生物碱对 5 种供试菌株抑菌效力的比较
Table 1 Anti-bacteria activity of the five total alkaloids

菌株 Pathogen	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone				
	S_{aw}	S_{EtOH}	S_{MeOH}	S_{base}	$S_{acetone}$
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	10.0(++)	13.3(++)	16.0(++)	12.7(++)	13.0(++)
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	10.0(+)	14.0(++)	17.0(++)	11.3(+)	12.7(++)
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	9.3(+)	11.3(+)	14.3(+)	11.7(+)	9.7(+)
巴氏杆菌 <i>P. multocida</i>	—	7.3(+)	8.3(+)	7.0(+)	7.0(+)
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	—	7.6(+)	7.3(+)	7.0(+)	7.0(+)
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	7.0(+)	8.7(+)	9.0(+)	7.3(+)	7.3(+)
肠形点状产气单胞菌 <i>A. f. itestinalis</i>	13.7(+)	18.3(+)	21.7(+)	16.0(+)	16.0(+)
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	—	7.0(+)	7.0(+)	7.0(+)	7.0(+)

注:数据为 3 次重复的平均值。“—”表示无抑菌圈,即所有溶剂对照均无抑菌圈;“+”表示抑菌圈可见;“++”表示抑菌圈清晰。
Note: All values are means of three replicates. “—” means invisible, and all control solvents show no activity. “+” means eyeable. “++” means clear.

综上所述可以看出,在提取过程中利用亲核性溶剂后,小果博落回的生物碱成分发生了改变,同时也使总生物碱对供试菌株的抑制作用有不同程度的增强,而生物碱成分和抑菌活性的变化很可能是血根碱等生物碱与溶剂发生了作用的结果。

3 讨 论

1) 一般所谓的“游离血根碱”其实是氢氧化血根碱和 6-羟基二氢血根碱的混合物,二者在溶液中处于动态平衡。当 $pH > 7$ 时,血根碱主要以不溶于水的叔胺形式,即以 6-羟基二氢血根碱存在^[13],其不能以稳定的形式被分离出来,但其可自发地在两分子之间发生缓慢的歧化反应和聚合反应。歧化反应的结果是生成氧化血根碱(Oxysanguinarine)和二氢血根碱(Dihydrosanguinarine),聚合反应的结果是生成 bis[6-(5,6-dihydrosanguinarinyl)]ether。歧化反应是不可逆的,其产物也是稳定的;但聚合反

应是可逆的,强碱性介质有助于聚合反应的进行,而碱性的降低则会导致平衡向逆反应方向进行。在强酸性条件下,二聚体则完全以氯化季铵盐的形式存在。血根碱在高浓度的醇和丙酮环境下,容易得到加成产物,例如常见的有 6-乙氧基血根碱、6-甲氧基血根碱及 6-丙酮基血根碱^[14]。同样的原理,白屈菜红碱亦可发生与血根碱类似的聚合反应和歧化反应。在本试验中,5 种总生物碱化学成分的差异,正好与相关文献报道的结果一致^[4]。有时这种作用时间足够充分,就会分离不到这类生物碱^[4]。因本试验只是进行了提取处理,检测结果显示,作用后的总生物碱中含有大量的血根碱和白屈菜红碱是合理的。从相反的角度考虑,要想得到这类季铵类生物碱,就得在提取分离过程中避免使用亲核性溶剂,或者提取分离操作应快速进行。

2) 伴随着不同溶剂处理总生物碱成分的变化,小果博落回活性成分的抑菌活性也表现出不同程度

的增强,而且这种活性上的变化很可能是由少量的血根碱等季铵类生物碱的变化引起的,说明其衍生物在抑菌活性方面较其自身更强。为了证明这一观点,下一步将对血根碱、白屈菜红碱及其衍生物进行抑菌活性的比较。在本试验中,可以明显地从 TLC 薄板上看出,血根碱和白屈菜红碱是小果博落回中的主要生物碱成分,且含量也较丰富。赵东亮等^[15]研究表明,这两种生物碱抗菌效力强、抗菌谱广。此外,小果博落回在我国分布广泛,且易于栽培管理。因此,小果博落回作为植物源农药和兽药,且有广阔的开发利用前景。

[参考文献]

[1] 上海中药研究所. 博落回的抑菌试验及动物试验 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
Shanghai Academy at Traditional Chinese Medicine. Bacterio-static and Animal Test of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997. (in Chinese)

[2] 张昌纯. 白屈菜的药理和临床研究概况 [J]. 中药材, 1987, 10 (5): 48-49.
Zhang C C. The survey of pharmacological and clinical study of *Chelidonium majus* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1987, 10(5): 48-49. (in Chinese)

[3] 张胜菊, 柯治国, 南玉生. 博落回抽提物对黄守瓜、菜青虫的田间药效评价 [J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(5): 450- 451.
Zhang S J, Ke Z G, Nan Y S. Effects of organic extract of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. on the controls of cucumber beetle and cabbage caterpillar in field [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2003, 22(5): 450- 451. (in Chinese)

[4] 胡之壁, 徐 垠, 冯胜初, 等. 博落回果实中有效成分的研究 [J]. 药学学报, 1979, 14(9): 535- 540.
Hu Z B, Xu Y, Feng S C, et al. Studies on the active principles of the fruits of *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1979, 14(9): 535- 540. (in Chinese)

[5] Eugenio S A, Luis R H M, José L S S, et al. Alkaloids from *Bocconia frutescens* and biological activity of their extracts [J]. Pharmaceutical Biology, 2006, 44(7): 540-543.

[6] Pavlina S, Radek M, Jii D, et al. Structural studies of benzo-

phenanthridine alkaloid free bases by NMR spectroscopy [J]. Magn Reson Chem, 2002, 40: 147-152.

[7] Barry D K, Moses O F, Maurice S. The benzophenanthride alkaloids [J]. Journal of Natural Products, 1984, 47(1): 1- 43.

[8] 孙丽艳, 魏雄辉, 韦 宇, 等. 博落回总生物碱提取方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(1): 15-18.
Sun L Y, Wei X H, Wei Y, et al. Extraction of total alkaloids from *Macleaya cordata* [J]. Chin J Pharm Anal, 2003, 23(1): 15-18. (in Chinese)

[9] Zhang F, Chen B, Xiao S, et al. Optimization and comparison of different extraction techniques for sanguinarine and chelerythrine in fruits of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. [J]. Separation and Purification Technology, 2005, 42: 283-290.

[10] 王 欣, 周 乐, 季春燕, 等. 博落回中生物碱的超声提取和分离 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(5): 118- 120, 124.
Wang X, Zhou L, Ji C Y, et al. Ultrasonic extraction and separation of alkaloids from *Macleaya cordata* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14 (5): 118-120, 124. (in Chinese)

[11] 李健强, 李六金. 兽医微生物学实验实习指导 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998.
Li J Q, Li L J. Experiment instruction of veterinary microbiology [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology of China Press, 1998. (in Chinese)

[12] Abizov E A, Tolkachev O N, Kopylova I E, et al. Distribution of the sum of sanguinarine and chelerythrine in the above-ground part of *Macleaya microcarpa* [J]. Medicinal Plants, 2003, 37(8): 413- 414.

[13] Jones R R, Harkrader R J, Southard G L. The effect of pH on sanguinarine iminium ion form [J]. Journal of Natural Products, 1986, 49(6): 1109-1111.

[14] Frank R S, Kenneth A L, Don K K. Some structural relationships among cytotoxic and antitumor benzophenanthridine alkaloid derivatives [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1973, 16(8): 939-940.

[15] 赵东亮, 郁建平, 周晓秋, 等. 博落回生物碱的抑菌作用 [J]. 食品科学, 2005, 26(1): 45- 47.
Zhao D L, Yu J P, Zhou X Q, et al. Antibacterial effect of the sanguinarine hydrochloride and bocconoline from *Macleaya cordata* [J]. Food Science, 2005, 26(1): 45- 47. (in Chinese)