

苦豆子生物碱抗菌活性的测定

刘军锋¹ 丁泽¹ 欧阳艳² 王芳¹ 邓利^{1*}

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 新疆伊犁师范学院 化学与生物科学学院, 新疆 伊宁 835000)

摘要: 采用抑菌圈法测定了槐定碱、苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦豆子总碱对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、番茄早疫、番茄灰霉和辣椒炭疽的抗菌活性。试验结果表明,5种生物碱对3种细菌生长均具有显著的抑制作用,其中槐定碱和苦参碱对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和番茄早疫的抗菌效果明显优于其他3种生物碱,苦参碱对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(MIC)达到12.5 μg/mL。5种生物碱对3种真菌的抗菌效果弱于对3种细菌的抗菌效果,5种生物碱对3种真菌的MIC大于等于100 μg/mL,氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦豆子总碱对番茄灰霉菌的MIC均达400 μg/mL。在质量浓度为100 μg/mL时,5种生物碱中仅槐定碱表现出对辣椒炭疽菌的抑制作用。苦豆子总碱抗菌活性影响因素的试验结果表明,苦豆子总碱具有良好的热稳定性,在弱碱性条件下(pH 8左右)具有更好的抑菌活性,在至少12 h内能够持续、稳定的对供试菌产生抑制作用。

关键词: 苦豆子; 生物碱; 抗菌活性; 最小抑菌浓度

中图分类号: TQ450.2

引言

随着化学药物引起的农畜产品污染和环境恶化等问题的日益突出,高效、低毒、易分解、无残留的生物农药的开发研究,已受到广泛关注^[1-3]。苦豆子(*Sophora alopecuroides*)是豆科槐属野生草本植物,在我国西北的新疆、内蒙、宁夏、甘肃等省区分布广泛。苦豆子种子中生物碱含量较高,约8.11%(质量分数),主要有氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、苦参碱和金雀花碱等20余种^[4]。大量研究^[5-8]表明,苦豆子生物碱在抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗心率失常、免疫调节等方面具有重要的药理活性和应用前景,适合开发高效、低毒、无残留的绿色农药。辣椒和番茄是新疆种植面积广、产量及出口量大的主要农产品。目前,对苦豆子总碱及单体碱在辣椒和番茄病害防治中的应用研究鲜有报道。

本文采用抑菌圈法测定了苦豆子生物碱提取物及其主要单体生物碱的抗菌活性及最小抑菌浓度,

并对影响苦豆子总碱抑菌效果的因素进行了研究。

1 实验部分

1.1 材料和菌株

苦豆子购自新疆伊宁市药材市场。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为北京化工大学生物实验教学中心保存菌种。供试真菌番茄早疫(*Alternaria solani*)、番茄灰霉(*Botrytis cinerea*)和辣椒炭疽(*Vermicularin capsici*)由北京市农业科学院李兴红老师惠赠。

1.2 试剂和仪器

槐定碱、苦参碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱,中国药品生物制品检定所;其他化学试剂均为分析纯。

JY92-II型超声波细胞破碎仪,上海京工实业有限公司;Avanti J25高速冷冻离心机,美国Beckman公司;RE-52A旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DHP120恒温培养箱,上海实验仪器厂有限公司;Olympus光学显微镜,日本奥林巴斯株式会社。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3 g/L,蛋白胨10 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂20 g/L;马铃薯培养基:马铃薯200 g/L,蔗糖20 g/L,琼脂20 g/L。

1.4 苦豆子总碱的提取

参考文献[9]的稀盐酸浸提法。将苦豆子干燥

收稿日期: 2010-08-31

基金项目: 国家自然科学基金(20876012); 新疆自治区科技厅“科技支疆”项目(200891106)

第一作者: 男,1976年生,讲师

* 通讯联系人

E-mail: dengli@mail.buct.edu.cn

后粉碎,用 14 目筛子筛取苦豆子粉末 500 g,加 5000 mL 去离子水,调节 pH 至 3.0,置入微波提取仪中提取。合并浸提液、离心,用 SP825 型大孔树脂吸附纯化,减压浓缩,旋转蒸发,得苦豆子总碱粗品。用超纯水配制 1 mg/mL 的苦豆子总生物碱稀释液,放入 4℃ 冰箱待用。

1.5 菌悬液的制备

将活化培养好的菌液分别接入无菌生理盐水中,依次进行梯度稀释,使菌悬液中细菌数为 $(1 \sim 2) \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 、真菌孢子数为 $(1 \sim 8) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。

1.6 生物碱抗菌活性的测定

分别取 0.2 mL 各种菌悬液加入已制备好的培养基平板中,均匀涂布。将灭菌的直径 6 mm 的滤纸片分别浸入配制好的生物碱溶液中,然后将浸透并晾干的滤纸片置于涂布接种的平板分区内,以生理盐水浸透的滤纸片作为空白对照。细菌于 37℃ 恒温培养 24 h,真菌 30℃ 培养 48 h,测定各处理及对照菌落抑菌圈直径。每个处理重复 3 次,计算其平均值和标准差。最小抑菌浓度以培养基平板上不长菌

时的最低生物碱浓度为准。

2 结果与讨论

2.1 不同生物碱的抗菌作用比较

抑菌圈法测定 100 $\mu\text{g/mL}$ 不同生物碱的抗菌效果如表 1 所示。总体来看,5 种生物碱对供试细菌的抑制效果优于真菌。与同质量浓度的氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦豆子总碱相比较,苦参碱和槐定碱的抑菌效果更明显,尤其是对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和番茄早疫的抑菌效果更显著。试验所用 5 种苦豆子生物碱对番茄灰霉菌均无抑制作用,可能是生物碱浓度(100 $\mu\text{g/mL}$) 过低所致。相关研究^[10]从电子结构的角度分析表明,氧化苦参碱的药理活性高于苦参碱,而本试验中还原型生物碱的抑菌效果则优于氧化型生物碱,袁静等^[11]的研究结果也表明,苦参碱的杀虫活性高于氧化苦参碱。从电子结构的角度分析药理活性可能还需要试验的验证,另推测苦参碱的生物活性可能在不同的试验对象上有所差异,这个问题值得进一步研究和探讨。

表 1 不同生物碱对试验菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of different alkaloids on the growth of trial microorganisms

菌种	抑菌圈直径/mm				
	槐定碱	苦参碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	苦豆子总碱
大肠杆菌	12.5 ± 0.15	12.8 ± 0.21	11.6 ± 0.17	11.8 ± 0.21	10.6 ± 0.15
金黄色葡萄球菌	11 ± 0.17	11.6 ± 0.21	11 ± 0.15	11.2 ± 0.2	10 ± 0.12
枯草芽孢杆菌	12.5 ± 0.25	13.6 ± 0.31	11 ± 0.17	10 ± 0.12	11 ± 0.15
番茄早疫	10.2 ± 0.15	10.5 ± 0.17	—	—	—
辣椒炭疽	10 ± 0.12	—	—	—	—
番茄灰霉	—	—	—	—	—

“—”为没有抑菌圈

与单体生物碱比较来看,苦豆子总碱对供试菌的总体抑制效果较弱,这可能与苦豆子总碱中主要活性成分的浓度和纯度较低有关。

2.2 最小抑菌浓度

将试验所用生物碱分别稀释成 400、200、100、50、25、12.5 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 的系列溶液,分别加入供试菌悬液,制成培养基平板,以无菌生长平皿的最低药物浓度定为最小抑菌浓度(MIC),结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出,试验所用 5 种生物碱对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌均有较强的抑制作用,尤其苦参碱对上述两种细菌的 MIC 达到 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 不同生物碱对试验菌的 MIC 测定

Table 2 Minimum inhibitory concentration of different alkaloids on the growth of trial microorganisms

菌种	最小抑菌浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
	槐定碱	苦参碱	氧化苦参碱	氧化槐果碱	苦豆子总碱
大肠杆菌	12.5	12.5	25	50	25
金黄色葡萄球菌	25	25	50	100	50
枯草芽孢杆菌	25	12.5	25	50	25
番茄早疫	100	100	200	200	200
辣椒炭疽	100	200	200	200	200
番茄灰霉	200	200	400	400	400

5 种生物碱对供试真菌的抑菌效果弱于对细菌的抑菌效果,除槐定碱对番茄早疫和辣椒炭疽以及苦参碱对番茄早疫的 MIC 为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 外,氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦豆子总碱对番茄早疫和辣椒炭疽的 MIC 均达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对番茄灰霉的 MIC 达 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。虽然氧化苦参碱对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 都是 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,但在氧化苦参碱浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,大肠杆菌的生长明显比枯草芽孢杆菌旺盛,这说明氧化苦参碱对枯草芽孢杆菌的抑制效果更好。

苦豆子总碱对细菌确有较强的抗菌活性,对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MIC 均为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而对番茄早疫菌和辣椒炭疽菌的 MIC 为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对番茄灰霉的 MIC 达 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明,由于抗菌有效成分浓

度和纯度较低,需用较高浓度的苦豆子总碱才能对蔬菜病原真菌起到较好的抑菌效果。冯俊涛等^[12]使用 0.1 g/mL (质量浓度) 的苦豆子丙酮提取物,对番茄灰霉菌的抑制率达 96.6%,李瑞等^[6]的研究结果也支持上述结论。

2.3 影响苦豆子总碱抗菌活性的因素

2.3.1 pH

分别选择枯草芽孢杆菌和辣椒炭疽菌为代表菌,考察 pH 对苦豆子总碱(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抗菌活性的影响,结果如表 3 所示。在 pH 4 ~ 10 范围内,苦豆子总碱的抗菌活性呈现出有规律的变化,苦豆子总碱在弱碱性条件下(pH 8 左右)表现出最佳抗菌效果。同样,pH 对苦豆子总碱抑制辣椒炭疽菌生长的影响非常明显:只有 pH 在中性和弱碱性时,抑菌作用才有所体现;在酸性和强碱条件下,抑菌圈消失。

表 3 pH 对苦豆子总碱抑菌活性的影响

Table 3 Effect of pH on the antibacterial activity of total alkaloids in *Sophora alopecuroides*

菌种	抑菌圈直径/mm						
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
枯草芽孢杆菌	—	9.5 ± 0.15	10.3 ± 0.12	11.5 ± 0.25	12.6 ± 0.31	11.9 ± 0.21	10.8 ± 0.15
辣椒炭疽	—	—	—	9.3 ± 0.15	10 ± 0.12	9.5 ± 0.2	—

分析 pH 对苦豆子总碱抗菌活性的影响,可能与 pH 影响菌体细胞膜的稳定性、膜表面蛋白活性及菌体对营养物质的吸收有关。苦豆子总碱在弱碱性(pH 8)条件下抗菌效果最佳,推测与苦豆子总碱的碱性性质和供试菌种生长的最适 pH 有关(pH 7 左右)。

2.3.2 加热处理

将灭菌的滤纸片放入 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦豆子总碱液浸泡并分别置于 25、50、75、100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中加热处理 2 h,以枯草芽孢杆菌和辣椒炭疽菌为代表菌,分别测定抑菌圈大小,比较不同温度下加热处理对苦豆子总碱抑菌活性的影响,结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出,随着处理温度的升高,苦豆子总碱对两种供试菌的抑菌效果逐步提高。结果表明,苦豆子总碱具有较好的热稳定性,可以在较高温度条件下稳定的发挥抗菌作用。推测苦豆子总碱的热稳定性与其各单体碱的理化性质有关。

2.3.3 作用时间

以枯草芽孢杆菌和辣椒炭疽菌为代表菌,使用 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦豆子总碱作用于以上两种供试菌,然后测定不同作用时间对苦豆子总碱抗菌活性的影

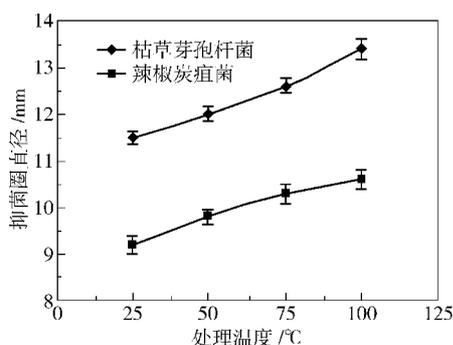


图 1 加热处理对苦豆子总碱抑菌活性的影响

Fig. 1 Effect of heat treatment on the antibacterial activity of total alkaloids in *Sophora alopecuroides*

响,结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看出,在相同的作用时间,苦豆子总碱对枯草芽孢杆菌的抗菌效果明显优于辣椒炭疽菌。同时,随着苦豆子总碱对供试菌作用时间的延长,苦豆子总碱的抑菌效果也逐步提高。虽然本试验没有测定更长作用时间的抑菌效果,但结合相关研究^[6,11]结果,苦豆子总碱能够在较长一段时间内持续、稳定的发挥抗菌作用。苦豆子总碱的抗菌稳定性为其在农业病虫害防治方面的应用提供了重

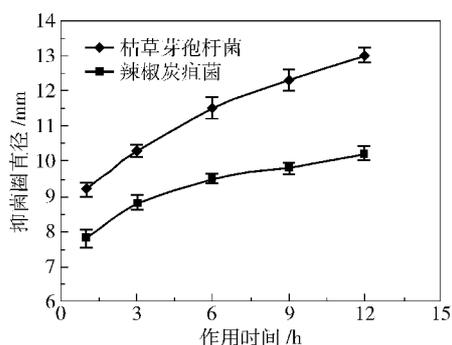


图 2 作用时间对苦豆子总碱抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of acting time on the antibacterial activity of total alkaloids in *Sophora alopecuroides*

要依据。

3 结论

苦豆子生物碱对供试细菌的抑制效果优于供试真菌。其中,槐定碱和苦参碱对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和番茄早疫菌的抗菌效果明显优于其他 3 种生物碱,苦参碱对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(MIC)达到 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。试验所用 5 种生物碱对 3 种真菌的 MIC 大于等于 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$,氧化苦参碱、氧化槐果碱和苦豆子总碱对番茄灰霉菌的 MIC 均达 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在质量浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,5 种生物碱中仅槐定碱表现出对辣椒炭疽菌的抑制作用。苦豆子总碱具有良好的热稳定性,在弱碱性条件下(pH 8 左右)能更好地发挥其抑菌作用,并且能够在较长时间内持续、稳定的对供试菌产生抑制作用。

参考文献:

[1] 邱德文. 我国生物农药现状分析与发展趋势[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 27-32.
Qiu D W. Current situation and prospects of bio-pesticides in China[J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 27-32. (in Chinese)

[2] 金轶伟, 柴一秋, 厉晓腊, 等. 生物农药的应用现状及其前景[J]. 河北农业科学, 2008, 12(6): 37-39.
Jin Y W, Chai Y Q, Li X L, et al. Application status and prospect of biopesticide[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2008, 12(6): 37-39. (in Chinese)

[3] 田志环. 我国生物农药发展现状及对策[J]. 河北农业科学, 2008, 12(3): 73-74.
Tian Z H. The current status and countermeasures on development of bio-pesticides in China[J]. Journal of He-

bei Agricultural Science, 2008, 12(3): 73-74. (in Chinese)

- [4] 李艳艳, 冯俊涛, 张兴, 等. 苦豆子化学成分及其生物活性研究进展[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 133-136.
Li Y Y, Feng J T, Zhang X, et al. Advance in research of chemical ingredients from *Sophora alopecuroides* L. and its bioactivities [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 133-136. (in Chinese)
- [5] 周娅, 杨志伟, 赵建宁, 等. 苦豆子总碱的体外抗菌活性研究[J]. 宁夏医学院学报, 2000, 22(2): 79-81.
Zhou Y, Yang Z W, Zhao J N, et al. A study on antibacterial activity of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* in vitro [J]. Journal of Ningxia Medical College, 2000, 22(2): 79-81. (in Chinese)
- [6] 李端, 周立刚, 王敬国, 等. 苦豆子提取物对黄瓜和番茄病原菌的抑制作用[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 558-563.
Li D, Zhou L G, Wang J G, et al. Inhibitory effects of *Sophora alopecuroides* extract to pathogens on cucumber and tomato [J]. Acta Botany Boreali-occidentalia Sinica, 2006, 26(3): 558-563. (in Chinese)
- [7] 侯东耀, 田平芳, 谭天伟. 四种中药提取物对蔬菜病原真菌的抑制作用[J]. 北方园艺, 2008(2): 222-224.
Hou D Y, Tian P F, Tan T W. Fungistasis of 4 kinds of Chinese Herb extracts to vegetable pathogenic [J]. Northern Horticulture, 2008(2): 222-224. (in Chinese)
- [8] 李弟灶, 潘显道, 吴松. 苦参碱类生物碱研究进展[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(1): 65-66.
Li D Z, Pan X D, Wu S. Advance in research of Alkaloids from *Sophora alopecuroides* [J]. Bulletin Medicine Research, 2005, 34(1): 65-66. (in Chinese)
- [9] 张为民, 蒲鹏, 张德刚, 等. 从苦豆子种子中提取生物碱的方法研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 7-9.
Zhang W M, Pu P, Zhang D G, et al. Studies on extraction of alkaloids in seeds of *Sophora alopecuroides* L. [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(2): 7-9. (in Chinese)
- [10] 赵宝中, 荣大奇, 王秀军. 苦参碱和氧化苦参碱电子结构与药性的关系[J]. 分子科学学报, 2000, 16(2): 88-93.
Zhao B Z, Rong D Q, Wang X J. Relationship of activity with electron structure for matrine and oxymatrine [J].

- Journal of Molecular Science, 2000, 16(2): 88-93. (in Chinese)
- [11] 袁静, 吕良忠, 丛斌, 等. 苦参生物碱杀虫生物活性测定[J]. 农药, 2004, 43(6): 284-287.
- Yuan J, Lv L Z, Cong B, et al. Biological activity of alkaloids from *Sophora flavescens* ait to pests [J]. Chinese Journal of Pesticides, 2004, 43(6): 284-287. (in Chinese)
- [12] 冯俊涛, 祝木金, 于平儒, 等. 西北地区植物源杀菌剂初步筛选[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(6): 129-134.
- Feng J T, Zhu M J, Yu P R, et al. Screening on the resources of botanical fungicides in Northwest China [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: National Science, 2002, 30(6): 129-134. (in Chinese)

Antimicrobial activity of *Sophora alopecuroides* alkaloids

LIU JunFeng¹ DING Ze¹ OUYANG Yan² WANG Fang¹ DENG Li¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. College of Chemical and Life Science, Yili Normal University, Yili Xinjiang 835000, China)

Abstract: The biological activity of sophoridine, matrine, oxymatrine, oxysophocarpine and total alkaloids from *Sophora alopecuroides* against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* and *Vermicularia capsici* have been tested using the inhibition zone method. The results showed that all the alkaloids exhibited excellent inhibitory activities against the three types of bacteria. The inhibitory effects of sophoridine and matrine against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Alternaria solani* were greater than that of the other alkaloids. The minimum inhibitory concentration (MIC) of matrine with *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* was 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Fungistasis of the five types of alkaloids with the three types of vegetable pathogenic fungi had lower activities than that in the case of the three types of bacteria. The MIC of the five types of alkaloids for the three types of fungi were all $\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, and the MIC of oxymatrine, oxysophocarpine and *Sophora alopecuroides* total alkaloids for *Botrytis cinerea* reached 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, only sophoridine showed an inhibitory effect against *Alternaria solani*. The total alkaloids from *Sophora alopecuroides* showed good thermal stability and optimum antibacterial activity under weakly alkaline conditions (about pH 8), and showed a sustained and steady inhibitory effect on trial bacteria within 12 hours.

Key words: *Sophora alopecuroides*; alkaloids; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration (MIC)