

# 万寿菊根部生物碱类提取物抑菌活性成分的研究

刘佳斌 苏炜 王金胜\* (山西农业大学生命科学院, 山西太谷 030801)

**摘要** 通过万寿菊根部生物碱类提取物对西瓜枯萎病菌抑制作用的研究, 结果表明, 在万寿菊根中分离出5类具有抑菌活性的生物碱, 其中水溶性生物碱对西瓜枯萎病菌菌丝生长有较好的抑制作用。

**关键词** 万寿菊; 西瓜枯萎病; 生物碱; 活性成分

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00746-02

## Research on the Bacteriostasis Active Constituent in Alkaloid from *Tagetes erecta* Root Extraction

Liu Jia-bin et al. (College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

**Abstract** This research mainly takes watermelon fusarium wilt as the research object, which does serious harm to melon species. The alkaloid from *Tagetes erecta* root was extracted with the method of dissolved with acid and sunk with alkali. And alkaloid bacteriostasis active constituent from *Tagetes erecta* root was isolated and purified with thin-layer chromatography, the column chromatographic analysis and some other biochemical methods. Then we exhaustively carried on the concrete classification and the research on alkaloid bacteriostasis material. The result indicated the alkaloid from *Tagetes erecta* root had many bioactive components against watermelon *Fusarium wilt*. By separating the alkaloid, we obtained five components of alkaloid. And Water-soluble alkaloid had the best inhibiting effect against *Fusarium wilt*.

**Key words** *Tagetes erecta*; Watermelon fusarium wilt; Alkaloid; Bioactive component

万寿菊(*Tagetes erecta*), 俗称臭芙蓉, 金盏花, 菊科万寿菊属<sup>[1]</sup>。目前对万寿菊的研究主要在医疗保健、色素提取以及化学成分的测定上<sup>[2-3]</sup>; 活性成分的研究主要是虫害的控制方面<sup>[4]</sup>, 对于其杀菌、抑菌活性方面的研究较少。万寿菊根部提取物可以抑制农作物、蔬菜等的菌类病害, 其中生物碱类物质占很大一部分<sup>[5]</sup>。

植物源农药是指从植物中提取的具有生物活性的代谢产物, 加工成的新型农药具有无公害、无污染、无残留且不易产生抗性等优点。植物性杀菌剂多为复合抑菌有效成分, 对病原真菌能从多方面加以抑制, 从而延缓抗性的产生<sup>[6-8]</sup>。笔者研究了万寿菊根提取物中生物碱类物质对西瓜枯萎病菌菌丝生长、孢子萌发和形成的影响, 以期为新农药开发和防治西瓜枯萎病的植物源农药提供理论基础和科学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 万寿菊根粉: 将采集的万寿菊根洗净, 于通风处阴干后, 放入恒温箱内45℃下烘干, 磨碎, 过60目筛, 供提取用。

西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* schlecht. f. sp. niveum): 由山西农业大学植物病理研究室提供。将已有的菌种接种到培养皿内, 25℃无光倒置进行纯化培养。

## 1.2 方 法

**1.2.1 生物碱提取的原理及技术路线。** 依据“酸溶碱沉”法提取得到的总生物碱, 根据生物碱溶解性和碱性的差异, 将总生物碱初步分离成弱碱性生物碱、中强碱性生物碱和水溶性生物碱3大部分, 再将前2部分根据生物碱中酚羟基分成酚性和非酚性2类。

**1.2.2 抑菌试验。** 检测试验主要采用最为普通的菌碟法, 计算相对抑制率。相对抑制率=(对照菌丝生长直径-处理菌丝生长直径)/对照菌丝生长直径×100%。

**1.2.3 薄板层析选择洗脱剂。** 准备。取酸水浸泡的粗提取物, 依据常用溶剂的极性<sup>[9]</sup>, 按不同比例配成展层剂(表1)。

点样。用毛细管蘸取少量酸水浸泡的粗提物在薄板上按常规点样, 待溶液挥发后, 将薄板置于层析缸中, 当展层剂上升到离玻璃板的另一端0.5~1.0cm时, 停止展层, 取出玻璃板并立即划下展层剂的前缘。显色。待展层剂完全挥发后, 取不同比例层析后的薄板直接置紫外灯下观察, 并用配制好的显色溶液, Dragendorff's reagent (Muriel)<sup>[10]</sup>溶液进行显色, 观察显色结果。

表1 不同溶剂配比的展层剂组合

溶剂	比例(V/V)	溶剂	比例(V/V)
氯仿	1	石油醚 乙酸乙酯	6 2
丙酮	1	苯 乙酸乙酯	8 2
氯仿 丙酮	9 1	甲醇	1
乙酸乙酯	1	甲醇 水	8 2

表2 不同生物碱提取物存在条件下西瓜枯萎病菌菌丝生长直径

抑菌液 含有各类生物碱	24 h		48 h	
	菌丝生长直径 cm	抑菌率 %	菌丝生长直径 cm	抑菌率 %
A: 酚性弱碱性生物碱	33.7	5.34	55.8	4.94
B: 非酚性弱碱性生物碱	22.4	37.08	51.2	12.78
C: 酚性叔胺生物碱	11.5	67.69	34.1	41.91
D: 非酚性叔胺生物碱	13.5	62.08	36.2	38.33
E: 水溶性生物碱	7.0	80.34	16.5	71.89
F: 含有氯仿(CK <sub>1</sub> )	35.6	-	58.7	-
G: 空白(CK <sub>2</sub> )	35.7	-	58.9	-

**1.2.4 柱层析分离。** 分离样品采用常压柱层析法<sup>[11]</sup>。用1.6×30的层析柱进行分离。柱下端接紫外检测仪检测洗脱成分变化。待检测器读数开始变化至变化结束之间用100ml小烧杯分别接取洗脱产物。用标签纸记录变化最高峰值读数, 各流份做抑菌试验, 确定最佳流份。

## 2 结果与分析

### 2.1 总生物碱的分离与抑菌活性的检测

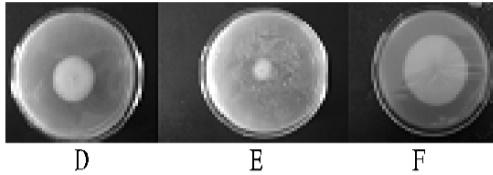
**2.1.1 不同提取物对西瓜枯萎病菌菌丝生长的影响。** 由表

基金项目 山西省自然科学基金项目(031011-1); 山西农业大学青年创新基金项目(2004068)。

作者简介 刘佳斌(1979-), 男, 山西太谷人, 在读硕士, 助教, 从事植物生物化学与分子生物学的研究。\* 通讯作者, 硕士生导师, 教授。

收稿日期 2006-10-25

2 和图1 可以看出,以水溶性生物碱 对西瓜枯萎病菌菌丝生长抑制作用最为明显;其次是非酚性叔胺生物碱;含氯仿 (CK<sub>1</sub>) 对菌丝生长无影响。水溶性的生物碱 抑菌效果十分明显,烘干后为白色晶体,滴入无菌水后能够完全溶解,溶液均一透明。由于水溶性生物碱 与其他抑菌物质相对比,具有良好的抑菌作用,而且是水溶性的,依此可以确定选用水溶性生物碱为柱层析的对象。



注:D 为非酚性叔胺生物碱;E 为水溶性生物碱 ;F 为含有氯仿 (CK)。

图1 不同生物碱提取物存在条件下西瓜枯萎病菌菌丝生长

**2.1.2 利用层析确定最佳洗脱剂。**根据表1 所示的不同溶剂、不同配比的展层剂对各类生物碱提取物样品进行展开,每份样板均置紫外灯下观察(表3),最后确定选取分离成分最多、层次最清晰、分离效果最好的展层剂组合——甲醇 水(8 2) 作为柱层析洗脱剂。

表3 不同溶剂、不同配比的展层剂对水溶性生物碱 的展层研究

溶剂及 比例(V/V)	出现的 条带	溶剂及 比例(V/V)	出现的 条带
氯仿(1)	1	石油醚 乙酸乙酯(6 2)	1
丙酮	1	苯 乙酸乙酯(8 2)	1
氯仿 丙酮(9 1)	1	甲醇(1)	1
乙酸乙酯(1)	1	甲醇 水(8 2)	2

**2.2 利用薄层层析对水溶性生物碱的简单分离和定性试验**  
用甲醇 水(8 2) 的混合物作展层剂,对水溶性生物碱 (成分E) 展开,层析荧光定位后观察到2 个条带,然后刮取各显色区域,并作抑菌试验。由图2 可见,水溶性生物碱 (成分E) 2 个成分对西瓜枯萎病菌都有较好的抑制效果,但是在薄板的最前沿跑出的条带具有的抑菌性最好。

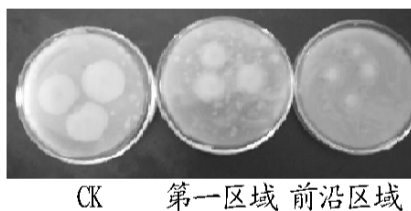


图2 薄层层析分离产物的抑菌实验

**2.3 用不同溶剂提取根粉中的活性物质** 分别用95% 甲醇和95% 乙醇浸泡万寿菊根粉冷浸3 次。参照齐景伟等苦参生物碱的提取方法<sup>[12]</sup>,结合“酸溶碱沉法”对总生物碱进行分。根据上述流程,分别用甲醇、乙醇提取得到了水溶性生物碱,定义为水溶性生物碱 (甲醇提取) 和水溶性生物碱 (乙醇提取)。将水溶性生物碱 (甲醇提取) 浓缩得到水溶性生物碱 (甲醇提取) 浓缩液。然后用薄板层析,层析液为甲醇 水(8 2),点样点分别为:A 水溶性生物碱 (乙醇提取);B 水溶性生物碱 (甲醇提取);C 水溶性生物碱 (甲醇提取) 浓缩液(表4)。

结果表明,甲醇提取的水溶性生物碱 ,在以甲醇 水(8

2) 为层析液的情况下,点样圆点完全展开,浓缩和粗提液含有相同数目的条带,只是由于浓度的原因,迁移率不同。所以选定甲醇来提取万寿菊根粉中的水溶性生物碱是正确的。

### 3 讨论

试验结果表明,万寿菊根提取出的各类生物碱中,不同萃取剂的粗提物对西瓜枯萎病菌菌丝生长和孢子萌发均有一定抑制作用,说明各提取物中均有活性成分存在,也可能活性成分有许多种,只是含量多少不同,其中尤属水溶性生物碱对西瓜枯萎病的抑制效果明显,进而对其抑菌活性成分进行了深入细致的研究。

表4 各点样点展层后出现的斑点个数及迁移率

样品	出现的斑点个数	迁移率 R <sub>f</sub> 值
A	3	0.13
		0.53
		0.81
B	2	0.14
		0.89
C	2	0.91
		0.97

通过对用“酸溶碱沉”法得到的水溶性生物碱进行薄板层析,得出最佳的洗脱剂——甲醇 水(8 2)。试验得到5 类生物碱,利用薄板层析观察各自在不同展层剂的展开情况,初步肯定生物碱由几种物质组成,基本证实水溶性的生物碱抑菌活性较好,只是量较少,不能光靠提取,需在实验室研究出结构,合成得到。试验获得了最佳水溶性生物碱成分分离的洗脱剂和提取水溶性生物碱的改进方法。

该试验为新农药的开发和先导化合物的发现提供依据,同时也为开发新的防治西瓜枯萎病的植物源农药提供理论基础和科学依据。

### 参考文献

- [1] 李玉平,龚宁,慕小倩. 菊科植物资源及其开发利用研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003(31):151-156.
- [2] 吴云骥,周海梅,赵萍,等. 万寿菊化学成分的研究[J]. 信阳师范学院学报:自然科学版,2004,17(4):417-419.
- [3] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京:化学工业出版社,2004:272-277.
- [4] 王新国,徐汉虹,赵善欢. 杀虫植物万寿菊的研究进展[J]. 西安联合大学学报,2002,5(2):6-10.
- [5] 陈红兵,王金胜,张作刚,等. 万寿菊根的提取物对西瓜枯萎病反应的抗性研究[J]. 植物病理学报,2003,33(5):439-443.
- [6] 范青山,肖小年,余世望. 我国抗菌植物资源研究与开发利用[J]. 自然资源,1995(16):20-24.
- [7] 刘志俊,谢德明,刘治波. 国外农药发展现状及未来展望[J]. 农药科学与管理,2000,21(2):12-14.
- [8] 徐汉虹,张志祥,程东美. 植物源农药与农业可持续发展[J]. 科技导报,2002(7):42-44.
- [9] 王文斌,郭春绒. 万寿菊根不同溶剂提取物对辣椒枯萎病菌的抑制作用[J]. 山西农业大学学报,2004,24(4):407-410.
- [10] 康文艺,余正文,杨小生,等. 生物碱成分常用显色剂及一种检测内酰胺的特效方法[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(3):39.
- [11] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 北京:科学出版社,2002:100-101.
- [12] 齐景伟,关红,乌云,等. 苦参生物碱的提取分离及抗寄生虫作用的研究[J]. 内蒙古畜牧科学,2003(3):5-7.