

苦参、山豆根生物碱及其总碱的抑菌活性研究

戴五好¹, 钱利武^{2*}, 杨士友^{3*}, 周国勤², 王丽丽⁴

(1. 安徽中医学院, 合肥 230031; 2. 安徽省药物研究所, 合肥 230022;
3. 安徽省药品评审中心, 合肥 230022; 4. 安徽医学高等专科学校, 合肥 230601)

[摘要] 目的:通过研究苦参、山豆根中生物碱及其总碱的体外抑菌活性,探讨苦参碱类化合物抑菌活性与结构之间的相关性。方法:采用牛津杯法,菌株37℃恒温培养24h,检测苦参、山豆根中生物碱对7种菌株(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、产碱假单胞菌、恶臭假单胞菌、肺炎链球菌、甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌)的抑制作用。结果:苦参、山豆根中生物碱对7种菌株均有抑制作用,其中氧化苦参碱、氧化槐果碱的抗菌作用较弱,槐定碱对甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌抗菌作用显著,抑菌圈分别达到(2.60±0.10), (2.53±0.15)cm。苦参总碱、山豆根总碱对乙型溶血性链球菌的抑菌圈分别为(2.43±0.21), (1.77±0.05)cm。结论:苦参、山豆根中生物碱的结构与抑菌活性有一定的联系,苦参、山豆根中生物碱可作为天然抗菌成分加以开发和利用。

[关键词] 苦参;山豆根;生物碱;抑菌活性;构效关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0177-04

Study on Antimicrobial Activity of Alkaloids in *Sophora flavescens* and *S. tonkinensis*

DAI Wu-hao¹, QIAN Li-wu^{2*}, YANG Shi-you^{3*}, ZHOU Guo-qin², WANG Li-li⁴

(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;
2. Anhui Institute of Materia Medica, Hefei 230022, China; 3. Center for Drug Evaluation in Anhui Province, Hefei 230022, China; 4. Anhui Medical College, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective:** By studying the alkaloids of *Sophora flavescens* and *Sophora tonkinensis* *in vitro* antibacterial activity, the relationship between the antibacterial activity and structure was examined. **Method:** Using

[收稿日期] 20110711(007)

[基金项目] 长三角地区科技联合攻关项目(10140702018);安徽省高层次人才创新创业资金(2009Z064)

[第一作者] 戴五好, 硕士研究生, 药师, 从事天然产物研究, Tel:0551-3658348, E-mail:280888243@qq.com

[通讯作者] * 杨士友, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药理及中药新药研究与开发, Tel: 05513658348, E-mail:acec@ada.gov.cn

* 钱利武, 博士, 从事天然产物开发研究, Tel:0551-3658348, E-mail:qianlw@163.com

- 瘀证和心阳虚血瘀证病症动物模型的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(3):245.
- [6] Burrell L M, Chan R, Phillips P A, et al. Validation of anechocardiographic assessment of cardiac function following moderate size myocardial infarction in the rat [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23: 570.
- [7] 祝善俊, 王江. 能量代谢疗法能否作为治疗心力衰竭的新靶点? [J]. 岭南心血管病杂志, 2010, 16(2):97.
- [8] Van Bilsen M, Smeets P J, Gilde A J, et al. Metabolic remodeling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2):218.
- [9] 林谦, 于友华. 党参对冠心病心绞痛患者的血液细胞及对小鼠心肌作用的定量细胞化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1994, 3(4):398.
- [10] 张琳, 常勃勃, 曹婉雯, 等. 丹参素对大鼠离体心脏缺血再灌注心肌能量代谢的影响[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3):278.
- [11] 胡元会, 吴华芹, 马铁民, 等. 心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌三磷酸腺苷含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5):1029.

[责任编辑] 聂淑琴

Oxford cup method, strains had been cultured for 24 hours at a constant temperature of 37 °C, the antimicrobial effect of alkaloids in *S. flavescens* and *S. tonkinensis* was studied *in vitro* against seven strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. putida*, *Streptococcus pneumoniae*, α -hemolytic streptococcus, β -hemolytic streptococcus). **Result:** The experimental results indicated the alkaloids in *S. flavescens* and *S. tonkinensis* showed the good inhibiting effect for seven strains, antibacterial activities of oxymatrine and oxysophocarpine were weak *in vitro* antibacterial activities of sophoridine showed remarkable effect for α -hemolytic streptococcus and β -hemolytic streptococcus, the inhibition zones by sophoridine were (2.60 ± 0.10), (2.53 ± 0.15) cm to α -hemolytic streptococcus and β -hemolytic streptococcus respectively. The inhibition zones by total matrine and total alkaloids in *Tonkin sophora* root were (2.43 ± 0.21), (1.77 ± 0.05) cm to β -hemolytic streptococcus respectively. **Conclusion:** It is concluded that there is some relationship between antibacterial activity and structure of alkaloids in *S. flavescens* and *S. tonkinensis*. Alkaloids as a natural antimicrobial components can be developed and utilized.

[**Key words**] *Sophora flavescens*; *Sophora tonkinensis*; alkaloid; antimicrobial activity; structure-activity relationship

苦参为双子叶植物纲豆科槐属植物苦参的干燥根,具有清热燥湿、杀虫止痒、通利小便和抗炎抗肿瘤等功效^[1-2],分布范围广。山豆根系双子叶植物纲豆科植物越南槐的干燥根及根茎,功效为清热解毒、消肿利咽、抗肿瘤、抗炎等^[1,3]。植物化学研究显示苦参及山豆根均含有多种生物碱,苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱属于苦参碱型生物碱,是由三价氮原子形成稠合的 3 个哌啶环(又称双稠哌啶)组合而成,不同分子之间的差别表现在 H 的构型以及双键的有无。野靛碱和鹰爪豆碱分别属于金雀花碱型及鹰爪豆碱型,与苦参碱型化合物结构相似,具体结构如图所示(图 1)。本实验旨在通过苦参、山豆根中生物碱及其总碱的体外抑菌作用,探讨其生物碱抑菌活性与结构的关系,为苦参碱类抗菌药物的开发利用提供理论依据。

科技有限公司,纯度均在 98% 以上);山豆根药材(产地广西)、苦参药材(产地安徽),经安徽药物研究所张毅主任鉴别,山豆根药材为越南槐 *Sophora tonkinensis* Gapnep. 的干燥根及根茎,苦参药材为苦参 *S. flavescens* Ait. 的干燥根;青霉素钠,哈药集团制药总厂(批号 A100506513)。

1.2 菌种 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CICC 20235)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* CICC 20236)、产碱假单胞菌(*P. alcaligenes* CICC 21622)、恶臭假单胞菌(*P. putida* CICC 21884)均购自中国食品发酵工业研究院;肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae* 31002)、甲型溶血性链球菌(α -hemolytic streptococcus 32210)、乙型溶血性链球菌(β -hemolytic streptococcus 32210)为安徽药物研究所药理教研室提供,均购自中国食品药品检定研究院。

1.3 试剂 乙醇、氨水、盐酸均为分析纯;生理盐水,蒸馏水,732 阳离子交换树脂等。

1.4 牛肉膏汤琼脂培养基成分 牛肉膏 1.2 g, 蛋白胨 4 g, 氯化钠 2 g, 琼脂 8 g, 蒸馏水 400 mL。

1.5 仪器 DNP-9082(1A)电热恒温培养箱(金坛市泰纳仪器厂),SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),LX-C35L 型立式自动电热压力蒸气灭菌器(合肥华泰医疗设备有限公司),AEY-210 电子分析天平(湘仪天平设备有限公司),KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 苦参、山豆根总生物碱的提取 山豆根生物总碱的提取^[4]:山豆根药材 0.5 kg,以 2 倍量 0.5% 盐酸水溶液超声 30 min,再经 17 倍量 0.5% 盐酸水

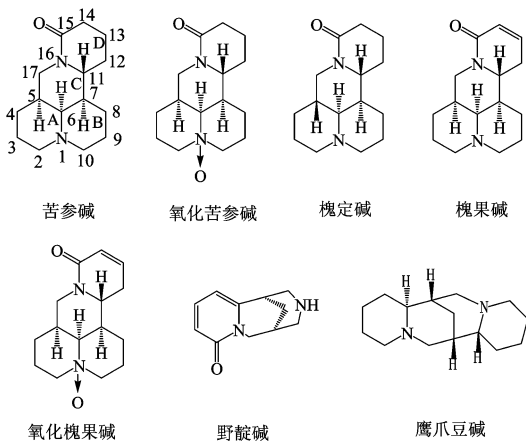


图 1 苦参碱类化合物

1 材料

1.1 样品 苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱,野靛碱、鹰爪豆碱(购自南京泽朗医药

溶液渗漉,渗漉液过滤并载入 732 型阳离子交换树脂,经水及 30% 乙醇溶液洗脱除杂,然后以 6% 氨醇溶液洗脱总生物碱成分,最后减压回收氨醇液得山豆根总碱浸膏。苦参生物总碱的提取同上述操作。采用酸性染料比色法^[5](即溴甲酚绿显色法)测定山豆根、苦参总碱含量,其山豆根、苦参总碱含量分别为 83.29%,70.41%。

2.2 固体培养基的制备^[6] 称取 1.4 项所述培养基置于 150 mL 三角烧瓶中,加蒸馏水并加热使其充分溶解,定容至 150 mL;另称取 8 g 琼脂于 500 mL 烧杯中,加蒸馏水并加热充分溶解;将三角烧瓶中所溶解的培养基转移到 500 mL 含琼脂的烧杯中,加热搅拌,使混合溶解,补足水分至 400 mL,调 pH 至 7.4~7.6,并用 4 层纱布趁热过滤,转入 500 mL 三角烧瓶中,取适量脱脂棉塞住瓶口,121 °C 灭菌 30 min,待冷却至 60 °C 后取出,在超净工作台上倒入一次性培养皿中(培养基直径 10 cm 左右,所倒入的琼脂的厚度为 4 mm 左右)。待冷却凝固后需经(35±2) °C 培养 48 h,确认无菌后放入 4 °C 冰箱中保存备用。

2.3 菌悬液的制备 取 8 只试管,分别倒入等量生理盐水至 1/3 处,在紫外灯下灭菌 30 min。分别用无菌棉签蘸取 1.2 项所述菌种各菌,将菌落与生理

盐水充分搅动使细菌分散均匀,配制成密度适当的(约 10⁷ 个/mL)菌悬液。校正菌液密度与标准比浊管相同即可,所有步骤均在超净工作台内完成。

2.4 样品溶液及对照品溶液的准备 样品溶液:取 1.1 项所述各样品适量,用 0.9% 的氯化钠注射液配成高、中、低 3 个质量浓度(0.1, 0.05, 0.025 g·mL⁻¹)。阳性对照品溶液:取青霉素钠(0.48 g 为 80 万单位)0.048 g,用 0.9% 的氯化钠注射液溶解成 100 mL;再从中取 1 mL,加 0.9% 的氯化钠注射液配成 8 mL,混均,再从中移取 1 mL,加 0.9% 的氯化钠注射液 9 mL 配成 10 mL 青霉素钠溶液(10 U)。

2.5 生物碱抗菌活性的测定 牛津杯法^[7-8]测抑菌圈直径:将灭菌的牛津杯(内径 6 mm,外径 8 mm)置于涂布接有菌种的平板分区内,分别加入样品 0.2 mL 于牛津杯中,以生理盐水作为空白对照、青霉素钠做为阳性对照,细菌于 37 °C 恒温培养 24 h,测定各处理及对照菌落抑菌圈直径大小。每个处理重复 3 次,计算其平均值。

3 结果

实验结果显示苦参碱、槐定碱、野靛碱、鹰爪豆碱、苦参总碱、山豆根总碱均表现出一定的抗菌活性,且呈现明显的量效关系(表 1);从以上数据看出,

表 1 不同生物碱对实验菌的抑菌圈直径($\bar{x} \pm s, n=3$)

测试组分	质量浓度 /g·mL ⁻¹	金黄色	肺炎链球菌	甲型溶血	乙型溶血	铜绿假	产碱假	恶臭假
		葡萄球菌		性链球菌	性链球菌	单胞菌	单胞菌	单胞菌
苦参碱	0.1	1.67 ± 0.11	1.50 ± 0.10	1.63 ± 0.06	1.99 ± 0.21	2.10 ± 0.26	1.60 ± 0.10	1.60 ± 0.15
	0.05	0.80 ± 0.05	-	0.80 ± 0.1	1.50 ± 0.06	1.60 ± 0.11	1.30 ± 0.10	1.16 ± 0.15
	0.025	-	-	-	-	1.47 ± 0.06	-	-
氧化苦参碱	0.1	-	-	-	0.90 ± 0.10	-	-	1.16 ± 0.15
	0.05	0.86 ± 0.11	-	-	-	-	1.06 ± 0.12	1.03 ± 0.15
	0.025	1.06 ± 0.11	1.03 ± 0.15	-	-	-	-	-
槐果碱	0.1	1.53 ± 0.25	1.23 ± 0.06	1.30 ± 0.10	1.50 ± 0.20	1.50 ± 0.17	1.37 ± 0.15	1.43 ± 0.05
	0.05	0.90 ± 0.10	1.06 ± 0.15	1.46 ± 0.15	1.26 ± 0.05	1.33 ± 0.05	1.46 ± 0.06	1.53 ± 0.15
	0.025	1.00 ± 0.20	1.36 ± 0.15	1.63 ± 0.37	-	1.36 ± 0.12	1.23 ± 0.23	1.90 ± 0.26
槐定碱	0.1	1.80 ± 0.10	1.57 ± 0.06	2.60 ± 0.10	2.53 ± 0.15	2.23 ± 0.12	2.03 ± 0.21	1.86 ± 0.20
	0.05	1.00 ± 0.20	1.43 ± 0.15	2.20 ± 0.17	1.37 ± 0.15	1.97 ± 0.21	1.87 ± 0.12	1.20 ± 0.2
	0.025	-	1.17 ± 0.15	1.87 ± 0.20	-	1.63 ± 0.06	1.60 ± 0.10	1.16 ± 0.15
氧化槐果碱	0.1	-	-	-	2.00 ± 0.15	1.23 ± 0.06	1.50 ± 0.20	1.20 ± 0.17
	0.05	-	-	-	1.33 ± 0.21	-	1.16 ± 0.21	0.93 ± 0.06
	0.025	-	-	-	-	-	-	-
野靛碱	0.1	1.63 ± 0.23	1.90 ± 0.30	1.53 ± 0.15	2.37 ± 0.15	1.60 ± 0.17	1.53 ± 0.15	1.63 ± 0.21
	0.05	1.17 ± 0.15	1.67 ± 0.15	-	1.80 ± 0.10	-	1.37 ± 0.06	1.33 ± 0.12
	0.025	-	-	-	-	-	1.26 ± 0.12	-
鹰爪豆碱	0.1	1.70 ± 0.10	1.73 ± 0.15	1.63 ± 0.05	2.57 ± 0.15	1.47 ± 0.15	1.77 ± 0.15	1.70 ± 0.20
	0.05	1.30 ± 0.17	1.57 ± 0.06	-	2.03 ± 0.25	0.97 ± 0.15	1.33 ± 0.12	1.30 ± 0.17
	0.025	-	-	-	-	-	1.27 ± 0.21	-
苦参总碱	0.1	1.60 ± 0.10	1.53 ± 0.06	2.10 ± 0.26	2.43 ± 0.21	1.23 ± 0.06	2.00 ± 0.20	1.97 ± 0.15
	0.05	1.47 ± 0.25	1.46 ± 0.12	1.90 ± 0.26	1.27 ± 0.30	1.43 ± 0.15	1.57 ± 0.06	1.30 ± 0.10
	0.025	1.17 ± 0.25	1.37 ± 0.15	1.67 ± 0.10	-	1.10 ± 0.10	1.07 ± 0.12	1.13 ± 0.12
山豆根总碱	0.1	2.03 ± 0.21	2.03 ± 0.25	2.17 ± 0.32	1.77 ± 0.05	1.73 ± 0.06	2.00 ± 0.17	177 ± 0.15
	0.05	1.23 ± 0.25	1.47 ± 0.25	2.00 ± 0.26	1.27 ± 0.21	1.60 ± 0.17	1.53 ± 0.21	1.30 ± 0.20
	0.025	1.27 ± 0.25	1.10 ± 0.00	1.56 ± 0.21	1.16 ± 0.29	1.17 ± 0.15	1.13 ± 0.15	1.10 ± 0.20
青霉素 ¹⁾	1.0	1.33 ± 0.21	1.27 ± 0.15	1.67 ± 0.15	3.53 ± 0.21	2.53 ± 0.15	2.77 ± 0.25	1.77 ± 0.15
生理盐水	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示无明显抑菌活性;¹⁾青霉素 1 U·mL⁻¹。

仅槐果碱量效关系不显著,这可能与槐果碱在生理盐水中的溶解性较差有关。苦参碱类化合物、苦参总碱及山豆根总碱对革兰阴性及阳性菌均有抑制活性(葡萄球菌及链球菌为革兰阳性菌,假单胞菌为革兰阴性菌),没有明显差异。苦参碱及槐果碱抑菌活性要强于各自的氧化产物氧化苦参碱和氧化槐果碱。

4 讨论

资料显示苦参碱粗提物具有广谱的抑菌活性,对革兰阴性菌及阳性菌均有强烈的抑制作用^[9]。本研究结果表明苦参碱类单体化合物与苦参总碱、山豆根总碱类似,对革兰阴性菌及阳性菌均有抑制活性,未表现出明显差异;其中乙型溶血性链球菌对最为敏感,肺炎链球菌相对较差。

在苦参碱类单体化合物中槐定碱与苦参碱互为同分异构体,从结构上看两者的差别在于 C-5 位连接的 H 构型不同(苦参碱 C-5 位 H 为 α 构型,槐定碱 C-5 位 H 为 β 构型)。 β -H 在空间结构上与 C-15 位羰基相隔较近,而 α -H 与羰基相距较远,羰基具有较强的吸电子能力,从而影响到化合物的活性;从实验结果看,在同等剂量下,槐定碱的抗菌效果要明显强于苦参碱。另外, D 环上共轭结构的存在也影响到化合物的抑菌活性,如槐果碱 D 环上的 2 个 sp^2 杂化的碳原子使其产生了内应力,4 个六元环几乎处于同一个平面,影响了槐果碱与靶标的结合,因此在同等条件下槐果碱的抑菌活性低于苦参碱。

氧化苦参碱和氧化槐果碱分别为苦参碱和槐果碱的氧化物,实验结果显示在所选菌株中,槐果碱及苦参碱的抑菌活性要分别强于各自的氧化产物,这与相关文献相一致。刘军锋等研究结果表明,还原型生物碱的抑菌效果则强于氧化型生物碱^[10]。苦参碱及氧化苦参碱对原木病原真菌的孢子萌发具有不同程度的抑制作用,抑制程度与微生物种类有关^[11]。野靛碱、鹰爪豆碱的抑菌活性与苦参碱较为

接近。

总之,苦参碱类化合物及其总碱是一类极具抑菌活性的前体药物,在今后的研究中,应借助化学合成及生物转化等手段,开展苦参碱类化合物结构多样性研究;通过构效关系研究阐明化合物结构与抑菌活性之间的相关性,将有助于研制出高效广谱的临床抗菌药物。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;25,188.
- [2] 黄璐琦,王永炎.中药材质量标准研究[M].北京:人民卫生出版社,2006:299.
- [3] 王君明,崔瑛.山豆根化学成分、药理作用及毒性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):229.
- [4] 王文蜀,周亚伟,叶蕴华,等.山豆根中生物碱类化学成分研究[C].北京:中国药学会学术年会论文集,2004:43.
- [5] 孟祥松,时军.溴甲酚绿比色法测定苦参总碱含量的研究[J].安徽医药,2007,1(1):41.
- [6] 张均田.现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1410.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2003:1654,1657,1661.
- [8] 王海青,阚红卫,靳康,等.浙贝止咳颗粒镇咳祛痰及抗菌作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):207.
- [9] 王关林,唐金花,蒋丹,等.苦参对鸡大肠杆菌的抑菌作用及其机制研究[J].中国农业科学,2006,39(5):1018.
- [10] 刘军锋,丁泽,欧阳艳,等.苦豆子生物碱抗菌活性的测定[J].北京化工大学学报:自然科学版,2011,38(2):84.
- [11] 杨雪云,赵博光,巨云为.苦参碱和氧化苦参碱的抑菌活性及增效作用[J].南京林业大学学报,2008(2):79.

[责任编辑 聂淑琴]