

广西地不容提取物及其化合物的抑菌活性

邓业成，李洁荣，高成伟，杨林林

(广西师范大学生命科学学院，桂林 541004)

摘要 在室内用生长速率法测定了广西地不容块根提取物及其化合物对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的抑菌活性。结果表明，广西地不容块根提取物对上述 4 种病原菌均有明显的抑制作用，质量浓度为 10 g/L 时，72 h 的抑菌率分别为 100%、91.96%、84.76% 和 100%；在从广西地不容块根提取物分离出的 7 个化合物中，*l*-罗默碱对 4 种病菌均有很高的抑菌活性，质量浓度为 1 g/L 时，72 h 的抑菌率分别为 100%、100%、85.04% 和 100%。紫堇定对梨黑斑病菌抑菌活性高，72 h 抑菌率为 100%，对梨褐斑病菌和柑橘疮痂病菌也有较高的抑菌活性，而对柑橘溃疡病菌的抑菌活性低。广西地不容块根提取物对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的 EC₅₀ 分别为 1.252 5、2.379 3、1.758 2、1.510 0 g/L，*l*-罗默碱的 EC₅₀ 分别为 0.147 3、0.167 1、0.346 4、0.118 2 g/L。

关键词 广西地不容提取物；病原菌；抑菌活性

中图分类号 S 482.39

Inhibitory activity of the extract from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* and its compounds against pathogenic fungi and bacteria

Deng Yecheng, Li Jierong, Gao Chengwei, Yang Linlin

(College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract The inhibitory activity of the extract from the root tubers of *Stephania kwangsiensis* Lo. and its compounds against *Mycosphaerella sentina* Schroter, *Alternaria kiknchiana* Tanaka, *Sphaceloma fawcetti* Jenk. and *Xanthomonas citri* (Hasse.) Dowson was determined in laboratory using the growth rate method. The results showed that the extract from the root tubers of *S. kwangsiensis* had a significant inhibitory activity against the four pathogenic fungi and bacteria, and the inhibitory rates of the extract at a concentration of 10 g/L were 100%, 91.96%, 84.76% and 100% after 72 h of treatment, respectively. As for the seven compounds isolated from the root tubers of *S. kwangsiensis*, *l*-roemerine had high inhibitory activity against the four pathogenic fungi and bacteria, and the inhibitory rates of *l*-roemerine at a concentration of 1 g/L were 100%, 100%, 85.04% and 100% after 72 h of treatment, respectively, while corydine had high inhibitory activity against *A. kiknchiana*, medium inhibitory activity against *M. sentina* and *S. fawcetti*, low inhibitory activity against *X. citri* and 100% inhibitory rate against *A. kiknchiana*. The EC₅₀ of the extract from the root tubers of *S. kwangsiensis* to *M. sentina*, *A. kiknchiana*, *S. fawcetti* and *X. citri* were 1.252 5, 2.379 3, 1.758 2 g/L and 1.510 0 g/L, respectively, whereas the EC₅₀ of *l*-roemerine to the four pathogenic fungi and bacteria were 0.147 3, 0.167 1, 0.346 4 g/L and 0.118 2 g/L, respectively.

Key words extracts of *Stephania kwangsiensis* Lo.; pathogenic fungi and bacteria; inhibitory activities

广西地不容(*Stephania kwangsiensis* Lo.)属防己科千金藤属植物，主产于广西西北部至西南部，生于石灰岩地区的山地灌丛^[1]。其块根含有丰富的生物碱，生物碱含量达 3%~4%，目前已从广西地不容块根中分离出 12 个异喹啉生物碱^[2-3]。广西地不容是一种重要的中草药，其块根是生产中药镇痛定(*l*-四氢巴马亭)的重要原料，在临床上用于镇痛、镇静、解热等^[4-5]。作者已对广西地不容的杀虫活

性及杀虫有效成分进行了报道^[6],说明其在农药领域也有很好的应用前景。本文在室内测定了广西地不容块根提取物及其化学成分对 4 种农作物病原菌的抑菌活性,旨在为该植物应用于农作物病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药剂

广西地不容块根甲醇提取物为广西地不容块根提取物中分离获得的 7 个纯化合物,即 *l*-四氢巴马亭、紫堇定、青风藤碱、巴马亭、*l*-罗默碱、dehassiline 和氯仿巴马亭。

1.1.2 供试病原菌

梨褐斑病菌 [*Mycosphaerella sentina* (Fr.) Schroter]、梨黑斑病菌(*Alternaria kiknchiana* Tanaka)、柑橘疮痂病菌(*Sphaceloma fawcetti* Jenk.)、柑橘溃疡病菌 [*Xanthomonas citri* (Hasse.) Dowson]。从果园中采集 4 种病害的新鲜病叶,在室内用 PDA 培养基培养分离出纯菌落,用于抑菌活性测定。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的提取及化合物的分离

将采集的广西地不容块根洗净泥土和杂质,切成片状,放在室内通风处阴干,再在 60 ℃ 的恒温鼓风干燥箱内干燥 4 h,用植物粉碎机粉碎,过 368 μm 筛。称取 1 kg 干粉放入 10 L 玻璃容器中,加入 5 L 甲醇,在室温下浸提 48 h,过滤。共浸提 2 次,将 2 次滤液合并,用旋转蒸发器在水浴中减压浓缩,蒸干溶剂,得广西地不容块根提取物。称重,保存于冰箱中备用。化合物的分离及鉴定见文献^[3]。

1.2.2 抑菌活性测定

采用生长速率法,将植物提取物和化合物用丙酮和水(1∶1,极性低的化合物单用丙酮)溶解,配成 100 g/L 的药液(毒力测定时,用丙酮和水配制

成 5~6 个系列浓度的药液),备用。在洁净操作台上,用移液管取 1 mL 药液(对照用相同比例的丙酮和水代替)加入 10 mL 量筒中,再加入 9 mL PDA 热培养基,混匀,倒入已灭菌的 9 cm 培养皿中,冷却凝固后即制成带毒培养基。真菌用直径 0.4 cm 的打孔器在培养好的菌落边缘切取菌饼,并用接种针将菌饼接在带毒培养基表面,使菌饼带有菌丝的一面朝下,每个培养皿接 3 个菌饼。细菌先用无菌水配成菌悬液,然后用微量进样器吸取菌悬液接在带毒培养基表面,每个培养皿接 3 个点。最后将培养皿放入温度为(28±1) ℃,相对湿度为 65%~75%的培养箱中培养,培养一定时间后(毒力测定时 72 h 检查结果)用十字交叉法测量菌落直径,按下式计算抑菌率:

抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

其中:真菌的菌落直径=测量的平均菌落直径(cm)-0.4;细菌的菌落直径为测量的平均菌落直径。

用最小二乘法求出毒力回归方程、有效中浓度(EC₅₀)等。

2 结果与分析

2.1 广西地不容块根提取物对 4 种病原菌的抑菌活性

在室内用生长速率法测定了广西地不容块根提取物对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的抑菌活性,结果见表 1。广西地不容块根提取物对上述 4 种病原菌的生长均有明显的抑制作用,用质量浓度为 10 g/L 的药液处理,72 h 的抑菌率分别为 100%、91.96%、84.76%和 100%,对梨褐斑病菌和柑橘溃疡病菌的活性高于对梨黑斑病菌和柑橘疮痂病菌的活性。对前两种病菌的抑菌率 96 h 仍达 100%,对后两种病菌的抑菌率随时间的延长而下降。

表 1 广西地不容块根提取物对 4 种病原菌的抑菌活性¹⁾

病原菌	抑菌率±SE ²⁾ /%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
梨褐斑病菌	(100.00±0) a	(100.00±0) a	(100.00±0) a	(100.00±0) a
梨黑斑病菌	(100.00±0) a	(97.14±2.86) a	(91.96±4.10) b	(88.89±3.46) b
柑橘疮痂病菌	(100.00±0) a	(100.00±0) a	(84.76±3.20) b	(79.25±2.74) c
柑橘溃疡病菌	(100.00±0) a	(100.00±0) a	(100.00±0) a	(100.00±0) a

1) 提取物浓度为 10 g/L。2) 数据为 3 次重复平均值;同列数据后标有相同字母者表示在 5%水平上差异不显著(DMRT)。

表 2 广西地不容块根提取物对 4 种病原菌的毒力

病原菌	毒力回归方程 (y=)	EC ₅₀ (95%置信限) /g · L ⁻¹	相对毒力 ¹⁾
梨褐斑病菌	4. 853 8+1. 495 1 <i>x</i>	1. 252 5(0. 852 1~1. 653 0)	1. 90
梨黑斑病菌	4. 287 1+1. 893 7 <i>x</i>	2. 379 3(1. 623 0~3. 135 6)	1. 00
柑橘疮痂病菌	4. 774 8+0. 919 1 <i>x</i>	1. 758 2(1. 336 1~2. 180 3)	1. 35
柑橘溃疡病菌	4. 685 2+1. 758 8 <i>x</i>	1. 510 0(1. 110 7~1. 909 3)	1. 58

1) 以最大 EC₅₀ 的病原菌的相对毒力为 1. 00,其他病原菌的相对毒力用最大 EC₅₀除以该病原菌的 EC₅₀ 计算所得。

进一步测定了广西地不容块根提取物对 4 种病菌的毒力,结果见表 2。广西地不容块根提取物对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的 EC₅₀ 分别为 1. 252 5、2. 379 3、1. 758 2、1. 510 0 g/L,对 4 种病菌的毒力相差不大,差异在 2 倍以内。

2.2 广西地不容块根中 7 种化学成分对 4 种病原菌的抑菌活性

测定了从广西地不容块根提取物中分离出的 7 种异喹啉生物碱对 4 种病菌的抑菌活性,结果见表 3。*l*-罗默碱对 4 种病菌均有很高的抑菌活性,用质量浓度为 1 g/L 的药液处理,72 h 对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的抑菌率

分别为 100%、100%、85. 04%和 100%。紫堇定对梨黑斑病菌抑菌活性高,72 h 抑菌率为 100%,对梨褐斑病菌和柑橘疮痂病菌也有较高的抑菌活性,72 h 抑菌率分别为 65. 69%和 60. 47%,而对柑橘溃疡病菌的抑菌活性低。其他 5 种化合物对 4 种病菌的抑菌活性均较低。说明广西地不容块根中对 4 种病菌的主要抑菌有效成分是 *l*-罗默碱。

进一步测定了 *l*-罗默碱对 4 种病菌的毒力,结果见表 4。*l*-罗默碱对梨褐斑病菌、梨黑斑病菌、柑橘疮痂病菌和柑橘溃疡病菌的 EC₅₀ 分别为0. 147 3、0. 167 1、0. 346 4 和 0. 118 2 g/L,对 4 种病菌的毒力差异在 3 倍以内,对柑橘溃疡病菌的毒力最高,对柑橘疮痂病菌的毒力最低。

表 3 广西地不容块根中 7 种化学成分对 4 种病原菌的抑菌活性¹⁾

化合物名称	72 h 抑菌率±SE ²⁾ /%			
	梨褐斑病菌	梨黑斑病菌	柑橘疮痂病菌	柑橘溃疡病菌
<i>l</i> -四氢巴马亭	(24. 02±0. 49) e	(42. 36±6. 34) b	(11. 86±1. 60) d	(14. 29±4. 37) c
紫堇定	(65. 69±1. 97) b	(100. 00±0) a	(60. 47±1. 07) b	(18. 09±4. 15) c
青风藤碱	(48. 53±1. 47) c	(45. 49±1. 79) b	(38. 57±5. 10) c	(24. 76±7. 45) c
巴马亭	(41. 67±3. 54) c	(51. 74±0. 77) b	(34. 83±0. 54) c	(22. 86±2. 86) c
<i>l</i> -罗默碱	(100. 00±0) a	(100. 00±0) a	(85. 04±7. 49) a	(100. 00±0) a
dehassiline	(44. 61±3. 43) c	(44. 15±5. 71) b	(34. 83±1. 07) c	(43. 81±2. 52) b
氯仿巴马亭	(32. 35±4. 50) d	(15. 55±5. 37) c	(19. 34±4. 18) d	(20. 00±4. 95) c

1) 化合物浓度为 1 g/L。2) 数据为 3 次重复平均值;同列数据后标有相同字母者表示在 5%水平上差异不显著(DMRT)。

表 4 *l*-罗默碱对 4 种病原菌的毒力

病原菌	毒力回归方程 (y=)	EC ₅₀ (95%置信限) /g · L ⁻¹	相对毒力 ¹⁾
梨褐斑病菌	6. 131 9+1. 360 7 <i>x</i>	0. 147 3(0. 107 5~0. 187 1)	2. 35
梨黑斑病菌	6. 403 5+1. 806 4 <i>x</i>	0. 167 1(0. 104 7~0. 229 5)	2. 07
柑橘疮痂病菌	5. 534 8+1. 161 4 <i>x</i>	0. 346 4(0. 138 6~0. 554 1)	1. 00
柑橘溃疡病菌	6. 526 0+1. 645 6 <i>x</i>	0. 118 2(0. 085 5~0. 150 9)	2. 93

1) 以最大 EC₅₀ 的病原菌的相对毒力为 1. 00,其他病原菌的相对毒力用最大 EC₅₀除以该病原菌的 EC₅₀ 计算所得。

3 讨论

从本研究结果可看出,广西地不容在离体条件下对所测定的 3 种农作物病原真菌和 1 种病原细菌均有很高的抑菌活性,说明该植物具有广谱抗菌作用,推测可能对其他病原菌也有活性,值得进一步研究。在从广西地不容块根提取物中分离出的 7 个纯化合物中,*l*-罗默碱的抑菌活性最高,抗菌谱最广,

对所测定的 4 种病原菌均有很高活性,与块根提取物相似,但活性是块根提取物的 5. 08~14. 24 倍,认为 *l*-罗默碱是广西地不容的主要抑菌有效成分。作者在以前的研究中,已发现 *l*-罗默碱是广西地不容块根中的主要杀虫有效成分^[6],说明该化合物是广西地不容植株中重要的生物活性成分,对其构效关系进行深入研究,有可能发现活性更高的新化合物,可为新农药的创制提供新的先导化合物。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 30 卷第 1 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 40 - 70.
- [2] 闵知大, 钟守明. 广西地不容生物碱的研究[J]. 药学学报, 1980, 15(9): 532 - 537.
- [3] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容块根生物碱成分研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(4): 73 - 77.
- [4] 王宪楷, 赵同芳. 千金藤属植物中生物碱成分的分布及其生物活性[J]. 中国药学杂志, 1990, 25(1): 3 - 5.
- [5] 金国章. 左旋四氢巴马汀和它的第二代新药—左旋千金藤啶碱的药理研究进展[J]. 药学学报, 1987, 22(6): 472 - 480.
- [6] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容的杀虫活性及有效成分研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 523 - 527.