

黄连中盐酸小檗碱的提取纯化及抑菌活性研究

屈 欢^{1,2*}, 黄 雪¹, 王军节¹, 杨晨希¹, 张 秀^{1,2}

(1. 北方民族大学生物科学与工程学院, 银川 750021;

2. 宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 银川 750021)

摘要 为了探究盐酸小檗碱在植物病原真菌方面的抑制作用, 以黄连根粉为材料, 采用酸水法提取和乙醇重结晶获得盐酸小檗碱纯品, 采用生长速率法研究了盐酸小檗碱对常见植物病原菌的抑制活性。结果表明, 盐酸小檗碱的提取率为3.3%, 经高效液相色谱法测得其含量为93.56%; 抑菌活性试验表明, 盐酸小檗碱在100 μg/mL时对玉米大斑病菌的抑制率达99.9%, EC₅₀为8.20 μg/mL, 表现出比药剂对照噁霉灵和百菌清更高的抑制活性; 进一步的试验表明, 与噁霉灵及百菌清相比, 盐酸小檗碱对玉米大斑病菌的抑制作用具有持效期长的特点。

关键词 盐酸小檗碱; 提取纯化; 含量测定; 抑菌活性

中图分类号: S 482.292 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019020

Purification and antifungal activity of berberine hydrochloride in Rhizoma Coptidis

QU Huan^{1,2*}, HUANG Xue¹, WANG Junjie¹, YANG Chenxi¹, ZHANG Xiu^{1,2}

(1. College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, China; 2. Ningxia Key Laboratory for Development and Applications of Microbial Resources in Special Environment, Yinchuan 750021, China)

Abstract The aim of this study is to measure the antifungal activity of berberine hydrochloride. The root powder of Rhizoma Coptidis was used as material to obtain berberine hydrochloride, the purified product of which was successfully obtained through extraction by using acid-water method and recrystallization with ethanol, and the antifungal activity of berberine hydrochloride against phytopathogenic fungi was investigated using the mycelial growth rate method. The results showed that the extraction rate of berberine hydrochloride was 3.3% and its content was 93.56% measured by HPLC. The results of biological assay indicated that berberine hydrochloride exhibited an excellent antifungal activity against *Exserohilum turcicum* at the concentration of 100 μg/mL with an inhibition rate of 99.9% and EC₅₀ value of 8.20 μg/mL, which were better than those of hymexazol and chlorothalonil, two commercially available agricultural fungicides. Compared with hymexazol and chlorothalonil, the inhibition effect of berberine hydrochloride on *E. turcicum* had a longer effective period.

Key words berberine hydrochloride; extraction and purification; determination of content; antifungal activity

由真菌和细菌引起的植物病害严重影响作物的产量和品质, 是造成巨大经济损失的主要原因之一^[1-2]。喷施化学抑菌剂是目前控制病害采取的主要手段, 但存在食品安全、环境污染以及易诱导病原物产生抗性等问题。因此, 开发新型、安全、环保的农业病害防控技术是当前生产中亟待解决的问题^[3]。已有研究证实植物多种次生代谢产物对病害具有良好的抑制作用^[4-5], 通过植物获取抑菌成分用于预防和控制农业病害的发生, 具有低毒、安全、环

境友好等特点, 已逐渐成为现代农业中防治病害的一项新型措施^[6-7]。

小檗碱又称黄连素, 一种常见的异喹啉生物碱, 主要以盐酸盐的形式广泛分布于植物中, 尤其在毛茛科、芸香科、小檗科植物根茎中含量较高, 如在黄连中含量最高可达10%, 是一种理想的天然药物资源, 近年来关于它的生物学及药理学十分广泛^[8]。文献报道及临床研究表明, 小檗碱具有广谱的抗菌活性, 它作为传统中药主要用于菌痢、胃肠炎、痈肿

收稿日期: 2019-01-11 修订日期: 2019-05-14

基金项目: 北方民族大学校级科研项目(2019XYZSK02); 北方民族大学引进人员科研启动项目(4400302500); 北方民族大学植物性农产

* 通信作者 E-mail: rosalie42@163.com

等细菌性感染疾病^[9],而在抑制病原真菌方面的研究和应用较少,尤其是植物病原菌防治方面。基于此,本研究选用黄连为原料,从中提取分离得到小檗碱,利用液相色谱分析其含量,采用生长速率法测试了其对常见植物病原真菌的抑制活性,探讨盐酸小檗碱对农业病原菌的抑制作用,为基于天然产物的植物源抑菌剂的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄连块根:购自宁夏银川国有永吉药店,将块根粉碎成粉末状,过80目筛,保存备用。

供试菌株:玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica*, 枸杞根腐病菌 *Fusarium solani*, 马铃薯早疫病菌 *Alternaria solani*, 马铃薯干腐病菌 *Fusarium sulphureum*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*。供试菌株中枸杞根腐病菌和西瓜枯萎病菌为宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室分离并鉴定,其余病菌为西北农林科技大学植物保护学院馈赠。

1.2 仪器及试剂

仪器:1200型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;X-4熔点测定仪,巩义市予华仪器有限责任公司;YXQ-LS-50A立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;ZF-2型三用紫外分析仪,上海市安亭电子仪器厂;HPS-250生化培养箱,上海恒科学仪器有限公司。

试剂:盐酸小檗碱标准品,上海瑞永生物科技有限公司;噁霉灵及百菌清,纯度≥98%,上海一研生物科技有限公司;薄层层析硅胶,青岛市基亿达硅胶试剂厂;色谱纯甲醇,阿拉丁;色谱纯乙腈,阿拉丁;其他试剂均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 黄连根中小檗碱的提取、分离与纯化及含量测定

1.3.1.1 小檗碱的提取、分离与纯化

准确称取黄连根粉50g,加入8倍量的0.5%硫酸水溶液,浸泡24h,过滤,滤液用石灰乳调pH为10,静置30min后抽滤,滤液用浓盐酸调pH为3,再加入滤液体积的10%固体氯化钠,搅拌至溶液出现微浊现象为止,放置过夜。抽滤,滤饼用蒸馏水洗

3次,50℃烘干得盐酸小檗碱粗品^[10]。粗品用热乙醇重结晶即得精制的盐酸小檗碱,使用熔点测定仪测定其熔点,并采用盐酸小檗碱标准品做对照,硅胶薄层层析检测盐酸小檗碱的纯度。

1.3.1.2 盐酸小檗碱含量测定^[11]

色谱条件:色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(35:65);检测波长345 nm;柱温为室温;流速1 mL/min;进样量为20 μL。

标准品溶液的制备:精密称取盐酸小檗碱标准品5 mg于10 mL容量瓶中溶解,超声处理30 min,再取1 mL溶于10 mL甲醇即得标准品溶液,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液备用,即得0.05 mg/mL的标准品溶液,备用。

样品溶液的制备:精密称取盐酸小檗碱样品3 mg,置于10 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,然后取1 mL转至10 mL容量瓶中,加10 mL甲醇溶解并制成0.03 mg/mL的样品溶液。然后用0.45 μm微孔滤膜过滤,备用。

1.3.2 抑菌活性测定

采用生长速率法^[12]测试目标化合物盐酸小檗碱对玉米大斑病菌、枸杞根腐病菌、马铃薯早疫病菌、马铃薯干腐病菌、小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌、番茄灰霉病菌、西瓜枯萎病菌8种病原菌的抑制活性。

将盐酸小檗碱用少量丙酮溶解,加入PDA培养基中,制成含药平板。以加入丙酮溶剂为空白对照组,以噁霉灵和百菌清作为药剂对照。将供试病原菌菌饼(直径0.4 cm)分别接种于含药平板上,于(28±0.5)℃培养箱中培养4~9 d,观察菌丝生长情况,并用游标卡尺采用十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝生长抑制率,并进行数据处理。

$$\text{抑菌率} = \frac{(\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径})}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 小檗碱的提取、分离与纯化

2.1.1 盐酸小檗碱的产率与纯度

试验用酸水法提取盐酸小檗碱,并采用乙醇重结晶方法纯化,重复3次,提取率为3.3%,试验重现性好。经熔点测定仪测定其熔点为200℃。以盐酸小檗碱标准品为对照,利用硅胶薄层层析法点样,

氯仿:氨:甲醇=30:1:8展开,于三用紫外分析仪下观察,目标化合物盐酸小檗碱与标准品在 R_f 值为0.62的位置上有相同的绿色荧光斑点,初步判断其为盐酸小檗碱,且纯度较高(图1)。

2.1.2 盐酸小檗碱含量测定

标准品及样品的HPLC的图谱如图2所示,从图中我们可以看出盐酸小檗碱标准品在1.3.1.2条件下各组分分离良好,在保留时间为3 min时出现目标化合物盐酸小檗碱的色谱峰,峰面积为94.59%。相同条件下,供试样品在3 min时出现对应的色谱峰,峰面积为93.56%,说明从黄连中提取分离纯化的为目标产物盐酸小檗碱,且纯度较高。

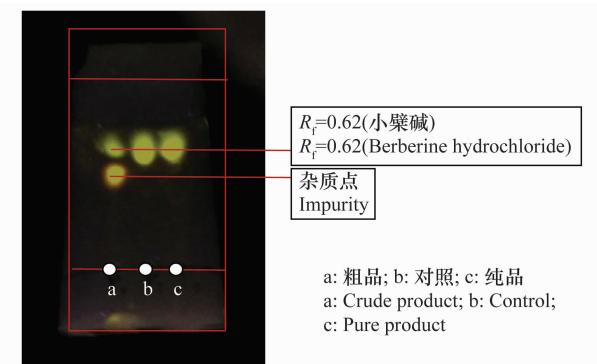


图1 盐酸小檗碱化合物薄层色谱图

Fig. 1 Thin-layer chromatographic analysis of berberine hydrochloride

表1 化合物对常见植物病原菌的抑制活性(96 h)¹⁾

Table 1 The inhibitory activity of several fungicides against common plant pathogens (96 h)

供试菌 Test pathogens	盐酸小檗碱 berberine hydrochloride	抑制率/% Inhibitory rate	噻霉灵 hymexazol	百菌清 chlorothalonil	空白对照 CK
玉米大斑病菌 <i>Setosphaeria turcica</i>	(99.9±0.01)aA	(82.8±0.18)bA	(48.0±0.46)cE	0	
马铃薯早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	(13.0±1.20)cE	(60.6±0.21)bC	(68.7±1.42)aC	0	
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	(7.2±1.73)bF	(84.7±2.11)aA	(83.7±2.62)aA	0	
枸杞根腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	(22.6±0.59)cD	(60.1±0.69)aC	(49.5±1.36)bE	0	
苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	(29.2±1.70)cC	(35.6±2.10)bE	(66.9±2.95)aC	0	
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium sulphureum</i>	(7.5±1.05)cF	(48.5±3.27)bd	(52.7±1.10)aD	0	
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	(44.0±1.19)cB	(71.1±2.64)bB	(76.7±0.38)aB	0	
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	(23.1±2.63)cD	(29.8±1.66)bf	(83.7±1.23)aA	0	

1) 表中抑制率为3次重复试验的平均值±标准差。噻霉灵和百菌清为阳性对照,丙酮为空白对照(CK)。数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著,小写字母表示同行数据间的比较,大写字母表示同列数据间的比较。

Data in the table are mean±SD. Hymexazol and chlorothalonil are positive controls, and acetone is a blank control. Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test; the lowercase letters represent comparisons between data in the same row, and the capital letters represent comparisons between data in the same column.

由表1可知,在浓度为100 μg/mL时,盐酸小檗碱对马铃薯早疫病菌、番茄灰霉病菌、枸杞根腐病菌、苹果腐烂病菌、马铃薯干腐病菌、小麦赤霉病菌、

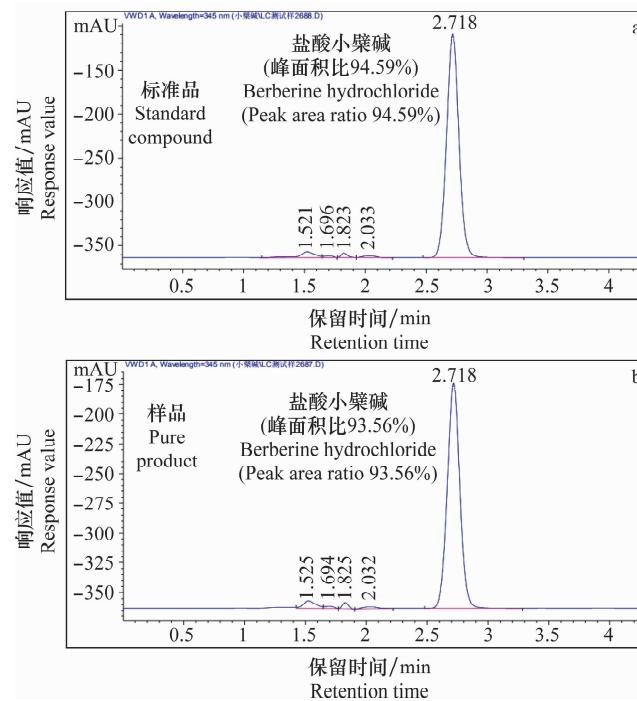


图2 盐酸小檗碱标准品(a)及样品(b)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of standard compound (a) and pure product (b) of berberine hydrochloride

2.2 盐酸小檗碱的生物活性

2.2.1 盐酸小檗碱对常见病原真菌的抑制活性

采用菌丝生长速率法测定100 μg/mL盐酸小檗碱及阳性对照100 μg/mL噁霉灵和100 μg/mL百菌清对8种植物病原真菌的抑制作用,结果如表1所示。

西瓜枯萎病菌均都表现出较低的抑制活性,抑制率为7.2%~44.0%,但对玉米大斑病菌的抑制率为99.9%,表现出比阳性对照噁霉灵(82.8%)和百菌

清(48.0%)更高的抑制活性。在所有供试病菌中,盐酸小檗碱只表现出对玉米大斑病菌高的抑制活性,这表明盐酸小檗碱在农作物病原菌抑制方面有可能是一种较专一性的抑菌剂,但本试验的供试菌种数量有限,对其他病原菌的作用有待进一步研究。

2.2.2 盐酸小檗碱对玉米大斑病菌抑制活性的持效性

在2.2.1的基础上,继续观察并记录盐酸小檗碱及阳性对照噁霉灵和百菌清对玉米大斑病菌的抑制情况,每隔24 h观察记录1次,持续到第9天,其抑菌率如表2所示、抑菌效果如图3所示。结果显示,第4天和第9天,盐酸小檗碱对玉米大斑病菌的抑制率都均为99.9%,而噁霉灵的抑制率从82.8%下降为56.1%,百菌清的抑制率从48.0%下降为27.1%,由此可知,与噁霉灵及百菌清相比,盐酸小檗碱对玉米大斑病菌的抑制作用随着时间的延长,抑制效果可维持不变,在离体培养下具有持效期长

的特点。

表2 化合物(100 μg/mL)对玉米大斑病菌的抑制活性¹⁾

Table 2 The inhibitory activity of several fungicides

(100 μg/mL) against *Setosphaeria turcica*

化合物 Fungicide	抑制率/% Inhibitory rate	
	4 d	9 d
盐酸小檗碱 berberine hydrochloride	(99.9±0.01)a	(99.9±0.01)a
噁霉灵 hymexazol	(82.8±0.18)b	(56.1±0.21)b
百菌清 chlorothalonil	(48.0±0.46)c	(27.1±0.59)c
空白对照 CK	0	0

1) 表中抑制率为3次重复试验的平均值±标准差。噁霉灵和百菌清为阳性对照,丙酮为空白对照(CK)。数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著,小写字母表示同列数据间的比较。

Data in the table are mean±SD. Hymexazol and chlorothalonil are positive controls, and acetone is a blank control. Different letters indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test, and the lowercase letter represents a comparison between data in the same column.

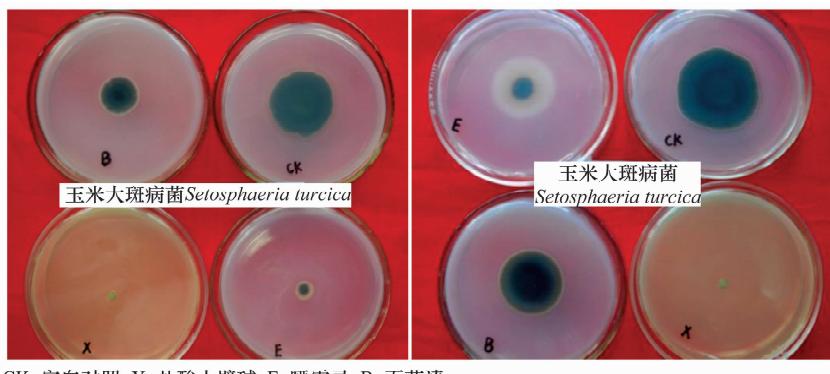


图3 化合物在4 d和9 d对玉米大斑病菌的抑制活性效果图

Fig. 3 Inhibitory activity of several fungicides against *Setosphaeria turcica* at 4 d and 9 d

2.2.3 化合物对玉米大斑病菌的EC₅₀测定

按照1.3.2抑菌活性测试方法,测定了化合物盐酸小檗碱、噁霉灵和百菌清梯度浓度下对玉米大

斑病菌的抑制活性,并根据抑菌结果计算EC₅₀,结果如表3所示。

表3 化合物对玉米大斑病菌的EC₅₀¹⁾

Table 3 The EC₅₀ values of several fungicides against *Setosphaeria turcica*¹⁾

化合物 Fungicide	回归方程 Regression equation	决定系数 R ²	半数效应浓度/ μg·mL ⁻¹ EC ₅₀	95%CL/ μg·mL ⁻¹	F值 F-value	F _{0.05(1,3)}	P值 P-value
盐酸小檗碱 berberine hydrochloride	y=2.930x+2.397	0.978	8.20	6.12~10.93	135.241	10.1	0.001
噁霉灵 hymexazol	y=1.715x+3.159	0.972	11.92	9.83~14.12	103.135	10.1	0.002
百菌清 chlorothalonil	y=0.830x+4.051	0.988	13.52	9.64~19.21	249.811	10.1	0.001

1) 噁霉灵和百菌清为阳性对照。利用软件SPSS 22.0进行数据处理并对回归方程进行F检验。

Hymexazol and chlorothalonil are positive controls. The data are analyzed by F test on SPSS 22.0.

化合物盐酸小檗碱表现出对玉米大斑病菌较高的抑制活性,抑制率为99.9%(表1),以噁霉灵和百

菌清原药为阳性对照,进一步研究了盐酸小檗碱在梯度浓度下对玉米大斑病菌的抑制效果,以浓度的

对数作为 x 轴,以抑制率的几率值作为 y 轴,利用软件 SPSS 22.0 求取毒力回归方程并计算半数效应浓度 EC₅₀,结果如表 3 所示。由表中可以看出,盐酸小檗碱对玉米大斑病菌的 EC₅₀ 为 8.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,远低于噁霉灵和百菌清对该菌的 EC₅₀ 值(噁霉灵和百菌清对玉米大斑病菌的 EC₅₀ 分别为 11.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 13.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$),表现出较好的抑制活性。

3 结论

以黄连根粉为原料提取纯化获得盐酸小檗碱纯品,提取率为 3.3%;以盐酸小檗碱标准品为对照,利用高效液相色谱法测定其含量为 93.56%;采用菌丝生长速率法对盐酸小檗碱的抑菌活性进行了研究,结果表明,在所有供试病菌中,盐酸小檗碱在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时表现出较专一的对玉米大斑病菌高的抑制活性,抑制率为 99.9%,EC₅₀ 为 8.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制活性高于阳性对照噁霉灵和百菌清;化合物对玉米大斑病菌持续抑制情况观察表明,与噁霉灵及百菌清相比,盐酸小檗碱对玉米大斑病菌的抑制作用具有持效期长的特点。盐酸小檗碱作为一种在植物中含量较高的天然药物资源,在抑菌方面表现出的这种专一性和较高的抑制活性,有待于我们进一步研究,为开发高效、低毒新型农用杀菌剂提供理论参考。

参考文献

- [1] 康振生. 我国植物真菌病害的研究现状及发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 9–12.
- [2] LIU Wende, WANG Guoliang. Plant innate immunity in rice: a defense against pathogen infection [J]. National Science Review, 2016, 3(3): 295–308.
- [3] ZHANG Wenjun, JIANG Fubin, OU Jianfeng. Global pesticide consumption and pollution: With China as a focus [J]. Proceedings of the International Academy of Ecology& Environmental Sciences, 2011, 1(2): 125–144.
- [4] OKWU D E, AWURUM A N, OKORONKWO J I. Phytochemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of extracts from citrus plants against *Fusarium oxysporum* of okra plant (*Hibiscus esculentus*) [J]. Pest Technology, 2007, 10: 145–148.
- [5] PRASAD R R, ANAMIKA A. Effects of plant leaf extract against *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz Sac.) causing post-harvest disease of papaya [J]. Journal of Agricultural Science, 2015, 7(5): 195–198.
- [6] 张兴, 马志卿, 冯俊涛, 等. 植物源农药研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 685–698.
- [7] ZIDA A, BAMBA S, YACOUBA A, et al. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review [J]. Journal de Mycologie Médicale, 2017, 27(1): 1–19.
- [8] 刘鸿雁, 张冬梅, 杨永建, 等. 盐酸小檗碱对大鼠糖脂代谢的影响[J]. 兰州大学学报(医学版), 2007, 33(2): 5–9.
- [9] 林媛, 司书毅, 蒋建东. 小檗碱的抗菌作用[J]. 药学学报, 2018, 53(2): 163–168.
- [10] 程咏梅, 陈仁华. 小檗碱提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1445–1447.
- [11] 侯峰, 田金苗. 高效液相色谱法测定香连胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2756–2757.
- [12] 屈欢, 田英, 谭春艳. 百里酚偶氮类衍生物的合成及抑菌活性[J]. 农药, 2018, 57(8): 555–559.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 84 页)

- [13] 吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 4–9.
- [14] WESTBROOK J K. Noctuid migration in Texas within the nocturnal aeroecological boundary layer [J]. Integrative and Comparative Biology, 2008, 48(1): 99–106.
- [15] WESTBROOK J K, EYSTER R S, WOLF W W, et al. Migration pathways of corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) indicated by tetroon trajectories [J]. Agricultural and Forest Meteorology, 1995, 73(1–2): 67–87.
- [16] FARROW R, DALY J. Long-range movements as an adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera, Noctuidae)—a review of its occurrence and detection in 4 pest species [J]. Australian Journal of Zoology, 1987, 35(1): 1–24.
- [17] TAYLOR P S, SHIELDS E J. Flight thresholds of the armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Environmental Entomology, 1990, 19(5): 1410–1417.
- [18] WESTBROOK J K, ESQUIVEL J F, LOPÉZ J D, et al. Validation of bollworm migration across south-central Texas in 1994–1996 [J]. Southwestern Entomologist, 1998, 23(3): 209–220.
- [19] LI Xijie, WU Mingfei, MA Jian, et al. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach [J]. Pest Management Science, 2020, 76(2): 454–463.
- [20] WANG Fengying, YANG Fan, LU Minghong, et al. Determining the migration duration of rice leaf folder (*Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)) moths using a trajectory analytical approach [J/OL]. Scientific Reports, 2017, 7: 39853.
- [21] 云南省植保植检站. 2019 年云南省病虫情报第七期: 全省草地贪夜蛾发生动态 [EB/OL]. (2019–07–02). <http://www.ynzbjz.com/Item/4032.aspx>.
- [22] 翟保平, 张孝羲. 迁飞过程中昆虫的行为: 对风温场的适应与选择 [J]. 生态学报, 1993, 13(4): 356–363.
- [23] 蒋春先, 杨秀丽, 齐会会, 等. 中国华南地区稻纵卷叶螟迁飞的一次雷达观测 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(23): 4808–4817.
- [24] 胡高, 包云轩, 王建强, 等. 褐飞虱的降落机制 [J]. 生态学报, 2007, 27(12): 5068–5075.

(责任编辑: 田 喆)