

千里光植物化学预试及抗菌有效部位化学成分检查

徐晓彬,林红英,冯羽裳,陈进军

(广东海洋大学农业生物技术研究所,广东湛江 524088)

摘要: 采用试管分提预试法、系统提取预试法和圆形纸层析预试法,对千里光进行了植物化学成分预试;利用硅胶 G薄板层析法,喷雾 Ehrlich试剂,对千里光全草及其抗菌有效部位中双稠吡咯啉生物碱进行了检查。结果发现,千里光全草含有黄酮及其甙类、萘醌及其甙类、酚类、强心甘、氨基酸、鞣质、皂甙、有机酸和生物碱,不含甾甙、多肽、蛋白质、内酯、挥发油和油脂;千里光全草含有双稠吡咯啉生物碱,但千里光抗菌有效部位中则未检出双稠吡咯啉生物碱。

关键词: 千里光;植物化学预试;化学成分;双稠吡咯啉生物碱

中图分类号: S853.93

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2006)03-0010-04

千里光 (*Senecio scandens* Buch - Ham., SC)为菊科千里光属的一种多年生草本植物。千里光属约有 1500种植物,其中大多数因含有较多量有毒双稠吡咯啉生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs)而成为有毒植物^[1]。对千里光属植物的化学成分研究多强调对 PAs的提取、分离和鉴定,已有 200多种 PAs被鉴定^[2]。SC对人和动物具有较广泛和明显的药理作用,毒副作用小^[3-6],其 70%乙醇提取物的抑杀细菌功效与市售双黄连注射液相当(另报),是 SC抗菌有效部位。SC抗菌有效部位是否含有 PAs尚未见报道。本研究对 SC进行植物化学预试,并对 SC全草及其抗菌有效部位中 PAs进行检测,为 SC的中药现代化研究提供资料。

收稿日期:2005-12-20

项目来源:广东省科技攻关重点引导项目(2004B20201007)

作者简介:徐晓彬(1980-),男,在读硕士研究生,主要研究方向为高效无公害饲料。陈进军博士为通讯作者, E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 千里光

于 2005年 8月采自广东省湛江市麻章区,经广东海洋大学农业生物技术研究所鉴定为菊科千里光属的多年生草本植物千里光 (*Senecio scandens* Buch - Ham.)。将 SC全草阴干,粉碎,储藏于阴凉干燥处备用。

1.2 试剂与仪器

碘化钾、次硝酸铋、碘化汞钾、硅钨酸、苦味酸、对硝基苯胺、亚硝基铁氰化钠、3,5-二硝基苯甲酸、磷钼酸、醋酸镁、三氯化铁、白明胶、茛三酮、硝酸银、镁粉、层析用硅胶 G等均作为国产分析纯试剂。Ehrlich试剂:对-二甲氨基苯甲醛 0.5g溶解在 25 ml含 0.35 ml高氯酸的无水乙醇中(新鲜配制)。KQ-100B型超声波机(昆山市超声仪器有限公司)、LGWD700(MG-5061T)型微波炉(天津乐金电子电器有限公司)、RE-52C型旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂)、FD-1B型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

[12] A lejandra Luquita, A. M. Gennaro, M. Rasia Influence of adsorbed plasma proteins on erythrocyte rheological

properties: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Pflügers Arch - Eur J Physiol, 2001, 443: 78~83.

Effects of *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber on the intestinal peristalsis and hemorheology in mice

XU Jian - ping, XIAO Hong - bo, SUN Zhi - liang, ZHOU Ke - yan

(College of Animal Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128, China)

Abstract: Objective: To study the regulative effects of *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber on the intestinal peristalsis and hemorheology in mice, and to provide an experimental evidence for the application of *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber. Methods: Sixty normal mice were divided into normal group, *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber group at low dose (5%) and at high dose (10%). The intestinal peristalsis in thirteen normal mice was measured 30 days after insoluble *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber had been given. Blood sample was taken from the right eye of another 30 mice to determine their hemorheological indexes such as hematocrit level and apparent viscosity of whole blood high and low shears. Results: In intestinal peristalsis test the carbon powder push percentage of *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber group at high dose had significant difference ($P < 0.01$) compared with normal control, while the hematocrit level and apparent viscosity of whole blood high and low shears were significantly lower than that of the control ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: *A laria pinnatifida* Harv. dietary fiber can enhance intestinal peristalsis, reduce hematocrit level and the apparent viscosity of whole blood high and low shears, and improve blood fluxion of mice.

Key words: *A laria pinnatifida* Harv.; dietary fiber; intestinal peristalsis; hemorheological indexes; mice

WFH-203型三用紫外分析仪(温州市孚华分析仪器厂)等。

1.3 SC植物化学预试

将SC全草粉末过20目筛,分别参照文献^[7,8]所述的方法,制备预试液,采用试管分项提取预试法、系统提取预试法和圆形纸层析预试法,进行SC全草植物化学成分预试。

1.4 SC全草中PA_s的检测

1.4.1 总生物碱提取液的制备 取过20目筛的SC全草粉末30g,加甲醇240ml,72℃热回流5次,每次4h,回收浸泡液中的溶剂,得浸膏,用1%HCl酸化处理,酸水液用等量CH₂Cl₂萃取6次除杂质,水层用氨水碱化至pH10~11,再加等量CH₂Cl₂萃取6次,回收有机相溶剂,得总生物碱提取液^[2]。

1.4.2 总生物碱及PA_s分析 采用试管法,分别用生物碱沉淀试剂碘化汞钾、苦味酸和硅钨酸进行总生物碱检查。将总生物碱提取液冷冻干燥,用适量甲醇溶解,利用薄板层析法(TLC),对总生物碱提取液进行PA_s分析。TLC展开剂为氯仿:甲醇:氨水=85:14:2,用PA_s特异性Ehrlich试剂喷雾显色,观察。如有淡紫色或紫褐色斑点,则为PA_s检查阳

性^[2],测定R_f值。每次TLC检查进行5个重复。

1.5 SC抗菌有效部位中PA_s的检测

1.5.1 SC全草70%乙醇提取液的制备 取过20目筛的SC全草粉末30g,装入烧瓶,加入70%乙醇适量,浸泡后超声处理1h^[9],再微波处理30s,然后加入70%乙醇至300ml,浸渍24h,收集浸出液,过滤,加无水乙醇50ml,过滤,向滤液中加入1/3体积的乙醚,萃取,重复2次,使脱色素,水层冷冻干燥,即得SC全草70%乙醇提取物(亦即SC抗菌有效部位)。

1.5.2 SC抗菌有效部位中PA_s的检测 将SC抗菌有效部位用适量甲醇溶解,采用1.4.2中所述方法分别进行总生物碱检查和PA_s薄板层析法分析。

2 结果

2.1 SC植物化学成分预试

预试结果见表1和表2。综合表1和表2可知,SC全草中含有黄酮及其甙类、蒽醌及其甙类、酚类、强心苷、氨基酸和鞣质,为千里光的主要成分。还含有皂甙、有机酸和生物碱等。不含甾甙、多肽、蛋白质、内酯、挥发油和油脂。

表1 千里光预试液中植物成分的检测结果(分项提取预试法和系统预试法)

编号	预试液号	试剂名称或条件	反应现象	结果
1	A	挥发油检测	阴性	挥发油 -
2	B	改良碘化铋钾试验	红棕色	生物碱 ±
3	B	碘化汞钾试验	浅黄色	生物碱 ±
4	B	硅钨酸试验	浅黄色	生物碱 +
5	B	氯化钠白明胶试验	浑浊	酚类 ±
6	B	三氯化铁试验	绿色	酚类 ±
7	B	重氮化试验	红色	酚类 +
8	C	溶血实验	红色	皂苷 +
9	C	沉淀试验	浑浊	蛋白质 ±
10	C	双缩脲试验	红色	蛋白质或多肽 ±
11	C	茚三酮试验	阴性	蛋白质,多肽或氨基酸 -
12	D	泡沫试验	阴性	皂苷 -
13	D	氯化钠白明胶试验	阴性	酚类 -
14	D	三氯化铁试验	绿色	酚类 +
15	D	重氮化试验	红色	酚类 +
16	E	3,5-二硝基苯甲酸试验	红色	强心苷 ±
17	E	碱性苦味酸试验	橙红色	强心苷 ±
18	E	亚硝基铁氰化钠试验	阴性	强心苷 -
19	E	盐酸-镁粉试验	红色	黄酮及其甙类 +
20	E	络合试验	黄绿色	黄酮及其甙类 +
21	E	碱性试验	阴性	蒽醌及其甙 -
22	E	醋酸镁试验	红色	蒽醌及其甙 ±
23	F	改良碘化铋钾	黄色沉淀	生物碱 +
24	F	碘化汞钾	阴性	生物碱 -
25	F	浓硫酸	黑色沉淀	可能含有皂甙、生物碱、其它 +
26	F	1%三氯化铁	黑绿色	可能含有酚、黄酮、鞣质 +
27	F	0.2%茚三酮反应	黄绿色	可能含有蛋白质、多肽 +
28	G	改良碘化铋钾	阴性	生物碱 -
29	G	碘化汞钾	浅黄色	生物碱 +
30	G	醇性苦味酸	阴性	可能含有生物碱、挥发油 -
31	G	浓硫酸	黑绿色	可能含有皂甙、生物碱、其它 +
32	G	1%钼酸钠浓硫酸溶液	黑绿色	生物碱 +
33	H	5%硝酸银乙醇溶液	白色沉淀	有机酸 +
34	H	1%三氯化铁	阴性	可能含有酚、黄酮、鞣质 -
35	I	10%氢氧化钠	棕黄色	可能有酚类、黄酮类、羟基醌类 +
36	I	10%氢氧化钠(加热)	灰黄色	内酯(溶解)油脂(溶解发泡) +
37	I	醇性苦味酸	阴性	可能含有生物碱、挥发油 -
38	I	浓硫酸	黑绿色	可能含有皂甙、生物碱、其它 +
39	I	盐酸+镁粉	阴性	黄酮 -
40	I	1%三氯化铁	黄色	可能含有酚、黄酮、鞣质 +

表2 千里光预试液中植物成分的检测结果(圆形纸层析法)

编号	检测项目	试剂	现象	结果
1	生物碱	喷改良碘化铋钾试剂	阴性	-
2	皂甙	喷5%磷钼酸乙醇溶液后于120℃烘5min	蓝色	+
3	强心甙	喷2%3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液,再喷4%氢氧化钠乙醇溶液	紫红色	+
4	黄酮及其甙类	喷1%三氯化铝后紫外灯光观察	黄色	+
5	蒽醌及其甙类	喷1%醋酸镁甲醇溶液	橙黄色	+
6	氨基酸	喷1%醋酸镁甲醇溶液后于90℃烘5min	紫色	+
7	酚性成分	喷2%三氯化铁乙醇溶液与2%铁氰化钾水溶液等量混合液	蓝色	+
8	鞣质	喷1%三氯化铁乙醇溶液	绿黑色	+

2.2 SC全草中 PA_s的检测

总生物碱进行试管法检查结果,碘化汞钾反应阳性、苦味酸反应阴性、硅钨酸反应阳性,结论为总生物碱阳性。TLC检查, Ehrlich试剂喷雾后,分别在 R_f 值为 0.74 ± 0.03、0.84 ± 0.01 和 0.91 ± 0.02 处出现淡紫色斑点,说明 SC 全草中含有 PA_s。

2.3 SC 抗菌有效部位中 PA_s 的检测

总生物碱试管法检查结果,碘化汞钾反应阳性、苦味酸反应阴性、硅钨酸反应阳性,结论为总生物碱阳性。经 TLC 检查,进行 Ehrlich 试剂喷雾后,未出现淡紫色斑点,即在 SC 抗菌有效部位中未检出 PA_s。

3 讨论

3.1 英国 2004 年初拟推出对含千里光属植物的内服药,包括干柏鼻炎片(Qian Bai Biyan Pian)实施禁令的法规草案,其主要根据是,千里光属的所有植物都含有 PA_s,而 SC 是千里光属的一种植物。实际上,千里光属植物有 1500 种以上,广布于世界各地,我国约 434 种,该属许多(并非所有的)植物含有 PA_s,至今已分离出 PA_s 近 200 种,其中 30 余种具有毒性^[1,2]。SC 原名千里及,始载于《本草拾遗》。谚语云:“有人识得千里光,全家一世不生疮”。许振(1947)及浙江省千里光协作组(1973)研究发现,SC 是一种抗菌谱广、临床疗效显著、毒副作用小的植物抗菌药,SC 水煎剂对小白鼠腹腔注射的 LD₅₀ 为 23 ± 7 g/kg^[3,6,10]。可见,虽然 SC 是千里光属的一种,但是其化学成分特别是 PA_s 的检查及毒性研究尚有很多疑问。

3.2 在中药现代化和国际化的进程中,和许多中草药一样,对 SC 的化学成分研究越来越深入。据报道,SC 含有色素类物质如菊黄质(chrysanthemaxanthin)和毛茛黄素(flavoxanthin)、氢醌(hydroquinone)、有机酸类如对-羟基苯乙酸(p-hydroxyphenyl acetic acid)、香荚兰酸(vanillic acid)、水杨酸焦粘酸(pyromucic acid)等^[10]。另外,SC 含有少量的-胡萝卜素和类胡萝卜素(carotenoid),以及胆碱、生物碱、黄酮甙、鞣质、酚类、挥发油等^[1,5,11]。本研究发现,SC 全草含有大量的黄酮及其甙类、酚性物质和蒽醌及其甙类,还含有一定量的强心苷、皂甙、鞣质、氨基酸、有机酸和生物碱,不含甾甙、多肽、蛋白质、内酯、油脂和挥发油。本研究检出 SC 全草含有强心苷,未检出挥发油,这些结果与文献^[1,5,10,11]报道有一定差异。

3.3 有些 PA_s 会引起肝静脉闭塞症,对实验动物具有致癌、

有机诱变和基因毒性。在医药市场上,含有千里光(不一定是 SC)的药物有千里光片、千里光注射液、千里光卫生液、千里光眼药水和干柏鼻炎片等,其中千里光片和干柏鼻炎片是内服的,其中是否含有 PA_s 以及含量多少,都有待于深入研究。另外,即使植物药中含有毒物质并不一定等同于药品中就一定含有该有毒成分,因为中草药通过炮制、精制及配成复方,可以达到减少甚至是去除原植物中有毒成分对机体的损伤。本研究采用对 PA_s 特异性强的 Ehrlich 试剂,利用 TLC 法对 SC 全草及 SC 抗菌有效部位中 PA_s 进行了检测(该法对 PA_s 检测的灵敏度为 0.5 μg^[12]),结果发现,SC 全草含有生物碱和 PA_s,这和文献报道^[10]一致。有关 SC 抗菌有效部位(有效成分)中总生物碱和 PA_s 的研究尚未见报道。本研究进一步对 SC 抗菌有效部位中总生物碱和 PA_s 进行了研究,结果发现,SC 抗菌有效部位中含有生物碱,但未检出 PA_s。可见进行 SC 抗菌有效部位筛选和精制,可以排除 SC 中的 PA_s,大大提升 SC 抗菌有效部位的安全性。

参考文献:

- [1] 吴斌,吴立军.千里光属植物的化学成分研究进展[J].中国中药杂志,2003,(2):97~100
- [2] 王跃虎,王建华,司红丽.狗舌草生物碱 LD₅₀测定及毒性成分分析[J].饲料工业,2003,24(5):34~35.
- [3] 许振.植物药剂对主要病菌药效比较观察[J].农报,1947,1(6):17.
- [4] 陈进军,王建华,耿果霞,等.千里光的化学成分鉴定及体外抗菌试验[J].动物医学进展,1999,20(4):35~37.
- [5] 马世宏,张卫明,王红,等.千里光在化妆品中的应用研究[J].四川日化,1996,(4):9~11.
- [6] 浙江省千里光协作组.千里光抗菌作用的实验研究和临床疗效观察[J].中华医学杂志,1973,(3):628~631.
- [7] 陈进军,聂芳红,王建华,等.狗舌草化学成分及其抗淋巴性白血病效果试验初报[A].见:颜水泉主编,中兽医医药研究进展[C].西安:西北农林科技大学出版社,2003,8:317~321.
- [8] 谭远友,胡诚,齐迎春,等.冰川棘豆的化学成分预试[J].甘肃畜牧兽医,2001,(2):1~4.
- [9] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用(第六卷)[M].北京:学苑出版社,1999,6013.
- [10] 陈进军,王建华,岳治权.中药千里光研究概况[A].

金丝桃素蛋白络合物体外抗 H5N1 亚型禽流感病毒的活性研究

赵晓虹¹, 梁剑平², 祝艳华¹, 尚若锋², 王雯慧¹, 崔颖², 罗永江², 王学江²

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070; 2 中国农业科学院
兰州畜牧与兽药研究所 农业部新兽药工程重点开放实验室)

摘要: 用鸡胚法进行了金丝桃素蛋白络合物抗 H5N1 亚型禽流感病毒活性研究。分别采用了感染病毒同时给药、给药后接种病毒、先感染病毒后给药三种方式, 通过测定鸡胚尿囊液的血凝效价和计算药物对感染鸡胚的保护率, 观察金丝桃素蛋白络合物的抗 H5N1 亚型禽流感病毒活性。实验结果表明, 药物在体外与病毒作用一段时间后再将其混悬液接种鸡胚, 药物浓度在 0.5 mg/ml 以上时, 对感染鸡胚的保护率达 100%, 同时给药组的血凝效价显著降低, 与对照组相比差异极显著; 在感染病毒前给药, 药物浓度在 2 mg/ml 以上时, 对感染鸡胚的保护率达 100%, 药物组的血凝效价显著降低, 与对照组相比差异极显著; 先感染病毒后给药, 药物浓度在 2 mg/ml 以上时, 对感染鸡胚的保护率达 88.9%, 血凝效价明显降低, 与对照组相比差异显著。同时, 在此种方式下, 药物对病毒的抑制作用与药物浓度有一定依赖性, 适当提高药物浓度, 可以增强其抗病毒活性。

关键词: 金丝桃素蛋白络合物; H5N1 亚型禽流感病毒; 血凝效价; 保护率

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2006)03-0013-03

禽流感是由正黏病毒科、流感病毒属、A 型流感病毒引起的禽类感染和/或疾病综合征^[1], 各国政府采取多种措施预防禽流感, 并加强了抗流感病毒药物的开发研制。中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所农业部新兽药工程重点开放实验室在对抗病毒中草药的筛选中, 发现贯叶连翘中有效成分金丝桃素具有显著的抗病毒作用^[2], 从而研制出金丝桃素蛋白络合物, 并研究其体外抗禽流感病毒 H5N1 亚型的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2006-01-09

项目来源: 国家十五科技攻关计划 (2004BA519A26)

作者简介: 赵晓虹 (1977-), 女, 在读硕士研究生。梁剑平为通讯作者, Tel: 0931-3810885, E-mail: liangjp100@sina.com

1.1.1 病毒 病料来自禽流感病死鸭只, 经哈尔滨兽医研究所进行病毒分离与鉴定为 H5N1 亚型。

1.1.2 药物 金丝桃素蛋白络合物, 由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所农业部新兽药工程重点开放实验室研制。

1.1.3 鸡胚 9 日龄 SPF 鸡胚, 购自兰州生物制品研究所。

1.1.4 鸡红细胞悬液 参照《动物病毒学》红细胞悬液的制备方法, 配成体积分数为 1% 的红血球, 现配现用。

1.2 方法

1.2.1 药液的制备 将金丝桃素蛋白络合物用助溶剂及双蒸水配制成浓度为 64 mg/ml 的药液。药液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 流通蒸气灭菌 30 min, 备用。

1.2.2 禽流感病毒的复苏 取保存的病毒液, 经双抗处理后, 用 0.9% 生理盐水梯度稀释, 选 10^{-3} ~ 10^{-5} 3 个浓度, 尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚 0.2 ml, 石蜡封孔后, 置

见: 颜水泉主编, 中兽医医药理论与实践 [C]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998, 8: 104 ~ 108

[11] 周欣, 赵超, 杨小生. 气相色谱-质谱分析黔产千里光挥发油的化学成分 [J]. 中草药, 2001, 32(10):

880 ~ 881.

[12] Molyneux R J, Gardner D R, James L F, et al. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 967: 57 ~ 74.

Preliminary phytochemical test of *Senecio scandens* Buch - Ham. and examination on chemical composition of its antimicrobial part

XU Xiao-bin, LIN Hong-ying, FENG Yu-shang, CHEN Jin-jun

(Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088, China)

Abstract: The preliminary phytochemical composition of *Senecio scandens* Buch - Ham. (SC) was tested by subentry extracting trial in cuvette, systemic extracting trial and round paper chromatographic trial. And pyrrolizidine alkaloids (PAs) in SC and antimicrobial part extracted from SC were examined by test of silica gel thin layer chromatography sprayed with Ehrlich reagent. It was found that SC mainly contains flavones, anthraquinones, phenolic substances, cardiac glycosides, amino acids, tannic materials, saponins, organic acids and alkaloids, but does not contain cyanogenic glycosides, polypeptides, proteins, lactones, volatile oils and lipins, and that SC contains PAs but there was no any PAs detected in the antimicrobial extract.

Key words: *Senecio scandens* Buch - Ham.; preliminary phytochemical test; chemical composition; pyrrolizidine alkaloid