



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102058596 A

(43) 申请公布日 2011.05.18

(21) 申请号 201010604912.1

(22) 申请日 2010.12.25

(71) 申请人 中国水产科学研究院珠江水产研究所

地址 510380 广东省广州市荔湾区西朗兴渔  
路1号

(72) 发明人 王庆 吴淑勤 石存斌 王高学  
刘春 曾伟伟 李宁求

(74) 专利代理机构 广州市深研专利事务所  
44229

代理人 陈雅平

(51) Int. Cl.

A61K 31/4741 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

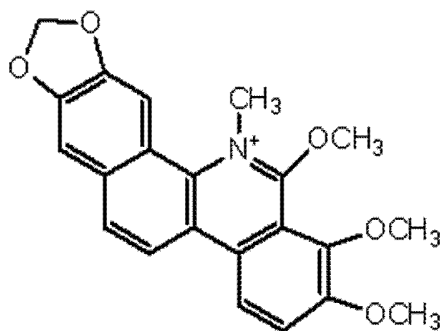
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 5 页

### (54) 发明名称

白屈菜红碱药物的制备方法及其在防治水产  
动物细菌性疾病中的应用

### (57) 摘要

白屈菜红碱药物的制备方法及其在防治水产  
动物细菌性疾病中的应用,该药物是由白屈菜红  
碱、辅料淀粉组成。该防治剂的制备方法:称量白  
屈菜红碱提取物(纯度 80%)与辅料淀粉加入混合  
机中混合均匀,获得含 5%~20% 白屈菜红碱的制  
剂。该细菌性疾病防治剂添加在饲料中投喂,使  
用剂量为:200-250mg/kg(每公斤体重按照投喂  
白屈菜红碱量计),添加在饲料中该防治剂低毒,  
不影响水产品质量,无残留、无污染、不易产生抗  
药性、不影响水产动物的进食和生长,使用剂量  
低,广泛适用于对鳊鱼、鲈鱼、鲤、草鱼、鳊鱼、鲮、  
鲮等细菌性出血病的防治。



1. 一种白屈菜红碱药物的制备方法,其特征是重量比的原料组成:白屈菜红碱 5%~20%,辅料 80%~95%,上述原料的总和为 100%,优选的辅料为医用淀粉。

2. 根据权利要求 1 所述的白屈菜红碱药物的制备方法,其特征是:

提取:将博落回种子晾干、粉碎,使用 8~10 倍甲醇,70℃热回流提取 3 次,每次 2h,合并提取液,过滤,减压浓缩、获得浸膏,用石油醚萃取,萃取液减压浓缩、获得浸膏进行硅胶柱层析分离;

分离:规模化生产对上述博落回浸膏用 100-200 目的硅胶,不锈钢层析柱分离,石油醚:乙酸乙酯:甲醇梯度洗脱;

采用薄层层析(TLC)法检测分析,合并相似流分,对获得的 6 个流分组:A、B、C、D、E、F 有杀菌活性的 E 流分组进行二级柱进一步柱层析分离;

同样不锈钢层析柱,石油醚:乙酸乙酯:甲醇进行梯度洗脱,采用 TLC 法检测分析,合并相似流分,共得到 7 个流分组:Ea、Eb、Ec、Ed、Ee、Ef 和 Eg, Ef 显示很高杀菌活性,对喷粉气流干燥后的白屈菜红碱提取物测定纯度 $\geq 80\%$ ,可作为制剂原料;

制剂制备:白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用上述白屈菜红碱提取物和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱 10 份、载体淀粉 90 份,构成 100 份;

其制备方法是,称取白屈菜红碱纯度 80%提取物 10g,加入淀粉载体 90g,充分混合搅拌均匀,即得含 8%白屈菜红碱该制剂 100g;

该化合物溶于氯仿、甲醇,微溶于石油醚、乙酸乙酯、丙酮和乙醇;熔点为 203~205℃。

3. 根据权利要求 1 所述的白屈菜红碱药物的制备方法,其特征是:白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用白屈菜红碱纯度 80%提取物和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱 20 份、载体淀粉 80 份,构成 100 份;

其制备方法是,称取白屈菜红碱纯度 80%提取物 20g,加入淀粉载体 80g,充分混合搅拌均匀,即得含 16%白屈菜红碱该制剂 100g。

4. 根据权利要求 1 所述的白屈菜红碱药物的制备方法,其特征是:白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用白屈菜红碱纯度 80%提取物和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱 15 份、载体淀粉 85 份,构成 100 份;

其制备方法是,称取白屈菜红碱提取物(纯度 80%)15g,加入淀粉载体 85g,充分混合搅拌均匀,即得含 12%白屈菜红碱该制剂 100g。

5. 白屈菜红碱药物在防治水产动物细菌性疾病中的应用,其特征是:已知可以杀灭的病原菌包括柱状黄杆菌、鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌等病原菌。

6. 根据权利要求 5 所述的白屈菜红碱药物在防治水产动物细菌性疾病中的应用,其特征是:白屈菜红碱在制备防治水产动物由嗜水气单胞菌引起的细菌性出血病药物中的应用。

7. 根据权利要求 5 所述的白屈菜红碱药物在防治水产动物细菌性疾病中的应用,其特征是:白屈菜红碱防治剂通过投喂方式应用,当预防剂量为 100-150 mg/kg,治疗剂量为 200-250 mg/kg,对鱼类由嗜水气单胞菌引起细菌性出血病具有显著的防治作用。

8. 根据权利要求 5 所述的白屈菜红碱药物在防治水产动物细菌性疾病中的应用,其特

征是：在生产上完全可以替代化学杀菌剂和抗生素，是对环境无污染的无公害植物源水产动物细菌性疾病防治剂，广泛适用于对鳊鱼、鲈鱼、鲤、草鱼、鳗鱼、鲷、鲆等多种淡水、海水鱼类的细菌性疾病和细菌性出血病的防治剂。

## 白屈菜红碱药物的制备方法及其在防治水产动物细菌性疾病中的应用

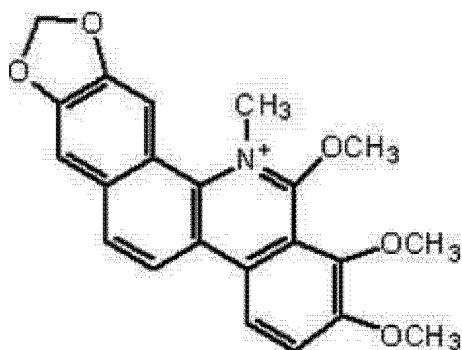
### 技术领域

[0001] 本发明属于白屈菜红碱的新用途,具体涉及白屈菜红碱在制备杀灭水产动物病原菌,如柱状黄杆菌、鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌等病原菌,特别是指由嗜水气单胞菌引起的鱼类细菌性出血病中的应用以及含有白屈菜红碱的药物制剂。

### 背景技术

[0002] 细菌性疾病是水产动物危害严重的常见疾病,特别是由嗜水气单胞菌引起的细菌性出血病,对渔业生产危害最为严重。目前,常采用的防治药物是一些内服药物如氟哌酸、萘诺沙星、硫酸庆大霉素等一些化学合成药物、抗生素类,由于长期使用产生耐药性,并且有些化学药物因不易降解、污染水环境;这些医用原料药在水产动物体内残留、蓄积,危害人类的身体健康,并且间接地导致人的病原菌耐药性,加大人们疾病防治的难度。

[0003] 白屈菜红碱 (Chelerythrine) 是从罂粟科、博落回属 (*Macleaya*) 两种植物博落回 *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. 或小果博落回 *M. microcarpa* (Maxim) Fedde 中提取分离出来的一种生物碱,其结构式为



该化合物的分子式为  $C_{22}H_{20}NO_5$ , 分子量为 348, 浅紫色颗粒状晶体物质。已知临床用途有:

(1) 用做人用药对抗肿瘤、治疗感染性疾病、治疗滴虫性阴道炎和宫颈糜烂、治疗皮肤疾病、治疗酒糟鼻、手足癣、疥疮、牛皮癣、头皮湿疹有确切效果;

(2) 用做兽药具有清热解毒、抗菌消炎的功能,对猪黄痢、白痢、水肿病、副伤寒和猪的传染性肠胃炎等多种疾病有特效且无抗药性、无残留和副作用,使用安全可靠;

(3) 用作生物农药具有杀蛆、杀螨作用。

### 发明内容

[0004] 本发明是经多年来对杀灭水产动物病原菌、特别是细菌性出血病做了大量的试验,近期在试验中发现从博落回 (*M. cordata* (Willd) R. Br.) 种子中提取分离的白屈菜红碱 (Chelerythrine) 具有显著的杀菌效果,而且不影响水产品质量、无残留、无污染、不

易产生抗药性、不影响水产动物的进食和生长,在开发水产动物药物领域具有广阔的市场前景。

[0005] 本发明的目的是提供白屈菜红碱在制备杀灭水产动物病原菌药物中的应用。白屈菜红碱单体杀灭水产动物病原菌药效试验结果显示,白屈菜红碱对 7 株水产动物病原菌,如柱状黄杆菌、鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌等病原菌均表现很好的抑制效果,对引起鱼类出血病的病原嗜水气单胞菌抑制效果最好。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种杀灭水产动物病原菌和细菌性出血病的防治剂,它是由下列重量比的原料组成:白屈菜红碱 5%~20%,辅料 80%~95%,上述原料的总和为 100%。本发明优选的辅料为医用淀粉。

[0007] 白屈菜红碱防治剂通过投喂方式应用,当预防剂量为 100~150 mg/kg,治疗剂量为 200~250 mg/kg,对鱼类由嗜水气单胞菌引起细菌性出血病具有显著的防治作用。

[0008] 本发明与现有技术相比,本发明的优点在于:

(1) 本发明对已知化合物白屈菜红碱发掘了新的用途,开拓了新的应用领域;

(2) 本发明特别适用对水产动物细菌性疾病有防治效果,对 7 种水产动物病原菌,如柱状黄杆菌、鳃弧菌、点状产气单胞菌点状亚种、嗜水气单胞菌、溶藻弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌等病原菌均表现很好的杀灭效果。尤其对细菌性出血病、弧菌病具有显著的防治效果,并对指环虫、拟指环虫、三代虫等蠕虫具有显著的杀灭作用,对水产动物及环境都非常安全,在生产上完全可以替代化学杀菌剂和抗生素,是对环境无污染的无公害植物源水产动物细菌性疾病防治剂,广泛适用于对鳊鱼、鲈鱼、鲤、草鱼、鳊鱼、鲮、鲢等多种淡水、海水鱼类的细菌性疾病和细菌性出血病的防治剂。

[0009] (3) 本发明的产品原料来源丰富,价廉、制备工艺简单而且使用方便。

[0010] (4) 本发明的产品是一种新型的药物,不易产生抗药性问题,能迅速治疗细菌性出血病。

## 附图说明

[0011] 图 1 化合物的 EIMS 图谱;

图 2 化合物的  $^1\text{H}$ NMR 图谱;

图 3 化合物的  $^{13}\text{C}$ NMR 图谱;

图 4 6-甲氧基二氢白屈菜红碱的结构式;

图 5 博落回杀灭嗜水气单胞菌活性成分的跟踪分离流程;

图 6 为表 1 不同给药量的白屈菜红碱对鲫鱼灌喂后在 24h、48h 和 96h 致死率;

图 7 为表 2 各时间段的  $\text{LD}_{50}$ ;

图 8 为表 3 试验菌悬液浓度 ( $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ );

图 9 为表 4 白屈菜红碱对水产动物病原菌抑制作用结果;

图 10 为表 5 20% 白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂预防出血病实验结果;

图 11 为表 6 20% 白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂治疗出血病实验结果。

## 具体实施方式

[0012] 为了更清楚的理解本发明,以下通过发明人给出的急性毒性试验、药效学试验及对比试验来进一步说明本发明防治剂的有益效果。

[0013] 试验例 1 白屈菜红碱单体对鲫鱼急性毒性试验

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 供试样品

试验所用白屈菜红碱,纯度测定为 98.04%,由西北农林科技大学动物科技学院水产系水产病害实验室制备提供。

##### 1.1.2 试验动物

试验所用鲫鱼购于陕西省水产研究所鱼种场,要求体质健壮,规格均一,平均体重 4.4 g (< 5 g)。购回后用浓度 20 mg·L<sup>-1</sup> 的 K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 药浴 15-20 min,捞出后在水簇箱中暂养 7d 左右,每天投喂 1-2 次,投入的饲料(实验室自制饲料)在 10 min 内吃完为限。待适应实验室环境条件后再进行毒性试验。

##### 1.1.3 试验仪器

ALC-1100.2 百分之一电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;KQ-500E 型超声波清洗器;5 ~ 10 μL,20 ~ 200 μL 移液器:VoluMate. Made in Germany;自动控温加热棒,浙江舟山市渔具厂生产;塑料盆(容积为 6L)等。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验条件

每盆加充分暴气的地下水 5 L,pH 7.2,控制水温为 25±1℃。每盆放养 10 尾鱼。放养鱼后,要求保持水中溶氧在 5 mg/L 以上。

#### 1.2.2 试验药物剂量的设定

首先,将药物用 DMSO 溶解,使用无菌水稀释到一定浓度,按照实验设计的药物剂量给每尾鱼用特制的平针头注射器灌喂 0.1-0.2mL,反复进行预试验,确定正式试验药物剂量的大致范围,即试验鱼在 24 h 内全部中毒死亡的药物剂量和 96 h 内不发死亡的药物剂量。然后在预试验基础上,在两个剂量范围内按照对数等差插入多个剂量的试验组,进行正式试验,观察各剂量下试验鱼的中毒死亡情况。

[0018] 在试验期间随时观察记录试验鱼的死亡情况,如发现鱼中毒死亡,应即时捞出,以免影响水质,影响试验结果。判断鱼死亡的方法是当鱼停止呼吸后(鳃盖运动停止),用玻璃棒或镊子轻击鱼的尾柄部,如果在 3 min 之内鱼体不产生任何应激反应,即可判断死亡。

[0019] 试验期间统计在 12 h、48 h 和 96 h 内各药物剂量下试验鱼的死亡情况。试验期间应保持安静,尽可能避免对试验鱼的任何干扰。试验重复 3 次,测定试验结果的再现性。并同时设空白对照组。

#### 1.2.3 最低致死浓度范围、半数致死浓度(LD<sub>50</sub>)计算

观察记录供试鱼在第 12 h、24 h 和 96 h 内的死亡情况,试验鱼各时间段开始出现死亡的最低浓度和下一个浓度为该时间段的最低致死浓度范围,并计算致死率。利用直线回归法,用直线回归方程  $y = a + bx$  ( $x$  - 药物浓度的浓度对数; $y$  - 死亡率转换成的概率单位; $a$ ,  $b$  分别为直线的截距与斜率。),求出  $a$  与  $b$ ,  $a$  与  $b$  的计算公式为:

$$a = \frac{\sum x^2 \sum y - \sum x \sum (xy)}{k \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{k \sum (xy) - \sum x \sum y}{k \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$k$  : 药物剂量的组数(死亡率为 0 和 100% 的剂量不计算在内)

求出  $a$ 、 $b$  后,便可确定出回归方程,然后再将 50% 死亡率的概率单位  $y=5.0$  带入方程,求出  $x$ ,取其反对数,便得出该时间内的  $LD_{50}$ ,并计算其 95% 的可信限,公式为:

$$LD_{50} \text{ 的 95\% 可信限} = \lg^{-1}(x \pm \frac{2S}{\sqrt{2N}} \times 1.96)$$

式中:  $s = \frac{1}{b}$

$N$  : 供试的动物总数(死亡率为 0 和 100% 的剂量不计算在内)

$x$  :  $LD_{50}$  值的对数

#### 1.2.4 安全剂量的计算

根据 Turbell 公式计算安全剂量:安全剂量 =  $\frac{48kLD_{50} \times 0.3}{(24kLD_{50}/48kLD_{50})^2}$

### 2. 结果与分析

#### 2.1 半数致死剂量 ( $LD_{50}$ )

##### 2.1.1 各试验剂量在不同时间内对鲫鱼致毒情况

各试验药物剂量在第 24 h、48 h 和 96 h 内的鲫鱼死亡情况见表 1。

##### [0021] 2.1.2 半数致死剂量 ( $LD_{50}$ )

将各试验浓度取其对数,得其浓度对数,并将各时间段试验鱼中毒死亡的百分率查表得其概率值,将各时间段的药物浓度对数及其对应的死亡率的概率值代入公式,求出回归方程,可计算出各时间段的半数致死量 ( $LD_{50}$ ),和其  $LD_{50}$  的 95% 可信限,结果见表 2。由表 2 中可知,第 24 h 内所得的回归方程为:  $Y = -4.0499 + 3.9138X$ , 半数致死量 ( $LD_{50}$ ) = 205.26  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 第 48 h 内所得的回归方程为:  $Y = -3.865 + 4.1087X$ ,  $LD_{50}$  = 143.75  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

##### [0022] 2.1.3 安全浓度计算结果

根据 Turbell 公式计算出白屈菜红碱对鲫鱼的安全剂量: 21.14  $\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0023] 从白屈菜红碱对鲫鱼 48 h 的  $LD_{50}$  为 21.14  $\text{mg}/\text{kg}$  发现,虽然使用防治剂量高于安全剂量,但在治疗剂量时没有造成对鱼类毒性,解剖也没有病理现象,所以,在治疗剂量对鱼类还是比较安全的,白屈菜红碱具有重要的推广应用前景。

##### [0024] 试验例 2 白屈菜红碱单体杀灭水产动物病原菌药效试验

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

##### 1.1.1 病原菌

柱状黄杆菌(鱼害粘球菌) (*Flavobacterium columnare*, 编号 G4)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*, 编号 E-3-11)、点状产气单胞菌点状亚种 (*Aeromonas punctata* sub.

*punctata*, 编号 XP91-4-1)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, 编号 ST78-3-3)均由中国科学院水生生物研究所鱼病室细菌组提供; 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维弧菌(*Vibrio harvey*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonida*)由西北农林科技大学水产系水产病害实验室保存。

[0025] 1.1.2 供试样品

由上述方法提取、分离的白屈菜红碱, 纯度测定为 98.04%。

[0026] 1.1.3 培养基

普通肉汤培养基: 牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g, 蒸馏水 1L, pH 为 7.4-7.6, 121℃ 高压灭菌 20min。

[0027] 普通营养琼脂: 蛋白胨 10g, 牛肉膏 3g, NaCl 5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.2, 121℃ 灭菌 30min。

[0028] 粘细菌培养基: 胰蛋白胨 5g, 酵母膏 0.5g, 乙酸钠 0.01g,  $\text{BaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  0.01g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0067g,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001g,  $\text{NaHCO}_3$  0.05g, 固体培养基加琼脂 12.0g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2, 121℃ 灭菌 30min。

[0029] 1.2 试验方法

1.2.1 白屈菜红碱药液的制备

精确称取白屈菜红碱 1 g, 在 100mL 容量瓶中用 5mL 二甲基亚砜(DMSO)溶解, 再用无水甲醇定容, 使浓度为 10 mg/mL, 使用时再用甲醇稀释到试验所用浓度。

[0030] 1.2.2 白屈菜红碱抑菌试验

(1) 菌悬液的制备

将 7 株水产病原菌分别接种于普通营养琼脂斜面培养基上, 在 25℃ 下培养 24-48 h 后, 反复活化 3 次, 然后分别将第 3 代的菌种用 0.65% 无菌生理盐水洗下菌苔, 制成菌悬液, 采用平板活菌计数法测定菌悬液浓度后稀释为  $10^5$ - $10^6$  cfu/mL, 4℃ 冰箱保存备用。7 株细菌菌悬液浓度见表 3。

[0031] (2) 对病原菌抑菌活性测定

采用试管连续倍比稀释法测定白屈菜红碱对 7 株病原菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。判定标准为 24 h 后的肉汤没有浑浊的试管中的样品浓度为该样品对试验细菌的最低抑菌浓度, 48 h 后肉汤没有浑浊的试管再分别取样, 接种于普通琼脂平皿中, 28℃ 培养, 若无菌落生长, 则该试管样品浓度为该样品对试验细菌的最低杀菌浓度。并设阳性、阴性和甲醇对照组。

[0032] 首先配置浓度为 2mg/mL 的白屈菜红碱溶液。按如下方法分别对 7 种病原菌进行试验。具体步骤为:

取试管 9 只, 第一管加入普通肉汤 0.8 mL, 其余 9 管均为 0.5 mL。第 1 管加入上述各个配制稀释好的白屈菜红碱溶液样品 0.2 mL, 混匀后取出 0.5 mL 放入第 2 管中, 照此连续稀释至第 9 管。取出 0.5 mL 弃去, 此时药物在各管中的浓度分别为: 1/5、1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640 和 1/1280 倍, 测试样品浓度为: 400  $\mu\text{g/mL}$ 、200  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、12.5  $\mu\text{g/mL}$ 、6.25  $\mu\text{g/mL}$ 、3.125  $\mu\text{g/mL}$  和 1.5625  $\mu\text{g/mL}$



mL。

[0033] 分别取 0.5 mL 的 7 种上述表 1 中计过数,稀释好的菌悬液直接加入上述 9 只试管中,振荡均匀。

[0034] 另设 3 支对照试管:普通肉汤培养液;0.5mL/mL 浓度甲醇普通肉汤培养液;接种细菌的普通肉汤培养液。每管设 3 支平行组。

## [0035] 2 结果与分析

白屈菜红碱对水产动物病原菌抑制作用见表 4。结果显示,白屈菜红碱对 7 株水产动物病原菌均表现很好的抑制效果,对引起鱼类出血病的病原嗜水气单胞菌抑制效果最好, MIC 均为 50  $\mu$ g/mL, MBC 均为 100  $\mu$ g/mL。对照组显示:当达到 MBC 时,溶剂对照不表现抑菌活性,此时该管中的甲醇浓度为 5%。从结果分析,白屈菜红碱对测试的其他病原菌也是具有显著的杀灭作用,是一种广谱性很好的天然产物,对防治水产动物多种细菌病如弧菌病、烂鳃病、肠炎等均有显著的效果,是一种有前途的生物源渔药。

## [0036] 试验例 3 20% 白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂的药效学试验

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 试验动物与病原菌

鲫鱼(*Carassius auratus*),规格整齐,平均体重 100.4g,来自陕西省水产研究所鱼种场;嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*,编号 ST78-3-3)均由中国科学院水生生物研究所鱼病室细菌组提供。

##### [0037] 1.1.2 供试药品

含 20% 白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂,由西北农林科技大学动物科技学院水产系水产病害实验室制备提供。

##### [0038] 1.1.3 仪器设备

SP-060 型水夹套恒温培养箱(上海实验仪器总厂);1-15K 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);移液枪(Volumate 公司);YXQ-LS-30S II 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。XH-B 旋涡混合器:姜堰市康健医疗器具有限公司;BX41 光学显微镜:OLYMPUS。Made in Japan;Satorius 万分之一电子天平;水族箱与控温装置。

## [0039] 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌悬液的制备

将嗜水气单胞菌接种于普通营养琼脂斜面培养基上,在 25℃ 下培养 24-48 h 后,用 0.65% 无菌生理盐水洗下菌苔,制成菌悬液,采用平板活菌计数法测定菌悬液浓度后稀释为  $10^5$ - $10^6$  cfu/mL,4℃ 冰箱保存备用。

### [0040] 1.2.2 预防实验

随机分成试验组和对照组,每组 20 尾,控制水温 25℃,日投饵率为 2%,首先投喂含不同梯度剂量药饵(见表 3),在 24h 以后,腹腔注射 0.2mL/尾嗜水气单胞菌菌悬液,连续用药 5d,在试验的第 6 天解剖鲫鱼,无菌下接种肝胰脏、肾、血液,观察有无嗜水气单胞菌,确定药物预防剂量。

### [0041] 1.2.3 治疗试验

随机分成试验组和对照组,每组 20 尾,水温 25℃,日投饵率为 2%,腹腔注射

0.5mL/尾,间隔5h后投喂含不同梯度剂量药饵(见表4),连续投喂药饵5d。观察鱼吃饵、活动、死亡情况,在第6天,解剖鲫鱼,无菌下接种肝胰脏、肾、血液,观察有无嗜水气单胞菌,确定药物治疗剂量。

## [0042] 2 结果与分析

### 2.1 预防实验

20%白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂预防细菌性出血病实验结果见表3。由表5看出,在连续用药5d预防,与第6天解剖鲫鱼后,该制剂在100-150 mg/kg剂量,均可预防细菌性出血病的发生。

### [0043] 2.2 治疗实验

20%白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂治疗人工感染的细菌性出血病,由表6看出,在连续用药5d后,第6天无菌解剖鲫鱼,在200-250 mg/kg时,均可达到治疗细菌性出血病。结果见表4。

[0044] 本研究结果表明,20%白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂对鱼类的细菌性出血病具有显著的防治作用,其治疗剂量为200-250 mg/kg,表明该制剂是一种应用前景良好的生物渔药。

[0045] 国内外关于白屈菜红碱生物活性研究很少,在水产领域应用尚未研究资料,杀菌活性研究证明,防治出血病效果显著,可以作为杀菌渔药很好的母体药源,进一步进行仿生合成研究。

[0046] 以下结合附图和发明人给出的具体实施例来详细说明从博落回种子中提取、分离、鉴定白屈菜红碱方法、制备产品的方法,这些仅是本发明较好的实施例,但不限于这些实施例。

## [0047] 实施例1:白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂的制备方法

### 一、白屈菜红碱提取物(纯度80%)的提取、分离

#### 1. 提取

将博落回种子晾干、粉碎,使用8~10倍甲醇,70℃热回流提取3次,每次2h,合并提取液,过滤,减压浓缩、获得浸膏,用石油醚萃取,萃取液减压浓缩、获得浸膏进行硅胶柱层析分离。

#### [0048] 2. 分离

规模化生产对上述博落回浸膏用100-200目的硅胶,不锈钢层析柱分离,石油醚:乙酸乙酯:甲醇梯度洗脱。采用薄层层析(TLC)法检测分析,合并相似流分,对获得的6个流分组:A、B、C、D、E、F有杀菌活性的E流分组进行二级柱进一步柱层析分离。同样不锈钢层析柱,石油醚:乙酸乙酯:甲醇进行梯度洗脱,采用TLC法检测分析,合并相似流分,共得到7个流分组:Ea、Eb、Ec、Ed、Ee、Ef和Eg。Ef显示很高杀菌活性,对喷粉气流干燥后的白屈菜红碱提取物测定纯度 $\geq 80\%$ 。可作为制剂原料。

## [0049] 3. 制剂制备

白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用上述白屈菜红碱提取物和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱10份、载体淀粉90份,构成100份。

[0050] 其制备方法是,称取白屈菜红碱提取物(纯度80%)10g,加入淀粉载体90g,充分混合搅拌均匀,即得含8%白屈菜红碱该制剂100g。

[0051] 该化合物溶于氯仿、甲醇,微溶于石油醚、乙酸乙酯、丙酮和乙醇。熔点为 203 ~ 205℃。

### [0052] 3.1 化合物质谱(EIMS)分析

化合物的 EIMS 谱图,如图 1 所示,解析为 EI-MS (70eV)  $m/z$  379(M<sup>+</sup>), 348, 333 ;分子量为 348.0。与白屈菜红碱的分子量一致。

### [0053] 3.2 化合物 <sup>1</sup>HNMR 分析

化合物的 <sup>1</sup>HNMR 谱图,如图 2 所示。图谱解析为:

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, TMS, 400 MHz)  $\delta$  7.12(1H, s, H-1), 7.7(1H, s, H-4), 5.54(1H, s, H-6), 7.05(1H, d, H-12), 7.63(1H, d, H-10), 7.78(1H, d, H-11), 7.48(1H, d, H-12), 2.76(3H, d, N-Me), 3.46(3H, s, OMe-6), 3.92(3H, s, OMe-8), 3.96(3H, s, OMe-7), 6.04(2H, s, -OCH<sub>2</sub>O-2, 3)。

### [0054] 3.3 化合物 <sup>13</sup>CNMR 分析

化合物的 <sup>13</sup>CNMR 谱图,如图 3 所示。图谱解析为:

<sup>13</sup>CNMR (CD<sub>3</sub>OD, TMS, 400MHz)  $\delta$  104.6(C-1), 147.9(C-2), 147.3(C-3), 100.6(C-4), 126.7(C-4a), 138.3(C-4b), 86.0(C-6), 125.7(C-6a), 146.6(C-7), 152.1(C-8), 112.9(C-9), 118.9(C-10), 124.8(C-10a), 122.5(C-10b), 120.0(C-11), 123.4(C-12), 131.0(C-12a), 101.0(-OCH<sub>2</sub>O-2, 3), 40.6(N-Me), 53.9(OMe-6), 61.6(OMe-7), 55.9(OMe-8)。

[0055] 根据上述物理和光谱学数据,鉴定化合物为 6-甲氧基二氢白屈菜红碱,分子式为 C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub>, 结构式见图 4。

### [0056] 试验使用主要仪器

Waters 高效液相色谱: Waters™600E 泵,996PDA 紫外检测器,Millennium 色谱管理工作站;SHIMADZU 高效液相色谱:LC-6AD 泵,SPD-10A VP UV-VIS 紫外检测器,CLASS-VP 6.14SR1 色谱管理工作站;HP 5988 型四极杆质谱仪,美国 HP 公司;Esquire 3000<sup>plus</sup> 型 ESI-MS,德国 BrukerDaltonics 公司;Nicolet AVATAR 360 FT-IR 型红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;Varian Mercury 300 BB 型核磁共振仪,美国 VARIAN 公司;Brucker AM 400 超导核磁共振仪等,美国 Brucker 公司。

### [0057] 实施例 2 防治剂的制备方法

白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用白屈菜红碱提取物(纯度 80%)和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱 20 份、载体淀粉 80 份,构成 100 份。

[0058] 其制备方法是,称取白屈菜红碱提取物(纯度 80%)20g,加入淀粉载体 80g,充分混合搅拌均匀,即得含 16% 白屈菜红碱该制剂 100g。

### [0059] 实施例 3 防治剂的制备方法

白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂采用白屈菜红碱提取物(纯度 80%)和其他辅料组成,所述的制剂的配方按下述质量百分比:白屈菜红碱 15 份、载体淀粉 85 份,构成 100 份。

[0060] 其制备方法是,称取白屈菜红碱提取物(纯度 80%)15g,加入淀粉载体 85g,充分混合搅拌均匀,即得含 12% 白屈菜红碱该制剂 100g。

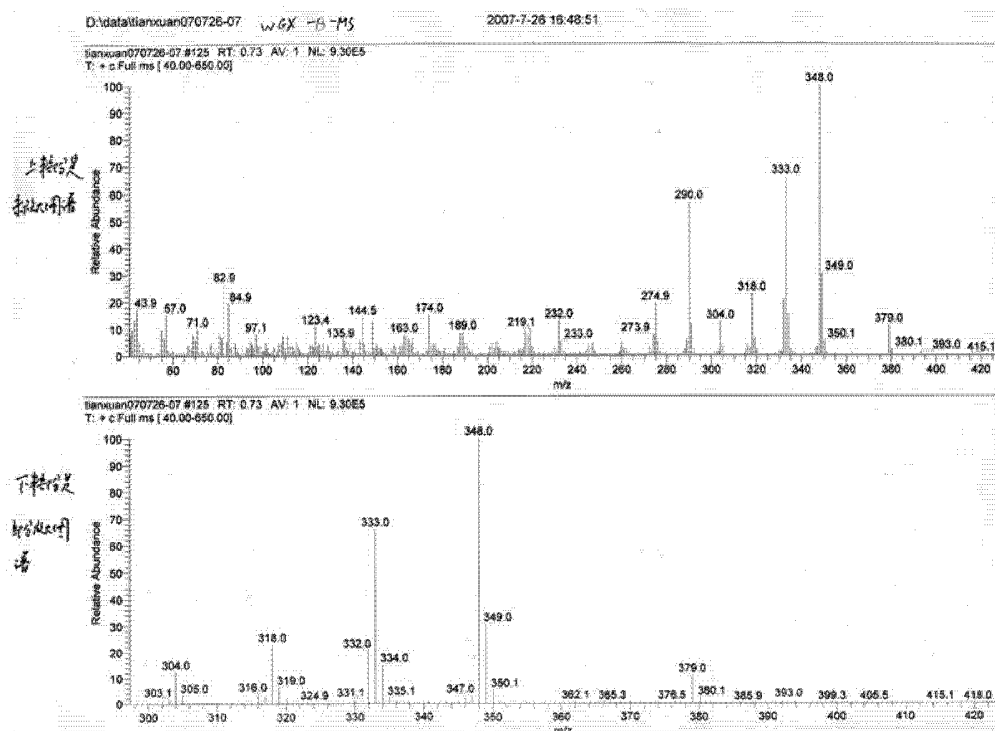
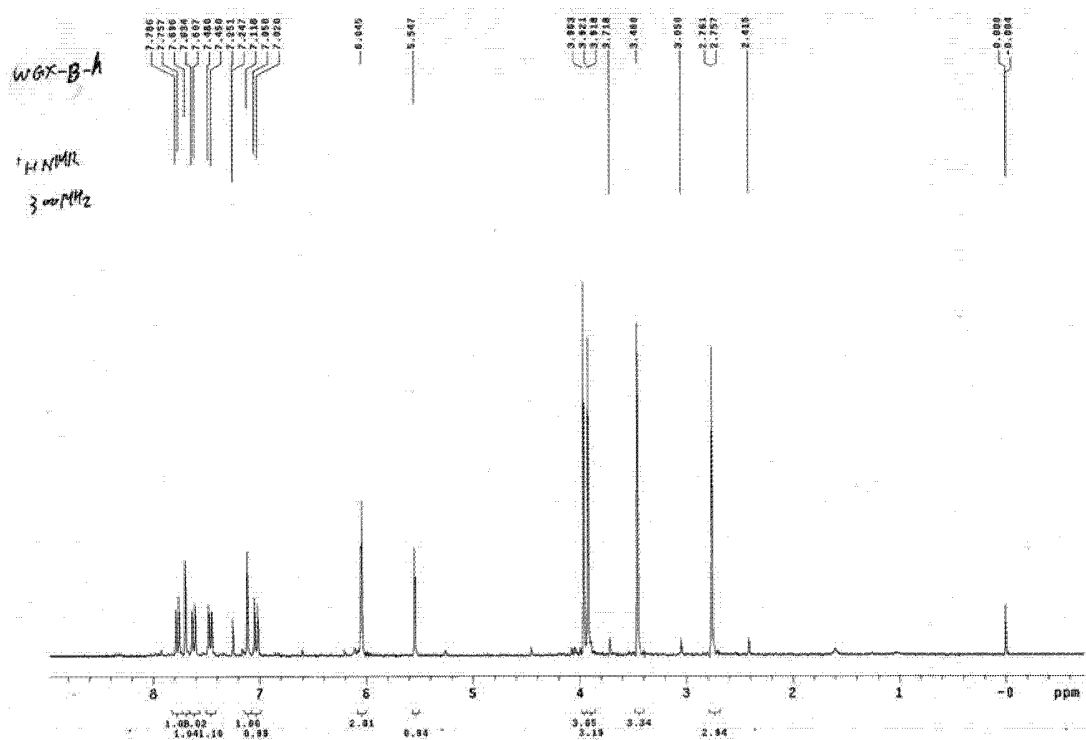


图 1



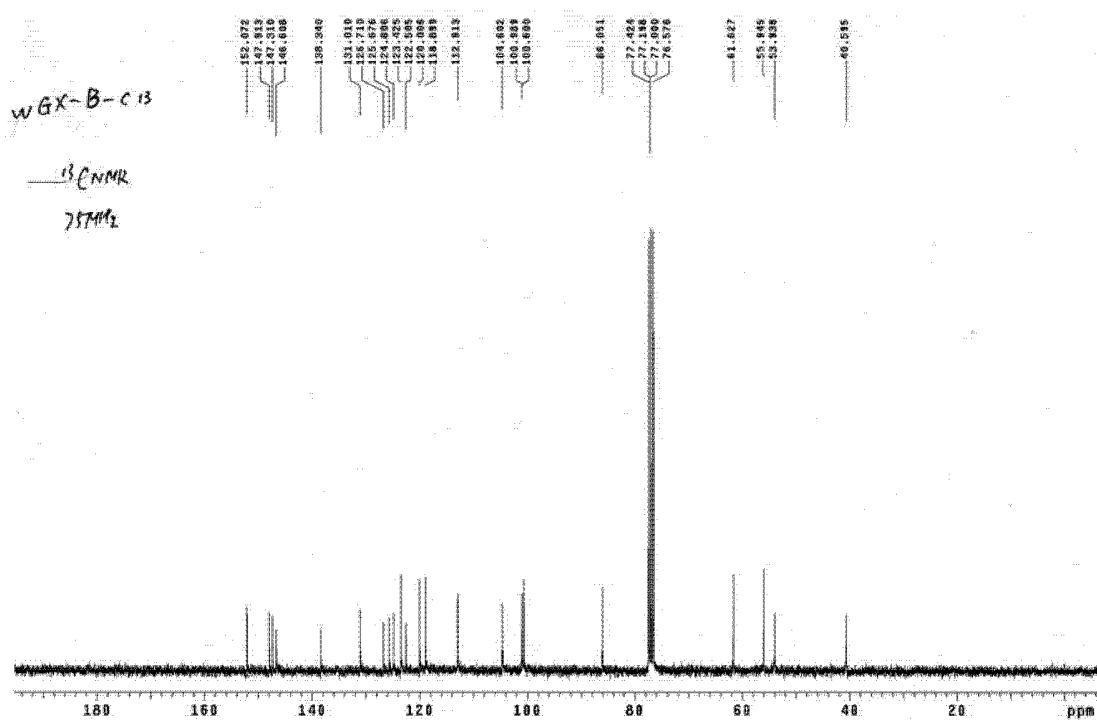


图 3

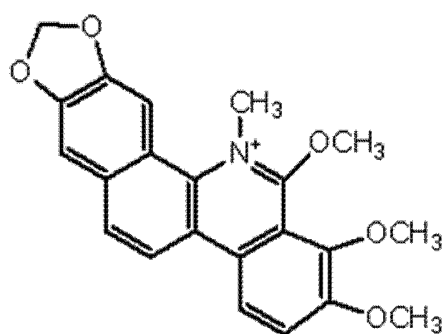


图 4

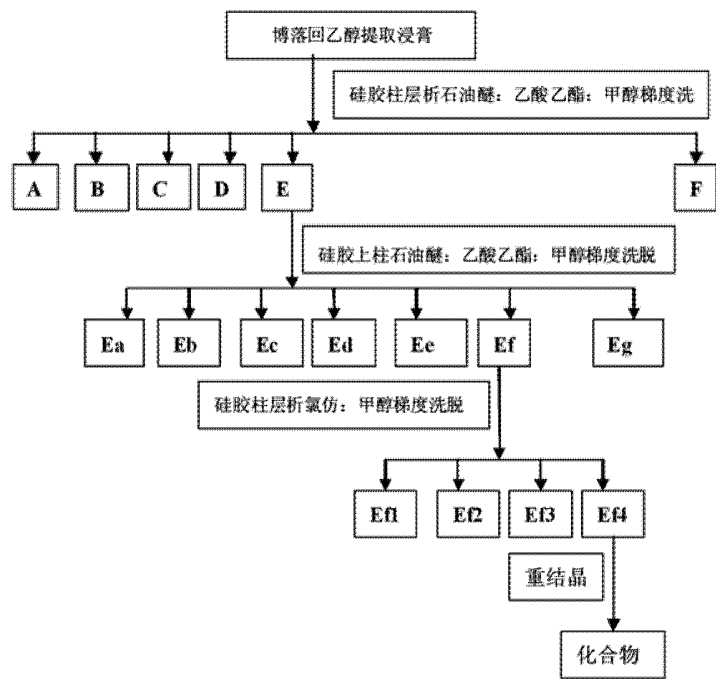


图 5

表 1 不同给药量的白屈菜红碱对鲫鱼灌喂后在 24h、48h 和 96h 致死率

药物浓度 (mg·kg <sup>-1</sup> )	浓度对数	试验鱼死亡百分率		
		24h	48h	96h
400	2.60	100	-	-
302	2.48	80	90	-
224	2.35	50	80	80
166	2.22	30	60	70
123	2.09	20	40	60
91	1.96	10	20	30
68	1.83	0	0	10
50	1.70	0	0	0
对照 CK	-	0	0	0

图 6

表 2 各时间段的 LD<sub>50</sub>

试验时间 Tested time	直线回归方程 Linear regression equation	LD <sub>50</sub> (mg·kg <sup>-1</sup> )	95%的可信限 (mg·kg <sup>-1</sup> ) Credible limit of ninety-five percent
24 h	Y=4.0499+3.9138X	205.26	162.18-257.04
48 h	Y=3.865+4.1087X	143.75	114.82-181.97
96 h	Y=3.5504+4.0732X	125.65	100.93-157.04

图 7

表 3 试验菌菌悬液浓度 (cfu.mL<sup>-1</sup>)

菌株种类	数量 cfu.mL <sup>-1</sup>
柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	1.1×10 <sup>6</sup>
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	1.4×10 <sup>6</sup>
点状产气单胞菌点状亚种 <i>Aeromonas punctata</i> sub. <i>punctata</i>	1.1×10 <sup>6</sup>
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	2.0×10 <sup>6</sup>
溶藻弧菌 ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )	1.8×10 <sup>6</sup>
哈维弧菌 <i>Vibrio Harvey</i>	1.5×10 <sup>6</sup>
杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonida</i>	1.4×10 <sup>6</sup>

图 8

表 4 白屈菜红碱对水产动物病原菌抑制作用结果

菌株 (Pathogens)	MIC (μg.mL <sup>-1</sup> )	MBC (μg.mL <sup>-1</sup> )
点状产气单胞菌点状亚种 <i>Aeromonas punctata</i> sub. <i>punctata</i>	25	50
哈维弧菌 <i>Vibrio harvey</i>	50	100
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	50	100
柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	25	50
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	50	100
杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonida</i>	50	100
溶藻弧菌 ( <i>Vibrio alginolyticus</i> )	50	100

图 9

表 5 20%白屈菜红碱水产动物细菌性疾病防治剂预防出血病实验结果

20%白屈菜红碱剂量 (mg/kg)	肝脾脏	肾脏	血液
100	+	-	+
150	-	-	-
200	-	-	-
250	-	-	-
300	-	-	-
350	+	-	-
400	+	-	-
450	-	-	-

\*注：“+”表示含嗜水气单胞菌，“-”表示不含嗜水气单胞菌。

图 10

表 6 20%白屈菜红碱水产动物细菌性疾病预防治疗剂治疗出血病实验结果

20%白屈菜红碱剂量 (mg/kg)	肝胰脏	肾脏	血液
150	+	+	+
200	+	-	-
250	-	-	-
300	-	-	-
350	-	-	-
400	-	-	-
450	-	-	-

\*注：“+”表示含嗜水气单胞菌，“-”表示不含嗜水气单胞菌。

图 11