

彭玉萌,霍光华,谭明辉,等.无患子抗稻瘟病菌活性皂苷的分离与鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(10):127-130.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.027

无患子抗稻瘟病菌活性皂苷的分离与鉴定

彭玉萌,霍光华,谭明辉,陈绪涛,肖大瑾

(江西农业大学生物科学与工程学院/江西省菌物资源保护与利用重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:探索无患子抗稻瘟病菌的活性成分,运用大孔吸附树脂及硅胶柱层析对无患子皂苷进行分离纯化,采用薄层色谱法和高效液相色谱法定性、光度比色法定量、核磁共振和质谱法确定结构、琼脂稀释法评价抗稻瘟病菌活性。结果显示,无患子提取物过 D101 大孔吸附树脂的 70% 乙醇洗脱液,再经过硅胶柱,收集到由三氯甲烷-甲醇(体积比分别为 1:1、3:1、5:1、7:1、9:1)洗脱下来的 5 个活性组分,该 5 个组分的抗稻瘟病菌 EC₅₀ 分别为 46.84、51.19、23.13、29.92、40.85 μg/mL。进一步纯化 7:1、5:1 流分,分别获得 1 个单体成分和含有 2 种成分的混合物,在浓度为 20 μg/mL 时,抗菌率分别为 84.16%、81.24%。该单体结构经波谱分析和文献比对被鉴定为常春藤 3-O-α-D-木吡喃糖基(1→3)-α-L-鼠李吡喃糖基(1→2)-α-L-阿拉伯吡喃糖苷。

关键词:无患子;皂苷;分离;抗稻瘟病菌活性

中图分类号: S435.111.4⁺1; S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0127-04

无患子(*Sapindus mukorossi*)正如其名的含义“无病之果”,该植物有着广泛的药用价值,果实可治疗过度流涎、丘疹、癫痫、萎黄病、偏头痛、湿疹、牛皮癣等,种子粉可治疗龋齿、关节炎、普通感冒、便秘、作呕等,种子可去皮肤黄褐色和雀斑、清洗皮肤油性分泌物、制洗发剂等,叶可用于浴池减缓关节痛,根可治疗痛风、风湿病等^[1]。已发现无患子提取物具有抑制光滑念珠菌、白色念珠菌、热带念珠菌^[2]、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、普通变形杆菌、幽门螺旋杆菌等细菌的活性,而且幽门螺旋杆菌等菌不会对该提取物产生抗性^[3],还可以抑制黑曲霉^[4]、苜蓿炭腐病菌和黄连白绢病病菌(EC₅₀为 181~407 μg/mL)^[5]等的活性。研究发现,无患子中果皮总皂苷提取物具有强烈抑制稻瘟病菌的活性,而无患子皂苷种类丰富,其中果实中含有 13 种五环三萜类齐墩果烷型皂苷^[5-9],根中含有 2 种五环三萜类甘遂烷型皂苷^[10-11],虫瘻中含有 7 种达玛烷型皂苷和 5 种甘遂烷型皂苷^[12-13],而且新的皂苷还在不断地被发现^[14]。为了寻觅其生防活性皂苷先导物,本试验对其进行分离探索,并进行色谱光谱定性定量分析以及活性跟踪。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

本试验于 2017 年在江西农业大学江西省菌物资源保护与利用重点实验室开展。无患子中果皮浸膏由南昌市生物资源保护与利用重点实验室制备^[15]。

GF254 薄层硅胶板,购自山东省烟台市芝罘化工厂;

收稿日期:2017-12-22

基金项目:江西省自然科学基金(编号:20142BAB214023、20171ACB20014);江西省科技支撑计划(编号:2010BNA08800)。

作者简介:彭玉萌(1988—),男,江西吉安人,硕士,讲师,主要从事生物资源利用研究。E-mail:pengyumeng478@126.com。

通信作者:霍光华,博士,教授,主要从事天然产物药化研究。

E-mail:hgh3828079@sohu.com。

D101 型大孔树脂,购自天津市南开大学化工厂;柱层析用硅胶(精致型),购自青岛海洋化工厂分厂。高效液相色谱仪,购自 Waters 公司;核磁共振波谱仪,400 MHz NMR 波谱仪,购自 Bruker 公司;UPLC-ESI-QTOF 质谱仪,购自安捷伦科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大孔吸附树脂初分无患子抗稻瘟病菌活性成分

醇洗脱梯度的选择:吸取 15 mL 无患子浸膏的正丁醇萃取物,缓慢上样至 D101 型大孔吸附树脂柱中,依次用 2 倍柱体积(BV)的体积分数为 0、30%、50%、70%、95% 的乙醇水溶液过柱,流速为 2 mL/min,收集各流分。分别测定各流分的皂苷含量、固形物含量以及抗稻瘟病菌活性。

洗脱剂用量的确定:吸取 15 mL 正丁醇萃取物,缓慢上样至 D101 型大孔吸附树脂柱中,依次用蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇、95% 乙醇各 4 BV 洗脱。以 1 BV/份收集流分,测定各流分中固形物含量和无患子皂苷的含量。

1.2.2 硅胶柱色谱分离无患子抗稻瘟活性成分 称取 90 g 200~300 目的硅胶,用三氯甲烷浸泡 24 h 后,湿法装柱。量取 10 mL 经大孔吸附树脂洗脱的 70% 流分,分别按三氯甲烷、甲醇体积比为 9:1、7:1、5:1、3:1 进行梯度洗脱,每个梯度 2 BV,每 50 mL 洗脱液收集 1 份。蒸干后,测定各洗脱流分在浓度为 50 μg/mL 时对稻瘟病菌的抑菌活性。

1.2.3 皂苷成分分析及波谱数据测定 薄层色谱分析(TLC)检测:将过硅胶柱后的各流分用毛细管点样于薄层板上,点样后用吹风机吹干,然后放入加有三氯甲烷和甲醇体积比为 7:3 的展开剂层析缸中,封上盖子,待展开至距离薄层板顶端 1 cm 左右时取出,用吹风机吹干,然后喷上 10% H₂SO₄ 溶液,加热显色。

高效液相色谱分析(HPLC)检测:将过硅胶柱后的各流分减压浓缩,冷冻干燥至干,分别称取少量样品,用色谱纯级的甲醇溶解,过 0.45 μm 滤膜,然后以乙腈和水为流动相,梯度洗脱,检测无患子皂苷的纯度。色谱柱为 C₁₈ 柱,4.6 mm ×

150 mm;柱温为 25 ℃;检测波长为 205 nm;流动相:A 泵是乙腈,B 泵是水。梯度洗脱程序为 0~5 min,30% A;5~6 min,30%~50% A;6~40 min,50%~70% A;40~60 min,70%~100% A。流速为 2 mL/min;进样量为 20 μL。

核磁谱图在 Bruker 公司 400 MHz NMR 波谱仪上测定,以四甲基硅为内标物,化学位移单位为 10⁻⁶,耦合常数单位为 Hz。

1.2.4 皂苷含量的定量分析 标准曲线的绘制:称取 10.0 mg 干燥的齐墩果酸,用甲醇溶解并定容至 10 mL,备用;称取 0.500 0 g 香草醛,用冰乙酸溶解并定容至 10 mL,备用;分别吸取齐墩果酸甲醇溶液 0、40、80、120、160、200、240 μL 于比色管中,每组 3 次重复,水浴加热挥去溶剂,先后加入 0.4 mL 配好的香草醛-冰醋酸溶液,1.4 mL 高氯酸(氧化剂),充分摇匀,于 70 ℃水浴加热 20 min,取出后立即浸入冰水浴中冷却 2~3 min,加入 10 mL 冰乙酸,在 546 nm 波长处测定其吸光度^[16]。用移液枪吸取一定体积的分离液,测定样品分离液的吸光度(用标准曲线法),以不加提取液为空白对照,计算提取液中的皂苷含量。

1.2.5 抗稻瘟病菌活性测定 将水稻稻瘟病菌接种到 PDA 培养基上,28 ℃培养 7 d,备用。用直径为 7 mm 的打孔器打取菌落边缘的菌块作为接种物,分别接种预先制备的含不同浓度无患子皂苷的 PDA 平板上,每个处理 3 次重复,培养 7 d 后采用十字交叉法测定菌落大小,并算出抑菌率:

抑菌率=(空白菌落直径-含药菌落直径)/(空白菌落直径-接入菌块直径)×100%。

2 结果与分析

表 2 不同洗脱剂用量对无患子皂苷洗脱的影响

洗脱剂	1 BV		2 BV		3 BV		4 BV	
	固形物含量 (mg)	皂苷含量 (mg)	固形物含量 (mg)	皂苷含量 (mg)	固形物含量 (mg)	皂苷含量 (mg)	固形物含量 (mg)	皂苷含量 (mg)
蒸馏水	11.8	0.0	4.1	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0
30% 乙醇	9.2	0.0	12.6	0.0	10.4	0.0	13.2	1.2
70% 乙醇	63.24	7.4	82.1	15.7	36.8	6.2	16.3	3.8

表 3 无患子皂苷大孔吸附树脂 70% 乙醇流分的抗稻瘟病菌活性

流分浓度 (μg/mL)	菌落直径 (mm)	抑菌率 (%)
CK	46.44 ± 0.11a	
20	35.93 ± 0.05b	26.65 ± 0.13e
50	27.32 ± 0.11c	48.48 ± 0.26d
80	17.16 ± 0.12d	74.24 ± 0.35c
110	14.14 ± 0.05e	81.90 ± 0.17b
140	11.28 ± 0.07f	89.15 ± 0.28a

注:同列数据后相同小写字母代表差异不显著,不同小写字母代表差异显著(P<0.05)。

2.2 硅胶柱色谱对无患子皂苷的分离效果

2.2.1 硅胶柱不同比例二元洗脱剂洗脱的无患子皂苷流分的抗稻瘟病菌活性 由表 4 可知,三氯甲烷与甲醇二元洗脱剂的体积比为 5:1、7:1 时,其 EC₅₀ 较小,分别为 23.132 5、29.918 7 μg/mL,而其他体积比的 EC₅₀ 均高于 40 μg/mL,说明主要活性物质可能在这 2 个流分中。另一方

2.1 大孔吸附树脂对无患子皂苷的初步分离效果

2.1.1 不同浓度乙醇水溶液的洗脱分离效果 由表 1 可知,无患子粗皂苷经 D101 大孔吸附树脂分离后,其皂苷主要集中于 70%、50%、95% 乙醇洗脱液中,蒸馏水和 30% 乙醇洗脱液中虽然有一定的固形物存在,但并未检测到皂苷,这说明其中的固形物有可能是糖类等水溶性杂质。因此,蒸馏水和低浓度乙醇可以用来除掉无患子粗皂苷中的杂质。

表 1 不同浓度乙醇水溶液对无患子皂苷的洗脱效果

洗脱流分	吸光度	皂苷含量 (mg)	固形物含量 (mg)
蒸馏水	0.000	0.0	15.6
30% 乙醇	0.000	0.0	26.3
50% 乙醇	0.137	6.8	58.9
70% 乙醇	0.170	13.6	72.6
95% 乙醇	0.126	2.6	18.2

2.1.2 洗脱剂用量对分离效果的影响 由表 2 可知,在用 3 BV 的蒸馏水洗脱时,已经能将萃取物中的水溶性杂质除尽,再继续用蒸馏水洗脱,则没有物质被洗脱下来;30% 乙醇洗脱用量至 3 BV 时,在流分中未检测到无患子皂苷,当用量达到 4 BV 时,开始有无患子皂苷,说明无患子皂苷随着 30% 乙醇用量的增加,已有部分被解吸,因此,30% 乙醇的用量确认为 3 BV;当 70% 乙醇的用量为 4 BV 时,已经能够洗下所有皂苷。因此,选择 D101 大孔吸附树脂纯化无患子皂苷的工艺为蒸馏水和 30% 乙醇各 3 BV,70% 乙醇 4 BV,依次洗脱,收集 70% 乙醇洗脱液。由表 3 可计算出,70% 乙醇流分抗稻瘟病菌的毒力方程为 $y=2.220 0x+1.390 8(r^2=0.987 2,P=0.001 7)$,EC₅₀=42.245 4 μg/mL,EC₉₀=159.610 0 μg/mL。

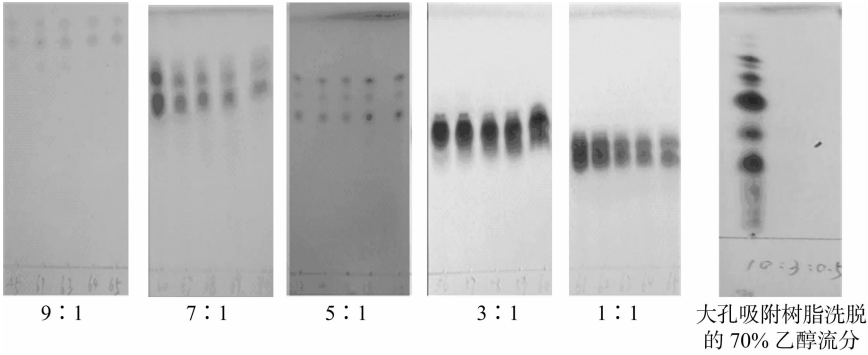
面,EC₉₀ 似乎表现出极性越弱的流分活性越强的趋势,即含糖基越少的无患子皂苷活性越强。

2.2.2 硅胶柱不同比例二元洗脱剂洗脱的无患子皂苷流分的色谱结果 由图 1 可知,大孔吸附树脂 70% 乙醇流分所含皂苷成分较多,至少有 5 个化合物。经过硅胶柱层析,各比例三氯甲烷和甲醇洗脱后,能够得到有效分离。1:1 和 3:1 流分似乎成分相对单一,但活性较弱,而活性较强的 5:1 流分似有 3 个成分,7:1、9:1 流分均有 2 个以上化合物。

2.2.3 无患子皂苷的纯化及其抗稻瘟病菌活性 向 5:1 流分的三氯甲烷-甲醇溶液中加入蒸馏水,有白色絮状物出现,离心收集白色絮状物,弃去上清液,获得了白色粉末状成分,经色谱纯甲醇溶解沉淀,HPLC 检测,获得了含有 2 个主峰的混合物 A(图 2-a)。将 7:1 流分重新上硅胶柱,进一步细分三氯甲烷和甲醇的比例,得到了白色晶体状物质,经 HPLC 检测,获得 1 个单体化合物 B(图 2-b)。2 个物质在浓度为 20 μg/mL 时,对稻瘟病菌的抑制率分别为 81.24%(图 2-c)、84.16%(图 2-d)。

表 4 各无患子洗脱流分对水稻稻瘟病菌菌丝生长的毒力

三氯甲烷与甲醇体积比	毒力回归方程	相关系数	P 值	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₉₀ (μg/mL)
9 : 1	$y = -0.495\ 9x + 3.411\ 1$	0.968 0	0.006 8	40.847 9	97.021 0
7 : 1	$y = 2.418\ 4x + 1.430\ 6$	0.902 6	0.036 0	29.918 7	101.358 9
5 : 1	$y = 1.756\ 4x + 2.603\ 9$	0.922 7	0.025 5	23.132 5	124.126 3
3 : 1	$y = 3.421\ 4x + 0.847\ 7$	0.990 8	0.001 1	51.186 2	121.261 9
1 : 1	$y = 2.594\ 9x + 0.664\ 8$	0.962 2	0.008 8	46.840 2	146.044 2



图下各比例代表不同体积比的三氯甲烷和甲醇
图1 无患子皂苷不同洗脱流分的 TLC 检测结果

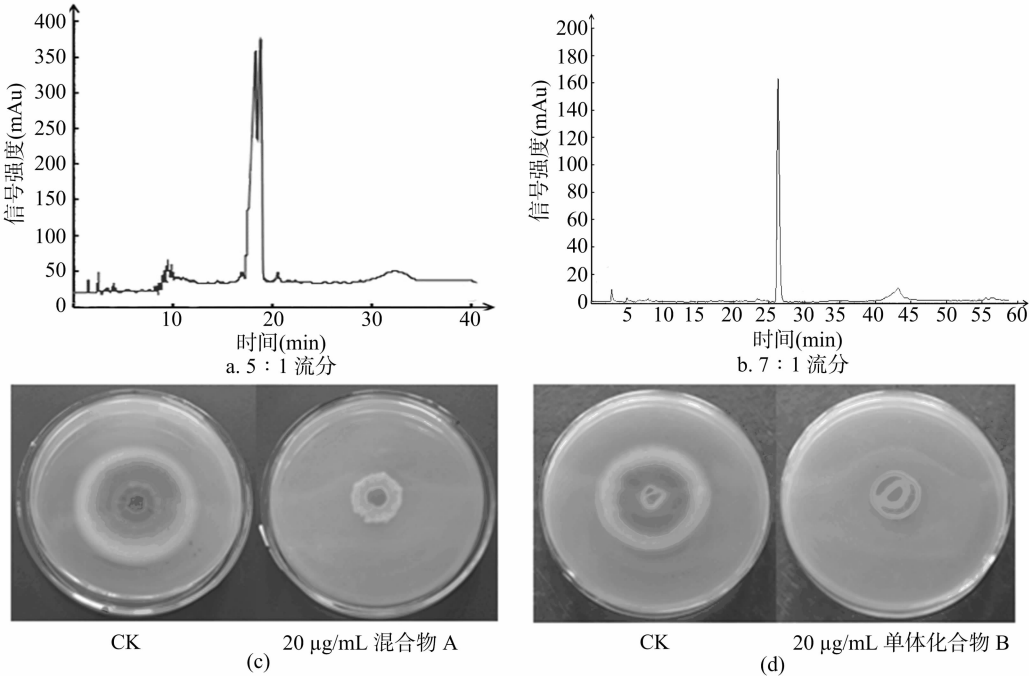


图2 活性无患子皂苷的 HPLC(a、b)和抗稻瘟病菌试验(c、d)结果

2.3 活性无患子皂苷的鉴定

活性无患子皂苷单体的结构式如图 3 所示,为白色晶状单体。¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ 0.73, 0.84, 0.93, 0.96, 0.99, 1.20 (3H, each, all s, 24, 26, 29, 30, 25, 27 - H₃), 1.63 (1H, m, 9 - H), 1.90 (1H, m, 11 - H), 2.86 (1H, dd, J = 17.03, 9.30 Hz, 18 - H), 3.28, 3.22 (2H, both d, J = 11.03, 23 - H₂), 3.64 (1H, dd, J = 6.32, 4.10 Hz, 3 - H), 4.47 (1H, d, J = 7.2 Hz, 1'' - H), 4.50 (1H, d, J = 6.88 Hz, 1' - H), 5.16 (1H, t, 12 - H), 5.22 (1H, brs, s, 1'' - H)。 ¹³C-NMR (101 MHz, MeOD) δ 182.31, 145.21, 123.26, 106.34, 104.51, 101.16, 82.11, 81.92, 77.42, 76.00, 75.04, 74.01, 72.73, 71.43,

70.87, 69.72, 69.65, 66.94, 65.31, 64.39, 47.95, 47.93, 47.55, 47.13, 43.76, 42.79, 42.59, 40.30, 39.47, 37.42, 34.76, 33.7, 33.41, 33.22, 31.42, 28.67, 26.38, 26.27, 24.32, 23.91, 23.82, 18.62, 17.84, 17.81, 16.20, 13.60。 HR-ESI-MS; m/z 882.497 7 [M + H]⁺ (calcd for C₄₆H₇₄O₁₆, 882.497 7)。与文献比对该单体的结构被确定为常春藤 3-O-α-D-木吡喃糖基(1→3)-α-L-鼠李吡喃糖基(1→2)-α-L-阿拉伯吡喃糖苷。

3 结论

无患子中果皮总皂苷浸膏正丁醇溶出物经 D101 大孔树

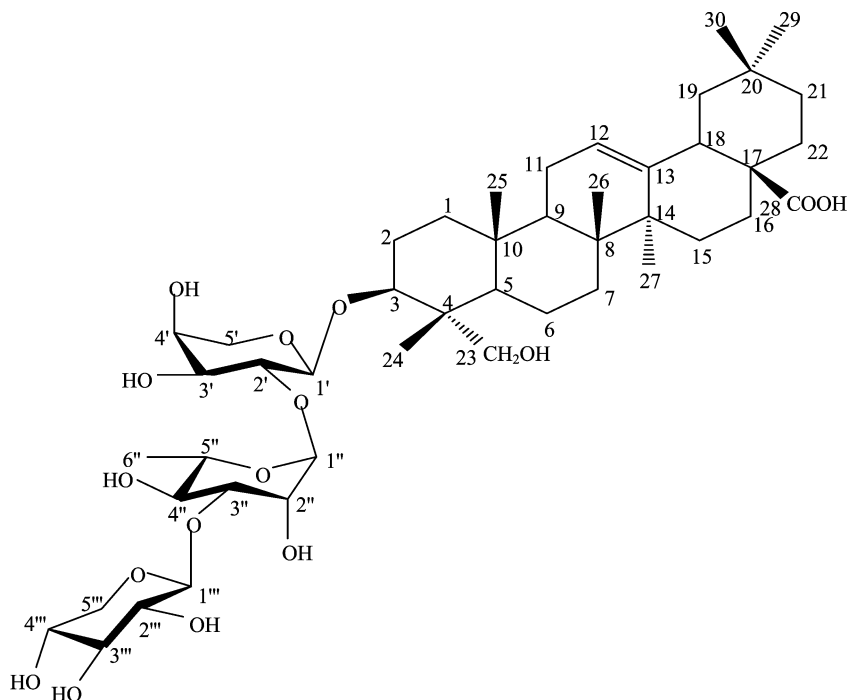


图3 活性无患子皂苷的单体结构

脂的 70% 乙醇水溶液洗脱, 洗脱物再经硅胶柱层析, 分别收集三氯甲烷和甲醇体积比为 5 : 1、7 : 1 的流分, 前者水洗后离心析出的白色粉末状为含 2 个成分的混合物, 后者进一步过硅胶柱, 细分二元洗脱剂流分, 获得白色晶状单体。这 2 个成分的混合物和单体在浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抗菌率分别为 81.24%、84.16%。经鉴定, 该单体无患子皂苷结构为常春藤 3-O- α -D-木吡喃糖基(1 \rightarrow 3)- α -L-鼠李吡喃糖基(1 \rightarrow 2)- α -L-阿拉伯吡喃糖苷。该皂苷成分为无患子抗稻瘟病菌活性先导物之一。

参考文献:

- [1] Upadhyay A, Singh D K. Pharmacological effects of *Sapindus mukorossi* [J]. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2012, 54(5): 273–280.
- [2] Talwar G P, Dar S A, Rai M K, et al. A novel polyherbal microbicide with inhibitory effect on bacterial, fungal and viral genital pathogens [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2008, 32(2): 180–185.
- [3] Ibrahim M, Khan A A, Tiwari S K, et al. Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H pylori*: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(44): 7136–7142.
- [4] 赵志敏, 南艳平, 唐青涛, 等. 无患子总皂苷的体外抑菌及抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 799–801.
- [5] Saha S, Walia S, Kumar J, et al. Structure – biological activity relationships in triterpenic saponins; the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi [J]. Pest Management Science, 2010, 66(8): 825–831.
- [6] Li R, Wu Z L, Wang Y J, et al. Separation of total saponins from the pericarp of *Sapindus mukorossi* Gaertn. by foam fractionation [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 51(6): 163–170.
- [7] Hwang T L, Wang C C, Kuo Y H, et al. The hederagenin saponin SMG-1 is a natural FMLP receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation [J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80(8): 1190–1200.
- [8] Huang H C, Liao S C, Chang F R, et al. Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(17): 4916–4919.
- [9] Huang H C, Wu M D, Tsai W J, et al. Triterpenoid saponins from the fruits and galls of *Sapindus mukorossi* [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1609–1616.
- [10] Ni W, Hua Y, Teng R W, et al. New tirucallane – type triterpenoid saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2004, 6(3): 205–209.
- [11] Ni W, Hua Y, Liu H Y, et al. Tirucallane – type triterpenoid saponins from the roots of *Sapindus mukorossi* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 54(10): 1443–1446.
- [12] Huang H C, Tsai W J, Morris – Natschke S L, et al. Sapinmusaponins F – J, bioactive tirucallane – type saponins from the galls of *Sapindus mukorossi* [J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(5): 763–767.
- [13] Kuo Y H, Huang H C, Kuo L M, et al. New dammarane – type saponins from the galls of *Sapindus mukorossi* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(12): 4722–4727.
- [14] Sharma A, Sati S C, Sati O P, et al. Triterpenoid saponins from the pericarps of *Sapindus mukorossi* [J]. Journal of Chemistry, 2013(1): 1–2.
- [15] 谭明辉, 霍光华. 无患子总皂苷的提取工艺及其抑菌活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(22): 5511–5514.
- [16] 傅勇, 雷鹏, 韩玉梅, 等. 大孔吸附树脂法制备无患子皂苷及其抑菌活性表征 [J]. 中药材, 2010, 33(2): 267–272.