

小桐子果壳抑菌活性部位的分离及其 HPLC-MS 分析

李育川^{1,2}, 郭巧生^{1*}, 房海灵¹, 申海进¹

(1 南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095; 2 云南省楚雄农业学校, 云南 楚雄 67500)

摘要:目的 寻找小桐子 *Jatropha curcas* 果壳的抑菌活性物质。方法 利用 6 种不同极性溶剂对果壳进行平行提取, 结合抑菌活性测定, 筛选出活性最强、提取率大于 10% 的粗提物; 再将筛选出的粗提物, 依次利用液-液萃取、硅胶柱反复柱色谱, 结合 PTLC 制备分离纯化。同时对各阶段分离产物进行活性追踪, 筛选出具有抗菌活性的物质, 最后采用 HPLC-MS 分析, 初步鉴定出活性部位主体成分。结果 从果壳中分得抑菌活性强且含量高 WA3 物质, 经 HPLC-MS 分析, 初步鉴定了含量较高的 3 个化合物, 为总量的 35.27%, 分别为环庚肽、麻疯树素、三萜醇三聚体。结论 小桐子果壳中含有丰富的抑菌活性物质, 分别属于肽类、二萜、三萜类化合物。

关键词:小桐子果壳; 抑菌活性物质; HPLC-MS; 环庚肽; 麻疯树素; 三萜醇三聚体

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1445-04

小桐子 *Jatropha curcas* L., 又名麻疯树, 为大戟科麻疯树属(*Jatropha* Linn.) 落叶灌木。小桐子原产美洲热带, 现广泛分布于全球热带地区, 在中国西南地区有大量栽培种或半野生种^[1]。该植物种仁的含油量最高可达 61.5%, 是热带地区一种极为适宜的生物柴油原料植物, 现在云南、四川、贵州等地已有大面积栽培。小桐子是国内外传统的药用^[2]和有毒植物^[3], 其全株均可入药。目前, 国内外对小桐子抑菌活性研究已有少量报道^[4-7], 对小桐子果壳抑菌活性的研究尚未见报道。笔者对小桐子果壳抑菌活性物质进行分离和初步鉴定, 以期为利用小桐子果壳开发抗菌药物提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器: 小桐子果壳于 2007 年 10 月采自云南永仁县, 经南京农业大学中药材研究所郭巧生教授鉴定为麻疯树 *Jatropha curcas* L. 的干燥果壳, 凭证标本(2007109)存放于南京农业大学中药材研究所标本室。新鲜成熟果实剥下种子后, 将果壳晒干粉碎后备用。

实验用白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici* Leon 和烟草疫霉病菌 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan。均由南京农业大学植保学院张正光教授提供。

美国 Thermo Finnigan 生产的 LG-MS (LC pumper survegog、auto sampler survegog、LCQ DE-CA XP plus)。乙醇、石油醚(I)、氯仿、醋酸乙酯、

正丁醇和甲醇均为国产分析纯。乙腈为色谱纯 (Fisher 公司), 实验用水为娃哈哈纯净水。

1.2 实验方法

1.2.1 果壳粗提物的提取: 按照李育川等^[8]使用的系统溶剂冷浸法对小桐子果壳进行平行提取。

1.2.2 抑菌粗提物的萃取分离: 参照陈晓青^[9]等介绍的液-液萃取法, 依次用石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇对小桐子果壳乙醇粗提物的水溶液进行分离萃取, 获得各萃取物。

1.2.3 硅胶柱色谱分离: 第一步, 大柱粗分: 以 100~200 目硅胶 H 常规湿法装柱, 取正丁醇萃取物(A3-4)样品 20 g 上样, 以醋酸乙酯-甲醇(12:1、6:1、1:2)为流动相进行梯度洗脱, 连接 HD-5 电脑紫外检测仪(检测波长 275 nm)在线检测, 合并同一吸收峰值收集液, 将各流分减压浓缩称重。第二步, 中柱细分: 以 200~300 目硅胶 H 常规湿法装柱, 取活性最强的 A3-4-1 样品 3 g; 以石油醚-醋酸乙酯(1:5)为流动相进行洗脱; 第三步, PTLC 分离制备: 以石油醚-醋酸乙酯(1:6)为展开液, 对样品 A3-4-1-1 进行 PTLC 分离制备; 在紫外透射仪下, 用刀片将各展开条带连同硅胶一同分别刮下, 然后多次用展开液溶解, 离心后倒出上清液, 上清液放入通风厨中挥发浓缩后称重。

1.2.4 抑菌活性测定: 分别准确称取各样品 0.8 g, 加 0.8 mL 聚山梨酯, 拌匀, 使其充分乳化, 蒸馏水溶解, 定容至 100 mL, 制成 8 g/L 处理液; 取 0.8 mL 聚山梨酯 80, 加蒸馏水定容至 100 mL, 制成

* 收稿日期: 2010-05-24

作者简介: 李育川(1972—), 男, 彝族, 云南永仁人, 高级讲师, 博士研究生, 主要从事药用植物资源利用与评价。

Tel: 13187656632 E-mail: lyuchuan72@163.com

* 通讯作者 郭巧生 Tel: (025) 84396591 E-mail: gqs@njau.edu.cn

0.8% 聚山梨酯 80 空白对照液。取 10 mL 处理液(对照液)加入到 90 mL 热培养基中,制备成浓度为 0.08% 含毒培养基供试。抑制活性测定方法参考冯俊涛等^[10]含毒培养基生长速率法。25℃ 恒温培养,72 h 后用十字交叉法测量菌落直径,按以下公式计算菌丝生长抑菌率:

抑菌率(%) = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径)] × 100%

1.3 HPLC-MS 分析: HPLC 条件: Thermo Electron corporation 色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: 溶剂 A(乙腈), 溶剂 B(水), 等度洗脱: 15% 溶剂 A, 85% 溶剂 B; 体积流量: 0.2 mL/min; 进样方式: 自动进样 0.2 μL。质谱条件: LCQ DECA XP plus(电喷雾离子阱质谱仪), 离子源: ESI; 质量分析器: 离子阱分析器; 正、负离子检测模式; 毛细管温度: 275℃; 源电压: 5 kV; 源毛细管电压: 15 kV; 质量数范围 100~2 000 *m/z*; 干燥气为氮气, 进样量: 20 μL。质谱数据采集模式: 自动质谱/质谱。

表 1 小桐子果壳 6 种溶剂提取物对 4 种植物病原菌菌丝生长抑制活性测定

Table 1 Antifungal activity of six solvent extracts from *J. curcas* fruit shell against mycelial radial growth of four plant pathogenic fungi

提取物	白菜黑斑病菌		小麦赤霉病菌		辣椒疫霉病菌		烟草疫霉病菌	
	<i>D</i> /mm	<i>I</i> /%	<i>D</i> /mm	<i>I</i> /%	<i>D</i> /mm	<i>I</i> /%	<i>D</i> /mm	<i>I</i> /%
水提取物	18.5±2.52	45.6b	16.3±1.71	42.0b	13.5±1.29	41.3b	12.5±1.27	34.2c
乙醇提取物	4.8±1.71	86.0a	4.3±0.96	84.8a	1.5±1.29	93.5a	4.3±1.26	77.6b
正丁醇提取物	32.3±1.71	5.2e	22.0±2.16	21.4d	16.5±1.29	28.3c	15.3±1.26	19.8d
醋酸乙酯提取物	22.0±2.94	35.3c	27.5±2.08	3.6e	22.8±1.26	2.2d	18.8±1.71	3.9e
三氯甲烷提取物	32.8±1.71	4.4e	27.3±2.50	4.5e	22.5±1.29	3.3d	17.8±1.71	7.9e
石油醚提取物	29.0±1.83	14.7d	19.0±2.16	32.1c	15.5±1.29	35.1bc	14.8±0.96	22.4d
多菌灵	2.8±1.71	91.9a	2.3±1.71	93.5a	1.25±1.50	94.5a	2.5±0.58	86.9a

同一列上不同的字母,分别表示在 $P < 0.05$ 水平上的差异显著性;表中数据为 4 个重复的平均数; *D* 表示菌落直径, *I* 表示抑制率;下同
Differernt small letters in same column indicate significance at 5% levels; Datums in this table are average of four replications;
D=diameter, F=inhibition rate Following tables are same

由此得出,乙醇粗提物对 4 种病原真菌抑制作用最强,可进行进一步的活性组分分离和抑菌活性分析;4 种植物病原真菌中白菜黑斑菌和辣椒疫霉病菌比较敏感,可用作活性追踪指示菌。

2.2 不同萃取物对 2 种病原真菌的抑制活性分析: 各萃取物对白菜黑斑病菌和辣椒疫霉菌 72 h 菌丝生长抑制活性测定结果见表 2。结果表明,各萃取物对 2 种病原真菌 72 h 菌丝生长均有一定的抑制作用,其中正丁醇萃取物和石油醚萃取物对 2 种植物病原真菌 72 h 菌丝生长的抑制作用显著高于其他萃取物;其抑制率与多菌灵无显著差异,均表现出极高的抑制活性;各萃取物对白菜黑斑病菌 72 h 菌丝生长的抑作用由强到弱依次为: 正丁醇萃取物、石油醚萃取物、水萃取物、醋酸乙酯萃取物、三氯甲烷

高效液相和质谱数据采集和分析采用化学工作站进行(美国, Thermo Finnigan)。

1.4 数据处理与分析: 数据采用 SPSS 16.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂提取物对 4 种病原菌的抑制活性分析: 利用 6 种不同极性溶剂对小桐子果壳进行提取, 6 种提取物对 4 种病原真菌菌丝生长抑制测定结果见表 1。测定结果表明,乙醇提取物对 4 种病菌 72 h 菌丝生长的抑制作用显著高于其他提取物,其对白菜黑斑病菌、小麦赤霉病菌、辣椒疫霉菌和烟草疫霉菌的 72 h 菌丝生长抑制率分别为 86.0%、84.8%、93.5% 和 77.6%, 其中对白菜黑斑病菌、小麦赤霉病菌和辣椒疫霉菌 72 h 菌丝生长抑制率与多菌灵差异不显著,显示出较高的抑菌活性;在各溶剂提取物对 4 种病菌真菌菌丝生长的抑制活性测定中,乙醇粗提物和水粗提物活性均显著高于其他粗提物。

萃取物。

由此得出,小桐子果壳乙醇粗提物的正丁醇萃取物和石油醚萃取物抑制菌活性高,值得继续进行分离研究。本实验首先选择正丁醇萃取物进行进一步的活性成分分离研究。

2.3 A3-4 样品柱色谱各流分抑菌活性分析

2.3.1 A3-4 样品大柱粗分各流分抑菌活性分析: 首先选择活性最强的正丁醇萃取物(A3-4)样品,经大柱粗分,共收集到 8 个流分。将各流分的收集液减压浓缩,利用白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌分别对 8 种流分进行抑菌活性测定,测定结果见表 3。结果表明,编号 A3-4-1(醋酸乙酯-甲醇 12:1)流分和编号 A3-4-6(醋酸乙酯-甲醇 6:1)流分对 2 种病原菌的 72 h 菌丝生长抑制率均显著高于其他流分,

表 2 小桐子果壳乙醇提取物的不同萃取物对 2 种植物病原菌菌丝生长抑制活性测定

Table 2 Antifungal activity of various fractions from *J. curcas* fruit shell of alcohol extracts against mycelial radial growth of two plant pathogenic fungi

萃取物	白菜黑斑病菌		辣椒疫霉病菌	
	D/mm	I/%	D/mm	I/%
石油醚萃取物	5.3±1.71	83.60b	3.8±0.96	84.38a
三氯甲烷萃取物	31.3±1.71	3.90d	22.5±2.38	7.30c
醋酸乙酯萃取物	29.3±2.22	8.60d	21.8±2.22	9.40c
正丁醇萃取物	4.5±1.29	85.95ab	2.3±1.71	90.63a
水萃取物	16.8±1.71	47.65c	11.0±1.63	54.18b
多菌灵	2.3±1.71	92.97a	1.3±1.50	94.80a

表 3 样品 A3-4 柱色谱流分对 2 种植物病原菌菌丝生长抑制活性测定

Table 3 Antifungal activity of fractions from A3-4 section after column chromatography against mycelial radial growth of two plant pathogenic fungi

流分	相对质量 分数/%	白菜黑斑病菌		小麦赤霉病菌	
		D/mm	I/%	D/mm	I/%
A3-4-1	35.68	3.0±1.41	85.0a	1.5±1.29	91.7ab
A3-4-2	11.35	18.8±2.75	8.8e	16.3±0.96	9.8d
A3-4-3	7.03	18.3±2.06	10.0e	17.8±2.22	5.6d
A3-4-4	13.51	14.8±1.71	26.3d	15.3±1.71	15.3d
A3-4-5	9.19	11.5±2.08	42.5c	9.3±2.22	48.6c
A3-4-6	7.57	5.5±1.29	72.5b	3.5±1.29	80.6b
A3-4-7	5.95	18.8±2.22	7.5e	16.5±2.08	9.7d
A3-4-8	9.73	19.5±1.29	3.8e	17.5±1.29	4.2e
多菌灵	—	1.8±1.71	91.3a	1.0±0.82	94.4a

其中 A3-4-1(醋酸乙酯-甲醇 12:1) 流分对 2 种植物病原菌的 72 h 菌丝生长抑制率均与多菌灵无显著差异,表现出极高的抑菌活性; A3-4-1 流分对白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌的 72 h 菌丝生长抑制率分别为 85.0% 和 91.7%, 其质量分数为 35.68%; A3-4-6(醋酸乙酯-甲醇 6:1) 流分对白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌的 72 h 菌丝生长抑制率分别为 72.5% 和 80.6%, 质量分数为 7.57%。

通过利用 2 种植物病原真菌对大柱粗分所得 8 种流分的抑菌活性追踪发现, 流分 A3-4-1 活性最强, 其对 2 种植物病原菌 72 h 菌丝生长的抑制率都超过 85%, 表现出极高的抑菌活性, 加之其相对质量分数都较高, 因此可选择 A3-4-1(醋酸乙酯-甲醇 12:1) 流分继续进行分离。

2.3.2 A3-4-1 样品中柱细分各流分抑菌活性分析: 将活性强含量高的 A3-4-1 流分, 经中柱细分, 共收集到 2 个流分; 将各流分的收集液减压浓缩, 利用白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌对 2 种流分进行抑菌活性测定, 测定结果见表 4。结果表明, A3-4-1-1(石油醚-醋酸乙酯 1:5) 流分对 2 种植物病原菌 72 h 菌丝

表 4 样品 A3-4-1 柱色谱流分对 2 种植物病原菌菌丝生长抑制活性测定

Table 4 Antifungal activity of fractions from A3-4-1 section after column chromatography against mycelial radial growth of two plant pathogenic fungi

流分	相对质量 分数/%	白菜黑斑病菌		小麦赤霉病菌	
		D/mm	I/%	D/mm	I/%
A3-4-1-1	64.00	2.5±1.29	88.1a	2.3±1.50	88.5a
A3-4-1-2	36.00	10.5±2.38	50.0b	7.3±1.26	63.0b
多菌灵	—	1.8±1.26	91.7a	1.5±1.29	92.3a

生长抑制率都显著高于 A3-4-1-2(石油醚-醋酸乙酯 1:5) 流分, 且与多菌灵无显著差异, 显示出极高的抑菌活性; A3-4-1-1(石油醚-醋酸乙酯 1:5) 流分对白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌的 72 h 菌丝生长抑制率分别为 88.1% 和 88.4%, 其质量分数为 64.00%。

由此得出, A3-4-1-1 流分对 2 种植物病原真菌的抑制率最高, 且其相对质量分数也较高, 因此可选择 A3-4-1-1 继续进行活性物质的分离、追踪。

2.3.3 A3-4-1-1 样品 PTLC 制备流分的抑菌活性分析: 选择 A3-4-1-1 流分膏, 以石油醚-醋酸乙酯 (1:5) 为展开液, 经薄层色谱分离制备。按不同 R_f 值共收集到 3 个流分; 白菜黑斑病菌和小麦赤霉病菌为供试菌, 分别对 3 种流分进行活性测定, 测定结果见表 5。结果表明, 3 个流分对 2 种供试菌均表现出较高的抑菌活性, 生长抑制率均大于 55%; 在 3 个流分中, WA3 样品对 2 种供试菌的抑制率显著高于 WA1 和 WA2 样品, 其对 2 种供试菌的 72 h 菌丝生长抑制率与多菌灵无显著差异, 分别为 86.5% 和 89.4%, 其质量分数为 68.46%。

表 5 样品 A3-4-1-1 PTLC 制备流分对 2 种植物病原菌菌丝生长抑制活性测定

Table 5 Antifungal activity of fractions from A3-4-1-1 section after PTLC against mycelial radial growth of two plant pathogenic fungi

流分	相对质量 分数/%	白菜黑斑病菌		小麦赤霉病菌	
		D/mm	I/%	D/mm	I/%
WA1	10.53	8.3±1.89	59.6b	7.3±1.26	61.4b
WA2	21.05	6.5±1.29	68.1b	6.5±1.29	65.4b
WA3	68.46	2.8±0.96	86.5a	2.0±1.63	89.4a
多菌灵	—	2.0±1.41	90.2a	0.8±0.96	96.0a

由此表明, 经 PTLC 制备所得的 3 种活性部位 WA1、WA2 和 WA3 都显示出较强的抑菌活性。其中 WA3 活性最强, 且其相对质量分数也最高。因此可选择 WA3 样品进行分析鉴定。

2.4 样品 WA3 的化学组成及其相对含量分析: 通

过对 WA3 样品进行 HPLC-MS 分析,在正、负离子模式下检出,各化合物在负离子模式下都有很好的响应。对图谱进行解析,解析了含量较高的 3 个化合物,为总量的 35.27%,初步鉴定为环庚肽(cyclogossine A)、二萜类化合物麻疯树素(jatrophin)、三萜类化合物三萜醇三聚体($C_{63}H_{117}O_9$)。

化合物 1: 相对质量分数 16.32%。ESI-MS m/z : 604.1, 740.9, 755.9, 757.1, 758。因主要质谱数据与 Horsten 等报道的文献中的环庚肽基本一致^[11],初步鉴定为环庚肽(cyclogossine A)。

化合物 2: 相对质量分数 12.73%。ESI-MS m/z : 217.3, 348.3, 351.7, 352。主要质谱数据与 Banerji 等报道的文献中的木脂素 Ia(lignan Ia),也称为麻疯树素基本一致^[12],初步鉴定为二萜类化合物麻疯树素(jatrophin)。

化合物 3: 相对质量分数 6.21%。ESI-MS m/z : 249.2, 325.6, 375.4, 375.6, 551.8 (相对丰度 100%), 583.6, 667.4, 758.0, 892.2, 1015.7, 主要质谱数据与 Khafagy 等报道的文献中的三萜醇三聚体($C_{63}H_{117}O_9$)基本一致^[13],初步鉴定为三萜类化合物三萜醇三聚体($C_{63}H_{117}O_9$)。

3 结论与讨论

小桐子果壳经乙醇提取,依次利用石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇对乙醇提取物的水溶液进行萃取;选择正丁醇萃取相上 100~200 目硅胶柱色谱,以醋酸乙酯-甲醇(12 B 1、6 B 1、1 B 2)为流动相进行梯度洗脱,共获得 8 个流分;选取第 1 流分(醋酸乙酯-甲醇 12 B 1),浓缩后再上 200~300 目硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(1 B 5)对流动相进行洗脱,获得 2 个流分;选取第 1 流分,将其浓缩,以石油醚-醋酸乙酯(1 B 6)为展开液,进行 PTLC 制备分离纯化,最后将展开条带最大的分离段 WA3 连同硅胶刮下,用展开液溶解 3 次后离心,取上清液浓缩。可获得以环庚肽、麻疯树素、三萜醇三聚体为主体成分具有较高抑菌作用的活性部位。

魏琴等^[4]从麻疯树种子中提取分离能明显抑制水稻稻瘟病菌、松赤枯病菌、玉米纹枯病菌、油菜菌核病菌的毒蛋白;李维莉等^[5]从小桐子茎中分离得到具有明显广谱抗菌活性物质:3,5-二羟基-对甲氧

基苯甲酸;曾礼华等^[6]发现小桐子叶的乙醇提取物对鸡大肠杆菌、金黄色葡萄球菌均有抑制作用;Ravindranath 等^[7]从麻疯树的茎中分离得到具有抗菌、抗真菌、抗生育、抗肿瘤的脱氧核糖核酸酶。本实验利用抑菌活性追踪法,从小桐子果壳中初步分离、鉴定得到以环庚肽、麻疯树素、三萜醇三聚体为主体成分的抗菌活性部位。这一结果可能与我国传统意义上将小桐子作为清热解毒、消肿止痛、用于治疗皮肤病(麻疯病)、胃肠炎和灭螺药物有关^[2]。

国内外学者研究发现,作为药用有毒植物的小桐子,其含有大量具有生物活性的蛋白类、二萜类、三萜类、黄酮类、生物碱类化合物,本实验从小桐子果壳中的分离得到对植物病原真菌具有抑制作用的二萜、三萜、肽类化合物,从而更进一步证实小桐子中含有丰富的抑菌物质,因此利用小桐子各活性部位开发抗菌活性物质前景广阔。

参考文献:

- [1] 丘华兴. 中国植物志 [M]. 第四十四卷第二分册 1. 北京: 科学出版社, 1996.
- [2] 江苏省新医学院. 中药大辞典 [M]. 下册 1. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [3] 陈冀胜, 郑 硕. 中国有毒植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] 魏 琴, 廖 毅, 周黎军, 等. 1 麻疯树毒蛋白(curcin)的抗真菌活性研究 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 711.
- [5] 李维莉, 彭永芳, 马银海, 等. 1 云南麻烘芋的化学成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 385.
- [6] 曾礼华, 严 钊, 陈 放. 1 麻疯树叶提取物对鸡大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的体外抑菌作用 [J]. 中国家禽, 2004, 8(1): 35.
- [7] Ravindranath N, Ravinder Reddy M, Mahender G, et al. Deoxyprussomerins from *Jatropha curcas*: Are they also plant metabolites? [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(16): 2387-2390.
- [8] 李育川, 郭巧生, 邵清松, 等. 1 小桐子枝叶提取物对蚜虫的毒杀活性 [J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(2): 89.
- [9] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳. 1 中草药成分分离分析技术与方法 [M]. 北京: 化工工业出版社, 2006.
- [10] 冯俊涛, 石勇强, 张 兴. 1 56 种植物抑菌活性筛选试验 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(2): 65.
- [11] Horsten S F A J, Van den Berg A J J, Kettenes van den Bosch J J, et al. Cyclogossine A: A novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia* [J]. *Planta Med*, 1996, 62(1): 46.
- [12] Banerji J, Das B, Chatterjee A, et al. Gadain, a lignan from *Jatropha gossypifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(10): 2323.
- [13] Khafagy S M, Mohamed Y A, Abdel Salam N A, et al. Phytochemical study of *Jatropha curcas* [J]. *Planta Med*, 1977, 31(3): 274.