

文章编号:1671-9352(2008)09-0001-05

水溶性海星皂苷的分离纯化及其抗真菌活性研究

樊廷俊¹,张铮¹,袁文鹏^{1,2},丛日山¹,王卫卫¹,荆昭¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院海洋生物系, 山东 青岛 266003;

2. 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250014)

摘要:为了分离纯化出具有强抗真菌活性的水溶性海星皂苷,以罗氏海盘车(*Asterias rollestoni*)腕为实验材料,利用水抽提方法获得水溶性海星皂苷粗品,依次利用大孔树脂和硅胶柱层析对水溶性海星皂苷进行了纯化,并对其抗真菌活性进行了测定。研究结果发现,在30%、50%、70%、80%、95%乙醇溶液的大孔树脂柱层析洗脱组分中,70%乙醇溶液洗脱组分对白色念珠菌和裂殖酵母菌的抗真菌活性最强。70%乙醇溶液洗脱组分经硅胶柱层析进一步纯化后,得到了SF-1、SF-2、SF-3和SF-4四种纯化样品,其中SF-1纯化样品没有抗真菌活性,SF-2纯化样品具有极弱的抗真菌活性,SF-3和SF-4纯化样品均具有很强的抗真菌活性。SF-3纯化样品在高压液相柱层析(HPLC)图谱中仅显示单一洗脱峰,表明其纯度很高,可应用于高效抗真菌药物的研制。研究结果为利用水溶性海星皂苷研制高效抗真菌药物奠定了基础。

关键词:海星;水溶性海星皂苷;抗真菌活性;大孔树脂柱层析;硅胶柱薄层层析

中图分类号: Q58 **文献标志码:** A

Purification and antifungal activity examination of water-soluble starfish glycosides from *Asterias rollestoni*

FAN Ting-jun¹, ZHANG Zheng¹, YUAN Wen-peng^{1,2}, CONG Ri-shan¹, WANG Wei-wei¹, JING Zhao¹

(1. Department of Marine Biology, College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong, China;

2. Research Institute of Biology, Science Academy of Shandong, Jinan 250014, Shandong, China)

Abstract: To exploit highly bioactive natural antifungal medicaments from starfish, water-soluble starfish glycosides from *Asterias rollestoni* were isolated and purified by macroporous resin column and silica gel column chromatography, and their antifungal bioactivities were also examined. Among the macroporous resin fractions of 30%, 50%, 70%, 80% and 95% ethanol, 70% ethanol eluted fractions showed the highest antifungal activity towards *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. After being checked by thin layer chromatography, purified SF-1, SF-2, SF-3 and SF-4 fractions were obtained from 70% ethanol eluted fractions with a silica gel column. Among the purified fractions, SF-3 and SF-4 showed much higher antifungal activities, while SF-1 did not show any antifungal activities and SF-2 had only very lower antifungal activities. SF-3 exhibited a single peak after loaded onto a high pressure liquid chromatography (HPLC) column, which indicated that SF-3 was pure enough to be used as a candidate of antifungal medicament development. This research will lay a solid foundation for the development and application of natural and highly bioactive antifungal medicaments.

Key words: *Asterias rollestoni*; water-soluble starfish glycosides; antifungal activities; macroporous resin column; silica gel column

皂苷,又称皂甙,是一种广泛存在于植物以及海洋棘皮动物中的、具有多种药理学活性的物质。海

星皂苷是海星的次生代谢产物,对纯的海星皂苷的大量试验表明它们具有多种药理活性:溶血活性、肿

收稿日期:2008-03-24

基金项目:教育部留学园人员基金资助项目(980418)

作者简介:樊廷俊(1964-),男,教授,博士生导师,主要研究方向为重要海水养殖动物细胞育种工程、海洋生物活性物质分离纯化及其性质研究。Email: tjfan@mail.ouc.edu.cn

瘤细胞毒性、抗病毒作用、抗革兰氏阳性菌活性、阻断哺乳动物神经肌肉传导作用、 Na^+/K^+ -ATP 酶抑制作用、抗溃疡作用以及抗炎、麻醉和降血压活性等^[1]。目前,对海星皂苷的制备多采用甲醇、乙醇等稀醇提取法^[2-3],这种工艺方法冗长复杂、萃取率低^[4],存在着有机溶剂使用量大、成本高、容易对环境造成污染等一系列缺点^[5];同时提取的海星皂苷水溶性比较差,应用时常需用促溶剂如 DMSO 等对其进行溶解,这在一定程度上影响了其抗真菌活性,也限制了其在临床医学上的应用范围。

到目前为止,国内外尚未见到对水溶性海星皂苷的报道极少,更没有利用水溶性海星皂苷进行抗真菌活性的研究报道。本文利用水抽提法、大孔树脂柱层析和硅胶柱层析从罗氏海盘车(*Asterias rollestoni*)腕中分离并纯化出水溶性海星皂苷,筛选出具有显著抗真菌活性的水溶性海星皂苷单体,为利用水溶性海星皂苷开发研制高效抗真菌药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

罗氏海盘车(*Asterias rollestoni*)采自青岛胶州湾海域,裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)由中国海洋大学微生物工程实验室友情惠赠,采用 YPD 培养基(酵母浸膏 0.5%,蛋白胨 1%,葡萄糖 2%,琼脂 2%)于 28 ℃ 培养;旋转蒸发器购自上海亚荣生化仪器厂,冷冻干燥机购自美国西盟(SIM)公司,AB-8 型大孔树脂购自天津南开化工厂,硅胶板及层析用硅胶(200~300 目)购自青岛海洋化工厂,Agilent1100 型高压液相柱层析(HPLC)仪、RID 检测器和 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 型 HPLC 层析柱(4.6 mm × 150 mm, 0.5 μm)为美国 Agilent 公司产品,HPLC 层析柱洗脱流动相所用乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.2 水溶性海星皂苷的分离提取

取新鲜罗氏海盘车腕,用匀浆器打碎,60 ℃ 水浴 2 h,期间不断搅拌,16 层纱布过滤后收集海星水提液。将海星水提液 pH 调整为 10,上样于预处理的 AB-8 型大孔树脂柱(30 mm × 300 mm),蒸馏水洗柱后分别用 30%、50%、70%、80%、95% 的乙醇溶液各 300 mL 进行洗脱,收集各种洗脱组分,石油醚脱脂后使用正丁醇进行萃取,经旋转蒸发和冷冻干燥后备用。

1.3 大孔树脂各洗脱组分抗真菌活性测定

参照 2005 中国药典中的管碟法^[6]进行抑菌环

直径的测定。将不同水溶性海星皂苷洗脱组分的冻干品配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的生理盐水溶液,分别测定其对裂殖酵母和白色念珠菌的抑菌环大小,测量抑菌环直径并拍照。

1.4 水溶性海星皂苷的硅胶柱层析

将筛选出的具有高抗真菌活性的大孔树脂柱洗脱组分上样于硅胶常压柱(15 mm × 200 mm),利用混合展层剂($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{水}}=4:1:5$)系统进行连续洗脱,收集洗脱组分(每管 5 mL)。对各洗脱组分进行硅胶板薄层层析,合并迁移率相同的洗脱组分,经旋转蒸发和冷冻干燥后备用。

1.5 水溶性海星皂苷各纯化组分的抗真菌活性测定

水溶性海星皂苷纯化组分抑菌环直径的测定方法同 1.3。硅胶柱纯化样品的最低抑菌浓度(MIC)的测定参照丛日山等(2007)琼脂稀释法^[5]。

1.6 水溶性海星皂苷纯化样品的纯度鉴定

称取水溶性海星皂苷纯化样品的冻干品 0.4 mg,用去离子水配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液,取 20 μL 溶液上样于 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 0.5 μm) HPLC 柱,在 25 ℃ 用流动相($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=36:100$)进行洗脱(流速为 1 mL/min),检测 203 nm 的光吸收,根据高压液相色谱确定被测组分的纯度。

1.7 数据处理

全部数据均使用“平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,各实验组间的数据比对均采用 Excel 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 大孔树脂各洗脱组分抗真菌活性

利用管碟法对使用 30%、50%、70%、80%、95% 乙醇洗脱的组分进行了抗真菌活性研究,各洗脱组分对裂殖酵母菌和白色念珠菌的抑制情况如图 1 所示,抑菌环大小测定及其 MIC 值如表 1 所示。结果表明,质量浓度为 0.5 mg/mL 的各洗脱组分对裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)均有一定抑制作用,但抑制程度不尽相同。其中,30% 的洗脱组分有较弱抗真菌活性;50%、80% 和 95% 的洗脱组分均具有较强的抗真菌活性;70% 的洗脱组分的抗真菌活性最强。

2.2 70% 乙醇洗脱组分硅胶柱层析

将具有显著抗真菌活性的 70% 乙醇洗脱组分进行硅胶柱层析,对各硅胶柱洗脱组分进行硅胶板薄层层析检测,结果如图 2 显示:第 9~10 号洗脱组

分均为迁移率 0.76 ± 0.01 的单一斑点,合并收集为 SF-1 纯化样品;第 17~18 号洗脱组均为迁移率 0.57 ± 0.01 的单一斑点,合并收集为 SF-2 纯化样品;第 25~26 号洗脱组均为迁移率 0.40 ± 0.01 的单一斑点,合并收集为 SF-3 纯化样品;第 34~35 号洗脱组均为 0.32 ± 0.01 的单一斑点,合并收集为 SF-4 纯化样品。对四种纯化样品分别进行旋转蒸发和冷冻干燥后,冷冻保存备用。

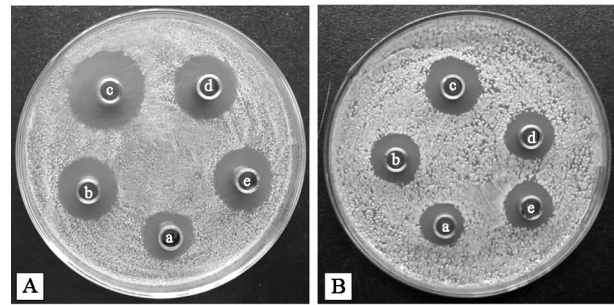


图 1 各种大孔树脂柱洗脱组分的抗真菌活性
A. 裂殖酵母菌; B. 白色酵母菌. a. 30% 乙醇溶液洗脱组分; b. 50% 乙醇溶液洗脱组分; c. 70% 乙醇溶液洗脱组分; d. 80% 乙醇溶液洗脱组分; e. 95% 乙醇溶液洗脱组分;各洗脱组分的使用质量浓度均为 0.5 mg/mL.

Fig. 1 Antifungal activities of different ethanol fractions from macroporous resin column

A. *Schizosaccharomyces pombe*; B. *Candida albicans*.
a. 30% ethanol fraction; b. 50% ethanol fraction; c. 70% ethanol fraction; d. 80% ethanol fraction; e. 95% ethanol fraction;
The concentration of each ethanol fraction used is 0.5 mg/mL.

表 1 各种大孔树脂柱洗脱组分对裂殖酵母菌和白色念珠菌的抑菌环大小 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Sizes of antifungal circles of different ethanol fractions from macroporous resin column towards *S. pombe* and *C. albicans* ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

大孔树脂洗脱组分	抑菌环直径/mm	
	裂殖酵母菌 (<i>S. pombe</i>)	白色念珠菌 (<i>C. albicans</i>)
30% 乙醇洗脱组分	17.14 ± 0.51	14.85 ± 0.15
50% 乙醇洗脱组分	19.36 ± 1.02	16.30 ± 0.64
70% 乙醇洗脱组分	24.03 ± 0.87	18.77 ± 0.98
80% 乙醇洗脱组分	20.75 ± 0.41	16.01 ± 1.17
95% 乙醇洗脱组分	20.58 ± 0.97	15.95 ± 1.12

注:各大孔树脂柱洗脱组分的使用质量浓度均为 0.5 mg/mL。

2.3 硅胶柱层析纯化样品的抗真菌活性鉴定

质量浓度为 0.5 mg/mL 的 SF-1、SF-2、SF-3 和 SF-4 纯化样品对裂殖酵母菌和白色念珠菌的抑菌环大小如图 3 所示,抑菌环大小测定及其 MIC 值如表 2 所示。在质量浓度为 0.5 mg/mL 的 4 种硅胶柱纯化样品中, SF-1 纯化样品没有抗真菌活性, SF-2 纯化样品具有极弱的抗真菌活性, SF-3 和 SF-4 纯化样品均具有很强的抗真菌活性。其中, SF-3 和 SF-4

纯化样品的抗真菌活性大于 SF-2 纯化样品 ($P < 0.01$), 而 SF-3 与 SF-4 纯化样品的抗真菌活性没有显著差异 ($P > 0.5$)。

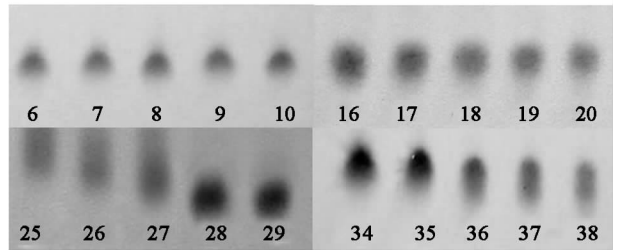


图 2 各种硅胶柱洗脱组分的薄层层析图谱
各硅胶柱洗脱组分的序号如薄层层析斑点下方的数字所示。第 9~10、17~18、25~26 和 34~35 号组分均为单一斑点。第 9~10 号组分的迁移率均为 0.76 ± 0.01 , 合并为 SF-1; 第 17~18 号组分的迁移率均为 0.57 ± 0.01 , 合并为 SF-2; 第 25~26 号的迁移率均为 0.40 ± 0.01 , 合并为 SF-3; 第 34~35 号组分的迁移率均为 0.32 ± 0.01 , 合并为 SF-4.

Fig. 2 Thin layer chromatogram of different fractions of silica gel column

The number of each fraction from silica gel column indicated at the bottom of each spot of thin layer chromatography. Fractions 9-10, 17-18, 25-26, and 34-35 are all with a single spot. The mobility of fractions 9-10 is 0.76 ± 0.01 , and which were pooled together named as SF-1. The mobility of fraction 17-18 is 0.57 ± 0.01 , and which were pooled together named as SF-2. The mobility of fractions 25-26 is 0.40 ± 0.01 , and which were pooled together named as SF-3. The mobility of fractions 34-35 is 0.32 ± 0.01 , and which were pooled together named as SF-4.

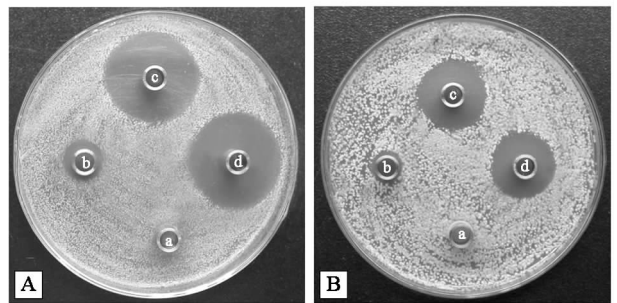


图 3 各种硅胶柱纯化样品的抗真菌活性
A. 裂殖酵母菌; B. 白色酵母菌. a. SF-1 纯化样品; b. SF-2 纯化样品; c. SF-3 纯化样品; d. SF-4 纯化样品.

Fig. 3 Antifungal activities of different ethanol fractions from silica gel column

A. *S. pombe*; B. *C. albicans*. a. the pooled fraction of SF-1; b. the pooled fraction of SF-2; c. the pooled fraction of SF-3; d. the pooled fraction of SF-4.

2.4 水溶性海星皂苷纯化样品 SF-3 的高压液相 (HPLC) 柱层析鉴定

将 $20 \mu\text{L}$ 0.5 mg/mL 的 SF-3 纯化样品水溶液上样于 HPLC 层析柱,各洗脱组分 ($V_{\text{乙醇}} : V_{\text{水}} = 36 : 100$) 的高压液相色谱图见图 4。SF-3 纯化样品在色谱图中仅仅显示为单一洗脱峰,面积归一化程度高达 98% 以上。SF-3 纯化样品在旋转蒸发后有结晶析出,说明水溶性海星皂苷纯化样品 SF-3 的纯度很高。

表2 各种硅胶柱纯化样品对裂殖酵母和白色念珠菌的抑菌环大小及其最低抑菌质量浓度(MIC)($n=3, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Sizes of antifungal circles of different purified fractions from silica gel column and their minimum inhibitory concentrations towards *S. pombe* and *C. albicans* ($n=3, \bar{x} \pm s$)

纯化组分	裂殖酵母菌(<i>S. pombe</i>)		白色念珠菌(<i>C. albicans</i>)	
	抑菌环直径/mm	MIC 值/($\mu\text{g/mL}$)	抑菌环直径/mm	MIC 值/($\mu\text{g/mL}$)
SF-1	—	—	—	—
SF-2	12.59 \pm 0.87	1.00	10.57 \pm 0.91	35.00
SF-3	26.77 \pm 1.20	0.25	20.92 \pm 1.25	10.00
SF-4	26.83 \pm 1.25	0.25	20.85 \pm 1.74	10.00

注:SF-1~4均为在薄层层析中迁移率相同且呈单一斑点的硅胶柱洗脱组分,各洗脱组分的使用质量浓度均为0.5 mg/mL。“—”示无抑菌环形成。

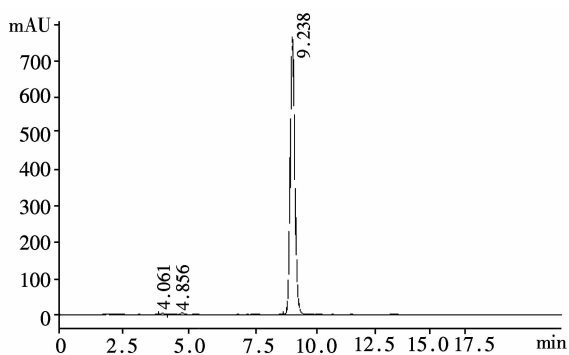


图4 水溶性海星皂苷纯化样品 SF-3 的高压液相色谱图
Fig.4 The HPLC chromatogram of SF-3 pooled fractions of water-soluble starfish glycoside

3 讨论

近年来,临床上器官移植、深部外科手术、血液透析与肠外营养手段的广泛应用,致使真菌病的发病率明显升高,广谱抗菌药、免疫抑制剂、放化疗药物的使用也越来越频繁^[7]。目前使用抗真菌药物并结合其它治疗措施,能在一定程度上控制某些真菌的感染;然而,随着抗真菌药物的过量滥用,各种真菌对抗真菌药物的抗药性也在逐渐提高,且目前临床上使用的各种合成抗真菌药物均对人体有一定的毒副作用。在这种情况下,从自然界生物中提取的天然抗真菌药物,以其特效低毒的优点越来越受到人们的青睐,也成为各国学者争相研究的目标。

海星皂苷不但具有抗癌、抗菌及抗炎活性,而且还具有持续降压等多种作用,是可开发为海洋药物的一种重要活性物质,应用前景十分广阔^[8]。日本学者 Hashimoto 和 Yasumoto 最早发现海星的水提取物中存在皂苷,并对其结构和物理化学性质进行了测定^[9]。学者们先后从海星纲 10 余种动物中分离出的皂苷样品具有抗菌活性^[10],并对其理化性质,溶血试验、紫外光谱和红外光谱进行了测定^[11]。目前,对海星皂苷的分离纯化主要采用甲醇等有机溶

剂提取,利用反相硅胶柱层析和反相 HPLC 获得各个组分^[12-13],这种海星皂苷的提取方法不仅操作步骤繁琐,而且所制备的皂苷单体化合物往往水溶性较差,在实践应用时常需要添加 DMSO 等有机促溶剂促进溶解,有机促溶剂的添加在一定程度上限制了这在一定程度上限制了其在临床医学和工农业生产等领域的应用途径和范围^[5]。由于海星皂苷的相对分子质量大,结构非常类似,多种海星皂苷及多羟基甾体皂苷常常混合存在,因此分离纯化的难度较大^[1]。至今国内外仍没有水溶性海星皂苷的分离纯化及其抗真菌活性的研究报道。

为了解决这一问题,我们首次建立了利用罗氏海盘车(*Asterias rollestoni*)腕的水抽提液、采用 60℃ 水浴的方法分离制备水溶性海星皂苷的方法,并先后利用大孔树脂柱层析和硅胶柱层析对水溶性海星皂苷进行了进一步纯化,获得了具有显著抗真菌活性、成分单一的水溶性海星皂苷,纯度为 98% 以上。

对罗氏海盘车腕进行水抽提的方法,一方面可以从海星中提取到更多的水溶性海星皂苷,另一方面可以保证海星皂苷中连接在苷元上的糖链不因温度过高而发生断裂,从而最大限度地保持了海星皂苷的生物活性。此外,由于皂苷在酸性条件下极易水解只有在碱性条件下才相对稳定,因此我们将水提液的 pH 值调为 10,以减少水溶性海星皂苷的水解。该技术方法已被袁文鹏等(2007)证实是切实有效的^[5]。

本文采用浓度梯度乙醇洗脱的方法从罗氏海盘车腕水抽提液中分离出了多种水溶性海星皂苷组分,发现在 30%~95% 乙醇溶液的大孔树脂柱层析洗脱组分中,70% 乙醇溶液洗脱组分对白色念珠菌和裂殖酵母菌的抗真菌活性最强。为了获得具有高抗真菌活性的水溶性海星皂苷单体组分,本文又利用硅胶柱层析对所得到的 70% 乙醇洗脱组分进行了进一步纯化。由于在硅胶柱层析中展层剂的选择合适与否直接关系到纯化操作的成败,本文还探索

了不同配比的正丁醇-异戊醇-水、正丁醇-乙醇-水、正丁醇-乙酸-水以及正丁醇-乙酸乙酯-水等不同展层剂对水溶性海星皂苷的分离条件,发现正丁醇-乙酸乙酯-水($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{水}}=4:1:5$)对海星皂苷的分离效果最好,并选用此展层剂对海星皂苷进行了硅胶柱层析纯化。通过硅胶柱层析最终获得了在硅胶板薄层层析中迁移率相同且仅为单一斑点的四种纯化样品——SF-1、SF-2、SF-3和SF-4,发现SF-3和SF-4纯化样品的抗真菌活性最强。该研究结果与袁文鹏等(2007)的研究报道是一致的^[5]。

为了确定纯化样品的纯度,本文还对SF-3纯化样品进行了HPLC柱层析,层析结果发现SF-3纯化样品在HPLC洗脱组分的色谱图中仅出现单一洗脱峰,面积归一化程度达98%以上,且SF-3纯化样品在旋转蒸发后有结晶析出,从而证明水溶性海星皂苷纯化样品SF-3的纯度很高,已为单体组分,可用于新型抗真菌药物的研制。

本文从罗氏海盘车腕水抽提液中分离制备出水溶性海星皂苷粗品,纯化并筛选出水溶性极强且具有高抗真菌活性的水溶性海星皂苷纯品,为研制新型高效海洋抗真菌药物奠定了基础。目前,正在进行SF-3单体组分抗真菌活性的广谱性以及体内外抗肿瘤活性的研究。

参考文献:

- [1] 汤海峰, 易杨华, 张淑瑜, 等. 海星皂苷的研究进展[J]. 中国海洋药物杂志, 2004, 23(12):48-57.
- [2] YANG S W, CHAN T M, BUEVICH A, et al. Novel steroidal saponins, Sch 725737 and Sch 725739, from a marine starfish, *Novodinia antillensis* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17: 5543-5547.
- [3] GIL J H, JUNG J H, KIM K J, et al. Structural determination of saponins extracted from starfish by fast atom bombardment collision-induced dissociation mass spectrometry [J]. Anal Sci, 2006, 22(4):641-644.
- [4] 文震, 党志, 宗敏华, 等. 超临界 CO₂ 萃取海星皂甙[J]. 精细化工, 2006, 23(7):657-660.
- [5] 袁文鹏, 丛日山, 杨秀霞, 等. 水溶性海参皂苷的分离纯化及其抗真菌活性研究[J]. 山东大学学报, 2007, 42(5): 69-73.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录 80.
- [7] 蒋庆锋, 周有骏, 盛春泉, 等. 作用于真菌细胞壁的抗真菌药物的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(6): 410.
- [8] 巴斯洛 M H. 海洋药物学[M]. 林秦禧, 译. 北京: 海洋出版社, 1985: 232-259.
- [9] HASHIMOTO Y, YASUMOTO T. Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish [J]. Bull Jap Soc Fish, 1960, 26(11):1132-1137.
- [10] GOLDSMITH L A, CARLON G P. In food-drugs from the sea proceeding [M]. Washington DC: Marine Technology Soc Publishing House, 1976:183-195.
- [11] 郭承华, 曹建国, 宁黔冀. 罗氏海盘车, 海燕、金氏真蛇尾鼠皂甙的制备及性质比较[J]. 中国海洋药物, 2000, 22(4):28.
- [12] GIL J H, JUNG J H, KIM K J, et al. Structural determination of saponins extracted from starfish by fast atom bombardment collision-induced dissociation mass spectrometry [J]. Anal Sci, 2006, 22(4):641-644.
- [13] WANG W, LI F, HONG J, et al. Four new saponins from the starfish *Certonardoa semiregularis* [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(4):435-439.

(编辑:于善清)