

圆滑番荔枝叶乙醇提取物中抑菌活性成分的初步分离

苟亚峰, 高圣凤, 孙世伟, 桑利伟, 刘爱勤*

(中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 万宁 571533)

摘要 采用活性跟踪法对圆滑番荔枝叶乙醇提取物中抑菌活性成分进行了初步分离。结果表明:圆滑番荔枝叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取组分对胡椒瘟病菌的抑制活性最高,从该萃取组分中分离得到化合物松香酸和 β -谷甾醇,并测定了其对于胡椒瘟病菌的抑菌活性。当两种化合物供试浓度为 0.6 mg/mL 时抑菌率分别达到了 69.21% 和 61.78%,对胡椒瘟病菌具有一定抑菌效果。

关键词 圆滑番荔枝叶; 萃取组分; 胡椒瘟病菌; 抑菌活性

中图分类号: S 435 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.01.024

Primary isolation of the components with antifungal activity from ethanol extracts of *Annona glabra* leaves

Gou Yafeng, Gao Shengfeng, Sun Shiwei, Sang Liwei, Liu Aiqin

(Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning 571533, China)

Abstract By using bioassay-guided method, the components with antifungal activity were isolated from the ethanol extracts of *Annona glabra* leaves. The results showed that ethyl acetate extraction of *Annona glabra* leaf ethanol extract had the strongest inhibitory effect on *Phytophthora capsici*, and two compounds (abietic acid and β -sitosterol) were isolated from ethyl acetate extraction. The antifungal activity of the two compounds was tested. When abietic acid and β -sitosterol concentration was 0.6 mg/mL, the inhibition rate against *Phytophthora capsici* reached to 69.21% and 61.78%, respectively.

Key words *Annona glabra* leaf; extract component; *Phytophthora capsici*; antifungal activity

圆滑番荔枝 (*Annona glabra* Linn.) 是番荔枝科 (Annonaceae) 番荔枝属 (*Annona*) 植物^[1], 我国南方诸省均有栽培。番荔枝科植物具有抗病毒、杀虫、抗癌等多种生理活性。杨世林等^[2]对番荔枝科植物化学成分及其抗肿瘤活性进行了研究, 结果表明该科植物所含的番荔枝素、多氧环己烯和苯乙烯内酯是主要的抗肿瘤活性成分。田丽娟等^[3]、常世忠等^[4]对圆滑番荔枝的化学成分进行了分析, 分离得到贝壳杉烷型二萜和生物碱等化合物, 发现其具有较强的抑制肿瘤的生理活性。姜盼等^[5]综述了圆滑番荔枝的化学成分及生物活性研究进展, 为进一步开发其药用价值奠定了基础。苟亚峰等^[6-7]研究报道了圆滑番荔枝乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物对胡椒瘟病菌菌丝生长具有较好的抑制作用。因此, 本试验以胡椒瘟病菌为供试病原菌, 采用活性追踪法^[8]分离圆滑番

荔枝叶乙醇提取物中抑菌活性成分, 为进一步研制防治胡椒瘟病的植物源杀菌剂提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试植物和供试病原菌

圆滑番荔枝叶采自中国热带农业科学院香料饮料研究所院内。将新鲜的圆滑番荔枝叶充分阴干, 磨碎过 40 目筛后置通风、避光处储藏备用。

胡椒瘟病菌 (*Phytophthora capsici*) 由中国热带农业科学院香料饮料研究所病虫害防控研究室提供。

1.2 圆滑番荔枝叶乙醇提取物制备

采用冷浸法: 准确称取 3 kg 的圆滑番荔枝叶干粉装入广口瓶中, 加入干粉 5 倍量的乙醇浸提 48 h, 过滤, 依次重复 3 次, 合并 3 次滤液并减压浓缩, 得圆滑番荔枝叶乙醇提取物浸膏 514.50 g, 放置 4℃ 冰箱内备用。

1.3 抑菌活性成分分离纯化

准确称取圆滑番荔枝叶乙醇提取物浸膏,用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯不同溶剂萃取,通过抑菌活性测定筛选出抑菌活性较高的萃取段进行抑菌活性成分分

离纯化。将大孔树脂湿法装柱,用适量的溶剂溶解萃取段,上样,用二氯甲烷:乙醇系统梯度洗脱,等量接馏分(每瓶大约 200 mL)。结合薄层色谱技术合并相同馏分,减压浓缩,上 GC-MS 分析(具体分离流程如图 1)。

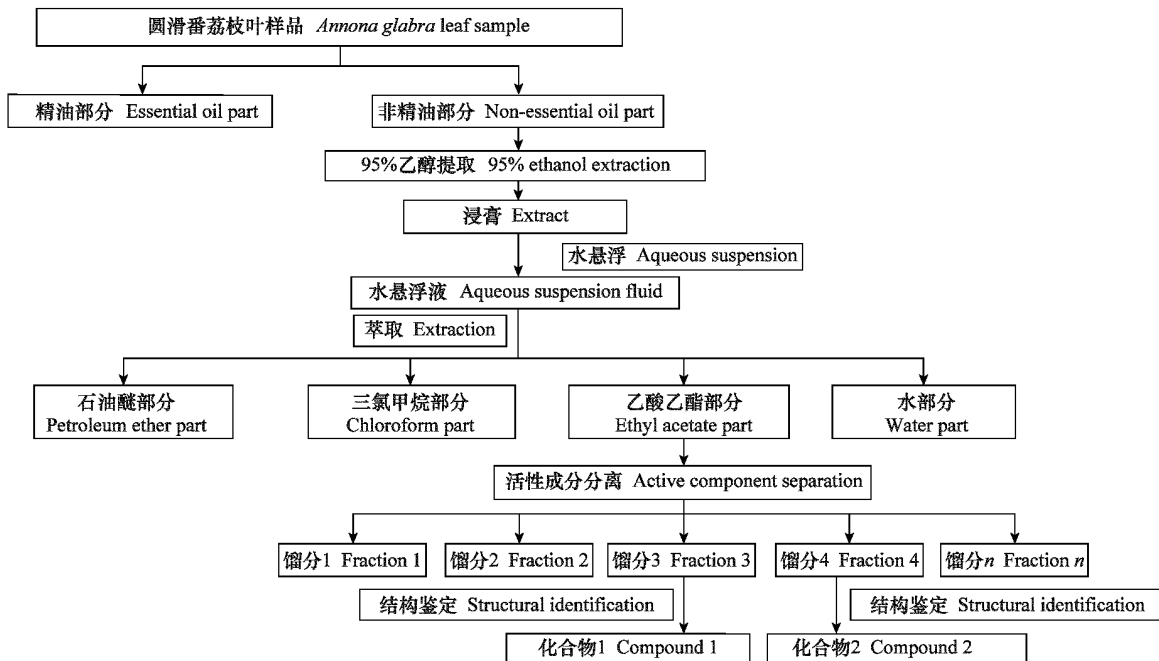


图 1 圆滑番荔枝抑菌活性成分分离纯化流程图

Fig. 1 Flowchart of separation and purification of the components with antifungal activity from *Annona glabra* leaves

1.4 抑菌活性测定

采用菌丝生长速率法测定圆滑番荔枝叶乙醇提取物不同溶剂萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性:准确称取供试化合物,先用溶剂助溶,再用无菌蒸馏水定容,制成母液。采用倍半稀释法用无菌蒸馏水依次稀释成供试浓度。将培养基熔化并冷却至 50°C 左右,把 1 mL 不同浓度的供试化合物分别与 9 mL/皿的 PDA 培养基混匀,待其凝固后,取菌落直径为 5 mm 的胡椒瘟病菌的外层菌块放置于培养皿中央,以加入等体积萃取溶剂的 PDA 培养平板为对照,每个处理做 3 个皿重复。接种后,在人工气候培养箱内, $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d,采用十字交叉法分别测量菌落直径,求其平均值,按下式计算抑菌率。

菌落直径(cm) = 测量菌落直径平均值 - 0.5;

抑菌率(%) = $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 圆滑番荔枝叶乙醇提取物的不同溶剂萃取物抑菌活性测定

按照 1.4 的方法测定不同萃取组分的抑菌活性,结果见图 2。

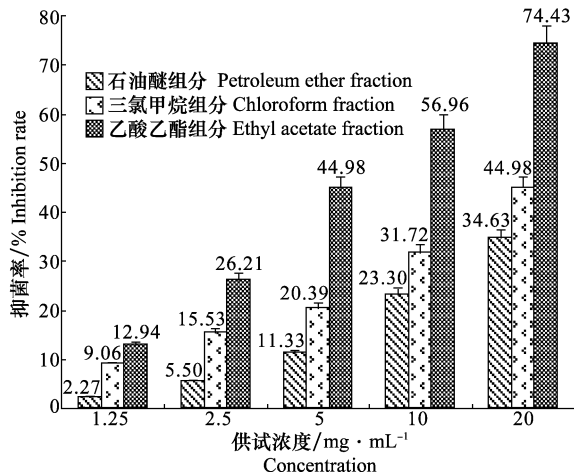


图 2 不同萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性测定结果

Fig. 2 Antifungal activity of different extracts to *Phytophthora capsici*

从图 2 中可以看出,在供试浓度下乙酸乙酯萃取组分的抑菌活性均高于石油醚和三氯甲烷萃取组分。当供试浓度为 10 mg/mL 时,只有乙酸乙酯萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌率达到了 50% 以上,其他两种溶剂萃取组分抑菌率均低于 50%。当供试浓度为 20 mg/mL 时,乙酸乙酯、三氯甲烷、石油醚

萃取组分的抑菌率分别为 74.43%、44.98% 和 34.63%。由此可见乙酸乙酯萃取组分中含有抑制胡椒瘟病菌的活性成分,可作为下一步抑菌活性成分分离的萃取组分。

2.2 GC-MS 检测

按照 1.3 的流程对乙酸乙酯萃取组分进行抑菌活性化合物分离,通过 GC-MS 检测,观察各馏分的

谱图,并与标准谱库对比,得化合物 1 和 2。

化合物 1 的 GC-MS 检测质谱信息(图 3)与标准谱库中松香酸数据一致,故鉴定化合物 1 为三环二萜类化合物松香酸(化学式为 $C_{20}H_{30}O_2$)。

化合物 2 的 GC-MS 检测质谱信息(图 4)与标准谱库中 β -谷甾醇数据一致,故鉴定化合物 2 为甾醇类化合物 β -谷甾醇(化学式为 $C_{29}H_{50}O$)。

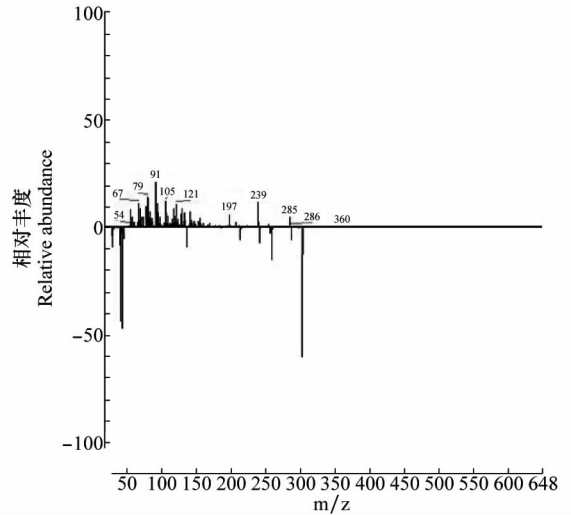
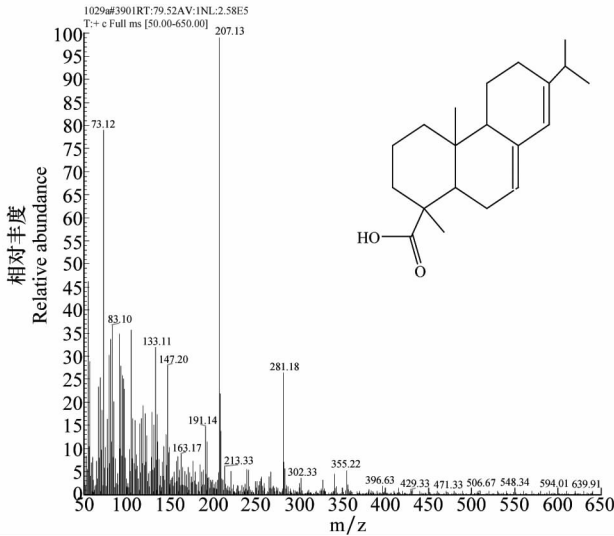


图 3 化合物 1 质谱图谱及与标准图谱对照图

Fig. 3 MS of compound one and standard control

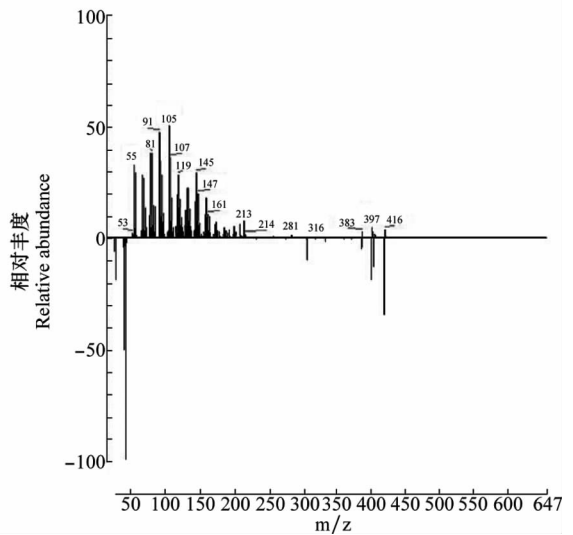
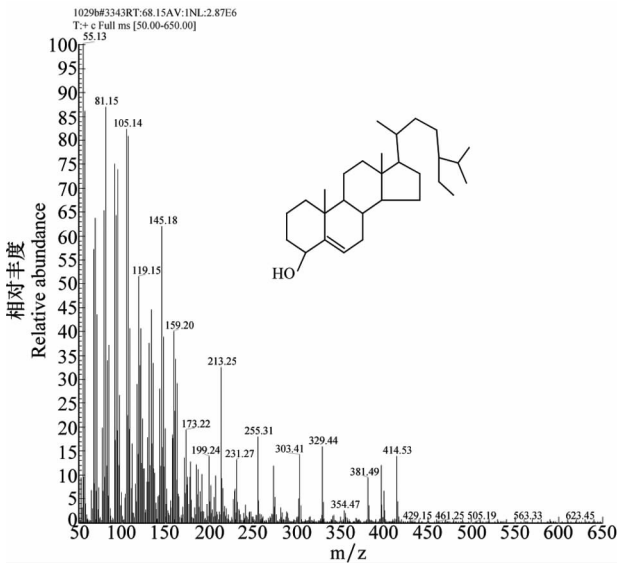


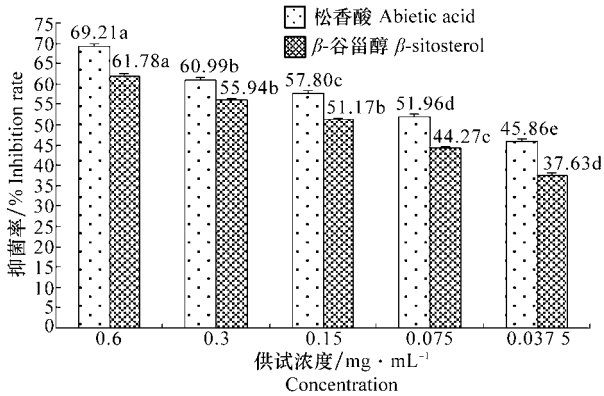
图 4 化合物 2 质谱图谱及与标准图谱对照图

Fig. 4 MS of compound two and standard control

2.3 松香酸和 β -谷甾醇对胡椒瘟病菌抑菌活性测定

分别用倍半稀释法将化合物松香酸和 β -谷甾醇(上海

迈瑞尔化学技术有限公司,纯度大于 75%)配成 5 个梯度浓度(0.6、0.3、0.15、0.075、0.037 5 mg/mL),按照 1.4 的方法测定其对胡椒瘟病菌的抑菌活性,测定结果见图 5。



图中数据均为3次重复的平均值, 相同处理下不同浓度柱子上标有不同小写字母表示经LSD多重比较在0.05水平上差异显著
Data in the figure are the means of three replicates; different letters on bars of same treatment indicate significant difference at 0.05 level by LSD's multiple comparison

图5 松香酸和 β -谷甾醇对胡椒瘟病菌抑菌活性测定结果
Fig. 5 Antifungal activity of abietic acid and β -sitosterol to *Phytophthora capsici*

从图5中可以看出, 在供试浓度下松香酸对胡椒瘟病菌的抑菌活性均高于 β -谷甾醇, 当供试浓度为0.6 mg/mL时, 松香酸和 β -谷甾醇对胡椒瘟病菌的抑菌率分别达到了69.21%和61.78%, 对胡椒瘟病菌具有一定的抑菌活性。

3 结论与讨论

从本试验中可以得出, 圆滑番荔枝叶乙醇提取物的乙酸乙酯萃取组分中含有对胡椒瘟病菌有较高抑菌活性的化合物。当供试浓度为20 mg/mL时, 乙酸乙酯萃取组分抑菌率达到了74.43%, 高于石油醚和三氯甲烷萃取组分的抑菌活性。进一步对乙酸乙酯萃取组分中抑菌活性成分分离, 得到松香酸和 β -谷甾醇, 当供试浓度为0.6 mg/mL时, 二者对胡椒瘟病

菌的抑菌率分别达到了69.21%和61.78%, 均对胡椒瘟病菌具有一定的抑菌活性, 其中松香酸的抑菌活性略高于 β -谷甾醇。

有研究报道番荔枝科植物含有生物碱、萜类、黄酮、番荔枝素、多氧环己烯和苯乙烯内酯等成分, 这些成分具有驱虫、抗病毒、杀虫、抗癌等多种生理活性^[9-10]。因此, 圆滑番荔枝叶乙醇提取物乙酸乙酯萃取组分中的高抑菌活性成分有待进一步分离, 此项研究对胡椒安全生产及产业的发展具有一定意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 170.
- [2] 杨世林, 余竟光, 徐丽珍. 番荔枝科植物化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(4): 376-382.
- [3] 田丽娟, 韩英, 孟正木, 等. 圆滑番荔枝的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 10-12.
- [4] 常世忠, 张笑松, 方薇. 圆滑番荔枝的化学成分研究[J]. 安徽医药, 2002, 6(1): 14-15.
- [5] 姜盼, 陈锴, 程宝奇, 等. 圆滑番荔枝的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2564-2570.
- [6] 苟亚峰, 刘爱勤, 孙世伟, 等. 23种植物提取物对胡椒瘟病原菌的抑制作用[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 128-131.
- [7] 苟亚峰, 孙世伟, 高圣风, 等. 圆滑番荔枝叶乙醇提取物不同萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性测定[J]. 热带农业科学, 2014, 34(4): 1-3.
- [8] 杨震发, 袁呈山, 杨顺义. 黄花棘豆抑制植物病原菌的活性成分研究[J]. 植物保护, 2014, 40(6): 59-64.
- [9] 李艳芳, 符立梧. 番荔枝内酯抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 245-247.
- [10] 朱峰, 刘晓红, 丁健华, 等. 番荔枝活性化学成分研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2007, 20(4): 62-70.

(责任编辑: 杨明丽)