

引用本文:邵玲莉,钱思,施晓秦,等.无患子皂苷的提取及抑菌性研究[J].安徽医药,2021,25(10):1943-1945.

DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.008.

◇ 药物分析 ◇



无患子皂苷的提取及抑菌性研究

邵玲莉,钱思,施晓秦,严兰琴

作者单位:金华职业技术学院制药学院,浙江 金华 321007

基金项目:2018年浙江省大学生科技创新项目(2018R471009)

摘要: 目的 优化无患子皂苷的提取工艺,并测定提取物的抑菌活性。方法 本研究起止时间为2018年3月至2019年3月。以乙醇为提取剂,采用超声波辅助法,通过正交试验对无患子皂苷的提取工艺进行研究;采用滤纸片扩散法测定提取物对细菌和真菌的抑制效果。结果 无患子皂苷的最佳提取工艺是以70%的乙醇为提取溶剂,料液比为1:5,超声提取60 min,共提取3次;无患子皂苷提取物对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌等细菌的抑菌效果不明显,但可以显著抑菌真菌的生长,对青霉菌、白色念珠菌和黑曲霉的最小抑菌浓度分别为0.05 g/mL、0.11 g/mL和0.44 g/mL(生药材/提取液)。结论 无患子皂苷的超声辅助提取法工艺稳定,提取物得率高,且对真菌抑菌效果显著,有很好的开发价值。

关键词: 无患子属; 中草药; 工艺学,制药; 无患子皂苷; 超声辅助提取; 正交试验; 抑菌活性

Extraction and antimicrobial activities of saponins from sapindus mukorossi

SHAO Lingli, QIAN Si, SHI Xiaoqin, YAN Lanqin

Author Affiliation: College of pharmacy, Jinhua Polytechnic, Jinhua, Zhejiang 321007, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process and to determine the antibacterial activity of saponins from sapindus mukorossi. **Methods** The study started in March 2018 and ended in March 2019. With ethanol as extracting agent, the ultrasonic-assisted extraction process of saponins was studied through orthogonal experiment and the inhibitory effects of these extracts on bacteria and fungi were measured by disk-diffusion method. **Results** The optimal extraction condition were: 70% of ethanol concentration, 1:5 of material-liquid ratio, 60 minutes of extraction time with 3 times of extraction cycles. The Sapindus-saponins extracts had no inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. However, they had significant antifungal activities against 3 kinds of strain. The minimal inhibitory concentrations against *Penicillium glaucum*, *Monilia albicans* and *Aspergillus niger* were 0.05, 0.11 and 0.44 g/mL (natural plants / extracting solutions), respectively. **Conclusions** The ultrasonic-assisted extraction process is stable and of high efficiency. Sapindus-saponins extracts show obvious antibacterial activity against fungi and have a great value of development.

Key words: Sapindus; Drugs, Chinese herbal; Technology, pharmaceutical; Sapindus-saponins; Ultrasonic-assisted extraction; Orthogonal test; Antibacterial activity

无患子(*Sapindus mukorossi*),又名木患子、肥皂树,是南方常见的行道树和庭院树^[1-2]。据《本草纲目》记载,无患子果皮具有清热祛痰,消积杀虫、洗面祛斑等作用,中医上可用于咳喘、食滞、白带、疳积、疮癣、肿毒等的治疗^[3]。现代研究表明,无患子果皮中主要的活性成分为无患子皂苷,它是一种天然的表面活性剂,具有良好的去污性、起泡性和杀菌抑菌、去屑止痒、抗炎、抗病毒、抗氧化以及对污染土壤的修复性等特殊的生物活性^[4-11],因此在医药、日化以及环境领域的价值倍受重视,具有很大的开发潜力和广阔的市场前景。

无患子皂苷的提取研究较多,传统方法主要包括水提法和有机溶剂提取法。张永忠等^[12]对无患子总皂苷进行超声提取工艺条件优化,其提取率为

3.14%,马丽珍^[13]采用水提醇沉法研究了无患子皂苷的提取工艺,无患子皂苷提取率为3.65%,黄素梅等^[14]优化后的无患子皂苷的提取条件是样品与乙醇比例为1:9(质量体积比)时,在60℃下提取3次,每次3 h,所得皂苷产率为9.32%,郑林禄等^[15]采用复合酶法探究了无患子皂苷的最佳工艺条件,欧霖拱^[16]利用大孔树脂吸附法对无患子皂苷进行了分离纯化,无患子皂苷纯度达到90.27%。以上研究取得了一定的效果,但是也存在提取率低、溶剂损失大、或者成本高等局限性。相比传统的提取方法,超声波提取法因操作简单、提取速度快、提取得率高等特点,在天然植物有效成分的提取方面表现出很大的应用潜力及良好的发展前景^[17]。本研究以乙醇为溶剂,采用超声波辅助法提取无患子果皮中

的总皂苷。在前期单因素试验基础上选取料液比、乙醇体积分数、超声时间和提取次数四个主要影响因素,通过正交试验优化无患子皂苷的提取条件,并对提取液进行抑菌试验研究,以期在无患子皂苷的进一步开发利用提供借鉴和参考。本研究起止时间为2018年3月至2019年3月,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料:无患子果皮,购自金华九德堂大药房。

供试菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、青霉菌(*Penicillium glaucum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、白色念珠菌(*Candida tropicalis*),均由金华职业技术学院医学院提供。

试剂:齐墩果酸标准品(上海一基实业有限公司,批号20180505);无水乙醇,甲醇,香草醛,冰醋酸,浓硫酸。牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、葡萄糖等试剂均购自金华东南化工仪器有限公司,土豆购自金华农贸市场。

仪器:JY99-II型超声提取装置(宁波新芝生物科技股份有限公司);电子精密天平(宁波海曙天宏称重设备有限公司)、752紫外可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、旋转蒸发器RE-52A(上海亚荣生化仪器厂)、J02005型手摇木塞打孔机(浙江上虞医疗器械厂)、HH-6型数显恒温水浴(常州天瑞仪器有限公司);SW-CJ-IF超净工作台(苏州净化设备有限公司);SHP-150生化培养箱(上海森信实验仪器有限公司);震荡培养箱(常州国华电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 无患子总皂苷的提取方法 准确称取10.00 g无患子果皮碎末,置锥形瓶中,加入一定量的提取溶剂,摇匀,采用L9(3⁴)正交试验^[18-19],利用超声波辅助法进行提取优化。

1.2.2 总皂苷含量测定方法采用比色法^[13] 标准曲线的制备:精密称取齐墩果酸标准品10.00 mg,置于烧杯中,用甲醇溶解并定容至10 mL的容量瓶中,摇匀,得1 mg/mL的标准品溶液。分别取0、50、100、150、200、250 μL标准溶液于六支比色管中,挥干溶剂后加入5%香草醛冰醋酸溶液0.3 mL(现配现用)、70%硫酸溶液4.5 mL,混匀,60℃下放置20 min显色,之后立即用流水冷却,加2 mL冰醋酸稀释混匀,以空白溶液作为对照,测553 nm处的吸光度,重复3次。计算回归方程为 $y=555.23x-79.201$ ($R^2=0.9994$),线性范围50~250 μg/mL,线性关系良好。

样品总皂苷的含量测定及提取得率计算:将1.2.1项下所得提取液适当稀释,取0.5 mL溶液于试管中挥干试剂后按上述标准曲线所示方法进行操作,所得吸光度值代入上述回归方程,按下式计算样品在不同提取条件下的皂苷提取率。皂苷提取得率(%)=[皂苷质量(g)/无患子果皮质量(g)]×100%。

1.2.3 抑菌活性测定方法 采用滤纸片扩散法,所用滤纸片直径为6 mm。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、氯化钠5 g、琼脂15~20 g、加水至1 000 mL。

土豆培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15~20 g、加水至1 000 mL。

供试菌种菌悬液的制备:(1)金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌菌悬液的配制。从4℃的冰箱中取出供试菌种,接种于新鲜液体培养基,在37℃下恒温培养24 h活化(白色念珠菌在28℃下恒温培养48 h活化),用移液枪吸取1.0 mL菌原液于9.0 mL无菌水中,得到稀释10倍的菌悬液,依次操作,直至稀释度为10⁻³,备用。(2)青霉菌、黑曲霉菌悬液的配制。取活化好的黑曲霉菌和青霉菌,用一定量无菌水冲洗孢子,利用比浊法制成110 cfu/mL菌悬液,4℃备用。

2 结果与分析

2.1 无患子总皂苷提取正交试验 按下表的因素与水平,对无患子皂苷进行提取优化。所得提取液过滤后适当稀释,测吸光度,计算皂苷提取量。见表1。

极差分析表明,各因素的影响主次顺序为D>B>A>C,根据K值的大小可知,因素的最佳水平为

表1 正交试验因素、水平及结果

试验号	A 固液比/(g/V)	B 溶剂浓度/%	C 超声时间/min	D 次数	吸光度	提取量/g
1	1:5	60	45	1	0.248	0.731
2	1:5	70	60	2	0.679	2.383
3	1:5	80	75	3	0.410	1.781
4	1:10	60	60	3	0.249	1.416
5	1:10	70	75	1	0.387	1.085
6	1:10	80	45	2	0.277	1.193
7	1:15	60	75	2	0.251	1.443
8	1:15	70	45	3	0.269	2.524
9	1:15	80	60	1	0.300	1.048
k ₁	1.632	1.197	1.483	0.955		
k ₂	1.231	1.997	1.616	1.673		
k ₃	1.672	1.341	1.437	1.907		
R	0.441	0.800	0.179	0.952		

注:k₁为各因素取水平1的三次试验的提取量之和的平均值,k₂为各因素取水平2的三次试验的提取量之和的平均值,k₃为各因素取水平3的三次试验的提取量之和的平均值。

$A_3B_2C_2D_3$, 由于因素 A 的影响不太显著, 且 A_1 与 A_3 相比差别不大, 因此从节约溶剂的角度考虑, 最终确定的最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2D_3$, 即 A(固液比)、B(乙醇浓度)、C(超声时间)、D(提取次数) 分别为 1:5、70%、60 min、3 次。在此条件下, 无患子总皂苷提取得率为 25.33%。

2.2 无患子皂苷抑菌活性试验 上述优化试验所得提取液利用旋转蒸发浓缩, 得到浓度约为 1.77 g 生药材/毫升的浓缩液, 将已灭菌滤纸片在提取浓缩液中浸泡 0.5 h 后取出, 逐个贴于涂布有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、白色念珠菌、青霉菌菌悬液的培养基表面。每个菌种设 3 个平行, 并以无菌水做对照。细菌于 37 ℃ 下培养 24 h, 白色念珠菌于 28 ℃ 的培养箱中培养 48 h, 青霉菌和黑曲霉于 28 ℃ 下培养 72 h 后观察。

通过抑菌试验发现, 无患子提取液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌基本无抑菌效果, 对白色念珠菌、黑曲霉及青霉菌抑菌效果明显。

2.3 最低抑菌浓度的测定 在无患子皂苷抑菌谱研究的基础上, 对浓缩液进行一系列稀释, 测定其最低抑菌浓度。试验结果见表 2。

表 2 抑菌圈长径/mm

菌种	无患子浓缩液稀释倍数							阴性对照
	原液	2	4	8	16	32	64	
青霉菌	21.5	20.0	18.5	16.0	15.0	10.3	—	—
黑曲霉	12.1	9.4	7.1	—	—	—	—	—
白色念珠菌	15.5	12.5	11.2	10.0	8.0	—	—	—

注: “—”表示无抑菌现象。滤纸片直径为 6 mm。

从表 2 可以看出, 无患子提取液浓度不同, 其对真菌的抑菌效果也不同, 浓度越高, 抑菌圈长径越大, 抑菌效果越好。并且, 对不同的真菌, 抑菌效果不同, 对青霉菌的抑菌效果最好, 浓缩液稀释 32 倍时仍有抑菌效果, 即最小抑菌浓度为 0.05 g 生药材/毫升提取液。对黑曲霉和白色念珠菌的最小抑菌浓度分别是稀释度为 4 倍和 16 倍。

3 讨论

无患子总皂苷的超声辅助提取中, 影响因素较多, 除了提取次数、时间、料液比、乙醇浓度之外, 还有超声波功率、温度、溶剂等, 根据资料查阅和前期的提取试验结果, 本研究超声功率采用 200 W, 温度 60 ℃, 皂苷提取也可以用水提法, 考虑到水提过程中往往会将一些单糖、寡糖、氨基酸、蛋白质、黏液质等提取出来, 杂质较多, 且苷类物质与水接触时间过长

易水解而失去生物活性, 因此选用乙醇为提取溶剂。

提取物的抑菌试验发现, 无患子总皂苷对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌等细菌有短时效的抑菌效果, 培养 20 h 时有明显的抑菌圈出现, 但当培养时间延长至 30 h 后, 抑菌圈里会逐渐长出小菌落, 所以, 总的来说, 对上述细菌抑菌效果不明显。对真菌的抑菌效果显著, 特别是对青霉菌和白色念珠菌, 这为进一步开发利用无患子的药用价值提供了科学依据和参考。

参考文献

- [1] 李丽, 罗君琴. 珍贵的乡土树种—无患子[J]. 江西园艺, 2005(2): 37-38.
- [2] CHEN CY, KUO PL, CHEN YH, et al. Tyrosinase inhibition, free radical scavenging, antimicroorganism and anticancer proliferation activities of sapindus mukorossi extracts[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2010, 41(2): 129-135.
- [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- [4] 杨鹤群, 韩春蕊, 赵丹青, 等. 无患子皂素的表面活性及复配增效性能[J]. 化工进展, 2015, 34(12): 4343-4347.
- [5] 王秋成, 陈奇, 马骏, 等. 无患子果皮提取物清洗矿物油污的可行性研究[J]. 浙江工业大学学报, 2015, 43(3): 241-245.
- [6] 高鹏宇, 陈明, 程亚勋, 等. 无患子皂苷对自发性高血压大鼠靶器官保护作用及机制研究[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(8): 1262-1265.
- [7] 王美玲, 胡小红. 无患子皂苷诱导人肺癌 A549 细胞凋亡的作用及其机制研究[J]. 中医药导报, 2015, 21(4): 35-38.
- [8] 金秋, 奚立民, 张昕欣, 等. 无患子皂苷的抗菌活性研究[J]. 科技通报, 2014, 30(3): 35-38.
- [9] 赵志敏, 南艳平, 唐青涛, 等. 无患子总皂苷抗炎及抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1592-1595.
- [10] 杨若聪, 张丽红, 张雪梅, 等. 无患子皂苷抗氧化活性研究[J]. 微量元素与健康研究, 2016, 33(6): 34-36.
- [11] 方译晨, 莫创荣, 龙妃菲, 等. 无患子皂苷水提液对 Cd 污染土壤的修复效果[J]. 西南农业学报, 2019, 32(3): 579-583.
- [12] 张永忠, 徐建军, 叶玉杰. 无患子果皮皂苷提取及天然洗手液制备研究[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(14): 34-36.
- [13] 马丽珍. 无患子皂苷提取工艺的优化[J]. 日用化学工业, 2015, 45(3): 149-151.
- [14] 黄素梅, 王敬文, 杜孟浩, 等. 无患子总皂苷的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 354-356.
- [15] 郑林禄, 朱梅花, 陈峰. 复合酶法提取无患子总皂苷的工艺研究[J]. 高师理科学刊, 2017, 37(6): 55-57.
- [16] 欧霖拱, 大孔树脂吸附分离无患子皂苷的研究[J]. 日用化学工业, 2017, 40(10): 27-30.
- [17] 张雷红. 天然药物化学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016.
- [18] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.
- [19] 杨瑞云, 李远, 梁凤琴, 等. 正交试验法优化灵香草中总皂苷提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(11): 16-19.

(收稿日期: 2019-05-08, 修回日期: 2020-06-07)