

# 旋覆花杀菌活性成分的分离与鉴定<sup>\*</sup>

丁海新<sup>1</sup>, 李广泽<sup>1, 2</sup>, 冯俊涛<sup>1, 2</sup>, 张 兴<sup>1, 2</sup>

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw)和小麦白粉病菌(*Erysiphe graminis* DC)为活性跟踪菌种, 从旋覆花(*Inula britannica* L.)花中分离得到3种杀菌活性化合物。经波谱分析与标准图谱比较, 鉴定化合物I为倍半萜类化合物1-O-Acetylbritannilactone, 化合物II和III分别为三萜类化合物Taraxasteryl palm itate和Taraxasterol acetate。

[关键词] 旋覆花; 杀菌活性; 1-O-Acetylbritannilactone; taraxasteryl palm itate; taraxasterol acetate

[中图分类号] S482.2<sup>+</sup>92

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)03-0090-05

旋覆花(*Inula britannica* L.)为菊科旋覆花属多年生草本植物, 是一种传统中草药, 具有平喘、镇咳、抗菌消炎等药理作用<sup>[1]</sup>。其主要化学成分为倍半萜类、黄酮类和百里香酚衍生物等<sup>[2, 3]</sup>。冯俊涛等<sup>[4]</sup>、李玉平等<sup>[5]</sup>对旋覆花农用杀菌活性进行了初步测试, 发现其提取物在离体条件下对小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌菌丝生长具有较强的抑制作用; 活体条件下对小麦白粉病菌具有较强的防治效果。本研究在前期工作的基础上, 采用活性跟踪法对旋覆花中的杀菌活性成分进行了分离和鉴定, 以期对旋覆花杀菌作用的进一步开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试样品 旋覆花于2002年7月中旬采自陕西杨凌, 取其花部, 阴干, 粉碎, 保存备用。

1.1.2 供试菌种 小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schw), 小麦白粉病菌(*Erysiphe graminis* DC), 均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 主要仪器 X-6型数字显示显微熔点测定仪(未校正), Equinox-55FT 红外光度计, BRUKER AVANCE DXR 200 MHz 核磁共振氢谱仪, BRUKER AM-400FT-NMR 核磁共振碳谱仪, HP5988A 型质谱仪(70 eV)。

### 1.2 方 法

1.2.1 杀菌活性测定 (1)离体测定。采用生长速率法和悬滴法<sup>[6]</sup>, 测定供试样品对病原菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用; (2)活体测定。采用温室盆栽法<sup>[7]</sup>测定供试样品对小麦白粉病的防治作用。

1.2.2 杀菌活性成分的分离 以小麦赤霉病菌和小麦白粉病菌为供试菌种, 采用离体和活体测定法测试分离过程中不同分离段的杀菌活性, 每次均选取活性相对较高段进行下一步分离工作。具体分离过程如下: 旋覆花花样(15 kg)用体积分数95%的工业乙醇渗漉提取, 减压蒸馏浓缩得乙醇浸膏。加水悬浮后, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂萃取, 分别浓缩得4部分萃取浸膏。取活性较高的氯仿萃取浸膏(300 g)进行硅胶干柱层析, 以氯仿-乙醚(体积比4:6)为流动相进行洗脱, 当溶剂前沿到达柱底即停止, 将硅胶柱分割为C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>和C<sub>5</sub>等5部分。较高活性部分C<sub>3</sub>浓缩放置析出大量晶体, 经重结晶得化合物I。取另一活性较高的C<sub>1</sub>(10 g)部分进行硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯(体积比16:1, 12:1, 8:1, 4:1, 1:1, 0:1)为洗脱剂进行梯度洗脱, 每50 mL收集1瓶, 共收集172份馏分, 薄层点板归类, 分为C<sub>1-1</sub>, C<sub>1-2</sub>, C<sub>1-3</sub>, ..., C<sub>1-12</sub>等12个部分。C<sub>1-1</sub>(2.1 g)继续进行硅胶柱层析, 洗脱剂为石油醚-氯仿(体积比20:1), 每30 mL收集1瓶, 馏分32~45合并, 浓缩放置析出晶体化

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2004-05-20

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A 04); 陕西省科技攻关项目(2001K04-G3-02)

[作者简介] 丁海新(1978-), 女, 宁夏石嘴山人, 硕士, 主要从事天然产物及植物化学研究。

[通讯作者] 冯俊涛(1967-), 男, 河南登封人, 副教授, 主要从事生物农药研究。E-mail: fengjt67@sohu.com

合物II。C<sub>1-2</sub> (0.78 g) 以二甲苯为展开剂, 硅胶薄板制备, 丙酮重结晶得化合物III。

1.2.3 结构鉴定 单体化合物经熔点测定及质谱(MS)、氢谱(<sup>1</sup>H NMR)、碳谱(<sup>13</sup>C NMR)和DEPT谱等光谱数据分析, 并与化合物标准图谱对照, 确定其结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构分析

化合物I, II, III进行波谱数据解析, 结果如下。

化合物I (图1): 无色晶体, m. p. 125~126, 分子式C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>, IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3493, 3129, 1731, 1656, 1273, 1384 <sup>1</sup>H NMR (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.08(3H, d,  $J = 6.8$  Hz, 15-H), 1.75(3H, s, 14-H), 2.04(CH<sub>3</sub>COO-, s), 3.91(2H, m, 1-H), 3.53(1H, m, 7-H), 4.17(1H, d,  $J = 2.4$  Hz, 6-H), 5.01(1H, m, 8-H), 5.72(1H, d,  $J = 2.4$  Hz, 13a-H), 6.31

(1H, d,  $J = 2.8$  Hz, 13b-H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  169.9 (C-12), 171.2 (MeCOO-), 137.0 (C-5), 136.5 (C-11), 130.9 (C-10), 123.7 (C-13), 75.9 (C-8), 68.3 (C-6), 64.2 (C-1), 45.1 (C-7), 34.4 (C-9), 32.9 (C-4), 31.1 (C-3), 26.5 (C-2), 20.9 (CH<sub>3</sub>COO-), 20.2 (C-14), 19.2 (C-15); DEPT谱: 季碳(171.2, 169.9, 137.0, 136.5, 130.9), 叔碳(75.9, 68.3, 45.1, 32.9), 仲碳(123.7, 64.2, 34.4, 31.1, 26.5), 伯碳(20.9, 20.2, 19.2); EIMS  $m/z$ : 308 (M<sup>+</sup>, 5), 290 (M-H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>, 8), 248 (M-AcOH<sup>+</sup>, 29), 230(19), 215(17), 207(15), 189(56), 179(52), 174(26), 169(39), 161(78), 152(55), 137(54), 133(62), 123(54), 109(84), 105(41), 95(72), 91(74), 69(100)。通过上述光谱数据分析, 并与文献[8~10]报道的氢谱和碳谱对照, 可推断该化合物为1-O-Acetylbritannilactone, 其化学结构及构型如图1所示。

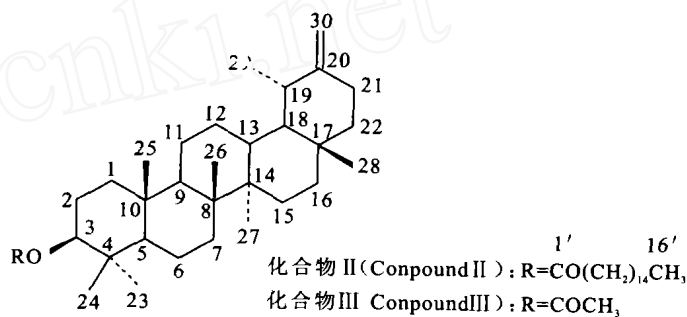
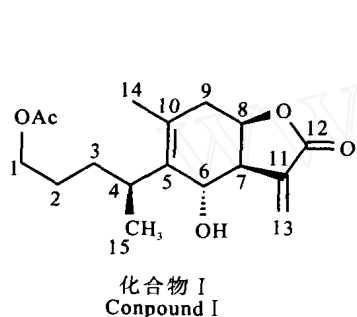


图1 旋覆花提取物化合物I, II和III的结构图

Fig. 1 Structure of compounds I, II and III from *Inula britannica* L.

化合物II (图1): 白色晶体, m. p. 95.5~96.5, 分子式C<sub>46</sub>H<sub>80</sub>O<sub>20</sub>, EIMS  $m/z$ : 664 (M<sup>+</sup>, 11), 445 (9), 408 (44), 393 (14), 365 (12), 339 (10), 299 (11), 272 (10), 257 (18), 239 (18), 229 (22), 218 (56), 205 (100); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>), 谱图数据如表1所示。由碳谱数据可推断该化合物具有乌苏烷型三萜类化合物骨架<sup>[11]</sup>。谱图数据与文献[12]数据相符, 可确定化合物II为Taraxasteryl palmitate。

化合物III (图1): 白色晶体, 分子式C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>, m. p. 256~257. EIMS  $m/z$ : 468 (M<sup>+</sup>, 50), 453 (8), 408 (17), 393 (12), 357 (11), 257 (12), 249 (40), 229 (18), 218 (41), 203 (83), <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>) 谱图数据如表1所示。由碳谱数据可推断该化合物具有乌苏烷型三萜类化合物骨架<sup>[11]</sup>。谱

图数据与文献[12]数据相符, 可确定化合物III为Taraxasterol acetate。

### 2.2 杀菌活性测定

以小麦赤霉病菌和小麦白粉病菌为供试菌种, 较为系统地测试了上述3种化合物的杀菌活性, 结果(表2)表明, 3种化合物对小麦赤霉病菌菌丝生长均有一定的抑制作用, 抑制率为50.3%~59.6%; 化合物Taraxasteryl palmitate和Taraxasterol acetate对小麦赤霉病菌孢子萌发具有很强的抑制作用, 在0.1 mg/mL剂量下, 抑制率均大于80%; 盆栽试验表明, Taraxasteryl palmitate对小麦白粉病菌具有较高的抑制作用, 7 d保护效果达56.4%, 值得进一步研究。

表 1 化合物Ⅱ和Ⅲ的碳谱数据

Table 1 Carbon-13 NMR signals of compounds Ⅱ and Ⅲ in CDCl<sub>3</sub>

| 碳原子<br>Carbon | 化合物Ⅱ Compound Ⅱ         |                           |                 | 化合物Ⅲ Compound Ⅲ         |                           |                 |
|---------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
|               | 化学位移 Chemical shift (δ) |                           | DEPT            | 化学位移 Chemical shift (δ) |                           | DEPT            |
|               | 测定值<br>Tested value     | 文献[12]值<br>Reported value |                 | 测定值<br>Tested value     | 文献[12]值<br>Reported value |                 |
| C-1           | 38.4                    | 38.4                      | CH <sub>2</sub> | 38.4                    | 38.4                      | CH <sub>2</sub> |
| C-2           | 23.7                    | 23.7                      | CH <sub>2</sub> | 23.7                    | 23.6                      | CH <sub>2</sub> |
| C-3           | 80.6                    | 80.5                      | CH              | 81.0                    | 80.8                      | CH              |
| C-4           | 37.8                    | 37.7                      | C               | 37.8                    | 37.7                      | C               |
| C-5           | 55.5                    | 55.4                      | CH              | 55.4                    | 55.4                      | CH              |
| C-6           | 18.2                    | 18.1                      | CH <sub>2</sub> | 18.2                    | 18.1                      | CH <sub>2</sub> |
| C-7           | 33.9                    | 33.9                      | CH <sub>2</sub> | 34.0                    | 33.9                      | CH <sub>2</sub> |
| C-8           | 40.9                    | 40.9                      | C               | 40.9                    | 40.8                      | C               |
| C-9           | 50.4                    | 50.3                      | CH              | 50.3                    | 50.3                      | CH              |
| C-10          | 37.0                    | 37.0                      | C               | 37.0                    | 37.0                      | C               |
| C-11          | 21.4                    | 21.4                      | CH <sub>2</sub> | 21.5                    | 21.4                      | CH <sub>2</sub> |
| C-12          | 25.6                    | 25.6                      | CH <sub>2</sub> | 25.6                    | 25.5                      | CH <sub>2</sub> |
| C-13          | 38.9                    | 38.8                      | CH              | 38.9                    | 38.8                      | CH              |
| C-14          | 42.0                    | 42.0                      | C               | 42.0                    | 41.9                      | C               |
| C-15          | 26.6                    | 26.6                      | CH <sub>2</sub> | 26.6                    | 26.6                      | CH <sub>2</sub> |
| C-16          | 39.2                    | 39.1                      | CH <sub>2</sub> | 39.2                    | 39.1                      | CH <sub>2</sub> |
| C-17          | 34.5                    | 34.4                      | C               | 34.5                    | 34.4                      | C               |
| C-18          | 48.6                    | 48.6                      | CH              | 48.7                    | 48.6                      | CH              |
| C-19          | 38.3                    | 38.4                      | CH              | 38.3                    | 38.3                      | CH              |
| C-20          | 154.6                   | 154.3                     | C               | 154.7                   | 154.4                     | C               |
| C-21          | 25.5                    | 25.6                      | CH <sub>2</sub> | 25.5                    | 25.4                      | CH <sub>2</sub> |
| C-22          | 39.4                    | 39.2                      | CH <sub>2</sub> | 39.4                    | 39.3                      | CH <sub>2</sub> |
| C-23          | 27.9                    | 27.9                      | CH <sub>3</sub> | 27.9                    | 27.8                      | CH <sub>3</sub> |
| C-24          | 16.5                    | 16.5                      | CH <sub>3</sub> | 16.5                    | 16.4                      | CH <sub>3</sub> |
| C-25          | 15.8                    | 15.9                      | CH <sub>3</sub> | 15.9                    | 15.8                      | CH <sub>3</sub> |
| C-26          | 16.3                    | 16.2                      | CH <sub>3</sub> | 16.3                    | 16.2                      | CH <sub>3</sub> |
| C-27          | 14.7                    | 14.7                      | CH <sub>3</sub> | 14.7                    | 14.6                      | CH <sub>3</sub> |
| C-28          | 26.2                    | 26.1                      | CH <sub>3</sub> | 26.1                    | 26.1                      | CH <sub>3</sub> |
| C-29          | 19.4                    | 19.4                      | CH <sub>3</sub> | 19.5                    | 19.5                      | CH <sub>3</sub> |
| C-30          | 107.1                   | 107.1                     | CH <sub>2</sub> | 107.1                   | 107.0                     | CH <sub>2</sub> |
| CO            | 173.7                   | 173.4                     | C               | 171.1                   | 170.8                     | C               |
| C-2'          | 34.8                    | 34.7                      | CH <sub>2</sub> | 21.3                    | 21.1                      | CH <sub>3</sub> |

注: 化合物Ⅱ C-3 位上取代基碳原子化学位移测定值分别为: δ173.7(CO), 34.8(C-2), 31.9(C-14), 29.6(C-4 到 C-13), 25.2(C-3), 22.6(C-15), 18.1(C-16); 参考值为 δ173.4(CO), 34.7(C-2), 31.9(C-14), 29.6(C-4 到 C-13), 25.1(C-3), 22.6(C-15), 18.1(C-16)。

Note: Other signals of compound Ⅱ were at δ173.7(CO), 34.8(C-2), 31.9(C-14), 29.6(C-4' to C-13), 25.2(C-3), 22.6(C-15) and 18.1(C-16), signals of compound in reference were at δ173.4(CO), 34.7(C-2), 31.9(C-14), 29.6(C-4' to C-13), 25.1(C-3), 22.6(C-15), 18.1(C-16).

表 2 3 个化合物对小麦赤霉病菌和小麦白粉病菌的抑制作用

Table 2 The inhibition of three compounds against *Fusarium graminearum* and *Erysiphe graminis* %

| 样品<br>Sample              | 小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>    |                                           | 对小麦白粉病菌<br>的保护效果<br>Protective effect on<br><i>Erysiphe graminis</i> |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                           | 菌丝生长抑制率<br>Inhibition rate of growing | 孢子萌发抑制率<br>Inhibition rate of germination |                                                                      |
| 1-O-Acetylbrunnianlactone | 59.6                                  | 28.9                                      | 16.5                                                                 |
| Taraxasteryl palmitate    | 50.3                                  | 80.3                                      | 56.4                                                                 |
| Taraxasterol acetate      | 58.7                                  | 83.9                                      | 1.7                                                                  |

注: 小麦赤霉病菌孢子萌发试验样品供试质量浓度为 0.1 mg/mL, 菌丝生长抑制试验样品供试质量浓度为 0.5 mg/mL, 小麦白粉病菌活体试验样品供试质量浓度为 1 mg/mL。

Note: *In vitro* test of spores and mycelia of *Fusarium graminearum*, the concentration of tested compounds were 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL respectively. *In vivo* test of *Erysiphe graminis*, the concentration of tested compounds was 1 mg/mL.

### 3 讨 论

从旋覆花中分离得到的萜类化合物具有多种生物活性,如倍半萜类化合物 britanin (旋覆花素) 具有明显的抗肿瘤 Hela 细胞和抑制霉菌等活性<sup>[13]</sup>; 裂环桉烷内酯类化合物 1, 6-O, O-diacytbritannilactone 能有效抑制人 KB (口咽腔表皮样癌细胞) 和 P-388 (淋巴瘤细胞) 肿瘤细胞的生长<sup>[10]</sup>; ergolide 等 4 种倍半萜内酯类化合物对 6 种人体肿瘤细胞系表现出不同程度的细胞毒性<sup>[14]</sup>; Iijima 等<sup>[15]</sup>以老鼠肝炎的预防效果为筛选指标,对旋覆花活性成分进行跟踪分离,得到三萜化合物 taraxasteryl acetate, 并发现该化合物脱酰基或氢化产物的生物活性有所降低。本研究以两种植物病原真菌为活性筛选菌种,分离得到了 3 种具有杀菌活

性的萜类化合物。可见,萜类化合物是旋覆花中主要的生物活性物质类别之一,有必要对其构效关系进行研究,并从细胞和分子水平上揭示其作用机制,有望发现更高活性的理想化合物,为新药创制奠定基础。

作者<sup>[16]</sup>选取 7 种植物病原菌为供试菌种,系统测试了旋覆花乙醇粗提物及其石油醚、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇萃取段的杀菌活性,除本研究的氯仿萃取段外,乙酸乙酯萃取段也表现出较高的杀菌活性,在供试质量浓度为 0.01 g/mL 时,对 5 种植物病原菌的菌丝生长抑制率均大于 70%。同时,馏分 C<sub>1-8</sub> 对小麦白粉病具有很强的保护效果,但因其含量极微而未能得到纯品化合物。由此可以推测,旋覆花中可能还含有其他杀菌活性成分,有必要在本研究的基础上,继续开展其杀菌活性成分的分析筛选。

### [参考文献]

- [1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994
- [2] Bohmann Ferdina, Jakupovic Jasmin, Mahanta Pradip K, et al. New sesquiterpene lactones from *Inula* species[J]. *Phytochemistry*, 1978, 17: 1165- 1172
- [3] Grande M, Piera F, Cuenca A, et al. Flavonoids from *Inula viscosa*[J]. *Planta Medica*, 1985, 53, 414- 419
- [4] 冯俊涛, 祝木金, 于平儒, 等. 西北地区植物源杀菌剂初步筛选[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(6): 129- 133
- [5] 李玉平, 冯俊涛, 邵红军, 等. 25 种菊科植物提取物对 3 种植物病原菌的药效试验[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(4): 123- 126
- [6] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [8] Ebcrpatoba P, Wleunko B. A sesquiterpene lactone from *Inula japonica*[J]. *Khim Priir Soedin*, 1974, 10: 730- 733
- [9] Jeske F, Huneck S, Jakupovic J. Secoederan anolides from *Inula japonica*[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(6): 1647- 1649
- [10] Zhou Bing-nan, Bai Nai-sheng, Li Long-ze, et al. Sesquiterpene lactones from *Inula britannica*[J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(1): 249- 252
- [11] 高锦明. 植物化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003
- [12] Amarendra Patra, Apurba K M, Alok K M. Carbon-13 resonance assignments of some friedelanones and taraxasteranes[J]. *Organic Magnetic Resonance*, 1981, 17(3): 166- 168
- [13] 钱名, 陈泽乃, 秦国伟, 等. 线叶旋覆花化学成分的研究[J]. *化学学报*, 1983, 41(3): 254
- [14] Eun Jung Park, Jinwoong Kim. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Inula britannica*[J]. *Planta Medica*, 1998, 64: 752- 754
- [15] Iijima K, Kiyohara H, Tanaka M, et al. Preventive effect of taraxasteryl acetate from *Inula britannica* subsp. *Japonica* on experimental hepatitis in vivo[J]. *Planta Medica*, 1995, 61(1): 50- 53
- [16] 丁海新. 旋覆花抑菌成分的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学植保学院, 2004

## Anti-fungi active compounds from *Inula britannica*

DING Hai-xin<sup>1</sup>, LI Guang-ze<sup>1, 2</sup>, FENG Jun-tao<sup>1, 2</sup>, ZHANG Xing<sup>1, 2</sup>

(1. Biorational Pesticides Research and Service Center, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract** Under the tracing of anti-fungi activity, three compounds were isolated from the flowers of *Inula britannica*. The structures were identified to be 1-O-Acetylbritannilactone, taraxasteryl palmitate and

taraxasterol acetate by MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT. Anti-fungi activities of three compounds were tested with *Fusarium graminearum* in vitro and *Erysiphe graminis* in vivo. The results showed Taraxasteryl palmitate and Taraxasterol acetate had strong inhibition on germination of spores of *Fusarium graminearum*. The inhibition rate was more than 80% under the concentration of 0.1 mg/mL. Taraxasteryl palmitate had potent preventive activity against *Erysiphe graminis* on wheat in vivo and the effect was 56.4% under the concentration of 1 mg/mL. In addition, 1-O-Acetylbritannilactone showed certain inhibition on growing of mycelia of *Fusarium graminearum* Schw.

**Key words:** *Inula britannica*; anti-fungi activity; 1-O-Acetylbritannilactone; Taraxasteryl palmitate; Taraxasterol acetate

(上接第 89 页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2005)03-0085-EA

## Analysis of the law and harm of hare to forest in the North of Shaanxi and Guanzhong

**YANG Xue-jun, HAN Chong-xuan, ZHANG Hong-li, BU Shu-hai, WANG Ming-chun, YANG Qing-e**

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** This paper analyzes the harm done by hare to forest in the north of Shaanxi and Guanzhong area with field research and statistics analysis. The result shows that the forest damaged by *Lepus capensis* is 126 100  $\text{hm}^2$ , and the average rate is 6.71%. The main kinds of trees are *Prunus amurica*, *Robinia pseudoacacia*, *Platycladus orientalis* and *Pinus tabulaeformis*. The harm to the same tree is different in different areas, and the harm in the same area is different with different trees. The season of harm is in winter and early springtime. There are 4 types of harm: strip plant, eat seedling, eat plant and gnaw rind.

**Key words:** forest in Guanzhong and the north of Shaanxi; *Lepus capensis*; harm