

白薇生物碱类成分抑制柑橘采后青霉病菌活性

陈楚英¹, 彭旋², 陈金印^{1,2}, 万春鹏^{1*}

(¹江西农业大学农学院·江西省果蔬保鲜与无损检测重点实验室·江西省果蔬采后处理关键技术与质量安全协同创新中心, 南昌 330045; ²萍乡学院, 江西萍乡 337055)

摘要:【目的】探究白薇抑制柑橘采后青霉病菌——意大利青霉活性部位的化学成分。【方法】采用抑菌活性靶向分离、溶剂萃取、各种柱层析及制备液相色谱分离单体化合物,核磁共振(NMR)和高分辨离子阱质谱(HR-IT-TOF-MS)鉴定分离的化合物。【结果】白薇乙酸乙酯(CAE)和正丁醇(CAB)萃取物有抑菌活性,正丁醇萃取物抑菌活性最强,大孔树脂进一步分离富集抑菌活性,CAB-C2为白薇抑菌活性部位,质量浓度为0.625 mg·mL⁻¹时其抑菌圈直径达到16.25 mm。采用各种柱层析及制备液相色谱技术从活性部位中分离出5个单体化合物,经NMR和MS鉴定为10β-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(1)、9-脱氢安托芬(2)、9,14-脱氢安托芬(3)、14羟基-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(4)、10α-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(5)。【结论】5种生物碱类活性成分均为首次从白薇中分离鉴定,生物碱类成分为白薇抑制柑橘采后青霉病菌的主要活性成分。

关键词:柑橘;青霉病;意大利青霉;白薇;生物碱;活性成分

中图分类号:S666.2

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2019)01-0094-09

Antifungal activity of *Cynanchum atratum* alkaloids against citrus post-harvest blue mould

CHEN Chuying¹, PENG Xuan², CHEN Jinyin^{1,2}, WAN Chunpeng^{1*}

(¹College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University / Jiangxi Key Laboratory for Post-harvest Technology and Nondestructive Testing of Fruits & Vegetables/Collaborative Innovation Center of Post-harvest Key Technology and Quality Safety of Fruits and Vegetables in Jiangxi Province, Nanchang 330045, Jiangxi, China; ²Pingxiang University, Pingxiang 337055, Jiangxi, China)

Abstract: 【Objective】Citrus fruits are often subjected to many postharvest diseases caused by various pathogens during picking, storage and transportation. Green and blue molds, caused by *Penicillium digitatum* and *P. italicum*, respectively, are two major postharvest citrus diseases and cause significant economic losses in the commercialization phase. Currently, control of postharvest citrus diseases relies mainly on the use of synthetic fungicides, which usually result in fungicide-resistance of the fungi, environment pollution and food safety problem. In recent years, much attention has been given to preventing citrus from the diseases by natural edible plant extracts. Scientists worldwide devote their time and energy to discover the high effect, low toxicity, safe and inexpensive plant-derived fungicides. Our researches also focus on plant-derived fungicides and chemical constituents target to inhibit *P. digitatum* and *P. italicum* *in vitro* and *in vivo*. Previously we showed the antifungal activities of *Cynanchum atratum* (CA) against 15 phytopathogenic fungi causing the postharvest diseases in fruits and vegetables. However, antifungal components were not clear. The extracts of *n*-butanol showed the best antifungal activity against *P. italicum*. In order to illuminate the antifungal constituents of the active fraction from *C. atratum* (CA) against phytopathogenic fungi *P. italicum* that cause citrus postharvest blue mould. 【Methods】Antifungal bioassay-guided isolation and identification of constituents in the active fraction

收稿日期:2018-06-06 接受日期:2018-10-09

基金项目:国家自然科学基金(31760598)

作者简介:陈楚英,女,助理研究员,博士,研究方向为柑橘采后贮藏技术。Tel: 13479185251, E-mail: ccy0728@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13979180522, E-mail: lemonwan@126.com

followed by liquid-liquid extraction and various column chromatographies. The preparative HPLC was used finally to get the pure compounds. The isolated compounds were identified by NMR and HR-IT-TOF-MS.【Results】Ethyl acetate (CAE) and *n*-butanol (CAB) liquid-liquid extracts at the concentration of 25 mg·mL⁻¹ showed antifungal activity with the inhibition zone of 14.3 and 20.5 mm, respectively. Moreover, CAB showed a higher antifungal activity than CAE and CA at the same concentrations. The water extracts showed no antifungal activity. CAB was further isolated to get the antifungal components. D101 macroporous resin column was firstly used to further enrich the antifungal constituents, which yielded four fractions (CAB-A to CAB-D), and only CAB-C fraction (the third fraction) showed antifungal activity at the concentration of 1.25 mg·mL⁻¹. CAB-B (the second fraction) and CAB-C fractions showed antifungal activity at the concentration of 2.5 mg·mL⁻¹. CAB-B, CAB-C and CAB-D (the fourth fraction) fractions showed antifungal activity at the concentration of 5.0 mg·mL⁻¹. So the CAB-C fraction was further isolated by silica gel chromatography and yielded four fractions (CAB-C1 to CAB-C4). Only CAB-C2 fraction (the second fraction) showed antifungal activity at the concentration of 0.625 mg·mL⁻¹, while CAB-C3 fraction showed antifungal activity at the concentration of 1.25 mg·mL⁻¹. However, CAB-C1 and CAB-C4 fractions showed no antifungal activity even at 10 mg·mL⁻¹. The CAB-C2 was the active fraction with the antifungal inhibition zone 16.25 mm at the concentration of 0.625 mg·mL⁻¹. CAB-C2 fraction was further isolated by ODS and Sephadex LH-20 column chromatographies. Finally, five pure compounds were isolated using various column chromatographies and preparative HPLC. Their structures were elucidated by NMR and MS and identified as 10β-(-)-antofine N-oxide, 9-dehydroantofine, 9,14-dehydroantofine, 14-hydroxyantofine N-oxide, and 10α-(-)-antofine N-oxide.【Conclusion】The five alkaloids were isolated for the first time from *C. atratum*. Alkaloids were the major antifungal constituents in *C. atratum* against *P. italicum*.

Key words: *Citrus*; Blue mould; *Penicillium italicum*; *Cynanchum atratum*; Alkaloids; Antifungal constituents

柑橘采后腐烂是柑橘贮藏和流通销售过程中的主要问题之一。柑橘采后贮藏期发生的微生物病害种类有20余种,由意大利青霉(*Penicillium italicum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)引起的柑橘青霉病(Blue mould)和绿霉病(Green mould)是最容易发生的2种柑橘采后病害,柑橘采后90%的腐烂由这2种病害引起^[1]。目前,柑橘采后病害防治的方法主要有以下3种:1)化学方法。主要是化学杀菌剂的使用,是目前应用最普遍的一种保鲜方法^[2-3]。2)生物方法。包括生防菌和抗菌素的使用^[4-5]。3)物理方法。物理处理防治柑橘采后病害的方法主要有热处理、冷藏和气调、电离辐射及静电保鲜技术、短波紫外线照射、减压和冷激贮藏保鲜技术等^[6-7]。另外,还有化学物理相结合的方法也常用于柑橘采后防腐保鲜^[8],山梨酸钾结合热处理可以有效降低柑橘采后绿霉病和酸腐病的发生率^[9]。化学方法由于抑菌谱宽、抑菌效果好,因此其防腐保鲜效果好,再加之获取容易、价格低廉,被广泛应用;但是化学杀

菌剂易导致化学残留,连续使用导致致病菌产生抗药性、污染环境等问题。近年来,从可食性植物资源中寻找天然植物源抑菌剂用于柑橘采后防腐保鲜受到了世界各国科研工作者的关注^[10]。

目前,植物挥发油用于柑橘采后保鲜中的应用研究较多^[11-14],但是植物非挥发油部分的研究则较少。近10年来,笔者课题组通过文献调研,选定了具有抑菌活性的400余种中草药或可食性植物资源,测定了这些提取物对柑橘青、绿霉病菌(即意大利青霉和指状青霉)的抑菌活性,发现了一批对这2种柑橘青霉属病原菌均具有较强抑制作用的中草药植物,同时对部分植物的抑菌机制和抑菌活性成分进行了系统深入的研究,并且对一部分活性较好的植物提取物进行了柑橘“活体”保鲜效果研究,取得了良好的保鲜效果^[15-19]。

白薇是萝藦科鹅绒藤属植物直立白薇(*Cynanchum atratum*)或蔓生白薇(*Cynanchum versicolor*)干燥根和根茎,收载于多部中医药古籍中,为一种临

床常用的清虚热中药材。化学成分及药理活性研究表明,白薇主要含有 C_{21} 甙体皂苷、强心苷、白薇素、挥发油等成分,具有退热、消炎、抗肿瘤和祛痰镇咳平喘的药效作用,其中 C_{21} 甙体皂苷为白薇的主要活性成分^[20]。笔者课题组前期研究发现,白薇具有很好的抑制多种植物病原菌的活性^[21],对‘新余蜜橘’和脐橙等具有良好的防腐保鲜效果^[22-23],对白薇抑制意大利青霉的活性物质提取工艺也进行了研究^[24],但其发挥抑菌作用的化合物还不清楚。

为了明确白薇抑菌活性成分的结构,笔者以意大利青霉为靶标菌株,采用抑菌活性追踪分离的方法,通过有机溶剂萃取、大孔吸附树脂、硅胶、ODS、葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 柱层析及制备液相的方法对抑菌活性部位进行分离纯化,得到 5 个单体化合物,通过¹H-NMR、¹³C-NMR 和 MS 等方法进行结构鉴定,为后续进一步开展活性成分抑菌机制、构效关系、结构修饰和生物仿生合成及柑橘植物源保鲜剂研制提供了前期基础。

1 材料和方法

1.1 材料

白薇 2015 年 4 月购自江西省樟树市中药材大市场(华丰药业有限公司);青霉病菌(*P. italicum*)由植物病理实验室从脐橙青霉病果中分离(江西农业大学农学院);D101 型大孔吸附树脂购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司;GF254 硅胶板及层析硅胶(48~75 μm)购自青岛海洋化工厂;十八烷基硅烷键合硅胶柱(ODS-A, 50 μm)和葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(20~150 μm)填料购自北京慧德易科技有限责任公司。

1.2 仪器与试剂

高速粉碎机 FW100(天津泰斯特);超声波清洗机 KQ-500B(昆山舒美);步琪 R-3 旋转蒸发仪(瑞士步琪);高压蒸汽灭菌器 YXQ-LS-70A(上海博迅);恒温培养箱 MIR-254(日本三洋);电子天平(日本岛津);超净工作台(苏州苏静);冷冻干燥机 FD-1000(东京理化);高效液相色谱仪(日本日立);核磁共振波谱仪 AVANCE III HD 400 MHz(瑞士布鲁克);离子阱飞行时间质谱仪(日本岛津)。三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、无水乙醇等有机溶剂均为分析纯,购自西陇化工股份有限公司;色谱纯甲醇购自 Sigma 试剂公司;氘代甲醇购自青岛腾龙微波科技

有限公司。

1.3 方法

1.3.1 白薇抑菌物质的提取 根据前期优化的提取参数^[24],稍微修改。称取 5 kg 白薇药材,粉碎,过 40 目(420 μm)筛,取筛下药材粉末,于 50 L 50%(φ)乙醇、提取温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下提取 2 h,重复提取 3 次,合并 3 次提取液,抽滤,用旋转蒸发器旋干得到白薇提取物。

1.3.2 抑菌活性的测定 根据参考文献[16],采用牛津杯法测定抑菌活性。意大利青霉活化及孢子悬浮液的制备:在无菌环境中,用已灭菌的接种环挑取意大利青霉菌落接种至 PDA 培养基上,放置 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 7 d 后(菌种活化),用无菌水将意大利青霉洗入三角瓶中,用散菌株将孢子打散,过滤,将滤液充分摇匀制成孢子悬浮液,血球计数板计数,使菌悬液孢子浓度为 $10^6\sim 10^7$ cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

抑菌活性的测定:无菌环境下,往未凝固的 100 mL PDA 培养基中加入 1 mL 意大利青霉悬液,摇匀倒入平板。待培养基凝固后,小心吸取 200 μL 不同浓度提取物于牛津杯中,每个样品重复测定 3 次。将平板放置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养,分别于培养后 2 d 和 10 d,采用十字交叉法测量抑菌圈直径,抑菌圈直径越大,抑菌活性越强。

1.3.3 抑菌活性部位靶向分离 采用抑菌活性追踪的方法,对白薇提取物抑菌活性部位进行分离。主要有以下 3 个步骤:

(1)白薇提取物有机溶剂萃取粗分离。取 10 g 白薇提取物溶解于适量蒸馏水中,依次用等体积的乙酸乙酯、正丁醇分别萃取 3 次,合并萃取液,旋干得到乙酸乙酯相(CAE)、正丁醇相(CAB)和水相(CAW)3 个组分,冷冻干燥成浸膏。分别将这 3 个组分配制成 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 2 个质量浓度的样品,进行后续抑菌活性的测定。根据抑菌活性测试结果,后续进一步选用正丁醇对白薇进行萃取分离,得到正丁醇相和水相。正丁醇相用于后续大孔吸附树脂柱层析分离。

(2)大孔吸附树脂柱层析分离。正丁醇相萃取物加适量蒸馏水充分溶解,离心,上清液采用湿法上样上于 D101 大孔吸附树脂柱,依次分别采用 3 倍柱体积的蒸馏水和 30%、50%、70% 和 95% 乙醇(V/V)进行洗脱,分别收集 30%(CAB-A)、50%(CAB-B)、70%(CAB-C)和 95% 乙醇洗脱(CAB-D)4 个组分。

分别将这4个组分配制成 $1.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个质量浓度梯度进行抑菌活性测定。根据抑菌活性测试结果,后续进一步选取CAB-C组分用于后续硅胶柱层析分离。

(3)硅胶柱层析分离。CAB-C组分用最少量甲醇充分溶解,用100目($150\text{ }\mu\text{m}$)层析硅胶拌样,旋蒸除去溶剂,采用干法上样,用三氯甲烷-甲醇混合溶剂系统(100:1、50:1、30:1、10:1、8:1、6:1、5:1、4:1和2:1)梯度洗脱。氯仿-甲醇8:1为展开剂对收集的流分进行薄层层析(TLC)分析,根据TLC合并相同流分为1个组分,得到4个组分(CAB-C1~CAB-C4),分别将这4个组分配制成 $0.625\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 5个质量浓度梯度进行抑菌活性测定。根据抑菌活性测试结果,CAB-C2组分为白薇抑菌活性部位。

1.3.4 抑菌活性部位(CAB-C2)HPLC分析 CAB-C2组分用甲醇配制成 $2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度,离心,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,取滤液用于HPLC分析。HPLC采用日立液相色谱系统包括5110泵、5210自动进样器、5310柱温箱和5430二极管阵列检测器,C18 Luna色谱柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$),柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相为色谱甲醇-含0.1%三氟乙酸超纯水(0 min,10%甲醇;25 min,100%),流速为 $0.75\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$,全波长检测。

1.3.5 CAB-C2中主要成分分离 CAB-C2组分用最少量甲醇充分溶解,离心后上于ODS柱(湿法上样),依次用体积分数为50%、60%、70%、80%、90%、100%甲醇洗脱,调整流速约为 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,每50 mL收集为1个流分。根据1.3.4中的HPLC检测条件对收集的流分进行分析。将主要色谱峰相同的合并为1个组分,得到3个组分(CAB-C2A~CAB-C2C)。

CAB-C2B组分用最少量甲醇溶解,离心,上于Sephadex LH-20柱,甲醇洗脱,根据1.3.4中的HPLC检测条件对收集的流分进行分析,合并相同色谱峰流分得到4个组分(CAB-C2B1~CAB-C2B4)。CAB-C2B1进行制备液相纯化得到化合物2和3;CAB-C2B3进行制备液相纯化得到化合物1、4和5,制备条件(表1和表2):C18 Luna色谱柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $10\text{ mm}\times 250\text{ mm}$),柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相A为色谱甲醇、B为含0.1%三氟乙酸超纯水,流速为 $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进

表1 制备化合物2和3的流动相条件

Table 1 The flow phase for preparation of compounds 2 and 3

时间 Time/min	甲醇 A Methanol A	水(含 0.1% 三氟乙酸) B Pure water (0.1% TFA) B
0	51	49
13.0	51	49
14.0	100	0
17.0	100	0
18.0	51	49
24.0	51	49

表2 制备化合物1、4和5的流动相条件

Table 2 The flow phase for preparation of compounds 1, 4 and 5

时间 Time/min	甲醇 A Methanol A	水(含 0.1% 三氟乙酸) B Pure water(0.1%TFA) B
0	49	51
18.0	49	51
21.0	100	0
23.0	100	0
24.0	49	51
30.0	49	51

样量 $100\text{ }\mu\text{L}$,检测波长 280 nm 。

将得到的化合物冷冻干燥后溶于氘带甲醇,测定其核磁共振谱,采用岛津离子阱飞行时间质谱仪(UPLC-IT-TOF-MS)测定其分子质量,根据相关谱图并结合相关文献解析化合物的结构。

1.4 数据分析

采用Excel 2007制图、SPSS 17.0对数据进行回归分析和Duncan多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 白薇提取物不同有机溶剂萃取物的抑菌活性

图1为白薇提取物及不同有机溶剂萃取物对意大利青霉的抑菌活性,从图1可以看出,有机溶剂乙

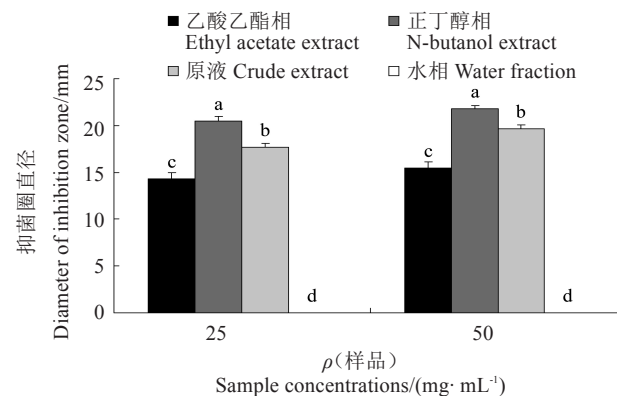


图1 白薇提取物及不同有机溶剂萃取物对意大利青霉的抑菌活性

Fig. 1 Antifungal activities of different solvent extracts from *C. atratum* against *P. italicum*

酸乙酯和正丁醇萃取物均有抑菌活性,而萃取后剩余的水相无抑菌活性,表明白薇抑菌活性物质为有机小分子化合物。正丁醇相抑菌活性最强,其抑菌圈直径显著大于白薇提取物($p < 0.05$),而乙酸乙酯相抑菌圈直径显著小于白薇提取物($p < 0.05$)。乙酸乙酯极性小于正丁醇,因此,后续试验直接采用正丁醇萃取,能够全部萃取出白薇抑菌活性物质。

2.2 大孔吸附树脂柱层析各组分的抑菌活性

白薇正丁醇萃取物经过D101大孔吸附树脂柱层析后得到的30%(CAB-A)、50%(CAB-B)、70%(CAB-C)和95%乙醇洗脱(CAB-D)4个组分,它们对意大利青霉的抑菌活性结果如图2所示。在培养2 d后(图2-A),发现30%(CAB-A)组分无抑菌活性,这与有机溶剂萃取后抑菌结果相一致,进一步说明白薇的抑菌活性物质为有机小分子化合物;20 mg·mL⁻¹质量浓度时70%(CAB-C)与50%(CAB-B)组分抑菌圈直径无显著差异($p > 0.05$),但他们均显著大于95%(CAB-D)组分($p < 0.05$),浓度为1.25~10 mg·mL⁻¹时,70%(CAB-C)组分的抑菌圈直径均显著大于其他各组分($p < 0.05$)。继续培养至10 d

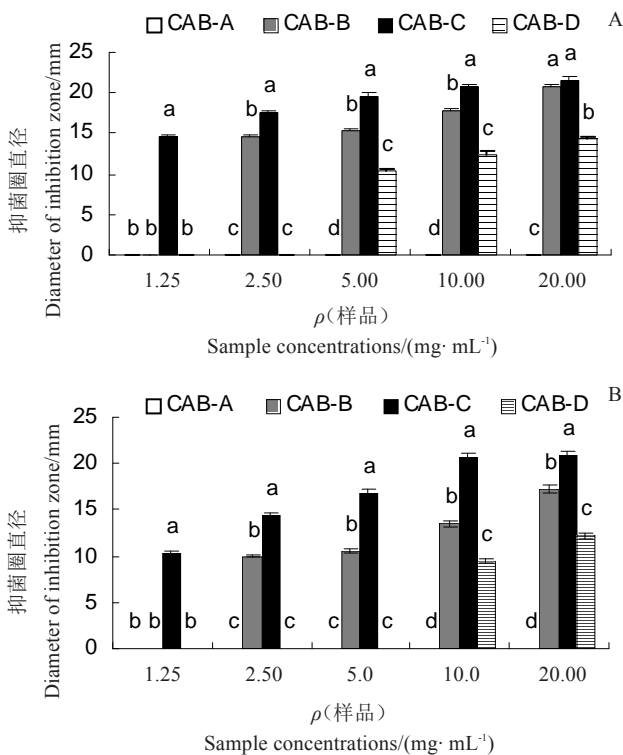


图 2 正丁醇萃取物大孔吸附树脂柱层析分离各组分培养 2 d (A) 和 10 d (B) 的抑菌活性

Fig. 2 Antifungal activities of different fractions isolated by macroporous resin column from *n*-butanol extract after culturing for 2 d (A) and 10 d (B)

时(图2-B),在测试浓度范围内70%(CAB-C)组分的抑菌圈直径均显著大于其他各组分($p < 0.05$),且其高浓度(10 mg·mL⁻¹和20 mg·mL⁻¹)时的抑菌活性与培养2 d时的抑菌活性无显著差异($p > 0.05$);50%(CAB-B)和95%(CAB-D)组分的抑菌圈直径培养10 d后显著减小;5 mg·mL⁻¹的95%(CAB-D)组分已无抑菌活性。表明70%(CAB-C)组分的抑菌活性及抑菌持续时间均最强,故后续选取CAB-C这一组分做进一步分离。

2.3 硅胶柱层析各组分的抑菌活性

CAB-C组分经硅胶柱层析,氯仿-甲醇混合溶剂梯度洗脱得到4个组分并对它们进行抑菌活性测定,结果如图3所示。在培养2 d后(图3-A),发现CAB-C1和CAB-C4两组分无抑菌活性,CAB-C2和CAB-C3两个组分均具有较好的抑菌活性,其中CAB-C2抑菌活性显著强于后者,为白薇抑菌活性部位,其质量浓度为0.625 mg·mL⁻¹时,抑菌圈直径达到16.25 mm。继续培养至10 d时(图3-B),CAB-C2和CAB-C3两个组分依然有较好的抑菌活性,后续对CAB-C2组分的化学成分进行分析。

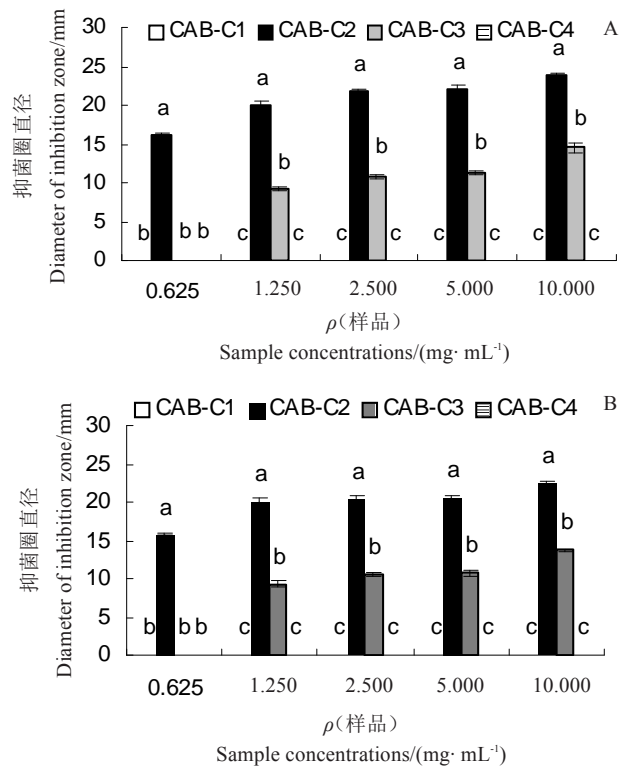


图 3 CAB-C 硅胶柱层析分离各组分培养 2 d (A) 和 10 d (B) 的抑菌活性

Fig. 3 Antifungal activities of different fractions isolated by silica gel column from CAB-C after culturing for 2 d (A) and 10 d (B)

2.4 HPLC分析抑菌活性部位(CAB-C2)化学成分

采用HPLC全波长分析CAB-C2组分的化学成分,结果如图4所示。CAB-C2组分活性成分最大吸

收峰在260 nm和280 nm左右,266 nm下主要有6个色谱峰,峰2和5相对含量最低,峰3为主要成分。后续采用柱层析分离CAB-C2组分的单体化合物,

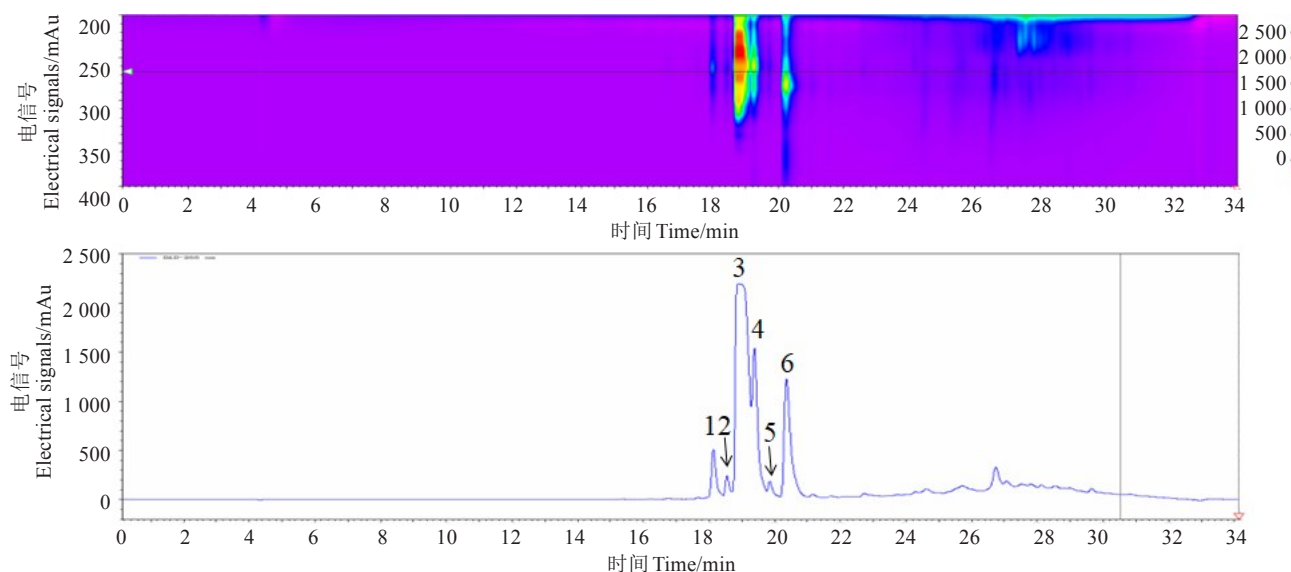


图4 白薇抑菌活性部位(CAB-C2)化学成分HPLC分析
Fig. 4 HPLC chromatograph of antifungal active fraction (CAB-C2)

采用NMR和MS的方法鉴定其结构。

2.5 CAB-C2主要成分鉴定

白薇抑菌活性部位CAB-C2组分经Sephadex LH-20柱和制备液相色谱分离得到5个化合物。根据化合物的理化性质/NMR和MS数据,并且与已知

文献对照,鉴定了化合物的结构,它们分别为:10 β -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(1)、9-脱氢安托芬(2)、9,14-脱氢安托芬(3)、14羟基-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(4)、10 α -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(5)(图5)。

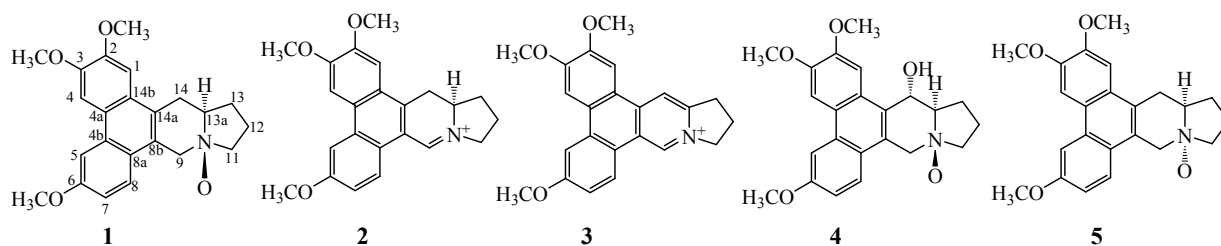


图5 化合物1-5的结构
Fig. 5 Chemical structures of compounds 1-5

化合物1,为黄色无定型粉末,HR-TOF-MS(m/z)给出的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 380.181 2,化合物1的分子质量为379,确定分子式为 $C_{23}H_{25}NO_4$; 1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据见表3和表4;根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR和HR-TOF-MS数据^[25]确定化合物1的结构为10 β -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱。

化合物2,为黄色无定型粉末,HR-TOF-MS(m/z)给出的分子离子峰 $[M]^+$ 362.170 4,确定分子式为 $C_{23}H_{24}NO_3^+$; 1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据见表3和表4;

根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR和HR-TOF-MS数据^[25-27]确定化合物2的结构为9-脱氢安托芬。

化合物3,为黄色无定型粉末,HR-TOF-MS(m/z)给出的分子离子峰 $[M]^+$ 360.156 8,确定分子式为 $C_{23}H_{22}NO_3^+$; 1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据见表3和表4;根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR和HR-TOF-MS数据^[27]确定化合物3的结构为9,14-脱氢安托芬。

化合物4,为黄色无定型粉末,HR-TOF-MS(m/z)给出的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 396.178 4,化合物4

的分子质量为 395, 确定分子式为 $C_{23}H_{25}NO_5$; 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据见表 3 和表 4; 根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 HR-TOF-MS 数据^[28]确定化合物 4 的结构为 14 羟基-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱。

化合物 5, 为黄色无定型粉末, HR-TOF-MS (m/

z) 给出的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 380.182 4, 化合物 5 的分子质量为 379, 确定分子式为 $C_{23}H_{25}NO_4$; 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据见表 3 和表 4; 根据 1H -NMR、 ^{13}C -NMR 和 HR-TOF-MS 数据^[25]确定化合物 5 的结构为 10 α -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱。

表 3 化合物 1~5 的 1H -NMR 数据 (400 MHz, CD_3OD)

Table 3 1H -NMR data of compounds 1-5 (400 MHz, CD_3OD)

No.	H 质子的化学位移 Chemical shift of H protons (耦合常数 Coupling constant, J/Hz)				
	1	2	3	4	5
1	7.24(s)	7.58(s)	7.48(s)	7.72(s)	7.45(s)
4	7.87(s)	8.08(s)	7.10(s)	8.00(brs)	8.07(s)
5	7.91(s)	8.05(d, 2.0)	7.13(brs)	8.00(brs)	8.05(d, 2.2)
7	7.26(s)	7.39(dd, 2.0, 9.0)	7.10(d, 8.8)	7.27(d, 9.0)	7.30(dd, 2.2, 9.0)
8	7.71(d, 8.8)	8.25(d, 9.0)	8.18(d, 6.4)	7.80(d, 9.0)	7.91(d, 9.0)
9	5.56(d, 15.9) 5.12(d, 15.9)	9.83(s)	9.67(s)	5.73(d, 16.2) 5.13(d, 16.2)	5.47(d, 15.4) 5.26(d, 15.4)
11	4.33(m) 4.08	4.48(m) 4.16(m)	4.84(overlap)	4.30(m) 4.15(s)	4.46(m) 3.84(m)
12	2.36~2.41(m)	2.23~2.42(m)	2.59(m)	2.46~2.52(m)	2.23~2.43(m)
13	2.26(m) 2.56(m)	2.09~2.16(m) 2.70~2.76(m)	3.51(m)	2.83(m) 2.46~2.52(m)	1.92~2.02(m) 2.61~2.69(m)
13 a	3.59(s)	3.58(s)		3.58(s)	3.58(s)
14	3.23 3.48(m)	3.19(t, 17.2) 4.29(m)	8.47(s)	5.53(s)	3.78(dd, 17.4, 6.4) 3.45(dd, 17.4, 6.4)
OCH ₃	3.99, 3.98, 3.97	4.14, 4.04, 4.04	3.97, 3.94, 3.92	4.06, 4.02, 4.02	4.07, 4.03, 4.02

注: s. 单峰; d. 双峰; t. 三重峰; m. 多重峰; dd. 双二重峰。

Note: s. Singlet; d. Doublet; t. Triplet; m. Multiplet; dd. Doublet of doublet.

表 4 化合物 1~5 的 ^{13}C -NMR 数据 (100 MHz, CD_3OD)

Table 4 ^{13}C -NMR data of compounds 1-5 (100 MHz,

CD_3OD)

No.	1	2	3	4	5
1	103.8	104.3	105.5	105.5	104.2
2	149.9	150.6	149.8	150.0	150.5
3	149.4	153.5	152.7	149.6	149.9
4	103.8	104.0	103.9	103.8	104.1
4 a	117.7	118.5	127.2	118.7	118.7
4 b	130.8	130.6	130.9	131.9	131.1
5	104.3	105.7	115.7	104.3	104.3
6	158.5	160.1	160.4	159.2	158.7
7	115.8	117.7	105.2	116.1	116.2
8	123.3	123.7	124.4	124.7	123.5
8 a	122.1	122.3	118.2	121.4	122.0
8 b	124.1	123.7	124.3	124.9	124.7
9	62.8	136.3	136.4	63.0	59.9
11	67.6	55.4	58.2	68.3	66.6
12	19.0	22.7	21.6	18.8	20.0
13	26.6	29.0	30.9	21.4	27.4
13 a	71.1	59.6	150.0	73.3	74.4
14	26.6	31.1	115.9	62.4	28.7
14 a	122.8	123.2	138.3	124.1	123.1
14 b	125.0	130.2	119.2	125.2	124.8
OCH ₃	55.1 55.0 54.6	55.2 54.8 54.6	55.4 55.3 54.8	55.2 55.0 54.6	55.2 55.1 54.6

3 讨 论

白薇资源丰富, 为常用中草药, 使用安全。目前对白薇药理活性的研究报道较多^[20], 但对其抑菌作用研究较少, 前期笔者研究发现, 白薇对意大利青霉、指状青霉、链格孢菌、灰霉菌、白地霉菌和囊孢壳菌等柑橘病原菌有很好的抑制作用; 另外对辣椒疫霉菌、西瓜尖镰孢菌、芦笋天门冬拟茎点霉菌、猕猴桃拟盘多毛孢菌、莴苣菌核核盘菌、葡萄座腔菌和茄褐纹拟茎点霉菌等其他植物病原菌也有显著的抑制效果, 表明白薇提取物有非常广谱的抗菌效果^[21]。目前对白薇的化学成分研究报道较多的为 C_{21} 甾体皂苷类成分, 此类化学成分的抗菌活性报道较少。因此, 白薇中可能存在其他类型的抗菌成分, 从白薇抑菌活性部位分离的 5 个生物碱均为菲骈吡里西丁类生物碱, 生物碱有良好的抑菌活性。白喉乌头总生物碱对稻瘟病菌、瓜类腐皮镰孢菌、黄瓜疫霉菌、甜瓜枯萎病菌和意大利青霉 5 种植物病原菌的菌丝生长均有明显的抑制作用^[29], 菲骈吡里西丁生物碱也具有广泛的抑菌活性。安托芬是腐榕叶中

一个具有强烈的抗真菌活性的生物碱成分^[30],可以有效抑制草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、黄色微球菌(*Micrococcus flavus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*),安托芬化学结构与白薇中的吡啶里西丁类生物碱结构类似。化合物 Ficuseptine 是榕属植物腐榕叶中另外一个具有抑制上述4种真菌和细菌(草酸青霉、枯草芽孢杆菌、黄色微球菌和大肠杆菌)活性的生物碱^[31]。化合物 Pergularinine 和 Tylophorinidine 也是2个与白薇生物碱具有类似结构的菲啉吡啶里西丁类生物碱,他们的抑菌活性与其能强烈抑制二氢叶酸还原酶活性有关^[32]。

4 结 论

以柑橘采后青霉病菌为靶标,采用抑菌活性追踪分离的方法,从白薇抑菌活性部位 CAB-C2 中分离出5个单体化合物,经鉴定他们的结构分别为10 β -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(1)、9-脱氢安托芬(2)、9,14-脱氢安托芬(3)、14-羟基-N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(4)、10 α -N-氧化-7-脱甲氧基娃儿滕碱(5)。生物碱类成分为白薇抑制柑橘采后青霉病菌的主要活性成分,所有生物碱类成分均首次从白薇中分离鉴定。

参考文献 References:

- [1] ZAFAR I, ZORA S, RAVJIT K, SAEED A. Management of citrus blue and green moulds through application of organic elicitors[J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41(1): 69-77.
- [2] KANETIS L, FORETER H, ADASKAVEG J E. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold[J]. Plant Disease, 2007, 91(11): 1502-1511.
- [3] HAO W N, ZHONG G H, HU M Y, LUO J J, WENG Q F, RIZWAN-UL-HAQ M. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz[J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 56(1): 39-43.
- [4] HUANG Y, WILD B L, MORRIS S C. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*[J]. Annals of Applied Biology, 1992, 120(2): 367-372.
- [5] DROBY S, COHEN L, DAUS A, WEISS B, HOREV B, CHALUTZ E, KATZ H, KEREN-TZUR M, SHACHNAI A. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus[J]. Biological Control, 1998, 12(2): 97-101.
- [6] PORAT R, DAUS A, WEISS B, COHEN L, FALLIK E, DROBY S. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment[J]. Postharvest Biology and Technology, 2000, 18(2): 151-157.
- [7] HONG S I, LEE H H, KIM D. Effects of hot water treatment on the storage stability of Satsuma mandarin as a postharvest decay control[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 43(2): 271-279.
- [8] MONTESINOS-HERRERO C, PALOU L. Combination of physical and low-toxicity chemical postharvest treatments for integrated disease management of citrus fruit: a review[J]. Stewart Postharvest Review, 2010, 6(1): 1-11.
- [9] SMILANICK J L, MANSOUR M F, GABLER F M, SORENSON D. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides[J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 47(2): 226-238.
- [10] SINGH H, AL-SAMARAI G, SYARHABIL M. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of citrus[J]. International Journal of Scientific and Research Publications, 2012, 2(3): 1-4.
- [11] SANCHEZ-GONZALEZ L, HAFER M C, CHIRALT A, GONZALEZ-MARTINEZ C. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(2): 277-283.
- [12] DU P W, REGNIEREGNIER T, COMBRINCK S. Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 53(3): 117-122.
- [13] TYAGI A K, MALIK A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms[J]. Food Control, 2011, 22(11): 1707-1714.
- [14] YAHAZADEH M R, OMIDBAIGI R Z, TAHERI H. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8): 1445-1450.
- [15] WAN C P, HAN J X, CHEN C Y, YAO L L, CHEN J Y, YUAN T. Monosubstituted benzene derivatives from fruits of *Ficus hirta* and their antifungal activity against phytopathogen *Penicillium italicum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(28): 5621-5624.
- [16] CHEN C Y, ZHENG J P, WAN C P, CHEN M, CHEN J Y. Effect of carboxymethyl cellulose coating enriched with clove oil on postharvest quality of 'Xinyu' mandarin oranges[J]. Fruits, 2016, 71(5): 319-327.
- [17] CHEN C Y, PENG X, ZENG R, CHEN M, WAN C P, CHEN J Y. *Ficus hirta* fruits extract incorporated into an alginate-based edible coating for Nanfeng mandarin preservation[J]. Scientia Horticulturae, 2016, 202: 41-48.

- [18] CHEN C Y, WAN C P, PENG X, CHEN Y H, CHEN M, CHEN J Y. Optimization of antifungal extracts from *Ficus hirta* fruits using response surface methodology and antifungal activity tests [J]. *Molecules*, 2015, 20(11): 19647-19659.
- [19] CHEN C Y, PENG X, ZENG R, WAN C P, CHEN M, CHEN J Y. Physiological and biochemical responses in cold-stored citrus fruits to carboxymethyl cellulose coating containing ethanol extract of *Impatiens balsamina* L. stems[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(4): e12999.
- [20] 袁鹰, 张卫东, 柳润辉, 扈晓佳, 苏娟, 郑兆广, 张薇. 白薇的化学成分和药理研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2007, 25(1): 6-9.
- YUAN Ying, ZHANG Weidong, LIU Runhui, HU Xiaojia, SU Juan, ZHENG Zhaoguang, ZHANG Wei. Advances in studies on chemical constituents and pharmacology of *Cynanchum atratum*[J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2007, 25(1): 6-9.
- [21] 彭旋, 陈楚英, 陈金印, 万春鹏. 白薇提取物的抗氧化和抑菌活性[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(4): 140-144.
- PENG Xuan, CHEN Chuying, CHEN Jinyin, WAN Chunpeng. Antioxidant and antifungal activities of *Cynanchum atratum*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(4): 140-144.
- [22] 郑嘉鹏, 甘武, 陈玉环, 陈楚英, 陈金印. 白薇提取液对新余蜜橘采后青霉病的防治效果研究[J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(6): 1119-1125.
- ZHENG Jiapeng, GAN Wu, CHEN Yuhuan, CHEN Chuying, CHEN Jinyin. Control effects of *Cynanchum Atratum* extracts on postharvest blue mold in Xinyu tangerine[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39(6): 1119-1125.
- [23] 彭旋, 陈玉环, 陈金印. 白薇提取液对意大利青霉抑菌机制及脐橙青霉病防治效果的研究[J]. *植物病理学报*, 2017, 47(3): 398-405.
- PENG Xuan, CHEN Chuying, CHEN Jinyin. Antifungal mechanism of *Cynanchum atratum* Bunge extracts on *Penicillium italicum* and control effect on blue mold of navel orange [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(3): 398-405.
- [24] 彭旋, 万春鹏, 陈玉环, 陈楚英, 陈金印. 响应面法优化白薇抑菌物质超声提取工艺[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(7): 176-182.
- PENG Xuan, WAN Chunpeng, CHEN Yuhuan, CHEN Chuying, CHEN Jinyin. Optimization of ultrasound extraction of antibacterial material from *Cynanchum atratum* Bunge with response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(7): 176-182.
- [25] LAVAULY M, RICHOMME P, BRUNETON J. New phenanthroindolizidine N-oxides alkaloids isolated from *Vincetoxicum hirsutaria* Medic[J]. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 1994, 68 (4): 225-227.
- [26] FABER L, WIEGREBE W. Stereospecific synthesis of a 9,11,12,13,13a,14-hexahydro-dibenzo (f, h) pyrrolo (1,2-b) isoquinolinealkaloid[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 1973, 56 (8): 2882-2884.
- [27] WU T S, SU C R, LEE K H. Cytotoxic and anti-HIV phenanthroindolizidine alkaloids from *Cryptocarya chinensis*[J]. *Natural Product Communications*, 2012, 7(6): 725-727.
- [28] STAERK D, CHRISTENSEN J, LEMMICH E, DUUS J O, OLSEN C E, JAROSZEWSKI J W. Cytotoxic activity of some phenanthroindolizidine N-oxide alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2000, 63 (11): 1584-1586.
- [29] 刘迪, 吴卫, 李冠. 白喉乌头总生物碱抑菌杀虫活性的初步研究[J]. *新疆农业科学*, 2009, 46(3): 620-624.
- LIU Di, WU Wei, LI Guan. Primary studies on the fungicidal and insecticidal activities of total alkaloids from *Aconitum leucostomum* Worosch[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2009, 46 (3): 620-624.
- [30] BAUMGARTNER B, ERDELMEIER C A J, WRIGHT A D, RALI T, STICHER O. Antofine, a strong antifungal alkaloid from *Ficus septica* leaves[J]. *Planta Medica*, 1989, 55 (7): 652-653.
- [31] BAUMGARTNER B, ERDELMEIER C A J, WRIGHT A D, RALI T, STICHER O. An antimicrobial alkaloid from *Ficus septica*[J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(10): 3327-3330.
- [32] RAO K N, VENKATACHALAM S R. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the *in vitro* cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents[J]. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14 (1): 53-59.