

# 开口箭甾体皂甙元的分离鉴定及其抗荔枝霜疫霉菌活性

吴光旭<sup>1,2</sup>, 刘爱媛<sup>1</sup>, 魏孝义<sup>3</sup>, 陈维信<sup>1\*</sup>

(1. 广东省果蔬保鲜重点实验室, 华南农业大学, 广州 510642; 2. 长江大学生命科学学院, 荆州 434025; 3. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

**摘要:** 在以荔枝霜疫霉菌为指示菌的生物活性测定导向跟踪下, 运用 TLC、硅胶柱层析、反相硅胶柱层析和凝胶柱层析等分离纯化方法, 从开口箭 (*Tupistra chinensis*) 甲醇提取物的乙酸乙酯分部萃取物中分离纯化得到 2 个抗菌化合物。经现代光谱 (MS, IR, 1D NMR 和 2D NMR) 分析, 确定化合物 1 为  $1\beta, 2\beta, 3\beta, 4\beta, 5\beta, 7\alpha$ -六羟基螺甾-25(27)-烯-6-酮, 化合物 2 为螺甾-25(27)-烯- $1\beta, 2\beta, 3\beta, 4\beta, 5\beta, 6\beta, 7\alpha$ -七醇。离体抗菌活性测定化合物 1 和化合物 2 抑制荔枝霜疫霉菌 (*Peronophythora litchii*) 孢子囊萌发的  $EC_{50}$  分别为  $100.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $124.37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用质量浓度为  $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的两个化合物分别处理后接种霜疫霉菌, 供试荔枝果实的发病率分别为 16.7% 和 18.9%。

**关键词:** 开口箭 (*Tupistra chinensis* Bak.) ; 甾体皂甙元; 荔枝霜疫霉菌 (*Peronophythora litchii*); 抗菌活性

中图分类号: Q946.887; S436.67 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2007)01-0089-04

## Isolation and Structural Elucidation of Sapogenins from *Tupistra chinensis* and Their Antifungal Acitivity Against *Peronophythora litchii*

WU Guang-Xu<sup>1,2</sup>, LIU Ai-Yuan<sup>1</sup>, WEI Xiao-Yi<sup>3</sup>, CHEN Wei-Xin<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory for Postharvest Science and Technology of Fruit and Vegetables, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. South China Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** The methanol extract of *Tupistra chinensis* showed antifungal acitivity against the sporangium germination of *Peronophythora litchii*. Bioassay-guided fractionation together with various chromatographic procedures (TLC, silica column chromatography, RP-18 reverse phase chromatography and Sephadex LH-20 gel chromatography) led to the isolation of two bioactive sapogenins from ethyl acetate phases of the methanol extract of *T. chinensis*. By means of spectroscopic analysis (MS, IR, 1D NMR and 2D NMR), their structures were identified as  $1\beta, 2\beta, 3\beta, 4\beta, 5\beta, 7\alpha$ -hexahydroxyspirost-25(27)-en-6-one (1) and spirost-25(27)-ene- $1\beta, 2\beta, 3\beta, 4\beta, 5\beta, 6\beta, 7\alpha$ -heptol (2). Bioassay *in vitro* revealed that the  $EC_{50}$  values of compounds 1 and 2 against sporangium germination of *P. litchii* were  $100.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $124.37 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. Treatment with  $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  of compounds 1 and 2 before inoculated with *P. litchii*, the incidences of downy blight disease of the tested litchi fruits were just 16.7% and 18.9%.

**Key words:** *Tupistra chinensis* Bak.; Sapogenins; *Peronophythora litchii*; Antifungal activity

开口箭 (*Tupistra chinensis* Bak.) 为百合科 (Liliaceae) 铃兰族 (Convallarieae) 开口箭属多年生草本植物<sup>[1]</sup>。主要分布在我国四川、湖北、云南和广西等地。开口箭多以根状茎入药, 民间常用于治疗头痛、咽喉痛、腰背疼痛、关节肿痛、跌打损伤、烧伤和烫伤等症。植物化学研究发现, 开口箭属植物中主要含有甾体皂甙、甾体皂甙元和强心甙类等成分<sup>[2~5]</sup>。笔者在筛选植物源抗菌物质对果蔬采后病害防治的研究中, 发现开口箭提取物对荔枝霜疫霉菌

(*Peronophythora litchii*) 具有较强的抗菌活性<sup>[6]</sup>, 并以荔枝霜疫霉菌为指示菌进行活性跟踪, 运用 TLC、硅胶柱层析、反相硅胶柱层析和凝胶柱层析等分离纯化方法, 从开口箭甲醇提取物的乙酸乙酯分部萃取物中分离纯化得到 2 个甾体皂甙元抗菌化合物。目前, 有关其抗荔枝霜疫霉菌活性的相关研究尚未见报道。本研究对植物源抗菌活性物质用于荔枝采后病害防治、降低腐损率、控制农残量、保证食用安全性, 以及提高我国果蔬产品国际竞争力具一定的意义。

收稿日期: 2006-07-27, 修回日期: 2006-11-24。

基金项目: 农业部科技项目(2006-G31); 湖北省科技攻关计划资助项目(2004AA201C35); 广东省科技攻关项目(2004A20301002)。

作者简介: 吴光旭(1961-), 男, 副教授, 博士, 主要从事天然产物及果蔬采后病理研究(E-mail: wuguxu@sohu.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence). E-mail: chenweix@sti.gd.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物材料的采集、鉴定、处理与保存

开口箭 (*Tupistra chinensis* Bak.) 样品于 2002 年 6 月采自神农架国家级自然保护区, 采集号为 2958 和 2959, 植物由华南农业大学林学院李秉滔教授鉴定, 植物标本藏于华南农业大学林学院标本馆 (CAN)。

将开口箭截取根茎, 去除泥土、残渣、黏附物和其它异物, 置于 65 ℃ 的干燥箱中烘干、粉碎、过 100 目筛(孔径 0.15 mm)制成干粉, 于 0 ℃ 低温下密封保存, 备用。

### 1.2 供试病原菌的分离、纯化与鉴定

参照方中达的方法<sup>[7]</sup>进行荔枝霜疫霉菌 (*Peronophthora litchii* Chen ex Ko et al.) 的分离与纯化。病原菌由作者鉴定。

### 1.3 仪器设备与试剂

Eyela N-1 旋转蒸发仪 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd)、BS2000S 型电子天平 (SARTORIUS)、SM 2-1 型显微镜 (Nikon)、层析柱(各种规格)、API 2000 型质谱仪、BRUKER EQUINOX-55 傅立叶变换红外光谱仪、Bruker DRX-400 型超导核磁共振仪。

硅胶(100~300 目, 青岛海洋化工厂)、ODS 反相硅胶(日本)、Sephadex 凝胶(日本)、氯仿、甲醇、四氢呋喃、丙酮、二甲亚砜、显色剂。

### 1.4 开口箭甲醇提取物及其分部萃取物的制备

采用冷浸法提取。将开口箭根茎干粉用体积分数为 95% 的甲醇反复浸泡直至浸出液无色为止, 将甲醇浸出液过滤, 用旋转蒸发仪减压(11 kPa, 50~60℃)浓缩得到浅褐色膏状甲醇提取物, 将甲醇提取物用少许稀酒精溶液溶解, 然后分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行液-液分部萃取, 减压浓缩得其石油醚分部萃取物、乙酸乙酯分部萃取物、正丁醇分部萃取物和水溶性剩余物。

### 1.5 化合物的分离纯化与光谱分析

以荔枝霜疫霉菌活性生测和 TLC 检测为导向, 对开口箭提取物进行分离纯化。将乙酸乙酯分部萃取物用硅胶柱层析(100~200 目, 200~300 目, 氯仿和甲醇混和液洗脱)、反相硅胶柱层析(RP-18, 甲醇和水混合液洗脱)和凝胶柱层析(Sephadex LH-20, 四氢呋喃洗脱)分离得到化合物 1。将乙酸乙酯分部萃取物进行硅胶柱层析(100~200 目, 甲醇和水混合液洗脱)和反相硅胶柱层析(RP-18, 甲醇和水混合液洗脱)得到化合物 2。

质谱(MS)用 Applied Biosystems API 2000 型质谱仪、采用大气压化学电离源(APCI)、正负两种离子模式、以二氯甲烷为溶剂直接进样测定。红外光谱(IR)用 BRUKER EQUINOX-55 傅立叶变换红外光谱仪, KBr 压片测定, 扫描范围 400~4000 cm<sup>-1</sup>。核磁共振(NMR)用 Bruker DRX-400 型超导核磁共振仪测定, 以 TMS 为内标, 氦代吡啶为溶剂。

### 1.6 开口箭提(萃)取物的抗菌活性测定

#### 1.6.1 开口箭提(萃)取物的离体(*in vitro*)抗菌活性测定

取在 25 ℃ 和 RH 98% 条件下培养(PDA 培养基)的菌龄为 5 d 的荔枝霜疫霉菌菌种, 用无菌水冲洗, 制成孢子囊悬浮液。取化合物 1 和化合物 2, 分别配制成浓度为 1000 μg·mL<sup>-1</sup> 的贮液。将孢子囊悬浮液与化合物 1 和化合物 2 各自的贮液分别配成浓度 50、100、150、200、250 μg·mL<sup>-1</sup> 的含药菌液, 含药菌液的浓度为每视野 20 个孢子囊, 将含药菌液摇匀, 置于 25 ℃ 和 RH 98% 条件下培养 6 h, 在 10×40 倍显微镜下, 观察各处理孢子囊萌发数, 计算萌发率或抑制率。

毒力计算方法: 将抑制率换算成机率值, 质量浓度以对数值表示, 以各提(萃)取物不同质量浓度的对数值(x)减去菌落生长抑制率的几率值(y), 求取毒力回归方程  $y = a + bx$ , 并计算抑制菌丝生长的 EC<sub>50</sub> 值。

#### 1.6.2 化合物对荔枝霜疫霉菌的活体(*in vivo*)抗菌试验

参照 Jiang 等的方法<sup>[8]</sup>, 将化合物 1 和化合物 2 分别配成浓度为 500 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 接着将药液分别均匀涂布于荔枝(淮枝)果尖处, 凉干, 再蘸取霜疫霉菌孢子囊悬浮液, 均匀涂布于施药处, 30 个荔枝果为一个处理, 重复 3 次, 同时, 设空白试验对照。单果包装, 在 25 ℃ 和 98% RH 条件下培养 7 d 后, 统计病、健果数, 计算发病率。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌化合物的结构鉴定

**化合物 1:** 为淡黄色粉末。其 APCI-MS 的负离子谱显示 [M + Cl]<sup>-</sup> 的离子峰为 *m/z* 543, 正离子谱显示 [M + H]<sup>+</sup> 的离子峰为 *m/z* 509。IR(KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3399 (OH), 2951 (C-H), 1716 (C=O), 1652 (C=C), 1453, 1379, 1107, 1049, 983, 920, 877, 851。核磁共振氢谱(400 MHz, 氦代吡啶): δ 4.32

(1H, br s, H-1), 4.40 (1H, br s, H-2), 4.74 (1H, br s, H-3), 5.81 (1H, d,  $J=3.2$  Hz, H-4), 4.54 (1H, br s, H-7), 4.56 (1H, m, H-16), 0.87 (3H, s, H-18), 1.45 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-21), 4.01 (1H, d,  $J=12.0$  Hz, H-26eq), 4.41 (1H, d,  $J=12.0$  Hz, H-26ax), 4.76 (1H, br s, H-27a), 4.79 (1H, br s, H-27b)。核磁共振碳谱(100 MHz, 氦代吡啶)见表1。

对比<sup>13</sup>C NMR 数据,查阅相关文献<sup>[2]</sup>与天然产物数据库(Dictionary of Natural Products database, Chapman & Hall, 2004, version 12: 2)可知,化合物1为 $1\beta,2\beta,3\beta,4\beta,5\beta,7\alpha$ -六羟基螺甾-25(27)-烯-6-酮( $1\beta,2\beta,3\beta,4\beta,5\beta,7\alpha$ -hexahydroxyspirost-25(27)-en-6-one)。其结构式见图1。

**化合物2:**为浅褐色粉末。其APCI-MS的负离子谱显示[ $M + Cl^-$ ] 的离子峰为  $m/z$  545, 正离子谱显示[ $M + H^+$ ] 的离子峰为  $m/z$  511。IR (KBr)  $\nu_{max}$  cm<sup>-1</sup>: 3517, 3435 (OH), 3159 (=C-H), 2946 (C-H), 1655 (C=C), 1452, 1379, 1231, 1101, 1045, 958, 920, 877, 852。核磁共振氢谱(400 MHz, 氦代吡啶):  $\delta$  4.34 (1H, br s, H-1), 4.31 (1H, br s, H-2), 4.74 (1H, d,  $J=3.0$  Hz, H-3), 5.31 (1H, d,  $J=3.0$  Hz, H-4), 5.00 (1H, d,  $J=2.8$  Hz, H-6), 4.48 (1H, br s, H-7), 2.61 (1H, br t,  $J=11.6$  Hz, H-8), 4.56 (1H, dd,  $J=14.4, 7.6$  Hz, H-16), 0.93 (3H, s, H-18), 1.98 (3H, s, H-19), 1.06 (3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-21), 3.98 (1H, d,  $J=12.0$  Hz, H-26eq), 4.40 (1H, d,  $J=12.0$  Hz, H-26ax), 4.75 (1H, br s, H-27a), 4.78 (1H, br s, H-27b)。核磁共振碳谱(100 MHz, 氦代吡啶)见表1。

<sup>13</sup>C NMR 显示该化合物有27个碳原子,其中包括3个甲基碳、8个亚甲基碳(其中包括一个末端烯碳 =CH<sub>2</sub>)、4个次甲基碳、7个偕氧次甲基碳和5个

表1 化合物1和化合物2的核磁共振碳谱  
Table 1 <sup>13</sup>C NMR(100 MHz, in pyridine-d<sub>6</sub>, δ ppm)  
data of compounds 1 and 2

C-position	Compound 1 δC	Compound 2 δC	C-position	Compound 1 δC	Compound 2 δC
1	76.5	79.7	15	31.5	32.0
2	67.9	67.2	16	81.3	81.3
3	75.5	75.6	17	62.9	63.1
4	71.2	69.8	18	16.3	16.4
5	86.3	78.2	19	13.0	15.6
6	211.1	73.6	20	42.1	42.1
7	75.2	71.8	21	15.0	15.0
8	40.9	34.6	22	109.5	109.5
9	38.0	37.6	23	33.2	33.2
10	50.2	40.4	24	29.0	29.0
11	22.0	21.4	25	144.4	144.5
12	39.4	39.8	26	65.1	65.0
13	40.7	40.4	27	108.8	108.7
14	49.3	50.1			

季碳。从以上数据可推导出化合物2分子式为  $C_{27}H_{42}O_9$ 。

对比碳谱数据,查阅文献<sup>[3]</sup>,确定化合物2为螺甾-25(27)-烯- $1\beta,2\beta,3\beta,4\beta,5\beta,6\beta,7\alpha$ -七醇(spirost-25(27)-ene- $1\beta,2\beta,3\beta,4\beta,5\beta,6\beta,7\alpha$ -heptol),其核磁共振氢谱和碳谱的数据属首次报道。其结构式见图1。

## 2.2 化合物1和化合物2对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的抑制效果

化合物1和化合物2对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的抑制效果随浓度升高而增强,化合物1的抗菌活力随浓度变化的幅度比化合物2平缓,在浓度为  $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,两化合物的抑菌效果基本相等(见图2)。经统计分析得出,化合物1对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的  $EC_{50}$  为  $100.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,化合物2对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的  $EC_{50}$  为  $124.37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

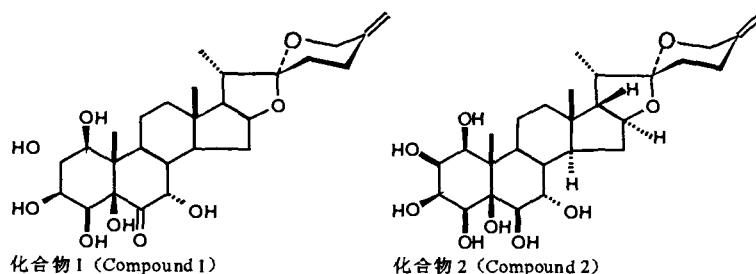


图1 化合物1和化合物2的结构式  
Fig. 1 Structures of compound 1 and compound 2

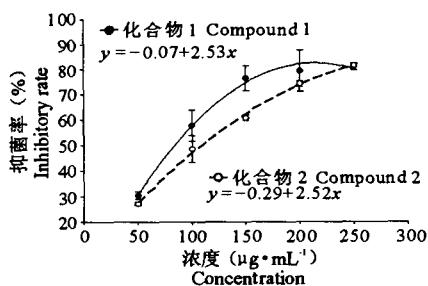


图 2 化合物 1 和化合物 2 对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的毒力

Fig. 2 Inhibitory effects on sporangium germination of *Peronophthora litchii* of compounds 1 and 2

#### 2.4 化合物 1 和化合物 2 对荔枝霜疫霉菌的接种防治效果

在荔枝果尖处定点分别涂抹化合物 1 和化合物 2 溶液, 然后再分别接种霜疫霉菌, 于 25 ℃ 和 RH 98% 条件下培养 7 d, 发病率分别为 16.7% 和 18.9%, 与对照(87.8%)相比, 具有显著差异。统计结果见表 2。

表 2 化合物 1 和化合物 2 对荔枝霜疫霉菌的活体抑菌效果

Table 2 Inhibitory effects of compounds 1 and 2 on *P. litchii* in vivo

处理 Treatment	浓度 (mg·mL⁻¹) Concentration	感病果 (粒) Infected fruit	健康果 (粒) Sound fruit	发病率 (%) Incidence of disease
对照 CK	0	79	11	87.8 a
化合物 1 Compound 1	500	15	75	16.7 b
化合物 2 Compound 2	500	17	73	18.9 b

Note: Followed by the same letters in each column are not significantly different at the 5% level (DMRT).

### 3 结论与讨论

在以荔枝霜疫霉菌为指示菌的生物活性测定与 TLC 分离检测的共同跟踪下, 运用硅胶柱层析、反相硅胶柱层析和凝胶柱层析等一系列分离纯化方法, 从开口箭甲醇提取物的乙酸乙酯萃取物中分离纯化得到 2 个单体抗菌化合物。经现代光谱(MS、IR、1D NMR 和 2D NMR)分析, 确认化合物 1 和化合物 2 为甾体皂甙元, 其化学名称为 1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ -六羟基螺甾-25(27)-烯-6-酮和螺甾-25(27)-烯-1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -七醇。

采用孢子萌发法测定, 化合物 1 和化合物 2 对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的 EC<sub>50</sub> 分别为 100.28 mg·mL⁻¹ 和 124.37 mg·mL⁻¹, 化合物 1 对荔枝霜疫霉菌孢子囊萌发的离体抗菌活性强于化合物 2。采用荔枝活体接种试验发现, 在质量浓度为

500 mg·mL⁻¹ 时, 化合物 1 和化合物 2 对荔枝果实接种霜疫霉菌的防病率分别为 83.3% 和 82.1%, 两化合物对荔枝霜疫霉菌的活体抑菌效果无明显差异。

开口箭属植物所含化学成分多为甾体皂甙类物质。有文献报道一些皂甙类化合物具有抗植物病原真菌的作用<sup>[9-12]</sup>。沈平等<sup>[13]</sup>在用稻瘟霉菌进行抗癌活性先导化合物追踪分离时, 发现弯蕊开口箭 (*T. wattii*) 根茎的乙醇提取物可使稻瘟霉菌 (*Pyricularia oryzae*) 的菌丝发生畸形, 分离得到 3 个具有很强细胞毒活性的强心苷, 并证明强心苷有抗稻瘟霉菌作用, 另外, 还分离出 wattosideB、WattosideC、kitigenin 和 convallageninB 等 4 个多羟基甾体皂苷元, 并测定了它们在体内对肿瘤细胞 K562 和 A2780a 的细胞毒活性。本研究发现开口箭中的 1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ -六羟基螺甾-25(27)-烯-6-酮和螺甾-25(27)-烯-1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -七醇具有抗荔枝霜疫霉菌活性, 进一步说明了开口箭属植物在植物源医药和农药研发方面具有重要价值。

### 参考文献:

- [1] 漢社班, 錢士輝, 丁志遵, 袁齊昌. 开口箭属五种植物的花粉形态学研究 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(2): 36-37.
- [2] 沈平, 王三龙, 杨崇仁, 蔡兵, 姚新生. 弯蕊开口箭的多羟基甾体皂甙元 [J]. 植物学报, 2003, 45(5): 626-629.
- [3] Pan W B, Chang F R, Wu Y C. Spirostanol saponins from the underground parts of *Tupistra chinensis* [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 48: 1350-1352.
- [4] Pan W B, Chang F R, Wu Y C. Tuplicigenin A, a new steroidal saponin from *Tupistra chinensis* [J]. J Nat Prod, 2000, 63: 861-863.
- [5] Wu G X, Wei X Y, Chen W X. Spirostane steroidal saponins from the underground parts of *Tupistra chinensis* [J]. Chinese Chem Lett, 2005, 16(7): 911-914.
- [6] 吴光旭, 杨小玲, 刘爱媛, 陈维信. 64 种植物提取物的离体抗真菌活性测试 [J]. 长江大学学报(自然科学版), 2005, 2(2): 77-82.
- [7] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 248-249.
- [8] Jiang Y M, Zhu X R, Li Y B. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis* [J]. Lebensm-Wiss Technol, 2001, 34(7): 430-436.
- [9] 陈梦菁. 铃兰族的甾体皂甙 [J]. 植物学通报, 1999, 16(1): 37-43.
- [10] 周立刚, 张颖君, 蔡艳, 刘玉青, 王锦亮, 王君健, 杨崇仁. 黄酮和甾体类化合物的抗真菌活性 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(3): 24-29.
- [11] 江洪, 谭汝成, 刘汉兰, 马敬中, 谢九皋. 盾叶薯蓣根抽提物中甾体皂甙成分对植物病原真菌的抑菌活性 [J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2002, 23(3): 96.
- [12] Carotenuto A, Fattorusso E, Lanzotti V, Magno S. Spirostanol saponins of *Allium porrum* L [J]. Phytochemistry, 1999, 51: 1077-1082.
- [13] Shen P, Wang S L, Liu X K, Yang C R, Cai B, Yao X S. Structure elucidation and activity evaluation of a new cardenolide from *Tupistra wattii* Hook. f [J]. Chinese J Med Chem, 2002, 12(5): 261-264.