

山核桃外果皮化学成分及抑菌活性初步研究

林君阳, 马良进, 陈安良, 张立钦

(浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 用不同溶剂对山核桃 *Carya cathayensis* 外果皮甲醇浸膏进行萃取分离, 得到石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相和正丁醇相浸膏, 对番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 苹果腐烂病菌 *Valsa mali*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*, 黄瓜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 等 5 种植物病原真菌进行了抑菌活性试验。结果表明, 正丁醇相抑菌活性最强, 达到 100%, 氯仿相和石油醚相次之, 乙酸乙酯相最弱。对抑菌活性较强的氯仿相进行了初步分离, 得到 2 种单体化合物, 鉴定为 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌 (5-hydroxy-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone) 和 β -谷甾醇。这 2 种化合物对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和小麦赤霉病菌孢子萌发均有一定的抑制作用。图 1 表 2 参 13

关键词: 森林保护学; 山核桃; 化学成分; 抑菌活性; 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌

中图分类号: 789.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2009)01-0100-05

Chemical components and antifungal activities of extracts from the husk of *Carya cathayensis*

LIN Jun-yang, MA Liang-jin, CHEN An-liang, ZHANG Li-qin

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Carya cathayensis* is distributed around Mount Tianmu and its nut production is one of the important incomes for the local people. The husks, which were often thrown away randomly, were confirmed having antifungal activities. Petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and n-butanol solvents were used to extract and separate the methanol extraction from the husk of *C. cathayensis* and get four fractions. Next, antifungal activities of the four fractions were compared to *Alternaria solani*, *Valsa mali*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The chloroform fraction was then separated by silica gel column chromatography. Results showed that antifungal activity with the four solvents was in the order: n-butanol (activity up to 100%) > chloroform and petroleum ether > ethyl acetate. Also, silica gel column chromatography revealed two compounds identified as 5-hydroxy-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone and β -sitosterol, which inhibited conidial germination of *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum*. [Ch, 1 fig, 2 tab, 13 ref.]

Key words: forest protection; *Carya cathayensis*; chemical components; antifungal activity; 5-hydroxy-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone

山核桃 *Carya cathayensis* 属于胡桃科 Juglandaceae 山核桃属 *Carya* 木本植物^[1], 主要分布于浙皖交界的天目山区周围, 是浙江省乃至世界性特色干果。目前, 浙江省山核桃面积约为 5.0 万 hm², 年产量达 0.8 万 t, 而山核桃外果皮达 2.1 万 t。山核桃外果皮的处理问题一直困扰着产区的地方政府和农民^[2]。当前, 尚未有理想的处理方法, 绝大部分外果皮都是随意倾倒在河边、路旁, 任它们腐烂发酵

收稿日期: 2008-03-03; 修回日期: 2008-08-11

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2005C12022)

作者简介: 林君阳, 从事生物防治研究。E-mail: ljj800103@163.com。通信作者: 马良进, 副教授, 博士, 从事森林病理和植物源农药等研究。E-mail: Malj@zjfc.edu.cn

被河水冲走，对周围生态环境产生严重的影响。据初步研究，山核桃外果皮中富含多酚类单宁、有机酸、苷类和生物碱等多元有机化合物，粗提液对小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 和水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 等病原真菌有明显的杀菌效果，具有开发成为植物源杀菌剂的潜力。因此，开发利用山核桃废弃外果皮不仅能变废为宝，而且对于保护生态环境也具有重要意义。本研究对山核桃外果皮中抑菌活性成分进行了初步分离，以期如山核桃外果皮的实际开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试植物样品

山核桃外果皮由浙江林学院天则山核桃科技开发有限公司提供，为当年 9 月初山核桃收获季节采摘的新鲜的手剥外果皮，阴干，备用。

1.2 供试菌种

供试植物病原真菌：番茄早疫病菌 *Alternaria solani*，苹果腐烂病菌 *Valsa mali*，小麦赤霉病菌，水稻纹枯病菌，黄瓜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*，均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.3 试剂

无水甲醇、石油醚(30 ~ 60 ℃)、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、丙酮等有机溶剂均为分析纯，由杭州大方化学试剂厂生产。

1.4 提取方法

将阴干的山核桃外果皮在 50 ℃烘箱里烘干，粉碎，过 60 目筛(孔径 0.25 mm)，以冷浸法用甲醇提取 3 次，提取时间分别为 48，24，24 h，合并滤液，真空旋转浓缩至凝固，得山核桃外果皮甲醇浸膏。

1.5 萃取分离方法

将山核桃外果皮甲醇浸膏用蒸馏水悬浮，用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和平正丁醇等依次进行萃取分离。将各萃取有机层真空旋转浓缩至凝固，得石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相和正丁醇相浸膏。

1.6 柱层析分离方法

对抑菌活性较强的萃取相浸膏进行柱层析分离。将氯仿相浸膏(19.55 g)进行柱层析，用硅胶作填料，以石油醚和乙酸乙酯的溶剂配比(12 : 1, 10 : 1, 8 : 1, 6 : 1, 4 : 1, 2 : 1, 1 : 1)为洗脱剂，进行梯度洗脱，合并成分相同的流分，共得到 21 份，浓缩为浸膏。

将第 3 个流分再次过层析柱，以石油醚和乙酸乙酯的溶剂配比(12 : 1)为洗脱剂，进行洗脱。通过分析型薄层色谱检查，合并成分相同的流分，最后得到 C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 共 8 份，自然挥发至凝固。

用液相制备从 C6 中分离得到化合物 1 和化合物 2。

1.7 抑菌活性测定方法

以生长速率法^[1]测定 4 个有机萃取相对供试 5 种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用。称取山核桃外果皮各萃取相浸膏 0.25 g，用相应的有机溶剂 5 mL 配制成质量浓度为 50 g·L⁻¹ 的母液，并配制成质量浓度为 5 和 10 g·L⁻¹ 的带毒培养基。在无菌条件下接种供试病原菌菌丝块(直径 0.4 cm)，置于 25 ℃左右恒温光照培养箱中培养，待培养 72 h 后取出培养皿(有些生长较快的病菌如水稻纹枯病菌培养 48 h)，用游标卡尺量菌落直径(十字交叉测量 2 次，取其平均数)。按下列公式计算抑制率：

菌落直径(cm) = 2 次直径平均数 - 0.4(菌饼的直径)；

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

以孢子萌发法^[2]测定分离得到的 2 个单体化合物对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌孢子萌发的抑制作用。用丙酮将化合物溶解，用移液管吸取一定量的溶液和制备好的孢子悬浮液加入小试管混合均匀，使混合液中化合物的质量浓度为 0.1 和 0.5 g·L⁻¹。用微量加样器吸取混合液滴到凹玻片上，然后

架放于带有浅水层的培养皿中, 加盖保湿培养于 28 ℃ 培养箱中。每处理设 3 个重复, 并设不含药剂的处理作空白对照。当空白对照孢子萌发率达到 90% 以上时, 检查各处理孢子萌发情况。按下列公式计算抑制率:

$$\text{孢子萌发率}(\%) = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{检查孢子总数}} \times 100;$$

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 4 个萃取相对 5 种供试病原真菌菌丝生长的抑制作用

根据苏秀^[3-4]山核桃外果皮甲醇提取液对 15 种植物病原真菌的抑制作用的试验结果, 选取其中抑制率较高的 5 种植物病原真菌为供试病原菌。采用生长速率法测定了 4 个有机萃取相对 5 种病原真菌菌丝生长的抑制作用(表 1)。结果表明, 供试质量浓度下, 正丁醇相对供试病原菌均表现出较高的抑制活性, 抑制率均达 100%, 氯仿相和石油醚相对苹果腐烂病菌的抑制活性较明显, 抑制率分别达到 82.4%, 85.5% 和 68.4%, 90.6%, 乙酸乙酯相抑菌活性较弱。供试对比质量浓度下, 质量浓度越高, 抑制率相对较高。试验结果表明正丁醇相和氯仿相对供试病菌的抑制活性相对较强, 考虑到对正丁醇相进行化学成分分离难度较大, 本试验选取氯仿相进行化学成分初步分离。

表 1 山核桃外果皮甲醇浸膏 4 个萃取相对 5 种病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition effect of extracts from the husk of *Carya cathayensis* against the hypha growth of five plant pathogens

萃取相	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%				
		水稻纹枯病菌	苹果腐烂病菌	黄瓜菌核病菌	小麦赤霉病菌	番茄早疫病菌
石油醚	5.0	36.9	68.4	37.7	15.0	9.5
	10.0	58.8	90.6	100	28.4	21.0
氯仿	5.0	30.4	82.4	12.0	16.1	4.0
	10.0	37.7	85.5	100	24.0	21.0
乙酸	5.0	—	3.1	**	—	6.6
乙酯	10.0	8.4	29.9	**	20.3	100
正丁醇	5.0	100	100	100	100	100
	10.0	100	100	100	100	100

说明: —无抑制活性; ** 为有促进生长作用。

2.2 化合物的结构鉴定

化合物 1: 黄色针状晶体; mp160 ~ 161 ℃; m/z (EI)204 (M^+ , 3.6), m/z (CI/NH₃) 205 [$(M^+H)^+$, 4.7]; ¹HNMR(CDCl₃, 400 MHz)DEPT135δ: 3.93(3H, s, OCH₃-2), 6.11(1H, s, H-3), 12.2(1H, S, OH-5); 7.67 (1H, dd, $J = 7.5$, 0.9HZ, H-8), 7.58 (1H, dd, $J = 8.2$, 7.5 HZ, H-7), 7.27 (1H, dd, $J = 8.2$, 0.9 HZ, H-6); ¹³CNMR (CD-CL₃, 100 MHz) DEPT135δ: 179.3 (s, C-1), 190.8(s, C-4), 161.1(s, C-2), 161.1(s, C-5), 125.2(d, C-6), 135.4(d, C-7), 119.5(d, C-8), 109.5(d, C-3), 114.2(s, C-4α), 131.1(s, C-8α), 56.6(q, OCH₃)。根据上述物理数据和波谱数据并参考文献[7-9]数据, 确定该化合物为 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌(5-hydroxy-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone)。分子结构见图1。

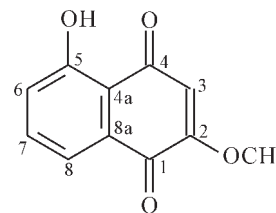


图 1 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌

Figure 1 5-hydroxy-2-methoxy-1, 4-naphthoquinone

化合物 2: 白色针晶; mp138 ~ 140 °C(丙酮)。与 β -谷甾醇标准品共 TLC(薄层色谱)测值一致; EI-MS 数据与文献[8]报道的 β -sitosterol 一致; 其 ^1H NMR(核磁共振氢谱)与 ^{13}C NMR(核磁共振碳谱)数据与王金兰等^[9]报道的一致; 混合熔点不下降, 故确定为 β -谷甾醇(β -sitosterol)。分子结构图参见文献[9]。

2.3 化合物的活性测定

采用孢子萌发法测定了分离得到的 2 种单体化合物对植物病原真菌孢子萌发的抑制作用, 测试结果表明, 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌(化合物 1)和 β -谷甾醇(化合物 2)对番茄灰霉病菌和小麦赤霉病菌的孢子萌发均表现一定的抑制活性, 其中 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌对 2 种供试病菌孢子萌发的抑制活性较高, 供试质量浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对番茄灰霉病菌和小麦赤霉病菌的孢子萌发抑制率分别为 73.9%和 100.0%(表 2)。

表 2 2 种单体化合物对植物病原真菌孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibition effect of the two compounds against spore germination of *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum*

供试化合物	$\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%	
		番茄灰霉病菌	小麦赤霉病菌
5-羟基-2-甲氧基-1,4-萘醌	0.1	65.6	50.6
	0.5	73.9	100
β -谷甾醇	0.1	42.3	15.3
	0.5	53.7	20.3

3 讨论

本研究对山核桃外果皮甲醇浸膏的氯仿萃取相中的抑菌活性成分进行了初步分离, 得到 2 种化合物, 5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌和 β -谷甾醇。目前, 尚未见山核桃外果皮化学成分的研究报道, 2 种化合物均为首次从山核桃外果皮中分离得到。

5-羟基-2-甲氧基-1, 4-萘醌属于萘醌类化合物, 是胡桃科植物中的主要化合物。Kim 等^[10]从胡桃科植物化香 *Platycary strobilacea*, Sang-Hyun Kim 等^[11]从核桃楸根中分离到该化合物, 活性试验表明, 它具有很强的抗人类结肠癌和肺癌细胞活性。该化合物对番茄灰霉病菌和小麦赤霉病菌孢子萌发的抑制作用较强, 具有进一步研究的价值。

β -谷甾醇为植物中常见的甾醇类化合物, 主要分布在植物的根、茎、叶、果实和种子中, 自然资源丰富。宋晚平^[12]从向日葵 *Helianthus annuus* 根中分离到的 β -谷甾醇, 并进行了抑菌试验, 发现它对青霉菌 *Penicillium chrysogenum*, 黑曲霉菌 *Aspergillus niger*, 康氏木霉菌 *Trichoderma koningii*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 均有一定的抑制作用, 其中对黑曲霉菌和康氏木霉菌抑制效果较好, 达到 50% 以上。余鑫平^[13]从小花假泽兰 *Mikania micrantha* 中分离到 β -谷甾醇, 并进行抑菌活性研究。结果表明, β -谷甾醇是小花假泽兰中主要抑菌活性成分之一。因此, 利用 β -谷甾醇进行农药活性系统研究开发, 可能在自然资源综合开发利用和植物病虫害防治方面取得双重效益。

山核桃外果皮甲醇浸膏不同溶剂萃取相中, 以正丁醇相的抑菌活性最强, 山核桃外果皮中富含的多酚类单宁和生物碱等化合物可能主要分布其中。作者正在对正丁醇相进行化学成分分离, 以期得到新的活性化合物, 为山核桃外果皮杀菌剂的开发奠定基础, 也可能为创制植物源杀菌剂提供新的活性化合物结构模板。

参考文献:

- [1] 张兴, 王兴林. 植物化学保护实验指导[R]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2000: 66 - 67.
ZHANG Xing, WANG Xinglin. *Experiment Instruction on Chemical Protection of Plant* [R]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2000: 66 - 67.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 152.

- [3] 苏秀. 山核桃外果皮提取物抑菌活性的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25** (3): 355 – 358.
SU Xiu. Antifungal and antibacterial activity of extracts from the husk of *Carya cathayensis* Sarg.[J]. *J Zhejiang For Coll* 2008, **25** (3): 355 – 358.
- [4] 苏秀. 山核桃外果皮提取物抑菌杀虫活性研究[D]. 临安: 浙江林学院, 2007.
SU Xiu. *Fungicide and Insecticidal Activity of the Extracts from Husk of Carya Cathayensis* Sarg.[D]. Lin'an: Zhejiang Forestry College, 2007.
- [5] KHALAFY J, BRUCE J M. Oxidative dehydrogenation of 1-tetralones: synthesis of juglone, aphthazarin, and α -hydroxyanthraquinones[J]. *J Sci Isl Repub Iran*, 2002, **13** (2): 131 – 139.
- [6] BARRE G, HOCQUAUX M, JACQUET B, *et al.* Differentiation entre les dihydroxy-2, 5 et -3, 5 naphthoquinones-1, 4 par resonance magnetique nucleaire du ^{13}C et ^1H , et heteronucleaire a deux dimensions[J]. *Tetrahedron Lett*, 1986, **51**: 6197 – 6200.
- [7] KHANNA R N, SINGH K P, YADAV S K, *et al.* Iodine catalysed alkyloxylation of naphthoquinones [J]. *Synt Commun*, 1989, **19**: 3151 – 3157.
- [8] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 754.
- [9] 王金兰, 田孝平, 郭洪利, 等. 山核桃树皮中生理活性成分的研究(1)[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2004, **20** (3): 7 – 9.
WANG Jinlan, TIAN Xiaoping, GUO Hongli, *et al.* The study on the biologically active components of the bark of *Juglans mandshurica* Maxim. [J]. *J Qiqihar Univ*, 2004, **20** (3): 7 – 9.
- [10] KIM Y I, LEE S H, CHO T S. Isolation of anticancer agents from the leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z. [J]. *Kor J Pharm*, 1996, **27** (3): 238 – 245.
- [11] KIM S H, LEE K S, SON J K, *et al.* Cytotoxic compounds from the Roots of *Juglans mandshurica*[J]. *J Nat Prod*, 1998, **61**: 643 – 645.
- [12] 宋晚平. 向日葵根中活性成分的提取分离研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
SONG Wanping. *Study on Extraction and Isolation of Bioactive Chemical Constitutes in Root of Helianthus annuus* [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2004.
- [13] 余鑫平. 小花假泽兰杀菌活性成分研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
YU Xinpeng. *Active Anti-microbial Ingredients in Mikania micrantha* [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2006.