张星哲,孟祥海,王佰成,等.醉蝶花主要成分提取及其对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):120-130.
Zhang X Z, Meng X H, Wang B C, et al.Extraction of main components from *Cleome spinosa* and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):120-130.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202406031

醉蝶花主要成分提取及其对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性

张星哲[1,2],孟祥海[1],王佰成[1],时新瑞[1],杨冰[1],王文慧[1],张艳菊[2*]

(1.黑龙江省农业科学院 牡丹江分院,黑龙江 牡丹江 157000;2.东北农业大学 植物保护学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘　要:[目的]确定醉蝶花活性物质最佳提取工艺并分析其主要成分,明确这些主要成分对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性与盆栽防效,以期为开发新的植物源农药,推动病虫害的绿色防控、农业的可持续发展提供参考依据。[方法]在单因素试验中,以提取物得率和抑菌率为指标,选取溶剂种类(无菌水以及甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、环己烷和丙酮)、乙醇浓度、萃取时间、料液比、萃取温度5个因素进行单因素试验。乙醇浓度选取20%、30%、40%、50%、60%、70%和80%,萃取时间选取1、2、3、4、5、6、7和8 h八个水平,料液比选取1∶3、1∶4、1∶5、1∶6、1∶7、1∶8和1∶9七个水平,萃取温度选取20、25、30、35、40、45和50 ℃七个水平。随后以单因素试验为基础,溶剂选择乙醇,根据萃取时间、温度、乙醇浓度进行正交试验设计。采用GC/MS分析醉蝶花活性物质主要成分,从中选取部分物质对黄瓜枯萎病菌进行处理。[结果]醉蝶花活性物质最佳提取工艺为萃取时间5 h、料液比1∶8、乙醇浓度60%和萃取温度30 ℃,在此条件下共分离出59种化合物,以牡丹酚含量最多;醉蝶花12种主要成分对黄瓜枯萎病菌的生长具有明显的抑制作用;芳樟醇、牡丹酚和茶香螺烷对黄瓜枯萎病菌的毒力回归方程分别为$Y=12.337\ 7+0.472\ 6X$(EC_{50}值为0.169 2 g·L^{-1})、$Y=12.258\ 0+0.542\ 8X$(EC_{50}值为0.294 3 g·L^{-1})和$Y=12.377\ 9+0.493\ 2X$(EC_{50}值为0.196 2 g·L^{-1});而茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病的盆栽防效分别为68.2%、80.6%和75.7%。[结论]醉蝶花主要成分中的茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚可以有效地抑制黄瓜枯萎病菌,对黄瓜枯萎病有很好的防治作用。

关键词:醉蝶花; 活性物质; 提取工艺; 成分分析; 抑菌活性; 盆栽防效
中图分类号:S182;S435.72　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0120-11

植物可以产生各种各样的次生代谢物,不少代谢物有多种生物活性,例如防病、杀菌等,多种植物产生的次生代谢产物对多种病菌都有抑制作用[1-2]。植物体内的萜烯类、生物碱、类黄酮等次生代谢物质都能够杀虫,或者具有一定的抗菌活性[3]。所以,作为庞大的一个资源库,植物是探究和发现新型杀菌剂的最好资源。近十多年来,农药相关领域的科研人员高度关注从不同植物中提取的精油对植物病原菌的抑制作用,使植物精油成为一种原料易得的新型农药。同时,从植物精油中发现了一些具有较好抑菌效果的单体化合物[4-5]。醉蝶花(*Cleome spinosa*)作为一种草本植物,其生长期为一到二年,在植物分类学上属于白菜花科[6]。醉蝶花除了观赏价值外,还具有抗菌、镇痛、消炎、驱虫等药理作用[7],但是其活性成分未知。因此,确定醉蝶花活性物质的最佳提取工艺,并分析其主要成分,对于开发新的植物源农药,进而推动病虫害的绿色防控、农业的可持续发展具有重大的应用价值。Ana等[8]于2016年利用环己烷、氯仿、乙酸乙酯和甲醇从醉蝶花叶片和根中提取活性物质,研究了提取物对细菌和酵母菌在内的17种人类病原菌的抑菌活性,结果表明,所有的提取物都显示出广泛的抗菌活性,环己烷萃取物抑菌效果最佳,对金黄色葡萄球菌具有较好的抑制活性。

以往对于醉蝶花活性物质的提取工艺、成分

收稿日期:2024-06-18　　**修回日期**:2024-08-10
基金项目:国家自然科学基金项目(31171792);2023年度省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2023-1-C006)
作者简介:张星哲(ORCID:0009-0005-8976-8773),博士,副研究员,研究方向:植物保护,E-mail:321893534@qq.com
*通信作者:张艳菊(ORCID:0000-0003-3578-7061),博士,教授,E-mail:zhangyanju1968@163.com

分析及其抑菌活性缺乏系统的研究。本试验分别采用单因素和正交设计研究萃取时间、乙醇浓度、料液比、萃取温度等因素对醉蝶花活性物质提取率的影响,分析了最佳提取工艺下的醉蝶花活性物质主要成分,并采用醉蝶花的12种主要成分作为处理试剂,测定了其对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性与盆栽防效,为今后从中筛选高效抑菌物质、为农业生产上减少化学农药污染、实现病虫害的绿色防控提供理论和实践依据。

1　材料与方法

1.1　醉蝶花活性物质提取方法

取50 g醉蝶花全株粉碎物于样品瓶中,按料液比所需容量加入60%的乙醇溶液中,于25 ℃摇床中震荡萃取4 h后,取出样品过滤、离心后,经旋转蒸发仪浓缩至干,精确称量,计算得率(提取率),再用少量20%乙醇溶解并用灭菌过的蒸馏水定容至50 mL,其提取物浓度为1 g·mL^{-1},于4 ℃冰箱中保存待用。每组试验重复3次。

$$\text{提取物得率}=\frac{\text{提取物重量}}{\text{样品重量}}\times 100\%$$

1.2　单因素试验

以提取物得率和抑菌率为指标,选取溶剂种类(无菌水以及甲醇、乙醇、乙酸乙酯、氯仿、环己烷和丙酮)、乙醇浓度、萃取时间、料液比、萃取温度5个因素进行单因素试验。乙醇浓度选取20%、30%、40%、50%、60%、70%和80%。萃取时间选取1、2、3、4、5、6、7和8 h八个水平,料液比选取1∶3、1∶4、1∶5、1∶6、1∶7、1∶8和1∶9七个水平,萃取温度选取20、25、30、35、40、45和50 ℃七个水平。

1.3　正交试验

以单因素试验为基础,溶剂选择乙醇,根据萃取时间、温度以及料液比进行正交表的相关设计。如表1所示。

1.4　抑菌率的测定

将在PSA培养基上培养7 d的黄瓜枯萎病菌,用直径为0.85 cm的打孔器在菌落边缘打孔切取生长能力相同的菌饼,用移菌钩将菌饼接种于倒有PSA的9.0 cm培养皿中央,在培养皿皿盖上面分别加入各处理提取物2 mL,以不加任何物质的平板作为对照,快速盖上接种菌饼的培养皿底,重复次数为5,密封存放在25 ℃培养箱内避光培养。间隔24 h采用十字交叉法测定各菌落直径。

表1　正交试验影响因素及各水平

Table 1　Factors and levels in orthogonal test

水平 Level	乙醇浓度/% Ethanol concentration	萃取时间/h Extraction time	料液比/(g·mL^{-1}) Solid−liquid ratio	萃取温度/℃ Extraction temperature
1	50	3	1∶6	30
2	60	4	1∶7	35
3	70	5	1∶8	40

$$\text{抑菌率}=\frac{\text{对照增长直径}-\text{处理增长直径}}{\text{对照增长直径}}\times 100\%$$

1.5　醉蝶花提取物成分分析

将用1.3中通过正交试验筛选的最佳提取工艺所得的醉蝶花提取物用500 μL色谱纯乙醇稀释,放入5 mL液相瓶中封好以备GC/MS分析。

采用HP-5MS色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度250 ℃;柱温起始温度50 ℃,保持2 min,5 ℃·min^{-1}升温到200 ℃,保持2 min,5 ℃·min^{-1}升温至280 ℃,不分流进样,1 μL进样量。MS条件:离子源和四极杆温度分别为230和150 ℃,扫描范围30～420 amu。利用NIST05标准质谱库分析试验获得的成分。

1.6　供试试剂

见表2。

1.7　醉蝶花12种主要成分对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性

采用菌丝生长速率法测定醉蝶花挥发性物质对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性。

用直径为0.85 cm的打孔器在黄瓜枯萎病菌菌落边缘打孔切取菌饼,用移菌钩将菌饼接种于PSA培养基的培养皿(r=4.50 cm,h=1.80 cm)中央,在培养皿皿盖上分别加入0.3 g(液体药剂根据密度算出所用体积)12种醉蝶花挥发性物质,处理分别为:T_1:芳樟醇、T_2:牡丹酚、T_3:茶香螺烷、T_4:十四烷基环氧乙烷、T_5:二十四烷、T_6:十七烷、T_7:乙基环戊烯醇酮、T_8:二十八烷、T_9:1,1,4a-三甲基-3,4,4a,5,6,7-六氢-2-(1H)-萘酮、T_{10}:9,12,15-十八碳三烯酸甲酯、T_{11}:植酮、T_{12}:三十五碳-17-烯、CK:清水对照,用封口膜封口,置于28 ℃

表2 试验所用试剂及其生产厂家

Table 2 Reagents for experiments and their manufacturers

名称 Name	生产厂家/提供单位 Manufacturer/provider
牡丹酚	上海源叶生物科技有限公司
芳樟醇	上海麦克林生化科技有限公司
十四烷基环氧乙烷	上海源叶生物科技有限公司
二十四烷	上海源叶生物科技有限公司
十七烷	上海源叶生物科技有限公司
乙基环戊烯醇酮	上海源叶生物科技有限公司
茶香螺烷	上海麦克林生化科技有限公司
二十八烷	上海源叶生物科技有限公司
1,1,4a-三甲基-3,4,4a,5,6,7-六氢-2-(1H)-萘酮	中宜生物科技有限公司
9,12,15-十八碳三烯酸甲酯	中宜生物科技有限公司
植酮	中宜生物科技有限公司
三十五碳-17-烯	中宜生物科技有限公司

注:以上试剂均为分析纯

Note: The above reagents are all analytical grade

培养箱中培养,黑暗处理。各处理重复次数为5,间隔1 d天用十字交叉法垂直测定各菌落直径,计算均值,连续测定7次,根据第7次测得的结果计算醉蝶花12种挥发性物质对黄瓜枯萎病菌的抑制作用。

1.8 醉蝶花提取物抑菌有效成分对黄瓜枯萎病菌的毒力测定

根据茶香螺烷、牡丹酚和芳樟醇3种物质在GC/MS试验获得的挥发性物质所占比率进行熏蒸试验设计,培养皿中茶香螺烷、牡丹酚和芳樟醇含量分别为:茶香螺烷0、0.081、0.153、0.234、0.306和0.387 g·L^{-1};牡丹酚0、0.135、0.279、0.414、0.549和0.693 g·L^{-1};芳樟醇0、0.117、0.225、0.342、0.459和0.567 g·L^{-1},其余试验方法同上。1周后采用十字交叉法测定各菌落直径,计算出抑菌率。

通过DPS软件,进行药剂剂量与抑菌率之间的线性回归分析,把抑菌率进行机率值(Y)转化,药剂剂量(g·L^{-1})进行对数(X)转化,算出毒力回归方程Y=A+BX,相关系数R^2,结合上述方程算出有效抑制中浓度EC_{50}。

1.9 醉蝶花提取物抑菌有效成分对黄瓜枯萎病的盆栽防效

观察黄瓜枯萎病菌生长情况,待其培养好后转移至PL培养液内,于恒温摇床(25 ℃、110 r·min^{-1})内培养1周。将菌丝液过滤后,留下滤液离心处理(4 ℃、4000 r·min^{-1}、5 min),弃掉上清,添加灭菌双蒸水,稀释孢子制备菌悬液浓度为1.0×10^{7}个·mL^{-1}。

盆栽试验在花盆(底部直径为16 cm、上部直径为30 cm、高为17 cm)内进行,每个花盆内装入4 kg营养土,加入200 mL 1.0×10^{7}个·mL^{-1}菌悬液,充分混匀,7 d后进行醉蝶花及其挥发性物质熏蒸处理。芳樟醇、牡丹酚 、茶香螺烷、醉蝶花添加量分别为20.85 g·m^{-2}、25.72 g·m^{-2}、17.15 g·m^{-2}、2.22 kg·m^{-2},以及20.00 g·m^{-2}氯化苦处理作为参照,以只接枯萎病菌不进行熏蒸处理为对照。添加醉蝶花和各挥发性物质后立即覆盖塑料薄膜进行熏蒸,15 d后接膜,对土壤进行松土、敞气24 h后移栽黄瓜幼苗。每个处理10株,3次重复。10~14 d后调查发病情况,病情分级标准同表3,根据病情指数计算防病效果。

病情指数=100×∑(各级病株数目×各级代表值)/(调查总株数目×最高级代表值)

防病效果=(对照区病情指数-处理区病情指数)/对照区病情指数

表3 黄瓜枯萎病分级标准

Table 3 Classification criteria of cucumber Fusarium wilt

等级 Grade	发病状况 Disease incidence status
0	无任何病症
1	胚轴或者子叶表现出轻微病症,没有影响生长
2	胚轴或者子叶表现为明显坏死斑,或者1片子叶黄化,对生长有影响
3	2片子叶黄化,或是1片子叶枯死
4	1片子叶生长僵化,植株部分萎蔫或停止生长
5	整株萎蔫、倒伏或枯死

1.10 统计分析

利用SPSS 20.0通过邓肯新复极差法进行差异显著性分析,数据取3次独立重复的平均值,误差线代表重复间的标准偏差,相同字母代表无显著差异,不同字母代表在0.05水平上存在显著差异。

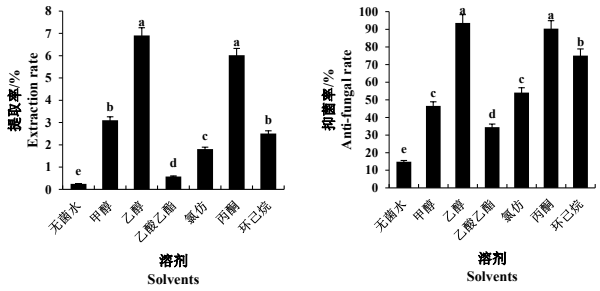
2 结果与分析

2.1 醉蝶花活性物质提取率单因素试验结果与分析

2.1.1 不同溶剂对醉蝶花活性物质提取率的影响

在其它萃取条件不变的前提下,温度保持在45 ℃,本试验采用无菌水以及甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、环己烷和丙酮6种有机溶剂对醉蝶

花成分进行提取。从图1可以看出,无菌水、甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、丙酮和环己烷对醉蝶花植株的提取率分别为0.247%、3.102%、6.908%、0.575%、1.804%、6.024%和2.503%。可见,无水乙醇对醉蝶花的提取率最高,而无菌水的提取率最低。抑菌率实验表现出了相近的趋势,醉蝶花以无菌水、甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、丙酮和环己烷为溶剂的提取物对黄瓜枯萎病菌的抑菌率分别为14.8%、46.5%、93.6%、34.5%、54.1%、90.4%和75.1%。从以上结果看出,用乙醇提取醉蝶花,无论从提取率和抑菌率来看效果都是最好,且乙醇无任何毒性,因此,后续的试验采用醉蝶花的乙醇提取物进行。



注:不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同

Note: Different letters indicated significant differences at $P<0.05$ level, the same below

图1　不同溶剂对醉蝶花提取率和黄瓜枯萎病菌抑菌率的影响

Fig. 1　Effects of different solvents on the extraction rate and inhibition rate of *C.spinosa* against *F. oxysporum*

2.1.2　萃取时间对醉蝶花活性物质提取率的影响

本试验选取无水乙醇作为提取溶剂并固定其它萃取条件,温度保持在45 ℃,研究萃取时间对醉蝶花提取率的影响情况。随着萃取时间的延长,醉蝶花活性物质提取率先上升后下降(图2)。在萃取时间为4和5 h时,提取率最高为7.065%和7.104%。同时,萃取时间4、5 h的提取率显著高于1、2 h和7、8 h。此外,当萃取时间为4、5和6 h时,对黄瓜枯萎病菌的抑菌率也最高。因此,醉蝶花提取物的最佳萃取时间是4和5 h。

2.1.3　醉蝶花与乙醇料料液比对醉蝶花活性物质提取率的影响

本试验固定萃取时间等其它条件,温度保持在45 ℃,研究醉蝶花与无水乙醇料液比对醉蝶花活性物质提取率的影响情况。当醉蝶花与乙醇料液比范围在1:3～1:6时,醉蝶花的活性物质提取率表现出随着料液比降低而急剧增加的趋势,而当料液比超过1:6时,醉蝶花活性物质提取率不再增加甚至略有下降(图3)。而料液比1:7对黄瓜枯萎病菌的抑菌率在各处理中为最高。可见,用乙醇溶剂提取醉蝶花的最佳料液比是1:6和1:7。

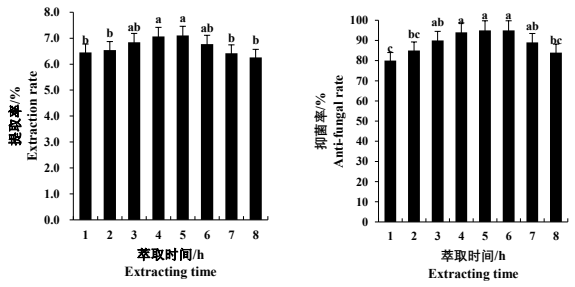


图2　不同萃取时间对醉蝶花提取率和黄瓜枯萎病菌抑菌率的影响

Fig. 2　Effects of different extracting time on extraction rate and inhibition rate of *C. spinosa* against *F. oxysporum*

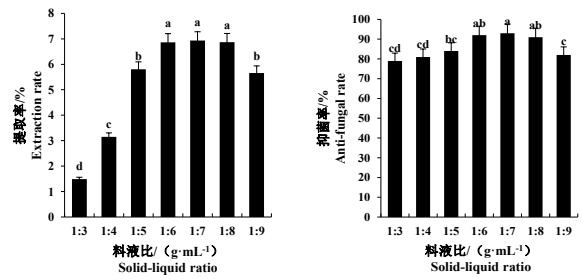


图3　不同料液比对醉蝶花提取率和黄瓜枯萎病菌抑菌率的影响

Fig. 3　Effects of solid-liquid ratio on refined oil extraction rate and inhibition rate of *C. spinosa* against *F. oxysporum*

2.1.4　乙醇浓度对醉蝶花活性物质提取率的影响

在萃取时间、料液比等其他条件固定不变的前提下,温度保持在45 ℃,研究不同乙醇浓度对醉蝶花活性物质提取率的影响情况。从图4可以看出,随着乙醇浓度的增加,醉蝶花活性物质提取率先是急剧增加,但当乙醇浓度达到40%时,提取率不再明显增加,当乙醇浓度在60%时提取率到达峰值7.045%,且对黄瓜枯萎病菌的抑菌率也达到最大值93%,随后提取率开始略有下降。可见,醉蝶花提取的最佳乙醇浓度是60%。

2.1.5　萃取温度对醉蝶花活性物质提取率的影响

保持萃取时间、乙醇浓度以及料液比等条件相同,采用不同温度对醉蝶花进行萃取。从图5可以看出,随着萃取温度的提高,醉蝶花活性物质提取率先是快速提高,当萃取温度达到30 ℃后,提取

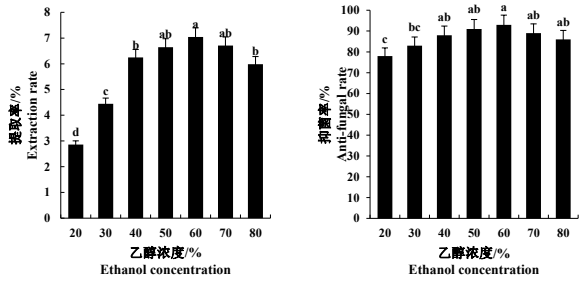


图4 乙醇浓度对醉蝶花提取率和黄瓜枯萎病菌抑菌率的影响

Fig. 4 Effects of ethanol concentration on extraction rate and inhibition rate of *C. spinosa* against *F. oxysporum*

率不再明显上升,当萃取温度提升到35 ℃时,提取率达到最大值6.8%,抑菌率达到最大值95%,随后提取率和抑菌率均开始有所下降。可见醉蝶花的最佳萃取温度是35 ℃。

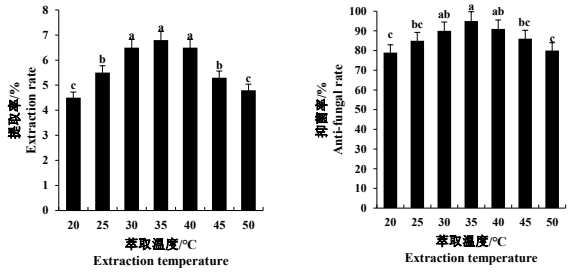


图5 萃取温度对醉蝶花提取率和黄瓜枯萎病菌抑菌率的影响

Fig. 5 Effects of extraction temperature on the extraction rate and inhibition rate of *C. spinosa* against *F. oxysporum*

2.2 醉蝶花活性物质提取率正交试验结果与分析

基于单因素试验,溶剂为乙醇,指标为醉蝶花活性物质提取率,选择正交试验进行醉蝶花提取物萃取工艺条件的优化,以保证其在试验中具有最佳工艺条件。单因素试验结果表明,醉蝶花活性物质提取率最高的萃取时间是4与5 h时,抑菌率在5和6 h萃取时间时为最高,从省时角度出发,选取3、4和5 h 3个水平条件继续优化;料液比1∶6之后,醉蝶花活性物质提取率和抑菌率均不再显著提高,故正交试验选取料液比1∶6、1∶7和1∶8 3个水平进行优化;乙醇浓度在60%时提取率和抑菌率最高,故选取50%、60%和70% 3个水平继续优化;当萃取温度为35 ℃时醉蝶花活性物质提取率和抑菌率最高,故选取30、35和40 ℃三个水平进行优化。

醉蝶花活性物质提取率的正交试验结果表明(表4),在9组正交试验组合中,9号试验$A_3B_3C_2D_1$的醉蝶花活性物质提取率最高为7.102%。也就是说,萃取时间5 h、料液比1∶8、乙醇浓度60%和萃取温度30 ℃是几组试验中的最优条件。

正交试验极差结果为$R_A>R_C>R_D>R_B$(表4),表明这4个因素对醉蝶花活性物质提取率的影响程度不同,其影响大小顺序为:萃取时间>乙醇浓度>萃取温度>料液比。这些结果说明,虽然所选各因素对醉蝶花活性物质提取率均有一定的影响,但萃取时间对乙醇萃取醉蝶花活性物质提取率的影响最为重要,其次是乙醇浓度和料液比。

根据每列K值大小预测本试验的最优组合为$A_3B_1C_2D_2$(表2),这与根据提取率得出的结果略有不同,然而B和D因素间的K值相差都不明显,因此,仍可认为$A_3B_3C_2D_1$组合是乙醇萃取醉蝶花提取物的最佳工艺条件,即萃取时间5 h、料液比1∶8、乙醇浓度60%和萃取温度30 ℃。

表4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test

试验号 Test number	因素及水平 Factors and levels A 萃取时间/h	B 料液比	C 乙醇浓度/%	D 萃取温度/℃	提取率/% Extraction rate
1	3	1∶6	50	30	6.832
2	3	1∶7	60	35	6.957
3	3	1∶8	70	40	6.854
4	4	1∶6	60	40	7.008
5	4	1∶7	70	30	6.984
6	4	1∶8	50	35	6.963
7	5	1∶6	70	35	7.089
8	5	1∶7	50	40	6.976
9	5	1∶8	60	30	7.102
K_1	20.643	20.929	20.771	20.918	
K_2	20.955	20.917	21.067	21.009	
K_3	21.167	20.919	20.927	20.838	
k_1	6.881	6.976	6.924	6.973	
k_2	6.985	6.972	7.022	7.003	
k_3	7.056	6.973	6.976	6.946	
R	0.175	0.004	0.098	0.057	

2.3 醉蝶花提取物成分分析

采用面积归一法对各成分的相对含量进行分析,结合质谱检索数据库对醉蝶花提取物成分进行鉴定分析。所得成分的GC-MS总离子谱图见图6。萃取时间5 h、料液比1∶8、乙醇浓度60%和萃取温度30 ℃的条件下共分离出59种化合物(表5)。主要成分有:牡丹酚(22.58%)、十四烷基环

氧乙烷(3.16%)、正二十四烷(3.11%)、正十七烷(2.91%)、正二十八烷(2.13%)、乙基环戊烯醇酮(2.68%)、茶香螺烷(2.53%)、芳樟醇(2.19%)、2,4-二甲基庚烷(1.78%)、(E)-2-己烯-1-醇(2.47%)、苯并环丁烯(1.34%)、2,3,7-三甲基癸烷(2.61%)、3,7-二甲基癸烷(1.26%)、2,4-二甲基十二烷(1.15%)、2,6,11-三甲基十二烷(2.45%)、5-乙基-2-甲基辛烷(1.29%)、正二十一烷(2.42%)、2-溴十二烷(1.31%)、1-羟基环己基苯基甲酮(1.25%)、十八醛(1.70%)、叶绿醇(4.85%)和2-甲基十六烷(1.34%)。

表5　醉蝶花提取物成分

Table 5　Chemical constituents of extracts from *C. spinosa*

化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content	化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content
牡丹酚	$C_8H_{10}O_3$	22.58	正十七烷	$C_{17}H_{36}$	2.91
十四烷基环氧乙烷	$C_{10}H_{32}O_2$	3.16	1－碘十三烷	$C_{13}H_{27}I$	0.05
乙基环戊烯醇酮	$C_7H_{10}O_2$	2.68	正癸烷	$C_{10}H_{22}$	0.26
茶香螺烷	$C_{13}H_{22}O$	2.53	正二十四烷	$C_{24}H_{50}$	3.11
芳樟醇	$C_{10}H_{18}O$	2.19	正二十一烷	$C_{21}H_{44}$	2.42
2,4－二甲基庚烷	C_9H_{20}	1.78	正十八烷	$C_{18}H_{38}$	0.73
4－甲基辛烷	C_9H_{20}	0.87	正三十烷	$C_{30}H_{62}$	0.33
(E)－2－己烯－1－醇	$C_6H_{12}O$	2.47	2,4－叔丁基苯酚	$C_{14}H_{22}O$	0.95
苯并环丁烯	C_8H_8	1.34	2,3,5－三甲基癸烷	$C_{13}H_{28}$	0.35
2－甲基壬烷	$C_{10}H_{22}$	0.25	2－溴十二烷	$C_{12}H_{25}Br$	1.31
2,4－二甲基己烷	C_8H_{18}	0.39	正二十五烷	C25H52	0.49
2,2,4,6,6－五甲基庚烷	$C_{12}H_{26}$	0.22	壬二酸	$C_9H_{16}O_4$	0.48
2,2,3,3,5,6,6－庚甲基庚烷	$C_{14}H_{30}$	0.56	正二十六烷	$C_{26}H_{54}$	0.32
2,5－二甲基壬烷	$C_{11}H_{24}$	0.47	1－羟基环己基苯基甲酮	$C_{25}H_{30}O_3$	1.25
4－甲基癸烷	$C_{11}H_{24}$	0.85	3－甲基－十二烷	$C_{13}H_{28}$	0.77
2,3,7－三甲癸烷	$C_{13}H_{28}$	2.61	2－溴四氢呋喃	C_4H_7OBr	0.5
4－乙基癸烷	$C_{12}H_{26}$	0.83	正二十八烷	$C_{28}H_{58}$	2.13
3,7－二甲基癸烷	$C_{12}H_{26}$	1.26	碘代十八烷	$C_{18}H_{37}I$	0.69
5－甲基－十一烷	$C_{12}H_{26}$	0.42	2,9－二甲基十一烷	$C_{13}H_{28}$	0.58
3,7－二甲基壬烷	$C_{11}H_{24}$	0.8	十六醛	$C_{16}H_{32}O$	0.72
正十九烷	$C_{19}H_{40}$	0.42	萘烷	$C_{10}H_{18}$	0.49
6－甲基十二烷	$C_{13}H_{28}$	0.51	正四十四烷	$C_{44}H_{90}$	0.46
4,6－二甲基十二烷	$C_{14}H_{30}$	0.53	3－甲基－十三烷	$C_{14}H_{30}$	0.39
2,3,8－三甲基癸烷	$C_{13}H_{28}$	0.26	正三十四烷	$C_{34}H_{70}$	0.93
2,4－二甲基十二烷	$C_{14}H_{30}$	1.15	十八醛	$C_9H_{16}O_2$	1.7
2,6,11－三甲基十二烷	$C_{15}H_{32}$	2.45	正三十一烷	$C_{31}H_{64}$	0.44
2,4,6－三甲癸烷	$C_{13}H_{28}$	0.73	叶绿醇	$C_{20}H_{40}O$	4.85
正十六烷	$C_{16}H_{34}$	0.53	2－甲基十六烷	$C_{17}H_{36}$	1.34
3－乙基－3－甲基庚烷	$C_{10}H_{22}$	0.54	2,2′－亚甲基双－(4－甲基－6－叔丁基苯酚)	$C_{23}H_{32}O_2$	0.63
5－乙基－2－甲基辛烷	$C_{11}H_{24}$	1.29	正二十烷	$C_{20}H_{44}$	0.94
1－碘十二烷	$C_{12}H_{25}I$	0.33	2－甲基－3－苯基－1H－吲哚	$C_{15}H_{13}N$	0.75
正十四烷	$C_{14}H_{30}$	0.58	正二十七烷	$C_{27}H_{56}$	0.61

2.4　醉蝶花12种主要成分对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性

图7为12种醉蝶花主要成分对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果。从图中可见,经十四烷基环氧乙烷、二十四烷、十七烷、乙基环戊烯醇酮、二十八烷、叶绿醇、2,3,7-三甲基癸烷、(E)-2-己烯-1-醇和2,6,11-三甲基十二烷处理7 d后的黄瓜枯萎病菌生长与空白对照处理的基本无差异,菌丝长满培养

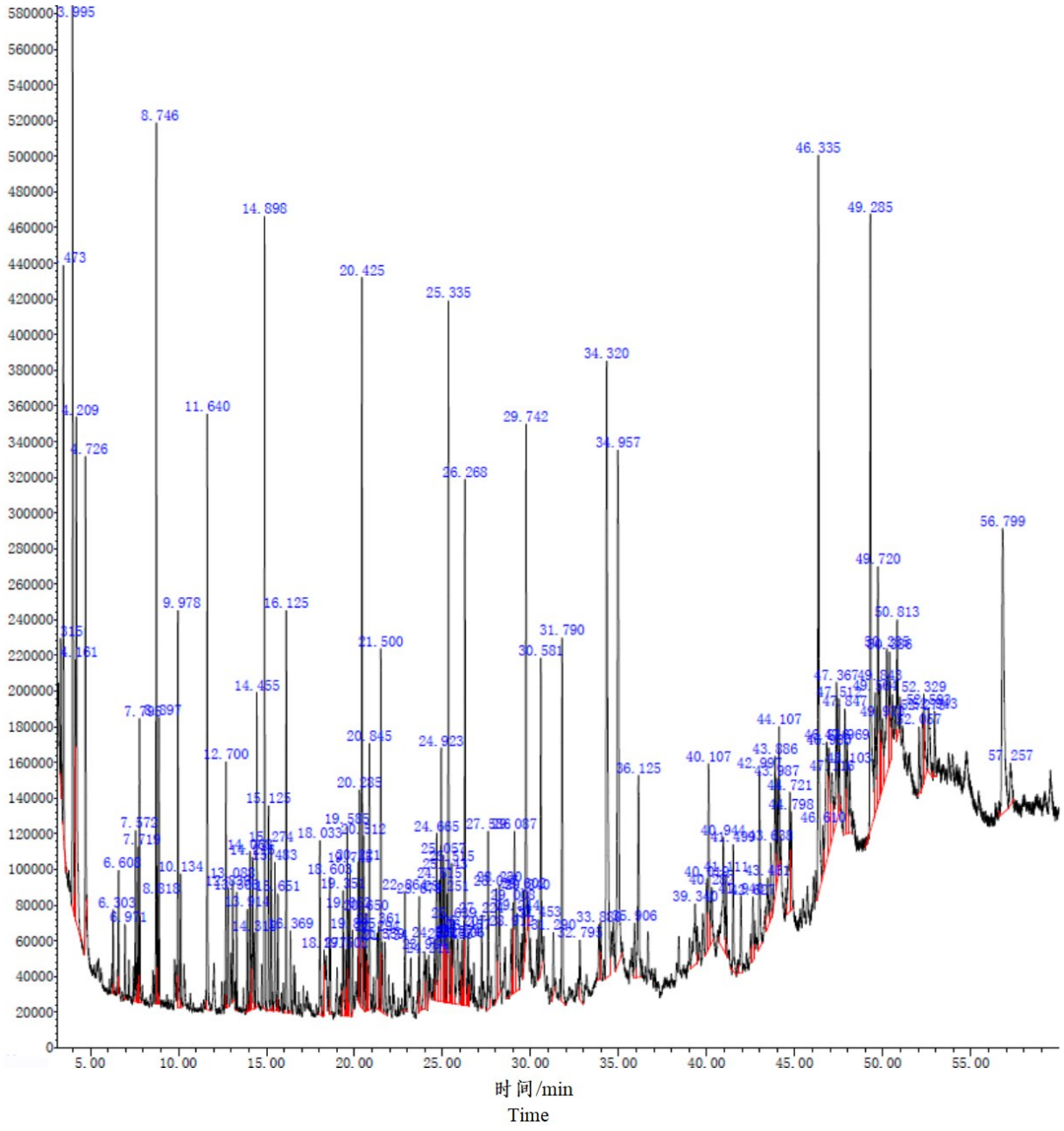


图6 醉蝶花提取物成分质谱图

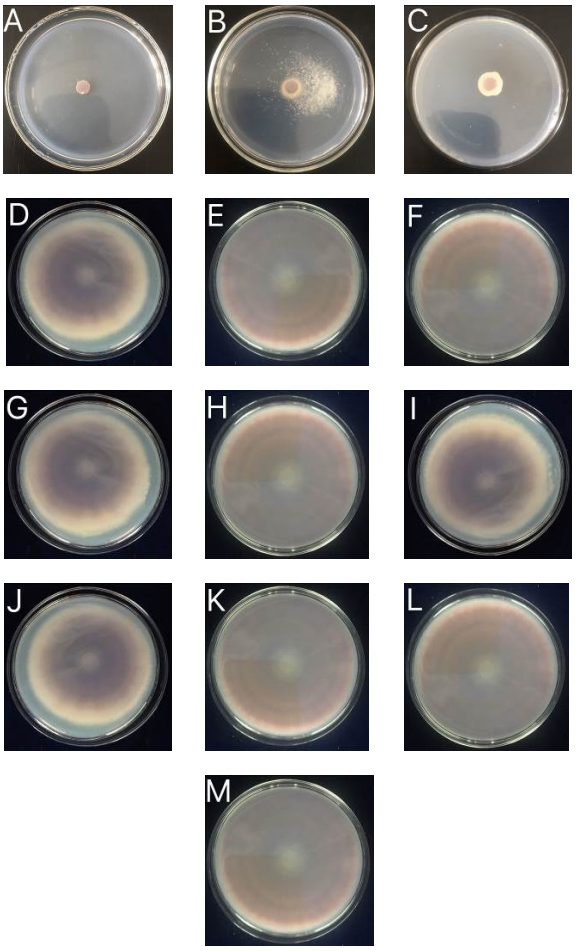
Fig. 6 Mass spectrum of *C. spinosa* extract components

皿,说明这9种物质对黄瓜枯萎病菌均无抑制作用,只有茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病菌有抑制作用(图7A-图7C),抑制率分别为99.9%、96.2%和91.0%。

2.5 茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病菌的毒力

进一步研究不同剂量茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病的抑菌作用和毒力,结果见表5和图8-图10。通过图8-图10可以看出,随着培养皿中3种物质剂量的增加,抑制作用也逐渐增强。芳樟醇剂量为0.117、0.225、0.342、0.459和0.567 g·L^{-1}时抑菌率分别为24.7%、69.9%、90.3%、96.7%和98.8%。茶香螺烷剂量为0.081、0.153、0.234、0.306和0.387 g·L^{-1}时抑菌率分别为0.3%、4.6%、31.4%、53.3%和72.0%;牡丹酚剂量为0.135、0.279、0.414、0.549和0.693 g·L^{-1}时抑菌率分别为23.6%、75.2%、92.5%、97.7%和99.7%。

将抑菌率转化为机率值(Y),药剂剂量(g·L^{-1})转化为对数(X),求出毒力回归方程Y=A+BX,



A:芳樟醇;B:牡丹酚;C:茶香螺烷;D:十四烷基环氧乙烷;E:二十四烷;F:十七烷;G:乙基环戊烯醇酮;H:二十八烷;I:叶绿醇;J:2,3,7-三甲基癸烷;K:(E)-2-己烯-1-醇;L:2,6,11-三甲基十二烷;M:对照

A: linalool; B: paeonol; C: tea spirane; D: tetradecyl epoxyethane; E: tetracosane; F: heptadecane; G: ethylcyclopentenolone; H: octacosanol; I: phytol; J: 2,3,7-trimethyldecane; K: (E) 2-Hexen-1-ol; L: 2,6,11-trimethyldodecane; M: control

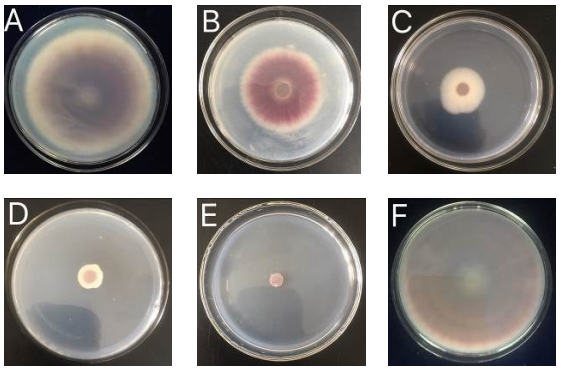
图7　12种醉蝶花挥发性物质对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果

Fig. 7　The inhibition effects of 12 volatile substances from *C. spinosa* on *F. oxysporum*

相关系数R^2,并根据方程计算有效抑制中浓度EC_{50}。芳樟醇对黄瓜枯萎病菌的毒力回归方程为Y=12.337 7+0.472 6X,EC_{50}值为0.169 2 g·L^{-1};牡丹酚对黄瓜枯萎病菌的毒力回归方程为Y=12.258 0+0.542 8X,EC_{50}值为0.294 3 g·L^{-1};茶香螺烷黄瓜枯萎病菌的毒力回归方程为Y=12.377 9+0.493 2X,EC_{50}值为0.196 2 g·L^{-1}。

3.3　茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病的盆栽防效

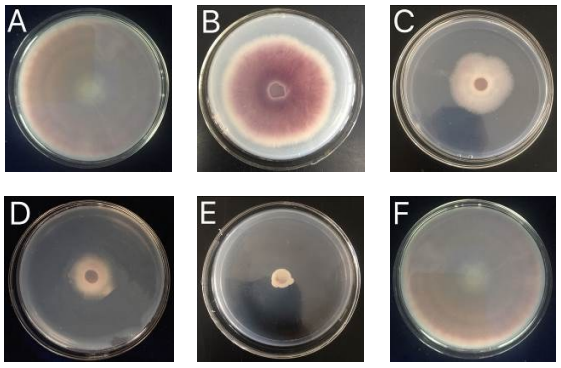
图11为芳樟醇、牡丹酚、茶香螺烷及醉蝶花粉碎物对黄瓜枯萎病的盆栽防效。由图可见,醉蝶花粉碎物及3种挥发性物质对黄瓜枯萎病的盆栽防效差异显著。芳樟醇熏蒸对黄瓜枯萎病的盆栽防治效果最好,为80.6%,其次为牡丹酚处理,防效为75.7%,氯化苦、醉蝶花整株和茶香螺烷的防



A:0.117 g·L^{-1};B:0.225 g·L^{-1};C:0.342 g·L^{-1};D:0.459 g·L^{-1};E:0.567 g·L^{-1};F:CK

图8　芳樟醇不同剂量对黄瓜枯萎病菌的抑制作用

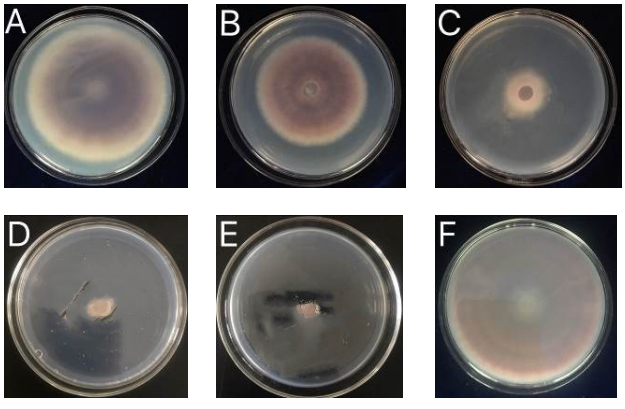
Fig. 8　Inhibition effects of different doses of linalool against *F. oxysporum*



A:0.081 g·L^{-1};B:0.153 g·L^{-1};C:0.234 g·L^{-1};D:0.306 g·L^{-1};E:0.387 g·L^{-1};F:CK

图9　茶香螺烷不同剂量对黄瓜枯萎病菌的抑制作用

Fig. 9　Inhibition effects of different doses of tea spirane against *F. oxysporum*



A: 0.135 g·L^{-1}; B: 0.279 g·L^{-1}; C: 0.414 g·L^{-1}; D: 0.549 g·L^{-1}; E: 0.693 g·L^{-1};F:CK

图10　牡丹酚不同剂量对黄瓜枯萎病菌的抑制作用

Fig. 10　Inhibition effects of different doses of Paeonol against *F. oxysporum*

表5 芳樟醇、牡丹酚和茶香螺烷对黄瓜枯萎病菌的菌丝生长的毒力

Table 5 Toxicity of phenol, linalool and tea spirane to the growth against *F. oxysporum*

供试药剂	毒力回归方程	相关系数 R^2	EC_{50}/(g·L^{-1})
芳樟醇	Y=12.337 7+0.472 6X	0.979 3	0.169 2
牡丹酚	Y=12.258 0+0.542 8X	0.989 9	0.294 3
茶香螺烷	Y=12.377 9+0.493 2X	0.999 7	0.196 2

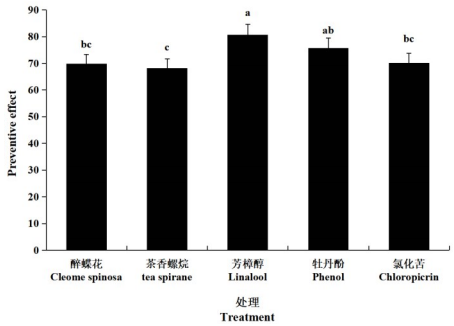


图11 芳樟醇、牡丹酚、茶香螺烷及醉蝶花粉碎物熏蒸对黄瓜枯萎病的盆栽防效

Fig.11 Potted control effect of *C. spinosa* and three kinds of volatile substance fumigation against *F. oxysporum*

效最差,防效分别为70.2%、69.9%和68.2%。

3 讨论与结论

本研究中,醉蝶花粉碎物对黄瓜枯萎病菌有良好的抑制作用,因此对醉蝶花成分进行提取,研究提取物的抑菌作用,鉴定抑菌活性成分。在采用有机溶剂萃取植物成分的研究中,萃取溶剂的选择千分重要。由于醉蝶花成分主要是一些极性高的分子,根据相似相溶的原则,宜采用一些高极性的有机溶剂进行萃取。本研究所选取的乙醇溶剂极性较大,因此萃取效果较好。

不同植物在萃取成分时需要的时间与料液比常常存在一定差异。从萃取时间来看,当时间延迟时,醉蝶花提取率表现为先提高后下降的趋势,这种结果同沈王庆等[9]的研究发现柠檬皮萃取精油试验结果类似,然而其在0.5 h时已获得最高得率,该结果同本研究的最佳萃取时间4 h与5 h具有一定差异。造成上述结果的原因可能是因柠檬皮表面存在较多孔洞,精油的渗入和吸收更快,从而利于萃取,因此所需萃取时间比本研究要短的多。但是李治巧等[10]研究发现,进行孜然精油的萃取时延长时间会获得更高的精油得率,最后趋于平稳,在7 h才获得较高得率。上述结果均能够说明,不同的植物种类需要的最佳萃取时间具有很大差异。当料液比较大时植物组织与溶剂的接触面积也会增加,有利于提高细胞质中成分和溶剂之间的交换速率,因此有利于植物组织成分萃取。但过多的溶剂所需成本增加,而且会加重后续旋转蒸发除掉溶剂的负担,从经济的角度出发不利于生产,因此需要将料液比控制在一定范围内,纠正溶剂使用越多越好的错误理念。在不同因素的影响程度方面,因植物材料自身具有不同的性质特点,也可能会引起同一因素在提取不同植物成分时的影响程度不同。

本研究得出的乙醇提取醉蝶花提取物的最佳工艺条件为:萃取时间与温度、料液比、乙醇浓度分别为5 h和30 ℃、1∶8、60%。本研究鉴定出的醉蝶花提取物主要成分有:十四烷基环氧乙烷、二十四烷、十七烷、二十八烷、乙基环戊烯醇酮、叶绿醇、2,3,7-三甲基癸烷、(E)-2-己烯-1-醇、2,6,11-三甲基十二烷、茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚。其中,十四烷基环氧乙烷、二十四烷、十七烷、乙基环戊烯醇酮、茶香螺烷和二十八烷在刘奇[11]的研究也被鉴定出来过,而芳樟醇等是本研究首次从醉蝶花中鉴定出来的。

异硫氰酸酯是广泛存在于西洋菜、甘蓝、花椰菜、西兰花、卷心菜、辣根、麻菜等十字花科芸等十字花科植物中次级代谢产物[12]。彭超[13]使用蒸馏萃取法从芥子提取物、山葵提取物中分别鉴定6种、8种异硫氰酸酯,所获取的异硫氰酸酯提取物对于铜绿假单胞杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌、沙门氏菌、荧光假单胞杆菌、藤黄八叠球菌、以及宋内志贺氏菌有较好的抑制作用。毕明芳[14]的研究结果表明,山葵提取物对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、蜡状芽孢杆菌、白色念珠菌、变形杆菌以及副溶血性弧菌等均有一定的抑制作用,并从山葵提取物中分离出了多种异硫氰酸酯。而本研究中,通过GC/MS分析鉴定醉蝶花提取物的成分,并未检测出异硫氰酸酯的存在,这与前人研究结果不同,可能是醉蝶花作为一种白花菜科植物,其次级代谢产物与十字花科相差较大所致。唐晓莲[15]的研究结果表明,红色毛癣菌在芳樟醇作用下其菌丝发生萎

缩,其表面粗糙,在菌丝顶部发生膨大与局部变形,胞质自溶,孢子的萌发与菌丝径向生长受到抑制,随着药液浓度增大所表示出的抑制作用增大,改变了菌膜通透性,降低麦角甾醇生成量,红色毛癣菌的微观构造发生改变,具体表现为细胞壁降解模糊,表面粗糙且厚度不均,细胞内膜皱缩破损,轮廓不清晰,一些细胞器损坏发生膜碎片化及其细胞质内容物泄漏。包雅婷[16]对紫斑牡丹花及其叶研究发现其具有很好的抗氧化活性与抗菌活性,对其抗菌成分进行预测为黄酮与酚酸。本研究中鉴定出的醉蝶花12种主要成分中,只有茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病菌较好的抑菌效果,抑制率分别为99.9%、96.2%与91.0%,3种物质对黄瓜枯萎病的盆栽防效依次是68.2%、75.7%与80.6%。上述结果说明,醉蝶花提取物中主要的抑菌活性物质是茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚。本试验首次发现醉蝶花的3种活性成分茶香螺烷、芳樟醇和牡丹酚对黄瓜枯萎病的抑制作用,可为生产上开发新型的生态环保型生物农药提供思路。

参　考　文　献

[1]Ehlers B K, Berg M P, Staudt M, et al. Plant secondary compounds in soil and their role in belowground species interactions[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2020, 35(8): 716-730.

[2]Hardy K. Paleomedicine and the use of plant secondary compounds in the Paleolithic and Early Neolithic [J]. Evolutionary Anthropology, 2019, 28(2): 60-71.

[3]Pebsworth P A, Hillier S, Wendler R, et al. Geophagy among East African Chimpanzees: consumed soils provide protection from plant secondary compounds and bioavailable iron [J]. Environmental Geochemistry and Health, 2019, 41(6): 2911-2927.

[4]Gaire S, Zheng W, Scharf M E, et al. Plant essential oil constituents enhance deltamethrin toxicity in a resistant population of bed bugs (*Cimex lectularius* L.) by inhibiting cytochrome P450 enzymes [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2021, 175: 104829.

[5]Tu Q B, Wang P Y, Sheng S, et al. Microencapsulation and antimicrobial activity of plant essential oil against *Ralstonia solanacearum* [J]. Waste and Biomass Valorization, 2020, 11(10): 5273-5282.

[6]Franciscasâmara M S, José P K, et al. Polyphenolic composition, antibacterial, modulator and neuroprotective activity of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (*Cleomaceae*) [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2019, 9(1): 12-17.

[7]赵星. 醉蝶花茎叶粉碎物对葡萄灰霉病的抑制作用[J]. 种子科技, 2021, 29(14): 25-26,113.
Zhao X. The inhibitory effect of crushed stems and leaves of *Cleome spinosa* on grape gray mold [J]. Seed Technology, 2021, 29(14): 25-26,113.

[8]da Silva A P S, da Silva L C N, da Fonseca C S M, et al. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* jaqc [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 963.

[9]沈王庆,沈哲华. 柠檬皮中香精油提取工艺的研究[J]. 内江师范学院学报, 2012, 27(12): 51-53.
Shen W Q, Shen Z H. On extraction of essential oil from lemon peel[J]. Journal of Neijiang Normal University, 2012, 27(12): 51-53.

[10]李治龙,刘新华,郭凌云,等. 新疆孜然精油提取工艺的优化[J]. 塔里木大学学报, 2011, 23(2): 91-96.
Li Z L, Liu X H, Guo L Y, et al. The optimization of process for extraction of essential oil of Xinjiang cummin[J]. Journal of Tarim University, 2011, 23(2): 91-96.

[11]刘奇. 醉蝶花提取液对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性及初步成分鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
Liu Q. Antibacterial activity and preliminary component identification of *Cleome spinosa* extract against *Fusarium oxysporum*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University.

[12]孙钰. 天然源苯酞类化合物和异硫氰酸酯类化合物杀菌活性评价及作用机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2021.
Sun Y. Evaluation of bactericidal activity and mechanism of natural phthalide compounds and isothiocyanate compounds [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2021.

[13]彭超. 山葵和芥子中异硫氰酸酯的抑菌活性成分与微胶囊研究[D]. 广州:广东工业大学, 2014.
Peng C. Study on antimicrobial active components and microcapsules of isothiocyanate in wasabi and mustard seed [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2014.

[14]毕明芳. 山葵风味成分的提取及活性研究[D]. 广州:广东工业大学, 2015.
Bi M F. Study on extraction and activity of wasabi flavor components [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2015.

[15]唐晓莲. 芳樟醇抗红色毛癣菌机理及生物活性研究[D]. 重庆:重庆理工大学, 2018.
Tang X L. Study on the mechanism and biological activity of linalool against *Trichophyton* rubrum [D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2018.

[16]包雅婷. 紫斑牡丹花、叶抗氧化与抗菌活性的研究[D]. 成都:西南民族大学, 2018.
Bao Y T. Study on antioxidant and antibacterial activities of flowers and leaves of *Paeonia* rockii[D]. Chengdu: Southwest University for Nationalities, 2018.

Extraction of main components from *Cleome spinosa* and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*

Zhang Xingzhe[1,2], Meng Xianghai[1], Wang Baicheng[1], Shi Xinrui[1], Yang Bing[1], Wang Wenhui[1], Zhang Yanju[2*]

(*1.Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157000, China; 2.College of Plant Protection, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: [Objective] The aim was to determine the optimal extraction process for the active substances in *Cleome spinosa* and analyze their main components, to clarify the antibacterial activity and potted plant control efficacy of these main components against *Fusarium oxysporum*, and to provide a reference for developing new plant-based pesticides, promoting green pest control, and supporting sustainable agricultural development. [Method] In a single-factor experiment, extraction yield and antibacterial rate were used as indicators to select five factors: solvent type (sterile water, methanol, ethanol, ethyl acetate, chloroform, cyclohexane, and acetone), ethanol concentration, extraction time, solid-liquid ratio, and extraction temperature. Ethanol concentrations were tested at seven levels: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, and 80%. Extraction times were tested at eight levels: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 hours. Solid-liquid ratios were tested at seven levels: 1∶3, 1∶4, 1∶5, 1∶6, 1∶7, 1∶8, and 1∶9. Extraction temperatures were tested at seven levels: 20, 25, 30, 35, 40, 45, and 50 ℃. Based on the single factor experiments, ethanol was selected as the solvent, and an orthogonal experiment was designed to optimize the extraction time, temperature, and ethanol concentration. GC/MS analysis was used to identify the main components of active substances in *C. spinosa*, and some of these substances were tested for their effects against *F. oxysporum*. [Result] The optimal extraction process for active substances from *C. spinosa* was found to be a five-hour extraction time, a solid-liquid ratio of 1∶8, 60% ethanol concentration, and an extraction temperature of 30 ℃. Under these conditions, a total of 59 compounds were isolated, with paeonol being the most abundant. Twelve main components of *C. spinosa* showed significant inhibitory effect on the growth of *F. oxysporum*. The toxicity regression equations of linalool, paeonol, and camellian against cucumber wilt pathogen were Y=12.337 7+0.472 6X (EC_{50} value of 0.169 2 g·L^{-1}), Y=12.258 0+0.542 8X (EC_{50} value of 0.294 3 g·L^{-1}), and Y=12.377 9+0.493 2X (EC_{50} value of 0.196 2 g·L^{-1}), respectively. In potted cucumber plants, thunbergol, linalool, and paeonol showed control efficacies of 68.2%, 80.6%, and 75.7%, respectively, against *F. oxysporum*. [Conclusion] Thunbergol, linalool, and paeonol, the main components of *C. spinosa*, can effectively inhibit *F. oxysporum* and have strong control effects against cucumber wilt disease.

Keywords: *Cleome spinosa*, Active substances, Extraction process, Component analysis, Antifungal activity, Potted plant prevention effect

(编辑:吕俊俐)