

甘草根中黄酮类化合物的提取、分离与衍生化及其抑菌活性研究

徐 曙¹, 赵兴增¹, 周 倩¹, 陈虞超², 李林蔚^{1,①}, 郭生虎^{2,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014; 2. 宁夏农林科学院农业生物技术研究中心, 宁夏 银川 750002]

摘要: 采用多重柱层析和重结晶的方法从甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)根中提取和分离6个黄酮类化合物,并通过结构修饰获得3个乙酰化衍生物,然后使用核磁共振和旋光技术进行结构鉴定;在此基础上,分别采用菌丝生长速率法和比浊法测定9个化合物在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对植物病原真菌和细菌的抑制率,并进一步测定了具有抑菌活性化合物的 EC_{50} (有效中浓度)和 EC_{90} (抑制率90%时的化合物浓度)值。结果表明:甘草根中6个黄酮类化合物及3个乙酰化衍生物分别为4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B、光甘草定、甘草素、异甘草素、甘草苷、4,4'-O-二乙酰基异甘草素、4-O-乙酰基异甘草素和4'-O-乙酰基甘草素。在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B和光甘草定对大部分供试病原菌的抑制率较高,异甘草素对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的抑制率达到76.25%,而4,4'-O-二乙酰基异甘草素和4-O-乙酰基异甘草素对部分病原菌的抑制率高于30.00%。4'-O-甲基光甘草定对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)的 EC_{50} 值均小于 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,对黄瓜灰霉病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著($P < 0.05$)低于对照药剂甲基硫菌灵,对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)的 EC_{50} 和 EC_{90} 值与甲基硫菌灵总体上无显著差异。Hispaglabridin B对黄瓜灰霉病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著低于甲基硫菌灵。光甘草定的抑菌活性最强,除了对枸杞炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的 EC_{50} 值为 $48.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 外,对其他供试病原菌的 EC_{50} 值均小于 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,并且对水稻纹枯病菌、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、黄瓜灰霉病菌和小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)的 EC_{50} 和 EC_{90} 值总体上显著低于甲基硫菌灵。异甘草素对水稻白叶枯病菌的 EC_{50} 值仅为 $2.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,与对照药剂噻枯唑无显著差异。综上所述,4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B和光甘草定具有广谱抑菌活性,可作为新型生物农药先导化合物进行开发;异甘草素对水稻白叶枯病菌具有较高的抑菌活性,可作为先导化合物开发细菌病害防治药剂。

关键词: 甘草; 黄酮类化合物; 衍生物; 植物病原菌; 抑制率; 室内毒力

中图分类号: Q946.887; S482.2⁺92; S567.23⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)06-0032-10
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.06.04

Extraction, isolation, and derivatization of flavonoids from root of *Glycyrrhiza uralensis* and study on their anti-microbial activities XU Shu¹, ZHAO Xingzeng¹, ZHOU Qian¹, CHEN Yuchao², LI Linwei^{1,①}, GUO Shenghu^{2,①} (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Agricultural Biotechnology Center, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(6): 32-41

Abstract: Six flavonoids were extracted and isolated from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. by using multi-column chromatography and recrystallization methods, three acetyl derivatives were obtained by

收稿日期: 2020-06-19

基金项目: 宁夏农林科学院对外科技合作专项(DW-X-2018009); 2019年医疗服务与保障能力提升补助资金(中医药事业传承与发展部分)“全国中药资源普查项目”(财社[2019]39号)

作者简介: 徐 曙(1987—),男,江苏常熟人,博士,副研究员,主要从事天然产物活性成分研究与开发。

①通信作者 E-mail: xt_llw@163.com; guosh1118@sina.com

structural modification, and then nuclear magnetic resonance and optical rotation technology were employed to confirm their structures; on the basis, inhibition rates of nine compounds at $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ against plant-pathogenic fungi and bacteria were determined by using mycelial growth rate method and turbidity method, and EC_{50} (median effective concentration) and EC_{90} (compound concentration at the inhibition rate of 90%) values of compounds with anti-microbial activities were further assayed. The results show that six flavonoids isolated from root of *G. uralensis* and three acetyl derivatives are 4'-O-methylglabridin, hispaglabridin B, glabridin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, liquiritin, 4,4'-O-diacetylisoliquiritigenin, 4-O-acetylisoliquiritigenin, and 4'-O-acetylliquiritigenin. At $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4'-O-methylglabridin, hispaglabridin B, and glabridin exhibit high inhibition rates against most test pathogens, inhibition rate of isoliquiritigenin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reaches 76.25%, while those of 4,4'-O-diacetylisoliquiritigenin and 4-O-acetylisoliquiritigenin against some pathogens are greater than 30.00%. The EC_{50} values of 4'-O-methylglabridin against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, and *Magnaporthe oryzae* are all smaller than $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and its EC_{50} and EC_{90} values against *B. cinerea* are significantly ($P < 0.05$) lower than those of control fungicide thiophanate-methyl, but those against *Rhizoctonia solani* are not significantly different from those of thiophanate-methyl in general. The EC_{50} and EC_{90} values of hispaglabridin B against *B. cinerea* are significantly lower than those of thiophanate-methyl. The anti-microbial activity of glabridin is the strongest, and except for the EC_{50} value against *Colletotrichum gloeosporioides*, which is $48.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the EC_{50} values against other test pathogens are all smaller than $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, meanwhile its EC_{50} and EC_{90} values against *R. solani*, *Fusarium oxysporum*, *B. cinerea*, and *Fusarium graminearum* are generally significantly lower than those of thiophanate-methyl. The EC_{50} value of isoliquiritigenin against *X. oryzae* pv. *oryzae* is only $2.98 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which is not significantly different from that of control bactericide bismethiazol. It is suggested that 4'-O-methylglabridin, hispaglabridin B, and glabridin possess broad-spectrum anti-microbial activities, and can be developed as leads of novel bio-pesticide; isoliquiritigenin possesses potent anti-microbial activity against *X. oryzae* pv. *oryzae*, and can be used as a lead for developing control agents against bacterial disease.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; flavonoids; derivatives; phytopathogens; inhibition rate; laboratory toxicity

植物病害是制约农业生产的重要因子,每年植物病害的发生都会造成巨大的经济损失。化学防治是控制植物病害的重要手段,然而,长期使用化学农药会带来严重的环境问题和病原菌抗药性问题^[1]。开发生物农药是缓解上述问题的有效途径之一。植物源活性成分具有来源丰富、作用方式特异、不易产生抗药性、对环境友好及对非靶标生物相对安全等特点,是开发新型生物农药的理想对象^[2]。

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的干燥根和根茎为常用中药材,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳以及调和诸药等功效;现代药理学研究表明;甘草还具有抑菌、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗氧化和保肝等作用^[3]。此外,甘草根部及茎叶提取物对多种植物病原真菌和卵菌的菌丝生长或孢子萌发具有显著的抑制作用^[4-6],而甘草黄酮类化合物可能是其主要抑菌活性成分之一^[6]。

甘草黄酮类化合物是甘草中一类重要的化学成分,具有丰富的生物活性^[7],其中部分黄酮类化合物

对包括植物病原菌在内的多种微生物的抑菌活性较强,可作为生物农药先导化合物开发利用^[8-12]。例如:甘草素、异甘草素、半甘草异黄酮 B 和光甘草定等化合物对多种植物病原真菌、卵菌和细菌具有显著的抑菌作用^[8,13-15]。然而,目前甘草黄酮类化合物对植物病原菌抑菌活性的研究仍不全面,影响其进一步的开发利用。

为进一步探明甘草黄酮类化合物对植物病原菌的抑菌活性,作者采用硅胶柱层析和重结晶方法从甘草根中分离和提取了6个黄酮类化合物单体,进行结构修饰后获得了3个乙酰化衍生物,并使用核磁共振和旋光技术进行了结构鉴定;采用菌丝生长速率法和比浊法测定这9个化合物在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对植物病原真菌和细菌生长的抑制率,并进一步测定了具有抑菌活性的黄酮类化合物对植物病原菌的 EC_{50} (有效中浓度)和 EC_{90} (抑制率90%时的化合物浓度)值,以期探明这9个化合物对植物病原菌的抑菌活性,并为甘草的资源化利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试人工栽培甘草根于2018年10月采自宁夏回族自治区吴忠市盐池县高沙窝镇,经宁夏农林科学院郭生虎研究员鉴定。供试菌种由南京农业大学周明国教授提供,包括水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、枸杞炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)7种真菌以及水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)1种细菌。培养真菌所用的PSA培养基含 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 去皮土豆的浸出液、 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉^[16];培养细菌所用的NB培养液含 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛肉浸膏、 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚蛋白胍、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母浸膏和 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖,pH 7.0^[17]。所有培养基均于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌20 min后待用。

仪器和试剂:Jasco P-1020全自动数字旋光仪(日本Jasco公司);Bruker AV-500 MHz型核磁共振仪(德国Bruker公司);柱层析色谱硅胶(200~300目)(青岛海洋化工厂);薄层色谱硅胶GF254(青岛海洋化工厂);EYELA N-1300D-WB旋转蒸发器(日本东京理化器械株式会社);DF-110集热式磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);721G可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);SPX-250BSH-II生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。乙酸乙酯(分析纯)、石油醚(分析纯)、体积分数95%乙醇(分析纯)、甲醇(分析纯)、三氯甲烷(化学纯)、三乙胺(化学纯)、乙酸酐(化学纯)、吡啶(化学纯)、4-二甲氨基吡啶(化学纯)和无水硫酸钠(分析纯)购自天津市富宇精细化工有限公司;甲基硫菌灵(纯度99%)和噻枯唑(纯度95%)购自上海源叶生物科技有限公司;配制培养基所用试剂及耗材购自南京寿德试验器材有限公司。

1.2 方法

1.2.1 提取和分离 将5 kg干燥的甘草根粉碎,然后用体积分数80%乙醇加热回流提取3次,提取液合并后,减压浓缩至无醇味,所得浸膏加5 L蒸馏水溶解,然后用等体积乙酸乙酯萃取3次,萃取液浓缩至

干,得乙酸乙酯部分浸膏200 g。浸膏经硅胶柱,用石油醚-乙酸乙酯系统(体积比100:0至0:100)进行梯度洗脱,得到Fr.1至Fr.10共10个组分。其中Fr.2(11.55 g)经硅胶柱反复分离、纯化和甲醇重结晶,得到化合物I(21 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比20:1)]、化合物II(16 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比10:1至1:1)]和化合物III(19 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比10:1至1:1)和三氯甲烷-甲醇系统(体积比10:1至1:1)];Fr.5(9.43 g)经硅胶柱反复分离、纯化和甲醇重结晶,得到化合物IV(28 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比5:1至1:1)]和化合物V(23 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比5:1至1:1)];Fr.7(7.86 g)经硅胶柱反复分离、纯化和甲醇重结晶,得到化合物VI(116 mg)[石油醚-乙酸乙酯系统(体积比10:1至1:1)和三氯甲烷-甲醇系统(体积比50:1至10:1)]。

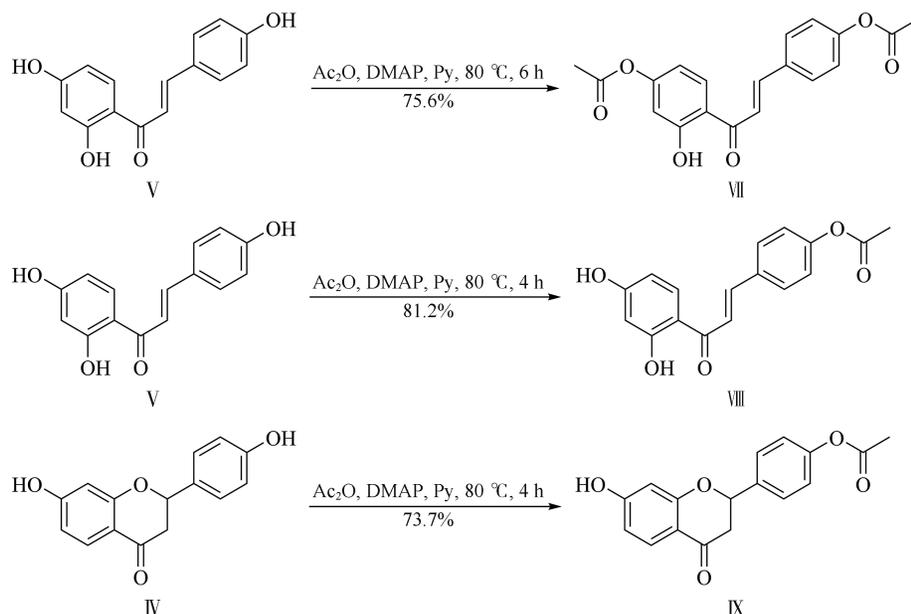
1.2.2 衍生物合成

1.2.2.1 4,4'-O-二乙酰基异甘草素(化合物VII)的合成 将异甘草素(500.00 mg,1.95 mmol)和吡啶(4.00 mL)混合均匀,升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入乙酸酐(0.40 mL,4.25 mmol)和4-二甲氨基吡啶(4.00 mg,0.12 mmol),反应6 h后,待反应液稍冷,倒入15 mL蒸馏水中,并在冰浴下持续搅拌30 min。待沉淀完全后抽滤,滤饼用少量蒸馏水淋洗,自然干燥,得黄色固体501.72 mg,收率75.6%。

1.2.2.2 4-O-乙酰基异甘草素(化合物VIII)的合成 将异甘草素(500.00 mg,1.95 mmol)和吡啶(2.00 mL)混合均匀,升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入乙酸酐(0.20 mL,2.12 mmol)和4-二甲氨基吡啶(2.00 mg,0.06 mmol),反应4 h后,待反应液稍冷,倒入10 mL蒸馏水中,并在冰浴下持续搅拌30 min。待沉淀完全后抽滤,滤饼用少量蒸馏水淋洗,自然干燥,得黄色固体472.34 mg,收率81.2%。

1.2.2.3 4'-O-乙酰基甘草素(化合物IX)的合成 将甘草素(500.00 mg,1.95 mmol)和吡啶(2.00 mL)混合均匀,升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入乙酸酐(0.20 mL,2.12 mmol)和4-二甲氨基吡啶(2.00 mg,0.06 mmol),反应4 h后,待反应液稍冷,倒入10 mL蒸馏水中,并在冰浴下持续搅拌30 min。待沉淀完全后抽滤,滤饼用少量蒸馏水淋洗,自然干燥,得白色固体428.93 mg,收率73.7%。

上述3个乙酰化衍生物的合成路线见图1。



Ac₂O: 乙酸酐 Acetic anhydride; DMAP: 4-二甲氨基吡啶 4-dimethylaminopyridine; Py: 吡啶 Pyridine. 图中百分数为收率 The percentages in the figure are yields. IV: 甘草素 Liquiritigenin; V: 异甘草素 Isoliquiritigenin; VII: 4,4'-O-二乙酰基异甘草素 4,4'-O-diacetylisoliquiritigenin; VIII: 4-O-乙酰基异甘草素 4-O-acetylisoliquiritigenin; IX: 4'-O-乙酰基甘草素 4'-O-acetylliquiritigenin.

图 1 甘草根中黄酮类化合物的乙酰化衍生物的合成路线
Fig. 1 Synthetic routes of acetyl derivatives of flavonoids from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

1.2.3 化合物结构鉴定 使用核磁共振仪和旋光仪对上述 9 个化合物进行结构鉴定。

1.2.4 抑菌活性测定

1.2.4.1 对植物病原真菌抑菌活性的测定 将各化合物单体溶于二甲基亚砷 (DMSO), 配制成 10 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液。将 PSA 培养基加热融化后室温放置, 当培养基冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右时, 加入母液使其终浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 倒入直径 6 cm 的培养皿中制成含药平板, 以含等体积 DMSO 的 PSA 平板作为溶剂对照, 以等浓度甲基硫菌灵为对照药剂, 另设 PSA 空白平板 (不加溶剂或者药液) 作为空白对照。将 7 种真菌分别接种于 PSA 平板上, 并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中预培养。用打孔器在预培养的生长旺盛的菌落边缘取直径 5 mm 的菌碟, 并接种于空白对照、溶剂对照和含药 PSA 平板上, 然后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中培养至空白对照接近长满平板。采用十字交叉法测量菌落直径 (扣除菌碟直径 5 mm)。抑制率计算公式为抑制率 = [(溶剂对照菌落直径 - 药剂处理菌落直径) / 溶剂对照菌落直径] $\times 100\%$ 。每个处理设置 3 个技术重复, 实验重复 3 次。

1.2.4.2 对植物病原细菌抑菌活性的测定 在 NB 培养液中接种细菌并在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下预

培养至对数生长期, 用可见分光光度计调节浊度 (OD_{600}) 至 0.02, 待用。将各化合物溶于 DMSO, 配制成 10 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液。向 NB 培养液中加入母液使其终浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以含等体积 DMSO 的 NB 培养液作为溶剂对照, 以等浓度噻枯唑为对照药剂, 另设 NB 空白培养液作为空白对照。向每 25 mL 的 NB 含药培养液中加入 100 μL 浊度 0.02 的细菌悬浮液, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养至空白对照对数生长期, 使用可见分光光度计测定菌液浊度。抑制率计算公式为抑制率 = [(溶剂对照菌液浊度 - 药剂处理菌液浊度) / 溶剂对照菌液浊度] $\times 100\%$ 。每个处理设置 3 个技术重复, 实验重复 3 次。

1.2.4.3 室内毒力回归方程计算 将各化合物溶于 DMSO, 配制成 10 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 母液, 根据 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各化合物对不同病原菌的抑制率设计浓度梯度, 并使用 DMSO 对母液进行稀释, 得到 6 个不同浓度的化合物溶液。按照上述方法制备含药 PSA 平板或含药 NB 培养液, 并设置溶剂对照, 然后接种、培养病原菌, 测定结果后计算抑制率, 并计算毒力回归方程、 EC_{50} 值和 EC_{90} 值^[18]。每个处理设置 3 个技术重复, 实验重复 3 次。

1.3 数据处理与统计分析

使用 EXCEL 2010 软件对数据进行处理;使用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 采用最小显著性差异法 (LSD) 进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 甘草根中黄酮类化合物鉴定

甘草根中 6 个黄酮类化合物的结构见图 2。

化合物 I: 白色粉末。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.06(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5), 6.92(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6'), 6.71(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-1''), 6.53(1H, dd, *J*=8.5, 2.3 Hz, H-5'), 6.49(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6), 6.40(1H, d, *J*=2.2 Hz, H-3'), 5.61(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-2''), 5.14(1H, s, OH-2'), 4.43(1H, dd, *J*=10.4, 2.6 Hz, H-2-*cis*), 4.09(1H, t, *J*=10.2 Hz, H-2-*trans*), 3.81(3H, s, OCH₃-4''), 3.58-3.56(1H, m, H-3), 3.04(1H, dd, *J*=15.9, 10.9 Hz, H-4-*trans*), 2.92(1H, dd, *J*=15.6, 3.7 Hz, H-4-*cis*), 1.48(3H, s, CH₃-4''), 1.44(3H, s, CH₃-5'')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 159.4(C-4'), 154.3(C-7), 151.9(C-8a), 149.8(C-2'), 129.2(C-6'), 128.9(C-2''), 128.2(C-5), 120.0(C-1'), 117.0(C-1''), 114.4(C-4a), 110.0(C-8), 108.7(C-6), 106.1(C-5'), 102.2(C-3'), 75.7(C-3''), 70.0(C-2), 55.3(OCH₃-4'), 31.8(C-3), 30.6(C-4), 27.8(C-4''), 27.6(C-5'')。以上数据与文献[19]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为 4'-O-甲基光甘草定 (4'-O-methylglabridin)。

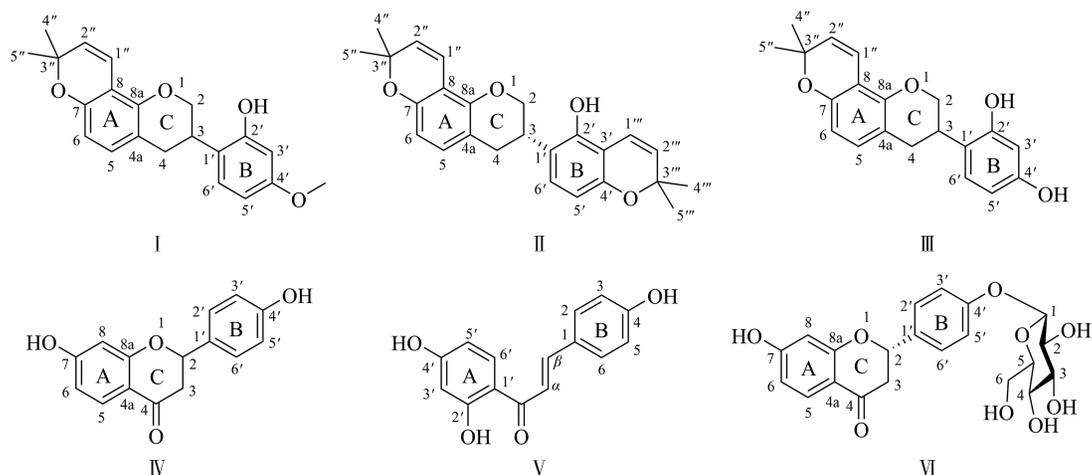
化合物 II: 白色粉末。[α]_D²⁰-26.84 (*c*=1, CHCl₃)。 ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.88(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5), 6.85(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-6'), 6.71(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-1''), 6.69(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-1''), 6.42(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-6), 6.32(1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5'), 5.67(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-2''), 5.61(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-2''), 4.97(1H, s, OH-2'), 4.43(1H, dd, *J*=10.3, 2.6 Hz, H-2-*cis*), 4.08(1H, t, *J*=10.3 Hz, H-2-*trans*), 3.59-3.53(1H, m, H-3), 3.00(1H, dd, *J*=15.6, 11.0 Hz, H-4-*trans*), 2.87(1H, dd, *J*=15.7, 1.7 Hz, H-4-*cis*), 1.47(6H, s, CH₃-4'', 5''), 1.44(6H, s, CH₃-4'', 5'')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ: 151.9(C-7), 151.5(C-8a), 150.2(C-4'), 149.8(C-2'), 129.3(C-2''), 129.2(C-2''), 128.9(C-5), 127.0(C-6'), 121.3(C-1'), 117.0(C-1''), 116.6(C-1'), 114.6(C-4a), 109.9(C-8), 109.6(C-3'), 108.6(C-6), 107.4(C-5'), 76.0(C-3''), 75.6(C-3''), 70.1(C-2), 31.8(C-3), 30.6(C-4), 27.9(C-4''), 27.8(C-5''), 27.7(C-4''), 27.6(C-5'')。以上数据与文献[20]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为 hispaglabridin B。

化合物 III: 白色粉末。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.36(1H, s, OH-2'), 9.09(1H, s, OH-4'), 6.88(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5), 6.85(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6'), 6.57(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-1''), 6.36(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-3'), 6.31(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6), 6.22(1H, dd, *J*=8.5, 2.0 Hz, H-5'), 5.67(1H, d, *J*=9.9 Hz, H-2''), 4.27(1H, dd, *J*=10.0, 2.1 Hz, H-2-*cis*), 3.97(1H, t, *J*=10.0 Hz, H-2-*trans*), 3.35-3.31(1H, m, H-3), 2.73(1H, dd, *J*=15.0, 12.5 Hz, H-4-*trans*), 2.53(1H, dd, *J*=15.0, 2.0 Hz, H-4-*cis*), 1.37(3H, s, CH₃-4''), 1.36(3H, s, CH₃-5'')。 ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 156.7(C-7), 154.5(C-4'), 152.1(C-8a), 150.4(C-2'), 130.1(C-2'), 128.4(C-5), 126.9(C-6'), 118.8(C-1'), 117.2(C-1''), 112.7(C-4a), 108.8(C-6), 108.0(C-5'), 107.4(C-8), 102.6(C-3'), 75.3(C-3''), 69.5(C-2), 31.0(C-4), 30.1(C-3), 27.4(C-4''), 27.3(C-5'')。以上数据与文献[19]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为光甘草定 (glabridin)。

化合物 IV: 白色粉末, 体积分数 10% H₂SO₄ 显黄色。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.77(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-8), 7.36(2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2', 6'), 6.86(2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3', 5'), 6.53(1H, dd, *J*=8.6, 2.4 Hz, H-6), 6.40(1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 5.41(1H, dd, *J*=13.0, 3.0 Hz, H-2), 3.07(1H, dd, *J*=17.0, 13.0 Hz, H-3-*trans*), 2.72(1H, dd, *J*=17.0, 3.0 Hz, H-3-*cis*)。 ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 191.4(C-4), 165.7(C-7), 164.2(C-8a), 158.7(C-4'), 131.5(C-1'), 129.3(C-5), 129.0(C-2', 6'), 116.0(C-3', 5'), 115.3(C-4a), 111.6(C-6), 103.2(C-8), 80.6(C-2), 44.9(C-3)。以上数据与文献[21]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为甘草素 (liquiritigenin)。

化合物 V: 黄色粉末, 体积分数 10% H₂SO₄ 显橙



I: 4'-O-甲基光甘草定 4'-O-methylglabridin; II: Hispaglabridin B; III: 光甘草定 Glabridin; IV: 甘草素 Liquiritigenin; V: 异甘草素 Isoliquiritigenin; VI: 甘草苷 Liquiritin.

图2 甘草根中黄酮类化合物结构
Fig. 2 Structures of flavonoids isolated from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

黄色。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.16 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-6'), 7.76 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H- β), 7.75 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2, 6), 7.72 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H- α), 6.84 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 6.40 (1H, dd, $J=9.2, 2.4$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 192.3 (C=O), 166.9 (C-4'), 165.2 (C-2'), 160.1 (C-4), 144.6 (C- β), 133.3 (C-6'), 131.7 (C-2, 6), 128.2 (C-1), 117.9 (C- α), 116.6 (C-3, 5), 113.9 (C-1'), 109.2 (C-5'), 103.7 (C-3')。以上数据与文献[21]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为异甘草素 (isoliquiritigenin)。

化合物VI: 白色粉末, 体积分数 10% H_2SO_4 显黄色。 $[\alpha]_D^{20} -60.84$ ($c=1$, DMSO)。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.65 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 7.41 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', 6'), 7.07 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.51 (1H, dd, $J=8.6, 2.0$ Hz, H-6), 6.32 (1H, br s, H-8), 5.50 (1H, dd, $J=12.4, 3.0$ Hz, H-2), 4.89 (1H, d, $J=7.2$ Hz, Glc-H-1), 3.11 (1H, dd, $J=16.6, 12.4$ Hz, H-3-*trans*), 2.69 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-3-*cis*)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 190.3 (C-4), 165.1 (C-7), 163.2 (C-9), 157.2 (C-4'), 131.9 (C-1'), 128.1 (C-5), 127.7 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 113.2 (C-10), 110.3 (C-6), 102.7 (C-8), 100.1 (Glc-C-1), 78.8 (C-2), 77.2 (Glc-C-3), 76.1 (Glc-C-5), 72.7 (Glc-C-2), 69.3 (Glc-C-4), 60.1 (Glc-C-6),

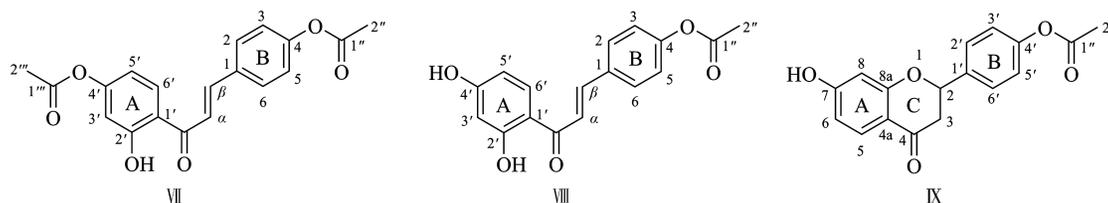
43.1 (C-3)。以上数据与文献[22]报道的结果基本一致, 故鉴定该化合物为甘草苷 (liquiritin)。

2.2 甘草根中黄酮类化合物的乙酰化衍生物鉴定

甘草根中黄酮类化合物的3个乙酰化衍生物的结构见图3。

化合物VII: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.02 (1H, s, OH-2'), 7.96 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6'), 7.94 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H- β), 7.72 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2, 6), 7.58 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H- α), 7.23 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, 5), 6.84 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-3'), 6.77 (1H, dd, $J=8.8, 2.2$ Hz, H-5'), 2.37 (3H, s, CH_3-2''), 2.36 (3H, s, CH_3-2'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 192.6 (C=O), 169.0 (C-1''), 168.4 (C-1'''), 165.2 (C-2'), 156.7 (C-4'), 152.7 (C-4), 144.5 (C- β), 132.2 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 129.8 (C-6'), 122.3 (C-3, 5), 120.2 (C- α), 117.9 (C-1'), 112.8 (C-5'), 111.3 (C-3'), 21.2 (C-2''), 21.1 (C-2'')。故鉴定该化合物为4, 4'-O-二乙酰基异甘草素 (4, 4'-O-diacetylisoliquiritigenin)。

化合物VIII: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.29 (1H, s, OH-2'), 7.83 (1H, d, $J=15.4$ Hz, H- β), 7.78 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6'), 7.63 (2H, d, $J=8.3$ Hz, H-2, 6), 7.46 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H- α), 7.16 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 6.40 (1H, dd, $J=8.8, 1.9$ Hz, H-5'), 6.35 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-3'), 5.85 (1H, s, OH-4'), 2.33 (3H, s, CH_3-2'')。故鉴定该化合物为4-O-乙酰



Ⅶ: 4,4'-*O*-二乙酰基异甘草素 4,4'-*O*-diacetylisoriquiritigenin; Ⅷ: 4-*O*-乙酰基异甘草素 4-*O*-acetylisoriquiritigenin; Ⅸ: 4'-*O*-乙酰基异甘草素 4'-*O*-acetylisoriquiritigenin.

图3 甘草根中黄酮类化合物的乙酰化衍生物的结构
Fig. 3 Structures of acetyl derivatives of flavonoids isolated from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

基异甘草素(4-*O*-acetylisoriquiritigenin)。

化合物Ⅸ: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.62(1H, s, OH-7), 7.70(1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5), 7.60(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.21(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.57(1H, dd, $J=8.7, 2.1$ Hz, H-6), 6.42(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 5.63(1H, dd, $J=12.8, 2.7$ Hz, H-2), 3.15(1H, dd, $J=16.7, 12.8$ Hz, H-3-*trans*), 2.78(1H, dd, $J=16.7, 2.9$ Hz, H-3-*cis*), 2.31(3H, s, CH₃-2''). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 190.07(C-4), 169.62(C-1''), 165.16(C-7), 163.41(C-8a), 150.92(C-4'), 137.06(C-1'), 128.91(C-5), 128.30(C-2', 6'), 122.38(C-3', 5'), 114.04(C-4a), 111.16(C-6), 103.08(C-8), 78.94(C-2), 43.66(C-3), 21.27(C-2''). 故鉴定该化合物为 4'-*O*-乙

酰基甘草素(4'-*O*-acetylisoriquiritigenin)。

2.3 甘草根中黄酮类化合物及其乙酰化衍生物的抑菌活性

2.3.1 对植物病原菌的抑制率 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草根中黄酮类化合物及其乙酰化衍生物对植物病原菌的抑制率见表1。由表1可见:在 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 4'-*O*-甲基光甘草定、hispaglabridin B 和光甘草定对大部分供试病原菌的抑制率较高。其中, 4'-*O*-甲基光甘草定对水稻纹枯病菌和黄瓜灰霉病菌的抑制率显著高于对照药剂甲基硫菌灵, 对小麦赤霉病菌和香蕉枯萎病菌的抑制率与甲基硫菌灵无显著差异; hispaglabridin B 对黄瓜灰霉病菌的抑制率显著高于甲基硫菌灵, 对小麦赤霉病菌的抑制率与甲基硫菌灵无显著差异; 光甘草定对水稻纹枯病菌、小麦赤霉病

表1 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草根中黄酮类化合物及其乙酰化衍生物对植物病原菌的抑制率($\bar{X}\pm\text{SD}$)¹⁾

Table 1 Inhibition rate of $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ flavonoids isolated from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and their acetyl derivatives against phytopathogens ($\bar{X}\pm\text{SD}$)¹⁾

化合物 Compound	对不同植物病原菌的抑制率/% Inhibition rate against different phytopathogens							
	Rs	Ss	Fg	Fo	Bc	Cg	Mo	Xoo
I	49.79±9.70ab	64.30±5.91b	52.45±6.23ab	35.16±1.19b	70.16±4.07a	24.33±2.63b	51.84±0.23c	56.21±3.50b
II	18.02±4.73d	40.92±0.99c	46.06±9.37ab	22.96±0.67c	41.83±1.95b	29.55±3.66b	64.79±0.50b	23.37±0.94d
III	65.78±7.85a	80.39±5.79a	59.18±7.36a	48.89±5.30a	67.64±3.86a	25.77±3.12b	40.73±13.94c	58.33±5.58b
IV	19.44±5.88d	14.07±5.44de	17.60±2.08d	6.07±1.30fg	3.51±2.35e	7.97±0.52c	12.16±3.69d	2.51±1.21ef
V	7.10±3.09e	18.12±7.08d	18.58±1.55d	12.82±1.97d	14.90±9.48de	9.42±3.51c	14.04±6.72de	76.25±4.95a
VI	8.85±1.40e	6.68±1.99ef	15.38±5.37d	8.32±1.26ef	5.52±5.19de	7.99±3.85c	4.38±2.35ef	1.84±0.76f
VII	12.33±7.29de	13.12±5.61de	27.99±5.63c	6.47±2.97efg	7.05±1.38de	8.86±5.99c	3.30±0.87f	37.04±4.42c
VIII	38.67±6.48bc	4.04±1.65f	32.49±7.02c	12.39±4.29de	15.48±8.66d	6.20±4.70c	2.85±0.71f	56.34±4.45b
IX	9.57±1.94e	8.94±1.26e	18.78±6.84cd	5.15±0.80g	6.28±2.77de	7.05±2.66c	7.66±2.46de	4.14±0.78e
TM	35.92±1.54c	80.07±2.84a	45.70±1.48b	33.49±6.78b	31.09±5.23c	97.73±0.97a	98.72±0.64a	—
Bis	—	—	—	—	—	—	—	79.57±6.81a

¹⁾ I: 4'-*O*-甲基光甘草定 4'-*O*-methylglabridin; II: Hispaglabridin B; III: 光甘草定 Glabridin; IV: 甘草素 Iquiritigenin; V: 异甘草素 Isoliquiritigenin; VI: 甘草苷 Liquiritin; VII: 4,4'-*O*-二乙酰基异甘草素 4,4'-*O*-diacetylisoriquiritigenin; VIII: 4-*O*-乙酰基异甘草素 4-*O*-acetylisoriquiritigenin; IX: 4'-*O*-乙酰基异甘草素 4'-*O*-acetylisoriquiritigenin; TM: 甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl; Bis: 噻枯唑 Bismethiazol. Rs: 水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*; Ss: 油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*; Fg: 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*; Fo: 香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*; Bc: 黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*; Cg: 枸杞炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*; Mo: 稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*; Xoo: 水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 同列中不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercases in the same column indicate the significant difference at 0.05 level. —: 无数据 No datum.

菌、香蕉枯萎病菌和黄瓜灰霉病菌的抑制率显著高于甲基硫菌灵,对油菜菌核病菌的抑制率与甲基硫菌灵无显著差异。

异甘草素对水稻白叶枯病菌的抑制率达76.25%,与对照药剂噻枯唑无显著差异,但对供试真菌的抑制率均未超过20.00%;4,4'-O-二乙酰基异甘草素对水稻白叶枯病菌的抑制率高于30.00%,但显著低于噻枯唑,对供试真菌(小麦赤霉病菌除外)的抑制率低于20.00%;4-O-乙酰基异甘草素对水稻纹枯病菌、小麦赤霉病菌和水稻白叶枯病菌的抑制率高于30.00%,其中,对水稻纹枯病菌的抑制率与甲基硫菌灵无显著差异,但对其他植物病原菌的抑制率均低于20.00%。

此外,甘草素、甘草苷和4'-O-乙酰基甘草素对所有供试病原菌的抑制率均未超过20.00%,抑菌活性较低。

2.3.2 对植物病原菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值 鉴于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B、光甘草定和4-O-乙酰基异甘草素对供试植物病原真菌和细菌具有较好的抑菌活性,因此,进一步测定了这

4个化合物对所有供试病原菌的室内毒力;此外, $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 异甘草素和4,4'-O-二乙酰基异甘草素对供试细菌具有较好的抑菌活性,因此,测定了这2个化合物对供试细菌的室内毒力。结果(表2)显示:总体上看,在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,上述6个化合物对供试植物病原菌的抑制率越高,其对供试植物病原菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值越低。

4'-O-甲基光甘草定具有广谱抑菌活性,对油菜菌核病菌、黄瓜灰霉病菌和稻瘟病菌的 EC_{50} 值分别为 5.75 、 5.30 和 $9.61 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, EC_{90} 值分别为 33.29 、 26.82 和 $56.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑菌效果较好,其中,对黄瓜灰霉病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著低于甲基硫菌灵。此外,4'-O-甲基光甘草定对水稻纹枯病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值与甲基硫菌灵总体上无显著差异;对小麦赤霉病菌的 EC_{50} 值与甲基硫菌灵无显著差异,但 EC_{90} 值显著高于甲基硫菌灵;对香蕉枯萎病菌、枸杞炭疽病菌和水稻白叶枯病菌也具有一定的抑菌活性,但其 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著高于对照药剂。

Hispaglabridin B 也具有广谱抑菌活性,但其抑菌活性总体上弱于4'-O-甲基光甘草定,其中,对黄瓜

表2 甘草根中黄酮类化合物及其乙酰化衍生物对植物病原菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 2 EC_{50} and EC_{90} values of flavonoids isolated from root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and their acetyl derivatives against phytopathogens ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

化合物 Compound	水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>		油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>		香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	
	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}
I	14.91±1.66bc	76.87±22.09b	5.75±0.47b	33.29±14.74b	11.54±0.24b	340.36±52.23a	29.93±2.68b	>500.00
II	56.80±6.17a	>500.00	14.46±1.88a	176.34±39.10a	40.52±10.36a	>500.00	35.66±0.96a	464.17±39.57a
III	7.56±0.24d	36.23±1.01c	3.72±0.22c	16.23±1.39c	8.48±0.20c	71.44±10.92b	8.80±0.03d	57.68±5.98c
VIII	19.03±3.24b	288.53±94.08a	>500.00	>500.00	57.01±7.94a	>500.00	>500.00	>500.00
TM	13.64±1.09c	74.82±3.76b	1.37±0.31d	9.43±3.28d	11.35±0.67b	87.86±9.57b	13.47±0.52c	93.84±6.95b
化合物 Compound	黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>		枸杞炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>		水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	
	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}
I	5.30±0.13d	26.82±0.78c	188.06±38.18a	>500.00	9.61±0.33a	56.60±11.15a	10.52±1.15bc	193.52±12.01b
II	14.87±0.80b	191.32±31.91a	96.98±21.47b	>500.00	4.11±0.28b	33.54±8.82b	12.12±0.66b	162.16±25.21b
III	5.94±0.09c	32.39±1.88b	48.90±6.63c	>500.00	8.99±0.76a	50.05±12.42ab	9.52±0.90c	97.52±16.33c
V	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00	>500.00	2.98±0.27d	24.79±5.12d
VII	—	—	—	—	—	—	18.43±1.58a	366.50±76.47a
VIII	—	—	—	—	—	—	10.13±0.93c	310.87±62.71a
TM	67.18±13.92a	>500.00	1.72±0.15d	4.14±0.95	4.31±0.88b	8.39±1.62c	—	—
Bis	—	—	—	—	—	—	3.25±0.98d	16.96±3.27d

¹⁾ I: 4'-O-甲基光甘草定 4'-O-methylglabridin; II: Hispaglabridin B; III: 光甘草定 Glabridin; V: 异甘草素 Isoliquiritigenin; VII: 4,4'-O-二乙酰基异甘草素 4,4'-O-diacetylisoliquiritigenin; VIII: 4-O-乙酰基异甘草素 4-O-acetylisoliquiritigenin; TM: 甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl; Bis: 噻枯唑 Bismethiazol. EC_{50} : 有效中浓度 Median effective concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); EC_{90} : 抑制率90%时的化合物浓度 Compound concentration at the inhibition rate of 90% ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). 同列中不同的小写字母表示在0.05水平上差异显著 Different lowercases in the same column indicate the significant difference at 0.05 level. —: 无数据 No datum.

灰霉病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著低于甲基硫菌灵;对稻瘟病菌的 EC_{50} 值仅 $4.11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与甲基硫菌灵无显著差异,但 EC_{90} 值显著高于甲基硫菌灵;对其他供试病原菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值均显著高于对照药剂。

光甘草定具有广谱抑菌活性,且其抑菌活性总体上强于 4'-O-甲基光甘草定。除了对枸杞炭疽病菌的 EC_{50} 值为 $48.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 外,光甘草定对其他供试病原菌的 EC_{50} 值均低于 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其中,对水稻纹枯病菌、香蕉枯萎病菌和黄瓜灰霉病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值均显著低于甲基硫菌灵;对小麦赤霉病菌的 EC_{50} 值显著低于甲基硫菌灵,但 EC_{90} 值无显著差异;对油菜菌核病菌和稻瘟病菌具有较为强烈的抑菌活性,但 EC_{50} 和 EC_{90} 值均显著高于甲基硫菌灵;对枸杞炭疽病菌和水稻白叶枯病菌具有一定的抑菌活性,但 EC_{50} 和 EC_{90} 值均显著高于对照药剂。

异甘草素对水稻白叶枯病菌的 EC_{50} 和 EC_{90} 值分别为 2.98 和 $24.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与噻枯唑无显著差异,并明显低于其他 5 个化合物。4,4'-O-二乙酰基异甘草素对水稻白叶枯病菌具有一定的抑菌活性,但 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著高于噻枯唑。4-O-乙酰基异甘草素对水稻纹枯病菌、小麦赤霉病菌和水稻白叶枯病菌具有一定的抑菌活性,但 EC_{50} 和 EC_{90} 值显著高于对照药剂,对其他供试病原菌无抑菌活性或抑菌活性较低。

3 讨论和结论

本研究从甘草根中分离得到 6 个化合物,衍生化得到 3 个化合物。依据结构类型特征,上述 9 个化合物分为 3 种类型:4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B 和光甘草定为异黄酮类化合物,异甘草素、4,4'-O-二乙酰基异甘草素和 4-O-乙酰基异甘草素为查尔酮类化合物,甘草素、甘草苷和 4'-O-乙酰基甘草素为黄酮类化合物。

从抑菌活性可以看出,4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B 和光甘草定对大部分供试植物病原菌都有较好的抑菌活性;异甘草素仅对植物病原细菌表现出较好的抑菌活性;4,4'-O-二乙酰基异甘草素对植物病原细菌具有一定的抑菌活性;4-O-乙酰基异甘草素除对植物病原细菌具有抑菌活性外,对部分供试植物病原真菌也具有一定的抑菌活性;其他化合物对植物病原菌无抑菌活性或抑菌活性较弱。

4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B 和光甘草定为光甘草定或其类似物,具有异黄酮类化合物母核结构。在所有供试化合物中,光甘草定的抑菌活性最强,4'-O-甲基光甘草定的抑菌活性次之,二者对部分植物病原真菌的抑菌活性显著优于对照药剂甲基硫菌灵或与之相当;hispaglabridin B 虽然也具有广谱的抑菌活性,但其抑菌活性总体上低于 4'-O-甲基光甘草定和光甘草定,以上数据表明异黄酮类化合物结构中 B 环上取代基结构增大,可导致其抑菌活性降低。此外,杨春平等^[8]发现,光甘草定对姜瘟病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、番茄青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*)、大白菜软腐病菌 (*Erwinia carotovora*) 和猕猴桃溃疡病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*) 等植物病原细菌具有强烈的抑菌作用,对番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌、马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、稻瘟病菌和茶叶炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等植物病原真菌或卵菌的孢子萌发也具有强烈的抑制活性,与本研究的结果互为补充。何桥^[12]合成了光甘草定类似物,发现部分类似物在高浓度时对姜瘟病菌、草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、马铃薯早疫病菌 (*Alternaria solani*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 和西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 等植物病原菌有一定的抑制作用。上述研究结果显示:光甘草定及其类似物具有开发成生物农药的潜力。

异甘草素、4,4'-O-二乙酰基异甘草素和 4-O-乙酰基异甘草素为异甘草素或其衍生物,具有查尔酮类化合物母核结构,其抑菌活性总体上弱于光甘草定及其类似物。然而,异甘草素虽然对供试植物病原真菌未表现出明显的抑菌活性,但是对供试植物病原细菌具有较高的抑菌活性,与对照药剂噻枯唑无显著差异,并且明显优于其他 8 个黄酮类化合物,说明异甘草素具有开发成植物细菌病害防治药剂的潜力。4,4'-O-二乙酰基异甘草素尽管保留了对水稻白叶枯病菌的抑菌活性,但抑菌活性较异甘草素明显下降。与异甘草素相比,4-O-乙酰基异甘草素对水稻白叶枯病菌的抑菌活性有所下降,但对水稻纹枯病菌和小麦赤霉病菌却表现出一定的抑菌活性。上述研究结果显示:在查尔酮类化合物的 A、B 环上引入取代基,会导致其抑菌活性降低。其原因可能是该化合物经乙酰化后,分子体积变大,在与靶点作用时,较大的取代基团不利于化合物深入靶点的活性腔,从而减

弱化合物与靶点的作用,进而减弱抑菌活性。

此外,本研究还发现甘草素、甘草苷和4'-O-乙酰基甘草素在 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对所有供试病原菌的抑菌活性较弱。

综合3个类型化合物的抑菌活性,对植物病原真菌的抑制效果由高到低依次为异黄酮类化合物、查尔酮类化合物、黄酮类化合物,对植物病原细菌(水稻白叶枯病菌)的抑制效果由高到低依次为查尔酮类化合物、异黄酮类化合物、黄酮类化合物。

综上所述,从甘草中分离得到的4'-O-甲基光甘草定、hispaglabridin B和光甘草定对供试植物病原菌具有广谱的抑菌活性,可作为新型生物农药先导化合物进行开发,异甘草素对供试细菌水稻白叶枯病菌具有较好的抑菌活性,可作为先导化合物开发细菌病害防治药剂。

参考文献:

- [1] 吴孔明. 中国农作物病虫害防控科技的发展方向[J]. 农学报, 2018, 8(1): 35-38.
- [2] 张 兴, 马志卿, 冯俊涛, 等. 植物源农药研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 685-698.
- [3] 孙红霞. 甘草根提取物对番茄枯萎病菌生物活性及抑菌机理的研究[D]. 晋中: 山西农业大学农学院, 2014: 11-14.
- [4] 罗建军, 翁群芳, 胡美英. 抑菌植物的筛选及甘草对5种植物病原真菌抑菌活性的研究[J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(3): 356-360.
- [5] 于志同, 韩立荣, 吴 华, 等. 34种植物丙酮提取物抑菌活性的初步筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(9): 72-76, 82.
- [6] 潘翠翠. 甘草抑菌活性物质分析及通过组织培养提高其含量研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学农学院, 2014: 14-19.
- [7] 钟永恒, 贾仕杰, 郝同江, 等. 甘草黄酮类化合物生理功能及其在食品中应用研究[J]. 中国林副特产, 2016(3): 91-94.
- [8] 杨春平, 陈华保, 钱 勇, 等. 一种异黄酮类化合物用于制备农用杀菌剂的用途: CN105145596A[P]. 2017-11-07.
- [9] GAFNER S, BERGERON C, VILLINSKI J R, et al. Isoflavonoids and coumarins from *Glycyrrhiza uralensis*: antibacterial activity against oral pathogens and conversion of isoflavans into isoflavan-quinones during purification[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(12): 2514-2519.
- [10] 吴金梅, 李文华, 张 雨, 等. 甘草总黄酮对金黄色葡萄球菌的作用研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 54-57.
- [11] 曾超珍, 刘志祥, 吴耀辉, 等. 超声波提取甘草黄酮及其抑菌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2402-2403.
- [12] 何 桥. 光甘草定类似物的合成及其农药活性测定[D]. 成都: 四川农业大学农学院, 2018: 3-4.
- [13] KUSUMA I W, ITOH K, TACHIBANA S. Antifungal activities against plant pathogenic fungi of flavonoids isolated from ambony wood[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2005, 8(1): 136-140.
- [14] LI Y, WEI W, ZHANG J, et al. Structures and antipathogenic fungi activities of flavonoids from pathogen-infected *Astragalus adsurgens* [J]. Natural Product Research, 2019, 33(6): 822-826.
- [15] 包 芳, 白海英, 彭静文, 等. 栽培甘草的化学成分及其抗菌活性研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 577-582.
- [16] DUAN Y, GE C, LIU S, et al. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013, 106: 61-67.
- [17] LIANG X, DUAN Y, YU X, et al. Photochemical degradation of bismethiazol: structural characterisation of the photoproducts and their inhibitory activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Pest Management Science, 2016, 72(5): 997-1003.
- [18] TAYLOR R J, SALAS B, SECOR G A, et al. Sensitivity of North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl)[J]. Plant Disease, 2002, 86: 797-802.
- [19] VAYA J, BELIELINKY P A, AVIRAM M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23(2): 302-313.
- [20] KIM M, KIM S, KIM Y, et al. Absolute configurations of (\pm)-glabridin enantiomers[J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2009, 30(2): 415-418.
- [21] RYU Y B, KIM J H, PARK S J, et al. Inhibition of neuraminidase activity by polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2010, 20(3): 971-974.
- [22] KUMAR N, SINGH B, KAUL V K. Flavonoids from *Rosa damascena* Mill.[J]. Natural Product Communications, 2006, 1(8): 623-626.

(责任编辑:张明霞)