

# 飞机草地上部分化学成分及其抑菌活性研究

谭亚婷<sup>1</sup>, 左安建<sup>1</sup>, 何彦仪<sup>1</sup>, 罗雨薇<sup>1</sup>, 胡世俊<sup>2\*</sup>, 闫晓慧<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西南林业大学生物多样性保护学院 云南省森林灾害预警与控制重点实验室;

<sup>2</sup>西南林业大学林学院 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 昆明 650224

**摘要:**为探究飞机草地上部分化学成分及其抑菌作用。采用正相硅胶、Sephadex LH-20 等色谱方法, 从飞机草乙酸乙酯提取物中得到 10 个化合物, 根据<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS 波谱数据, 分别鉴定为: 5,6,7,4'-四甲氧基黄酮(**1**)、圣草素-7,4'-二甲醚(**2**)、5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基黄酮(**3**)、二氢山柰素(**4**)、异野樱素(**5**)、4'-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮(**6**)、5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮(**7**)、3'-羟基-5,7,8,4'-四甲氧基黄酮(**8**)、香叶木素(**9**)、山柰酚(**10**), 其中, 化合物**2**和**8**均首次从飞机草中分离得到。采用生长速率法测定了飞机草乙醇提取物、不同萃取物、乙酸乙酯萃取物柱层析不同馏分对 4 种核桃病原真菌的抑制活性, 确定其活性成分集中于馏分 2 (石油醚: 丙酮 = 5: 1), 选择该部分所得化合物**4**、**5**、**7**对 4 种病原菌进行毒力测定, 结果表明, 化合物**5**对拟茎点霉菌丝生长抑制作用最强, EC<sub>50</sub>为 0.106 2 mg/mL。研究结果为利用飞机草开发植物源农药提供理论依据。

**关键词:**飞机草; 化学成分; 抑菌活性; 毒力测定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)3-0410-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.008

## Study on chemical components from aerial part of *Chromolaena odorata* and their antifungal activity

TAN Ya-ting<sup>1</sup>, ZUO An-jian<sup>1</sup>, HE Yan-yi<sup>1</sup>, LUO Yu-wei<sup>1</sup>, HU Shi-jun<sup>2\*</sup>, YAN Xiao-hui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province,  
College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University;

<sup>2</sup>Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Southwest China,  
College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

**Abstract:** The chemical constituents of aerial part of *Chromolaena odorata* were explored by silica gel column chromatography as well as Sephadex LH-20 chromatography and their antifungal activity were also tested. Finally, 10 compounds were isolated from the ethyl acetate extract of *C. odorata* and their structures were determined by various spectral data including <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS. The structures were identified as 5,6,7,4'-tetramethoxyflavanone (**1**), eriodictyol-7,4'-dimethyl ether (**2**), 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavanone (**3**), dihydrokaempferide (**4**), isosakuranetin (**5**), 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone (**6**), 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavanone (**7**), 3'-hydroxy-5,7,8,4'-tetramethoxyflavone (**8**), diosmetin (**9**), kaempferol (**10**). Among them, compounds **2** and **8** were isolated for the first time from *C. odorata*. The antifungal activity on 4 pathogenic fungi of *Juglans regia* of different extracts of *C. odorata* and column chromatography of different distillates of the ethyl acetate layer extract from *C. odorata* were measured by growth rate method. It was found that the active components were concentrated in distillate 2 (petroleum ether: acetone = 5: 1). The virulence of the compounds **4**, **5** and **7** against the pathogenic fungi were determined. According to the results compound **5** showed the significant inhibitory effect on the growth of mycelium with EC<sub>50</sub> of 0.106 2 mg/mL. The results provide a theoretical basis for the exploitation of plant-derived pesticides by using *C. odorata*.

**Key words:** *Chromolaena odorata*; chemical constituents; antifungal activity; toxicity test

收稿日期: 2020-06-24 接受日期: 2020-12-21

基金项目: 国家自然科学基金(31560106); 云南省应用基础研究重点项目(2019FA011); 云南省教育厅科学基金(2018 Y133)

\* 通信作者 E-mail: shijunhu@126.com, luckyxh@163.com

飞机草(*Chromolaena odorata* L.)又名香泽兰,是一种多年生草本,属于菊科(Compositae)泽兰属(*Eupatorium*)<sup>[1]</sup>。原产地为中、南美洲,现分布地区有非洲、大洋洲、亚洲和西太平洋群岛大部分热带及亚热带地区<sup>[2]</sup>。通过有性生殖与无性生殖方式进行繁殖,其瘦果能借助冠毛随风长距离传播<sup>[3]</sup>。可分泌化感物质来抑制其周围其他植物的生长,对生物多样性造成极大的破坏<sup>[4]</sup>。因此,飞机草被列为世界各国重要检疫性杂草之一<sup>[5]</sup>,飞机草主要化学成分有黄酮、萜类、生物碱等物质,具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化等生物活性<sup>[6-8]</sup>。在我国民间作为一种全草入药且多外用的中草药,其性温,味道微酸,可用于跌打肿痛、疮疡肿毒、皮炎和外伤止血,还具有驱虫、杀虫的作用<sup>[9]</sup>。

核桃(*Juglans regia* L.)的种植在云南省脱贫攻坚和美丽乡村建设中发挥巨大的作用<sup>[10]</sup>,但近年来云南核桃种植地区的病害流行严重影响核桃的品质和产量,给种植户造成了极大的经济损失<sup>[11,12]</sup>,传统化学防治存在环境污染、人畜安全、农药残留等安全隐患。随着“绿色食品”概念的加强<sup>[13]</sup>,人们意识到对食品安全与人类健康息息相关<sup>[14]</sup>,不断从植物中寻找具有生物活性的抗菌物质,开发对作物安全、高效、低毒、低残留,对人体安全的新型植物源农药<sup>[15]</sup>。因此,有效利用入侵植物的资源优势也是控制其危害的方法之一<sup>[16]</sup>。本研究以入侵植物飞机草地上部分为材料,分离并鉴定化合物10个,其中,化合物2和8均首次从飞机草中获得,抑菌活性成分集中于乙酸乙酯萃取物柱层析馏分2中,因此,进一步对该部分分离得到的化合物进行抑菌活性研究。为利用入侵植物飞机草,使其变废为宝,达到减少环境破坏的目的,具有一定的社会、生态及经济效益,同时为核桃真菌病害的绿色防治提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:DFY-C 快速开盖万能高速粉碎机(温岭市林大机械有限公司);LT502 电子天平(常熟市大量仪器有限责任公司);N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);DL-1 万用电炉(天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂);正相色谱硅胶(青岛海洋化工厂);MCI 小孔树脂,40~70 μm 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司);反相色谱硅胶(德国默克公司);ZF-6 三重紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);Bruker DRX-

500 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司);WPL-230BE 恒温电热培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司);无菌超净工作台(苏净安泰工厂);自动压力蒸汽灭菌器(厦门致微仪器有限公司)。

试剂:工业纯硫酸、分析纯乙醇(云南杨林滇滇药业有限公司);工业纯乙醇、石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷、甲醇、丙酮经重蒸后使用(昆明锱泰纳工贸有限公司);氘代氯仿、氘代丙酮、氘代甲醇(美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司);水为实验室自制蒸馏水。

### 1.2 材料与菌种

飞机草地上部分于2011年8月采自云南红河,由西南林业大学胡世俊副教授鉴定为*Chromolaena odorata* L.,植物标本存放于西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室。植物材料3.7 kg 风干粉碎,按料液比1:3加入95%乙醇,加热回流提取4 h,共5次,提取液用旋转蒸发仪浓缩回收溶剂,得提取物520 g,4℃下冷藏用于后期研究。

供试菌种为叶点霉(*Phyllosticta* sp.)、炭疽菌(*Colletotrichum* sp.)、壳二孢(*Ascochyta* sp.)、拟茎点霉(*Phomopsis* sp.),由西南林业大学生命科学学院陈玉惠教授提供,病原菌系从云南临沧、大理、楚雄、曲靖、保山和昭通等县(市)核桃主栽地区的398份感病核桃病叶和果实分离得到,用PDA培养基,于28℃培养箱中培养。

### 1.3 分离与鉴定

蒸馏水溶解粗提物,依次用等量石油醚、乙酸乙酯萃取三次,过滤,减压浓缩得石油醚浸膏(114.38 g)、乙酸乙酯浸膏(145.78 g)、水萃取浸膏(167.32 g)。乙酸乙酯浸膏以石油醚/丙酮系统硅胶柱层析,湿法装柱,干法上样,依次用10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、0:1梯度洗脱,浓缩得Fr.1(9.78 g)、Fr.2(8.69 g)、Fr.3(5.86 g)、Fr.4(7.56 g)、Fr.5(6.97 g)、Fr.6(10.62 g)。Fr.1经MCI色谱柱甲醇-水(10%→95%)分离,60%~70%部分采用葡萄糖凝胶色谱柱(丙酮)纯化得无色透明块状结晶、白色粉末,为化合物1(683 mg)、2(592 mg),剩余部分采用葡萄糖凝胶色谱柱(氯仿:甲醇=1:1)纯化得白色粉末,为化合物3(168 mg)。Fr.2经MCI色谱柱甲醇-水(25%→100%)分离,其中25%-55%部分采用葡萄糖凝胶色谱柱(甲醇)纯化得白色粉末,为化合物4(98 mg);70%部分经重结晶析出白色针状结晶,为化合物5(76 mg),采用硅胶柱色谱分离70%

部分,以石油醚-乙酸乙酯作为洗脱剂,洗脱梯度为 30:1、20:1、10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、5:1 部分经重结晶析出白色片状结晶,为化合物 **6** (42 mg); 70% ~ 90% 部分采用葡萄糖凝胶色谱(氯仿:甲醇 = 1:1) 纯化得到白色片状结晶,为化合物 **7** (56 mg)。Fr. 4 经 MCI 色谱柱甲醇-水(20% → 100%) 分离,采用硅胶柱色谱分离 60% 部分,石油醚/氯仿/甲醇作为洗脱剂,洗脱梯度为 62.5:62.5:1、30:30:1、15:15:1、8:8:1、4:4:1、2:2:1、62.5:62.5:1 部分采用葡萄糖凝胶色谱(甲醇)淋洗后经硅胶柱色谱分离,石油醚/乙酸乙酯作洗脱剂,洗脱梯度为 10:1、5:1、3:1、2:1、1:1、5:1 部分经重结晶析出黄色颗粒结晶,化合物 **8** (426 mg); 30:30:1 部分采用葡萄糖凝胶色谱(甲醇)纯化得到无色透明结晶,为化合物 **9** (354 mg); 15:15:1 部分采用葡萄糖凝胶色谱(氯仿:甲醇 = 1:1) 纯化得到黄色粉末,为化合物 **10** (656 mg)。

采用<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、MS 等光谱学方法,各化合物在 TLC 中比移值以及表现出的物理化学特征等对所得单体化合物进行结构鉴定,并参照文献,确定以上化合物化学结构。

#### 1.4 飞机草粗提物抑菌活性检测

分别称取 0.50 g 供试植物乙醇提取物、不同萃取物、乙酸乙酯柱层析馏分溶解于分析 DMSO 溶液中,超声辅助溶解制成 100 mg/mL 的粗提物母液。采用菌丝生长速率法对供试核桃病原真菌的抑制率进行测定。在无菌操作条件下,于 50 ~ 60 °C 的 PDA 培养基中加入飞机草粗提物母液,稀释为 1 mg/mL 的含药培养基,同时以含等体积的 DMSO 溶剂的培养基的作为对照,含 50 μg/mL 苯醚甲环唑-DMSO 溶液的培养基作为阳性对照,用直径为 4 mm 打孔器在菌落边缘生长一致的部分打取菌饼,将菌饼(有菌丝的面朝下)转接于含药平板中央,每个处理共 5 个重复,置于 28 °C 恒温培养箱中暗培养。采用十字交叉法每 2 天对各处理菌落生长直径进行测定,对照菌落长满至培养皿边缘时结束测定,根据下列公式计算抑菌率:

$$\text{对照纯生长量(mm)} =$$

$$\frac{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}}{\text{对照纯生长量}} \quad (1)$$

$$\text{处理纯生长量(mm)} = \text{组菌落直径} - \text{菌饼直径} \quad (2)$$

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照纯生长量} - \text{处理纯生长量}}{\text{对照纯生长量}} \times 100\% \quad (3)$$

#### 1.5 飞机草化学成分毒力测定

分别称取 3 种化合物 0.10 g,加入分析纯 DM-

SO 溶液,超声辅助溶解制成 10 mg/mL 的化合物母液。采用梯度法稀释法分别在 150 mL 的 PDA 培养基中于 50 ~ 60 °C 时加入 0.75、1.50、2.25、3.00 mL 化合物母液,稀释成浓度为 50、100、150、200 μg/mL 的 4 个浓度梯度的含药培养基,以加入等梯度的等体积 DMSO 为对照,每个处理共 5 个重复,接种与培养方式同“1.4”。参照陈丽华室内离体抑菌活性测定方法<sup>[17]</sup>,以药剂质量浓度对数为横坐标(x),抑菌活性概率值为纵坐标(y),采用数据软件绘制毒力曲线,求得毒力回归方程和相关系数,计算 EC<sub>50</sub>,对不同植物粗提物的毒力大小进行比较。

#### 1.6 数据处理

以上数据均采用 Excel 2010 软件进行数据统计,运用 SPSS17.0 统计软件(One-way ANOVA, Duncan post hoc test,  $P < 0.05$ ) 进行多重比较分析。

### 2 结果与分析

#### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 无色透明块状结晶;ESI-MS:  $m/z$  345  $[M+H]^+$  得出化合物分子量为 344,可判定该化合物分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.38 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.33 (1H, d, H-8), 5.34 (1H, dd,  $J = 2.8, 13.4$  Hz, H-2), 3.94, 3.86, 3.83, 3.82 (各 3H, s, 4 × OCH<sub>3</sub>), 3.02 (1H, dd,  $J = 13.4, 16.7$  Hz, H-3α), 2.75 (1H, dd,  $J = 2.9, 16.7$  Hz, H-3β) <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.2 (C-2), 45.4 (C-3), 189.6 (C-4), 154.3 (C-5), 137.5 (C-6), 159.5 (C-7), 96.4 (C-8), 160.0 (C-9), 109.2 (C-10), 130.7 (C-1'), 127.7 (C-2', 6'), 114.3 (C-3', 5'), 159.8 (C-4'), 61.7, 61.4, 56.1, 55.4 (4 × OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[18]</sup>报道的已知化合物一致,因此鉴定为 5,6,7,4'-四甲氧基黄烷酮。

**化合物 2** 白色无定形粉末;ESI-MS:  $m/z$  317  $[M+H]^+$  得出化合物分子量为 316,可判定该化合物分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.02 (1H, s, 5-OH), 7.04 (H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 6.93 (2H, d,  $J = 2.1, 8.3$  Hz, H-6'), 6.88 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'), 6.06 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-6), 6.04 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-8), 5.32 (1H, dd,  $J = 3.0, 13.0$  Hz, H-2), 3.91 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.07 (1H, dd,  $J = 13.0, 17.2$  Hz, H-3α), 2.78 (1H, dd,  $J = 3.1, 17.2$  Hz, H-3β); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.0 (C-2), 43.2 (C-3), 196.0 (C-4),

164.1 (C-5), 95.1 (C-6), 168.0 (C-7), 94.3 (C-8), 162.9 (C-9), 103.2 (C-10), 131.5 (C-1'), 112.7 (C-2'), 145.9 (C-3'), 145.0 (C-4'), 110.7 (C-5'), 118.2 (C-6'), 56.1, 55.7 (2 × OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[19]</sup>报道的已知化合物一致, 圣草素-7,4'-二甲醚。

**化合物 3** 白色粉末; ESI-MS:  $m/z$  317 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 316, 可判定该化合物分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.19 (1H, s, 5-OH), 7.37 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-2', H-6'), 6.95 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-3', H-5'), 6.11 (1H, s, H-8), 5.34 (1H, dd,  $J$  = 2.9, 13.1 Hz, H-2), 3.94 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.09 (1H, dd,  $J$  = 13.1, 17.2 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.78 (1H, dd,  $J$  = 3.0, 17.2 Hz, H-3 $\beta$ ); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.1 (C-2), 43.2 (C-3), 196.9 (C-4), 154.4 (C-5), 128.3 (C-6), 157.5 (C-7), 94.6 (C-8), 158.7 (C-9), 103.1 (C-10), 130.2 (C-1'), 127.7 (C-2', 6'), 114.2 (C-3', 5'), 160.1 (C-4'), 61.0 (6-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (4'-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[20]</sup>报道的已知化合物一致, 判定该化合物为 5,7-二羟基-6,4'-二甲氧基二氢黄酮。

**化合物 4** 白色絮状粉末; ESI-MS:  $m/z$  303 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 302, 可判定该化合物分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 7.51 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2', H-6'), 6.99 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-3', H-5'), 5.99 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-6), 5.95 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-8), 5.12 (1H, d,  $J$  = 11.3, H-2), 4.68 (1H, d,  $J$  = 11.6, H-3), 3.83 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 84.1 (C-2), 73.1 (C-3), 198.2 (C-4), 165.0 (C-5), 97.1 (C-6), 167.7 (C-7), 96.0 (C-8), 164.1 (C-9), 101.5 (C-10), 130.2 (C-2', 6'), 114.4 (C-3', 5'), 55.6 (4'-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[21]</sup>的已知化合物一致, 判定该化合物为二氢山柰素。

**化合物 5** 白色针状结晶; ESI-MS:  $m/z$  287 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 286, 可判定该化合物分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.37 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-2', H-6'), 6.95 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-3', H-5'), 5.97 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-6), 5.99 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-8), 5.37 (1H, dd,  $J$  = 3.0, 13.1 Hz, H-2), 3.10 (1H, dd,  $J$  = 13.1, 17.2 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.79 (1H, dd,  $J$  = 3.0, 17.0 Hz, H-3 $\beta$ ),

3.83 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 12.05 (1H, s, 5-OH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.0 (C-2), 43.1 (C-3), 196.1 (C-4), 164.4 (C-5), 96.7 (C-6), 164.3 (C-7), 95.4 (C-8), 164.4 (C-9), 103.3 (C-10), 130.3 (C-1'), 127.8 (C-2', 6'), 114.3 (C-3', 5'), 160.1 (C-4'), 55.4 (4'-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[22]</sup>的已知化合物一致, 因此鉴定为异野樱素。

**化合物 6** 白色片状结晶; ESI-MS:  $m/z$  331 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 330, 可判定该化合物分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.34 (1H, s, H-8), 5.33 (1H, dd,  $J$  = 2.8, 13.4 Hz, H-2), 3.94, 3.86, 3.82 (各 3H, s, 3 × OCH<sub>3</sub>), 3.02 (1H, dd,  $J$  = 13.4, 16.7 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.76 (1H, dd,  $J$  = 2.9, 16.7 Hz, H-3 $\beta$ ); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.2 (C-2), 45.3 (C-3), 189.8 (C-4), 154.3 (C-5), 137.5 (C-6), 158.6 (C-7), 96.4 (C-8), 159.9 (C-9), 109.1 (C-10), 130.7 (C-1'), 128.0 (C-2', 6'), 115.7 (C-3', 5'), 156.2 (C-4'), 61.7, 61.4, 56.2 (3 × OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[18]</sup>报道的已知化合物一致, 因此鉴定为 4'-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮。

**化合物 7** 白色片状结晶; ESI-MS:  $m/z$  37 ([M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 374, 可判定该化合物分子式为 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.25 (2H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-2'), 6.94 (2H, dd,  $J$  = 2.2, 8.8 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-5'), 5.34 (1H, dd,  $J$  = 2.7, 13.4 Hz, H-2), 3.04 (1H, dd,  $J$  = 13.5, 16.7 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.77 (1H, dd,  $J$  = 2.8, 16.7 Hz, H-3 $\beta$ ), 3.87, 3.82, 3.94, 3.92, 3.90 (各 3H, s, 5 × OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 79.5 (C-2), 45.5 (C-3), 189.3 (C-4), 154.3 (C-5), 137.6 (C-6), 159.8 (C-7), 96.4 (C-8), 159.5 (C-9), 109.2 (C-10), 131.1 (C-1'), 109.4 (C-2'), 149.3 (C-3'), 149.5 (C-4'), 111.2 (C-5'), 118.9 (C-6'), 61.7, 61.4, 56.2, 56.0, 56.0 (5 × OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献报道<sup>[21]</sup>的已知化合物一致, 判定该化合物为 5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮。

**化合物 8** 黄色颗粒结晶; ESI-MS:  $m/z$  359 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 358, 可判定该化合物分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.48 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-6'), 7.39 (1H, s, H-2'), 7.06 (1H, s, H-6), 7.05 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5'),

6.56 (1H, s, H-3), 3.93, 3.91, 3.85, 3.84 (各 3H, s, 4 × OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 164.0 (C-2), 106.9 (C-3), 179.6 (C-4), 153.3 (C-5), 97.9 (C-6), 160.0 (C-7), 141.8 (C-8), 156.1 (C-9), 112.6 (C-10), 124.9 (C-1'), 113.0 (C-2'), 148.8 (C-3'), 152.4 (C-4'), 113.8 (C-5'), 119.7 (C-6'), 62.6, 61.8, 57.0, 56.5 (4 × OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[22]</sup>报道的已知化合物一致,判定该化合物为 3'-羟基-5,7,8,4'-四甲氧基黄烷酮。

**化合物 9** 无色透明针状结晶; ESI-MS: *m/z* 301 [M + H]<sup>+</sup> 得出化合物分子量为 300, 可判定该化合物分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 7.56 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.5 Hz, H-2'), 7.49 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-6'), 7.13 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3'), 6.64 (1H, s, H-3), 6.55 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.25 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.94 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.86 (1H, s, 5-OH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ: 163.3 (C-2), 104.6 (C-3),

183.0 (C-4), 99.7 (C-6), 164.9 (C-7), 94.7 (C-8), 158.8 (C-9), 104.6 (C-10), 124.8 (C-1'), 119.7 (C-2'), 112.4 (C-3'), 151.7 (C-4'), 147.8 (C-5'), 113.6 (C-6'), 56.4 (4'-OCH<sub>3</sub>)。上述数据与文献<sup>[23]</sup>报道的已知化合物一致,判定该化合物为香叶木素。

**化合物 10** 黄色粉末; ESI-MS: *m/z* 285 [M-H]<sup>-</sup> 得出化合物分子量为 286, 可判定该化合物分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.07 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3', 5'), 6.38 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 148.0 (C-2), 137.1 (C-3), 177.4 (C-4), 158.3 (C-5), 99.3 (C-6), 165.6 (C-7), 94.4 (C-8), 162.5 (C-9), 104.5 (C-10), 123.7 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 116.3 (C-3', 5'), 160.6 (C-4')。上述数据与文献<sup>[24]</sup>报道的已知化合物一致,判定该化合物为山柰酚。

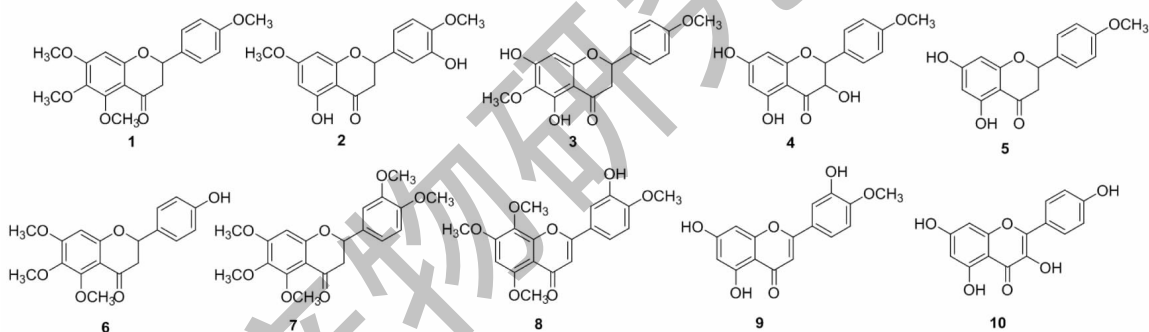


图 1 化合物 1~10 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of the compounds 1-10

## 2.2 飞机草粗提物抑菌活性筛选

采用生长速率法测定了飞机草不同粗提物对四株核桃病原菌叶点霉、炭疽菌、壳二孢和拟茎点霉的抑菌活性,结果见表 1。飞机草乙醇提取物、石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物对叶点霉均表现出一定的抑菌活性,抑菌率在 45.45% ~ 60.05%, 其中,乙酸乙酯萃取物对叶点霉的抑菌作用最强,而水萃取物对叶点霉无抑菌活性。飞机草各提取物对炭疽菌和拟茎点霉的抑菌活性均较弱,抑菌率在 6.74% ~ 26.97% 之间,其中水萃取物对拟茎点霉无抑菌活性。飞机草不同提取物对壳二孢均表现出较强的抑菌活性,抑菌率均在 50% 以上,其中,乙酸乙酯萃取物对壳二孢的抑菌率高达 79.06%。上述结果表明,飞机草对供试四株核桃病原菌的,抑菌活性成分

主要集中在乙酸乙酯萃取物中。因此,我们进一步对乙酸乙酯萃取物的抑菌成分进行了研究。

## 2.3 飞机草乙酸乙酯萃取物不同馏分的抑菌筛选

采用硅胶柱层析对飞机草乙酸乙酯萃取物进行了成分分离,获得 6 个馏分,并对各个馏分的抑菌活性进行了测定。由表 2 可知,不同馏分对 4 种核桃病原真菌的抑菌作用表现出明显差异。馏分 1~3 均能明显抑制叶点霉的菌丝生长,馏分 4~6 对叶点霉的菌丝生长无影响,馏分 2 (石油醚:丙酮 = 5:1) 部分对该病原菌菌丝生长抑制效果最强;馏分 1-6 均能抑制炭疽菌的菌丝生长,其中馏分 2 部分对炭疽菌抑菌活性最好;馏分 1~3 对壳二孢表现出良好的抑制作用,其中,馏分 3 的抑菌活性相对较高,馏分 4~6 对壳二孢无抑菌效果;馏分 1~5 均能对拟

表1 飞机草不同粗提取物对4种核桃病原菌的抑菌活性

Table 1 The anti-fungal activities of the different extracts from *C. odorata* against 4 pathogenic fungi on *J. regia*

样品 Sample	抑制率 Inhibition rate (%)			
	叶点霉 <i>Phyllosticta</i> sp.	炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> sp.	壳二孢 <i>Ascochyta</i> sp.	拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.
乙醇提取物 Ethanol extract	45.45 ± 0.00 <sup>d</sup>	19.09 ± 0.91 <sup>c</sup>	65.10 ± 0.66 <sup>c</sup>	22.64 ± 0.00 <sup>b</sup>
石油醚萃取物 Petroleum ether extract	54.88 ± 0.48 <sup>c</sup>	19.28 ± 0.72 <sup>c</sup>	65.89 ± 0.78 <sup>c</sup>	22.01 ± 0.44 <sup>b</sup>
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	60.05 ± 0.72 <sup>b</sup>	26.97 ± 0.30 <sup>b</sup>	79.06 ± 0.40 <sup>b</sup>	23.90 ± 0.78 <sup>b</sup>
水萃取物 Water extract	-	6.74 ± 0.08 <sup>d</sup>	51.77 ± 0.61 <sup>d</sup>	-
苯醚甲环唑 Difenoconazole	73.78 ± 1.14 <sup>a</sup>	76.41 ± 0.86 <sup>a</sup>	89.40 ± 1.30 <sup>a</sup>	68.87 ± 0.00 <sup>a</sup>

注:“/”代表未统计或未检出;数据后的±值,表示标准偏差;同列数据后的小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

Note:“/” represents uncounted or undetected;The ± value after the data is the standard deviation;The lowercase letters in the same list indicate significant differences among different soil water contents ( $P < 0.05$ ), the same below.

茎点霉表现出一定的抑制作用,抑菌率在11.22%~58.50%之间,其中馏分2的抑菌率最高,对菌丝生长的抑制作用最强,而馏分6对该病原菌无抑菌

效果。综上所述,有效抑制叶点霉、炭疽菌、壳二孢3种病原菌的成分主要集中在馏分2部分,抑制壳二孢的成分主要集中在馏分3部分。

表2 飞机草乙酸乙酯萃取物不同馏分对4种核桃病原菌的抑菌活性

Table 2 The anti-fungal activities of the different distillates of ethyl acetate extract from *C. odorata* against 4 pathogenic fungi on *J. regia*

馏分 Distillate	抑制率 Inhibition rate (%)			
	叶点霉 <i>Phyllosticta</i> sp.	炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> sp.	壳二孢 <i>Ascochyta</i> sp.	拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.
Fr. 1	37.47 ± 0.63 <sup>c</sup>	32.21 ± 0.55 <sup>c</sup>	16.67 ± 0.23 <sup>d</sup>	57.95 ± 0.54 <sup>b</sup>
Fr. 2	67.54 ± 0.88 <sup>a</sup>	40.69 ± 0.69 <sup>b</sup>	18.62 ± 0.56 <sup>c</sup>	58.50 ± 0.90 <sup>b</sup>
Fr. 3	54.89 ± 0.26 <sup>b</sup>	38.13 ± 0.20 <sup>b</sup>	46.90 ± 0.32 <sup>b</sup>	44.65 ± 0.45 <sup>c</sup>
Fr. 4	-	6.78 ± 0.11 <sup>c</sup>	-	11.22 ± 0.10 <sup>e</sup>
Fr. 5	-	11.84 ± 1.49 <sup>d</sup>	-	14.47 ± 0.92 <sup>d</sup>
Fr. 6	-	8.45 ± 1.55 <sup>de</sup>	-	-
苯醚甲环唑 Difenoconazole	67.54 ± 0.88 <sup>a</sup>	69.51 ± 1.18 <sup>a</sup>	56.25 ± 0.09 <sup>a</sup>	79.24 ± 0.32 <sup>a</sup>

注:表中 Fr. 1~Fr. 6 代表乙酸乙酯萃取物馏分,依次为洗脱剂石油醚:丙酮=10:1,5:1,3:1,2:1,1:1,0:1。

Note:Fr. 1-Fr. 6 represent the distillates of ethyl acetate extracts, followed by petroleum ether:acetone = 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 0:1.

## 2.4 不同化合物对供试病原菌的抑菌活性

进一步以抑菌活性较好的馏分2部分离得到3个量大的化合物4、5、7为供试化合物,测定其对4种核桃病原真菌的抑菌毒力,结果表明不同化合物对各病原菌的毒力之间的差别显著(表3)。其中,3个化合物对叶点霉、炭疽菌、壳二孢的抑菌活性强弱依次为:化合物5 > 化合物4 > 化合物7,其中抑菌活性最强的化合物5对上述三种菌的 $EC_{50}$ 分别为0.154 3、0.202 9、0.268 7 mg/mL,但仍均与阳性对照差异较大;对拟茎点霉的抑菌活性最强的仍是化合物5,其次为化合物7和化合物4, $EC_{50}$ 分别为0.106 2、0.404 2、0.587 0 mg/mL,其中,化合物5

(异野樱素)对4种核桃病原菌均表现出较好的抑菌作用,该化合物对拟茎点霉菌丝生长抑制作用最强(图2D-1)。4种菌株在PDA培养基中于28℃恒温培养箱中暗培养,菌丝长势均良好(图2A~D)。菌丝初期均为白色,菌落中间的颜色在4天后出现变化,6天时最为明显,且添加药剂的菌落颜色较深于对照。叶点霉菌落中间为淡墨绿色,白色绒毛状菌丝附于外围,炭疽菌菌落中间为淡橘红色,外围菌丝呈白色,壳二孢菌落中间为墨绿色且占比例较大,外围仅有一圈白色绒毛状菌丝,拟茎点霉菌落出现明显的颜色分圈,苯醚甲环唑处理后能明显抑制各病原菌菌丝生长。

表3 3种化合物对4种核桃病原菌的相对毒力  
Table 3 Toxicity of 3 compounds against 4 pathogenic fungi infecting *J. regia*

供试菌 Pathogen	供试化合物 Test compound	毒力回归方 Toxicity equation	相关系数 $r^2$ Correlation coefficient	EC <sub>50</sub> (mg/mL)
叶点霉 <i>Phyllosticta</i> sp.	4	$y = 1.001 2x + 1.994 5$	0.969 6	1.004 4
	5	$y = 2.331 4x - 0.101 9$	0.929 7	0.154 3
	7	$y = 0.287 3x + 3.929 3$	0.988 1	5.330 9
	Y	$y = 1.338 2x + 2.465 4$	0.996 7	0.078 3
炭疽菌 <i>Colletotrichum</i> sp.	4	$y = 1.547 1x + 0.872 5$	0.900 8	0.465 5
	5	$y = 3.350 9x - 2.731 6$	0.949 5	0.202 9
	7	$y = 1.125 3x + 1.960 7$	0.924 3	0.502 2
	Y	$y = 1.687 5x + 1.528 3$	0.996 8	0.114 1
壳二孢 <i>Ascochyta</i> sp.	4	$y = 1.325 6x + 1.330 0$	0.909 2	0.587 0
	5	$y = 2.357 9x - 0.728 1$	0.926 5	0.268 7
	7	$y = 0.227 7x + 3.902 8$	0.971 0	65.856 7
	Y	$y = 1.944 5x + 1.205 1$	0.954 7	0.089 5
拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.	4	$y = 0.699 6x + 3.223 5$	0.976 7	0.587 0
	5	$y = 2.310 6x + 0.318 1$	0.956 7	0.106 2
	7	$y = 1.163 7x + 1.966 7$	0.929 8	0.404 2
	Y	$y = 2.218 1x + 0.555 8$	0.927 5	0.100 8

注：“Y”表示阳性对照。

Note: “Y” represents the positive control.

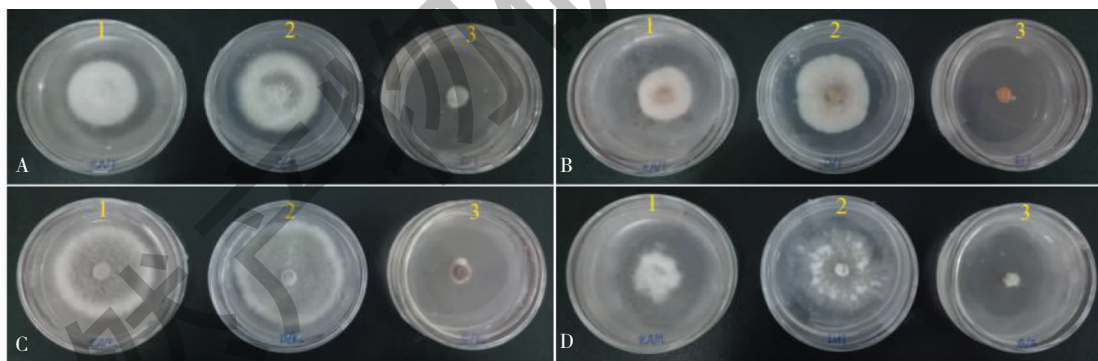


图2 150 μg/mL 异野樱素对核桃病原菌的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effect of 150 μg/mL of isosakuranetin on pathogenic fungi from *J. regia*

注: A~D: 叶点霉、炭疽菌、壳二孢、拟茎点霉; 1~3: 异野樱素、对照、阳性对照。Note: A-D: *Phyllosticta* sp., *Colletotrichum* sp., *Ascochyta* sp., *Phomopsis* sp.; 1-3: Isosakuranetin, control group and positive control group.

### 3 讨论与结论

本研究为进一步探究飞机草的抑菌活性,对飞机草地上部分进行系统的分离,从乙酸乙酯层共分离得到10个化合物,包括6个二氢黄酮、1个二氢黄酮醇、2个黄酮、1个黄酮醇,其中有化合物**2**、**8**首次从飞机草中分离获得。研究报道,黄酮化合物是飞机草叶片中主要次生代谢物质,在飞机草的防御

和竞争中具有重要作用,能使飞机草在入侵过程通过强抗性和强化感活性去突破新天敌和新的竞争者的阻碍<sup>[25]</sup>。因此,推测黄酮化合物是飞机草成功入侵的特征成分。植物为抵御来自于环境或其它生物物种的外来伤害逐渐形成了基于特异性的作用机制形成的化学防御物质,使其在长期进化和自然选择中占有明显优势<sup>[26]</sup>,植物源活性物质可作为抑菌主

要成分<sup>[27]</sup>,对今后开发为新型的天然抗菌剂具有重要意义。

目前常用乙醇提取植物中次生代谢,但不同的提取溶剂对植物抑菌效果具有不同影响<sup>[28]</sup>。本研究对飞机草各粗提物进行抑菌活性筛选,发现 1 mg/mL 乙酸乙酯萃取物对 4 种核桃病原真菌的抑制活性高于乙醇提取物、石油醚萃取物、水萃取物,可能是抑制核桃病原菌的活性成分极性与乙酸乙酯极性相似。该萃取物经硅胶柱色谱分离划段得到 6 个馏分,比较发现馏分 2 部分能够有效抑制叶点霉、炭疽菌、拟茎点霉病原菌,抑制率分别为 67.54%、40.69%、58.50%,抑制壳二孢的成分主要集中在馏分 3 部分,进一步测定了馏分 2 部分分离得到的量大的化合物 4、5、7 对 4 种核桃病原真菌的抑菌毒力。化合物 4、5 对 4 株病原菌的整体抑制作用优于化合物 7,其中,化合物 5 对 4 种核桃病原菌的抑菌活性均较好,其对各病原菌的 EC<sub>50</sub> 分别为拟茎点霉 0.106 2 mg/mL、叶点霉 0.154 3 mg/mL、炭疽菌 0.202 9 mg/mL、壳二孢 0.268 7 mg/mL,该结果与已报道的 A 环的 5-OH、7-OH 为重要抗菌活性基团相吻合<sup>[23]</sup>。此外,化合物结构中的甲氧基存在,也是其抑菌的活性基团,研究报道该类化合物可有效抑制菌胶包炭疽菌,且抑菌效果随浓度的增加而增强<sup>[29]</sup>。黄酮类化合物因其具有较高的抑菌活性,很早就被应用于抑菌治疗<sup>[30]</sup>。

综上所述,飞机草乙醇提取物中抑核桃病原菌的活性成分集中于乙酸乙酯层,而异野樱素是该萃取层的主要活性物质。飞机草富含黄酮化学成分,黄酮类抑菌活性显著<sup>[39]</sup>。今后可进一步围绕黄酮类成分进行抑菌先导化合物的开发,为飞机草的治理和综合利用奠定基础,也为开发为新型杀菌剂提供理论依据。

**致谢:**感谢西南林业大学生命科学学院陈玉惠教授提供供试菌种。

#### 参考文献

- 1 Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Science. Flora of China: Vol 74 (中国植物志:第 74 卷) [M]. Beijing: Science Press, 1985.
- 2 Yu XQ, Feng YL, Li QM. Review of research advances and prospects of invasive *Chromolaena odorata* [J]. Chin J Plant Ecol (植物生态学报), 2010, 34: 591-600.
- 3 Yang FJ. Study on invasion mechanism and control of harmful invasive plant *Chromolaena odorata* [D]. Heilongjiang: Northeast Forestry University (东北林业大学), 2003.
- 4 Wang R, Chen X, Ding GH. Comparison of the allelopathic effects between native and invasive *Chromolaena odorata* [J]. North Hortic (北方园艺), 2013, 10: 66-69.
- 5 Wang R, Ding JQ. International Convention on the control of alien pests and international biological control [C]. The third National Symposium on Integrated Crop Pest Management (第三次全国农作物病虫害综合防治学术讨论会), 1996: 17-18.
- 6 Ding ZH, Zhang XM, Liu JK, et al. The chemical constituents from *Eupatorium odoratum* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2001, 13(5): 22-24.
- 7 Zhang LK, Luo DQ, Feng YL, et al. Chemical constituents of *Chromolaena odorata* and their anticancer activities [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2013, 35: 545-548.
- 8 Thang PT, Patrick S, Teik LS, et al. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage [J]. Burns, 2001, 27: 319-327.
- 9 Ditorial Board of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese medicine. Chinese Materia Medica: Vol 7 (中华本草:第七分册) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999.
- 10 Hu Q, Xiao LJ, Yang Q, et al. Research progress of *Juglans sigillata* cv. 'Yangbidapao' [J]. J West China For Sci (西部林业科学), 2019, 48(3): 141-147.
- 11 Feng D, Yuan RL, Wang YX, et al. List of major harmful organisms of walnut in Yunnan Province [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2016, 44(28): 11-14.
- 12 Zhao YM, Zhao N, Feng XF, et al. Preliminary study on the fungi diversity from the diseased walnut branches in Yunnan Province [J]. For Pest Dis (中国森林病虫), 2017, 36(4): 11-16.
- 13 Zhao GY, Luan JD, Song YP. China's green food policy: types, characteristics and optimization path [J]. J Nanjing Agr Univ: Soc Sci (南京农业大学学报:社科版), 2019, 19(6): 139-148.
- 14 Chiu YH, Sandoval-Insausti H, Ley SH, et al. Association between intake of fruits and vegetables by pesticide residue status and coronary heart disease risk [J]. Environ Int, 2019, 132: 105-113.
- 15 Xu SC, Dong HH, Zeng XJ, et al. Research progress in screening and bioactivity of terpenoid botanical pesticides [J]. Chem Ind Forest Prod (林产化学与工业), 2019, 39(1): 1-12.
- 16 Ross ST, Charlie SM, Christian K A, The role of invasive



- alien species in shaping local livelihoods and human well-being; a review [J]. *J Environ Manage*, 2019, 229: 145-157.
- 17 Chen LH, Zhang JH, Wu YX, et al. Identification of the pathogen causing canker on *Juglans sigillata* L. and indoor screening of fungicides [J]. *J Yunnan Agri Univ: Nat Sci* (云南农业大学学报: 自科版), 2016, 31: 624-629.
- 18 Suksamrarn A, Chotipong A, Suavansri T, et al. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27: 507-511.
- 19 Cao JQ, Sun SW, Chen H, et al. Studies on flavonoids from *Blumea riparia* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 782-784.
- 20 Wang YY, Ma GX, Huang Z, et al. Identification of compounds in alien invasive plant *Chromolaena odorata* [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2016, 51: 698-702.
- 21 Na Z, Feng YL, Xu YK. Chemical constituents from aerial parts of *Eupatorium odoratum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 1896-1900.
- 22 Zhao AH, Peng LY, Wang ZY, et al. An ionone derivative from *Isodon leucophyllus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25: 503-506.
- 23 Liu PY. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of herb of *Eupatorium odoratum* L. [D]. Hebei: Hebei Medical University (河北医科大学), 2015.
- 24 Yuan JQ, Yang JS, Miao JH. Studies on flavonoids of *Eupatorium odoratum* L. [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30: 657-660.
- 25 Zhang LK. Study on chemical defense substances and Allelochemicals of invasive plant *Chromolaena odorata* [D]. Beijing: Chinese Academy Sciences University (中国科学院大学), 2013.
- 26 Chen MS, Zhu JX, Zhang GH. Inducible direct plant defense against insect herbivores [J]. *Chin Bull Entomol* (昆虫知识), 2009, 46(2): 175-186.
- 27 Sylvester WS, Son R, Lew KF, et al. Antibacterial activity of java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) extract against *Klebsiella pneumoniae* isolated from several vegetables [J]. *Internat Food Res J*, 2015, 22: 1770-1776.
- 28 Wang XJ, Sheng DF. Effect of different solvents on extraction of effective total flavones and antibacterial activity of *Ligustrum lucidum* [J]. *North Hortic* (北方园艺), 2014, 9: 137-139.
- 29 Zhang XF, Du CH, Hao SH, et al. Research of active material in petroleum ether extraction from tangerine peel for *in vitro* control of *Valsa mali* [J]. *Hubei Agr Sci* (湖北农业科学), 2015, 54: 3150-3152.
- 30 Teresehuk ML, Riera MV, Castro GR, et al. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta* [J]. *J Ethnopharmacol*, 1997, 56: 227-232.