

25-29

[文章编号]1000-2782(2000)06-0025-05

## 砂地柏叶中鬼臼毒素的分离与鉴定

王继栋<sup>1</sup>, 田暄<sup>2</sup>, 张兴<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 西农校区 712100;

2 兰州大学 应用有机化学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 在生物活性跟踪测试指导下, 从砂地柏叶的乙醇提取物中通过硅胶柱层析, 分离得到一种对菜青虫有高拒食活性的成分, 经紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、质谱(MS)、氢核磁共振谱(<sup>1</sup>H-NMR)分析, 鉴定其为鬼臼毒素。其对菜青虫在高质量浓度下呈拒食作用, 低质量浓度下则具胃毒毒杀作用。

[关键词] 砂地柏; 鬼臼毒素; 植物性杀虫剂

[中图分类号] S482.39

[文献标识码] A

~~植物~~ 杀虫活性成分

砂地柏(*Sabina vulgaris* Ant.)为分布于西北各省区的一种沙地植物。西北农业大学无公害农药研究服务中心筛选、发现了其杀虫活性, 并首次以活性跟踪法从其果实石油醚提取物中分离得到一种杀虫活性物质——脱氧鬼臼毒素。在研究中对不同地区砂地柏及其不同部位中的脱氧鬼臼毒素含量与生物活性作了较为系统的测试<sup>[1,2]</sup>, 发现其中可能还含有其他杀虫活性成分, 尤其是陕西榆林砂地柏叶子样品表现出很高的拒食活性, 值得进一步探讨。砂地柏叶子的生物量较为丰富, 比其他部位易采收处理。本研究在前述工作的基础上, 继续在生物活性跟踪的指导下, 从砂地柏叶中分离出其他有杀虫活性的成分。

## 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

砂地柏叶采自陕西榆林, 晾干, 粉碎过 0.37 mm 筛, 保存于-35℃低温冰箱内备用。二氯甲烷、丙酮等溶剂均为分析纯试剂, 硅胶为柱层析用硅胶(49~74 μm)。鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素标样均由兰州大学应用有机化学国家重点实验室提供。

试虫为菜青虫(*Pieris rapae* L.), 由大田采回 4 龄幼虫, 于室内用新鲜甘蓝叶片饲养至 5 龄前期, 挑取健康整齐的幼虫供试。

## 1.2 测试仪器

X<sub>4</sub>型显微熔点测定仪, 紫外(UV)光谱仪(日本岛津), 170SX 富里叶变换光谱仪(FT-IR)(美国), AM-400 核磁共振仪(AM-400 NMR)(德国 BRVKER 公司), HP-5988 GC/MS 气质仪(日本惠普公司), 圆二色谱(Circular dichroism, 简称 CD)仪, JASCO 20C 自动记录旋光光谱仪(日本分光公司)。

[收稿日期] 1999-10-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39979506)

[作者简介] 王继栋(1972-), 男, 现为华南植物研究所博士研究生。

### 1.3 提取分离方法

取陕西榆林砂地柏叶粉碎物 1 500 g, 经石油醚(60~90 °C)提取 3 次脱脂后, 再用工业乙醇提取 3 次, 每次 12 h, 过滤、浓缩得浸膏 215 g。以二氯甲烷: 丙酮为淋洗剂, 结合生物测定进行硅胶柱层析分离。

### 1.4 生测方法

以菜青虫为试虫, 采用小叶碟添加法<sup>[3,4]</sup>进行生物活性测定。

### 1.5 化合物结构鉴定

从砂地柏叶中分得的结晶物经熔点、紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、质谱(MS)、核磁共振(NMR)测试后, 分别对照有关文献分析鉴定其结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性成分的分​​离结果

对提得的 215 g 浸膏进行柱层析, 以二氯甲烷: 丙酮(体积比)为 80: 1, 40: 1, 30: 1, 20: 1, 10: 1, 5: 1, 3: 1, 2: 1, 1: 1 及丙酮、甲醇系列溶剂为淋洗剂, 每馏分收集 100 mL, 共得 148 个馏分。经薄层层析(TLC)检测后, 合并相应馏分, 共得 15 个组分。浓缩各组分, 其中 7~13 组分有沉淀, 滤出沉淀, 把滤液浓缩至干(沉淀部分以角码 1 标志, 滤液部分以角码 2 标志), 以菜青虫为试虫进行活性测试, 结果见表 1。

表 1 榆林砂地柏叶的提取物柱层析所得各组分对菜青虫生测结果

组 分	拒食率/%		最终死亡率/%
	24 h	48 h	
叶 1	29.51	24.39	18.18
叶 2	56.95	60.55	18.18
叶 3	93.57	94.75	72.73
叶 4	89.90	93.36	56.37
叶 5	94.03	96.09	63.64
叶 6	89.44	94.87	45.46
叶 7 <sub>1</sub>	45.51	32.87	20.66
叶 7 <sub>2</sub>	89.67	88.28	67.27
叶 8 <sub>1</sub>	43.97	63.17	63.64
叶 8 <sub>2</sub>	80.14	90.35	51.52
叶 9 <sub>1</sub>	18.71	20.03	0
叶 9 <sub>2</sub>	76.92	80.92	34.55
叶 10 <sub>1</sub>	89.44	94.20	56.37
叶 10 <sub>2</sub>	99.31	99.67	12.73
叶 11 <sub>1</sub>	24.57	24.05	27.27
叶 11 <sub>2</sub>	74.05	81.31	9.10
叶 12 <sub>1</sub>	2.00	27.12	0
叶 12 <sub>2</sub>	28.82	36.50	0
叶 13 <sub>1</sub>	19.06	29.00	12.73
叶 13 <sub>2</sub>	13.55	13.55	0
叶 14	12.86	12.86	0
叶 15	2.41	2.41	12.73

注: 每处理 10 头试虫, 各样品均以丙酮稀释成 100 倍液供试。

由表1可以看出,叶3,4,5,6,7<sub>2</sub>,8<sub>2</sub>,9<sub>2</sub>,10<sub>1</sub>和10<sub>2</sub>各组分对菜青虫都有较好的拒食活性,其中以组分叶10<sub>2</sub>对菜青虫的拒食率最高。以脱氧鬼臼纯品作为标样,经TLC检测后表明组分10<sub>2</sub>中的主要成分不为脱氧鬼臼毒素。将叶10<sub>2</sub>用二氯甲烷:丙酮(体积比为1:1)溶解后,用活性炭两次脱色,再浓缩后进行第二次柱层析,淋洗液系统同前,共得21个馏分。经TLC检测后合并为P<sub>1</sub>,P<sub>2</sub>,结晶I(微量),P<sub>3</sub>,P<sub>4</sub>,P<sub>5</sub>,结晶I(1.5g),P<sub>6</sub>,P<sub>7</sub>,P<sub>8</sub>,结晶II(微量),P<sub>9</sub>,P<sub>10</sub>和P<sub>11</sub>。以菜青虫为试虫对各组分进行生物活性测定,结果见表2。

表2 组分叶10<sub>2</sub>柱层析所得各组分对菜青虫生物测定结果

组 分	拒食率/%		最终死亡率/%
	24 h	48 h	
P <sub>1</sub>	89.52	89.91	33.33
P <sub>2</sub>	91.66	88.57	30.00
P <sub>3</sub>	91.86	90.47	0.00
P <sub>4</sub>	86.19	85.14	20.00
P <sub>5</sub>	98.32	94.16	0.00
P <sub>6</sub>	99.16	99.08	20.00
P <sub>7</sub>	96.63	97.69	20.00
P <sub>8</sub>	95.28	95.05	0.00
P <sub>9</sub>	94.44	86.18	10.00
P <sub>10</sub>	63.16	50.69	20.00
P <sub>11</sub>	64.21	51.61	20.00
结晶I	52.00	52.07	20.00
结晶II	100.00	99.82	10.00
结晶III	37.89	36.52	0.00

注:每处理10头菜青虫,样品以丙酮稀释成200倍液供试。

由表2可看出,结晶I和结晶III的拒食率和死亡率均不高,属无活性成分。结晶II在200倍液下拒食率可达100%,将其稀释至2000倍,测定了对菜青虫的作用。24h拒食率降为80%,但48h后表现出中毒症状,最终死亡率高达90%以上,说明其也有很强的胃毒毒杀作用。

## 2.2 结晶II的鉴定

结晶II的纯化:用无水乙醇重结晶。

物理性质 结晶II为白色针状结晶,易溶于氯仿,熔点182~184℃。

波谱分析数据 结晶II用乙醇溶解,其紫外光谱主要有3个吸收峰:224.4nm(A=1.628),274.4nm(A=0.513)和292.2nm(A=0.612)。

红外光谱(IR):3345~3478cm<sup>-1</sup>,ν<sub>OH</sub>吸收;3045~3112cm<sup>-1</sup>,苯环上ν<sub>C-H</sub>吸收;2956,2889cm<sup>-1</sup>,苯环上ν<sub>C-H</sub>吸收;2768cm<sup>-1</sup>,ν<sub>OCH<sub>3</sub></sub>吸收;1757cm<sup>-1</sup>,五元内酯环ν<sub>C=O</sub>吸收;1625,1588,1506,1489cm<sup>-1</sup>,苯环上ν<sub>C=C</sub>吸收;1236,1128cm<sup>-1</sup>,五元内酯环ν<sub>C-O</sub>吸收。

质谱(MS)显示M<sup>+</sup>414(Base peak,89%);399(M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>,5%);397(M<sup>+</sup>-OH,2%);396(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O,2%);312(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>,3%);297(312-CH<sub>3</sub>,4%);181(苄基裂解,22%);168(苄基裂解,39%);44(CO<sub>2</sub><sup>+</sup>,100%)。

由相对分子质量为414及砂地柏中含大量鬼臼类物质推测该物质可能为鬼臼毒素。

氢核磁共振谱( $^1\text{H-NMR}$ ):  $\delta$ 2.50(s, 1H, -OH),  $\delta$ 2.80(m, 2H,  $\text{H}_{2,3}$ ),  $\delta$ 3.75(s, 6H,  $\text{H}_{2',5'}$ ),  $\delta$ 3.81(s, 3H,  $\text{H}_{4'}$ ), 4.05(t, 1H,  $\text{H}_{1,1\beta}$ ,  $J=9.5$  Hz),  $\delta$ 4.55(m, 2H,  $\text{H}_1, \text{H}_{1\alpha}$ ),  $\delta$ 4.75(d, 1H,  $\text{H}_4, J=8.8$  Hz),  $\delta$ 5.95(d, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ,  $J=1.2$  Hz),  $\delta$ 6.35(s, 2H,  $\text{H}_{2',6'}$ ),  $\delta$ 6.50(s, 1H,  $\text{H}_6$ ),  $\delta$ 7.12(s, 1H,  $\text{H}_5$ ).

由上述四谱数据,经查阅文献,证明该结晶 I 为鬼臼毒素<sup>[5-11]</sup>。

圆二色谱(CD)图:由参考文献[12]知,284 nm 处第 1 偶合谱带中,长波长吸收的最大值  $\Delta_\epsilon_1$  的绝对值减短波长吸收的最大值  $\Delta_\epsilon_2$  的绝对值小于零时,C-2 位的取代基处于  $\alpha$  构型,C-4 位苯环处于准  $\alpha$  键。

$$|\Delta_\epsilon_1| = 0.50 (286.5 \text{ nm}),$$

$$|\Delta_\epsilon_2| = 3.60 (273 \text{ nm}),$$

$$|\Delta_\epsilon_1| - |\Delta_\epsilon_2| < 0.$$

所以 C-2 位的取代基处于  $\alpha$  构型,进一步证实该物质为鬼臼毒素。

不同展开剂中的展开情况 以鬼臼毒素、脱氧鬼臼毒素和结晶 I 作对照授以不同的展开系统,以薄层层析(TLC)展开,其结果如表 3。

表 3 结晶 I、鬼臼毒素与脱氧鬼臼毒素在不同展开剂中的 Rf 值

展开剂 (二氯甲烷:丙酮)	Rf 值		
	鬼臼毒素	结晶 I	脱氧鬼臼毒素
5:1	0.482	0.482	0.859
10:1	0.242	0.242	0.515

连续多次展开,结晶 I 和鬼臼毒素的 Rf 值始终相同,结果证明结晶 I 即为鬼臼毒素。

#### [参考文献]

- [1] 张 兴,付昌斌,高聪芬,等.新杀虫植物砂地柏研究进展[J].西北农业大学学报,1995,23(4):53-57.
- [2] 余向阳,张 兴.砂地柏果实中杀虫活性成分研究[J].西北农业大学学报,1999,27(3):11-15.
- [3] 赵善欢,曹 毅,彭中健,等.应用天然植物产品川楝素防治菜青虫试验[J].植物保护学报,1985,12(3):125-131.
- [4] 张 兴,张民力,赵善欢.楝属川楝素含量与生物活性的关系[J].华南农业大学学报,1988,9(4):21-30.
- [5] 马 辰,罗淑荣.鬼臼类植物中木脂素类化合物的研究进展[J].中草药,1992,23(5):271-277.
- [6] Anthony W, Jonathan L H, William C A. Components of podophyllin X  $\text{V}^{\text{II}}$  polymorphic modifications of podophyllotoxin[J]. J Org Chem, 1956, 21:288-291.
- [7] 刘 发,尚天民,傅丰永.华鬼臼根化学成分的研究[J].药学学报,1979,14(4):241-245.
- [8] 张昭惠.VP16-213 质谱裂解方式[J].北京医药工业,1983,4:20-23.
- [9] 陈耀祖,华苏明,陈能煜.质谱学中的立体化学效应——鬼臼立体异构体的质谱研究[J].化学学报,1985,43:960-964.
- [10] Andrew P. The mass spectra of some lignans of the 1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene series[J]. J Chem Soc(C 卷),1968:74-79.
- [11] G Fred B, John D L, Susan B H Z. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners. structure-activity relationship in microtubule assembly[J]. J of Med Chem, 1979, 22(3):215-221.
- [12] 田 喧,李景新,陈耀祖.自旋标记鬼臼类化合物圆二色谱的研究[J].高等学校化学学报,1992,13(3):349-351.

## The isolation and identification of podophyllotoxin from *Sabina vulgaris* Ant.

WANG Ji-dong<sup>1</sup>, TIAN Xuan<sup>2</sup>, ZHANG Xing<sup>1</sup>

(1 *Research and Development Center of Biorational Pesticides, Northwest Science and Technology  
University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;*

2 *National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China*)

**Abstract:** According to the guidance of bioactivity assaying and using silica column chromatography, a compound having high antifeeding activity to the tested insect *Pieris rapae* L. is isolated from the ethanol extract of the leaves of *Sabina vulgaris* Ant. Its molecular structure is identified to be podophyllotoxin, a known compound, by UV, IR, MS and <sup>1</sup>H-NMR. It is also found that the podophyllotoxin has antifeeding activity in higher concentrations and has stomach poisonous activity in lower concentrations to the 5 instar larva of *Pieris rapae* L. .

**Key words:** *Sabina vulgaris* Ant. ; podophyllotoxin; botanical insecticide