

苦皮藤果实中农药活性成分的分离和结构鉴定

杨征敏, 吴文君, 姬志勤, 钮绪燕

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 采用5种溶剂对苦皮藤假种皮进行了系统提取,在灵敏的活性追踪指导下,分别从苦皮藤假种皮体积分数25%和50%的乙醇提取物中分离、鉴定了4个化合物:卫矛醇(化合物I)、 $1\alpha, 2\alpha, 4\beta, 6\beta, 8\alpha, 9\beta, 13$ -七羟基-二氢沉香呋喃(化合物II)、 9β -苯甲酰氧基- $1\alpha, 8\beta, 13$ -三乙酰氧基-二氢沉香呋喃(化合物III)、 β -谷甾醇(化合物IV);其中化合物II有杀菌活性,化合物III有杀虫活性,化合物II为在苦皮藤中首次分离鉴定。

[关键词] 植物源农药;苦皮藤;二氢沉香呋喃

[中图分类号] S482

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)06-061-04

苦皮藤(*Celastrus angulatus* Maxim)属卫矛科(Celastraceae)南蛇藤属(*Celastrus*)一种多年生木质藤本植物,是一种开发天然产物农药的宝贵资源,因此,对其农药活性成分的研究在国内外一直倍受关注。但以前许多学者主要对其根皮的杀虫活性成分进行了研究^[1-3]。近年来,笔者仅对苦皮藤果实中的杀菌活性成分进行了初步研究^[4]。为了充分开发利用这种宝贵植物资源,本研究对苦皮藤假种皮进行了系统提取,分离、鉴定了4个化合物,其中2个分别具有杀虫和杀菌活性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦皮藤假种皮 1998-08在周至县甘峪湾乡采集苦皮藤果实,剥离假种皮,风干,粉碎,保存备用。

1.1.2 供试昆虫 粘虫(*Mythimna separata*)幼虫,室内以小麦苗或玉米苗饲养;小地老虎(*Agrotis ypsilon*)幼虫,室内以油菜叶饲养;挑选龄期相同,个体大小基本相似的幼虫供试。

1.1.3 供试病原菌 玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、黄瓜霜霉病菌(*Pseudoperonospora cubensis*)、小麦白粉病菌(*Blumeria graminis*)。盆栽植物黄瓜(长春密刺)、小麦(辉县红)、玉米(陕9)均为感病品种。

1.1.4 主要仪器 分析制备型高效液相色谱仪(美

国WATERS公司),WDL-95色谱工作站(大连化学物理所),薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂),薄板自动点样器(瑞士CAMAG公司),X-4型数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司),756MC紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),Bruker Apex II高分辨质谱仪(Bruker公司),Bruker DRX500 MHz核磁共振仪(Bruker公司)。

1.2 方法

1.2.1 杀虫活性测定 采用载毒叶片定量饲喂法和定量点滴法,进行杀虫活性追踪,具体方法参照文献[5,6]。

1.2.2 杀菌活性测定 采用菌丝生长速率法、孢子萌发试验法、温室盆栽试验进行杀菌活性追踪,具体方法参照文献[6,7]。

1.2.3 苦皮藤假种皮的系统提取 在室温条件下,将苦皮藤假种皮粉(40 kg)用体积分数25%,50%和95%的乙醇、工业苯、石油醚依次提取3 d。将乙醇水的提取液在大搪瓷盘中吹干即可得到提取物;苯、石油醚提取液减压浓缩即可。其中,体积分数25%的乙醇提取物在吹干的过程中形成大量的无活性结晶,用镊子夹出比较大的晶体,在丙酮中重结晶得到无色的四面体型结晶(化合物I)40 mg。生测表明,体积分数25%的乙醇提取物(230 g)有杀菌活性,体积分数50%的乙醇提取物(185 g)有微弱杀虫活性。

1.2.4 杀菌活性成分的分离 将体积分数25%的

[收稿日期] 2000-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39770506)

[作者简介] 杨征敏(1974),男,陕西周至人,助教,在读博士,主要从事天然产物农药的研究和开发工作。

乙醇提取物浸膏与 300 g 硅胶拌匀, 晾干, 装入底部有砂芯的耐酸过滤漏斗中, 依次用 3 L 正丁醇、甲醇、蒸馏水洗脱, 收集浓缩各洗脱液。用 70 mL 氯仿溶解有杀菌活性的正丁醇洗脱物 (54 g), 然后以 40 mL 体积分数为 50% 含水甲醇萃取 3 次, 浓缩后得到有杀菌活性的氯仿相 (18.1 g)。以真空液相层析柱将氯仿相分为石油醚部分、氯仿部分和甲醇部分。以氯仿-石油醚 (99/2-90/10) 为流动相, 控制流速为 3~3.5 mL/min, 将有杀菌活性的氯仿部分 (8.1 g) 进行硅胶柱层析; 等体积 (400 mL/份) 收集, 收集到第 62 份时, 用甲醇清柱, 最后浓缩得到 70 份淋洗液。其中 68[#] 在溶剂低温缓慢挥发的情况下于烧杯的壁上产生淡黄色结晶, 小心刮下得淡黄色结晶, 用甲醇-丙酮 (5:1) 重结晶得到 1 个有杀菌活性的无色结晶 (化合物 II)。

1.2.5 杀虫活性成分的分离 将体积分数 50% 的乙醇提取物 (185 g) 晾干, 依次用氯仿、甲醇、蒸馏水提取, 收集浓缩各提取液。用丙酮溶解有微弱杀虫活性的氯仿提取物 (65 g) 后, 向其中加入 100 g 硅胶并混匀, 挥干溶剂; 然后装入耐酸过滤漏斗中依次用氯仿、甲醇洗脱, 收集浓缩各洗脱液。以石油醚-氯仿 (98:2) 为洗脱剂, 在控制流速为 6~8 mL/min 的条件下, 用硅胶柱分离有杀虫活性的氯仿洗脱物 (45 g), 等体积收集洗脱液 (400 mL), 共收集 170 份。生测表明, 洗脱物 137[#]~139[#] (2.015 g) 有杀虫活性。

以石油醚-二氧六环 (98:2) 为洗脱剂, 在控制流速为 2~2.5 mL/min 的条件下, 用低压制备硅胶柱 (粒径为 5 μm) 分离有杀虫活性的洗脱物 137[#]~139[#] (2.015 g), 等体积收集洗脱液 (60 mL), 共收集 45 份。根据洗脱物组成将其合并为 5 部分: A (1[#]~7[#])、B (8[#]~19[#])、C (20[#]~32[#])、D (33[#]~41[#])、E (42[#]~45[#], 有杀虫活性), 然后将各合并液置于通风橱中让溶剂在低温下缓慢挥发。7 d 后 A 中析出橙红色结晶 78 mg, 用丙酮洗掉色素得到有杀虫活性的无色结晶 (化合物 III: 40 mg)。把 E 段 (120 mg) 用硅胶薄板制备 (石油醚-丙酮=5:1), 从展开的第 2 条带中得到 1 个杀虫活性的无色结晶 (化合物 IV: 6.3 mg)。

1.2.6 结构鉴定 测定样品高分辨质谱 (HRMS)、氢核磁共振谱 (¹H NMR)、碳核磁共振谱 (¹³C NMR) 数据。

2 结果与分析

2.1 化学结构分析

化合物 I: 白色针状结晶, m. p. 198~199。

负离子 HR FAB-MS 得出准分子离子 m/z : 181.0718 [M-1]⁺, 可以推得分子式为 C₆H₁₃O₆。由 C₆H₁₃O₆ 计算其相对分子质量为 182.0718, δ (DM-SO-d₆): 63.5 (C-1, C-6), 69.8 (C-2, C-5), 70.6 (C-3, C-4)。δ_H (DM-SO, 500 MHz): 3.27 (C₁-OH, C₆-OH), 3.40 (C₃-OH, C₄-OH), 3.68 (C₂-OH, C₅-OH), 3.98 (H-3, H-4), 4.05 (H-1, H-6), 4.35 (H-2, H-4)。以上数据与文献 [8] 结果一致, 故可确定 NW 26 为卫矛醇, 为在苦皮藤中首次分离鉴定。

化合物 II (图 1): 无色六面体形结晶, m. p. 215~217。m/z (SMS): 333.1556 [M-1]⁺, 由此推得分子式为 C₁₅H₂₅O₈; 计算相对分子质量为 333.1556。根据 COSY 谱及 HMQC 谱, 并参照类似化合物的数据 [9] 对化合物 I 的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱进行了归属。δ (DM-SO-d₆): 71.5 (C-1), 70.0 (C-2), 43.4 (C-3), 72.4 (C-4), 91.4 (C-5), 75.3 (C-6), 58.1 (C-7), 74.9 (C-8), 74.0 (C-9), 54.0 (C-10), 81.6 (C-11), 27.5 (C-12), 65.0 (C-13), 26.9 (C-14), 30.6 (C-15)。δ_H (DM-SO, 500 MHz): 4.10 (1H, m, C₁-H), 5.10 (1H, d, J = 5.4 Hz, C₁-OH), 3.92 (1H, m, C₂-H), 4.90 (1H, d, J = 6.6 Hz, C₂-OH), 1.64 (1H, J = 13.5, 2.7 Hz, C₃-H), 1.85 (1H, dd, J = 13.5, 3.6 Hz, C₃-H), 4.53 (1H, s, C₄-OH), 4.69 (1H, d, J = 5.1 Hz, C₆-H), 5.52 (1H, d, J = 5.1 Hz, C₆-OH), 2.00 (1H, d, J = 3.3 Hz, C₇-H), 4.08 (1H, m, C₈-H), 4.90 (1H, d, J = 6.9 Hz, C₈-OH), 3.97 (1H, d, J = 4.2 Hz, C₉-H), 4.35 (1H, d, J = 4.2 Hz, C₉-OH), 1.50 (1H, s, C₁₂-H), 3.74 (1H, dd, J = 4.8, 10.5 Hz, C₁₃-H), 4.31 (1H, dd, J = 2.4, 10.5 Hz, C₁₃-H), 5.31 (1H, dd, J = 2.4, 4.8 Hz, C₁₃-OH), 1.40 (1H, s, C₁₄-H), 1.61 (1H, s, C₁₅-H)。由以上结果可以推定, 其结构为 1α, 2α, 4β, 6β, 8α, 9β, 13-七羟基-二氢沉香呋喃, 为首次在苦皮藤中分离鉴定。

化合物 III (图 1): 白色针状晶体, m. p. 136~137。δ (CDCl₃-d₆): 36.6 (C-1), 29.7 (C-2), 71.8 (C-3), 46.0 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.7 (C-7), 32.0 (C-8), 50.3 (C-9), 36.2 (C-10), 28.3 (C-11), 39.9 (C-12), 42.4 (C-13), 56.9 (C-14), 26.3 (C-15), 29.3 (C-16), 56.2 (C-17), 11.9 (C-18), 19.8 (C-19), 32.0 (C-20), 19.4 (C-21), 34.1 (C-22), 24.3 (C-23), 37.3 (C-24), 19.1 (C-25), 12.0 (C-26), 23.2 (C-27), 21.1 (C-28), 18.8 (C-29)。δ_H (CDCl₃, 500 MHz): δ 67 (3H, s, C₁₀-CH₃),

0.77~0.92 (12H, m, 4 × CH₃), 1.00 (3H, s, C₁₃-CH₃), 1.81 (1H, s, C₃-OH), 3.51 (1H, m, C₃-H),

5.34 (1H, dd, $J = 4.6$ Hz, C₆-H)。以上数据与文献[10~12]值一致, 故可确定NW 27为β-谷甾醇。

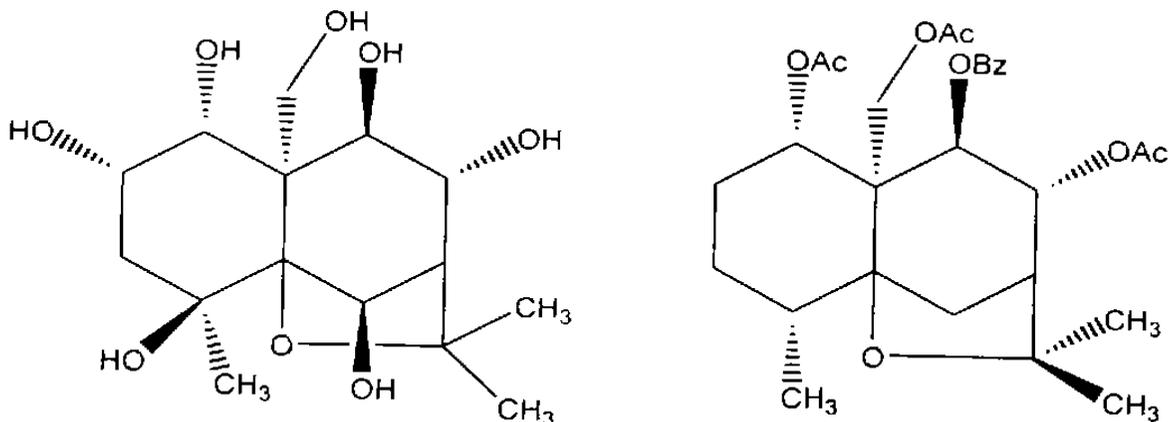


图1 苦皮藤假种皮提取物化合物II, IV的结构图

Fig 1 Structure of extracts II, IV from *Celastrus angulatus* arils

化合物IV (图1): 无色针状结晶, m. p. 215~217。由Fabms HR 得出: 539[M + Na]⁺, 457[M + H-HOAc]⁺, 417[539-C₆H₅CO₂H]⁺, 395[M + H-C₆H₅CO₂H]⁺, 335[395-HOAc]⁺, 275[335-HOAc]⁺, 215[275-HOAc]⁺, 233[275 + H-Ac]⁺。HR FABMS 结果为[M + Na]⁺: 539.22458, 其分子式为C₂₈H₃₆O₉Na, 相对分子质量计算值为539.22515。所以化合物IV的分子量为539[M + Na]⁺ - 23[Na]⁺ = 516, 分子式为C₂₈H₃₆O₈。根据COSY谱及HMQC谱, 并参照类似化合物的数据[9]对化合物I的¹H NMR和¹³C NMR谱进行了归属。δ_H (CDCl₃, 500 MHz): δ 3.4 (1H, dd, $J = 4.5, 12$ Hz, H-1), 1.42-2.77 (8H, m, H-2, H-3, H-4, H-6, H-7), 5.50 (1H, dd, $J = 3.0, 9.5$ Hz, H-8), 6.00 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-9), 1.11 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, H-12), 4.88和4.90 (2 × 1H, ABq, $J = 12.5$ Hz, H-13), 1.53 (3H, s, H-14), 1.18 (3H, s, H-15)。δ_C (CD-

Cl₃-d₆): 75.8, 76.4, 77.6 (C-1, C-8, C-9, 未指认), 24.4 (C-2), 26.2 (C-3), 39.9 (C-4), 88.3 (C-5), 36.3 (C-6), 47.2 (C-7), 50.2 (C-10), 81.7 (C-11), 16.9 (C-12), 61.6 (C-13), 22.8 (C-14), 30.8 (C-15)。以上数据与文献[13]结果一致, 故该化合物为9β-苯甲酰氧基-1α, 8β, 13β-三乙酰氧基-二氢沉香呔喃。为首次在苦皮藤果实中分离鉴定。

2.2 活性成分的毒力

试验测定表明, 分离得到的化合物II对玉米小斑病菌孢子萌发的抑制毒力 (EC₅₀) 为169.29 mg/L。虽然它对玉米小斑病菌孢子萌发抑制能力低, 但值得注意的是化合物II能使由萌发孢子长出的菌丝发生异常分枝。本次试验中因化合物IV量少而未能测定其毒力, 据报道, Benigna等^[13]从云南白杜中分离出化合物IV, 并证明它对菜青虫有很好的拒食和毒杀活性。

[参考文献]

- [1] Wakabayashi N, Wu W J, Waters R M, et al Celangilin: a nonalkaloids insect antifeedant from Chinese bittersweet, *Celastrus angulatus* [J]. J Nat Prod, 1988, 51(3): 537- 542
- [2] Wu W J, Tu Y Q, Liu H X, et al Celangilin, III and IV: new insecticidal sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus* [J]. J Nat Prod, 1992, 55(9): 1294- 1298
- [3] Wu W J, Wang M A, Zhou W M, et al Five insecticidal sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus* [J]. J Nat Prod, 2001, 64(3): 364- 367
- [4] 杨征敏, 吴文君, 王明安, 等. 苦皮藤假种皮中的杀菌活性成分研究[J]. 农药学报, 2001, (2): 93- 96
- [5] 慕立义, 吴文君, 王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [6] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991

- [7] 方中达 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [8] 龚运淮 天然有机化合物¹³CNMR 化学位移[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1986 409
- [9] Den Hertog H J, Hackmann J T, Navati D D, et al M alkanguniol, one of the polyalcohols from *Celastrus paniculatus*[J]. Tetrahedron Letter, 1973, (11): 845- 848
- [10] 龚运淮 天然有机化合物¹³CNMR 化学位移[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 1986 244
- [11] 王明安, 李增民, 陈馥衡 南蛇藤根皮化学成分的研究(简报)[J]. 北京农业大学学报, 1994, 20(4): 438
- [12] 巴 杭, 王保德, 朱大元 毛茛兔唇花化学成份的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1997, (9): 44- 48
- [13] Benigna M, Tincusi A, Ignacio A, et al New sesquiterpenes from *Crossopetalum tonduzii*[J]. J Nat Prod, 1998, 61(12): 1520- 1523

Studies on pesticidal components of *Celastrus angulatus*

YANG Zheng-min, WU Wen-jun, JI Zhi-qin, NIU Xu-yan

(College of plant protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Chinese bittersweet (*Celastrus angulatus* Max.) is a traditional botanical insecticidal plant and distributes in most areas of China. More attentions are being paid to its insecticidal components in root bark, leaves and seed, while little is known about active components in its arils. Two compounds were isolated from the arils of *Celastrus angulatus* by bioassay-guided isolation. Their structures were determined as dulcitol (I), 1 α , 2 α , 4 β , 6 β , 8 α , 9 α , 13-heptahydroxy- β -dihydroagarofuran (II); β -sitosterol (III); 9 β -benzoxo-1 α , 8 β , 13-triacetoxy- β -dihydroagarofuran (IV). II and III were fungicidal and insecticidal components, respectively.

Key words: botanical pesticide; *Celastrus angulatus*; dihydroagarofuran

· 简 讯 ·

人类胚胎干细胞研究取得重大进展

由西北农林科技大学著名胚胎工程专家窦忠英教授率领的攻关小组第 6 次从人类胚胎干细胞中分化得到心脏跳动样细胞团。这是我国科学家在国内取得的惟一由人类胚胎干细胞分化得到的心脏跳动样细胞团, 标志着我国人类胚胎干细胞研究已跻身世界先进行列。

据悉, 我校科研人员于 2001 年 8 月 25 日开始, 对源于人胎儿原始生殖细胞的胚胎干细胞进行体外分化培养, 28 日即见到心脏跳动样细胞团, 每分钟跳动 90 次。

1993 年我校专家就开始进行胚胎干细胞分离与克隆研究, 1996 年从小鼠胚胎干细胞分化得到心脏跳动样细胞团, 1997 年分离克隆出人类胚胎干细胞, 现传至第 9 代。2001 年又分离克隆出成年山羊皮肤类干细胞。

干细胞是目前国内外生命科学研究的热点和前沿课题。胚胎干细胞在临床医学、组织工程、克隆动物、转基因工程、生物学研究等领域具有重要理论价值及应用潜力。其中人类胚胎干细胞在心肌梗死、心肌坏死、帕金森氏症、老年性痴呆症、脊髓损伤、皮肤烧伤等修复治疗方面, 具有广阔的应用前景。