

砂地柏果实中2种二萜类杀虫活性成分的分离^{*}

朱海云^{1,2}, 李广泽¹, 廉应江¹, 冯俊涛¹, 张 兴¹

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100; 2 宝鸡文理学院 化学化工系, 陕西 宝鸡 721007)

[摘 要] 以粘虫幼虫为试虫, 采用活性跟踪法, 从砂地柏(*Sabina vulgaris* Ant.)果实中分离出2种二萜化合物, 经MS, ¹H NMR 和¹³C NMR 鉴定为4-表-松香醛和7, 13-松香二烯-3-酮。活性测试结果表明, 0.005 g/mL 4-表-松香醛和7, 13-松香二烯-3-酮对3龄粘虫均具有较强的拒食及一定的毒杀活性。

[关键词] 砂地柏; 杀虫活性; 二萜化合物; 4-表-松香醛; 7, 13-松香二烯-3-酮

[中图分类号] S482.3⁺9; Q946.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)02-0079-04

砂地柏(*Sabina vulgaris* Ant.)为柏科圆柏属植物, 是我国西北干旱沙区主要的防风固沙灌木树种。国内外对砂地柏化学成分及药理学已进行了深入的探讨, 结果表明^[1~7], 砂地柏中含有木脂素、萜类、香豆素、甾醇、酚类、有机酸及烃类衍生物等多类化学物质, 其中木脂素、萜类及有机酸均有不同程度的抗肿瘤活性。

西北农林科技大学无公害农药研究服务中心对砂地柏的杀虫作用、植物化学、结构与杀虫活性关系、杀虫致毒机理等进行了较系统的研究, 已分离出鬼臼毒素^[8]、脱氧鬼臼毒素^[9,10]、松油烯-4-醇^[11]及 β -谷甾醇^[12]等4种杀虫活性成分。杀虫活性测试表明^[8~13], 砂地柏中含有的多种类型化合物可能均有一定的杀虫作用, 通过复杂的相互作用对昆虫表现出拒食、胃毒、熏杀及生长发育抑制活性。本研究采用活性跟踪法, 对砂地柏果实中的杀虫活性成分进行进一步分离鉴定, 旨在为其活性成分之间的相互作用研究奠定基础, 并为产业化开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物样品 砂地柏果实, 于2002-11 采自甘肃张掖, 经室温阴干, 粉碎后低温保存备用。

供试昆虫 粘虫(*Mythimna separata* Walker), 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心养虫室提供($T = (25 \pm 2)^\circ\text{C}$; RH. = 65%~80%; L/D = 12 h/12 h), 试验时挑取生长发育状态一致的健康3

龄初期幼虫供试。

化学药剂 鬼臼毒素(95%纯度)及脱氧鬼臼毒素(95%纯度)由兰州大学应用有机化学实验室提供。

1.2 主要仪器

X-6 显微熔点测定仪, Waters-600 高效液相色谱仪, HP-5988 质谱仪, Bruker AM-400 超导核磁共振仪等。

1.3 试验方法

提取与分离 将170.5 kg 砂地柏果实粉碎样用体积分数95%工业乙醇渗漉提取, 浓缩得乙醇浸膏, 加水悬浮后, 再依次用石油醚(30~60)、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取, 减压浓缩萃取液得4种萃取物浸膏。采用活性跟踪法, 将1350 g 氯仿浸膏用2个玻璃柱(80 mm × 1200 mm)进行硅胶柱(55~74 μm)层析平行分离, 以氯仿-乙酸乙酯体积比6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8依次洗脱, 收集(500 mL/馏分)、合并 R_f 值一致的馏分, 得活性部分A₁(1~8 馏分, 413 g)和B(9~22 馏分, 465 g), 其中B中出现大量沉淀, 用乙醚洗涤并过滤, 分滤液浸膏(B₁, 254.3 g)和沉淀(B₂, 210 g)两部分。A和B₁成分交叉较多, 故将其合并, 进行二次硅胶柱层析, 以石油醚-氯仿-乙酸乙酯为溶剂系统按不同比例依次洗脱, 合并馏分, 得活性成分A₃(18.8 g)、A₄及晶体A₈。A₃经柱层析(石油醚洗脱)分离, 得一黄绿色油状物A₃₋₃; A₄长时间低温放置变为固体, TLC 检测初步确定其为一纯品。B₂和A₈经重结晶、TLC 检

^{*} [收稿日期] 2004-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970506); 国家“863”计划项目(2001AA246016); 国家“十五”攻关项目(2002BA516A04)

[作者简介] 朱海云(1976-), 男, 陕西乾县人, 在读硕士, 主要从事天然产物农药活性成分的提取与分离研究。

[通讯作者] 冯俊涛(1967-), 男, 河南登封人, 副教授, 主要从事农药学与植物化学保护研究。E-mail: Jtfeng@126.com

测、熔点测定及HPLC分析,其 R_f 值、熔点、保留时间分别与鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素标准品一致,故确定晶体B₂和A₈分别为鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素。

生测方法 提取分离的各步产物对粘虫的拒食及毒杀作用采用小叶碟添加法^[14]测定:将试虫置于7.5 cm 培养皿中,每皿接试虫10头,每处理重复3次,待测样品用丙酮稀释100或200倍,将小麦叶片剪成1 cm × 1.5 cm 大小的叶碟,于药液中浸渍2 s后自然晾干(另设丙酮对照),饲喂试虫。72 h后检查各处理试虫的取食量和死亡数,并计算拒食率和死亡率。死亡标准:虫体失水皱缩,触之不动。

2 结果与分析

通过多次硅胶柱层析和TLC检测相结合,从砂地柏氯仿萃取物浸膏中分离得到化合物鬼臼毒素(157.5 g)、脱氧鬼臼毒素(87.1 g)、A₃₋₃(6.3 g)和A₄(8.4 g),A₃₋₃和A₄在多个展开剂系统的TLC检测中均为一个圆斑,故初步判定其为纯品。通过MS,¹H NMR (300 MHz)及¹³C NMR (75 MHz)并与文献值对照,确定A₃₋₃和A₄分别为4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮。

13-松香二烯-3-酮

2.1 4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮结构的鉴定

4-表-松香醛,黄绿色油状物,分子式C₂₀H₃₀O, E M S m/z : 286 (M⁺, 22), 271 (M-CH₃, 85), 257 (M-CHO, 75), 243 (M-C₃H₇, 19)。¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 0.71 (s, 3H, H-18), 1.07 (s, 3H, H-20), 1.30 (d, 6H, J= 5.1 Hz, H-16, 17), 1.7~2.6 (m, 12H, H-1, 2, 3, 6, 11, 12), 5.42 (m, 1H, H-7), 5.82 (br, 1H, 14-H), 9.97 (s, 1H, H-19)。¹³C NMR (含DEPT)见表1。

7,13-松香二烯-3-酮,黄色固体,分子式C₂₀H₃₀O, m. p. 39~40, E M S m/z : 286 (M⁺, 88), 271 (M-CH₃, 18), 243 (M-C₃H₇, 36)。¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 1.05 (d, 3H, J= 2.4 Hz, H-16), 1.06 (d, 3H, J= 2.4 Hz, H-17), 1.11 (s, 6H, H-19, 20), 1.18 (s, 3H, H-18), 1.9 (m, 1H, H-15), 1.3~3.0 (m, 10H, H-1, 2, 6, 11, 12), 5.5 (br, 1H, H-7), 5.9 (s, 1H, H-14)。¹³C NMR (含DEPT)见表1。

表1 4-表-松香醛(A₃₋₃)和7,13-松香二烯-3-酮(A₄)的¹³C NMR 数据
Table 1 ¹³C NMR data for 4-epirabietal(A₃₋₃) and abiet-7,13-dien-3-one (A₄)

C	A ₃₋₃		A ₄	
	δ (DEPT)	文献值Ref	δ (DEPT)	文献值Ref
1	38.80(t)	38.8	38.32(t)	38.1
2	19.94(t)	19.9	34.99(t)	34.9
3	35.37(t)	35.4	217.04(s)	216.3
4	47.82(s)	47.8	47.82(s)	47.6
5	49.46(d)	49.6	50.22(d)	50.1
6	23.27(t)	23.2	24.36(t)	24.2
7	120.20(d)	120.1	120.89(d)	120.6
8	135.62(s)	135.6	135.48(s)	135.4
9	51.73(d)	51.8	51.63(d)	51.6
10	35.48(s)	35.4	34.99(s)	34.9
11	22.91(t)	23.2	22.91(t)	22.8
12	27.71(t)	27.6	27.60(t)	27.4
13	145.74(s)	145.6	145.91(s)	145.6
14	122.46(d)	122.5	122.31(d)	122.3
15	35.16(d)	35	35.06(d)	34.9
16	21.62(q)	21.4	22.40(q)	22.1
17	21.04(q)	20.9	21.62(q)	21.4
18	24.33(q)	24.3	25.22(q)	25.1
19	206.38(d)	206	21.05(q)	20.9
20	13.88(q)	13.8	13.63(q)	13.5

注:溶剂为CDCl₃,以TMS作内标;文献中¹³C NMR 为50 MHz。

Note: The solvent was CDCl₃, with TMS as int. standard; ¹³C NMR was 50 MHz in reference.

根据以上MS, ¹H NMR, ¹³C NMR 及DEPT 数据,分析与文献[5]的¹³C NMR 对照,数据一致。

故确定A₃₋₃和A₄分别为二萜类化合物4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮,结构见图1。

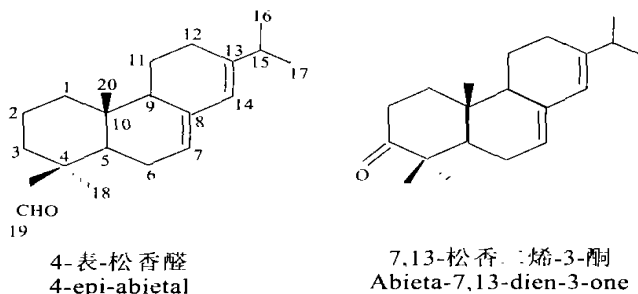


图1 2种二萜类化合物的化学结构

Fig 1 The chemical structure of two diterpenoids

2.2 杀虫活性测定

以鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素为对照,测试了4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮对3龄粘虫的拒食及毒杀活性,结果见表2。由表2可见,4-表-松香醛和

7,13-松香二烯-3-酮对3龄粘虫均具有较强的拒食及一定的毒杀活性;4-表-松香醛与鬼臼毒素活性相当,7,13-松香二烯-3-酮明显高于鬼臼毒素,但两者活性均低于脱氧鬼臼毒素。

表2 4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮对3龄粘虫的生物活性测定

Table 2 The bioassay activity of 4-*epi*-abietal and abieta-7,13-dien-3-one against the 3rd-instar *Mythimna separata*

供试药剂 Tested compounds	质量浓度/(g·mL ⁻¹) Concentration	72 h 拒食率/% Antifeedant rate in 72 h	72 h 校正死亡率/% Adjusted mortality in 72 h
4-表-松香醛 4- <i>epi</i> -abietal	0.005	85.76	43.33
7,13-松香二烯-3-酮 Abieta-7,13-dien-3-one	0.005	96.11	76.78
鬼臼毒素 Podophyllotoxin	0.005	85.68	40
脱氧鬼臼毒素 Deoxy-podophyllotoxin	0.002	100	91.70

注: 试验中每处理设3个重复, 每重复10头粘虫; 表中数据为3次重复的平均值。

Note: In this test, the treatment was repeated 3 times, and 10 *Mythimna separata* as a group. The data of the table was the average of 3 groups

3 讨论

从本研究分离得到的4个化合物的量及对粘虫的生物活性测定结果来看,砂地柏中4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮的含量远小于鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素,活性也不及脱氧鬼臼毒素,因此初步推测,4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮可能不是砂地柏中的主要杀虫活性成分。

本研究结果表明,4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮对3龄粘虫均具有较强的拒食及一定的毒杀活性;近期试验发现,0.01 g/mL 4-表-松香醛对5龄菜青虫(*Pieris rapae* L.)和3龄小菜蛾(*Plutella maculipennis* L.)7 d的死亡率分别为50%和62.5%;0.008 g/mL 7,13-松香二烯-3-酮对上述2种试虫的死

亡率分别为100%和47.36%。可见这2种二萜类物质对多种害虫均具有生物活性,故其杀虫谱、作用方式、致毒机理等有待于进一步研究。另外,4-表-松香醛和7,13-松香二烯-3-酮与松香酸均为具有松香烯骨架的化合物,因该类化合物结构简单,易于人工合成,且松香酸^[6,15,16]的药理活性及其衍生物合成方面的研究颇多,故该类化合物结构与杀虫活性之间关系的研究,可在一定程度上借鉴松香酸的研究结果。

砂地柏中除大量的鬼臼类化合物有杀虫活性外,单萜类、甾醇、有机酸等也有相关杀虫活性方面的报道^[11,17-19],本研究发现了砂地柏中二萜类物质的杀虫活性,结合前期研究结果,推测砂地柏中杀虫活性成分复杂多样,值得进一步分离。

致谢: 兰州大学应用有机化学国家重点实验室田暄教授帮助进行了化合物的鉴定工作,在此表示感谢!

[参考文献]

[1] San Feliciano A, Miguel del Corral J M, Gordaliza M, et al. Acidic and phenolic lignans from *Juniperus sabina* [J]. *Phytochemistry*, 1991,

30(10): 3483- 3485

- [2] Pascual Teresa J de, San Feliciano A, Miguel del Corral J M, et al 2, 5-dimethylcoumarins from leaves of *Juniperus sabina* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(12): 2778- 2779
- [3] Pascual Teresa J de, San Feliciano A, Tabernero M L, et al Componentes de las arceutidas de *Juniperus sabina* L. [J]. *An Quim*, 1978, 74: 1093- 1096
- [4] Pascual Teresa J de, San Feliciano A, Miguel del Corral J M, et al Terpenoids from *Juniperus sabina* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(1): 300- 301
- [5] San Feliciano A, Miguel del Corral J M, Gordaliza M, et al Two diterpenoids from leaves of *Juniperus sabina* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2): 695- 697
- [6] Mossa J S, Muhammad I, El-feraly F S, et al 3 β -12-dihydroxyabieta-8, 11, 13-triene-1-one and other constituents from *Juniperus excelsa* leaves [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(8): 2789- 2792
- [7] 方圣鼎, 顾云龙, 沙也夫·木沙德林, 等 叉子圆柏中的抗肿瘤化学成分 [J]. *植物学报*, 1989, 31: 382- 388
- [8] 王继栋, 田 暄, 张 兴 砂地柏叶中鬼臼毒素的分离与鉴定 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2000, 28(6): 25- 29
- [9] 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
- [10] 张 兴, 高 蓉, 田 暄, 等 砂地柏果实中杀虫活性成分的结构鉴定 [J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(4): 16- 18
- [11] 魏红梅 几种植物精油的熏蒸杀虫作用及其活性成分研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学植保学院, 2000
- [12] 李耀发 砂地柏枝叶中杀虫活性成分初步研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学植保学院, 2003
- [13] 付昌斌, 张 兴 砂地柏果实提取物对棉铃虫生长发育的影响 [J]. *西北农业大学学报*, 1998, 26(1): 8- 12
- [14] 张 兴, 赵善欢 楝科植物对几种害虫的拒食和忌避作用 [J]. *华南农学院学报*, 1983, (4): 1- 7
- [15] Fernández M A, Tomos M P, García M D, et al Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea* [J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 2001, 53(6): 867- 872
- [16] Woo-Sik K, Hea-Sung J. Synthesis and photocrosslinking of poly [J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2001, 22(11): 825- 828
- [17] 高 蓉, 田 暄, 张 兴 3种鬼臼毒类物质杀虫活性测试 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2001, 29(1): 71- 74
- [18] 莫建初, 刘志茹, 王 海, 等 芫花杀虫活性成分的结构鉴定 [J]. *中南林学院学报*, 2001, 21(4): 5- 10
- [19] 王利国, 孟昭金, 李 玲 用有机酸及杀虫剂处理的杨枝把诱集棉铃虫 [J]. *中国生物防治*, 2003, 19(1): 31- 33

Isolation and structural identification of two insecticidal diterpenoids from fruits of *Sabina vulgaris* Ant

ZHU Hai-yun^{1,2}, LI Guang-ze¹, LIAN Ying-jiang¹, FENG Jun-tao¹, ZHANG Xing¹

(1 *Biorational Pesticide Research and Development Center, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;*

2 *Department of Chemistry, Baoji University of Arts and Sciences, Baoji, Shaanxi 721007, China)*

Abstract With *Mythimna separata* Walker as the screening insect, two diterpenoids compounds were isolated from fruits of *Sabina vulgaris* Ant. According to the guidance of bioactivity assaying, their molecular structures were identified to be 4-epi-abietal and abieta-7, 13-dien-3-one by MS, ¹H NMR, ¹³C NMR. The result of bioassay showed that 0.005 g/mL 4-epi-abietal and abieta-7, 13-dien-3-one exhibited good antifeeding and some poisonous activity against the 3rd-instar *Mythimna separata*.

Key words *Sabina vulgaris* Ant; insecticidal activity; diterpenoid compounds; 4-epi-abietal; abieta-7, 13-dien-3-one