

小花八角枝叶中的薄荷烷型单萜

隋先进¹, 其木格¹, 张正曦¹, 武海波^{1,2}, 王文蜀^{1,2*}, 覃巧飞¹, 董旭俊³, 焦玉国¹

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

2. 北京市食品环境与健康工程技术研究中心, 北京 100081

3. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710091

摘要: 目的 研究有毒药用植物小花八角 *Illicium micranthum* 枝叶的化学成分及其对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性。方法 利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等方法对小花八角枝叶的化学成分进行系统的分离, 通过质谱、核磁共振谱等波谱方法, 结合理化性质分析鉴定化合物结构; 采用触杀胃毒联合毒力方法测定化合物 2 对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性。**结果** 从小花八角枝叶甲醇提取物的醋酸乙酯萃取部位分离得到 5 个薄荷烷型单萜化合物, 分别鉴定为 (-)-(1R*,4S*)-1-羟甲基-2-烯基-4-异丙基-1,4-环己二醇 (1)、(1R,2R,4R)-1-甲基-4-异丙基-1,2,4-环己三醇 (2)、4-羟基胡椒酮 (3)、乳香醇 C (4)、 α,α -二甲基-4-羟甲基苯甲醇 (5)。其中化合物 1 为新化合物, 命名为小花八角素 A。**结论** 化合物 1 为新化合物, 化合物 2~5 为首次从该植物中分离得到。化合物 2 对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性与浓度呈正相关, 48 h 后的 LD₅₀ 值为 30.4 mg/L, 72 h 后的 LD₅₀ 值为 22.5 mg/L。

关键词: 小花八角; 薄荷烷型单萜; 小花八角素 A; (-)-(1R*,4S*)-1-羟甲基-2-烯基-4-异丙基-1,4-环己二醇; (1R,2R,4R)-1-甲基-4-异丙基-1,2,4-环己三醇; 韭菜迟眼蕈蚊幼虫; 杀虫活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)22-3947-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.003

Menthane-type monoterpenes from branches and leaves of *Illicium micranthum*

SUI Xian-jin¹, QI Mu-ge¹, ZHANG Zheng-xi¹, WU Hai-bo^{1,2}, WANG Wen-shu^{1,2}, QIN Qiao-fei¹,
DONG Xu-jun³, JIAO Yu-guo¹

1. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. Beijing Engineering Research Center of Food Environment and Public Health, Minzu University of China, Beijing 100081, China

3. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710091, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the branches and leaves of *Illicium micranthum* and insecticidal activities on larvae of *Bradysia odoriphaga*. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel, and Sephadex LH-20 column chromatography. Their structures were elucidated by physicochemical properties and spectroscopic analyses. The standard contact and stomach bioassay method was used to assess the effects of median lethal dose (LD₅₀) of compound 2 on the demographic parameters of larvae of *B. odoriphaga*. **Results** Five monoterpenoids were isolated from the ethyl acetate layer of methanol extract from the branches and leaves of *I. micranthum*. Compound 1, (-)-(1R*,4S*)-1-(hydroxymethyl)-4-isopropylcyclohex-2-ene-1,4-diol, was a new monoterpenoid and named as illicmicrene A, and the other compounds were identified as (1R,2R,4R)-1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,2,4-cyclohexanetriol (2), 4-hydroxypiperitone (3), olibanumol C (4) and α,α -dimethyl-4-hydroxymethylbenzyl alcohol (5), respectively. **Conclusion** Compound 1 is isolated as a new compound and compounds 2—5 are obtained from *I. micranthum* for the first time. Furthermore, compound 2 shows the insecticidal effects on larvae of *B. odoriphaga* with LD₅₀ values at 30.4 mg/L after 48 h, at 22.5 mg/L after 72 h.

收稿日期: 2016-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31200260, 31270591); 建设世界一流大学 (学科) 和特色发展引导专项资金; 一流大学与一流学科建设过渡性经费专项资金资助; 中央民族大学 2014 年校级科研项目 (Z2014044); 高等学校学科创新引智计划 (B08044); 中央民族大学大学生创新训练计划资助项目 (GCCX2015110038)

作者简介: 隋先进 (1991—), 男, 硕士在读, 研究方向为民族地区药用植物化学成分研究。

Tel: (010)68932242 Fax: (010)68932633 E-mail: suixianjin_1991@126.com

***通信作者** 王文蜀 (1974—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为天然产物化学。Tel: (010)68932242 E-mail: wangws@muc.edu.cn

Key words: *Illicium micranthum* Dunn; menthane-type monoterpene; illicmicrene A; (-)-(1R*,4S*)-1-(hydroxymethyl)-4-isopropylcyclohex-2-ene-1,4-diol; (1R,2R,4R)-1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,2,4-cyclohexanetriol; larvae of *Bradysia odoriphaga*; insecticidal activity

小花八角 *Illicium micranthum* Dunn 是木兰科 (Magnoliaceae) 八角属 *Illicium* Linn. 植物, 为多年生灌木或小乔木, 广泛分布于我国西南民族地区^[1]。其根、树皮、叶和果实可入药; 树皮外用可治风湿骨痛、跌打损伤; 其果实入药有祛风解表、行气止痛、止吐泻之效, 可治感冒风寒、呕吐腹泻、胸腹气痛等症。小花八角用作傣药, 有毒, 药用时需注意用量; 煮水可作杀虫农药^[1-3]。韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang, 俗称韭蛆, 以 7 科超过 30 种植物为食, 是影响我国北方韭菜产量的主要害虫^[4]。韭蛆的生活习性导致其防治管理方法主要是运用一类化学合成农药进行灌根处理, 该方法给环境带来农药残留等影响。因此, 发展新型、高效、环境友好型的杀虫剂十分必要^[5-6]。本课题组前期已从小花八角果实和枝叶中有抗氧化活性的提取物中分离得到了 23 个化合物^[7-8]。为进一步深入研究该植物的化学成分, 寻找新型杀虫农药先导化合物, 本实验采用现代色谱分离技术, 对其枝叶进行了系统化学成分研究, 从甲醇提取物的醋酸乙酯萃取部位中分离得到了 5 个化合物, 分别鉴定为 (-)-(1R*,4S*)-1-羟甲基-2-烯基-4-异丙基-1,4-环己二醇 [(-)-(1R*,4S*)-1-(hydroxymethyl)-4-isopropylcyclohex-2-ene-1,4-diol, **1**]、(1R,2R,4R)-1-甲基-4-异丙基-1,2,4-环己三醇 [(1R,2R,4R)-1-methyl-4-(1-methylethyl)-1,2,4-cyclohexanetriol, **2**]、4-羟基胡椒酮 (4-hydroxypiperitone, **3**)、乳香醇 C (olibanumol C, **4**)、 α,α -二甲基-4-羟甲基苯甲醇 (α,α -dimethyl-4-hydroxymethylbenzyl alcohol, **5**)。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 命名为小花八角素 A, 化合物 **2~5** 为首次从该植物中分离得到。对化合物 **2** 进行了韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性测试, 实验结果显示其作用 48 h 后的 LD₅₀ 值为 30.4 mg/L, 72 h 后的 LD₅₀ 值为 22.5 mg/L。

1 仪器与材料

DRX 500、AVANCE 600 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司); BT224S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); Anton Paar MCP 200 Analytical Automatic Polarimeter 旋光仪 (奥地利安东帕公司); Nicolet IS5 FT-IR (KBr) 红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Agilent 6890N-5975

质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Agilent HPLC-QTOF/MS 6520 高分辨质谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); 薄层色谱硅胶 (GF254) 和柱色谱硅胶 (100~200 目、200~300 目) 均购自青岛海洋化工有限公司; Sephadex LH-20 为 Pharmacia 公司生产; 氘代试剂为北京大学大北公司产品; 水为蒸馏水; 其他试剂均为分析纯, 北京化工厂生产。

小花八角枝叶于 2011 年 10 月采于云南省澜沧县, 由中国科学院昆明植物研究所李锡文研究员鉴定为小花八角 *Illicium micranthum* Dunn 的枝叶, 标本 (201110103) 保存于中央民族大学生命与环境科学学院。

2 提取与分离

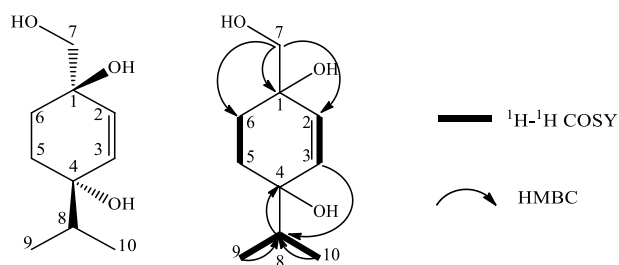
干燥的小花八角枝叶 500.0 g, 粉碎, 甲醇室温提取 3 次, 每次 7 d, 合并提取液, 减压浓缩, 得棕色的总浸膏 50.0 g。将总浸膏加入适量蒸馏水混悬, 依次用石油醚、醋酸乙酯萃取, 浓缩, 得到相应的萃取物。醋酸乙酯萃取物 15.0 g, 拌以等量硅胶 (100~200 目), 经硅胶柱色谱 (200~300 目), 以石油醚-丙酮 (30:1→0:1) 为洗脱剂梯度洗脱, 得 Fr. 1~9。Fr. 5 (石油醚-丙酮 5:1) 经反复硅胶柱色谱并结合 Sephadex LH-20 (氯仿-甲醇 1:1) 凝胶柱色谱得到化合物 **2** (5.0 mg)、**3** (2.0 mg)。Fr. 6 (石油醚-丙酮 3:1) 经反复硅胶柱色谱并结合 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (氯仿-甲醇 1:1) 得到化合物 **1** (1.5 mg)、**4** (2.5 mg)、**5** (1.5 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状物, 薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。HR-ESI-MS m/z : 209.114 7 [$M+Na$]⁺ (计算值 209.114 8) 给出分子式 C₁₀H₁₈O₃ (c 0.1, MeOH)。IR 谱提示含有羟基 (3 384 cm⁻¹) 和双键 (1 666 cm⁻¹)。¹H-NMR (600 MHz, CD₃COCD₃) 谱 (表 1) 中可见 2 个双键氢信号 δ_H 5.70 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-2)、5.66 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-3); 1 对连氧亚甲基信号 δ_H 3.40 (1H, dd, J = 5.4, 10.8 Hz, H-7a)、3.34 (1H, dd, J = 6.0, 10.8 Hz, H-7b) 提示存在 1 个羟甲基; 1 组异丙基信号 δ_H 1.69 (1H, m, H-8)、0.94 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-10)、0.88 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-9)。¹H-¹H COSY 谱中, 有 3 组相关信号 (图 1)。

表1 化合物1的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data for compound 1

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	—	69.9
2	5.70 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	132.1
3	5.66 (1H, d, $J = 12.0$ Hz)	136.1
4	—	71.8
5	1.92 (1H, m, H-5b), 1.48 (1H, m, H-5a)	27.8
6	1.88 (1H, m, H-6b), 1.56 (1H, m, H-6a)	29.6
7	3.40 (1H, dd, $J = 5.4, 10.8$ Hz, H-7a), 3.34 (1H, dd, $J = 6.0, 10.8$ Hz, H-7b)	70.5
8	1.69 (1H, m)	38.3
9	0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	18.0
10	0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	17.0

图1 化合物1的结构及主要 ^1H - ^1H COSY和HMBC相关
Fig. 1 Structure and key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 1

^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3COCD_3) 谱(表1)和DEPT谱显示化合物1含有10个碳信号,包括1组双键碳信号 δ_{C} 136.1 (C-3)、132.1 (C-2);1个连氧亚甲基碳信号 δ_{C} 70.5 (C-7);1组异丙基碳信号 δ_{C} 38.3 (C-8)、18.0 (C-9)、17.0 (C-10);2个连氧季碳信号 δ_{C} 71.8 (C-4)、69.9 (C-1)。结合一维NMR信息,初步推断可能是1个薄荷烷型单萜。HMBC谱中H-7a (δ_{H} 3.40)、H-7b (δ_{H} 3.34)与C-1 (δ_{C} 69.9)远程相关, H-8 (δ_{H} 1.69)与C-4 (δ_{C} 71.8)远程相关,确定连氧亚甲基连在C-1上,异丙基连在C-4上。通过HSQC和HMBC图谱,对化合物1的NMR数据进行了归属,确证了其平面结构。查阅文献发现化合物1与(-)-(1R*,4S*)-1,4-dihydroxy-*p*-menth-2-ene^[9]的 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据非常相似,二者差异仅在于化合物1中7位上的1个H被-OH取代,而且NOESY谱中有H-7a与H-5a、H-2相关信号, H-3与H-8相关信号,提示C-1和C-4的羟基应该处于相反的方向,这种伸展方向与文献化合物的相对构型一致。进一步对比比旋光度数值,发现二者均让偏振光左旋为负值。综上推测化合物1与已知

化合物的相对构型一致,确定其结构式为(-)-(1R*,4S*)-1-羟甲基-2-烯基-4-异丙基-1,4-环己二醇,经SciFinder检索核实,为1个未见报道的薄荷烷单萜,命名为小花八角素A。

化合物2:无色油状物, $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_3$, ESI-MS m/z : 189.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$,薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。 ^1H -NMR (600 MHz, MeOD) δ : 3.50 (1H, brs, H-2), 1.94 (1H, m, H-3b), 1.90 (1H, m, H-6b), 1.78 (1H, m, H-5b), 1.59 (1H, m, H-3a), 1.56 (1H, m, H-8), 1.44 (1H, m, H-5a), 1.39 (1H, m, H-6a), 1.23 (3H, s, 7- CH_3), 0.91 (3H, brs, 10- CH_3), 0.90 (3H, brs, 9- CH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, MeOD) δ : 75.79 (C-4), 75.74 (C-2), 72.09 (C-1), 39.05 (C-8), 34.86 (C-3), 30.42 (C-6), 30.32 (C-5), 27.13 (C-7), 17.27 (C-10), 17.18 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[10],故鉴定化合物2为(1R,2R,4R)-1-甲基-4-异丙基-1,2,4-环己三醇。

化合物3:无色油状物, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$, ESI-MS m/z : 169.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$,薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 5.80 (1H, s, H-2), 2.35 (1H, m, H-4b), 2.28 (1H, m, H-4a), 2.01 (3H, s, 10- CH_3), 1.75 (1H, m, H-7), 1.60 (1H, m, H-5b), 1.36 (1H, m, H-5a), 0.85 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 9- CH_3), 0.74 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 8- CH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 201.63 (C-1), 161.58 (C-3), 122.56 (C-2), 76.60 (C-6), 32.94 (C-4), 31.09 (C-5), 30.41 (C-7), 23.32 (C-10), 15.95 (C-9), 15.56 (C-8)。以上数据与文献报道一致^[11],故鉴定化合物3为4-羟基胡椒酮。

化合物4:无色油状物, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$, ESI-MS m/z : 171.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$,薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 5.51 (1H, s, H-2), 3.91 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-7), 2.18 (1H, m, H-6b), 2.14 (1H, m, H-3b), 1.97 (1H, m, H-6a), 1.91 (1H, m, H-3a), 1.65 (1H, m, H-5b), 1.64 (1H, m, H-8), 1.50 (1H, m, H-5a), 0.93 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 10- CH_3), 0.91 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 9- CH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 138.55 (C-1), 119.64 (C-2), 71.75 (C-4), 66.71 (C-7), 37.56 (C-8), 35.31 (C-3), 31.87 (C-5), 23.48 (C-6), 17.25 (C-9), 17.19 (C-10)。以上数据与文献报道一致^[12],故鉴定化合物4为乳香醇C。

化合物5:无色油状物, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$, ESI-MS m/z : 167.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$,薄层展开后三氯化锑显色剂显淡黄色。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 7.48 (2H, d,

$J = 8.4$ Hz, H-2, 6), 7.29 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3, 5), 4.59 (2H, s, H-7), 1.48 (6H, s, 9, 10-CH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃COCD₃) δ : 150.01 (C-1), 141.08 (C-4), 127.07 (C-3, 5), 125.26 (C-2, 6), 71.95 (C-8), 64.61 (C-7), 32.49 (C-9, 10)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 5 为 α,α -二甲基-4-羟甲基苯甲醇。

4 杀虫活性研究

杀虫活性参照文献报道^[14]采用触杀胃毒联合

毒力方法, 测试化合物 2 对 4 龄韭菜迟眼蕈蚊幼虫的半数致死量 (LD₅₀)。

结果表明, 将化合物 2 质量浓度设定在 100.0 mg/L, 韭菜迟眼蕈蚊幼虫 48 h 后死亡率大于 50%。表 2 中显示化合物 2 对韭菜迟眼蕈蚊幼虫有明显的毒杀活性, 且随质量浓度的升高而增强。运用 SPSS 19.0 软件上的 Probit 模型对化合物毒力活性测定数据进行统计分析^[15], 化合物 2 在 48 h 后的 LD₅₀ 值为 30.4 mg/L; 72 h 后的 LD₅₀ 值为 22.5 mg/L。

表 2 化合物 2 对 4 龄韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒杀活性

Table 2 Insecticidal activities data of compound 2 on four age-stage larvae of *B. odoriphaga*

ρ /(mg·mL ⁻¹)	供试昆虫总数	48 h			72 h		
		死亡数	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡数	死亡率/%	校正死亡率/%
空白	60	3	5.00	0.00	4	6.70	0.00
12.5	60	23	38.33	35.09	25	41.67	37.48
25.0	60	28	46.67	43.86	32	53.33	49.98
50.0	60	38	63.33	61.40	42	68.33	66.06
100.0	60	49	71.67	70.18	53	81.67	80.35

校正死亡率 = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率)

Corrected mortality = (mortality of experimental group - mortality of control group) / (1 - mortality of control group)

天然薄荷烷型单萜是广泛存在于药用植物的一类功效化学成分, 但测试从小花八角中所得单萜的杀虫活性尚属首次报道。上述测试结果显示, 单萜化合物 2 对韭菜迟眼蕈蚊幼虫有毒杀活性, 其 48、72 h 的 LD₅₀ 的测试结果值均小于 50 mg/L, 可能是小花八角中一种重要的、具有杀虫活性的化合物。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物所. 云南植物志 (第 11 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [2] 林 祁. 八角属药用植物资源 [J]. 中草药, 2002, 33(7): 654-657.
- [3] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [4] Li W X, Yang Y T, Xie W Q, et al. Effects of temperature on the age-stage, two-sex life table of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) [J]. *J Econ Entomol*, 2015, 108(1): 126-134.
- [5] 张 兴, 李广泽, 马志卿, 等. 试论“农药无公害化” [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(3): 130-137.
- [6] 何 军, 马志卿, 张 兴. 植物源农药概述 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(9): 79-86.
- [7] Liu T T, Wu H B, Wang W S, et al. A new illicinolide from leaves of *Illicium micranthum* Dunn [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(19): 1598-1601.

- [8] 刘婷婷, 武海波, 陈艳艳, 等. 小花八角果实抗氧化活性部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 611-614.
- [9] Ahmed A. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(7): 989-991.
- [10] Nagamatsu R, Mitsunashi S, Shigetomi K, et al. Cleavage of α -dicarbonyl compounds by terpene hydroperoxide [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2012, 76(10): 1904-1908.
- [11] Pooter H L D, Buyck L F D, Schamp N M. The volatiles of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25(3): 691-694.
- [12] Yoshikawa M, Morikawa T, Oominami H, et al. Absolute stereostructures of olibanumols A, B, C, H, I, and J from olibanum, gum-resin of *Boswellia carterii*, and inhibitors of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(9): 957-964.
- [13] Yun B S, Lee I K, Kim J P, et al. Lipid peroxidation inhibitory activity of some constituents isolated from the stem bark of *Eucalyptus globulus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2000, 23(2): 147-150.
- [14] Zhang P, Liu F, Mu W, et al. Life table study of the effects of sublethal concentrations of thiamethoxam on *Bradysia odoriphaga* Yang and Zhang [J]. *Pestic Biochem Phys*, 2014, 111: 31-37.
- [15] 武怀恒, 万 鹏, 黄民松. 毒力回归计算方法及相应软件使用介绍 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(27): 9335-9338.