

马桑籽中马桑内酯类化合物的提取分离及其活性

张雁冰¹, 朱献民¹, 艾国民¹, 李孟楼²

(1. 郑州大学化学系 新药研究开发中心, 河南 郑州 450052; 2. 西北林业科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

随着人们环保意识的增强以及社会对可持续发展的要求, 在害虫防治领域人们急切盼望着有高效、低毒、无污染的新型农药来代替高毒有机合成农药。植物源农药具有在环境中降解快, 对人畜及非靶标生物毒性低, 害虫不易产生抗性等优点, 在未来的害虫防治中有十分广阔的前景。

马桑 *Coriaria sinica* Maxim. 为马桑科马桑属植物, 是多年生落叶有毒的小乔木或灌木。其自然资源丰富, 在我国分布广泛。马桑根部药用, 用于治风湿麻木、风火牙痛、痰饮、跌打损伤、烫火伤、急性结膜炎等^[1]。马桑全株有毒, 在民间有用于土农药的记载, 马桑提取物对多种咀嚼式害虫具有明显的拒食和胃毒作用, 可用作植物农药。马桑内酯类化合物是马桑的主要活性成分, 对中枢神经系统具有显著的药理作用^[2]。笔者曾经对马桑叶的化学成分进行了研究, 提取分离出 7 种长链酸酯^[3]和 8 个黄酮类化合物^[4]。本实验对马桑籽乙醇提取液水相部分的化学成分进行研究, 分离鉴定了 3 个内酯类化合物和 1 个芳香族化合物, 分别为羟基马桑毒素(tutin, I)、马桑亭(coriatin, II)、马桑宁(corianin, III)、香草醛(vanillic acid, IV), 并对马桑内酯类化合物进行了初步的活性研究。

1 仪器和试剂

北京科仪电光仪器厂 XT5 显微熔点测定仪, 温度未校正; 高分辨质谱 Waters 谱仪, KBr 压片; 瑞士 Bruker DPX-400 型超导核磁共振仪, 内标 TMS; 反应检测用 GF₂₅₄ 薄层层板; Micromass 公司 Q-Tof MicroTM 高分辨质谱仪; Thermo Nicolet IR200 Spectrometer 红外光谱仪。0.3% 印楝素(azadirachtin)乳油(商品名为爱禾), 云南新联化工厂生产; 其他所用化学试剂均为分析纯; 植物原料从陕西省采集, 经西北农林科技大学鉴定。

2 提取与分离

马桑籽 75 kg(干重), 95% 乙醇回流提取 3 次, 提取液浓缩成浸膏, 用石油醚萃取除去叶绿素, 然后

石油醚、丙酮和水萃取, 得水相。水相通过大孔吸附树脂得粗品。然后进行柱色谱, 重结晶得香草醛、羟基马桑毒素、马桑亭, 同时得到羟基马桑毒素和马桑宁的混合物。由于它们为同分异构体, 性质很相似, 一般分离方法如重结晶、柱色谱很难把二者分离, 笔者通过 RP-HPLC 对二者成功地进行了分离。分离条件: 混合物样品用 50% 甲醇溶液溶解, 流动相为乙腈(14%), 紫外检测波长 215 nm, 恒溶剂洗脱, 体积流量为 5 mL/min, 分别在 6.70 min 和 11.29 min 出峰, 该条件下样品的色谱达到基线分离, 见图 1。

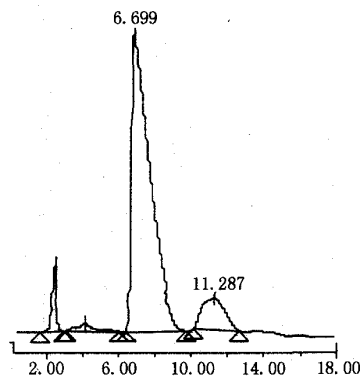


图 1 羟基马桑毒素和马桑宁的分离图

Fig. 1 RP-HPLC Chromatogram of tutin and corianin

3 化合物的理化性质和光谱数据

化合物 I: 无色块状结晶, mp 205~207 °C。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}(\text{cm}^{-1})$: 3 532(OH), 3 000, 1 761(C=O), 1 655(C=C), 1 466, 1 165。¹H-NMR[(CD₃)₂CO] δ : 1.30(3H, s, H-7), 1.91(3H, s, H-10), 2.59(1H, d, J =6.1 Hz, H-14), 3.01(1H, d, J =3.1 Hz, H-12), 3.09(1H, d, J =4.3 Hz, H-5), 3.22(1H, brs, H-4), 3.64(1H, d, J =3.1 Hz, H-11), 3.94(1H, d, J =6.0 Hz, H-14), 4.20(1H, s, H-2), 4.65(1H, s, H-9), 4.81(1H, s, H-3), 4.82(1H, s, H-9); ¹³C-NMR[(CD₃)₂CO] δ : 45.6(C-1), 78.0(C-6), 84.1(C-3), 50.0(C-4), 50.3(C-5), 72.6(C-2), 22.9(C-10), 143.1(C-8), 110.6(C-9), 20.7(C-7), 60.8(C-11),

收稿日期: 2006-09-08

基金项目: 2002~2004 年国家自然科学基金资助项目(30170777)

作者简介: 李孟楼(1957—), 男, 教授, 博士生导师。主要从事森林害虫防治及杀虫剂毒理研究。

60.1 (C-12), 65.8 (C-13), 51.8 (C-14), 175.4 (C-15)。数据与文献报道^[5]比较确定为羟基马桑毒素(tutin)。单晶X射线衍射测试进一步证明了其立体结构,表明其晶体属正交晶系,空间群为p212121,晶胞中有4个分子,晶体中有3种形式的氢键,4-O-H...O-2、1-O-H...O-6和4-O-H...O-6。由于氢键的作用,分子之间形成规则的堆积,见图2。

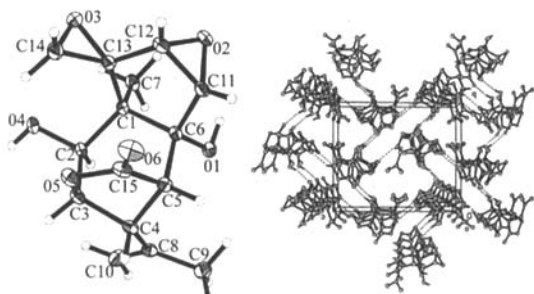


图2 化合物I的单晶X射线衍射和多分子空间堆积图

Fig. 2 X-Ray Diffraction pattern of compound I single crystal and polymolecular distribution

化合物II: 无色结晶, mp 259~261 °C。其IR

$\nu_{\max}^{\text{KBr}}(\text{cm}^{-1})$: 3 272(OH), 3 080, 2 972, 1 775(-OC=O), 1 445。 $^1\text{H-NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]\delta$: 1.05(3H, s, H-7), 1.35(3H, s, H-10), 1.44(3H, s, H-9), 1.57(1H, dd, $J=3.68, 3.77$ Hz, H-2), 1.96(1H, d, $J=15.07$ Hz, H-2), 2.48(1H, m, H-4), 2.76(1H, d, $J=4.17$ Hz, H-14), 2.98(1H, d, $J=4.73$ Hz, H-5), 3.00(1H, d, $J=4.23$ Hz, H-14), 3.13(1H, d, $J=3.02$ Hz, H-12), 3.67(1H, d, $J=3.02$ Hz, H-11), 4.82(1H, t, $J=4.34$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]\delta$: 40.0 (C-1), 32.1 (C-2), 78.8 (C-3), 49.7 (C-4), 52.6 (C-5), 75.7 (C-6), 22.4 (C-7), 69.3 (C-8), 30.1 (C-9), 28.5 (C-10), 61.3 (C-11), 58.3 (C-12), 67.1 (C-13), 52.1 (C-14), 174.9 (C-15)。其波谱数据与文献数据基本一致^[6],确定该化合物的结构为马桑亭(coriatin)。X衍射测试表明,其晶体呈无色透明块状,属正交晶系,空间群为p212121,每个晶胞有4个分子,晶体中有两种形式的氢键:4-O-H...O-1和1-O-H...O-4。由于氢键的作用,分子之间形成规则的堆积,见图3。

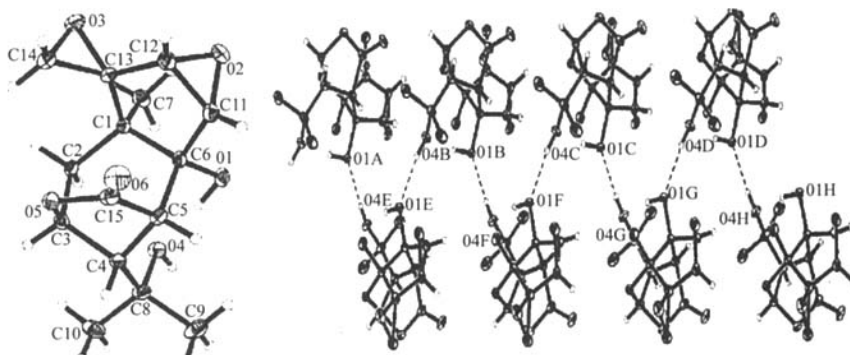


图3 化合物II的单晶X射线衍射图和若干分子的晶体衍射透视图

Fig. 3 X-Ray Diffraction pattern of compound II single crystal and perspective drawing of some molecular crystal diffraction

化合物III: 无色结晶, mp 259~262 °C; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}(\text{cm}^{-1})$: 3 271, 3 080, 2 973, 1 775, 1 446; $^1\text{H-NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]\delta$: 1.07(3H, s, H-7), 1.95(3H, s, H-10), 3.13(1H, d, $J=4.0$ Hz, H-5), 3.36(1H, m, H-4), 3.49(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-11), 3.78(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-12), 3.79, 3.88(2H, dd, $J=10.0, 10.0$ Hz, H-14), 4.21(1H, d, $J=4.0$ Hz, H-2), 4.89, 4.92(2H, br s, H-9), 5.01(1H, t, $J=4.0$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]\delta$: 55.3 (C-1), 81.9 (C-2), 85.5 (C-3), 48.9 (C-4), 49.9 (C-5), 75.6 (C-6), 22.9 (C-7), 141.3 (C-8), 112.5 (C-9), 21.7 (C-10), 64.1 (C-11), 60.9 (C-12), 90.4 (C-13), 77.5 (C-

14), 175.3 (C-15)。数据与文献数据一致^[6],确定该化合物的结构为马桑宁(corianin)。

化合物IV: 无色针状结晶, mp 146~148 °C; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 9.82(1H, s, CHO), 7.40(1H, m, H-6), 7.24(1H, s, H-2), 7.04(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 6.36(1H, br s, OH), 3.91(3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 129.7 (C-1), 108.8 (C-2), 147.2 (C-3), 151.7 (C-4), 114.4 (C-5), 127.5 (C-6), 56.4 (OCH_3), 190.9 (CO)。核磁数据与文献报道一致^[7],确定为香草醛(vanillic acid)。

4 活性测定

采用叶碟法,在非选择性条件下测定。将新鲜甘

蓝叶片打成直径为2 cm的叶碟,取适量羟基马桑毒素(0.022 g)、马桑亭(0.015 g),0.3%印楝素乳油(0.050 g)溶于适量的丙酮-甲醇(2:1)混合溶液中,加入1滴曲拉通(洗涤剂),再加入水配成50 mL药液,然后加水对半稀释,浸渍叶碟5 s。晾干后放入垫有滤纸的(加水保湿)直径为7 cm的培养皿中,每个培养皿放入2片处理叶碟,接入一头已饥饿4 h的3龄小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 幼虫。每处理设10个重复,用丙酮-甲醇(2:1)和曲拉通的混合液加水稀释作为对照,处理后放于25℃恒温箱中,24 h后用坐标纸测量被取食的叶面积。

由表1中可以看出,马桑亭对小菜蛾没有明显的拒食作用,而羟基马桑毒素有明显的拒食的活性,440 μg/mL的拒食率达69.0%。虽然对小菜蛾无毒杀作用,但是能明显延缓小菜蛾的化蛹时间,抑制小菜蛾的生长发育。需要说明的是对照所用是0.3%印楝素乳油,是市售的制剂商品,其浓度是折算后的浓度,而实验所用的羟基马桑毒素是纯化合物。

表1 羟基马桑毒素(I)和马桑亭(II)对小菜蛾幼虫的拒食活性

Table 1 Apatist activity of tutin (I) and coriartin (II) on larva of *P. xylostella*

药品	质量浓度/ (μg · mL ⁻¹)	24 h后取食 面积/mm ²	拒食率/%	72 h后死 亡率/%	处理后6 d 化蛹率/%
I	300	142	10.1	0	80
I	150	145	8.2	0	100
I	75	159	—	0	100
I	440	49	69.0	0	20
I	220	85	46.2	0	40
I	110	102	35.4	0	40
印楝素	3	42	73.4	40	20
对照	—	158	—	0	100

5 结果和讨论

本实验通过对马桑籽乙醇提取液进行分离,得到羟基马桑毒素、马桑亭、马桑宁、香草醛;其中香草

醛为首次从该属植物中分离得到。并通过选择合适的条件,利用RP-HPLC成功地分离羟基马桑毒素和马桑宁的混合物,为天然产物中倍半萜类化合物的分离提供了高效、便捷、可行的分离方法。

通过X射线单晶衍射确定了羟基马桑毒素和马桑亭的立体构型。通过分析研究羟基马桑毒素的二维核磁共振谱HMBC,笔者认为文献[5]关于C-7和C-10的化学位移值报道可能有误,因 $\delta_c = 20.737$ 的碳与2位氢和14位氢相关,故推断为C-7,而 $\delta_c = 22.972$ 的碳与9位氢相关,推测为C-10。

通过对羟基马桑毒素和马桑亭的杀虫活性实验,表明羟基马桑毒素对小菜蛾具有明显的拒食作用,有必要对其进行结构修饰,合成其衍生物,并通过构效关系研究确定羟基马桑毒素的活性中心,以其为模板合成活性更强的化合物,为绿色农药的研制起到积极的作用。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishers, 1997.
- [2] Zou X Y, Zeng H, Zheng H, et al. Effect of coriaria lactone on calcium homeostasis in pyramidal neuron of hippocampus of rats [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 2002, 33(3): 379-380.
- [3] Zhang Y B, Li L, Liu H M, et al. Studies on the chemical constituents of *Coriaria sinica* Maxim. [J]. *J Zhengzhou Univ: Nat Sci* (郑州大学学报:自然科学版), 2005, 37(1): 75-77.
- [4] Zhang Y B, Wang K R, Liu H M, et al. Flavonoid glycosides from the leaves of *Coriaria sinica* Maxim. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(3): 341-343.
- [5] Wei H, Zeng F J, Lu M Y, et al. Studies on chemical constituents from the *Coriaria sinica* Maxim. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1998, 33(9): 688-692.
- [6] Zhang H H, Sun H D. Diterpenoids from *Rabdosia flexicaulis* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3534-3536.
- [7] Yang Y S, He L, Yang A M, et al. Studies on the chemical constituents of *Lagotis brachystachya* Maxim. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(2): 153-154.

使君子叶挥发油的化学成分分析

毕和平¹, 韩长日^{1*}, 梁振益², 王 媚¹, 钟琼芯³

(1. 海南师范大学 化学系, 海南海口 571158; 2. 海南大学分析测试中心, 海南海口 570228;

3. 海南师范大学 生物系, 海南海口 571158)

使君子 *Quisqualis indica* L. 始载于《南方草木状》, 以干燥成熟的果实入药, 性温、味甘, 具有杀虫

消积的功效, 主要用于蛔虫、蛲虫病, 虫积腹痛, 小儿疳积等症^[1]。使君子根、叶亦可供药用, 具有杀虫消

收稿日期: 2006-10-19

作者简介: 毕和平(1955—), 男, 教授, 主要从事天然药物化学研究。 E-mail: bhphx@hainnu.edu.cn

* 通讯作者 韩长日 E-mail: hchr@hainnu.edu.cn