

·研究简报·

中国粗榧枝叶提取物分离及其对反枝苋的除草活性

郝双红^{*}, 魏 艳, 张 景, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心,陕西 杨凌 712100)

摘要:以对杂草反枝苋种子萌发及根、茎生长的抑制作用为指标,提取、分离、鉴定了中国粗榧 Cephaelotaxus sinensis L i 枝叶中的除草活性成分。中国粗榧枝叶乙醇提取物的酸水溶液用苯萃取,萃余相碱化并用氯仿萃取得总生物碱。以硅胶及氧化铝柱层析从中国粗榧总生物碱中分离出了 3个生物碱类化合物 H₁、H₂ 和 H₃,其结构依次鉴定为桥氧三尖杉碱、三尖杉碱及 11羟基三尖杉碱。在 1.00 mg/mL 的供试浓度下, H₁ 对反枝苋种子根、茎生长的抑制率分别为 86.1% 和 82.4%, H₃ 对反枝苋种子根、茎生长的抑制率分别为 84.2% 和 77.1%, H₂ 除草作用较弱。测定结果表明,萃取所得总生物碱为中国粗榧的主要活性成分。

关键词:中国粗榧;桥氧三尖杉碱;三尖杉碱;11羟基三尖杉碱;除草活性

中图分类号:S482.4; O658 文献标识码:A 文章编号:1008-7303(2006)01-0091-04

Herbicidal Activity of Twig and Needle Extracts from Cephaelotaxus sinensis against Amaranthus retroflexus

HAO Shuang-hong^{*}, WEI Yan, ZHANG Jing, ZHANG Xing

(Research and Development Center of Bi rational Pesticides, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Herbicidal components of Cephaelotaxus sinensis against Amaranthus retroflexus were isolated by bioassay-guided separation. The main active components were alkaloids in chloroform partition derived from the ethanol extract. Drupacine, cephalotaxine and 11-hydroxycephalotaxine were isolated from the chloroform partition first by silica gel column chromatography (CC) and then by alum inum oxide CC respectively, and identified by IR, MS, ¹H NMR. The herbicidal activity of drupacine and 11-hydroxycephalotaxine were much higher than cephalotaxine. The inhibitory rates of drupacine and 11-hydroxycephalotaxine to the growth of root and stem of Amaranthus retroflexus were nearly or more than 80% at 1 mg/mL concentration.

Key words: Cephaelotaxus sinensis L i; drupacine; cephalotaxine; 11-hydroxycephalotaxine; herbicidal activity

中国粗榧 Cephaelotaxus sinensis L i 简称粗榧,为三尖杉科三尖杉属植物,为中国特有物种,广泛

分布于我国 14 个省区^[1,2]。20世纪 60 年代, Paudler^[3]、Powell^[4]等人首次从三尖杉属植物

收稿日期:2005-06-09;修回日期:2005-12-16。

作者简介:^{*}郝双红(1974-),男,通讯作者,陕西三原人,博士,讲师,主要从事生物源农药研究和开发。联系电话:029-87092122; Email: doublered74@sina.com

基金项目:西北农林科技大学青年专项基金;西北农林科技大学人才基金;国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A04)。

三尖杉和日本粗榧中分离出抗癌活性物质三尖杉酯碱。接着人们又对该属植物的化学成分、药用活性及活性化合物的合成等进行了大量的研究^[5,6]。该属植物在我国民间常被用作消积驱虫药,也有消炎润肺的功效。中国粗榧有一定杀虫活性,对粘虫具较强的拒食作用^[7],对松材线虫具有强的杀虫活性^[8]。三尖杉酯碱的衍生物对烟草花叶病毒也具有较强的钝化作用^[9]。笔者在对西北地区除草活性植物进行初筛时,发现中国粗榧对多种植物种子萌发及发芽后根、茎的生长有明显的抑制作用^[10],故对其除草活性做了进一步研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 植物材料

中国粗榧 *Cephaelotaxus sinensis* Li 枝叶, 2003年9月采自陕西秦岭, 经阴干、粉碎(过30目筛, 筛孔约0.49 mm)后, 置于-30℃冰箱中保存备用。反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 种子采自西北农林科技大学试验农场。

1.2 中国粗榧除草活性成分的提取分离和结构鉴定

1.2.1 活性成分的提取及萃取分离 中国粗榧枝叶粉碎样品用适量工业乙醇(纯度95%)室温浸提5次,每次7 d并时常搅拌,合并、过滤提取液,减压浓缩得总浸膏2.4 kg。总浸膏用10倍量(V/W)质量分数为5%的乙酸水溶液(pH=3)充分捏溶,抽滤后滤液用等体积苯萃取2次。萃余水相用氨水调至碱性(pH=9),再用等体积氯仿萃取3次,萃取液脱溶得140.9 g总生物碱C。

1.2.2 活性成分的柱层析分离 将氯仿萃取所得120.0 g总生物碱经硅胶柱层析,依次用氯仿、氯仿和甲醇的混合溶液(100:1、90:1、80:1……10:1, 体积比)进行梯度洗脱,等体积收集洗脱液。对收集液进行硅胶薄层层析检测(以体积比为11:1的氯仿和甲醇混合溶液作展开剂,显色剂用改良的碘化铋钾),合并R_f值相同的收集液并减压浓缩,得10个R_f值不同的馏分。生物测定结果表明,馏分C-3(得率8.2%)、C-5(得率10.5%)、C-10(得率14.8%)具有较强的除草活性。分别用中性氧化铝对上述3种馏分进行柱层析,以石油醚和氯仿的混合溶液、氯仿、氯仿和甲醇的混合

溶液进行梯度洗脱,得3个生物碱结晶,分别记作H₁(0.88 g)、H₂(0.62 g)和H₃(0.65 g),以微量除草活性测定方法分别测定其对反枝苋种子萌发及根、茎生长的抑制作用。

1.2.3 活性成分的结构鉴定 X6显微熔点测定仪(温度计未校正); Nicolet NEXUS 670 FT-IR(KBr压片法); HP 5988 MS; ZAB HS质谱仪(数据系统为MASPEC system); Bruker AM-300核磁共振仪。

1.3 微量除草活性测定方法

将2 cm×3 cm滤纸条垂直于长边折起0.5 cm,用微量进样器将50 μL梯度浓度药液均匀滴加在滤纸条面积较大部分(2 cm×2.5 cm)上,挥干溶剂。把滤纸条载药部位贴在载玻片(2.5 cm×7.5 cm)上,每片平行贴2条,间距1 cm,每药剂重复3次。将载玻片放入垫有两层滤纸的培养皿(直径9 cm)中,皿内加入5 mL蒸馏水,使滤纸条未受药部分与皿中湿滤纸充分接触。每滤纸条受药部分前端(距未受药部位较远端)播20粒大小一致的反枝苋种子。将培养皿倾斜15°(滤纸条吸水端向下)放入培养箱(28℃, 相对湿度90%, L/D=12 h/12 h)中培养, 72 h后统计各处理种子发芽率, 测量发芽种子根、茎长度。按照下式计算发芽及根茎生长抑制率:

$$\text{萌发抑制率} (\%) = \frac{\text{对照萌发数} - \text{处理萌发数}}{\text{对照萌发数}} \times 100$$

$$\text{生长抑制率} (\%) = \frac{\text{对照生长量} - \text{处理生长量}}{\text{对照生长量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 总生物碱及其柱层析馏分的除草活性

氯仿萃取的总生物碱及其柱层析馏分对反枝苋种子萌发及根茎生长的抑制作用测定结果见表1。从中可以看出,总生物碱具有较强的除草活性,在10 mg/mL的供试浓度下,可完全抑制反枝苋种子的萌发及根茎生长。在浓度为2 mg/mL时,总生物碱柱层析馏分C-3、C-5及C-10对反枝苋种子发芽后根、茎生长的抑制作用均显著高于其他各馏分,C-3及C-10对反枝苋种子萌发的抑制作用也显著高于相同浓度下其他各馏分。由此看来,总生物碱中除草活性较高的成分主要分布

于 C-3、C-5 及 C-10 3 个馏分中,这几部分的除草活性成分值得进一步分离。

2.2 三种生物碱的除草活性

从中国粗榧总生物碱中具较强除草活性的一级柱层析馏分 C-3、C-5 及 C-10 中,分离出 **H₁**、**H₂**、**H₃** 3 种生物碱单体,其除草活性测定结果见表 2。从中可以看出,在 1.00 mg/mL 的供试浓度

下, **H₁** 对反枝苋种子发芽后幼根及幼芽生长的抑制作用显著高于其他两种生物碱; 1.00 mg/mL 的 **H₃** 对反枝苋种子发芽后幼根及幼芽生长的抑制作用显著高于 **H₂**; **H₂** 对反枝苋种子萌发及根茎生长的抑制作用均较弱。3 种生物碱中, **H₁** 的除草活性最高, **H₃** 次之, **H₂** 活性最低。

Table 1 Herbicidal activity of total alkaloid and its subfractions separated by column chromatography against *A. retroflexus*

Fractions	Concentration / mg · mL ⁻¹	Inhibition rate ±SE (%)		
		Seed bourgeon	Taproot development	Caulis development
C	10	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a
	2	20.9 ±0.33 b	85.5 ±0.20 b	76.6 ±0.17 b
C-3	10	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a
	2	33.3 ±2.52 c	80.9 ±0.42 b	72.7 ±0.41 b
C-5	10	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a	100.0 ±0.00 a
	2	8.33 ±1.45 d	76.9 ±0.28 c	71.3 ±0.23 b
C-6	10	83.3 ±0.67 b	98.9 ±0.06 a	95.9 ±0.13 a
	2	30.6 ±0.33 c	63.7 ±0.84 c	46.4 ±0.63 c
C-10	10	47.2 ±1.20 b	93.5 ±0.21 a	89.4 ±0.22 a
	2	19.4 ±0.88 c	66.8 ±0.64 c	51.2 ±0.59 c

Note: C and C-3 to C-10 means the total alkaloids and the 3rd to 10th subfractions. Values within the same column followed by same letter are not significantly difference at P_{0.05} level, the same as in table 2.

Table 2 Herbicidal activity of three alkaloids from *C. sinensis* against *A. retroflexus*

Compounds	Concentration / mg · mL ⁻¹	Inhibition rate ±SE (%)		
		Seed bourgeon	Taproot development	Caulis development
H₁	1.00	24.2 ±0.14 c	86.1 ±0.29 a	82.4 ±0.35 a
	0.33	12.1 ±0.07 e	73.0 ±0.58 c	27.4 ±0.23 c
H₂	1.00	19.7 ±0.40 d	33.4 ±0.25 d	10.6 ±0.35 d
	0.33	19.7 ±0.46 d	25.8 ±0.45 e	0.50 ±0.01 e
H₃	1.00	63.3 ±0.47 a	84.3 ±0.42 b	77.1 ±0.57 b
	0.33	30.6 ±0.35 b	10.2 ±0.09 f	0.00 ±0.00 e

2.3 三种生物碱的结构鉴定

H₁、**H₂** 及 **H₃** 的物理性质及 MS、¹H NMR、IR 值见表 3。从中可以看出, **H₁** 的测定数据与文献 [11, 12] 报道一致, 故鉴定为桥氧三尖杉碱; **H₂** 的数据与文献 [11~14] 报道一致, 故鉴定为三尖杉碱; **H₃** 的测定数据与文献 [11, 15] 报道一致, 故鉴定为 11 羟基三尖杉碱。3 种生物碱的结构见图 1。

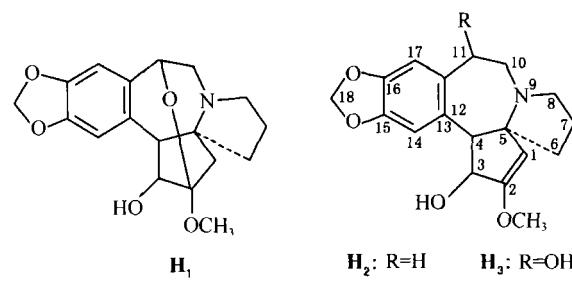


Fig. 1 Chemical structures of **H₁**, **H₂** and **H₃**

Table 3 Physical, MS, IR and ^1H NMR data of \mathbf{H}_1 , \mathbf{H}_2 and \mathbf{H}_3

Compd	Appearance	Mp (Ref data) /	MS, m/z	IR, ν/cm^{-1}	^1H NMR,
\mathbf{H}_1	White needle crystle	70 ~ 73 (72 ~ 73)	331 (M^+ , base peak), 314, 300, 272, 242, 228, 214, 190, 161, 154, 142, 141, 138, 131, 124, 110, 96, 83	3 526, 3 433, 1 626, 1 487, 1 059, 942	1. 45 (d, 1H, $J = 12 \text{ Hz}$, $\text{C}_1\text{-H}$), 2. 67 (d, 1H, $J = 12 \text{ Hz}$, $\text{C}_1\text{-H}$), 3. 02 ~ 3. 14 (m, 2H, $\text{C}_{10}\text{-H}$), 3. 44 (d, 1H, $J = 9 \text{ Hz}$, $\text{C}_4\text{-H}$), 3. 48 (s, 3H, CH_3OC), 4. 03 (d, 1H, $J = 9 \text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}$), 4. 88 (q, 1H, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 5. 94 (s, 2H, OCH_2O), 6. 65 (s, 1H, $\text{C}_{14}\text{-H}$), 6. 66 (s, 1H, $\text{C}_{17}\text{-H}$)
\mathbf{H}_2	White column crystle	135 ~ 136 (136. 0 ~ 137. 5)	315 (M^+ , base peak), 314, 300, 298, 284, 272, 254, 214, 166, 150, 137	3 227, 1 648, 1 503, 1 486, 1 037, 933	3. 65 (d, 1H, $J = 9 \text{ Hz}$, $\text{C}_4\text{-H}$), 3. 72 (s, 3H, CH_3OC), 4. 74 (d, 1H, $J = 9 \text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}$), 4. 92 (s, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 5. 89 (s, 2H, OCH_2O), 6. 64 (s, 1H, $\text{C}_{14}\text{-H}$), 6. 67 (s, 1H, $\text{C}_{17}\text{-H}$)
\mathbf{H}_3	White column crystle	235 ~ 240 (240 ~ 250)	331 (M^+ , base peak), 314 (base peak), 313, 300, 298, 289, 270	3 197, 1 645, 1 504, 1 456, 1 097, 1 029, 924	3. 28 ~ 3. 35 (m, 2H, $\text{C}_{10}\text{-H}$), 3. 48 (d, 1H, $J = 8 \text{ Hz}$, $\text{C}_4\text{-H}$), 3. 73 (s, 3H, CH_3OC), 4. 48 (d, 1H, $J = 8 \text{ Hz}$, $\text{C}_3\text{-H}$), 4. 64 (s, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 4. 79 (t, 1H, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 5. 93 (s, 2H, OCH_2O), 6. 63 (s, 1H, $\text{C}_{14}\text{-H}$), 6. 88 (s, 1H, $\text{C}_{17}\text{-H}$)

参考文献:

- [1] GUO Wen-jie(郭文杰), LU Xue-hua(鲁雪华), LIN Yong(林勇). 三尖杉的资源利用与开发 [J]. *Sabtrop Plant Res Commun*(亚热带植物通讯), 1998, 27 (1): 23-26.
- [2] ZHOU Xiu-jia(周秀佳), HU Zhi-bi(胡之璧), HUANG Jian-dong(黄炼栋), et al 中国三尖杉属植物资源研究 [J]. *J Hubei Agric College*(湖北农学院学报), 1997, 17 (2): 100-103.
- [3] Paudler W W, Kerley G I, Mackay J. Alkaloids of *Cephaelotaxus drupacea* and *Cephaelotaxus fortunei* [J]. *J Org Chem*, 1963, 28 (9): 2194-2197.
- [4] Powell R G, Weisleder C R, Smith C R. Structure of *Cephaelotaxus* and related alkaloids [J]. *Tetrahedron Lett*, 1969, (46): 4081-4086.
- [5] WU Cheng-wei(吴承卫). 三尖杉及其生物碱类成分的研究进展 [J]. *Foreign Medical Sciences: M Section*(国外医学药学分册), 1993, 20 (6): 321-325.
- [6] CAI Zhong-jun(蔡仲军). 三尖杉碱全合成研究的新进展 [J]. *Chin J Org Chem*(有机化学), 1991, (6): 573-582.
- [7] ZHANG Xing(张兴), YANG Chong-zhen(杨崇珍), WANG Xing-lin(王兴林). 西北地区杀虫植物的筛选 [J]. *Acta Univ Agric Boreali-occidentalis*(西北农业大学学报), 1999, 27 (2): 21-27.
- [8] WEN Yan-hua(文艳华), FENG Zhi-xin(冯志新), XU Han-hong(徐汉虹), et al 植物抽提物对几种植物病原线虫的杀虫活性筛选 [J]. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), 2001, 20 (3): 235-238.
- [9] XIN Yu-cheng(辛玉成), QIN Shu-lian(秦淑莲), WANG Yuan-qing(王元庆), et al 三尖杉酯碱合成物质对烟草花叶病毒的作用效果初报 [J]. *J Laiyang Agric College*(莱阳农学院学报), 1998, 15 (3): 205-207.
- [10] HAO Shuang-hong(郝双红), ZHANG Bo(张勃), SONG Wei(宋卫), et al 西北地区 67 种植物化感作用研究简报 [A]. *Proceedings of the 8th National Teaching & Research Symposium in Pesticide Science*(第八届全国农药学科教学科研研讨会会议论文集) [C]. Shaanxi Yangling(陕西杨凌), 2004. 295-299.
- [11] REN Li-juan(任丽娟), XUE Zhi(薛智). 中国粗榧抗肿瘤有效成分的研究 [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 1981, 12 (6): 241-244.
- [12] Institute of Materie Medica(中国医学科学院), Chinese Academy of Medical Sciences(中国人民解放军第一七八医院). 海南粗榧抗肿瘤有效成分的研究 [J]. *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1976, 34 (4): 283-293.
- [13] MA Guang-en(马广恩), LIN Long-ze(林隆泽), ZHAO Zhi-yuan(赵志远), et al 三尖杉属植物中生物碱的研究——三尖杉中抗癌有效成分的分离和鉴定及新生物碱 (+) 乙酰三尖杉碱 [J]. *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1977, 35 (3, 4): 201-208.
- [14] XING Yuan-qing(刑远清), ZHENG Min(郑敏), JIN Qi-ting(金奇庭). 秦岭产三尖杉中抗癌成分的分离和鉴定 [J]. *J Xi'an Univ Arch & Tech*(西安建筑科技大学学报), 1995, 27 (2): 215-217, 221.
- [15] MA Guang-en(马广恩), LIN Long-ze(林隆泽), ZHAO Zhi-yuan(赵志远), et al 三尖杉属植物中生物碱的研究——三尖杉 (*Cephaelotaxus fortunei* Hook f.) 中的四种微量生物碱的分离和鉴定及福建三尖杉碱的化学结构 [J]. *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1978, 36 (2): 129-136.

(Ed. TANG J)