

文章编号: 1001- 411X (2001) 03- 0020- 03

国产印楝种子中印楝素的结构鉴定

徐汉虹¹, 何道航¹, 魏孝义², 张志祥¹

(1 华南 农业大学昆虫 毒理研究室, 广东 广州 510642; 2 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510648)

摘要: 采用硅胶柱层析法从国产印楝(*Azadirachta indica* A. Juss)种子中分离得到化合物 FI₅, 经波谱分析确定其结构为印楝素. 并验证了印楝素的拒食活性.

关键词: 印楝; 印楝素; 结构鉴定; 拒食性活性
中图分类号: S482. 39 文献标识码: A

印楝(*Azadirachta indica* A. Juss)为楝科楝属杀虫植物, 在亚洲南部、非洲及大洋洲广为分布. 国内印楝栽培始于 80 年代初, 迄今已在海南省、四川省和云南省大面积引种并获得成功^[1-3]. 印楝中含有多种对害虫有拒食活性及生长发育抑制作用的四环三萜类化合物, 其中以印楝素(azadirachtin)最为著名. 目前, 关于国产印楝中印楝素的生物活性测定、作用机理及组织培养等方面研究已有报道^[3-9], 但对其结构鉴定迄今鲜有报道. 笔者从我国印楝种子的提取物中分离得到一种具有拒食、抑制生长发育活性的成分(代号为 FI₅), 依靠高分辨质谱和核磁共振等推定其化学结构为印楝素, 现将结果报道如下.

1 FI₅ 的结构鉴定

1.1 波谱数据及推理

FI₅ 为白色无定形粉末, 易溶于甲醇、丙酮, 难溶于水.

UV 显示: FI₅ 在 217 nm 有最大吸收.

红外光谱给出了羟基(3 440 cm⁻¹)、酯基(1 741 cm⁻¹、1 250 cm⁻¹)和碳碳双键(1 648 cm⁻¹、1 619 cm⁻¹)的吸收带.

EI-MS 显示 FI₅ 的相对分子质量为 720, m/e 峰有 703、685 等特征峰, 代表分子离子连续 2 次失去水分子碎片的离子峰.

¹³C-NMR 谱及 DEPT 显示有 35 个碳原子, 其中 6 个甲基碳、5 个亚甲基碳、11 个次甲基碳和 13 个季碳. ¹³C-NMR 谱中 δ 71. 8 (s)、128. 6 (s)、137. 6 (d)、14. 3 (q)、11. 9 (q) 及 ¹H-NMR 谱中烯键质子讯号 δ . 90 (1H, m)、甲基质子讯号 δ . 75 (3H, s) 和 δ . 83 (3H, s), 结合 UV 在 217 nm 有最大吸收, 说明分子中有一甲基巴豆酰氧基; ¹³C-NMR 谱中 δ 2. 7 (q)、 δ 3. 4 (q)

讯号及 ¹H-NMR 谱中 δ . 77 (3H, s)、 δ . 66 (3H, s) 质子讯号说明有 2 个甲氧基, 联系 ¹³C-NMR 谱中 δ 66. 2 (s) 和 δ 69. 7 (s) 2 个羰基碳讯号, 提示分子中有 2 个甲基酯; ¹³C-NMR 谱中 δ 1. 3 (q)、173. 3 (s) 及 ¹H-NMR 谱中 δ . 92 (3H, s), 说明有 1 个乙酰氧基; ¹H-NMR 谱中 δ . 01 (1H, s)、 δ . 62 (1H, s) 及 ¹³C-NMR 谱中 δ 08. 8 (d)、 δ 47. 1 (d) 显示有 1 个乙烯氧基, 说明分子中有 1 个二氢呋喃环结构; ¹³C-NMR 谱中 δ 04. 2 (s) 和 δ 07. 4 (s) 说明分子中有 2 个缩醛或缩酮结构. FI₅ 的 ¹³C-NMR 谱和 ¹H-NMR 谱的数据归属分别见表 1、表 2, 与文献^[6]报道一致.

表 1 FI₅ 的 ¹³C-NMR 谱数据

Tab 1 ¹³C-NMR chemical shifts of FI₅

C 序号	化学位移	C 序号	化学位移
carbon	chemical shift	carbon	chemical shift
1	70. 5 (d)	19	69. 1 (t)
2	29. 8 (t)	20	83. 6 (s)
3	67. 0 (d)	21	107. 4 (s)
4	45. 4 (s)	22	108. 8 (d)
5	37. 0 (d)	23	147. 1 (d)
6	74. 4 (d)	28	73. 0 (t)
7	76. 4 (d)	29	166. 2 (s)
8	50. 2 (s)	30	18. 4 (t)
9	44. 7 (d)	3- C=O	173. 3 (s)
10	52. 5 (s)	CH ₃	21. 3 (q)
11	104. 2 (s)	29- OCH ₃	52. 7 (q)
12	169. 7 (s)	12- OCH ₃	53. 3 (q)
13	69. 9 (s)	O-Tig	
14	69. 1 (s)	1'	171. 8 (s)
15	73. 8 (d)	2'	128. 6 (d)
16	25. 0 (t)	3'	137. 6 (d)
17	48. 7 (d)	4'	14. 3 (q)
18	20. 9 (q)	5'	11. 9 (q)

表 2 FI₅ 的 ¹H-NMR 谱数据

Tab. 2 ¹H-NMR data of FI₅

质子 proton	¹ H-NMR 谱数据 ¹ H-NMR data	质子 proton	¹ H-NMR 谱数据 ¹ H-NMR data
H-1	4.74(1H, br. s)	H-19 β	4.13(1H, d, J=9.6 Hz)
H-2 α	2.21(1H, br. d, J=16.4 Hz)	H-21	5.62(1H, s)
H-2 β	2.21(1H, br. d, J=16.4 Hz)	H-22	5.01(1H, br. s)
H-3	5.48(1H, br. s)	H-23	6.43(1H, br. s)
H-3'	6.90(1H, m,)	H-28 α	3.74(1H, d, J=9.2 Hz)
H-5	3.33(1H, d, J=12.4 Hz)	H-28 β	4.05(1H, d, J=8.8 Hz)
H-6	4.57(1H, br. d, J=12.5 Hz)	Ac	1.92(3H, s)
H-7	4.72(1H, br. s)	COOCH ₃	3.77(3H, s)
H-9	3.31(1H, br. s)	COOCH ₃	3.66(3H, s)
H-15	4.64(1H, br. s)	4'-Me	1.75(3H, d, J=7.2 Hz)
H-16 α	1.65(1H, overlq)	5'-Me	1.83(3H, s)
H-6 β	1.29(1H, br. d, J=13.2 Hz)	18-Me	1.98(3H, s)
H-17	2.35(1H, d, J=5.2 Hz)	30-Me	1.72(3H, s)
H-19 α	3.60(1H, d, J=9.6 Hz)		

1.2 不同展开剂的展开情况

以混合液(甲醇:丙酮:氯仿)为展开剂, 将印楝素和 FI₅ 分别受以体积比 20:3:1、20:2:1 和 10:1:1 三种展开系统, 发现它们的 R_f 值分别为 0.84、0.79 和 0.72, 再以高效板展开, FI₅ 与印楝素亦无差异. 从而可以进一步确定, 从国产印楝种子分离出的化合物为印楝素, 其结构如图 1.

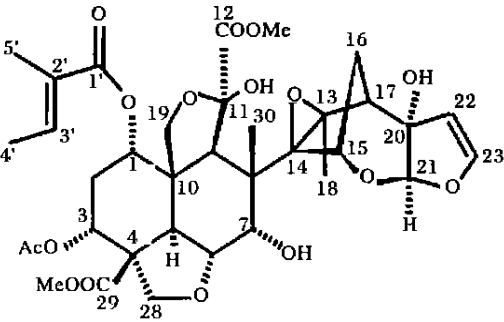


图 1 印楝素化学结构图
Fig. 1 Chemical structure of azadirachtin

2 试验部分

2.1 试验仪器、材料和样品

印楝种子采自云南省元江县(印楝树于 1995 年自缅甸引种栽培), 由中国林科院云南资源昆虫研究所赖永祺研究员采集. 紫外光谱用 Beckman DU-600 型仪测定; IR 用 Analect RFX-65A 型仪测定, KBr 压片; NMR 用 Bruker DRX-400 超导型核磁共振仪测定, 以 CDCl₃ 为溶剂, TMS 为内标; MS 用 Finnigan-4510 型仪测定. 柱层析和薄层层析用硅胶为青岛海洋化工厂产品. 展开剂中甲醇、氯仿、丙酮均为分析

纯; 显色剂为 $\varphi=5\%$ 硫酸乙醇溶液. $\varphi=95\%$ 印楝素为美国 Sigma 公司提供; $\varphi=90\%$ 川楝素为四川宜宾红光制药厂生产. 菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 幼虫在温室 [温度 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 75%~82%, 12 h 光照/12 h 黑暗] 条件下饲养, 取大小整齐一致的 5 龄前期幼虫供试.

2.2 提取与分离

称取印楝种子 2.5 kg, 粉碎, 石油醚脱脂, 然后用体积比为 85% 甲醇于室温下浸提 48 h, 共 3 次. 减压浓缩后得水层物. 加乙酸乙酯萃取 3 次, 萃取物经硅胶柱层析, 依次用氯仿-甲醇梯度洗脱, 每 200 mL 收集一流分, 在氯仿-甲醇 (V:V=93:7) 处接收到一个浅黄色流分. 该流分浓缩物再经硅胶低压柱层析, 甲醇-水 (V:V=50:50) 等度洗脱, 收集流分经薄层层析检测, 得一白色粉末状化合物 FI₅.

2.3 拒食活性测定

叶碟饲喂法测定 5 龄菜粉蝶幼虫的拒食作用. 取 d=9 cm 的培养皿, 内垫 1 张滤纸, 用少许蒸馏水湿润. 将新鲜菜心叶片用 d=2 cm 的打孔器打成叶碟. 待测样品用丙酮溶解, 浸叶 2 d, 取出让溶剂挥发干. 然后放入培养皿中. 每个培养皿放 4 片, 丙酮对照放 6 片. 接入 1 头已饥饿 5 h 的 5 龄菜粉蝶幼虫. 每处理 10 个重复, 记录 24、48 h 后的取食叶面积, 按下面公式计算拒食率.

非选择性拒食率 = (对照组取食叶面积 - 处理后取食叶面积) / 对照组取食叶面积 $\times$ 100%.

FI₅ 对菜粉蝶幼虫的拒食作用测定结果见表 3.

由表 3 可知, 在 $\rho=60$ mg $\cdot$ L⁻¹ 相同处理浓度下, FI₅ 和印楝素对 5 龄菜粉蝶幼虫的拒食活性都优于川楝素 (toosendanin), 二者 24、48 h 的非选择性拒食

率分别为 82.45%、83.58% 和 90.05%、91.96%。生物活性测定结果显示 FI₅ 和印楝素是相似的。

表 3 FI₅ 对 5 龄菜粉蝶幼虫的拒食作用
Tab. 3 Antifeedant effects FI₅ against the 5th larvae of *P. rapae*

样品 sample	ρ / (mg·L ⁻¹)	拒食率 antifeedant rate/ %	
		24 h	48 h
FI ₅	15	12.44	20.17
	30	23.31	59.27
	60	82.45	90.05
印楝素 azadirachtin	60	83.58	91.96
川楝素 toosendanin	60	63.34	82.28

参考文献:

[1] 赵善欢, 张业光, 蔡德智, 等. 印楝引种试验初报[J]. 华南农业大学学报, 1989, 10(2): 34—39.
[2] 张 兴, 赵善欢. 国产印楝树皮中印楝素测试初报[J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(4): 91—94.
[3] 徐汉虹, 万树青, 荣晓东. 野生植物资源与生物合理性农药[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(4): 1—6
[4] 张业光, 张 兴, 赵善欢. 引种印楝国产种子的印楝素含量及杀虫活性初步研究[J]. 华南农业大学学报, 1992, 13(1): 14—19.
[5] 黄光斗, 曾鑫年, 钱 辉, 等. 印楝叶组织培养繁殖研究[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(3): 129—130.
[6] JACOBSON M. Focus on phytochemical pesticides volume 1 [M]. Florida: CRC Press 1989. 21—29.

Structural Identification of Azadirachtin from the Seeds of Introduced *Azadirachta indica* A. Juss Planted in China

XU Han-hong¹, HE Dao-hang¹, WEI Xiao-yi², ZHANG Zhi-xiang¹
(1 Lab. of Insect Toxicology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences Guangzhou 510648 China)

Abstract:The substance FI₅ was isolated from the seeds of introduced neem trees (*Azadirachta indica* A. Juss) planted in China by open column chromatography on silica gel. On the basis of spectroscopic analysis its structure was identified as azadirachtin. The result of no-choice antifeedant experiment against the larvae of *Pieris rapae* showed that it had the most potential antifeedant activity.

Key words: *Azadirachta indica*; azadirachtin; structural identification; antifeedant activity

【责任编辑 周志红】