

22, 23-二氢印楝素 A 的制备、结构鉴定及生物活性

张志祥¹, 程东美², 徐汉虹¹, 吴毓林³, 尹标林³, 杨晓云¹

(1 农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642;

2 仲恺农业技术学院 植保系, 广东 广州 510225; 3 中国科学院 上海有机化学生命科学研究, 上海 200032)

摘要: 以印楝素 A 为原料, 采用氢化加成反应合成了 22, 23-二氢印楝素 A, 用核磁共振氢谱对其结构进行鉴定, 采用浸叶法测定了 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾 *Plutella xylostella*、棉铃虫 *Heliothis armigera* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的拒食活性。结果表明: 处理后 24 和 48 h, 22, 23-二氢印楝素 A 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫 AFC₅₀ 值为 6.55 和 12.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理后 48 h, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾 3 龄幼虫的拒食率为 80.29%, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 22, 23-二氢印楝素 A 对棉铃虫 3 龄幼虫的拒食率为 81.16%。

关键词: 22, 23-二氢印楝素 A; 结构鉴定; 拒食活性

中图分类号: S482.39

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0111-03

Preparation, structural identification and bioactivity of 22, 23-dihydroazadirachtin A

ZHANG Zhi-xiang¹, CHENG Dong-mei², XU Han-hong¹, WU Yu-lin³, YIN Biao-lin³, YANG Xiao-yun¹

(1 Key Lab of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Lab of Insect Toxicology, South China Agric. Univ.,

Guangzhou 510642, China; 2 Plant Protection Department, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China;

3 Shanghai Institute of Organic Chemistry and Life Sciences, Chinese Academy of Sciences Shanghai 200032, China)

Abstract: 22, 23-dihydroazadirachtin A was synthesized with hydrogenation reaction, and azadirachtin A was the original material. The structure of 22, 23-dihydroazadirachtin A was determined with ¹H NMR. Antifeedant activity of 22, 23-dihydroazadirachtin A against larvae of *Spodoptera litura*, *Plutella xylostella* and *Heliothis armigera* was assayed. The results showed that the AFC₅₀ of 22, 23-dihydroazadirachtin A against 3rd instar larvae of *Spodoptera litura* were 6.55 and 12.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 and 48 h treatment respectively. After 48 h treatment, the antifeedant level of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 22, 23-dihydroazadirachtin A against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* was 80.29%, and that of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 22, 23-dihydroazadirachtin A against 3rd instar larvae of *Heliothis armigera* was 81.16%.

Key words: 22, 23-dihydroazadirachtin A; identification; antifeedant activity

印楝 *Azadirachta indica* 是楝科楝属乔木, 原产于印度次大陆, 具有杀虫、杀菌和杀线虫等多种生物活性^[1]。印楝杀虫剂是当今世界公认的最优秀的生物农药之一, 其国际影响与市场空间日益扩大^[2]。1980~2002 年, 在德国、肯尼亚、印度、澳大利亚和加拿大召开了 7 次国际印楝大会^[3]。目前, 世界上有 40 多种印楝杀虫制剂。印楝素 A (azadirachtin A) 是印楝中的主要杀虫活性物质^[4]。由于含有 3 个双键、4 个酯

键, 印楝素较易水解和光解, 为了研究更稳定的印楝素衍生物及双键对印楝素生物活性的影响, 本文通过控制反应条件, 对印楝素 A 的 C₂₂~₂₃ 位的双键进行了氢化加成反应, 并对反应产物进行了生物活性测定。

1 材料与方法

1.1 供试材料与供试昆虫

印楝素 A: w(印楝素 A)=96.8%, 华南农业大学

收稿日期: 2004-04-16

作者简介: 张志祥(1974-), 男, 讲师, 博士。通讯作者: 徐汉虹(1961-), 男, 教授, 博士;

E-mail: hhxu@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20377015)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

昆虫毒理研究室自制。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*: 从广州市郊的芋头叶、芥蓝叶或花椰菜上采集斜纹夜蛾卵块, 低龄虫以芋头叶饲养, 高龄虫以木薯叶饲养。

小菜蛾 *Plutella xylostella*: 从华南农业大学试验农场的芥蓝或甘蓝上采回小菜蛾的蛹, 放入养虫室内的纱笼中, 放入 $\varphi=10\%$ 的蜂蜜。在装有珍珠岩的瓷盘 (30 cm×20 cm×5 cm) 中播菜心种子, 苗长至约 3 cm 高时, 放入笼中供小菜蛾成虫产卵, 24 或 48 h 后取出。

棉铃虫 *Heliothis amigera*: 中山大学何道航博士提供, 室内用人工饲料饲养。

1.2 试验方法

1.2.1 印楝素 A 氢化加成反应 144 mg 印楝素 A 溶于 10 mL 乙酸乙酯中, 加入 20 mg 钯碳, 室温下向液面常压加氢, 磁力搅拌 12 h 后, 停止加氢, 滤除钯碳, 浓缩滤液。硅胶柱层析 (硅胶 H, 200~300 目) 分离出产物, 流动相: $V(\text{石油醚}) : V(\text{丙酮}) = 20 : 1$ 。22, 23-二氢印楝素 A 为反应产物之一。

1.2.2 拒食活性测定 参考吴文君方法^[5]。选取洁净的甘蓝叶片 (小菜蛾和斜纹夜蛾幼虫用) 或烟草 (棉铃虫幼虫用) 叶片, 用打孔器 (内径 $d=19$ mm) 打出叶碟, 将叶碟在供试药液中浸 2 s 后取出, 放在洁净的台面上自然晾干, 然后将叶碟置于垫有保湿滤纸的培养皿中, 每皿 3 片叶, 每皿 1 头虫, 每个浓度 10 个重复。处理完毕后, 将培养皿置于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 养虫室中, 24 和 48 h 后用叶面积测定仪调查取食情况。

拒食率 = $[(\text{对照取食叶面积} - \text{处理取食叶面积}) \div \text{对照取食叶面积}] \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 加成产物结构鉴定

由于反应目标比较明确, 所得产物只能是印楝素氢化加成产物中的一种, 因此, 采用核磁共振 H 谱同时对原料印楝素 A 和反应产物进行了对比分析,

从而对反应产物进行了结构鉴定。

反应产物核磁共振 H 谱数据及归属见表 1。通过与印楝素 A 核磁共振 H 谱及 John 等^[6] 和 Kraus 等^[7] 报道印楝素 A 核磁共振 H 谱数据相比较、分析, 确定产物 22, 23-二氢印楝素 A 的结构:

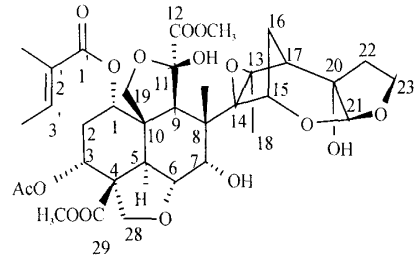


表 1 22, 23-二氢印楝素 A 的 ¹H NMR 数据
Tab. 1 ¹H NMR data of 22, 23-dihydroazadirachtin A

质子 proton	δ	质子 proton	δ
H-1	4.74 dd (2.7, 2.7)	H-19 α	3.64 d (9.9)
H-2 α	2.28 m	H-19 β	4.14 d (9.9)
H-2 β	2.00 m	H-21	5.31 s
H-3	5.49 t	H-22	2.0~2.3 m
H-5	3.34 d (12.6)	H-23	3.91 m, 4.04 m
H-6	4.57 dd (12.3, 2.4)	H-28	3.74 d (9.3), 4.07 d (8.7)
H-7	4.69 d (2.1)	H-30	1.74 s
H-9	3.19 s	OCH ₃	3.78 s
H-15	4.66 d (3.3)		3.67 s
H-16 α	1.70 m	3'	6.92 m
H-16 β	1.50 d (12.6)	4'	1.79 dd (7.2, 1.5)
H-17	2.47 d (5.1)	5'	1.86 br s
H-18	2.03 s	CH ₃ CO	1.95 s

2.2 22, 23-二氢印楝素 A 拒食活性测定

2.2.1 22, 23-二氢印楝素 A 对斜纹夜蛾幼虫拒食活性测定 以印楝素 A 为对照, 测定了 22, 23-二氢印楝素 A 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性, 结果见表 2。

表 2 22, 23-二氢印楝素 A 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫拒食活性测定

Tab. 2 Antifeedant activity of 22, 23-dihydroazadirachtin A against 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

处理 treatment	t/h	毒力回归方程 antifeedant activity regress equation	AFC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	95% 置信限 limits distance	相关系数 correlation coefficient
22, 23-二氢印楝素 A	24	$Y = 3.9647 + 1.2682x$	6.55	4.87~8.82	0.9894
22, 23-dihydroazadirachtin A					
印楝素 A azadirachtin A	24	$Y = 5.0690 + 1.1777x$	0.87	0.51~1.50	0.9881
22, 23-二氢印楝素 A	48	$Y = 3.3000 + 1.5447x$	12.61	10.49~15.14	0.9890
22, 23-dihydroazadirachtin A					
印楝素 A azadirachtin A	48	$Y = 4.8720 + 0.4967x$	1.81	0.86~3.83	0.9918

从表 2 可以看出, 处理后 24 h, 22, 23-二氢印楝素 A 和印楝素 A 均对斜纹夜蛾 3 龄幼虫具有较好的拒食活性, AFC_{50} 分别为 6.55 和 0.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AFC_{50} 95% 置信区间分别为 4.87 ~ 8.82 和 0.51 ~ 1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 处理后 48 h, AFC_{50} 分别为 12.61 和 1.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AFC_{50} 95% 置信区间分别为 10.49 ~ 15.14 和

0.86 ~ 3.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 印楝素 A 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性明显高于 22, 23-二氢印楝素 A.

2.2.2 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾和棉铃虫 3 龄幼虫拒食活性测定 以印楝素 A 作药剂对照, 测定 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾和棉铃虫 3 龄幼虫的拒食活性, 结果见表 3.

表 3 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾和棉铃虫 3 龄幼虫的拒食活性测定¹⁾

Tab. 3 Antifeedant activity of 22, 23-dihydroazadirachtin A against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* and *Heliothis armigera* (48 h)

处理 treatment	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	
		(平均取食面积 ¹⁾ ave. leaf eaten \pm SE) / mm^2	拒食率 antifeedant rate / %
对照 control	0	66.04 \pm 3.94 a	
印楝素 A azadirachtin A	3	10.85 \pm 3.02 b	83.57
22, 23-二氢印楝素 A 22, 23-dihydroazadirachtin A	3	13.02 \pm 3.10 b	80.29
处理 treatment	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	棉铃虫 <i>H. armigera</i>	
		(平均取食面积 ¹⁾ ave. leaf eaten \pm SE) / mm^2	拒食率 antifeedant rate / %
对照 control	0	312.59 \pm 49.07 a	
印楝素 A azadirachtin A	5	43.98 \pm 17.11 b	85.93
22, 23-二氢印楝素 A 22, 23-dihydroazadirachtin A	5	58.90 \pm 9.88 b	81.16

1) 同列数据后字母相同者, 表示在 5% 水平上差异不显著 (DMRT)

从表 3 中可以看出, 在试验浓度下, 印楝素 A 和 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾和棉铃虫 3 龄幼虫均具有较好的拒食活性, 处理后 48 h, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 印楝素 A 和 22, 23-二氢印楝素 A 对小菜蛾 3 龄幼虫的拒食率分别为 83.57% 和 80.29%; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 印楝素 A 和 22, 23-二氢印楝素 A 对棉铃虫 3 龄幼虫的拒食率分别为 85.93% 和 81.16%。方差分析表明, 在相同质量浓度下, 印楝素 A 对棉铃虫和小菜蛾 3 龄幼虫的拒食活性与 22, 23-二氢印楝素 A 相当。

3 讨论

22, 23-二氢印楝素 A 是印楝素 A 的 $C_{22}\sim_{23}$ 位双键氢化加成产物, 对小菜蛾、斜纹夜蛾和棉铃虫幼虫均具有较好的拒食活性, 在相同浓度下, 22, 23-二氢印楝素 A 对棉铃虫和小菜蛾 3 龄幼虫的拒食活性与印楝素 A 相当, 22, 23-二氢印楝素 A 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性明显低于印楝素 A。这表明, $C_{22}\sim_{23}$ 位上的双键对印楝素 A 的活性有一定的影响, 双键在一定程度上提高了印楝素 A 的拒食活性, 将 $C_{22}\sim_{23}$ 氢化加成后, 并没有使印楝素 A 的拒食活性发生质的变化。

双键是印楝素 A 的主要光不稳定因素, 将印楝

素 $C_{22}\sim_{23}$ 双键氢化加成, 有助于提高印楝素 A 的稳定性, 对延长印楝素在农田系统的持效期有一定的指导意义。

参考文献:

[1] 张志祥, 程东美, 徐汉虹, 等. 印楝杀虫剂防治蝗虫的应用前景[J]. 农药科学与管理, 2004, 26(7): 8-13.
 [2] 徐汉虹, 张志祥, 查友贵. 中国植物性农药开发前景[J]. 农药, 2003, 43(3): 1-9.
 [3] 张志祥, 程东美, 田永清, 等. 印楝、印楝杀虫剂与生态环境[J]. 科技导报, 2004, 2: 56-59.
 [4] SCHMUTTERER H. Properties and potential of natural pesticides from neem trees, *Azadirachta indica* [J]. Annual Review of Entomology, 1990, 35: 271-297.
 [5] 吴文君. 昆虫拒食剂的生物测定方法[J]. 昆虫知识, 1988, 25(6): 365-367.
 [6] JOHN N B, HOWARD B B, PHILIP S J, et al. An X-ray crystallographic mass spectroscopic and NMR study of the limonoid antifeedant azadirachtin and related derivatives [J]. Tetrahedron, 1987, 43(12): 2805-2815.
 [7] KRAUS W. Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) [J]. Tetrahedron, 1987, 43(12): 2817-2830.

【责任编辑 李晓丹】