

黄皮种子中杀松材线虫成分分离及活性测定

马伏宁, 万树青, 刘序铭, 赵 凤

(天然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)

摘要:采用药液浸渍法测定了黄皮 *Clausena lansium* 不同部位甲醇提取物对松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的生物活性,在活性跟踪的基础上,通过萃取、柱层析、薄层制备、重结晶、核磁共振等方法对其有效成分进行了分离和结构鉴定. 结果表明,黄皮不同部位甲醇提取物中种子提取物对松材线虫的毒杀活性最高,在 1 mg/mL 水溶液中处理 72 h 的校正死亡率为 100%. 各萃取相中石油醚相的活性最高,从石油醚相中分离、纯化获得一黄色晶体,经核磁共振检测分析为 Lansiumamide B (*N*-甲基-*N*-顺-苯乙烯-肉桂酰胺). 该化合物处理松材线虫 24、48、72 h 的 LC_{50} 值分别为 8.38、6.36、5.38 mg/L,表明该化合物是黄皮种子中主要杀松材线虫活性成分.

关键词:松材线虫; 黄皮; *N*-甲基-*N*-顺-苯乙烯-肉桂酰胺

中图分类号:S482.3

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)01-0023-04

Active Ingredients of Seed Extracts of *Clausena lansium* and Nematocidal Activity Against *Bursaphelenchus xylophilus*

MA Fu-ning, WAN Shu-qing, LIU Xu-ming, ZHAO Feng

(Key Lab of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Lab of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Nematocidal activity of methanol extracts from the different parts of *Clausena lansium* was determined by dipping method. The active ingredients were isolated and identified on the basis of active-directed fractionation with column chromatography, thin layer chromatography (TLC), recrystallization and nuclear magnetic resonance (NMR). The results showed that the most effective extract against *Bursaphelenchus xylophilus* was seed methanol extract, which gave 100% mortality after 72 h treatment at the mass concentration of 1 mg/mL. The active ingredients were concentrated in petroleum ether fraction and a yellow crystal was obtained and purified. It was identified as Lansiumamide B (*N*-methyl-*N*-cis-styryl-cinnamamide) on the basis of NMR data. The bioassay results revealed that LC_{50} values of Lansiumamide B against *B. xylophilus* were 8.38, 6.36 and 5.38 mg/L after 24, 48 and 72 h treatment, respectively. The results indicated that Lansiumamide B was effective against *B. xylophilus*.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; *Clausena lansium*; *N*-methyl-*N*-cis-styryl-cinnamamide

植物通常不能主动避开其他生物的取食和危害,而在自然界长期的协同进化过程中逐渐发展出能产生一些对其他生物具有驱避或毒杀作用的次生代谢物质,其中一些化合物具有独特的结构特征,有可能成为防治害虫的生防制剂或先导化合物. 以天

然除虫菊和烟碱为先导化合物,人工合成开发出现代拟除虫菊酯类和新烟碱类杀虫剂并已得到广泛的应用. 从植物中寻找具有农药活性的化合物,是开发环境和谐农药的一条重要途径.

松材线虫病(Pine Wilt Disease)是我国二类检疫

收稿日期:2008-03-04

作者简介:马伏宁(1974—),女,博士研究生; 通讯作者:万树青(1963—),男,教授,博士,E-mail: wanshuqing@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(990703,010319);天然农药及化学生物学教育部重点实验室基金(2005)

病害,它是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 寄生在松树体内所引起的一种毁灭性病害. 松材线虫主要危害日本黑松 *Pinus thunbergii*、马尾松 *P. massoniana*、西黄松 *P. poderosa*、欧洲赤松 *P. sylvestris*、海岸松 *P. pinastor* 和黄山松 *P. Taiwanensis* 等松属植物^[1]. 我国自1982年在南京紫金山松林中发现该病害以来,在山东、安徽、江苏、浙江、广东、台湾及香港等地均发现该病害. 目前,松树发病后能够防治并且相对环保的药物非常缺乏,一些对松材线虫有活性的化学物质,也往往由于水溶性、内吸性差,结构复杂合成困难,毒性高,成本高等原因而影响实际应用. 因而迫切需要研发出既经济又环保的新型杀松材线虫药剂.

芸香科 Rutaceae 黄皮属 *Clausena* 植物在我国自古即为药用,具有广泛的药理活性,研究表明黄皮属植物具有保肝、降脂、解痉、抑菌及抗癌等生物活性^[2]. 黄皮 *Clausena lansium* 原产于我国热带地区,在广东、广西、福建、四川、云南、台湾、海南等地均有分布. 黄皮的叶、根、果均能入药,含有香豆素、生物碱等活性成分^[3]. 关于黄皮的研究多集中在医药和挥发油方面,在农业方面的研究较少. 万树青等^[4]在研究几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性时,发现黄皮种子甲醇、石油醚提取物对萝卜蚜具有一定的杀灭作用. 本研究就黄皮种子中对松材线虫有毒杀活性的化学成分进行了分离和鉴定,以期为植物源杀线虫剂的开发提供依据.

1 材料与方 法

1.1 材 料

黄皮 *Clausena lansium* 叶、树皮、花、成熟果实均采自华南农业大学昆虫毒理重点实验室杀虫植物园.

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 由华南农业大学资源环境学院线虫研究室提供,在25℃培养箱中以玉米粒培养的盘多毛孢菌 *Pestalotia* sp. 培养15 d后,用改良贝曼漏斗法分离收集线虫,无菌水冲洗2次后,配成约为1 000条/mL的线虫液(混合虫龄)备用.

主要仪器和试剂:DRX-600型超导核磁共振仪,瑞士Bruker公司制造;光照培养箱LRH-300-GH,广东省医疗器械厂出品;RY-1G熔点仪,天津市新天光仪器公司生产;光学显微镜,日本Olympus公司制造;KH2500型超声波清洁剂,昆山禾创超声仪器有限公司制造;LABOROTA 20L型旋转蒸发仪,德国Heidolph公司制造. 硅胶,青岛海洋化工厂生产;其

他有机试剂均为国产分析纯.

1.2 活性成分提取、分离和结构鉴定方法

1.2.1 植物材料的提取 超声波提取:采集新鲜的黄皮种子、花、树皮和叶置于闭光的通风处自然阴干,放置于干燥箱中50℃烘1~2 h至干脆,用植物粉碎机将其粉碎,过80目筛. 称取材料干粉各30 g,放入250 mL具塞三角瓶中,加入150 mL甲醇,振荡均匀,黑暗条件下放置过夜,室温下超声波提取20 min,抽滤,反复提取3次,合并提取液,减压浓缩近干得粗提物,称质量并计算提取率. 粗提物用于生物活性测定.

冷浸法提取:2.5 kg的黄皮种子干粉按5 mL/g的量加入甲醇,置于避光阴凉处,期间数次摇动,72 h后抽滤,残渣再添加甲醇浸泡,如此反复浸提3次,抽滤后将提取液合并,在20 L旋转蒸发仪上45~50℃减压浓缩至膏状,得种子提取物.

1.2.2 种子提取物的初步分离 将黄皮种子甲醇提取物用少量的甲醇溶解后,加入5倍量蒸馏水溶解,转入分液漏斗中,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,每种溶剂连续萃取3次,每次500 mL. 对各萃取相及最后剩下的水相进行减压浓缩得稠膏,在0.1 mg/mL水溶液中进行各萃取相生物活性测定.

1.2.3 活性成分分离和结构鉴定 经生物活性测定,种子提取物石油醚萃取相的活性最好,继续对石油醚相进行硅胶柱层析. 装柱用100~200目硅胶,以石油醚和乙酸乙酯的混合溶剂进行洗脱. 点样于GF254硅胶薄板上,碘、荧光和硫酸显色后合并点板结果相近的馏分,对所合并的馏分进行活性测定后再对有活性的馏分继续分离,通过薄层层析获得单一的活性成分,进行重结晶,用3种不同洗脱剂薄层层析后显色均为单一点的化合物被认为是纯化合物.

化合物结构鉴定:核磁共振氢谱(¹H NMR)(600 MHz)和碳谱(¹³C NMR)(150 MHz)以氘代氯仿(CDCl₃)为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标测定. 熔点仪测熔点,用甲醇溶解少量化合物配成质量浓度为10 mg/L的溶液,以甲醇为参比扫描紫外吸收峰. 结构剖析由中国科学院华南植物园魏孝义研究员完成.

1.2.4 生物活性测定 药液浸渍法:各供试提取物以蒸馏水(含φ<2%的丙酮)配制成试验设置浓度的溶液,取1.5 mL溶液加入24孔细胞板内,然后用胶头滴管加入供试松材线虫50~100条,每孔作为1次重复,每处理4次重复,对照为蒸馏水(含φ<2%

的丙酮),置25℃培养箱处理24、48和72h后,在光学显微镜(4×)下检查线虫死亡数.以虫体发直、拨针拨动不活动的虫体放入清水24h后仍不能恢复活动的确定为死亡状态,按下式计算校正死亡率.

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%$$

1.2.5 数据统计分析方法 本试验中的测定数据、平均数、标准误、线形回归方程等数据用 Microsoft Excel 2002 软件处理,并用 DPS 软件邓肯氏新复极差多重比较法(Duncan's multiple range test, DMRT)进行差异性分析.化合物结构图采用 ChemDraw Ultra 8.0 软件绘制.

2 结果与分析

2.1 黄皮不同部位甲醇提取物提取率及对松材线虫的毒杀活性

对黄皮的种子、花、叶和树皮的干粉进行超声波提取.结果(表1)显示,叶、树皮和种子的提取率相近,花的提取率最低.采用药液浸渍法进行生物活性测定,在1mg/mL的处理质量浓度下,黄皮各部位甲醇提取物均有一定的杀松材线虫活性,其中种子提取物的活性高于其他部位提取物,其处理松材线虫72h校正死亡率达到100%,叶、树皮和花的校正死亡率达40%~50%.

表1 黄皮各部位甲醇提取物的提取率及杀松材线虫活性
Tab.1 Extract rate of methanol extracts from different parts of *Clausena lansium* and nematocidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*

部位	提取率/%	校正死亡率 ¹⁾ /%
叶	21.75	47.04 ± 2.56b
树皮	20.37	43.64 ± 3.20d
种子	18.40	100.00 ± 0.00a
花	9.27	45.69 ± 2.39c
对照(蒸馏水)		14.5 ²⁾

1)表中的“校正死亡率”为平均值±标准误,是提取物质量浓度为1mg/mL处理72h后的结果;本列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT法);2)所示数据为供试松材线虫对照组的死亡率

2.2 黄皮种子各萃取相对松材线虫的毒杀活性

将黄皮种子甲醇粗提物进行液-液萃取,分别得到石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇及水相萃取物,采用药液浸渍法测定上述几种萃取物对松材线虫的生物活性.结果表明,在0.1mg/mL质量浓度处理48、72h后,石油醚相对松材线虫表现出较好的活性,氯仿相和正丁醇相的活性次之,乙酸乙酯相和水

相活性较差(表2).

表2 黄皮种子提取物各萃取相对松材线虫的杀虫活性
Tab.2 Nematocidal activity of different extracts from seeds of *Clausena lansium* against *Bursaphelenchus xylophilus*

萃取物	校正死亡率 ¹⁾ /%	
	48 h	72 h
石油醚相	49.71 ± 0.02a	77.14 ± 0.78a
氯仿相	17.26 ± 0.12b	40.94 ± 0.41b
乙酸乙酯相	5.64 ± 0.01d	-0.04 ± 0.05d
正丁醇相	12.62 ± 0.08c	22.29 ± 0.23c
水相	-0.03 ± 0.04e	-0.07 ± 0.27d
对照(蒸馏水)	12.5 ²⁾	14.5 ²⁾

1)表中的“校正死亡率”为平均值±标准误,是萃取相质量浓度为0.1mg/mL处理后的结果;同列数据后字母相同者表示在5%水平差异不显著(DMRT);2)所示数据为供试松材线虫对照组的死亡率

2.3 种子提取物有效成分的分离、纯化和鉴定

种子提取物石油醚相萃取物经过2级硅胶柱层析,将活性馏分用自制薄层色谱板分离并通过重结晶得到一黄色晶体.测定其熔点为67~68℃,紫外最大吸收峰(甲醇溶解):221.4,273.2,293.4. ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃): δ_H 为 3.08(s, 3H, CH₃), 6.22(d, J = 8.4 Hz, 1H, CH), 6.47(d, J = 8.4 Hz, 1H, CH), 6.92(d, J = 15.4 Hz, 1H, CH), 7.63(d, J = 15.4 Hz, 1H, CH), 7.19~7.44(m, 10H, CH_{ar}). ¹³C-NMR(150 MHz, CDCl₃): δ_C 为 34.4(CH₃), 118.2(C-2), 124.8(C-2'), 127.7(CH_{ar}), 127.7(CH_{ar}), 127.9(CH_{ar}), 128.4(C-1'), 128.4(CH_{ar}), 128.4(CH_{ar}), 128.4(CH_{ar}), 128.5(CH_{ar}), 128.5(CH_{ar}), 128.6(CH_{ar}), 129.5(CH_{ar}), 134.2(C_{ar}), 135.9(C_{ar}), 142.4(C-3), 166.2(CO).

综合核磁共振氢谱和碳谱数据并与 Lin^[5] 及 Alexander^[6] 报道的数据进行比较,鉴定该化合物为 Lansiumamide B,分子式为 C₁₈H₁₇NO,相对分子质量为 263.1310,化学结构见图1.

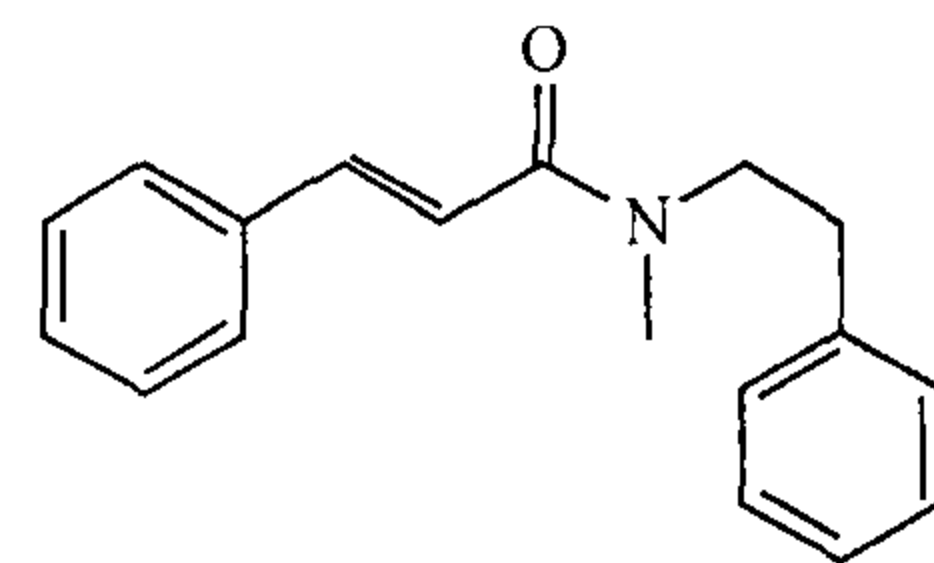


图1 Lansiumamide B 的化学结构
Fig.1 Chemical structure of Lansiumamide B

2.4 Lansiumamide B 对松材线虫的毒力

为了进一步确定 Lansiumamide B 对松材线虫的毒力,先分别设 15、30、45、60、75、90 mg/L 6 个质量浓度梯度测定其毒杀活性,24 h 的校正死亡率达到 85%~96%,48 h 的校正死亡率除 15 mg/L 的为 99% 外,其他质量浓度的均为 100%。又分别设 2、4、6、8、10、12 mg/L 测定其活性, Lansiumamide B 处理松材线虫 24、48 和 72 h 后的致死中质量浓度(LC₅₀)分别为 8.38、6.36 和 5.38 mg/L(表 3)。所用 Lansiumamide B 为晶体,纯度为 99% 以上。

表 3 Lansiumamide B 处理不同时间对松材线虫的毒力

Tab. 3 Toxicity of Lansiumamide B against *Bursaphelenchus xylophilus* at different time treatment

t/h	回归方程	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	R ²	95%置信限/ (mg·L ⁻¹)
24	Y = -0.263 2 + 5.701 7X	8.38	0.959 8	7.77~9.03
48	Y = 0.444 4 + 5.672 0X	6.36	0.942 7	5.90~6.84
72	Y = 0.618 5 + 5.998 3X	5.38	0.959 3	4.96~5.83

3 讨论

试验中发现乙酸乙酯相和水相萃取物处理松材线虫 72 h 的校正死亡率为负值,这可能与黄皮种子中含有一些能够维持或促进线虫生长的活性物质有关,这些活性物质使得黄皮具有中药药效而得到长期使用,如已经测定出自然干燥的黄皮果核中含有 0.174% 的黄皮酰胺^[7],黄皮酰胺是从黄皮叶中分离出的具有抗衰老、促智活性的物质。

相关的研究表明:阿维菌素(50 mg/L)24 h 的校正死亡率为 83%^[8],Lansiumamide B(45 mg/L)的校正死亡率为 91%。植物源的杀线虫活性物质骆驼蓬碱 72 h 的 LC₅₀ 值为 135.74 mg/L^[9],鱼藤酮 120 h 的杀松材线虫效果比丙线磷好,其 120 h 的 LC₅₀ 值为 1.86 mg/L^[10],而 Lansiumamide B 72 h 的 LC₅₀ 值为 5.38 mg/L。可见,与以上杀线虫剂试验效果相比,从黄皮中分离的 Lansiumamide B 对松材线虫具有优良的毒杀活性。

Lansiumamide B 自 1989 年台湾的 Lin^[5] 报道以来,鲜见其生物活性方面的研究报道。黄皮树 *Phellodendron chinense* 为黄檗属(黄皮属的姊妹属)植物,从中分离的三萜和酰胺类化合物对昆虫具有拒食作用^[11],肉桂酰胺类化合物对鸟和其他生物也具有拒

食作用^[12],Lansiumamide B 是否具有拒食活性还有待于进一步研究。黄皮的整个果实(包括果皮、果肉和种子)长期被作为一种水果和中药材使用,从黄皮种子中提取的化合物对人类和环境相对安全,因此有必要对黄皮种子中活性化合物 Lansiumamide B 的作用机制、人工合成及在植物线虫防治和在农业、医药等方面的实际应用作深入的研究。

致谢:华南植物园魏孝义研究员在化合物结构鉴定中提供帮助,华南农业大学李秉滔教授鉴定植物材料,在此一并致谢!

参考文献:

- [1] 朱克恭. 松材线虫病研究综述[J]. 世界林业研究,1995(3):28-33.
- [2] 潘瑞乐,朱兆仪. 黄皮属药用植物研究进展[J]. 国外医药:植物药分册,1990,5(6):243-247.
- [3] 闫少羽,崔承彬,姚新生. 黄皮属植物生物碱的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2002,12(3):179-186.
- [4] 万树青,郑大睿. 几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性[J]. 植物保护,2005,31(6):55-57.
- [5] LIN Jer-huei. Cinnamamide derivatives from *Clausena lansium*[J]. Phytochemistry, 1989, 28(2):621-622.
- [6] ALEXANDER B, MARTIN E M. Synthesis of enamides from aldehydes and amides[J]. Tetrahedron, 2004(60):6665-6677.
- [7] 黄雪松,罗丽君. 黄皮果、黄皮核中黄皮酰胺的测定[J]. 食品工业科技,2006,27(6):172-173.
- [8] 谈家金,冯志新,杜永部. 几种物质对松材线虫的作用[J]. 四川林业科技,2003,24(4):32-34.
- [9] 翁群芳,钟国华,胡美英,等. 骆驼蓬提取物对松材线虫的生物活性及生理效应[J]. 中国农业科学,2005,38(10):2014-2022.
- [10] 胡林,黄晓东,夏坚,等. 鱼藤酮及六种哒唑、咪唑类医用驱虫剂对松材线虫的作用[J]. 江西农业大学学报,2006,28(2):204-207.
- [11] SU Rong-hui, KIM M, YAMAMOTO T, et al. Antifeeding constituents of *Phellodendron chinense* fruit against *Reticulitermes speratus*[J]. Journal of Pesticide Science, 1990,15(4):567-572.
- [12] WATKINS R W, GILL E L, BISHOP J D. Evaluation of cinnamamide as an avian repellent: determination of a dose response curve[J]. Pesticide Science, 1995, 44(4):335-340.

【责任编辑 李晓卉】