

黄果茄杀灭钉螺有效成分的分离提纯及其效果观察

李洲¹,程溪¹,王春静¹,李桂玲^{2*},夏淑贞²,魏凤华³

【摘要】 目的 分离提纯黄果茄果实灭螺的有效成分,观察灭螺效果,并确定其分子结构。方法 将黄果茄果实去蒂去籽后干燥粉碎,用 95%乙醇提取并浓缩,然后加乙酸乙酯处理,用薄层层析法(TLC)和柱层析法(CCL)对其进行分离,得到 7 种主要组份。采用“浸泡法”对其中 4 种含量较高的组分进行灭钉螺实验,确证 $R_f = 0.58$ 这一生物碱组分(A)为主要灭螺成分之一。选择最佳洗脱剂对灭螺效果最好组分 A 进行分离,得到 A1 及 A2 两组分。对 A1, A2 进行灭钉螺实验,比较其灭螺效果。电子轰击质谱测定有效成分分子量、核磁共振仪和红外光谱仪测定分子结构。结果 黄果茄果实有效成分 A ($R_f = 0.58$) 的灭螺效果较好,当投药量为 2.50 mg/L,钉螺的死亡率为 94.2% (28℃)。乙酸乙酯-氯仿-甲醇(11:11:35)系统对 A 的分离效果最好。灭螺对照实验发现:当 A2 投药量为 0.20 mg/L,钉螺的死亡率为 100.0% (28℃),其分子量为 867,熔点为 298~305℃。结论 黄果茄有效成分提纯物 A2 为边缘茄碱(α -solanargine),其对湖北钉螺有很好的杀灭效果。

【关键词】 黄果茄;杀软体动物药;湖北钉螺

中图分类号:R943.24

文献标识码:A

Purification of the Effective Component from *Solanum xanthocarpum* and its Effect against *Oncomelania* Snails

LI Zhou, CHENG Xi, WANG Chun-jing, LI Gui-ling*, XIA Shu-zhen, WEI Feng-hua
(Tongji Medical College, Huazhong university of Science and Technology, Wuhan 430032, China)

【Abstract】 Objective To extract and purify the active component from *Solanum xanthocarpum* for *Oncomelania* snail control, evaluate its effect against the snails and determine its chemical structure. **Methods** Pedicel and seed were moved and the remaining part of the *Solanum xanthocarpum* fruit was torrefied and ground into powder. The powder was soaked into 95% ethanol and extracted. The residue was treated by ethyl acetate. 7 components were separated by methods of thin layer chromatography(TLC) and column chromatography(CCL). 4 main components were observed for the effect of snail-killing by immersion method. An alkaloid with $R_f = 0.58$, named as component A, was confirmed as one of the effective components for *Oncomelania* snail control. The component A was further purified and received A1 and A2 by proper elusion, and their effect was re-tested. The molecular weight and chemical structure of A2 were determined by MS, NMR and IR respectively. **Results** The death rate of *Oncomelania* snails was 94.2% when the concentration of component A was 2.50 mg/L(28℃). The flow liquid system(ethyl acetate:chloroform:methanol=11:11:35) applied was the best reagent for separating component A. The death rate of *Oncomelania* snails in solution of A2(0.2 mg/L) was 100%(28℃). The molecular weight of A2 was 867 with an mp 298-305℃. **Conclusion** The effective agent(A2), one of the active components from the fruit of *Solanum xanthocarpum*, is α -solanargine which shows an excellent effect in killing *Oncomelania* snails.

【Key words】 *Solanum xanthocarpum*; Molluscacides; *Oncomelania hupensis*

Supported by the Special Funds for Schistosomiasis Control, Health Department of Hubei Province(No.2003-04)

* Corresponding author, E-mail: gueilinli@163.net

杀灭钉螺,是控制和阻断日本血吸虫病传播的重要手段之一。近年来血吸虫病流行加剧,实际灭螺速度远不及洪水泛滥引起的钉螺扩散速度。目前使用的灭螺药物品种单一(氯硝柳胺),价格较贵。研制高效、价廉、对环境无污染的灭螺药物是国内外学者重点研究课题。作者等与湖北省血吸虫病防治研究所合

作,已证明广泛分布于我国南方丘陵地带茄科植物黄果茄(*Solanum xanthocarpum* Schrad et Wendl, SX),其果实提取物具有较好的灭螺效果^[1-3]。湖北地区野生及人工栽培的 SX,以及贵州省野生 SX 对比研究发现,其有效成分灭螺效果存在地域性差异^[1]。本研究对黄果茄灭螺有效组分之一作进一步纯化,并观察其灭螺效果,以便为制定 SX 药源质量监控标准提供

基金项目:湖北省卫生厅血防专项基金资助项目(鄂血咨字 2003-04)
作者单位:1 华中科技大学同济医学院,武汉 430032; 2 华中科技大学同济医学院医学化学系,武汉 430032; 3 湖北省血吸虫病防治研究所,武汉 430079

* 通讯作者

材料与方法

1 仪器、试剂及材料

仪器：旋转蒸发仪（型号：ZFQ85A，上海医疗器械专用机械厂），循环水式多用真空泵（型号：SHB，郑州长城仪器厂），超级恒温器（型号：YJ501，上海跃进医疗器械厂），真空干燥器（型号：ZK-82A，上海实验仪器厂产品），UV-1 型三用紫外分析仪（上海分析仪器厂），旋光用 WZZ-1 型自动显示旋光仪，LCQ DECA XP PLUS 型质谱仪（美国 Thermo Finnigan 公司），Inova-600 型核磁共振仪（美国 Varian 公司），IR-460 型红外光谱（日本岛津公司）。

试剂：薄层层析硅胶 G（青岛海洋化工厂），柱层析硅胶（100~120 目、200~300 目，上海申江化工厂），层析柱：2 cm × 70 cm。展开剂：苯-甲醇系统、乙酸乙酯-氯仿-甲醇系统，显色剂为改良碘化铋钾生物碱试剂及浓硫酸-甲醇系统。

药材：黄果茄成熟果实，采于武汉市近郊菜甸区，经中国科学院武汉植物研究所鉴定。湖北钉螺，采自武汉二桥水域，挑选大小一致、活动能力强的钉螺。

2 黄果茄主要化学成分的提取

将黄果茄成熟果实去蒂、去籽，置于真空恒温箱 60℃ 以下干燥，粉碎后以 20 目筛筛分，粗粉用 95% 乙醇浸泡 24 h，抽滤，反复提取 5 次后合并滤液，用旋转蒸发仪在 60℃ 以下减压浓缩至稠膏状。再经 5% 醋酸、1% 氨水反复溶解、沉淀，获得 SX 主要化学成分生物碱样品^[1]。用乙酸乙酯对其脱脂处理。

利用薄层层析法（TLC）寻找分离 SX 主要化学成分生物碱的操作条件。即：取少量样品，溶于甲醇，经薄层点样、溶剂展开、显色分析等实验，选出分离 SX 主要化学成分生物碱的有效混合溶剂为苯-甲醇（4:3）系统。用改良的碘化铋钾溶液显色，可得到 R_f 值分别为 0.11、0.20、0.30、0.38、0.58、0.64 及 0.78 的 7 种生物碱成分斑点。根据上述寻找的操作条件进行柱层析。控制洗脱剂流速为 20 滴/min，每 1 ml 为 1 流份、分段收集样品共 120 流份，采用薄层层析法，分别用毛细管蘸取微量流份点在硅胶预制板上进行层析、显色，并计算 R_f 值，合并 R_f 值相同的流份，经蒸发浓缩、真空干燥获得 R_f 值分别为 0.30、0.38、0.58 及 0.64 的 4 种具有显著灭螺效果的生物碱组分。其中， $R_f = 0.58$ （A，粉末状）组分含量较多。

3 4 种组分灭螺效果比较

取 R_f 值分别为 0.30、0.38、0.58 及 0.64 的组分，用去氯水分别配成浓度为 2.5、2.0、1.5 及 1.0 mg/L 溶液。参照 WHO “灭螺剂实验室筛法” 中的浸泡法^[4,7]进行灭螺实验，每组 120 只钉螺均分 4 杯，

每组 30 只，置于 28℃ 恒温水浴，48 h 后取出钉螺，用去氯水冲洗 3 次，放入盛有少许去氯水的小烧杯中 72 h 统计钉螺存活率。能爬壁或吸附于壁上者判为活螺。其余钉螺，用针刺法判断，对针刺有反应的判为活螺。其余无反应的钉螺用敲碎法判断，若能快速收缩则仍判为活螺，始终无反应者判为死螺。同时设空白平行对照组。

4 有效组分 A 的分离与纯化

利用薄层层析法（TLC）寻找分离组分 A 的操作条件。即：取微量组分 A，溶于甲醇，经薄层点样、溶剂展开、显色分析等实验，找出分离组分 A 的有效混合溶剂为乙酸乙酯/氯仿/甲醇（11:11:35）系统，浓硫酸/甲醇（1:1）为显色系统，可获得 R_f 值分别为 0.90（A1）及 0.70（A2）的两个组分的斑点。取组分 A 30 mg，根据薄层层析选择的操作条件进行柱层析分离。用上述展开溶剂洗脱、显色剂监测，在平衡硅胶柱后上样层析。控制洗脱剂流速为 20 滴/min，每毫升为 1 流份、分段收集样品 120 流份。分别用毛细管蘸取微量流份点于硅胶预制板，进行薄层层析、显色，计算 R_f 值，合并 R_f 值相同流份，经蒸发浓缩、真空干燥后获得淡黄色粉末 A1、白色无定型粉末 A2 两组分。

5 A1 及 A2 灭螺效果比较

同上述 3 操作方法，对 A1 及 A2 组分进行灭螺实验。浓度分别为 0.20、0.15 及 0.10 mg/L。

6 A2 组分化学成分鉴定

分别用微量显微熔点仪、电子轰击质谱及自动显示旋光仪，测定 A2 熔点、分子量及旋光度。用核磁共振谱、红外光谱，确定其分子结构。

结果与讨论

1 灭螺效果

4 种不同 R_f 值的有效组分，浸泡法灭螺实验结果表明，28℃ 条件下，组分 A（ $R_f = 0.58$ ）灭螺效果较好，当剂量为 2.5 mg/L 浸泡 48 h 后，钉螺死亡率为 94.2%（表 1）。纯化后的 A2 组分灭螺效果提高 10 倍以上（表 2）。

2 A2 化学结构鉴定

A2 为白色无定形粉末，味微苦。溶于水、甲醇等溶剂，难溶于亲脂性有机溶剂。熔点为 298~305℃，分子量为 867，旋光度为 $[\alpha]_D^{25} -112^\circ$ （吡啶）。质谱（mass spectrometry, MS）给出 869（基峰， $M^+ +$

2H), 分子式为 C₄₅H₇₃NO₁₅。

表 1 R_f 值不同的 4 种有效组分浸泡钉螺 48 h 后死亡率 (28 °C)
Table 1 Snail-killing effect of active fraction after 48 h

R _f 值 R _f value	不同浓度有效组分浸泡 48 h 后钉螺死亡率 Snail death rate under different concentration of fraction A after 48 h (%)			
	2.5 mg/L	2.0 mg/L	1.5 mg/L	1.0 mg/L
0.30	87.7	54.4	32.2	16.6
0.38	88.8	68.8	40.0	23.3
0.58(A)	94.2	80.0	67.7	41.1
0.64	56.6	33.3	24.4	13.3
对照组 Control	0	0	0	0

注: 各组实验螺数均为 120 只 Note: 120 snails in each group.

表 2 A1 及 A2 组分浸泡 48 h 后钉螺死亡率
Table 2 Snail-killing effects of A1, A2 after 48 h

R _f 值 R _f value	不同浓度 A1 及 A2 药液浸泡 48 h 后钉螺死亡率 Snail death rate under different concentration of components A1 and A2 after 48 h (%)		
	0.2 mg/L	0.15 mg/L	0.10 mg/L
0.70(A2)	100	88.8	52.2
0.90(A1)	7.7	4.4	0
对照组 Control	0	0	0

注: 各组实验螺数均为 90 只。Note: 90 snails in each group.

与生物碱沉淀试剂 Dragendroff (碘化铋钾) 试剂、Wagner (碘-碘化钾) 试剂均呈阳性反应, 提示该化合物为生物碱成分。与三氯化锑反应和 Liebermann-Burchard 反应均呈阳性, 提示 A2 具有甾体母核。Molish 反应阳性, 提示为苷类化合物。Legal 反应、Kedde 反应、Baljet、Keller-Kiliani 反应均呈阴性排除强心苷的可能。结合文献报道植物亲缘关系, 初步确定 A2 为甾体生物碱苷类成分。A2 的红外吸收光谱 (infrared absorption spectroscopy, IR)^[5] 中 3 408 cm⁻¹ (OH), 1 042 cm⁻¹、1 134 cm⁻¹ (C-O), 提示分子中具有羟基和苷键, 1 570 cm⁻¹ 提示存在双键, 1 383 cm⁻¹ 提示有甲基。A2 的质谱中^[5], m/z 869 (M⁺ + 2H), 723 (M + 2H-C₆H₁₀O₄)⁺, 576 (723-C₆H₁₁O₄)⁺, 414 [576-C₆H₁₀O₄] (rhamnose, 鼠李糖)⁺、苷元 [C₂₇H₄₃NO₂ (solasodine + H, 茄次碱)]⁺, 396 (苷元-H₂O), 提示 A2 分子中含有 3 个糖基。这一推论得到¹H-NMR 谱中 δ5.02 (1H, s), 4.93 (1H, s), 4.71 (1H overpapped signals) 3 个糖端基质子信号的佐证, 并得到¹³C 核磁共振谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹³C-MHR)^[5] 中 δ100.4 (d), 100.4 (d),

100.2 (d) 3 个糖端基碳信号的进一步证明。茄次碱骨架的 NMR 信号以及边缘茄碱中糖基的 NMR 信号与文献 [6] 报道一致。

综上所述, A2 初步确定为边缘茄碱 (α-solamargine), 其化学结构为 (25R) -3β-O-α-L-rhamno-pyranosyl- (1→2) -O- [α-L-rhamnopyranosyl- (1→4)] -O-β-D-glucopyranoside, 结构式如图 1。

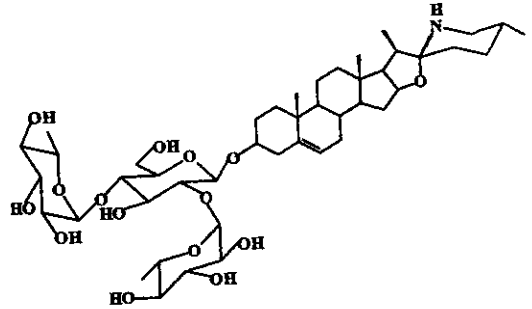


图 1 边缘茄碱化学结构式
Fig. 1 Chemical configuration of α-solamargine

本研究应用现代分离、纯化技术, 从黄果茄果实中分离获得灭螺有效成分化合物单体 A2, 其分子结构为边缘茄碱。A2 组分能有效地杀灭钉螺, 在 28 °C、剂量为 0.2 mg/L, 浸泡 48 h, 钉螺死亡率为 100%。

目前使用的灭螺药物对环境均有不同程度的污染。而野生的黄果茄植物广泛分布于我国南方丘陵地带, 还可人工栽培。本研究结果为进一步探讨黄果茄灭螺作用机制及对灭螺药物的深入研究开发, 提供了重要参考资料及实验材料。对于进一步研究寻找毒副作用低, 保护生态环境的灭螺药物, 有一定参考价值。

参 考 文 献

[1] 罗钊, 李桂玲. 不同地区黄果茄杀灭钉螺的效果研究 [J]. 中草药, 2004 (增刊), 155-157.
 [2] 魏风华, 徐兴建, 刘建兵, 等. 黄果茄植物灭螺成分的提取及灭螺研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16 (6): 58-60.
 [3] 杨满业, 贺新生, 林明, 等. 黄果茄生物碱的初步研究 [J]. 绵阳农专学报, 1995, 12 (4): 9-11.
 [4] 毛守白, 著. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 704.
 [5] 于德权, 杨俊山, 主编. 分析化学手册 (第 7 分册) [M]. 第 2 版, 北京: 化学工业出版社, 1999. 729.
 [6] Ripperger H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum* [J]. Phytochemistry, 1995, 9: 1475-1477.
 [7] Mott KE. Plant Molluscicides [M]. New York, John Wiley & Sons LTD, 1987. 251, 303-304.

(收稿日期: 2004-10-18 编辑: 富秀兰)