

· 研究论文 ·

绒叶泡桐花中除草活性成分的分离与除草活性

袁忠林^{*1}, 罗兰¹, 臧爱梅², 孟昭礼¹

(1. 青岛农业大学 农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109; 2 高密市农业局, 山东 高密 261500)

摘要:采用活性追踪和柱层析技术,以对杂草反枝苋、生菜、黄瓜种子胚根生长的抑制作用为指标,对泡桐花中除草活性成分进行了提取、分离和鉴定。绒叶泡桐 *Paulownia tomentosa* 花乙醇提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水萃取后进行活性测定,结果表明,石油醚萃取物在浓度为 0.5 mg/mL 时,对反枝苋、生菜和黄瓜种子胚根生长的抑制率分别为 76.30%、56.17%和 23.36%;乙酸乙酯萃取物在浓度为 0.5 mg/mL 时,对反枝苋、生菜和黄瓜种子胚根生长的抑制率分别为 99.89%、63.53%和 32.74%。通过对乙酸乙酯萃取物进行硅胶柱层析分离,得到一种活性较高的化合物,经鉴定其为对乙氧基苯甲醛,其抑制反枝苋种子胚根生长的 EC_{50} 值为 55.20 μ g/mL。对乙氧基苯甲醛是首次从绒叶泡桐中分离鉴定的化合物,也是首次将其用于除草活性研究。

关键词:绒叶泡桐;除草活性物质;分离;生物测定

中图分类号:O658.1;S482.4

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2009)02-0239-05

Isolation and Bioassay of Herbicidal Active Ingredient from *Paulownia tomentosa*

YUAN Zhong-lin^{*1}, LUO Lan¹, ZANG Ai-mei², MENG Zhao-li¹

(1. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China;

2 Agricultural Bureau of Gaomi, Gaomi 261500, Shandong Province, China)

Abstract: Herbicidal active ingredient extracted, isolated and identified from *Paulownia tomentosa* (Thund) Steud against *Amaranthus retroflexus* L., *Lactuca sativa* var *capitata* L. and *Cucumis sativus* L. were tested by bioassay-guided separation. The extracts from *P. tomentosa* flower with ethanol were extracted with petroleum ether, ethyl acetate and n-butanol. The inhibition rate of the ethyl acetate extract to growth of the 3 kinds of plant radicle were 99.89%, 63.53% and 32.74% respectively at 0.5 mg/mL concentration, and that of petroleum ether were 76.30%, 56.17% and 23.36%. One compound had been obtained with silica gel column chromatography from ethyl acetate extraction, and it was authenticated as p-ethoxybenzaldehyde. The inhibitory EC_{50} of this compound against *A. retroflexus* radical growth was 55.20 μ g/mL. p-Ethoxybenzaldehyde was the first reported from *Paulownia tomentosa* with herbicidal activity.

Key words: *Paulownia tomentosa*; herbicidal activity constituents; isolation; bioassay

玄参科 (Scrophulariaceae)泡桐属 (*Paulownia*)植物起源于我国,共有 7 种,在我国分布广泛,其药

用价值早有记载^[1],其中的绒叶泡桐 *Paulownia tomentosa* (Thund) Steud 又叫毛泡桐,其叶、花、果

收稿日期:2008-12-16;修回日期:2009-02-24.

作者简介:袁忠林(1964-),男,陕西扶风人,博士,教授,主要从事天然产物农药的研究工作.联系电话:0532-86080261; E-mail: zhonglin@163.com

基金项目:山东省科技发展计划项目(2006GG3202031).

实和树皮均可入药,具有消炎、止咳、化痰、利尿等功效^[2]。有关泡桐花中的化学成分、药理作用等国内外已有较多报道^[3~9]。前期的研究表明,泡桐中存在一定的除草活性物质^[10,11]。为了进一步寻找其中可能作为除草剂的先导化合物,笔者对泡桐花中的活性成分进行了分离、鉴定,现将有关结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

绒叶泡桐 *Paulownia tomentosa* 花,2005年采于山东省高密市李家营镇,自然阴干,粉碎,备用。受试植物生菜 *Lactuca sativa* var. *capitata* L. (品种为美国产结球生菜)、黄瓜 *Cucumis sativus* L. 均购于山东青岛市城阳区蔬菜种子市场;反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 种子采于青岛农业大学校内。

乙醇、石油醚(沸程 60~90)、乙酸乙酯、正丁醇和丙酮均为市售分析纯。薄层层析硅胶(GF254)、柱层析硅胶(200~300目)购自青岛海洋化工厂。

WRS-1B型数字熔点仪(温度未经校正);PE-2400(型)元素分析测定仪;USA NICOLET FT-IR SDX 红外光谱仪;Bruker AM 400型核磁共振仪(以丙酮为溶剂,以 TMS 为内标)。

1.2 泡桐花提取物的制备

取粉碎后的泡桐花粉末 2.5 kg,装入 3 000 mL 三角瓶中,加入适量乙醇(以浸过植物材料为宜),于 40℃ 水浴锅中恒温提取 3 次,分别在 3、5、7 d 后过滤,合并滤液,减压浓缩至浸膏状,冷冻干燥后称重得 273 g 干物质。取干物质 250 g,加 450 mL 蒸馏水悬浮后,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,每种溶剂萃取 5 次,每次 500 mL,合并萃取液,减压浓缩,冷冻干燥,分别得到石油醚萃取物 93 g、乙酸乙酯萃取物 43 g、正丁醇萃取物 42 g 和水萃取部分 16 g。

1.3 除草活性测定

采用培养皿药膜法测定 4 种溶剂萃取物对 3 种植物的除草活性^[10,11]。分别称取 4 种溶剂萃取物的干物质各 5 mg,溶于 10 mL 相应的溶剂中,配成 0.5 mg/mL 的药液。在培养皿(φ 9 cm)中放置滤纸,分别加入上述配好的药液 3 mL,室内放

置 3~4 h 待溶剂挥发后的滤纸即为药膜。以晾干并用等量相应溶剂浸渍过的滤纸为对照。每浓度重复 3 次。每皿处理 20 粒种子,共 60 粒,每皿加水 8 mL,放入 27℃ 恒温箱中培养,2 d 后测定其胚根长度,按下式计算其抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照胚根长度} - \text{处理胚根长度}}{\text{对照胚根长度}} \times 100$$

1.4 除草活性成分的分离与鉴定

通过初步的除草活性测定发现,乙酸乙酯萃取物具有较强的生物活性,因此对该萃取物进行了进一步的分离。

用 200~300 目硅胶粉 700 g,湿法装柱;称取乙酸乙酯萃取干物质 40 g,加适量乙酸乙酯溶解后上柱,用石油醚-丙酮体积比分别为 15:1、12:1、10:1、5:1、3:1、2:1、1:1 和乙酸乙酯依次梯度洗脱,采用等份法(每份 15 mL)接样,对收集液进行硅胶薄层层析(TLC)检测(以石油醚和丙酮不同比例混合溶液作展开剂),合并 R_f 相同的收集液并减压浓缩。对所得 R_f 不同的馏分用反枝苋作为受试植物进行室内除草活性测定,对活性较高的馏分进行再次柱层析(以石油醚-丙酮体积比 5:1 为洗脱剂),获得分离物,通过元素分析、红外光谱、核磁共振等测定,确定其结构,并进行除草活性测定。

1.5 数据分析方法

由同一处理的胚根长度的平均值计算抑制率。将数据进行浓度-对数和抑制率-机率值的转换求出毒力回归方程,计算有效中浓度 EC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 四种溶剂萃取物的除草活性

测定结果见表 1。可以看出,在浓度为 0.5 mg/mL 时,乙酸乙酯萃取物对反枝苋、生菜和黄瓜种子胚根生长的抑制率分别为 99.89%、63.53% 和 32.74%;明显高于石油醚萃取物和正丁醇萃取物对 3 种植物种子胚根的抑制率,因此,可以确定活性物质主要集中在乙酸乙酯萃取部分,且对反枝苋的抑制作用最强。

2.2 乙酸乙酯萃取部分柱层析各馏分的除草活性

对乙酸乙酯萃取物进行柱层析分离,共获得 17 个 R_f 不同的馏分,在浓度为 0.5 mg/mL 下测

定其对反枝苋的除草活性,结果如表 2。

由表 2 可知,在 0.5 mg/mL 浓度下,10 号馏分对反枝苋的抑制率达到 89.02%,9 号和 6 号馏

分分别为 72.61% 和 51.48%。因此,推断活性物质主要集中在 10 号、9 号和 6 号馏分中。

表 1 四种溶剂萃取物对 3 种植物种子胚根生长的抑制作用 (0.5 mg/mL)

Table 1 Inhibition of 4 extracts to the radical growth of 3 kinds of plant seeds (0.5 mg/mL)

| 萃取物 Fractions | 抑制率 Inhibition rate (%) | | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------|
| | 反枝苋 <i>A. retroflexus</i> | 生菜 <i>L. sativa</i> | 黄瓜 <i>C. sativus</i> |
| 乙酸乙酯萃取物 of ethyl acetate | 99.89 ±0.07 | 63.53 ±0.98 | 32.74 ±2.10 |
| 石油醚萃取物 of petroleum ether | 76.30 ±0.10 | 56.17 ±1.25 | 23.36 ±2.64 |
| 正丁醇萃取物 of n-butanol | 5.57 ±3.38 | - | - |
| 水萃取物 of water | 6.42 ±0.52 | - | - |

表 2 柱层析分离所得 17 个馏分在浓度为 0.5 mg/mL 下对反枝苋的除草活性

Table 2 Herbicidal activity of 17 fractions under 0.5 mg/mL against *A. retroflexus*

| 馏分 Fractions | 质量 Weight/g | 抑制率 Inhibition rate (%) | 馏分 Fractions | 质量 Weight/g | 抑制率 Inhibition rate (%) |
|--------------|-------------|-------------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| 1 (1~8) | 0.015 | 3.42 ±0.11 | 10 (178~190) | 0.132 | 89.02 ±1.04 |
| 2 (9~23) | 0.061 | 10.44 ±0.60 | 11 (191~211) | 1.021 | 25.27 ±0.79 |
| 3 (24~45) | 0.123 | 8.53 ±0.60 | 12 (211~223) | 5.162 | 31.44 ±1.08 |
| 4 (46~73) | 1.562 | 37.55 ±1.63 | 13 (224~246) | 1.268 | 26.07 ±0.30 |
| 5 (74~83) | 1.325 | 11.90 ±0.44 | 14 (246~261) | 0.348 | 21.44 ±0.74 |
| 6 (84~102) | 0.260 | 51.48 ±0.70 | 15 (262~271) | 1.652 | 10.71 ±0.79 |
| 7 (103~144) | 2.050 | 31.24 ±0.85 | 16 (272~286) | 1.306 | 12.60 ±0.70 |
| 8 (145~157) | 2.021 | 30.22 ±2.18 | 17 (287~296) | 0.259 | 9.66 ±0.49 |
| 9 (158~177) | 3.315 | 72.61 ±0.69 | | | |

2.3 活性成分的分离纯化与活性测定

由于 10 号馏分样品太少,故对 9 号馏分进行再次硅胶柱的分离纯化,得到白色晶体化合物 A (以体积比为 3:1 的石油醚:丙酮作展开剂时的 R_f

值为 0.59)。测定化合物 A 对反枝苋的除草活性,以草甘膦为对照药剂,计算出 EC_{50} 值和 95% 置信限,结果见表 3。浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的化合物 A 对反枝苋胚根生长的抑制作用见图 1。

表 3 化合物 A 和草甘膦对反枝苋的除草活性

Table 3 Herbicidal activity of compound A and glyphosate against *A. retroflexus*

| 供试样品 Samples | 毒力方程 Regression equation | 相关系数 (r) Coefficient of correlation | EC_{50} (95% CL) / ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------------|-----------------------------|--|--|
| 化合物 A compound A | $Y = -0.2959 + 3.0402x$ | 0.9130 | 55.20 (47.15 ~ 64.64) |
| 草甘膦 glyphosate | $Y = 3.9645 + 0.7428x$ | 0.9947 | 24.78 (11.94 ~ 51.42) |

由表 3 可知,化合物 A 和草甘膦对反枝苋抑制作用的 EC_{50} 值分别为 55.20 和 24.78 $\mu\text{g/mL}$ 。根据毒力方程的斜率和截距可以得出,草甘膦在低浓度下的抑制活性较化合物 A 的高,而高浓度下化合物 A 的活性较高。

2.4 除草活性成分的结构鉴定

通过红外、氢谱、碳谱、元素分析和熔点测定等分析手段对化合物 A 的结构进行了鉴定,结果如下:

$^1\text{H NMR}$: 1.34 (t, 3H, $J = 7.37$ Hz, $-\text{CH}_3$), 4.29 (q, 2H, $J = 7.21$ Hz, $-\text{CH}_2$), 6.92 (d, 2H, $J = 8.82$ Hz, Ar-H, 3, 3'), 7.90 (d, 2H, $J = 8.81$ Hz, Ar-H, 2, 2'), 9.13 (s, 1H, $-\text{CHO}$)。

$^{13}\text{C NMR}$: 14.66 ($-\text{CH}_3$), 60.89 ($-\text{CH}_2-$), 122.76 (Ar-C, 1), 132.37 (Ar-C, 2, 2'), 115.99 (Ar-C, 3, 3'), 162.52 ((Ar-C, 4), 206.31 ($-\text{CHO}$)。

IR , ν/cm^{-1} : 3218 (Ar-C-H), 2995 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 2978 ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$), 1673 ($-\text{CHO}$), 1607

(ArC), 1 591 (ArC), 1 447 (ArC), 1 287 (C-O-C), 849 (Ar).

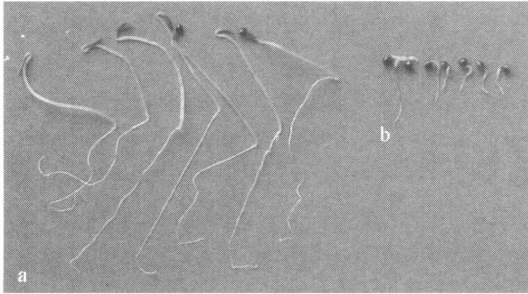


图 1 化合物 A 对反枝苋胚根生长的抑制作用

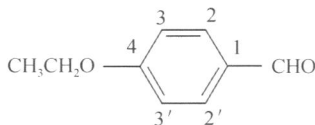
Fig 1 Inhibition of compound A against the radical growth of *A. retroflexus*

a: 对照 Untreated (CK) b: 处理 Treated (250 µg/mL)

元素分析: 实测值 C 72.01, H 6.52; 理论值 C 71.98, H 6.71。

熔点: 13 ~ 14 (文献值^[12] 13 ~ 14)。

结合文献 [13 ~ 15] 推断该化合物为对乙氧基苯甲醛 (p-ethoxybenzaldehyde), 分子式 $C_9H_{10}O_2$, 相对分子质量为 150.2, 结构式如下:



3 讨论

从植物中寻找除草活性化合物是新除草剂研发的一条重要途径。本试验采用活性追踪法, 从绒叶泡桐花乙酸乙酯萃取物中分离得到一种具有除草活性的物质——对乙氧基苯甲醛, 其对反枝苋的 EC_{50} 值为 $55.20 \mu\text{g}/\text{mL}$, 在高浓度下的活性高于对照药剂草甘膦, 而在低浓度下则稍低于草甘膦。

笔者只是对乙酸乙酯萃取物进行了进一步的分离和鉴定, 对石油醚萃取物未进行分离; 另外, 从乙酸乙酯萃取物中分离的活性物质也并不是活性最高的组份, 尽管 10 号馏分对反枝苋的抑制率为 89.02%, 但因其量少而没能再次进行分离与鉴定; 泡桐花中的其他主要除草活性成分以及对乙氧基苯甲醛对其他植物胚根生长的抑制情况尚需进一步研究。

梁峰涛^[16]对白花泡桐叶石油醚萃取部分的化学成分进行了研究, 共获得 13 个化合物, 对其中

10 个化合物的结构进行了鉴定; 李志刚^[17]对毛泡桐花中生物活性成分的研究证明共有 25 种化合物; 但迄今尚未见其他有关从泡桐中分离出对乙氧基苯甲醛的报道。对乙氧基苯甲醛是皂用香精香料^[12], 也用于医药中间体, 并具有治疗红斑痤疮的作用^[18], 尚未见有关其除草活性的报道。对乙氧基苯甲醛结构简单, 易于合成和结构改造, 可作为农药先导化合物进一步研究。

植物中的化学成分十分复杂, 生物活性多样, 植物提取物所表现出来的除草活性往往并非单一化合物, 可能是几种或几类化合物共同作用的结果; 同种物质对不同植物的除草作用可能不同。有关对乙氧基苯甲醛的作用机理及杀草谱还有待进一步研究。

致谢: 感谢山东大学药学院药物分析测试中心对该化合物进行的 IR、¹H NMR、¹³C NMR 测定; 感谢青岛农业大学化学与药学院孙家隆副教授、郝双红副教授的帮助!

参考文献:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae Academicae Sinicae Edita (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1979.
- [2] Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Scientific and Technical Publishers (上海科技出版社), 1977.
- [3] SONG Yong-fang (宋永芳), LUO Jia-liang (罗嘉梁), Ni Shan-qing (倪善庆), et al 泡桐花的化学成份研究 [J]. Chemistry & Industry of Forest Products (林产化学与工业), 1990, 10 (4): 265-272.
- [4] KANG K H, JANG S K, KM B K, et al Antibacterial Phenylpropanoid Glycosides from *Paulownia tomentosa* Steud [J]. Arch Pharm Research, 1994, 17 (6): 470-474.
- [5] KANG K H, HUH H, KM B K, et al An Antiviral Furanquinone from *Paulownia tomentosa* Steud [J]. Phototherapy Research, 1999, 13 (7): 624-626.
- [6] WANG Xiao (王晓), CHENG Chuan-ge (程传格), LIU Jian-hua (刘建华), et al 泡桐花精油化学成分分析 [J]. Chemistry & Industry of Forest Products (林产化学与工业), 2005, 25 (2): 99-102.
- [7] WANG Bao-hua (王宝华), GAO Zeng-ping (高增平), JIANG Pei-fen (江佩芬), et al 鲜泡桐花与阴干泡桐花化学成分的对比较研究 [J]. J Beijing Univ Traditional Chinese Med (北京中医药大学学报), 2003, 26 (3): 56-57.
- [8] FU Ming-zhe (付明哲), LU Xing-min (卢兴民), LU Gang (陆

- 刚), et al 泡桐花黄酮抗菌作用及对免疫机能的影响 [J]. Chin J Veterinary Med (中国兽医杂志), 1999, 25 (5): 46-47.
- [9] DU Xin (杜欣), SHI Yan-ping (师彦平), LI Zhi-gang (李志刚), et al 毛泡桐花中黄酮类成分的分离与结构确定 [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2004, 35 (3): 245-247.
- [10] LUO Lan (罗兰), MENG Zhao-li (孟昭礼), YUAN Zhong-lin (袁忠林). 绒叶泡桐提取液对黄瓜和蕹草种子胚根伸长的抑制作用 [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2004, 31 (3): 335-337.
- [11] ZANG A im ei (臧爱梅), LUO Lan (罗兰), MENG Zhao-li (孟昭礼), et al 绒叶泡桐叶提取物对植物种子胚根生长的抑制作用 [J]. Xiandai Nongye Keji (现代农业科技), 2007, 12: 50-52.
- [12] MA Shi-chang (马世昌). Dictionary of Chemical Products (化工产品辞典) [M]. Xi'an (西安): Shaanxi Science and Technology Press (陕西科技出版社), 1990.
- [13] POUCHERT C J. Aldrich Chemical Infrared Absorption Spectrum [M]. Aldrich Chemical Co. 3rd ed., 1981.
- [14] TANG Yu-ping (唐于平), LOU Feng-chang (楼凤昌), HU Jie (胡杰), et al 槐果皮中的脂溶性成份 [J]. Nat Prod Res Develop (天然产物研究与开发), 2001, 13 (3): 4-7;
- [15] DIAN J A. Lange's Handbook of Chemistry (兰氏化学手册) [M]. WEI Jun-fa, et al (魏俊发等译). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2003.
- [16] LIANG Feng-tao (梁峰涛). Studies on Chemical Constituents of the Extractives by Petroleum from the Leaves of Paulownia Fortunei (Seem.) Hensl (白花泡桐叶石油醚部分的化学成分研究) [D]. Lanzhou (兰州): Lanzhou University (兰州大学), 2004.
- [17] LI Zhi-gang (李志刚). The Bioactive Constituents from the Flower of Paulownia tomentosa (Thund) Steud (毛泡桐花生物活性的研究) [D]. Lanzhou (兰州): Lanzhou University (兰州大学), 2002.
- [18] DRAELOS Z D, FULLER B B. Efficacy of 1% 4-Ethoxybenzaldehyde in Reducing Facial Erythema [J]. Dermatol Surg, 2005, 31 (7): 881-885.

(Ed. JIN S H)

· 会讯 ·

国际食品法典农药残留委员会 (CCPR) 第 41 届年会在北京召开

4月20日,国际食品法典农药残留委员会(CCPR)第41届年会在北京召开。CCPR会议主席、中国工程院院士陈宗懋先生主持会议,中国农业部张桃林副部长、世界卫生组织驻华代表麦克当裴雷(M ukundanpillay)博士出席会议开幕式并致辞。来自66个国家和地区、5个成员国组织和政府间组织、9个国际非政府组织近320名代表参加了会议。在CCPR年会会议后,还举办了“农药残留与风险评估国际学术研讨会与培训班”和“中美农药助剂管理研讨会”,国内农药管理和科研单位200余人参加了会议和培训。10余名国外知名专家做了主题发言,中国农业大学潘灿平教授应邀在大会上做了“不确定度及其在农药残留分析中的应用”的报告。

CCPR第41届年会由设在农业部的CCPR秘书处具体承办。农药残留委员会是食品法典委员会的一个重要分委会。本次年会是中国作为CCPR主席国主持召开的第3次会议。在为期6天的会议中,评估和审议了43种农药在蔬菜、水果、粮食、肉类、禽类等动植物产品中约800项农药最大残留限量标准,并就修订CCPR风险评估原则、建立农药优先审议列表、制定小作物和特殊作物法典指南、如何推动全球农药最大残留限量标准统一协调等有关事宜进行了讨论。

(潘灿平 供稿)