

三裂蟛蜞菊中的倍半萜内酯成分及其化感作用

张玉虎, 刘梅芳, 凌铁军, 魏孝义*

(中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘要: 从外来种三裂蟛蜞菊 (*Wedelia trilobata*) 的全株中分离得到 6 个倍半萜内酯化合物, 通过光谱分析, 分别鉴定为 6-异丁酰基-三叶拉色芹内酯 (1)、1 β -acetoxo-4 α , 9 α -dihydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (2)、1 β , 9 α -diacetoxo-4 α -hydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (3a)、1 β , 9 α -diacetoxo-4 α -hydroxy-6 β -methacryloxyprostatolide (3b)、1 β , 4 α -dihydroxy-9 α -tigloyloxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4a)、9 α -angeloyloxy-1 β , 4 α -dihydroxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4b)。除 1 和 3a 外, 其余 4 个化合物均是首次从该植物中得到。通过种子萌发和幼苗生长抑制试验发现化合物 1、2、3a 和 3b 的混合物以及 4a 和 4b 的混合物对萝卜、小白菜和西红柿的幼苗生长有较强的抑制作用。4a 和 4b 的混合物对咸水虾有较高的毒性。

关键词: 三裂蟛蜞菊; 倍半萜内酯; 化感作用

中图分类号: Q949.783.506

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)06-0533-05

Allelopathic Sesquiterpene Lactones from *Wedelia trilobata*

ZHANG Yu-hu, LIU Mei-fang, LING Tie-jun, WEI Xiao-yi*

(South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Science, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Six sesquiterpene lactones were isolated from the whole plant of *Wedelia trilobata* (Compositae). On the basis of spectral data, the structures of these constituents were identified as trilobolide-6-O-isobutyrate (1), 1 β -acetoxo-4 α , 9 α -dihydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (2), 1 β , 9 α -diacetoxo-4 α -hydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (3a), 1 β , 9 α -diacetoxo-4 α -hydroxy-6 β -methacryloxyprostatolide (3b), 1 β , 4 α -dihydroxy-9 α -tigloyloxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4a), and 9 α -angeloyloxy-1 β , 4 α -dihydroxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4b). All compounds except 1 and 3a were isolated from this plant for the first time. Compounds 1, 2, a mixture of 3a and 3b, and a mixture of 4a and 4b exhibited potent growth inhibitory effect on the seedlings of radish, cabbage, and tomato in seed germination and seedling growth inhibition test. The mixture of 4a and 4b showed toxicity to brine shrimp in lethality test.

Key words: *Wedelia trilobata*; Sesquiterpene lactones; Allelopathy

三裂蟛蜞菊 (*Wedelia trilobata* (L.) A. S. Hitchc.) 是菊科蟛蜞菊属的一种草本植物, 又名南美蟛蜞菊, 原产于热带美洲, 20 世纪 70 年代作为地被植物引入我国, 现在华南地区成为一种严重危害性杂草。三裂蟛蜞菊生长、繁殖迅速, 很少有病虫害的发生, 具有极强的入侵性。其群落中其它种类的植物较少, 多形成单一群落。以前的研究发现三裂蟛蜞菊有较强的化感作用 (Allelopathy)^[1], 但其化感物

质不十分明确。国内外曾经对三裂蟛蜞菊中的化学成分进行了研究, 主要成分是二萜类、倍半萜内酯类、甾醇类等化合物^[2, 3]。为了深入了解三裂蟛蜞菊中的化感物质及其化感作用, 探讨其入侵机制, 我们对其化学成分及其化感作用进行了研究。本文报道了从三裂蟛蜞菊全草中分离、鉴定的 6 个倍半萜内酯成分, 以及这些成分对植物幼苗生长的抑制作用和对咸水虾的毒性。

收稿日期: 2004-03-16 接受日期: 2004-04-14

基金项目: 中国科学院华南植物研究所所长基金(20023299)资助

* 通讯作者 Corresponding author

1 材料和方法

1.1 材料

三裂蟛蜞菊于 2002 年 7 月采自中国科学院华南植物园。种子萌发和幼苗生长抑制试验所用的受体植物分别是萝卜(*Raphanus sativus*)、小白菜(*Brassica chinensis*) 和西红柿(*Lycopersicon esculentum*)。咸水虾致死试验所用咸水虾(*Artemia salina*) 卵产自 Aquatic Lifeline, Inc. (Salt Lake City, Utah, USA)。柱层析用硅胶为青岛海洋化工厂生产, 柱层析用凝胶为 Sephadex LH-20, 薄层层析板是烟台黄务硅胶开发试验厂生产。

1.2 仪器

熔点用 MP-S2 显微熔点仪(温度计未校正)测定; 高效液相色谱仪用 Waters 600, 检测器为 Waters 2487 双波长紫外检测器, 半制备色谱柱为 Nova-Pak HR C18 (6 μ m, 7.8 \times 300 mm)。ESIMS 用 API 2000 LC/MS/MS 仪, 用正离子模式, 直接进样测定; ^1H NMR 谱和 ^{13}C NMR 谱用 Bruker DRX-400 型超导核磁共振仪测定, 以四甲基硅烷(TMS)为内标、氘代氯仿(CDCl_3)为溶剂。

1.3 提取、分离

三裂蟛蜞菊干粉(3.5 kg)用 95% 的乙醇浸提 3 次, 每次 48 h。乙醇提取液减压浓缩后加水形成悬浮液, 依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取。氯仿部分提取物(21 g)经硅胶柱层析, 氯仿-甲醇(98:2-9:1)梯度洗脱, 用丙酮重结晶得到 **1**(0.875 g, 0.25%)、**2**(0.612 g, 0.174%)、混合结晶 **3**(1.5 g,

0.428%)及混合结晶 **4**(1.76 g, 0.532%)。取混合结晶 **4**(30 mg)用高效液相色谱[流动相为甲醇-水(65:35), 紫外检测波长为 215 nm, 流速为 1.0 ml min⁻¹, 柱压为 3 000 Pa]进行制备分离得到 **4a**(15 mg)和 **4b**(10 mg)。

1.4 结构鉴定

各化合物的 ^1H NMR 数据见表 1; ^{13}C NMR 数据见表 2。

6-异丁酰基-三叶拉色芹内酯(trilobolide-6-O-isobutyrate, 1) 无色针状结晶(丙酮), mp 225 $^{\circ}\text{C}$, [α]_D²⁵ + 33(c 0.305, 甲醇), 分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_9$; ESIMS m/z: 453 [M + H]⁺, 435 [M + H - H₂O]⁺, 411 [M + H - CH₂CO]⁺, 394, 245, 227, 209, 181。光谱数据与文献[2]报道一致。

1 β -Acetoxy-4 α ,9 α -dihydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (2) 无色晶体(丙酮), mp 190 $^{\circ}\text{C}$, [α]_D²⁵ + 28(c 0.215, 甲醇), 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_8$; ESIMS m/z: 411[M + H]⁺, 393 [M + H - H₂O]⁺, 325 [M + H - CH₂CO - C₃H₈]⁺, 227, 199, 185, 118, 105。光谱数据与文献[4]报道一致。

1 β ,9 α -Diacetoxy-4 α -hydroxy-6 β -isobutyroxyprostatolide (3a)和 1 β ,9 α -diacetoxy-4 α -hydroxy-6 β -methacryloxyprostatolide (3b)(混合结晶 3) 无色针状结晶(丙酮), [α]_D²⁵ + 101(c 0.235, 甲醇); 分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_9$ (**3a**)和 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_9$ (**3b**); ESIMS (**3a**) m/z: 453[M + H]⁺, 435 [M + H - H₂O]⁺, 394, 375, 347, 305, 287, 263, 245, 227, 210, 199; ESIMS (**3b**) m/z: 451 [M + H]⁺, 433 [M + H - H₂O]⁺, 391 [M + H - CH₂CO]⁺,

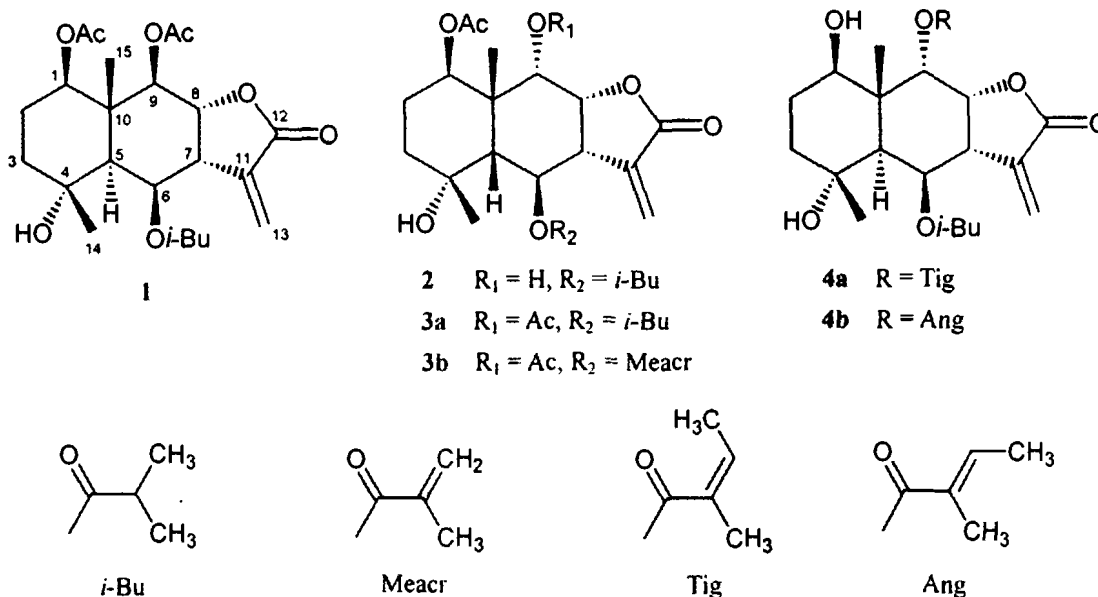


表 1 化合物 1、2、3a、3b、4a 和 4b 的 ¹H NMR 数据
Table 1 ¹H NMR data for compounds 1, 2, 3a, 3b, 4a, and 4b

质子 Proton	1	2	3a	3b	4a	4b
H-1	4.56 dd (4.0, 4.0)	5.09 dd (3.6, 3.6)	5.51 dd (3.6, 3.6)	5.50 dd (3.6, 4.0)	3.90 dd (11.2, 4.8)	3.91 dd (11.2, 4.8)
H-2 α	1.80 m	2.25 m	2.19 m	2.18 m	2.14 m	2.16 m
H-2 β	1.57 m	1.58 m	1.28 m	1.28 m	1.54 m	1.56 m
H-3 α	1.75 m	1.80 m	1.74 m	1.75 m	1.79 m	1.79 m
H-3 β	1.16 m	1.55 m	1.22 m	1.22 m	1.46 m	1.48 m
H-5	1.86 d (2.8)	1.73 d (3.6)	1.70 d (10.8)	1.70 d (10.8)	1.42 d (2.8)	1.28 d (2.4)
H-6	5.94 dd (4.0, 2.8)	5.82 dd (3.6, 3.6)	5.75 dd (10.8, 8.4)	5.77 dd (10.8, 8.4)	5.47 dd (4.4, 2.8)	5.47 dd (4.0, 2.8)
H-7	3.15 ddd (9.6, 8.0, 2.3)	3.20 m	3.40 m	3.41 m	3.22 ddd (4.4, 3.2, 2.8)	3.24 ddd (4.0, 3.2, 2.8)
H-8	4.86 dd (4.4, 8.0)	4.91 dd (3.6, 8.8)	4.94 dd (9.6, 3.2)	4.96 dd (9.6, 3.2)	5.43 dd (3.2, 1.6)	5.49 dd (4.0, 2.0)
H-9	5.20 d (4.4)	3.82 d (3.6)	5.28 d (3.2)	5.32 d (3.2)	4.61 dd (2.8, 1.6)	4.64 dd (2.4, 2.0)
H-13 α	6.22 d (4.0)	6.28 d (4.0)	6.22 d (3.2)	6.23 d (3.2)	5.80 s	5.81 s
H-13 β	5.64 d (3.2)	5.78 d (4.0)	5.54 d (2.8)	5.55 d (2.85)	6.61 s	6.62 s
H-14	1.35 s	1.06 s	1.27 s	1.27 s	1.27 s	1.26 s
H-15	1.34 s	1.29 s	1.24 s	1.24 s	1.30 s	1.31 s
6-Ester	2.57 sept (6.8)	2.53 sept (7.2)	2.60 sept (7.2)		2.61 sept (6.8)	2.62 sept (6.8)
	1.20 d (6.8)	1.16 d (7.2)	1.23 d (7.2)	6.24 br s 5.75 br s	1.21 d (6.8)	1.23 d (6.8)
	1.18 d (6.8)	1.17 d (7.2)	1.20 d (7.2)	1.99 s	1.25 d (6.8)	1.28 d (6.8)
1-OAc	1.98 s	2.03 s	1.98 s	1.98 s		
9-Ester	1.92 s		1.94 s	1.95 s	1.73 d (1.6)	1.88 d (7.2)
					1.74 d (3.2)	1.91 d (1.6)
					6.77 dd (3.2, 1.6)	6.12 dd (7.2, 1.6)

表 2 化合物 1、2、3a、3b、4a 和 4b 的 ¹³C NMR 数据
Table 2 ¹³C NMR data for compounds 1, 2, 3a, 3b, 4a, and 4b

碳 Carbon	1	2	3a	3b	4a	4b
C-1	73.0	75.5	68.3	68.1	70.3	70.3
C-2	24.0	24.4	21.8	21.7	27.9	28.0
C-3	41.6	34.0	34.8	34.8	41.4	41.4
C-4	71.1	68.5	70.1	70.0	71.0	71.1
C-5	44.9	51.1	54.1	54.9	43.5	43.5
C-6	68.0	70.8	73.1	73.3	74.1	74.1
C-7	43.4	42.9	42.8	42.4	43.9	44.0
C-8	72.1	74.3	73.0	73.0	64.6	64.5
C-9	70.6	71.4	71.8	71.4	81.9	81.9
C-10	41.3	41.0	40.6	40.5	44.4	44.5
C-11	134.1	133.9	135.8	135.5	131.9	132.2
C-12	170.5	170.4	169.0	169.1	163.6	163.5
C-13	119.2	122.5	122.6	122.6	133.3	133.2
C-14	14.3	21.7	22.2	22.4	25.0	25.1
C-15	26.4	29.7	31.7	31.5	14.3	14.3
6-Ester	19.0	18.7	18.9	18.2	19.0	19.1
	18.4	18.7	18.4	128.1	18.5	18.6
	34.5	34.1	34.6	136.9	34.5	34.5
	176.2	175.9	177.8	168.1	176.3	176.3
1-OAc	21.0	21.2	21.2	21.1		
	169.3	170.6	170.4	170.3		
9-Ester	20.3		20.5	20.5	11.8	15.9
	169.1		169.1	168.8	14.5	20.4
					127.7	126.9
					139.3	140.3
					166.7	166.5

347, 305, 287, 263, 245, 227, 181。结晶 3 的 ¹H NMR (表 1)和 ¹³C NMR (表 2) 谱与化合物 1 的相似,符合 1, 9- 二乙酰氧基桉叶烷内酯(eudesmolides)的光谱特征,但多数信号呈现对峰,通过与文献[4]对比,证明结晶 3 为 3a 和 3b 的混合物。¹H NMR 峰面积积分值显示 2 个化合物在混合物中的比例接近 1:1。

1 β, 4 α -Dihydroxy-9 α -tigloyloxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4a) 白色粉末,分子式为 C₁₂H₃₄O₈; ESIMS m/z: 451[M+H]⁺, 345[M+H-C₃H₇COOH-H₂O]⁺, 263, 245, 227, 199, 181, 123, 99。光谱数据与文献[5]报道一致。

9 α -Angeloyloxy-1 β, 4 α -dihydroxy-6 β -methylpropanoylprostatolide (4b) 白色粉末,分子式为 C₂₄H₃₄O₈; ESIMS m/z: 451[M+H]⁺, 345[M+H-C₃H₇COOH-H₂O]⁺, 227, 199, 181, 83。光谱数据与文献[5]报道一致。

1.5 种子萌发和幼苗生长抑制试验

种子萌发和幼苗生长抑制试验用培养皿滤纸片法^[6]。具体方法如下:在内径为 2.5 cm 的培养皿中放入两张直径比 2.5 cm 略小的圆形滤纸。将分离得到的待测样品组分 1 (化合物 1)、2 (化合物 2)、3(3a 和 3b 的混合结晶)、4 (4a 和 4b 的混合物)用丙酮配成浓度分别为 1 000 μg ml⁻¹、500 μg ml⁻¹、250 μg ml⁻¹、

100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 、50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 的样品溶液, 分别吸取 0.5 ml 样品溶液滴加到滤纸片上, 待溶剂挥发完全后, 于培养皿中加入 0.5 ml 0.1% 的吐温 -20 (助溶作用) 水溶液, 每个处理浓度设三个重复。以不含样品的丙酮代替样品溶液同上处理作为对照组。在滤纸上放入 10 至 12 粒供试植物种子, 在适宜的条件下培养 4 d 后观察种子的萌发和幼苗生长, 并测量幼苗的苗高和根长, 计算每组处理的平均苗高和根长, 通过与对照组的苗高和根长相比较, 计算各处理浓度的抑制率[(对照组苗高或根长 - 处理组苗高或根长) \div 对照组苗高或根长 \times 100%], 结果如表 3。根据各个处理浓度的抑制率用 SPSS 数理统计方法计算半数抑制浓度(IC₅₀), 结果如表 4。本研究用萝卜、小白菜和西红柿作为试验植物。

1.6 咸水虾致死试验

咸水虾致死试验参照文献[7], 具体方法如下: 取 30 cm \times 20 cm \times 4 cm 瓷盘备用。取一不透光的硬塑料片, 裁成宽刚好为瓷盘的深度、长刚好能紧密卡入瓷盘中, 在该塑料片上打多个直径约为 2 mm 的小孔, 将该塑料片卡在瓷盘的 2/3 处, 将瓷盘隔成大小不等的两个隔间。在该瓷盘中加入约 1 500 ml 海水, 取咸水虾卵少量 (约 0.2-0.4 g) 加入大隔间的海水中, 在大隔间上盖上锡纸遮光, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 左右、有光条件下孵化, 并用微型通气泵向小隔间的海水不断通气, 48 h 内即可孵出小虾虫。孵出的小虾虫由于其趋光性, 通过隔板上的小孔进入小隔间, 在其通过小孔时, 脱去卵壳。

将待测样品(同种子萌发和幼苗生长抑制试验)

表 3 组分 1-4 对小白菜、萝卜、西红柿幼苗生长的抑制率 (%)

Table 3 Inhibitory rates (%) of compositions 1-4 in seedling growth of cabbage, radish and tomato

组分 Composition	浓度 Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	小白菜 Cabbage		萝卜 Radish		西红柿 Tomato	
		苗高 Shoot height	根长 Root length	苗高 Shoot height	根长 Root length	苗高 Shoot height	根长 Root length
1	1000	46	82	69	80	94	95
	500	46	78	61	69	93	94
	250	41	63	58	56.5	64	65
	100	29	31	53	43.5	42	34
	50	30	25	52	31.5	20	17
2	1000	51	87	61	77	92	93
	500	34	77	54	64	65	33
	250	32	44	51	38	50	22
	100	30	33	43	36	30	12
	50	19	16	28.7	27	15	10
3	1000	52	78	68	31.8	95	96
	500	52	53	55	15.4	83	77
	250	46	45	52	11.5	71	65
	100	45	36	45	3.9	43	50
	50	19	21	32	2.0	22	30
4	1000	57	85	68.3	78	92	95
	500	57	72	68	69	90	87
	250	50	39	59	60	80	66
	100	47	35	57.8	30	34	51
	50	40	31	54.4	19	20	33

表 4 组分 1-4 对小白菜、萝卜、西红柿幼苗生长的 IC₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

Table 4 IC₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$) of compositions 1-4 for cabbage, radish, and tomato seedlings

组分 Composition	小白菜 Cabbage		萝卜 Radish		西红柿 Tomato	
	苗高 Shoot height	根长 Root length	苗高 Shoot height	根长 Root length	苗高 Shoot height	根长 Root length
1	527	171	848	246	140	170
2	1187	286	294	587	630	624
3	515	452	220	1364	129	132
4	2314	474	830	216	132	209

配成浓度为 10.0 mg ml^{-1} 、 1.0 mg ml^{-1} 、 0.1 mg ml^{-1} 的丙酮溶液,取不同浓度的样品溶液 0.1 ml 分别滴加在事先准备好的圆形滤纸片(直径约 0.9 cm)上。待溶剂完全挥发后将滤纸片放入内径约 1 cm 、具刻度的平底小瓶中。用移液管吸取小虾虫 10 只加入小瓶中,加海水至 1 ml 刻度,使样品的浓度分别为 1000 、 100 和 $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 分别在每个小瓶中加入 1 滴 0.05% 干酵母海水溶液作为小虾的食物。每个浓度组设 5 个重复。以丙酮代替样品溶液同上处理作为对照。于 24 h 观察、记录咸水虾的死亡数。按文献 [7] 方法计算每组处理的平均死亡率,根据各组分在不同浓度下的平均死亡率用 SPSS 法计算半数致死浓度(LC_{50})。

2 结果和分析

三裂蜆蜞菊乙醇提取物的氯仿溶解部分经硅胶柱层析分离得到 2 个化合物(1、2)和 2 个混合结晶(3、4),混合结晶 4 用高效液相色谱制备分离得到化合物 4a 和 4b。用光谱分析及与文献对比、鉴定结构,化合物 1 为 6-异丁酰基-三叶拉色芹内酯(trilobolide-6-O-isobutyrate), 2 为 1β -acetoxo- 4α , 9α -dihydroxy- 6β -isobutyroxyprostatolide, 3 为 1β , 9α -diacetoxo- 4α -hydroxy- 6β -isobutyroxyprostatolide (3a) 和 1β , 9α -diacetoxo- 4α -hydroxy- 6β -methacryloxyprostatolide (3b) 的混合物。4a 和 4b 为一对差向异构体,只是异戊稀酰基中双键的构型不同,分别是 1β , 4α -dihydroxy- 9α -tigloyloxy- 6β -methylpropanoylprostatolide 和 9α -angeloyloxy- 1β , 4α -dihydroxy- 6β -methylpropanoylprostatolide。上述成分,除 1 和 3a 外,均是首次从三裂蜆蜞菊中发现。

种子萌发和幼苗生长抑制试验发现化合物 1、2、3a 和 3b 的混合结晶 3、4a 和 4b 的混合物 4 对种子萌发率无影响,但都对受试植物幼苗的生长具有较强的抑制作用,在浓度为 $1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 时,对 3 种受体植物幼苗生长的抑制率均达 50% ,最高的达到 96% (表 3)。从表 3 和表 4 可见:组分 1、3、4 对西红柿的根长和苗高均有强烈抑制作用, IC_{50} 为 129 至 $209 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; 4 个组分对小白菜根长的抑制作用强于对苗高的抑制作用,其中化合物 1 和 2 对根长的 IC_{50} 分别达 $171 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 和 $286 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$; 对萝卜幼苗的生长,组分 2 和 3 对苗高的抑制作用强于对

根长的抑制作用,而组分 1 和 4 则正好相反。不同组分对不同受体植物及同一受体植物的苗高和根长表现出不同的抑制作用。

咸水虾致死试验是一种快速测定样品毒性的方法,以前主要用于环境毒性和农药残留的检测,后来又用于生物活性物质的筛选^[7],本研究首次将其用于化感作用的测定。对四个组分的咸水虾致死试验显示,组分 1 在 1000 、 100 和 $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 浓度下咸水虾的平均死亡数分别为 3、1、1; 组分 2 分别为 2、1、1; 组分 3 分别为 4、2、1; 组分 4 分别为 10、4、2; 对照组无一死亡。经计算组分 1-3 的 LC_{50} 均大于 $2000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 说明组分 1-3 对咸水虾无明显毒性; 但组分 4 在 $1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 浓度时,咸水虾死亡率为 100% , 在 $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 和 $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 浓度时,死亡率分别是 40% 和 20% , LC_{50} 为 $72.9 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 说明组分 4 对咸水虾有较强毒性。以前的研究发现化合物 4a 和 4b 在 $1.0 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ 的浓度时对 HeLa S₃ 细胞生长的抑制率分别为 80% 和 87% ^[5], 本研究的试验结果与文献报道的细胞毒性试验结果一致。从结构上看,六个化合物具有相同的骨架结构,主要区别在于 4a 和 4b 有一异戊烯酰氧基,这一基团可能与其毒性密切相关。

参考文献

- [1] Nie C R (聂呈荣), Zeng R S (曾任森), Li H S (黎华寿), et al. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of *Wedelia trilobata* on peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. J Peanut Sin (花生学报), 2002, 31(3):1-5. (in Chinese)
- [2] Bohlmann F, Ziesche J, Robert M K, et al. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an ent-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia* [J]. Phytochemistry, 1981, 20(4):751-756.
- [3] Huang X S (黄雪松), Huang R C (黄荣春). Studies on enriched yield of wedeliatrilolactone A and B in *Wedelia trilobata* by macroporous resin [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2003, 34(8):701-704. (in Chinese)
- [4] Ragasa C Y, Padolina W G. New eudesmanolide sesquiterpenes from a Philippines collection of *Wedelia prostrata* [J]. J Nat Prod, 1993, 56(3):386-393.
- [5] Farag S F, El-Emary N A, Niwa M. Eudesmanolides from *Wedelia prostrata* [J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44(4):661-664.
- [6] Zeng R S (曾任森). Review on bioassay methods for allelopathy research [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 1999, 10(1):123-126. (in Chinese)
- [7] Meyer B N, Ferrigni N R, Putham J E, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents [J]. Planta Med, 1982, 45(2):31-34.