

小桐子果壳化感物质的初步分离和鉴定

李育川^{1,2}, 郭巧生^{2*}, 申海进^{2,3}, 房海灵^{2,4}

(1. 昆明学院农学院, 昆明 650214; 2. 南京农业大学中药材研究所, 南京 210095; 3. 常州卫生高等职业技术学校药学院, 江苏 常州 213000; 4. 江西省林业科学院, 南昌 330032)

摘要: 为明确小桐子(*Jatropha curcas* L.)果壳的化感物质, 对小桐子果壳水提物的水萃取物进行了分离和初步鉴定。结果表明, AO 活性部位为 10 g L⁻¹ 时, 对萝卜(*Raphanus sativus* Linn.)、苏丹草[*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf]幼苗生长的抑制率均高于 80%。经对 AO 部位进行 HPLC-MS 分析, 选择鉴定了含量较高的 6 个化合物, 其含量为总量的 60.13%。其中, 化合物 6 初步鉴定为槐木皂苷 V (Araliasaponin V), 化合物 1、2、3、4、5 相似, 初步鉴定为肽和蛋白, 其相对含量之和为 56.13%。利用小桐子果壳可开发植物源除草剂。

关键词: 小桐子; 果壳; 化感物质; 分离鉴定; HPLC-MS

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.01.011

Preliminary Isolation and Identification of Allelopathic Compounds from *Jatropha curcas* L. Fruit Shells

LI Yu-chuan^{1,2}, GUO Qiao-sheng^{2*}, SHEN Hai-jing^{2,3}, Fang Hai-lin^{2,4}

(1. College of Agriculture, Kunming University, Kunming 650214, China; 2. Institute of Chinese Medicine Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Department of Pharmacy, Changzhou Higher Health Occupation Technical School, Changzhou 213000, China; 4. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China)

Abstract: In order to understand allelopathic compounds from fruit shells of *Jatropha curcas* L., the aqueous extract were isolated and identified. The results showed that *Raphanus sativus* Linn. and *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf seedlings were treated with 10 g L⁻¹ AO active part, inhibition rates of growth were higher than 80%. Six compounds in AO were identified by HPLC-MS, accounting for 60.13% of the total content. The compound 6 was identified primarily to be Araliasaponin V, the other five compounds were similar and identified primarily to be peptide or protein compounds, which the sum of relative content was 56.13%. So, it was suggested that the fruit shells of *J. curcas* could be used to develop botanical herbicide.

Key words: *Jatropha curcas*; Fruit shell; Allelopathic compound; Isolation and identification; HPLC-MS

小桐子(*Jatropha curcas* L.), 又名麻疯树, 为大戟科(Euphiaceae)麻疯树属落叶灌木。小桐子原产美洲热带, 现广泛分布于全球热带地区, 在中国西南地区有大量栽培种或半野生种^[1]。该植物种仁的含油量最高可达 61.5%, 是一种热带地区极为适宜的生物柴油原料植物, 现云南、四川、贵州等地已有

大面积栽培。小桐子是传统的药用^[2]和有毒植物^[3], 其全株均可入药。随着云南 6.67 × 10⁵ hm² 生物柴油小桐子原料基地的建设, 如何科学合理地解决生产过程中产生的大量“废弃物”(云南省每年约有 9 × 10⁵ t 果壳和 3 × 10⁶ t 修剪下的枝叶), 这是生物柴油小桐子产业发展中急需解决的难题。变废为宝,

收稿日期: 2012-05-14 接受日期: 2012-09-24

基金项目: 昆明学院科研项目(XJ11L003)资助

作者简介: 李育川(1972~), 男, 副教授, 博士, 主要从事药用植物资源利用与评价研究。E-mail: lychuan72@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gqs@njau.edu.cn

利用小桐子果壳、茎枝、油饼等副产物开发植物源农药产品,前景广阔。

目前,国内外对小桐子化感活性研究已有少量报道。有研究报道小桐子果壳和枝叶的水提物对萝卜(*Raphanus sativus* Linn.)、苏丹草[*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf]、黑麦草(*Lolium perenne* L.)等植物的种子发芽和幼苗生长有很强的抑制作用^[4];马沅和陈放等^[5]报道小桐子枝叶和种子的水浸出物对玉米(*Zea mays* L.)种子萌发和幼苗生长有显著抑制作用。可见,小桐子中含有丰富的化感物质,对其化感物质进行系统深入的研究具有重要意义。本文对小桐子果壳水提取物的水萃取相进行化感物质的分离和初步鉴定,以期利用小桐子果壳开发植物源除草剂提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

实验用的小桐子(*Jatropha curcas* L.)果壳水提取物的水萃取相样品按李育川等^[4]的方法制备。实验用的萝卜(*Raphanus sativus* Linn.)和苏丹草[*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf]种子购于江苏省农业科学院种子门市部。

LC-MS (LC pumper surgeor、auto sampler surgeor、LCQ DECA XP plus)为美国 Thermo Finnigan 生产。95%乙醇、石油醚(I)、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和甲醇均为国产分析纯。乙腈为色谱纯(Fisher 公司),实验用水为娃哈哈纯净水。

1.2 样品的制备

按照李育川等^[4]方法对小桐子果壳先用蒸馏水冷浸提取,减压浓缩后再将浸膏用水溶解,然后依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇对小桐子果壳水粗提取物进行分离萃取,最后将剩余水相减压浓缩,获得具有化感活性的样品。

1.3 水萃取相的醇沉法分离

参考卢艳花等^[7]的醇沉法(Sevage 法),对小桐子果壳水粗提物的水萃取物进行分离。准确称取小桐子果壳的水萃取物 20 g 于 500 mL 三角瓶中,加 100 mL 蒸馏水,使其充分溶解,然后加入 95%乙醇 50 mL,密封瓶口;静置过夜后,倒出上清液经减压浓缩得 AN 样品;再向沉淀中加入 95%乙醇

100 mL,静置过夜后倒出上清液,重复 3 次,最后过滤,将滤液与收集所得 95%乙醇洗涤液合并,减压浓缩得样品 AS;过滤所得不溶物为 AO 样品。

1.4 活性测定方法

准确称取经醇沉法分离所得样品各 1.0 g,分别加入 1.0 mL 吐温-80,拌匀,使其充分乳化,再用蒸馏水溶解,定容至 100 mL,配制成 10 g L⁻¹ 的溶液。对照液为 1.0 mL 吐温-80 加蒸馏水定容至 100 mL。

供试样品对苏丹草和萝卜的抑制效率参照陈志云等^[5]和李育川等^[4]的方法。每处理 3 个重复,72 h 后(苏丹草培养 96 h)分别测定幼苗的根长(苏丹草测主根)和茎长,计算抑制率。抑制率(%) = [(对照根或茎生长长度 - 处理根或茎生长长度) / 对照根或茎生长长度] × 100%

1.5 AO样品薄层点样显色检视

显色指示剂参考卢艳花^[7]的专属性显色剂配制方法。薄层点样时,首先称取 AO 样品 0.1 g,用 10 mL 乙醇溶剂溶解,用 10 μL 毛细管点到薄层板上,待溶剂挥发后,根据检试物质不同,有的在紫外灯下照射观察,有的喷显色剂,有的喷显色剂后放入 110℃烘箱中烘烤后观察。每种显色检试做 3 次重复。待测样品化学成分的系统预识参照卢艳花^[3]的方法。

1.6 薄层酸水解

参考张晓丽等^[8]的方法,将点有化合物 6 和黄芩苷的高效薄层板放入盛有 7 mL 浓盐酸的烧杯中,杯口覆双层滤纸和塑料薄膜,置 80℃水浴中加热 20 min,取出挥发干净 HCl,点齐墩果酸标准品,以氯仿-甲醇(10:1)展开,50%硫酸喷雾加热显色,检出鉴定苷元为齐墩果酸。同法进行薄层酸水,标准糖为标准品进行对照检出。

1.7 HPLC-MS分析

HPLC 条件:Thermo Electron corporation 色谱柱 Zorbax SB-C18 (250 mm × 2.1 mm, 5 μm);流动相:溶剂 A 为乙腈,溶剂 B 为水,等度洗脱:18%溶剂 A, 82%溶剂 B;流速:0.2 mL min⁻¹;进样方式:自动进样 0.2 μL。质谱条件:LCQ DECA XP plus (电喷雾离子阱质谱仪),离子源:ESI;质量分析

器:离子阱分析器;负离子检测模式;毛细管温度:275℃;源电压:5 kV;源毛细管电压:15 kV;质量数扫描范围 100 ~ 2000 m/z ;干燥气为氮气,进样量:20 μL 。质谱数据采集模式:自动质谱/质谱。高效液相和质谱数据采集和分析采用化学工作站进行(Thermo Finnigan)。

1.8 数据处理和分析

数据采用 SPSS 16.0 进行方差分析。

2 结果和分析

2.1 样品的化感活性

具有化感活性的小桐子果壳水粗提物的水萃

取相样品经醇沉法分离后,各分离样品对萝卜和苏丹草幼苗生长均有抑制作用(表 1)。结果表明,分离所得的 3 个样品 AO、AN 和 AS 对萝卜和苏丹草幼苗生长都表现出一定的抑制作用,且 3 种样品对 2 种供试植物种子幼苗生长的抑制作用达显著水平。其中, AO 样品的抑制作用最强,对萝卜和苏丹草幼苗根长的抑制率分别为 88.35%、84.50%,对茎高的抑制率分别为 87.31%、86.91%,显著高于其它 2 种样品($P < 0.05$),且与广谱性除草剂绿麦隆无显著差异,显示出极高的化感活性;AN 样品对萝卜和苏丹草幼苗根长和茎高的抑制率均在 35% ~ 55%,显示出一定的抑制活性;AS 样品对萝卜和苏丹草幼苗根长和茎高的抑制率最小,其抑制率均低于 25%,显著低于其它 2 种样品。

表 1 样品对植物幼苗生长的抑制率(%)

Table 1 Inhibition rate (%) of separated fractions to seedling growth

分离的样品 Separated fraction	萝卜 <i>Raphanus sativus</i>		苏丹草 <i>Sorghum sudanense</i>	
	根长 Root length	茎高 Stem height	根长 Root length	茎高 Stem height
AN	38.81b	44.13b	38.72b	51.43b
AO	88.35a	87.31a	84.50a	86.91a
AS	24.61c	23.48c	8.15c	16.43c
绿麦隆 Chlortoluron	89.16a	88.93a	87.84a	88.33a

同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 5\%$)。

Data followed different small letters within column indicate significant difference at 0.05 level.

2.2 AO样品的薄层点样显色检视

样品 AO 经薄层点样后用各类专属显色剂显色结果见表 2。结果表明,初步确定样品 AO 可能含有多糖、皂苷、氨基酸及蛋白类、萜类和甾体类物质。

2.3 AO样品的HPLC-MS分析

对 AO 样品进行 HPLC-MS 分析,各化合物在负离子模式下均有较好响应。结合文献资料对图谱进行解析,选择鉴定含量较高的 6 个化合物,为总量的 60.68%。其中化合物 1 ~ 5 相似,初步鉴定为肽和蛋白,其相对含量超过 56.13%;化合物 6 初步鉴定为楸木皂苷 V (Araliasaponin V)。

化合物 1 RT:2.11;相对质量分数 5.93%。ESI-MS m/z : 141.5 (相对丰度 100%)、149.2、267.2、279.1、391.4、1162.2、1525.7、1623.3、1918.1、1977.6。

化合物 2 RT:2.61;相对质量分数 15.42%。

ESI-MS m/z : 141.5 (相对丰度 100%)、176.7、267.3、279.2、391.4、393.5、1060.3、1525.6、1623.1、1918.3、1977.4。该化合物有 8 个峰与化合物 1 基本一致。

化合物 3 RT:2.78;相对质量分数 19.77%。

ESI-MS m/z : 141.8 (相对丰度 100%)、149.2、267.4、279.3、391.4、393.6、1623.2、1918.4、1977.5。该化合物有 7 个峰与化合物 1、2 基本一致。

化合物 4 RT:2.95;相对质量分数 11.27%。

ESI-MS m/z : 141.7 (相对丰度 100%)、149.4、267.2、279.4、391.4、393.4、1623.0、1918.2、1977.4。该化合物有 7 个峰与化合物 1 ~ 3 基本一致。

化合物 5 RT:3.25;相对质量分数 3.76%。

ESI-MS m/z : 136.2 (相对丰度 100%)、141.6、176.7、267.3、279.2、390.3、391.4、1060.5、1623.4、1977.6。该化合物有 7 个峰与化合物 1 ~ 4 基本一致。

表 2 样品 AO 的薄层点样显色

Table 2 Color reaction of AO fraction by thin-layer

成分 Compound	显色剂 Color reagent	AO
生物碱类 Alkaloids	a. Dragendorff	-
	b. Wagner	-
	c. Meyer	-
	d. Bertrand	-
黄酮类 Flavonoids	a. 三氯化铝 - 乙醇试剂	-
	b. 10% 氢氧化钾水溶液	-
	c. 10% 三氯化铋氯仿液	-
多糖 Polysaccharides	Molish	+
皂苷 Saponins	碘蒸汽	+
蒽醌类 Anthraquinones	a. 10% 氢氧化钾甲醇液	-
	b. 氨气	-
萜类和甾体化合物 Terpenes and Steroids	a. 香草醛-硫酸试剂	+
	b. 10% 三氯化铋氯仿液	+
氨基酸、肽与胺类 Amino acids, Peptide and Amines	茚三酮试剂	+

+: 正反应; -: 负反应。

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

化合物 6 RT:4.41; 相对质量分数 4.55%。ESI-MS m/z : 203.2、233.4、189.0、135.2、527、803.4、921.2、965.1、1127.6。其中的碎片离子 m/z 234、203、189、135 表明化合物 6 的母核为齐墩果烷型的三萜皂苷; 因碎片离子 m/z 1127、965、803、527 数据与张雷等^[9]报道楸木皂苷 V (Araliasaponin V) 相似; 另外, 化合物 6 经酸水解后的薄层检查, 只检出齐墩果酸和葡萄糖。结合以上信息, 初步鉴定化合物 6 为楸木皂苷 V (Araliasaponin V)。

3 结论和讨论

小桐子果壳经水冷浸提取, 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇对水提取物依次进行萃取; 剩余的水萃取相经浓缩后用水溶解, 加入 50% 体积的 95% 乙醇静置过夜, 倒出全部上清液; 留下的沉淀再反复用 95% 乙醇进行洗涤, 最后获得以肽或蛋白、齐墩果酸皂苷类物质为主体成分, 且具有较强化感作用的物质。

郝双红^[10]对西北地区大戟科植物大戟 (*Euphorbia pekinensis* Rupr.) 和蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 提取物的除草活性进行了测定, 结果表明它们均有一定的除草活性, 这些除草活性与大戟科部分植物含有

氨基酸、萜类、甾醇、酚类及有毒的高分子有机酸物质有关。通过对小桐子果壳化感活性的测定和对化感活性物质的分离研究, 结果表明小桐子中也含有大量化感活性物质, 并推断这些化感活性物质可能与小桐子中有毒的毒蛋白(麻疯树毒蛋白)、萜类等成分^[11]有关。当然这些成分是否为有效抑制植物种子萌发和幼苗生长的化感成分, 还需要更多的实验证明。

致谢 在图谱解析过程中, 得到了中国科学院江苏植物研究所张涵庆研究员的帮助, 在此表示感谢。

参考文献

- [1] Kiu H S. Flora Republicae Popularis Sinica, Tomus 44(2) [M]. Beijing: Science Press, 1996: 148-149.
丘华兴. 中国植物志 第44卷第2分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 148-149.
- [2] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Traditional Medicine, Vol. 2 [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977: 2227.
江苏省新医学院. 中药大辞典 下册 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 2227.
- [3] Chen J S, Zheng S. China Poisonous Plants [M]. Beijing: Sciences Press, 1987: 1-258.

- 陈冀胜, 郑硕. 中国有毒植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1-258.
- [4] Li Y C, Guo Q S, Shao Q S, et al. Bioassay on herbicidal activity of extracts from *Jatropha curcas* [J]. J Plant Resour Environ, 2009, 18(4): 72-78.
李育川, 郭巧生, 邵清松, 等. 小桐子提取物除草活性的生物测定 [J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(4): 72-78.
- [5] Ma Y, Chen F, Wang S H, et al. Allelopathy of *Jatropha curcas* water extracts on economic crops [J]. North Hort, 2009(8): 19-23.
马沅, 陈放, 王胜华, 等. 麻疯树水浸液对两种经济作物的化感作用研究 [J]. 北方园艺, 2009(8): 19-23.
- [6] Chen Z Y, Liang S F, Li D W, et al. Allelopathy of 12 species including *Eupatorium catarium* on *Bidens alba* seedlings [J]. J Trop Subtrop Bot, 2011, 19(5): 454-462.
陈志云, 梁水凤, 李东文, 等. 假臭草等12种植物对白花鬼针草幼苗的化感作用 [J]. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(5): 454-462.
- [7] Lu Y H, Wei D Z, Jiang X M. Examples for Extraction and Separation of Effective Ingredients of Traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 1-85, 349-358.
- 卢艳花, 魏东芝, 蒋晓萌. 中药有效成分的提取分离实例 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 1-85, 349-358.
- [8] Zhang X L, Wu P J, Shi R, et al. Analytic research on types of monosaccharide in structure of polysaccharide of Chinese drugs [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2011, 31(6): 564-568.
张晓丽, 吴品昌, 史锐, 等. 中药多糖苷结构中单糖种类的分析研究 [J]. 吉林中医药, 2011, 31(6): 564-568.
- [9] Zhang L, Wang Z C, Guo M Q, et al. Identification of three saponins from leaves of *Aralias elate* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2004, 35(9): 969-973.
张雷, 王志财, 郭明全, 等. 辽东楸木叶中3个皂苷的鉴定 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 969-973.
- [10] Hao S H. Studies on the herbicidal constituents in *Cephalotaxus sinensis* [D]. Yangling: Northwest Agricultural & Forest University, 2005: 45-46.
郝双红. 中国粗榧除草活性成分研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005: 45-46.
- [11] Martínez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, et al. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico [J]. Food Chem, 2006, 96(1): 80-89.