

黄皮种子中酰胺类生物碱及其杀线虫活性研究

范玉娇^{1,2}, 陈惠琴², 梅文莉², 许书慧³, 周丽曼², 黄绵佳^{1*}, 戴好富^{2*}

(1. 海南大学热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口 571101; 3. 海口市人民医院药学部, 海口 570208)

摘要: 为了解黄皮种子中的酰胺类生物碱及其杀线虫活性, 运用多种色谱学及波谱学方法分离并鉴定了 10 个酰胺类生物碱, 分别为: *N*-甲基桂皮酰胺 (1), clausenalansamide A (2), 3-dehydroxy-3-methoxyl-clausenalansamide A (3), clausenalansamide B (4), 黄皮新肉桂酰胺 B (5), *N*-(2-苯乙基)肉桂酰胺 (6), 2'-dehydroxy-2'-oxo-clausenalansamide B (7), lansamide-7 (8), homoclausenamide (9), 1,5-dihydro-5-hydroxy-1-methyl-3,5-diphenyl-2*H*-pyrrol-2-one (10)。其中, 化合物 3, 7, 10 为新天然产物。首次对黄皮种子中的酰胺类生物碱 2~8 进行全齿复活线虫致死活性的测试, 发现所测化合物均有致死活性, 其中, 化合物 2, 3, 5 和 8 有较强的致死活性, 且均优于阳性对照除线磷, 可为相关农药的研发提供科学依据。

关键词: 黄皮; 种子; 酰胺类生物碱; 全齿复活线虫; 致死活性

doi: 10.11926/jtsb.3771

Amide Alkaloids from the Seeds of *Clausena lansium* and Their Nematicidal Activities

FAN Yu-jiao^{1,2}, CHEN Hui-qin², MEI Wen-li², XU Shu-hui³, ZHOU Li-man², HUANG Mian-jia^{1*}, DAI Hao-fu^{2*}

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Department of Pharmacy, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China)

Abstract: In order to understand the nematicidal activities of amide alkaloids from the seeds of *Clausena lansium*, ten amide alkaloids were isolated by comprehensive chromatographic techniques. On the basis of spectral data, their structures were identified as: *N*-methyl-cinnamamide (1), clausenalansamide A (2), 3-dehydroxy-3-methoxyl-clausenalansamide A (3), clausenalansamide B (4), lansiumamide B (5), *N*-2-phenylethyl-cinnamamide (6), 2'-dehydroxy-2'-oxo-clausenalansamide B (7), lansamide-7 (8), homoclausenamide (9), 1,5-dihydro-5-hydroxy-1-methyl-3,5-diphenyl-2*H*-pyrrol-2-one (10). Among them, compounds 3, 7 and 10 were new natural products. Meanwhile, the nematicidal activity against *Panagrellus redivivus* was tested for the first time. All of them showed the nematicidal activity, and compounds 2, 3, 5 and 8 presented stronger activities than dichlorofenthion, providing scientific evidence for the development of new pesticide.

Key words: *Clausena lansium*; Seed; Amide alkaloid; *Panagrellus redivivus*; Lethal activity

收稿日期: 2017-05-26

接受日期: 2017-07-18

基金项目: 海南省卫生计生科教项目(16A200125); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2016140); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(17CXTD-15)资助

This work was supported by the Project of Hainan Health and Family Planning Science and Education (Grant No. 16A200125), the Project of Key Research and Development in Hainan Province (Grant No. ZDYF2016140), and the Special Fund for Basic Research of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (Grant No. 17CXTD-15).

作者简介: 范玉娇(1993~), 女, 硕士研究生, 从事天然产物化学研究。E-mail: 634447748@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: daihaofu@itbb.org.cn; hmj886@163.com

黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 为芸香科 (Rutaceae) 黄皮属植物, 是热带亚热带常绿果树, 又名油皮, 油梅, 黄批, 鸡皮果, 黄罐子^[1]。原产于我国南方, 至今已有 1 500 年的历史, 在我国两广、海南、福建、台湾等地均有较广泛栽培, 民间多用于治疗食积胀满, 脘腹疼痛, 疝疼, 痰饮、咳喘等症^[2]。迄今, 国内外对黄皮化学成分及生物活性方面的研究主要集中于根、茎、叶上, 对种子的研究较少。生物碱是黄皮中重要的特征性成分之一, 具有保肝^[3]、抗老年痴呆^[4]、抗肿瘤^[5]、抑菌^[6]等活性, 存在潜在的开发价值。在本次研究中通过分析黄皮种子的乙醇提取物发现, 其中存在大量的生物碱, 而黄皮种子在日常生活中因其不可食用而往往被废弃。因此, 研究黄皮种子中的生物碱及其生物活性既有利于对黄皮种子的再次利用, 同时也能丰富黄皮中生物碱的结构类型及生物活性, 为其临床应用及资源的合理开发奠定基础。本次试验结合色谱学与波谱学方法对黄皮种子中的酰胺类生物碱进行分离与鉴定, 旨在筛选出黄皮种子中具有优良全齿复活线虫致死活性的酰胺类生物碱, 为其创新农药的研制提供理论和物质基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料 样品于 2011 年 5 月购自海南省儋州市, 经中国热带农业科学院热带生物技术研究所王军博士鉴定为黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels]。标本 (CL20110501) 现存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

仪器 旋转蒸发仪 (Heidolph 公司); 安捷伦 1260 分析型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); 戴安 SUMMITP680A 半制备高效液相色谱仪 (戴安, 美国); 质谱仪 (Micromass Autospec-Uitima-TOF); 核磁共振波谱仪 (Bruker AV-500, 以 TMS 为内标); 超净工作台 (上海博讯实业有限公司); 万分之一电子秤 (北京赛多利斯天平有限公司); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司); 超纯水装置 (厦门锐思捷水纯化技术有限公司)。

填料 柱层析硅胶 (200~300 目, 60~80 目) (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 和 RP-18 填料 (德国 Merck 公司); DI01 型大孔吸附树脂 (山东鲁抗医药股份有限公司)。

试剂 常用分析纯有机溶剂购自广州化工和天津大茂等公司; PBS 平衡盐溶液购自北京欣经科技公司; 浓硫酸购自博滨岭化工有限公司; 氘代试剂 (CD₃OD 和 CDCl₃) 购自 Merck 公司; 色谱溶剂购自天津四友和天津康科德等公司; 其他试剂均为重蒸工业试剂。

1.2 提取和分离

将黄皮种子晒干粉碎, 室温下用 95% 乙醇浸提 3 次, 每次 7 d。所得浸提液过滤后经减压浓缩得乙醇粗浸膏, 随后将其分散于水中成悬浊液, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 分别经减压浓缩得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水相 4 部分。

乙酸乙酯萃取物 (84.6 g) 重结晶得到大量黄色晶体即化合物 **5**, 剩余样品经大孔吸附树脂以甲醇-水 (40%~100%) 和丙酮先后进行洗脱, 分段收集, 通过 TLC 薄层色谱检测, 合并相同的部分, 得到 13 个流份 Fr.1~Fr.13。Fr.6 (7.2 g) 经 RP-18 反相柱色谱, 以甲醇-水 (40%~100%) 为流动相进行梯度洗脱得到 7 个流份 Fr.6.1~Fr.6.7。

Fr.6.2 (30.1 mg) 经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱; 20% 乙腈水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm) 恒梯度洗脱得到化合物 **1** (2.5 mg, 保留时间 19.1 min)。

Fr.6.4 (1.8 g) 经 Sephadex LH-20 柱色谱 (甲醇) 分离得到 4 个流份 Fr.6.4.1~Fr.6.4.4, Fr.6.4.1 经重结晶得到白色晶体即化合物 **2** (3.6 mg); 剩余样品经硅胶柱色谱以石油醚-乙酸乙酯 (10:1~0:1) 为流动相梯度洗脱后, 经 TLC 薄层色谱检测合并得到 9 个流份 Fr.6.4.1.1~Fr.6.4.1.9。Fr.6.4.1.8 经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱; 40% 乙腈水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm) 恒梯度洗脱得到化合物 **3** (14.2 mg, 保留时间 9.3 min)。Fr.6.4.1.5 经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱; 35% 乙腈水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm) 恒梯度洗脱得到化合物 **7** (3.0 mg, 保留时间 34.9 min) 和化合物 **8** (11.0 mg, 保留时间 24.0 min)。Fr.6.4.1.6 经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱; 35% 乙腈水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm) 恒梯度洗脱得到化合物 **9** (2.4 mg, 保留时间 23.2 min)。Fr.6.4.2 经半制备高效液相色谱 (C₁₈ 柱; 60% 甲醇水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm) 恒梯度洗脱得到化合物 **10** (3.0 mg, 保留时间 15.3 min)。

Fr.6.5 (3.2 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇)分离得到 4 个流份 Fr.6.5.1~Fr.6.5.4。Fr.6.5.2 经硅胶柱色谱以石油醚-乙酸乙酯(10:1~0:1)梯度洗脱后,通过 TLC 薄层色谱检测合并得到 10 个流份(Fr.6.5.2.1~Fr.6.5.2.10)。Fr.6.5.2.5 经半制备高效液相色谱(C₁₈柱; 45%乙腈水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm)恒梯度洗脱得到化合物 **4** (14.2 mg, 保留时间 18.3 min)。Fr.6.5.4 经半制备高效液相色谱(C₁₈柱; 50%甲醇水; 流速 4 mL min⁻¹; 检测波长 200, 254 nm)恒梯度洗脱得到化合物 **6** (5.9 mg, 保留时间 41.6 min)。

1.3 全齿复活线虫致死活性测试

全齿复活线虫致死活性测定方法参照马青云等^[7]。全齿复活线虫接种于燕麦培养基上, 28℃下培养 7~10 d。按贝曼漏斗法, 利用多层擦镜纸于无菌水中过滤线虫 3 次, 获得线虫悬浮液。将 1 mg 待测样品溶于 20 μL DMSO 中配制成待测样品。于 96 孔板中分别配制以下反应体系: 5 μL 待测样品(终浓度为 2.5 mg mL⁻¹)+30 μL 线虫悬浮液(约 200~300 条线虫)+无菌水 65 μL 作为实验组; 5 μL DMSO+30 μL 线虫悬浮液(约 200~300 条线虫)+无菌水 65 μL 作为阴性对照组; 5 μL 除线磷(终浓度为 2.5 mg mL⁻¹)+30 μL 线虫悬浮液(约 200~300 条线虫)+无菌水 65 μL 作为阳性对照组, 混匀后于室温条件下培养 24 h, 在解剖镜下观察并统计线虫死亡数, 统计的线虫数量不少于 100 条。每个处理均设 3 次重复。线虫死亡率(%)=死亡线虫数/计数线虫总数×100%; 线虫校正死亡率(%)=(处理线虫死亡率-对照线虫死亡率)/(1-对照线虫死亡率)×100%。

1.4 结构鉴定

N-甲基桂皮酰胺 (1) 淡黄色晶体(CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 184.3 [M + Na]⁺; 分子式为 C₁₀H₁₁NO; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_H 7.62 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-3), 7.46 (2H, dd, *J* = 6.7, 2.2 Hz, H-5, 9), 7.32 (3H, m, H-6, 7, 8), 6.44 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-2), 6.16 (1H, br s, NH), 2.93 (3H, d, *J* = 4.9 Hz, N-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ_C 166.9 (C-1), 120.8 (C-2), 140.8 (C-3), 134.9 (C-4), 127.9 (C-5, 9), 128.9 (C-6, 8), 129.7 (C-7), 26.6 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[8]报道的一致, 故鉴定为 *N*-甲基桂皮酰胺。

Clausenalansamide A (2) 白色晶体(CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 320.2 [M + Na]⁺; 分子式为 C₁₈H₁₉NO₃; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_H 7.12~7.32 (10H, m, Ar-CH), 6.11 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-1'), 5.97 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2'), 4.92 (1H, dd, *J* = 5.0 Hz, H-3), 4.66 (1H, dd, *J* = 9.0, 5.0 Hz, H-2), 3.53 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, 3-OH), 3.32 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, 2-OH), 2.87 (3H, s, N-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ_C 172.5 (C-1), 72.1 (C-2), 75.9 (C-3), 139.5 (C-4), 126.4 (C-5, 9), 128.4~128.9 (C-6, 7, 8, 4', 5', 6', 7', 8'), 127.3 (C-1'), 126.2 (C-2'), 133.7 (C-3'), 34.8 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[9]报道的一致, 故鉴定为 clausenalansamide A。

3-Dehydroxy-3-methoxyl-clausenalansamide A (3) 无色油状物(CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 334.3 [M + Na]⁺; 推测分子式为 C₁₉H₂₁NO₃。对比化合物 **2** 与化合物 **3** 的碳氢谱数据及分子量, 推测化合物 **3** 较化合物 **2** 少了 1 个羟基, 而多了 1 个甲氧基, 推测 2 位或 3 位碳上的羟基被替换成甲氧基。¹H 和 ¹³C NMR 谱显示存在 2 个单取代苯环, 1 个顺式双键[δ_H 6.09 (d, *J* = 8.8 Hz)/δ_C 125.1; δ_H 6.31 (d, *J* = 8.8 Hz)/δ_C 128.1], 2 个连氧取代的次甲基[δ_H 4.55 (dd, *J* = 9.4, 6.8 Hz)/δ_C 72.2; δ_H 4.20 (d, *J* = 6.8 Hz)/δ_C 86.2], 1 个甲氧基[δ_H 3.11 (s)/δ_C 57.2], 1 个氮甲基[δ_H 2.93 (s)/δ_C 35.20]。HMBC 谱显示: H-1'与 C-3'有相关; N-CH₃与 C-1'有相关, 证明了 CH₃-N-CH=CH-Ph 片段的存在; 另外, N-CH₃与酮羰基碳 C-1 有相关信号, H-2 和 H-3 分别与 C-1 和 C-4 有相关信号, 以及 OCH₃与 C-3 有相关信号, 结合 ¹H-¹H COSY 谱中的相关信号 H-2/H-3, 证明了 CH₃-N-C(O)-CH(OH)-CH(OCH₃)-Ph 片段的存在。综上所述, 结合分子量, 化合物 **3** 的结构鉴定为 3-dehydroxy-3-methoxyl-clausenalansamide A^[10], 为一新的天然产物。对化合物 **3** 的归属如下: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_H 7.18~7.32 (10H, m, Ar-CH), 6.31 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-1'), 6.09 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2'), 4.55 (1H, dd, *J* = 9.4, 6.8 Hz, H-2), 4.20 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-3), 3.11 (3H, s, OCH₃), 3.03 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, 2-OH), 2.93 (3H, s, N-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ_C 173.3 (C-1), 72.2 (C-2), 86.2 (C-3), 137.9 (C-4), 128.1 (C-1'), 125.1 (C-2'), 134.2 (C-3'), 127.9-128.9 (Ar-CH), 57.2 (OCH₃), 35.2 (N-CH₃)。

Clausenalansamide B (4) 白色粉末(CH₃OH); ESI-MS *m/z*: 304.3 [M + Na]⁺; 分子式为

$C_{18}H_{19}NO_2$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.76 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-3), 7.35~7.55 (10H, m, Ar-CH), 6.85 (1H, d, $J = 15.4$ Hz, H-2), 5.06 (1H, dd, $J = 7.5$, 2.4 Hz, H-2'), 4.82 (1H, br s, 2'-OH), 3.80 (1H, dd, $J = 14.2$, 7.5 Hz, H-1'a), 3.72 (1H, dd, $J = 14.2$, 2.4 Hz, H-1'b), 2.83 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 169.3 (C-1), 116.7 (C-2), 144.1 (C-3), 135.1 (C-4), 58.5 (C-1'), 74.0 (C-2'), 142.5 (C-3'), 126.0 (C-4', 8'), 127.8~130.1 (C-5, 6, 7, 8, 9, 5', 6', 7'), 37.9 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[11]报道的一致, 故鉴定为 clausenalansamide B。

黄皮新肉桂酰胺 B (5) 淡黄色晶体(CH_3OH); ESI-MS m/z : 286.3 [$M + Na$]⁺; 分子式为 $C_{18}H_{17}NO$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.58 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-3), 7.18~7.40 (10H, m, Ar-CH), 6.88 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-2), 6.44 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-1'), 6.19 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2'), 3.04 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 166.5 (C-1), 118.4 (C-2), 142.8 (C-3), 128.8 (C-1'), 125.2 (C-2'), 134.5-135.3 (Ar-C), 128.0-129.8 (Ar-CH), 34.7 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[12]报道的一致, 故鉴定为黄皮新肉桂酰胺 B。

N-(2-苯乙基)肉桂酰胺 (6) 白色晶体(CH_3OH); ESI-MS m/z : 274.3 [$M + Na$]⁺; 分子式为 $C_{17}H_{17}NO$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.53 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3), 7.14~7.40 (10H, m, Ar-CH), 6.23 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-2), 5.54 (1H, br s, NH), 3.58 (2H, q, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 2.81 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-2'); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 166.0 (C-1), 120.7 (C-2), 141.2 (C-3), 139.0 (C-4), 128.8~129.8 (C-5, 6, 7, 8, 9, 4', 8'), 40.9 (C-1'), 35.8 (C-2'), 134.9 (C-3'), 127.9 (C-5', 7'), 126.7 (C-6')。以上波谱数据与文献[13]报道的一致, 故鉴定化合物为 N-(2-苯乙基)肉桂酰胺。

2'-Dehydroxy-2'-oxo-clausenalansamide B (7) 白色粉末(CH_3OH); ESI-MS m/z : 302.3 [$M + Na$]⁺; 推测分子式为 $C_{18}H_{17}NO_2$ 。对比化合物 7 与化合物 4 的碳氢谱及分子量, 发现化合物 7 较化合物 4 仅少了 1 个连氧次甲基, 但多了一个羰基, 推测 4 中 2'位羟基被氧化成酮羰基。 1H 和 ^{13}C NMR 谱显示存在 2 个单取代苯环, 1 个反式双键 [δ_H 7.61 (d, $J = 15.5$ Hz)/ δ_C 143.6; δ_H 6.88 (d, $J = 15.5$ Hz)/ δ_C 116.9], 1 个亚甲基 [δ_H 4.85 (s)/ δ_C 54.8], 1 个氮甲基 [δ_H 3.16

(s)/ δ_C 37.0]。HMBC 谱显示: H-2, H-3 和 N-CH₃ 与 C-1 有相关信号, H-3 与 C-4 有相关信号, 证实了 $CH_3-N-C(O)-CH=CH-Ph$ 片段的存在; 另外, N-CH₃ 与 C-1'有相关信号, H-1'与 C-2', H-4'/H-8'与 C-2'有相关信号, 由此推测 $CH_3-N-CH_2-C(O)-Ph$ 片段的存在。结合分子量, 化合物 7 的结构鉴定为 2'-dehydroxy-2'-oxo-clausenalansamide B^[14], 为一新的天然产物。对化合物 7 的归属如下: 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.88 (2H, dd, $J = 7.2$, 1.2 Hz, H-4', 8'), 7.61 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-3), 7.49 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-6'), 7.43 (2H, dd, $J = 7.6$, 1.5 Hz, H-5, 9), 7.37 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5', 7'), 7.27 (3H, m, H-6, 7, 8), 6.88 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-2), 4.85 (2H, s, H-1'), 3.16 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 167.5 (C-1), 116.9 (C-2), 143.6 (C-3), 135.4 (C-4), 128.1 (C-5, 9), 128.9 (C-6, 8), 129.9 (C-7), 54.8 (C-1'), 194.6 (C-2'), 135.3 (C-3'), 128.1 (C-4', 8'), 128.9 (C-5', 7'), 133.8 (C-6'), 37.0 (N-CH₃)。

Lansamide-7 (8) 白色晶体(CH_3OH); ESI-MS m/z : 304.3 [$M + Na$]⁺; 分子式为 $C_{18}H_{19}NO_2$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.21~7.28 (6H, m, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5''), 6.89 (2H, dd, $J = 8.2$, 1.6 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, br d, $J = 7.2$ Hz, H-2'', 6''), 4.57 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-3), 3.82 (1H, dd, $J = 10.1$, 6.7 Hz, H-6a), 3.28 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-6b), 3.23 (1H, dd, $J = 10.0$, 8.8 Hz, H-4), 3.14 (1H, dd, $J = 8.8$, 6.7 Hz, H-5), 3.04 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 176.6 (C-2), 72.8 (C-3), 51.3 (C-4), 40.5 (C-5), 56.1 (C-6), 140.3 (C-1'), 127.6~128.6 (Ar-CH), 140.7 (C-1''), 29.9 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[15]报道的一致, 故鉴定为 lansamide-7。

Homoclausenamide (9) 白色晶体(CH_3OH); ESI-MS m/z : 302.2 [$M + Na$]⁺; 分子式 $C_{18}H_{17}NO_2$; 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 7.06~7.21 (10H, m, Ar-CH), 6.41 (1H, s, H-6), 4.36 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 4.21 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-4), 3.25 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ_C 169.4 (C-2), 73.4 (C-3), 49.7 (C-4), 120.9 (C-5), 128.4 (C-6), 139.3 (C-1'), 137.7 (C-1''), 126.3~128.8 (Ar-CH), 34.5 (N-CH₃)。以上波谱数据与文献[16]报道的一致, 故鉴定化合物为 homoclausenamide。

1,5-Dihydro-5-hydroxy-1-methyl-3,5-diphenyl-2H-pyrrol-2-one (10) 白色油状物(CH_3OH); ESI-

MS m/z : 288.3 $[M + Na]^+$; 推测分子式为 $C_{17}H_{15}NO_2$, 不饱和度为 11。 1H 和 ^{13}C NMR 谱显示存在 2 个单取代苯环, 1 个双键上的质子 [δ_H 7.18 (s)/ δ_C 145.5], 1 个连氧季碳 [δ_C 90.9], 1 个氮甲基 [δ_H 2.73 (s)/ δ_C 24.3]。HMBC 谱显示: N-CH₃ 与酮羰基 C-2 和 C-5 有相关信号, H-4 与酮羰基 C-2、C-3 和 C-5 有相关信号, 结合不饱和度及分子量, 推测 5-hydroxy-1-methyl-1,5-dihydro-2H-pyrrol-2-one 骨架的存在。另外, Ar-CH 与 C-3 和 C-5 均有相关信号, 证实两个单取代苯环应

分别连在 C-3 和 C-5 上。综上所述, 化合物 **10** 的结构鉴定为 1,5-dihydro-5-hydroxy-1-methyl-3,5-diphenyl-2H-pyrrol-2-one^[17], 为一新的天然产物。对化合物 **10** 的归属如下: 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 7.86 (2H, dd, $J = 7.3, 2.1$ Hz, H-2'', 6''), 7.34~7.41 (8H, m, C-2', 3', 4', 5', 6', 3'', 4'', 5''), 7.18 (1H, s, H-4), 2.78 (3H, s, N-CH₃); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ_C 171.1 (C-2), 138.9 (C-3), 145.5 (C-4), 90.9 (C-5), 132.4 (C-1'), 135.4 (C-1''), 127.0~130.0 (Ar-CH), 24.3 (N-CH₃)。

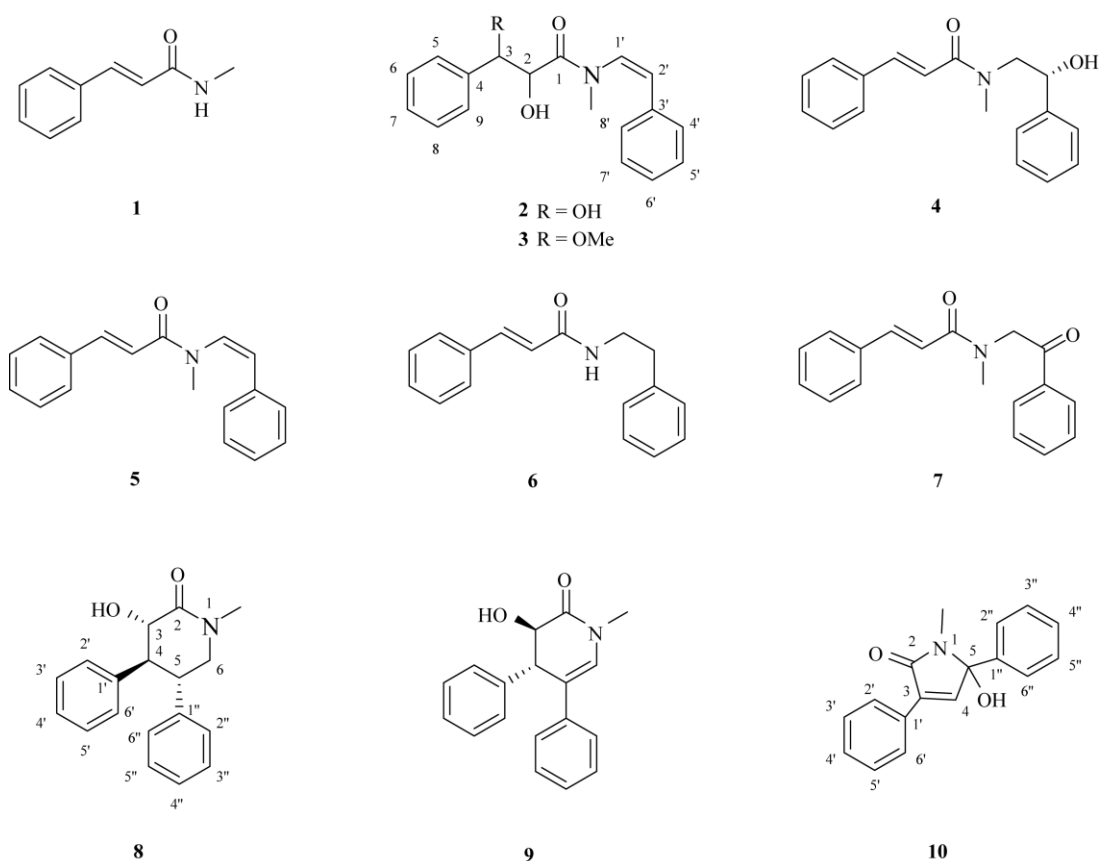


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig.1 Structures of compounds 1-10

2 活性分析

对化合物 **2~8** 进行全齿复活线虫致死活性的测试, 结果表明, 所有化合物均有一定的致死活性, 其中, 化合物 **2, 3, 5** 和 **8** 对全齿复活线虫的致死活性均优于阳性对照除线磷, 2.5 mg mL⁻¹ 的化合物致死率分别为 56.48%、79.58%、71.49% 和 46.14% (表 1)。

3 讨论

本课题组前期从黄皮果皮乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部分发现了大量的咪唑类生物碱^[18], 而本研究从黄皮种子中分离得到 10 个化合物, 分别为: *N*-甲基桂皮酰胺 (**1**), clausenalansamide A (**2**), 3-dehydroxy-3-methoxyl-clausenalansamide A (**3**), clausenalansamide B (**4**), 黄皮新肉桂酰胺 B (**5**), *N*-(2-

表 1 化合物 2~8 (2.5 mg mL⁻¹)的全齿复活线虫致死活性Table 1 Nematicidal activities of compounds 2-8 (2.5 mg mL⁻¹) against *Panagrellus redivivus*l

| 化合物 Compound | 校正致死率 /% Revised lethality | 类型 Type |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 2 | 56.48 ±2.01 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 3 | 79.58 ±3.48 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 4 | 21.43 ±3.03 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 5 | 71.49 ±1.52 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 6 | 20.15 ±1.27 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 7 | 16.31 ±0.58 | 苯丙酰胺 Hydrocinnamamide |
| 8 | 46.14 ±4.75 | 环状酰胺 Cyclic amide |
| 除线磷 Dichlorofenthion | 31.64 ±3.64 | - |

senamide (9)和 1,5-dihydro-5-hydroxy-1-methyl-3,5-diphenyl-2H-pyrrol-2-one (10)。其中大部分化合物为酰胺类生物碱, 尚未发现吡唑类生物碱, 与黄皮果实的化学成分存在一定的差异。同时, 本研究首次对黄皮种子中的酰胺类生物碱进行全齿复活线虫致死活性的研究, 结果显示, 所测酰胺类生物碱均有一定的致死活性, 部分酰胺类生物碱有较强的致死活性, 甚至优于阳性对照除线磷。相比化合物 2 和化合物 3, 二者的区别仅在于 3 位的取代基, 但化合物 3 的活性明显优于化合物 2, 推测结构中 3 位羟基甲氧化有助于提高活性。对比化合物 4、5 和 7, 三者结构上的区别在于 1'和 2'位的取代基不同, 但对比其活性发现化合物 4 和化合物 7 的活性均较弱, 说明 2'位的羟基或羰基取代对活性影响不大, 但当 1', 2'形成双键时即化合物 5, 其活性则有较大的提高, 说明该双键对杀全齿复活线虫活性有着重要意义。本研究为进一步开发黄皮种子中的酰胺类生物碱为新型的低毒且高效的农药提供了新的思路。

参考文献

- [1] HUANG X S, LUO L J. Determination of the clausenaminade in the fruit and seed of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels [J]. Sci Technol Food Ind, 2006, 27(6): 172-173. doi: 10.3969/j.issn.1002-0306.2006.06.056.
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. doi: 10.3969/j.issn.1002-0306.2006.06.056.
- [2] REN Q, LI F, LUO X Z, et al. Advances in coumarin compounds from *Clausena* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2009, 20(5): 1283-1285. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2009.05.150.
任强, 李芳, 罗秀珍, 等. 黄皮属植物香豆素类成分研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1283-1285. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2009.05.150.
- [3] YANG M H, CHEN Y Y, HUANG L. Studies on the chemical constituents of (*Clausena lansium*) (Lour.) Skeels. II: The isolation and structural elucidation of neoclausenamide and dehydrocycloclausenamide [J]. Acta Chim Sin, 1987, 5(3): 267-272. doi: 10.1002/cjoc.19870050312.
- [4] ZHANG J T, DUAN W Z, LIU S L, et al. Antidementia effects of (-)clausenamide [J]. Herald Med, 2001, 20(7): 403-404. doi: 10.3870/j.issn.1004-0781.2001.07.001.
张均田, 段文贞, 刘少林, 等. (-)黄皮酰胺的抗老年痴呆作用 [J]. 医药导报, 2001, 20(7): 403-404. doi: 10.3870/j.issn.1004-0781.2001.07.001.
- [5] ZUO M M, ZHOU J M, HU G H, et al. Synthesis and anti-tumor activities *in vitro* of cinnamic amide compounds [J]. Chem World, 2012, 53(4): 239-242. doi: 10.3969/j.issn.0367-6358.2012.04.014.
左明明, 周健民, 胡国辉, 等. 肉桂酰胺类化合物的合成及其体外抗肿瘤活性 [J]. 化学世界, 2012, 53(4): 239-242. doi: 10.3969/j.issn.0367-6358.2012.04.014.
- [6] LIU X M, MA F N, WAN S Q. Antifungal activity of the methanol extract of *Clausena lansium* [J]. Plant Prot, 2008, 34(2): 64-66. doi: 10.3969/j.issn.0529-1542.2008.02.017.
刘序铭, 马伏宁, 万树青. 黄皮甲醇提取物的抑真菌作用 [J]. 植物保护, 2008, 34(2): 64-66. doi: 10.3969/j.issn.0529-1542.2008.02.017.
- [7] MA Q Y, HUANG S Z, LI H F, et al. Studies on the biocontrol activity of compounds from *Polygonum perfoliatum* [J]. Hubei Agric Sci, 2013, 52(21): 5245-5247. doi: 10.3969/j.issn.0439-8114.2013.21.035.
马青云, 黄圣卓, 李红芳, 等. 杠板归中化学成分生防活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(21): 5245-5247. doi: 10.3969/j.issn.0439-8114.2013.21.035.
- [8] SHEN W W, LI W, WANG G C, et al. Chemical constituents of *Clausena lansium* [J]. J Jinan Univ (Nat Sci), 2012, 33(5): 506-509. doi: 10.3969/j.issn.1000-9965.2012.05.015.
申文伟, 李雯, 王国才, 等. 黄皮核的化学成分 [J]. 暨南大学学报 (自然科学版), 2012, 33(5): 506-509. doi: 10.3969/j.issn.1000-9965.

- 2012.05.015.
- [9] MANEERAT W, THA-IN S, CHEENPRACHA S, et al. New amides from the seeds of *Clausena lansium* [J]. *J Med Plant Res*, 2011, 5(13): 2812–2815.
- [10] YANG L, ZHENG Q Y, WANG D X, et al. Reversal of nucleophilicity of enamides in water: Control of cyclization pathways by reaction media for the orthogonal synthesis of dihydropyridinone and pyro-lidinone *Clausena* alkaloids [J]. *Org Lett*, 2008, 10(12): 2461–2464. doi: 10.1021/ol800740h.
- [11] WANG G C, LI W, WANG Y, et al. A new amide and a new monoterpene from the seeds of *Clausena lansium* [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(6): 558–562. doi: 10.1080/14786419.2012.678354.
- [12] BAYER A, MAIER M E. Synthesis of enamides from aldehydes and amides [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(31): 6665–6677. doi: 10.1016/j.tet.2004.05.082.
- [13] BORGES-DEL-CASTILLO J, VAZQUEZ-BUENO P, SECUNDINO-LUCAS M, et al. The *N*-2-phenylethylcinnamamide from *Spilanthes ocyimifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(11): 2671–2672. doi: 10.1016/S0031-9422(00)84123-0.
- [14] HIGUCHI, SHOHEI, ARAI, et al. Preparation and formulation of phenacylacetamides as drugs for the treatment of liver diseases: JP 03024009 [P]. 1991-02-01.
- [15] SHEN D Y, NGUYEN T N, WU S J, et al. γ - and δ -Lactams from the leaves of *Clausena lansium* [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(11): 2521–2530. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00148.
- [16] YANG M H, CHEN Y Y, HUANG L. Studies on the chemical constituents of *Clausena Lansium* (Lour.) Skeels III: The structural elucidation of homo-and zeta-clausenamide⁽¹⁾ [J]. *Chin Chem Lett*, 1991, 2(4): 291–292.
- [17] YANG L, LEI C H, WANG D X, et al. Highly efficient and expedient synthesis of 5-hydroxy-1*H*-pyrrol-2-(5*H*)-ones from FeCl₃-catalyzed tandem intramolecular enaminic addition of tertiary enamides to ketones and 1,3-hydroxy rearrangement [J]. *Org Lett*, 2010, 12(17): 3918–3921. doi: 10.1021/ol101607z.
- [18] DENG H D. Study on the bioactive components from peels of *Clausena lansium* [D]. Haikou: Hainan University, 2014.
邓会栋. 黄皮果皮中的生物活性成分研究 [D]. 海口: 海南大学, 2014.