

# 胜红蓟地上部化感作用物的分离与鉴定

韦琦 曾任森 孔垂华 骆世明

(华南农业大学热带亚热带生态研究所, 广州 510642)

曾强 谭惠芬

(南开大学元素有机化学研究所, 天津 300071)

**摘要** 胜红蓟 (*Ageratum conyzoides*) 是华南地区的重要杂草, 具有显著的化感作用。本文利用色谱和波谱技术对胜红蓟地上部化感活性成分进行分离和化学结构鉴定, 得到两个化感作用物质: 胜红蓟素 (6,7-二甲氧基-2,2-二甲基烯) 和 5,22-二烯-3 $\beta$ -甾甾醇。对这两个作用物的化感作用研究表明: 胜红蓟素对受体幼苗生长有抑制作用,  $500 \times 10^{-6}$  处理对稗草生长达到完全抑制, 对萝卜的抑制率也高达 90%。浓度降到  $25 \times 10^{-6}$  对稗草和萝卜幼苗生长仍具有显著的抑制作用。

**关键词** 化感作用物质 胜红蓟 分离与鉴定

## THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ALLELOCHEMICALS FROM AERIAL PARTS OF TROPIC *AGERATUM*

Wei Qi, Zeng Rensen, Kong Chuihua and Luo Shiming

(Ecology Institute of Tropic and Subtropic, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Zeng Qiang and Tan Huifen

(Element-Organic Chemistry Laboratory, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** Tropic *Ageratum* (*Ageratum conyzoides*), a common weed in south China, was reported to have allelopathic potentials in our previous paper. In this paper, the allelochemicals from aerial parts of the herb were isolated and identified. Their allelopathic potentials were investigated. Two compounds, which were chromatographed by TLC and HPLC were obtained in pure form. They were identified to be 6,7-dimethoxy-2,2-dimethylchromene (ageratochromene) and stigmastra-5,22-dien-3 $\beta$ -ol by means of IR, NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) and MS. Bioassay results show that the ageratochromene was highly inhibitory to the seedling growth of the acceptor plants. The treatment with 500 ppm ageratochromene inhibited the seedling growth of barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*) and radish (*Raphanus sativas*) up to 100% and 90%, respectively. Treatment with  $25 \times 10^{-6}$  ageratochromene had statistically significant inhibition to the seedling growth of barnyardgrass and the shoot growth of radish.

**Key words** Allelochemicals, Isolation and identification, *Ageratum*

胜红蓟(*Ageratum conyzoides*)是我国南方旱地常见的杂草,它终年生长,种子数量多,萌发率高,具有较强的侵占能力,在部分旱作地,桑田及橡胶幼木林段可造成较严重的危害(林熔等,1985)。对胜红蓟的草药功效,驱虫特性和作为柑桔园捕食螨寄主等方面已做了大量的工作(Wiedefeld & Roder, 1991),但对胜红蓟具有的化感作用(Allelopathy)却没有引起足够的重视。我们曾报道了胜红蓟对植物的化感作用(曾任森等,1993),发现其化感抑制作用主要是通过地上部淋溶和凋落物分解向体外释放次生代谢物来抑制邻近植物的生长发育,且凋落物分解在15天内抑制作用有增强趋势。本文将进一步报道对胜红蓟地上部化感物质的分离与鉴定,并研究其化感物质对稗草(*Echinochloa crusgalli*)和萝卜(*Raphanus sativus*)的化感作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

胜红蓟采自华南农业大学校园,选用健康成熟期地上部分,晾干备用。受体采用稗草和萝卜,种子分别来源于南开大学元素有机化学研究所生测室和广东省农业科学研究院。稗草是稻田的重要杂草,萝卜发芽率高,生长快,对化感物质反应敏感(曾任森等,1993)。

### 1.2 试剂与仪器

所用有机溶剂均为分析纯试剂,薄层层析硅胶为GF<sub>254</sub>,10~40 $\mu$ ,柱层析硅胶为硅胶H,10~40 $\mu$ ,显色剂用5%磷钼酸的乙醇溶液。红外光谱(IR)用D<sub>s</sub>-301,WFD-14型红外光谱仪。核磁共振(NMR)用JEOL,FX-90Q型核磁共振仪测定。质谱(MS)用MSHP 5988A,EI-MS,轰击电压70ev。制备高压液相色谱(Prep HPLC),使用Backman黄金系统,石油醚/异丙醇溶剂,Si柱(正相),300×10mm,406/168/486,紫外检测波长230nm。

### 1.3 化感物质的生物测定方法(骆世明等,1995)

采用“小杯法”测定化感物质对受体幼苗生长的影响,在50ml小烧杯中加一层石英砂,放上滤纸,将含有化感作用物质的溶液加到杯中,待溶剂挥发干后,加入5ml蒸馏水。将受体种子预先作浸种和催芽处理,选12粒均匀已发芽的种子放到滤纸上,于温室中培养,白天温度24~29℃,夜间20~24℃,每天光照9小时。并每天向杯中加水1ml,培养5天后,分别测定幼苗的苗高和根长,对照仅加5ml蒸馏水,各处理3次重复。

### 1.4 数据统计分析方法

参照Williamson G. B. (1988)的方法。即:

$$RI = \begin{cases} 1 - C/T & \text{当 } T \geq C \\ T/C - 1 & \text{当 } T < C \end{cases}$$

其中:C为对照值,T为处理值。RI为化感作用效应:RI>0为促进,RI<0为抑制,绝对值的大小与作用强度一致。

## 2 结果分析

### 2.1 胜红蓟地上部化感物质的分离

用晾干的胜红蓟地上部为材料在室温下用石油醚浸提,提取物对受体(稗草和萝卜)幼苗生长具有强烈的抑制作用。提取物浓缩后用柱色谱分离(乙醇为淋洗剂)得到5个组份,取其中对受体抑制作用最强的组份( $\overline{RI} = -0.503$ )进一步用柱色谱分离[乙醇/石油醚(1:2)为淋洗剂]又得5个组份,继续取对受体抑制作用最强的组份( $RI = -0.723$ )用柱色谱分离(石油醚为淋洗剂)得6个组份,其中抑制作用最强的组份 $\overline{RI}$ 值达 $-0.864$ ,进一步用高压液相色谱分离得浅黄色晶体(化合物 I)。其次1组份 $\overline{RI} = -0.499$ 接近第一次分

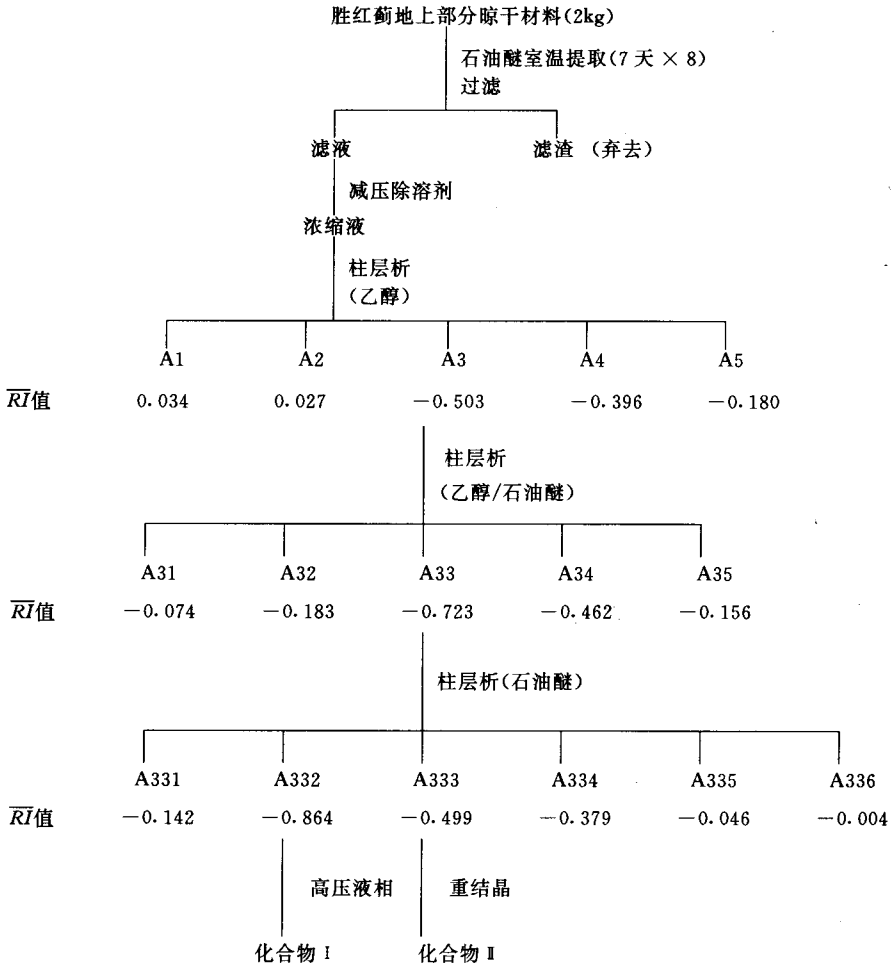


图1 化感作用物质的分离流程

Fig. 1 Separating procedure for allelochemicals of *A. conyzoides* aerial parts

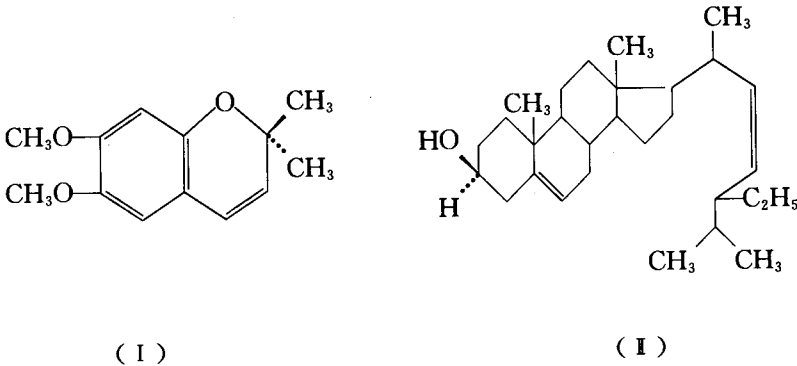
生测 $\overline{RI}$ 值为两种受体苗高和根长4个测试项目 $\overline{RI}$ 值的平均值。图中的编号顺序与柱层析时洗脱顺序一致。

离时作用最强的组份,将其进一步重结晶纯化得白色晶体(化合物 I)。整个分离流程见图1。

## 2.2 胜红蓟地上部化感物质的结构鉴定

化合物 I:浅黄色晶体,mp:44~47℃,易溶于石油醚、乙酸乙酯、丙酮等有机溶剂,难溶于水。MS 测定分子量220,分子式: $C_{13}H_{16}O_3$ 。IR(KBr 压片): $\nu$  1495.1(C=C),1211.1(OCH<sub>3</sub>),1127.1(C-O-C),900.1(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>),849.6(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) $cm^{-1}$ 。NMR C(DCl<sub>3</sub> × 10<sup>-6</sup>), $\delta_H$ : 1.18(6H s 2CH<sub>3</sub>-2),3.61(6H d J=1H<sub>2</sub> OCH<sub>3</sub>-6 OCH<sub>3</sub>-7),5.33(1H s H-4),6.01(1H s H-3),6.26(1H s H-8),6.37(1H s H-5); $\delta_C$ :75.40(2),127.63(3),121.56(4),112.68(5),142.69(6),146.91(7),100.65(8),149.30(9),112.68(10),27.30(CH<sub>3</sub>-2),55.36(OCH<sub>3</sub>-6),56.01(OCH<sub>3</sub>-7)。以上数据与文献报道的数据相符(Gonzalez,1991),故断定化合物 I 为:6,7-二甲氧基-2,2-二甲基色烯,俗称胜红蓟素或早熟素。

化合物 II:白色晶体,mp:162~164℃,溶于石油醚/乙酸乙酯的混合溶剂,不溶于水。MS 测定分子量412,分子式  $C_{29}H_{48}O$ 。测定其<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 谱并与 Sadtler 标准图谱对照(Sadtler Research Laboratories,1982),确定化合物 II 为:5,22-二烯-3 $\beta$ -甾甾醇。



## 2.3 化合物 I 和 II 的化感作用

化合物 I 和 II 分别配成不同浓度,以稗草和萝卜为受体,用“小杯法”测定它们的化感作用。

从化合物 I 的  $\overline{RI}$  值可见,  $500 \times 10^{-6}$  和  $250 \times 10^{-6}$  两种浓度对稗草幼苗的生长达到完全抑制,随着浓度降低,抑制强度下降,但浓度降至  $25 \times 10^{-6}$  时对稗草的抑制作用仍很显著。萝卜受抑制的程度稍差,  $500 \times 10^{-6}$  浓度虽不能完全抑制,但与对照相比其抑制率也达到 90%,随着浓度降低,抑制作用很快减弱。浓度至  $25 \times 10^{-6}$  时化合物 I 对萝卜根已无抑制作用,但对萝卜苗高仍有一定的抑制作用。 $F$  测验表明:各浓度对受体幼苗生长有不同效应,其差异达到极显著水平,其中对稗草苗高  $F=210.57$ ,对稗草根长  $F=187.39$ ,对萝卜苗高  $F=76.27$ ,对萝卜根长  $F=616.55$ ,均大于  $F_{0.01}=5.99$  ( $V_1=4, V_2=10$ )。多重比较结果见表1。

表1 不同浓度化感物 I (胜红菊素)的化感作用的测定结果

Table 1 Influence of ageratochromene with different concentrations on seedling growths of barnyardgrass and radish

| (1) 对稗草苗高的影响<br>Height of barnyardgrass shoots                    |                  |                                | (2) 对稗草根长的影响<br>Length of barnyardgrass roots                     |                  |                                |
|---|------------------|--------------------------------|---|------------------|--------------------------------|
| 浓 度<br>Concentrations<br>( $10^{-6}\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | $\bar{R}\bar{I}$ | 差异显著性<br>Significance<br>5% 1% | 浓 度<br>Concentrations<br>( $10^{-6}\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | $\bar{R}\bar{I}$ | 差异显著性<br>Significance<br>5% 1% |
| 25  | -0.665           | a A                            | 25  | -0.620           | a A                            |
| 50  | -0.748           | b B                            | 50  | -0.647           | a A                            |
| 100   | -0.887           | c C                            | 100   | -0.895           | b B                            |
| 250   | -1.000           | d D                            | 250   | -1.000           | c C                            |
| 500   | -1.000           | d D                            | 500   | -1.000           | c C                            |
| $F=210.57^{**}$ ( $F_{0.01}=5.99$ )                               |                  |                                | $F=187.39^{**}$ ( $F_{0.01}=5.99$ )                               |                  |                                |
| (3) 对萝卜苗高的影响<br>Height of radish shoots                           |                  |                                | (4) 对萝卜根长的影响<br>Length of radish roots                            |                  |                                |
| 浓 度<br>Concentrations<br>$10^{-6}\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$     | $\bar{R}\bar{I}$ | 差异显著性<br>Significance<br>5% 1% | 浓 度<br>Concentrations<br>$10^{-6}\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$     | $\bar{R}\bar{I}$ | 差异显著性<br>Significance<br>5% 1% |
| 25  | -0.131           | a A                            | 25  | 0.033            | a A                            |
| 50  | -0.194           | ab A                           | 50  | -0.090           | b B                            |
| 100   | -0.248           | ab A                           | 100   | -0.105           | b B                            |
| 250   | -0.321           | b A                            | 250   | -0.173           | c B                            |
| 500   | -0.938           | c B                            | 500   | -0.960           | d C                            |
| $F=76.27^{**}$ ( $F_{0.01}=5.99$ )                                |                  |                                | $F=616.55^{**}$ ( $F_{0.01}=5.99$ )                               |                  |                                |
| (自由度 Degree of freedom=4/10)                                      |                  |                                |   |                  |                                |

用不同浓度化合物 I 处理受体幼苗,结果发现,高浓度 $2000\times 10^{-6}$ 对稗草幼苗才有显著抑制作用,而低浓度 $500\times 10^{-6}$ 则出现促进作用。在对萝卜的影响中, $2000\times 10^{-6}$ , $1000\times 10^{-6}$ 和 $500\times 10^{-6}$ 3种浓度对其根长均有极显著的抑制作用,而 $1000\times 10^{-6}$ 及 $500\times 10^{-6}$ 浓度对萝卜苗高反而具有促进作用,表现出高抑低促效应。两种受体的根部比地上部分对化感物作用更敏感,不同浓度化合物 I 对受体幼苗生长的影响见表2。

表2 不同浓度化合物 I 对稗草和萝卜幼苗生长的影响及 t 测验结果

Table 2 Influence of allelochemicals I with different concentrations on seedling growth of *R. sativus* and *E. crusgalli*

| 受体植物<br>Acceptor    | 测试项目<br>Test items | $2000\times 10^{-6}$ |           | $1000\times 10^{-6}$ |           | $500\times 10^{-6}$ |           |
|---------------------|--------------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---------------------|-----------|
|                     |                    | <i>RI</i>            | $ t $     | <i>RI</i>            | $ t $     | <i>RI</i>           | $ t $     |
| 稗 草                 | 苗高 Seedling height | -0.117               | 11.167 ** | -0.092               | 9.373 *   | 0.186               | 11.484 ** |
| <i>E. crusgalli</i> | 根长 Root length     | -0.168               | 10.777 ** | -0.048               | 6.928 *   | 0.446               | 25.674 ** |
| 萝 卜                 | 苗高 Seedling height | -0.018               | 0.506     | 0.129                | 14.412 ** | 0.162               | 7.891 *   |
| <i>R. sativus</i>   | 根长 Root length     | -0.231               | 21.561 ** | -0.174               | 11.372 ** | -0.191              | 10.147 ** |

自由度 Freedom  $v=2, t_{0.01}=9.925, t_{0.05}=4.303$

### 3 讨论

在胜红蓟化感物质的分离与实验过程中发现:每分离一次,其中对受体抑制作用最强组分的 $\overline{RI}$ 值就减小一次,分别是 $-0.503$ ,  $-0.723$ 和 $-0.864$ ,说明胜红蓟素的纯度与对受体抑制效果有正相关关系,而混合物(浸提物)中各化合物之间无协同作用。将胜红蓟素与化合物 I 的混合物(重量比为1:1)在 $100 \times 10^{-6}$ 浓度时处理稗草和萝卜其抑制作用得不到加强的结果更证明了这一点(混合物与同浓度胜红蓟素处理的 $\overline{RI}$ 值没有显著差异)。但是,我们在对木麻黄(*Caurina equisetifolia*)的化感作用研究中发现:混合物中的各个化合物(均为黄酮类)之间往往会发生协同作用而加强植物的化感作用(邓兰桂等,1996)。这种协同作用没有在胜红蓟素与化合物 I 中出现,可能是由于胜红蓟素和化合物 I 自身的化感作用差异太大所致。

在近十余年间,人们一直在研究胜红蓟的杀虫活性(Gonzalez,1991)和抗菌及促进伤口愈合的特性。发现胜红蓟素能干扰昆虫保幼激素活性而使昆虫早熟变态(Fagoonee & Umrit,1981),胜红蓟中存在的这种保幼激素活性化合物能有效地阻止昆虫的胚胎发育,以至产生致命后果,这种防御昆虫侵袭的机制对于自身的生存是至关重要的。本研究进一步揭示胜红蓟素同时具有排斥其它竞争植物,争取生存机会的另一种生态功能。植物不象动物,它生活在固定地点,为了生存繁衍,合成出次生物质以避免动物的侵袭或增强与其它植物竞争的能力,这是生物在其协同进化中获得的一种竞争机制。胜红蓟素正是胜红蓟在其生长发育阶段释放给外界的次生物质,由于它具有抗保幼激素作用,故增强了其防御昆虫侵袭的能力,同时其对周围植物的化感抑制作用也增强了它的生存竞争力。胜红蓟次生代谢产物具有的这一多种生态功效现象值得注意,植物在进化中保留的一物多用机制有利于植物经济利用代谢产物,减少消耗。

胜红蓟除地上部外,其根分泌物和挥发物质也有一定的化感作用(骆世明等,1995)。我们的初步研究还发现:胜红蓟挥发物和根分泌物质的化感作用往往会受其发育时期和环境温度的影响,对其挥发物和根分泌物中的化感作用物的分离鉴定工作正在进行之中。进一步的工作将研究胜红蓟的化感作用与环境关系;研究胜红蓟有效成份对动植物的作用方式;进而人工合成胜红蓟素及其修饰物并研究其修饰物的生态效应。

### 参 考 文 献

- 邓兰桂,孔垂华,骆世明,1996:木麻黄小枝提取物的分离鉴定及其对幼苗的化感作用,应用生态学报,7(2)145~149。  
林榕等编著,1985:中国植物志,科学出版社,74卷,53~54。  
骆世明,林象联,曾任森等,1995:华南农区典型植物的化感作用研究,生态科学,(2)114。  
曾任森,骆世明,1993:香茅、胜红蓟和三叶鬼针草的植物他感作用研究,华南农业大学学报,14(4)8~14。  
Fagoonee I & Umrit,1981:Anti-gonadotropic hormones from the goatweed, *Ageratum conyzoides*. *Insect Sci Application*. 1 (4)373~376。  
Gonzalez A G.,1991:Methoxy flavones from *Ageratum conyzoides*. *Phytochem*. 30(4)1269~1271。  
Sadtler research laboratories. 1982: *Nuclear magnetic resonance spectra*. Division of bio-rad laboratories. Inc. 62: 35602M, 62:12274c。

- 
- Wiedenfeld H. & Roder E. ,1991; Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum conyzoides*. *Plant Med.* **57**(6)578~579.
- Wiliamson G. B. ,1988; Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls. *J. Chem. Eco.* **14**(1)181~187.