

东北林业大学

硕士学位论文

核桃楸树皮中活性物质的提取与分析

姓名：袁海舰

申请学位级别：硕士

专业：林产化学加工工程

指导教师：李淑君;孙墨珑

20070601

摘要

以核桃楸树皮为原料,用 95 %的乙醇提取其中的活性物质。依次用石油醚、氯仿和乙酸乙酯对乙醇提取物萃取分离后,对各萃取相及乙醇提取物进行生物活性测试。结果显示它们对试虫都具有毒杀和拒食作用,并且触杀作用比胃毒作用致虫死亡率高,药效快。核桃楸树皮抑菌活性成分相对集中于氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相中,二者对杨树叶枯病的最低抑菌浓度都是 3.125 mg/mL。活性测试为活性物质的提取和核桃楸树皮提取物在农林方面的应用提供了科学依据。

先后用化学预试法、GC-MS 联用分析法探索了乙酸乙酯相和氯仿相的化学组分。化学预试结果显示乙酸乙酯萃取相中含有酚类和鞣质、萜醌类、黄酮类、内酯和香豆素,可能含有机酸、不含蒽醌及其甙类,GC-MS 联用分离确认出其中 14 种化合物,占乙酸乙酯萃取相的 94.61 %,含量最大的化合物为 1,2,3-苯三醇、胡桃醌和 7-甲氧基-1-四氢萘酮,含量分别为 42.31 %、12.33 %和 11.26 %;GC-MS 联用分析初步确认出氯仿萃取相中的 13 种化合物,占氯仿萃取相的 94.04 %,含量最大的化合物是胡桃醌,占氯仿萃取相的 36.65 %;TLC 和 HPLC 联合分离法探索了纯化胡桃醌的条件,乙酸乙酯萃取相最佳展开剂为氯仿:丙酮 = 2:1,氯仿萃取相最佳展开剂为氯仿:丙酮 = 8:1。化学组分的分析可以为活性物质的分离提纯工作提供参考。

对胡桃醌的提取工艺、稳定性、生物活性及胡桃醌含量测定方法进行了研究。结果显示:用超声波提取、常规提取和索氏提取三种方法对核桃楸树皮进行提取,得到的胡桃醌占原料的质量百分比依次为 0.00131 %、0.00126 %和 0.00111 %。超声波辅助浸提,减压蒸馏法提取法可以从核桃楸树皮中得到高纯度的胡桃醌,GC-MS 联用分析显示提取产物中胡桃醌相对含量达到 96.420 %。产物的无色亚甲基蓝显色反应、碱液试验、傅立叶红外光谱、¹H NMR 都显示提取产物具有胡桃醌的结构特征,这种提取高纯度胡桃醌的简便方法,对胡桃醌的应用具有重要意义。在胡桃醌溶液中添加吐温 80 会增加胡桃醌的稳定性;pH 值和温度都对胡桃醌溶液的稳定性有较大的影响,pH 值为 4 时胡桃醌最稳定,温度越高胡桃醌越不稳定,探索影响胡桃醌稳定性的因素对胡桃醌的生产和储存具有重要的意义。胡桃醌有很好的杀虫和抑菌性,胡桃醌对杨树叶枯病、杨树烂皮病、樟子松枯梢病都有很好的抑菌作用,其中的胡桃醌对杨树叶枯病的最低抑菌浓度为 0.0625 g/L。施药 2d,胡桃醌对舞毒蛾触杀致死中浓度为 0.83 g/L。在检测波长为 426nm 处,首次采用简便易行的分光光度法测定核桃楸树皮中的胡桃醌含量为 0.0933 %,验证了此种方法的加样回收率为 99.6 %,重复性良好,测定结果与常用的 HPLC 法测定结果相近。

关键词 核桃楸树皮;活性;提取;胡桃醌

Abstract

The active components in bark of *Juglans mandshurica* are extracted by 95% alcohol, and then the extractives are separated by petroleum ether, chloroform and ethyl acetate in turn. The results of activities test of all these extractives showed they all had insecticidal activities to *Lymantria dispar* and they can all make *Lymantria dispar* refuse eating food. The chloroform and ethyl acetate extracts have stronger antifungal activities, The MIC of them is 3.125 mg/ml to *Alternaria alternata*. Activities tests not only point out way for analysis and extraction of active compound in bark of *Juglans mandshurica*, but also give science information for the application.

Chemical methods and GC-MS methods are used in turn for analyzing the chemical components of chloroform and ethyl acetate extracts. The results of chemical tests showed that there are hydroxybenzenes and tannin, naphthoquinones, flavones, lactones, coumarines in the ethyl acetate extracts, there are probably organic acid, but not anthraquinones and its glucide in the ethyl acetate extracts, the analysis of GC-MS affirm 14 compounds of them, 94.61% of ethyl acetate extracts, the most compounds are 1,2,3-Benzenetriol, 5-hydroxy-1,4-Naphthalenedione and 7-Methoxy-1-tetralone, their contents in ethyl acetate extracts are 42.31%、12.33%、11.26%. The analysis of GC-MS affirm 13 compounds in chloroform extracts. the content in chloroform extracts is 94.04%, the most compound is 5-hydroxy-1,4-Naphthalenedione, the content in chloroform extracts is 36.65%; TLC separation- HPLC test showed that the best spread solvents are chloroform : acetone=2:1 for chloroform extracts, and chloroform :acetone=8:1 for ethyl acetate extracts. The analysis of chemical components may be consults for the separation and purification of activities components.

Extraction, stability, bioactivity and determination of weight content of juglone were studied. The results show that the extraction yields are 0.001 31%, 0.001 26% and 0.001 11% for ultrasonic extraction, conventional extraction and soxhlet extraction, respectively. High-purity samples of juglone were obtained by ultrasonic-aided extraction and vacuum distillation, and the relative weight content was 96.420% according to the analytical results of GC-MS. The structural characteristics of juglone were also confirmed by color reaction, alkali reaction, FT-IR and ¹H NMR, and a simple procedure of extraction was developed. It can also be found that, with strong anti-oxidation properties and weak anti-induction properties, the incorporation of Tween 80 was not corresponding with the increase in decreasing rate, and pH and temperature had a striking effect on stability of

juglone solution. Optimum stability was observed with pH 4, and the elevated temperature had a negative effect on stability. The experimental results also show that the extracted juglone has good insecticidal activity and anti-fungi property, and effective prevention of plant diseases, and the minimum concentration and pesticide time for prevention of poplar-leaves related diseases are 0.0625 g/L and 2d, and LC₅₀ for *Lymantria dispar* is 0.83 g/L. Spectrophotometric method was applied for the determination of juglone content at wavelength of 426 nm, and the content and recovery rate were found to be 0.0933% and 99.6%, which further confirmed the data obtained from HPLC analysis.

Keywords Bark of *Juglans mandshurica*; activities; extraction; juglone

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得东北林业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：袁海舰

签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解东北林业大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权东北林业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：袁海舰

导师签名：李淑君

签字日期：2007年6月22日

签字日期：2007年6月22日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

1 绪论

核桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim) 又名胡桃楸、山核桃, 是胡桃科胡桃属植物中的一种。其中胡桃(核桃)的健脑效果和丰富营养价值为世人所推崇, 因此吸引人们对胡桃科植物的植物形态及核桃果仁等进行了大量的研究。但是, 近年来研究表明: 该科植物除了果仁部分具有丰富的营养价值和药用价值外, 植物本身还具有化感、杀虫、抑菌等生物毒性, 是一种潜在的生物农药资源^[1-4]。化学农药长期使用在保障农作物高产和稳产方面发挥了巨大的作用。然而传统化学农药的长期使用导致害虫产生的抗药性迫使人们加大用药剂量, 引起越来越严重的环境问题。如: 土壤、农产品中农药残留逐年增加, 危害人、畜安全等^[5-6]。因此, 寻求和开发对人类健康和生态环境安全的新型农药越来越迫切。研究表明, 植物是生物活性化合物的天然宝库, 其产生的次生代谢产物超过 400000 种^[7]。其中的大多数化学物质如萜烯类、生物碱、类黄酮、甾体、酚类、独特的氨基酸和多糖等均具有杀虫和抗菌活性^[8]。植物源农药是从植物中提取有杀虫或抗菌作用的活性物质, 直接或间接加工合成的新型农药。由于该类农药具有在环境中生物降解快, 对人畜及非靶标生物毒性低, 害虫不易产生抗性等优点^[9], 所以该类农药的研究开发和应用已经成为当前农药和植保界研究的热门课题。其中对胡桃属植物的研究就是一例。

1.1 胡桃属植物在农业上的应用研究

1.1.1 杀虫活性

对核桃楸杀虫活性成分的研究未见报道, 对胡桃属植物中核桃叶提取物的杀虫活性偶有报导^[10]。核桃叶提取物对杨毒蛾具有较强的胃毒作用, 但无拒食和触杀作用^[11]。核桃提取物具有抗寄生虫和驱避作用^[12], 胡桃醌和蓝雪醌是几丁质合成酶抑制剂, 抑制雌埃及蚊虫、黑腹国蝇等昆虫体内蜕皮激素 20-单合酶活性^[13]。翟梅枝等分别就核桃叶提取物对蚜虫的触杀作用和对杨毒蛾生物活性进行了研究。研究结果表明, 核桃叶提取物对蚜虫具有较强的触杀作用, 击倒作用随浓度增大而增大^[14]。

翟梅枝等还研究了核桃叶提取物及萃取物对粘虫、小菜蛾的生物活性^[15]。结果表明: 核桃叶 95%乙醇冷提物对小菜蛾有明显的拒食作用; 提取物的乙酸乙酯萃取部分对粘虫有较明显的拒食作用, 且乙酸乙酯萃取物浓度的变化, 对粘虫的拒食率、死亡率及生长发育抑制率均有较大影响研究还表明: 提取时所用乙醇浓度越大, 提取物活性越明显, 且冷提的效果较热提好。

1.1.2 抗病活性

早在 1982 年 CaФyЯгоD Ж 等就报导, 用胡桃叶子水浸液防治棉花凋萎病, 提高产量 50.9% 以上。2003 年翟梅枝研究了核桃叶乙醇提取物对烟草叶花病毒、金黄色葡

萄球菌、枯草芽孢杆菌和黑根霉(真菌)的抑菌作用,证明核桃叶次生物质具有较好的抑菌活性^[16]。

1.1.3 化感作用

化感作用(allelopathy, 又称他感作用或异株克生作用)是植物通过淋溶、挥发、残体分解和根系分泌向环境中释放化学物质,从而对自身或周围其他植物(包括微生物)间接产生有害或有利的作用^[17-21]。由于核桃的化感作用对植物有抑制和促进的双重作用,因此在生产实践中可以科学设计核桃与作物、蔬菜间作类型和间作距离。利用核桃的化感作用有效控制田间杂草,为人类开发新型的无公害植物除草剂提供了新的途径。胡桃科植物具有化感作用,其次生代谢物胡桃醌能抑制其他植物的生长发育^[22]。刘彬彬等对核桃叶石油醚提取物的化感作用进行了研究,证明核桃叶石油醚提取物对一些植物的生长发育有抑制作用^[23],胥耀平等以核桃叶为供体材料,以不同科的莴苣、小麦、西红柿为受体材料,采用发芽和生长实验,研究了核桃叶提取物浓度对三种受体的化感作用^[24],结果表明,不同浓度的核桃叶提取物对三种受体分别有抑制或促进作用,酚类及黄酮类化合物可能是主要化感成分。

综上所述,胡桃属植物提取物在农林病虫害防治方面的研究主要集中在核桃上,而对核桃楸的研究则较少,研究核桃楸的生物活性,对全面认识核桃楸,进而更有效的综合利用核桃楸这种珍贵的资源至为重要。

1.2 核桃楸生物活性研究

王少东等对核桃楸青果皮的抗肿瘤作用进行了药理研究,结果表明,核桃楸青果皮水提浸膏对小鼠肉瘤 180 和小鼠实体型肝癌均有明显的抑制作用,其机理在于诱导动物机体产生细胞免疫反应,对肿瘤细胞核酸代谢水平有抑制作用^[25]。王绍林等对核桃楸青果皮的抗肿瘤作用进行的研究表明,核桃楸青果皮水提浸膏对小鼠移植性肿瘤有明显的抑制作用,抑制率与所用剂量有依赖关系,是一种有前途的抗癌药物^[26]。

青龙衣对皮肤病、子宫脱垂、白细胞减少症有良好的临床疗效,并有较好的镇痛作用。其有效成分对肿瘤有明显的抑制作用,活性成分为胡桃醌、粗萘醌、鞣花酸和核桃多糖等^[27]。

兰英等就核桃楸青果皮水提物对降低小鼠体内丙二醛质量浓度和诱生小鼠肿瘤坏死因子进行了研究,结果表明:核桃楸青果皮水提物可降低小鼠体内脂质过氧化程度^[28],并具有一定的免疫调节作用^[29]。

姜丽萍等就核桃楸青果皮等浸出物对小鼠巨噬细胞内 α -TNF 基因表达的影响进行了研究,揭示了核桃楸青果皮等浸出物用于抗肿瘤的作用机理。研究表明,核桃楸青果皮具有抗菌作用,核桃楸青果皮醇提取物在体外能抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及枯草杆菌。核桃楸青果皮还具有抗病毒作用,其煎剂对流感、亚洲型 68-1 株和孤儿病毒 ECHO 有抑制作用。通过原位杂交检测技术,首先发现核桃楸青果皮具有促进小鼠巨噬细胞的 TNF α -mRNA 表达的效应,因此具有抗肿瘤作用^[4]。

宋华等就核桃楸叶提取液对肿瘤细胞的抑制作用进行了研究。实验将核桃楸叶子的乙醇提取物按极性分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取,通过萃取液和不同肿瘤细胞共同体外培养,检测不同浓度提取液对肿瘤细胞增殖作用的影响。研究表明,在对人体正常细胞株无杀伤作用的浓度范围内,核桃楸叶子的乙酸乙酯提取液对人的多种肿瘤细胞具有较强的增殖抑制作用,说明核桃楸中低脂性部位可能含有直接作用于肿瘤细胞的活性成分^[30]。

核桃楸粗提物中的有效成分和药理作用机理尚不十分清楚,其有效成分的提取分离和药用作理机理是目前国内的主要研究方向之一。并且,核桃楸活性的研究相对集中在医学上,其在农林病虫害防治方面的研究未见报道,所以研究核桃楸在病虫害防治方面的生物活性,对综合有效利用核桃楸这种珍贵资源非常重要。

1.3 核桃楸中活性成分的研究

核桃楸化学成分的研究也取得一定的进展,国内外学者已先后从核桃楸中分离提纯出单体化合物胡桃醌等。1985年,许绍惠等首次从核桃楸的新鲜根皮、枝皮和青果皮中分离提纯出胡桃醌,并鉴定了结构,与国际上报道完全一致。胡桃醌是核桃楸中主要的毒性物质,含量较高,在核桃楸枝皮中的含量可达0.02~0.4mg/g(鲜重)以上^[31]。

对胡桃属植物中胡桃醌衍生物的毒性成分和其它生物活性成分也有报导。如核桃楸枝皮中含有胡桃醌衍生物5-羟基-3,3'-双胡桃醌,核桃叶中含有生物活性成分黄酮醇和多酚复合物等。这些胡桃醌的衍生物及其它活性成分的毒性,一般都小于胡桃醌。胡桃醌具有明显的抑菌和抗癌作用,又是一种抗生成分。研究胡桃属植物的毒性物质,对探讨胡桃属植物群落的结构及其毒性物质在医学和农业上的应用等,都具有十分重要的意义^[32]。

李敬芬等对核桃楸树皮化学成分的提取和分离进行了初步研究。将核桃楸树皮乙醇提取物分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取成5部分,其中乙酸乙酯部分经聚酰胺粗短柱粗分离及葡聚糖凝胶柱纯化,得一化合物。经化学反应及红外光谱初步鉴定为醌苷,其最后结构尚待研究^[33]。

吴乃居等对核桃楸叶化学成分进行了研究,从中分出6个单体,经理化定性和光谱分析确定其结构为:二十九烷醇、二十八烷醇-2、 β -谷甾醇、胡桃醌、3-甲氧基-7-甲基胡桃醌和琥珀酸等。但未对各化学成分的活性做进一步研究^[34]。

Hirakawa K等对胡桃属植物进行了研究,从核桃楸的鲜皮中分离得到萘醌^[35]。Joe Yoonki等从核桃楸的根中分离得到2种新的三羟基萘葡萄糖苷,并鉴定了它们的结构^[36]。Lee Sungwon等从核桃楸的根中分离得到3种新的葡萄糖苷(2个三羟基萘葡萄糖苷和1个1-羟基-4-甲氧基萘葡萄糖苷),并鉴定了它们的结构。这3种新的葡萄糖苷对人的肿瘤无细胞毒作用^[37]。

Kim Sanghyun等从核桃楸的根中分离得到3种新的化合物(二芳基庚酮糖、三羟基吡喃甲酯和萘醌等),并鉴定了它们的结构。其中三羟基吡喃甲酯对人的2种癌细胞有

活性作用^[38]。Lee Kyungseon 等从核桃楸的根中分离得到 1 种新的化合物、3 种已知二芳基庚酸和 1 种已知倍半萜烯，并鉴定了它们的结构。除 1 种二芳基庚酸外，其余 4 种化合物对人的结肠癌和肺癌细胞有细胞毒作用^[39]。

Li Gao 等从核桃楸的根中分离得到 4 种新的化合物(二芳基庚酸)和 2 种已知化合物(四氢萘酮)，并鉴定了它们的结构^[40]。Lee Eunbang 等从核桃楸的未熟果中分离得到胃毒活性物^[41]。Min Byungsun 等分别从核桃楸的茎和皮中分离得到 9 种化合物(其中 3 种萜葡萄糖苷、4 种黄酮醇和 2 种三羟基苯甲酰葡萄糖苷等)，并鉴定了它们的结构。其中：紫杉叶素对 MT-4 细胞有强烈的诱导作用；三羟基苯甲酰葡萄糖具有显著的抗体活性；其他化合物活性低或无活性^[42-44]。

核桃楸树皮中含有大量的活性成分^[45-47]，但是已有研究的仅有核桃醌和三羟基苯甲酰葡萄糖等少数几种^[48]。仍有很大的研究空间，本课题将对核桃楸树皮中的生物活性物质进行较深入的分析研究。

1.4 胡桃醌应用的研究

1.4.1 胡桃醌在医学上的应用

Mezhevalova A G(1958)报导，鼯鼠对胡桃醌的忍耐量是每克体重 0.04 mg，最低致死量为 0.09 mg，毒性的临界值是 0.05 mg，致死量是 0.1~1.0 mg，但对患有结核的豚鼠和兔的试验中发现，胡桃醌的毒性作用却降低了^[31]。Ikekawa Tetsura 等报导，胡桃醌有抗肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* 602)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi* A) 黄色微球菌 (*Micrococcus flavus* 16)、枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis* NRRL 558) 大肠杆菌 (*Eschichia* NIHJ) 等真菌的作用^[31]；许绍惠曾与中国医科大学口腔医院等单位合作，临床试验证明用胡桃醌 (100~200 ppm) 治疗牙周炎确有明显效果。此外，有人报导，胡桃醌有治疗便秘、赤痢、阳痿遗精、腰疼、无名肿瘤、经淋巴结核及外用治疗头癣、牛皮癣和橡皮肿等作用^[31]。此外，胡桃醌对鱼类和蝌蚪都有明显的毒害作用，既使对生活力很强的泥鳅鱼，一般在浓度为 10 ppm 时便可以致死。但是，胡桃醌对一些害虫毒害作用不太明显。从抑菌试验来看，胡桃醌浓度 > 50 ppm 时，其抑菌作用随浓度增加而增强。

胡桃醌有抗肿瘤的作用，在国外一有些报导，Bhargava^[49]报导，对小鼠自发性乳腺癌和移植性乳腺癌有明显的抗癌活性，使艾氏腹水癌细胞的有丝分裂异常。Singh Raeshuer 等报导。8-氯胡桃醌同巯基链烷酸的缩合物对小白鼠的白血病 P338 具有抗癌活性。在国内，1975 年华北冶药厂抗菌素研究所，用核桃青皮制版“7421”注射液，经临床试验证明、配合放疗、化疗治疗癌症有增高白血球的作用，许绍惠与沈阳药学院肿瘤研究室合作^[50]，进行胡桃醌抗癌试验的结果表明胡桃醌对 S180 实体瘤的抑瘤率达 50%，对移植肝癌腹水型瘤株的小白鼠生命延长率达 95~126%。同时，应用放射性同位素方法证明，胡桃醌可以抑制肿瘤细胞 DNA 的合成，在体外培养 5 小时达到高峰，其中 0.025 mg/mL 掺入抑制率为 60.2%，0.1 mg/mL 掺入抑制率为 71.5%。电子显微镜观察

结果表明，胡桃醌对肝癌腹水型肝癌的超微结果也有明显的影响，主要表现在使线粒体发生严重的空泡化。从胡桃醌的结构看，有可以起到氢键给予体(donor)的酚羟基，又有能够形成氢键的两个羰基，因此是一个比较理想的脱氧核糖核酸的 Intercalants。

1.4.2 胡桃醌在农业上的应用

1967年 Ikekawa Tetsuro 等^[51]报章，胡桃醌可抑制灰梨孢霉菌(*Piricularia grisea*)、稻瘟病菌(*P. oryzae*)，炭疽病(*Glomerella cingulata*)等 17 种真菌。另据报导^[52]核桃楸中活性成份胡桃醌可抑制柳叶栅锈病 (*Melampsora arctico* Rostr)、杨树烂皮病(*Valsa Sordida*)、侧柏枯枝病(*Diplodia thujae* Westd)、落叶松杨锈病(*Metampsora Larici-populina*)等孢子的萌发，同时对水稻稻瘟病(*Piricularia oryzae*)、稻纹枯病(*Hypochnus Sasakii*)、棉花枯萎病(*Fusarium Vasinfectum*)、黄瓜蔓割病(*Fusarium Solami*)、茄子褐纹病(*Phomopsis Vexans*)和茄子黄萎病(*Backerium Solanacegrum*)菌丝的生长也有明显的抑制作用。Funk D·F 等^[53]报导用胡桃醌处理日本落叶松叶松、挪威云杉、美国五针松、欧洲赤松幼苗时发现，高浓度(10^{-2} ~ 10^{-4} mol/L)有抑制作用，低浓度(10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L)有促进作用。Ritveld w J^[54](1983)报导胡桃醌对大部分草木植物和木本植物的幼苗在高浓度(10^{-3} ~ 10^{-4} mol/L)时有抑制作用，较低浓度(10^{-8} ~ 10^{-6} mol/L)则无明显的损害作用，其中以对金银忍冬 (*Lonicera mackii*)，截胡铁扫帚 (*Lespedeza cuneata*)、绦车轴草 (*Trifolium incarnatum*)、欧洲凯木(*Alnus glutinosa*)和牛奶子(*Elacagnus umbellata*)最为敏感。许绍惠等试验表明，高浓度时对长白落叶松、刺槐和胡校子的种子均有降低发芽率的作用，而低浓度则无明显作用，对落叶松幼树、红松和黄菠萝幼苗进行浇灌只在 15~30 天内有些抑制作用，但到秋末计算整个株高、地径的生长量则无明显不良影响。可见，胡桃醌在农业将有广泛的应用前景。

由于胡桃醌在医学和农业上都有一个很好的应用前景，所以研究胡桃醌的制取方法，尤其是研究从天然植物提取高纯度胡桃醌的方法对胡桃醌的应用有重要意义，也有利于综合高效利用核桃楸这种珍贵的资源。

2 核桃楸树皮提取物生物活性的研究

2.1 材料和仪器

2.1.1 供试材料

核桃楸树皮, 核桃楸树皮采自东北林业大学帽儿山实验林场; 样品经阴干、粉碎后, 筛取 40~60 目待用。

舞毒蛾, 实验用舞毒蛾于 2006 年 4 月采自越冬舞毒蛾卵块, 置入 4 ℃冰箱内放置。5 月中旬取出, 经 70 %乙醇消毒后室温孵化, 以新鲜的杨树叶饲养至 I~II 龄供试。

甘蓝夜蛾, 采用黑光灯诱集成虫, 将诱集到的成虫放入已铺好报纸的罐头瓶中, 再罩纱布的瓶盖上放蘸饱 10 %蜂蜜水的棉球以供成虫取食, 待成虫产卵后, 把卵块取出放进 2 %的次氯酸钠溶液中消毒 5 分钟后再转移到已高压灭菌的罐头瓶中, 瓶底用吸水棉球保湿, 加盖封严, 待虫卵孵化后, 使幼虫饥饿 12 小时后选健虫备用。

樟子松枯梢病(*Sphaeropsis sapinea*), 世界上广泛分布而又危害严重的一种病害, 它主要危害以松属为主的针叶树。樟子松是我国三北防护林工程和治沙工程的主要造林树种, 截至“九·五”末期, 我国三北地区已有樟子松人工林 50 万~60 万 hm^2 ^[55]。

杨树叶枯病(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler), 我国东北、西北、华北等地区杨树主要病害之一。该病菌既危害插条苗, 又危害实生苗, 发病最重者整株叶片会全部枯死(向玉英, 1986)。这种病害给林业生产造成了很大的经济损失^[56]。

杨树烂皮病(*Cytospora chrysosperma* (pers.) Fr.), 我国杨树栽培区都有发生, 但主要分布在东北、西北、华北等地。危害各种杨树 (*Populus* spp.), 以及旱柳(*Salix matsudana*)、榆(*Ulmus pumila*)、板栗(*Castanes millissima*)、槭(*Acer* spp.)、桑(*Morus alba*)、接骨木(*Sambucus* spp.)、木槿(*Hibiscus Syriacus*)、花楸(*Catalpa ovata*)等。是公园、绿地、行道树和苗圃杨树的常见病和多发病, 常引起行道树大量枯死, 新移栽的杨树发病尤重^[57]。

2.1.2 主要仪器

HPG-400H 人工气候箱, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; SANYO SUTOCL AVE MLS-3020 高压灭菌锅; OL-CJ-IF 医用型洁净工作台。

2.2 实验方法

2.2.1 供试药膏的制备

核桃楸树皮提取方法: 取核桃楸树皮 40~60 目样品 2.5 kg 放入玻璃缸中, 加入 95%的乙醇 15000 mL, 料液比为 1:6, 每间隔约 6 h 搅拌一次, 放置 48 h。取上层墨绿

色清液抽滤，滤液在旋转蒸发器中，45 ℃真空浓缩成黑色膏状物，每批样品共浸提三次。

萃取分离方法如图 2-1，称取上述膏状物 30 g，加入 600 mL 蒸馏水，超声波振荡 2 min，使他们形成分布均匀的悬浮液，在分液漏斗中依次用 3×200 mL 的石油醚、氯仿、乙酸乙酯进行萃取，各萃取三次。各相萃取液及剩余水相在旋转蒸发器中经真空浓缩可得到石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相和水相浸膏。

工艺流程如图 2-1 所示。

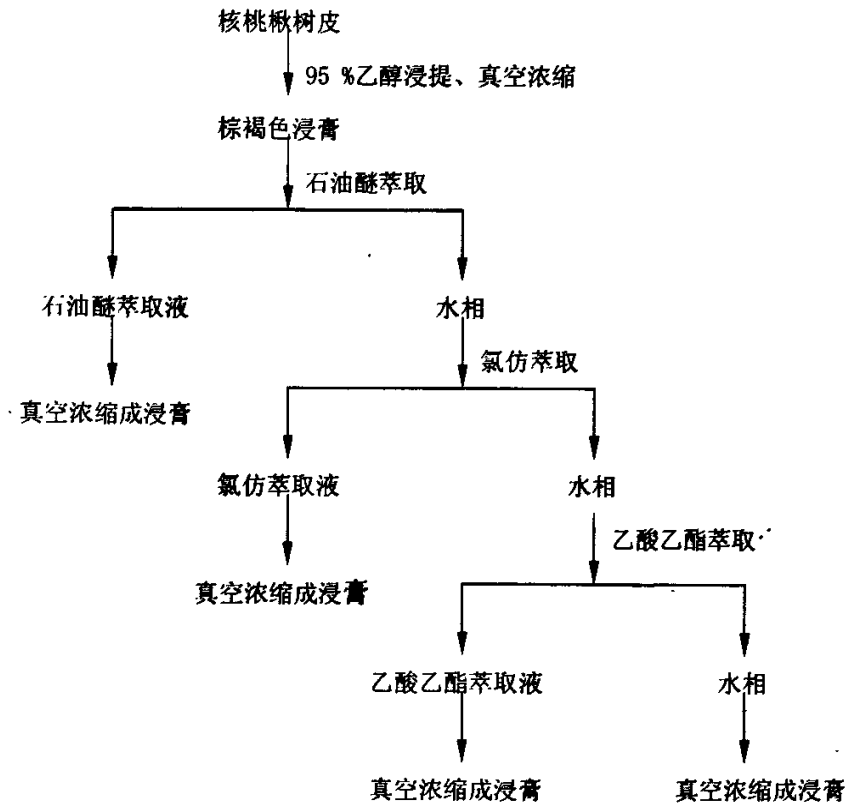


图 2-1 供试药膏制备流程图

2.2.2 提取物的杀虫活性测试

触杀，触杀活性试验采用药液浸虫法。将试虫在供试核桃楸树皮药液中浸渍 5 s 后取出，吸去多余药液，移入玻璃瓶中，放入新鲜杨树叶供舞毒蛾试虫取食。甘蓝夜蛾饲喂新鲜白菜叶。

胃毒，胃毒活性试验采用叶片浸药饲虫法。将新鲜杨树叶分别浸入不同浓度的药液中，5 s 后取出，待浸药杨树叶表面挥干后，放入装有饥饿试虫的玻璃瓶中供舞毒蛾试虫取食。甘蓝夜蛾饲喂浸药白菜叶^[58]。

判断虫子是否死亡方法，正常爬行的为活虫，不能爬行的、仰翻的虫子，用毛笔触

动其腹部，若只是稍微动弹，则算为死亡。

数据处理方法，一个供试药液即为 1 个处理，舞毒蛾每处理 30 只虫，每处理重复 3 次。甘蓝夜蛾每处理 15 只虫，每处理重复 3 次。

数据处理公式为：

$$\text{死亡率/\%} = \frac{\text{死亡虫子数}}{\text{原有虫子总数}} \times 100\% \quad (2-1)$$

$$\text{校正死亡率/\%} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\% \quad (2-2)$$

2.2.3 树皮提取物抑菌活性测试

2.2.3.1 培养基的制备

采用马铃薯培养基(PDA)^[59]：去皮马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，水 1000 mL，琼脂 20 g；将洗净去皮的马铃薯切碎，加水 1000 mL 煮沸 30 min，用纱布滤去马铃薯，加水补足 1000 mL，然后加琼脂和蔗糖，加热使琼脂完全溶化，趁热用纱布过滤，而后分装试管或三角瓶中，加棉花塞后在 121 °C 下加压蒸汽灭菌 20 min。

2.2.3.2 菌悬液的制备

(1) 用酒精灯火焰灭菌后的 0.5 cm 直径打孔器在培养好的菌落外缘切下带菌培养基菌饼。然后用火焰灭菌后的接种针或消毒的镊子将菌饼反置（有菌丝的一面向下和培养基贴合）移植到斜面培养基中央位置，一个斜面培养基试管中接一个菌饼。

(2) 将移植完菌饼后的试管用试管塞封口，放入恒温培养箱中培养 72 h 对供试菌种进行活化。

(3) 在装有已活化好菌种的试管中加入用无菌生理盐水，用接种针挑取活化的菌体，使孢子悬浮于无菌生理盐水中，然后倒入有玻璃珠无菌三角瓶中，振摇使菌丝和孢子形成均匀悬浮液，用无菌生理盐水稀释，调整菌液浓度为 10⁴~10⁵ cfu/mL，备用。

2.2.3.3 抑菌活性定性检测

将马铃薯固体培养基融化倒入平皿，待冷却凝固后，分别加入 1 mL 供试菌液，然后涂布均匀，按无菌操作将预先灭菌阴干并浸蘸 50 mg/mL 各提取物的 1 cm 滤纸圆片平贴在含菌培养基上，每种提取物的滤纸片在每只含菌平板上间隔一定的距离贴 2 片，每提取物做 2 次重复，取其平均值，同时并用浸有溶剂的滤纸片做空白对照。培养皿放在培养箱中，28 °C 培养 72 h，取出观察是否有抑菌圈，判断抑菌效果^[60]。

2.2.3.4 氟仿和乙酸乙酯萃取相对杨树叶枯病的 MIC 测定

取 7 支 50 mL 刻度试管，精确称取 0.25 g 待测药品放入第一支试管中，加 5 mL 丙酮，超声波震荡辅助溶解，用无菌水定容至 10 mL，其余 7 支各加入 5 mL 无菌水，从第 1 支吸取 5 mL 药液至第 2 支，混合后，再吸取 5 mL 至第 3 支，以此类推，最后 1 支试管取出 5 mL 弃去，每一试管加入 15 mL 65 °C PDA 培养基，混匀后用试管塞封口

放置成斜面凝固。另取不加药品丙酮按上述方法操作制成系列斜面作为对照。用移液管吸取 0.5 mL 已配制好的杨树叶枯病菌悬液放入带药斜面培养基上（每一斜面的接种量为 104 cfu），涂布均匀，于培养箱中 28 °C 培养 72 h，观察是否有菌丝生长。无菌丝生长的斜面中，药品浓度最低者即为最低抑菌浓度^[61]。所有操作均在洁净工作台中完成。

Cfu: colony formine unit, 菌落形成单位, 将稀释后的一定量的菌液通过浇注或涂布的方法, 让其内的微生物单细胞一一分散在琼脂平板上, 待培养后, 每一活细胞就形成一个菌落, 意思就是每毫升菌液中含有多少单细胞。

2.3 结果与分析

2.3.1 核桃楸树皮乙醇提取物杀虫活性

2.3.1.1 核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾的触杀作用

将核桃楸树皮乙醇浸膏配制成浓度梯度为 50、10、5、1 和 0.5 g/L 的药液。无样品对照, 施药 5 d, 试虫死亡情况如表 2-1 所示。

表 2-1 核桃楸树皮对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	0	0	0	0	0
0.5	5.0	10.0	11.7	11.7	15.0
1	10.0	10.0	23.3	31.7	35.0
5	25.0	30.0	50.0	55.0	65.0
10	28.3	40.0	53.3	60.0	68.3
50	31.7	45.0	58.3	73.3	78.3

由表 1 可以看出, 核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾有较强的触杀作用。施药时间 \geq 3 d, 药液浓度 \geq 5 g/L 时, 平均校正死亡率均超过 50 %。

核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾触杀作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析如表 2-2 所示。

表 2-2 核桃楸树皮对舞毒蛾的触杀作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析

施药时间(t)/d	校正死亡率—施药浓度回归方程	相关系数 R	LC ₅₀ /g·L ⁻¹
3	$L = 0.106 \ln c / g \cdot L^{-1} + 0.242$	0.89	11.4
4	$L = 0.129 \ln c / g \cdot L^{-1} + 0.279$	0.94	5.5
5	$L = 0.137 \ln c / g \cdot L^{-1} + 0.328$	0.91	3.5

表 2-2 结果表明, 施药时间为 3、4 和 5 d 时, 致死中浓度分别为 11.4、5.5 和 3.5 g/L。

核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾触杀作用的校正死亡率—施药时间毒力分析如表 2-3 所示。结果表明, 药液浓度为 5、10 和 50 g/L 时, 致死中时间分别为 3.5、3.1 和 2.7 d。

表 2-3 核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾触杀作用的校正死亡率—施药时间毒力分析

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	校正死亡率—施药时间 回归方程	相关系数 R	致死中时间 (LT ₅₀) /d
5	$L = 0.124t/d + 0.064$	0.95	3.5
10	$L = 0.129t/d + 0.095$	0.93	3.1
50	$L = 0.151t/d + 0.099$	0.94	2.7

2.3.1.2 核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾的胃毒作用

将核桃楸树皮乙醇浸膏配制成浓度梯度为 50、10、5、1 和 0.5 g/L 的药液。无样品对照，施药 5 d，试虫死亡情况如表 2-4 所示。

表 2-4 核桃楸树皮对舞毒蛾的胃毒作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 L %				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	0	0	0	0	0
0.5	0	13.3	13.3	18.3	20.0
1	5.0	15.0	18.3	21.7	25.0
5	10.0	20.0	23.3	33.3	35.0
10	13.3	25.0	25.0	51.7	53.3
50	15.0	25.0	28.3	53.3	61.7

由表 2-4 可以看出，核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾有较强的胃毒作用。施药时间 ≥ 4 d，药液浓度 ≥ 10 g/L 时，平均校正死亡率均超过 50%。

核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾胃毒作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析如表 2-5 所示。

表 2-5 核桃楸树皮对舞毒蛾胃毒作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析

施药时间 (t) /d	校正死亡率—施药浓度回归方程	相关系数 R	致死中浓度(LC ₅₀)/g·L ⁻¹
4	$L = 0.085\ln c/g \cdot L^{-1} + 0.236$	0.90	22.6
5	$L = 0.095\ln c/g \cdot L^{-1} + 0.254$	0.95	13.3

表 2-5 结果表明，施药时间为 4 d 和 5 d 时，致死中浓度分别为 22.6 g/L 和 13.3 g/L。

核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾胃毒作用的校正死亡率—施药时间毒力分析如表 2-6 所示。

表 2-6 核桃楸树皮对舞毒蛾胃毒作用的校正死亡率—施药时间毒力分析

药液浓度(c)/g·L ⁻¹	校正死亡率—施药时间回归方程	相关系数 R	致死中时(LT ₅₀)/d
10	$L = 0.109t/d + 0.008$	0.95	4.5
50	$L = 0.122t/d + 0.001$	0.96	4.1

表 2-6 结果表明，药液浓度为 10 g/L 和 50 g/L 时，致死中时分别为 4.5 d 和 4.1 d。

比较表 2-1 和表 2-4，药液浓度或施药时间均相同时，核桃楸树皮乙醇提取物对舞毒蛾的触杀作用强于胃毒作用。

2.3.1.3 核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾的触杀作用

将核桃楸树皮乙醇浸膏配制成浓度梯度为 50、10、5、1 和 0.5 g/L 的药液。无样品对照, 施药 5 d, 试虫死亡情况如表 2-7 所示。

表 2-7 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾的触杀作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	0	0	0	0	0
0.5	0	0	13.3	16.7	20.0
1	3.3	6.7	16.7	23.3	33.3
5	3.3	6.7	26.7	43.3	43.3
10	6.7	16.7	36.7	53.3	56.7
50	13.3	26.7	40.0	53.3	70.0

由表 2-7 可以看出, 核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾有较强的触杀作用。施药时间 ≥ 4 d, 药液浓度 ≥ 10 g/L 时, 平均校正死亡率均超过 50%。

核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾触杀作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析如表 2-8 所示。

表 2-8 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾触杀作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析

施药时间 (t) /d	校正死亡率—施药浓度回归方程	相关系数(R)	致死中浓度 (LC ₅₀) /g·L ⁻¹
4	$L = 0.0881nc/g \cdot L^{-1} + 0.255$	0.892	16.3
5	$L = 0.1051nc/g \cdot L^{-1} + 0.297$	0.975	6.9

表 2-8 结果表明, 施药时间为 4 d 和 5 d 时, 致死中浓度分别为 16.3 g/L 和 6.9 g/L。

核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾触杀作用的校正死亡率—施药时间毒力分析如表 2-9 所示。

表 2-9 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾触杀作用的校正死亡率—施药时间毒力分析

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	校正死亡率—施药时间 回归方程	相关系数 (R)	致死中时 (LT ₅₀) /d
10	$L = 0.127t/d - 0.033$	0.97	4.2
50	$L = 0.138t/d - 0.006$	0.99	3.7

表 2-9 结果表明, 药液浓度为 10 g/L 和 50 g/L 时, 致死中时分别为 4.2 d 和 3.7 d。

2.3.1.4 核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾的胃毒作用

将核桃楸树皮乙醇浸膏配制成浓度梯度为 50、10、5、1 和 0.5 g/L 的药液。无样品对照, 施药 5 d, 试虫死亡情况如表 2-10 所示。

表 2-10 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾的胃毒作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照	0	0	0	0	0
0.5	0	3.3	16.7	18.3	23.3
1	0	6.7	20.0	23.3	40.0
5	3.3	10.0	23.3	33.3	46.7
10	10.0	23.3	26.7	50.0	56.7
50	16.7	33.3	33.3	53.3	66.7

由表 2-10 可以看出, 核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾有较强的胃毒作用。施药时间 ≥ 4 d, 药液浓度 ≥ 10 g/L 时, 平均校正死亡率均超过 50%。

核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾胃毒作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析如表 2-11 所示。

表 2-11 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾胃毒作用的校正死亡率—施药浓度毒力分析

施药时间 (<i>t</i>) /d	校正死亡率—施药浓度 回归方程	相关系数 (<i>R</i>)	致死中浓度 (<i>LC</i> ₅₀) /g·L ⁻¹
4	$L = 0.082 \ln c / g \cdot L^{-1} + 0.240$	0.92	24.1
5	$L = 0.087 \ln c / g \cdot L^{-1} + 0.343$	0.94	6.1

表 2-11 结果表明, 施药时间为 4 d 和 5 d 时, 致死中浓度分别为 24.1 g/L 和 6.1 g/L。

核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾胃毒作用的校正死亡率—施药时间毒力分析如表 2-12 所示。

表 2-12 核桃楸树皮对甘蓝夜蛾胃毒作用的校正死亡率—施药时间毒力分析

药液浓度 (<i>c</i>) /g·L ⁻¹	校正死亡率—施药时间 回归方程	相关系数 (<i>R</i>)	致死中时 (<i>LT</i> ₅₀) /d
10	$L = 0.116 t / d - 0.013$	0.95	4.4
50	$L = 0.127 t / d + 0.022$	0.96	3.8

表 2-12 结果表明, 药液浓度为 10 g/L 和 50 g/L 时, 致死中时分别为 4.4 d 和 3.8 d。

比较表 2-7 和表 2-10, 药液浓度或施药时间均相同时, 核桃楸树皮乙醇提取物对甘蓝夜蛾的触杀作用和胃毒作用无显著差异。

2.3.2 石油醚萃取相杀虫活性

称取 5 g 石油醚萃取相浸膏, 加入 5 mL 丙酮、2 mL 吐温 80 和少量的蒸馏水, 震荡溶解, 用蒸馏水定容至 100 mL, 即得到 50 g/L 的母液, 取一定量的母液稀释成系列浓度, 以 50 g/L 的丙酮水溶液作为对照, 分别研究其对舞毒蛾的触杀作用和胃毒作用。

2.3.2.1 石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用

石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用如表 2-13 所示。

表 2-13 石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度 (<i>c</i>) /g·L ⁻¹	校正死亡率 (<i>L</i>) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	22.73	34.88	34.88	35.71	40.48	46.34	45
30	25	39.53	48.84	47.62	52.38	58.54	57.5
50	27.27	39.53	48.84	54.76	57.14	63.41	62.5

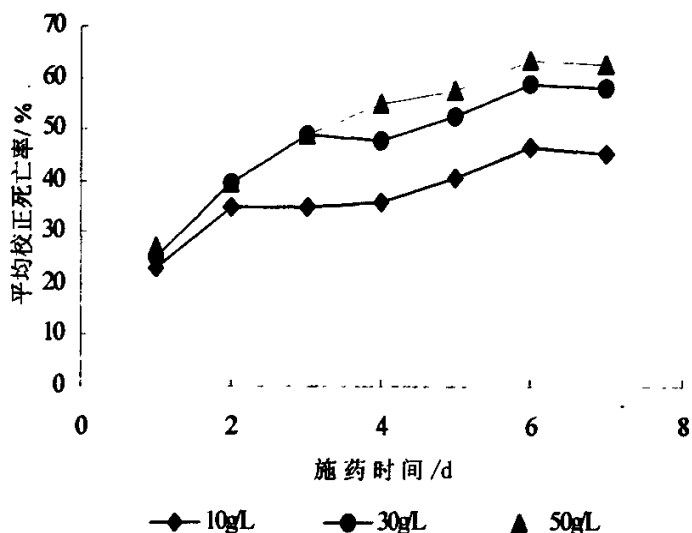


图 2-2 石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用

由图 2-2 和表 2-13 可以看出, 随着施药时间的增长, 舞毒蛾的平均校正死亡率都呈上升趋势, 但上升趋势逐渐缓和, 最后两天甚至有下降趋势。这说明石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用效果, 在施药后一周内逐渐表现出来, 施药后第三天, 被施三种不同浓度药液的虫子, 平均校正死亡率已分别达到 34.88 %、48.84 %和 48.84 %, 说明石油醚萃取相对舞毒蛾的触杀作用, 在较短的时间内就有很好的效果。另外, 由图表还可以看出, 石油醚萃取相的杀虫效果随药液浓度增大而提高。

2.3.2.2 石油醚萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

石油醚萃取相对舞毒蛾的胃毒作用如表 2-14 和图 2-3 所示。

表 2-14 石油醚萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	校正死亡率(L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	22.5	27.5	30	32.5	35	37.5	40
30	0	0.25	5	7.5	7.5	12.5	25
50	0	7.5	12.5	17.5	25	32.5	37.5

由图 2-3 可以看出, 随着施药时间的增长, 三条曲线都呈上升趋势, 且上升趋势未见缓和迹象, 施药后第七天, 被施三种不同浓度药液作用的虫子, 平均校正死亡率分别为 40 %、25 %、37.5 %, 这说明石油醚萃取相对舞毒蛾的胃毒作用在短期内效果不明显。另外, 由图表还可以看出, 石油醚萃取相的杀虫效果并不是随药液浓度增大而提高: 在施药后第一天, 被 10 g/L 药液作用的虫子平均校正死亡率为 22.5 %, 而被 30 g/L 和 50 g/L 药液作用的虫子平均校正死亡率都为 0, 随着施药时间的增长, 三条曲线有接近的趋势, 分析其原因可能是被浓度较大的药液浸泡的叶片气味较大, 使虫子产生了很强的拒食性, 所食叶片很少, 吃进体内的药量较少, 所以施药后前几天死亡率反而较低, 在实验中也发现被浓度较大的药液浸泡的叶片, 被虫子啃食的小孔较少。但长时间

的不进食可能会被饿死，这又解释了为什么施药后期校正死亡率会有所接近。

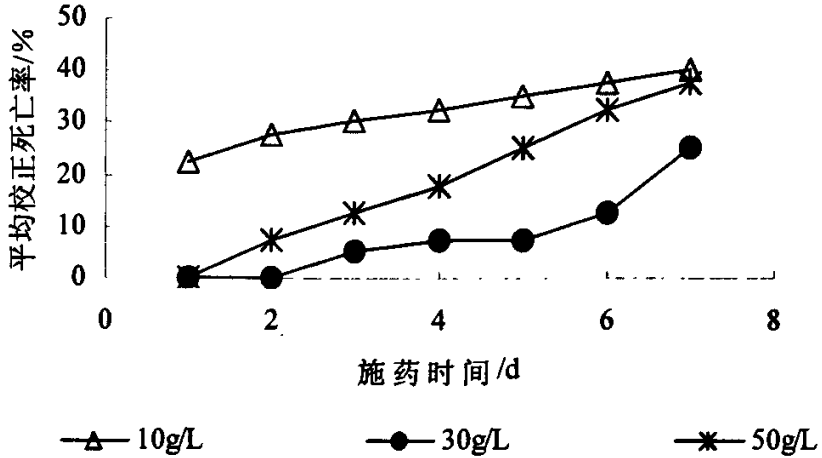


图 2-3 石油醚萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

2.3.3 氯仿萃取相杀虫活性

2.3.3.1 氯仿萃取相对舞毒蛾的触杀作用

氯仿萃取相对舞毒蛾的触杀作用如表 2-15 和图 2-4 所示。

表 2-15 氯仿萃取相对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	15.9	13.95	18.6	16.67	19.05	17.07	20
30	9.09	13.95	30.23	38.1	40.48	43.9	45
50	9.09	48.84	58.14	57.14	66.67	68.29	67.5

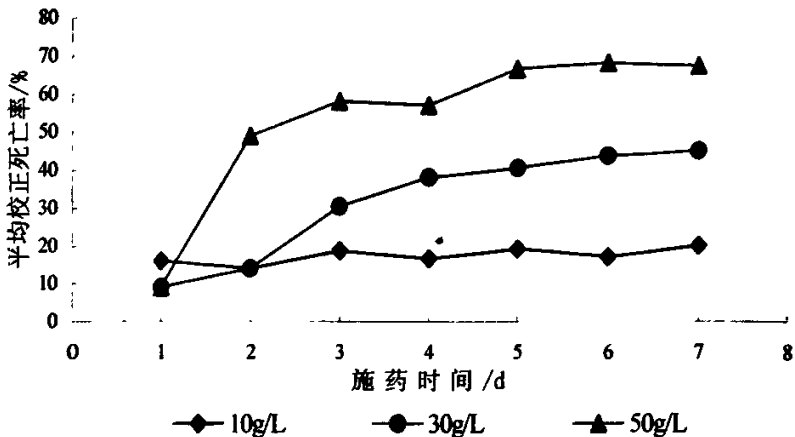


图 2-4 氯仿萃取相对舞毒蛾的触杀作用

由表 2-15 和图 2-4 可以看出, 被三种不同浓度的药液作用的虫子, 在施药后第三天平均校正死亡率分别为 18.6 %、30.23 %、58.14 %, 在随后的几天中没有大幅度的增大, 说明氯仿萃取相对舞毒蛾的触杀作用, 在短期内就可显示效果, 另外由图表还可以看出, 氯仿萃取相的杀虫效果随药液浓度增大而提高。

2.3.3.2 氯仿萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

氯仿萃取相对舞毒蛾的胃毒作用如表 2-16 和图 2-5 所示。

表 2-16 氯仿萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	10	12.5	12.5	15	15	15	15
50	5	12.5	15	17.5	17.5	22.5	22.5

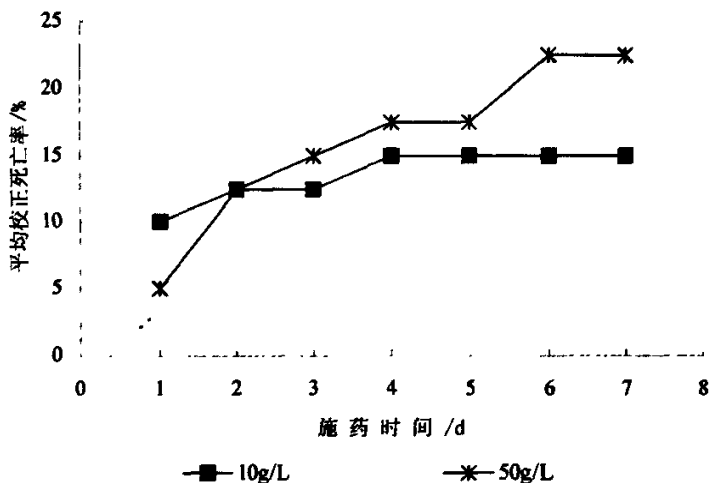


图 2-5 氯仿萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

由表 2-16 和图 2-5 可以看出, 随着施药时间的增长, 二条曲线都呈上升趋势, 施药后第七天, 被施两种不同浓度药液的虫子, 平均校正死亡率分别为 15 %和 22.5 %, 这说明氯仿萃取相对舞毒蛾的胃毒效果不明显。另外由图表还可以看出, 在施药后第一天, 被 10 g/L 药液作用的虫子平均校正死亡率为 10 %, 而被 50g/L 药液作用的虫子平均校正死亡率为 5 %, 随着施药时间的增长, 被 50 g/L 药液作用的虫子校正死亡率增加较快, 原因可能是被浓度较大的药液浸泡的叶片气味较大, 使虫子产生了很强的拒食性, 所食叶片很少, 吃进肚子里的累计药量较少, 所以施药后前几天死亡率反而较低, 在实验中也发现被浓度较大的药液浸泡的叶片, 被虫子啃食的小孔较少。但长时间的 not 进食可能会被饿死, 所以施药后期被较大浓度药液作用的虫子校正死亡率增加较快。

2.3.4 乙酸乙酯萃取相杀虫活性

2.3.4.1 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的触杀作用

乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的触杀作用如表 2-17 和图 2-6 所示。

表 2-17 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	9.09	11.63	20.93	21.43	21.43	21.95	20
30	30.78	37.21	48.84	52.38	54.76	65.85	70
50	63.64	72.09	76.74	80.95	80.95	80.49	80

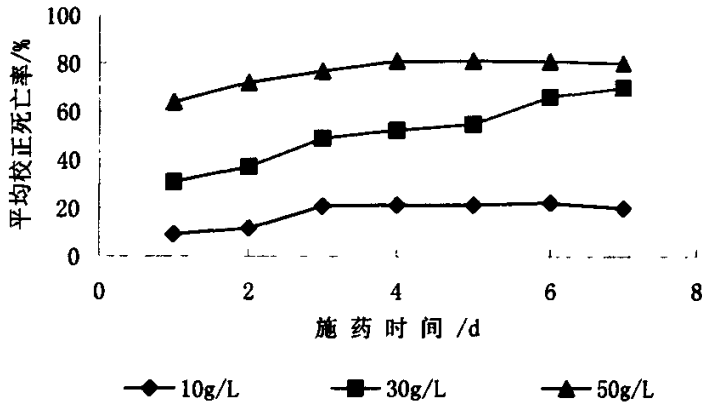


图 2-6 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的触杀作用

由表 2-17 和图 2-6 可以看出，随着施药时间的增长，舞毒蛾的平均校正死亡率略呈上升趋势，到施药后第三天，舞毒蛾的校正死亡率分别已达到 20.93%、48.84%、76.74%，与第七天的并没有太大的差别，所以可以说乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的触杀作用效果，施药后第三天就可以表现出来。另外由图表还可以看出，乙酸乙酯萃取相的杀虫效果随药液浓度增大而提高，且杀虫率随浓度变化的而变化的趋势很明显。

2.3.4.2 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的胃毒作用如表 2-18 和图 2-7 所示。结果显示，被施 10 g/L 与 20 g/L 药液的舞毒蛾在施药后三天内没有死亡，在施药后第七天校正死亡率分别为 5% 和 2.5%，被施 50 g/L 药液的舞毒蛾在施药后第七天，校正死亡率也仅为 15%，说明乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的胃毒作用较弱且缓慢。

表 2-18 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	2.5	5	5	5
20	0	0	0	2.5	2.5	2.5	2.5
50	2.5	5	5	5	5	12.5	15

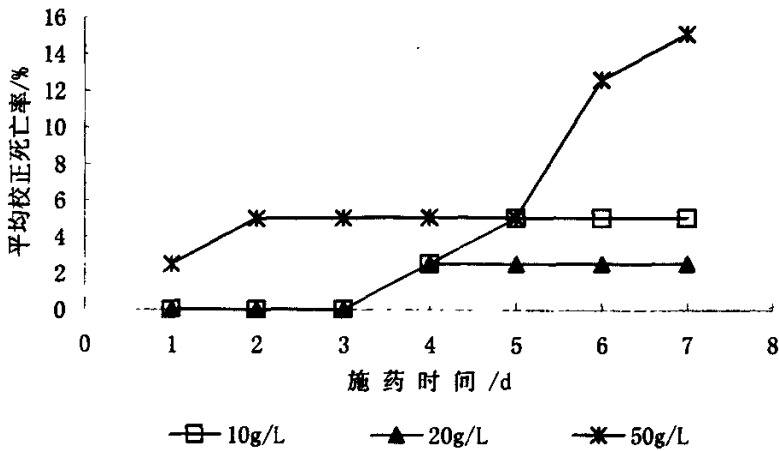


图 2-7 乙酸乙酯萃取相对舞毒蛾的胃毒作用

2.3.5 水相杀虫活性

2.3.5.1 水相对舞毒蛾的触杀作用

水相对舞毒蛾的触杀作用如表 2-19 和图 2-8 所示。

表 2-19 水相对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度 (c) /g·L ⁻¹	平均校正死亡率 (L) /%						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	11.63	14.29	19.05	17.07	17.5
30	0	13.95	27.91	30.95	40.48	41.46	45
50	13.64	37.21	53.49	66.67	66.67	70.73	75

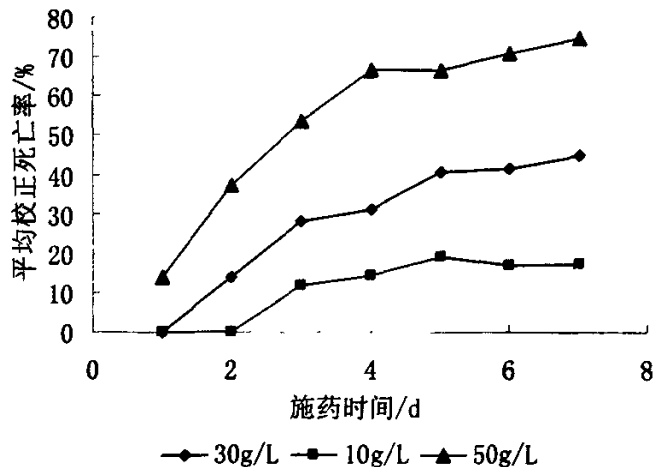


图 2-8 水相对舞毒蛾的触杀作用

由表 2-19 和图 2-8 可以看出, 随着施药时间的增长, 舞毒蛾的平均校正死亡率略呈上升趋势, 施药后第四天, 虫子校正死亡率分别为 14.29%、30.95%、66.67%, 与第七天相比相差不大, 水相对舞毒蛾的触杀作用效果在施药后 4 天内表现出来。虫子校

正死亡率随药液浓度的增大而增大。

2.3.5.2 水相对舞毒蛾的胃毒作用

水相对舞毒蛾的胃毒作用如表 2-20 和图 2-9 所示。

在施药后前四天，被 50g/L 药液的舞毒蛾校正死亡率反而低，说明水相提取物能使舞毒蛾产生一定的拒食性，总体来说，水相对舞毒蛾的胃毒作用效果不明显。

图 2-20 水相对舞毒蛾的胃毒作用

药液浓度 $c/g \cdot L^{-1}$	平均校正死亡率 (L) / %						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照	0	0	0	0	0	0	0
1	0	2.5	2.5	5	5	7.5	7.5
10	2.5	5	5	5	5	5	7.5
20	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
30	2.5	7.5	10	10	10	12.5	15
50	0	0	2.5	2.5	7.5	12.5	12.5

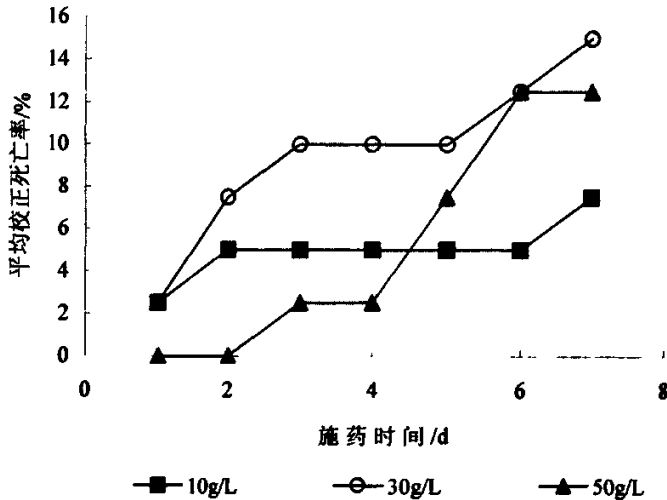


图 2-9 水相对舞毒蛾的胃毒作用

2.3.6 提取物抑菌活性

用滤纸片法检测了核桃楸树皮乙醇提取物及其石油醚萃取相、氯仿萃取相、乙酸乙酯萃取相、剩余水相对杨树烂皮病、樟子松枯梢病、杨树叶枯病三种林业病害菌种的抑制作用，其结果如表 2-21 所示。

表 2-21 核桃楸树皮提取物的抑菌作用

供试菌种	抑菌作用				
	乙醇相	石油醚相	氯仿相	乙酸乙酯相	水相
杨树烂皮病	否	否	有	有	否
樟子松枯梢病	否	否	有	有	否
杨树叶枯病	有	否	有	有	有

核桃楸树皮氯仿相和乙酸乙酯萃取相对三种病菌都有抑制作用，乙醇提取物和水相仅对杨树叶枯病菌有抑制作用，石油醚萃取相对三种病菌都没有抑制作用，说明氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相是核桃楸树皮抑菌活性成分的富集组分，应该对这两个萃取相进行进一步的分离提纯以发现核桃楸树皮种的活性物质。并且发现杨树叶枯病对药液的抵抗力最弱，只有石油醚相对它没有抑制作用，所以杨树叶枯病菌可以作为一种活性检测剂，在以后的分离过程中，用以检测分离组分是否有生物活性。图 2-10 和图 2-11 为氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相对杨树叶枯病作用效果图。

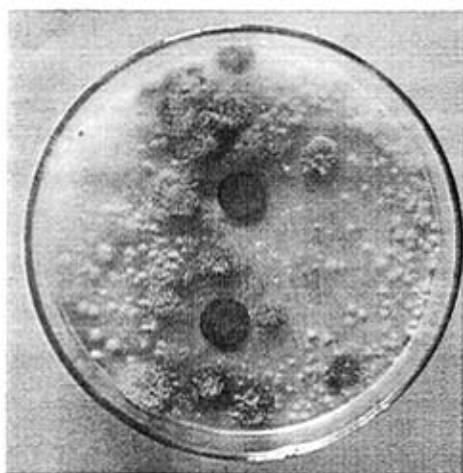


图 2-10 氯仿萃取相

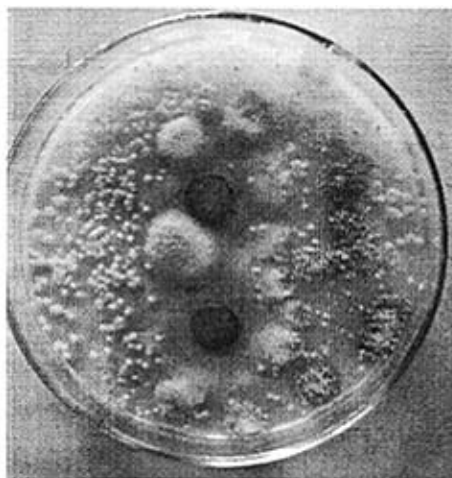


图 2-11 乙酸乙酯萃取相

2.3.7 提取物的最低抑菌浓度 (MIC)

通过二倍稀释法配制成 12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL、1.563 mg/mL、0.782 mg/mL、0.391 mg/mL 系列浓度的氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相，然后测定对杨树叶枯病的最低抑菌浓度，结果如图 2-12 和图 2-13 所示。

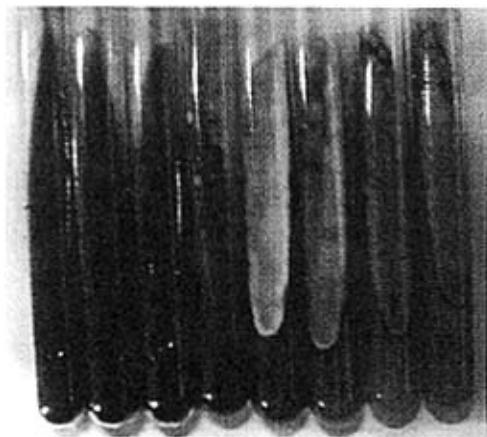


图 2-12 氯仿萃取相系列抑菌作用

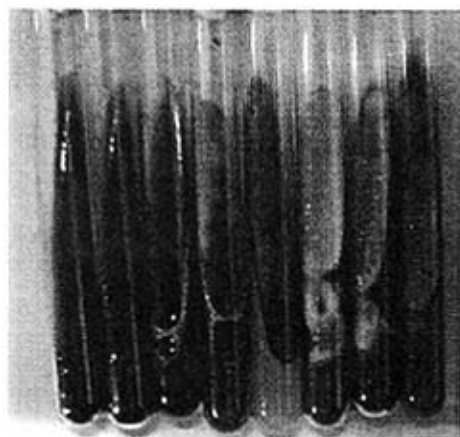


图 2-13 乙酸乙酯萃取相系列抑菌作用

由图 2-12 和图 2-13 可以看出氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相都是在从高浓度算起第四个试管开始有菌丝生长，所以这两个萃取相对杨树叶枯病的最低抑菌浓度都应该是第三个试管所对应的药液浓度 3.125 mg/mL，比较它们从高浓度算起第四个试管中菌丝生长情况如图 2-14 和图 2-15 可以发现，氯仿萃取相菌丝生长较少，说明相比较而言，氯仿萃取相要比乙酸乙酯萃取相有较好的抑菌效果。



图 2-14 氯仿萃取相 1.563 mg/mL

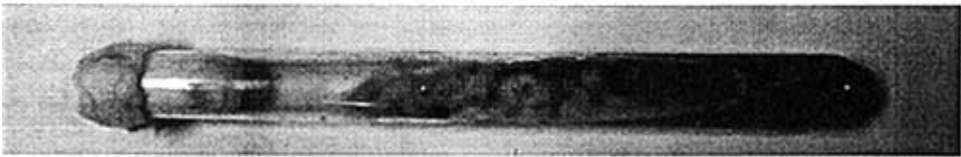


图 2-15 乙酸乙酯萃取相 1.563 mg/mL

2.4 本章小结

(1) 核桃楸树皮 95 %乙醇提取物对舞毒蛾有较强的胃毒作用和触杀作用，且触杀作用强于胃毒作用。施药时间 ≥ 3 d，药液浓度 ≥ 5 g/L 时，触杀作用平均校正死亡率超过 50 %。施药时间 ≥ 4 d，药液浓度 ≥ 10 g/L 时，胃毒作用平均校正死亡率超过 50 %。核桃楸树皮 95 %乙醇提取物对甘蓝夜蛾均有较强的胃毒作用和触杀作用，触杀作用和胃毒作用无显著差异。施药时间 ≥ 4 d，药液浓度 ≥ 10 g/L 时，触杀作用和胃毒作用平均校正死亡率均超过 50 %。

(2) 核桃楸皮的石油醚萃取相、氯仿萃取相、乙酸乙酯萃取相、水相中都含有活性成分，对舞毒蛾都有一定的毒杀作用，并且毒杀规律相近。主要表现为触杀作用效果要大于胃毒作用效果，触杀作用药效更快，在三天内就会被表现出来，而胃毒作用却需要一周甚至更长的时间。随着溶液浓度的增大，触杀作用效果会加强，但胃毒作用效果不是有规律的加强，有时反而会降低，这是因为药品使虫子产生了拒食性，这种作用使得舞毒蛾实际摄入量与药品浓度不是成正比例关系。

(3) 核桃楸树皮氯仿相和乙酸乙酯萃取相对杨树烂皮病、樟子松枯梢病、杨树叶枯病三种病菌都有抑制作用，乙醇提取物和水相仅对杨树叶枯病菌有抑制作用，石油醚萃取相对三种病菌都没有抑制作用，说明氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相是核桃楸树皮抑菌活性成分的富集组分；杨树叶枯病对药液的抵抗力最弱，只有石油醚相对它没有抑制作用，所以杨树叶枯病菌可以作为一种活性检测剂，在以后的分离过程中，用以检测分离组分是否有生物活性；氯仿相和乙酸乙酯萃取相对杨树叶枯病的最低抑菌浓度都是

3.125 mg/mL, 氯仿萃取相要比乙酸乙酯萃取相有较好的抑菌效果。

3 核桃楸树皮活性成分研究

由于氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相有较好的杀虫和抑菌活性，是活性成分的富集组分，所以本研究选择对这两相进行活性成分的分析。研究将首先用化学检验法进行化学成分预分析，然后采用 GC-MS 联合法分析氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相中的活性成分，用 TLC 法和高效液相色谱法（HPLC）探索氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相的分离条件，并采用 HPLC 法测定核桃楸树皮中胡桃醌的含量。

3.1 主要仪器与试剂

LC-2000 高效液相色谱仪、美国 Agilent 公司生产的 6890N-5973 inert GC-MS、铺板器、紫外线分析仪、10×5×10 cm 和 20×10×20 cm 层析缸、20 μ L 微量进样器、超声波清洗机、GF254 涤纶片基硅胶薄层板、化学试剂均为分析纯。

3.2 实验方法

3.2.1 化学成分预分析

乙酸乙酯萃取相化学成分的层析检测法：用 0.5×100 mm 玻璃点样毛细管在已剪制好的涤纶片基硅胶板上点样，在 10×5×10 cm 层析缸中用氯仿：丙酮=2:1 的展开剂充分展开，取出后用雾化器喷洒已经配制好的显色剂。

乙酸乙酯萃取相化学成分的滤纸片检测法：将供试液滴于滤纸片上，干燥后喷洒已配制好的显色剂。

3.2.2 GC-MS 分析

色谱条件：DB-17MS 型毛细管色谱柱，柱长 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μ m。气化室温度 260 $^{\circ}$ C，载气为氦气，柱流量 1 mL/min，进样量 1 μ L 分流比 30:1。起始温度为 60 $^{\circ}$ C，以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 200 $^{\circ}$ C，再以 5 $^{\circ}$ C/min 升温至 280 $^{\circ}$ C，保留 5 min。GC-MS 接口温度 290 $^{\circ}$ C。

质谱条件：电离源 EI 电子能量 70 eV，离子源温度 230 $^{\circ}$ C。扫描范围：15-260 amu（原子质量单位）。

3.2.3 TLC 分离

3.2.3.1 试样溶液的配制

称取试样浸膏 0.2 g 溶于 3 mL 甲醇中，配制成一定浓度的溶液。

3.2.3.2 GF254 硅胶薄层板的铺制

称取硅胶与蒸馏水以质量比为 1:3 的配比于一烧杯中，搅拌均匀后用铺板器在干燥的玻璃板上进行铺板。然后在 100 $^{\circ}$ C 下活化 1 h。取出，放入干燥器中备用。

3.2.3.3 试样 TLC 展开剂的探索

用 4×20 cm 的硅胶薄层板在 20×10×20 cm 层析缸中探索试样最佳展开剂配比。

3.2.3.4 TLC 分离及所得组分的 HPLC 分析

展开：用 20 μL 微量进样器在 20×20 cm 的硅胶薄层板上点样 300 μL ，在距硅胶板底部 1.5 cm 处成一条线，用展开剂展开，在同一块板上展开胡桃醌标准品。

刮板处理：刮取与胡桃醌标准品有相同 Rf 值的色带放在试管中，滴加甲醇后在超声波清洗机中震荡几分钟，静置 10 分钟，用滴管吸取上清液即为 TLC 分离后所得组分，氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相分离后所得组分分别记为 A 和 B。

HPLC 分析：用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析，条件为：C18W 4.6 mm ϕ ×250 mm KYA TECH，流动相甲醇，检测波长 250 nm；流速 0.5 mL/min；柱温为室温；进样量 5 μL 。

3.2.4 核桃楸树皮中胡桃醌含量的测定

胡桃醌含量测定方法采用高效液相色谱法（外标法）^[62]。

色谱条件：C-8 反相色谱柱；流动相：56 % 色谱纯甲醇-44 % 重蒸水（磷酸调 pH 值至 3.5）；检测波长 250 nm；流速 0.5 mL/min；柱温为室温；进样量 10 μL 。

精确配制胡桃醌标准甲醇溶液 0.625、1.25、2.50、3.75 和 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 。分别取 10 μL 标准溶液依次进样 5 次，测定峰面积，取平均值。精确称取 2 g 核桃楸样品，以氯仿为浸提液，分别采取常规提取法、索氏提取法和超声波提取法浸提^[63]。合并浸提液，减压蒸馏，蒸干提取液，用甲醇分 3 次溶解提取物，定容至 10 mL。进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。按照胡桃醌标准溶液的测定方法测定样品峰面积。

常规提取法条件为：浸提液体积（mL）与样品质量比（g）为 10:1，在 50°C 时振荡浸提 3 次，每次浸提 1 h。索氏提取法和超声波提取法的条件同总黄酮的测定。

3.3 结果与分析

3.3.1 化学成分预分析结果

(1) 酚类和鞣质。在一层析好的缘纶片基硅胶板上喷洒 2 % 三氯化铁乙醇溶液与 2 % 铁氰化钾水溶液的等量混合液，薄层板上出现蓝色斑点。结果显示在树皮乙酸乙酯萃取相中含有酚类和鞣质。

(2) 有机酸。取一广泛 pH 试纸，用玻棒将供试液滴于 pH 试纸上，供试液 pH 值在 5~6 之间。结果显示在树皮乙酸乙酯萃取相中可能含有有机酸。

(3) 黄酮类。三氯化铝试验：将供试液滴于滤纸上，喷洒 1 % 三氯化铝乙醇溶液，在滤纸上显出黄色斑点，在紫外灯（波长为 365 nm）下观察，有显著的黄绿色荧光；盐酸-镁粉试验：取供试液 1 mL，加入适量镁粉，再加入浓盐酸 2~3 滴，立即发生剧烈反应且有大量的气泡产生，2 min 内溶液变为墨绿色；层析法：将一层析好的缘纶片基薄层板置于紫外灯下观察，可见黄绿色荧光，取出并喷洒 1 % 三氯化铁甲醇溶液，再在紫外灯下观察，荧光显著加强。结果显示在树皮乙酸乙酯萃取相中含有黄酮类物

质。

(4) 蒽醌及其甙类。碱液试验，取供试液 1 mL，加入 1 % 氢氧化钠溶液，溶液变成红色；硼酸试验，将供试液点于滤纸片上，晾干后，喷洒 12 % 硼酸水溶液，滤纸上斑点显亮黄绿色；层析法，取一层析好的涤纶片基薄层板，喷洒 2 % 氨水，在 90 °C 烘箱中加热 2 min，没有明显变化。结果显示在树皮乙酸乙酯萃取相中不含有蒽醌及其甙类。

(5) 萘醌类。在一层析好的涤纶片基硅胶板上喷洒无色亚甲蓝试剂后，层析板上出现亮蓝色斑点，证明核桃楸树皮乙酸乙酯相中含有萘醌类物质。

(6) 内酯、香豆素。荧光试验，将供试液滴于涤纶片基薄层板上，晾干后，在日光下观察，荧光现象不明显，置于紫外灯下可看见黄绿色荧光，喷洒 1 % 氢氧化钾试剂后，荧光加强；层析法，在一层析好的涤纶片基薄层板上喷洒新配制的 1 mol·L⁻¹ 盐酸羟胺甲醇溶液与 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠甲醇溶液的等量混合液，晾干，再喷洒 1 % 三氯化铁盐酸溶液，在 80 °C 烘箱中加热 2 min，纸片上可见紫色斑点。结果显示在树皮乙酸乙酯萃取相中含有内酯、香豆素。

3.3.2 GC-MS 结果分析

3.3.2.1 氯仿萃取相的 GC-MS 分析

树皮氯仿萃取相的总离子流色谱如图 3-1 所示，氯仿萃取相化学成分的确证根据 GC-MS 联用所得质谱信息数据库检索，并与标准谱图对照初步确认出 13 种化合物见表 3-1，化合物的定量采用峰面积归一化法计算。13 种化合物占氯仿萃取相的 94.04 %，其中萘醌类 1 种占氯仿萃取相的 36.65 %；醛类 2 种占氯仿萃取相的 12.83 %；酮类 2 种占氯仿萃取相的 10.23 %；有机酸 2 种占氯仿萃取相的 9.02 %；酚类 3 种占氯仿萃取相的 7.38 %；酯类 1 种占氯仿萃取相的 6.68 %；呋喃 1 种占氯仿萃取相的 5.83 %；醚类 1 种占氯仿萃取相的 5.42 %；在核桃楸树皮氯仿萃取相中含量最大的化合物是 5-羟基-1,4-萘醌，占氯仿萃取相的 36.65 %，其分子结构及质谱如图 3-2 所示。

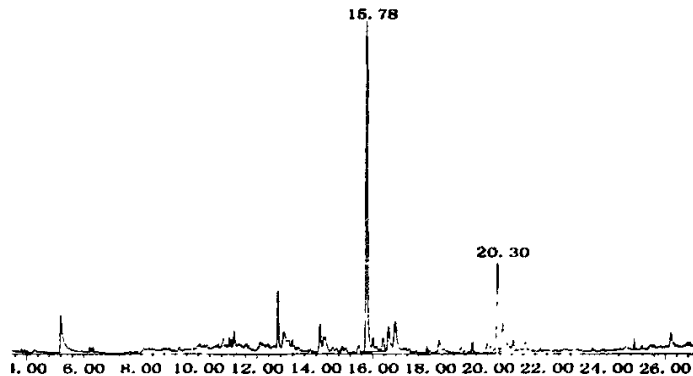


图 3-1 氯仿萃取相的总离子流色谱

表 3-1 氯仿萃取相化学成分鉴定结果

序号	化合物名称	保留时间/min	相对分子质量	化学式	相对含量/%	相似度/%
1	4-羟基-4-甲基-2-戊酮 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	5.20	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	6.61	72
2	2,3-二氢苯并呋喃 Benzofuran, 2,3-dihydro-	12.69	120	C ₈ H ₈ O	5.83	80
3	香草醛 (3-甲氧基-4-羟基苯甲醛) Vanillin	12.90	152	C ₈ H ₈ O ₃	5.37	95
4	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-Methoxy-4-vinylphenol	14.14	150	C ₉ H ₁₀ O ₂	3.55	86
5	4-(4-羟苯基)-2-丁酮 4-(4-hydroxyphenyl)-2-Butanone,	14.32	164	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	3.62	75
6	5-羟基-1,4-萘醌 5-hydroxy-1,4-Naphthalenedione,	15.77	174	C ₁₀ H ₆ O ₃	36.65	96
7	4-羟基-3-甲氧基苯乙酸 4-hydroxy-3-methoxy-Benzeneacetic acid,	16.35	182	C ₉ H ₁₀ O ₄	2.51	88
8	甲基(2-羟基-3-乙氧基-苯甲)醚 Methyl-(2-hydroxy-3-ethoxy-benzyl) ether	16.54	182	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	5.42	78
9	4-羟基-2-甲氧基肉桂醛 4-Hydroxy-2-methoxycinnamaldehyde	16.77	178	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	7.46	92
10	4-((1E)-3-羟基-1-丙烯基)-2-甲氧基苯酚 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	18.30	180	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	1.86	90
11	亚油酸乙酯 Linoleic acid ethyl ester	20.29	308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	6.68	99
12	9,12-十八二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	20.48	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	6.51	99
13	对称 2,2'-亚甲基-6-(1,1-二甲乙基)-4-甲基双酚 Phenol,2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	26.18	340	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	1.97	96

据报导, 5-羟基-1,4-萘醌, 俗名胡桃醌, 是胡桃属植物主要的毒性物质, 在医学上是一种很有前途的抗癌和消炎药物, 在农林病虫害防治方面又有良好的应用前景^[64], 所以有必要对其提取方法进行研究。

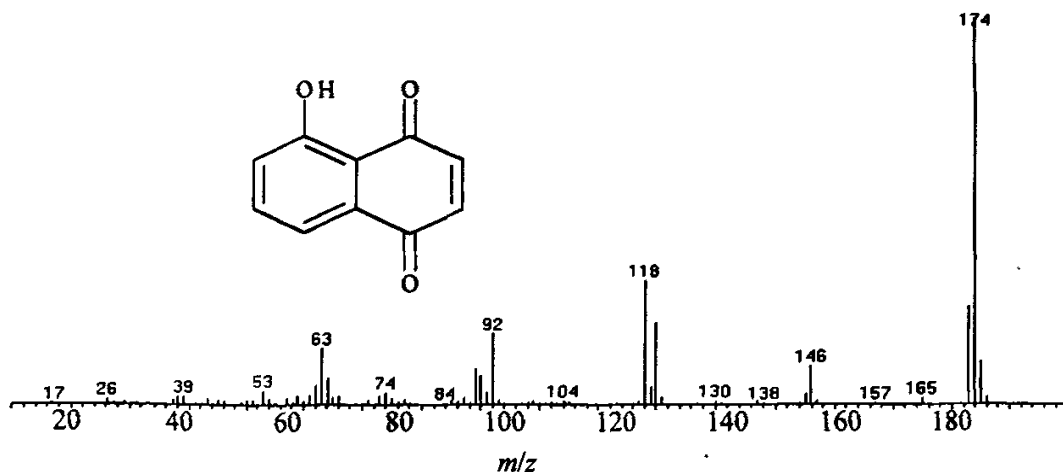


图 3-2 5-羟基-1,4-萘醌的质谱图

3.3.2.2 乙酸乙酯萃取相的 GC-MS 分析

图 3-3 为树皮乙酸乙酯萃取相的总离子流色谱图。

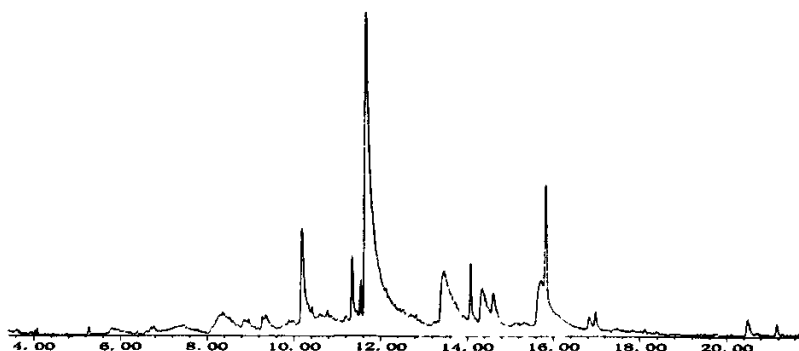


图 3-3 乙酸乙酯萃取相的总离子流色谱

乙酸乙酯萃取相化学成分的确认根据 GC-MS 联用所得质谱信息数据库检索, 并与标准谱图对照初步确认出 14 种化合物见表 3-2, 化合物的定量采用峰面积归一化法计算。

表 3-2 乙酸乙酯萃取相的化学成分分析

序号	化合物名称	保留时间 /min	相对分子质量	化学式	相对含量 / %	相似度 / %
1	4-羟基-4-甲基-2-戊酮 2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	8.36	116	$C_6H_{12}O_2$	3.98	70
2	2,3-二氢苯并呋喃 Benzofuran, 2,3-dihydro-	8.96	120	C_8H_8O	1.12	70
3	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-呋喃-4-酮 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	9.35	144	$C_6H_8O_4$	1.78	53
4	5-羟甲基-2-呋喃醛 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)-	10.17	126	$C_6H_6O_3$	4.96	94
5	2,6-二甲氧基苯酚 Phenol, 2,6-dimethoxy-	11.33	154	$C_8H_{10}O_3$	2.59	96
6	3,5-二羟基甲苯 3,5-Dihydroxytoluene	11.53	124	$C_7H_8O_2$	1.07	95
7	1,2,3-苯三醇 1,2,3-Benzenetriol	11.63	126	$C_6H_6O_3$	42.31	95
8	5-羟基-1,4-萘醌 1,4-Naphthalenedione, 5-hydroxy-	13.45	174	$C_{10}H_6O_3$	12.33	98
9	D-阿洛糖 D-Allose	14.06	180	$C_6H_{12}O_6$	3.24	90
10	3,4-二氢-6,7-二羟基-1(2H)-萘醌 1(2H)-Naphthalenone, 3,4-dihydro-6,7-dihydroxy-	14.32	178	$C_{10}H_{10}O_3$	3.94	72
11	4-羟基-2-甲氧基肉桂醛 4-Hydroxy-2-methoxycinnamaldehyde	14.59	178	$C_{10}H_{10}O_3$	3.75	94
12	7-甲氧基-1-四氢萘酮 7-Methoxy-1-tetralone	15.81	176	$C_{11}H_{12}O_2$	11.26	84
13	1,5-萘二酚 1,5-Naphthalenediol	16.85	160	$C_{10}H_8O_2$	1.13	95
14	8-羟基-2-甲氧基-1,4-萘醌 1,4-Naphthalenedione, 8-hydroxy-2-methoxy-	16.98	204	$C_{11}H_8O_4$	1.15	94

从核桃楸树皮乙酸乙酯相中分离确认 14 种化合物, 占乙酸乙酯萃取相的 94.61 %,

其中酚类 4 种占乙酸乙酯萃取相的 47.1 %；酮类 4 种占乙酸乙酯萃取相的 20.96 %；萜醌类 2 种占乙酸乙酯萃取相的 13.48 %；醛类 2 种占乙酸乙酯萃取相的 8.71 %；糖类 1 种占乙酸乙酯萃取相的 3.24 %；呋喃 1 种占乙酸乙酯萃取相的 1.12 %。核桃楸乙酸乙酯萃取相中含量较大的化合物分别为 1,2,3-苯三醇、5-羟基-1,4-萜醌和 7-甲氧基-1-四氢萜醌，含量分别为 42.31、12.33 和 11.26 %，1,2,3-苯三醇、7-甲氧基-1-四氢萜醌的分子结构和质谱如图 3-4 和图 3-5 所示。

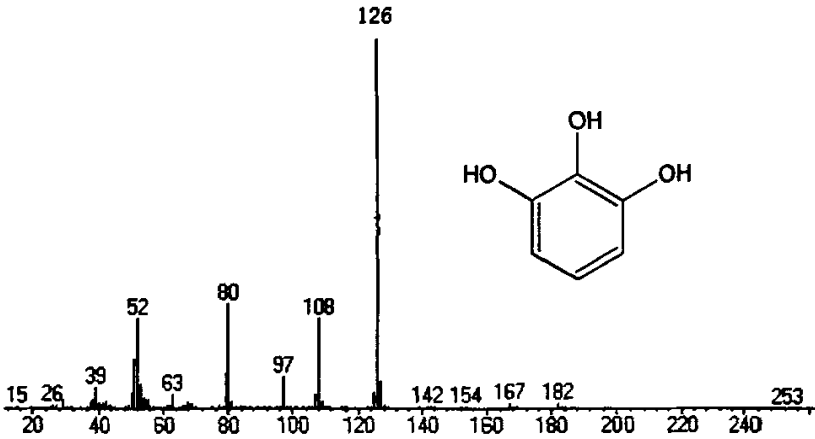


图 3-4 1,2,3-苯三醇质谱图

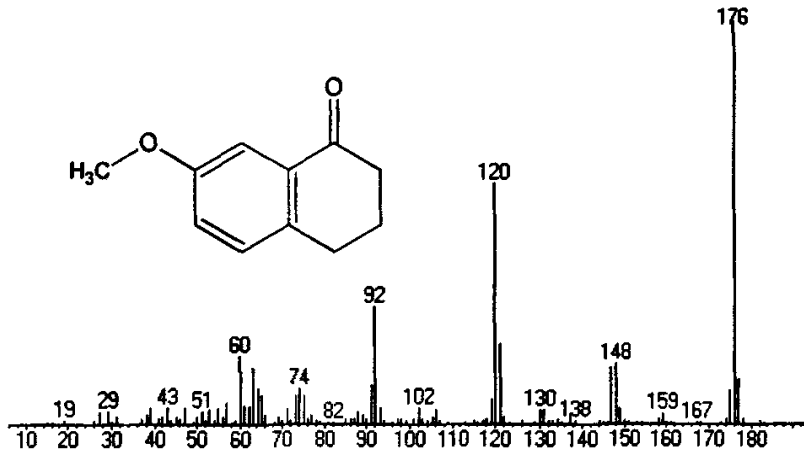


图 3-5 7-甲氧基-1-四氢萜醌质谱图

3.3.3 TLC 分离与检测

3.3.3.1 试样 TLC 展开条件的探索

实验结果显示乙酸乙酯萃取相最佳展开剂为氯仿:丙酮 =2:1，氯仿萃取相最佳展开剂为氯仿:丙酮 =8:1，它们展开情况如图 3-6 所示。当在薄层板上喷洒无色亚甲蓝试剂后，与胡桃醌具有相近 R_f 值的组分变为为亮蓝色，与标准样品显色情况一致，证明此

斑点为胡桃醌。

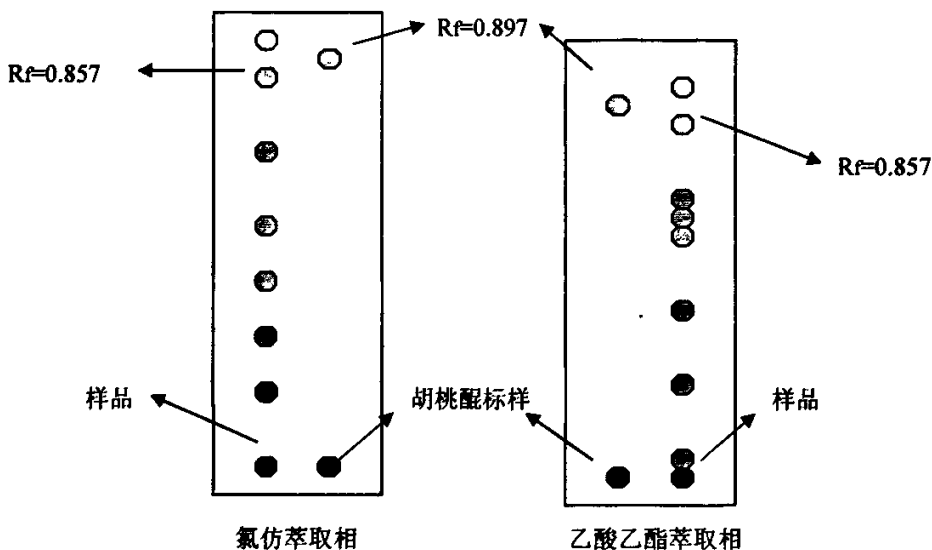


图 3-6 氯仿和乙酸乙酯萃取相 TLC 展开效果图

3.3.3.2 TLC 分离所得组分的 HPLC 分析

TLC 分离后所得组分及胡桃醌标准品的 HPLC 分析结果如图所示，由谱图可以看出保留时间 $t=6.645$ 附近 A 和 B 有一与标准样品相似的 HPLC 峰，并且为谱图中最大峰。结果表明，胡桃醌为 A 和 B 中的主要组分。

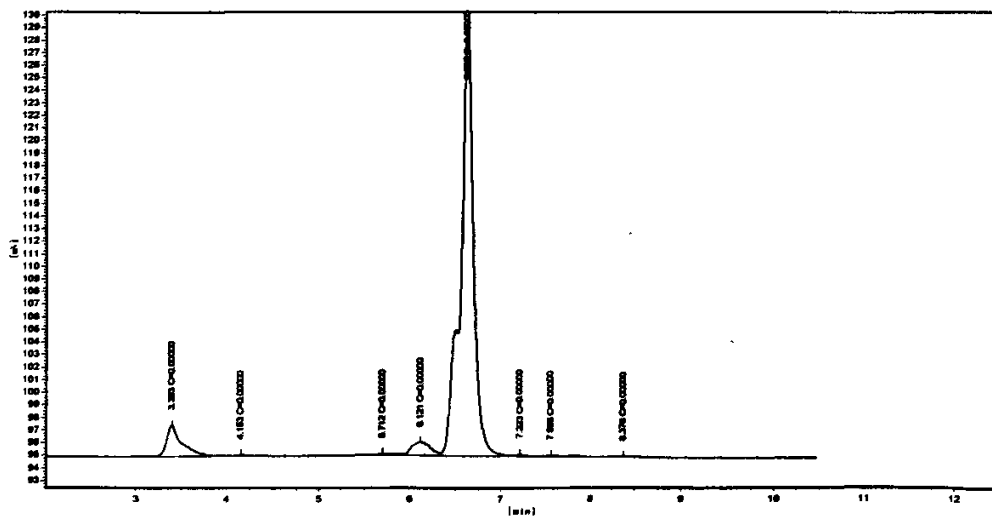


图 3-7 胡桃醌标准品 HPLC 图

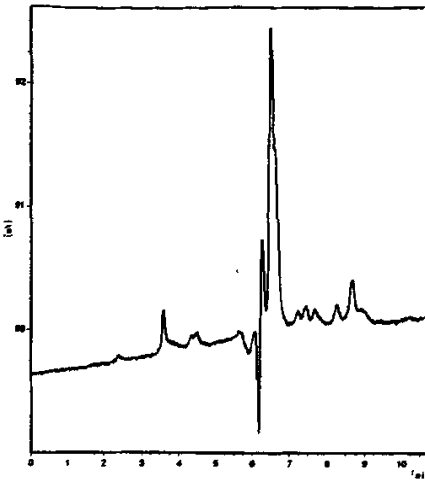


图 3-7 氯仿萃取相组分 A 的 HPLC 谱图

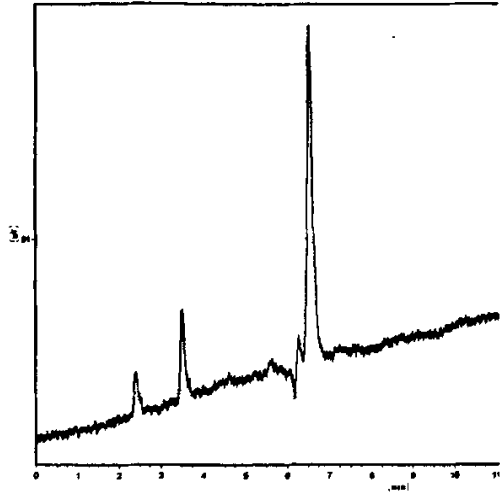


图 3-8 乙酸乙酯萃取相组分 B 的 HPLC 谱图

3.3.4 核桃楸树皮中胡桃醌的含量

胡桃醌标准曲线数据见表 3-3。保留时间为 13 min。线性回归得胡桃醌浓度 c_2 与峰面积 A 的关系为 $c_2 = 7.185 \times 10^{-3} A$ 。线性范围为 0~5.00 $\mu\text{g/mL}$ ，线性相关系数 $r = 0.999$ 。从胡桃醌标准曲线中查找核桃楸样品相应浓度，计算得出核桃楸样品胡桃醌含量。3 种提取法浸提核桃楸样品胡桃醌含量如表 3-4 所示。

表 3-3 胡桃醌标准曲线数据

编号 No.	胡桃醌浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) juglone conc.	峰面积 A peak area
1	0	0
2	0.625	86.9
3	1.25	175.6
4	2.50	345.5
5	3.75	525.5
6	5.00	694.0

表 3-4 3 种提取法浸提核桃楸样品胡桃醌含量

浸提方法 extracting methods	超声波法 ultrasonic	常规法 common	索氏法 reflux
胡桃醌含量 Juglone / %	0.001 31	0.001 26	0.001 11

由表 3-4 可以看出，超声波提取法浸提得到的胡桃醌含量高于常规提取法，而常规提取法得到的胡桃醌含量又高于索氏提取法。超声波提取法浸提核桃楸样品，胡桃醌含量均高于常规提取法，而常规提取法得到的胡桃醌含量又高于索氏提取法。

3.4 本章小结

(1) 用化学法对核桃楸树皮乙酸乙酯萃取相的成分进行预试，结果显示乙酸乙酯萃取相中含有酚类和鞣质、萘醌类、黄酮类、内酯和香豆素，可能含有机酸，不含葱醌

及其甙类，GC-MS 联用分离确认出其中 14 种化合物，占乙酸乙酯萃取相的 94.61 %，含量最大的化合物为 1,2,3-苯三醇、5-羟基-1,4-萘醌和 7-甲氧基-1-四氢萘酮，含量分别为 42.31 %、12.33 %、11.26 %；GC-MS 联用分析初步确认出氯仿萃取相中的 13 中化合物，占氯仿萃取相的 94.04 %，含量最大的化合物是 5-羟基-1,4-萘醌，占氯仿萃取相的 36.65 %。

(2) TLC 分离—HPLC 检测进一步证明氯仿和乙酸乙酯萃取相中都含有生物活性物质胡桃醌：用超声波提取、常规提取和索氏提取三种方法提取核桃楸树皮中的胡桃醌，提取得率大小顺序为超声波提取法 > 常规提取法 > 索氏提取法，三种提取方法得到的胡桃醌在树皮中的含量依次为 0.001 31 %、0.001 26 %、0.001 11 %。

4 核桃楸树皮中胡桃醌的提取

通过对核桃楸树皮中杀虫和抑菌活性物质的分析可知胡桃醌是核桃楸树皮中含量最大的毒性物质,资料显示胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)是从核桃楸(*Juglans mandshurica*)中提取分离出的一种萘醌类活性物质,能够抑制肿瘤细胞的生长并可以直接杀伤肿瘤细胞,可抑制柳叶栅锈病、杨树烂皮病、侧柏枯枝病、落叶松杨锈病等孢子的萌发,同时对水稻稻瘟病、稻纹枯病、棉花枯萎病、黄瓜蔓割病、茄子褐纹病和茄子黄萎病菌丝的生长也有明显的抑制作用。此外,胡桃醌还能够抑制其他植物的生长发育,表现出很好的化感作用^[65]。

胡桃醌的多种生物活性,使其在医学和农林业等方面都有非常广泛的应用前景,但并没有关于胡桃醌提取方法的报道,并且对胡桃醌含量的测定大多采用高效液相色谱法^[66]。用高效液相色谱法测定胡桃醌含量时,虽然准确度高,但准备工作复杂,操作时间较长,不适用于间断且频繁的测定工作。对胡桃醌提取工艺测定方法的研究就显得尤为重要。虽然早在1885年Bernchen和Semper就确定了胡桃醌的结构,但对胡桃醌化学和物理性质的研究却未见报道,所以本节计划从胡桃醌稳定性的角度对胡桃醌的性质进行初步探讨,这也为在胡桃醌提取及储存过程中应该采取的方法提供了科学依据。

本章以核桃楸树皮作为原料,采用超声波辅助浸提与减压蒸馏等方法提取胡桃醌,并采用分光光度法测定胡桃醌的含量,另外本章还将考察氧化还原剂、酸度、温度、真空度对胡桃醌稳定性的影响,从杀虫和抑菌两方面研究胡桃醌的生物活性。

4.1 原料与试剂

4.1.1 供试材料与试剂

核桃楸(*Juglans mandshurica maxim*)树皮采自东北林业大学实验林场,经阴干、粉碎成40-60目样品待用,胡桃醌标准样品为美国SIGMA公司生产,其余所用试剂均为分析纯。

4.1.2 主要仪器

6890N-5973insert GC-MS 美国安捷伦公司、av-300 傅立叶变换核磁共振仪测定、Magna560 傅立叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司)、TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)、LC-2000 高效液相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司)、Sartorius 公司 ME5 百万分之一分析天平、JY92-II D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、RE-52A 旋转蒸发器(巩义市英峪予华仪器厂)。

4.2 方法

4.2.1 胡桃醌的提取

4.2.1.1 超声波辅助浸提

精密称取样品 20.0028 g, 放入 250 mL 烧杯中, 加含水溶剂 200 mL, 放置 10 min 使充分浸泡, 于 JY92-II D 型超声波细胞粉碎机中超声波震荡 10 min, 浸提液呈现明显的棕黄色。超声条件为: 每工作 1 s, 间隔 1 s; 超声功率 300 W, 温度不高于 40 °C。

4.2.1.2 水蒸气减压蒸馏

将超声波辅助浸提后物料全部移入 500 mL 旋转蒸发瓶, 采用 RE-52A 旋转蒸发器在 30–100 °C 范围内减压蒸馏, 直至馏出液无色。

萃取及干燥: 将馏出液用少量有机溶剂萃取, 蒸干溶剂, 真空干燥, 得到橙色的针状晶体 18 mg, 提取得率为 0.09%。

4.2.2 产物表征

4.2.2.1 化学法定性

(1) 无色亚甲蓝显色反应

取微量产物于试管中, 用乙醇溶解, 取少量溶液在圆形滤纸片上展开, 晾干, 用已经配制好的无色亚甲蓝溶液喷雾。

(2) 碱液试验

取上述溶液 1 mL, 放在 10 mL 试管中, 滴加 5% 氢氧化钠溶液。

4.2.2.2 官能团表征

采用美国尼高力公司生产的 MagnaIR560E.S.P 傅里叶红外光谱仪, 以 KBr 压片法分析产物的化学结构。

4.2.2.3 化学组成分析

色谱条件: DB-17MS 型毛细管色谱柱, 柱长 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm 。气化室温度 260 °C, 载气为氦气, 柱流量 1 mL/min, 进样量 1 μL 分流比 30:1。起始温度为 60 °C, 以 20 °C/min 升温至 200 °C, 再以 5 °C/min 升温至 280 °C, 保留 5 min。GC-MS 接口温度 290 °C。

质谱条件: 电离源 EI 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C。扫描范围: 15-260 amu (原子质量单位)。

4.2.2.4 产物的 $^1\text{H NMR}$ 光谱分析

将产物溶于氘代氯仿 (CDCl_3) 中, av-300 傅立叶变换核磁共振仪测定, 内标为 TMS。

4.2.3 胡桃醌定量方法研究

4.2.3.1 检测波长的选择与标准曲线的绘制

精确配制胡桃醌标准甲醇溶液质量浓度为 0.0517、1.293、5.173、10.35 和 15.52

$\mu\text{g/mL}$; 用紫外可见分光光度计, 在 200~550 nm 范围内进行光谱扫描; 选择检测波长, 并读取其在检测波长处的吸光度; 最后绘制吸光度 (A) 与胡桃醌质量浓度 (c) 的标准曲线, 得出回归方程。

4.2.3.2 样品的稳定性与加样回收率试验

分别扫描已放置 0、1、3、5、10、24、48、96 h 的样品液在检测波长处的吸光度, 考察样品的稳定性。在 10 mL 已知质量浓度为 1.894 $\mu\text{g/mL}$ 的样品液中分别加入质量浓度为 5.173 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液 1.0、1.5、2.0 mL。按照胡桃醌标准溶液的测定方法测定吸光度, 考察样品的加样回收率。

4.2.3.3 胡桃醌提取率与馏出液体积的关系

称取样品 2.0034 g, 按供试液制备方法制备样品液, 每 50 mL 接一个馏分, 在检测波长下测定吸光度值, 直至吸光度值接近标准曲线在纵坐标上的截距 $A=0.0011$, 视为提取的理论终点, 根据回归方程计算各馏分中胡桃醌的质量 M, 以到第 n 个馏分时馏出液总体积 V_n 为横坐标, 对应的胡桃醌的提取率 T 为纵坐标作图, 提取率计算公式如下:

$$T = \frac{M_1 + \dots + M_n}{\text{胡桃醌总量}} \times 100\% \quad (4-1)$$

4.2.3.4 样品的胡桃醌提取及胡桃醌含量的测定

准确称取核桃楸树皮 2 g, 加入 200 mL 含水溶剂, 超声波震荡 10 min; 然后将物料在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸馏, 定容至 1000 mL, 得到样品液。按照胡桃醌标准溶液的测定方法测定样品液的吸光度。根据标准曲线回归方程计算样品液的质量浓度, 进而计算出核桃楸树皮中胡桃醌的含量。

4.2.4 胡桃醌稳定性检测

胡桃醌定量用紫外可见分光光度法。

根据样品处理前后胡桃醌含量的变化计算胡桃醌的消减率, 消减率计算公式如下:

$$\text{消减率}(\%) = \frac{\text{处理前胡桃醌的含量} - \text{处理后胡桃醌的含量}}{\text{处理前胡桃醌的含量}} \times 100\% \quad (4-2)$$

4.2.4.1 H_2O_2 的影响

吸取胡桃醌样品溶液 0.5 mL 于 5 只 10 mL 容量瓶中, 加入不同量的 H_2O_2 , 用甲醇水 (体积比 3: 1) 定容至刻度, H_2O_2 浓度分别为 0.2 %、0.6 %、1.0 %、1.2 %、1.4 %, 测定胡桃醌的含量, 蜡封后避光放置 6 h, 再次测定胡桃醌含量, 计算胡桃醌的降解率^[67]。

4.2.4.2 Na_2SO_3 对胡桃醌稳定性的影响

吸取胡桃醌样品溶液 0.5 mL 于 5 只 10 mL 容量瓶中, 加入不同量的 Na_2SO_3 溶液 (浓度 0.2 %), 用甲醇水 (体积比 3: 1) 定容至刻度, Na_2SO_3 浓度分别为 0.01 %、0.02 %、0.03 %、0.04 %、0.05 %, 测定胡桃醌的含量, 蜡封后在室温避光下放置 6 h,

再次测定胡桃醌含量，通过含量的变化计算胡桃醌的降解率。

4.2.4.3 吐温 80 的影响

吸取胡桃醌样品溶液 0.5 mL 于 5 只 10 mL 容量瓶中，加入不同量的吐温 80，用甲醇水（体积比 3:1）定容至刻度，吐温 80 浓度分别为 2%、6%、8%、10%、12%，测定胡桃醌含量。蜡封后放置 15 d，再次测定胡桃醌的含量，通过含量的变化计算胡桃醌的降解率。

4.2.4.4 光照和真空度对胡桃醌稳定性的影响

吸取胡桃醌样品溶液 0.5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，测定胡桃醌原始含量，蜡封暗室放置 15 天后再次测量胡桃醌的含量；另外分别吸取 0.5 mL 待测样品溶液放在 4 只培养皿里，涂布均匀后分别于暗处、室内自然光下、阳光直射处（每天 8h）和真空放置 15 d，用 3×2 mL 甲醇洗涤三次，稀释定容至 10 mL，测定胡桃醌含量，与原始含量作比较计算胡桃醌降解率。

4.2.4.5 酸碱性的影响

吸取胡桃醌样品溶液 2.5 mL 于 5 只 50 mL 容量瓶中，用甲醇水溶液（甲醇：水=4:1）稀释，用盐酸和氢氧化钠溶液调节 PH 值分别为 2、4、6、8、12，测定胡桃醌含量；蜡封后放置，3 d、10 d、14 d 后分别取样测定胡桃醌含量，计算胡桃醌降解率。

4.2.4.6 温度对样品中胡桃醌降解率的影响

吸取胡桃醌样品溶液 2.5 mL 于 5 只 50 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，测定胡桃醌含量；蜡封后分别于 4±1℃、24±1℃、34±1℃、44±1℃、54±1℃放置，3 d、5 d、9 d、14 d、19 d 后分别取样测定胡桃醌含量，计算胡桃醌降解率。

4.2.5 胡桃醌生物活性测试

4.2.5.1 胡桃醌对舞毒蛾的触杀作用

用丙酮做空白对照，考察 0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL 胡桃醌丙酮溶液在 48 h 内对舞毒蛾的触杀作用。触杀活性试验采用药液浸虫法。将试虫在供试核桃楸树皮药液中浸渍 5 s 后取出，吸去多余药液，移入玻璃瓶中，放入新鲜杨树叶供舞毒蛾试虫取食。

4.2.5.2 胡桃醌抑菌活性的研究

采用滤纸片法检测了胡桃醌对杨树叶枯病、杨树烂皮病、樟子松枯梢病的抑制作用（参考第二章方法），并用二倍稀释法（初始浓度 0.5 g/L，参考第二章），测定了胡桃醌对杨树叶枯病的最低抑菌浓度。

4.3 结果与分析

4.3.1 产物的表征

4.3.1.1 化学法定性

无色亚甲蓝显色反应：滤纸上出现蓝色环带，证明产物中含有苯醌或者萘醌。

此反应属于氧化还原反应，无色亚甲蓝常用作苯醌和萘醌类化合物薄层色谱和纸色谱的专用显色剂，样品呈现蓝色，蒽醌类化合物无此反应。

碱液试验：试管中溶液变红，证明供试液中含有羟基醌类。因为羟基醌类在碱性溶液中会发生颜色变化，呈橙、红、紫红色及蓝色。胡桃醌在碱液中的反应机理如下：

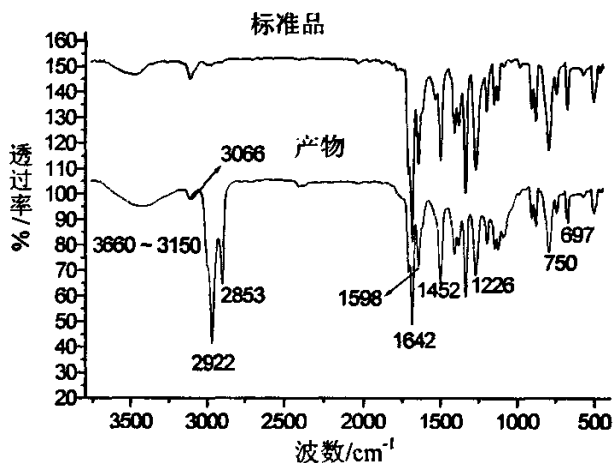
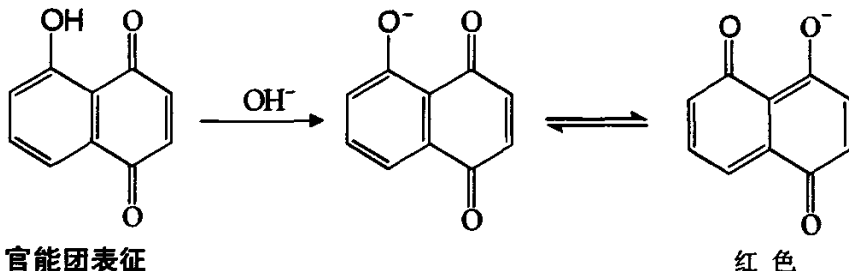


图 4-1 产物和标准品的傅立叶红外光谱

解析胡桃醌标准品傅立叶红外光谱， $3660\text{ cm}^{-1}\sim 3150\text{ cm}^{-1}$ 的宽峰为 O—H 伸缩振动； 3066 cm^{-1} 峰为苯环上不饱和 C—H 伸缩振动； 1642 cm^{-1} 左右为 C=O 伸缩振动； 1598 cm^{-1} 、 1452 cm^{-1} 为苯环骨架振动吸收； 1226 cm^{-1} 为 C—O 伸缩振动； 750 cm^{-1} 、 697 cm^{-1} 为苯环上 C—H 面外弯曲振动。

对比产物和标准品的傅立叶红外光谱可以看出，产物具有了胡桃醌标准品的上述所有特征吸收，并且与标准品红外谱图相似性极好，证明了产物具有羟基萘醌的化学结构。而两红外吸收光谱的差别在于，产物在 2922 cm^{-1} 与 2853 cm^{-1} 处出现饱和 C—H 的强吸收峰，推测其为产物中其它物质所产生。

4.3.1.3 化学组成分析

对产物进行 GC-MS 分析，共分离出 3 个化合物，化合物的定量按峰面积归一化法计算，其总离子流图见图 4-2。成分分析是根据 GC-MS 联用所得质谱信息数据库检索与标准谱图对照、分析，初步鉴定了它们的化学结构，结果见表 4-1。

表 4-1 产物的化学组成

序号 NO.	保留时间/ min Retention time	化合物名称 compounds	分子式 molecular formula	相对含量/ % relative content	相似 度 MF
1	25.183	1, 4-萘醌 1,4-Naphthalenedione	C ₁₀ H ₆ O ₂	0.704 %	97
2	27.563	5-羟基-1, 4-萘醌 5-hydroxy-1,4-Naphthalenedione,	C ₁₀ H ₆ O ₃	96.420 %	97
3	30.044	7-甲氧基-3, 4-二氢-1(2H)-萘醌 7-methoxy-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalenone	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	2.875 %	59

由图 4-2 及表 1 可以看出, 产物中主要成分为胡桃醌 (5-hydroxy-1,4-Naphthalenedione), 相对含量达到 96.420 %。另外 1,4-萘醌 (1,4-Na-phthalenedione) 相对含量 0.704 %, 7-甲氧基-3,4-二氢-1-萘醌 (7-methoxy-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalenone) 相对含量 2.875 %。

由此可见, 通过超声波辅助浸提、水蒸气减压蒸馏、氯仿萃取后蒸干溶剂的方可以简便、快捷地制得较高纯度的胡桃醌产品。

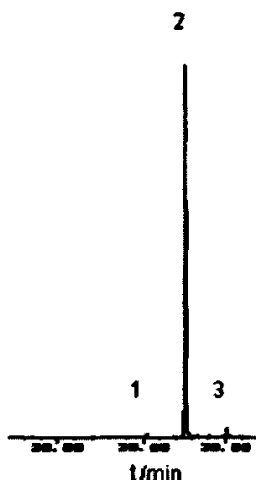
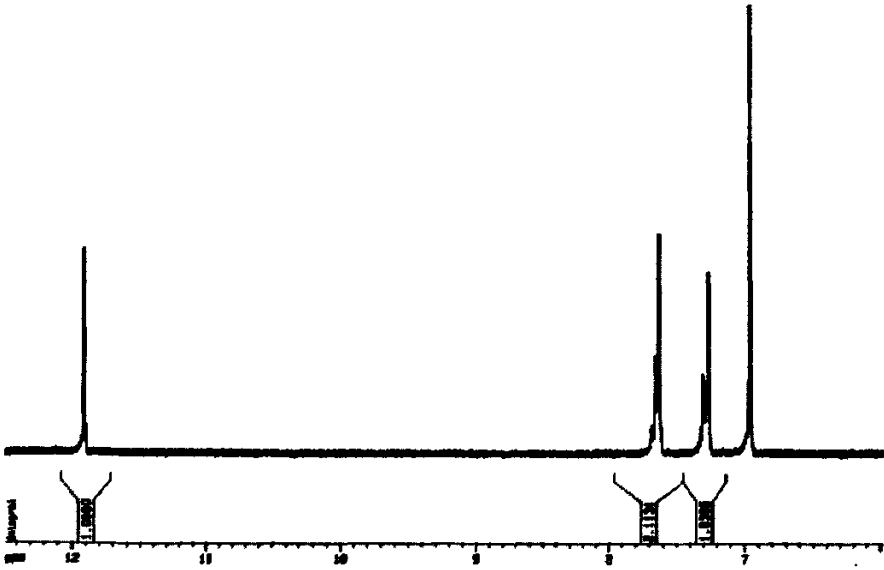


图 4-2 产物的总离子流色谱图

4.3.1.4 产物的 ¹H NMR 光谱解析

产物的 ¹H NMR 图如图 4-3 所示, $\delta_{\text{H}}11.9123$ 的单峰为羟基中质子的吸收, $\delta_{\text{H}}7.64$ 附近的组峰为萘醌环上 C₂-H、C₃-H 两个质子的信号, $\delta_{\text{H}} 7.3$ 附近的组峰是萘醌环上 C₇-H、C₈-H 两个质子的吸收峰, $\delta_{\text{H}}6.9$ 处的峰是萘醌环上 C₆-H 的信号, 与文献报道一致, 证明产物中含有 5-羟基-1, 4-萘醌结构。

图4-3 产物的¹H NMR 图

4.3.2 胡桃醌的定量方法研究

4.3.2.1 检测波长的选择与标准曲线

胡桃醌标准样品溶液的紫外可见光谱如图 4-4 所示。对胡桃醌的结构进行分析，分子中苯环与一个羰基共轭，所以应在 251 nm 与 335 nm 处产生吸收峰，但由于 α 位羟基的影响，在 335 nm 处的吸收峰红移至 426 nm 处，而此处的吸收峰最能反映胡桃醌的结构特征，且峰形平缓，波长有波动时吸光度值变化不大，可以降低系统误差，所以选择 426 nm 处为检测波长。

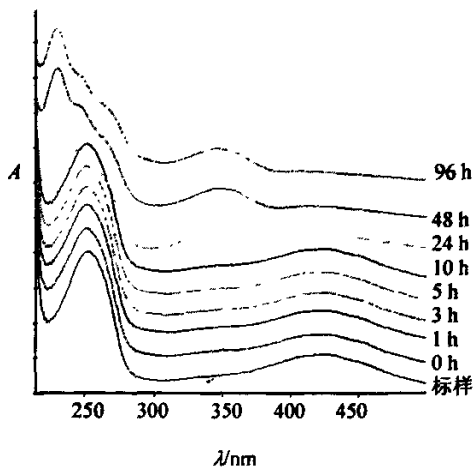


图 4-4 核桃楸树皮样品液与胡桃醌标准溶液的紫外可见光谱

根据胡桃醌标准曲线数据线性回归得出胡桃醌质量浓度 (c) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与吸光度 (A) 的回归方程为 $c = 10.60A - 0.0001$, $r = 0.999$, 在质量浓度为 0.0517~15.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$

范围内线性关系良好。

4.3.2.2 样品的稳定性

核桃楸树皮样品液放置不同时间的紫外可见光下光谱变化如图 4-4 所示。核桃楸树皮样品液放置 10 h 内光谱形状与胡桃醌标准样品溶液相似，吸光度值相对标准偏差为 0.8 %，稳定性良好；放置 24 h 后 426 nm 处吸收降低，345 nm 处吸收增加，形成一个新的吸收峰；放置 96 h 后 426 nm 处吸收峰消失。由此可见，胡桃醌含量的测定选择提取后 10 h 内进行。

4.3.2.3 样品的加样回收率

在核桃楸树皮样品液为 10 mL，样品中胡桃醌含量为 1.894 μ g 时，其加样回收率数据如表 4-2 所示。6 次平均加样回收率为 99.6 %，相对标准偏差为 1.15 %，说明分光光度法测定胡桃醌的含量结果准确。

表 4-2 样品的加样回收率

加入胡桃醌 标准品量/ μ g	胡桃醌测得量/ μ g	加样回收率/%	平均加样 回收率/%	相对标准 偏差/%
5.173	5.058	97.8	99.6	1.15
5.173	5.099	98.6		
7.759	7.821	100.8		
7.759	7.766	100.1		
10.35	10.35	100.0		
10.35	10.38	100.3		

4.3.2.4 胡桃醌提取率与馏出液体积的关系

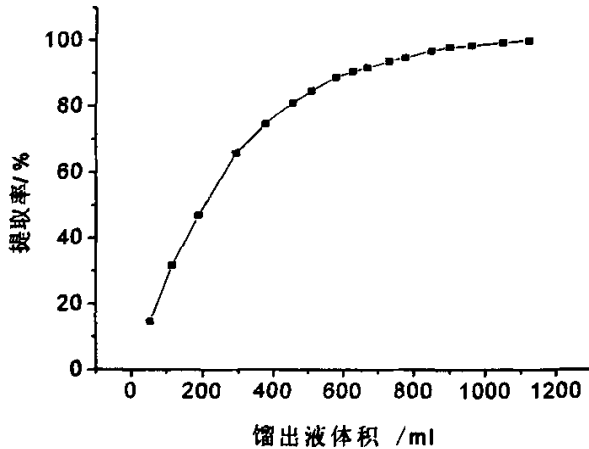


图 4-5 胡桃醌提取率与馏出液体积的关系示意图

由图 4-5 可以看出，胡桃醌的提取率随着馏出液体积的增加而增加，但增长趋势逐渐变缓，这说明在整个蒸馏过程中，新的馏出液中胡桃醌含量越来越低，提取效率也在逐渐的降低，在馏出液体积为 450 mL 左右提取率增长趋势有一个明显的减缓过程，此时对应的提取率为 83 %，这一阶段平均每 100 毫升馏出液胡桃醌提取率变化 18.44 %，而馏出液体积从 1000 mL 到 1130 mL 的蒸馏过程中提取率的变化不到 1 %，蒸馏效率很

低,同时考虑到馏出液体积为 1000 mL 时,胡桃醌的提取率已超过 99%,所以可把馏出液体积为 1000 mL 作为蒸馏终点。

4.3.2.5 胡桃醌的质量分数

胡桃醌质量分数如表 4-3 所示。核桃楸树皮中胡桃醌平均质量分数为 0.0933%,5 次测定相对标准偏差为 0.123%,说明分光光度法测定胡桃醌质量分数的重复性良好。

表 4-3 树皮中胡桃醌质量分数

样品/g	A	c/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	胡桃醌质量分数/%	平均质量分数/%	相对标准偏差/%
2.0031	0.1753	1.858	0.0928	0.0933	0.123
2.0050	0.1787	1.894	0.0945		
2.0020	0.1762	1.867	0.0933		
2.0045	0.1731	1.834	0.0915		
2.0061	0.1786	1.892	0.0944		

4.3.3 胡桃醌的稳定性

4.3.3.1 H_2O_2 对胡桃醌稳定性的影响

由图 4-6 和表 4-4 可以看出,随着 H_2O_2 浓度的增加胡桃醌的消减率有增加趋势,0.2% H_2O_2 浓度下暗室放置 6h 后,胡桃醌消减率为 0,胡桃醌没有降解,在 1.4% H_2O_2 浓度下暗室放置 6h 后,胡桃醌消减率为 3.10%。结果表明胡桃醌有一定的抗氧化性。

表 4-4 H_2O_2 对胡桃醌稳定性的影响

H_2O_2 浓度/%	0.2	0.6	1.0	1.2	1.4
消减率/%	0	0.71	1.32	2.86	3.10

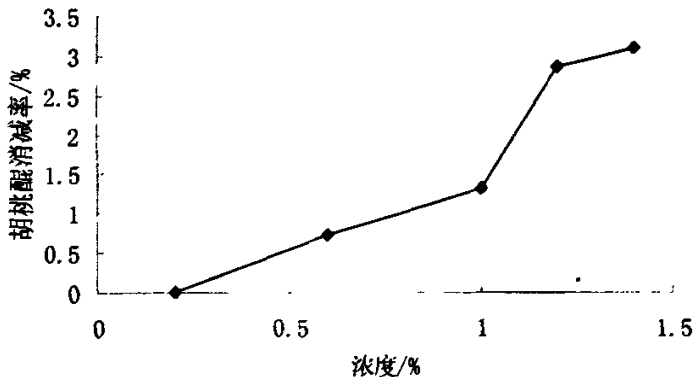


图 4-6 H_2O_2 对胡桃醌稳定性的影响

4.3.3.2 Na_2SO_3 对胡桃醌稳定性的影响

由表 4-5 和图 4-7 可以看出随着 Na_2SO_3 浓度的增加,胡桃醌消减率先增加后下降呈抛物线变化趋势,在 0.03% Na_2SO_3 浓度下暗室放置 6 h 后,胡桃醌消减率最大为 55.60%。结果表明胡桃醌抗还原能力较差,容易与还原剂反应。通过被 Na_2SO_3 处理前后胡桃醌紫外可见光谱图 4-8 的对照可以看出,处理前 426 nm 处的吸收峰在处理后退移至 351 nm 处,说明胡桃醌分子结构发生了变化,胡桃醌发生了还原反应。

表 4-5 Na₂SO₃ 对胡桃醌稳定性的影响

Na ₂ SO ₃ 浓度/%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
消减率/%	42.8	50.65	55.60	52.02	45.83

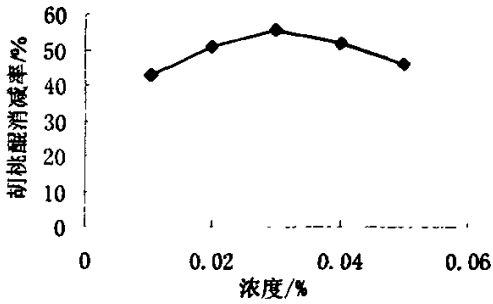


图 4-7 Na₂SO₃ 对胡桃醌稳定性的影响

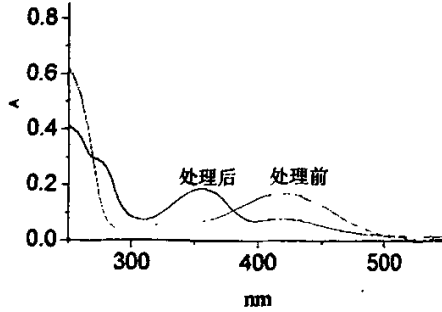


图 4-8 Na₂SO₃ 处理前后胡桃醌 UV-Vis 光谱图

4.3.3.3 吐温 80 的影响

乳化剂的主要作用是对有效成分起到助溶、分散、匀湿和渗透的作用，乳化剂的存在会影响有效成分对光的吸收。因为在本论文第二章核桃楸树皮杀虫活性研究中，药液的配置时都用到了吐温 80，所以本节要考察吐温 80 对胡桃醌稳定性的影响。图表显示，随着吐温 80 浓度的增加，在 15 天内胡桃醌的消减率逐渐下降，所以不必担心吐温 80 会加大胡桃醌的消减率。

表 4-6 吐温 80 对胡桃醌降解率的影响

吐温 80 浓度	2%	6%	8%	10%	12%
降解率	21.4%	17.45%	15.04%	7%	4.1%

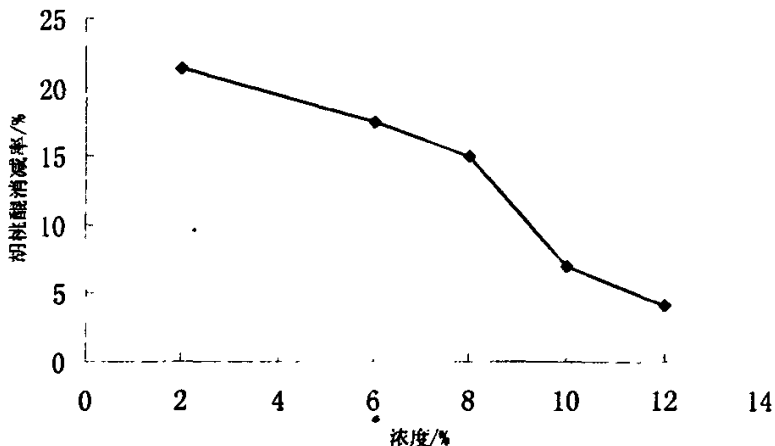


图 4-9 吐温 80 对胡桃醌降解率的影响

4.3.3.4 环境对胡桃醌稳定性的影响

由图 4-10 和表 4-7 可以看出，存放于暗室与室内自然光照射的胡桃醌消减率相近分别为 65.17 和 65.25，比阳光照射作用的 83.81 要小，真空放置的胡桃醌消减率最大为 92.71%，以甲醇溶液存在的胡桃醌消减率最小为 0.58%，比前四种形式存在的胡桃醌

消减率小很多。结果显示以固态存在的胡桃醌更不稳定，光照和真空度会增加这种不稳定性，其原因可能是胡桃醌易升华。

表 4-7 环境对胡桃醌稳定性的影响

放置形式	暗处避光	室内自然光	阳光照射	真空	甲醇溶液中
消减率/%	65.17	65.25	83.81	92.7	0.58

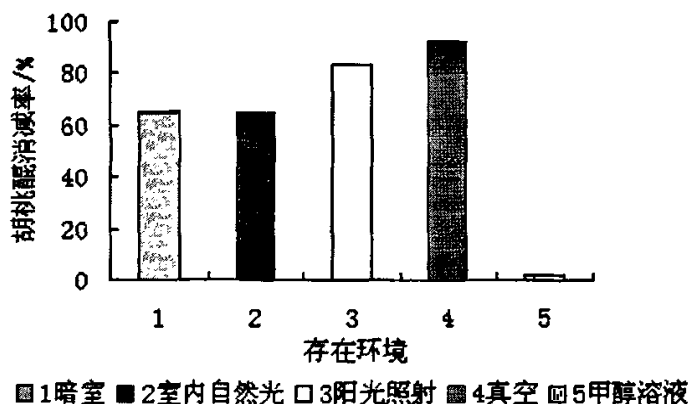


图 4-10 环境对胡桃醌稳定性的影响

4.3.3.5 pH 值对胡桃醌稳定性的影响

由图 4-11 和表 4-8 可以看出，pH 值对胡桃醌稳定性影响很大，在 pH 值为 4 时胡桃醌消减率最小，胡桃醌最稳定。另外随着放置时间的延长，胡桃醌消减率增加。

表 4-8 pH 值对胡桃醌稳定性的影响

pH 值	3 天	10 天	14 天
2	3 %	7.46 %	7.89 %
4	0.57 %	0.82 %	0.84 %
6	9.56 %	19.67 %	21.86 %
8	32.02 %	34.48 %	34.67 %
12	24.88 %	44.87 %	53.32 %

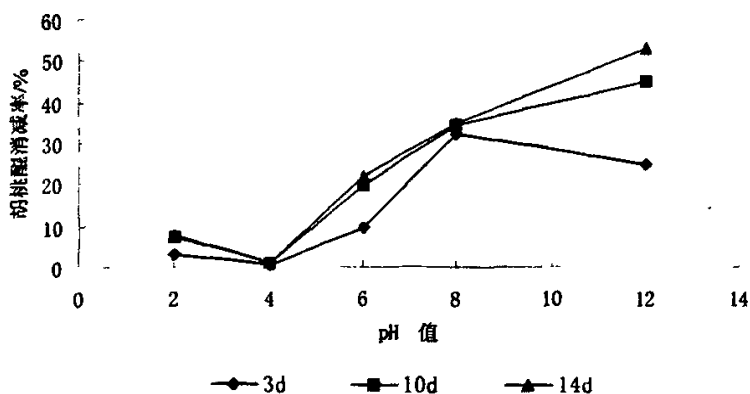


图 4-11 pH 值对胡桃醌稳定性的影响

4.3.3.6 温度对胡桃醌稳定性的影响

由图 4-12 和表 4-9 可以看出, 温度越高, 胡桃醌越不稳定, 4℃放置 19d 胡桃醌消减率为 2.97%, 44℃放置 19 天胡桃醌消减率为 10.09%。随着放置时间的延长, 胡桃醌消减率加大。

表 4-9 温度对胡桃醌稳定性的影响

	3d	5d	9d	14d	19d
4℃	0.73 %	0.80 %	0.86 %	0.97 %	2.97 %
24℃	3.19 %	3.69 %	4.35 %	4.15 %	5.55 %
34℃	0.34 %	3.44 %	5.56 %	5.72 %	6.41 %
44℃	6.94 %	8.26 %	8.53 %	8.75 %	10.09 %

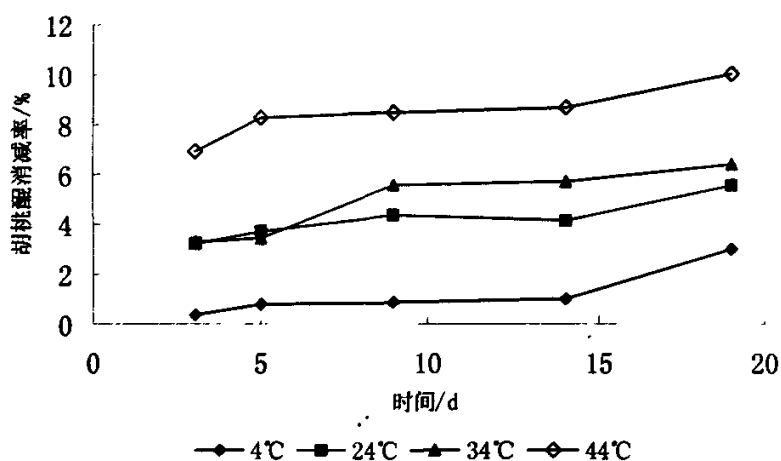


图 4-12 温度对胡桃醌稳定性的影响

4.3.4 胡桃醌的生物活性

4.3.4.1 胡桃醌对舞毒蛾的触杀作用

胡桃醌对舞毒蛾的触杀作用结果如表 4-10 所示, 胡桃醌对舞毒蛾有非常强的触杀作用, 在 48 h 内 1.2 g/L 的胡桃醌对舞毒蛾触杀校正死亡率为 83.31%。

表 4-10 48h 内胡桃醌对舞毒蛾的触杀作用

药液浓度/C g·L ⁻¹	对照	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
校正死亡率/L %	0	2.06	35.4	45.6	68.75	83.31

校正死亡率—施药浓度毒力分析如图 4-13 所示, 回归曲线方程为 $L=97.925C-31.316$, 计算出施药 48 h 时致死中浓度 $LC_{50}=0.83$ g/L。

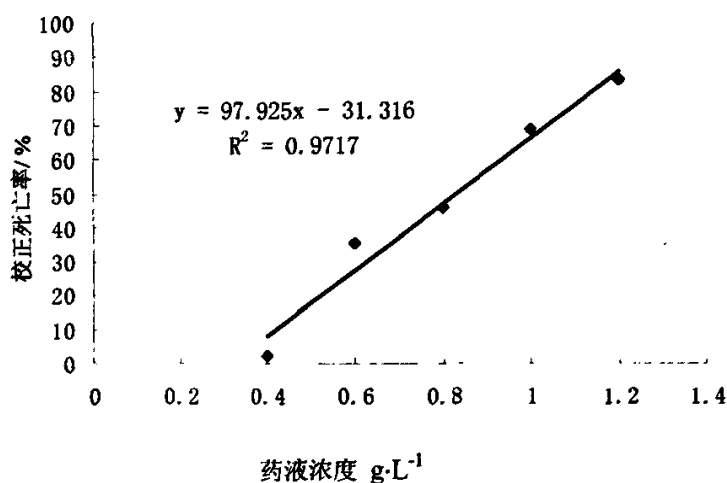


图 4-13 48 h 内胡桃醌对舞毒蛾的触杀作用

4.3.4.2 胡桃醌的抑菌活性

实验结果显示, $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胡桃醌对杨树叶枯病、杨树烂皮病和樟子松枯梢病、都有很好的抑菌作用, 抑菌圈直径都在 2.0 cm 以上, 其中的胡桃醌对杨树叶枯病的最低抑菌浓度为 $0.0625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



图 4-14 胡桃醌对杨树叶枯病抑菌效果

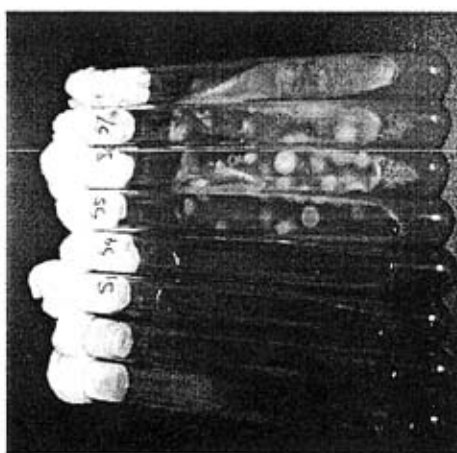


图 4-15 对杨树叶枯病最低抑菌浓度的测定效果

4.4 本章小结

(1) 本章以核桃楸树皮为原料, 成功地通过超声波辅助浸提、水蒸气减压蒸馏、氯仿萃取后蒸干溶剂的简便、快捷的方法提取得到较高纯度的橙色晶体产物胡桃醌。无色亚甲蓝显色反应表明产物中含有苯醌或者萘醌, 碱液试验表明其中含有羟基醌类化合物。傅立叶红外光谱法分析表明产物具有羟基萘醌的特征吸收。GC-MS 分析说明产物中主要成分为胡桃醌、1,4-萘醌及 7-甲氧基-3,4-二氢-1-萘醌, 归一化法定量表明产物中胡桃醌含量达 96.420% 。

(2) 采用分光光度法测定核桃楸树皮中胡桃醌的含量。研究表明：检测波长为 426 nm，核桃楸树皮中的胡桃醌含量为 0.0933 %，重复性良好；核桃楸树皮样品液放置 10 h 内稳定性良好；加样回收率为 99.6 %；分光光度法测定胡桃醌的含量结果准确，方法简单易行。

(3) 稳定性实验表明，胡桃醌有较强的抗氧化性较弱的抗还原性，以甲醇溶液的形式存在比固态形式存在稳定，在胡桃醌溶液中添加吐温 80 不会增加胡桃醌消减率，pH 值为 4 时胡桃醌最稳定，温度升高则胡桃醌消减率增加。

(4) 生物活性分析表明胡桃醌有很好的杀虫和抑菌性能，胡桃醌对舞毒蛾触杀致死中浓度在 48h 内为 0.83 g/L。0.5 g/L 的胡桃醌对杨树叶枯病、杨树烂皮病和樟子松枯梢病都有很好的抑菌作用，抑菌圈直径都在 2.0 cm 以上，其中的胡桃醌对杨树叶枯病的最低抑菌浓度为仅为 0.0625 g/L。

结论

(1) 核桃楸树皮乙醇提取物和乙醇提取物的石油醚相、氯仿相、乙酸乙酯相和剩余水相都具有杀虫活性, 其中各种供试药液触杀作用比胃毒作用致虫死亡率高, 药效快; 随着药液浓度的增加, 触杀作用效果加强, 而胃毒作用效果却不是有规律的加强, 有时反而会降低, 原因可能是药品使虫子产生拒食性, 使得虫子实际被施药量降低。氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相是核桃楸树皮抑菌活性成分的富集组分, 对杨树烂皮病、樟子松枯梢病、杨树叶枯病三种病菌的生长都有很好的抑制作用, 乙醇提取物和水相仅对杨树叶枯病菌有抑制作用, 石油醚萃取相对三种病菌都没有抑制作用, 其中氯仿和乙酸乙酯萃取相对杨树叶枯病的最低抑菌浓度都是 3.125 mg/mL, 通过细微比较发现氯仿萃取相要比乙酸乙酯萃取相有较好的抑菌效果。

(2) 用化学法对核桃楸树皮乙酸乙酯萃取相的成分进行预试, 结果显示乙酸乙酯萃取相中含有酚类和鞣质、萘醌类、黄酮类、内酯、香豆素, 可能含有机酸、不含蒽醌及其甙类, GC-MS 联用分离确认出其中 14 种化合物, 占乙酸乙酯萃取相的 94.61 %, 含量最大的化合物为 1,2,3-苯三醇、5-羟基-1,4-萘醌和 7-甲氧基-1-四氢萘酮, 含量分别为 42.31 %、12.33 %、11.26 %; GC-MS 联用分析初步确认出氯仿萃取相中的 13 中化合物, 占氯仿萃取相的 94.04 %, 含量最大的化合物是 5-羟基-1,4-萘醌, 占氯仿萃取相的 36.65 %; TLC 分离-HPLC 检测进一步证明氯仿和乙酸乙酯萃取相中都含有生物活性物质胡桃醌。

(3) 用超声波提取、常规提取和索氏提取三种方法提取核桃楸树皮中的胡桃醌, 提取所得胡桃醌占原料的质量百分比依次为 0.00131 %、0.00126 %、0.00111 %。超声波辅助浸提, 减压蒸馏法可以从核桃楸树皮中提取高纯度的胡桃醌。GC-MS 联用分析显示提取产物中胡桃醌相对含量达到 96.420 %。并且产物的无色亚甲基蓝显色反应、碱液试验、傅立叶红外光谱、¹H NMR 都显示提取产物显示了胡桃醌的结构特征。在检测波长为 426 nm 处, 采用分光光度法测定胡桃醌的含量, 方法简便易行, 结果准确, 方法的加样回收率为 99.6 %, 重复性良好; 分光光度法测得核桃楸树皮中的胡桃醌含量为 0.0933 %, 与 HPLC 法测定结果相近。

(4) 稳定性实验表明, 胡桃醌有较强的抗氧化性和较弱的抗还原性, 以固态形式存在的胡桃醌易于升华, 在胡桃醌溶液中添加吐温 80 会增加胡桃醌的稳定性, pH 值为 4 时胡桃醌最稳定, 温度升高则胡桃醌消减率增加。生物活性分析表明胡桃醌有很好的杀虫和抑菌性能, 胡桃醌对舞毒蛾触杀致死中浓度在 48 h 内为 0.83 g/L。0.5 g/L 的胡桃醌对杨树叶枯病、杨树烂皮病和樟子松枯梢病都有很好的抑菌作用, 抑菌圈直径都在 2.0 cm 以上, 其中的胡桃醌对杨树叶枯病的最低抑菌浓度为仅为 0.0625 g/L。

参考文献

- [1] 王少东, 脱朝伟. 核桃楸青果皮抗肿瘤作用的药理研究[J]. 辽宁中药杂志, 1990(11):37-39
- [2] 张野平, 杨志博, 苏静洲, 等. 胡桃醌抗肿瘤作用的研究(I)[J]. 沈阳药学院学报, 1987, 4 (3): 166-169
- [3] 宛蕾等, 胡桃青皮抗炎及镇痛作用的研究[J]. 中国药理与临床. 1999, 15(2): 29-30
- [4] 宋 华, 包永明, 张红梅, 安利佳. 核桃楸叶提取液对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 大连轻工业学院学报, 2001, 20(2): 109-111
- [5] 张文吉, 李学峰, 王成菊. 新农药应用指南(第3版)[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000: 32-33
- [6] 李金培, 张玉珍. 植物源农药的利用[J]. 世界农业, 1998(12): 28-30
- [7] Swain T. Secondary compound as protective agents [J]. Ann Rev Plant physiol. 1977, 28: 479-501
- [8] 操海群, 岳永德, 花日茂, 等. 植物源农药研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(1): 40-44
- [9] 史卫国, 徐之明, 黄清臻, 等. 植物源农药的进展[J]. 农药科学与管理, 1997(3): 33-35
- [10] 孙墨珑. 核桃楸化学成分及生物活性研究进展[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(3): 85-86
- [11] 翟梅枝, 杨秀萍, 林奇英, 等. 核桃叶提取物对杨毒蛾生物活性的研究[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(2): 65-67
- [12] Guarrera P M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. J Ethnopharmacol, 1999, 68(1-3): 183-192
- [13] Mitchell M J, Smith SL. Effects of the chitin synthetase inhibitor plumbagin and its 2-demethyl derivative juglone on insect ecdysone 20-monooxygenase activity. Experientia, 1998, 44(11-12): 990-991
- [14] 翟梅枝, 杨秀萍, 刘路. 核桃叶提取物对蚜虫的触杀作用[J]. 西北林学院学报, 2000, 16(4): 55-56
- [15] 翟梅枝, 张凤云, 刘朝斌, 等. 核桃叶提取物对粘虫和小菜蛾的拒食活性研究, 西北林学院学报, 2005, 20(2): 138-140
- [16] 翟梅枝. 植物次生物质的抗病活性及构效分析. 福建农林大学博士学位论文
- [17] 宋 君. 植物间的他感作用[J]. 生态学杂志, 1990, 9(6): 43-47
- [18] 董卓杭, 林文雄. 作物化感作用研究现状及前景展望[J]. 中国生态农业学报,

- 2001, 9(1): 80-83
- [19]翟明普, 贾黎明. 森林植物间的他感作用[J]. 北京林业大学学报, 1993, 15(3): 138-147
- [20]林文雄, 何华勤, 郭玉春, 等. 水稻化感作用及其生理生化特性的研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(6): 871-875
- [21]马茂华, 于凤兰, 孔令韶. 油蒿的化感作用研究. 生态学报, 1999, 19(5): 670-676
- [22]姚焕英, 唐静成, 张鞍灵, 等. 核桃属植物化学成分及生物活性研究[J]. 西北植物, 2003, 23(9): 1650-1655
- [23]刘彬彬, 胥耀平, 高锦明, 等. 核桃叶石油醚提取物化感作用的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(4)
- [24]王少东, 脱朝伟. 核桃楸青果皮抗肿瘤作用的药理研究. 辽宁中杂志, 1990(11): 37-39
- [25]王绍林, 王绍东, 刘今方. 核桃楸青果皮的生药鉴别和抗肿瘤作研究. 药学实践杂志, 1995, 13(1): 40-42
- [26]徐巍. 青龙衣的药用研究概述. 中医药信息, 2002, 19(6): 13-14
- [27]兰英, 赵锐. 核桃楸青果皮水提物对降低小鼠体内丙二醛质量度的研究. 北华大学学报, 2000, 1(6): 476-477
- [28]兰英, 房金波, 张维晶等. 核桃楸青果皮(G P J M)水提物诱生小肿瘤坏死因子的实验研究. 东北师范大学学报(自然科学版), 2003, 35(1): 78-81
- [29]常殿武, 傅桂连, 等. 核桃楸青果皮等浸出物对小鼠巨噬内 α -TNF 基因表达的影响. 中国现代医学杂志, 2003, 13(12): 32-33
- [30]许绍惠, 唐婉屏, 韩忠环. 核桃楸毒性成分研究. 沈阳农业大学报, 1986, 17(2): 34-39
- [31]许绍惠, 许泓. 胡桃属植物毒性成分及其应用. 沈阳农业大学报, 1990, 21(2): 167-170
- [32]李敬芬, 王建农, 谷艳玲. 核桃楸树皮化学成分的研究. 佳木斯学院学报, 1994, 17(6): 1-3
- [33]吴乃居, 陈鸿英, 王振国. 核桃楸叶化学成分研究. 中草药, 1925(1): 10-11
- [34]Hirakawa, K, Ogiue E, Motoyoshiya J, et al. Naphthoquinones from Juglandaceae, *Phytochemistry*, 1986, 25(6): 1494-1495
- [35]Joe yoonki, Son Jongkeun, Park Sunghee, et al. New naphthalenyl glucosides from the roots of *juglans mandshurica*. *Journal of Natural Products*, 1996, 59(2): 159-160
- [36]Lee Sungwon, Lee Kyongsun, Son Jongkeun, et al. New naphthalenyl glucosides from the roots of *juglans mandshurica*. *Planta Medica*, 2000, 66(2): 184-186
- [37]Kim Sanghyun, Lee Kyongsun, Son Jongkeun, et al. cytotoxic compounds from

- the roots of *Juglans mandshurica*. *Journal of Natural Products*, 1998, 61(5):643-645
- [38]Lee Kyungseon, Li Gao, Kim Sunghwan, et al. Cytotoxic diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*. *Journal of Natural Products*, 2002, 65(11): 1707-1708
- [39]Li Gao, Xu Minglu, Choi Hangan, et al. Four new diarylheptanoids from the roots of *Juglans mandshurica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 51(3): 262-264
- [40]Lee Eunbang, Hyun Jinee, Li Da wei, et al. Gastroprotective activity of the unripe fruit extract of *Juglans mandshurica* in rats. *Natural Product Sciences*, 2001, 7(3): 87-89
- [41]Min Byungsun, Nakamura N, Miyashiro H, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2000, 48(2): 194-200
- [42]Min Byungsun, Lee Hyeongkyu, Lee Sangmyung, et al. Antihuman immunodeficiency virus-type 1 activity of constituents from *Juglans mandshurica*. *Archives of Pharmacal Research*, 2002, 25(4): 441-445
- [43]Min Byungsun, Lee Sunyoung, Kim Junghee, et al. Anti-complement activity of constituents from the stem-bark of *Juglans mandshurica*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 26(7): 1042-1044
- [44]姚焕英, 唐静成, 张鞍灵, 等. 核桃属植物化学成分及生物活性研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1650-1655
- [45]石建辉, 王金辉, 车东, 等. 核桃楸树皮化学成分研究, 2005, 7(1): 7-8
- [46]王金兰, 田孝平, 郭洪利, 等. 山核桃树皮中生理活性成分的研究(1)[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2004, 20(3): 7-9
- [47]朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨: 黑龙江省科技出版社, 1989, 207
- [48]许绍惠. 核桃楸毒性成分应用的探讨[J]. 辽宁林业科技, 1989(4): 42-48
- [49]Bhargava et al, Study on the Anti-Tumor Activity of juglone. *Journal of pharmaceutical Science*, 1988, 57(10)
- [50]张野平, 许绍惠. 胡桃醌抗肿瘤作用的研究. 沈阳药学院院报, 1987, 4(3): 168-188
- [51]Ikekawa Tetsuro et al, Study on antifungal activities of juglone. *Chem Pharm Bull*;1967, 15(2): 242-245
- [52]许绍惠. 胡桃属植物毒性成分及其应用[J]. 沈阳农业大学学报, 1990, 21(2): 167-170
- [53]Funk D T et al. Preliminary Studies on the Allelopathic Effects of jugone. *Forest Science*, 1979, 25(3): 452-454
- [54]Rietveld W J. Studies on the Allelopathic Effects of jugone. *Chem, ecol*.1983, 9(2): 295-30

- [55]陈江燕, 宋晓东. 樟子松枯梢病病原菌生物学特性的研究[J]. 辽宁林业科技, 1999, 4: 25-27
- [56]苏晓华, 张香华. 鉴别抗杨叶枯病基因连锁分子标记[J]. 林业科学, 2000, 36(6): 73-76
- [57]HAO JY, SUN D H. CytoSPora canker of Poplars and control methods, Forest Investigation Design, 2001(2): 62
- [58]吴文君. 生物杀虫剂—原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1998
- [59]赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 251
- [60]周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆: 科技文献出版社重庆分社, 1987
- [61]李钧敏, 虞优优, 金则新. 大血藤叶片提取物抑菌作用的初步研究[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 28(1)
- [62]索绪斌, 高奎滨, 张云凌, 等. 高效液相色谱法测定青龙衣中胡桃酮含量[J]. 中药材, 2003, 26, (11): 793
- [63]赵兵, 王玉春, 欧阳藩, 等. 超声波在植物提取中的应用[J]. 中草药, 1999, 30, (9): 附1-附3
- [64]许绍惠, 许泓. 胡桃属植物毒性成分及其应用[J]. 沈阳农业大学学报, 1990, 21(2): 167-170
- [65]唐静成. 核桃叶活性成分的研究(I)[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2003
- [66]孙墨珑, 宋湛谦, 方桂珍. 胡桃楸总黄酮及胡桃醌含量的测定[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(2): 93-95
- [67]郭薇, 马福秋, 崔瑞敏, 等. 叶黄素提取方法研究概况[J]. 化学与黏合, 2005, 27(6)

攻读学位期间发表的学术论文

- [1] 孙墨珑, 袁海舰, 宋湛谦, 等. 核桃楸树皮乙醇提取物的杀虫活性. 东北林业大学学报, 2007, 35(1): 60-62
- [2] 孙墨珑, 袁海舰, 宋湛谦, 等. 减压蒸馏法提取核桃楸树皮中的胡桃醌. 林产化学与工业 (EI 收录), 已接收
- [3] 宋子娟, 李淑君, 袁海舰, 等. 辛酸蔗糖酯的合成与杀虫活性研究. 北京林业大学学报 (EI 收录), 2007, 29(2): 116-121
- [4] 孙墨珑, 袁海舰, 李淑君, 等. 分光光度法测定核桃楸树皮中胡桃醌的含量. 东北林业大学学报, 2007, 35(6): 37-38
- [5] 申请专利: 孙墨珑, 李淑君, 袁海舰, 等. 一种提取胡桃醌的方法. 申请号 200610150876. X
- [6] 申请专利: 李淑君, 宋子娟, 袁海舰, 等. 利用减压制备具有杀虫活性的蔗糖酯的方法. 申请号: 200610009604. 8

致谢

本课题承蒙黑龙江自然科学基金资助，特致殷切谢意。

衷心感谢导师李淑君副教授和孙墨珑教授对本人的精心指导。她们严谨求实的科学态度、仁爱善良的道德风范使我深受教育，也必将使我受益终生。即将告别校园，二位导师的不倦教诲和无私帮助仍历历在目，记忆犹新，感激之情难于言表，我愿珍藏这份宝贵的感情，让它们伴我终生。在此恭祝二位导师工作顺利，身体健康，永远光彩照人。

在三年来的学习和生活中，得到了林产化学加工工程专业的方桂珍教授、刘守新教授、王立娟副教授、刘志明副教授、任世学老师和黄占华老师等各位老师的关心与帮助，在此表示诚挚的谢意。同时还要感谢轻化工程的苏文强教授、钱学仁教授、于钢教授、刘文波副教授、沈静老师、许士玉老师等各位老师的关心与支持，感谢实验室的张丽君老师对我的帮助。祝愿老师们工作顺利，身体健康。

感谢在一起生活和学习的同窗好友们，愿我们友谊如同帽儿山一样岿然不倒，屹立在东北大地上，如若松花江之水一样绵延不绝，流淌在青山绿水之间。让我们相约在心底，相约在可预见的未来！祝各位同学前程似锦！

感谢家人和女友对我的鼓励与支持！