

沼液中化学成分的研究

吴慧斌, 刘丁才, 许剑锋*

上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 通过用硅胶、凝胶柱层析和制备液相纯化, 从沼液浓缩物里分离出四个化合物, 经鉴定其中一个为新化合物, 将其命名为 24-降齐墩果烷-4, 12-二烯-3, 22-二酮(1), 其余三个为已知化合物, 8-羟基-3, 4-二氢喹啉-2 酮(2)、(E)-3-(2-羟基苯)丙烯酰胺(3)、苯乙酸(4)。这些化合物均是首次从鸡粪沼液中分离出来。

关键词: 沼液; 化学成分; 24-降齐墩果烷-4, 12-二烯-3, 22-二酮; 苯乙酸

中图分类号: R284. 2

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2015. 01. 003

Chemical Constituents of Biogas Slurry

WU Hui-bin, LIU Ding-cai, XU Jian-feng*

College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: A new pentacyclic triterpenoid compound (1) and three known compounds (2-4) were isolated and purified from the biogas slurry by various liquid chromatographys. The new compound was named as 24-norolean-4, 12-diene-3, 22-dione, the other 3 compounds were identified as 6-hydroxy-3, 4-dihydroquinolines-2-ketone (2), (E)-3-(2-hydroxy benzene) acrylamide (3) and phenylacetate (4), respectively. They were isolated from the biogas slurry for the first time.

Key words: biogas slurry; chemical constituents; 24-norolean-4, 12-diene-3, 22-dione; phenylacetate

沼液是人畜粪便和各种农作物秸秆等有机物经沼气池密封厌氧发酵产生沼气后的液体残留物^[1], 是沼气工程产生的两大副产物之一, 主要被用作叶面肥、饲料添加剂、浸泡种子等。目前研究表明, 沼液是一种速效水肥, 含有多种农作物所需的营养元素^[2,3], 它不仅含有作物生长所必需的氮、磷、钾、微量元素、氨基酸等多种营养物质, 而且含有植物生长激素、B 族维生素、抗生素等活性、抗性物质^[4]。研究发现, 通过对生长作物喷洒沼液有促进作物生长和预防或抑制病虫害的作用, 而且对 20 多种病虫害的防治效果达到或超过了现在使用的农药效果^[5], 但目前研究仅限于沼液的理化性质, 矿物质含量、重金属含量以及氨基酸和 B 族维生素含量的测定, 对其抑菌机理和化学成分的详细研究并没有报道。而现在沼气应用已在全国范围内大范围推广, 沼液的量急剧增加, 所以对沼液成分的研究有利于废弃物的综合利用, 不仅可以减少农药和一些化学药品的使用, 降低农业成本, 同时也可以减少对环境的污

染, 有较高的社会效益。

本研究针对以鸡粪为原料的沼液成分进行了分析鉴定, 刘丁才等在前期的工作中已经从沼渣中分离到 6 个化合物, β -谷甾醇、22 β -羟基- β -白檀桐、29-羟基-12-土当归烯-3, 22-二酮、17 β -雌二醇、S(-)-雌马酚^[6]。在之前研究的基础上从沼液中进一步分离出 4 个化合物, 经鉴定, 一个为新化合物, 24-降齐墩果烷-4, 12-二烯-3, 22-二酮(1), 3 个为已知化合物, 8-羟基-3, 4-二氢喹啉-2 酮(2)、(E)-3-(2-羟基苯)丙烯酰胺(3)、苯乙酸(4)。这些化合物都是从鸡粪沼液中首次分离出来。其中, 研究发现苯乙酸在体内具有抑制肿瘤生长, 诱导细胞凋亡的作用, 但是有剂量依赖性^[7]。

1 仪器与材料

Bruker AVANCE II 600 型核磁共振仪, TMS 为内标 (Bruker); Bruker ALPHA 红外光谱仪; Waters Q-TOF 高分辨电离喷雾质谱; 凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech; 柱层析硅胶 (200 ~ 300 目) 和硅胶薄层色谱预制板 (GF₂₅₄) 购自青岛海洋化工有限公司; 制备 HPLC 色谱柱填料 (Sino Chrom ODS-BP

10 μm , 20 mm \times 250 mm; 色谱处理系统: EC2000 GPC 系统) 购自大连依利特分析仪器有限公司; 液相色谱级甲醇、乙腈购自 Sigma 公司; 水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯 (AR), 上海国药集团化学试剂公司; 沼液取自于上海市浦东新区六灶镇文彬养鸡场沼气池, 经同济大学现代农业科学与工程研究院朱洪光教授鉴定为以鸡粪为原料产生的沼液, 标本现存于上海海洋大学食品学院海洋与生物制药研究室。

2 提取与分离

鸡场沼液在室温下 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩去掉 80% 水分得到沼液浓缩液, 将沼液浓缩液与萃取溶剂按 1:2 进行萃取。先用石油醚进行萃取, 合并浓缩后得石油醚萃取物 41 g; 其次用乙酸乙酯进行萃取, 合并浓缩后得到乙酸乙酯萃取物 84 g; 再次用正丁醇进行萃取, 收集、浓缩得到正丁醇萃取物 57 g; 由于余下水相所溶物质一般都是极性很大的糖类、蛋白等, 故舍弃。

沼液石油醚和乙酸乙酯萃取部分, 经薄层色谱 (石油醚: 乙酸乙酯 = 3:1) 展开, 并用 10% 浓硫酸乙醇溶液染色烘干后发现相同的显色点, 因此合并两个部位。向萃取物浸膏中加入等量的粗硅胶, 搅拌均匀并烘干上样, 经 200 ~ 300 目硅胶柱层析, 依次以石油醚: 乙酸乙酯 (PE/EA) (100:0 \rightarrow 30:1 \rightarrow 25:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 15:1 \rightarrow 8:1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 1:1) 梯度洗脱, 洗脱液根据 TLC 检测结果合并、浓缩, 得到四部分 (F1 ~ F4)。F3 经 200 ~ 300 目硅胶柱层析, 硅胶 H 柱层析, 葡聚糖 LH-20 柱层析, 再经半制备 HPLC 纯化, 以 88% 甲醇/水溶剂等度洗脱, 流速 10 mL/min, 收集时间 $t_{\text{R}} = 14.32$ min 出峰的组分, 得化合物 **1**。

将沼液正丁醇部分经 300 ~ 400 目硅胶柱层析, 依次以氯仿/甲醇溶液 (30:1 \rightarrow 25:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 15:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 1:1) 梯度洗脱, 洗脱液根据薄层色谱 (TLC) 检测结果合并、浓缩, 得五个部分 (N1 ~ N5)。第三部分先用少量甲醇萃取, 减压浓缩, 再经凝胶 LH-20 层析以 100% 甲醇溶液进行反复等度洗脱, 得到化合物 **2**; 第四部分直接用少量甲醇萃取, 然后减压浓缩, 再经凝胶 LH-20 层析以 100% 甲醇溶液进行反复等度洗脱, 得到化合物 **3** 和 **4**。

3 结构鉴定

化合物 **1** 无色针晶 (MeOH); $[\alpha]_{\text{D}}^{15} + 48.6$ (c

0.25, CHCl_3); HR-ESI-MS m/z : 422.3208 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (理论值 422.3184), 分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{O}_2$; IR (KBr) ν_{max} : 3389, 2952, 2927, 2869, 1704, 1462, 1378, 974 cm^{-1} , 其在 1704 cm^{-1} 处有强吸收峰, 说明含有羰基结构。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) 中在 δ 5.38 (1H, t, 3.4 Hz) 处有烯键质子信号且被耦合裂分为三重峰, 说明其邻键碳是亚甲基, 且在高场区一共有 7 个甲基信号, 分别为 δ 1.80 (3H, s)、 δ 1.25 (3H, s)、 δ 1.19 (3H, s)、 δ 1.19 (3H, s)、 δ 1.03 (3H, s)、 δ 1.00 (3H, s) 和 δ 0.86 (3H, s), 其中在偏低场处 δ 1.80 (3H, s) 出现甲基质子单峰, 未被耦合裂分, 说明 δ_{H} 1.80 (3H, s) 处甲基连在 δ_{C} (164.4, 128.2) 处碳形成烯键上。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) 推出该化合物含有 10 个季碳、3 个次甲基、9 个亚甲基、7 个甲基, 低场区也显示有 2 个典型的羰基季碳 (δ_{C} 216.9, 199.0) 和 4 个烯键碳 (δ_{C} 164.4, 141.8, 128.2, 123.9)。此外, 从整个 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 可知, 化合物 **1** 属五环三萜类。利用 HSQC 将各质子信号归属到与其相连的碳原子上, 再利用 ^1H - ^1H COSY 图谱将互相耦合的质子片段进行链接。HMBC 图谱进一步验证了部分连接, 并将羰基、甲基与各片段联系起来, 其中显示 3H-23 与 C-3、C-4、C-5 相关, 3H-24 与 C-1、C-5 和 C-9 相关, 3H-25 与 C-7、C-9、C-14 相关, 3H-26 与 C-8、C-13、C-15 相关, 3H-27 与 C-16、C-18、C-22 相关, 3H-28 和 3H-29 同时与 C-19、C-20、C-21 相关, 从而确定了关键链接。化合物 **1** 的具体一维、二维核磁数据见表 1, 通过与文献中 olean-12-ene-3,22-dione 的核磁共振数据比较^[8], 以及通过全面的 ^1H - ^1H NOESY 相关信号分析确定化合物 **1** 的立体结构。鉴定结构如图 1, 为新化合物, 将其命名为 24-降齐墩果烷-4, 12-二烯-3, 22-二酮 (24-norolean-4,12-diene-3,22-dione)

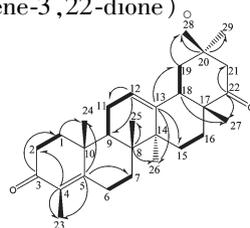


图 1 化合物 **1** 的主要二维相关信号

Fig. 1 Key COSY (—) and HMBC (—) correlations of compound **1**

表1 化合物1的核磁共振数据
Table 1 1D-and 2D NMR data of 1(CDCl₃)

No.	¹³ C NMR	¹ H NMR (<i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1a 1b	37.1	1.95-2.07 (1H, <i>ol</i> ,H-1a), 1.60-1.68 (1H, <i>ol</i> ,H-1b)	1b 1a;2a	24	11b;24
2a 2b	33.5	2.46 (1H, <i>m</i> ,H-2a), 2.33-2.37 (1H, <i>ol</i> ,H-2b)	1a,b;		24
3	199.0			1	
4	128.2		5;23	2;23	
5	164.4		4;6a,b	7;24	
6a 6b	24.7	2.65(1H, <i>dt</i> ,14.4,3.5,H-6a), 2.23(1H, <i>td</i> ,14.3,2.0,H-6b)	7b		25
7a 7b	31.8	1.64 (1H, <i>m</i> ,H-7a), 1.54 (1H, <i>dt</i> , 12.9,3.8,H-7b)			6b;15b;25
8	39.6			25;26	
9	46.6	1.36 (1H, <i>ddd</i> ,13.7,4.6,3.6)			26
10	39.3				
11	24.0	1.95-2.07 (1H, <i>ol</i> ,H-11a),1.15 (1H, <i>dt</i> ,13.1,3.3,H-11b)	12		24
12	123.9	5.38 (1H, <i>t</i> ,3.4)	11	9;11	
13	141.8			15;19;26	
14	42.8				
15a 15b	25.2	1.81-1.85 (1H, <i>ol</i> ,H-15a), 1.22 (1H, <i>m</i> ,H-15b)			25 7a
16a 16b	27.3	1.95-2.07 (2H, <i>ol</i>)	15a 15b;16a		
17	47.9				
18	48.2	2.33-2.37 (1H, <i>ol</i>)	19a,b	27	
19a 19b	46.7	2.10 (1H, <i>t</i> ,13.8,H-19a), 1.81-1.85 (1H, <i>ol</i> ,H-19b)	18;	28	21b
20	34.3			28;29	
21a 21b	51.1	2.42 (1H, <i>d</i> ,14.4 Hz,H-21a), 1.95-2.07 (1H, <i>ol</i> ,H-21b)			
22	216.9			21;27	
23	11.2	1.80 (3H, <i>s</i>)		3;4;5	24
24	18.9	1.25 (3H, <i>s</i>)		1;9	23
25	16.8	1.19 (3H, <i>s</i>)		9;14	
26	25.0	1.19 (3H, <i>s</i>)		13;14	7b;9;16
27	20.9	1.03 (3H, <i>s</i>)		18;22	
28	32.2	1.00 (3H, <i>s</i>)		19;20;21	27
29	25.5	0.86 (3H, <i>s</i>)		19;20;21	19b;21b

化合物2 白色无定型粉末,易溶于甲醇;IR (KBr) ν_{\max} : 3224, 1644, 1587, 1492, 1440, 1271, 1197, 795, 739 cm^{-1} ; ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 6.80 (1H,*t*,*J*=7.8 Hz,H-6), 6.68 (1H,*d*,*J*=8.4

Hz,H-7), 6.65 (1H,*dd*,*J*=7.5,1.1 Hz,H-5), 4.48 (1H,*s*,8-OH), 2.91 (2H,*t*,*J*=7.5 Hz,H-4), 2.55 (2H,*t*,*J*=7.6 Hz,H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 173.3 (*s*, C-2), 145.3 (*s*, C-8), 126.3 (*s*, C-9),

126.0 (*s*, C-9), 124.2 (*d*, C-6), 119.6 (*d*, C-5), 114.4 (*d*, C-3), 31.6 (*t*, C-3), 26.2 (*t*, C-4)。化合物**2**的¹³C NMR数据与已知结构8-羟基-3,4-二氢喹啉-2-酮的文献^[9]数据相比,二者一致,从而确定了化合物**2**的结构。

化合物3 无色片状晶体(MeOH); IR (KBr) ν_{\max} : 3445, 654, 1600, 1556, 1427, 1351, 1028, 757 cm^{-1} ; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.95 (1H, *d*, *J* = 9.5 Hz, H-3), 7.65 (1H, *dd*, *J* = 7.8, 0.8 Hz, H-6'), 7.53 (1H, *td*, *J* = 7.6, 1.3 Hz, H-4'), 7.35 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, H-3'), 7.24 (1H, *td*, *J* = 7.5, 0.9 Hz, H-5'), 6.61 (1H, *d*, *J* = 9.4 Hz, H-2), 4.86 (1H, OH-1'); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 165.4 (*s*, C-1), 142.7 (*d*, C-3), 139.8 (*s*, C-2'), 131.9 (*d*, C-4'), 129.1 (*d*, C-6), 123.9 (*d*, C-5), 121.6 (*d*, C-2), 121.4 (*s*, C-1'), 116.8 (*d*, C-3')。推出来的结构与已知结构 *o*-coumaric acid amide^[10]的结构一致,从而确定了化合物**3**就是(*E*)-3-(2-羟基苯)丙烯酰胺。

化合物4 无色不定型结晶(MeOH),易溶于甲醇和乙醇,有刺激挥发气味。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.26-7.31 (4H, *m*, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.21 ~ 7.24 (1H, *m*, H-4'), 4.92 (1H, *brs*, OH), 3.58 (2H, *s*, H-2); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 175.5 (*s*, C-1), 136.0 (*s*, C-1'), 130.3 (*d*, C-2', 6'), 129.4 (*d*, C-3', C-5'), 127.8 (*d*, C-4'), 41.9 (*t*, C-2)。化合物**4**的¹³C NMR与已知结构苯乙酸的文献^[11]数据相比,二者完全一致,从而确定了化合物**4**的结构。

参考文献

- 1 Wang C (汪崇), Gao L (高琳), Yang WL (杨文亮). Study of biogas slurry composition by using pig manure as raw material of fermentation. *Modern J Animal Husband Vet-erin Med* (现代畜牧兽医), 2012, 8: 51-52.
- 2 Hararla Y. Treatment and utilization of animal wastes in Japan [C]//FFTC. Proceedings of food and fertilizer technology center for the Asian and Pacific region, Taiwan: Taipei, 1995. 1-18.
- 3 Haga K. Animal waste problems and their solution from the technological point of view in Japan. *Japan Agric Res Quarterly*, 1998, 32: 203-210.
- 4 Guo SL (郭双连), Zhang WD (张无敌), Xie J (谢建), et al. The research and application of biogas slurry as pig feed additives. *Yunnan Agric Sci Technol* (云南农业科技), 2003, 4: 14-16.
- 5 Zhang WD (张无敌), Song HC (宋洪川), Ding Q (丁琪), et al. Application of methane fermentative residues in control of crop diseases and insect pests. *Res Agric Mod* (农业现代化研究), 2001, 2: 167-170.
- 6 Liu DC (刘丁才), Zhu HG (朱洪光), Xu JF (许剑锋). Chemical constituents of biogas residues. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1070-1073.
- 7 Yang CH (杨朝华), You C (游潮), Huang SW (黄少伟), et al. Effect of phenylacetate on apoptosis in rat C6 glioma cells *in vivo*. *Med J West China* (西部医学), 2009, 21: 1841-1843.
- 8 Fish PV, Johnson WS. The first examples of nonenzymic, biomimetic polyene pentacyclizations. Total synthesis of the pentacyclic triterpenoid sophoradiol. *J Org Chem*, 1994, 59: 2324-2335.
- 9 Wei QY, Tan TW, Hou BC. The study of the effect of biogas digestates on plant stress-tolerance. International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment, 2012/03.
- 10 Zhivko V, Elena B, Alia T. Radical scavenging activity prediction of *o*-coumaric acid thioamide. *J Molecul Struc; Theor-chem*, 2007, 821: 133-138.
- 11 Gachet MS, Kunert O, Kaiser M, et al. Jacaranone-derived glucosidic esters from *Jacaranda glabra* and their activity against *Plasmodium falciparum*. *J Nat Prod*, 2010, 73: 553-556.