

巴东醉鱼草杀虫活性成分的初步分离及活性追踪^①

张秀云, 李治伟, 陆德玲, 冯俊涛, 张 兴

西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

摘要: 采用杀虫活性追踪和化学分离相结合的方法对巴东醉鱼草 95%乙醇提取物的石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物进行活性成分分离, 在 5 mg/mL 的体积质量分数下, 石油醚萃取物经一级柱层析所得馏分 AG 的活性最高, 对 3 龄粘虫 24 h, 48 h 和 72 h 拒食率分别达 58.44%, 79.77% 和 71.52%, 对 5 龄菜青虫 24 h 和 48 h 拒食率分别达 89.03% 和 72.73%; 乙酸乙酯萃取物经一级柱层析所得馏分 BB 对 3 龄粘虫 24 h, 48 h 和 72 h 拒食率分别达 97.34%, 100% 和 100%, 对 3 龄小菜蛾 24 h 和 48 h 拒食率最高分别达 97.33% 和 99.46%。实验结果表明, 经过一级柱层析后, 石油醚萃取物杀虫活性物质主要分布在 AG 段, 乙酸乙酯萃取物杀虫活性物质主要分布在 BA, BB 和 BC 段。

关键词: 巴东醉鱼草; 拒食活性; 粘虫; 小菜蛾; 菜青虫

中图分类号: Q949.776.3

文献标志码: A

醉鱼草属 *Buddleja* Linn. 是马钱科中最大的一个属, 全世界约有 100 余种, 分布于美洲和亚洲的热带和温带地区, 该属一些种类可供药用和观赏^[1]。巴东醉鱼草 *B. albiflora* Hemsl., 又叫酒药花, 为马钱科 Loganiaceae 醉鱼草属 *Buddleja* L., 该植物的花蕾部分能止咳化痰, 具有治眼痛的功效。西北农林科技大学无公害农药研究服务中心经过初筛, 发现巴东醉鱼草 95%乙醇提取物对粘虫具有良好的拒食及毒杀作用^[2]。随后的研究发现, 巴东醉鱼草 95%乙醇提取物的不同溶剂萃取物对 3 龄小菜蛾幼虫、5 龄菜青虫幼虫均有明显的拒食和生长发育抑制作用^[3]。为了进一步探明巴东醉鱼草提取物中的杀虫活性物质, 本研究采用活性跟踪法对巴东醉鱼草 95%乙醇提取物的石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物进行了阶段性分离, 进一步明确了杀虫活性成分所在部位, 为后续的分离工作提供了有效依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料: 巴东醉鱼草 95%乙醇提取物的石油醚和乙酸乙酯萃取物分别经一级柱层析所得各馏分, 再分别取适量样品用丙酮溶解定容至 5 mg/mL(置于 4 °C 冰箱中)备用。

供试昆虫: 粘虫 *Mythimna separata* W. 3 龄幼虫、小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 3 龄幼虫均为“西北农林科技大学无公害农药研究服务中心”养虫室提供。菜青虫 *Pieris rapae* L. 自近期内未施过药的甘蓝地采回菜青虫幼虫, 经室内饲养 2~3 d 后, 挑选生理发育状态一致且健壮的 5 龄前期幼虫供试。

1.2 石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物的柱层析分离

用 95%乙醇对粉碎后的巴东醉鱼草样品进行渗漉提取, 提取液浓缩回收得到乙醇浸膏, 然后将浸膏用

① 收稿日期: 2011-01-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(青年基金 31101486); 农业部行业(农业)专项“生物源农药创制与技术集成及产业化开发”基金资助项目(K312021014); 陕西省农业攻关基金资助项目“巴东醉鱼草杀虫剂的研制及产品开发”(2010K02-09-1)。

作者简介: 张秀云(1974-), 女, 安徽青阳人, 博士, 讲师, 主要从事天然产物农药研究。

通信作者: 冯俊涛, 教授。

水捏溶分散,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇不同极性的溶剂萃取,得到相应的萃取物。

石油醚萃取物(A)的分离:石油醚萃取物(621 g)以石油醚:丙酮(1:0.10:1.8:1.5:1.3:1,各5 000 mL)为洗脱剂进行硅胶柱层析(Φ 12 cm, L 140 cm, 2.5 kg, 200~300目),通过TLC分析合并为9个馏分,分别记为A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8和A9,并分别取适量样品用丙酮溶解定容至5 mg/mL(置于4℃冰箱中)备用。

乙酸乙酯萃取物(B)的分离:乙酸乙酯萃取物(870 g)以氯仿:甲醇(1:0.50:1.20:1.15:1.10:1,各5 000 mL)为洗脱剂分2次进行硅胶柱层析(Φ 12 cm, L 140 cm, 2.5 kg, 200~300目),通过TLC分析合并为9个馏分,分别记为B1,B2,B3,B4,B5,B6,B7,B8和B9,并分别取适量样品用丙酮溶解定容至5 mg/mL(置于4℃冰箱中)备用。

1.3 生物活性测定

对粘虫和菜青虫的生物活性测定采用小叶碟添加法^[4],在直径9.0 cm的培养皿底部铺一层滤纸,并加水保湿。每培养皿内放10头试虫,试虫饥饿约4 h,每处理设3个重复。将待测样品用丙酮(分析纯)稀释成一定体积质量分数的溶液,从近期内未施过药的玉米田采回新鲜玉米叶片(菜青虫用甘蓝叶片代替玉米叶片),用打孔器打成直径1 cm的叶碟,在配好的药液内浸2~3 s,自然晾干(另设丙酮对照)。于皿内加叶碟1片,恒温($T=25\text{℃}\pm 1\text{℃}$; $RH=70\%\sim 80\%$)下饲养,待试虫取食完再加,夜晚视试虫取食情况可以多加几片,记录试虫取食的叶碟数量,并于24 h,48 h和72 h用坐标纸统计取食总量,计算拒食率,同时采用Microsoft office excel统计函数求出拒食毒力曲线及拒食中浓度(AFC₅₀)。72 h后开始用正常叶片饲养,直至化蛹、羽化,并检查试虫最终死亡情况(死亡标准以不能取食,触之不动为准),计算死亡率和校正死亡率。

$$\text{拒食率}(\%) = \frac{\text{对照组取食面积} - \text{处理组取食面积}}{\text{对照组取食面积}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡数}}{\text{供试总虫数}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理组死亡率}(\%) - \text{对照组死亡率}(\%)}{1 - \text{对照组死亡率}(\%)} \times 100 \quad (3)$$

对小菜蛾生物活性测定采用叶碟法^[5],即用直径5 cm的养虫盒,将近期内未施过药的新鲜甘蓝叶片用打孔器打制成直径为0.5 cm的叶碟,在配好的药液内浸2~3 s,自然晾干(另设丙酮对照)。于皿内加叶碟3片,恒温($T=25\text{℃}\pm 1\text{℃}$; $RH=70\%\sim 80\%$)下饲养,并于24 h和48 h检查试虫取食叶片量和中毒死亡情况(死亡标准以试虫不能取食,触之不动为准),调查结果采用叶片分级法,根据取食面积统计拒食率,并统计试虫死亡情况,依据式(2)计算死亡率。

叶片分级标准如下:

0级:叶片上无取食的痕迹; I级:叶片上有零星取食痕迹; II级:叶片上有明显取食缺刻; III级:叶片被取食面积约占1/3; IV级:叶片被取食面积约占1/2; V级:仅留下少量残渣。

$$\text{取食指数}(\%) = \frac{\sum(\text{为害级别数} \times \text{各级叶片数})}{\text{总叶片数} \times \text{最高为害级别数} \times \text{参试总虫数}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{拒食率}(\%) = \frac{\text{对照取食指数}(\%) - \text{处理取食指数}(\%)}{\text{对照取食指数}(\%)} \times 100 \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 巴东醉鱼草石油醚萃取物一级柱层析各馏分的生物活性

巴东醉鱼草石油醚萃取物经一级柱层析后,所得9个馏分对3龄粘虫幼虫的生物活性见表1。从表1可知,A7馏分对3龄粘虫幼虫的拒食活性明显比其他馏分强,其24 h,48 h和72 h的拒食率分别为58.44%,79.77%和64.69%;A5和A9在24 h对试虫不表现出拒食活性,随着处理时间的延长,显示出一定的活性,但其72 h的拒食率均不超过40%;其余各馏分在不同时间内对3龄粘虫幼虫均有一定程度的

活性,但都不如 A7 的活性强.说明石油醚萃取物中对 3 龄粘虫幼虫的活性成分主要集中在 A7 段.

石油醚萃取物各馏分 72 h 的校正死亡率差异较大,其中 A2 和 A7 两个馏分对 3 龄粘虫的校正死亡率分别达 48.25%和 37.74%;其余各馏分对 3 龄粘虫 72 h 的校正死亡率均不超过 25%.说明 A2 和 A7 馏分是石油醚萃取物中对 3 龄粘虫毒杀活性较强的部分.

表 1 石油醚萃取物一级柱层析各馏分对 3 龄粘虫幼虫的生物活性

供试样品	拒食率/%			校正死亡率/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A1	23.26 abc	65.63 b	57.16 b	0.00 c	1.15 d	13.35 cd
A2	38.22 abc	37.46 de	64.37 ab	10.00 a	39.86 a	48.25 a
A3	13.14 c	15.34 f	64.37 ab	4.53 ab	16.36 bc	13.35 cd
A4	52.38 ab	49.75 c	28.50 c	1.15 bc	13.01 bc	23.95 bc
A5	0.00 d	7.69 g	39.20 c	10.00 a	13.01 bc	20.49 cd
A6	48.49 ab	50.00 c	71.52 a	0.00 c	23.18 ab	23.54 bc
A7	58.44 a	79.77 a	64.69 ab	10.00 a	23.18 ab	37.74 ab
A8	26.80 abc	31.22 e	35.68 c	10.00 a	16.36 bc	17.24 cd
A9	0.00 d	43.74 cd	35.69 c	0.00 c	6.70 cd	9.89 d

注:同列数据后不同小写字母表示差异具有统计学意义($p < 0.05$).下同.

巴东醉鱼草石油醚萃取物经一级柱层析后,所得各馏分对 5 龄菜青虫幼虫的生物活性见表 2. 48 h 的拒食率以 A1, A7 和 A8 较强,分别为 79.85%, 59.09%和 72.73%, 24 h 的拒食率则以 A7 最佳,达到 89.03%.说明石油醚萃取物对 5 龄菜青虫幼虫拒食活性较强的馏分主要集中在 A1, A7 和 A8 部分.从表 2 还看出,石油醚各馏分对 5 龄菜青虫幼虫没有明显的致死和致畸作用.

表 2 石油醚萃取物一级柱层析各馏分对 5 龄菜青虫幼虫的生物活性

供试样品	拒食率/%		校正死亡率/%		畸形蛹数 /头
	24 h	48 h	24 h	48 h	
A1	38.10 f	79.85 a	0.00 a	0.00 c	0.00
A2	0.00 i	0.00 f	0.00 a	0.00 c	0.00
A3	48.65 e	25.85 d	0.00 a	0.00 c	2.00
A4	24.26 g	45.44 bc	0.00 a	6.67 b	0.00
A5	6.24 h	11.83 e	0.00 a	10.00 a	0.00
A6	73.82 b	48.48 bc	0.00 a	0.00 c	4.00
A7	89.03 a	59.09 b	0.00 a	0.00 c	0.00
A8	68.46 c	72.73 a	0.00 a	0.00 c	0.00
A9	28.63 g	43.06 c	0.00 a	0.00 c	0.00
A	58.54 d	45.44 bc	0.00 a	6.67 b	0.00

2.2 巴东醉鱼草乙酸乙酯萃取物一级柱层析各馏分的生物活性

乙酸乙酯萃取物经一级柱层析后,所得各馏分对 3 龄粘虫和 3 龄小菜蛾幼虫的拒食活性和胃毒活性有明显差异,其中对小菜蛾拒食活性较高的馏分有 B1 和 B2,对粘虫有较强拒食活性的成分集中在 B1, B2 和 B3 三个部分,其中对粘虫 72 h 的拒食作用强烈,拒食率均达到 100%;校正死亡率呈现出与拒食率大致相同的趋势,对粘虫的毒杀作用尤为显著,此三个馏分在 48 h 和 72 h 对粘虫的校正死亡率均为 100%,显示了强烈的毒杀活性.以上实验数据说明,乙酸乙酯萃取物中的活性成分主要集中在 B1, B2 和 B3 三个部分.

表 3 乙酸乙酯萃取物的一级柱层析各馏分对 3 龄粘虫和 3 龄小菜蛾幼虫的生物活性

供试样品	拒食率/%					校正死亡率/%				
	小菜蛾		粘虫			小菜蛾		粘虫		
	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h
B1	93.75 a	99.46 ab	94.68 a	99.07 ab	100.00 a	60.64 ab	100.00 a	95.47 ab	100.00 a	100.00 a
B2	97.33 a	99.46 a	86.13 ab	100.00 a	100.00 a	6.70 a	98.85 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
B3	72.44 b	83.86 abc	94.68 a	95.83 abc	100.00 a	4.53 b	22.46 a	77.85 b	100.00 a	100.00 a
B4	50.00 c	54.29 abc	94.68 a	95.83 abc	99.38 a	6.70 c	1.15 b	2.37 c	56.67 b	100.00 a
B5	24.23 d	57.21 abc	97.34 a	97.92 abc	99.38 a	0.00 c	1.15 cd	6.70 c	20.00 cd	81.65 b
B6	54.21 c	8.75 d	97.34 a	67.08 c	99.38 a	0.00 c	8.76 bc	0.00 c	46.50 bc	86.99 ab
B7	50.00 c	62.59 abc	92.93 a	76.43 abc	78.33 b	0.00 c	6.70 d	4.53 c	10.00 d	25.00 c
B8	20.47 d	48.56 c	97.34 a	66.67 c	76.67 b	0.00 c	0.00 cd	4.53 c	16.67 cd	22.46 c
B9	56.39 c	54.37 cd	69.55 b	61.23 cd	53.33 cd	0.00 c	0.00 d	2.37 c	10.00 d	11.61 c

3 结 论

巴东醉鱼草提取物的杀虫活性成分主要集中在 A7 和 BB 馏分中。前期的研究结果表明, 巴东醉鱼草乙醇提取物经不同溶剂萃取后, 所得各萃取段对试虫的生物活性有差异, 其中石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物的活性明显高于正丁醇萃取物和水相^[3]。在此基础上, 本研究着重对石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物进行了进一步分离, 以明确杀虫活性成分所在部位, 试验结果表明, 经过一级柱层析, 该两相萃取物中杀虫活性成分的分布有差异, 其中石油醚萃取物的杀虫活性成分主要集中在 A7 段, 在整个石油醚萃取物中, 极性处于中等偏大; 而乙酸乙酯萃取物的杀虫活性成分主要集中在 B1、B2 和 B3, 在整个乙酸乙酯萃取物中, 极性较小。这说明巴东醉鱼草中杀虫活性成分为中等极性。要明确其结构, 还需要进一步采用活性跟踪法进行分离和结构鉴定。乙酸乙酯萃取物一级柱层析的 B1、B2 和 B3 三个馏分对粘虫 72 h 的拒食率及校正死亡率均达到 100%, 显示出强烈的活性, 为了更加明确地探明其中的杀虫活性成分, 进一步的分离工作正在进行中。

巴东醉鱼草提取物中含有多种类型的次生代谢产物, 建立合理的活性物质分离方法, 是发现高活性杀虫先导化合物的有效手段。从植物提取物中探寻新的有效成分作为合成新型化学农药的模板, 一直是植物源农药研究的重点之一。巴东醉鱼草属于马钱科醉鱼草属, 该属植物富含多种类型的次生代谢产物, 如环烯醚萜苷类^[6]、黄酮^[7]、酚酸及其苷类^[8]等, 这些成分显示出了多方面的生物活性, 如大叶醉鱼草 *B. davidii* F. 对蝗虫有胃毒和触杀活性^[9]; 张海平^[10]、陶靓^[11]研究了巴东醉鱼草的化学成分, 其中含有黄酮、苷类、甾体皂苷和苯丙素等成分, 但均未开展活性研究工作。本研究以杀虫活性为基础, 进行活性成分的追踪分离, 目标明确, 分离流程更加合理, 有望从中发现具有良好杀虫活性的化合物。周刚^[12]等指出, 植物提取物中对供试昆虫有活性的化合物可能不止一种, 只是分布在不同的极性范围内, 而这种分布将有利于植物提取物中其他组分的分离和进一步的开发利用。目前, 有关巴东醉鱼草杀虫活性成分的分离和鉴定工作正在进行中。

另外, 据文献报道, 植物中含有大量的精油^[13], 有些精油具有明显的生物活性^[14~15], 有关巴东醉鱼草精油的农用生物活性也值得研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志 第一卷. 第四册. [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 98.
- [2] 张宏利, 冯俊涛, 陈安良, 等. 秦岭山区 204 种植物对粘虫的生物活性测定 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 92-94.
- [3] 张秀云, 李治伟, 冯俊涛, 等. 巴东醉鱼草提取物对几种害虫的生物活性研究 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 36(2): 192-198.

- [4] 张 兴. 川楝素制品对菜青虫生物活性的研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 1988.
- [5] 张宗柄. 杀虫剂的毒力测定 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 23—128.
- [6] YAMAMOTO A, NITTA S, MIYASE T, et al. Phenylethanoid and Lignan-iridoid Complex Glycosides from Roots of *Buddleja Davidii* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(2): 421—425.
- [7] MIYAGOSHI M, TAKEDA T, NAKAMURA T, et al. Studies on the Glycosides from *Buddleja Amreicana* L. [J]. *Japanese Journal of Pharmacognosy*, 1990, 44(3): 167—170.
- [8] DING Ning, YAHARA S, NOHARA T. Structure of Mimengosides A and B, New Triterpenoid Glycosides from *Buddlejae Flos* Produced in China [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(3): 780—782.
- [9] 李顺举, 王艳波, 刘志杰, 等. 大叶醉鱼草提取液杀蝗虫活性的研究 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1490—1491.
- [10] 张海平, 陶 靛. 巴东醉鱼草化学成分的研究(II) [J]. *中药材*, 2010, 33(6): 922—924.
- [11] 陶 靛, 黄金程, 赵艳萍, 等. 巴东醉鱼草化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(23): 3043—3046.
- [12] 周 刚, 丁 伟, 张永强. 川黄柏提取物对朱砂叶螨生物活性的研究 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 32(1): 107—110.
- [13] LIU Xiao-li, ZHAO Mou-ming, CUI Chun, et al. A Study of the Composition of Essential Oils from *Emblica (Phyllanthus emblica* L.) Fruit by Supercritical Fluid Extraction and Their Antioxidant Activity [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(5): 122—127.
- [14] 方才君, 胡仕林. 植物精油对朱砂叶螨的毒性试验 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 1997, 22(4): 470—472.
- [15] 石俊雄, 张 恒, 王晶君, 等. 腐熟粕的化学成分及对烟苗的生物效应 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(1): 100—104.

Tracing Insecticidal Ingredients from *Buddleja albiflora* Hemsl.

ZHANG Xiu-yun, LI Zhi-wei, LU De-ling,
FENG Jun-tao, ZHANG Xing

Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A&F University,

Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Yangling Shaanxi, 712100, China

Abstract: The petroleum extracts and ethyl acetate extracts of 95% ethanol extract of *Buddleja albiflora* H. were isolated by means of phytochemistry combined with insecticidal bioassay. Fraction AG from petroleum extracts, with concentration of 5 mg/mL, showed the antifeedant rate against 3rd instar of *Mythimna separata* W. of 58.44%, 79.77% and 71.52% during 24, 48 and 72 h, respectively, which were 89.03% and 72.73% against 5rd instar of *Pieris rapae* L. during 24 and 48 h. Fraction BB from ethyl acetate extracts showed the antifeedant rate against 3rd instar of *Mythimna separata* W. of 97.34%, 100% and 100% during 24, 48 and 72 h, respectively, which were 97.33% and 99.46% against 3rd instar of *Plutella xylostella* L. during 24 and 48 h. The results showed that the insecticidal ingredients of petroleum extracts were distributed in AG part, while that of ethyl acetate extracts were in BA, BB and BC parts.

Key words: *Buddleja albiflora* Hemsl; antifeedant activity; *Mythimna separata* W.; *Pieris rapae* L.; *Mythimna separata* W.