

文章编号: 1000-5471(2007)01-0107-04

川黄柏提取物对朱砂叶螨生物活性的研究^①

周 刚, 丁 伟, 张永强

西南大学 植物保护学院, 重庆 400716

摘要: 系统研究了川黄柏的石油醚(30~60)℃、乙醇、丙酮、甲醇和水等溶剂的平行提取物对朱砂叶螨的生物活性。将不同提取物配制成相应浓度 10 mg/mL, 并测定其对朱砂叶螨的触杀毒力(48 h), 结果表明: 在川黄柏不同溶剂的平行提取物中, 以丙酮和甲醇提取物对朱砂叶螨的致死率最高, 处理 48 h 校正死亡率均为 100%, 与同组其他溶剂提取物的触杀毒力存在明显差异($p < 0.05$)。毒力测定结果表明, 对朱砂叶螨毒性最强的是甲醇的平行提取物, 2.272 3 mg/mL, 其 95% 的置信限为 1.607 2~3.212 5 mg/mL; 丙酮的平行提取物效果基本与甲醇持平。

关键词: 川黄柏; 朱砂叶螨; 生物活性

中图分类号: S433.7

文献标识码: A

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 是我国分布最广、发生最为严重的一种农业害螨。螨类害虫个体小, 繁殖快, 代数多, 适应性强, 易产生抗药性, 危害十分严重, 是公认的最难防治的有害生物群落之一^[1,2]。多年来, 对螨类的控制主要依赖化学农药, 但大量使用化学农药不可避免地会产生 3 R(抗性 Resistance、残留 Residue 和害螨再猖獗 Resurgence)等问题。为了克服化学农药带来的副作用, 许多研究人员在探讨非化学措施控制该螨的效果, 这些措施包括抗性植物品种的筛选, 捕食螨的释放等。此外研究植物提取物对螨的控制效果也取得了很大进展。张永强等^[3]报道了姜黄 *Curcuma longa* 不同溶剂提取物对朱砂叶螨的生物活性; 方才君等^[4]测定了 6 种植物精油对朱砂叶螨的毒性; 贺春贵^[5]测定了 5 种中药植物对该螨的控制效果; Chiasson *et al.*^[6] 研究报道了以 3 种提取方法从洋艾 *Artemisia absinthium* 和艾菊 *Tanacetum vulgare* 中获得的植物精油对二点叶螨 *T. urticae* 的作用效果。此外国内外专家学者研究报道了印楝、瑞香狼毒等的杀螨活性, 并制成了相应的杀螨剂剂型^[7-11]。这些研究报道明确了从植物中可以获得比较理想的杀螨活性物质, 为研究开发植物性的杀螨剂奠定了一定的基础。

川黄柏是一种常用清热药, 主治湿热痢疾、黄疸、热淋及湿疹, 系芸香科黄檗属黄皮树 *Phyllodendron chinese* Schneid 的树皮, 主要含有小檗碱、药根碱黄柏酮、黄柏内脂等多种成分, 并富含粘液质。川黄柏主产四川、陕西、甘肃、湖北、广西、云南、贵州等地, 湖南、广东也有分布和栽培。对中药植物生物活性的研究已经有许多研究报道, 但有关川黄柏在农业领域对有害生物的活性还鲜有报道, 尤其是川黄柏杀螨活性的研究未见报道。为了明确该中药植物的杀螨活性, 我们就川黄柏提取物对朱砂叶螨的室内生物活性进行了研究并报告如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试螨类

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, 最初采自重庆市北碚区田间的豇豆苗上, 在人工气候室

① 收稿日期: 2006-10-07

基金项目: 西南大学青年基金资助项目。

作者简介: 周 刚(1976-), 男, 贵州六盘水人, 助教, 硕士研究生, 主要从事天然产物农药开发与农药合成研究。

内(26±1)℃、60%~80%RH 条件下用盆栽豇豆苗饲养了多年所获得的品系。

1.1.2 供试川黄柏提取物

川黄柏购自重庆市中药材市场,植物材料置于 60℃烘箱烘干,小型粉碎机粉碎,过 60 目筛。称取 250 g 的川黄柏粉末,平分为 5 份,分别用石油醚(30~60)℃,乙醇,丙酮、甲醇[均为分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司生产]和水冷浸 48 h 提取,过滤,浓缩定容得到相应的平行提取物。

顺序提取物的获得方法是称取 50 g 川黄柏粉末,先用石油醚(30~60)℃冷浸 48 h,过滤,浓缩定容获得石油醚提取物;浸渍后的残渣再以乙醇冷浸 48 h,过滤,浓缩定容获得乙醇顺序提取物;之后再用水重复上述操作,分别获得丙酮、甲醇和水的顺序提取物。

1.1.3 对照药品

姜黄素 curcumin AR 95% 购于成都市科龙化工试剂厂(批号 20060201)

1.2 实验方法与数据分析

参照 FAO 推荐的标准螨类抗药性的测定方法—玻片浸渍法^[12]并加以改进。挑在玻片双面胶带上的供试螨在温度(26±1)℃、60%~80%RH 的环境下放置 4 h,用双目解剖镜检查,剔除死亡和不活泼的个体,记载活螨数。在各提取物中加入适量吐温 80,用水稀释配制成 10 mg/mL 溶液,将玻片带螨的一端浸入药液中,5 s 后取出,迅速用吸水纸吸干螨体及其周围多余的药液。同样条件下培养 48 h,每 24 h 检查 1 次结果。用毛笔轻触螨体,以螨足不动者为死亡。试验重复 3 次。试验结果采用 SPSS 软件按几率值分析法进行线性回归,采用 Duncan's 法进行方差分析^[13]。

2 结果与分析

2.1 川黄柏顺序提取物对朱砂叶螨的触杀毒力

用 10 mg/mL 川黄柏不同溶剂顺序提取物,在实验室条件下测定对朱砂叶螨的触杀毒力,结果见表 2。

表 1 川黄柏顺序提取物在 10 mg/mL 浓度时对朱砂叶螨的室内毒力效果

Table 1 Comparison of the Toxicity Against *Tetranychus cinnabrinus* of *Phyllodendron chinese* Sequence Extracts at 10 mg/mL Concentration in Laboratory

材 料	校正死亡率/(平均值±标准误)					
	石油醚 30~60℃	乙 醇	丙 酮	甲 醇	水	
川黄柏	24 h	19.80±2.51 c	26.31±1.69 b	69.77±1.25 a	75.66±1.38 a	10.09±2.31 c
	48 h	47.02±1.42 b	35.12±4.78 c	80.32±1.35 a	85.00±0.67 a	12.90±2.16 c

注:表中数据为 3 个重复的平均值;同一列数值后面字母相同表示差异不显著($p>0.05$)。

从表 1 看出,在川黄柏不同溶剂顺序提取物中,丙酮和甲醇提取物对朱砂叶螨的致死活性较好,处理 48 h 校正死亡率分别为 80.32%和 85.00%,与同组其他溶剂的提取物间存在明显差异($p<0.05$)。

2.2 川黄柏平行提取物对朱砂叶螨的触杀毒力

用 10 mg/mL 川黄柏不同溶剂的平行提取物,在实验室条件下测定对朱砂叶螨的触杀毒力,结果见表 2。

表 2 川黄柏平行提取物在 10 mg/mL 浓度时对朱砂叶螨的室内毒力效果

Table 1 Comparison of the Toxicity Against *Tetranychus cinnabrinus* of *Phyllodendron chinese* Parallel Extracts at 10 mg/mL Concentration in Laboratory

材 料	校正死亡率/(平均值±标准误)					
	石油醚 30~60℃	乙 醇	丙 酮	甲 醇	水	
川黄柏	24 h	19.88±2.54 c	28.42±1.55 b	91.25±1.25 a	95.45±2.64 a	19.46±1.66 c
	48 h	47.42±1.45 b	40.97±4.15 b	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	23.56±1.86 c

注:表中数据为 3 个重复的平均值;同一列数值后面字母相同表示差异不显著($p>0.05$)。

从表 2 看出, 在川黄柏不同溶剂平行提取物中, 以丙酮和甲醇提取物对朱砂叶螨的致死率最高, 处理 48 h 校正死亡率均为 100%, 与同组其他溶剂的提取物间存在明显差异 ($p < 0.05$), 由此可见, 川黄柏对朱砂叶螨的毒杀活性物质主要存在于极性适中的丙酮和甲醇提取物中。

上述的结果显示, 在川黄柏不同溶剂平行提取物中, 同样是丙酮和甲醇提取物对朱砂叶螨的致死活性较好, 但与顺序提取物的杀螨效果相比, 活性有所增加。

2.3 川黄柏丙酮、甲醇平行提取物与姜黄素对朱砂叶螨的毒力回归直线

处理 48 h 后的丙酮和甲醇平行提取物 10 mg/mL 对朱砂叶螨均有明显的致死作用。为了进一步明确 2 种溶剂提取物间毒力差异的情况, 需要做进一步的毒力测定, 以致死中浓度 (LC_{50}) 来比较 2 种溶剂提取物的毒力差异, 并以姜黄素做对照, 结果如表 3 所示。

表 3 川黄柏丙酮、甲醇平行提取物与姜黄素对朱砂叶螨的毒力回归直线 (48 h)

Table 3 The Toxicity Regression Line of Acetone and Methanol Parallel Extracts from *P. chinese* against *T. cinnabrinus* (48 h) and Curcumin

川黄柏	直线回归方程	相关系数	致死中浓度 LC_{50}	95% 置信限
丙酮平行提取物	$y = 2.4532 + 0.6897x$	0.9688	4.9257	2.5564 ~ 8.7455
甲醇平行提取物	$y = 1.0713 + 1.1705x$	0.9839	2.2723	1.6072 ~ 3.2125
姜黄素(对照)	$y = 2.7238 + 0.6653x$	0.9846	2.6377	1.5098 ~ 3.7546

从表 3 看出, 对朱砂叶螨毒力最强的是甲醇提取物, 其 LC_{50} 是 2.2723 mg/mL, 其 95% 的置信限为 1.6072 ~ 3.2125 mg/mL。与姜黄素对朱砂叶螨成螨的效果基本持平; 但丙酮平行提取物的效果略低于甲醇平行提取物, 其 LC_{50} 是 4.9257 mg/mL, 其 95% 的置信限为 2.5564 ~ 8.7455 mg/mL, 因而可以确定甲醇为川黄柏杀螨活性成分的最佳提取溶剂, 但考虑到其毒性问题, 在试验过程中须谨慎处理。

3 讨 论

(1) 川黄柏为常用中药, 以干树皮入药, 其主要成分是小檗碱和药根碱, 而早期前苏联和日本对川黄柏叶成分的研究中发现, 黄柏叶中还同时含有少量的黄柏甙 (Phellamurin)、脱氢黄柏甙 (Amurensin)、金丝桃甙 (Hyperoside) 等黄酮类化合物, 其中黄柏甙具有一定的抗癌活性, 金丝桃甙则有降低胆固醇、抗炎镇咳的作用。小檗碱作为黄柏抗菌有效成分, 其药理作用与黄连大体相似, 但含量较黄连低。体外试验川黄柏水煎剂或醇浸剂在体外对金黄色葡萄球菌等多种细菌均有抑制作用。川黄柏的乙醚浸提物对新型隐球菌和红色发癣菌等真菌具有较强的抑菌作用。此外川黄柏对于乙型肝炎表面抗原具有明显的选择性抑制作用。但有关川黄柏杀螨效果的研究未见报道, 本文研究了川黄柏的不同溶剂提取物对朱砂叶螨的毒杀作用, 结果证实中药植物川黄柏的甲醇和丙酮提取物有明显的杀螨活性, 这为植物源杀螨剂的开发又引入了新的成员, 但对于其杀螨机理和杀螨有效成分的确定等将有待进一步的研究。

(2) 据郭书好等^[14]的报道, 川黄柏的石油醚提取物, 以气相色谱-质谱联用技术测定其化学组成, 共分离出 40 个组分, 鉴定了 10 个化合物, 其主要成分为挥发油类物质柠檬烯。本试验中, 石油醚提取物对朱砂叶螨几乎没有毒杀活性, 说明了川黄柏中柠檬烯不是主要的杀螨活性成分。

(3) 川黄柏作为植物源杀螨药物的开发, 可具有低毒, 高效, 无残留, 不易产生抗性等优点, 且川黄柏种植广泛, 作为植物源农药的药用开发具有很大的潜力和资源优势。

(4) 对川黄柏不同溶剂提取物的生物活性测定结果表明, 川黄柏杀螨活性物质主要存在于丙酮和甲醇的极性间, 并以甲醇和丙酮的平行提取物效果较为显著, 但从表 2 还可以看出, 在丙酮和甲醇的极性间外的溶剂提取物仍然具有一定的杀螨活性, 这表明川黄柏体内含有对朱砂叶螨有生物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川黄柏其他组分的分离提取和进一步的研究开发与综合利用。

参考文献:

- [1] 张 弘, 孟 铃. 农用杀螨剂应用、开发现状及展望[J]. 农药, 2003, 42(3): 14—17.
- [2] 何 林, 杨 羽, 符建章, 等. 朱砂叶螨阿维菌素抗性品系选育及适合度研究[J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 395—400.
- [3] 张永强, 丁 伟, 赵志模, 等. 姜黄对朱砂叶螨的生物活性[J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 390—394.
- [4] 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.
- [5] 贺春贵. 几种植物杀虫剂的初步研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1996, (3): 233—235.
- [6] Chiasson H, Bélanger A, Bostanlan N, *et al.* Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction[J]. Journal of Economic Entomology, 2001, 94(1): 167—171.
- [7] Shi G L, Liu S Q, Cao H, *et al.* Acaricidal Activities of Extracts of *Stellera chamaejasme* Against *Tetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2004, 97(6): 1 912—1 916.
- [8] Sundaram K M S, Sloane L. Effects of pure and formulated azadirachtin, a neem-based biopesticide, on the phytophagous spider mite, *Tetranychus urticae* Koch[J]. Journal of Environmental Science Health B, 1995, 30: 801—814.
- [9] Lawrence A D, Williams, Mansingh A. The insecticidal and acaricidal actions of compounds from *Azadirachta indica* (A. Juss) and their use in tropical pest management[J]. Integrated Pest Management Reviews, 1996, (1): 133—145.
- [10] Hiisaar K, Luik A, Kuusik A, *et al.* The effect of NeemAzal T/S on the mortality of mite *Tetranychus urticae* Koch and some insects-*Aphis gossypii* Glov. and Thrips tabaci Lind. Practice Oriented Results on Use and Productions of Neemingredients and Pheromones[J]. Proceeding 8th Workshop, 2000: 41—45.
- [11] Sundaram K M S, Campbell R, Sloane L, *et al.* Uptake, translocation, persistence and fate of azadirachtin in aspen plants (*Populus tremuloides* Michx.) and its effect on pestiferous two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) [J]. Crop Protection, 1995, 14(5): 415—442.
- [12] FAO. Plant production and protection 21, recommended methods for measurement of resistance to pesticides[C]. Rome, Italy, 1980: 49—54.
- [13] Finney D J. Probit Analysis[M]. London: Cambridge University Press, 1987: 230—269.
- [14] 郭书好, 周明辉, 李素梅. 川黄柏果挥发油的化学成分研究[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 1998, 19(3): 61—63.

Studies on Acaricidal Bioactivities of *Phyllodendron chinese* Schneid

ZHOU Gang, DING Wei, ZHANG Yong-qiang

School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Petroleum ether (30~60°C), ethanol, acetone, methanol and water extracts of *Phyllodendron chinese* at a concentration of 10 mg/mL were used to determine their acaricidal bioactivities against *Tetranychus cinnabarinus*. The results showed that of the extracts studied the acetone and methanol parallel extracts resulted in significantly higher mortality of the pest than the other extracts ($p < 0.05$) and after 48 hours' treatment, all the *T. cinnabarinus* adults were killed. In a further study, methanol parallel extracts was shown to be most toxic to *T. cinnabarinus*, with a LC_{50} of 2.272 3 mg/mL and a 95% confidential limit of LC_{50} of 1.607 2~3.212 5 mg/mL. The effects of acetone parallel extracts were similar to those of methanol parallel extracts.

Key words: *Phyllodendron chinese* (Schneid); *Tetranychus cinnabarinus*; biological activity