

假蒟提取物对斜纹夜蛾的触杀活性及其有效成分的初步分离

刘红芳¹, 符悦冠²

(1. 长江师范学院 生命科学与技术学院, 重庆 408100;

2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 为研究假蒟的杀虫生物活性, 对假蒟根、茎、叶用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、乙醇和甲醇 5 种溶剂依次进行索氏提取, 测定各提取物对斜纹夜蛾幼虫的触杀活性, 并对其有效成分进行了初步分离。结果表明, 不同部位不同溶剂提取物对斜纹夜蛾幼虫的触杀活性不同, 假蒟的主要活性部位为根, 其次为茎, 叶活性最低; 5 种有机溶剂提取物中, 以石油醚提取物的活性最突出, 其他溶剂提取物对试虫基本无生物活性。虫龄越低提取物的杀虫活性越好, 假蒟根石油醚提取物对斜纹夜蛾三至六龄幼虫的致死中浓度(LC₅₀)分别为 0.204 9%、0.370 8%、0.853 6%、1.233 1%; 假蒟茎石油醚提取物对斜纹夜蛾三至六龄幼虫的 LC₅₀ 分别为 0.239 2%、0.397 8%、0.948 5%、1.486 7%。通过对假蒟根石油醚洗提物进行柱层析和 TLC 分离, 得到 16 个组分, 主要活性组分为 A、B、C、D, 在 1 mg/mL 质量浓度下, 其对斜纹夜蛾四龄幼虫 24 h 校正死亡率均达到 100%; 其次是组分 E 和组分 F, 24 h 校正死亡率分别为 53.33% 和 36.67%; 其他组分基本无生物活性。总之, 假蒟根石油醚提取物对斜纹夜蛾的触杀活性最高, 且虫龄越低杀虫效果越好。

关键词: 假蒟; 斜纹夜蛾; 提取物; 触杀活性; 有效成分

中图分类号: S433 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)08-0077-05

Insecticidal Activity of Extracts from *Piper sarmentosum* on *Spodoptera litura* and Preliminary Purification of Insecticidal Ingredients

LIU Hong-fang¹, FU Yue-guan²

(1. Life Science and Technology Institute, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China;

2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

Abstract: In order to study insecticidal activity of *Piper sarmentosum*, the bioactivities of the extracts from the roots, stems and leaves of *Piper sarmentosum* respectively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol by Soxhlet method were tested using *Spodoptera litura* larvae. The results showed that the bioactivities of them were different with different parts of plant samples, the roots of *Piper sarmentosum* was the maximal, stems secondly, and leaves lastly. Bioactivity of the extract with petroleum ether was the highest, and the others were useless. The results of bioassay test showed that, the contact toxicities of the crude extracts against *Spodoptera litura* increased with the decrease of ages of the insects. The LC₅₀ of the

收稿日期: 2014-01-18

基金项目: 海南省重点科技计划项目(01203)

作者简介: 刘红芳(1978-), 女, 甘肃民勤人, 讲师, 硕士, 主要从事植物病虫害防治研究。E-mail: lhongfang@163.com

extracts with petroleum ether from roots and stems of *Piper sarmentosum* against *Spodoptera litura* 3th, 4th, 5th, 6th larvae were 0.204 9%, 0.370 8%, 0.853 6%, 1.233 1% and 0.239 2%, 0.397 8%, 0.948 5%, 1.486 7% respectively 24 h after treatment. Separation of the ingredients extracted in petroleum ether fraction was performed through silica gel column followed by TLC analysis, and 16 ingredient groups were obtained. The bioactivity tests showed that the first(A), the second(B), the third(C) and the fourth(D) ingredient groups had the strongest contact toxicities on the 4th larvae of *Spodoptera litura*, with a mortality of 100% respectively at the dose of 1 mg/mL 24 h after treatment. The fifth(E) and the sixth(F) ingredient groups also had higher contact toxicities, with a mortality of 53.33% and 36.67% respectively, and the others were useless. Petroleum ether extracts from roots of *Piper sarmentosum* showed the highest activity on *Spodoptera litura* larvae, and the earlier the pest stage, the higher the bioactivity.

Key words: *Piper sarmentosum*; *Spodoptera litura*; extracts; insecticidal activity; effective component

斜纹夜蛾(*Spodoptera litura* Fabricius)属鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae),其食性广泛,已知寄主多达 290 种以上,是一种世界性农业害虫^[1]。长期以来,对斜纹夜蛾的防治主要依赖于化学杀虫剂,然而化学农药的大量使用不仅使该害虫对许多化学农药产生不同程度的抗药性,而且对生态环境造成了破坏^[2-3]。随着现代农业的快速发展和人们对产品质量要求的提高,人们更寄希望于植物源等天然药物的研究开发,更加重视其对害虫具有毒杀、拒食和驱避等作用的活性成分作用机制、结构和生物活性物质构效关系的研究,重视与环境相融的高效低毒商品制剂的开发研制。假蒟是一种常见的祛风湿类药用植物,更是中华跌打丸的重要原料之一,被 2010 版《中华人民共和国药典》附录收载^[4-5]。近年来,人们对其生药学及其挥发油进行了研究报道^[6-7],其在杀虫抑菌方面亦表现出较高的生物活性^[8-11]。为了进一步明确假蒟的杀虫生物活性,研究了假蒟不同溶剂提取物对斜纹夜蛾的触杀活性,并对假蒟有效成分进行了初步分离,为其在有害生物综合治理中的深入开发和利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 自中国热带农业科学院环境与植物保护研究所试验场的橡胶园内采集新鲜假蒟。

1.1.2 供试昆虫 从中国热带农业科学院环境与植物保护研究所附近的甘蓝菜地采回斜纹夜蛾幼虫,在室内饲养至成虫,用 10%的蜜糖水为成虫补充营养让其产卵,收集卵块,孵化后用新鲜蓖麻叶于

室温下饲养,选取发育整齐一致的 F₁ 代幼虫供试。

1.2 方法

1.2.1 假蒟提取物的制备 采用索氏(Soxhlet)抽提法^[12]。将采集的假蒟清洗干净,根、茎、叶分开,于室内自然阴干,用植物粉碎研磨机粉碎制成干粉(550 μm);称取适量干粉,装入高 10 cm、直径 5 cm 的滤纸圆筒内,上下均封口后用石油醚(沸程 60~90 ℃)、氯仿、乙酸乙酯、乙醇、甲醇(在 500 mL 的平底烧瓶中加入提取溶剂 250 mL)等系列溶剂进行分步提取,即样品先用极性低的溶剂提取,其残渣再用极性相对较高的溶剂继续提取。提取液用 4 层纱布过滤后于旋转蒸发器(55 ℃)中浓缩成膏状物,贴上标签保存在冰箱中备用。

1.2.2 假蒟提取物溶液配制 将假蒟提取物先用少量丙酮和 1 滴吐温 80 溶解,然后用水稀释定容至所需浓度(以提取物质量分数表示),各分成若干等份,分装于指型管(直径 2.5 cm、高 10 cm)中,每等份约 20 mL 左右。

1.2.3 假蒟提取物对斜纹夜蛾幼虫毒杀作用测定

选择发育整齐一致的斜纹夜蛾四龄幼虫,用供试样品 5% 的溶液浸泡 3~5 s,将试虫拿出用滤纸吸干多余药液后放入养虫盒内饲养,用清水加少量丙酮和 1 滴吐温 80 作对照(CK)。每处理 3 个重复,每重复 10 头试虫。置于温度为(24±1)℃、相对湿度为 80%±10%、光周期为(L:D)=12:12 的人工气候箱中,24 h 后检查试虫的存活和死亡头数,根据下面公式计算 24 h 死亡率和校正死亡率。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡虫数}}{\text{供试总虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{对照生存率} - \text{处理生存率}}{\text{对照生存率}} \times 100\%。$$

1.2.4 假蒟提取物对斜纹夜蛾幼虫致死中浓度的测定 选择触杀活性较高的溶剂提取物进行致死中浓度(LC₅₀)测定。方法:采用等差或等比稀释法将提取物稀释成 5 个浓度,分别求出提取物不同浓度的校正死亡率,再将死亡率转化成概率值,浓度转化成对数值,利用 SAS 统计软件计算回归方程、相关系数(*r*)、LC₅₀ 及其 95% 置信区间。

1.2.5 假蒟根提取物有效成分的初步分离

1.2.5.1 提取物的初步洗提分离 称取假蒟根乙醇提取浸膏 122 g,加入等量 75 ~ 48 μm 柱层析硅胶拌成粉状物,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和无水乙醇(各 500 mL)洗脱,洗脱液分别浓缩后得到石油醚、氯仿、乙酸乙酯和乙醇洗提物,称质量计算洗提物的洗提率。并将洗提物配制成 1% 溶液对斜纹夜蛾进行触杀活性测定。

$$\text{洗提率} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$$

其中:*M*₁ 表示样品洗提前质量,*M*₂ 表示样品洗后质量。

1.2.5.2 洗提物柱层析分离 根据 1.2.5.1 生物活性测定结果,选取活性较高的石油醚洗提物进行硅胶柱层析。

制样:称取适量假蒟根石油醚洗提物,用少量石油醚稀释;

装柱:采用湿法上柱;

上样:将假蒟根石油醚洗提物用少量洗脱液溶解,用移液管将样品稀释液沿着柱内壁小心加入柱内,每个层析柱加样品 5 g;

洗脱:采用系列极性洗脱剂(*V*_{石油醚}:*V*_{氯仿} = 5 : 1、3 : 1、1 : 1、1 : 3、1 : 5)梯度洗脱;

洗脱液的收集:10 mL/管分别收集,薄层色谱(TLC)检测(层析液:*V*_{石油醚} : *V*_{氯仿} = 4 : 1),合并比移值(*R*_f 值)相同的洗脱液供下一步试验;

生测:以斜纹夜蛾四龄幼虫为试虫,确定各组分的生物活性。

2 结果与分析

2.1 假蒟提取物对斜纹夜蛾幼虫触杀活性测定结果

从表 1 可以看出,假蒟根、茎石油醚提取物对斜纹夜蛾四龄幼虫具有很高的触杀活性,在使用质量分数为 5% 时,其致死活性均达到了 100%;

假蒟叶石油醚提取物对斜纹夜蛾触杀活性较低,质量分数为 5% 时,致死活性只有 30%;假蒟不同部位其他溶剂提取物对斜纹夜蛾四龄幼虫基本无触杀活性。

表 1 假蒟系列溶剂提取物对斜纹夜蛾幼虫的触杀活性

| 材料 | 供试样品 | 供试虫数/头 | 死亡虫数/头 | 死亡率/% | 校正死亡率/% |
|-----|---------|--------|--------|-------|---------|
| 假蒟根 | 石油醚提取物 | 30 | 30 | 100 | 100 |
| | 氯仿提取物 | 30 | 3 | 10 | 10 |
| | 乙酸乙酯提取物 | 30 | 1 | 3.33 | 3.33 |
| | 乙醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 甲醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 假蒟茎 | 石油醚提取物 | 30 | 30 | 100 | 100 |
| | 氯仿提取物 | 30 | 2 | 6.66 | 6.66 |
| | 乙酸乙酯提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 乙醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 甲醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| 假蒟叶 | 石油醚提取物 | 30 | 9 | 30 | 30 |
| | 氯仿提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 乙酸乙酯提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 乙醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | 甲醇提取物 | 30 | 0 | 0 | 0 |
| | CK | 30 | 0 | 0 | |

2.2 假蒟提取物对斜纹夜蛾各龄期幼虫的致死中浓度

假蒟根和茎石油醚提取物不同质量分数对斜纹夜蛾各龄期幼虫的触杀活性测定结果见表 2,根据表 2 得出假蒟根和茎石油醚提取物对斜纹夜蛾各龄幼虫的回归方程、LC₅₀,结果见表 3。从表 3 可以看出,

表 2 假蒟提取物对斜纹夜蛾不同龄期幼虫的触杀活性 %

| 幼虫龄期 | 假蒟根石油醚提取物 | | 假蒟茎石油醚提取物 | |
|------|-----------|-------|-----------|-------|
| | 质量分数 | 校正死亡率 | 质量分数 | 校正死亡率 |
| 三龄 | 0.30 | 80.00 | 0.35 | 86.67 |
| | 0.25 | 60.00 | 0.30 | 73.33 |
| | 0.20 | 40.00 | 0.25 | 46.67 |
| | 0.15 | 23.33 | 0.20 | 30.00 |
| | 0.10 | 13.33 | 0.15 | 13.33 |
| 四龄 | 0.50 | 86.67 | 2.00 | 93.33 |
| | 0.45 | 83.33 | 1.00 | 83.33 |
| | 0.40 | 46.67 | 0.50 | 46.67 |
| | 0.35 | 40.00 | 0.25 | 30.00 |
| | 0.30 | 30.00 | 0.125 | 20.00 |
| 五龄 | 4.00 | 93.33 | 4.00 | 86.67 |
| | 2.00 | 86.67 | 2.00 | 76.67 |
| | 1.00 | 46.67 | 1.00 | 46.67 |
| | 0.50 | 26.67 | 0.50 | 33.33 |
| | 0.25 | 13.33 | 0.25 | 13.33 |
| 六龄 | 5.00 | 86.67 | 5.00 | 80.00 |
| | 2.50 | 80.00 | 2.50 | 66.67 |
| | 1.25 | 46.67 | 1.25 | 46.67 |
| | 0.63 | 23.33 | 0.63 | 23.33 |
| | 0.30 | 13.33 | 0.30 | 13.33 |

假蒟根和茎石油醚提取物对斜纹夜蛾各龄幼虫均有触杀活性,尤其对三、四龄幼虫效果较好,对五、六龄幼虫的触杀效果明显降低。假蒟根石油醚提取物对斜纹夜蛾三至六龄幼虫的 LC_{50} 分别为 0.204 9%、0.370 8%、0.853 6%、1.233 1%;假蒟茎石油醚提

取物对斜纹夜蛾不同龄期幼虫的 LC_{50} 分别为 0.239 2%、0.397 8%、0.948 5%、1.486 7%。幼虫龄期越高,其致死中浓度越高,相对来说,假蒟根石油醚提取物对斜纹夜蛾不同龄期幼虫的致死中浓度比假蒟茎石油醚提取物的致死中浓度低。

表 3 假蒟提取物对斜纹夜蛾各龄期幼虫的毒力测定结果

| 供试样品 | 幼虫龄期 | 回归方程 | r | $LC_{50}/\%$ | 95%置信区间/% |
|-----------|------|-------------------------|---------|--------------|-----------------|
| 假蒟根石油醚提取物 | 三龄 | $y=4.035\ 0x-4.326\ 7$ | 0.980 0 | 0.204 9 | 0.180 0~0.233 0 |
| | 四龄 | $y=7.544\ 6x-14.384\ 0$ | 0.954 9 | 0.370 8 | 0.345 9~0.397 5 |
| | 五龄 | $y=2.311\ 2x+0.536\ 5$ | 0.984 9 | 0.853 6 | 0.670 7~1.086 3 |
| | 六龄 | $y=1.973\ 8x+0.872\ 7$ | 0.985 6 | 1.233 1 | 0.944 5~1.610 0 |
| 假蒟茎石油醚提取物 | 三龄 | $y=6.026\ 6x-9.335\ 9$ | 0.988 9 | 0.239 2 | 0.219 6~0.260 5 |
| | 四龄 | $y=2.052\ 0x+1.717\ 4$ | 0.980 2 | 0.397 8 | 0.304 8~0.519 3 |
| | 五龄 | $y=1.860\ 9x+1.321\ 0$ | 0.993 2 | 0.948 5 | 0.718 7~1.251 8 |
| | 六龄 | $y=1.663\ 1x+1.387\ 5$ | 0.996 2 | 1.486 7 | 1.090 1~2.027 6 |

2.3 假蒟根不同溶剂洗提物对斜纹夜蛾触杀活性测定结果

利用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、乙醇对假蒟根乙醇提取物依次进行分步洗提,分别得到各溶剂的洗提物,其对斜纹夜蛾触杀活性测定结果见表 4。以石油醚的洗提率最高,为 24.75%,其次为乙酸乙酯、乙醇,洗提率分别为 11.72%和 7.61%,氯仿的洗提率最低,只有 3.99%。对洗提物进行生物活性跟踪测试表明,石油醚洗提物对斜纹夜蛾四龄幼虫的生物活性最高,其质量分数为 1%时的触杀活性达 100%。其他系列溶剂洗提物对斜纹夜蛾基本无活性,说明假蒟对斜纹夜蛾的活性成分易溶于石油醚,用石油醚洗提基本将活性物质洗提完全。所以石油醚洗提物初步被定为进一步研究的基础材料。

表 4 假蒟根不同溶剂洗提物对斜纹夜蛾的触杀活性 %

| 溶剂 | 洗提率 | 死亡率 | 校正死亡率 |
|------|-------|------|-------|
| 石油醚 | 24.75 | 100 | 100 |
| 氯仿 | 3.99 | 0 | 0 |
| 乙酸乙酯 | 11.72 | 3.33 | 3.33 |
| 乙醇 | 7.61 | 0 | 0 |

为了获得假蒟根中具有杀虫活性的单体化合物,在对洗提物活性追踪的基础上,以石油醚-氯仿为洗脱溶剂对假蒟石油醚洗提物进行柱层析分离,同时对所分离组分进行生物活性追踪。第 1~6 管为石油醚-氯仿(5:1)洗脱物,第 7~12 管为石油醚-氯仿(3:1)洗脱物,第 13~18 管为石油醚-氯仿(1:1)洗脱物,第 19~24 管为石油醚-氯仿(1:3)洗脱物,第 25~30 管为石油醚-氯仿(1:5)洗脱物。经 TLC 检测将相同组分进行合并:1-2 合并为组分 A,3 组

分为组分 B,4 组分为组分 C,5-6 合并为组分 D,7-11 合并为组分 E,12-17 合并为组分 F,18 组分为组分 G,19 组分为组分 H,20 组分为组分 I,21 组分为组分 J,22 组分为组分 K,23 组分为组分 L,24 组分为组分 M,25 组分为组分 N,26 组分为组分 O,27-30 合并为组分 P。将合并后各组分分别配制成 1 mg/mL 溶液,采用浸渍法,以斜纹夜蛾四龄幼虫为试虫进行生物活性测定,其结果如表 5 所示。从表 5 可以看到,在 16 个组分中,假蒟根石油醚洗提物的主要活性组分为 A、B、C、D,其对斜纹夜蛾四龄幼虫 24 h 校正死亡率均达到 100%;其次是组分 E 和组分 F,24 h 校正死亡率分别为 53.33%和 36.67%;其他组分基本无生物活性。

表 5 假蒟提取物各组分对斜纹夜蛾的触杀活性 %

| 组分 | 死亡率 | 校正死亡率 |
|----------|--------------|-------|
| A(1-2) | 100a | 100 |
| B(3) | 100a | 100 |
| C(4) | 100a | 100 |
| D(5-6) | 100a | 100 |
| E(7-11) | 53.33±11.11b | 53.33 |
| F(12-17) | 36.67±4.44b | 36.67 |
| G(18) | 0c | 0 |
| H(19) | 6.67±8.89c | 6.67 |
| I(20) | 3.33±4.44c | 3.33 |
| J(21) | 0c | 0 |
| K(22) | 3.33±4.44c | 3.33 |
| L(23) | 0c | 0 |
| M(24) | 3.33±4.44c | 3.33 |
| N(25) | 0c | 0 |
| O(26) | 0c | 0 |
| P(27-30) | 0c | 0 |
| CK | 0c | 0 |

注:同列不同小写英文字母表示差异达 0.05 显著水平,数据方差分析前进行反正弦平方根转换。

3 结论与讨论

假蒟根和茎石油醚提取物对斜纹夜蛾幼虫具有良好的触杀活性,在质量分数为5%时,四龄幼虫经处理后开始剧烈抽搐,无法爬行,几秒钟即可死亡,内肛腺部破裂,并有浓状物溢出,中毒症状非常明显。但低质量分数处理时,若试虫2 h内不死亡,基本都可以复苏,且在继续饲养过程中一般能正常化蛹。幼虫龄期越低,假蒟石油醚提取物的毒力越强,随着幼虫龄期的增长其毒力明显降低。相对来说,假蒟根石油醚提取物对斜纹夜蛾不同龄期幼虫的致死中浓度比假蒟茎石油醚提取物的致死中浓度低。同一种植物杀虫剂通常具有毒杀、拒食、抑制生长发育等多种生物活性,本研究只测定了假蒟提取物对斜纹夜蛾的触杀活性,其他作用方式还有待进一步研究。单就假蒟石油醚提取物对斜纹夜蛾的触杀活性来看,这是一种值得深入研究的杀虫植物。

目前植物源杀虫剂的研究由以往的直接利用发展为寻找新式结构,在确定活性成分和作用机制的基础上,研究高活性化合物的结构与活性之间的关系,并以构效关系为基础,反复修饰先导化合物的结构,最终实现经济、高效的仿生合成。本研究分离得到16个组分,发现4个高活性组分,但尚未确定其纯度以及化学结构,且其对斜纹夜蛾的作用机制、生物活性物质的构效关系等尚不明确,均需要更进一步研究,为假蒟资源的有效开发利用创造条件。

参考文献:

[1] 秦厚国,汪笃栋,丁建,等.斜纹夜蛾寄主植物名录[J].江西农业学报,2006,18(5):51-58.

- [2] Saleem M A,Ahmad M,Ahmad M,*et al.* Resistance to selected organochlorin, organophosphate, carbamate and pyrethroid,in *Spodoptera litura* (Lepidopter;Noctuidae) from Pakistan[J]. Journal of Economic Entomology,2008,101(5):1667-1675.
- [3] Ahmad M,Sayyed A H,Saleem M A,*et al.* Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera;Noctuidae) from Pakistan[J]. Crop Protection,2008,27(10):1367-1372.
- [4] 洗寒梅,邓家刚.广西临床常见中草药[M].南宁:广西科学技术出版社,2007:107-108.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010.
- [6] 蔡毅,姜建萍,苏建群,等.假蒟的生药学鉴别[J].中国中药杂志,2006,5(31):434-436.
- [7] 蔡毅,董栋,么春艳,等. GC-MS 分析广西产4种栽培胡椒属植物叶中的挥发油成分[J]. 华西药学杂志,2010,25(6):641-644.
- [8] 刘红芳,符悦冠,王祝年.50种热带地区植物对斜纹夜蛾的拒食活性[J].华东昆虫学报,2005,14(1):17-20.
- [9] 覃伟权,余凤玉,黄山春,等.植物乙醇提取物对椰心叶甲生物活性的影响[J].热带作物学报,2008,28(4):84-88.
- [10] 张方平,刘红芳,罗永强,等.25种热带植物乙醇提取物对比哈小爪螨驱避作用[J].植物保护,2006,32(4):57-60.
- [11] 孙丹,刘业平,张世瑞.假和草胡椒提取物对植物病原菌的抑制作用初探[J].广东农业科学,2008(8):95-96.
- [12] 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,2001,16(4):55-56.