

水蓼杀虫活性成分的提取与活性

曾维爱^{1,2,3}, 谭济才^{1*}, 张春艳¹, 谭琳¹, 陈建芝¹, 李先文¹, 李密¹

(1. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128;

2. 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; 3. 湖南农业大学食品科技学院, 长沙 410128)

摘要 采用回流提取、萃取等方法, 以菜青虫 5 龄幼虫为试虫, 经生物活性测定表明, 水蓼 95% 乙醇粗提物的不同溶剂萃取物对菜青虫具有很强的拒食活性和一定的触杀作用。其中, 乙醚萃取物的拒食活性和触杀作用最强。

关键词 水蓼; 提取物; 菜青虫; 生物活性

中图分类号 S 482.39

Extraction and separation of the active ingredients from *Polygonum hydropiper*

Zeng Weiai^{1,2,3}, Tan Jicai¹, Zhang Chunyan¹, Tan Lin¹, Chen Jianzhi¹, Li Xianwen¹, Li Mi¹

(1. College of Bio-safe Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract Two extraction methods and four solvents were selected to obtain extracts from the whole plant of *Polygonum hydropiper* L. by reflux extraction. The bioactivity of the extracts against the 5th instar larvae of *Pieris rapae* L. was investigated. The results showed that the extracted by different solvents had high antifeeding effects and contact toxicity against *Pieris rapae* L. In these extracts, the ether extract of PHEE had the strongest biological activity.

Key words *Polygonum hydropiper* L.; extract; *Pieris rapae* L.; bioactivity.

水蓼 (*Polygonum hydropiper* L.) 属蓼科 (Polygonaceae) 蓼属 (*Polygonum* L.) 的一年生草本

收稿日期: 2006-04-10

基金项目: 湖南省“十五”重大科技攻关项目 (05NK1004)

致谢 水蓼经湖南农业大学周朴华教授鉴定, 菜青虫经湖南农业大学谭济才教授鉴定, 水蓼有效活性成分的提取分离工作在湖南农业大学天然产物中心完成, 袁哲明博士提供养虫室, 在此一并致谢。

* 通讯作者 Tel: 13319582998; E-mail: tanjicai@163.com

植物,在我国大部分地区都有分布^[1],具有杀虫、拒食、驱避等生物活性。菜青虫(*Pieris rapae* L.)是十字花科植物的主要害虫。菜青虫啃食绿色蔬菜菜叶不仅造成缺口和虫粪污染,还传播大白菜软腐病等病菌,高发期甚至可将蔬菜全部吃光,仅留叶柄,严重影响蔬菜质量^[2]。经笔者试验证明水蓼的95%乙醇提取物对菜青虫有较强的生物活性,如能将其开发为一种新型的植物性杀虫剂,对充分利用该种植物资源具有重要意义。为此,作者对其中的活性成分进行提取和初步分离,有利于将之开发为一种新型的植物性杀虫剂,充分利用该植物资源为农业生产服务,同时为杀虫剂的仿生合成提供结构模板。

1 材料和方法

1.1 供试材料及昆虫

水蓼(*Polygonum hydropiper* L.),采自湖南农业大学浏阳河边,采集全株,洗净,晾干,粉碎,过60目筛,密封保存备用。菜青虫(*Pieris rapae* L.),从未施药的甘蓝叶上采集低龄幼虫,室内饲养后挑选整齐一致的5龄幼虫供试。室内饲养条件: $T=(28\pm1)^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}=(80\pm5)\%$, $\text{L}/\text{D}=12\text{ h}/12\text{ h}$ 。

1.2 提取分离方法

1.2.1 水蓼乙醇提取物的制备

采用回流提取法:准确称取390.30 g水蓼粉碎物3份,装于3 000 mL圆底烧瓶中,分别以95%乙醇、50%乙醇、水为溶剂,回流提取1.5 h,料液比1:6,水浴温度50℃,提取3次。合并3次提取液,过滤,离心(5 000 r/min,10 min),旋转蒸发仪浓缩,得浓缩液,冷冻干燥24 h,得不同溶剂的粗提物,备用。其中,水蓼95%乙醇粗提物简称为PHEE。

1.2.2 活性成分的初步分离

采用液-液分配法(萃取法):准确称取PHEE 41.9119 g,加6倍量蒸馏水250 mL,超声波助溶,装入分液漏斗中,分别用石油醚、氯仿、乙醚、乙酸乙酯各萃取3次(125 mL/次),单独合并各溶剂的萃取液,其中,不溶于水和上述有机溶剂的萃取液即乳化层单独作为一种萃取液,所有萃取液经旋转蒸发仪浓缩,得浓缩液,冷冻干燥24 h,得PHEE萃取物,备用,并计算萃取率。

1.3 试验方法

将以上获得的萃取物以丙酮为溶剂配制成 $1\times10^4\text{ mg/kg}$ 溶液备用。

1.3.1 拒食活性的测定(非选择性试验)

采用张兴等人的方法^[3],溶液浓度为 $2.5\times10^3\text{ mg/kg}$,从未施过药的甘蓝田采回新鲜甘蓝叶,用打孔器打成直径1.5 cm的圆形叶碟,浸入药液3 s后取出,晾干后放入垫有保湿滤纸的培养皿($d=7\text{ cm}$)中,CK用丙酮处理,每皿接入1头饥饿4 h的5龄幼虫,每10头为1组,重复3次,取食24 h和48 h后,测定剩余叶面积,计算拒食率。

作者利用扫描仪及Photoshop软件测量叶面积,经多次试验比较,比传统的利用坐标纸法或LI-3000型叶面积仪测定叶面积要方便、精确。其工作原理是,利用扫描仪扫描叶碟,用Photoshop软件测量取食前后各叶碟的像素,根据像素可方便准确的计算出剩余叶面积。

取食面积 = 叶碟面积 $\times (1 - \frac{\text{取食后叶碟像素}}{\text{取食前叶碟像素}})$;

非选择性拒食率 = $[(\text{CK取食面积} - \text{处理取食面积})/\text{CK取食面积}] \times 100\%$ 。

1.3.2 触杀作用的测定(点滴法)

参照慕立义的方法^[4],测定对菜粉蝶5龄幼虫的触杀作用。将供试样品用丙酮稀释,溶液浓度为 $2.5\times10^3\text{ mg/kg}$,用微量点滴仪将稀释液点滴试虫的前胸背板,对照组点滴丙酮。每头点滴2 μL ,每处理3个重复,每重复10头试虫。处理后的幼虫置于垫有吸水纸的培养皿中用新鲜甘蓝叶片饲喂,连续观察3 d,计算死亡率和校正死亡率。

死亡率 = $\frac{\text{死亡数量}}{\text{供试虫总数量}} \times 100\%$;

校正死亡率 = $\frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{100 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 液-液分配法对PHEE初步分离效果

液-液分配法对PHEE初步分离效果见表1。

表1 液-液分配法对水蓼乙醇提取物的初步分离效果

萃取溶剂	萃取物状态	萃取物重/g	萃取率/%
石油醚	浸膏	2.807	6.697
氯仿	浸膏	2.759	6.582
乙醚	浸膏	1.305	3.114
乙酸乙酯	固体	3.112	7.424
水	固体	22.719	54.207
乳化层 ¹⁾	固体	7.686	18.339

1) 乳化层为不溶于水和上述有机溶剂的萃取液。

从表1可以看出,萃取物总重为40.388 g,回收率达96.364%,损失1.524 g,占3.636%。就萃取物状态而言,石油醚、氯仿和乙醚的萃取物为浸膏,乙酸乙酯、水、非水非有萃取物状态为固体。就萃取率而言,水萃取物最多,为22.719 g,占54.207%;其次为非水非有萃,占18.339%,乙醚萃最少,其萃取率仅为3.114%,其他3种溶剂的萃取率差不多,为6%~7%。

2.2 各萃取物对菜青虫的拒食活性

各萃取物对菜青虫的拒食活性见表2。

表2 水蓼粗提物溶剂萃取物对5龄菜青虫的生物活性¹⁾

萃取溶剂	取食面积/cm ² ·头 ⁻¹		拒食率/%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
石油醚	1.94	4.40	61.03 c	51.41 c
氯仿	1.00	2.40	79.79 b	73.46 b
乙醚	0.47	1.55	90.57 a	82.93 a
乙酸乙酯	0.88	2.24	82.38 b	75.32 b
水	2.12	5.04	57.30 cd	44.31 d
乳化层	2.32	5.17	53.20 d	42.97 d
CK	4.97	9.06	0 e	0 e

1) 数据为3次重复的平均值,数据后有相同字母者是经DMRT检验差异不显著($p>0.05$),各处理溶液浓度为 2.5×10^3 mg/kg, CK用丙酮处理。

由表2可知,PHEE的几种溶剂萃取物对菜青虫具有较强的拒食活性。其中,乙醚萃取物的拒食活性最强,24、48 h后拒食率分别为90.57%和82.93%;其次为氯仿和乙酸乙酯,其拒食率为73.46%~82.38%,石油醚、水、乳化层的生物活性更弱,但拒食活性都在40%以上,表现出一定的拒食活性。

2.3 PHEE萃取物对菜青虫的触杀作用

PHEE萃取物对菜青虫的触杀作用见表3。

表3 PHEE萃取物对菜青虫的触杀作用¹⁾

处理	24 h		48 h		72 h	
	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%
石油醚萃	16.67	13.79 c	28.33	23.21 c	46.67	39.62 c
氯仿萃	21.67	18.97 b	40.00	35.71 ab	60.00	54.72 ab
乙醚萃	26.67	24.14 a	45.00	41.07 a	61.67	56.60 a
乙酸乙酯萃	23.33	20.69 ab	38.33	33.93 b	53.33	47.17 b
水萃	18.33	15.52 bc	23.33	17.86 c	31.67	22.64 d
乳化层	16.67	13.79 c	26.67	21.43 c	35.00	26.42 d
CK	3.33	0 d	6.67	0 d	11.67	0 e

1) 表中数据为3次重复的平均值,数据后有相同字母者是经DMRT检验差异不显著($p>0.05$),各处理溶液浓度为 2.5×10^3 mg/kg, CK用丙酮处理。

由表3可知,不同溶剂的PHEE萃取物对菜青虫5龄幼虫具有一定的触杀活性,以乙醚萃取物的触杀活性较强,24、48 h和72 h的校正死亡率分别为24.14%、41.07%和56.60%。

3 结论与讨论

本试验通过不同溶剂的PHEE萃取物的生物活性试验表明,PHEE萃取物对菜青虫5龄幼虫具有很强的拒食作用和一定的触杀作用。其中以PHEE乙醚萃取物的活性最强,处理24、48 h后拒食率分别为90.57%和82.93%;24、48 h和72 h对菜青虫的触杀校正死亡率分别为24.14%、41.07%和56.60%。作者还对通过拒食作用和触杀作用未死的菜青虫进行继续饲养,直到其化蛹、羽化,观察其产卵情况。作者发现一个现象,所有处理后的菜青虫都比对照提前1~5 d化蛹,而且蛹的羽化率仅为51.36%,对照蛹的羽化率为96.63%;处理后的菜青虫即使羽化成菜粉蝶,但所有的菜粉蝶都不产卵,这是否跟处理药剂有关,还有待进一步的试验证明。

植物中的化学成分有数十种乃至数百种化合物,但其中的杀虫活性成分可能只有一种或几种。为了从中获得有效成分,液-液分配萃取法是一种重要的方法,特别适合样品分离的预处理,在天然产物分离工作中已被广泛采用,如张国洲等从瑞香狼毒中提取分离瑞香亭、狼毒色原酮、伞形花内酯,就是采用此法^[5]。

从国际上的发展趋势看,研究活性植物主要是为了寻找供化学合成的先导活性化合物。因此,应以活性较高的提取物为基础,分析其组成、结构,从而指导人工合成,开发出与环境相适应的农药产品,这方面的工作有待进一步研究。

参考文献

[1] 李安仁. 中国植物志(第25卷第1分册)[M]. 北京:科学出版社,1998:1-118.
[2] 邱式邦, 万方浩. 蔬菜害虫生物防治[M]. 北京:金盾出版社,2000.
[3] 张兴, 潘文亮. 缓效型杀虫剂室内生物测定的药效计算和评价[J]. 北京农业科学, 1989, 7(3): 6-10.
[4] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1994: 47-49.
[5] 张国洲, 王亚维, 徐汉虹, 等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离(I)[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(4): 340-344.