

黄花蒿杀螨活性物质的提取分离及活性评价

尚德斌, 骆星丹, 李春华, 张永强, 丁伟

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: 采用石油醚(30~60℃)、石油醚(60~90℃)、乙醇、丙酮和水等5种溶剂对采自6月份的黄花蒿的根、茎、叶分别进行活性成分的初步提取, 然后用柱层析进行分离检查, 并进一步用分离得到的组份对朱砂叶螨进行生物测定。结果表明, 在黄花蒿根、茎、叶的不同溶剂提取物中, 丙酮提取物对朱砂叶螨普遍具有较高的触杀活性。其中叶的丙酮提取物杀螨活性最高, 在48h内(5mg/ml)的杀螨校正死亡率达到98.95%。在分离的13个大的组分中, 第11和12组分活性较高, 48h, 5mg/ml对朱砂叶螨的校正死亡率分别为99.30%和99.29%。用这两组份对朱砂叶螨进行毒力回归分析, 得到它们的 LC_{50} 分别为0.3683、0.1586 mg/ml。

关键词: 黄花蒿; 杀螨活性; 朱砂叶螨; 提取分离

中图分类号: S482.5+2 **文献标识码:** A

Primary Extract, Separation and Biological Activities Evaluation of Acaricidal Substances of *Artemisia annua* L.

Shang Debin, Luo Xingdan, Li Chunhua, Zhang Yongqiang, Ding Wei

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: Primary extract the active elements from the root, stem and foliage of *Artemisia annua* L with petroleum ether (30~60℃), petroleum ether (60~90℃), ethanol, acetone and water were carried out in laboratory. Then further separation of active elements was detected by column chromatography, and then the separated elements' acaricidal activity was measured against *Tetranychus cinnabarinus*. The results indicated that acetone extract was the most effective to *T. cinnabarinus* in different solvent extracts of the root, stem and foliage of *A. annua* L. However the foliage acetone extract was the most effective against *T. cinnabarinus*, of which the corrected mortality was 98.95% within 48h (5mg/ml). In the 13 main separated groups, the 11th and 12th had the best activities. The corrected mortality against *T. cinnabarinus* was 99.30% and 99.29% respectively within 48h at the concentration of 5mg/ml. The toxicity regression linear analysis of these two groups against *T. cinnabarinus* were 0.3683 and 0.1586 mg/ml, respectively.

Key words: *Artemisia annua* L, Acaricidal activity, *Tetranychus cinnabarinus* Bois, Extract and separation

农业螨类中植食性的叶螨, 其危害几乎遍及世界范围内所有的农作物和地区, 朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 是中国分布最广、发生危害最为严重的一种农业害螨。其个体小, 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]。由于化学农药的滥用, 导致了

农药残留和螨类抗药性等问题的产生, 已经成为当今世界农业生产和农产品出口的严重障碍。从天然产物中寻找新的高效、低毒、低残留和与环境相容性好的生物农药已经成为当今杀螨剂研究开发的一个热点^[3]。

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 是一年生草本植物, 为

基金项目: 重庆市科技攻关项目“植物源杀虫剂研究”(20016599)。

第一作者简介: 尚德斌, 男, 1984年出生, 河南南召人, 从事天然产物农药研究。E-mail: sdb64@126.com。通信地址: 400716 重庆市北碚区天生路216号西南大学植物保护学院。Tel: 023-68250218。

通讯作者: 丁伟, 男, 1966年出生, 博士, 教授, 河南邓州人, 从事天然产物农药研究。E-mail: dwing818@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2006-11-07, 修回日期: 2006-11-11。

菊科蒿属。株高 40~250cm 以上,全生育期 210d 左右。黄花蒿在中国各地都有分布,生态适应性非常广,常生于山坡、林地、荒地。黄花蒿药用价值很高,青蒿素的衍生物可生产很多系列药品。青蒿素主治疟疾、结核病,潮热、伤暑、低热无汗,还具有清热凉血、退虚热、解暑、截疟作用等。对黄花蒿的研究在医药方面报道很多^[4-7]。有关黄花蒿在农业上生物活性的研究也有许多报道,如 Kordalis 等^[8]报道了从三种蒿属植物的地上部分提取的精油对谷象 *Sitophilus granarius* L. 都有明显的致死作用。李云寿等^[9]报道了黄花蒿精油对米象 *S. oryzae*、玉米象 *S. zeamais*、绿豆象 *Callosobruchus chinensis* 和蚕豆象 *Bruchus rufimanus* 等 4 种重要仓库害虫的成虫具有很强烈的熏杀活性。黄花蒿提取物对棉蚜 *Aphis gossypii* Glover、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 及豇豆荚螟 *Etiella zinckenella* Treitschke 也具有较强的拒食性^[10]。黄花蒿地上部分的乙醇提取物对 *Epilachna paenulata* Germ (鞘翅目:瓢甲科)幼虫有很强的拒食作用。同样的浓度对南部灰翅夜蛾 *Spodoptera eridania* (鳞翅目:夜蛾科)的取食抑制率为 87%^[11]。但到目前为止,还没有关于黄花蒿杀螨活性的系统研究,对于杀螨活性物质的极性分布也没有报道。笔者对黄花蒿杀螨活性成分进行了初步的分离提取和活性评价,明确黄花蒿杀螨活性物质的系统分布,以便为从天然产物中研发新型杀螨剂和对黄花蒿的综合开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 黄花蒿于 2006 年 6 月份全株采自于西南大学后山试验田。将采得的黄花蒿分成根、茎、叶三部分,自然阴干,用小型家用粉碎机粉碎备用。

1.1.2 供试生物 朱砂叶螨敏感品系。最初采自重庆市北碚区田间的豇豆苗上,在人工气候室内 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 60%~80% RH、光照条件 L:D=14h:10h 下用盆栽豇豆苗饲养了多年所获得的品系。

试验前栽种一批整齐的豇豆苗,往每株苗子上挑朱砂叶螨雌成螨 15 只,任其产卵 12h,移去成螨。待螨卵孵化之后,同样条件下培养 8-9d 作为供试螨。

1.1.3 提取溶剂 石油醚 (30~60℃ 沸程)、石油醚 (60~90℃ 沸程)、乙醇、丙酮(均为分析纯,重庆川东化工集团有限公司生产)和自来水。

1.2 实验方法

1.2.1 黄花蒿杀螨活性物质的提取

(1) 平行提取法:称取根、茎、叶各五份,每份 200g。分别用上述试剂各 1000ml 浸泡 2d,间歇摇动。

提取液通过中速滤纸,然后用 RE-2000 型旋转蒸发器将滤液蒸干,转入小瓶中待用。

(2) 顺序提取法:分别取上述根、茎、叶、石油醚 (30~60℃ 沸程) 提取物的残渣,再同平行提取法分别依次加入石油醚 (60~90℃ 沸程)、乙醇、丙酮和水。所得的滤液再分别用旋转蒸发器蒸干,收集备用。

1.2.2 黄花蒿杀螨活性成分的初步追踪分离 层析用硅胶 (100~200 目) (青岛海洋化工),干法装柱,称取上述活性最高的提取物 4g,加 4g 硅胶拌匀,加于硅胶柱顶端,用石油醚:丙酮 (13:1, 11:1, 9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:2, 1:3) 洗脱,控制洗脱剂流速在 200ml/h,每 40min 收集一份,共分离得 20 份物质。然后用薄层层析 (石油醚:丙酮 (3:1) 混合液为展开剂) 检查,根据 Rf 值的大小合并相同部分,共得到 13 份不同的组分。

1.2.3 黄花蒿杀螨活性评价实验 采用玻片点样法,将双面胶剪成 3cm 长,贴在载玻片的一端,用镊子揭去胶带上的纸片,用零号毛笔挑选事先准备好的,健康活泼,整齐一致的朱砂叶螨雌成螨。将其背部粘在双面胶带上,每片两行,每行 20 只左右。在同饲养条件下放置 4h 后,用双目镜观察,剔除死亡或不活泼的个体,记载实际的螨的个数,作为供试基数。用内径为 0.5mm 玻璃点样毛细管吸取一定浓度的微量药液,在双目镜下,小心将药液直接点滴于螨体。

相同饲养条件下放置 3d,每 24h 检查一次结果,以毛笔轻触螨体,螨螯肢不动者为死亡。以浸渍清水为对照。

对所得数据利用 Abbott 公式^[12]进行校正,用 SPSS 软件完成邓肯氏方差分析检验。毒力回归式及 LC₅₀ 用 Finney 机率值分析法求出。

Abbott 公式:

$$\text{校正死亡率 (\%)} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$$

100%

2 结果与分析

2.1 黄花蒿不同溶剂提取物杀螨活性的测定结果

采用点滴法测定黄花蒿不同溶剂的提取物杀螨活性,结果见表 1。

由表 1 可以看出,黄花蒿根、茎、叶的丙酮提取物对朱砂叶螨的触杀活性普遍较高,其它四种溶剂提取物的杀螨活性相对较低。根、茎、叶的丙酮提取物中,总体趋势是叶的杀螨活性最高,茎次之,根最低,它们在 48h 的校正死亡率分别达到 98.95%、72.35%、66.00%,校正死亡率 95% 的置信区间分别为

表 1 黄花蒿根、茎、叶不同溶剂提取物杀螨活性 (5mg/ml, 48h)

不同提取物	根		茎		叶	
	校正死亡率 (%)	校正死亡率的 95%的置信区间	校正死亡率 (%)	校正死亡率的 95%的置信区间	校正死亡率 (%)	校正死亡率的 95%的置信区间
石油醚 I	36.54 eBCD	31.76~41.32	53.35bcB	49.40~57.30	71.39 bc B	60.57~82.21
石油醚 II	43.64 bBC	35.81~51.46	52.89bcB	36.90~68.88	76.62 b B	73.81~79.44
乙醇	45.10 bBC	35.36~54.84	51.25cB	50.09~52.40	69.90 c B	61.03~78.77
丙酮	66.00 aA	52.86~79.14	72.53aA	56.79~88.27	98.95 a A	93.45~104.08
水	23.27 dE	8.20~38.34	17.35eD	6.68~28.01	31.82 e D	19.87~43.77
石油醚 II 顺	30.82 cDE	19.99~41.64	60.00bB	54.48~65.52	60.63 d C	54.05~67.22
乙醇顺	46.06 bB	39.16~52.96	33.33dC	23.59~43.08	69.19 c B	65.55~72.84
丙酮顺	36.60 eBCD	30.98~42.23	57.69bcB	52.92~62.47	69.76 c B	63.92~75.62
水顺	35.76 cCD	30.54~40.97	34.59dC	31.89~37.30	32.70 e D	25.56~39.86
F 值	30.10*		59.014*		109.40*	
自由度	8, 18		8, 18		8, 18	

注:表中数据为平均值,同一列数字后面所列字母,不同大写字母表示存在邓肯氏新复极差法检验极显著差异(P<0.01),不同小写字母表示存在显著差异(P<0.05)。表 2 和表 3 同。石油醚 I——石油醚(30~60℃);石油醚 II——石油醚(60~90℃);顺代表顺序提取。

93.45~104.08、56.79~88.27、52.86~79.14, 均与同组的其他溶剂提取物之间存在极明显差异(P<0.01)。根、茎、叶水提物的杀螨活性均最低,48h 内的平均校正死亡率分别只有 23.27%、17.35%、31.82%。

2.2 黄花蒿叶丙酮提取物柱层析所得不同组分的杀螨活性比较

采用生物活性追踪法测定黄花蒿叶的丙酮提取物柱层析所得不同组分的杀螨活性,结果如表 2。

表 2 黄花蒿叶丙酮提取物柱层析组分杀螨活性 (5mg/ml, 48h)

不同组分	校正死亡率(%)	校正死亡率 95%的置信区间
1	32.85fgF	28.54~37.16
2	37.12fF	34.16~40.09
3	60.54eE	56.35~64.74
4	62.46eE	55.34~69.58
5	82.52cC	81.79~83.24
6	89.74bB	85.08~94.41
7	79.47cCD	71.18~87.77
8	27.36gF	20.35~34.37
9	31.23fgF	27.67~34.79
10	26.95gF	21.37~32.54
11	99.30aA	96.32~102.29
12	99.29aA	96.24~102.34
13	73.07dD	65.76~80.38
F 值	527.809	
自由度	12,26	

由表 2 可以看出,在最终分离出的 13 种组分中,组份 11 和 12 的杀螨活性最高,48h 内的校正死亡率分别达到 99.30%、99.20%, 其 95% CI 分别为 96.32~102.29、96.24~102.34,组分 5 和 6 次之,48h 内

的平均校正死亡率分别达到 82.52%、89.74%,其 95% CI 分别为 81.79~83.24、85.08~94.41mg/ml。由此可见,黄花蒿杀螨活性物质主要存在于丙酮提取物中,其中又以叶的丙酮提取物中含量最高。

对活性较高的第 11 和 12 组分进行了毒力回归分析,结果列于表 3。

由表 3 看出,在分离出的 13 个组份中,组份 11 和 12 的 LC₅₀ 分别为 0.3683 和 0.1586mg/ml,而叶的丙酮提取物的 LC₅₀ 为 0.3832 mg/ml,组分 12 的活性相对于丙酮提取物而言提高了约 2 倍。表明这两种组份对朱砂叶螨具有较好的触杀活性,进一步证实黄花蒿杀螨活性物质主要存在于叶的丙酮提取物中,且该提取物可能含有两种不同的高效杀螨活性物质。

3 讨论

为了克服化学杀螨药剂带来的副作用,许多研究人员在探讨更为有效的理想的控制害螨的方法,从植物中筛选杀螨活性物质是一个重要方面。源于植物的天然活性物质多数对害虫(螨)具有选择作用,且对哺乳动物,非靶标生物和环境较为安全^[13]。而黄花蒿中有效的杀螨活性成份的成功分离提取,找到了一条开发源于植物的天然杀螨活性物质的新途径。由于自然地理原因,重庆是全球青蒿(黄花蒿)种植的最大基地,有“青蒿(黄花蒿)故乡”的美誉。开发黄花蒿的优势得天独厚。青蒿素是中国独有的一个抗疟新药,因其独特神奇的药效成分为中国中药里的一枝奇葩。丰富的植物资源为研究工作提供了极大的便利。综合对黄花蒿根、茎、叶不同溶剂杀螨活性物质的生物测定,发现黄花蒿叶的丙酮提取物杀螨活性比较理想,48h

表3 黄花蒿叶丙酮提取物和分离的第11和12组分对朱砂叶螨的毒力回归分析

处理	毒力回归直线	相关系数	LC ₅₀ 及 95%的置信限 (mg/ml)
丙酮提取物	$y=1.8435+1.2218x$	0.9781	0.3832(0.2576-0.5702)
第11组分 the 11 th	$y=1.5283+1.3582x$	0.9870	0.3683(0.2494-0.5441)
第12组分 the 12 th	$y=2.8472+0.9784x$	0.9850	0.1586(0.0916-0.2747)

内(5mg/ml)的平均校正死亡率高达98.95%。

对黄花蒿叶的丙酮提取物用柱层析进行分离,共得到13种不同的组分。对这13个组分进行综合分析,对朱砂叶螨48h的校正死亡率最低为27.36%,最高为99.30%;用杀螨活性最高的第11和12两组份对朱砂叶螨进行毒力回归分析,得到它们的LC₅₀分别为0.3683、0.1586 mg/ml。这可以确定黄花蒿的杀螨活性物质的大致分布。今后对这些组分进行进一步的分离纯化,获得杀螨有效成份的单体,并进行结构鉴定和杀螨机理研究,有望获得新的具有天然产物杀螨活性的化合物。但还需要注意,这些杀螨物质的新颖性,这些物质在黄花蒿不同产地、不同生长时期,植株不同部位的分布情况等。

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] Choi W I, Lee S G, Park H M, et al. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2004, 97(2): 553-558.
- [4] 姚守华,李绪翠.黄花蒿(青蒿)的药用价值及开发应用[J].中国医学研究与临床,2005,3(7):58-59.
- [5] Eckstein-Ludwig U, Webb R J, van Goethem I D A, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum* [J].

Nature, 2003, 424: 957-961.

- [6] Youn H J, Noh J W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella* [J]. Veterinary Parasitology, 2001, 96:257-263.
- [7] Juteau F, Masotti V, Bessiere J M, et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil[J]. Fitoterapia, 2002, 73: 532-535.
- [8] Kordalis S, Aslan I, Calmasur O, et al. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Industrial Crops and Products, 2006, 23:162-170.
- [9] 李云寿,唐绍宗,邹华英,等.黄花蒿提取物的杀虫活性[J].农药,2000,39(10):25-26.
- [10] 朱芬,雷朝亮,王健.黄花蒿粗提物对几种害虫拒食性的初步研究[J].昆虫天敌,2003,25(1):16-19.
- [11] Maggi M E, Mangeaud A, Carpinella M C, et al. Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 31(7):1527-1536.
- [12] Abbott W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide [J]. Journal of Economic Entomology, 1925, 18: 265-267.
- [13] Isman M B. Plant essential oils for pest and disease management[J]. Crop Protection, 2000,19:603-608.

(责任编辑:陈素洁)