

东莨菪内酯的纯度与其杀螨活性的相关性

秦培元, 丁伟, 张永强, 杨振国

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘要: [目的]以黄花蒿丙酮提取物为载体,采用叶碟浸渍法测定比较不同纯度的东莨菪内酯对朱砂叶螨卵、幼螨和成螨的触杀活性。[结果]不同纯度的东莨菪内酯对朱砂叶螨卵的活性有一定的差异,处理120 h孵化抑制率均低于50%,对幼螨和成螨的活性呈起伏式增加,处理48 h作用效果最佳的含量均表现在73.45%,其 LC_{50} 值分别为89.63、97.34 mg/L。[结论]东莨菪内酯对朱砂叶螨的生物活性并不是纯度越高越好,在提取物中含有一定的原料杂质反而对药效有一定的增效作用。

关键词: 东莨菪内酯; 朱砂叶螨; 触杀活性

中图分类号: S482.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006-0413(2012)02-0144-04

The Correlation Research that Scopoletin Purity and Acaricidal Activity

QIN Pei-yuan, DING Wei, ZHANG Yong-qiang, YANG Zhen-guo

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

Abstract: [Aims] The acaricidal activity of different purity of scopoletin against different stages of *Tetranychus cinnabarinus* using leaf dipping method were evaluated in this article. [Results] The results showed that the different scopoletin purity exhibited weak bioactivity against the egg of *T. cinnabarinus* and the hatch inhibition rates were all less than 50% after 120 h treatment. The contact toxicity of different scopoletin purity against larval mites and adult mites exhibited rolling-rise type tendency, the 73.45% purity of scopoletin were strongest and their median lethal concentrations (LC_{50}) were 89.63 and 97.34 mg/L, respectively after 48 h treatment. [Conclusions] It can be concluded that the acaricidal activity against *T. cinnabarinus* doesn't enhance with the increasing of scopoletin purity and but some synergistic activity comes with some impurity in raw materials.

Key words: scopoletin; *Tetranychus cinnabarinus*; contact toxicity

植物源农药来自于植物,能够起杀虫活性的通常是其中的关键成分。为此,一般要采用活性追踪的方法将有效成分提取分离出来^[1-2],而且一些制剂也追求以纯活性成分来进行加工^[3]。但一些研究表明植物性的杀菌和杀虫药剂纯品的效果反而没有粗提取物的好。如岑依静等^[4]研究发现薇甘菊 *Mikania micrantha* 的甲醇提取物对柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 具有很强的产卵驱避作用,进一步对甲醇提取物柱层析分离得到3个具有产卵驱避作用的组分,但其效果都不及原来的提取物,说明薇甘菊对柑橘全爪螨的产卵驱避作用是各组分共同作用的结果。东莨菪内酯(scopoletin)属香豆素类化合物,在自然界广泛存在,该化合物目前主要在医药上研究较多^[5]。张永强等^[6]首次证实了黄花蒿 *Artemisia annua* 叶的丙酮提取物对朱砂叶螨具有较强的触杀活性,并验证了其活性成分为东莨菪内酯。东莨菪内酯可以从重庆市范围内大面积人工栽培的黄花蒿材料中提取获得,为了推进其产业化进程,有必要探明最佳杀螨效果的东莨菪内酯的有效含量。笔者通过在柱层析分离时调整洗脱剂的极性、层析硅胶的用量、流速及纯结晶等方法得到11种纯度不同的东莨菪内酯,以

朱砂叶螨为指示生物,进行室内生物活性测定,以明确在黄花蒿丙酮提取物中不同纯度的东莨菪内酯与朱砂叶螨之间的毒力关系,以便为进一步开发利用东莨菪内酯特别是生产上进行制剂加工提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试螨类

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 最初采自重庆市北碚区农田的豇豆苗上,在人工气候室内(26 ± 1) °C、60%~80% RH条件下用豇豆苗盆栽,在没有接触任何农药的条件下饲养12年以上所获得的品系。

1.1.2 供试植物的来源及前处理

黄花蒿 *Artemisia annua* 来源于重庆市酉阳山区,经石油醚热回流提取青蒿素后的黄花蒿残渣,于60 °C烘箱内烘干,小型万能粉碎机粉碎后过250 μ m筛。

1.1.3 东莨菪内酯的分离

称取一定量的粉碎物用丙酮(质量比为1:5)冷浸48 h,

收稿日期:2011-10-24,修返日期:2011-12-03

基金项目:科技部农业科技成果转化基金(2010GB2F100388);教育部博士点新教师基金(20100182120021)

作者简介:秦培元(1984—),男,新疆哈密人,硕士研究生,主要从事天然产物农药研究。E-mail:qinpy2919030@126.com。

通讯作者:丁伟,男,河南邓州人,教授,博士研究生,博士生导师,主要从事天然产物农药研究。Tel:023-68250218, E-mail:dwing818@yahoo.com.cn。

过滤,浓缩至无丙酮味为止,获得黄花蒿丙酮提取物。称取黄花蒿丙酮提取物3 g,加3 g硅胶拌匀,加于硅胶柱顶端(注意保持硅胶柱顶端水平)用48~75 μm 层析硅胶(青岛海洋化工)进行柱层析分离,用石油醚-乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂进行洗脱,控制流速在300 mL/h,每100 mL收集1份。洗脱过程中进行在线监测,东莨菪内酯在254 nm紫外光下会产生蓝色荧光^[7],将含有东莨菪内酯的洗脱剂收集起来备用。用相同的方法继续分离提取东莨菪内酯,只是在洗脱过程中调整洗脱剂的极性、层析硅胶用量、流速和对分离得到的东莨菪内酯纯结晶等。得到11个东莨菪内酯纯度不同的黄花蒿提取物,并用高效液相色谱对其含量进行检测。检测条件:色谱柱 C_{18} 反向色谱柱,流动相乙腈-水(体积比80:20),流速0.8 mL/min,检测波长340 nm,进样量为20 μL 。经液相色谱检测这11个不同东莨菪内酯纯度的黄花蒿提取物中东莨菪内酯含量由低到高分别为0.97%、11.56%、22.86%、29.64%、42.06%、51.36%、60.27%、73.45%、80.54%、91.47%、97.36%。

1.2 试验方法与步骤

1.2.1 不同纯度的东莨菪内酯对螨卵的触杀活性

将1.1.3的方法制备的11个东莨菪内酯纯度不同的组分各取适量加入一定量的丙酮和吐温80使其完全溶解,用水稀释配制成含总成分1600 mg/L的溶液,作为供试药液。试验方法采用叶碟浸渍法^[8-9],在9 cm的培养皿中放入一层大小一致的棉花,棉花上平铺一层吸水纸,加入适量的蒸馏水润湿。摘取平展的豇豆叶片,叶背朝上平贴在吸水纸上,每一叶片挑入雌成螨10头,于人工气候室内(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、60%~80% RH条件下培养24 h,挑去雌成螨,此时每片豇豆叶片上约有30~40颗螨卵。用镊子夹取叶片浸液5 s,每处理设置3次重复,以含有0.1%吐温80的水溶液作为空白对照。叶片晾干后按照上述方法重新放入培养皿中,检查并记录剩余螨卵数,培养条件同上,每日往培养皿中加水保湿,每24 h在解剖镜下观察卵孵化情况,卵壳破裂视为孵化,持续观察5 d。当对照卵全部孵化时,处理卵仍没有孵化的视为死亡。分别检查螨卵的孵化情况,计算孵化率,试验重复5次。

1.2.2 不同纯度的东莨菪内酯对幼螨的触杀活性

方法同1.2.1当叶片上有30~40颗卵时,在相同条件下培养4 d,待螨卵孵化出幼螨后浸药。做毒力回归分析时在初试的基础上选用5~7个质量浓度。浸药后在相同条件下培养3 d,每24 h在解剖镜下观察幼螨死亡情况,以毛笔尖轻触螨体壁,完全不动的视为死亡。计算幼螨死亡率和毒力回归分析,毒力回归分析由几率值分析方法计算,由SPSS13.0统计完成,试验重复5次。

1.2.3 不同纯度的东莨菪内酯对雌成螨的触杀活性

方法同1.2.1,每片豇豆叶片挑30头螨在相同条件下放置4 h,待螨在叶片上稳定后浸药。做毒力回归分析时在初试的基础上选用5~7个质量浓度。浸药后在相同条件下培养3 d,每24 h在解剖镜下观察螨死亡情况,以毛笔尖轻触螨体壁,完全不动的视为死亡。计算螨死亡率和毒力回归分析方法同1.2.2,试验重复5次。

2 结果与分析

2.1 不同纯度的东莨菪内酯对朱砂叶螨卵的生物活性

分别用不同含量的东莨菪内酯的黄花蒿提取物配制成的含有总成分1600 mg/L的制剂,在实验室条件下测定各自对朱砂叶螨卵的触杀活性,结果见图1。

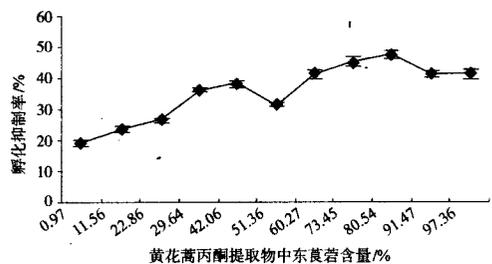


图1 不同纯度东莨菪内酯对朱砂叶螨卵的触杀活性(120 h)

从图1看出各个含量的东莨菪内酯对朱砂叶螨卵120 h的孵化抑制率都小于50%。但总体呈上升趋势,在29.64%~42.06%区间出现一个活性增长的高峰。到51.36%时反而杀卵活性下降。在60.27%时,活性又开始增加,到73.45%~80.54%含量时,东莨菪内酯提取物对螨卵的孵化抑制率相对较好一些,分别为45.45%和47.62%,之后又开始下降。这说明虽然东莨菪内酯对螨卵的活性较低,但在一定含量范围内也表现出杀卵活性的差异。

2.2 不同纯度东莨菪内酯对不同螨态朱砂叶螨生物活性

分别用不同含量的东莨菪内酯的青蒿提取物配制成的含有总成分1600 mg/L的制剂,在实验室条件下测定各自对不同螨态的朱砂叶螨的触杀活性,结果见图2。

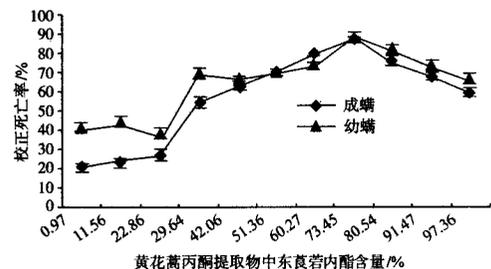


图2 不同纯度东莨菪内酯对朱砂叶螨成螨和幼螨触杀活性评价(48 h)

从图2看出:不同东莨菪内酯含量的黄花蒿丙酮提取物对幼螨和成螨的活性总体呈起伏式上升的趋势,分别在

29.64%和73.45%处出现2个高峰。处理48 h,对幼螨和成螨作用效果最好的均为73.45%东莨菪内酯含量的黄花蒿丙酮提取物,校正死亡率分别为88%和86.67%。随着提取物中东莨菪内酯含量的增加,对幼螨和成螨的活性反而都降低,当含量达到97.36%时,对幼螨和成螨的校正死亡率分别为66.07%和58.89%。其中幼螨的活性下降的较慢。

2.3 不同纯度的东莨菪内酯对朱砂叶螨幼螨的毒力

从表1看出8种不同东莨菪内酯含量的黄花蒿提取物对朱砂叶螨的幼螨处理48 h都有较好的触杀活性,LC₅₀值分别为257.88、188.57、144.93、122.36、89.63、101.86、214.14 mg/L。其中活性最好的是73.45%含量的东莨菪内酯,其LC₅₀值为89.63 mg/L。表明东莨菪内酯对朱砂叶螨幼螨的生物活性随其含量的增加呈先增加后降低的趋势,总体表现为73.45%>60.27%>51.36%>42.06%>29.64%,但80.54%、91.47%和97.36%与73.45%相比活性有所下降。

表1 不同纯度东莨菪内酯对朱砂叶螨幼螨毒力 (48 h)

东莨菪内酯 含量/%	毒力回归直线 (y=)	相关 系数	LC ₅₀ 值/(mg·L ⁻¹) (95%置信区间)
29.64	0.7229+1.3366x	0.9624	257.88(226.52~356.03)
42.06	0.8917+1.23.9x	0.9951	188.57(135.59~242.02)
51.36	1.1050+1.3172x	0.9299	144.93(35.63~252.79)
60.27	0.7369+0.8704x	0.9726	122.36(77.41~206.56)
73.45	1.5913+1.5887x	0.9850	89.63(67.68~130.05)
80.54	1.0401+1.1765x	0.9733	101.86(84.45~112.87)
91.47	0.4356+0.6544x	0.9652	130.59(84.05~176.06)
97.36	0.6189+0.9980x	0.9402	214.14(149.48~306.77)

2.4 不同纯度的东莨菪内酯对朱砂叶螨雌成螨的毒力

不同纯度东莨菪内酯对朱砂叶螨雌成螨毒力见表2。

表2 不同纯度东莨菪内酯对朱砂叶螨雌成螨毒力 (48 h)

东莨菪内酯 含量/%	毒力回归直线 (y=)	相关 系数	LC ₅₀ 值/(mg·L ⁻¹) (95%置信区间)
29.64	2.1734+1.4689x	0.9544	283.99(167.77~307.09)
42.06	3.2740+0.9858x	0.9366	256.34(140.98~377.46)
51.36	2.5161+1.4971x	0.9685	195.62(135.51~258.60)
60.27	1.7117+1.8909x	0.9902	131.34(45.23~167.44)
73.45	1.8507+1.8799x	0.9973	97.34(38.22~158.65)
80.54	1.7325+1.6272x	0.9632	192.32(79.30~247.49)
91.47	0.7417+2.1667x	0.9759	215.93(109.32~328.88)
97.36	3.1942+0.7748x	0.9932	239.79(166.67~317.87)

从表2看出东莨菪内酯对朱砂叶螨成螨的LC₅₀值随含量的不同而有所变化,29.64%、42.06%、51.36%、60.27%、73.45%、80.54%、91.47%和97.36%含量的东莨菪内酯对朱砂叶螨的LC₅₀值分别为283.99、256.34、195.62、131.34、97.34、192.32、215.93、239.79 mg/L。73.45%含量的东莨菪内酯活性最高。这表明植物源活性物质东莨菪内酯对朱砂叶螨成螨的生物活性并不随着其含量的升高而增强,升高到某一个含量后其活性最高,再增加含量其活性反而会

有所下降。

3 讨论

对东莨菪内酯(scopoletin)的生物活性的研究已经有相关报道。如张永强等^[10]研究发现东莨菪内酯对朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 有较强的触杀活性,LC₅₀值(48 h)为101.4 mg/L,进一步对其作用机理研究发现东莨菪内酯对朱砂叶螨的Ca²⁺-ATP酶有一定的抑制作用。梁为等^[11]研究发现东莨菪内酯对朱砂叶螨雌成螨有很强的触杀作用,并兼有内吸活性。Vera等^[12]发现东莨菪内酯对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 有取食抑制作用。对幼虫发育和生长没有影响,且不会使成虫出现畸形。Shukla等^[13]发现东莨菪内酯具有较强的抗真菌活性,尤其是对烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*, 抑制中浓度(IC₅₀)为305.4 mg/L,对镰刀菌梭形杆菌 *Fusarium fusiformis* 和半裸镰刀菌 *Fusarium semitectum* 也有较好的效果,抑制中浓度分别为822.5、469.3 mg/L。但这些报道都局限在东莨菪内酯的纯品上面,没有考虑在提取过程中一些残渣的影响,而实际生物测定过程中,经常会出现纯品的活性反而不及一些粗提取活性的现象。本文报道了含有不同量的东莨菪内酯的黄花蒿提取物对不同螨态的朱砂叶螨的触杀活性。结果表明:在29.64%~73.45%含量范围内其杀螨活性随着东莨菪内酯的含量增加而增强。但在含量为80.54%时的杀卵活性最好。而对幼螨和成螨48 h的触杀活性又表现出73.45%含量的东莨菪内酯效果最好,LC₅₀值分别为89.63、97.34 mg/L,当含量超过73.45%时杀螨活性反而随着东莨菪内酯含量的增加而降低,当含量达到97.36%时对幼螨和成螨的LC₅₀值反而是214.14、239.79 mg/L。这种现象符合植物源农药的活性规律,说明黄花蒿提取物中除了东莨菪内酯有较好的杀螨活性外,还有其他的组分也具有较好的杀螨活性。它们相互间具有协同增效的作用,当提取物中不同活性成分比例达到最佳配比时也达到了它的最高活性。所以73.45%含量的东莨菪内酯才表现了最高活性,当其含量升高或降低时活性都会下降。

植物源农药一般是多种成分共同起作用的,所以在提取、分离植物源农药的过程中,也应该注意尽可能的将活性成分都集中于同一个体系,而不是单独的将某一种活性成分纯化出来,这样才能做到最大可能的发挥植物源农药的最佳药效。

菊科植物黄花蒿在医药上具有重要的应用前景,可以用来提取抗疟疾的药物青蒿素。在青蒿素提取过程中,大量的黄花蒿或者青蒿残渣都作为副产品被废弃了。试验研究表明从这些提取过青蒿素的黄花蒿残渣中可以有效地提取具有杀螨活性的化合物东莨菪内酯,这为黄花蒿的综合开发利用提供了很好的一个途径。但是到底要提纯

到什么程度才能获得理想的杀螨有效成分一直是综合利用的一个瓶颈问题。本研究的结果可以为以黄花蒿或者青蒿残渣为原料提取杀螨活性物质提供重要的参考依据。当然,由于在研究不同纯度东莨菪内酯的生物效应过程中,主要的原料是黄花蒿提取完青蒿素后的残渣,这可能和直接利用黄花蒿丙酮提取物来进行不同纯度东莨菪内酯的生物活性研究会有一定的差异,但本研究的结果可以作为重要的参考,而且对于产业化的生产更具有实际意义。

参考文献:

- [1] 李有志,徐汉虹. 湘黑藤的杀虫活性及其杀虫成分[J]. 中国农业科学, 2007, 40(8): 1688-1696.
- [2] 阮娜,宋小平. 丁香杀螨活性成分的追踪分离纯化与结构鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 21(9): 24-27.
- [3] 邓志勇,邓业成,阳振. 我国植物源农药的研究与应用[J]. 广西农业科学, 2006, 36(7): 678-681.
- [4] 岑伊静,庞雄飞,凌冰,等. 薇甘菊提取物对柑橘全爪螨的产卵驱避作用及有效组分分析[J]. 生态学报, 2004, 24(11): 2542-2547.

- [5] 魏丽娟,周金培,戴岳,等. 天然产物东莨菪素的研究进展[J]. 海峡药学, 2009, 21(4): 10-13.
- [6] 张永强,丁伟,赵志模,等. 黄花蒿提取物对朱砂叶螨的生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 7(5): 577-584.
- [7] 喻蓉,许庆,李伯刚,等. 搭棚藤的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(5): 405-407.
- [8] 龙丽萍,凌炎,唐文伟. 三种植物性杀虫剂对菜青虫的毒效[J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2006, 32(4): 402-405.
- [9] 吴文君,刘惠霞,朱靖博. 天然产物杀虫剂:原理、方法、实践[M]. 陕西:科学技术出版社, 1998: 12-16.
- [10] 张永强. 黄花蒿杀螨活性物质追踪及杀螨作用机理研究[D]. 西南大学, 2008.
- [11] 梁为,成军,师光禄,等. 东莨菪内酯的杀螨活性及其作用机理[J]. 园艺学报, 2010, 37(增刊): 2200.
- [12] VERA N, POPICH S, LUNA L, et al. Toxicity and Synergism in the Feeding Deterrence of Some Coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chem & Biodivers, 2006, 3(1): 21-26.
- [13] SHUKLA Y N, SRIVASTAVA A, KUMAR, et al. Phytotoxic and Antimicrobial Constituents of *Argyrea speciosa* and *Oenothera biennis*[J]. Ethnopharm, 1999, 67(3): 241-245.

责任编辑:赵平

(上接第143页)

- [21] CHANG K S, TAK J H, KIM S I, et al. Repellency of Cinnamomum Cassia Bark Bompounds and Cream Containing Cassia Oil to *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) under Laboreatory and Indoor Conditions[J]. Pest Management Science, 2006, 62(11): 1032-1038.
- [22] PROMSIRI S, NAKSATHIT A, KRUAATTRACHUE M, et al.

Evaluation of Iarvicidal Activity of Medicinal Plant Extracts to *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) and Other Effects on a non Target Fish[J]. Insect Science, 2006, 13(3): 179-188.

- [23] 唐启义,冯明光. DPS数据处理系统:实验设计、统计分析及数据挖掘[M]. 北京:科学技术出版社, 2007: 80-86.
- [24] 张志祥,徐汉虹,程东美. EXCEL在毒力回归计算中的应用[J]. 昆虫知识, 2002, 39(1): 67-70.

责任编辑:赵平

中国化工学会农药专业委员会第十五届年会 论文征集通知

由中国化工学会农药专业委员会主办、全国农药信息总站承办的中国化工学会农药专业委员会第十五届年会拟定于2012年5月召开,热忱欢迎全国从事农药研究、开发和生产的专家、学者,此次会议将为与会代表提供一次学术交流和展示各自研究成果的极好机会,对我国农药行业的发展产生积极促进作用。

学会年会的主题: 技术进步 企业发展 环境和谐

现开始向学会理事、团体会员单位及从事农药科研、生产、应用、环境毒理学研究等相关领域工作的学者征集本次年会的会议论文。论文的主要内容:关于我国农药研究的新思维、新品种、新方法等;合成技术研究、生产工艺改进、三废治理及分析方法等绿色化研究;农药加工工艺、助剂应用及剂型研究;生物技术在农药研究中的应用;农药应用技术研究;安全评价性研究;农药生产用新设备、新器械研究等;农药在环境中的代谢与残留等。

所有来稿均请专家评审,论文录用后作者到会参加交流,会议期间将组织专家评选优秀论文,颁发优秀论文证书。

具体要求:1)论文要主题明确,观点新颖,结构严谨,数据准确,文责自负;2)提交的论文在国内外刊物上未公开发表;3)提交的论文请按《农药》杂志要求格式书写;4)论文请用电子文件形式发到学会秘书处;5)论文不退,请作者自留底稿。

本次论文征集截止日期为2012年4月10日。敬请附上详细联系地址、邮政编码、电话(单位及手机)、传真以及E-mail地址。凡参加会议的代表提供的论文均编入大会论文集。

电话(传真):024-85869187。

联系人:张敏恒 13898166268;李新18704096827,lixin1@sinochem.com;赵平 13898152073,zhaoping1@sinochem.com。

中国化工学会农药专业委员会