第 26 卷第 3 期 河 北 科 技 大 学 学 报 Vol. 26, No. 3
2005 年 9 月 Journal of Hebei University of Science and Technology Sept. 2005

文章编号: 1008-1542(2005)03-0208-04

几种植物有效成分的提取及杀虫活性研究

杨会龙[1], 刘宝友[2], 王淑娟[3]

(1. 河北科技大学后勤管理处, 河北石家庄 050018; 2. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 3. 河北省环境检测中心站, 河北石家庄 050051)

摘 要: 对 10 种植物的有效成分进行了提取, 通过对提取物的抑菌试验和杀虫活性试验, 筛选出 3 种较好的 Bt 菌混剂候选复配植物, 还对其中最具开发价值的植物砂地柏进行了不同有机溶剂提取物杀虫活性的比较试验, 并确定了石油醚为最佳提取溶剂。

关键词: 萃取; 杀虫活性; 闹羊花; 藜芦; 砂地柏

中图分类号: TQ174 文献标识码: A

Study on insecticidal activity and extraction of effective component from several nature plants

YANG Hui-long[1], LIU Bao-you[2], WANG Shu-juan[3]

(1. Administrative Office of Rear Service, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 2. College of Environment Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 3. Hebei Environmental Monitoring Centre, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

Abstract: This paper reports the extraction of effective component from 10 nature plants, three of which are selected out as promising candidates of mixed bacillus thuringiensis by the restraining bacteria test and insecticidal test of extracts. The insecticidal activity of different organic solvent extracts from the most exploit value plant sabina vulgaris indicates that petroleum ether is the suitable extraction solvent.

Key words: extraction; insecticidal activity; rhododendron moll; veratrum; sabina vulgaris

人们对环境保护和食品安全日益重视, 并不断开发出高效、低毒、低残留杀虫剂, 以期解决一些有机合成杀虫剂的残留和抗性等问题。同时, 人们也纷纷把目光投向新型无公害杀虫剂, 其中研发比较成功的是生物源杀虫剂, 主要包括植物源杀虫剂和微生物源杀虫剂[1]。植物源杀虫剂实质是用于防治害虫的植物体中的活性物质, 主要是植物的次生代谢产物, 一般具有以下优点: 选择性强, 对害虫的天敌以及人、畜低毒; 在环境中易降解, 无残留污染; 作用方式独特, 害虫不易产生抗药性; 来源广泛, 开发和使用成本较低等。研究植物体内杀虫活性物质已经成为近年来国内外农药研究领域的热点[2~4]。本文选取几种植物进行有效成分提取, 并对提取物进行了杀虫活性研究, 以期得到良好的制备 Bt(苏云金芽孢杆菌) 菌混剂的复配植物。

1 实验部分

1.1 材料和试剂

收稿日期: 2005-01-28; 修回日期: 2005-04-24; 责任编辑: 陈玉堂
基金项目: 河北省教育厅基金资助项目(2001229)
作者简介: 杨会龙(1970-), 男, 河北曲阳人, 工程师, 主要从事环境保护、绿色化学合成技术与工艺及管理经济学方面的研究。

藜芦(veratrum, 根)、闹羊花(rhododendron molle, 花和叶)、雷公藤(tripterygium wilfordii hook f, 根和茎)、八角茴香(illicium vatum, 果实等)、断肠草(gelseminum elegans benth, 根、茎、叶)、莨菪(anisodus tanguticus, 根)、洋金花(flos daturae, 花和叶)、醉鱼草(buddleja lindeyana, 茎和叶)、马桑(coriaria sinica maxim, 根、茎、叶、皮)、砂地柏(sabina vulgaris, 果实等)(购自药材市场, 粉碎后过 40 目(1 目= $1.523\ 92/n^2 \times 10^{-2}$ m(径长), 1 目= $1.853\ 05/n^4 \times 10^{-6}\ m^3$(粒度))筛, 本文称为粉剂); 乙醇、氯仿、正己烷、苯、石油醚(AR); NaCl, NaOH (AR); 蛋白胨、牛肉膏、琼脂、Bt 粉剂(外购); 鱼虫、菜青虫(分别购自鱼虫市场和采自菜田)。

1.2　实验方法

1.2.1　植物杀虫活性物质的提取

1) 植物杀虫活性物质的粗提　分别用水提法和醇提法, 粗提所含杀虫活性物质。水提法: 将 10 g 植物粉剂倒入烧杯中, 加入 400 mL 水, 浸泡过夜, 煮沸 2 h, 稍冷, 用 4 层纱布过滤, 去除残渣, 滤液浓缩至 100 mL。醇提法: 将 10 g 植物粉剂倒入装有冷凝器的烧瓶中, 每次加入 φ(乙醇) 为 95% 的乙醇溶液 100 mL, 提取 3 次, 每次回流 1 h, 用 4 层纱布过滤, 合并提取液, 浓缩至 50 mL。

2) 植物杀虫活性物质的精提　10 种天然杀虫植物经过 2 次筛选, 对藜芦、闹羊花、砂地柏 3 种植物进行精提。藜芦所含的有效成分为生物碱, 且均为亲脂性的物质。采取如下提取方法: 将 10 g 藜芦粉剂加入烧瓶中, 加入 50~ 60 g 的 φ(乙醇) 为 95% 的乙醇溶液, 提取 3 次, 每次回流 1 h, 合并提取液, 稍冷, 过滤, 将滤液浓缩至 50 mL, 加入 2 倍量的蒸馏水充分搅拌后放冰箱冷冻 24 h, 过滤, 将滤液浓缩至 50 mL(终提液)。

闹羊花所含的杀虫有效成分为木毒素和石楠素, 均属木藜芦烷类毒素, 藜芦烷毒素是一种含有多羟基的极性化合物, 为水溶性物质。其提取方法如下: 将 10 g 闹羊花粉剂置于烧杯中, 加入 400 mL 水, 浸泡过夜, 煮沸 2 h, 用 4 层纱布过滤, 将滤液浓缩至 100 mL, 向浓缩液中加入 120 mL φ(乙醇) 为 95% 的乙醇溶液, 搅拌均匀, 瓶中出现絮状沉淀(蛋白质、糖类及其他有机质), 抽滤, 将滤液浓缩至 72 mL(蒸余液)。

砂地柏的果实具有较高毒性, 含有丰富的杀虫活性物质, 目前已经分离出的活性物质有(脱氧)鬼臼毒素和松油烯-4-醇[4]等。砂地柏提取方法如下: 将 10 g 砂地柏粉剂加入烧瓶中, 加入石油醚 50 mL, 提取 3 次, 每次回流 1 h。合并提取液, 浓缩至总体积的 1/2, 然后在冰箱内于 -20 ℃下冷冻过夜, 过滤后得提取物。提取物用丙酮溶解并稀释至 50 mL(终提液)。

1.2.2　培养基的制备

在锥形瓶中依次加入 0.5 g 牛肉膏、1 g 蛋白胨、0.5 g NaCl 和 80 g 水, 搅拌下加热使其溶解, 补加水至 100 mL, 再放入 2 g 琼脂, 搅拌下加热溶化, 再补加水至 100 mL, 小心地用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值到 7.0。于锥形瓶口塞上棉塞, 外罩 1 块纱布, 然后在纱布外侧包 1 层纸, 其外用 1 道麻绳包扎好。将配制好的培养基和包装好的培养皿放入灭菌锅中, 在 0.11 MPa, 120 ℃的条件下, 用高压蒸气灭菌 0.5 h。取出培养皿和锥形瓶, 放在无菌操作台上, 将培养基分别倒入 8 个培养皿中, 放凉, 凝固, 备用。

1.2.3　生物活性测定试验

1) 抑菌试验　将 0.1 g Bt 粉剂搅拌下溶于 100 mL 水中制成 Bt 菌液, 然后向每个培养皿中分别加入 0.2 mL Bt 菌液, 用玻璃棒轻刮使 Bt 菌液均匀涂于培养基的表面。用直径为 0.8 cm 的圆滤纸片蘸取提取液, 放入培养皿中。每个培养皿均匀放置蘸取提取液的纸片 5 枚。将制好的培养基放入恒温培养箱中培养, 温度控制在 29 ℃, 24 h 后观察菌落生长情况并测量抑菌圈的大小。

2) 以鱼虫为试虫的杀虫活性试验　8 支试管中分别加入 30 mL 水并放入 20 只鱼虫。向每支试管内滴入一定量的植物提取液, 使试管内提取液中粉剂的质量浓度达 0.002 g/mL。其中一支试管不滴加任何提取液, 以作空白对照。定时观察并记录试管内鱼虫的存活状况。

3) 以菜青虫为试虫的杀虫活性试验　将菜青虫分别装到几个烧杯中, 取新鲜菜叶, 反复冲洗, 晾干, 用打孔器打成直径为 1.5 cm 的圆叶片若干。将提取液稀释到粉剂质量浓度为 0.01 g/mL。用圆叶片蘸取提取液, 晾干, 放入烧杯内, 每杯放入蘸取同一种提取液的叶片, 其中一瓶蘸取蒸馏水以作空白对照。常温下观察并记录菜青虫的存活状况及取食情况。

2　结果与讨论

2.1　通过抑菌试验筛选可与 Bt 复配的植物

本研究的目的在于克服单独使用 Bt 生物杀虫剂的不足和缺点, 从具有杀虫活性的植物中筛选出 Bt 菌混剂复配植物, 以期提高 Bt 菌的杀虫效力, 扩大杀虫谱。笔者选用 10 种植物的粗提取液, 通过抑菌试验对杀虫植物进行初步筛选。从表 1 可以看出, 雷公藤、洋金花和八角茴香均有明显的抑菌作用, 其余几种植物无抑菌作用。由于参与复配的植物提取液不应有抑菌作用, 所以笔者排除洋金花、八角茴香和雷公藤 3 种植物, 对其余几种植物作进一步筛选。

表 1 10 种植物对 Bt 菌剂的抑菌效果试验

Tab. 1 Restraining bacteria test of 10 nature plants to mixed bacillus thuringiensis

提取液植物	藜芦	断肠草	洋金花	八角茴香	莨菪	砂地柏	雷公藤	闹羊花	醉鱼草	马桑
抑菌圈直径/ cm	0	0	1.4	1.4	0	0	1.5	0	0	0

2.2 通过鱼虫试验筛选具有较强杀虫活性的植物

用水提法对各种植物进行提取, 所得提取液以鱼虫为试虫做杀虫活性测定试验。从表 2 可以看出: 7 种提取液都显示出一定的杀伤效果, 但它们的毒性大小及见效快慢有很大的差别, 其中以闹羊花的水提液毒性最大, 见效最快, 藜芦次之, 砂地柏也具有相当大的毒性, 其余几种毒性较小, 见效较慢。因此, 笔者选取闹羊花、藜芦和砂地柏为候选复配植物作进一步研究。表 2 中, 试虫校正死亡率= (处理死亡数- 对照死亡数) / (试虫总数- 对照死亡数) × 100% (下同)。

表 2 7 种植物水提取液对鱼虫的室内校正死亡率试验

Tab. 2 Indoor correction mortality test of water extract from seven plants on water flea

植物种类	不同时间鱼虫的校正死亡率/ %							
	3 h	6 h	9 h	12 h	18 h	24 h	48 h	60 h
马 桑	0	5.0	10.0	15.0	20.0	30.0	50.0	70.0
断肠草	0	5.0	20.0	35.0	60.0	85.0	90.0	100.0
莨 菪	5.0	5.0	5.0	10.0	15.0	20.0	55.0	55.0
砂地柏	0	5.0	10.0	20.0	75.0	80.0	95.0	100.0
闹羊花	10.0	10.0	50.0	75.0	100.0	100.0	100.0	100.0
醉鱼草	5.0	5.0	10.0	15.0	30.0	80.0	80.0	85.0
藜 芦	0	10.0	20.0	65.0	100.0	100.0	100.0	100.0

2.3 闹羊花、藜芦、砂地柏所含有效成分提取方法的研究

据文献报道, 闹羊花、藜芦和砂地柏的部分有效成分能溶于水和乙醇[5~7]。为了确定最佳提取方案, 本试验分别用水提法和醇提法对 3 种植物进行提取, 分别得到水提液和醇提液; 水提后的滤渣再用醇提, 得水-醇提液; 醇提后的滤渣再用水提, 得醇-水提液。各提取液以鱼虫为试虫进行毒力检测试验。由表 3 可以看出: 闹羊花和砂地柏 2 种植物的水提液毒力稍大于醇提液, 藜芦的醇提液毒力稍大于水提液。据此, 确定闹羊花和藜芦的精提取方案(见 1.2.1)。由于它们的水-醇提液或醇-水提液的毒力远小于水提液或醇提液, 说明它们所含的杀虫活性物质大多都溶于醇和水。由此可知, 3 种植物的杀虫活性成分可以采用水及醇类有机溶剂来提取, 但是可否用其他溶剂提取尚未知。由于砂地柏的资源最为丰富, 材料成本低, 最具开发价值, 所以笔者选取不同的有机溶剂, 对其有效成分的提取进行了进一步考察。

表 3 闹羊花, 藜芦和砂地柏的水、醇提液对鱼虫的室内校正死亡率试验

Tab. 3 Indoor correction mortality test on water flea of water and alcoholic extract from rhododendron molle, veratrum and sabina vulgaris

植物种类	不同时间鱼虫的校正死亡率/ %						
	3 h	6 h	9 h	12 h	18 h	24 h	48 h
闹羊花水提液	0.0	15.0	80.0	90.0	100.0	100.0	100.0
闹羊花醇提液	0.0	0.0	50.0	70.0	100.0	100.0	100.0
闹羊花水-醇提液	0.0	0.0	0.0	5.0	10.0	20.0	35.0
闹羊花醇-水提液	0.0	0.0	5.0	5.0	10.0	10.0	20.0
藜芦水提液	0.0	10.0	70.0	100.0	100.0	100.0	100.0
藜芦醇提液	10.0	15.0	85.0	100.0	100.0	100.0	100.0
藜芦水-醇提液	0.0	10.0	25.0	85.0	100.0	100.0	100.0
藜芦醇-水提液	0.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	15.0
砂地柏水提液	0.0	0.0	10.0	40.0	70.0	85.0	100.0
砂地柏醇提液	0.0	0.0	5.0	35.0	60.0	75.0	100.0
砂地柏水-醇提液	0.0	0.0	5.0	15.0	15.0	20.0	25.0
砂地柏醇-水提液	0.0	0.0	0.0	5.0	10.0	10.0	10.0

2.4 不同有机溶剂提取砂地柏果实有效成分研究

笔者在砂地柏果实活性成分的提取过程中以生物活性跟踪测定法为指导, 经不同溶剂(石油醚(60~ 90 ℃)、正己烷、苯、氯仿、乙醇) 进行平行提取。考虑到砂地柏潜在的开发价值, 笔者选用菜青虫

作为试虫。石油醚和正己烷提取液经冰箱冷冻 12 h 后有不溶物析出, 过滤得不溶物, 分别为石 A 和正 A。滤液回收溶剂后, 得石 B 和正 B。其他几种溶剂提取液回收溶剂后, 得苯 B、氯 B 和乙 B。测定各种提取物对菜青虫的生物活性, 选择出较佳溶剂。砂地柏果实不同溶剂提取物对菜青虫生物活性的比较见表 4。由表 4 可以看出: 石 A 和正 A 对菜青虫活性最高, 正 A 尤为突出, 仅在 24 h 内拒食率就接近 100%, 48 h 死亡率高达 100%; 石 A 的活性稍低于正 A, 但其拒食率和最终死亡率都达 90% 以上; 除乙 B 外, 其余几种溶剂提取物尽管都均有较高的拒食活性, 但是死亡率较低。综合考虑溶剂价格及提取效率, 笔者认为, 选择石油醚(60~ 90 ℃) 作为最佳提取溶剂是较为合理的, 据此, 确定砂地柏果实的精提方案(见 1. 2. 1) 。

表 4　砂地柏果实不同溶剂提取物对菜青虫生物活性比较

Tab.4　Comparing the biological activity of different organic solvent extracts from sabina vulgaris fruitage against cabbage butterfly larvae

植物提取液	24 h 拒食率	48 h 拒食率	48 h 校正死亡率
石 A	91.4	95.2	90.9
石 B	84.3	89.1	46.0
正 A	99.5	99.7	100.0
正 B	81.9	90.0	37.0
苯 B	90.5	95.0	46.0
氯 B	91.2	95.3	46.0
乙 B	46.0	63.0	25.1

样品均配制成 25.0 g/L 的丙酮溶液供试, 拒食率= (对照平均取食量- 处理平均取食量) / 对照平均取食量 × 100%, 取食量以菜青虫对青菜的取食质量计

3 结　论

通过对 10 种植物提取物的抑菌试验, 初步筛选出 7 种植物作为潜在的 Bt 菌混剂候选复配植物, 通过提取液对鱼虫的杀虫活性试验, 筛选出了闹羊花、藜芦和砂地柏 3 种较好的候选植物。对最具开发价值的植物砂地柏进行了不同有机溶剂提取物的杀虫活性比较实验, 确定石油醚为最佳提取溶剂。

参考文献:

[1] 罗　敏, 林永贤, 杨玉旺, 等. 生物农药——21 世纪农药的生力军[J]. 河北工业科技, 2003, 20(5): 54-59.

[2] 张　舒. 植物源杀虫剂的开发研究综述[J]. 湖北农业科学, 2001, (4): 53-55.

[3] 操海群, 岳永德, 花日茂, 等. 植物源农药研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(1): 40-44.

[4] 马志卿, 张　兴. 植物源杀虫物质的作用特点[J]. 植物保护, 2000, 26(2): 37-39.

[5] 张　兴, 冯俊涛, 陈安良, 等. 砂地柏杀虫作用研究概况[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(4): 130-134.

[6] 钟国华, 刘金香, 官　珊, 等. 闹羊花素类化合物对斜纹蛾幼虫表皮成分的影响与构效关系[J]. 昆虫学报, 2004, 47(6), 705-714.

[7] 杨丽娟. 几种有毒植物提取液对落叶松鞘蛾幼虫的毒杀作用[J]. 通化师范学院学报, 2004, 25(2): 80-83

(上接第 **179** 页)

$m< 0$时, 原点 O 为稳定焦点。注意到变换(3), 由张芷芬唯一性定理[4] 知, 系统(1) 在原点外围至多存在一个极限环, 且若存在, 它一定是不稳定的。

注: 令 $l= 1$, 系统(1) 变为文献[5] 研究的系统, 不过这里的证明比文献[5] 更简洁; 令 $l= 1$, $\alpha= 1$, 系统(1)即为文献[6] 研究的系统, 这里还解决了文献[6] 中未涉及到的极限环存在性问题。

参考文献:

[1] 叶彦谦. 极限环论[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1984

[2] 韩茂安. 平面定常系统有无闭轨的判别法[J]. 南京大学学报, 1985, 21(2): 233-244

[3] 张锦炎. 常微分方程几何理论与分支问题[M]. 修订再版. 北京: 北京大学出版社, 1987. 189-190

[4] 张芷芬, 丁同仁, 黄文灶, 等. 微分方程定性理论[M]. 北京: 科学出版社, 1985

[5] 刘德明. 一多项式系统的极限环[J]. 辽宁师范大学学报, 1999, 22(3): 203-207.

[6] 邹　应. 方程 $dx/dt= - y+ dx + bx^2+ bdxy- by^2$, $dy/dt= x(1+ ax + y)$ 的极限环讨论[J]. 武汉大学学报, 1977, (4): 7-9.