

· 研究简报 ·

杠柳杀虫活性成分的分离

师宝君^a, 高履桐^a, 姬志勤^a, 张继文^b, 吴文君^a, 胡兆农^{*a}

(西北农林科技大学 a. 植物保护学院, b. 理学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用柱层析分离、高效液相色谱切分和生物活性追踪法,从杠柳 *Periploca sepium* 根皮甲醇提取物中分离出 2 个具有杀虫活性的化合物(**G₁** 和 **G₂**),经鉴定其分别为已知物杠柳新苷 **D** 和 **F**。生物活性测定结果表明,化合物 **G₁** 和 **G₂** 对 3 龄粘虫 *Mythimna separata* 48 h 的胃毒致死中浓度(LC₅₀)分别为 0.39 和 0.34 mg/mL, 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 48 h 的胃毒 LC₅₀ 值分别为 1.21 和 1.39 mg/mL。

关键词:杠柳;杀虫活性;分离;杠柳新苷

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2012.01.16

中图分类号:S482.39

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2012)01-0103-04

Isolation of the insecticidal ingredients from *Periploca sepium*

SHI Baojun^a, GAO Lütong^a, JI Zhiqin^a, ZHANG Jiwen^b,
WU Wenjun^a, HU Zhaonong^{*a}

(a. College of Plant Protection, b. College of Sciences, Northwest Agricultural and Forestry University,
Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract:Two compounds, periplocoside **D** and **F** were isolated from the methanol extract of the root barks of *Periploca sepium* by silica gel chromatograph, high pressure liquid chromatograph (HPLC) and bioassay-guided fractionation. The bioassay results showed that periplocoside **D** and **F** had stomach toxic activity with the LC₅₀ value of 48 h 0.39 and 0.34 mg/mL against 3rd instar larvae of *Mythimna separata*, and against 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* with the LC₅₀ value of 48 h 1.21 and 1.39 mg/mL.

Key words: *Periploca sepium*; insecticidal activity; isolated; periplocoside

杠柳 *Periploca sepium* Bge 是萝藦科 (Asclepiadaceae) 杠柳属的一种蔓生性灌木,又名北五加、香加皮,主要分布于我国东北、华北、西北、西南及广西、湖南、湖北、河南和江西等省区,资源丰富^[1]。已有研究表明:杠柳根皮粗提物对菜青虫 *Pieris rapae*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 具有较强的拒食活性,且会严重影响试虫的生长发育^[2-4];其对

麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 具有一定的触杀活性^[5];对粘虫 *Mythimna separata* 具有一定的胃毒和触杀活性^[6-7]。Itakawa 等已从杠柳根皮中分离得到 42 种杠柳新苷类化合物,并对其抗肿瘤活性进行了研究^[8-12]。有关其杀虫活性的报道仅有杠柳新苷 NW 对 3 龄小菜蛾、粘虫和菜青虫具有较强的胃毒活性^[13],但对小地老虎 *Agrotis ypsilon* 无胃毒活性。

收稿日期:2011-07-26;修回日期:2011-10-23.

作者简介:师宝君,男,助理研究员,主要从事天然产物农药研究, **E-mail:**sbj9612@yahoo.com.cn; * 通信作者 (Author for correspondence): 胡兆农,男,教授,主要从事农药毒理学研究, **E-mail:**huzhaonong@nwsuaf.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2010CB126105);国家公益性行业(农业)科研专项(200903052);国家自然科学基金(30870344,31071704);西北农林科技大学青年学术骨干项目。

为了进一步明确杠柳的杀虫活性成分,笔者采用生物活性追踪分离法,从杠柳甲醇提取物中分离鉴定出2个活性化合物,对其杀虫活性进行了测试。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物 杠柳 *Periploca sepium* Bunge 根皮于2006年9月购自西安药材市场,由西北农林科技大学生命学院鉴定。

1.1.2 试剂和仪器 石油醚(60~90℃)、甲醇、氯仿、丙酮均为市售分析纯试剂;200~300目(粒径48~75 μm)硅胶为青岛海洋化工厂生产。

制备型高效液相色谱(HPLC)系统:SYB-3输液泵,UV100型检测器,φ50 mm×300 mm 不锈钢柱,C₁₈填料(粒度为10 μm)(天津科技高新技术公司生产);分析型HPLC系统:Waters600E型液相色谱仪(带600E泵,UV486紫外检测器和WDL95工作站)(美国Waters公司生产);分析型色谱柱为YWG C₁₈柱(φ4.6 mm×250 mm,填料粒径为10 μm)(大连化学物理所生产);X4型显微熔点测定仪(温度未校正)(北京第二光学仪器厂生产);Bruker Apex II质谱仪及Bruker RPX 500 MHz核磁共振仪(德国Bruker公司生产)。

1.1.3 试虫 均由西北农林科技大学农药研究所提供。粘虫 *Mythimna separata* (Walker):室内以麦苗和玉米苗累代饲养,取4龄幼虫供触杀活性测定,3龄幼虫供胃毒活性测定;小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus):室内以蛭石萝卜苗或油菜苗饲养,取3龄幼虫供试;小地老虎 *Agrotis ypsilon* (Rottemberg):室内以甘蓝叶片饲养,取3龄幼虫供试。

1.2 活性成分的提取分离

1.2.1 活性成分的提取 采用热回流法^[14]。将20 kg杠柳根皮晾干、粉碎后用60 L石油醚回流提取3次,每次3 h。过滤,滤液经减压浓缩得石油醚提取物,残渣再用60 L甲醇回流提取3次,每次3 h。过滤,滤液经减压浓缩得甲醇提取物。

1.2.2 活性成分的分离 采用生物活性追踪法^[14]。取有杀虫活性的甲醇提取物200 g,用少量氯仿溶解,以1.0 kg硅胶为吸附剂,石油醚湿法装柱(10 cm×1 m),干法上样。依次用石油醚、石油醚-丙酮(体积比9:1、4:1、1:1、1:4)、丙酮和甲醇洗脱,每种洗脱剂用量均为2.5 L,每收集500 mL为1份,薄层色谱[TLC,展开剂V(石油醚):V(丙酮)

=6:4]检测,归类合并,共得到10个馏分。以粘虫3龄幼虫为试虫,测定柱层析中各馏分的胃毒活性,发现第6个馏分有活性,继续对其进行分离。将馏分6(3.2 g)用少量氯仿溶解,吸附在少量硅胶上进行柱层析(2.0 cm×1 m),用石油醚-丙酮梯度洗脱,得到6个馏分,其中馏分4活性较强,对其采用制备HLPC切分,得到2个化合物。测定化合物的熔点、质谱及核磁共振氢谱和碳谱,结合相关文献解析化合物的结构。

1.3 生物活性测定方法

1.3.1 触杀活性测定 采用微量点滴法^[15]。挑取适宜的试虫,用微量点滴器在其前胸背板上定量点滴供试样品的丙酮稀释液(对照组只点滴等量丙酮),每处理10头试虫,分置于培养皿内,于22~25℃、相对湿度为70%~80%的养虫室内饲养,定时观察记录试虫中毒症状。实验重复4次。

1.3.2 胃毒活性测定 采用载毒叶碟法^[15]。用丙酮将供试样品配成50 mg/mL的溶液,用1 μL微量点滴器将药液涂布在0.5 cm×0.5 cm小麦叶片上。对照只点滴等量丙酮溶液。待溶剂挥发后,将叶片放入24孔板中,每孔放1叶片并接1头饥饿12 h的3龄幼虫。每处理10头试虫,重复4次。用湿纱布保湿,于22~25℃、相对湿度为70%~80%的养虫室内饲养,24、48 h后检查结果,计算死亡率和校正死亡率,观察记录试虫中毒症状,采用孙云沛法^[16]计算毒力回归方程和致死中浓度(LC₅₀)。采用数据处理系统软件(SPSS13.0),计算药剂的LC₅₀、b值及其95%置信限。

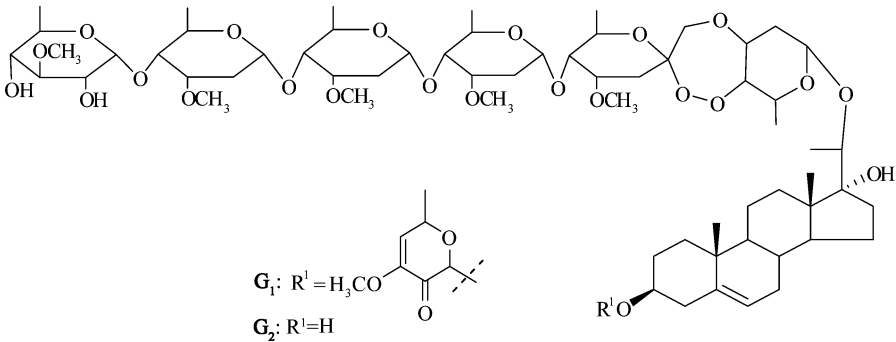
2 结果与分析

2.1 杠柳活性成分的理化数据及结构鉴定

G₁,白色粉末,熔点189~190℃(文献值^[11]:191~193℃)。ESI-MS表明其准分子离子峰[M+Na]⁺ m/z为1 391.34,结合¹³C NMR谱给出分子式为C₇₀H₁₁₁O₂₆Na(计算值1 391.62),得其相对分子质量为1 368,分子式为C₇₀H₁₁₂O₂₆。其¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMBC和HSQC谱与文献^[17]报道的C₇₀H₁₁₂O₂₆杠柳新苷D基本一致,故将其鉴定为杠柳新苷D。

G₂,白色粉末,熔点194~196℃(文献值^[12]:195~198℃)。ESI-MS表明其准分子离子峰[M+Na]⁺ m/z为1 251.34,结合¹³C NMR谱给出分子式为C₆₃H₁₀₄O₂₃Na(计算值1 251.70),得其相对分子质量为1 228,分子式为C₆₃H₁₀₄O₂₃。其¹H NMR、

¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HMBC 和 HSQC 谱中的数 据与杠柳新苷 F^[18] 基本一致,故将其鉴定为杠柳新 2 个化合物的结构如 Scheme 1 所示。



Scheme 1

2.2 化合物的杀虫活性

2.2.1 胃毒及触杀活性 化合物 G₁ 和 G₂ 在 10 mg/mL 下对 3 龄小地老虎无触杀和胃毒活性,对 4 龄粘虫和小菜蛾均无触杀活性,但对 3 龄粘虫和小菜蛾具有胃毒活性,24 h 的死亡率分别为 75.0%

和 77.5%,48 h 的死亡率分别为 90.0% 和 95.0%。进一步的毒力测定结果表明:化合物 G₁ 和 G₂ 对粘虫的 48 h LC₅₀ 值分别为 0.39 和 0.34 mg/mL,对小菜蛾 48 h 的 LC₅₀ 值分别为 1.21 和 1.39 mg/mL (表 1)。

表 1 化合物对 3 龄粘虫和小菜蛾的胃毒活性

Table 1 Stomach toxicity of the insecticidal compounds against the 3rd instar larvae of *Mythimna separata* and *Plutella xylostella*

化合物 Compd.	试虫 Tested insect	处理时间 Treated time/h	毒力回归方程 Toxicity regression equation	<i>r</i>	LC ₅₀ /(mg/mL)	95% 置信限 95% CL
G ₁	粘虫 <i>M. separata</i>	24	$Y=4.271\ 1+1.445\ 1x$	0.960 0	3.19	1.63~7.94
		48	$Y=5.487\ 6+1.193\ 3x$	0.997 1	0.39	0.26~0.59
	小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	24	$Y=4.820\ 3+1.526\ 6x$	0.969 7	1.31	0.93~1.85
		48	$Y=4.847\ 0+1.840\ 9x$	0.987 1	1.21	0.91~1.61
G ₂	粘虫 <i>M. separata</i>	24	$Y=4.531\ 5+1.376\ 6x$	0.993 5	2.19	1.53~3.14
		48	$Y=5.592\ 3+1.275\ 1x$	0.938 2	0.34	0.23~0.52
	小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	24	$Y=4.465\ 7+1.330\ 8x$	0.953 5	2.52	1.57~4.63
		48	$Y=4.823\ 7+1.230\ 7x$	0.993 7	1.39	0.91~2.11

2.2.2 中毒症状观察 供试粘虫和小菜蛾取食载毒叶片 4 h 后,部分出现中毒症状。中毒试虫腹部明显肿胀,不能弯曲亦不能爬行,但身体上部及头部可自由活动。随着中毒时间延长,腹足不能正常伸缩,但用针刺仍有反应。最终因肿胀加剧,48 h 后死亡。

3 结论与讨论

本研究从杠柳根皮中分离鉴定出 2 个具有杀虫活性的化合物,经鉴定其分别为杠柳新苷 D 和 F。尽管前人已经从杠柳中分离得到过这 2 个化合物,并对其抗癌活性进行了初步研究^[17-18],但并未见其

具有杀虫活性的报道。本研究结果表明,杠柳新苷 D 和 F 对 3 龄粘虫和小菜蛾具有一定的胃毒活性,但其对同为鳞翅目的小地老虎却无活性,其原因有待进一步研究。

从中毒症状来看,其与试虫对杠柳新苷 NW 的中毒症状相同。已有研究表明:试虫取食经杠柳新苷 NW 处理的叶片后,中毒试虫中肠杯状细胞与柱状细胞微绒毛层、内质网、线粒体及核膜等部分遭到破坏,导致消化道破坏解体以及消化酶活性发生变化,而致使昆虫死亡^{〔13〕}。由此可初步判断杠柳新苷 D 和 F 可能也作用于昆虫消化系统,具体尚有待进一步研究和验证。

参考文献 (Reference):

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1997, 1683.
New Medical College of Jiangsu. Dictionary of Chinese Traditional Medicine [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1997, 1683. (in Chinese)
- [2] 朱九生, 乔雄梧, 王静. 杠柳根皮乙醇粗提物对菜青虫的拒食作用及其防治效果[J]. 昆虫知识, 2004, 141(6): 48–52.
ZHU Jiusheng, QIAO Xiongwu, WANG Jing. Antifeedant effect and control efficacy of ethanol crude extracts from the root bark of *Periploca sepium* against imported cabbage worm, *Pieris rapae* [J]. *Chinese Bull Entomol*, 2004, 141(6): 48–52. (in Chinese)
- [3] 朱九生, 乔雄梧, 王静. 杠柳的不同溶剂提取分离物对小菜蛾幼虫的拒食和毒杀作用[J]. 农药学报, 2004, 6(2): 48–52.
ZHU Jiusheng, QIAO Xiongwu, WANG Jing. Study on antifeedant and insecticidal activities of extracts and fractions from *Periploca sepium* Bunge against *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2004, 6(2): 48–52. (in Chinese)
- [4] 朱九生, 乔雄梧, 王静, 等. 杠柳根皮乙醇提取物对蔬菜害虫小菜蛾的生物活性[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 31–34.
ZHU Jiusheng, QIAO Xiongwu, WANG Jing, et al. The bioactivity of the ethanol extracts from root bark of *Periploca sepium* against *Plutella xylostella* [J]. *J Plant Resources Environ*, 2004, 13(3): 31–34. (in Chinese)
- [5] 史清华, 马养民, 秦虎强. 杠柳根皮挥发油化学成分及对麦二叉蚜的毒杀活性初探[J]. 西北植物学报, 2006, 26(3): 620–623.
SHI Qinghua, MA Yangmin, QIN Huqiang. Chemical components and insecticidal activity of essential oil in *Periploca sepium* root bark to *Schizaphis graminum* [J]. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 2006, 26(3): 620–623. (in Chinese)
- [6] 史清华, 马养民, 秦虎强. 杠柳根皮化学成分及杀虫活性的初步研究[J]. 西南林学院学报, 2008, 28(2): 38–41.
SHI Qinghua, MA Yangmin, QIN Huqiang. Chemical composition and bioactivity of root bark from *Periploca sepium* [J]. *J Southwest For College*, 2008, 28(2): 38–41. (in Chinese)
- [7] 陈玲, 马养民, 史清华, 等. 杠柳叶的化学成分及其粗提物杀虫活性研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(2): 142–145.
CHEN Ling, MA Yangmin, SHI Qinghua, et al. Chemical composition and insecticidal activity of extracts from *Periploca sepium* leaves [J]. *J Northwest For College*, 2007, 22(2): 142–145. (in Chinese)
- [8] 张援虎, 王锋鹏. 杠柳属植物化学成分研究进展[J]. 天然产物研究和开发, 2003, 15(2): 157.
ZHANG Yuanhu, WANG Fengpeng. Recent advances of chemical constituents of *Periploca* plants [J]. *Nat Prod Res Develop*, 2003, 15(2): 157. (in Chinese)
- [9] DENG Y R, WEI Y P, YIN F, et al. A new cardenolide and two new pregnane glycosides from the root barks of *Periploca sepium* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2010, 93: 1602–1609.
- [10] WANG L, YIN Z Q, SHEN W B, et al. A new pregnane and a new diphenyl-methane from the root barks of *Periploca sepium* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2007, 90: 1581–1585.
- [11] FENG J Q, ZHAO W M. Five new pregnane glycosides from the root barks of *Periploca sepium* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2008, 91: 1798–1805.
- [12] FENG J Q, ZHANG R J, ZHOU Y, et al. Immunosuppressive pregnane glycosides from *Periploca sepium* and *Periploca forrestii* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69: 2716–2723.
- [13] 赵彦超, 师宝君, 胡兆农. 杠柳毒素 NW 的杀虫活性[J]. 昆虫知识, 2008, 45(6): 950–952.
ZHAO Yangchao, SHI Baojun, HU Zhaonong. The insecticidal activity of periplocoside NW [J]. *Chinese Bull Entomol*, 2008, 45(6): 950–952. (in Chinese)
- [14] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博. 天然产物杀虫剂: 原理、方法、实践 [M]. 西安: 陕西科学与技术出版社, 1998: 45–76.
WU Wenjun, LIU Huixia, ZHU Jingbo. Natural Product Insecticide: Theory, Method and Practice [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1998: 45–76. (in Chinese)
- [15] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论 [M]. 西安: 陕西科学与技术出版社, 1987: 23–25.
WU Wenjun. The Experimental Techniques of Plant Protection [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1987: 23–25. (in Chinese)
- [16] SUN Y P, JOHNSON E R. Synergistic and antagonistic actions of insecticide-synergist combinations and their mode of action [J]. *J Agric Food Chem*, 1960, 8(4): 261–266.
- [17] ITOKAWA H, XU J P, TAKEYA K, et al. Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium*. IV. Structures of new pregnane glycosides, periplocosides D, E, L and M [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(6): 2084–2089.
- [18] ITOKAWA H, XU J P, TAKEYA K, et al. Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium*. V. Structures of new pregnaneglycosides, periplocosides J, K, F and O [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(11): 4441–4446.

(责任编辑: 金淑惠)