

· 研究简报 ·

透骨草杀虫活性成分分离鉴定及其生物活性研究

肖新敏^a, 胡兆农^a, 姬志勤^a, 师宝君^a,
张继文^b, 魏少鹏^a, 吴文君^{*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,从透骨草 *Phryma leptostachya* L. 石油醚提取物中分离出 2 个具有杀虫活性的化合物 (**B₁** 和 **B₂**),采用质谱、核磁共振氢谱和碳谱,并结合相关文献对其结构进行鉴定,发现其分别为双氧木脂素 A 和 E。首次以粘虫 *Mythimna separata*、槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、小地老虎 *Agrotis ypsilon* 和家蝇 *Musca domestica* 为试虫,测定了这 2 个化合物的杀虫活性。结果表明:化合物 **B₁** 和 **B₂** 对 3 龄粘虫 24 h 的胃毒致死中浓度(LC₅₀值)分别为 34.9 和 52.8 μg/mL,24 h 触杀致死中量(LD₅₀值)分别为 0.09 和 0.26 μg/头;对 3 龄槐尺蠖 24 h 的胃毒 LC₅₀值分别为 66.1 和 1 675 μg/mL,触杀 LD₅₀值分别为 0.049 和 1.33 μg/头;对家蝇成虫 24 h 的胃毒 LC₅₀值分别为 39.2 和 969 μg/mL,触杀 LD₅₀值分别为 0.047 和 1.12 μg/头。

关键词:透骨草;杀虫活性;双氧木脂素 A;双氧木脂素 E

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2012.05.19

中图分类号:Q965;S482.39

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2012)05-0583-04

Isolation, structure identification and bioactivity of active ingredients from *Phryma leptostachya*

XIAO Xinmin^a, HU Zhaonong^a, JI Zhiqin^a, SHI Baojun^a,
ZHANG Jiwen^b, WEI Shaopeng^a, WU Wenjun^{*a}

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

Abstract: Two compounds, haedoxane A and E were isolated from the petroleum ether extract of the roots and stems of *Phryma leptostachya* L. by silica gel chromatograph, high pressure liquid chromatograph (HPLC) and bioassay-guided fractionation. The bioassay results showed that haedoxane A and E had stomach toxic activity with the LC₅₀ value of 24 h 34.9 and 52.8 μg/mL against 3rd instar larvae of *Mythimna separata*, against 3rd instar larvae of *Semiothisa cinerearia* with the LC₅₀ value of 24 h 66.1 and 1 675 μg/mL, and against *Musca domestica* with the LC₅₀ value of 24 h 39.2 and 969 μg/mL. Haedoxane A and E had topical toxic activity with the LD₅₀ value of 0.09 and

收稿日期:2012-04-11;修回日期:2012-06-19.

作者简介:肖新敏,女,讲师,在读博士研究生,**E-mail**:xiaoxinmin2005@126.com; *通信作者(Author for correspondence):吴文君,男,教授,主要从事农药学研究,**E-mail**:wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)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(31171868,31071704).

0.26 $\mu\text{g}/\text{larvae}$ against 3rd instar larvae of *M. separata*, against 3rd instar larvae of *S. cinerearia* with the LD₅₀ value of 0.049 and 1.33 $\mu\text{g}/\text{larvae}$, and against *M. domestica* with the LD₅₀ value of 24 h 0.047 and 1.12 $\mu\text{g}/\text{fly}$.

Key words: *Phryma leptostachya*; insecticidal activity; haedoxane A; haedoxane E

透骨草 *Phryma leptostachya* L. 为透骨草科 (Phrymaceae) 透骨草属植物, 生于林下或林边阴湿处, 在我国主要分布于东北、华北及长江流域各地。全草及根有毒, 能清热, 可治疗黄水疮、疥癣及虫疮毒, 其根可杀蝇蛆, 全草能杀灭菜青虫^[1]。已有研究^[2-4]表明: 透骨草粗提物对卤虫 *Artemia sinica* 及淡色库蚊 *Culex pipiens pallens*、埃及伊蚊 *Aedes aegypt* 等多个蚊虫品种和家蝇 *Musca domestica* 具有较强的杀虫活性。国外学者从透骨草中已分离出透骨草灵-I^[5]、透骨草灵-II^[6-7]、透骨草醇乙酸酯^[2]和双氧木脂素 A^[8]等木脂素类化合物, 合成了双氧木脂素 E^[9], 并发现透骨草醇乙酸酯对卤虫、淡色库蚊、埃及伊蚊、东乡骚扰蚊 *Ochlerotatus togoi* 和家蝇等双翅目卫生害虫具有很强的杀虫活性^[2-4]。但目前尚未见有关双氧木脂素 A 和 E 对家蝇、尤其是对鳞翅目等田间害虫是否具有杀虫活性的报道。

为了进一步明确透骨草的杀虫活性成分, 笔者采用生物活性追踪分离法, 从透骨草的石油醚提取物中分离鉴定出 2 个活性化合物, 并对其杀虫谱进行了测试。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物 透骨草 *P. leptostachya* 于 2009 年 10 月采自吉林省辽源市, 由西北农林科技大学生命学院鉴定并保存。

1.1.2 试剂和仪器 石油醚 (60~90 °C) 等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, $\Phi 50\text{ mm} \times 300\text{ mm}$ 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 ($\Phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, 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, 除家蝇外均取 3 龄幼虫供试。粘虫 *Mythimna separata*: 室内以麦苗和玉米苗累代饲养; 槐尺蠖 *Semiothisa cinerearia*: 室内以国槐叶累代饲养; 小菜蛾 *Plutella xylostella*: 室内以蛭石萝卜苗饲养; 小地老虎 *Agrotis ypsilon*: 室内以甘蓝叶片饲养; 家蝇 *Musca domestica*: 室内 [温度 (25 ± 2) °C, 相对湿度 65%~80%; L/D = 12 h: 12 h] 饲养的敏感品系, 选择羽化后 2~4 d 整齐一致的健康家蝇供试。

1.2 活性成分的提取及分离

1.2.1 提取 采用室温浸提法。将阴干的 7.5 kg 透骨草根粉碎后用 25 L 石油醚于室温下浸提 3 次, 每次 3 d。过滤, 滤液经减压浓缩得石油醚浸膏。

1.2.2 分离 采用生物活性追踪法^[10]。取 132.5 g 石油醚浸膏, 用丙酮溶解后拌入适量硅胶, 于通风橱中风干, 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 [V(石油醚): V(丙酮) = 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5]、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 [展开剂 V(石油醚): V(丙酮) = 7:3] 检测, 归类合并, 共得到 12 个馏分。以粘虫 3 龄幼虫为试虫, 测定各馏分的胃毒活性。发现第 7 个馏分活性较强, 继续对其进行分离。将馏分 7 (5.3 g) 用少量丙酮溶解, 吸附在少量硅胶上进行柱层析 (5.0 cm × 1 m), 用石油醚-丙酮梯度洗脱, 得到 9 个馏分, 其中馏分 5 活性最强, 采用制备 HLPC 对其进行切分, 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

采用载毒叶碟法^[11]测定化合物对粘虫、槐尺蠖、小菜蛾和小地老虎的胃毒活性; 采用微量点滴法^[11]测定其对粘虫、槐尺蠖、小菜蛾和小地老虎的触杀活性; 采用胃毒法^[12]测定其对家蝇的胃毒活性; 采用点滴法^[12]测定其对家蝇触杀活性。

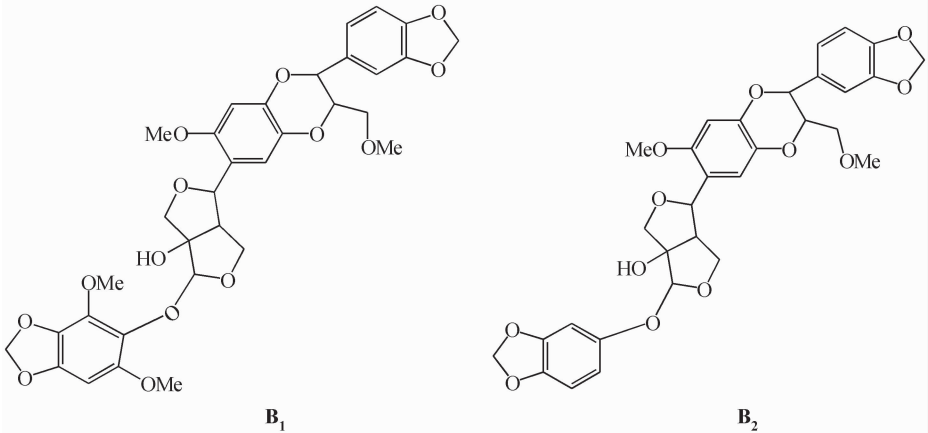
采用孙云沛法^[13]及数据处理系统软件 (SPSS13.0), 计算毒力回归方程和致死中浓度 (LC₅₀) 或致死中量 (LD₅₀) 及其 95% 置信限。

2 结果与分析

2.1 透骨草活性成分的理化数据及结构鉴定

B₁:白色粉末,熔点 175 ~ 176 ℃ (文献值^[9] 173 ~ 175 ℃)。ESI-MS 表明其准分子离子峰[**M** + **Na**]⁺ *m/z* 为 677. 32,结合¹³C NMR 谱给出的分子式 C₃₃H₃₄O₁₄Na (计算值 677. 70),得其相对分子质量为 654,分子式为 C₃₃H₃₄O₁₄。其 ¹H NMR、¹³C NMR、¹H – ¹HCOSY 和 HMBC 谱与文献[9]报道的 C₃₃H₃₄O₁₄双氧木脂素 A 基本一致,故将其鉴定

为双氧木脂素 A。
B₂:白色粉末,熔点 159 ~ 160℃ (文献值^[9] 158 ~ 159 ℃)。ESI-MS 表明其准分子离子峰[**M** – **H**][–] *m/z* 为 592. 92,结合¹³C NMR 谱给出的分子式 C₃₁H₂₉O₁₂(计算值 592. 54),得其相对分子质量为 594,分子式为 C₃₁H₃₀O₁₂。其 ¹H NMR、¹³C NMR、¹H – ¹HCOSY 和 HMBC 谱与文献[9]报道的 C₃₁H₃₀O₁₂双氧木脂素 E 基本一致,故将其鉴定为双氧木脂素 E。
2 个化合物的结构如 **Scheme 1** 所示。



Scheme 1

2.2 杀虫活性

2.2.1 胃毒及触杀活性 在 1 mg/mL 下,化合物 **B₁** 和 **B₂** 对 3 龄小地老虎和小菜蛾无触杀和胃毒活性,对 3 龄粘虫 24 h 的胃毒死亡率均为 100%,触杀死亡率分别为 100% 和 95. 8%,对 3 龄槐尺蠖 24 h

胃毒死亡率分别为 100% 和 33. 3%,触杀死亡率分别为 100% 和 41. 7%,对家蝇成虫 24 h 的胃毒死亡率分别为 100% 和 54. 2%,触杀死亡率分别为 100% 和 50%。进一步的毒力测定结果(表 1)表明:**B₁** 和 **B₂** 对 3 龄粘虫 24 h 的胃毒 LC₅₀值分别为

表 1 供试化合物对 3 种试虫的触杀及胃毒活性
Table 1 Stomach toxicity and topical toxicity of the insecticidal compounds against *M. separata*, *S. cinerearia* and *M. domestica*

化合物 Compd	作用方式 Mode of action	试虫 Tested insects	毒力回归方程 Toxicity regression equation	<i>r</i>	[LC ₅₀ (95% 置信限)/(μg/mL)]/ [LD ₅₀ (95% CL)/(μg/larvae)]
双氧木脂素 A Haedoxane A (B₁)	胃毒活性 Stomach toxicity	粘虫 <i>M. separata</i>	y = 1. 818 6 + 2. 965 2 x	0. 983 2	34. 9 (29. 3 ~ 44. 9)
		槐尺蠖 <i>S. cinerearia</i>	y = 0. 959 3 + 2. 220 4 x	0. 994 5	66. 1 (51. 9 ~ 84. 0)
		家蝇 <i>M. domestica</i>	y = 1. 113 6 + 2. 438 9 x	0. 998 9	39. 2 (31. 3 ~ 49. 1)
	触杀活性 Topical toxicity	粘虫 <i>M. separata</i>	y = 6. 923 9 + 1. 881 4 x	0. 970 1	0. 090 (0. 071 ~ 0. 126)
		槐尺蠖 <i>S. cinerearia</i>	y = 7. 941 3 + 2. 254 3 x	0. 977 8	0. 049 (0. 038 ~ 0. 064)
		家蝇 <i>M. domestica</i>	y = 5. 840 0 + 0. 634 8 x	0. 998 7	0. 047 (0. 006 ~ 0. 077)
双氧木脂素 E Haedoxane E (B₂)	胃毒活性 Stomach toxicity	粘虫 <i>M. separata</i>	y = 1. 599 2 + 1. 973 6 x	0. 988 7	52. 8 (39. 8 ~ 70. 1)
		槐尺蠖 <i>S. cinerearia</i>	y = 1. 011 6 + 1. 237 1 x	0. 985 6	1 675 (851 ~ 329 8)
		家蝇 <i>M. domestica</i>	y = -0. 539 4 + 1. 855 0 x	0. 985 9	969 (673 ~ 139 4)
	触杀活性 Topical toxicity	粘虫 <i>M. separata</i>	y = 6. 388 0 + 2. 387 9x	0. 973 3	0. 260 (0. 197 ~ 0. 355)
		槐尺蠖 <i>S. cinerearia</i>	y = 4. 837 1 + 1. 312 1 x	0. 993 8	1. 33 (0. 759 ~ 2. 333)
		家蝇 <i>M. domestica</i>	y = 4. 976 7 + 0. 472 8 x	0. 990 4	1. 12 (0. 067 ~ 0. 166)

34.9 和 52.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 触杀 LD_{50} 值分别为 0.09 和 0.26 $\mu\text{g}/\text{头}$; 对 3 龄槐尺蠖 24 h 的胃毒 LC_{50} 值分别为 66.1 和 1 675 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 触杀 LD_{50} 值分别为 0.049 和 1.33 $\mu\text{g}/\text{头}$; 对家蝇成虫 24 h 的胃毒 LC_{50} 值分别为 39.2 和 969 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 触杀 LD_{50} 值分别为 0.047 和 1.12 $\mu\text{g}/\text{头}$ 。

2.2.2 中毒症状观察 供试粘虫和槐尺蠖在取食载毒叶片或经药液点滴处理大约 2 h 后, 部分出现中毒症状: 大部分试虫静止不动, 中毒粘虫和槐尺蠖虫体瘫软, 用镊子触及试虫腹部末端毫无反应, 出现麻醉现象直至死亡。家蝇在处理迅速表现出兴奋状态, 频繁从三角瓶顶部落下(对照则多集聚于三角瓶顶部), 之后又迅速爬起或飞行; 稍后大多被击倒, 落于三角瓶底部, 无力飞行, 爬行不稳, 足、翅颤动, 口器和生殖器偶有伸缩; 处理后约 4 h, 部分试虫死亡。

3 结论与讨论

本研究从透骨草根茎中分离鉴定出 2 个具有杀虫活性的化合物 (B_1 和 B_2), 经鉴定其分别为已知物双氧木脂素 A 和双氧木脂素 E, 其中双氧木脂素 E 为首次从透骨草中分离得到。杀虫活性测定结果表明, 化合物 B_1 的杀虫活性明显高于化合物 B_2 。

Yamauchi 等^[14]推测此类透骨草中的双骈四氢呋喃型木脂素的杀虫活性主要与呋喃环上 2 位的羟基有关, 而芳环甲氧基的取代会进一步加强化合物的杀虫活性。化合物 B_1 比 B_2 多了 2 个芳环甲氧基, 本研究中 B_1 对 3 龄粘虫、槐尺蠖和家蝇成虫的胃毒以及触杀活性比 B_2 提高了约 1~30 倍, 进一步证明了 Yamauchi 等的推测。

研究表明, 双氧木脂素 A 和双氧木脂素 E 对 3 龄粘虫、3 龄槐尺蠖和家蝇成虫具有较强的胃毒和触杀活性, 但其对同为鳞翅目的小地老虎和小菜蛾却无活性, 这对于此类化合物的毒理学研究具有重要意义, 其原因还有待进一步研究。

参考文献 (Reference):

[1] 中国土农药编辑委员会. 中国土农药志[M]. 北京: 科学出版社, 1959: 143.
Editorial Committee of Chinese Native Agricultural Drugs. Records of Chinese Native Agricultural Drugs [M]. Beijing: Science Press, 1959: 143. (in Chinese)

[2] LEE S M, MIN B S, KHO Y H. Brine shrimp lethality of the

compounds from *Phryma leptostachya* L. [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(5): 652–654.

[3] PARK I K, SHIN S C, KIM C S, *et al* Larvicidal activity of lignans identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against three mosquito species[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4): 969–972.

[4] SEO S M, PARK I K. Larvicidal activity of medicinal plant extracts and lignan identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against housefly (*Musca domestica* L.) [J]. *Parasitol Res*, 2012, 110(5): 1849–1853.

[5] TANIGUCHI E, OSHIMA Y, PHRYMAROLIN I. A novel lignan from *Phryma leptostachya* L. [J]. *Agric Biol Chem*, 1972, 36: 1018–1025.

[6] TANIGUCHI E, OSHIMA Y. Structure of phrymarolin- II [J]. *Agric Biol Chem*, 1972, 36(9): 1489–1496.

[7] TANIGUCHI E, OSHIMA Y. The structure of a novel lignan, phrymarolin-II from *Phryma leptostachya* L. [J]. *Agric Biol Chem*, 1969, 33(3): 466–468.

[8] TANIGUCHI E, IMAMURA K, ISHIBASHI F, *et al*. Structure of the novel insecticidal sesquigignan, Haedoxan A [J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(3): 631–643.

[9] ISHIBASHI F, TANIGUCHI E. Syntheses of (±)-haedoxan A, D, E and their stereoisomers[J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(6): 1565–1573.

[10] 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)

[11] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987: 23–25.
WU Wenjun. The Experimental Techniques of Plant Protection [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1987: 23–25. (in Chinese)

[12] 周利娟, 黄继光, 徐汉虹, 等. 从华蟹甲草中分离的两种活性成分对家蝇的杀虫活性[J]. 昆虫学报, 2006, 49(1): 74–79.
ZHOU Lijuan, HUANG Jiguang, XU Hanhong, *et al*. Insecticidal activities of two active components from a Chinese indigenous plant, *Sinacalia tangutica* (Maxim.) B. Nord against *Musca domestica vicina* Macquart adults[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(1): 74–79. (in Chinese)

[13] 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.

[14] YAMAUCHI S, TANIGUCHI E. Synthesis and insecticidal activity of lignan analogs (I) [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(12): 3075–3084.

(责任编辑: 金淑惠)