

雷公藤非生物碱分离及对粘虫作用方式研究^{*}

罗都强, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 提取、分离了雷公藤(*Trip terygium wilfordii* Hook)根皮中非生物碱物质,经鉴定其主要成分为总萜内酯,含量为105.3 g/kg。以粘虫为试虫,对非生物碱物质杀虫活性和作用方式进行了系统的生物测定。结果表明,非生物碱对粘虫具有拒食、毒杀、麻醉、触杀和杀卵作用。拒食中质量浓度 AF_{50} 为50.26 mg/L;毒杀中质量浓度 LC_{50} 为34.72 mg/L,麻醉中量 ND_{50} 为13.45 μ g/g,触杀中量 LD_{50} 为3.54 μ g/头,在非生物碱质量浓度为0.5~20 g/L时,34%~65%的粘虫卵不能孵化。

[关键词] 雷公藤; 非生物碱; 粘虫; 杀虫活性

[中图分类号] S482.3⁺9 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1000-2782(2001)04-081-04

雷公藤(*Trip terygium wilfordii* Hook)为卫矛科雷公藤属植物,又名黄藤根、霹雳木、菜虫药。在我国很早以前就用于医学和防治各种害虫,为著名的杀虫植物之一^[1~4]。关于雷公藤杀虫活性成分的研究始于20世纪40年代,美国人Beroza等^[2]先后从雷公藤根皮中提取分离到一系列大环内酯生物碱化合物Wilfordine, Wilforine, Wilfortrine, Wilforine, Wilforzine,并对其杀虫活性进行了测试,发现这些生物碱对欧洲玉米螟初孵幼虫有很强的毒杀活性。自70年代以来,医学界发现雷公藤有明显的抗肿瘤、抗风湿作用,因而对雷公藤的研究转向医学,特别是在分离鉴定抗肿瘤活性成分方面取得很大进展,而作为杀虫活性成分的研究未有大的进展。为此,作者采用生物活性追踪与化学分离相结合的方法,从雷公藤根皮中提取了另一大类杀虫活性物质雷公藤非生物碱,对其主要成分进行鉴定和含量测定,并测试了其对粘虫的作用方式,现将试验初步结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

粘虫 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心养虫室提供。

雷公藤根皮 从福建泰宁县医药公司购回。

雷公藤内酯醇标准品 由福建省医科所药物室提供。

1.2 雷公藤非生物碱提取

参照文献[5]的方法,将雷公藤根皮粉碎后装入提取器中,加入体积分数95% EtOH 加热回流4次。合并提取液,减压回收溶剂。浓缩液加入体积分数5% HCl,浸泡过夜,滤除酸水液,酸不溶物水洗至中性。加EtOAc回流溶解,滤除残渣。母液回收EtOAc得到浅褐色粗提物。粗提物上硅胶柱层析,EtOAc洗脱,TLC检测,喷洒Kedde试剂显色,收集阳性反应洗脱液,回收EtOAc,干燥后得到略带黄色的雷公藤非生物碱粉末。

1.3 雷公藤非生物碱提取物中总萜内酯的鉴定

1.3.1 定性检测 Dragendorff 试验 取提取物少许溶于体积分数1% HCl中,加入碘化铋钾溶液2滴,产生浅黄色沉淀。

Zimmermann 试验 取提取物少许溶于体积分数95% EtOH 中,加入体积分数2%的间二硝基苯与2 mol/L的KOH混合醇溶液2滴,溶液显紫色。

Kedde 试验 取提取物少许溶于体积分数95% EtOH 中,加入体积分数2% 3,5-二硝基苯甲酸与2 mol/L NaOH的混合醇溶液2滴,溶液显紫红色。

开闭环试验 取提取物少许,加入2 mL 质量浓度1.0 mg/L的NaOH溶液,水浴加热煮沸3~4 min,待溶液澄清后取出放冷,滴加体积分数1% HCl使溶液酸化后出现浑浊。

* [收稿日期] 2001-02-16

[基金项目] 高等学校博士点基金(003518); 杨凌农业高新技术产业示范区重大科技开发基金(98A19)

[作者简介] 罗都强(1965-),男,陕西扶风人,讲师,在读博士,主要从事农药毒理学研究。

1.4 非生物碱提取物中总萜内酯含量测定

1.4.1 原理 采用比色法测定含量,利用不饱和五元内酯环上的活性次甲基在碱性溶液中与 Kedde 试剂显色,在 530 nm 处有强吸收峰,吸光度 A 与浓度 C 之间有很好的线性关系,适合于定量分析。

1.4.2 标准曲线的绘制 准确称取雷公藤内酯醇标准品溶液 0.5 mg/mL,吸取 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,放入 10.0 mL 容量瓶中,在各具塞试管中依次加体积分数 95% 乙醇稀释至 4 mL,加入 1 mL Kedde 试剂,放置 30 min 后,以第 1 管作空白,在 530 nm 处测得各管吸光度 A。其标准曲线回归方程 $A = -0.0199 + 8.25C$, $r = 0.9912^{**}$ 。

1.4.3 提取物中总萜内酯含量测定 分别称取雷公藤非生物碱提取物 20.4, 20.9, 20.8 mg, 加入体积分数 95% EtOH 溶解于 10 mL 容量瓶中,定容至 4 mL,加入 1 mL Kedde 试剂。在 UV 120-02 型岛津分光光度仪上测吸光度 A,去离子水做空白对照,波长 530 nm,其余条件不变。根据标准曲线计算总萜内酯含量。

1.5 生物活性测定

1.5.1 拒食及毒杀作用 采用张兴等^[6]的小叶碟添加法,测定对粘虫的生物活性,每处理用虫 10 头,重复 3 次。于 96 h 统计取食量,计算拒食率;观察死亡数,计算死亡率。

1.5.2 麻醉作用 按改进的夹毒叶片法测定^[7]。将供试样品用丙酮稀释成 1 000 和 500 mg/L 两种质量浓度,在 0.6 cm 的叶碟上用 1.049 μ L 微量注射器均匀涂在叶片上,制成夹毒叶片。将从田间采回的

5 龄幼虫饥饿 4 h,逐头称重后置于直径 5 cm 的养虫盆。共用 200 头试虫,于 25 $^{\circ}$ C 温室饲养,8 h 后弃除未吃完夹毒叶片的试虫,换上无毒叶片,再经 2 h 检查试虫是否麻醉。虫体平直、瘫痪、镊子尖刺其尾部,试虫无反应者为麻醉,然后按照杀虫剂胃毒毒力的测定方法,统计样品的麻醉中量 ND_{50} 。

1.5.3 触杀作用 采用毛细管点滴法进行。按不同剂量设置 5 个药剂处理。用点滴量为 1.049 μ L 的毛细管点滴器施药液于试虫前胸背板。点滴后于 25 $^{\circ}$ C 下饲养,每处理 30 头,96 h 检查死亡数,统计死亡率。

1.5.4 杀卵作用 采用浸卵法测定。用丙酮将雷公藤非生物碱稀释成不同质量浓度,把已数好的粘虫卵块放入不同质量浓度药液中浸 5 s,取出置于吸水纸上,待丙酮挥发完后,放入干净的垫有滤纸的直径 9 cm 的玻璃培养皿中,加水 1~2 滴保湿,移到温室下培养,逐日观察卵孵化及幼虫死亡数,计算 5 d 卵孵化率和幼虫存活率。

2 结果与分析

2.1 定性检测

经 Dragendorff、Zimmermann、Kedde、开闭环试验,发现提取物溶液产生浅黄色沉淀,溶液显紫色、溶液显紫红色、酸化出现浑浊等现象,因此可推断该非生物碱提取物主要成分为总萜内酯。

2.2 雷公藤非生物碱中总萜内酯含量

总萜内酯含量测定结果见表 1。由表 1 可见,总萜内酯含量平均值为 105.3 g/kg。

表 1 雷公藤非生物碱提取物中总萜内酯含量

Table 1 The terpenoids content of non-alkaloids from *Tripterygium wilfordii*

重复次数 Treat	样品重量/mg Weight	吸光度 Absorbance	总萜内酯含量/(g·kg ⁻¹) Total content of the terpenoids	总萜内酯含量 平均值/(g·kg ⁻¹) Average content of the terpenoids
1	20.4	1.430	103.5	105.3
2	20.9	1.204	106.5	
3	20.8	1.199	106.0	

2.3 生物活性

2.3.1 拒食及毒杀作用 拒食作用测定结果(表 2)表明,雷公藤非生物碱对 5 龄粘虫的拒食作用随质量浓度增大而提高。以其质量浓度对数(X)为自变量,拒食率的机率值(Y)为因变量作回归,则 $Y = 2.0454 + 1.7368X$, $AF_{50} = 50.26$ mg/L, $\chi^2 = 0.45$ 。

毒杀作用测定结果(表 2)表明,雷公藤非生物碱对 5 龄粘虫有毒杀作用,其回归方程 $Y = 2.9330 +$

$1.3417X$, $LC_{50} = 34.72$ mg/L, $\chi^2 = 0.0918^{**}$ 。处理后的幼虫大多数在体表出现黑斑,死亡时虫体瘫软、失水、极度缩短死亡。

2.3.2 麻醉作用 雷公藤非生物碱对粘虫具有很强的麻醉作用,取食一定量处理叶片后,幼虫在叶片周围慢慢爬动,4 h 开始麻醉,10 h 大部分试虫麻醉,麻醉后虫体柔软,可随意弯曲,经过约 24 h 后复苏。苏醒后取食少量处理叶片,又进入麻醉,不断重复。为此,作者按照测定杀虫剂胃毒毒力的方法计算

10 h 的麻醉中量 ND_{50} , 测定结果见表 3。由表 3 求 正常平均剂量)/2= 13 452 $\mu\text{g/g}$
出麻醉中量 ND_{50} = (中间组麻醉平均剂量+ 中间组

表 2 雷公藤非生物碱对 5 龄粘虫的拒食和毒杀作用

Table 2 Antifeeding and toxicity activity of the non-alkaloids from *Trip terygium w ilford ii* against the 5 th instarts larval of *L eucania separata* Walker

非生物碱质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	平均取食量(叶碟数) A verage feeding amounts (the number of foliage dishes)	平均拒食率/% A verage antifeeding rate	校正死亡率/% Corrected mortality	平均拒食 率机率值 Y	校正死亡 率机率值 Y
20	150	25.3	38.0	4.3349	4.6945
40	120	40.3	51.7	4.7544	5.0426
80	22.7	63.8	69.0	5.3531	5.4959
160	30.3	85.0	82.7	6.0364	5.9424
320	20.4	89.9	89.5	6.2759	6.2536
CK	201	—	—	—	—

表 3 雷公藤非生物碱对 5 龄粘虫的麻醉作用

Table 3 Narcosis of the non-alkaloids from *T rip terygium w ilford ii* against the 5 th instars larval of *L eucania separata* Walker

中间组反应 Reaction of middle group	数量 N umber	最低剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) M in i n u m dosage	最高剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) M a x i u m dosage	平均剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) A verage dosage
存活 Survival	13	5.9146	22.6078	10.8811
麻醉 Narcosis	29	5.7322	22.9918	16.0153

2.3.3 触杀作用 采用毛细管点滴法测定的触杀作用结果见表 4。由表 4 可以看出, 雷公藤非生物碱物质对粘虫具有触杀作用。质量浓度对数(X)和校正死亡率的机率值(Y)之间的回归方程 $Y = -0.2634 + 1.4916X$, $LC_{50} = 3377.87 \text{ mg/L}$, $\chi^2 = 0.5895^{**}$, 用点滴量为 $1.049 \mu\text{L}$, 故 $LD_{50} = 3377.87 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 1.049 \mu\text{L}/\text{头} = 354 \mu\text{g}/\text{头}$ 。

2.3.4 杀卵作用 由表 5 可见, 用雷公藤非生物碱的丙酮溶液处理后, 在非生物碱质量浓度为 0.5~20 g/L 时, 34%~65% 的粘虫卵不能孵化; 即使孵化, 绝大多数幼虫亦在短时间内死亡, 非生物碱质量浓度为 0.5 g/L 时, 孵化幼虫的存活率为 27.0%, 质量浓度为 20 g/L 时, 孵化幼虫存活率为 9.4%。

表 4 雷公藤非生物碱对 5 龄粘虫的触杀作用

Table 4 Contact toxicity of the non-alkaloids from *T rip terygium w ilford ii* against the 5 th instars larval of *L eucania separata* Walker

非生物碱质量浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	校正死亡率机率值 Y
1 000	23.3	20.6	4.1796
2 000	43.3	41.4	4.7827
4 000	53.3	51.7	5.0426
8 000	60.0	58.6	5.2173
10 000	90.0	89.7	6.2646
CK	3.3	—	—

表 5 处理 5 d 后卵的孵化及存活

Table 5 L iving and hatching of eggs 5 days after treating

处理质量浓度/ (g · L ⁻¹) Treating concentration	供试卵粒数 N umber of eggs for treating	孵化卵粒数 Hatching eggs num ber	未孵化卵粒数 U n-hatching eggs num ber	孵化率/% Hatching ratio	存活幼虫数 L iving larvae	幼虫存活率/% L iving larvae ratio
0.5	150	98	52	65.3	25	27.0
20	150	53	97	35.3	5	9.4
CK	150	150	0	100	136	90.7

3 结果与讨论

试验结果表明,雷公藤中除生物碱外,非生物碱也是其另一类主要杀虫物质,因其主要含有总萜内酯化合物,含量为 105.3 g/kg,对粘虫有拒食、毒杀、麻醉及杀卵作用。

同时在试验过程中,还观察到雷公藤非生物碱对菜青虫(*Pieris rapae* L.)有多种作用方式,对玉米象(*Sitophilus zeamismotsh*)有一定的胃毒作用,

对棉铃虫(*Helicoverpa armigera* (Hubner))也有一定的抑制生长发育作用。据此作者认为,雷公藤非生物碱也是雷公藤中除生物碱外的另一类主要杀虫成分,其杀虫活性成分可能是二萜内酯化合物。详细的杀虫谱值得进一步确定。

在此基础上,采用生物活性追踪的方法,首次从非生物碱中分离到了具有触杀活性的二萜内酯单体活性成分,目前鉴定工作正在进行之中。

[参考文献]

- [1] 陈同素. 国产杀虫药雷公藤研究[J]. 中华化学工业杂志, 1934, 9(2): 20
- [2] Beroza M, Bottger G T. The insecticidal value of *Tripterygium wilfordii* [J]. Econ Entomol, 1954, 47(1): 188- 199
- [3] 罗都强, 张 兴, 冯俊涛. 杀虫植物雷公藤研究进展[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(3): 84- 89
- [4] 罗都强, 张 兴. 雷公藤非生物碱对菜青虫杀虫活性研究[J]. 农药学报, 2000, 2(4): 94- 96
- [5] 徐礼桑. 中草药有效成分分析法(下)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 374- 376
- [6] 张 兴, 潘文亮. 缓效型杀虫剂室内生物测定的药效计算和评价[J]. 北京农业科学, 1989, (3): 6- 10
- [7] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 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, 1997

Isolation and bioactivities of the non-alkaloids from *Tripterygium wilfordii* against *Leucania separata* Walker

LUO Du-qiang, ZHANG Xing

(Biorational Pesticides Research and Service Center, Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The non-alkaloids were extracted from the root bark of *Tripterygium wilfordii* Hook and identified. The results of bioassay showed that the non-alkaloids have obviously insecticidal activities to *Leucania separata* Walker. LC_{50} value of poisoning to the 5th instars of *Leucania separata*, is 34.72 mg/L. The value of medium antifeeding concentration (AF_{50}) of the non-alkaloids extracts against the 5th larval of *Leucania separata* is 50.25 mg/L. Median narcosis dose (ND_{50}) is 13.45 μ g/g. Median contact dose (LD_{50}) is 3.54 μ g/head. When the concentration of the non-alkaloids is 0.5- 20 g/L, the unhatching of eggs ratio is 34% - 60%.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook; Non-alkaloids; *Leucania separata* Walker; insecticidal activity