

广西地不容的杀虫活性及有效成分研究

邓业成^{1, 2}, 徐汉虹²

(¹广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004; ²华南农业大学昆虫毒理研究室/农药与化学生物学教育部重点实验室, 广州 510642)

摘要: 首次研究了广西地不容的杀虫活性及有效成分。结果表明, 广西地不容植株各部位对褐飞虱均有触杀活性, 而以块根甲醇提取物的活性最高, LD₅₀值为 1.5794 μg/头。通过活性跟踪, 从块根提取物中分离鉴定出主要杀虫有效成分 *l*-罗默碱, 其对褐飞虱具有很高的触杀毒性, LD₅₀值为 0.0443 μg/头, 是防治褐飞虱的化学杀虫剂马拉硫磷毒力的 7.48 倍。*l*-罗默碱对褐飞虱也有胃毒杀虫作用。

关键词: 广西地不容; 杀虫活性; 褐飞虱; *l*-罗默碱

Studies on Insecticidal Activities and Active Ingredients of *Stephania kwangsiensis* Lo.

DENG Ye-cheng^{1,2}, XU Han-hong²

(¹ College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004; ² Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University/ Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Guangzhou 510642)

Abstract: Insecticidal activities and active ingredients of *Stephania kwangsiensis* were studied for the first time. The results showed that all parts of *Stephania kwangsiensis* had contact activity to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, and the contact activity of methanol extract from tuber was highest, with a LD₅₀ value being 1.5794 μg/female. *l*-roemerine was isolated from tuber of *Stephania kwangsiensis* and identified, and it was the main active ingredient. *l*-roemerine had high contact toxicity to brown planthopper, with a LD₅₀ value being 0.0443 μg/female. Contact toxicity of *l*-roemerine to brown planthopper was 7.48 times that of malathion, the conventional chemical insecticide used for controlling brown planthopper. *l*-roemerine had also stomach poison activity to brown planthopper.

Key words: *Stephania kwangsiensis* Lo.; Insecticidal activities; Brown planthopper; *l*-roemerine

广西地不容 (*Stephania kwangsiensis* Lo.) 属防己科千金藤属多年生草质落叶藤本植物。主产于广西西北部至西南部, 生于石灰岩地区的山地灌丛^[1]。块根中生物碱含量达 3%~4%, 其中 *l*-四氢巴马亭 (颠痛定) 含量超过 2%。到目前为止, 已从广西地不容块根中分离出 12 个异喹啉生物碱^[2~4]。广西地不容主要应用于医药领域, 其块根是生产中药颠痛定的重要原料, 在临床上用于镇痛、镇静、解热等^[5,6]。其中所含有的其它生物碱也各有药理作用。至今未见有关广西地不容杀虫作用的报道。作者在杀虫植物活性筛选中, 发现广西地不容提取物对褐飞虱有很高的杀虫活性。在此基础上, 进一步对其有效成分进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål): 从田间采集褐飞虱成虫或若虫 300 头左右, 放在网室中分蘖至孕穗期的威优 747 水稻上饲养 1~2 代。待其种群繁殖到足够数量时, 用长翅雌成虫或 3 龄若虫作为供试昆虫。

主要仪器: Finnigan-4510 型质谱仪 (美国 TSP 公司), DRX-400 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司), 4001 型旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司)。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的提取 将采集的广西地不容块根、

收稿日期: 2004-09-06

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (036837)

作者简介: 邓业成 (1965-), 男, 广西全州人, 副研究员, 博士, 主要从事植物保护及植物源农药研究。Tel: 0773-5840024; E-mail: dyecheng@163.com

cm、高 20 cm 的大试管中, 再将大试管直立在抽气瓶中。剪取分蘖期水稻稻茎 3 支, 浸入大试管的药液中, 塞紧抽气瓶塞子, 抽气 30 min 左右, 待稻茎表面基本无气泡冒出时, 打开瓶塞放气, 使药液吸入稻茎中。5 min 后取出稻茎, 放入清水中漂洗 2 min, 洗去稻茎表面的药液, 晾干。将用药液处理过的稻茎 1 支插在养虫笼的海绵垫剪口中(养虫笼与 1.2.3 同), 接入褐飞虱 3 龄若虫 25 头, 每浓度重复 3 次, 共用虫 75 头。试虫放在温度 (25±1)℃, 相对湿度 75%~85%, 每日光照 16 h 的光照培养箱中饲养, 48 h 检查死虫数, 用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度(LC₅₀)、

LC₅₀ 值的 95%置信限等。

2 结果与分析

2.1 广西地不容植株不同部位提取物对褐飞虱的触杀毒力

测定了广西地不容块根、须根、种子和茎叶 4 个部分甲醇提取物对褐飞虱的触杀毒力, 结果见表 1。块根、须根、种子、茎叶对褐飞虱的 LD₅₀ 值分别为 1.5794、5.9615、14.1559、16.9254μg/头, 块根的毒力最高, 茎叶的毒力最低, 块根毒力是茎叶的 10.72 倍, 须根的毒力居中, 种子与茎叶毒力相差不大。

表 1 广西地不容植株各部位甲醇提取物对褐飞虱长翅雌成虫的触杀毒力

Table 1 Contact toxicity of methanol extracts from different parts of <i>Stephania kwangsiensis</i> to brown planthopper						
植株部位 Parts of plant	提取率 (%) Extracted rate	毒力回归方程 Toxicity regression equation	X ²	S _b	LD ₅₀ (95%置信限) (μg/♀) LD ₅₀ (95% confidence interval)	相对毒力 Relative toxicity
块根 Tuber	18.70	y=4.4259+2.8925x	6.70	0.3082	1.5794(1.0987~2.0600)	10.72
须根 Small roots	12.94	y=2.8628+2.7564x	4.91	0.2924	5.9615(3.7724~8.1507)	2.84
种子 Seed	12.88	y=1.6277+2.9301x	0.87	0.1358	14.1559(8.5258~19.7860)	1.20
茎叶 Stem and leaf	9.70	y=2.2155+2.2655x	2.20	0.2827	16.9254(9.3648~24.4861)	1

2.2 广西地不容块根提取物初步分离各部分对褐飞虱的触杀毒力

由于广西地不容块根提取物对褐飞虱的触杀毒力最高, 所以选择块根进一步研究其有效成分。首先按照 1.2.2 的方法对其提取物进行了初步分离, 并测定了初分各部分对褐飞虱的触杀毒力, 结果见表 2。第 II 部分对褐飞虱的触杀毒力最高, LD₅₀ 值为 0.3106 μg/

头, 第 I 部分触杀毒力最低, LD₅₀ 值为 3.9705 μg/头, 前者是后者的 12.78 倍。第 III、IV、V、VI 部分触杀毒力差异不大, LD₅₀ 值分别为 1.8318、1.1313、1.0184 和 1.0888 μg/头。广西地不容块根提取物初分的 6 个部分中, 第 II 部分对褐飞虱的活性是其余 5 个部分的 2.17~12.78 倍。说明主要的杀虫有效成分存在于第 II 部分中。

表 2 广西地不容块根提取物初步分离各部分对褐飞虱长翅雌成虫的触杀毒力

Table 2 Contact toxicity of preliminarily isolated parts of extract from tuber of <i>Stephania kwangsiensis</i> to brown planthopper					
初分各部分 Isolated parts	毒力回归方程 Toxicity regression equation	X ²	S _b	LD ₅₀ (95%置信限) (μg/♀) LD ₅₀ (95% confidence interval)	相对毒力 Relative toxicity
I	y=4.1073+1.4908 x	3.20	0.1670	3.9705(2.4630~5.4781)	1
II	y=5.9577+1.8859 x	2.89	0.3939	0.3106(0.2039~0.4173)	12.78
III	y=4.6648+1.2750 x	3.64	0.1174	1.8318(1.2559~2.4077)	2.17
IV	y=4.9044+1.7840 x	0.34	0.0430	1.1313(0.7274~1.5352)	3.51
V	y=4.9886+1.4445 x	2.77	0.1722	1.0184(0.6666~1.3702)	3.90
VI	y=4.9608+1.0615 x	1.59	0.1188	1.0888(0.7299~1.4477)	3.65

2.3 广西地不容块根有效成分的分离纯化及结构鉴定

2.3.1 有效成分的分离纯化 对杀虫活性最高的第 II 部分进行柱层析分离。样品 7 g, 用少量丙酮溶解, 用 20 g 110~149 μm 的普通硅胶拌样, 200 g 48~74 μm 硅胶装柱, 以氯仿/甲醇溶剂系统梯度洗脱。共获得 50 个流分, 相同流分合并后, 得 12 个组分。

测定了各组分对褐飞虱的触杀活性, 结果见表 3。在 12 个组分中, 第 3 组分对褐飞虱长翅雌成虫的触杀活性最高, 用 1μg/头点滴处理, 24 和 48 h 校正死亡率分别为 68.07%和 95.38%。其余 11 个组分对褐飞虱的触杀活性均很低, 用 1 μg/头点滴处理, 24 和 48 h 校正死亡率分别为 0~16.62%和 0~21.35%。由此可

知,对褐飞虱的主要杀虫有效成分存在于第3组分中。

表3 第II部分柱层析各组分对褐飞虱长翅雌成虫的触杀活性

Table 3 Contact activity of components from chromatography to brown planthopper

组 分 Components	校正死亡率 ($\bar{X} \pm SE$) (%) Corrected mortality	
	24 h	48 h
1	15.12±3.34 b	17.90±3.22 bc
2	12.34±1.58 bc	21.35±1.84 b
3	68.07±3.04 a	95.38±2.60 a
4	7.32±1.40 cd	10.23±1.13 de
5	16.62±2.77 b	16.62±2.57 bcd
6	0±0 e	0±0 f
7	0±0 e	4.35±2.48 ef
8	4.55±2.62 de	6.13±1.47 ef
9	0±0 e	0±0 f
10	0±0 e	4.69±2.63 ef
11	11.49±2.59 bc	14.45±1.12 cd
12	3.12±1.56 de	4.57±2.51 ef

剂量为 1μg/头; 同列数据后标有相同字母者表示在 5%水平上差异不显著(DMRT)。

The dose is 1μg/♀; The same letters show that the difference is not significant at 0.05 level(DMRT)

对第3组分再进行硅胶柱层析分离,样品2.2g,用少量丙酮溶解,用6g 110~149 μm 的普通硅胶拌样,60g 48~74 μm 硅胶装柱,石油醚/丙酮溶剂系统梯度洗脱,以50 ml 为1个流分,得83个流分。相同流分合并,得7个组分,即1~9、10~11、12~35、36~43、44~48、49~82、83。经杀虫活性测定,组分12~35对褐飞虱有很高的触杀活性,其余组分无活性。组分12~35静置,让溶剂挥发,析出结晶。经过多次重结晶后,获得纯化合物327 mg。

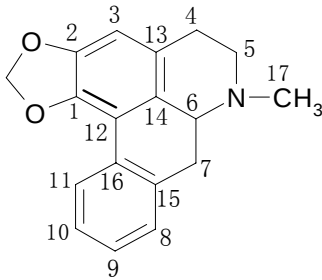
表4 化合物的核磁共振谱(¹H、¹³C)数据

Table 4 Data of ¹³C NMR and ¹H NMR of compound

碳位 C-position	δ _C	δ _H
1	143.1	
2	148	
3	108.2	6.60, s
4	28.9	2.61~2.71,m
5	53.8	3.12~3.17,m
6	62.7	3.26~3.35,m
7	34.3	2.61~2.71,m
8	127.3	
9	127.6	7.23~7.32, (3H, m)
10	127.8	

2.3.2 化合物的结构鉴定 化合物的结构主要通过核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、质谱的解析,以及与有关文献报道的数据进行比较来确定。

纯化合物在石油醚-乙醚中重结晶,为乳黄色簇晶。溶于丙酮、乙醚、乙醇。EI-MS(m/z): 281(M⁺), 278, 236, 124, 109, 44。核磁共振氢谱和碳谱数据归属见表4。综合以上数据,并与文献[2]报道的数据进行比较,鉴定纯化合物为*l*-罗默碱。化学结构如下:



2.4 *l*-罗默碱对褐飞虱的触杀和胃毒毒力

用毛细管微量点滴法测定了*l*-罗默碱对褐飞虱的触杀毒力,结果见表5。*l*-罗默碱对褐飞虱的LD₅₀值为0.0443 μg/头,其触杀毒力是广西地不容块根提取物毒力的35.68倍,说明随着有效成分的浓缩和纯化,对褐飞虱的杀虫活性大幅度提高。与防治褐飞虱的化学杀虫剂马拉硫磷比较,*l*-罗默碱的毒力比马拉硫磷高,是马拉硫磷毒力的7.48倍,说明*l*-罗默碱对褐飞虱的触杀毒力高。

用稻茎吸药法测定了*l*-罗默碱对褐飞虱3龄若虫的胃毒毒力,结果见表6。*l*-罗默碱对褐飞虱的LC₅₀值为0.7277 mg·ml⁻¹,是块根提取物毒力的23.02倍。说明*l*-罗默碱对褐飞虱有胃毒活性。

碳位 C-position	δ _C	δ _H
11	128.5	8.02, m
12	117.0	
13	129.1	
14	126.0	
15	135.9	
16	131.6	
17	43.2	2.96, s
C ₂ -OCH ₃		6.12, d(1.0)
C ₁ -OCH ₃		5.97, d(1.0)

表 5 *l*-罗默碱对褐飞虱长翅雌成虫的触杀毒力

Table 5 Contact toxicity of *l*-roemerine to brown planthopper

样品	毒力回归方程	X^2	S_b	LD ₅₀ (95%置信限) (μg/♀)	相对毒力
Sample	Toxicity regression equation			LD ₅₀ (95% confidence interval)	Relative toxicity
<i>l</i> -罗默碱 <i>l</i> -roemerine	$y=7.3736+1.7532x$	5.00	0.1930	0.0443(0.03143~0.05711)	35.68
块根提取物 Extract of tuber	$y=4.4259+2.8925x$	6.70	0.3082	1.5794(1.0987~2.0600)	1
马拉硫磷 Malathion	$y=5.7795+1.6248x$	2.07	0.1435	0.3313(0.2346~0.4281)	4.77

表 6 *l*-罗默碱对褐飞虱 3 龄若虫的胃毒毒力

Table 6 Stomach poison toxicity of *l*-roemerine to the third instar nymph of brown planthopper

样品	毒力回归方程	X^2	S_b	LC ₅₀ (95%置信限) (mg·ml ⁻¹)	相对毒力
Sample	Toxicity regression equation			LC ₅₀ (95% confidence interval)	Relative toxicity
<i>l</i> -罗默碱 <i>l</i> -roemerine	$y=5.1921+1.3916x$	1.66	0.6806	0.7277(0.4762~0.9791)	23.02
块根提取物 Extract of tuber	$y=2.5404+2.0094x$	3.42	0.2033	16.7529(11.0737~22.4321)	1

3 结论与讨论

广西地不容植株各部位对褐飞虱均有触杀活性，而以块根甲醇提取物的活性最高，LD₅₀ 值为 1.5794 μg/头。采用活性跟踪法，从块根提取物中分离鉴定出有效成分 *l*-罗默碱，其对褐飞虱具有很高的触杀毒力，LD₅₀ 值为 0.0443 μg/头。与防治褐飞虱的化学杀虫剂马拉硫磷比较，*l*-罗默碱的毒力是马拉硫磷毒力的 7.48 倍。*l*-罗默碱对褐飞虱也有胃毒杀虫作用。至于 *l*-罗默碱对其它昆虫是否有杀虫活性，有待进一步研究。

广西地不容是一种很重要的中草药，含有丰富的生物碱，目前主要用来提取中药镇痛定（*l*-四氢巴马亭），对该植物中其它多种生物碱还未进行开发利用。本文首次发现 *l*-罗默碱对褐飞虱有很高的触杀活性，可望开发成新型商品杀虫剂，为该植物利用于农药领域，为综合开发利用广西地不容提供了理论依据。*l*-罗默碱是一种新发现的杀虫化合物，其杀虫活性高，结构与现有化学杀虫剂不同，可为创制新型结构的杀虫剂提供新的先导化合物，具有很好的开发应用前景。

References

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第三十卷第一分册). 北京: 科学出版社, 1996: 40-70.
Editorial Committee of Records of Chinese Plants, Chinese Academy of Sciences. *Records of Chinese Plants*(Vol.30, No.1), Beijing: Science Press, 1996: 40-70.(in Chinese)

[2] 闵知大, 钟守明. 广西地不容生物碱的研究. 药学报, 1980, 15(9): 532-537.
Min Z D, Zhong S M. Studies on Alkaloids of *Stephania kwangsiensis* Lo. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1980, 15(9): 532-537. (in Chinese)

[3] 成桂仁, 王桂青, 文永新. 广西地不容生物碱的研究. 中草药, 1981, 12(4): 6-8.
Cheng G R, Wang G Q, Wen Y X. Studies on Alkaloids of *Stephania kwangsiensis* Lo. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1981, 12(4): 6-8. (in Chinese)

[4] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容块根生物碱成分研究. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(4): 73-77.
Deng Y C, Xu H H. Alkaloids from the tubers of *Stephania kwangsiensis* Lo. *Journal of Guangxi Normal University(Edition of Natural Sciences)*, 2004, 22(4): 73-77. (in Chinese)

[5] 王宪楷, 赵同芳. 千金藤属植物中生物碱成分的分布及其生物活性. 中国药学杂志, 1990, 25(1): 3-5.
Wang X K, Zhao T F. Distributions and biological activities of alkaloids from genus *Stephania*. *Journal of Chinese Pharmacy*, 1990, 25(1): 3-5. (in Chinese)

[6] 金国章. 左旋四氢巴马汀和它的第二代新药—左旋千金藤啶碱的药理研究进展. 药学报, 1987, 22(6):472-480.
Jin G Z. Pharmacologic Progress of *l*-tetrahydropalmatine and its second generation new drugs— *l*-Stepholidine. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1987, 22(6):472-480. (in Chinese)

[7] 肖崇厚主编. 中药化学. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 94-95.
Xiao C H. *Chemistry of Traditional Chinese Medicine*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1997: 94-95. (in Chinese)

[8] 谭福杰. 农业害虫抗药性测定方法. 南京农业大学学报, 1987, (4):107-122.
Tan F J. Methods for determination of resistance in agricultural insects. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1987, (4):107-122. (in Chinese)

[9] Xenou-Kokoletsi M, Christias C. A simple and rapid technique for assaying toxicants in aphids. *Journal of Applied Entomology*, 2002, 126:108-113.

(责任编辑 王红艳)