

何首乌杀虫活性成分的分离纯化及初步鉴定

李春英^{1,2}, 刘廷辉¹, 岳建明^{1,3}, 卢曦¹, 董文芳¹, 何运转¹

(1. 河北农业大学 植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001;

2. 华北制药集团爱诺有限公司, 河北 石家庄 052365; 3. 先正达(中国)投资有限公司, 河北 保定 071001)

摘要: 为研究与开发安全性高的新型植物源杀虫剂, 本试验用 70%乙醇对何首乌进行粗提, 粗提物用大孔吸附树脂进行初步分离, 50%乙醇洗脱馏分用乙酸乙酯进行萃取, 乙酸乙酯萃取物用硅胶柱层析进一步分离, 洗脱馏分 E 用高效液相色谱进行初步鉴定。50%乙醇洗脱馏分的生长抑制作用高于水洗脱馏分; 乙酸乙酯萃取物的生长抑制作用高于水萃取物; 洗脱馏分 E 对棉铃虫的生长抑制作用较好。何首乌中对棉铃虫具有杀虫活性的主要成分为 E 洗脱馏分。

关键词: 何首乌; 天然产物; 棉铃虫; 杀虫活性

中图分类号: S482.2

文献标志码: A

Isolation and structural identification of insecticidal activities produced by *Polygonum multiflorum* Thunb.

LI Chun-ying^{1,2}, LIU Ting-hui¹, YUE Jian-ming^{1,2}, LU Xi¹, DONG Wen-fang¹, HE Yun-zhuan¹

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei/Biological Control Center of Plant Diseases and Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China; 2. North China Pharmaceutical Group AINO Co., Ltd, Shijiazhuang 052365, China;

3. Syngenta(China)Investment Co., Ltd, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to research and develop a new botanical insecticide, isolation and structural identification of insecticidal activities produced by *Polygonum multiflorum* Thunb. were carried out. The *P. multiflorum* was extracted by 70% ethanol. The crude extract was separated by using the method of Macroporous resin. The 50% ethanol was extracted by ethyl acetate. Then, further separation was conducted by the method of Silica gel column chromatography. Finally, the E fraction was identified by HPLC. The bioassay results showed that the extracts of 50% ethanol fraction had stronger inhibition than the distilled water fraction; the extracts of ethylacetate components had stronger inhibition than the distilled water components; The E fraction had the strongest inhibition. The E fraction of *P. multiflorum* was the insecticidal composition.

Keywords: *Polygonum multiflorum*; natural product; *Helicoverpa armigera*; insecticidal activity

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 河北省中药材产业技术体系(0402009)。

作者简介: 李春英(1985-), 女, 河北省石家庄人, 硕士, 助工, 从事农药制剂的研发工作。

通讯作者: 何运转(1963-), 女, 博士, 教授, 主要从事昆虫生理、毒理学方面的研究。

我国是一个农业大国,在农业生产中由害虫造成的损失占农作物损失总量的15%以上,因此害虫防治是农业生产中的一项重要任务。杀虫剂在农业生产中发挥着十分重要的作用。但化学杀虫剂的广泛使用导致残留、抗性和再猖獗等问题日益严重^[1]。因此寻求新型的无公害杀虫剂已经成为当务之急。植物源杀虫剂一般具有高效、低毒、选择性高、不使害虫产生抗药性等优点^[2]。因此研究和开发这类新型的无公害杀虫剂具有重要的理论意义和广阔的应用前景。

全世界约有植物50多万种,高等植物近30多万种,植物资源十分丰富。业已对6000多种植物次生代谢物或者植物提取物进行了生物活性筛选,发现有2000多种化合物具有杀虫活性。我国植物资源异常丰富,高等植物约有3万多种,而有毒植物约占1万多种,它们大多具有杀虫、杀菌效果^[4-5]。随着有机农业的不断发展和农业商品的进一步全球化,植物源农药在高附加值经济作物上的应用更具潜力^[5]。何首乌,又称首乌、赤首乌等,为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)的干燥块根,具有抗衰老、增强免疫力、抗菌、调血脂等多方面的药理作用。研究证明,何首乌中含有生物活性成分主要有3大类:二苯乙烯苷类化合物、蒽醌类及磷脂类^[6]。迄今为止,有关何首乌的生物活性研究尚未见报道,因此研究何首乌对棉铃虫的杀虫活性并对其有效成分进行提取分离、纯化及结构鉴定,旨在为开发新颖的先导化合物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)相对敏感品系,由南京农业大学提供。室内进行人工饲养(温度26~27℃,相对湿度65%~75%)^[7],选取发育整齐的3龄幼虫(8~12 mg)作为试虫。

1.1.2 供试药材 何首乌块根采自河北省邢台市内丘县西部山区。

1.1.3 仪器与试剂 高效液相色谱(美国安捷伦公司 Agilent 1200LC);摇床(中国哈尔滨东联技术开发有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣仪器厂);离心机(centrifuge 5810R eppendorf);乙酸乙酯、苯、甲酸、乙醇均为分析纯;甲醇为高效液相色谱纯;

柱层析硅胶(100~200目);薄层层析硅胶 GF254;S-8型树脂。

1.2 方法

1.2.1 何首乌粉的制备 将何首乌块茎切片用理化干燥箱在60℃下烘干,用粉碎机充分粉碎,过40目筛($\phi=0.635$ mm,光照14L:10D),制成何首乌干粉,放入4℃冰箱中密封保存备用。

1.2.2 何首乌70%乙醇提取物的制备 取何首乌干粉20 g,加入5倍量70%乙醇,采用超声波和间歇震荡相结合的方法进行定量提取,将浸提液滤出,重复3次,合并滤液,用旋转蒸发仪浓缩至膏状,放入4℃冰箱备用。

1.2.3 大孔吸附树脂分离纯化醇提取物及各分离馏分对棉铃虫生长发育的影响 ①树脂柱分离纯化醇提取物。大孔吸附树脂(S-8型树脂)预处理参考陈同来等的方法^[8]:用乙醇浸泡24 h后,倒出浸泡液,再用去离子水洗净乙醇(洗涤液在试管中加水不浑浊),然后转入酸碱处理,先用5%的盐酸溶液浸泡3 h后用去离子水洗至中性,再用5%的氢氧化钠溶液浸泡3 h后用去离子水洗至中性,备用。

上样液的制备^[9]:称取何首乌浸膏30 g,第1次加水500 mL,超声(100 kHz,30 min),离心(3000 r/min,30 min),残渣再加水500 mL,同法处理,合并2次离心上清液。减压浓缩,备用。

上样洗脱:选用40 mm×100 cm的玻璃管柱,按湿法装柱,装柱后平衡12 h,上样量2 g。将树脂柱用水洗脱5倍树脂体积,再用50%乙醇洗脱至流出液近无色,分别收集水和50%乙醇洗脱液,回收溶剂,减压干燥,洗脱液流速为2 mL/min。

②活性成分的追踪。采用饲料混毒法,配成浓度为0.2%的人工饲料(每100 g饲料中含0.2 g物质)。以发育整齐已知体重的棉铃虫3龄幼虫为试虫,进行单管饲喂,每处理30头,每2 d换1次处理饲料,第5天换成正常饲料,以正常饲料作对照。分别于第1,3,5,7天称重,并观察试虫的生长发育状况直至羽化。计算体重抑制率、化蛹率、羽化率和校正死亡率等。

$$\text{校正死亡率(\%)} = \frac{\text{处理组死亡率(\%)} - \text{对照组死亡率(\%)}}{1 - \text{对照组死亡率(\%)}} \times 100$$

1.2.4 薄层层析分离50%乙醇洗脱馏分 ①薄层硅胶板的制作。将薄层层析硅胶 GF254与0.3%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液按1:3比例混合进

行研磨,充分研磨一定时间后均匀地铺在 10 cm×20 cm 的玻璃板上,水平放置自然晾干,在 105 ℃烘箱中恒温活化 30 min,放在干燥器中备用。

② 薄层层析分离。取制备好的乙酸乙酯萃取部位浓缩液样品,用 5 μ L 定溶毛细点样管在离硅胶板底部约 1.5 cm 处点样,溶剂自然挥发。将点样后的硅胶板放入装有展开剂的层析缸内,展开剂为苯:乙酸乙酯:甲酸=5:5:2, R_f 为 0.6,展开后取出吹干,分别在自然光和紫外光 365 nm 下观察。

1.2.5 硅胶柱层分离纯化 50%乙醇洗脱馏分

① 乙酸乙酯萃取物进行柱层层析分离。用烧杯量取柱层析硅胶(100~200 目)500 mL 进行湿法装柱,上样量为 2 g。以薄层层析展开剂 $V_{\text{苯}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲酸}}=5:5:2$ 为依据进行梯度洗脱,用紫外灯观察收集不同洗脱馏分。② 活性成分的追踪。具体操作方法同 1.2.3。

1.2.6 高效液相色谱检测 以二苯乙烯苷为对照品,色谱条件:ZORBAX SB-C18(150 mm×4.6

mm,5 μ m),流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=20:80$;流速 1 mL/min;检测波长:320 nm;柱温 30 ℃;进样量 5 μ L。

2 结果与分析

2.1 何首乌提取物经大孔吸附树脂分离后各馏分对棉铃虫生长发育的影响

何首乌 70%乙醇提取物利用大孔树脂进行分离,得到 50%乙醇洗脱馏分(a)。生物活性测定结果表明,50%乙醇洗脱馏分对棉铃虫幼虫生长发育影响较显著(见表 1),第 5 天时体重抑制率达到了 76.9%,体重仅为 84.7 mg,而对照体重达到了 333.7 mg,幼虫历期延长了 3.3 d,蛹重、化蛹率和羽化率均显著降低,校正死亡率达到 10.3%。水洗脱馏分处理组(b),第 5 天时体重抑制率仅为 39.1%,幼虫历期延长了 1.6 d,蛹重、化蛹率和羽化率均无显著影响,校正死亡率为 3.4%。

表 1 大孔吸附树脂柱层析分离各馏分对棉铃虫幼虫生长发育的影响

Table 1 Effects of different components by macroporous resin column chromatography on development of *H. armigera*

处理 Treatment	处理前/mg Before treatment	幼虫体重抑制率/% The average growth inhibitory rate				幼虫历期/d Larva duration	蛹重/mg Pupa weight	化蛹率/% Pupating rate	羽化率/% Emergence	校正死亡率/% Corrected mortalities
		第 1 天 The 1 st day	第 3 天 The 3 rd day	第 5 天 The 5 th day	第 7 天 The 7 th day					
a 馏分	10.1ab	-27.7	35.9	76.9	26.8	17.9a	220.6b	89.2	87.8	10.3
b 馏分	9.6a	17.9	28.5	39.1	-63.5	16.2b	253.6a	88.5	96.5	
对照	10.1b	—	—	—	—	14.6c	259.1a	96.6	100	—

注:不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平下差异显著,下表同。

2.2 硅胶柱层析分离各馏分对棉铃虫生长发育的影响

由表 2 可知,硅胶柱层析分离各馏分对棉铃虫的生长发育有不同程度的影响。其中 E 馏分最显著,第 3 和第 5 天体重抑制率分别达到了 60%和 80%,体重仅为 40.3 mg 和 61.2 mg,而对照体重达

到了 85.2 mg 和 265.3 mg。C、D、F 馏分在第 1 天时体重抑制率也都达到了 50%以上,但体重抑制率呈下降趋势。A、B 和 C 馏分的幼虫历期与对照差异不显著,D、E 和 F 馏分的幼虫历期与对照差异显著,分别延长了 0.2,0.7 和 0.3 d。

表 2 硅胶柱层析分离各馏分对棉铃虫生长发育的影响

Table 2 Effects of different components by silica gel column chromatography on development of *H. armigera*

馏分 Components	处理前/mg Before treatment	幼虫体重抑制率/% The average growth inhibitory rate				幼虫历期/d Larva duration	蛹重/mg Pupa weight	化蛹率/% Pupating rate	羽化率/% Emergence	校正死亡率/% Corrected mortalities
		第 1 天 The 1 st day	第 3 天 The 3 rd day	第 5 天 The 5 th day	第 7 天 The 7 th day					
A	9.6b	12.2	83.8a	-0.5	3.3	15.2b	222.7a	96.0	92.0	15.7

续表

馏分 Components	处理前/mg Before treatment	幼虫体重抑制率/% The average growth inhibitory rate				幼虫历期/d Larva duration	蛹重/mg Pupa weight	化蛹率/% Pupating rate	羽化率/% Emergence	校正死亡率/% Corrected mortalities
		第 1 天 The 1 st day	第 3 天 The 3 rd day	第 5 天 The 5 th day	第 7 天 The 7 th day					
B	9.7b	11.5	85.6a	0.5	-5.3	15.3b	224.5a	96.4	85.2	11.8
C	10.5a	53.5	64.4b	18.2	-5.5	15.3b	227.9a	84.6	95.5	19.5
D	10.0ab	55.2	65.6b	23.0	-13.7	15.6ab	224.3a	96.3	92.3	8.0
E	9.9ab	53.7	40.3c	80.0	48.1	16.1a	211.9a	76.9	85.0	38.7
F	9.9b	55.7	57.7b	33.0	-2.8	15.7ab	216.7a	87.0	90.0	38.0
对照	9.6b	—	85.2a	—	—	15.4b	233.8a	92.9	100	—

2.3 E 洗脱馏分液相色谱检测结果

由图 1~4 可知,以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(二苯乙烯苷)为对照品进行检测,二苯乙烯苷的保留时间为 15.256 min,杀虫活性物质 E 的保留时间为 19.658 min;以大黄素为对照品进行检测,大黄素的保留时间为 4.669 min,杀虫活性物质 E 的保留时间为 3.780 min。因此证明杀虫活性物质 E 不是二苯乙烯苷也不是大黄素。杀虫活性物质 E 的结构还需要进一步的鉴定。

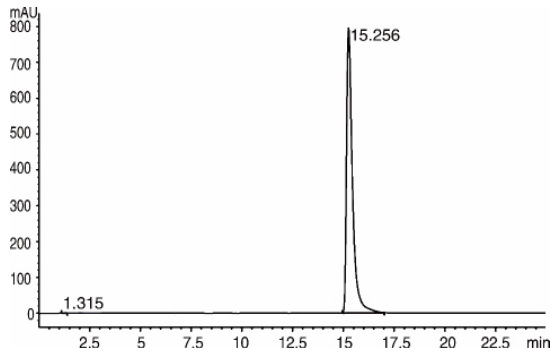


图 1 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷高压液相色谱图
Fig.1 HPLC chromatogram of 2,3,5,4'-Tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside

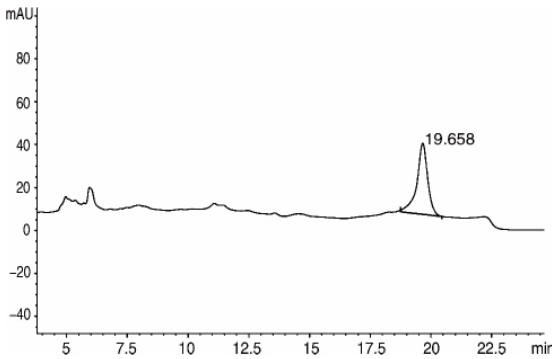


图 2 馏分 E 高压液相色谱图(以二苯乙烯苷为对照品)
Fig.2 HPLC chromatogram of fraction E

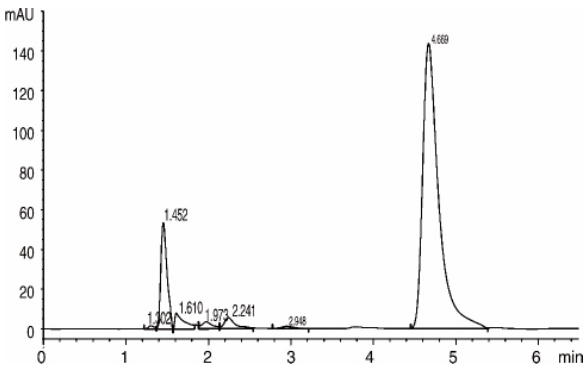


图 3 大黄素液相色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of emodin

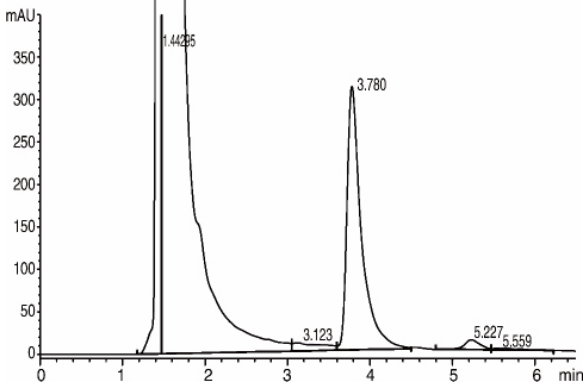


图 4 馏分 E 高压液相色谱图(以大黄素为对照品)
Fig.4 HPLC chromatogram of fraction E

3 结论与讨论

何首乌在医学上研究比较深入,对其化学成分和提取工艺已有一定的研究基础,这些医药活性成分是否具备杀虫活性有待验证。臧二乐等^[12]报道,何首乌中活性成分主要为二苯乙烯苷类、蒽醌类和磷脂类等。二苯乙烯苷类中主要活性成分为 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称二

苯乙烯苷)。二苯乙烯苷属多羟基化合物,具有较强的分子极性,易溶于水、低分子醇类溶剂和丙酮等,蒽醌类主要有大黄素、大黄素甲醚以及少量的大黄酚和大黄酸等^[11]。由于水提取物中杂质较多(例如淀粉、蛋白质和色素等)且黏稠,从而导致过滤、浓缩及分离都比较困难,因此在进一步研究中将 70%乙醇作为何首乌杀虫活性成分的提取溶剂,其最佳提取工艺今后仍需进一步研究。水粗提物是否能够直接加工成可利用的制剂也有待进一步研究。

通过对硅胶柱分离各馏分的研究,发现在第 1 天时 A、B 馏分影响不显著,C、D、E、F 馏分影响显著。但 C、D、F 馏分体重抑制率呈下降趋势,而 E 馏分对棉铃虫的影响逐渐加大,体重抑制率最高达到了 80.0%。其他馏分对棉铃虫也有一定的影响,但是效果不明显。因此推测对棉铃虫起主要作用的成分为 E 馏分。

研究表明,何首乌乙醇提取物对棉铃虫具有较高的杀虫活性,但乙醇提取物的化学成分十分复杂,每一大类化合物又包含数十种结构相似但各不相同的化合物。因此本试验采用生物活性追踪和化学分离相结合的方法,从何首乌块根中分离出了 E 杀虫活性物质。杀虫活性物质 E 极易溶于乙醇,根据“相似相容”原理,E 馏分应为极性物质,何首乌中二苯乙烯苷为极性物质,但经过高效液相色谱证明 E 馏分不是化合物二苯乙烯苷,也不是化学成分大黄素,活性物质 E 的结构还需要进一步的鉴定。张弘等^[12]以大黄素为原料合成了甲基化衍生物大黄素甲醚和三甲氧基大黄素并对甜菜夜蛾幼虫进行杀虫活性研究,结果发现,三甲氧基大黄素对甜菜夜蛾幼虫的生理活动具有明显的抑制作用,而大黄素和大黄素甲醚则对其无明显影响。何首乌中化学成分也

有大黄素和大黄素甲醚。本研究通过生物跟踪法最后得到的有效成分 E 经过高效液相色谱证明不是大黄素,因此推测何首乌中大黄素对棉铃虫无明显影响,但以大黄素为原料合成其它的衍生物是否对棉铃虫有杀虫活性,仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘国强,高锦明,吴文君. 植物源杀虫成分研究新进展[J]. 西北植物学报,2002,22(3):703-713.
- [2] 藏二乐,李萍. 植物源杀虫剂研究现状[J]. 农药,1994,33(4):5-7.
- [3] 王小艺. 中国植物资源杀虫剂的研究与应用[J]. 世界农业,2000(2):30-32.
- [4] 赵家永,邓先明,温兴莲,等. 21 世纪植物源农药开发利用现状与展望[J]. 植物医生,2002,15(1):2-3.
- [5] Oscar L,Joseg,Mabav G,et al. New Trends in Pest Control: the Search for Greener Insecticides [J]. Green Chem, 2005, 7: 431-442.
- [6] 南京药学院中草药编写组. 中草药学[M]. 2 版. 南京:江苏人民出版社,1976:161.
- [7] 梁革梅,谭维嘉,郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进[J]. 植物保护,1999(2):15-17.
- [8] 陈来同,唐运. 生物化学产品制备技术[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003:79-80.
- [9] 相聪坤,吴海燕,陈迎春,等. 何首乌中二苯乙烯苷的提取及其纯化用大孔吸附树脂的筛选研究[J]. 河北中医,2009,31(2):272-274.
- [10] 吴文君. 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.
- [11] 管淑玉,苏薇薇. 何首乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中南药学,2008,6(4):454-455.
- [12] 孙墨琰. 植物有效成分的提取分离与定量分析[J]. 森林工程,2003,19(4):16-17.

(编辑:李 川)