

文章编号:1001-1498(2004)04-0447-06

# 狼毒根提取物的生物活性测定\*

吕全, 贾秀贞, 梁军, 汪跃, 张星耀

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091)

**摘要:**狼毒是我国北方普遍生长的一种有毒植物,其根是一种传统中药材。20世纪90年代中期以来,作为一种植源性农药资源,狼毒的开发研究受到重视。本研究表明不同狼毒根提取物都能表现出一定的生物活性,利用狼毒根水浸液与乙醇提取物对舞毒蛾幼虫的拒食作用最高达99%,7d的校正死亡率最高达100%,室内毒力测定中防后5d的校正死亡率最高达100%;不同有机溶剂对狼毒根乙醇提取物萃取分离得到的有效成分对油松毛虫的拒食作用最高达92.39%,7d的校正死亡率最高达100%。不同有机溶剂的萃取物对杨树溃疡病原菌表现出抑制生长的作用,而对仙客来尖镰孢基本没有效果。

**关键词:**狼毒;根提取物;生物活性测定

**中图分类号:**S763 **文献标识码:**A

有机合成杀虫剂在使用中产生的“3R”问题,即残留(Residue)、抗性(Resistance)和害虫再猖獗(Resurgence),引起人们对其高度重视和重新评价,一些国家很早就开始研制一系列选择性强、效率高、成本低、不污染环境、对人畜安全的生物农药<sup>[1]</sup>。

狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)属瑞香科(Thymnaceae)、狼毒属(*Stellera*) (英文名 Chinese stellera),是多年生草本植物,我国有广泛分布,喜生于草地、高山向阳处<sup>[2]</sup>。其根可入药,有祛痰、治积的效能,外敷可治疥癣,根提取物中含有抗癌成分<sup>[3]</sup>。狼毒全株有毒,其根有剧毒,在草地上常造成家畜误食而中毒的现象,它与牧草争水、肥、空间,严重影响草场利用及牧草的品质与繁殖,引起草场退化,实为我国天然草场一大祸害,其孳生繁衍成为草地退化的一个重要标志。

利用狼毒的毒性防治农业病虫鼠害自古就有记载,近年来这方面的科学研究更是直接推动了该生物资源的利用,为一种新型环境协调性农药的开发奠定了基础。利用根提取物对农业和果树上重要的害虫包括亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis* Guenee)、菜粉蝶(*Pieris rapae* Linnaeus)、桃蚜(*Myzus persicae* Sulzer)、山楂叶螨(*Tetranychus viennensis* Zacher)进行了生物活性测定的研究<sup>[4-6]</sup>,结果表明效果良好,并对杀虫机理进行了探讨<sup>[5,7]</sup>,同时进行了活性成分的纯化、鉴定<sup>[8-10]</sup>。但是未见对狼毒在林业害虫上的研究报道,并且更没有对植物病害上的研究报道。为此进行了初步研究,拓展了狼毒的应用范围,也为林业病虫害的防治提供了一种环境协调性

收稿日期:2004-02-19

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(课题编号:2001BA509B12)

作者简介:吕全(1974—),男,内蒙古四子王旗人,助理研究员。

\* 感谢北京林业大学李镇宇教授、中国林科院张永安研究员提供试虫,山东农业大学刘会香博士提供尖镰孢纯培养物。

农药的使用选择。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

(1) 供试材料:狼毒,采自河北省丰宁县坝上草原(海拔 1 500 m)。将根阴干,然后将其根放入恒温箱中烘干(40 ~ 50 )至材料发脆,再磨碎过 60 目筛,放入冰箱备用。

(2) 防治对象:舞毒蛾(*Lymantria dispar* Linnaeus)用毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)树叶喂养,温度(25 ±1) ,相对湿度(85 ±10) % ,每日光照 12 h;油松毛虫(*Dendrolimus tabulaeformis* Tsai & Liu)用油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)针叶饲养,温度 25 ±1 ,相对湿度(85 ±10) % ,不需直接光照;杨树溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea* Cesati & De Notaris) (保存于本实验室)和仙客来尖镰孢(*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *cyclaminis* Gerlach)培养于 PDA 培养基。

### 1.2 狼毒有效成分提取方法

(1) 水浸法:将狼毒的根粉,按 1 5 的重量加入蒸馏水,浸泡 48 h 后过滤,制得 0.2 g mL<sup>-1</sup> 的水浸液待用。

(2) 冷浸法:采用张国洲等<sup>[11]</sup>的方法,得到乙醇提取物浸膏(SCEE)。

(3) 回流法:采用张国洲等<sup>[11]</sup>的方法,用 3 种溶剂石油醚、氯仿、乙醇依次提取,分别得到 3 种提取物。

(4) 活性成分的初步分离:采用张国洲等<sup>[11]</sup>的方法,得到 5 种萃取物,即石油醚萃取物(PEE)、氯仿萃取物(CE)、乙酸乙酯萃取物(EAE)、正丁醇萃取物(BAE)和水萃取物(WE)。设丙酮对照(CKA)。

### 1.3 生物活性测定

1.3.1 舞毒蛾、油松毛虫的生物活性测定 拒食作用测定:将新鲜毛白杨叶片用打孔器( $\phi = 1$  cm)打成叶碟,放入不同浓度梯度的狼毒提取液中(0.05、0.1、0.15 g mL<sup>-1</sup>狼毒根水浸液,0.02、0.01、0.005、0.002 5 g mL<sup>-1</sup> SCEE 的丙酮稀释液)浸 5 s,然后将 5 片放入培养皿中( $\phi = 9$  cm,内垫滤纸加蒸馏水保湿),每皿放入饥饿 4 h 的舞毒蛾 4 龄幼虫 1 头(每处理 10 头,3 次重复),另设丙酮处理的对照。

将新鲜的油松针叶剪齐放入不同萃取剂萃取 SCEE 得到的样品丙酮稀释液(400  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>)中浸 5 s,然后将 5 根针叶放入培养皿中,在每皿放入饥饿 4 h 的油松毛虫 4 龄幼虫 1 头,(每处理 10 头,3 次重复),另设丙酮处理的对照。

处理 24、48 h 后测定剩余叶面积和剩余针叶长度,据此计算幼虫取食叶面积和拒食率。2 d 后换新鲜叶片继续饲养。每天记录死虫数,7 d 后调查结果,计算死亡率、校正防效<sup>[11,12]</sup>。

室内毒力测定:室内试验共设 9 个处理,即 0.05、0.1、0.15 g mL<sup>-1</sup>狼毒根水浸液,0.02、0.01、0.005、0.002 5 g mL<sup>-1</sup> SCEE,以康福多 20 % 浓可溶剂 2 000 倍液和清水空白为对照。于试验前 1 d 采新鲜毛白杨枝条用清水栽培,每个处理接种 4 龄舞毒蛾 6 头,3 次重复,用喷雾器按以上处理浓度全株均匀喷雾,以滴水为度。药后 24、72、168 h 分别统计活虫数,计算防治效果。

$$\text{拒食率} = \frac{\text{对照组取食叶面积} - \text{处理组取食叶面积}}{\text{对照组取食叶面积}} \times 100 \%$$

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

1.3.2 对杨树溃疡病菌和仙客来尖镰孢的抑制作用 高压灭菌的狼毒根提取物冷却到 60 与 PDA 培养基混合(培养基/提取物比例为 20:1),制成平板,另设空白对照(Control)。将直径 5 mm 的病原真菌小块接种在含有不同提取液的琼胶平板中央,5 次重复。在室温条件下培养,每隔 24、48、72 h 后测定菌落生长的直径。

## 2 结果

### 2.1 有效成分的提取

使用 3 种方法对根提取物的提取率进行比较,水浸法提取率最高,而且十分简便易行;在冷浸法和回流法中,乙醇的提取率最高(表 1)。使用不同有机溶剂乙醇提取物进行萃取以进一步分离有效成分,水萃取率最高,其次是正丁醇、乙酸乙酯和石油醚,氯仿最低(表 2)。

表 1 狼毒不同溶剂的提取率

方法	溶剂	提取物状态	提取率/%
回流去	石油醚	浸膏	1.48
	氯仿	浸膏	1.60
	乙醇	浸膏	16.09
水浸法	蒸馏水	溶液	42.26
冷浸法	乙醇	浸膏	16.42

表 2 不同溶剂对 SCEF 萃取效果

溶剂	萃取物状态	萃取率/%
石油醚	浸膏	3.60
氯仿	浸膏	0.50
乙酸乙酯	固体	6.52
正丁醇	固体	12.24
水	浸膏	40.08

### 2.2 对舞毒蛾、油松毛虫幼虫生物活性测定

2.2.1 对舞毒蛾拒食作用测定 根水浸液与 SCEE 提取物各浓度对舞毒蛾幼虫的生物活性见表 3。 $0.02 \text{ g mL}^{-1}$ 的生物活性最强,24、48、168 h 后的校正死亡率都非常高, $0.15 \text{ g mL}^{-1}$ 的水浸液作用也非常大。随着稀释倍数的增加,二者的生物活性也随之降低,但 SCEE 稀释到  $0.0025 \text{ g mL}^{-1}$ 的效果和  $0.05 \text{ g mL}^{-1}$ 水浸液的效果没有差异,表明 SCEE 有效成分的含量高于水浸液的。

2.2.2 对舞毒蛾室内毒力测定 根提取物对舞毒蛾的触杀作用随着浓度的增高而增高(表 3)。药后 72 h, $0.15 \text{ g mL}^{-1}$ 水浸液与  $0.02 \text{ g mL}^{-1}$ SCEE 的校正死亡率即可达 100%,平均校正死亡率也达到 88.9%。

表 3 根提取物对舞毒蛾幼虫的生物活性

处理/( $\text{g mL}^{-1}$ )		拒食作用			触杀作用			
		拒食率/%		7 d 校正死亡率/%	校正死亡率/%			
		24 h	48 h		24 h	72 h	120 h	平均
水浸液	0.05	87.5	78.0	66.7 c	0.0	0.0	0.0	0.0 e
	0.1	100.0	82.1	83.3 b	33.3	66.7	80.0	61.1 d
SCEE	0.15	100.0	87.3	100.0 a	66.7	100.0	100.0	88.9 b
	0.0025	74.9	83.2	66.7 c	33.3	66.7	80.0	66.1 d
	0.005	95.8	83.4	83.3 b	50.0	83.3	100.0	77.8 c
	0.01	100.0	90.2	83.3 b	50.0	83.3	100.0	77.8 c
	0.02	100.0	99.0	100.0 a	66.7	100.0	100.0	88.9 b
康福多对照	-	-	-	-	100.0	100.0	100.0	100.0 a
清水对照	-	-	-	-	-	-	-	-

= 0.01, 下表同。

2.2.3 对油松毛虫拒食作用测定 使用不同有机溶剂对狼毒乙醇提取物萃取,分离得到的不同有效成分对油松毛虫 4 龄幼虫进行生物活性测定(表 4)。氯仿萃取物的活性最高,其次是石油醚萃取物,效果十分理想;正丁醇萃取物和水萃取物的拒食率虽然也较高,但是最终的死亡率明显不如前二者;乙酸乙酯萃取物的死亡率最低,只有 10.53%。

表 4 SCEE 萃取物对油松毛虫的生物活性

处理	拒食率/%		7 d 校正死亡率/%
	24 h	48 h	%
PEE	87.65	91.20	94.74 a
CE	89.48	92.39	100.00 b
EAE	53.97	63.70	10.53 c
BAE	73.77	77.91	52.63 d
WE	83.96	85.09	42.11 e
CKA	-	-	-

### 2.3 对病原真菌的生物活性测定

图 1 为 SCEE 的不同萃取物对杨树溃疡病菌在 24、48、72 h 时的生长影响情况。不同提取物对杨树溃疡病菌都有不同程度的抑制生长作用,且随着时间的增加这种作用愈加明显(空白对照的斜率最大),其中石油醚萃取物和正丁醇萃取物的作用最大(两条线重合),氯仿萃取物和乙酸乙酯萃取物的作用其次,这 4 种萃取物作用明显大于水萃取物以及丙酮对照和空白对照。

待空白对照组的杨树溃疡病菌长满平板( $\phi=8.50$  cm)后,各个处理的病原菌生长情况见表 5,与图 1 情况基本一致,石油醚萃取物的抑制作用最大。

图 2 为 SCEE 的不同萃取物对仙客来尖镰孢 24、48、72 h 的生长影响情况。从图中可见,只有乙酸乙酯萃取物对仙客来尖镰孢的抑制强于丙酮对照(72 h 时的),与随后的空白对照长满平板时情况相一致(表 5),其余都没有效果。

## 3 分析和讨论

采用回流法用不同有机溶剂粗提狼毒根有效成分,溶剂极性越高提取率越大,与前人的研究结果相吻合,并且各自的提取率相差不大<sup>[11]</sup>。进一步,乙醇粗提物

(SCEE)的不同有机溶剂萃取分离有效成分,萃取率和前人研究结果有明显差别,本研究中水萃取率最高,而张国洲<sup>[11]</sup>报道正丁醇萃取率最高(38.96%),除去水萃取物外,其他 4 种有机溶

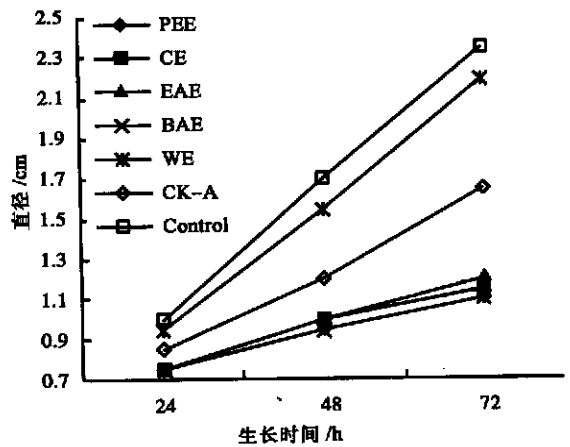


图 1 SCEE 萃取物对杨树溃疡病菌的抑制作用

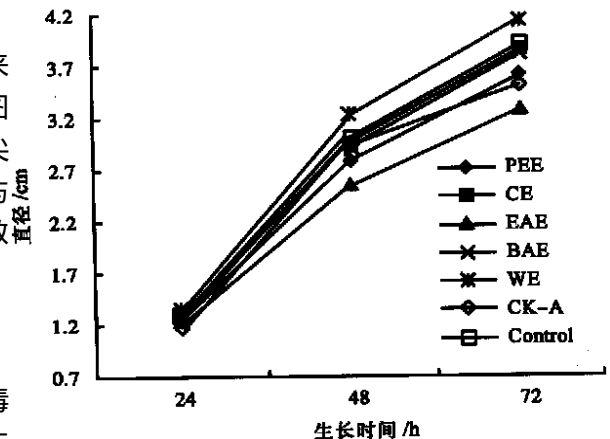


图 2 SCEE 萃取物对仙客来尖镰孢的抑制作用

剂的萃取率相对大小和前人表现出一致性(正丁醇 > 乙酸乙酯 > 石油醚 > 氯仿)。

表5 空白对照组病原菌长满平板后各处理间的直径生长

处理	PEE	CE	EAE	BAE	WE	CKA	CK
杨树溃疡病菌	3.07 a	4.30 b	3.80 ab	4.88 b	8.30 d	5.87 c	8.50 d
仙客来尖镰孢	7.13 b	7.90 c	6.50 a	7.93 c	8.33 d	7.17 b	8.50 d

得到的多种有效成分进行了生物活性测定,效果都十分理想。在直接获得原材料的情况下,从生产中简单实用的角度出发,水浸和乙醇冷浸更可行。从萃取得到的有效成分生物测定来看,氯仿萃取物对油松毛虫作用最大;在对菜粉蝶的生测中也是氯仿萃取物的作用最大<sup>[11]</sup>;在对山楂叶螨的触杀和内吸处理中,也是氯仿提取物表现出最高的活性<sup>[5]</sup>。本实验中对所选昆虫和病原真菌作用最好的成分不同,氯仿萃取物对油松毛虫作用最大,而石油醚萃取物和正丁醇萃取物对溃疡病原真菌的作用最大。抑制病菌生长的试验中,对杨树溃疡病菌有很好的抑制作用,对仙客来尖镰孢抑制作用很差。提示狼毒有效成分的多样性,值得进一步研究确定具体的作用成分。

近年张国洲等<sup>[4,7~9,11]</sup>就狼毒粗提取物及4种活性成分对昆虫的生物活性进行了深入研究,狼毒根乙醇提取物对亚洲玉米螟幼虫、桃蚜、菜粉蝶幼虫具有很强的生物活性,对斜纹夜蛾(*Spodoptera litura* Fabricius)幼虫、小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)幼虫的生物活性弱,说明狼毒的有效成分具有一定针对性。本研究中有同样的认识(对杨树溃疡病菌抑制作用明显而对仙客来尖镰孢基本没有作用)。有必要加大狼毒根提取物的生物测定研究,确定其杀虫、杀菌谱。

狼毒杀虫有效成分的分离鉴定研究<sup>[8~10]</sup>发现,狼毒根中含有对棉蚜系蚜虫有较强毒杀活性的物质,并通过活性跟踪对杀蚜活性物质进行分离纯化和结构鉴定,获得二个化合物,确定其结构为1,5-二苯基-1-戊酮和1,5-二苯基-2-烯-1-戊酮,以及谷甾醇、伞形花内酯、瑞香亭和狼毒色原酮等4种有效成分。通过人工合成有效成分的途径研制高效低毒的仿生农药及其应用是今后重点研究内容之一。

## 参考文献:

- [1] 徐汉虹,陈立,赵善欢. 国内外农药研究动态[J]. 广东农药科学,1997,5:31~33
- [2] 史志诚,李祚煌,洪子鹞,等. 中国草地重要有毒植物[M]. 北京:中国农业出版社,1997.140~150
- [3] 冯威建,池川哲郎,吉田光二,等. 瑞香狼毒提取物尼地吗啉的抗癌活性[J]. 中国肿瘤杂志,1995,17(1):24~26
- [4] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒提取物对昆虫的生物活性研究[J]. 湖南农业大学学报,2000a,26(3):190~192
- [5] 曹挥,刘素琪,赵莉茵,等. 瑞香狼毒提取物对山楂叶螨的生物活性及酶活性影响[J]. 林业科学,2003,29(1):98~102
- [6] 侯太平,崔球,向瑞礼,等. 从瑞香狼毒中提取灭蚜活性物质的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2001,38(5):744~747
- [7] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分对昆虫生理生化的影响[J]. 湖南农业大学学报,2000b,26(5):366~367
- [8] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离( ) [J]. 安徽农业大学学报,2000c,27(4):340~344
- [9] 张国洲,王亚维,徐汉虹,等. 瑞香狼毒杀虫活性成分的提取与分离( ) [J]. 安徽农业大学学报,2000d,27(4):345~347
- [10] 侯太平,崔球,陈淑华,等. 瑞香狼毒中灭蚜活性物质的结构鉴定[J]. 有机化学,2002,22(1):67~70
- [11] 张国洲,徐汉虹,赵善欢,等. 瑞香狼毒中杀虫活性成分的提取与初步分离[J]. 青海大学学报(自然科学版),2000e,18(4):3~6.

[12] 吴文君. 化学保护试验技术导论[M]. 西安:陕西科技出版社,1988

## Study on Biological Activity of Extraction from the Root of *Stellera chamaejasme*

LU Quan , JIA Xirzhen , LIANG Jun , WANG Yue , ZHANG Xing-yao

(Research Institute of Forest Ecology , Environment and Protection , CAF , Beijing 100091)

**Abstract :** The root of Chinese stellera (*Stellera chamaejasme*) was a traditional Chinese medicine , which was a toxic plant grown widely in north of China. Since the medium of 1980s , researchers emphasized Chinese stellera as a kind of resource of plant pesticides. The result of bioassay illustrated that the different extracts from root of Chinese stellera possess certain biological activity. 99 % larvae of *Lymantria dispar* refused to feed on the leaves immersed by water extract and SCEE of the root , which caused the 100 % larvae death correctively. In the experiment of evaluating toxicity , the larva had 100 % corrective mortality after dealing with the extracts 5 d later. The antifeeding effects rates reached 92.39 % when the larva of *Dendrolimus tabulaeformis* was fed on the extract of SCEE with different organic solvents , meanwhile the corrective mortality reached at 100 % after 7 d. The different extracts by different organic agents could restrain the growth of *Botryosphaeria dothidea* in artificial medium , but had no obvious effects on the growth of *Fusarium oxysporum*.

**Key words :** *Stellera chamaejasme* ;extract of root ;activity bioassay