山苍子有效杀虫成分的分离与鉴定

张红建,郑联合,赵 阔,高红日,罗 山,陈 艳,王 涛

(海南省粮油科学研究所,海南 琼海 571400)

摘 要:采用液液萃取法对山苍子乙醇粗提物进行分离和纯化,研究各萃取组分对赤拟谷盗的生物活性作用,并测定具有生物活性作用的萃取物的有效杀虫成分。结果表明:1.57 mg/cm^{2}的氯仿萃取物对赤拟谷盗的驱避率达81.26%,50 mg/mL的氯仿萃取物对赤拟谷盗的触杀校正死亡率达75.98%。通过GC-MS检测出氯仿萃取物中含有机化合物共20种,其中羟基香茅醛相对含量为21.15%,2,6-二异丙基苯胺相对含量为16.41%,三氯叔丁醇相对含量为10.54%。对赤拟谷盗具有驱避、触杀作用的物质可能主要为羟基香茅醛和2,6-二异丙基苯胺。

关键词:山苍子;杀虫成分;分离;鉴定

中图分类号:S 379.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2016)03-0065-04

Separation and identification of insecticidal constituents of *Litsea cubeba*

ZHANG Hong-jian, ZHENG Lian-he, ZHAO Kuo, GAO Hong-ri, LUO Shan, CHEN Yan, WANG Tao

(Hainan Grain & Oil Science Research Institute, Qionhai Hainan 571400)

Abstract: The primary ethanol extracts of litsea cubeba were separated and purified by liquid-liquid extraction method. The biological activity of the extraction compositions against Tribolium castaneum was studied and the effective insecticidal compositions were determined. The results showed that the repellent rate of chloroform extracts at1.57mg/cm2 against Tribolium castaneum was 81.26% and the contact-killing corrected mortality at 50mg/mL was 75.98%. The chloroform extracts contented 20 kinds of organic compounds by GC-MS and 7-hydroxy-3,7-dimethyl- Octanal was 21.15%, 2,6-Diisopropylaniline was 16.41%, Chlorobutanol was 10.54%. The bioactivators possessed repelling and contact-killing may be 7-hydroxy-3,7-dimethyl- Octanal, 2,6-Diisopropylaniline.

Key words: litsea cubeba; insecticidal constituent; separation; identification

我国对储粮害虫的防治主要以磷化氢熏蒸为主,但长期、过度、不规范的使用已引起严重的"3R"(抗药性 Resistance、再猖獗 Resurgence、农药残留 Residue)问题[1]。植物源杀虫剂是从具有杀虫活性的植物或者提取其有效成分制成的杀虫剂,具有安全、低毒、高效和无抗性等优势,近年已成为人们研究的重点[2-5]。山苍子(*Litsea cubeba*)由于其对储粮害虫具有较好的防治作用[6],农村不少地区已用于稻谷的储藏中。不仅如此,国内的有关专家学者也已对山苍子的防虫效果进行了研究,陈嘉东[7]试验发现用山苍子处理瓦缸储粮防治效果好,用千分之三的山苍子处理农户储粮,可保持6个月无虫或基本无虫。莫茂军等[8]测定了山苍子乙醇提取物对桔全爪螨的生物活性作用,结果发现其对桔全爪螨的产卵驱避率达到96.43%,死亡率达92%以上。杨耐德[9]试验发现山苍子油空仓杀虫剂量为8 mL/m^3,实仓剂量为10 g/kg时,玉米象、锯谷盗等全部死亡。

目前,虽然关于山苍子防治储粮害虫的研究较多,但主要集中在用法及用量上[10-11],对其有效的杀虫成分并没有进一步的确定。为明确山苍子的有效杀虫成分,本实验将研究山苍子不同萃取组分对赤拟谷盗的驱避率和触杀校正死亡率,测定具有生物活性作用的萃取物的有效杀虫成分,为进一步开发利用山苍子进行储粮害虫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

DHG-9123A型电热恒温鼓风干燥箱:天津市泰斯特仪器有限公司;AL104电子天平:梅特勒-托

收稿日期:2015-10-26
基金项目:海南省科学事业费项目(KYYS-2014-04)
作者简介:张红建,1989年出生,男,硕士研究生.

利多仪器有限公司;LRH－150－S恒温恒湿培养箱:广东省医疗器械厂;SB－5200－DTD超声波清洗仪:宁波新芝生物科技股份有限公司;HP6890/5973MSD型毛细管气相色谱—质谱联用仪:美国Hewlett－Packark公司。

1.2 实验材料

山苍子干果:采自广西省,粉碎后过20目筛备用。供试害虫:赤拟谷盗采自海南省某粮库,培养方法参照文献[12]。

1.3 实验方法

1.3.1 粗提物的制备

准确称取100 g粉碎后的样品,按1∶5的比例加入浓度为95%的乙醇,室温条件浸提48 h后过滤、洗涤,在80 ℃下用旋转蒸发仪蒸至膏状,得到山苍子粗提物。

1.3.2 粗提物的分离纯化[13]

准确称取10.00 g山苍子粗提物,按1∶10的比例加入蒸馏水,在30 ℃、99%功率条件下超声10 min,常压下用漏斗过滤得滤渣为样品1。将过滤后的水溶液倒入分液漏斗中,用100 mL正己烷进行萃取,连续萃取3次,合并正己烷,用旋转蒸发仪在80 ℃下蒸干,得正己烷萃取物即样品2。水层再用100 mL氯仿进行萃取,连续萃取3次,合并氯仿,用旋转蒸发仪在80 ℃下蒸干得氯仿萃取物即样品3。最后,水层用100 mL乙酸乙酯进行萃取,连续萃取3次,合并乙酸乙酯,用旋转蒸发仪在80℃下蒸干得乙酸乙酯萃取物即样品4。剩下的水溶液,用旋转蒸发仪在95 ℃下蒸干即得样品5。将各组分分别称重计算萃取率。

萃取率/% =萃取物质量/粗提物质量×100%

1.3.3 各组分驱避性的测定[14]

用丙酮分别将上述样品溶解并配成0.1 g/mL的样液备用。将培养皿(直径9 cm)洗净、烘干,圆形滤纸(直径9 cm)对半剪开。用移液枪分别吸取各样液0.5 mL滴在一半滤纸上,相当于1.57 mg/cm^2的药量,另一半滴加0.5 mL丙酮作为对照。待液滴完全吸收后,室温下使丙酮挥发。用透明胶带将两半滤纸重新拼接,放入培养皿底部,在培养皿中部接入20头供试成虫,每种样液设3次重复试验。接虫后将培养皿放入27±1 ℃、75%±5%相对湿度条件下培养,12 h后检查成虫在培养皿中的分布情况,计算驱避率。

驱避率/% =(对照边虫数－处理边虫数)/对照边虫数×100%

1.3.4 各组分触杀性的测定[15]

采用微量点滴法:用丙酮分别将上述样品溶解并配成50 mg/mL的样液,用微量进样器(1 μL)分别将0.5 μL不同样液滴于试虫前胸背板上,以滴加等量丙酮为对照,处理20头试虫,处理后试虫放入培养瓶中,在27±1 ℃、75%±5%相对湿度条件下培养,每种样液设3次重复试验,3d后检查成虫在培养瓶中的死亡情况,计算校正死亡率。

死亡率/% =死亡数/总数×100%

校正死亡率/% =(处理死亡率－对照死亡率)/(1－对照死亡率)×100%

1.3.5 山苍子活性成分的GC－MS分析

从山苍子粗提物的氯仿萃取液中取50 mL样液,用旋转蒸发仪将其浓缩至5 mL左右,然后直接进行气相色谱—质谱联用分析。气相色谱条件:石英毛细管柱HP－INNOWax(30 m×0.25 mm,0.25 μm),程序升温:柱温80 ℃,以10 ℃/min升到150 ℃,再以6 ℃/min升到250 ℃,保持10 min;载气为He,柱流量1.0mL/min,进样口温度280 ℃,分流比10∶1。质谱条件:EI源;电离电压70 eV,离子源温度230 ℃,扫描范围10～500 aum,进样量1.0 μL。谱库为NIST2005。

2 结果与分析

2.1 山苍子粗提物分离纯化结果

山苍子粗提物中各组分萃取结果见图1。由图1可知,样品1即滤渣部分萃取率最大,达到45.37%。其次是样品5即水溶液部分,萃取率为28.54%。样品3即氯仿部分萃取率为19.46%,样品2和样品4的萃取率较低,在3%以下。

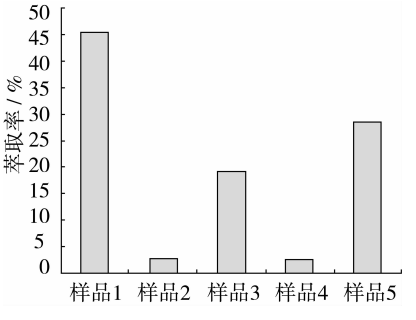

图1 各组分萃取率

2.2 各组分驱避性测定结果

各组分样液对赤拟谷盗的驱避率测定结果如图2所示。从图2中可以看出样品3即氯仿萃取部分对赤拟谷盗的驱避率最大,达到81.26%。其次是

样品1,但其驱避率也仅为28.85%。样品2、样品4、样品5对赤拟谷盗的驱避率都不大于15.2%。Malik[16]根据驱避率不同,将药剂驱避效果分为0~V6个等级,本实验中样品3对赤拟谷盗的驱避效果达到了最高等级V级,样品1为Ⅱ级,样品2、样品4、样品5仅为Ⅰ级。因此,对赤拟谷盗驱避作用较大的物质主要集中在山苍子粗提物的氯仿萃取物中。

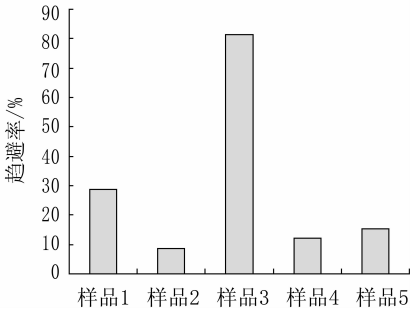

图2 各组分样液对赤拟谷盗的驱避率

2.3 各组分触杀性测定结果

各组分样液对赤拟谷盗的触杀性试验结果见图3。从图3中可知样品3即氯仿萃取部分对赤拟谷盗的触杀校正死亡率为75.95%,明显高于其他各组分样液。其次为样品1的24.53%,样品2对赤拟谷盗的触杀校正死亡率最低,仅为10.65%。因此,对赤拟谷盗具有触杀作用的物质主要集中在山苍子粗提物的氯仿萃取物中。

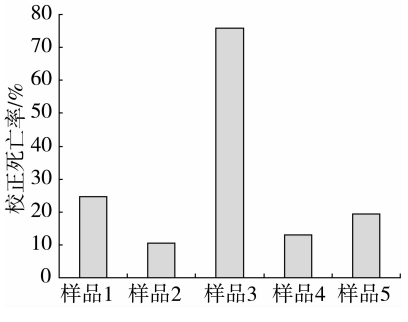

图3 各组分样液对赤拟谷盗的校正死亡率

2.4 有效杀虫成分鉴定结果

氯仿萃取组分GC-MS的测定结果见表1。由表1可知,通过GC-MS检测出有机化合物共20种,主要成分为酮、醛及醇类。其中8号羟基香茅醛相对百分含量最大,为21.15%。其次为18号2,6-二异丙基苯胺,13号三氯叔丁醇,12号3-O-甲基-N-乙酰基-D-葡萄糖胺,其相对百分含量分别为16.41%、10.54%和10.03%。羟基香茅醛是我国国标规定允许使用的食用香料,具有菩提、铃兰等气味,对赤拟谷盗可能表现出较强的驱避作用。2,6-二异丙基苯胺是合成新型杀虫剂杀螨隆的关键中间体,对害虫具有较强的触杀和胃毒作用[17],很可能为山苍子氯仿提取物中主要的杀虫活性物质。但对赤拟谷盗的生物活性作用是否为以上两种物质单独作用的结果还是跟其他物质协调作用的结果还需进一步测定。

表1 氯仿萃取物GC-MS的测定结果

序号	保留时间	成分化学式	分子量	名称	相对含量
1	11.23	未鉴定出	-	-	1.16
2	12.34	$C_8H_{15}NO_3$	173	2,5-二甲基-4-硝基-3-己酮	1.10
3	12.87	C_7H_8O	108	3-甲酚	1.14
4	13.74	$C_{10}H_{18}O$	154	香茅醛	2.75
5	14.73	$C_7H_{10}O_2$	126	3-乙基-2-羟基-2-环戊烯-1-酮	3.56
6	15.47	$C_4H_5N_3O$	111	4-氨基-2-羟基嘧啶	1.88
7	18.22	$C_8H_{14}O$	126	6-甲基-5-庚烯-2-酮	8.33
8	18.83	$C_{10}H_{20}O_2$	172	羟基香茅醛	21.15
9	19.79	$C_8H_{14}O$	126	2-乙基环己酮	1.65
10	20.17	未鉴定出	-	-	2.88
11	20.52	未鉴定出	-	-	1.00
12	21.40	$C_9H_{17}NO_6$	235	3-O-甲基-N-乙酰基-D-葡萄糖胺	10.03
13	21.78	$C_4H_7C_{l3}O$	176	三氯叔丁醇	10.54
14	22.11	C_6H_9NO	111	3,4-二甲基-3-吡唑啉-2-酮	1.35
15	23.28	$C_7H_{12}N_2$	124	1-乙基-3,5-二甲基吡唑	0.66
16	24.04	$C_{16}H_{34}O$	242	2-十六烷醇	3.31
17	24.56	$C_6H_{12}N_2$	112	1,3,4-三甲基-2-吡唑啉	5.93
18	26.95	$C_{12}H_{19}N$	177	2,6-二异丙基苯胺	16.14
19	27.83	$C_{18}H_{34}O_2$	282	油酸	3.55
20	28.75	$C_{18}H_{32}O_2$	280	亚油酸	1.86

3 结论

采用液液萃取对山苍子乙醇粗提物进行纯化,其中滤渣部分占45.37%、水溶性物质占28.54%、氯仿萃取物占19.46%、乙酸乙酯萃取物占2.62%、正己烷萃取物占2.83%。氯仿萃取物对赤拟谷盗表现出较大的生物活性作用,对赤拟谷盗的驱避率达81.26%,触杀校正死亡率达75.98%。通过GC-MS检测出氯仿萃取物中含有机化合物共20种,主要成分为酮、醛及醇类。其中羟基香茅醛相对百分含量为21.15%、2,6-二异丙基苯胺相对百分含量为16.41%,三氯叔丁醇相对百分含量为10.54%。对赤拟谷盗具有驱避、触杀作用的物质

可能主要为羟基香茅醛和2,6－二异丙基苯胺,其具体杀虫效果仍需进一步试验。

参考文献:

[1]邓天福, 王争艳, 尉吉乾, 等. 4种植物提取物对两种储粮害虫的驱避作用[J]. 安徽农业科学, 2008,36(2):614－615.

[2]车明哲. 植物粗提物杀虫活性研究展望[J]. 生态经济, 2010(12):176－177.

[3]Asawalam E F, Ebere U E, Emeasor K C. Effect of some plant products on the control of *rice weevil Sitophilus oryzae* (*L.*) Coleopteta: Curculionidae[J]. Journal of Medicinal Plants Research [J], 2012, 6(33):4811－4814.

[4]Pugazhvendan S R, Ronald Ross P, Elumalai K. Insecticidal and repellant activities of plants oil against stored grain pest, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012(1):412－415.

[5]Jaya P,Singh B,Prakash N,et al. Insecticidal activity of*Ageratum conyzoides L.*, *Coleus aromaticus Benth.* And *Hyptis suaveolens*(*L.*) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum Herbst* [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(9):2210－2215.

[6]邓楠, 旷春桃, 王玲芝. 山苍子油的提取、化学成分及其动力学的研究[J]. 中国食品添加剂, 2014(9):80－84.

[7]陈嘉东. 华南地区农户储粮害虫防治技探讨[J]. 粮油仓储科技通讯, 2000(1):35－37.

[8]莫茂军, 吴洪基, 韩诗畴, 等. 16种植物乙醇提取物对桔全爪螨的生物活性测定[J]. 环境昆虫学报,2008,30(1):44－49.

[9]杨耐德. 利用植物防治储粮害虫[J]. 农村经济与科技, 1999, 10(8):35.

[10]Kai Yang, Cheng Fangwang, Chun Xunyou, et al. Bioactivity of essential oil of *litsea cubeba* from China and its main compounds against two stored product insects [J]. Journal of Asia－Pacific Entomology, 2014(17):459－466.

[11]Xuegui Wang, Qian Li, Litao Shen, et al. Fumigant, contact and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus* [J]. Journal of Insect Science, 2014, 75(14): 1－9.

[12]曹阳. 赤拟谷盗磷化氢抗性及快速测定方法研究[J]. 粮食储藏, 2000(1):10－15.

[13]曾宪儒. 植物提取物对蔬菜害虫的生物活性筛选及其活性组分作用机理研究[D]. 南宁:广西大学, 2005.

[14]邓天福, 王争艳, 尉吉乾, 等.4种植物提取物对两种储粮害虫的驱避作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2):614－615.

[15]Zhi Long Liu, Swee Hock Goh, Shuit Hung Ho . Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against*Sitophilus zeamais Motschulsky* and *Tribolium castaneum* (*Herbst*) [J]. Journal of Stored Products Reseach, 2007(43):290－296.

[16]Malik M M, Muiutaba N S H. Screening of some indigenous plants as repellents of antifeedants for stored grain insect[J]. Stored Products Research, 1984, (20):45－48.

[17]李付刚, 葛晶, 谢涛.2,6－二异丙基苯胺的制备及应用[J]. 精细化工原料及中间体,2008(1):19－20.

(上接第64页)

2.1.5　台间差

两台设备分别对四水平样品和大米实物标准物质进行检测,采用配对 t 检验法比较两台设备的检测结果是否存在显著性差异。

表9　台间差测定

序号	样品号	1# 仪器	2# 仪器	差值 d_i	均值 d	标准偏差 s_d	t_d	$t_{0.05,9}$
1	1	0.103	0.115	－0.012	0.009 42	0.014 53	2.05	2.262 2
2		0.122	0.099	0.023				
3	2	0.241	0.212	0.029				
4		0.235	0.230	0.005				
5	3	0.337	0.327	0.010				
6		0.349	0.327	0.022				
7	4	0.435	0.429	0.006				
8		0.440	0.449	－0.009				
9	大米	0.203	0.180	0.023				
10	标物	0.199	0.202	－0.003				

经计算, $t_d = 2.05$,查 t 分布表,$t_{0.05,9} = 2.262\ 2$, $t_d = 2.05 < t_{0.05,9} = 2.262\ 2$,说明两台设备的测定结果之间不存在显著性差异(见表9)。

3　结论

与石墨炉原子吸收光谱法比较,X－射线荧光光谱样品前处理简单,无试剂消耗,检测成本低,绿色环保,并且对人员素质、检测环境要求低。检测时间25 min,完成一个样品(双试验)的检测时间为60 min,检测时间短,检测效率高,该方法适合粮食收购现场使用。

参考文献:

[1]GB2762—2012,食品中污染物限量[S].

[2]GB/T 5009.15—2003,食品中镉的测定[S].

[3]GB/T 6379.6—2009,测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)[S].