

山橙叶粗提物的杀虫活性研究

许亚楠,熊 婷,曾东强,刘晓亮,唐文伟*

广西大学农药与环境毒理研究所,南宁 530005

摘要:为探索山橙 *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth 作为生物农药的应用价值,本研究以山橙枝叶为研究对象,采用冷浸法提取山橙的甲醇粗提物,用同时蒸馏萃取法提取山橙叶精油;采用叶管药膜法和玻片浸渍法分别测定了山橙叶甲醇粗提物及精油对榕管蓟马 *Gynaikothrips uzeli* Zimmerman 和柑橘全爪螨 *Panonychus citri* Mc Gregor 的杀虫活性。结果表明,山橙叶甲醇粗提物对榕管蓟马具有显著的生物活性,处理后 72 h 的校正死亡率达到 76.89%。进一步生物活性测定表明,对榕管蓟马具有生物活性的成分主要集中在乙酸乙酯萃取层,处理后 24 h 的 LC_{50} 值为 4.9507 mg/mL;山橙叶甲醇粗提物及精油对柑橘全爪螨均具有显著的杀虫活性,处理后 24 h 的 LC_{50} 值分别为 5.5524、0.4142 mg/mL。本研究为进一步探究山橙中对榕管蓟马具有生物活性的天然产物提供了理论依据。

关键词:山橙;精油;粗提物;生物活性

中图分类号:S435.79

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.10.012

Insecticidal Activity of Leaves of *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth

XU Ya-nan, XIONG ting, ZENG Dong-qiang, LIU Xiao-liang, TANG Wen-wei*

Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: In order to explore the application value of *Melodinus suaveolens* as biological pesticides, the leaves of *M. suaveolens* was extracted with methanol by cold maceration. After that, simultaneous distillation extraction (SDE) was adopted for extracting the essential oil from leaves of *M. suaveolens*. Leaf-tube residual bioassay and slide-dip immersion method were used respectively to detect the insecticidal activity of the methanol extract and essential oil against *Gynaikothrips uzeli* Zimmerman and *Panonychus citri* (McGregor). The results showed that the methanol extract of *M. suaveolens* possessed obvious insecticidal activity on *G. uzeli*. After 72 h treatment, the mortality rate of *G. uzeli* was 76.89%. The further biological activity test indicated that the insecticidal composition of *M. suaveolens* which against *G. uzeli* mainly located in the EtOAc-soluble fraction. After 24 h treatment, the value of LC_{50} was 4.9507 mg/mL. The methanol extract and essential oil from *M. suaveolens* leaves showed significant toxicity against *P. citri*, the value of LC_{50} were 5.5524 mg/mL and 0.4142 mg/mL after 24 h treatment, respectively. In conclusion, results of this study provided a theoretical basis for further research on the bio-active natural products of *M. suaveolens* against *G. uzeli*.

Key words: *Melodinus suaveolens*; essential oil; methanol extract; bioactivity

山橙 *Melodinus suaveolens*, 又名马骝藤、猢猻果、猴子果,为夹竹桃科山橙属植物,主要分布于我国广东、广西等地;果实具有行气、止痛、除湿、杀虫等功效,用于治疗胃气痛、膈症、疝气、瘰疬、皮肤热毒、湿癣疥癩^[1]。近年来,山橙属植物以其含有结构新颖的单萜吡啶型生物碱引起了一些学者的关注^[2,3]。

目前,对山橙的研究仅限于化学成分分离和鉴定。迄今为止,国内外学者从山橙枝叶中已分离 60 余种化合物,主要为生物碱类成分^[4-7]。关于其活性的研究主要集中在对癌细胞的抑制方面,在农业方面的活性罕有涉及。张方平等人在研究 25 种热带植物乙醇粗提物对比哈小爪螨 *P. citri* 驱避作用时,发现山橙的乙醇粗提物对比哈小爪螨的产卵驱避率达到 100%,对成螨的驱避率达到 94%^[8]。这说明该植物在防治农业害虫方面的活性值得进一步探索。

本研究通过同时蒸馏萃取法(SDE)从山橙叶中提取精油,对其在防治农业害虫方面的活性进行了

收稿日期:2015-06-11 接受日期:2015-09-02

基金项目:国家自然科学基金(31160375,31201573);广西自然科学基金(2012GXNSFBA053044);亚热带农业生物资源保护与利用国家实验室开放课题基金(KSL-CUSAb-2012-10)

* 通讯作者 E-mail:wenweitg@163.com

初步探索,为山橙资源的开发利用提供了科学依据。通过测定山橙叶粗提物及精油对榕管蓟马、柑橘全爪螨的杀虫活性,为进一步挖掘山橙的应用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山橙 *M. suaveolens*, 采自广西十万大山,由广西林业勘察设计院钟业聪高级工程师鉴定;榕管蓟马 *G. uzeli* 采自广西大学实验基地,寄主为雅榕 *Ficus concinna* Miq.。柑橘全爪螨 *P. citri* 采自广西大学实验基地,寄主为毛叶枣 *Zizyphus mauritiana* Lam.。试虫采集回后室内饲养,第2代作为生测虫源;正己烷、甲醇、乙酸乙酯、石油醚、氯化钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

同时蒸馏萃取装置(安徽天长市长城玻璃仪器制造厂);98-1-C型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);HH-S电子恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);冷却水循环器(施都凯仪器设备上海有限公司);电子天平 PL203(梅特勒—托利多仪器上海有限公司);高倍体视显微镜(德国 ZEISS 公司);光照培养箱(金坛市天宏实验仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 植物粗提物的提取

将采集的供试材料,分别放在通风处阴干,粉碎。将植物粉末 38 kg 分置入大型容器(20 L)中,用5倍量(体积比)的甲醇在室温下用冷浸法提取,72 h后过滤,收集滤液,共提取3次,合并滤液,滤液用旋转蒸发仪蒸馏浓缩,合并多次浓缩物得到植物的甲醇粗提物,置于4℃冰箱中备用。

1.3.2 植物粗提物的萃取分离

将山橙甲醇粗提物 3.7 kg 用蒸馏水充分热溶(水温低于50℃),装入分液漏斗悬浮,分别用等体积石油醚、乙酸乙酯萃取3次,减压浓缩得石油醚层(403 g)、乙酸乙酯(667 g)和水层(504 g)浓缩稠膏,置冰箱中冷藏备用。

1.3.3 山橙精油的提取

准确称量山橙的新鲜叶片 50 g,剪成面积为1~2 cm²左右的碎片,置于1000 mL圆底烧瓶中。按规定水料比加入蒸馏水,溶解一定量的 NaCl,轻轻振摇 2 min,使水淹没叶片。浸泡适当时间后,将烧瓶接入同时蒸馏萃取装置的沸水蒸馏端;另取一

500 mL圆底烧瓶,加入120 mL正己烷,接入同时蒸馏萃取的水浴端(70℃恒温);打开水浴锅和电热套开关,加热至水和正己烷沸腾,控制加热温度和冷凝水流速,以使随水蒸气上升的精油在冷凝后及时并充分地转移至正己烷中。装有叶片的烧瓶停止加热后,需继续供应正己烷蒸气 10 min左右。同时蒸馏萃取结束后,收集正己烷萃取液,使用旋转蒸发仪进行浓缩,浓缩至3~5 mL后,用N₂吹出残留溶剂得到油状物即为山橙叶精油。

1.3.4 生物活性测定

1.3.4.1 榕管蓟马的生物活性测定

参考 Alfredo 和 Anthon 的 TIBS 法^[9],经适当修改建立叶管药膜法。将供试样品以丙酮溶解,再加蒸馏水配制对应浓度(丙酮含量不超过5%)。用移液管取适量药液加入到20 mL的玻璃指形瓶中,均匀滚动,使药液在玻璃指形瓶内壁形成均匀的药膜。再将小叶榕的新鲜叶片(2 cm×3 cm)在药液中浸5 s,取出自然晾干再放入药膜瓶中,用毛笔轻轻移入30头左右的榕管蓟马成虫,用保鲜膜封口(扎小孔),处理过的试虫置于25±1℃,RH 75%的光照培养箱中,24 h后调查死亡率。每个处理3次重复,设5%丙酮的蒸馏水作对照。

1.3.4.2 柑橘全爪螨的生物活性测定

参照 FAO(联合国粮农组织)推荐的玻片浸渍法^[10,11]并加以改进。供试样品以丙酮溶解,再加蒸馏水配制对应浓度(丙酮含量不超过5%)。用柔软的细毛笔轻轻挑选雌成螨,将其背部粘在双面胶带上(注意不能粘住螨足、螨须、口器),每片粘3行,每行10头左右,剔除死亡或生命力较弱的个体并补充。将带螨玻片的一端浸入药液中5 s左右后取出,迅速用吸水纸吸干螨体及其周围多余的药液,然后将处理过的试虫放置于温度为25±1℃,RH 75%的光照培养箱中,24 h后,在双目解剖镜下检查结果,用毛笔轻触螨体,螨足不动视为死亡。每处理3次重复,设含5%丙酮的蒸馏水对照。

1.3.5 数据分析

采用 SPSS 17.0 及 Excel 进行统计分析,LC₅₀值及毒力回归方程均使用概率值法计算,方差分析采用邓肯氏极差多重比较法(Duncan's Multiple Ranges Test, DMRT)。

$$\text{死亡率}(\%) = (\text{死亡虫数} / \text{处理虫数}) \times 100$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = [(\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}) / (1 - \text{对照死亡率})] \times 100$$

2 结果与分析

2.1 十一种植物粗提物对榕管蓟马的杀虫活性

表1 十一种植物甲醇粗提物对榕管蓟马的杀虫活性(10 mg/mL)

Table 1 Insecticidal toxicities of the methanol extracts of 11 plants against the *G. uzeli* at the concentration of 10 mg/mL

植物粗提物 Methanol extract	校正死亡率 ⁽¹⁾ Corrected mortality (%) ⁽²⁾		
	24 h	48 h	72 h
山橙叶 <i>M. suaveolens</i> leaves	29.04 ± 2.5 a	48.45 ± 5.50 a	76.89 ± 3.67 a
狭叶坡垒 <i>Hopea chinensis</i>	20.00 ± 6.66 c	14.94 ± 3.98 de	52.31 ± 7.65 b
尖山橙 <i>Melodinus fusiformis</i>	8.15 ± 2.56 de	28.74 ± 3.98 c	36.43 ± 5.85 c
毒根斑鸠菊 <i>Vernonia cumingiana</i>	28.15 ± 7.18 b	47.87 ± 6.80 ab	60.32 ± 3.41 b
龙州山橙果 <i>Melodinus morsei</i>	1.67 ± 2.89 e	3.45 ± 2.98 f	8.35 ± 5.23 e
山橙果 <i>M. suaveolens</i> fruits	1.64 ± 2.87 e	5.17 ± 2.98 f	52.74 ± 5.23 b
土常山 <i>Hydrange stenophylla</i>	12.14 ± 3.98 cd	39.52 ± 4.21 b	36.13 ± 0.92 c
山菅兰 <i>Dianella ensifolia</i>	2.56 ± 4.44 e	16.64 ± 3.60 d	28.70 ± 5.97 cd
杜蚣花 <i>Callicarpa erythrosticta</i>	1.67 ± 2.89 e	6.32 ± 4.33 ef	9.83 ± 4.30 e
大山橙 <i>Melodinus magnificus</i>	4.46 ± 3.89 de	7.94 ± 6.93 def	7.18 ± 3.89 e
锯叶竹节树 <i>Carallia diplopetala</i>	4.77 ± 4.12 de	11.33 ± 7.38 def	25.25 ± 7.47 d

注:(1)表中同列数据后小写字母相同者表示在5%水平上差异不显著(DMRT);(2)表中数据为平均数±SE, n=3。

Note:(1) The data within the same column followed by the same letter indicated no significant difference at $P=0.05$ level, based on Duncan's multiple range test (DMRT); (2) The data were mean ± SE, $n=3$.

从11种植物甲醇粗提物对榕管蓟马的生物活性测定结果可以看出,山橙叶粗提物对榕管蓟马具有显著的生物活性,处理后72 h校正死亡率达到76.89%;毒根斑鸠菊次之,处理后72h校正死亡率为60.32%;狭叶坡垒和山橙果对榕管蓟马活性较弱,处理后72h校正死亡率均为50%左右;尖山橙、土常山、山菅兰、锯叶竹节树对榕管蓟马的活性微

在10 mg/mL浓度下,以药膜法测定了采自广西十万大山的十一种植物甲醇粗提物对榕管蓟马成虫的杀虫活性。结果如表1。

弱,杜蚣花、大山橙和龙州山橙果对其无显著活性。

2.2 山橙叶粗提物及精油对榕管蓟马的杀虫活性

针对活性筛选结果中山橙叶粗提物对榕管蓟马具有显著的生物活性,进一步采用改进后的叶管药膜法测定山橙叶粗提物及精油对榕管蓟马处理24 h后的毒力,结果如表2。

表2 山橙叶粗提物及精油对榕管蓟马的毒力

Table 2 The toxicity of the methanol extract and essential oil from *M. suaveolens* leaves against *G. uzeli*

样品 Sample	毒力回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (mg/mL)	95%置信区间 CL(95)	相关系数 <i>r</i>	卡方值 χ^2
山橙叶粗提物 Methanol extract	$y = 3.7690 + 1.1130x$	12.7271	9.2272 ~ 21.0291	0.9971	0.2989
山橙叶精油 Essential Oil	$y = 2.9380 + 1.6611x$	17.4335	12.5905 ~ 29.2894	0.9937	0.9326

生物测定结果显示,山橙叶精油对榕管蓟马活性较弱,山橙叶粗提物对榕管蓟马活性较好,处理24 h后的LC₅₀值为12.7271 mg/mL。

2.3 山橙叶粗提物各萃取层对榕管蓟马的杀虫活性

为了进一步探究活性成分在山橙枝叶中的分布部位,本研究对山橙叶甲醇粗提物进行了萃取分离,测定了山橙叶粗提物各萃取层在10 mg/mL浓度下对榕管蓟马的生物活性,结果如下表3。

综合分析山橙叶粗提物各萃取层对榕管蓟马的活性,结果表明山橙粗提物中对榕管蓟马具有活性的物质主要集中于乙酸乙酯萃取层中。在10 mg/mL的浓度下,处理24 h后的校正死亡率为72.30%,处理48 h后的校正死亡率为96.33%。并进一步测定了乙酸乙酯萃取层对榕管蓟马的毒力,结果如表4,处理24 h后LC₅₀值为4.9507 mg/mL,处理48 h后LC₅₀值为2.0384 mg/mL,处理72 h后LC₅₀值为1.5042 mg/mL。这一结果表明有必要对

山橙甲醇粗提物的乙酸乙酯萃取层进一步分离,从而找到对榕管蓟马具有杀虫活性的化合物。

表3 山橙叶粗提物各萃取层(10 mg/mL)对榕管蓟马成虫的杀虫活性

Table 3 Insecticidal activity of different fractions of *M. suaveolens* leaves against *G. uzeli* at the concentration of 10 mg/mL

萃取层 Soluble fraction	校正死亡率 Corrected mortality (%)	
	24 h	48 h
石油醚层 Petroleumether-soluble	56.84 ± 4.67 b	82.98 ± 5.89 b
乙酸乙酯层 EtOAc-soluble	72.30 ± 3.01 a	96.33 ± 0.36 a
水层 H ₂ O-soluble	28.27 ± 5.30 d	39.94 ± 4.82 d
甲醇粗提物 Methanol extract	29.04 ± 2.5 c	48.45 ± 5.50 c

注:(1)表中同列数据后小写字母相同者表示在5%水平上差异不显著(DMRT);(2)表中数据为平均数±SE,n=3。

Note:(1) The data within the same column followed by the same letter indicated no significant difference at $P=0.05$ level, based on Duncan's multiple range test (DMRT); (2) The data were mean ± SE, $n=3$.

表4 山橙叶粗提物乙酸乙酯层对榕管蓟马的毒力

Table 4 The toxicities of EtOAc-soluble of *M. suaveolens* leaves against *G. uzeli*

山橙乙酸乙酯萃取层 EtOAc-soluble	毒力回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (mg/mL)	95%置信限 CL(95)	相关系数 <i>r</i>	卡方值 χ^2
24 h	$Y = 4.1885 + (1.1681 \pm 0.1091)x$	4.9507	3.0252 ~ 8.1019	0.9351	4.5564
48 h	$Y = 4.5702 + (1.3896 \pm 0.0819)x$	2.0384	1.4086 ~ 2.9498	0.9717	2.4555
72 h	$Y = 4.6980 + (1.7542 \pm 0.0712)x$	1.5042	1.0910 ~ 2.0739	0.9980	0.2423

2.4 山橙叶粗提物及精油对柑橘全爪螨的生物活性

目前,尚未有关于山橙活性成分在农业害虫防治方面的报道,仅有只字片语涉及到山橙粗提物对螨的活性,结果不详。为了便于比较,本研究除了系

统地测定了山橙叶粗提物及精油对榕管蓟马的活性外,还采用玻片浸渍法测定了山橙叶粗提物及精油对柑橘全爪螨雌成螨的毒力。处理24 h后的结果如表5。

表5 山橙叶粗提物及精油对柑橘全爪螨雌成螨的毒力

Table 5 The toxicity of the methanol extract and essential oil from *M. suaveolens* leaves against *P. citri*

样品 Sample	毒力回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (mg/mL)	95%置信区间 GL(95)	相关系数 <i>r</i>	卡方值 χ^2
山橙叶粗提物 Methanol extract	$y = 3.9020 + 1.4749x$	5.5524	4.3798 ~ 7.0391	0.9979	0.4717
山橙叶精油 Essential oil	$y = 5.3545 + 0.9260x$	0.4142	0.0755 ~ 0.8982	0.9911	0.3959

表5的结果表明,山橙叶精油对柑橘全爪螨雌成螨具有显著的杀虫活性,处理后24 h的LC₅₀值为0.4142 mg/mL。而山橙叶粗提物对柑橘全爪螨活性较弱,处理后24 h的LC₅₀值为5.5524 mg/mL。从而可以推断对柑橘全爪螨具有杀虫活性的成分存在于精油中,而非山橙叶粗提物中。今后可对山橙叶精油化学成分做进一步分析,寻找对柑橘全爪螨具有杀虫活性的化学成分。

3 讨论与结论

本实验对十一种植物粗提物进行了活性筛选,

测定了不同浓度的山橙叶粗提物、精油对榕管蓟马、柑橘全爪螨雌成螨的杀虫活性,以及山橙各萃取层对榕管蓟马的杀虫活性。以往文献中对杀虫活性成分进行追踪时主要采取分离纯化,对精油的研究尚属空白,本实验首次通过SDE法提取了山橙叶精油,并对其进行了活性测定,从而为准确定位活性成分存在部位奠定了基础。其中,山橙叶粗提物及精油对柑橘全爪螨表现较好的触杀活性,处理24 h后LC₅₀值分别为5.5524、0.4142 mg/mL。今后有必要对山橙叶精油深入研究,以寻找对柑橘全爪螨有活性的化学成分。山橙叶粗提物乙酸乙酯萃取层对榕

管蓟马处理 48 h 后的 LC_{50} 值为 2.0384 mg/mL, 但山橙叶精油对榕管蓟马活性较低。从而推测, 山橙叶中对榕管蓟马具有杀虫活性的成分集中在乙酸乙酯层, 对柑橘全爪螨具有杀虫活性的成分存在于精油中。实际生产中, 对榕管蓟马的防治多采用化学措施, 容易造成害虫抗药性增强、药害等问题, 本研究结果可为研发防治榕管蓟马的新药剂提供思路。

目前, 尚未有关于山橙叶精油对柑橘全爪螨的杀螨活性的研究报道。作为一种世界性的柑橘害螨, 柑橘全爪螨通过吸食柑橘叶片、嫩梢、花蕾和果实的汁液造成减产、品质下降和树体早衰。当前防治该害虫的主要手段仍然是施用化学农药, 但化学农药长期不合理使用严重影响了果品质量安全, 并造成柑橘全爪螨的抗药性增强和生态环境的破坏, 更限制了我国柑橘的出口贸易^[12]。因此, 研究开发新的高效、低毒、对环境友好的植物源杀螨剂对柑橘生产具有重要意义。本研究结果显示山橙叶精油对柑橘全爪螨活性较好, 有必要进一步研究萃取条件对精油提取率的影响, 从而为山橙精油的应用及杀螨新药的研制提供理论依据。

本研究采用同时蒸馏萃取法(SDE)提取了山橙叶精油, 可大幅度节省萃取时间。相比传统的水蒸气蒸馏法, 不仅节省了溶剂, 而且免去人为操作带来的污染, 较为可取。

综上所述, 研究结果显示了山橙在农业害虫防治领域的开发和应用前景, 据此推测山橙所含活性成分在农业害虫防治方面的潜力巨大。今后, 需进一步系统分离山橙叶甲醇粗提物的乙酸乙酯萃取层, 并研究其对榕管蓟马的作用机理。同时, 有必要研究山橙叶精油有效成分的分离、提取, 探究山橙叶精油对柑橘全爪螨的作用方式、作用机理等。通过这样一系列的研究, 可探索山橙在农业害虫防治方面的价值, 为进一步探究山橙精油化学成分, 尤其是开发利用山橙中对榕管蓟马具有杀虫活性的天然产物成分提供了理论依据。

参考文献

1 Chinese Herbalism Editorial Board, State Administration of

Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China (国家中医药管理局《中华本草》编委会). Chinese Herbalism(中华本草). the sixth volume. Shang Hai; Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.

- 2 Feng T, Li Y, Liu YP, et al. Melotenine A, a cytotoxic monoterpene indole alkaloid from *Melodinus tenuicaudatus*. *Org Lett*, 2010, 12:968-971.
- 3 Feng T, Cai XH, Li Y, et al. Melotenine A and B, two unprecedented alkaloids from *Melodinus henryi*. *Org Lett*, 2009, 11:4834-4837.
- 4 Liu YP, Zhao YL, Feng T, et al. Melosuavines A-H, cytotoxic bisindole alkaloid derivatives from *Melodinus suaveolens*. *J Nat Prod*, 2013, 76:2322-2329.
- 5 Zhang TT, Zhi WL, Wen JW, et al. Alkaloids from *Melodinus suaveolens*. *Heterocycles*, 2013, 87:2047-2052.
- 6 Liu YP, Li Y, Cai XH, et al. Melodinines M-U, cytotoxic alkaloids from *Melodinus suaveolens*. *J Nat Prod*, 2012, 75:220-224.
- 7 Ye JH, Zhou YL, Huang ZH, et al. Alkaloids from *Melodinus suaveolens*. *Phytochemistry*, 1991, 30:3168-3170.
- 8 Zhang FP(张方平), Liu HF(刘红芳), Luo YQ(罗永强), et al. Repellent effects of the alcohol extracts of 25 tropical plants to *Oligonychus bharensis* Hirst. *Plant Protection*(植物保护), 2006, 32(4):57-60.
- 9 Alfredo R, Anthony MS. Development of a bioassay system for monitoring susceptibility in *Thrips tabaci*. *Pest Manag*, 2003, 59:553-558.
- 10 David M, Pamela M. Inhibition of octopamines-stimulated adenylylase activity in two spotted mites by dicofol and related diphenylcarbinol acaricides. *Pestic Biochem Phys*, 1993, 46:228-235.
- 11 FAO. Plant production and protection 21, recommend methods for measurement of resistance of pesticide. 1980, 49-54.
- 12 Xiong ZH(熊忠华), Xi YG(席运官), Chen XJ(陈小俊), et al. A study on the control technologies for 4 kinds of natural pesticides against *Panonychus citri* (McGregor) in organic Citrus Orchard. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2013, 35:97-101.