



李一鸣, 陈孝甜, 王勇庆, 等. 印楝素干粉的制备及生物活性测定[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 48-51.

印楝素干粉的制备及生物活性测定

李一鸣¹, 陈孝甜¹, 王勇庆¹, 程东美², 张志祥¹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室/华南农业大学农学院, 广东 广州 510642;
2 仲恺农业工程学院农学院, 广东 广州 510225)

摘要:【目的】测定印楝素干粉及印楝素 A、印楝素 B 的生物活性, 建立印楝素干粉中印楝素含量的检测方法。【方法】采用乙酸乙酯浸提法制备印楝素干粉, HPLC 法检测印楝素含量, 叶碟法测定生物活性。【结果】处理 24 h 后, 印楝素干粉对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 2 龄幼虫和大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 3 龄幼虫的 AFC_{50} 值分别为 0.28 和 $70.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抗食活性明显高于印楝素 A 和印楝素 B。【结论】该干粉制备方法不仅简单有效, 且生物活性良好, 具有推广应用价值。

关键词:印楝素干粉; 斜纹夜蛾; 大菜粉蝶; 乙酸乙酯浸提法; 叶碟法; HPLC; 生物活性

中图分类号:S482

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2017)04-0048-04

Preparation and bioactivity determination of azadirachtin-rich dry powder

LI Yiming¹, CHEN Xiaotian¹, WANG Yongqing¹, CHENG Dongmei², ZHANG Zhixiang¹

(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology/College of Agriculture, South China Agricultural University, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China; 2 College of Agriculture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract:【Objective】To study the biological activity of azadirachtin-rich dry powder, azadirachtin A and azadirachtin B, and establish a method for determining azadirachtin content of dry powder.【Method】Azadirachtin-rich dry powder was prepared by ethyl acetate extraction method, the azadirachtin content of dry powder was determined by HPLC and the biological activity was measured by leaf disc test.【Result】 AFC_{50} of azadirachtin-rich dry powder was $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ against 2nd instar larvae of *Spodoptera litura* and $70.71 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ against the 3rd instar larvae of *Pieris brassicae* 24 h after treatment. The antifeedant activity of azadirachtin-rich dry powder was clearly higher than that of azadirachtin A and azadirachtin B.【Conclusion】This preparation method of the dry powder is simple, effective, and has good biological activity. It is recommended for popularization and application.

Key words: azadirachtin-rich dry powder; *Spodoptera litura*; *Pieris brassicae*; ethyl acetate extraction method; leaf disc test; HPLC; bioactivity

印楝 *Azadirachta indica* 为楝科楝属乔木^[1], 原产地区^[2]。1983 年, 印楝首次被引入我国, 该项目由华南农业大学赵善欢教授发起, 后在海南省、四川省和

收稿日期:2017-03-14 优先出版时间:2017-06-21

优先出版网址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20170621.1924.016.html>

作者简介:李一鸣(1991—), 女, 硕士研究生, E-mail: xysgliyiming@163.com; 通信作者:张志祥(1974—), 男, 教授, 博士, E-mail: zdsys@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(2016A030313387)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

云南省大面积引种并获得成功^[3]。印楝素是从印楝中提取出来的一种四环三萜类固醇化合物^[4-5], 对昆虫具有胃毒、触杀、拒食、驱避、抑制呼吸^[6-7]、调节生长和节育等作用^[8]。雄性和雌性大鼠试验表明印楝素对脊椎动物是安全的, 以每天 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹的剂量口服施用持续 90 d, 没有产生生理毒性、死亡, 组织质量、病理学、血清和血液参数没有变化^[9]。研究表明印楝素对大部分农业害虫的天敌也不会产生较大的影响^[10]。此外, 印楝素在环境中能迅速而彻底地降解、抗性风险低^[11], 被认为是完美的植物源杀虫剂^[12-13]。印楝中已发现了 100 多种化合物, 至少有 70 种化合物具有生物活性。印楝素可分为印楝素 A、B、C、D、E、F、G、I 共 8 种, 其中印楝素 A 含量最高, 其也是通常意义上的印楝素^[14]。印楝植株中印楝素 A 和印楝素 B 的含量在所有印楝素类化合物中占比最高。这些活性物质对菜青虫 *Pieris rapae*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等多种农业害虫都有很好的杀虫活性^[15-17]。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 属鳞翅目夜蛾科, 全国各地均有分布^[18], 寄主广泛, 可危害蔬菜、粮食、经济作物等近 100 科、300 多种植物, 造成严重的经济损失^[19]。大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 属鳞翅目粉蝶科, 是十字花科蔬菜上的主要害虫之一, 以幼虫聚集为害叶片^[20]。目前, 防治斜纹夜蛾、大菜粉蝶多用化学药剂, 植物源农药防治较为少见。本研究采用乙酸乙酯浸取法提取印楝素种子中的印楝素制备印楝素干粉, 并将其与印楝素 A 及印楝素 B 的活性进行比较, 以期为防治斜纹夜蛾、大菜粉蝶提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

印楝种子由四川绿金生物科技有限公司提供, 印楝素质量分数为 0.37%; 印楝素 A 标准品(质量分数 96.8%): 美国 Sigma 公司生产; 印楝素 B(质量分数 95.2%)由华南农业大学昆虫毒理研究室从印楝种子中分离纯化并进行结构鉴定。

从广东省广州市郊的芋头 *Cococasia esculenta*、芥蓝 *Brassica alboglabra* 或花椰菜 *Brassica oleracea* var. *botrytis* 上采集斜纹夜蛾卵块, 低龄虫以芋头叶饲养, 高龄虫以木薯叶饲养。于云南省昆明市郊采集大菜粉蝶卵, 卵孵化后, 幼虫在华南农业大学昆虫毒理研究室内用芥蓝和甘蓝 *Brassica oleracea* 叶饲养。

美国惠普 1100 高效液相色谱仪, 具可调波长的紫外检测器, 3D 化学工作站; HHS · 11-Ni 型恒温水

浴锅: 北京靖卫科学仪器厂生产; 4001 型旋转蒸发仪: 德国 Heidolph 公司生产; LI-3000 叶面积测定仪: 美国 Lincoln 公司制造; 1702-MP8 型电子天平: 德国 Startorius GmbH Gottingen 公司生产; 循环水真空泵 SHB-Ⅲ; 布氏漏斗等。

乙酸乙酯、石油醚 I (30 ~ 60 °C)、石油醚 II (60 ~ 90 °C) 均为分析纯(天津富宇精细化工有限公司), 乙腈为色谱纯(美国 MREDA), 超纯水, 电阻 ≥ 18.2 MΩ 等。

1.2 方法

1.2.1 印楝素干粉提取 在烘箱中于 40 °C 条件下烘烤印楝种子 3 h 后, 将其在室温条件下磨碎, 加入石油醚 I 进行脱脂处理, 用大滤纸滤除部分石油醚, 再用布氏漏斗滤除滤渣中残余的石油醚。将晾干的滤渣常温减压干燥后粉碎, 制得印楝种子粉。在 60 °C 水浴条件下, 用乙酯乙酯浸提印楝种子粉, 重复 3 次, 每次 5 h, 滤除残渣, 合并滤出液, 用旋转蒸发仪于 60 °C 条件下减压蒸除乙酸乙酯得到乙酸乙酯抽提物。在抽提物中加入少量乙酸乙酯, 振荡摇匀后, 于室温条件下滴加到石油醚中, 边加边振荡, 将沉淀过滤, 用石油醚洗涤 3 次, 减压干燥制得印楝素干粉。

1.2.2 印楝素含量测定 称取印楝素标准品于容量瓶中, 甲醇溶解并定容。再次使用甲醇稀释配成系列浓度标准溶液, 以标准溶液浓度对峰面积绘制得标准曲线。

色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为不同比例的乙腈和水进行梯度洗脱, 流速为 1 mL · min⁻¹, 流动相比例及处理时间为: V(乙腈): V(水) = 40: 60, 0 ~ 3 min, V(乙腈): V(水) = 30: 70, 3 ~ 9 min, V(乙腈): V(水) = 100: 0, 9 ~ 13 min, V(乙腈): V(水) = 40: 60, 13 ~ 20 min。柱温: 30 °C; 检测波长: 215 nm; 进样量: 10 μL。准确称取 1.0 g 制备好的印楝素干粉于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇, 涡旋 2 min, 离心, 过 0.22 μm 滤膜, 待 HPLC 测定, 外标法计算含量。

1.2.3 拒食活性测定 选取厚薄均匀的甘蓝叶片, 用打孔器打出叶碟 (d = 19 mm), 叶碟在供试药液中浸 3 s 后取出, 自然晾干后, 将叶碟置于垫有保湿滤纸的培养皿中, 每皿 3 片叶, 接入 1 头虫, 每个处理 10 个重复。24 h 后调查并按公式计算拒食率。

$$\text{拒食率} = \frac{\text{对照取食叶面积} - \text{处理取食叶面积}}{\text{对照取食叶面积}} \times 100\%.$$

1.2.4 体质量测定 将印楝素干粉、印楝素 A 和印

楝素B,用 V (丙酮): V (水)=1:1的溶液配至供试浓度。将刚采集的甘蓝叶片洗净晾干。将供试叶片在药液中浸泡3 s后取出,晾干后放入垫有保湿滤纸的培养皿中,在每个培养皿中放入1头幼虫,每个处理10个重复,处理质量浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。幼虫放入培养皿前在电子天平上称质量。每隔1 d换上新的滤纸及新鲜的未处理供试叶片,每天在电子天平上称供试昆虫的体质量。

2 结果与分析

2.1 印楝素 HPLC 检测结果

乙酸乙酯浸提印楝种子粉,乙酸乙酯减压蒸除后,用石油醚从浓缩液中制备印楝素干粉。图1a中印楝素A标准品的保留时间为9.463 min。印楝素干粉色谱图如图1b所示。

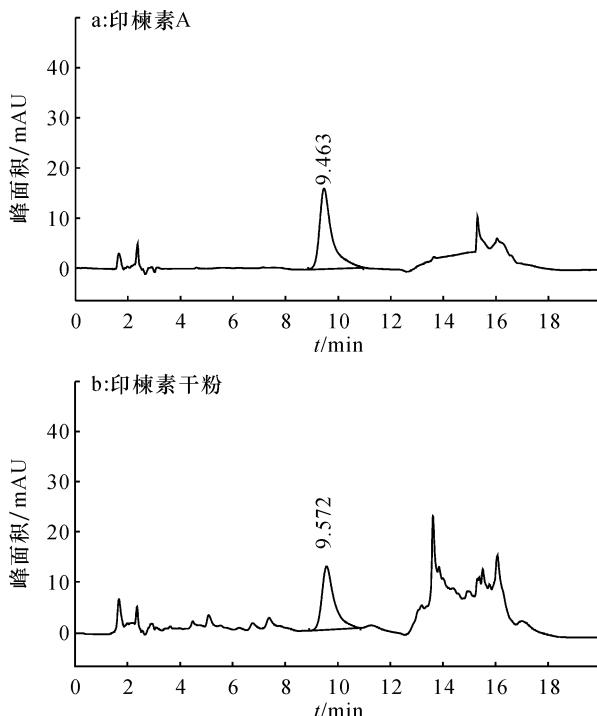


图1 印楝素 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC graph of azadirachtin

2.2 印楝素干粉中印楝素含量测定

乙酸乙酯浸提法制备得到印楝素干粉,干粉中印楝素质量分数(以印楝素A计)和提取率分别为7.920%和81.047%。滤出沉淀后,在室内敞开体系中让溶剂自然挥发,沉淀不黏结;减压干燥后,呈外观良好的浅黄色粉状物。试验结果表明该方法能有效提取印楝素。

2.3 拒食活性测定结果

分别以斜纹夜蛾2龄幼虫、大菜粉蝶3龄幼虫为对象,测定印楝素A、印楝素B和印楝素干粉的非选择性拒食活性,结果见表1。从表1中可以看出,印楝素干粉、印楝素A和印楝素B均对斜纹夜蛾2龄幼虫具有较好的拒食活性,处理24 h后, AFC_{50} 分别为 0.28 、 1.04 和 $2.93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; AFC_{50} 95%置信限分别为 $0.24 \sim 0.33$ 、 $0.71 \sim 1.51$ 和 $2.07 \sim 4.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。处理24 h后,印楝素干粉、印楝素A和印楝素B对大菜粉蝶3龄幼虫的 AFC_{50} 分别为 70.71 、 182.34 和 $225.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; AFC_{50} 95%置信限分别为 $57.61 \sim 86.78$ 、 $118.54 \sim 280.47$ 和 $135.09 \sim 376.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果表明,印楝素干粉对斜纹夜蛾和大菜粉蝶的拒食活性明显高于印楝素A和印楝素B。印楝素干粉、印楝素A和印楝素B对大菜粉蝶3龄幼虫具有一定的拒食活性。

2.4 印楝素对斜纹夜蛾幼虫体质量的影响

以斜纹夜蛾4龄幼虫为对象,采用浸药叶片处理,测定印楝素干粉、印楝素A和印楝素B对斜纹夜蛾4龄幼虫体质量的影响,结果见表2。从表2中可以看出,印楝素干粉、印楝素A和印楝素B对斜纹夜蛾幼虫的体质量具有非常显著的抑制作用。在试验浓度下处理2~5 d,印楝素干粉和印楝素B对斜纹夜蛾幼虫的体质量影响明显高于印楝素A,差异显著。在相同浓度下处理1~5 d,印楝素干粉对斜纹夜蛾幼虫生长发育的影响明显高于印楝素B,且在药后1、3、4 d时差异显著。

表1 印楝素A、印楝素B及印楝素干粉对斜纹夜蛾和大菜粉蝶拒食活性测定结果¹⁾

Tab. 1 The antifeedant activities of azadirachtin A, azadirachtin B and azadirachtin-rich dry powder against *Spodoptera litura* and *Pieris brassicae*

处理	斜纹夜蛾2龄幼虫			大菜粉蝶3龄幼虫		
	毒力回归方程 ²⁾	AFC_{50} (95%置信限)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 (r)	毒力回归方程 ²⁾	AFC_{50} (95%置信限)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 (r)
印楝素A	$y = 4.9601 + 2.5597x$	1.04(0.71~1.51)	0.9899	$y = 0.0408 + 2.1935x$	182.34(118.54~280.47)	0.9769
印楝素B	$y = 3.8222 + 2.5197x$	2.93(2.07~4.16)	0.9763	$y = 1.0708 + 1.6699x$	225.44(135.09~376.20)	0.9458
印楝素干粉	$y = 5.8974 + 1.6301x$	0.28(0.24~0.33)	0.9885	$y = 2.3874 + 1.4126x$	70.71(57.61~86.78)	0.9984

1)印楝素干粉中有效成分的含量以印楝素A计,干粉中印楝素A质量分数为7.920%,处理时间为24 h;2) y 为死亡率, x 为样品质量浓度对数值。

表2 施用印楝素干粉、印楝素A和印楝素B对斜纹夜蛾幼虫体质量的影响¹⁾Tab. 2 The effects of azadirachtin-rich dry powder, azadirachtin A and azadirachtin B on larvae weight of *Spodoptera litura*

处理	药后 1 d	药后 2 d	药后 3 d	药后 4 d	药后 5 d	m/g
印楝素 A	0.031 ± 0.002b	0.048 ± 0.003b	0.076 ± 0.008b	0.133 ± 0.011b	0.232 ± 0.018b	
印楝素 B	0.032 ± 0.002b	0.045 ± 0.002c	0.049 ± 0.002d	0.072 ± 0.006d	0.105 ± 0.010d	
印楝素干粉	0.027 ± 0.002c	0.042 ± 0.002cd	0.045 ± 0.002e	0.060 ± 0.005e	0.087 ± 0.010de	
CK	0.046 ± 0.003a	0.081 ± 0.005a	0.179 ± 0.005a	0.253 ± 0.012a	0.362 ± 0.033a	

1) 干粉中有效成分含量以印楝素 A 计, 干粉中印楝素 A 质量分数为 7.920%, 处理时间为 72 h; 同列数据后凡具有一个相同字母者, 表示在 5% 水平上差异不显著(DMRT)。

3 结论

w 为 0.3% 的印楝素乳油是目前市面唯一基于印楝素干粉的制剂, 然而乳油制剂中成分比重大的有机溶剂, 如苯、甲苯、二甲苯、甲醇等, 不仅对环境有害, 还会对人类健康造成严重威胁^[21]。需要制备含量及活性更高的印楝素干粉, 使制备新的印楝素制剂, 如微乳液和悬浮浓缩物等成为可能。本文使用乙酸乙酯浸提法制备了印楝素干粉。该提取方法不仅简单有效, 制备得到的印楝素干粉对斜纹夜蛾及大菜粉蝶的活性更是优于印楝素 A 及印楝素 B。印楝素干粉是植物直接提取物, 其化学成分比印楝素 A 及印楝素 B 更为复杂, 不仅包含其他多种的印楝同系物, 还可能具有其他活性物质, 因而生物活性更高。

本研究建立了印楝素干粉的 HPLC 检测方法, 能快速高效地测定印楝素干粉中印楝素 A 的含量, 分离效果好, 对检测印楝素 A 及印楝素干粉具有一定参考意义。

参考文献:

- [1] 徐汉虹, 何道航, 魏孝义, 等. 国产印楝种子中印楝素的结构鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 20-22.
- [2] 龚伟, 胡庭兴, 宫渊波, 等. 印楝在我国的引种与经营利用现状[J]. 四川林业科技, 2004, 25(3): 48-52.
- [3] 冯沙克, 赵元藩. 云南省印楝种植及相关产业的发展现状[J]. 林业调查规划, 2007, 32(5): 79-82.
- [4] 段琼芬, 王有琼, 孙龙, 等. 4 种提取印楝素方法的比较[J]. 农药, 2005, 44(10): 455-456.
- [5] JARVIS A P, MORGAN E D. Analysis of small samples of limonoids of neem (*Azadirachta indica*) using solid phase extraction from tissue culture[J]. Phytochem Anal, 2000, 11(3): 184-189.
- [6] SAKURAI K, TANINO K. Synthetic studies on azadirachtin: Construction of the ABC ring system via the Diels-Alder reaction of a vinyl allenylsilane derivative[J]. Tetrahedron Lett, 2015, 56(3): 496-499.
- [7] REMEDIO R N, NUNES P H, ANHOLETO L A, et al. Morphological effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae)[J]. Parasitology Res, 2015, 114(2): 431-444.
- [8] 操海群, 岳永德, 花日茂, 等. 植物源农药研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(1): 40-44.
- [9] RAIZADA R B, SRIVASTAVA M K, KAUSHAL R A, et al. Azadirachtin, a neem biopesticide: Subchronic toxicity assessment in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(5): 477-483.
- [10] 李泳. 植物源杀虫剂对储粮害虫米象生物活性的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [11] MAITRA B, SEN S, HOMECHAUDHURI S. Flow cytometric analysis of fish leukocytes as a model for toxicity produced by azadirachtin-based bioagrocontaminant[J]. Toxicol Environ Chem, 2014, 96(2): 328-341.
- [12] 高全. 印楝素活性成分对照品的分离制备[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [13] KANOKMEDHAKUL S, KANOKMEDHAKU K, PRAJUABSUK T, et al. Azadirachtin derivatives from seed kernels of *Azadirachta excelsa*[J]. J Nat Prod, 2005, 68(7): 1047-1050.
- [14] 张国洲, 吴恭谦. 植物性杀虫剂研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(1): 25-28.
- [15] 张志祥, 程东美, 徐汉虹, 等. 印楝素 A 和印楝素 B 的生物活性及增效作用[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(5): 515-518.
- [16] 张志祥, 程东美, 徐汉虹. 印楝素 A 和印楝素 B 生物活性比较[J]. 植物保护, 2007, 33(3): 80-82.
- [17] 张志祥, 田永清, 程东美, 等. 印楝素 A 和印楝素 B 的稳定性比较[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 125-127.
- [18] 王瑞龙, 孙玉林, 梁笑婷, 等. 6 种植物次生物质对斜纹夜蛾解毒酶活性的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(16): 5191-5198.
- [19] 邓劲松. 生物农药印楝素防治蔬菜斜纹夜蛾试验[J]. 植物医生, 2015, 28(2): 32-33.
- [20] 张余杰, 张亚, 董丁铭, 等. 坡柳皂苷对大菜粉蝶生长发育的抑制活性[J]. 农药学学报, 2014, 16(1): 102-105.
- [21] 刘文广. 现代农药剂型加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 416-422.

【责任编辑 霍 欢】

<http://xuebao.scau.edu.cn>