

引种印楝国产种子的印楝素含量 及杀虫活性初步研究

张业光 张 兴* 赵善欢

(昆虫毒理研究室)

摘要 应用高效液相色谱法 (HPLC) 定量分析结果表明, 从海南省种植的印楝树 (*Azadirachta indica* A. Juss) 上收获的种子中印楝素 (Azadirachtin) 含量为 0.48%, 甲醇提取物获得率为 16.39%, 其中含印楝素 2.9%。国产印楝种子提取物对亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) 和小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫均有强烈的抑制生长发育作用活性。提取物馏分 F₃₋₅ (含印楝素 0.883%) 500 ppm 饲喂亚洲玉米螟 4~5 龄幼虫造成 100% 畸形死亡和变成“永久性幼虫”, 113 ppm 时也有显著效果。2% 处理小菜蛾四龄幼虫也使之 100% 畸形死亡。试验还发现不含印楝素的其它馏分对以上两种害虫也有不同程度的作用效果, 值得进一步研究。

关键词 印楝; 印楝素; 亚洲玉米螟; 小菜蛾; 生长发育抑制作用

印楝是目前世界公认的高效杀虫植物, 许多国家和地区的科学家正致力于印楝的引种、栽培和加工生产杀虫剂的研究。华南农业大学昆虫毒理研究室与海南万宁县林业局合作, 于 1986 年开始试验引种印楝, 并已获得初步成功^[1]。因此, 很有必要研究这些国产印楝产物的杀虫活性, 评价在我国热带地区种植印楝并用之于生产杀虫剂的实际价值, 为印楝的推广种植和开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 印楝素含量分析

1.1.1 印楝种子来源 采自海南省万宁县境内栽培于沙壤地上的印楝树。该树于 1986 年引种于非洲多哥, 1988 年 9 月第 1 次结果成熟。收采新鲜成熟的印楝果, 剥除果皮, 用清水洗去果肉后放在阴晾处风干种子备用。

1.1.2 提取与初步分离 用小型植物捣碎机将印楝种子粉碎后, 装入具塞磨口三角瓶中, 用甲醇 (分析纯 99.5%) 在常温下浸提种子粉 6 次 (每次 8 h), 浸提液减压除溶剂后得甲醇提取物。然后用硅胶 H (200~260 目, 青岛产) 柱层析分离甲醇提取物为 4 个馏分 (详见图 1)。各馏份减压蒸除溶剂后分别用丙酮 (分析纯) 定容为 10 ml, 密封保存于冰箱内备用。

1.1.3 定量分析 用 Water LC-244 型高效液相色谱仪配 Lambda-Max Model 紫外及可见分光光度检测器分析印楝素含量, 选用柱型: Zorbax C₈ (4.6 mm×250 mm); 流动相: 甲醇+水 (6:4); 柱压: 2 000 磅/cm²; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 40°C; 检测波长: 217 nm。印楝素纯品 (标样) 由联邦德国 Hohenheim 大学化学系 W. Clauss 教授提供。

* 张兴同志现在西北农业大学植保系工作。

1990-06-04 收稿

1.2 生物测定

1.2.1 亚洲玉米螟 供试幼虫是在恒温养虫室 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照 16 h/d) 用半人工饲料^[1]周年饲养的种群。供试样品先用丙酮溶解, 均匀拌入半人工饲料 (对照组拌入等量丙酮), 在通风橱中让丙酮挥发后将饲料装入圆柱形 (直径 9 cm, 高 9 cm) 玻璃罐头瓶中, 每瓶放饲料 50 g, 接入 4~5 龄幼虫 40~60 头, 瓶口用有铜纱透气孔的塑料盖扣紧, 饲喂幼虫 48 h 后换入无药物处理的饲料继续饲养至幼虫化蛹、羽化。逐日观察记录试虫的生长、发育和畸变情况。

1.2.2 小菜蛾 原采自广州市郊菜田, 经室内用天然饲料饲养 2~3 代后, 选取生长发育正常整齐的幼虫供试。用丙酮将供试样品稀释后, 取一片约 5 cm \times 5 cm 大小的甘兰叶片在稀释液中浸 1 s 即取出, 让丙酮挥发后把叶片放到直径为 9 cm 的玻璃培养皿中 (皿底垫有滤纸加蒸馏水保湿), 每皿放入 10 头 4 龄初期幼虫, 皿口盖上一层纱布再扣上皿盖。待幼虫接触取食 48 h 后换入无处理新鲜叶片继续饲养至化蛹和羽化。每处理设 5 个重复。对照组以纯丙酮处理叶片作对比。

2 试验结果

HPLC 分析表明, 印楝素 (标样) 在该色谱条件下的保留时间为 6.88 min。进样量为 1~4 μg 范围内时, 峰面积与进样量呈极显著的线性相关 (回归方程: $y = 5\,167.7x + 4\,486$; 相关系数: $r = 0.9987$ 见图 2)。

对甲醇提取物的 4 个馏分进行 2 次 HPLC 分析均表明, F_{1-2} , F_{8-15} 和 F_M 三馏分测不出印楝素。而 F_{3-5} 在 6.88 分处有明显的吸收峰, 说明含有印楝素 (见图 3, 表 1)。根据标准曲线换算得 F_{3-5} 馏分中印楝素含量为 0.883% (两次测定的平均值), 并据此计得甲醇提取物中含印楝素 2.94%, 种子中含 0.48%。

国产印楝种子提取物对亚洲玉米螟幼虫有强烈的抑制生长发育活性。生测结果表明, 经混有提取物的饲料喂食后, 幼虫生长发育受扰乱, 大多数成为长时间 (比对照组延长 20~30 天) 不能蜕皮化蛹的“永久性幼虫”。该虫不能正常活动取食, 后期表皮出现瘤状黑斑, 胸足变黑, 虫体缩小变黑褐色后慢慢死去。部分幼虫化为不能继续正常发育的畸型蛹, 或成为不能完全脱离蛹壳、翅短小, 不能展翅正常飞翔、交配、产卵的畸形成虫。 F_{3-5} 馏分活性最强, 0.05% 浓度可使 100% 试虫在幼虫期发育受抑死亡。不含印楝素的其它几个馏分也有不同程度的活性, 其活性强度顺序为: $F_{1-2} > F_{8-15} > F_M$ (详见图 4)。能诱发的虫体发育受抑症状与印楝素纯品和 F_{3-5} 相似。

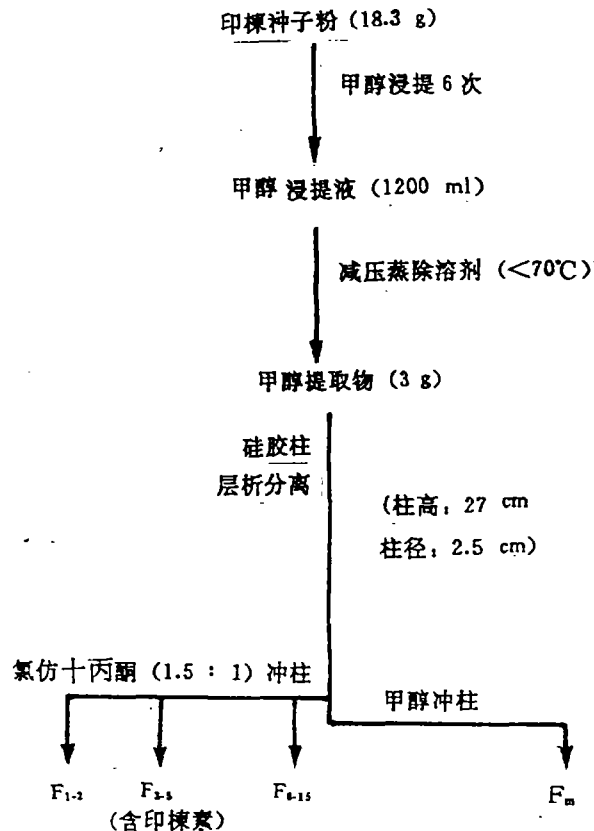


图1 国产印楝种子杀虫成分提取与初步分离程序 1988. 10. 广州

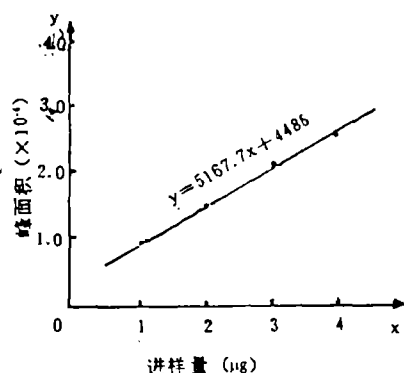


图2 印楝素 HPLC 分析标准曲线
1988年11月, 广州

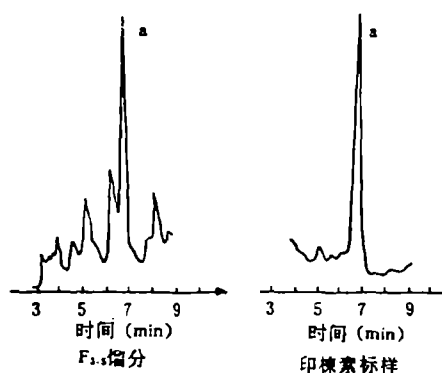


图3 印楝 HPLC 分析谱图 1988年11月, 广州
a. 印楝素 (保留时间: 6.88 min)

表1 国产印楝种子印楝素含量 HPLC 分析结果

1988年11月, 广州

测试样品	稀释倍数	进样量(μl)	印楝素 出峰面积	印楝素· 测出量(μg)	测试样品中 印楝素含量 (mg/g)
F ₁₋₂	50	10	测不出	0	0
	原液	5			
F ₂₋₃	50	10	13 384	1.721 8	8.609
	50	10	13 832	1.808 5	9.042
F ₄₋₁₅	50	10	测不出	0	0
	原液	5			
F ₂₄	50	10	测不出	0	0
	原液	5			

* 印楝素测出量是出峰面积按标准曲线(图2)换算而来。

用 F₃₋₅ 与联邦德国提供的印楝素纯品作生物活性比较的测定结果表明, 当饲料中含有印楝素浓度相同时, F₃₋₅ 的活性比印楝素略高或相当(表2)。显然是由于 F₃₋₅ 中含有除印楝素外的杀虫活性成分。

表2

印楝素对亚洲玉米螟生长发育抑制作用效果

1989年1月, 广州

供试样品	饲料中样品 浓度(ppm)	饲料中印楝素 浓度(ppm)	供试虫数 (头)	合计畸形· 死亡率(%)
F ₃₋₅	565	5.0	45	95.56 a
印楝素(西德)	5.0	5.0	45	82.22 ab
F ₂₋₃	113	1.0	44	68.16 b
印楝素(西德)	1.0	1.0	44	45.46 c
对 照	—	—	45	24.44

* 试栏数据后字母相同者示方差分析(邓肯氏法)在5%水平差异不显著。

对小菜蛾生测结果也表明国产印楝提取物对该虫有显著的作用活性。 F_{1-2} 活性最强, F_{3-5} 次之。在2%浓度处理时这两组分造成小菜蛾幼虫的畸形死亡率达100%, F_M 的活性相对较差(详见图5)。接触取食印楝提取物后,小菜蛾很少形成“永久性幼虫”,相当一部分因不能正常蜕皮化蛹在幼虫期死亡或形成“幼虫—蛹中间体”;也有的形成畸形蛹和畸形成虫。

3 讨论

印楝在亚洲,非洲和拉丁美洲的许多地区都有分布和栽培。据近年国外研究报道,分布于不同地区的各品种与生态型所含印楝素等杀虫成分有显著差异^{[5][6]}。在非洲多哥北部的印楝种子含印楝素最丰,达0.5%~0.66%;而印度,缅甸、苏丹等地种子中印楝素含量只有0.15%~0.35%。Singh, R. P (1986)的研究认为,生长在热带干旱地区的印楝杀虫成分明显高于沿海多雨地区的印楝;多雨高湿地区收获的种子中印楝油含量较高^[9]。海南省万宁县属于高温多雨的沿海地区,种植从多哥引种的印楝不但生长速度快,而且印楝素含量也较高(达0.48%),初步说明在该地区种印楝并用于生产杀虫剂有较高价值,建议有关部门重视印楝的推广种植。

赵善欢等(1984)曾报导印楝素(美国提供)对亚洲玉米螟的作用活性和毒理机制^[2],认为印楝素作用于昆虫的神经内分泌系统,影响蜕皮激素和保幼激素的分泌,导致发生系统性病变。本研究证实国产印楝种子中含印楝素的提取物馏分有与之相同的作用活性,并且还发现不含印楝素的馏分也会使害虫产生相似的致毒症状,说明非印楝素杀虫成分的作用不可忽视。已经鉴定了分子结构的印楝次生化合物至少有32种,其中三萜类物质有26种^[7]。Salannin, Meliatrol, Vepaol, Isovepaol 和 Nimibidin 等均有杀虫活性。因此,研究国产印楝的其它杀虫活性成分的含量和有效简易的提取方法都很有意义。

小菜蛾严重的抗药性问题已经引起世界性的关注,寻找新型杀虫剂克服其抗药性是十

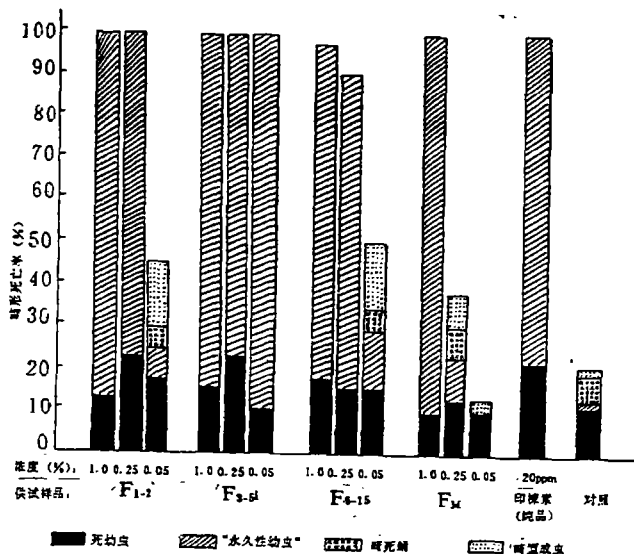


图4 国产印楝种子提取物对亚洲玉米螟生长发育抑制作用效果 (1988年, 广州)

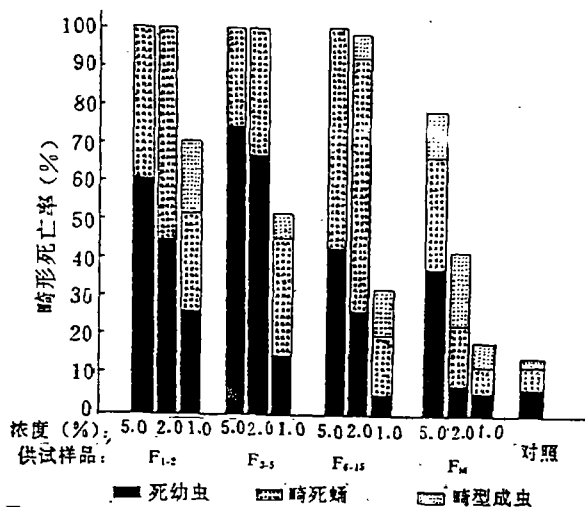


图5 国产印楝种子提取物对四龄小菜蛾生长发育抑制作用效果
(张业光等, 1989年1月, 广州)

分迫切的课题。国外在应用印楝产物防治小菜蛾方面已做了一些工作^[4,8,10]。最有意义的是 Völlinger, M. 证实印楝提取物不易使小菜蛾产生抗性^[11]。本研究结果也表明,在我国发展生产印楝杀虫剂将为防治小菜蛾提供有效的途径。

4 结论

高效液相色谱 (HPLC) 法分析和生物测定结果表明,我国首次引种成功的印楝树上种子中含印楝素达 0.48%,印楝种子提取物对亚洲玉米螟和小菜蛾都有高效的抑制生长发育活性。说明在我国种植印楝生产杀虫剂是大有希望的。

致谢 仪器分析工作得到华南农业大学中心实验室齐军同志协助,谨致谢忱!

参 考 文 献

- 1 周大荣等. 玉米螟人工大量繁殖饲养. 植物保护学报, 1980, 7 (2): 263~281
- 2 赵善欢等. 印楝素对亚洲玉米螟幼虫生长发育的影响. 昆虫学报, 1984, 27 (3): 241~247
- 3 赵善欢等. 印楝引种试验初报. 华南农业大学学报, 1989, 10 (2): 34~39
- 4 Dreyer M. Field and laboratory trial with simple neem products as protectants against pests of vegetables and field crops in Togo. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed). Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ 1987. 431~447
- 5 Ermel K, et al. Comparison of the azadirachtin content of neem seeds from ecotypes of Asian and African origin. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed.) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1984. 91~94
- 6 Kirsch K. Studies of the efficacy of neem extracts in controlling major insect pests of tobacco and cabbage in The Philippines. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1987. 495~515
- 7 Rao, K N and Parmar B S. A compendium of chemical constituents of neem. Neem Newsletter 1984, 1 (4): 39~46
- 8 Schneider B H and K Ermel. Quantitation determination of azadirachtin in crude and enriched extracts. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed.) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1987. 161~170
- 9 Singh R P. Comparison of antifeedant efficacy and extract yield of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ecotypes and parts of neem tree. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed.) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1987. 185~194
- 10 Sombatsiri K. and K. Tembookeat. Efficacy of an improved neem kernel extract in the control of *Spodoptera litura* and of *Plutella xylostella* under the laboratory condition and in the fields. In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed.) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1987. 195~203
- 11 Völlinger M. Studies on the possible development of resistance to neem seed kernel extract and deltamethrin in *Plutella xylostella* (L.) In: Schmutterer, H. and K. R. S. Ascher (ed.) Natural Pesticides from the Neem Tree and other Tropical Plants. Eschborn, GTZ, 1987. 543~554

PRELIMINARY STUDIES ON AZADIRACTIN CONTENT AND INSECTICIDAL
ACTIVITY OF THE SEEDS FROM THE INTRODUCED NEEM TREES *Azadirachta*
indica A. Juss PLANTED IN CHINA

Zhang Yeguang Zhang Xing Chiu Shin—Foon

(Laboratory of Insect Toxicology)

Abstract With High Performance Liquid Chromatograph (HPLC), a quantitative analysis of azadirachtin of neem seeds collected from neem trees that were introduced from Togo, Africa, now successfully cultivated in Wannin county, Hainan Province, China, as well as the test of insecticidal activity of the seed extracts have been conducted in the laboratory. The results showed that the air-dried seeds contained azadirachtin up to 0.48%. The methanol extract with a recovery rate of 16.39% from the neem seeds contained azadirachtin at 2.94%. F_{3-5} , a fraction of the methanol extract containing azadirachtin at 0.883% was significantly effective against the 4—5th instar larvae of Asiatic corn borer, *Ostrinia furnacalis* when administered at a concentration of 113 ppm mixed with an artificial diet, and all the larvae developed malformation and died or became so call “permanent larvae” when treated at a concentration of 500 ppm. After eating or coming in contact with leaves treated with 2% of F_{3-5} , all the 4th instar larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* were inhibited in their growth and development, malformation and death following. Besides the F_{3-5} , other fractions of the methanol extract containing no azadirachtin e.g. F_{1-2} , F_{4-15} and F_{16} , also showed similar bioactivity against the two insect pests, this is worthy of further studies.

Key words *Azadirachta indica* A. Juss; Azadirachtin; *Ostrinia furnacalis*; *Plutella xylostella*; Growth and development inhibition