

番茄茎叶提取物对萝卜蚜的毒力及其活性物质的分离纯化和结构的初步解析

李会¹, 吴世标³, 贾福丽¹, 陈义娟¹, 胡金锋³, 吴节莉², 代光辉¹

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 农业部都市农业(南方)开放重点实验室, 上海 200240;

2. 上海交通大学分析测试中心, 上海 200240; 3. 华东师范大学脑功能基因组学研究所, 上海 200062)

摘要: 番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)茎叶提取物对萝卜蚜(*Lipaphis erysimi* Kaltentbach)具有防治效果,且随着浓度的提高活性加强。在田间小区试验中,当浓度为 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对萝卜蚜的防效为97%。室内生测实验结果表明,其对萝卜蚜毒效的 LC_{50} 为 $10.36\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。通过对番茄茎叶进行提取、分离和纯化,结合活性跟踪,经红外光谱、紫外光谱、质谱、核磁共振等分析,初步确定该活性结构为一分子量为300.1415的脂肪酸酯类化合物。

关键词: 番茄;植物提取物;萝卜蚜;防治效果

中图分类号: S 482.1

文献标识码: A

Control Effect of Leaf and Stalk Extracts of *Lycopersicon esculentum* Mill on *Lipaphis erysimi* Kaltentbach and Isolation, Purification and Structure Identification of the Active Substances

LI Hui¹, WU Shi-biao³, JIA Fu-li¹, CHEN Yi-Juan¹,
HU Jin-fen³, WU Jie-li², DAI Guang-hui¹

(1. Plant Health and Natural Products Lab, School of Agriculture and Biology, Key Laboratory of Urban Agriculture (south), Ministry of Agriculture, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2. Instrumental Analysis Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

3. Department of Natural Products for Chemical Genetic Research, Key Laboratory of Brain Functional Genomics, Ministry of Education & Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics (MOE & SBFG), East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: This study showed that extracts from stalks and leaves of tomato plant(*Lycopersicon esculentum* Mill) had a control effect against Turnip aphid(*Lipaphis erysimi* Kaltentbach). The efficiency increased as the dose increased. The control effect (97%) of the extracts ($30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) against the insect was demonstrated through field experiment. The indoor bioassay results also showed that the extracts are toxic to turnip aphid with LC_{50} of $10.36\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The active compounds were extracted, isolated and purified, as an ester of fatty acid. Its molecular weight was identified as 300.1415.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill; extracts; *Lipaphis erysimi* Kaltentbach; control effect

收稿日期: 2010-12-07

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化基金(083919n8100); 上海市蔬菜学重点学科基金(B209); 上海农乐生物制品股份有限公司研究与发展基金资助。

作者简介: 李会(1985-), 男, 陕西子洲人, 硕士研究生, 研究方向: 植物源杀虫剂;

代光辉为本文的通讯作者, 女, 教授, 博士生导师, Tel: 021-34206923, E-mail: gh dai@sjtu.edu.cn

萝卜蚜(*Lipaphis erysimi* Kalténbach)又称菜缢管蚜,是十字花科蔬菜的重要害虫,主要危害乌塌菜、菜薹、白菜、萝卜、芥菜、青菜、甘蓝、花椰菜、芜菁等十字花科蔬菜,偏嗜白菜及芥菜。在蔬菜叶背或留种株的嫩梢叶上危害。受害叶片变黄、矮化、萎缩、生长停滞,该虫还能传播十字花科蔬菜花叶病毒病,其损失比直接为害更为严重^[1-3]。由于萝卜蚜世代多、寿命长、繁殖量大、危害重、且易产生抗药性,给防治带来很大困难。目前人们一般依赖于化学农药抗蚜威和吡虫啉等来对其进行防治。但是大量使用化学合成农药会促使害虫产生抗药性,农药残留会对食物链及环境造成破坏和污染。为此,利用来源于天然植物中的活性物质来控制植物病虫害,由于其安全性高、容易降解,将成为今后主要的发展方向,具有广阔的市场发展前景。

目前针对萝卜蚜的植物源农药大部分处于研究阶段,实现产业化的为数不多。据报道苦参碱用于防治萝卜蚜^[4-6],其高浓度下校正死亡率可达到88%,但是此植物源农药并没有大面积推广应用,究其原因其达到防效所需时间较长,植物资源不够丰富,导致相对成本较高,而制约了在实际生产中的应用。另据报道,广西师范大学刘艳华等从广西75种野生植物中筛选出一种对萝卜蚜毒力最高的植物大头艾纳香,但是未分离纯化到其活性化合物^[7]。

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)属茄科植物,在我国绝大部分地区广泛种植,资源丰富;据文献报道,目前已发现番茄茎叶提取物对三十多种真菌有抑制作用^[8],然而其茎叶一直作为农业废弃物处置而未加以利用。本研究将对番茄茎叶中活性物质进行提取、杀虫活性测定及活性结构解析,旨在从番茄茎叶中寻求一种对萝卜蚜具有致死作用的活性化合物,从而为将番茄茎叶提取物开发为一种低毒、低残留、低成本的绿色植物源杀虫剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

番茄(*L. esculentum*)茎叶采集于孙桥现代农业园区,为樱桃番茄品种埃德丽诺。番茄茎叶经清洗、晾干、60℃干燥、粉碎成20~40目粉末,放置于通风环境的标本橱中备用。

萝卜蚜(*L. erysimi*)采集于上海交通大学农业与生物工程训练中心农场的卷心菜地中。卷心菜品种(品系)选用京丰一号。配置药液的溶剂采用对蚜

虫无毒的10%DMSO溶液作为溶剂。

1.2 仪器、试剂

所使用仪器:DJ-04L粉碎机、DGX-9053型干燥箱、RE-52C旋转蒸发器、SHZ-III循环水真空泵、DL-180超声波、BA210S电子天平显色喷瓶、层析柱、紫外观察箱

所使用试剂:

(1)分离用试剂:甲醇、乙醇、丙酮、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、正丁醇等有机溶剂,均为分析纯(AR),由上海凌峰化学试剂有限公司生产。

(2)制备用试剂:乙醇,由上海凌峰化学试剂有限公司生产;二甲基亚砷,由国药集团化学试剂有限公司生产;丙酮,由上海凌峰化学试剂有限公司生产。

1.3 植物提取物的制备

番茄茎叶粉末的制备:将番茄茎叶,置于烘箱中,60℃烘干(24h),在中药粉碎机中粉碎15~30s。

植物材料提取:称取100g番茄茎叶粉末,置于烧杯中放在电磁搅拌器上,用1L70%乙醇搅拌煮沸30min,过滤后用旋转蒸发器40℃浓缩至干,称重后加入一定量的蒸馏水,经超声波震荡得提取液,然后用蒸馏水配制成浓度为40mg·mL⁻¹粗提液,再等倍稀释为5个浓度梯度进行室内萝卜蚜毒力生物测定;采用同样的方法,制备并配置30mg·mL⁻¹的粗提液进行萝卜蚜的田间防治试验。

采用浸提法获得番茄中的植物活性粗提物,用于进行分离纯化研究,方法为:称取3kg番茄粉末,置于桶中,加入20L甲醇浸提24h,浓缩,回收甲醇继续浸提,重复2次,3次浸提共得粗提物284g。

1.4 活性化合物的分离纯化及结构鉴定

将浸提所得的全部番茄茎叶粗提物进行硅胶柱粗分:分离采用层析柱(10cm×100cm),番茄茎叶粗提物用硅胶拌样,然后用洗脱剂(石油醚:乙酸乙酯为20:1)溶解后,湿法上样,石油醚-乙酸乙酯(20:1、15:1、10:1、5:1、1:1)为洗脱液进行梯度洗脱,硅胶(200~300目)2kg为固定相,流速为2滴/秒,500mL收集一瓶,共收集76瓶。经薄层层析检测后将相同或相似成分合并,共得6个组分,减压浓缩至干,每个组分取出约100mg,均配成10mg·mL⁻¹的药液。

活性组分二的薄层层析分析:采用硅胶(GF254)薄层板,石油醚:乙酸乙酯(20:1)为展开剂

进行薄板层析,层析后,置于通风橱内用吹风机吹干,然后在紫外观察箱内,用 254 nm 荧光检测和 10%硫酸(溶剂为乙醇)显色剂显色。检测到两个化合物,一个硫酸下显紫色斑点命名为 LH1,一个 254 nm 荧光下显黑色斑点命名为 LH2。

用石油醚:丙酮(25:1)洗脱剂的硅胶柱等度洗脱继续分离组分二中 LH1 和 LH2 两化合物。采用薄层层析检测跟踪,分别收集到两个化合物。

先用石油醚:乙酸乙酯(17:1)为洗脱剂等度洗脱继续纯化 LH1,再用石油醚:丙酮(15:1)等度洗脱,接着用石油醚:二氯甲烷(3:2)为洗脱剂的硅胶柱等度洗脱去色素纯化 LH1。二氯甲烷:甲醇(1:1)为洗脱剂的凝胶柱(SephadexLH-20,下同)纯化 LH1,最后用石油醚:乙酸乙酯(15:1)为洗脱剂的硅胶柱等度洗脱纯化 LH1,得到淡黄色液体呈刺激性气味的化合物 LH1 40.7 mg,取其中 20 mg 用 10% DMSO 配制成 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液用于活性测定。

用石油醚:丙酮(25:1)为洗脱剂的硅胶柱等度洗脱纯化 LH2,再用二氯甲烷:甲醇(1:1)为洗脱剂的凝胶柱纯化 LH1,最后用石油醚:乙酸乙酯(15:1)为洗脱剂的硅胶柱等度洗脱纯化 LH2,得到红黄色液态化合物 50.6 mg,取出其中 20.3 mg 用 10% DMSO 配制 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液用于活性测定。

所得活性化合物 LH1 为淡黄色液体状化合物,在 10%硫酸烤板下显紫红色。于上海交通大学分析测试中心进行核磁共振碳谱、氢谱以及质谱分析。

核磁共振($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$):采用 Varian MERCURY Plus-400 核磁共振仪,氘代试剂为 CDCl_3 。

质谱:采用 Waters UPLC Acquity/QTOFMS Premier 四级杆飞行时间串联质谱仪,用乙腈为溶剂。

1.5 粗提物及分离纯化过程中各组分对蚜虫的活性测定

蚜虫的饲养:萝卜蚜养于农业工程训练中心的卷心菜地中。加强菜地的田间管理,定时除去病态、变异的萝卜蚜,以保证萝卜蚜正常繁殖、生长。在田间饲养蚜虫的同时,在培养室中种植盆栽卷心菜,将蚜虫接于其上。定时除去蚜虫的天敌,保证蚜虫种群的安全、繁殖。生测时同样选取大小一致的健康成虫。

对番茄粗提液进行浓度梯度生测采用室内叶片

法,参照文献^[9-10]方法并加以改进。用浸湿的棉花、纱布将青菜叶片基部绑住,接上供试蚜虫,每叶片接虫 25 头左右,共设 4 个重复,然后喷洒不同浓度梯度的粗提液,以清水作为对照,24 h 后统计蚜虫死亡率。分离纯化所得组分及化合物数量较少,因而对 6 个组分以及对活性组分中分离得到的化合物 LH1 和 LH2 进行的生测采用载玻片浸渍法^[11]。将双面胶贴于载玻片的一端,然后取健康的成蚜,将其背部粘于双面胶上,每片 30 头,2 h 后境检,剔除死亡和受伤个体,补足每片 30 头。每个处理设 4 个重复,用 10% DMSO 水溶液为空白对照,将玻片浸于药液中轻轻振荡 5 s 后取出,用吸水纸吸取多余药液,观察蚜虫处理后的症状。

1.6 提取物防治萝卜蚜田间小区试验

于 2009 年 12 月 3 日,本试验在上海交大农业与生物工程训练中心的卷心菜地里,进行田间小区试验,气温 $6 \sim 10 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 56%。选取萝卜蚜大量产生的卷心菜 6 株一小区,共设对照、化学处理和粗提物处理 3 个处理,每个处理设 3 个小区(总共处理约 6 890 只萝卜蚜)。对照设水,化学处理为将吡虫啉 10%可湿性粉剂配成 $1.33 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水剂,粗提物处理为用水将番茄茎叶提取物配成的 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药液。施药前调查虫情和被害状,用手持喷雾器将药液均匀喷于卷心菜叶背面至滴水为止,施药 24 h 后调查活虫数。

虫口减退率(%) = $\frac{\text{药前虫口数} - \text{药后虫口数}}{\text{药前虫口数}}$

防治效果(%) = $\frac{\text{处理组虫口减退率} - \text{对照组虫口减退率}}{1 - \text{对照组虫口减退率}}$

2 结果

2.1 粗提液对萝卜蚜防治效果的室内测定结果

通过对不同浓度的番茄茎叶提取物杀虫活性的测定结果表明,提取物对萝卜蚜有很好的熏杀作用,而且杀虫效果和提取物浓度呈正相关。 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及更高浓度的提取物均表现出显著的杀虫效果,当浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,校正死亡率达到 87.5%(表 1)。利用 DPS 统计软件对试验数据进行分析,查表将校正死亡率转换成对应的几率值,将提取液浓度取对数值,求得毒力回归方程 $Y = 3.016 2x + 1.937 4$,相关系数为 $R^2 = 0.984 4$,提取物对萝卜蚜的 LC_{50} 为 $10.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表1 番茄茎叶提取物对萝卜蚜药效浓度梯度试验

Tab. 1 Efficacy of *L. esculentum* extracts on *L. erysimi* with different concentrations

提取液浓度/(mg·mL ⁻¹)	死亡率/%	防效/%
40	95.3±1.2a	94.8
20	88±6.9a	87.5
10	44.7±32.0b	41.7
5	21.3±15.0bc	17.7
2.5	7±1.2c	3.1
对照	4±0c	—

2.2 粗提液的分离纯化,及各组分的室内活性生物测定结果

对番茄粗提物通过第一次硅胶柱层析,分离后所得6个组分,分别进行生物活性测定结果表明,组分2和组分3具有显著的杀虫效果,其中组分2杀虫效果较好(见表2)。

表2 番茄茎叶提取物粗分所得六组分对萝卜蚜室内毒力测定

Tab. 2 Toxicity test of different fractions of *L. esculentum* extracts on *L. esculentum* in vitro

组分	死亡率/%	防效/%
1	88.3±17.1a	87.24
2	96.7±5.8a	96.4
3	93.3±7.6a	92.7
4	33.3±12.6bc	27.3
5	36.7±27.5bc	30.9
6	40±25b	34.6
对照	8.3±2.9c	—

对从组分2中分离到的两个化合物LH1和LH2进行生测,得出LH1化合物1h后校正死亡率大于70%,具有一定的杀虫效果(见表3)。

表3 番茄茎叶提取物组分二中两个化合物对萝卜蚜室内毒力测定

Tab. 3 Toxicity test of two compounds from fractions 2 on *L. esculentum* in vitro

处理	死亡率/%	防效/%
LH1	80.0±10a	78.6
LH2	63.3±20.2b	59.9
对照	8.3±2.9c	—

2.3 粗提液室内杀虫试验中毒症状观察

室内叶片生测法试验中,通过对粗提物处理后萝卜蚜的中毒症状观察,发现经过一段时间(大约半小时到一小时左右)处理试虫明显失常。一开始试虫慢慢失水、身体变软、变瘪;过一段时间(大约一个多小时)试虫不能正常爬行,易翻倒,但翻倒后对外界刺激仍有反应。再过一段时间(两小时后),试虫完全停止活动,对刺激无反应。以上现象推测可能是由于在粗提物中的活性物质穿透萝卜蚜表皮细胞

而进入其体内,从而对其产生了致死作用。番茄茎叶提取物中活性化合物的杀虫机制有待于进一步研究。

2.4 活性化合物LH1的结构解析

对活性化合物LH1进行核磁共振氢谱分析,见图1,显示其为一种脂肪酸酯,其中有连氧氢,有烯键,高场处有较多脂肪氢。通过对其核磁共振碳谱分析,见图2,显示其中有双键,有连氧碳。对活性化合物通过四级杆飞行时间质谱分析,见图3,显示其分子量为300.1415,其活性结构正在进一步鉴定中。

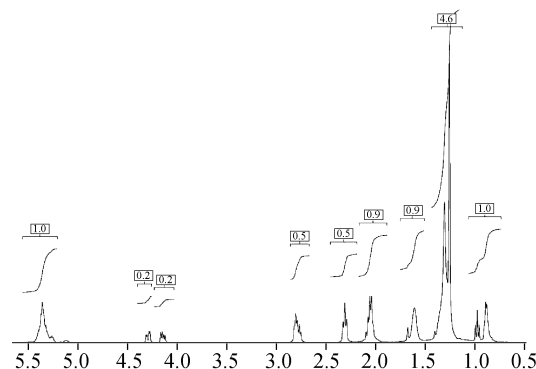
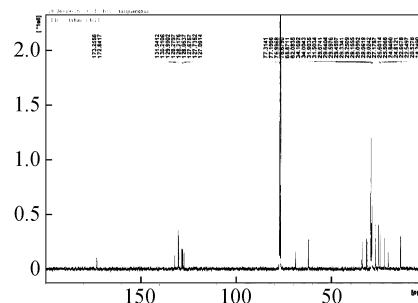
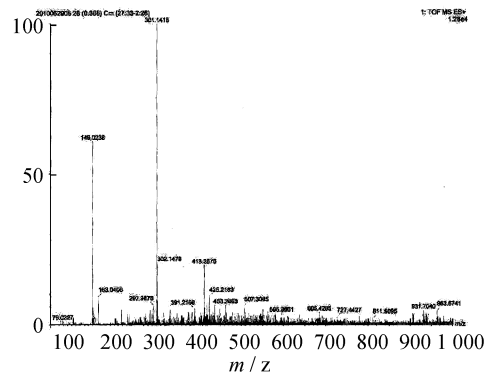
图1 活性化合物LH1的核磁共振氢谱图(溶剂为CDCl₃)Fig. 1 ¹H-NMR of the compound LH1图2 活性化合物LH1的核磁共振碳谱图(溶剂为CDCl₃)Fig. 2 ¹³C-NMR of the compound LH1

图3 活性化合物LH1的质谱图(溶剂为乙腈)

Fig. 3 MASS SPECTRUM of the compound LH1

2.5 番茄茎叶粗提物田间小区试验结果

田间小区试验结果表明提取物处理一天后对萝卜蚜有明显的致死作用,防治效果与化学对照无显著差异(见表4)。

表4 番茄茎叶提取物对萝卜田间小区防治试验

Tab. 4 Effect of *L. esculentum* extracts on *L. esculentum* control in the field

处理	死亡率/%	防效/%
提取液(30 mg · mL ⁻¹)	97.2 ± 2.9a	97.1
吡虫啉(1.33 mg · mL ⁻¹)	99.7 ± 0.5a	99.7
对照	3.9 ± 5.9b	—

3 结论与讨论

本研究通过载玻片浸渍法生测试验证明了番茄茎叶提取物中含有一种或多种脂肪酸酯对萝卜蚜有较好的杀虫活性,其活性化合物对萝卜蚜在短时间内有致死作用;田间小区试验结果进一步表明,提取物对萝卜蚜有明显的防治效果。以上试验结果表明,番茄茎叶提取物中含有防治萝卜蚜的活性物质,经过核磁共振氢谱等分析表明,该活性物质为一种或多种脂肪酸酯。该结果,为植物源农药的进一步的深入研究开发奠定了基础。关于活性化合物LH1的结构解析正在进一步进行中,同时番茄提取物的大田试验、剂型、毒理等还有待于更深入的研究。

在田间小区试验中未发现提取物对十字花科蔬菜生长有药害作用,据文献报道番茄茎叶提取物对棉铃虫也具有抑制生长的作用^[12]。由此可见该提取物具有较广的杀虫谱,以番茄茎叶为原料,开发出一种安全广谱的植物源天然杀虫剂,具有一定的可行性。

经过和已有防治萝卜蚜的植物源农药进行比较,发现现有针对萝卜蚜的植物源农药均未得到实质上的推广应用。番茄茎叶提取物达到高防效所需时间较短,植物资源又极其丰富。相对于大头艾纳香来说,本研究已从番茄中分离到活性化合物,并确定其种类和分子量,具体结构正在进一步解析中,而大头艾纳香中针对萝卜蚜的活性化合物并未进行研究。

该研究取番茄茎叶进行研究以期利用,实现了农业废弃物的再利用,变废为宝,有利于农业可持续发展。

参考文献:

- [1] 侯任环,赵讯,邓玲,等. 几种常见杀虫剂对萝卜蚜的毒力测定及药效试验[J]. 广东农业科学,1998,1(1):47-49.
- [2] 王学贵,沈丽淘,张敏,等. 36种植物甲醇提取物杀蚜虫活性的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):778-779,819.
- [3] 万树青,郑大睿. 几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性[J]. 植物保护,2005,31(6):55-57.
- [4] 朱锦磊,徐健,殷向东,等. 0.38%苦参碱乳油防治蔬菜蚜虫室内毒力测定[J]. 安徽农业科学,2003,31(2):278.
- [5] 赵伯涛,王康才,钱骅,等. 苦参总生物碱提取工艺优化及杀蚜虫活性研究[J]. 中国野生植物资源,2008,27(1):43-46.
- [6] 李强,吴莉宇. 辣蓼挥发油对萝卜蚜的毒力测定[J]. 热带农业科学,2006,26(4):20-21.
- [7] 刘艳华,邓业成,邓志勇. 75种植物提取物对萝卜蚜杀虫活性的测定[J]. 河南农业科学,2008,1:72-75.
- [8] 陶永霞,刘洪海,王忠民,等. 番茄碱的研究现状及应用前景[J]. 现代食品科技,2006,22(2):253-256.
- [9] 刘月,霍清,张盛宇,等. 臭椿叶提取液对蚜虫防治效果的研究[J]. 北方园艺,2009,(9):94-95.
- [10] 乔淑芬,孙智慧,顾地周. 长白山区三种龙胆乙醇浸提液对大豆蚜虫的触杀活性[J]. 农药,2009,48(12):929-931.
- [11] 赵彦君,师宝君,胡兆农. 杠柳毒素NW的杀虫活性[J]. 昆虫知识,2008,45(6):950-952.
- [12] 段江燕,徐志宏,韦举刚,等. 番茄碱对棉铃虫毒性分析[J]. 山西大学学报,2005,19(4):63-66.
- [13] 孙莹,卢志平,高松红,等. 番茄茎叶挥发性成分的提取与鉴定[J]. 中国药物化学杂志,2001,11(5):277-278.
- [14] 高占林,潘文亮,党志红,等. 几种杀虫植物对蚜虫的生物活性及与化学杀虫剂混用的联合毒力. 河北农业大学学报,2004,27(4):67-70.
- [15] 官亚军,石宝才,路虹,等. 温度对三种蚜虫生长发育及繁殖的影响[J]. 华北农业学报,2006,21(5):96-98.
- [16] 张兴,杨崇珍,王兴林. 西北地区杀虫植物的筛选[J]. 西北农业大学学报,1999,27(2):21-27.
- [17] Rosangela Marchelli. A multiresidual method for the simultaneous determination of the main glycoalkaloids and flavonoids in fresh and processed tomato by LC-DAD-MS/MS[J]. Journal of Separation Science,2009,32:3664-3671.