

黄杜鹃花杀虫活性成分及其对害虫毒杀作用的研究

胡美英 赵善欢

(昆虫毒理研究室)

摘要 作者采用生物活性追踪法,报道黄杜鹃花杀虫活性成分的提取、分离和鉴定结果。三种对害虫具有较高活性的化合物——闹羊花素-Ⅰ、Grayanotoxin-III和Kalmanol已被分离出来,其中以闹羊花素-Ⅰ为主要杀虫有效成分,在花中含量最高,达0.2%,另二种化合物的含量仅为0.04%。这三种化合物对马铃薯甲虫和草地夜蛾的拒食和毒杀作用强弱顺序为闹羊花素-Ⅰ>Grayanotoxin-III=Kalmanol。闹羊花素-Ⅰ或花乙酸乙酯萃取物对马铃薯甲虫和草地夜蛾的盆栽药效试验表明,防治效果良好,此外,对杂拟谷盗成虫亦有很强的毒杀作用和控制种群的作用。

关键词 黄杜鹃; 马铃薯甲虫; 草地夜蛾; 杂拟谷盗; 闹羊花素-Ⅰ; Grayanotoxin-III; Kalmanol

杀虫剂的应用仍是当今防治农业害虫及卫生害虫的重要手段之一。然而,由于长期大量使用合成有机杀虫剂,加之有些杀虫剂品种本身存在一些缺点,导致出现环境污染、害虫产生抗药性、杀伤天敌、害虫再猖獗等众所周知的严重问题^[1]。克服这些弊病的手段之一就是发展高效、安全、经济、无公害的新型杀虫剂^[2,4]。迄今人们已发现不少植物杀虫剂对害虫具有很高的活性,它们的杀虫作用方式和作用机制亦不同于一般的合成有机杀虫剂,而且对环境无污染^[4]。因此,近10余年来,对植物杀虫剂的研究已引起了国内外科学家们的极大兴趣。

黄杜鹃(又称闹羊花)(*Rhododendron molle* G. Don)的花作为杀虫植物使用在我国已有较长久的历史。它对多种农业害虫和卫生害虫具有显著的胃毒、触杀及熏杀等杀虫作用^[5]。最近研究表明,黄杜鹃花抽提物对小菜蛾、粘虫有很强的胃毒和拒食作用^[1]。我们的研究目的是分离提纯黄杜鹃花的杀虫有效成分,鉴定其化学结构,为杀虫剂新品种的开发应用及模拟合成提供科学的依据。

天津南开大学元素有机化学研究所尚稚珍、刘准教授等从1987年开始同时和我们合作,进行黄杜鹃的化学成分及杀虫活性研究,结果将另文发表。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 黄杜鹃干花 1989年4月从广东省乐昌县采回黄杜鹃鲜花,并在45~50℃下烘

本文是1988~1990年华南农业大学与美国犹他州天然产品研究所(NPI)合作成果的一部分,是作者胡美英在美国二年的科研工作的一部分。

1991-09-17收稿

干。

1. 1. 2 供试昆虫:

草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith); 用人工饲料在恒温 28℃ 和相对湿度 80% 条件下饲养 (Kubo 等^[12]), 挑选虫龄一致发育正常的幼虫供试。

马铃薯甲虫 (*Leptinotarsa decemlineata* Say): 用马铃薯鲜叶为饲料, 室内饲养多代发育正常的幼虫。

杂拟谷盗 (*Tribolium confusum* Jacquelin duval) 由卡罗来多 (Colorado) 生物供应公司提供。

1. 1. 3 Sabadilla 粉剂 从 IFM 公司购买, 含 Veratrine 生物碱 0.8%。95% 印栋素由美国 NPI 研究所提供。

1. 2 试验方法

1. 2. 1 杀虫有效成份的分离提纯:

提取: 4 kg 干花经磨碎后, 放入具塞磨口三角瓶内, 加入 30 倍 (V/W) 的甲醇, 在室温下浸提 48 h。浸提液滤出后, 滤液置于 R-110 真空旋转蒸发器中浓缩至干。残渣加入 30 倍量的甲醇。继续浸提 2 天。如此步骤重复 3 次, 直至滤出液无色为止。合并浓缩物, 获得提取率为 12.3% 的粘膏状甲醇抽提物。

初步分离: 采用液液萃取分配法。每次称取抽提物 50 g, 溶解于 30 倍 (V/W) 蒸馏水中, 装入分液漏斗内, 加入等量的二氯甲烷萃取分配, 重复 3 次, 所得的水萃取液再加入等量的乙酸乙酯萃取 3 次, 合并相同的萃取液, 并浓缩至干。

薄层层析 (TLC) 和柱层析分离: 参照 Klocke 等 (1985) 报道的分离技术进行。展开 TLC 板的溶剂是氯仿、甲醇和水 (60:15:4) 的混合液。柱层析分离采用直径 7 cm, 高 120 cm 的玻璃管柱。用湿法装柱法将硅胶 700 g 装入柱内作为固定相, 以甲醇和二氯甲烷混合液系统作为流动相进行梯度洗脱。所得洗脱液每 10 ml 分别浓缩后, 用 TLC 检验, 相同斑点合并。

1. 2. 2 生物活性的室内测定

拒食作用: 参照 Yamasaki 等^[14]报道的方法进行测定。

死亡率及生长发育抑制作用: 用不同浓度的药剂混合于人工饲料中, 然后把这些混药的饲料分别装入 5 ml 容量的具塞指头管中, 每管接入初孵幼虫 1 头。接虫后 10 天, 检查幼虫的生存及死亡情况。生存的幼虫用电子天平称其体重。从而求出死亡率和生长发育抑制率。

以上二项试验中, 每一药剂均用 5~6 个浓度, 按自小二乘法求出 95% 保叶效果所需的浓度 (PC₉₅)、致死中浓度 (LC₅₀) 及有效抑制中率 (EC₅₀)。

对杂拟谷盗的生物活性测定: 采用拌饲料法, 将药剂溶于少量丙酮, 拌入面粉中, 待丙酮挥发后, 把混药的面粉装入直径 7 cm、高 14 cm 的玻璃瓶中, 每瓶装入 35 g, 并接入供试成虫 18 头。接虫后 30 天和 50 天, 进行药效检查。

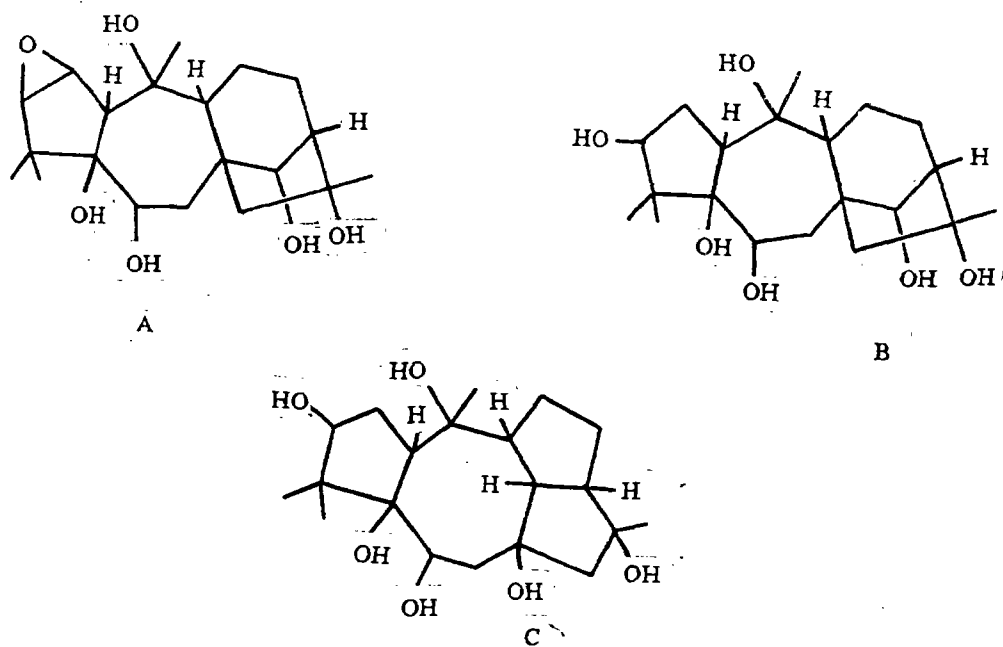
盆栽试验: 生长期 1 个月的盆栽马铃薯或棉花用于试验。供试药剂溶于 0.05% 吐温-80 水溶液中, 用手动喷雾器将药液喷于叶片上, 自然风干后, 接入一定数量的试虫。施药后 2、8、12 天, 检查虫口密度和叶片被害情况。每处理设 4 个重复。叶片被害程度的评定是根据被害叶面积百分率划分为 6 个级别。0 级: 叶片完好无损; 1 级: 被害叶面积 ≤ 10%; 2 级: 被害叶面积 11~39%; 3 级: 被害叶面积 40~69%; 4 级: 被害叶面积 70~94%; 5 级: 被害叶面积 95% 以上。防治效果按冯夏等^[1]的方法计算。

以上所有数据均用邓肯氏多范围法 (DMRT) 进行统计, 以比较各药剂处理间效果的差异性。

2 试验结果

2.1 杀虫有效成分的分离、提纯与鉴定

据试验发现, 黄杜鹃花甲醇抽提物对草地夜蛾和马铃薯甲虫均有较高的生物活性, 而其残渣则几乎无效。因此, 我们认为大部分的杀虫有效成分基本上已抽提出来。在这基础上, 采用生物活性追踪法指导提取分离流程。用液液萃取、TLC、柱层析、重结晶等手段进行分离。乙酸乙酯萃取物进入柱层析后, 用甲醇和二氯甲烷混合溶剂进行系统梯度洗脱分离, 共得 14 个馏分, 而生测结果表明, 仅馏分—5 和馏分—9 对草地夜蛾和马铃薯甲虫有较高的活性。馏分—5 在甲醇和二氯甲烷混合液以 1: 9 比例洗脱时而获得, 在花中其含量为 0.2%。馏分—9 则在此混合液以 1.5: 8.5 比例洗脱时而获得, 在花中的含量为 0.04%。馏分—5 再用丙酮重结晶后获得白色结晶。经过物理性测定 (如熔点测定) 和光谱学检定 (如红外线光谱、质谱和核磁共振) 的数据证明, 这一白色结晶为二萜烯类化合物——闹羊花素—Ⅱ, 又称黄杜鹃素—Ⅱ (Rhodojaponin—II), 其化学结构式见下图 A (鉴定见 Klocke 等^[11])。这一化合物早在 1969 年已由 Hikino 等^[8]从 *Rhododendron japonicum* 中分离得到, 1979 年我国武汉医学院附属一院亦从黄杜鹃的干燥成熟果实中分离出来。



A—Rhodojaponin—Ⅱ, B—Grayanotoxin—Ⅱ, C—Kalmanol

黄杜鹃花中三种活性成分的化学结构式

馏分—9 对昆虫活性低于馏分—5, 在花中的含量亦低于馏分—5。TLC 测定表明, 馏分—9 中还含有几种化合物。从 TLC 分离出来二个化合物, 再用丙酮重结晶所得到的白色结

晶,根据物理学和光谱学的检测数据,鉴定了这两种结晶化合物——Grayanotoxin—III 和 Kalmanol 的化学结构式,见图 B 和 C (鉴定见 Klocke 等^[11])。Grayanotoxin—III 已由 Scott 等^[12]从几种杜鹃属植物分离得到。Kalmanol 的首次报道是 Burke 等^[7]从 *Kalmia angustifolia* 中分离出来。

2. 2 闹羊花素—Ⅲ等几种活性成分对草地夜蛾和马铃薯甲虫的杀虫作用

2. 2. 1 室内试验

拒食作用:试验结果表明,从黄杜鹃花中分离出来的三个化合物对马铃薯甲虫和草地夜蛾具有较高的拒食作用。已有报道,印楝素对多种害虫表现出强烈的拒食作用^[2,4],因而在此试验中采用印楝素作为药效对比。在供试的几种药剂中,对马铃薯甲虫拒食活性最强的是闹羊花素—Ⅲ,其 PC_{50} 值为 $2.8 \mu\text{g}/50 \text{ mm}^2$,而印楝素则为 $50.0 \mu\text{g}/50 \text{ mm}^2$,说明其拒食活性比印楝素高 18 倍,值得重视。对草地夜蛾拒食活性最强的是印楝素,闹羊花素—Ⅲ居于第二。Grayanotoxin—III、I 和 Kalmanol 对这两种害虫的拒食活性相近似,都低于闹羊花素—Ⅲ (见表 1)。

毒杀作用:闹羊花素—Ⅲ、Veratrine 及 Sabadilla 分别混入人工饲料中,用以饲喂草地夜蛾初孵幼虫。结果指出,闹羊花素—Ⅲ表现出最强的毒杀作用, LC_{50} 值为 9.1 ppm 。在亚致死剂量下,试虫生长发育减慢,体重减轻。 EC_{50} 值为 3.9 ppm 。Veratrine 的毒杀作用次之,比闹羊花素—Ⅲ低约为 3 倍 (见表 2)。

此外,采用注射法把闹羊花素—Ⅲ经口腔注射入草地夜蛾五龄幼虫体内 (剂量为 $25 \mu\text{g}/\text{虫}$),结果表明,闹羊花素—Ⅲ有显著的触杀作用。注射后 20 min,全部试虫被击倒,注射后 2 天,死亡率为 56.5%。

2. 2. 2 盆栽试验

对马铃薯甲虫的药效试验:闹羊花素—Ⅲ喷于马铃薯植株上,可有效地防治马铃薯甲虫。当幼虫接到处理植株上,多数试虫爬动缓慢,不能正常取食,最后死亡。处理后 2 天,除对照组外,各处理的虫口密度显著下降,虫口减退率达 90.9%~95.5%。处理后 8 天,叶片受害率降低为 2%~3%,而对照组则高达 99%。黄杜鹃花乙酸乙酯萃取物与闹羊花素—Ⅲ的效果都很好。两药的效果近同 (见表 3)。

表 1 几种植物活性成分对马铃薯甲虫和草地夜蛾的拒食作用*

处 理	$PC_{50} (\mu\text{g}/50 \text{ mm}^2)$	
	马铃薯甲虫 (四龄幼虫)	草地夜蛾 (三龄幼虫)
闹羊花素—Ⅲ	2.8	6.4
Grayanotoxin—III	12.5	12.0
Grayanotoxin—I	12.5	12.0
Kalmanol	15.0	12.5
Sabadilla	501.0	525.0
印楝素	50.0	0.1

* 每处理设 5~6 个浓度,每浓度设 5~8 个重复。表中结果为处理后 24 h 的测定数据。

表 2 三种植物活性成分混入试虫饲料中对草地夜蛾的毒杀作用*

处 理	EC_{50} (ppm)	LC_{50} (ppm)
闹羊花素—Ⅲ	3.9	9.1
Veratrine	9.7	28.6
Sabadilla	910.5	3 011.0

* 每处理设 5~6 个浓度。 EC_{50} 的测定每浓度用 15 头幼虫; LC_{50} 的测定,每浓度用 30 头幼虫。表中结果为处理后 10 天的测定数据。

表 3 黄杜鹃花的活性成分对马铃薯甲虫防治效果测定（盆栽试验）

处 理	使 用 浓 度 (ppm)	喷药后天数及测定结果*		
		2 天 虫口减退率 (%)	8 天 叶片受害率 (%) (±SD)	16 天 化蛹率 (%) (±SD)
闹羊花素—Ⅱ	75	95.5 ^a	3±0.8 ^a	8±3 ^a
	150	95.5 ^a	2±0.9 ^a	5±4 ^a
黄杜鹃花乙酸	1000	90.9 ^a	2±1.3 ^a	9±0 ^a
乙酸萃取物	2000	95.5 ^a	0 ^a	0 ^a
对照	0	4.5 ^a	99±0.9 ^a	92±3 ^a

* ①表中数据为 4 个重复的平均数，每重复供试幼虫 22 头。
②数据后标有相同字母者，表示经方差分析法（DMRT）检定，于 5% 水平上无显著差异

对草地夜蛾的药效试验：闹羊花素—Ⅱ和黄杜鹃花乙酸乙酯萃取物对草地夜蛾都有很高的防治效果。处理后 8 天，闹羊花素—Ⅱ（150 ppm）的防效达 86.5%，而 0.5% 黄杜鹃花乙酸乙酯萃取物的防效高达 99.7%，经处理的植株几乎没有受虫害（见表 4）。

表 4 黄杜鹃花的活性成分对草地夜蛾防治效果测定（盆栽试验）

处 理	使 用 浓 度 (ppm)	处理后 8 天的结果*	
		叶片受害率 (%) (±SD)	防治效果 * (%)
闹羊花素—Ⅱ	150	13±4 ^a	86.5
黄杜鹃花乙酸 乙酯萃取物	1 000	51±22 ^a	46.9
	2 000	19±8 ^a	80.2
	5 000	0.3±0.4 ^a	99.7
对照	0	96±4 ^a	—

* ①表中数据为 4 个重复的平均数。
②数据后标有相同字母者，表示经方差分析法（DMRT）检定，于 5% 水平上无显著差异。

2. 2. 3 对仓库害虫杂拟谷盗的药效试验

试验结果表明，闹羊花素—Ⅱ（10 ppm）、黄杜鹃花萃取物（70 ppm）和 Sabadilla（5 000 ppm）对杂拟谷盗成虫种群的形成均具有显著的控制作用，防效分别为 64.6%，65.6% 和 87.6%。但在供试的低浓度下，前两者对成虫的触杀作用较差。当使用浓度提高为黄杜鹃花萃取物 350 ppm 和闹羊花素—Ⅱ 50 ppm，对供试成虫则有很强的触杀作用。两者的死亡率分别为 87% 和 89%，控制种群的防治效果分别高达 97.6% 和 100%（见表 5）。

表 5 三种植物活性成分对杂拟谷盗防治效果的测定^{*}

处 理	使 用 浓 度 (ppm)	成虫死亡率 (%) (±SD)	幼虫增加头数 (±SD)		防治效果 (%)
			低 龄	高 龄	
闹羊花素—Ⅲ	10	0 [*]	146±9 [*]	2±1 [*]	64.6
	50	89±6 [*]	0 [*]	0 [*]	100.0
黄杜鹃花乙酸 乙酯萃取物	70	0 [*]	137±9 [*]	7±2 [*]	65.6
	350	87±3 [*]	10±1 [*]	0 [*]	97.6
Sabadilla	1 000	0 [*]	289±12 [*]	145±11 [*]	0
	5 000	61±9 [*]	52±31 [*]	0 [*]	87.6
对 照	0	0 [*]	301±55 [*]	117±8 [*]	—

* ①表中数据为 3 个重复的平均数。
②数据后标有相同字母者，表示经方差分析法 (DMRT) 检定，于 5% 水平上无显著差异。

3 结论和讨论

3. 1 闹羊花素—Ⅲ对草地夜蛾和马铃薯甲虫具有很强的拒食作用和毒杀作用。盆栽试验结果证明，它能有效地防治这两种害虫。闹羊花素—Ⅲ对杂拟谷盗也有很强的控制种群建立的作用。
3. 2 闹羊花素—Ⅲ是黄杜鹃花中的主要杀虫有效成分。在几种二萜类的化学成分中，以闹羊花素—Ⅲ在花中含量最高 (含量为 0.2%)，对供试害虫的活性亦最强。Grayanotoxin—III 和 Kalmanol 在花中的含量仅为 0.04%，对供试害虫的活性亦较低。
3. 3 本试验采用的提取流程，具有方法简便，设备简单，提取效率较高，能提取 0.2% 的杀虫主要成分，为将来大规模应用花的提取物来防治害虫展示了可能性。花的乙酸乙酯萃取物中含有 14% 的闹羊花素—Ⅲ。若折算成纯品供试，它对几种试虫的活性与纯品无明显差异。因此，在害虫防治中，可直接使用黄杜鹃花的乙酸乙酯萃取物。
3. 4 不同杜鹃品种的抽提物对同一种昆虫的活性也不同。Bell 等^[1]采用 104 种杜鹃属 (*Rhododendron* L.) 植物对暗星象 (*Sciophilus obscurus* Horn) 进行取食行为的测定。结果表明，只有 7 种为高抗品种，16 种为中抗品种，其余为低抗或敏感品种。*Rhododendron molle* 为中抗品种。抗性高低是否与不同品种的闹羊花素—Ⅲ含量存在差异有关，值得进一步深入探讨。

致谢 本研究蒙美国犹他州天然产品研究所 (NPI) James A. Klocke 博士的指导和帮助，特表谢意。

参 考 文 献

1 冯夏, 赵善欢. 黄杜鹃提取物对几种害虫的生物活性及其作用机理的初步研究. 华南农业大学学报, 1990, 11 (2), 68~76

2 苗建才. 无公害杀虫剂及应用技术. 黑龙江: 科学技术出版社, 1990. 1~18

3 武汉医学院附属一院. 八厘麻毒素的提取分离及药用标准. 武汉医学院学报, 1979 (1), 44

- 4 赵善欢. 2000 年杀虫剂及害虫化学防治的展望. 农药, 1985 (4): 1
- 5 赵善欢, 张兴. 植物杀虫剂对水稻三化螟的拒食及内吸毒力试验. 中国农业科学, 1982 (2): 56~62
- 6 Bell, H. T., Clarke, R. C., Resistance among *Rhododendron* species to obscure root weevil feeding. J. Econ. Ent., 1978, (71): 869~870
- 7 Burke, J. W., Doskotch, R. W., Ni, C. Z. and Clardy, J., Kalmanol, a pharmacologically active diterpenoid with a new ring skeleton from *Kalmia angustifolia* L. J. Am. Chem. Soc., 1989, (111): 5831~5833
- 8 Hikino, H., Ito, K., Ohta, T. and Takemoto, T., Stereotstructure of rhodojaponin I, II, and III, toxins of *Rhododendron japonicum*, and of asebotoxin III, toxin of *Pieris japonica*. Chem. Pharm. Bull., 1969, (17): 1078~1079
- 9 Klocke, J. A., Plant compounds as sources and models of insect control agents. Econ. and Medicinal Plant Research, 1989, (3): 103~144
- 10 Klocke, J. A., Balandrin, M. F., Adams, R. P. and Kingsford, E., Insecticidal chromenes from the volatile oil of *Hemizonia fitchii*. J. Chem. Ecol., 1985, 11 (6): 701~712
- 11 Klocke, J. A., Hu, M. Y., Chiu, S. F. and Kubo, I., Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle*. Phytochem., 1991, 30 (6): 1797~1800
- 12 Kubo, I. And Klocke, J. A., Mechanisms of plant resistance to insects. ACS Symposium series 208, American Chemical Society, Washington, D. C. 1983, 329~346
- 13 Scott, P. M., Coldwell, B. B. and Wiberg, G. S. Grayanotoxins. Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice. Food Cosmet. Toxicol. 1971, (9): 179~184
- 14 Yamasaki, B. R. and Klocke, J. A., Structure bioactivity relationships of salannin as an antifeedant against the colorado potato beetle. J. Agric. Food Chem., 1989 (37): 1118~1124

STUDIES ON THE INSECTICIDAL PRINCIPLES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF YELLOW AZALEA, *Rhododendron molle* G. Don

Hu Meiying Chiu Shinfoon
(Laboratory of Insect Toxicology)

Abstract Three grayanoid diterpenes, rhodojaponin—III, grayanotoxin—III and Kalmanol were isolated and identified as the most active constituents in the dried flowers of yellow azalea, *Rhododendron molle* G. Don, collected from north Guangdong province. Rhodojaponin—III, the major compound, with a content of 0.2% in the dried flowers, exhibited high level of antifeedant, insect growth inhibitor, and insecticidal properties against the larvae of *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera frugiperda* and significant fecundity inhibitory effect against the adults of *Tribolium confusum*. Rhodojaponin—III and the EtoAc extract of azalea flowers were also tested in greenhouse bioassays for its residual activity against *L. decemlineata* and *S. frugiperda*. Results of potted trials indicated that rhodojaponin—III or EtoAc extract of azalea flowers were very promising for control of *L. decemlineata* and *S. frugiperda*.

Grayanotoxin—III and kalmanol were found to occur in much less content in azalea flowers and proved to be less effective as antifeedants against the larvae of *L. decemlineata* and *S. frugiperda* as compared with rhodojaponin—III.

Key words *Rhododendron molle*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera frugiperda*, *Tribolium confusum*; rhodojaponin—III, grayanotoxin—III; kalmanol