

水茄甲醇提取物对小菜蛾的生物活性 与化学成分研究

唐文伟, 刘晓亮, 曾东强*

(广西大学 农药与环境毒理研究所, 广西 南宁 350005)

摘要: 为探索外来入侵植物水茄 *Solanum torvum* Swartz 的综合利用价值, 以小菜蛾为生物活性靶标试虫, 在活性跟踪的基础上, 综合采用硅胶柱层析、凝胶柱层析、ODS 柱层析、聚酰胺层析、HPLC 制备等方法对其生物活性成分进行分离, 从乙酸乙酯萃取层中分离得到了 8 个化合物, 其中 5 个为黄酮类化合物, 分别是槲皮素(1)、木犀草素(2)、芹菜素(3)、山萘酚(4)和 tamarixin(5); 3 个为生物碱类化合物, 分别是 N-*p*-香豆酰酪胺(6)、N-2-hydroxy-2-(*p*-hydroxyphenylethyl) *p*-coumaramide(7)和 N-(2'-羟基二十四碳酰基)-1,3,4-三羟基-2-氨基-十八烷(8)。其中 N-*p*-香豆酰酪胺和 N-2-hydroxy-2-(*p*-hydroxyphenylethyl) *p*-coumaramide 对小菜蛾 2 龄幼虫具有显著的毒杀活性, 其 48 h 的 LC₅₀ 值分别为 103.5 μg/mL 和 123.1 μg/mL。研究为利用水茄中的天然产物成分开发成生物农药提供参考。

关键词: 水茄; 天然产物成分; 小菜蛾

中图分类号: S482.3⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286 (2012) 03-0483-04

Natural Products with Bioactivity against *Plutella xylostella* L. Isolated from *Solanum torvum* Swartz

TANG Wen-wei, LIU Xiao-liang, ZENG Dong-qiang*

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

Abstract: The EtOAc-soluble fraction of methanol extract of the whole plant of *Solanum torvum* Swartz exhibited potent activities against *Plutella xylostella* L. The fraction was separated using column chromatography (CC) over silica gel, ODS, polyamide polymer, Sephadex LH-20 and HPLC. Five known flavonoids, quercetin (1), luteolin (2), apigenin (3), kaempferol (4), tamarixin (5), and 3 known alkaloids, N-trans-*p*-coumaroyl tyramine(6), N-2-hydroxy-2-(*p*-hydroxyphenylethyl) *p*-coumaramide(7), N-(2'-hydroxytetra cosyl)-1, 3, 4-trihydroxy-2-amino-octadecane (8), were isolated by activity-guided fractionation. Compound N-trans-*p*-coumaroyl tyramine and N-2-hydroxy-2-(*p*-hydroxyphenylethyl) *p*-coumaramide exhibited potent toxicities against the 2th instar larvae of *P. xylostella*. The LC₅₀ values were 103.5 μg/mL and 123.1 μg/mL for 48 h, respectively. The study provided a scientific basis for utilization of *S. torvum* in development of botanical pesticides.

Key words: *Solanum torvum* Swartz; natural products; *Plutella xylostella* L.

水茄 *Solanum torvum* Swartz, 茄科 Solanaceae 茄属 *Solanum*。又名金钮扣、山颠茄、刺茄、鸭卡、金钮头、金衫扣^[1], 为无意引入侵植物, 属引进种的逸生种^[2], 主要入侵旱地作物。关于水茄的生物活性研究, 多见于医药研究。水茄可以作为中草药, 味辛, 微凉, 口服有毒^[3], 果实可以用于散瘀、

收稿日期: 2012-03-01 修回日期: 2012-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160375)、广西自然科学基金(2012GXNSFBA053044)和广西大学科研基金资助项目 (XBZ110382)

作者简介: 唐文伟 (1977—), 男, 讲师, 博士, 主要从事天然产物与农药创制研究, E-mail: wenweit@yahoo.com.cn;

*通讯作者: 曾东强, 教授, 博士, E-mail: zengdq550@163.com。

通经、消肿、止痛、止咳^[4]；根可以用于跌打瘀痛，腰肌劳损，胃痛，牙痛^[4]，闭经，久咳；鲜叶捣烂外敷可治无名肿毒^[1]。临床动物实验上的研究表明，水茄果实的甲醇粗提物具有抗化脓放线菌 *Actinomyces pyogenes*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、克雷柏氏杆菌 *Klebsiella pneumoniae*、绿脓假单胞杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 等细菌性病和黑曲霉菌 *Aspergillus niger*、白色念珠菌 *Candida albicans* 等真菌病的作用^[5]，从水茄中分离得到的 torvanol A 和 torvoside A 有显著的抗病毒活性^[6-7]，在我国水茄也是作为抗病毒的中草药的成分之一^[8]。在农业利用上，国内外尚未有对水茄生物活性的系统研究。初步的研究表明，水茄甲醇粗提物有抑制甘蔗凤梨病菌 *Ceratocystis paradoxa*、柑桔酸腐菌 *Geotrichum candidum*^[9-10]的作用，并具有杀螺活性^[8]。

本研究团队前期在对广西植物农药活性筛选的研究中发现，水茄甲醇粗提物对小菜蛾具有显著的毒杀活性，为明确其生物活性成分，在活性跟踪的基础上对其进行了天然产物成分分离，旨在为综合利用水茄提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试植物水茄 *Solanum torvum* Swartz 全株采自广西壮族自治区的十万大山，采集时间为2007年10月中旬，由广西林业勘察设计院钟业聪研究员鉴定，标本号 No. AN100916。

1.1.2 试虫 小菜蛾 *Plutella xylostella* L.: 从未施任何化学药剂的实验菜地采集高龄幼虫，在室内用未施药甘蓝叶(品种为京丰一号)饲养，收集蛹，成虫羽化后让其产卵于菜苗(品种为四九菜心)上，卵孵化后再用靠近法将1-2龄幼虫转移至甘蓝叶上饲养，挑选健康的2龄幼虫进行生物测定。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料的制备 采用冷浸法提取，将采集的植物材料放在室内通风处阴干，再在50℃的恒温鼓风干燥箱内充分干燥，用植物粉碎机粉碎。将材料干粉装入大型溶剂桶内(50 kg)，加入甲醇，溶剂比为 $v:m=5:1$ ，期间间断摇晃溶剂桶，每次提取72 h，重复提取3次，合并滤液用浓缩仪减压浓缩，得到甲醇粗提物，置于冰箱中备用。

1.2.2 生物活性成分的分离 以活性跟踪为基础，综合采用硅胶柱层析、凝胶柱层析、ODS柱层析、聚酰胺层析、HPLC制备等方法对水茄提取物的生物活性成分进行分离。

1.2.3 天然产物成分的结构鉴定 核磁共振谱(NMR)测定:以氘代试剂为溶剂，四甲基硅烷(TMS)为内标，测定¹H NMR、¹³C NMR和必要的²D NMR。

质谱(MS)测定:采取EI源、ESI源测定。根据MS图谱分析判断出化合物的分子量，由核磁共振谱推测C、H原子数及相关基团，结合二者的情况推测出化合物的结构，然后通过比对文献，鉴定出化合物的结构，并进行波谱数据的归属。

1.2.4 小菜蛾的毒杀活性测定 采用叶片浸渍法测定药剂对小菜蛾2龄幼虫的毒杀活性。将待测样品以少量丙酮或甲醇溶解(丙酮或甲醇含量为10%)，然后用水稀释到所需浓度并加入吐温-80少许，对照以10%丙酮或甲醇水溶液处理。选取洁净的甘蓝叶片在供试药液中浸渍1~2 s后取出，放在洁净的滤纸上，自然晾干后置于垫有保湿滤纸的培养皿中(Ø 9 cm)，每皿放入2片叶片，接入饥饿6 h处理的小菜蛾3龄幼虫(斜纹夜蛾2龄幼虫)10头，每处理重复3次。将培养皿置于光照培养箱(25±1)℃，65%~75% r.h.)中，24 h，48 h后分别调查试虫的死亡情况，计算死亡率。用最小二乘法计算毒力回归方程、致死中浓度、致死中浓度值的95%置信限等。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死虫数}}{\text{处理虫数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{(\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率})}{(100 - \text{对照死亡率})} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 水茄各萃取层对小菜蛾的毒杀活性

在5 mg/mL的浓度下，测定了水茄的石油醚萃取层、乙酸乙酯萃取层和水层对小菜蛾2龄幼虫毒杀作用(表1)。从表1的结果可以看出，水茄的乙酸乙酯萃取层对小菜蛾的毒杀活性最好，因此选择乙酸乙酯层进行天然产物成分分离。

表1 水茄的不同萃取层(5 mg/mL)对小菜蛾2龄幼虫的48 h毒杀活性

Tab.1 The toxicities of different partition of *S. torvum* against the 2th instar larvae of *P. xylostella* at the concentration of 5 mg/mL

萃取物 Soluble fraction	校正死亡率/% Corrected mortality
石油醚层 petroleum ether-soluble fraction	10.37 ± 0.64 b
乙酸乙酯 EtOAc-soluble fraction	41.48 ± 2.57 a
水层 H ₂ O-soluble fraction	17.41 ± 6.51 b
对照 CK	0.00 ± 0.00

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); 表中数据为平均数± SE, n = 10。

The data within a column followed by the same letter were not significantly different at P=0.05, based on Duncan's multiple range test (DMRT). The data were mean ± SE and n = 10 .

2.2 水茄中生物活性成分的分

化学成分分离过程中以活性跟踪为基础, 综合采用硅胶柱层析、凝胶柱层析、ODS 柱层析、聚酰胺层析、HPLC 制备等方法对水茄乙酸乙酯萃取层进行天然产物成分分离, 总计分离得到了 8 个化合物, 鉴定了其化学结构, 其中 5 个为黄酮类化合物, 分别是槲皮素(1)^[11]、木犀草素(2)^[12-13]、芹菜素(3)^[14-15]、山萘酚(4)^[16-17]、tamarixin(5)^[18]; 3 个为生物碱类化合物, 分别是 N-p-香豆酰酪胺(6)^[19-22]、N-2-hydroxy-2-(p-hydroxyphenylethyl) p-coumaramide(7)^[23-26]、N-(2'-羟基二十四碳酰基)-1,3,4-三羟基-2-氨基-十八烷(8), 结构式如图 1。

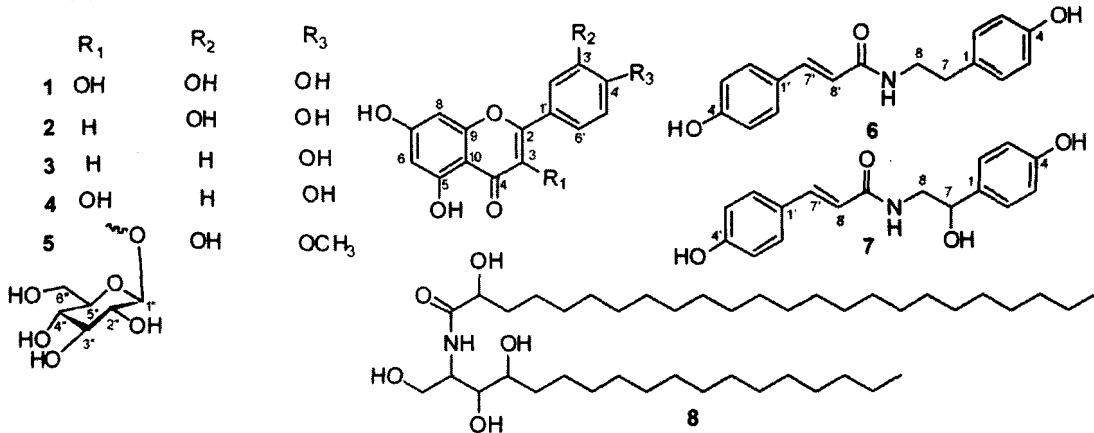


图 1 水茄乙酸乙酯萃取层分离得到的化合物

Fig.1 Structures of compounds 1 to 8 isolated from *S. torvum*

2.3 化合物对小菜蛾的毒杀活性

采用叶片浸渍法测定了从水茄乙酸乙酯萃取层分离得到的 8 个化合物对小菜蛾 2 龄幼虫的毒杀活性, 结果见表 2。其中化合物 1、2、3、4、5 和 8 的预实验结果表明, 对小菜蛾 2 龄幼虫无显著毒杀活性, 化合物 6 和 7 具有显著毒杀活性。N-p-香豆酰酪胺(6)、N-2-hydroxy-2-(p-hydroxyphenylethyl) p-coumaramide (7)对小菜蛾具有一定的毒杀活性, 其 LC₅₀ 的值分别为 103.5 μg/mL 和 123.1 μg/mL, 低于对照药剂氟虫腓, 而其他化合物无显著毒杀活性。

表 2 供试化合物对小菜蛾 2th 幼虫的 48 h 毒杀毒性

Tab.2 The toxicities of the tested compounds against the 2th instar larvae of *P. xylostella* for 48 h

化合物 Comp.	回归方程 Regression equation	LC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	95%置信限 95% CI	相关系数 Coefficient correlation	卡方值 X ²
6	y = 0.906 5 + (2.031 7 ± 0.180 9) x	103.5	86.75~129.2	0.991 5	2.921 4
7	y = 1.031 7 + (1.898 5 ± 0.181 0) x	123.1	100.2~161.3	0.982 2	5.305 3
氟虫腓 Fipronil	y = 2.026 7 + (1.678 5 ± 0.217 1) x	59.06	47.72~73.10	0.988 5	1.722 9

3 结论与讨论

本研究在活性跟踪的基础上,利用植物化学中天然产物成分分离的方法对水茄中对小菜蛾2龄幼虫具有毒杀生物活性的化学成分进行了分离,从中分离得到了8个化合物(图1),其中化合物N-p-香豆酰酪胺、N-2-hydroxy-2-(p-hydroxyphenylethyl) p-coumaramide对小菜蛾2龄幼虫具有显著的毒杀活性。水茄作为一种外来入侵生物,在热带、亚热带广为分布,多生于路旁、荒地及村庄附近,为将其开发为植物性农药提供了丰富的原材料来源,本研究的结果表明,水茄中含有对小菜蛾具有显著生物活性的化学成分,进一步的研究将有可能发现更多高活性化合物。因此,针对水茄进行深入研究,将有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 全国中草药汇编组.全国中草药汇编:上册[M].北京:人民卫生出版社,1996:126-127.
- [2] 邹蓉,韦春强,唐赛春,等.广西茄科外来植物研究[J].亚热带植物科学,2009,38(2):60-63.
- [3] 贵州省中医研究所.贵州民间药物第1辑[M].贵阳:贵州人民出版社,1965:83.
- [4] 李保真,覃德海,方鼎.广西壮族民间药用植物的初步研究(三)[J].广西医学,1984,6(5):261-264.
- [5] Chah K F, Muko K N, Oboegbulem S I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit[J]. Fitoterapia, 2000, 71(2):187-189.
- [6] Arthan D, Svasti J, Kittakoop P, et al. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*[J]. Phytochemistry, 2002,59(4):459-463.
- [7] Nguelefack T B, Feumebo C B, Ateufack G, et al. Anti-ulcerogenic properties of the aqueous and methanol extracts from the leaves of *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae) in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology,2008,119(1):135-140.
- [8] 谢纲,李冲.茄属植物化学成分和生物活性[J].国外医药(植物药分册),2006,21(2):63-65.
- [9] 丘麒,罗建军,郝卫宁,等.21种植物提取物对番茄早疫病菌等3种病原菌抑菌活性的初步研究[J].安徽农业科学,2008(17):7306-7307.
- [10] 丘麒,罗建军,施楚新,等.21种植物提取物对3种柑桔病原真菌抑菌活性的初步研究[J].安徽农业大学学报,2008,35(1):42-45.
- [11] Ma H, Wang C, Yang L, et al. Chemical constituents of *Senecio cannabinifolius* var. *integrifolius*[J]. Chin J Nat Med, 2009,7(1):28-30.
- [12] 梅文莉,倪伟,华燕,等.小叶红光树的化学成分[J].天然产物研究与开发,2002,14(5):26-28.
- [13] Du Zhangli, Zhiqi Y, Lei W, et al. Coumarins and flavonoids from Leaves of *Broussonetia papyrifera*[J].N at Prod Res Dev, 2008,20(4):630-632.
- [14] 杜彰礼,殷志琦,王磊,等.楮叶中香豆素和黄酮类化学成分研究(英文)[J].天然产物研究与开发,2008,20(4):630-632.
- [15] 周光雄,程燕,叶文才,等.三叉刺中黄酮类化学成分研究[J].中草药,2008,39(4):510-512.
- [16] 李明芳,罗娅君,李辉容.大叶金花草黄酮类化学成分的研究[J].四川师范大学学报:自然科学版,2009,32(3):358-360.
- [17] 李宁,李宏轩,孟大利,等.藜仁的化学成分(II)[J].沈阳药科大学学报,2009,26(11):871-873.
- [18] Fico G, Rodondi G, Flamini G, et al. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species[J]. Phytochemistry, 2007, 68(12): 1683-1691.
- [19] Yoshihara T, Takamatsu S, Sakamura S. Three new phenolic amides from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Agri Biol Chem, 1978, 42(3):623-627.
- [20] 高广春,吴萍,曹洪麟,等.金钟藤中酚类化合物的研究[J].热带亚热带植物学报,2006,14(3):233-237.
- [21] 张朝凤,张紫佳,张勉,等.大果飞蛾藤的化学成分研究[J].中国药学杂志,2006,41(2):94-96.
- [22] Mühlenbeck U, Kortenbusch A, Barz W. Formation of hydroxychinamoylamides and α -hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*[J]. Phytochemistry, 1996,42(6):1573-1579.
- [23] Yoshihara T, Takamatsu S, Sakamura S. Three new phenolic amides from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Agri Biol Chem,1978,42(3):623-627.
- [24] Lixin Z, Ping D. A cinnamide derivative from *Solanum verbascifolium* L.[J]. Journal of Asian Natral Products Research. 2002, 4(3):185-187.
- [25] Matsuda F, Morino K, Ano R, et al. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue[J]. Plant Cell Physiol, 2005,46(3):454-466.
- [26] Mühlenbeck U, Kortenbusch A, Barz W. Formation of hydroxychinamoylamides and α -hydroxyacetovanillone in cell cultures of *Solanum khasianum*[J]. Phytochemistry, 1996,42(6):1573-1579.