

茅苍术提取物及其活性成分的杀蚊虫作用

何海¹ 张香梅¹ 王璋倩² AHN Youngjoon² 王沫¹

1. 华中农业大学药用植物研究所, 武汉 430070;

2. 国立首尔大学农业与生命科学学院, 韩国 首尔 151742

摘要 用乙醇超声提取法提取茅苍术根茎物质, 并进行杀蚊有效活性成分分离, 采用幼虫浸渍法测定其对敏感型淡色库蚊、野生型地下家蚊和白纹伊蚊3龄幼虫的活性。结果发现: 乙醇粗提物对淡色库蚊、地下家蚊和白纹伊蚊的24 h LC₅₀值分别为22.71、36.30、23.51 μg/mL。不同溶剂萃取物对白纹伊蚊生物活性测定结果表明, 活性成分主要在正己烷相中, 其LC₅₀为16.87 μg/mL; 而乙酸乙酯相和水相成分基本无活性。进一步对正己烷萃取物以硅胶柱层析分离的不同成分进行生物活性测定, 活性成分主要为H2和H6; 白纹伊蚊3龄幼虫在其25 μg/mL质量浓度下24 h死亡率均达100%。结果表明茅苍术的杀虫活性成分对敏感型淡色库蚊、野生型地下家蚊和白纹伊蚊的幼虫均具有较强生物活性, 具有新型杀蚊剂开发潜力。

关键词 茅苍术; 淡色库蚊; 地下家蚊; 白纹伊蚊; 活性成分

中图分类号 S 482.3⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0039-04

蚊虫是重要的卫生害虫, 不仅叮咬吸血给人们的生活造成干扰, 更重要的是蚊虫为多种严重疾病的传播媒介; 全世界每年感染蚊媒传染病的病例高达7亿多, 主要包括疟疾、黄热病、登革热、流行性乙型脑炎、丝虫病等^[1-3]。由于相应的疫苗、特效药的缺失, 防控蚊虫等传播媒介是阻止这些疾病传播的重要途径^[4-5]。但长期大量的使用化学杀虫剂控制蚊虫, 在各地已有大量的关于蚊虫对杀虫剂产生抗药性的研究报道^[6-9]。此外由于化学药剂的环境安全问题, 人们越来越重视应用各种方法对蚊虫进行综合防治 (integrated mosquito management, IMM), 以达到既控制蚊虫又对环境影响最小的目的^[2, 10]。同时, 寻找新型、未产生抗药性的活性化合物也是重要的途径。

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 为菊科术属植物, 其根茎在历年的药典均有记载, 是一种传统的中药材, 在中国、泰国、日本等国家长期广泛使用^[11]。茅苍术的药理活性成分主要为其挥发油中的倍半萜类和聚乙炔类物质, 如苍术素、茅术醇、苍术内酯 I、苍术内酯 II、苍术内酯 III、苍术酮、β-桉叶醇等, 对其研究主要集中于其抗肿瘤、抗炎活

性等^[11-12], 但涉及其农用活性却很少。Lü 等^[13]的研究表明茅苍术的乙醚索氏提取物对仓储害虫米象、锯谷盗、小眼书虱有熏蒸活性; Kim 等^[14]报道了苍术酮和苍术内酯 III 对粉尘螨、屋尘螨有触杀和熏蒸活性, 但尚未有研究其杀蚊活性的报道。本研究以茅苍术根茎为材料, 通过生物活性追踪法对其提取物中杀蚊幼虫活性成分进行了分离, 以期开发新型杀虫剂提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 经华中农业大学药用植物研究所王沫教授鉴定为菊科植物茅苍术, 采自湖北英山, 以其干燥根茎粉碎后用于提取。

淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* Coquillett 为敏感型, 长期在韩国首尔大学实验室条件下饲养; 地下家蚊 *Culex pipiens molestus* Forskal 于2008年采集自韩国首尔市内积水环境, 白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse 于2011年采集自韩国大田市稻田(附近有牛圈), 实验室条件下饲养。取3龄幼虫供试。

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 国家国际科技合作项目(2011DFA31290)

何海, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物学。E-mail: he-hai@outlook.com

通信作者: 王沫, 教授, 研究方向: 药用植物学。E-mail: wangmo@mail.hzau.edu.cn

1.2 茅苍术提取物的制备

使用超声辅助提取法。茅苍术根茎粉碎后称量,按质量(g)乘以 3 加入无水乙醇(mL),超声提取 30 min,抽滤得滤液;重复提取 3 次,合并滤液,45 ℃减压浓缩至浸膏状,4 ℃保存备用。

1.3 茅苍术提取物的萃取分离

称取粗提物,按质量(g)乘以 40 加超纯水(mL)分散,依次以等体积的正己烷、氯仿、乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩各萃取相得正己烷相、氯仿相、乙酸乙酯相、水相。不同萃取相的膏状物于 4 ℃保存备用。

1.4 茅苍术提取物正己烷相的硅胶柱层析分离

采用湿法装柱,将 660 g 硅胶装入内径 55 mm 的玻璃层析柱中,用少量正己烷溶解 10 g 正己烷相浸膏,上样过柱。以正己烷-乙酸乙酯为淋洗剂进行梯度淋洗,每份 200 mL 收集馏分,最后用甲醇淋洗。馏分经 TLC 检测后合并相同馏分,减压浓缩得到 8 个成分,编号为 H1~H8,置 4 ℃保存备用。

1.5 杀蚊幼虫生物活性测定

生物活性测定采用 WHO 推荐的幼虫浸渍法^[15]。有机相样品用无水乙醇制备样品溶液至所需浓度,水相样品用水制备,取 100 μ L 样品溶液置于 150 mL 超纯水中,加入 4 μ L 吐温 20 混匀;与含

有 20~25 只蚊幼虫的 50 mL 超纯水混匀。每处理 3 个平行,以加相应溶剂的处理为对照,24 h 后检查记录死亡虫数。结果用 Abbott^[16]公式进行校正,计算校正死亡率。使用 SPSS 19.0 软件分析。死亡率百分数转化成其平方根的反正弦值后,使用 Scheffe 法进行方差分析^[13]。

2 结果与分析

2.1 茅苍术乙醇提取物对不同蚊幼虫的杀虫活性

乙醇超声提取茅苍术根茎,提取得率为 10.3%。利用幼虫浸渍法,测定粗提物对敏感型淡色库蚊、野生型地下家蚊和野生型白纹伊蚊幼虫的 24 h 杀虫活性。结果(表 1)表明茅苍术乙醇提取物对野生型白纹伊蚊和敏感型淡色库蚊幼虫的杀虫效果显著优于对地下家蚊幼虫的效果,其对野生型白纹伊蚊及敏感型淡色库蚊的毒力接近,致死中质量浓度(LC₅₀)分别为 23.51、22.71 μ g/mL,低于对野生型地下家蚊的 LC₅₀(36.30 μ g/mL)。然而,对于野生型地下家蚊,其毒力回归方程的斜率为最大(6.06),且其 LC₉₀值(59.07 μ g/mL)与敏感型淡色库蚊 LC₉₀值(47.21 μ g/mL)无显著差异(表 1),说明茅苍术根茎的乙醇提取物对野生型地下家蚊幼虫亦有较好活性。

表 1 茅苍术根茎乙醇提取物对 3 种蚊幼虫的 24 h 杀虫活性

Table 1 Larvicidal activities of ethanol extract of *A. lancea* rhizome against larvae of 3 types of mosquitoes during a 24 h exposure

试虫 Tested colonies	方程斜率 Slope \pm SE	χ^2	LC ₅₀ (95% CL)/(μ g/mL)	LC ₉₀ (95% CL)/(μ g/mL)
淡色库蚊(敏感型) <i>C. pipiens pallens</i> (susceptible)	4.03 \pm 0.40	0.22*	22.71(20.66~24.52)	47.21(42.53~54.48)
地下家蚊(野生型) <i>C. pipiens molestus</i> (wild)	6.06 \pm 0.49	1.20*	36.30(34.31~38.74)	59.07(53.29~67.73)
白纹伊蚊(野生型) <i>A. albopictus</i> (wild)	4.54 \pm 0.51	1.60*	23.51(21.15~25.49)	45.02(40.80~51.74)

* 方程的显著性水平为 $\alpha=0.01$ 。下同。* indicated the significant difference at 0.01 level. The same as below.

2.2 茅苍术粗提物不同萃取成分的杀蚊幼虫活性

对茅苍术粗提物进行萃取分离,分别得到正己烷相、氯仿相、乙酸乙酯相和水相 4 个粗提物萃取成分,其中极性最小的正己烷相和极性最大的水相成分为粗提物的主要成分,分别占到 50.76% 和 43.72%(表 2)。使用不同浓度下的各萃取物对野生型白纹伊蚊的幼虫进行活性测定,结果(表 2)表明:正己烷相为主要的活性成分,其 LC₅₀值为 16.87 μ g/mL,且毒力回归方程的斜率较大(5.82);其次为氯仿相,LC₅₀值达 54.86 μ g/mL,活性显著低于正己

烷相。而乙酸乙酯相和水相即使在 200 μ g/mL 或 250 μ g/mL 时也几乎无活性。

2.3 茅苍术粗提物正己烷相不同柱层析馏分的杀蚊幼虫活性

活性最高的正己烷萃取相利用硅胶柱层析分离,得到 H1~H8 共 8 个馏分。以 H4 和 H2 的得率为高,分离得率分别为 47.31% 和 28.68%(表 3)。将馏分分别对野生型白纹伊蚊幼虫进行生测,结果(表 3)表明:在质量浓度为 25 μ g/mL、处理 24 h 后,成分 H2、H6 的死亡率达 100%,显著高于其他馏

表 2 茅苍术根茎不同溶剂萃取物对野生型白纹伊蚊幼虫的 24 h 杀虫活性
Table 2 Larvicidal activities of fractions from solvent partitioning of the extract of *A. lancea* rhizome against wild *A. albopictus* during a 24 h exposure

萃取相 Fractions	得率/% Yield	LC ₅₀ (95% CL)/(μg/mL)	方程斜率 Slope±SE	χ ²
正己烷相 Hexane-soluble fraction	50.76	16.87(15.46~18.18)	5.82±0.73	4.50 *
氯仿相 Chloroform-soluble fraction	4.87	54.86(48.45~62.48)	3.67±0.45	1.34 *
乙酸乙酯相 Ethyl acetate-soluble fraction	0.65	>200		
水相 Water-soluble fraction	43.72	>250		

表 3 正己烷相不同柱层析馏分得率及
对野生型白纹伊蚊幼虫的杀虫活性

Table 3 Yield of subfractions separated from hexane fraction with column chromatography and their larvicidal activity against wild *A. albopictus* %

馏分 Fractions	得率 Yield	校正死亡率 Corrected mortality±SE
H1	0.39	1.45±1.45c
H2	28.68	100.00±0.00a
H3	7.35	8.33±1.67c
H4	47.31	5.09±0.09c
H5	3.00	6.67±3.33c
H6	2.68	100.00±0.00a
H7	3.84	57.73±1.36b
H8	6.76	0.00±0.00c

注：校正死亡率为在质量浓度为 25 μg/mL 处理 24 h 的数据；
P<0.01。Note: The corrected mortality data were observed at 25 μg/mL during a 24 h exposure; P<0.01.

分；成分 H7 的校正死亡率为 57.73%；馏分 H1、H3、H4、H5、H8 基本无活性。

3 讨 论

自然界的植物在与各种有害生物协同进化过程中会形成一系列次生代谢产物，这些代谢产物很多具有低毒、环境相容性好、对特定生物有活性、对非靶标生物安全等优点^[2-3,10,17]。研究表明，青蒿^[2]、蛇莓^[2]、水黄皮^[5]、白胡椒和黑胡椒^[10]等植物代谢物成分具有杀蚊活性。本文以茅苍术为材料，对其提取物通过生物活性追踪法研究了不同成分对蚊幼虫的生物活性，发现正己烷相有 2 个成分(H2 和 H6)，以 25 μg/mL 质量浓度对野生型白纹伊蚊 3 龄幼虫，杀灭率均为 100%，且 H2 的得率高，显示出较好的开发潜力。

本研究选用的 3 种试虫，淡色库蚊为敏感型，长年未接触任何药剂，地下家蚊和白纹伊蚊均采自野外，长期受多种药剂汰选，对多种药剂会有不同程度的抗药性或耐药性，但以茅苍术根茎的正己烷相

H2 和 H6 成分测试，25 μg/mL 显示出 100% 的杀灭活性，这对蚊虫的抗性治理将会是一个极好的选择。

参 考 文 献

- [1] 崔春来,陈晶晶,王四宝.蚊媒传染病的遗传控制和共生控制[J].应用昆虫学报,2015,52(5):1061-1071.
- [2] GHOSH A,CHOWDHURY N,CHANDRA G. Plant extracts as potential mosquito larvicides[J]. Indian journal of medical research,2012,135(5): 581-598.
- [3] 汪秀芳,薛淋淋,叶碎高,等.驱蚊、灭蚊植物资源及其应用前景分析[J].生态科学,2013,32(3):391-399.
- [4] 于冬冬,闫合,吴华,等.蛇莓杀蚊幼虫活性成分初步分离与鉴定[J].西北农业学报,2015,24(1):156-160.
- [5] PERUMALSAMY H,JANG M J,KIM J R, et al. Larvicidal activity and possible mode of action of four flavonoids and two fatty acids identified in *Milletia pinnata* seed toward three mosquito species[J]. Parasites & vectors,2015,8: 237.
- [6] CUI F,RAYMOND M,QIAO C L. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China [J]. Pest management science, 2006,62(11): 1013-1022.
- [7] 蔡松武,林立丰,段金花,等.广东省白纹伊蚊抗药性现状与抗性治理对策[J].中国媒介生物学及控制杂志,2006,17(4): 274-276.
- [8] 孟凤霞,靳建超,陈云,等.我国淡色库蚊/致倦库蚊对常用化学杀虫剂的抗药性[J].中国媒介生物学及控制杂志,2011,22(6):517-520,528.
- [9] 孙养信,吕文,霍丽霞,等.陕西省白纹伊蚊抗药性研究和防制策略[J].中国媒介生物学及控制杂志,2013,24(1):47-49.
- [10] 刘丽娟,陈晨,王海防,等.植物粗提物对淡色库蚊幼虫的生物活性[J].公共卫生与预防医学,2014,25(5):11-14.
- [11] KOONRUNGSESOMBOON N,NA-BANGCHANG K,KAR-BWANG J. Therapeutic potential and pharmacological activities of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC [J]. Asian pacific journal of tropical medicine,2014,7(6): 421-428.
- [12] 付梅红,朱东海,方婧,等.苍术的化学、分子生物学和药理学研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(20):2669-2672.
- [13] LÜ J H,HE Y Q. Fumigant toxicity of *Ailanthus altissima* Swingle, *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. and *Elsholtzia stauntonii* Benth extracts on three major stored-grain insects

- [J]. Industrial crops and products, 2010, 32(3): 681-683.
- [14] KIM H K, YUN Y K, AHN Y J. Toxicity of atractylon and atractylenolide III identified in *Atractylodes ovata* rhizome to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(15): 6027-6031.
- [15] World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides [M]. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, Geneva: WHO, 2005.
- [16] ABBOTT W S. A method of computing the effectiveness of an insecticide[J]. Journal of economic entomology, 1925, 18(2): 265-267.
- [17] 张兴, 马志卿, 冯俊涛, 等. 植物源农药研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 685-698.

Toxic effects of extract and active component from *Atractylodes lancea* on mosquito

HE Hai¹ ZHANG Xiangmei¹ WANG Zhangqian² AHN Youngjoon² WANG Mo¹

1. Institute of Medicinal Plant, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;
2. College of Agriculture and Life Science, Seoul National University,
Seoul 151742, Republic of Korea

Abstract Ethanol extract from *Atractylodes lancea* rhizome was ultrasonically extracted and its active components was further purified. Toxicity test of the extract and active components on susceptible *Culex pipiens pallens*, wild *C. pipiens molestus* and *Aedes albopictus* were performed using larvae immersion method. The LC₅₀ of ethanol extract against larvae of *C. pipiens pallens*, *C. pipiens molestus* and *A. albopictus* during a 24 h exposure were 22.71, 36.30 and 23.51 μg/mL, respectively. The major active component against *A. albopictus* was in Hexane-phase, with a LC₅₀ of 16.87 μg/mL. Whereas the ethyl acetate-soluble and water-soluble components showed no laticidal activity. Two sub-fractions H2 and H6, separated from hexane-soluble phase with silica gel column chromatography, were the major active components. A 100% mortality of *A. albopictus* was observed at 25 μg/mL of H2 and H6 during a 24 h exposure. The results demonstrated that the active compounds from *A. lancea* were of high laticidal activity against susceptible *C. pipiens pallens*, wild *C. pipiens molestus* and *A. albopictus* and had the potential to be developed as novel insecticide.

Keywords *Atractylodes lancea*; *Culex pipiens pallens*; *Culex pipiens molestus*; *Aedes albopictus*; active component

(责任编辑:边书京)