

吴文君 ● 著

植物杀虫剂 苦皮藤素 研究与应用

ZHIWU SHACHONGJI
KUPITENG SU
YANJIU YU YINGYONG



化学工业出版社

吴文君 ● 著

植物杀虫剂 苦皮藤素 研究与应用



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是作者近三十年致力于苦皮藤研究工作的总结。在简述植物源天然产物杀虫剂相关知识的基础上,系统阐述了杀虫植物苦皮藤及其活性成分,苦皮藤素的作用机理和选择机理、衍生合成,以及杀虫植物苦皮藤的开发应用情况。另外,还详细介绍了苦皮藤植株中 Hd3 菌株、A10 菌株、2B 菌株等内生真菌的研究进展。

本书可供天然产物药物学、植物源新农药研发与创制等人员阅读,也可供高等学校农药、植保等相关专业师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物杀虫剂苦皮藤素研究与应用/吴文君著. —北京:化学工业出版社, 2011.1

ISBN 978-7-122-09867-2

I. 植… II. 吴… III. 植物性杀虫剂-研究 IV. TQ453.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 216057 号

责任编辑:刘 军

文字编辑:张春娥

责任校对:周梦华

装帧设计:关 飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷:三河市延风印装厂

装 订:三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 19 $\frac{3}{4}$ 字数 327 千字

2011 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:80.00 元

版权所有 违者必究

目 录

1 植物源天然产物杀虫剂	1
1.1 杀虫植物与植物杀虫剂	2
1.2 研究杀虫植物的意义	2
1.3 研究杀虫植物的前景	5
参考文献	6
2 杀虫植物苦皮藤及其活性成分	7
2.1 杀虫植物苦皮藤	8
2.1.1 形态	8
2.1.2 分布	10
2.1.3 繁殖与栽培	12
2.2 次生代谢物的生物活性	13
2.2.1 杀虫活性	13
2.2.2 杀菌活性	15
2.3 活性成分的分离及结构鉴定	16
2.3.1 苦皮藤根皮中杀虫活性成分的分离及结构鉴定	16
2.3.2 苦皮藤叶子中杀虫活性成分的分离及结构鉴定	73
2.3.3 苦皮藤果实假种皮中杀虫、杀菌成分的分离及结构鉴定	74
2.4 苦皮藤素三维定量构效关系研究	77
2.4.1 麻醉活性成分的 QSAR 研究	79
2.4.2 毒杀活性成分的 QSAR 研究	84
2.5 苦皮藤素质谱裂解规律及其应用	87
2.5.1 ESI/MS 裂解规律	88
2.5.2 利用 ESI-MS/MS 鉴别 β -二氢沉香呋喃异构体	92
2.5.3 苦皮藤根皮提取物 LC-ESI/MS 分析	101
参考文献	119
3 苦皮藤素的作用机理和选择机理	121
3.1 苦皮藤素 IV 的麻醉作用机理	122
3.1.1 对兴奋性突触后电位的影响	122

3.1.2	对轴突传导动作电位的影响	123
3.1.3	对神经-肌肉兴奋性接点电位的影响	123
3.1.4	对神经细胞钠通道的影响	125
3.1.5	对肌细胞超微结构的影响	128
3.1.6	苦皮藤素Ⅳ对肌细胞钙通道的影响	131
3.2	苦皮藤素Ⅴ的毒杀作用机理	148
3.2.1	对中肠细胞的影响	149
3.2.2	对中肠消化酶活性的影响	150
3.2.3	苦皮藤素Ⅴ引起昆虫失水的机理	150
3.2.4	苦皮藤素Ⅴ作用靶标的定位	152
3.2.5	苦皮藤素Ⅴ作用靶标的分离	156
3.3	麻醉成分对昆虫的选择毒性及机制	160
3.3.1	选择麻醉作用	160
3.3.2	选择麻醉作用的机制	160
3.4	毒杀成分对昆虫的选择毒性及其机制	163
3.4.1	选择毒性的证实	163
3.4.2	选择毒杀作用的机制	163
	参考文献	171
4	苦皮藤素的衍生合成	173
4.1	β -二氢沉香呋喃多元醇的全合成研究	174
4.2	β -二氢沉香呋喃多元醇酯衍生物的合成研究	183
4.2.1	苦皮藤素Ⅴ的衍生合成	183
4.2.2	提取物水解产物衍生物的定向多样性合成	192
4.2.3	双呋喃二氢沉香呋喃衍生物的合成	197
4.2.4	其他研究小组关于二氢沉香呋喃衍生物的合成	217
	参考文献	217
5	杀虫植物苦皮藤的开发应用	221
5.1	有效成分的稳定性	222
5.1.1	温度及 pH 值对有效成分生物活性的影响	222
5.1.2	光照对苦皮藤根皮粗提物杀虫活性的影响	223
5.2	活性成分在植物中的分布及含量变化	224
5.2.1	活性成分在植物中的分布	224
5.2.2	活性成分的地域性和季节性变化	225
5.3	剂型和制剂加工	225
5.3.1	有效成分提取	225
5.3.2	有效成分含量分析	227

5.3.3 乳油配制	229
5.3.4 微乳剂加工	233
5.3.5 微粉剂加工	239
5.3.6 混剂(混用)研究	242
5.3.7 抗药性风险评价	245
5.4 苦皮藤素的环境毒理学研究	247
5.4.1 苦皮藤素的光照稳定性	247
5.4.2 苦皮藤素在水体中的稳定性	248
5.4.3 苦皮藤素V在土壤中的稳定性	255
5.4.4 苦皮藤素V在作物和土壤中的残留	261
5.4.5 苦皮藤素乳油对非靶标生物的毒性	263
5.5 苦皮藤素制剂的市场定位及产业化	266
参考文献	269

6 苦皮藤植株中内生真菌的研究 271

6.1 Hd3 菌株的研究	272
6.1.1 活性成分的分布及初步定性	272
6.1.2 杀虫活性成分的分离及结构鉴定	275
6.1.3 抑菌活性成分的分离及结构鉴定	277
6.1.4 菌株鉴定	282
6.2 A10 菌株的研究	285
6.2.1 发酵产物的处理	285
6.2.2 生物活性	286
6.2.3 杀菌活性成分的分离及结构鉴定	288
6.2.4 菌株鉴定	291
6.3 2B 菌株的研究	292
6.3.1 发酵产物的处理	292
6.3.2 生物活性测定	292
6.3.3 抑菌活性成分的分离及结构鉴定	294
6.3.4 菌株鉴定	299
参考文献	301

附 录 303

1. 发表的相关论文	303
2. 研究团队简介	308
3. 参与苦皮藤研究的研究生	309

1

植物源天然产物杀虫剂

植物源天然产物杀虫剂主要是指在深入研究杀虫植物的基础上，以其次生代谢产物开发的农用杀虫剂。

1.1 杀虫植物与植物杀虫剂

有些植物体内含有的某些成分具有杀虫活性，我们将这些植物称为杀虫植物 (insecticidal plant)，而把这些杀虫活性成分提取加工成的杀虫制剂称为植物杀虫剂 (plant-derived insecticide)。和化学合成杀虫剂相比较，植物杀虫剂一般具有如下特点：

① 大多数植物杀虫剂，特别是其制剂对哺乳动物的毒性较低，尤其是接触毒性和吸入毒性很低，因而在生产、运输和使用过程中比较安全。

② 植物杀虫剂本身是生物体在其生命过程中形成的，一般只含碳、氢、氧、氮四种元素，在环境中容易降解，对生态环境的影响较小。

③ 植物杀虫剂的原料一般都是从植物中提取的多成分混合物，对害虫协同发挥作用，而且可能有多个作用位点，可以延缓产生害虫抗药性。

④ 规模化生产时，其原材料的供应受到限制。生产植物杀虫剂的植物虽然可以规模化人工种植，但需要占用大量土地，生产周期较长，而且还会受到地域、气候条件等的限制。从理论上讲，植物杀虫剂可以采用组织培养等生物技术来生产，但亦会受到技术、成本等问题的制约，迄今也没有一个真正商品化的植物杀虫剂是采用生物技术生产的。

⑤ 许多植物杀虫剂防治谱窄，甚至有明显的选择性。现代种植业中，有些作物会受到多种害虫同时为害，如果使用防治谱太窄的植物杀虫剂则难以控制其危害。

⑥ 大多数植物杀虫剂作用缓慢，在遇到害虫大量发生时，特别是一些暴食性害虫大发生时，不能及时控制危害。

1.2 研究杀虫植物的意义

研究杀虫植物的一个重要意义就是可以直接利用杀虫植物开发杀虫剂。通常是先从植物材料中提取杀虫活性成分，然后再将植物提取物按

农药质量标准加工成商品化植物源杀虫剂。直接利用杀虫植物开发杀虫剂的典型代表是楝科植物印楝 (*Azadirachta indica*, 俗名 neem 或 margosa tree)。印楝原产于印度、缅甸和巴基斯坦等国, 在南亚、非洲、南美洲的许多地区都有分布和栽培。在我国云南和四川, 印楝的栽培面积达 7000 公顷 (hm^2) 以上。印楝的主要杀虫活性成分是印楝素 (azadirachtin A), 分布在种核中。印楝素堪称“理想的杀虫剂”: 广谱、对天敌干扰少、无明显的脊椎动物毒性或植物药害, 在环境中迅速降解, 地区性资源丰富而且可以再生^[1]。

第一个真正商品化的印楝产品是 1985 年由 W. R. Grace & Co. 在美国注册登记的 Margosan-O, 其是由印楝种核提取物加工的乳油, 含印楝素 0.3% 及 14% 印楝油, 以后又有美国 Agridyne Technologies 的 Azatin, Ringer Corp. 的 Bioneem 和 Neemesis, 加拿大 Safe Ltd. 的 Safer's ENI, 印度 ITC Ltd. 的 Wellgro 和 RD-Repelin, West Coast Herbochem 的 Neemark, Gharda Chernicals 的 Neemguard 及德国 Tri-folio M. 的 Neemazal 等^[2]。据美国农业部农业研究中心统计, 印楝制剂至少能有效地控制 128 种农林业害虫, 包括舞毒蛾、日本金龟甲、蚜虫、烟草夜蛾和棉铃虫等。菲律宾国际水稻研究所试验证明, 印楝制剂能有效地控制二点黑尾叶蝉、二化螟、稻瘿蚊和蚱蜢的为害。印楝制剂用于防治贮粮害虫十分有效, 对谷物的保护作用可持续数月, 尤其是对谷象和谷蠹有很长的持效期。

研究杀虫植物的另一重要意义是可以从杀虫植物中分离、鉴定杀虫活性成分, 从中筛选出先导化合物, 用人工合成的方法进行结构优化研究, 以期创制新型杀虫剂。植物在其进化过程中逆境压力的多样性和复杂性, 导致其所产生的次生代谢产物的多样性和复杂性, 因而可提供多种新颖独特的化学结构。此外, 植物的这些次生代谢产物本身源于自然, 一般都容易降解, 因而有较好的环境相容性, 适合以其为先导开发出环境友好型杀虫剂。这方面的典型代表是对杀虫植物除虫菊 (*Pyrethrum cinerariaefolium*) 的研究。除虫菊的杀虫活性成分是两种菊酸和三种酮醇组成的 6 种除虫菊酯 (通称天然除虫菊素), 其中以除虫菊素 I 和除虫菊素 II 含量最丰富, 杀虫活性最强。

1947 年 Schechte 和 Laforge 以除虫菊素 I 为先导, 以丙烯基代替环戊烯醇侧链的戊二烯基, 首次人工合成了第一个拟除虫菊酯杀虫剂丙烯菊酯 (allethrin)。和天然除虫菊素相比, 丙烯菊酯的毒力没有很大程度的提高, 光稳定性有所改善, 但仍属于光不稳定化合物, 使其在大

田的应用受到限制。日本住友公司于 1968 年以苯环结构（苯氧基苄醇）代替天然除虫菊酯酮醇部分的不饱和结构合成了苯醚菊酯（phenothrin），解决了天然除虫菊酯及丙烯菊酯酮醇部分的光稳定性问题，1971 年又在此基础上引入氰基合成了氰苯醚菊酯（cyphenothrin），使其杀虫活性大大提高。1972 年英国洛桑试验站的 Elliott 以氯代菊酸与苯氧基苄醇合成了氯菊酯（permethrin，即二氯苯醚菊酯），才真正解决了天然除虫菊素分子中两个光不稳定中心的问题，成功开发出第一个光稳定的农用拟除虫菊酯杀虫剂。以此为突破，又相继开发出氯氰菊酯（cypermethrin）和溴氰菊酯（deltamethrin）等高效杀虫剂。

近 30 年来，拟除虫菊酯杀虫剂的分子结构已经发生了很大变化。以氰戊菊酯（fenvalerate）为例，分子中已不具环丙烷的结构，打破了拟除虫菊酯必须有“三碳环”结构的传统观念，使合成工艺大大简化，成本降低；氟硅菊酯（silaflofen）则以硅原子取代菊酯结构中的碳原子，从而降低了对鱼类的毒性，而且对白蚁有良好的趋避作用；醚菊酯（etofenprox）则显著降低了对蜜蜂及稻田捕食性蜘蛛的毒性，其分子结构中已无菊酸部分，已不再是“酯”，但其空间结构、生物活性、作用机理仍同于拟除虫菊酯。此外，在结构中引入氟原子，其理化性质变化较小，但生物活性改变很大，如联苯菊酯（bifenthrin）、氟氯氰菊酯（cyhalothrin）等兼有杀虫、杀螨作用，而七氟菊酯（tefluthrin）则因其蒸气压高而适合于土壤中地下害虫的防治。

自 1947 年丙烯菊酯问世以来，以除虫菊素为先导，合成了成千上万的化合物，开发出数十个高效拟除虫菊酯类杀虫剂，成为杀虫剂市场的三大支柱之一^[3]。

此外，研究杀虫植物还有一个重要意义，即以杀虫活性成分为探针，发现新的作用靶标，继而以新靶标为筛选模型，定向合成新的杀虫化合物。邻氨基苯甲酰胺类杀虫剂的开发是其典型事例。

产于南美的大枫子科植物尼亚那（*Ryania speciosa*）是著名的杀虫植物，其枝条的水提取物能有效防治多种鳞翅目害虫。从尼亚那提取物中分离出 10 种活性成分，主要是鱼尼丁（ryanodine）。鱼尼丁引起昆虫的中毒症状表现为：停止取食，偶尔返吐，肌肉松弛性麻痹，没有高度兴奋症状，明显地区别于常见的神经毒剂或呼吸毒剂，而表现为肌肉毒剂。科学家们详细地研究了鱼尼丁的作用机理，以鱼尼丁为探针，发现了一种新的作用靶标——和 Ca^{2+} 通道相偶联的鱼尼丁受体（RyR），进一步解析了 RyR 的结构及调控 Ca^{2+} 的机理。以鱼尼丁受体为筛选模

型,日本农药公司开发出邻苯二甲酰胺类杀虫剂氟虫酰胺(flubendiamide),杜邦公司开发出邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂氯虫酰胺(chlorantraniliprole)等^[4,5]。

这些新型杀虫剂的特点是:①高效低用量。以DP-012为例,其对草地夜蛾3龄幼虫喷雾处理的 LC_{50} 为0.12mg/L,而氯氰菊酯 LC_{50} 为5.30mg/L,即DP-012的毒力约为氯氰菊酯的50倍。②对哺乳动物安全。氟虫酰胺对大鼠、小鼠的经口急性毒性 LD_{50} 均大于2000mg/kg。目前,以鱼尼丁受体为靶标的杀虫剂研发正方兴未艾。

1.3 研究杀虫植物的前景

如前所述,杀虫植物的研究内容集中在两方面,其一是直接利用杀虫植物——将杀虫植物的活性成分开发为商品化的杀虫剂;其次是间接利用杀虫植物——从其活性成分中发现先导化合物或以活性成分为探针发现新靶标,创制新型杀虫剂。

20世纪80年代末期,由于不合理的使用化学农药而带来的农药残毒、环境污染等负面影响引起了政府和公众的重视和关注,一些高毒化学农药逐步退出市场,出口贸易农副产品中农药残留标准越来越严格,这就给植物源杀虫剂的生产和应用提供了一定的发展空间。迄今为止,我国已有烟碱、除虫菊素、鱼藤酮、印楝素、苦皮藤素、川楝素、藜芦碱、苦参碱、辣椒碱、木烟碱、茴蒿素、对叶百部碱、马钱子碱、异羊角拗苷、茶皂苷、蛇床子素和莨菪烷类生物碱等18种植物源杀虫剂取得农药临时或正式登记并批量生产,取得一定的经济效益和环境生态效益。可以预计,在蔬菜、水果、茶叶、花卉、中药材生产以及城市绿化虫害治理方面,植物源杀虫剂将会占有较大的市场份额。

笔者认为,作为杀虫剂开发利用的植物资源应具备下述条件:

- ① 有效成分应有较高的杀虫活性;
- ② 有效成分对非靶标生物安全,其毒性应在“低毒”级别;
- ③ 有效成分对光分解应有足够的稳定性;
- ④ 所利用的不应是植物的根和茎,而是叶、果实、枝条等,最好是多年生植物,有再生性,可持续利用;
- ⑤ 容易人工繁殖与栽培。

目前,我国产业化的植物杀虫剂除印楝素和除虫菊素外,绝大多数都不完全符合上述标准。尽管每年都有不少杀虫植物的研究报道,但要再筛选到像印楝、除虫菊这样的杀虫植物恐怕是很困难的。

发现新的杀虫先导化合物一直是杀虫植物研究的重点。所谓先导化合物(lead compound),是指通过生物测定,从众多的候选化合物中发现和选定的具有杀虫活性的新化合物,一般具有新颖的化学结构,并有衍生化和改变结构的发展潜力,可以用作起始研究模型,经结构优化,开发出新型杀虫剂。近年来,全世界每年分离到成千上万的化合物,已报道的植物次生代谢物数量已超过60万个,其中具有生物活性的化合物超过10万个(截至2005年)^[6],但新型结构化合物的比率很低,能作为先导化合物的则更少。相信随着现代分离技术的不断发展,植物中许多具有杀虫活性的微量、甚至痕量的次生代谢产物将被分离并鉴定分子结构,因而会发现更多的杀虫先导化合物。

相对于先导化合物的研究,将杀虫活性成分作为探针发现新靶标的研究较少。笔者认为,绝大多数杀虫活性化合物都没有被当作探针去研究新靶标,这个领域的研究前景十分广阔,而且从某种意义上讲,发现一个新靶标的理论价值和经济价值均远远超过发现一个新的先导化合物。

参 考 文 献

- [1] Copping L G. The Biopesticide Manual. 1st Edition. British Crop Protection Council, 49 Downing Street, Farnham, Surrey, 1998: IX-X.
- [2] Mordue A J, Blackwell A. Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol*, 1993, 39 (11): 903-934.
- [3] 吴文君, 罗万春. 农药学. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [4] Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, *et al.* Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests. *J Pestic Sci*, 2005, 30: 354-360.
- [5] Cordova D, Benner E A, Sacher M D, *et al.* Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006, 84 (3): 196-214.
- [6] Bérday J. Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of antibiotics*, 2005, 58 (1): 1-26.

2

杀虫植物苦皮藤及其活性成分

2.1 杀虫植物苦皮藤

2.1.1 形态

苦皮藤 (*Celastrus angulatus* Max.), 俗称苦树皮、菜药、麻蛇曼、马断肠等, 为卫矛科 (Celastraceae) 南蛇藤属 (*Celastrus*) 植物。

苦皮藤为藤本灌木, 小枝带有 4~6 角棱, 皮孔明显; 冬芽短卵形, 长 2~5mm。叶大, 宽卵形、椭圆状长圆形或近圆形, 长 10~18cm, 宽 5~12cm, 先端突尖, 基部圆形至近截形, 缘具不规则钝锯齿, 面下脉上疏生柔毛; 叶柄长 1~3cm。聚伞状圆锥花序, 顶生, 长 10~20cm 或更长; 花淡绿白色, 雌雄异株; 雄花萼片三角状卵形, 长约 1.5mm, 花瓣长圆形, 长 5mm, 边缘呈不整齐锯齿状, 雄蕊着生于肉质花盘边缘, 较花瓣为长, 花丝基部较宽, 退化雌蕊卵形; 雌花退化雄蕊很小, 子房近球形, 花柱柱状, 柱头 3~4 裂。蒴果黄色,



图 2-1 野生苦皮藤 (摄于陕西洛南县)

近球形，直径达 1.2cm，成熟时 3 瓣裂。种子每室 2 粒，椭圆形，棕色，长约 5mm，外被橘红色假种皮。花期 5~6 月，果期 8~10 月（图 2-1~图 2-4）。

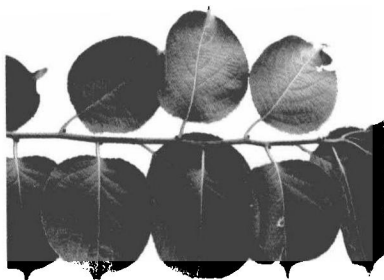


图 2-2 苦皮藤叶片形态



图 2-3 苦皮藤茎（皮孔明显）



图 2-4 苦皮藤果实

苦皮藤根系发达，主根粗而长，其最显著的特点是：根皮（韧皮部）发达，鲜根皮呈玫瑰红色（图 2-5）。据笔者测定，直径 1.5cm 左右的鲜根，每 100kg 可剥鲜根皮 45.6kg，晒干后可得干根皮 26.2kg。

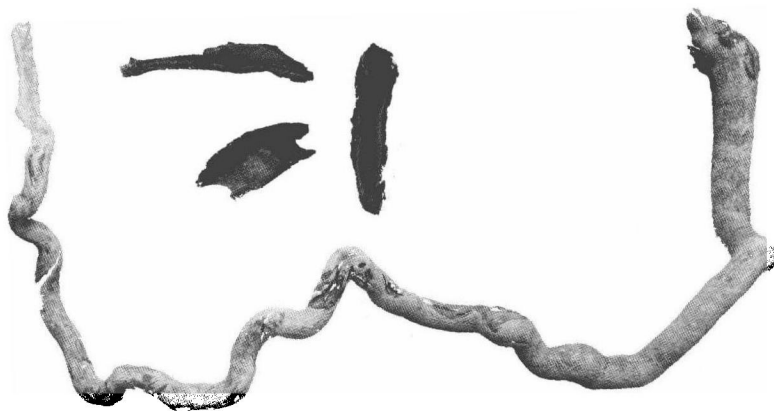


图 2-5 苦皮藤根及根皮

2.1.2 分布

国外除日本外，未见有文献报道有苦皮藤分布。根据文献记载及笔者实地考察，在我国，苦皮藤广泛分布于长江流域和黄河流域各省，主要分布在甘肃、陕西、河南、云南、贵州、四川、湖南、湖北、江苏、浙江、安徽、江西等省。就陕西省而言，据笔者调查，苦皮藤主要分布



图 2-6 岩石缝中的苦皮藤植株（摄于陕西周至县）

在秦岭南北坡及大巴山北坡，特别是关中地区的华县、华阴、蓝田、周至、眉县、宝鸡、凤县、太白等县以及汉中、商洛、安康地区各县。主要在海拔 500~1000m 的丘陵浅山区，低于 500m、高于 1500m，几乎没有分布。

苦皮藤主要生长在荒山草坡或灌木丛中，在高大的乔木林里基本没有分布。就土壤类型而言，苦皮藤适合在中性或酸性的石渣土中生长，许多植株就生长在没有土壤的石缝中（图 2-6~图 2-9）。

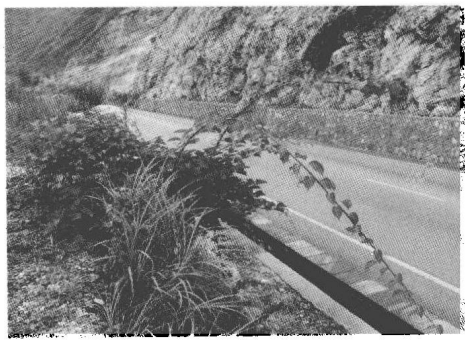


图 2-7 公路旁的苦皮藤植株（摄于贵州铜仁地区）



图 2-8 岩石上的苦皮藤幼小植株（摄于陕西 310 国道旁）



图 2-9 生长在房前屋后的苦皮藤植株（摄于贵州雷山县）