



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102657241 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201210109713. 2

(22) 申请日 2012. 04. 16

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650204 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 黎胜红 华娟 骆世洪

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

A01N 65/18(2009. 01)

A01N 37/10(2006. 01)

A01N 43/40(2006. 01)

A01N 37/02(2006. 01)

A01N 45/00(2006. 01)

A01P 7/04(2006. 01)

审查员 孙瑞峰

权利要求书1页 说明书10页

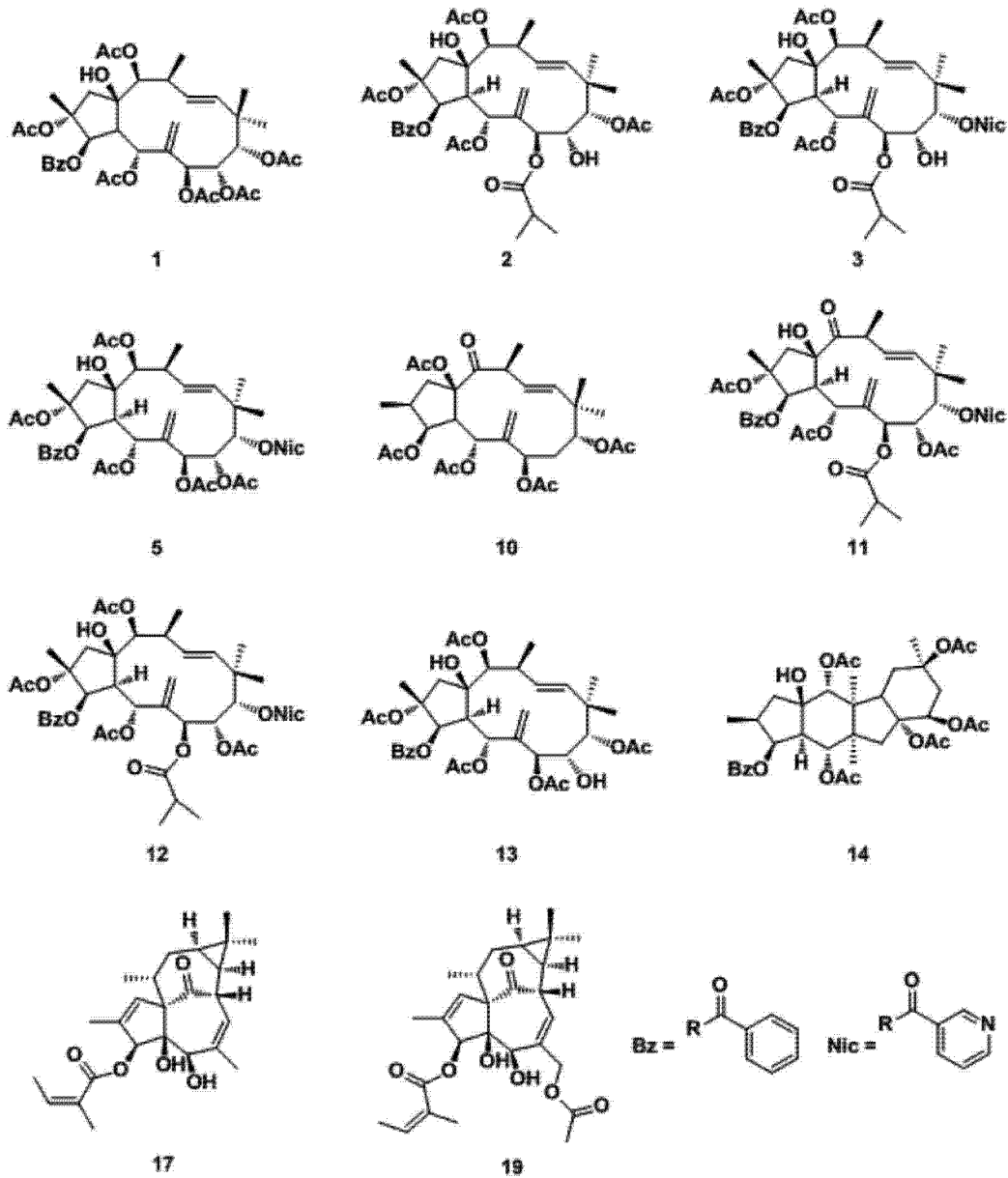
(54) 发明名称

昆虫拒食剂及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一类以草本植物南欧大戟提取物总二萜及活性化合物 1-19 为活性成分的新型的天然二萜昆虫拒食剂,其制备方法及其总二萜和活性化合物在制备昆虫拒食剂中的应用。本发明的昆虫拒食剂高效低毒,使用安全,无污染,利于生态平衡,且具有广谱性,对棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、小菜蛾、玉米螟等多种植食性昆虫具有显著防治效果。

1. 下列结构式所示的任一二萜类化合物 1-3、5、10-14、17、19 或其任意组合为活性成分在制备昆虫拒食剂中的应用，



2. 如权利要求 1 所述的任一二萜类化合物 1-3、5、10-14、17、19 或其任意组合为活性成分在制备昆虫拒食剂中的应用，其特征为：化合物 1-3、5、10-14、17、19 来自于南欧大戟提取物，所述南欧大戟提取物的制备方法为，用有机溶剂甲醇或乙醇或氯仿或丙酮或乙醚或石油醚或正己烷或环己烷冷浸或者热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉，或者先用上述有机溶剂冷浸或热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉，然后再用乙酸乙酯或氯仿萃取，得到含有化合物 1-3、5、10-14、17、19 的南欧大戟提取物，然后添加拒食剂常规辅料制成昆虫拒食剂。

昆虫拒食剂及其制备方法与应用

技术领域：

[0001] 本发明属于昆虫拒食剂领域，具体地，涉及一类以草本植物南欧大戟提取物总二萜及活性化合物 1-19 为活性成分的天然二萜昆虫拒食剂，其制备方法及其总二萜和活性化合物在制备昆虫拒食剂中的应用。

背景技术：

[0002] 农药在农业生产中发挥着十分重要的作用，随着人们健康意识的提高，对农产品品质要求的提高，市场对农药的安全环保性要求也越来越高。由于传统杀虫剂存在着不可克服的环境污染及引起害虫抗性等方面的严重问题，人们越来越重视生态合理的有效控制害虫新方法的研究。从天然产物筛选出安全高效的化合物，直接开发为新的生物农药或以其为模型合成新的更安全高效的农药是创新生物农药发展的主要方向。其中，植物源拒食剂由于其解决了传统农药的环境污染及害虫易产生抗性两大主要问题，因而越来越受到科学界及产业界的重视，成为新型生物农药研究的一个重要分支。例如，对印楝、鱼藤以及除虫菊等杀虫植物的研究都很成功，开发了印楝素、鱼藤酮和除虫菊酯等著名农药，为防治一些世界性害虫做出了重要贡献。但这些杀虫植物的缺点是受栽培区域限制，因此生产成本较高。南欧大戟 (*Euphorbia peolus*) 是具有杀虫潜力和应用前景的植物之一，原产于地中海，在我国云南、广西、广东、福建、香港和台湾等地广泛分布，是房前屋后或园林中常见的杂草，资源非常丰富。几十年来，国内外对南欧大戟的化学成分及活性进行了不少研究，但未发现利用南欧大戟提取物总二萜及活性化合物为活性成分制备昆虫拒食剂的报道。

发明内容：

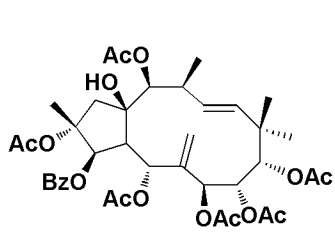
[0003] 本发明的目的是提供一类新型的以草本植物南欧大戟提取物总二萜及活性化合物 1-19 为活性成分的天然二萜拒食剂，它们的制备方法，进一步的目的是提供总二萜和活性化合物在制备昆虫拒食剂中的应用。

[0004] 本发明的下述技术方案是用来达到上述的发明目的的：

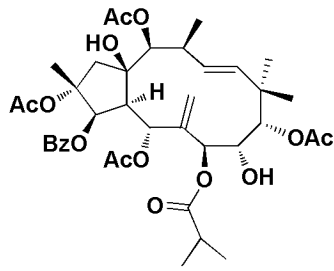
[0005] 昆虫拒食剂，以草本植物南欧大戟提取物总二萜为活性成分。

[0006] 昆虫拒食剂，以草本植物南欧大戟中的下列任一二萜类化合物 1-19 或化合物 1-19 的任意组合为活性成分，

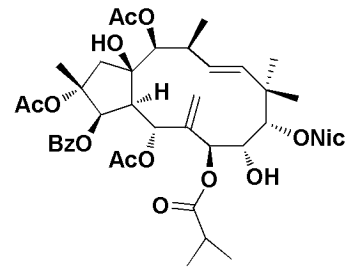
[0007]



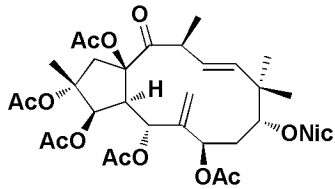
1



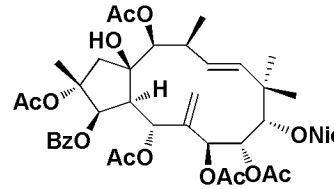
2



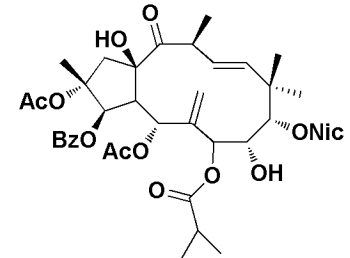
3



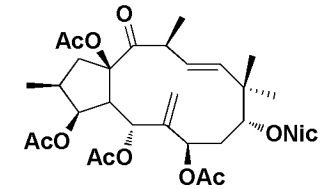
4



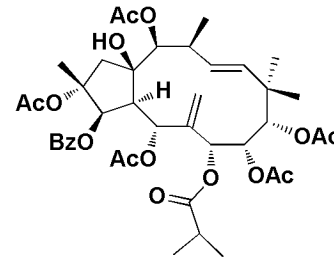
5



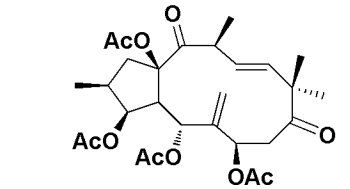
6



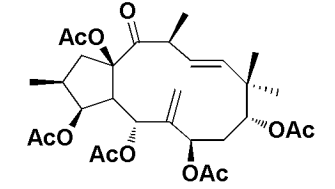
7



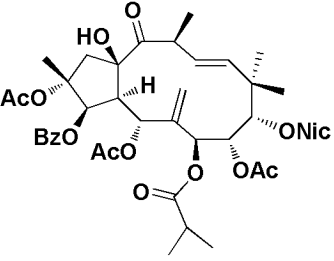
8



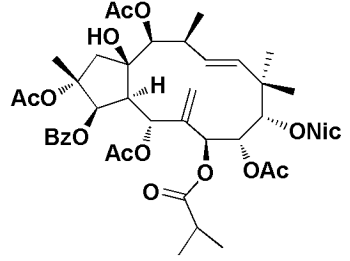
9



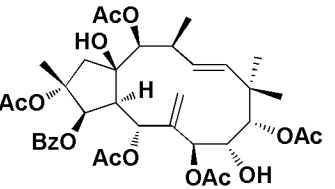
10



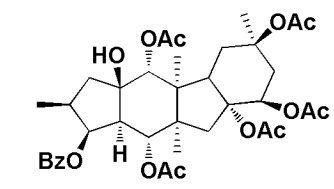
11



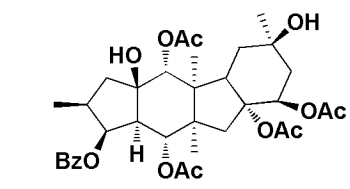
12



13

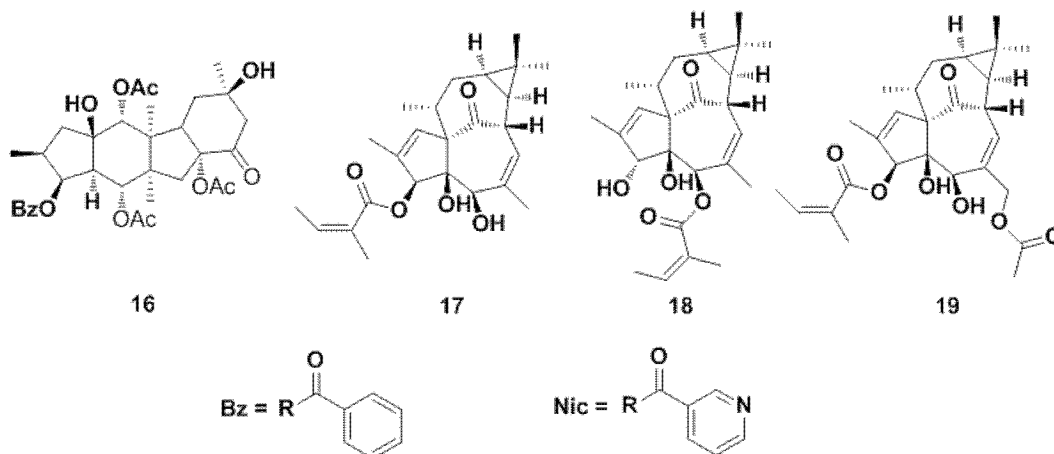


14



15

[0008]



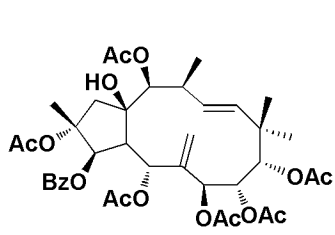
[0009] 本发明的上述昆虫拒食剂的制备方法,包括用有机溶剂甲醇或乙醇或氯仿或丙酮或乙醚或石油醚或正己烷或环己烷直接冷浸或者热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉,或者先用上述有机溶剂冷浸或热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉再用乙酸乙酯或氯仿萃取得到总二萜,然后添加拒食剂常规辅料制成制剂。

[0010] 本发明的上述昆虫拒食剂的制备方法,包括用有机溶剂甲醇或乙醇或氯仿或丙酮或乙醚或石油醚或正己烷或环己烷直接冷浸或者热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉,或者先用上述有机溶剂冷浸或热回流提取新鲜南欧大戟全株或其干燥粗粉后再用乙酸乙酯或氯仿萃取得到总二萜,经反复柱层析得到活性二萜化合物 1-19,然后添加拒食剂常规辅料制成制剂。

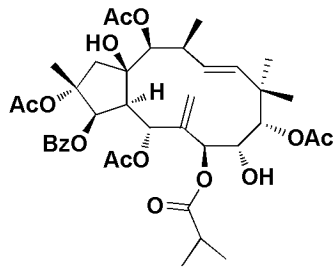
[0011] 本发明的南欧大戟提取物总二萜在制备昆虫拒食剂中的应用。

[0012] 本发明还提供了下列任一二萜类化合物 1-19 化合物或化合物 1-19 的任意组合在制备昆虫拒食剂中的应用,

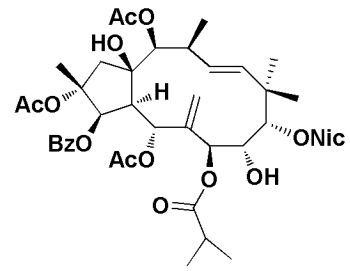
[0013]



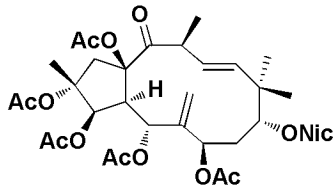
1



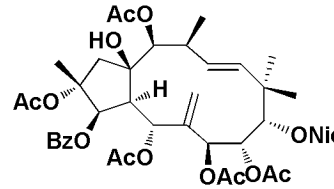
2



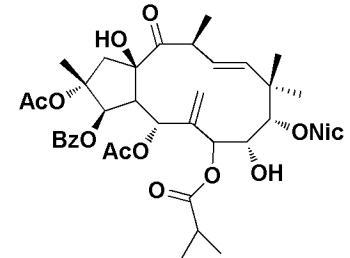
3



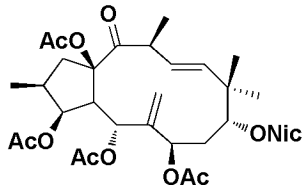
4



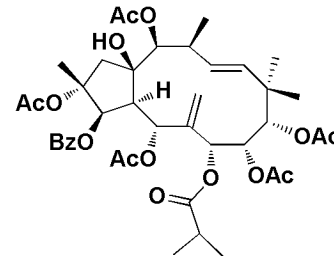
5



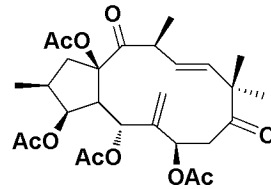
6



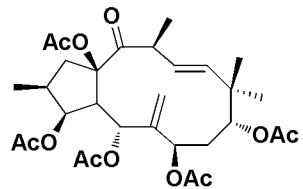
7



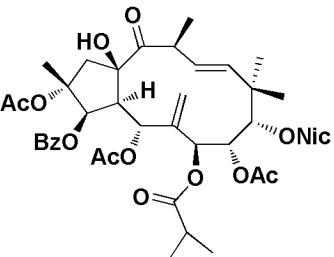
8



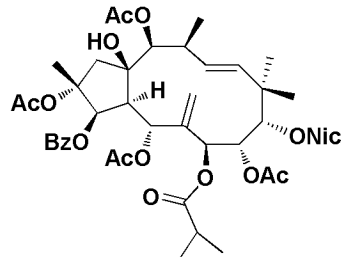
9



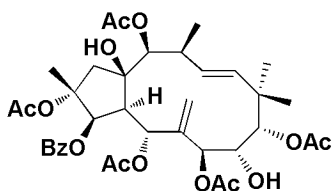
10



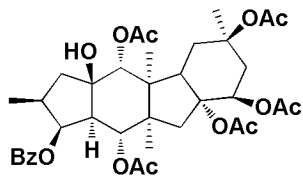
11



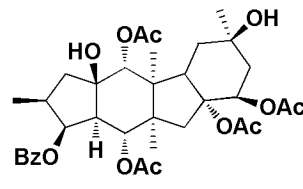
12



13

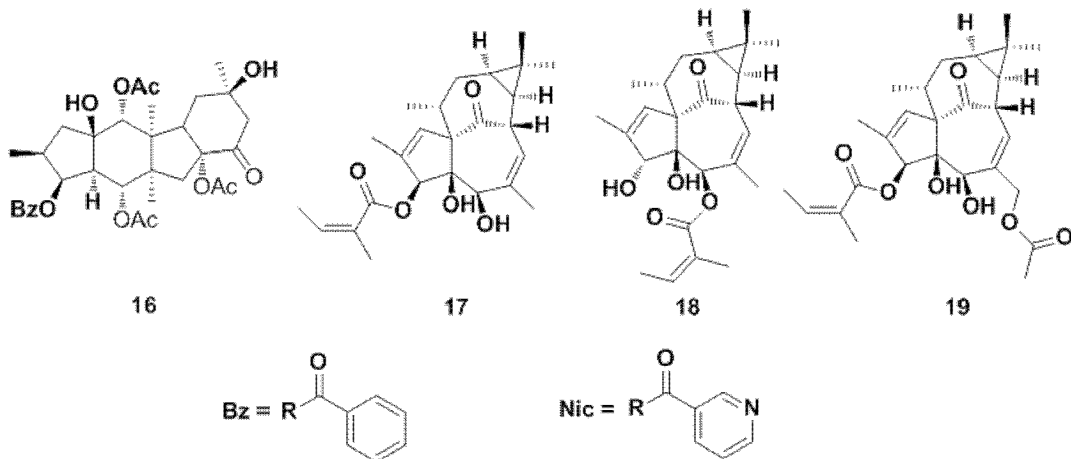


14



15

[0014]



[0015] 本发明的二萜拒食剂经活性测试显示具有很强的昆虫拒食活性。在实际应用中，本发明总二萜是以如下的量施用于基材或一种群上：所述量的范围为 $0.5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ ，优选在 $1 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ ，与载体和 / 或媒体相结合；本发明二萜化合物是以单个化合物或不同化合物的任意组合物按如下的量施用于基材或一种群上：所述量的范围 $0.05 \sim 100\text{nM/cm}^2$ ，优选在 $0.1 \sim 50\text{nM/cm}^2$ ，与载体和 / 或媒体相结合。

[0016] 本发明的二萜拒食剂用于植物表面或其生长环境中，可防治棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、小菜蛾、玉米螟等多种植食性昆虫。

[0017] 本发明的二萜拒食剂可制成乳剂、水剂、水乳剂、可湿型粉剂，优选的形式是乳剂和水乳剂。

具体实施方式：

[0018] 为了更好地理解本发明，下面结合本发明的实施例来进一步对本发明的实质内容和有益效果进行说明，但本发明的技术方案并不局限于此。

[0019] 实施例 1：

[0020] 南欧大戟提取物总二萜及二萜化合物 1-19 的提取与分离：

[0021] 新鲜南欧大戟 (*Euphorbia peplus*) 全株材料 9Kg，切碎后立即用甲醇冷浸提取 ($3 \times 25\text{L}$)，浓缩后得到总二萜粗提物，浸膏用乙酸乙酯萃取 3 次，浓缩乙酸乙酯部分，得到总二萜 130g，用适量氯仿 / 丙酮将其溶解后硅胶 (200-300 目) 拌样，装柱进行粗分离，用氯仿 - 丙酮 (10 : 0-0 : 10) 进行梯度洗脱，得到 10 个主要部分 (Frs 1-10)，其中 Fr3 用 MC I 柱层析 (60-100% MeOH-H₂O) 后得 5 个亚部分 (Frs 3a-3e)，再对 Fr3c (80% MeOH 洗脱部分) 通过反复硅胶柱层析 (石油醚 - 丙酮, 4 : 1) 和 Sephadx-LH20 柱层析 (丙酮) 纯化得到化合物 8 (82mg)，化合物 9 (9mg)，化合物 10 (23mg)，化合物 14 (151mg)，化合物 17 (650mg)，化合物 18 (32mg) 和化合物 19 (38mg)；Fr4 通过硅胶柱层析 (石油醚 - 乙酸乙酯, 2 : 1)，Sephadx-LH20 柱层析 (丙酮) 得到化合物 1 (115mg) 和化合物 2 (324mg)；Fr5 部分用 MCI-gel 柱层析 (80-100% MeOH-H₂O) 后得 3 个亚部分 (Frs 5a-5c)，再对 Fr5a (80% MeOH 洗脱部分) 通过反复硅胶柱层析和 Sephadx-LH20 柱层析 (丙酮) 得到化合物 3 (362mg)，化合物 4 (36mg)，化合物 5 (88mg)，化合物 6 (5mg)，化合物 7 (133mg)，化合物 11 (5mg)，化合物 12 (30mg)，化合物 13 (3mg)，化合物 15 (9mg) 和化合物 16 (2mg)。

[0022] 实施例 2：

[0023] 南欧大戟总二萜拒食活性检测：

[0024] 采用选择性拒食活性测定方法测定从实施例 1 中获得的南欧大戟总二萜对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)、斜纹夜蛾 (*Prodenia litura*)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、玉米螟 (*Pyrausta nubilalis*) 等昆虫的拒食活性。南欧大戟总二萜用丙酮配置成各种浓度梯度 (100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 500 μ g/mL, 800 μ g/mL, 1000 μ g/mL) 作为昆虫拒食剂。活性测试之前将幼虫饥饿 4-5 小时。选取生长一致的小白菜 (*Brassica chinensis*) 叶, 冲洗干净, 纱布拭干, 用打孔器 (直径 1.1cm) 打制成圆叶片 (叶蝶)。将各浓度的溶液取 10 μ l 均匀涂抹在叶蝶上, 放在吸水纸上晾干, 即成处理叶蝶; 对照叶蝶为直接取丙酮溶液 10 μ l 涂抹在叶蝶上, 并放在吸水纸上晾干。然后再将 2 张处理叶蝶和 2 张对照叶蝶交错放入一个直径 9cm 的培养皿内。为防止叶蝶干缩, 在培养皿底垫一层滤纸, 滴加蒸馏水保湿。每个处理设 5 组重复, 试验后 24 小时, 36 小时和 48 小时检查叶蝶被取食的面积。用坐标纸法测量对照叶蝶和处理叶蝶被试虫取食的面积。拒食率 = $[(C-T)/(C+T)] \times 100$ 。用几率值法计算拒食中浓度 EC_{50} (μ g/mL)。

[0025] 测试结果表明, 南欧大戟总二萜溶液对供试昆虫具有很强的拒食活性 (见表 1)。

[0026] 表 1、南欧大戟总二萜拒食活性数据 (EC_{50} , μ g/mL)

[0027]

	甜菜夜蛾	棉铃虫	斜纹夜蛾	小菜蛾	玉米螟
拒食中浓度	6.381	2.716	8.505	3.597	18.85

[0028] 实施例 3：

[0029] 南欧大戟二萜化合物的拒食活性检测：

[0030] 将本发明实施例 1 中获得的二萜化合物 1-19, 用丙酮配置成与实施例 2 同样的浓度梯度作为昆虫拒食剂, 然后按实施例 2 的叶蝶法测定其对供试昆虫的拒食作用, 24 小时后检查叶蝶取食面积, 计算拒食中浓度 EC_{50} (nM/cm^2)。

[0031] 测试结果表明, 本发明所述二萜化合物 1-19 对供试昆虫均具有很强的拒食作用 (见表 2)。

[0032] 表 2、南欧大戟二萜化合物的拒食活性数据 (EC_{50} , nM/cm^2)

[0033]

化合物	甜菜夜蛾	棉铃虫	斜纹夜蛾	小菜蛾	玉米螟
1	0.105	0.127	0.154	0.254	1.932
2	0.248	0.334	0.290	0.357	0.994
3	0.493	0.527	0.462	0.673	1.286
4	0.533	0.654	0.518	0.765	1.852
5	1.947	1.625	1.417	2.549	4.775

6	0.871	0.920	0.853	1.021	2.760
7	0.900	0.881	0.767	0.852	2.643
8	0.769	0.672	0.637	0.973	1.816
9	0.892	0.858	0.756	1.447	3.474
10	0.703	0.739	0.841	1.178	3.523
11	1.388	1.553	1.873	2.796	7.378
12	1.273	1.227	1.536	2.151	5.719
13	0.787	0.843	0.750	1.348	2.514
14	1.230	0.962	0.911	1.633	3.750
15	2.794	1.335	2.174	1.865	5.495
16	2.462	2.023	1.988	2.733	6.164
17	9.378	7.146	6.493	12.590	17.302
18	11.527	8.526	8.327	9.314	21.510
19	10.130	9.310	9.202	11.980	25.166

[0034] 下述实施例 4-12 配方中有关组分选择如下：

[0035] 润湿剂可选用：脂肪醇硫酸盐、十二烷基苯磺酸盐、吐温、山梨醇聚氧乙醚、木质素磺酸盐、茶枯、搭皂角；

[0036] 乳化剂可选用：肥皂、烷基苯磺酸钠、脂肪酸聚氧乙烯基酯；

[0037] 稳定剂可选用：环氧植物油、环氧酯；

[0038] 有机溶剂可选用：甲醇、乙醇、丙酮；

[0039] pH 值调节剂可选用：醋酸、碳酸氢钠；

[0040] 防腐剂可选用：苯甲酸钠。

[0041] 实施例 4：

[0042] 南欧大戟总二萜乳剂拒食剂制备：

[0043] 取实施例 1 所制得南欧大戟总二萜 10g，加入润湿剂 20g，乳化剂 20g，稳定剂 8g，有机溶剂 40g，pH 值调节剂 2g，充分混合搅拌乳化，即得乳剂。

[0044] 实施例 5：

[0045] 0.5% 二萜拒食剂的制备：

[0046] (A) 成分配比（重量）：

[0047] 化合物 1 含量：0.1%， 化合物 2 含量：0.2%

- [0048] 化合物 3 含量 :0.2%， 润湿剂 :20%
- [0049] 乳化剂 :20% 稳定剂 :6%
- [0050] 有机溶剂 :53.2% pH 值调节剂 :0.3%
- [0051] (B) 制备方法 :溶液混配法
- [0052] 将实施例 1 所制得化合物 1、化合物 2、化合物 3 用一定量的溶剂溶解,按配方设定的化合物含量比例混合搅拌,然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂搅拌均匀即可。
- [0053] 实施例 6 :
- [0054] 0.8%二萜拒食剂的制备 :
- [0055] (A) 成分配比 (重量) :
- [0056] 化合物 14 含量 :0.2%， 化合物 15 含量 :0.4%
- [0057] 化合物 16 含量 :0.2%， 润湿剂 :20%
- [0058] 乳化剂 :20% 稳定剂 :6%
- [0059] 有机溶剂 :52.9% pH 值调节剂 :0.3%
- [0060] (B) 制备方法 :溶液混配法
- [0061] 将实施例 1 所制得化合物 14、化合物 15、化合物 16 用一定量的溶剂溶解,按配方设定的化合物含量比例混合搅拌,然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂搅拌均匀即可。
- [0062] 实施例 7 :
- [0063] 1%二萜拒食剂 I 的制备 :
- [0064] (A) 成分配比 (重量) :
- [0065] 化合物 17 含量 :0.3%， 化合物 18 含量 :0.3%
- [0066] 化合物 19 含量 :0.4%， 润湿剂 :20%
- [0067] 乳化剂 :20% 稳定剂 :6%
- [0068] 有机溶剂 :52.7% pH 值调节剂 :0.3%
- [0069] (B) 制备方法 :溶液混配法
- [0070] 将实施例 1 所制得化合物 17、化合物 18、化合物 19 用一定量的溶剂溶解,按配方设定的化合物含量比例混合搅拌,然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂搅拌均匀即可。
- [0071] 实施例 8 :
- [0072] 1%二萜拒食剂 II 的制备 :
- [0073] (A) 成分配比 (重量) :
- [0074] 化合物 1 含量 :0.2%， 化合物 15 含量 :0.4%
- [0075] 化合物 19 含量 :0.4%， 润湿剂 :20%
- [0076] 乳化剂 :20% 稳定剂 :6%
- [0077] 有机溶剂 :52.7% pH 值调节剂 :0.3%
- [0078] (B) 制备方法 :溶液混配法
- [0079] 将实施例 1 所制得化合物 1、化合物 15、化合物 19 用一定量的溶剂溶解,按配方设定的化合物含量比例混合搅拌,然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂搅

拌均匀即可。

[0080] 实施例 9：

[0081] 1%二萜拒食剂 III 的制备：

[0082] (A) 成分配比（重量）：

[0083] 化合物 1 含量：0.2%， 化合物 2 含量：0.4%

[0084] 化合物 3 含量：0.4%， 润湿剂：15%

[0085] 乳化剂：10% 稳定剂：6%

[0086] 有机溶剂：20% pH 值调节剂：0.3%

[0087] 防腐剂：1% 水：46.7%

[0088] (B) 制备方法：溶液混配法

[0089] 将实施例 1 所制得化合物 1、化合物 2、化合物 3 用一定量的溶剂溶解，按配方设定的化合物含量比例混合搅拌，然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂、防腐剂和 水搅拌均匀即可。

[0090] 实施例 10：

[0091] 1.5%二萜拒食剂的制备：

[0092] (A) 成分配比（重量）：

[0093] 化合物 14 含量：0.4%， 化合物 15 含量：0.5%

[0094] 化合物 16 含量：0.6%， 润湿剂：15%

[0095] 乳化剂：10% 稳定剂：6%

[0096] 有机溶剂：20% pH 值调节剂：0.3%

[0097] 防腐剂：1% 水：46.2%

[0098] (B) 制备方法：溶液混配法

[0099] 将实施例 1 所制得化合物 14、化合物 15、化合物 16 用一定量的溶剂溶解，按配方设定的化合物含量比例混合搅拌，然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂、防腐剂和 水搅拌均匀即可。

[0100] 实施例 11：

[0101] 2%二萜拒食剂 I 的制备：

[0102] (A) 成分配比（重量）：

[0103] 化合物 17 含量：0.6%， 化合物 18 含量：0.7%

[0104] 化合物 19 含量：0.7%， 润湿剂：15%

[0105] 乳化剂：10% 稳定剂：6%

[0106] 有机溶剂：20% v pH 值调节剂：0.3%

[0107] 防腐剂：1% 水：45.7%

[0108] (B) 制备方法：溶液混配法

[0109] 将实施例 1 所制得化合物 17、化合物 18、化合物 19 用一定量的溶剂溶解，按配方设定的化合物含量比例混合搅拌，然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂、防腐剂和 水搅拌均匀即可。

[0110] 实施例 12：

[0111] 2%二萜拒食剂 II 的制备：

[0112] (A) 成分配比 (重量):

[0113] 化合物 1 含量 :0.2%, 化合物 15 含量 :0.7%

[0114] 化合物 19 含量 :1.1%, 润湿剂 :15%

[0115] 乳化剂 :10% 稳定剂 :6%

[0116] 有机溶剂 :20% pH 值调节剂 :0.3%

[0117] 防腐剂 :1% 水 :45.7%

[0118] (B) 制备方法 :溶液混配法

[0119] 将实施例 1 所制得化合物 1、化合物 15、化合物 19 用一定量的溶剂溶解,按配方设定的化合物含量比例混合搅拌,然后加入润湿剂、乳化剂、稳定剂、有机溶剂、pH 值调节剂、防腐剂和水搅拌均匀即可。