

仿生农用杀菌剂银泰的研制与应用

孟昭礼¹, 方向阳¹, 罗兰¹, 尚坚²

(1. 莱阳农学院, 山东省农业仿生应用工程技术研究中心, 山东青岛 266109;

2. 烟台大学应用化学系, 山东烟台 264005)

[摘要] 银泰(1-对羟基苯基丁酮)是以银杏外种皮提纯物白果酚为先导化合物仿生合成的一种杀菌剂。其中,银杏果实乙醇粗提物8.3倍和25倍液对苹果腐烂病抑菌率达100%和50%;银杏果实外种皮提纯物白果酚200倍和400倍液对苹果腐烂病菌抑菌率均为100%。20%银泰微乳剂对苹果腐烂病、番茄灰霉病等4种病菌EC₅₀为17.26~48.43 mg/L,分别优于对照药剂;田间防治小麦纹枯病等4种病害效果达85%以上;对非靶标生物安全,且不易产生抗药性。仿生合成的银泰原药对大白鼠毒性试验,经口、经皮LD₅₀均为4 640 mg/kg,20%银泰乳油对大白鼠毒性试验,经口LD₅₀为3 160 mg/kg,经皮LD₅₀为2 150 mg/kg;亚慢性经口毒性(90 d)试验雌为19.1 mg/kg,雄为18.3 mg/kg;Ames、细胞微核和染色体畸变试验均为阴性结果。

[关键词] 银杏;白果酚;仿生合成;银泰;防治效果

[中图分类号] Q819; S482.2⁺92 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2007)03-0028-07

植物农药一般具有环境友好性,但对有害生物见效慢且效果差,而传统化学农药一般毒性高,有不少品种具有残留^[1~3]。如何把植物农药和化学农药的优点集于一身,是国内外农药创制的热点之一,如拟除虫菊酯类农药是最成功的范例之一^[2]。笔者从1983年致力于仿生农用杀菌剂的研制与应用,从银杏的生物活性现象入手,证实银杏各器官均存在农用抑菌物质,并从银杏外种皮获得了先导化合物,在仿生合成中对先导化合物的结构进行了改造,得到了银果、银泰和仿生安等系列产品^[1]。

1 银杏农用抑菌活性的发现与证实

1.1 银杏的生物活性现象

银杏(*Ginkgo biloba* L.)属于银杏科,只有1属1种,又称白果,起源于中国,在1.9亿年前的中生代侏罗纪已发展到全盛时期,成了北半球植物王国的主角,是第四纪冰川幸存下来的古老珍贵树种,被称为“活化石”,其生命力很强,能生存数千年之久^[1]。

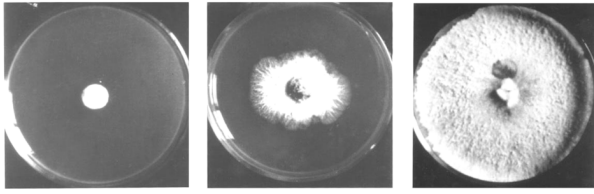
银杏具有很强的抗辐射能力。1945年,美国在日本广岛投下了第一枚原子弹,距爆炸中心1 km的银杏树是最先恢复萌芽的植物。

银杏对创伤具有很强的愈合能力。银杏树受伤后自己能够愈合,且未愈合部位木质不易发生腐烂现象。泰山大灵岩寺的银杏树被雷击三次,目前仍枝繁叶茂,硕果累累。

银杏抗逆性强,一般不易受病虫害的侵染^[4]。农谚称:“蚂蚁不上银杏树”。笔者多次多点考察发现蚂蚁靠近银杏树时会敏感地转换方向,且银杏叶一般不发霉、不腐烂、不变色。

1.2 银杏中生物活性物质的提取及活性测定

对银杏中抑菌物质采用冷浸方法提取,用生长速率法进行了抑菌作用的测定,结果证实银杏各器官均具有抑菌活性物质,其中以外种皮含量最为丰富。银杏果实乙醇粗提物8.3倍液对苹果腐烂病的抑菌率达100%,25倍液达50%(见图1);对苹果轮纹病菌、苹果干腐病菌和玉米小斑病菌也具有显著的抑菌作用。



银杏果实乙醇提取液 (8.3X) 银杏果实乙醇提取液 (8.3X) CK(含等量乙醇)

图 1 银杏果实乙醇粗提物对苹果腐烂病菌的抑制作用

Fig.1 Control effect of ethanol extract from the fruit of *Ginkgo Biloba* L. against *Valsa Mali*

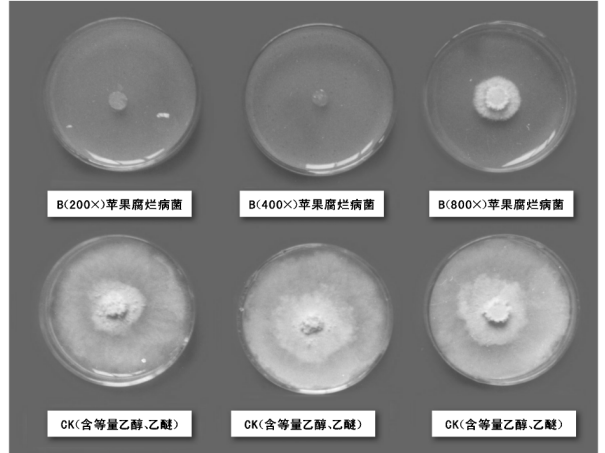


图 2 先导化合物 B 对苹果腐烂病菌的抑制作用
Fig.2 Control effect of lead compound B against *Valsa Mali*

1.3 银杏中先导化合物的分离提纯及活性测定

采用 pH 梯度萃取法和柱层析法对银杏外种皮中的生物活性物质进行分离提纯^[5]，采用生长速率法对分离提纯的活性物质 (B) 进行生物活性测定^[6]，其 200 倍、400 倍和 800 倍液对苹果腐烂病菌抑菌率分别为 100%、100%和 80.01% (见图 2)。

1.4 先导化合物的结构认定

对分离提纯的活性物质 (B) 采用色-质分析 (见图 3)、红外分析 (见图 4) 和核磁共振分析 (见图 5) 进行结构认定，并与相关文献的数据进

行比较，确定化合物 (B) 为白果酚，化学结构为。

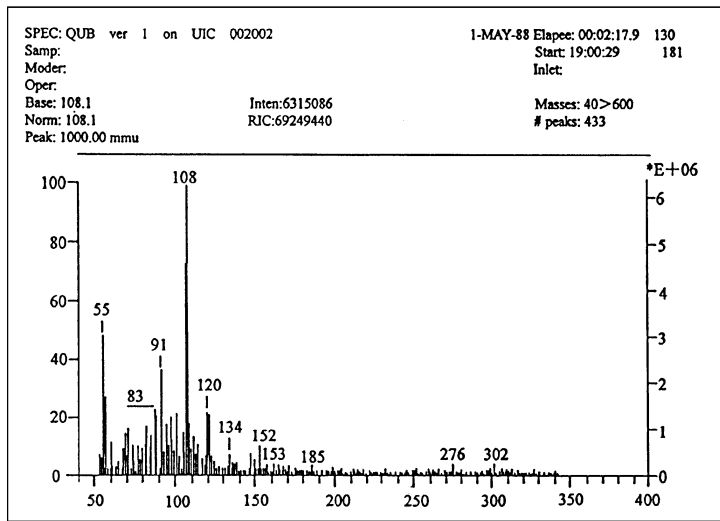
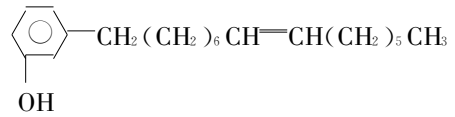


图 3 白果酚色质联仪谱图

Fig.3 Plot of ginkgolic phenol by GC-MS

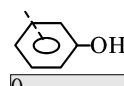
2 银泰的仿生合成

2.1 仿生合成的模型分析

从银杏外种皮分离提纯出来的生物活性较好的化合物为白果酚，以其为先导化合物 (也可称之为模型或模板) 进行仿生合成试验。

白果酚分子中，含有酚羟基，它是一个亲水性

较强的基团，具有一定的抑菌作用。另外还含有一个不饱和长碳链取代基，这是一个强的疏水基团，可能对药物分子穿透细胞膜有较大帮助。因此认为其核心结构为



可在邻、间、对位被烷、烯、酰基取代获衍生物。

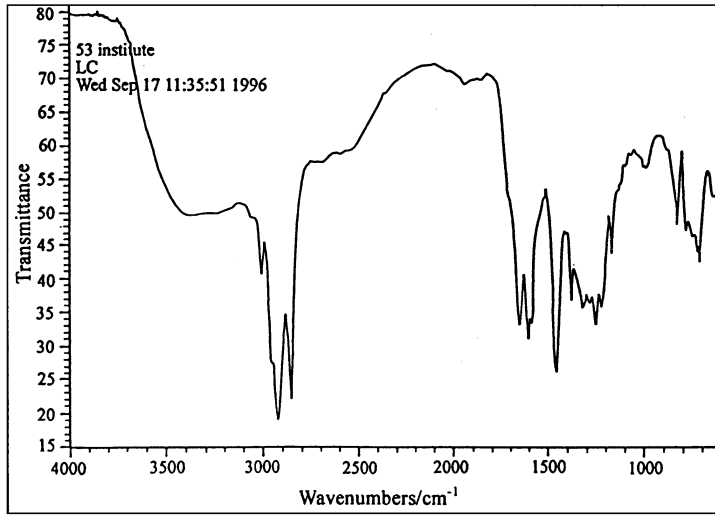


图 4 白果酚红外光谱图

Fig.4 Plot of ginkgolic phenol by infrared ray (IR)

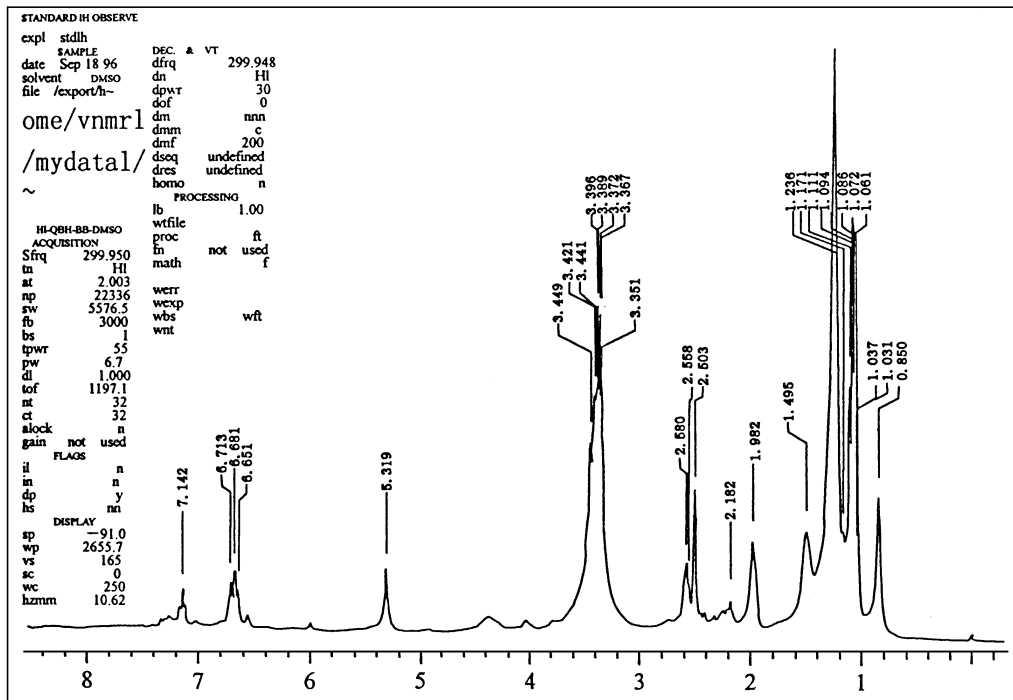
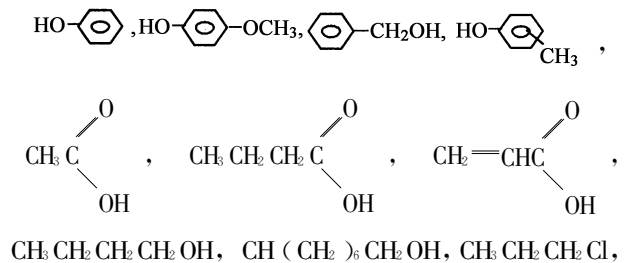


图 5 白果酚核磁共振谱图

Fig.5 Plot of ginkgolic phenol by nuclear magnetic resonance (NMR)

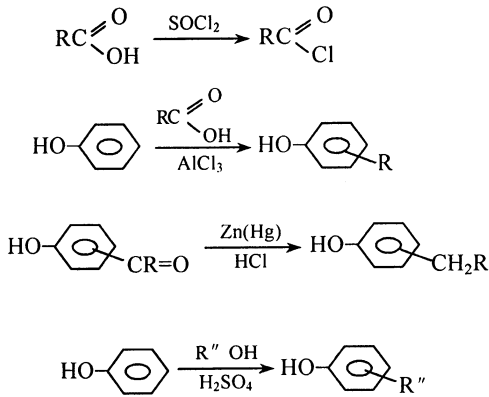
2.2 仿生合成的设计^[7~9]


2.2.1 合成原料 根据对先导化合物构效关系的分析, 结合合成能力、原料资源及成本的考虑, 拟以下面原料为起始原料:



CH₂=CHCH₂Cl 等。

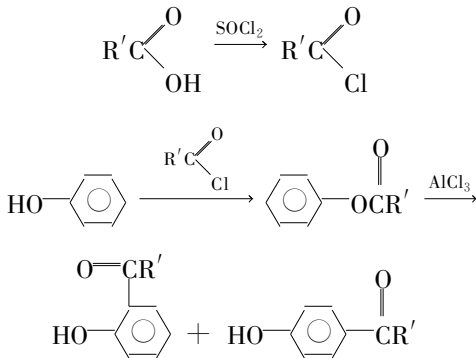
2.2.2 仿生合成路线



其中, R, R', R''为烷基或非 1-1 位烯基。 表示邻、间、对位取位置不定。

2.3 仿生合成

以苯酚与卤代烃或羧酸为原料, 仿生合成为



通过上述合成路线, 获得仿生合成物银泰 (Yintai, 代号为 b)。

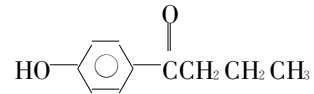
3 银泰的结构认定和室内外药效试验

3.1 结构认定

由国家药物及代谢产物分析中心进行结构认定 (图谱省略)。

依据有机化合物元素分析通则 (IMM-96) 和有机化合物元素分析 (IMM-005-96), 采用 Car10-Erba-1106 元素分析仪, 对银泰进行元素分析。检测结果为: I. C 72.74%, H 7.55%; II. C 72.84%, H 7.57%。

依据《分析方法通则》, 采用 AM-500, VGZAB-ZF, 1MPACT-400 对银泰进行红外光谱、质谱, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT 谱结构分析, 并与相关文献的数据进行比较, 确定仿生化合物 b 为 1-对羟基苯基丁酮, 其化学结构为



3.2 室内生物活性测定

采用生长速率法室内测定了银泰对苹果腐烂病菌、苹果干腐病菌、葡萄黑痘病菌和玉米大斑病菌的生物活性^[8]。测定结果见表 1。

表 1 银泰制剂对几种病原菌的室内生测结果
Table 1 Control effect of Yintai against several pathogenetic fungi

病原菌	药剂	毒力方程	EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	EC ₉₅ /mg/L ⁻¹	相关系数 (r)
苹果腐烂病菌	20% 银泰微乳剂	y=1.214 2+2.756 4 x	23.63	93.37	0.987 8
<i>Valsa mali</i>	20% 银泰乳油	y=1.832 4+2.233 9 x	26.18	142.67	0.997 8
	32% 克菌乳油	y=-0.853 1+3.667 7 x	39.43	110.75	0.999 1
苹果干腐病菌	20% 银泰微乳剂	y=2.931 9+1.227 3 x	48.43	575.62	0.945 4
<i>Botryosphaeria berengerianabotry</i>	20% 银泰乳油	y=2.213 5+1.594 0 x	56.36	608.89	0.973 7
	32% 克菌乳油	y=1.906 5+1.758 1 x	57.48	495.59	0.977 1
葡萄黑痘病菌	20% 银泰微乳剂	y=273 22+1.448 5 x	32.28	502.66	0.990 7
<i>Elsinoe ampelina</i>	50% 多菌灵可湿性粉剂	y=2.479 3+1.241 7 x	107.15	2 263.3	0.885 3
玉米大斑病菌	20% 银泰微乳剂	y=3.089 2+1.544 6 x	17.26	200.47	0.992 0
<i>Exserohilum turcicum</i>	50% 多菌灵可湿性粉剂	y=2.795 7+1.404 1 x	37.14	551.25	0.977 4

从表1可知, 20%银泰微乳剂对苹果腐烂病菌、葡萄黑痘病菌、玉米大斑病菌抑制作用优于对照药剂克菌和多菌灵, 对苹果干腐病菌抑制作用与克菌相当。

3.3 田间药效试验

田间药效试验除了对苹果腐烂病采用划道涂抹法外, 均采用喷雾法, 试验中每处理重复4次, 每小区按随机区组排列, 试验结果统计和计算按“农药田间药效试验准则”处理^[9,10]。

选用20%银泰微乳剂对苹果腐烂病、草莓白粉病、小麦纹枯病和玉米大斑病进行田间药效试验, 结果见表2~表5。

表2 划道涂抹法20%银泰乳油对苹果腐烂病的防治效果

Table 2 Control effect of 20% Yintai EC against *Valsa mali*

药剂	浓度 /μl·L ⁻¹	药前平均病斑面积/cm ²	药后平均病斑扩展面积/cm ²	扩展率/%	防治效果/%
	6 666.7	202.8	0	0	100
20%银泰乳油	4 000	167.3	0	0	100
	2 000	307.0	10.5	34	93.2
32%克菌乳油	4 000	229.7	11.6	5.1	89.8
对照	清水	200.5	100.3	50.0	—

由表2可知, 20%银泰乳油对苹果腐烂病的防治效果优于32%克菌乳油的防治效果。

表3 20%银泰微乳剂对草莓白粉病的药效试验

Table 3 Control effect of 20% Yintai ME against *Sphaerotheca macularis* on strawberry

药剂	浓度/μl·L ⁻¹	病情指数/%	防治效果/%
	333	7.5	88.2
20%银泰微乳剂	250	7.9	83.0
	200	11.3	75.7
粉锈宁可湿性粉剂	250	13.5	71.0
烯唑醇可湿性粉剂	250	11.2	75.9
对照	清水	46.5	—

由表3可以看出, 20%银泰微乳剂好于两种对照药剂的防治效果。

由表4可知, 20%银泰微乳剂对小麦纹枯病防治效果明显高于70%甲基托布津防治效果。

表4 20%银泰微乳剂对小麦纹枯病的防治效果

Table 4 Control effect of 20% Yintai ME against *Rizoctonia cerealis*

药剂	浓度 /μl·L ⁻¹	防前发病	最后发病	发病率增	防效
		株率/%	株率/%	加值/%	/%
	200	10.1	21.9	11.8	85.5
20%银泰微乳剂	400	11.8	20.2	8.4	89.6
	800	13.2	17.8	4.6	94.3
70%甲基托布津可湿性粉剂	400	12.6	35.3	22.7	72.0
对照	清水	11.2	92.3	81.1	—

表5 20%银泰对玉米大斑病的田间防治效果

Table 5 Control effect of 20% Yintai ME against *Exserohilum turcicum*

药剂	浓度 /μl·L ⁻¹	防前病斑	防后病斑	增加面积	防效
		面积/mm ²	面积/mm ²	/mm ²	/%
	200	725.2	3 144.1	2 418.9	89.9
20%银泰微乳剂	400	876.9	2 649.5	1 772.6	92.6
	800	900.7	1 834.7	9 34.0	96.1
50%多菌灵可湿性粉剂	400	852.3	6 648.2	5 795.9	75.8
对照	清水	728.6	24 677.8	2 3949.2	—

由表5可知, 20%银泰微乳剂对玉米大斑病具有较好的防治效果, 明显地高于常用药剂多菌灵。

4 银泰的毒性试验

银泰的急性和亚慢性毒性试验, 经山东省劳动卫生职业病研究所和中国预防医学院劳动卫生与职业病研究所测试, 结果见表6和表7。

表6 银泰急性毒性测试结果

Table 6 Test result of acute toxicity of Yintai

药剂	急性经口		急性经皮		刺激性试验	
	LD ₅₀ /mg·kg ⁻¹		LD ₅₀ /mg·kg ⁻¹		皮肤	眼睛
	雌性	雄性	雌性	雄性		
银泰原药	4 640	4 640	4 640	4 640	无	轻度
20%银泰乳油	3 160	3 160	2 150	2 150	无	重度

表7 银泰原药亚慢性毒性测试结果

Table 7 Test result of subchronic toxicity of Yintai technical material

药剂	蓄积毒性	Ames 试验	细胞微 核试验	初级精母	亚慢性经口毒性	
				细胞染色体 畸变试验	(90 d) /mg·kg ⁻¹	
				阴性	阴性	雌性
银泰原药	轻度蓄积	阴性	阴性	阴性	19.1	18.3

从表 6 和表 7 可以看出，银泰属于低毒农药，Ames 试验、细胞微核试验、初级精母细胞染色体畸变试验均为阴性。

5 20%银泰乳油的环境安全性评价

5.1 残留试验

经中国农业大学和山东省农业仿生应用工程技术研究中心测定，试验结果见表 8 和表 9。

表 8 20%银泰乳油在番茄中的消解动态

Table 8 Dynamic degradation of 20% Yintai EC in tomato

取样时间/d	银泰残留量/mg·kg ⁻¹				消失率/%
	重复		平均		
0	2.88	2.77	2.80	2.82	
1	1.66	1.71	1.70	1.69	40.1
2	1.39	1.50	1.40	1.43	49.3
3	1.04	1.01	1.11	1.05	62.8
5	0.71	0.78	0.65	0.71	74.8
9	0.55	0.61	0.60	0.58	79.4
15	0.18	0.20	0.14	0.17	94.0

表 9 20%银泰乳油在番茄中的最终残留 (15 d)

Table 9 Final residue of 20% Yintai in tomato (15 days after treatment)

施药量/kg·m ⁻²	地点	最终残留量/mg·kg ⁻¹
0.5	山东莱阳	0.17
0.05	山东莱阳	0.05

从银泰在番茄中的消解动态和最终残留测定结果 (见表 8、表 9) 看出，银泰在番茄中的半衰期为 4.15 d，15 d 的消解率为 94%，最终残留为 0.05 mg/kg，为低残留农药。

5.2 对非靶标生物的影响

国家环境保护总局南京环境科学研究所对 20%银泰乳油进行了斑马鱼、蜜蜂、鹌鹑、家蚕等四种环境生物的毒性试验。测试结果见表 10。

根据农药对环境生物的急性毒性分级标准，20%银泰乳油对蜂、鸟、蚕的毒性为低毒，对鱼为中毒，因该品种用于旱田，不直接用于水田沙水域，对水生生物无直接危害影响。

表 10 20%银泰乳油对几种非靶标生物的影响

Table 10 Disturbance of 20% Yintai EC to several non-target organism

种类	时间	LC ₅₀
斑马鱼	96 h	5.02 mg/L (药液)
蜜蜂	48 h	866.0 mg/L (药液)
鹌鹑	7 d	822.6 mg/kg (鹌鹑)
家蚕	48 h	>4 000 mg/kg (桑叶)

6 20%银泰乳油抗药性风险评估

苹果腐烂病菌对 20%银泰乳油的抗药性风险测定结果，见表 11。

表 11 20%银泰乳油对苹果腐烂病菌的抗性培育结果

Table 11 Resistant research result of 20% Yintai EC on *Valsa mali*

培育代数	毒力方程	EC ₅₀ /μL·L ⁻¹	R/S
F0	y=2.734 x+1.793	18.346	—
F1	y=1.926 x+2.407	18.932	1.032
F2	y=2.783 x+1.794	17.196	0.937
F3	y=2.268 x+2.170	18.156	0.990
F4	y=2.813 x+1.766	17.333	0.945
F5	y=-0.117 x+4.149	17.110	0.933
F6	y=2.718 x+1.885	16.238	0.885
F7	y=1.917 x+2.413	18.936	1.032
F8	y=2.480 x+2.075	16.374	0.893
F9	y=1.738 x+2.538	19.283	1.051
F10	y=3.001 x+1.638	16.592	0.904
F12	y=3.226 x+1.532	14.394	0.785
F14	y=2.693 x+1.820	18.532	1.010
F16	y=2.534 x+2.032	16.367	0.892
F18	y=2.810 x+1.834	15.635	0.852
F20	y=3.262 x+1.522	13.875	0.756
F22	y=2.287 x+2.149	18.300	0.997
F24	y=2.248 x+2.182	18.252	0.995
F26	y=2.564 x+2.086	14.716	0.802
F28	y=2.957 x+1.692	16.228	0.885
F30	y=2.661 x+1.923	16.459	0.897

由表 11 可以看出，经过 30 代抗性培育，苹果腐烂病菌没有对 20%银泰乳油产生抗药性。仅 F1，

F7, F9, F14 代的 EC_{50} 略大于 F0 代 EC_{50} , 抗性比值分别仅为 1.032, 1.032, 1.051 和 1.010, 属正常水平, 其他各代的抗性比值均小于 1, 大部分在 0.8—1.0 之间, 整个抗性比值保持在一个比较恒定的水平, 与 F0 代对药剂的敏感性没有差异。

7 讨论

银杏是我国古老珍贵的树种, 它具有特殊的生物学特性, 除了发现它的农用抑菌活性外, 其他农用价值有待进一步探索。

仿生合成的银泰系列产品是从银杏的生物活性现象入手, 到仿生合成与农用杀菌剂的田间应用, 这是一项多学科相结合的系统工程, 它对我国仿生农药的研发具有积极的推动作用。该产品不但具有植物农药的低毒性, 而且具有传统化学农药的高效性。它的开发和应用, 将对保护生态资源、生态环境和促进出口创汇有一定的意义。

我国是植物资源最丰富的国家之一, 从植物中获得先导化合物具有得天独厚的优势, 采用仿生合成手段得到农药新品种的前景十分广阔。

参考文献

- [1] 孟昭礼. 银杏及其仿生杀菌剂[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2004
- [2] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 世界书局(校点本), 1979
- [4] 陈冀胜, 郑 硕. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [5] 付丰永. 白果化学成分的研究—氢化白果亚酸[J]. 化学学报, 1962, 28(1): 52
- [6] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1997
- [7] 邢共毅, 徐瑞秋, 周 政等. 基础有机化学(下)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1983
- [8] 林传光, 蔡润生. 两个白果化合物对轮枝杆菌的作用[J]. 中国植物志, 1950, 5(1): 6
- [9] 国家质量技术监督局. 农药田间药效试验准则(一)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000
- [10] 国家质量技术监督局. 农药田间药效试验准则(二)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004

Research on Bionic Fungicide Yintai and Its Application

Meng Zhaoli¹, Fang Xiangyang¹, Luo Lan¹, Shang Jian²

(1. Laiyang Agricultural Colleague, Research Center of Agri-bionic Engineering and Technology of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109, China; 2. Department of Applied Chemistry, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China)

[**Abstract**] Yintai (p-hydroxy butrophenone) is a kind of bionic fungicides synthesized by simulating the lead compound of ginkgol isolated from the exosperm of ginkgo fruit. 8.3-time diluted solution of alcohol crude extract from the ginkgo fruit showed 100% inhibition on the pathogen of apple canker (*Valsa mali*), and 50% inhibition for the 25-time solution. Both 200-time and 400 time solutions of ginkgol, extracted from external seed coat of ginkgo, had 100% inhibition on pathogen of apple canker (*Valsa mali*). EC_{50} of 20% Yintai ME against 4 kinds of pathogens, including apple canker, tomato gray mold, and so on, ranges from 17.26 mg/L to 48.43 mg/L, better than the contrast chemicals respectively. Field control effects on 4 kinds of diseases, e. g., *Rhizoctonia cerealis*, are higher than 85%, with safety to non-target organisms, and no symptom of pesticide resistance. Both LD_{50} of acute oral toxicity and LD_{50} of acute dermal toxicity to mouse are 4 640 mg/kg by Yintai technical material, and 3 160 mg/kg and 2 150 mg/kg by 20% Yintai EC coorespondingly. Trials of subchronic toxicity (90 days) revealed that oral toxicity was 19.1 mg/kg for female, and 18.3 mg/kg for male, with negative results on Ames test, micro-nucleus test, and chromosome-type aberration test.

[**Key words**] *Ginkgo biloba* L.; ginkgol; bionic synthesis; Yintai; control effect