

核桃青皮中抗植物病毒活性物质的提取条件的研究

张新华, 翟梅枝*, 景炳年, 郭琪

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:本研究以不同溶剂和方法对核桃青皮进行了抗植物病毒物质的提取和活性测定,并且通过单因素试验和正交试验,以核桃青皮中抗病毒活性物质的抑制率为主要考察指标,对影响提取效果的因素进行了研究。结果表明:提取物的抗病毒活性因提取溶剂和提取方法的不同而异。以体积分数 95 %乙醇为提取溶剂,冷浸提取物在质量浓度 10 mg/mL 时,对烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 的抑制率最高,为 80.0 %。采用冷浸提取时,各因素对核桃青皮抗病毒活性物质提取效果的影响程度从高到低依次为乙醇浓度>液固比>提取次数>提取时间,确定了优化的提取条件为:95%乙醇冷提 4 次,每次 26 h,液固比为 5:1。

关键词:核桃青皮;烟草花叶病毒;提取

中图分类号:S792.130.8

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)01-0149-05

Extraction Condition of Activity of Antiviral Substances from Walnut Peel

ZHANG Xin-hua, ZHAI Mei-zhi, JING Bing-nian, GUO Qi

(College of Forest, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To optimize the conditions for extracting antiviral substances from walnut (*Juglans regia* L.) peel, different solvents and methods were applied. The extraction process was studied by single factor and orthogonal experiment guided by the inhibition rate of antiviral substances. The results showed that activities of antiviral substances varied from different solvents and methods. The extract from 95% ethanol with a concentration of 10 mg/mL, exhibited the highest inhibition rate on tobacco mosaic virus (TMV) i. e. , 80.0%. The successive order of factors affecting the extracting was ethanol concentration, liquid-solid ratio, extracting times, extracting time. The optima conditions of soaking were determined to be 95% alcohol 26 h, 4 times, and 5:1 liquid-solid ratio.

Key words: walnut peel; tobacco mosaic virus; extraction

植物病毒病素有“植物癌症”之称^[1]。其危害仅次于真菌病害,近年烟草病毒病在我国各主产烟区经常发生,重病田块减产 70%以上^[2],已成为烟草主要病害之一。该病的病原物多(据报道引起我国烟草病毒病的病毒共有 16 种)^[3],病毒种群变化快,并且病毒在植物细胞内绝对寄生,其复制所需的物质、能量、场所完全由寄主细胞提供,加之植物没有完整的免疫代谢系统,使植物病毒病的防治更加困难。目前,仍未找到有效的化学药剂和防治方法^[4,5]。

自 1914 年 Allard 首次报道商陆(*Phytolacca acinosa*)汁液中存在抗 TMV 活性物质后,国内外学

者对植物抗病毒活性物质进行了多方面的探索和研究^[6~12],从已知的有机或无机化合物到植物粗提物中,均发现了一些对 TMV 有较好效果的抑制剂。

植物体产生的多种次生代谢产物,具有抗病毒的活性。如:生物碱类、类黄酮类、蛋白质类、有机酸类和酚类化合物等许多不同类型的化合物^[13]。翟梅枝等^[14,15]研究显示,核桃叶次生物质对抑制 TMV 侵染心叶烟和防治烟草花叶病具有较好的抑制作用,并且其中的天然黄酮类化合物通过进一步研究有望开发出新的植物源抗病毒剂。

本研究以烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic

收稿日期:2007-07-18 修回日期:2007-10-08

基金项目:国家自然科学基金(30571494),中国博士后基金(2004035689),西北农林科技大学优秀人才专项基金(04ZR005)

作者简介:张新华(1982-),男,新疆昌吉人,硕士研究生,从事林产资源综合利用研究。

通讯作者:翟梅枝(1963-),女,河南西平人,副教授,博士,主要从事植物资源利用和植物病害防治研究。

virus, TMV)为主要研究对象,采用不同溶剂和提取方法对核桃青皮中抗病毒物质进行提取,测定其抗 TMV 活性,并进行核桃青皮中抗病毒活性物质提取条件的优化,研究结果可望为核桃青皮的综合利用和植物源抗病毒剂的开发提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品 核桃青皮 2005 年 9 月采自渭北核桃主产区黄龙县,自然晾干后,在 45℃左右的烘箱中烘干,粉碎过 20 目筛(孔径 0.84 mm),然后密封于塑料袋内,置冰箱中备用。

1.1.2 寄主植物 选用普通烟 K326 (*Nicotiana tabacum* var. K326)和心叶烟 (*Nicotiana glauca*)为寄主植物,前者为 TMV 的系统侵染寄主,用于病毒的繁殖;后者为 TMV 的局部枯斑寄主。供试烟苗采用直播土培育苗技术进行培育,适合移栽时将幼苗分株移入直径 15 cm 的花盆中土培,生长一定时间后,选长势一致的幼苗用于病毒接种试验。

1.1.3 供试病毒 烟草花叶病毒(TMV)普通株系,保存在普通烟 K326 植株上,接种前取发病的鲜叶 1 g 研磨、过滤、定容至 50 mL,供接种用。

1.1.4 主要仪器及试剂 仪器主要有 RE52A 旋转薄膜蒸发仪、循环水真空泵、植物粉碎机、恒温水浴锅等;试剂有乙醇、丙酮、甲醇、二甲基亚砜等,均为分析纯;去离子水。

1.2 方法

1.2.1 核桃青皮中次生物质的提取 在提取时间 3 h、液固比 5:1(mL:g)条件下,用丙酮 95%(体积分数,下同)乙醇、甲醇和水作溶剂,采取回流、冷浸 2 种不同的提取方法,提取核桃青皮中的次生物质,以半叶法接种心叶烟,根据提取物对 TMV 的抑制效果确定适宜的提取溶剂和方法。

1.2.2 单因素试验

1.2.2.1 溶剂体积分数的选择 在确定液固比为 5:1、浸提温度为室温、浸提次数为 3 次,每次浸提时间为 24 h 不变的条件下,计算各提取物的得率,比较溶剂的不同体积分数(65%、75%、85%、95%、100%)对浸出物抗病毒活性的影响,从而确定溶剂的适宜体积分数。

1.2.2.2 提取时间的选择 在液固比 5:1,浸提温度为室温,浸提次数为 3 次,溶剂浓度由 1.2.2.1 试验确定,每次浸提时间分别为 16、20、24、28、32 h,计算各提取物的得率,考察浸提时间与浸出物抗

万方数据

病毒活性的关系,确定最佳浸提时间。

1.2.2.3 液固比的选择 在溶剂体积分数、浸提温度和浸提时间确定的情况下,浸提次数为 3 次,分别以 3:1、5:1、7:1、9:1、11:1 的液固比进行浸提,计算各提取物的得率,选择最佳液固比。

1.2.2.4 提取次数的选择 在溶剂体积分数、浸提温度、浸提时间和液固比都确定的情况下,进一步研究提取次数(2 次、3 次、4 次、5 次、6 次)与浸出物抗病毒活性的关系,计算提取物的得率,确定最佳提取次数。

1.2.3 核桃青皮中抗病毒活性物质提取条件优化

根据单因素试验确定的范围,以溶剂的体积分数、提取时间、提取次数和液固比作为考察的 4 因素,每因素 3 水平,以抗病毒活性为指标,用(3⁴)正交表安排试验,得出核桃青皮中抗病毒活性物质提取的最佳工艺条件。

1.2.4 病毒接种液的配制 取一定量样品提取液,加入少量 DMSO 溶解后,加蒸馏水稀释至 1 mL,接种前加入新制备的病毒提取液 0.5 mL,混合均匀后用于接种,以不含样品提取物的相同浓度病毒溶液为对照接种液。

1.2.5 抗病毒活性的测定 采用半叶法混合接种。选择健康、生长旺盛的 6~8 叶期心叶烟,左半叶接种含有 TMV 的植物样品提取液,右半叶接种对照液。每处理接种 4~5 个叶片,重复 3 次,3 d 后分别统计枯斑数目,抑制率计算公式为:

抑制率(%)=(对照平均每叶枯斑数-处理平均每叶枯斑数)/对照平均每叶枯斑数×100

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂和方法对核桃青皮提取物抗 TMV 活性的影响

表 1 可看出:1)提取方法相同时,提取物的抗病毒活性因提取溶剂不同而异,4 种提取溶剂所得提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果都较好,抑制率均在 55%以上,它们的抑制率大小依次为:95%乙醇提取物>丙酮提取物≈甲醇提取物>水提取物。这种差异可能是由于不同溶剂提取物中活性物质的种类和含量不同所致。乙醇是植物生物活性成分提取中最常用的溶剂,其毒性小、价格便宜、浓缩回收方便;以水为溶剂,虽然成本较低,但提取物中其他杂质含量较多,且水提取液浓缩困难、提取物存放中易腐败变质;而甲醇和丙酮 2 种溶剂有毒、污染严重。因此,从经济和安全的角度来看,选择乙醇为溶剂提取核桃青皮中抗病毒活性物质较适宜。2)提取溶剂相同时,冷浸提

取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果均好于回流提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果。95%乙醇为溶剂提取时,在供试质量浓度 10 mg/mL 时,冷浸提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制率达 80.0%,回流提取物的抑制率为 74.7%。这可能是由于不同提取方法所获得的活性物质种类和数量不同。回流提取时,样品和溶剂一直处于较高温度下,一些热不稳定的活性物质因长时间受热发生性质变化。因此,在相同溶剂提取时,冷浸提取物的抗病毒效果好。综合考虑认为,核桃青皮中抗 TMV 活性物质的提取以 95%乙醇溶液冷浸提取较好。

表 1 不同溶剂、方法提取的核桃青皮活性物质对 TMV 的抑制效果

Table 1 Inhibition effects of active substance from different solvents and methods in walnut peel to TMV infecting *Nicotiana glutinosa*

溶剂	不同提取方法的抑制率/%	
	回流	冷提
水	55.2	75.2
甲醇	69.1	76.9
95%	74.7	80.0
丙酮	69.8	76.4

注:供试提取物的质量浓度 10 mg/mL¹,下同

2.2 单因素试验

2.2.1 溶剂体积分数的选择

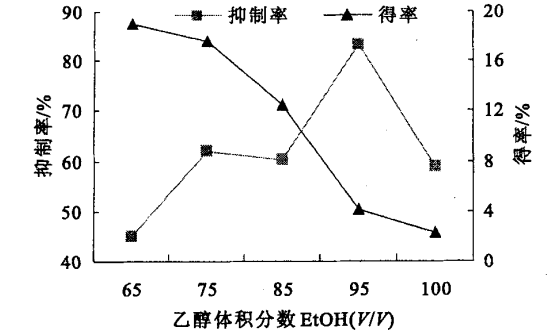


图 1 溶剂体积分数对抑制率和得率的影响
Fig.1 Effect of solvent concentration on the inhibition and extraction rate

由图 1 所示可知,核桃青皮提取物的抗病毒活性随着乙醇浓度的增大先升高再降低。当乙醇浓度为 65%时,提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制率仅为 44.92%,当乙醇浓度为 95%时,抑制率达到 83.24%,但无水乙醇的提取物其抗病毒活性反而下降,仅为 58.94%。这可能是由于抗病毒活性高的物质适宜溶解于 95%乙醇中,而低浓度乙醇或无水乙醇的提取物中这些活性物质含量较低造成的。

从提取物的得率来看,随着乙醇浓度的提高核桃青皮提取物得率一直呈现下降趋势。这可能是因

为不同浓度的乙醇适宜提取的物质种类及其含量不同,用低浓度乙醇提取出的物质中水溶性的成分含量多于用高浓度的乙醇,从而导致 65%乙醇提取得率最高,95%乙醇提取得率最低。

从图 1 中的两条折线的变化趋势可明显看出,提取浓度由 85%上升到 95%,提取物抗病毒抑制率和提取物得率两者的变化幅度都最大。因本研究是以抗病毒活性物质的抑制率为主要考察指标,所以,核桃青皮提取时选用乙醇浓度为 95%左右较好。

2.2.2 提取时间的选择

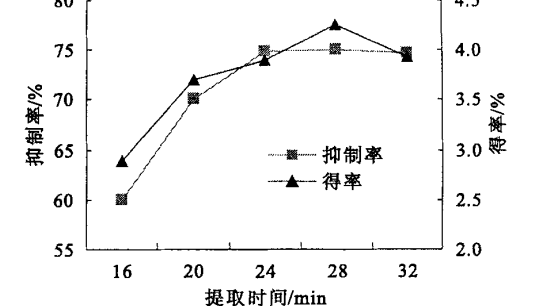


图 2 提取时间对抑制率和得率的影响
Fig.2 Effect of extracting time on the inhibition rate and extraction rate

从图 2 可看出,随着提取时间的增加,提取物抗病毒活性和提取得率都在逐渐增加,在提取 24 h 内,上升趋势明显,随后增加的趋势渐缓,当提取时间在 28 h 左右时,提取得率达到 4.26%,之后又下降,提取物的抗病毒活性从 24 h 到 32 h 基本趋于稳定,抑制率为 75.0%。结合两者考虑后认为,提取时间 28 h 较适宜。

2.2.3 液固比的选择

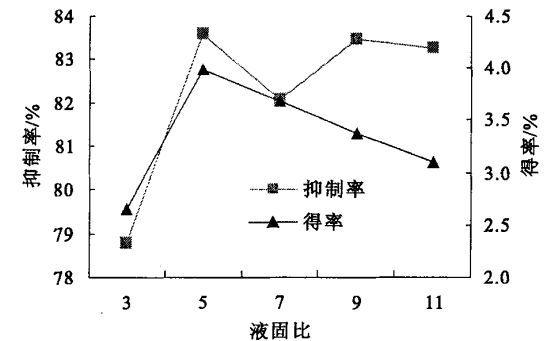


图 3 液固比对抑制率和得率的影响
Fig.3 Effect of liquid-solid ratio on the inhibition rate and extraction rate

由图 3 所知,在液固比为 5 : 1 时,提取物的得率最高,为 3.99%。此时提取物对病毒的抑制效果也最好,抑制率为 83.60%。当液固比大于或者小于 5 : 1 时,提取物的得率和提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制率都下降,故适宜的液固比为 5 : 1 左右。

2.2.4 提取次数的选择

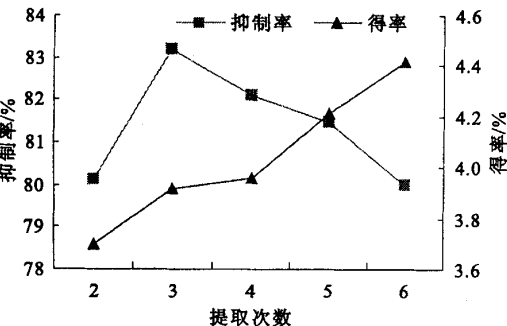


图4 提取次数对抑制率和得率的影响

Fig. 4 Effect of extract times on the inhibition rate and extraction rate

由图4所知,提取次数由2次增加到3次时,提取物对TMV 侵染心叶烟的抑制率为83.21%,增加了3.1%;提取物的得率为3.95%,增加0.25%。之后随提取次数的增加,提取物对TMV 侵染心叶烟的抑制率呈现下降趋势,提取物的得率则是随着提取次数的增加一直呈上升趋势,但增加的幅度不大。综合考虑提取过程的经济性和提取物的抑制效果后认为,适宜的提取次数为3次。

2.3 提取工艺的确定

根据单因素试验结果确定正交试验因素的水平范围,其试验方案及结果分析见表2。

表2 正交试验方案及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号	A 乙醇浓度(%)	B 提取时间/h	C 液固比/mL·g ⁻¹	D 提取次数	得率/%	抑制率/%
1	1(85)	1(26)	1(4)	1(3)	6.19	79.32
2	1	2(28)	2(5)	2(4)	6.27	74.84
3	1	3(30)	3(6)	3(5)	6.41	75.64
4	2(90)	1	2	3	5.81	72.65
5	2	2	3	1	3.63	78.63
6	2	3	1	2	4.50	74.32
7	3(95)	1	3	2	3.60	87.52
8	3	2	1	3	3.62	81.87
9	3	3	2	1	3.12	80.93
K ₁	229.80	239.49	235.51	238.88	K ₁ +K ₂ +K ₃ =705.715	
K ₂	225.60	235.34	228.415	236.68		
K ₃	250.315	230.89	241.79	230.16		
R	24.715	8.605	13.375	8.715		

注:表中得率和抑制率均为3次实验结果的平均值

由表2可看出:各因素对核桃青皮提取物的抗病毒活性影响从高到低依次为A>C>D>B。A和C的差异最大,其它二因素中,D次之,B的影响最小。因此,在实际的生产中需尽量缩短提取时间,减少提取次数,从而减少提取溶液的用量和溶剂回收的工作量,达到加快生产周期,降低生产成本。故选择最佳提取条件为:A₃B₁C₃D₂,即乙醇体积分数为95%、提取时间为26 h、液固比为5:1、提取次数为4次。

3 结论与讨论

由本研究结果得出:核桃青皮中抗TMV 活性物质的提取以95%乙醇溶液冷浸提取较好。从溶剂体积分数、提取时间、液固比和提取次数的单因素试验和正交试验结果综合考察,核桃青皮中抗病毒活性物质提取的优化条件为:95%乙醇冷提4次,每次26 h、液固比为5:1。

植物中含有丰富的天然成分,其中既有小分子的抗病毒物质,也有大分子的抗病毒物质,前人对植物中抗病毒物质的研究大多以大分子的蛋白质为研究对象,本试验的目的是从植物中提取小分子的抗病毒物质,确定其适宜的提取溶剂、方法和提取工艺。由于大多数小分子物质在乙醇中的溶解度较大,而用水为溶剂既可以提取到蛋白质、多糖和核酸等大分子物质,也可以提取到小分子物质,虽然成本较低,但提取物成分较复杂、杂质含量多、浓缩困难,且水提取物易腐败变质;而甲醇、丙酮有毒、价格高、污染严重,不利于活性成分的进一步分离纯化,故试验中尽量少用;乙醇是活性成分提取中最常用的溶剂,其毒性小、价格便宜、浓缩回收方便,因此从经济、安全来看,本试验选择乙醇作为抗病毒活性成分提取的高极性溶剂,而没有选择水和甲醇。

在研究植物的有效成分时,植物材料的提取分离方法往往会影响活性成分的结构,从而影响其活

性。因此筛选合适的提取溶剂、提取方法、提取工艺是筛选植物源抗病毒物质的最基础工作,只有在此基础上进行抗病毒活性物质的大量提取、分离和纯化,才有可能获得高活性的抗病毒物质,并由此创造出环境相容性好的抗病毒制剂。

提取物抑制 TMV 侵染心叶烟的活性不仅表现在枯斑数目的多少上,还表现在枯斑面积的大小上,通用的抑制率计算公式 $\text{抑制率}\% = \frac{[(\text{对照平均每叶枯斑数} - \text{处理平均每叶枯斑数}) / \text{对照平均每叶枯斑数}] \times 100}$,此公式仅以枯斑数量的多少作为计算的依据,而未考虑枯斑面积的大小,这可能会对试验结果的评价造成一定的误差。因此,在今后的研究工作中,考察半叶法接种效果时,提取物的抗病毒活性应以枯斑数量和面积两个指标综合评价更加科学。如何建立科学有效的新方法还有待植物病理工作者深入研究。

参考文献

- [1] 邱德文,李慧英,黄润秋. 中国化工学会农药专业委员会第八届年会论文集[C]. 中国 张家界,1996. 42-50.
- [2] 钱玉梅,王凤龙,王劲波,等. 山东省烟草病毒病种群发生动态及防治对策[J]. 烟草科技,2001,(2):42-15.
- [3] 王凤龙. 烟草病毒病综合防治技术[J]. 烟草科技,2002,(4):43.
- [4] 安德荣,慕小倩,蔡马,等. 植物病毒复制抑制物的提取和其抗性测定[J]. 西北农业学报. 1994,3(1):95-98.
- [5] 安德荣. 植物病毒化学防治的研究现状和所面临的问题[J]. 生命科学. 1994,6(2):15-18.
- [6] 李重九,侯玉霞,王蔚霞,等. 植物病毒选择性治疗药剂的筛选研究[J]. 植物病理学报,1997,27(4):343-348.
- [7] 侯玉霞,李重九,马立新. 中草药中抗病毒植物 TMV 活性物质 PZ1 作用机理研究[J]. 中国农业大学学报,2000,(5):21-24.
- [8] 孙惠,吴祖建,谢联辉,等. 杨树菇(*Agrocybe aegerita*)中一种抑制 TMV 侵染的蛋白质醇化及部分特性[J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33(3):351-354.
- [9] 刘学瑞,肖启明. 植物源农药防治烟草花叶病机理初探[J]. 中国生物防治,1997,13(3):128-131.
- [10] 姚宇澄,杨焰,高军,等. 牛心朴子草抗植物病毒组分的生物活性研究[J]. 内蒙古工业大学学报,2002,21(1):1-4.
- [11] French C J, Elder M, Leggett F, et al. Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus[J]. Can J Plant Pathol,1991,13,(1):1-6.
- [12] Friedrich L, Lawton K, Dincher S, et al. Benzoethiadiazole induces systemic acquired resisistance in tobacco[J]. Plant J, 1996,10:61-70
- [13] 薛伟,宋宝安,逢丽丽,等. 抗病毒植物的研究新进展[J]. 农药,2005,45(5):193~197.
- [14] 翟梅枝. 植物次生物质的抗病活性及构效分析[D]. 福建农林大学博士学位论文,2003.
- [15] 翟梅枝,景炳年,贾彩霞,等. 核桃叶中抗植物病毒活性物质提取条件的研究[J]. 林产化学与工业,2007,27(2):71-75.
- [3] 李虹,刘虹,谢承恩. 茶叶中铜的测定[J]. 广西预防医学,2004,10(1):35-36.
- [4] 张庭廷,李蜀萍. 茶叶中微量铜、铅的连续测定[J]. 中国公共卫生,2001,17(10):948.
- [5] NY 659-2003,茶叶中铬、镉、砷、汞及氟化物限量标准[S].
- [6] 谢黎虹,许梓荣. 重金属镉对动物及人类的毒性研究进展[J]. 浙江农业学报,2003,15(6):376-381.
- [7] Gambe lungh Apiccininir, AmbrogiMetal. Primary DNA damage in chrome-plating workers[J]. Toxicology,2003,188(2-3):187-95.
- [8] Gibb HJ, Lee PS. Pinsky PF. Lung cancermong workers in chromium chemical production[J]. Amjindmed,2000,38(2):115-126.
- [9] 陈宗宏,孙明星,楚民生,等. 微波消解等离子体发射光谱法测定铁矿石中 14 种元素的研究[J]. 化学世界,2006(7):401-406.
- [10] 郑永军,赵斌,尤进茂. 微波消解 ICP-AES 法测定牛黄解毒片中的微量元素[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(6):1155-1157.
- [11] 龚志华,肖文军,蔡利娅,等. 茶叶固相方法研究[J]. 湖南农业大学学报,2006,32(1):45-48.
- [12] 冯绍元,齐志明,黄冠华,等. 重金属在夏玉米作物体中残留特征的田间试验研究[J]. 灌溉排水学报,2003,22(6):10-13.
- [13] 徐加宽,杨连新,王余龙,等. 水稻对重金属元素的吸收与分配机理的研究进展[J]. 植物学通报,2005,22(5):614-622.

(上接第 148 页)