

## 核桃叶中抗植物病毒活性物质提取条件的研究



ZHAI Mei-zhi

翟梅枝, 景炳年, 贾彩霞, 刘朝斌

(西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 以不同溶剂和方法对核桃叶进行了抗植物病毒物质的提取和活性测定。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 g/L 时,对烟草花叶病毒(TMV) 的抑制率最高,为 100%。采用冷浸提取时,核桃叶中抗 TMV 活性物质提取的优化条件是:以体积分数 95% 乙醇为提取溶剂,料液比 1:10(g:mL),提取 18 h,得率 21.42%。质量浓度 5 g/L 的提取物对 TMV 感染心叶烟的抑制率为 100%。该提取物的乙酸乙酯萃取物经多次层析分离和纯化得到黄酮类化合物 A,质量浓度 0.5 g/L 的化合物 A 对 TMV 感染心叶烟的抑制率达 85.55%,说明化合物 A 是乙酸乙酯萃取物中的主要抗病毒活性成分之一。

**关键词:** 核桃;烟草花叶病毒;提取方法

中图分类号:TQ91

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2007)02-0071-05

## Study on Extraction Conditions of Active Antiviral Substance from Walnut Leaves

ZHAI Mei-zhi, JING Bing-nian, JIA Cai-xia, LIU Chao-bin

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Antiviral substances of walnut (*Juglans regia* L.) leaves were extracted by different solvents and methods, and their antiviral activities were determined. The results showed that antiviral activity is dissimilar based on extracts from walnut leaves with different solvent and methods. For cold-leached extract with 95% ethanol, when concentration inoculated is 10 g/L, inhibition rate on tobacco mosaic virus(TMV) of the extract was the best, 100%; optimum extraction condition of this extract is: 95% ethanol as solvent, ratio of material to solvent 1:10, soaking time 18 h, extraction rate 21.42%. The inhibition rate of the extract on TMV infecting *Nicotiana glutinosa* is 100% when concentration inoculated is 5 g/L. Besides, an antiviral flavonoid A was isolated from ethyl acetate extract through column chromatography, thin layer chromatography and recrystallization. When its concentration inoculated is 0.5 g/L, inhibition rate of this compound on TMV infecting *N. glutinosa* is 85.55%. The result indicated that compound A is one of the main antiviral components in ethyl acetate extract.

**Key words:** walnut(*Juglans regia* L.); tobacco mosaic virus; extraction method

从植物中寻找具有农药活性的物质是新农药创制的重要途径。植物病毒病给农业生产造成极大的损失。据统计,全世界每年仅烟草花叶病毒(TMV)造成的损失就达 1 亿美元以上<sup>[1]</sup>。植物是天然药物的宝库,国内外学者对植物中抗病毒活性物质进行了广泛深入的研究<sup>[2-7]</sup>,发现了一些对 TMV 有较好效果的抑制剂。目前,国内外对于植物活性成分的研究主要集中在次生代谢物质上。次生物质种类繁多,且化合物骨架结构、取代基种类也不同,对生物的活性作用就不同。因此,从植物中寻找抑制植物病毒天然活性物质,并将其直接运用到防治,或进一步研究有效成分的分子结构与生物活性的构效关系,通过仿生合成得到既能有效控制植物病毒病,又不会对环境及其他生物造成伤害的植物源抗病毒剂,这方面的研究具有广阔的应用前景。核桃(*Juglans regia* L.)是胡桃属植物中经济价值最高的一种,在我国栽培历史悠久,分布广泛。据报道,核桃叶次生物质对蚜虫、粘虫、杨毒蛾具有较好的触杀和胃毒

收稿日期:2006-01-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571494);中国博士后科学基金资助项目(2004035689);陕西省科技攻关项目(2004K03-G3)

作者简介:翟梅枝(1963-),女,河南西平人,副教授,博士,主要从事林产资源综合利用研究。

效果<sup>[8-10]</sup>,对金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌等具有较好的抑制作用<sup>[11]</sup>,但核桃叶抗植物病毒活性方面未见报道,本研究采用不同溶剂和提取方法对核桃叶中次生物质进行提取,利用活性跟踪手段测定其抗TMV活性,并进行核桃叶中抗病毒活性物质提取条件的优化,研究结果可望为核桃叶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** 核桃叶于2004年9月采自西北农林科技大学核桃采穗圃内,自然晾干后,于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 glutinosa*) 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。供试烟苗均采用直播漂浮育苗技术进行培育,经 50 d 水培后,将幼苗移入直径 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,提纯后备用。

**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、751 型分光光度计、高速离心机、植物粉碎机、恒温水浴锅等;试剂有乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、聚乙二醇、二甲基亚砷等,均为分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 核桃叶中次生物质的提取** 在提取时间 3 h、料液比 1:15 (g:mL,下同)条件下,用 95% (体积分数,下同)乙醇、甲醇和水作溶剂,采取 3 种不同的提取方法,提取核桃叶中的次生物质,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) 索氏提取:称取核桃叶粉样品 20 g,加入折叠好的脱脂滤纸,装入索氏提取器中,用不同溶剂在水浴中加热连续提取一定时间,过滤提取液,滤液减压浓缩得索氏提取物。2) 回流提取:称取核桃叶粉样品 20 g 置于圆底烧瓶中,用不同的溶剂进行回流提取,过滤提取液,滤液减压浓缩得回流提取物。3) 冷浸提取:称取核桃叶粉样品 20 g 置于烧杯中,用不同提取溶剂于室温下浸泡一定时间后过滤,滤液减压浓缩得冷浸提取物。

**1.2.2 核桃叶中抗病毒活性物质提取条件优化** 以乙醇体积分数、提取时间和料液比为因素,设置正交试验,采用冷浸法提取核桃叶中的抗病毒活性物质,根据活性跟踪结果确定适宜的提取条件。

**1.2.3 萃取物、分离物的制备** 以 95% 乙醇冷浸提取的核桃叶粗提取物 (W) 悬浮于水中,依次以石油醚、乙酸乙酯、正丁醇为溶剂萃取分离,分别得到石油醚萃取物 ( $W_1$ )、乙酸乙酯萃取物 ( $W_2$ )、正丁醇萃取物 ( $W_3$ ) 和萃余水相 ( $W_4$ );乙酸乙酯萃取物经聚酰胺柱层析分离得 30%、50%、70% 乙醇洗脱物质分别记为  $W_{2-30}$ 、 $W_{2-50}$ 、 $W_{2-70}$ ,选择活性高的洗脱物质上硅胶柱和 Sephadex LH-20 凝胶柱分离纯化得到化合物 A。

**1.2.4 TMV 病毒的提纯** TMV 经心叶烟纯化后,在普通烟 K326 上繁殖。TMV 的提纯参考 Gooding 等<sup>[12]</sup>的方法,略有修改,其中在第一次加入聚乙二醇 (PEG) 之前采取两次离心的方法,离心速度为 5 000 r/m,每次 30 min,其他步骤不变。

**1.2.5 病毒接种液的配制** 取一定量样品提取液,加入少量二甲基亚砷 (DMSO) 溶解后,加蒸馏水稀释至 1 mL,接种前加入提纯病毒液,使提取液中病毒的最终质量浓度为 20~30 mg/L,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。

**1.2.6 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:

$$\text{抑制率} = (\text{对照平均每叶枯斑数} - \text{处理平均每叶枯斑数}) / \text{对照平均每叶枯斑数} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂和方法对核桃叶提取物抗 TMV 活性的影响

在提取时间(3 h)、料液比(1:15)一定时,用 95 % 乙醇、甲醇和水 3 种溶剂,采取 3 种不同提取方法对核桃叶中抗病毒活性物质进行提取,所得提取物(供试质量浓度 10 g/L)抗 TMV 活性跟踪测定结果见表 1(数据为 3 次的平均值)。

表 1 不同溶剂和方法提取的核桃叶活性物质对 TMV 的抑制效果

Table 1 Inhibiting effects of active substance extracted with different solvents and methods from walnut leaves on TMV infecting *N. glutinosa*

溶剂 solvents	不同提取方法的抑制率/% inhibition rate of extracts from different extraction methods		
	索提 Soxhlet extraction	回流 refluxing	冷浸 cold soaking
水 water	62.42	58.46	64.55
甲醇 methanol	86.04	78.58	88.96
95 % EtOH	93.25	86.68	100.00

由表 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,95 % 乙醇提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果最好。水提取物的抑制率最低仅为 30 % 左右,比 95 % 乙醇提取物的抑制率低 30 % 左右。这种差异可能是由于溶剂不同提取物中活性物质的种类和含量不同所致。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;以水为溶剂,虽然成本较低,但提取物中其他杂质含量较多,且水提取物浓缩困难、易腐败变质。甲醇提取物的 TWV 抑制率与乙醇提取物的相仿,但甲醇有毒、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叶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最好,其次为索提提取物,回流提取物对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果最差。95 % 乙醇为溶剂提取时,不同提取方法所得提取物(供试质量浓度 10 g/L)对 TMV 侵染心叶烟的抑制效果依次是:冷浸提取物(100 %) > 索提提取物(93.25 %) > 回流提取物(86.68 %)。推测是由于不同提取方法所获得的活性物质种类和数量有所不同,回流提取时,样品和溶剂一直处于较高温度下,虽然提取物的得率较其它方法高些,但一些热不稳定的活性物质因长期受热发生性质变化。因此,在同一溶剂的相同浓度下,回流提取物的抗病毒活性最差,冷浸提取物的抗病毒效果最好,索提获得的提取物其抗病毒效果居中。从提取物的抗 TMV 活性考虑,核桃叶中抗 TMV 活性物质的提取以 95 % 乙醇溶液冷浸提取较好。

### 2.2 核桃叶中抗 TMV 活性物质提取条件的优化

表 2 正交试验设计方案及结果分析

Table 2 Orthogonal test design and analyses

试验号 No.	A 乙醇体积分数/% EtOH volume fraction	B 时间/h time	C 料液比(g:mL) material: liquid	得率/% yield	抑制率/% inhibition rate
1	75	6	1:7.5	7.86	89.12
2	75	12	1:10	9.02	92.36
3	75	18	1:12.5	12.26	98.02
4	95	6	1:12.5	16.75	98.57
5	95	12	1:7.5	10.68	99.99
6	95	18	1:10	21.42	100.00
7	100	6	1:10	11.36	92.56
8	100	12	1:12.5	15.86	88.36
9	100	18	1:7.5	10.96	86.92
$k_1$	93.17	93.42	96.37		
$k_2$	99.52	93.57	94.97		
$k_3$	89.28	94.98	94.98		
R	10.24	1.56	1.40		

由正交试验结果(见表2,数据为3次的平均值)的直观分析可以看出:1)供试质量浓度10 g/L时,3个试验因素对活性物质抗TMV抑制率的影响顺序依次为:A>B>C。即乙醇体积分数为影响提取物抗TMV活性的主要因素。所以,进行核桃叶中活性物质的提取时,必须将乙醇体积分数控制在最优水平上,对于次要因素则可在一定范围内选取适当的水平。2)核桃叶中活性物质提取的适宜条件为 $A_2B_3C_2$ 和 $A_2B_2C_1$ ,这两种组合所得的提取物(供试质量浓度10 g/L)对TMV的抑制率分别为100%和99.99%。但两者的提取物得率因料液比、提取时间不同差异较大, $A_2B_3C_2$ 组合提取18 h,得率为21.42%; $A_2B_2C_1$ 组合因料液比小于 $A_2B_3C_2$ 组合,且提取时间较短(12 h),得率仅为10.68%,前者的提取得率为后者的2.01倍。综合考虑提取时间、料液比和提取物得率等因素对活性成分的影响,选择 $A_2B_3C_2$ 作为核桃叶中抗TMV活性物质提取条件的最优组合。即以95%乙醇为提取溶剂,料液比1:10,冷浸18 h,所得活性物质对TMV抑制作用最强,且提取物得率较高。

### 2.3 核桃叶提取物对TMV的抑制效果

核桃叶的95%乙醇冷浸提取物具有成分复杂,所含物质种类多的特点,以不同溶剂(极性依次由小到大:石油醚、乙酸乙酯和正丁醇)进行萃取分离将其分为4个极性不同的部分,并对其中抗TMV感染心叶烟活性最高的乙酸乙酯萃取物进一步跟踪分离。核桃叶提取物、各萃取物和分离物对TMV感染心叶烟的抑制效果见表3。

表3 核桃叶提取物对TMV感染心叶烟的抑制效果

Table 3 Inhibiting effects of different extracts from walnut leaves on TMV infecting *N. glutinosa*

提取物 <sup>1)</sup> extracts	质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> ) mass concentration	接种叶片数/片 no. of inoculation leaf/piece	左/右半叶平均枯斑数/个 left/right average necrosis/No.	抑制率/% inhibition rate
W	5	12	85/0	100.00
W <sub>1</sub>	1	12	72/35	51.39
W <sub>2</sub>	1	12	84/11	86.91
W <sub>3</sub>	1	12	76/28	63.16
W <sub>4</sub>	1	12	85/46	42.59
W <sub>2-30</sub>	0.5	12	76/21	72.37
W <sub>2-50</sub>	0.5	12	80/31	61.25
W <sub>2-70</sub>	0.5	12	72/29	59.72
化合物 A compound A	0.5	12	90/12	85.55

1)表中代号见1.2.3节 symbols in the Table see in part 1.2.3

由表3可看出,在供试质量浓度为5 g/L时,W对TMV感染心叶烟的抑制率仍为100%。在冷浸提取物的各萃取物、分离物中,W<sub>2</sub>和化合物A对TMV感染心叶烟的抑制率都在85%以上,分别为86.91%和85.55%;各萃取物在供试质量浓度为1 g/L时,对TMV感染心叶烟的抑制率大小依次为:W<sub>2</sub>(86.91%)>W<sub>3</sub>(63.16%)>W<sub>1</sub>(51.39%)>W<sub>4</sub>(42.59%)。活性最高的乙酸乙酯萃取物经多次聚酰胺柱层析分离得到的3个不同洗脱流分中,W<sub>2-30</sub>对TMV感染心叶烟的抑制率最高,为72.37%。该洗脱物经Sephadex LH-20柱纯化得到化合物A,定性检测显示:化合物A具有黄酮类物质的典型反应。活性检测表明,在供试质量浓度为0.5 g/L时,化合物A对TMV感染心叶烟具有较好的抑制效果,抑制率达85.55%,高于W<sub>2-30</sub>对TMV感染心叶烟的抑制率,与W<sub>2</sub>的抑制率接近。说明化合物A是乙酸乙酯萃取物中的主要抗病毒活性成分之一。

## 3 结论

3.1 同一植物材料因提取溶剂、提取方法不同,所得活性物质对TMV感染心叶烟的抑制效果不同。核桃叶中抗TMV活性物质的提取以95%乙醇溶液冷浸提取较好。

3.2 核桃叶的95%乙醇冷浸提取物经萃取分离和活性跟踪显示,各萃取物中对TMV感染心叶烟的抑制作用大小依次为:乙酸乙酯萃取物>正丁醇萃取物>石油醚萃取物>萃余水相;乙酸乙酯萃取物经柱层析分离、纯化和重结晶得到化合物A,A物质对TMV感染心叶烟具有较好的抑制效果,质量浓度

0.5 g/L 的 A 对 TMV 抑制率达 85.55 %。

**3.3 采用冷浸提取时,核桃叶中抗 TMV 活性成分提取的优化条件是:95 % 乙醇为提取溶剂,料液比 1:10(g:mL),提取 18 h,得率为 21.42 %。质量浓度 5 g/L 的活性物质对 TMV 的抑制率为 100 %。**

#### 参考文献:

- [1] 吴云峰. 生物病毒农药筛选及应用[J]. 世界农业, 1995(5): 35-36.
- [2] 陈启建, 刘国坤, 吴祖建, 等. 三叶鬼针草中黄酮甙对烟草花叶病毒的抑制作用[J]. 福建农林大学学报, 2003, 32(2): 181-184.
- [3] 侯玉霞, 李重九, 马立新. 中草药中抗植物病毒 TMV 活性物质 PZI 作用机理研究[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(1): 21-24.
- [4] 孙慧, 赵辰光, 仝鑫, 等. 杨树菇凝集素 AAVP 具有抗病毒和促进菌丝分化功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(2): 210-214.
- [5] 刘国坤, 谢联辉, 林奇英, 等. 15 种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 279-283.
- [6] 付鸣佳, 林健清, 吴祖建, 等. 杏鲍菇抗烟草花叶病毒病毒蛋白的筛选[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 29-34.
- [7] NARWAL S, BALASUBRAHMANYAM A, LODHA M L, et al. Purification and properties of antiviral proteins from the leaves of *Bougainvillea xbutiana*[J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2001, 38(5): 342-347.
- [8] 翟梅枝, 张凤云, 刘朝斌, 等. 核桃叶中植物农药的拒食活性研究[J]. 西北林学院学报, 2005, 20(2): 138-140.
- [9] 翟梅枝, 杨秀萍, 刘路. 核桃叶提取物对蚜虫的触杀作用[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(4): 55-56.
- [10] 翟梅枝, 杨秀萍, 林奇英, 等. 核桃叶提取物对杨毒蛾生物活性的研究[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(2): 65-67.
- [11] 翟梅枝, 李晓明, 林奇英, 等. 核桃叶抑菌成分的提取及其抑菌活性[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(4): 89-91.
- [12] GOODING G V, HEBERT T A. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. *Phytopathology*, 1967, 57: 1285-1289.

## 下 期 要 目

双歧杆菌在低聚木糖基质中的增殖和代谢过程

羧甲基落叶松单宁的合成及抑菌性能研究

角毛壳菌降解粗纤维基因的筛选

樟脑标准样品的制备和定值研究

工业填料塔真空精馏分离松轻油

基因重组酵母发酵木糖产酒精的研究

生物质热解气化行为的研究

利用银杏叶制备酵母饲料添加剂的优良菌筛选及其培养条件

冷态鼓泡流化床中木屑流化速度的研究

低聚木糖溶液冷冻浓缩时冰晶生长动力学研究

氯化萘烯马来酸酐合成环氧树脂的研究

均匀设计法优化桦木醇的超临界二氧化碳萃取工艺

不同活化方法对微晶纤维素结构和氧化反应性能的影响

低取代度季铵型半纤维素合成及其结构的研究

分子蒸馏纯化八角精油的工艺研究

二步炭化法制备高活性木炭

黑荆树树皮原花青素生理活性的研究(英文)

漆酚基乳化剂 UE8 的制备及性能研究

以糠醇为碳源液相浸渍法制备有序中孔炭分子筛

二氧化硅凝胶葡萄糖传感器上羧甲基纤维素酶活性测定

木质素磺酸盐在 UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下的降解

从椴子皮中提取果胶的研究

微波辅助萃取-固相萃取联用技术分析桑叶挥发性成分

麦秸秆外表面膜及异氰酸酯对麦秸与 LDPE 界面结合的影响

蔗渣液化产物改性环氧树脂的制备和性能研究

雀梅藤果实色素的提取及理化性质研究

乌饭树树叶中黄酮类物质的分离、纯化及结构鉴定