

铺地竹叶中除草活性物质的提取工艺研究

陈涛¹, 汤锋^{2*}, 房立翠¹, 唐俊¹

(1. 安徽省农产品安全重点实验室, 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036;
2. 国际竹藤网络中心, 北京 100102)

摘要: 采用正交试验设计, 研究了提取溶剂、料液比、提取温度和提取次数等因素对铺地竹叶中除草活性成分提取的影响, 并通过生物测定评价了提取物对杂草抑制效果。结果表明, 提取溶剂为 50%乙醇, 料液比为 1:7, 提取温度为 60℃, 提取次数为 3 次时, 提取率最高, 达 14.50%; 以 75%乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:6, 提取温度为 80℃, 提取 3 次时, 所得提取物在 0.4 g·L⁻¹ 浓度时对结球生菜根和匍匐剪股颖根的抑制效果均达到最高水平, 抑制率分别为 67.83%和 36.82%。

关键词: 铺地竹; 竹叶提取物; 除草活性; 提取工艺

中图分类号: S795.08; S482.49

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2011)01-0081-06

Optimized extraction of herbicidal active substance from *Sasa argenteostriatus* leaves

CHEN Tao¹, TANG Feng², FANG Li-cui¹, TANG Jun¹

(1. Key Laboratory of Anhui Agri-food Safety, School of Resource and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. International Centre for Bamboo & Rattan, Beijing 100102)

Abstract: The effects of different factors (extraction solvent, liquid ratio, extraction temperature, extraction times) on the herbicidal active ingredient extraction of *S. argenteostriatus* were studied through orthogonal experiment, and the inhibitory effects of extracts on weeds were appraised by the biological testing. The results indicated that the extraction percentage was highest, up to 14.50% in the condition of using 50% ethanol as extraction solvent with 1:7 solid/liquid ratio, and extraction for three times at 60℃, when taken 75% ethanol as extraction solvent with 1:6 liquid ratio, and extraction three times at 80℃, the inhibition of the bamboo leaves extracts at a concentration of 0.4 g·L⁻¹ to the root of *Lactuca sativa* L. and *Agrostis stolonifera* var. *penncross* were up to the highest levels, 67.83% and 36.82%, respectively.

Key words: *S. argenteostriatus*; bamboo leaves extracts; herbicidal activity; extraction procedure

铺地竹(*Sasa argenteostriatus*)属禾本科竹亚科赤竹属植物, 是一种地被丛生竹, 其地下鞭发达, 植丛低矮, 生长迅速, 繁殖容易, 维护简单, 耐修剪, 每年可收割 2~3 次。该竹种主要分布于浙江、江苏一带, 现已引种至山东和北京等地^[1-2]。由于铺地竹秆形矮小, 竹材、竹笋利用价值低, 一直以来仅作为种质资源加以保存, 没有得到开发利用^[3]。近年来, 刘翠等研究发现, 铺地竹叶对结球生菜、

小青菜、凹头苋的根和茎有较好的抑制作用^[4]。汤锋等研究表明, 铺地竹叶对狗牙根、早熟禾、红三叶等植物的种子萌发与幼苗生长具有极强的抑制作用, 认为以铺地竹竹叶为原料开发植物源除草剂, 具有较强的应用潜力^[5]。

本试验以铺地竹叶为研究对象, 采用正交设计方法, 研究了不同提取溶剂、料液比、提取温度及提取次数等因素对竹叶中除草活性物质的提取及其

收稿日期: 2010-06-18

基金项目: 国家自然科学基金(30871961)资助。

作者简介: 陈涛, 男, 硕士研究生。

* 通讯作者: 汤锋, 男, 博士, 教授。E-mail: fengtang@icbr.ac.cn

生物活性的影响, 以期开发以铺地竹竹叶为原料的植物源除草剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

结球生菜 *Lactuca sativa* L., 市售; 匍匐翦股颖 *Agrostis stolonifera* var. *pennecross*, 北京禾木青科技有限公司。

1.2 铺地竹样品的采集

铺地竹 *S. argenteastriatus* 竹叶样品于2008年10月采自安徽省广德县林场竹种园。将采集的样品, 用水洗净, 自然条件下于室内通风干燥, 用电动粉碎机加工成粉末, 置于4℃冰箱备用。

1.3 竹叶提取物的制备

以提取溶剂、料液比、提取温度和提取次数为因素, 每个因素选择4个水平设计正交试验, 如表1。

表1 提取工艺正交设计的因素水平
Table 1 Factors with 4 coded settings

因素 Factor	提取溶剂 Extraction solvent A	料液比 Liquid ratio B	提取温度/℃ Extraction temperature C	提取次数 Extraction times D
水平1 Level 1	水 Water	1:5	20	1
水平2 Level 2	50%乙醇 Ethanol	1:6	40	2
水平3 Level 3	75%乙醇 Ethanol	1:7	60	3
水平4 Level 4	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:8	80	4

准确称取铺地竹竹叶样品20g, 置于250mL具塞三角瓶中, 按表1设计的料液比加入提取溶剂, 分别在设计的提取温度下, 于水浴中振荡提取6h, 再盖紧瓶塞放置于暗处浸提至24h, 浸提完成后, 倾出提取液, 再加入同量提取溶剂, 按上述方法重复提取。

提取完成后, 抽滤, 合并提取液, 置于旋转蒸发仪内浓缩至膏状, 称重并计算提取率。然后用50%丙酮水溶液定容至10mL(即1mL提取物溶液相当于2g竹叶样品), 作为样品贮备液, 置于4℃冰箱保存备用。

1.4 生物测定

1.4.1 种子表面消毒 将供试植物种子浸入0.2%次氯酸钠溶液中消毒30min, 用自来水冲洗, 再用蒸馏水洗涤5~6次。然后用蒸馏水浸泡2h, 备用。

1.4.2 样品溶液的配制 取1mL样品贮备液于10mL容量瓶中, 用50%丙酮水溶液定容至10mL, 备用。

1.4.3 含药培养平板的制备 取9cm的培养皿, 每个培养皿中放一张滤纸, 用移液管移取1mL配制后的样品溶液均匀滴于滤纸上, 自然风干后, 取出滤纸, 在每个培养皿中加10mL 0.5%琼脂培养基, 待培养基凝固后将含药滤纸放在上面, 每处理重复3次。

1.4.4 供试植物培养 用镊子将消毒后的种子移到培养皿平板上, 每皿30粒。用保鲜袋密封培养皿, 结球生菜处理置于28℃培养箱中于遮光条件下培养4d, 取出, 再置于相同温度下光照培养箱中

培养1d, 光暗比为14:10。匍匐翦股颖处理直接在光照培养箱中培养10d, 光暗比为16:8, 黑暗时温度设为20℃, 光照时温度设为30℃。

1.4.5 结果检查 培养结束后, 从每个培养皿中选择10株长势最好的植株, 分别测量根和茎的长度, 计算抑制率。

1.5 结果计算

提取率=(提取物干重/原竹叶干重)×100%

抑制率=(对照组长度—处理组长度)/对照组长度×100%

2 结果与分析

2.1 提取率结果

通过正交设计对铺地竹竹叶中除草活性成分的提取方案进行优化, 由表2可以看出, 不同提取因素组合, 其提取率存在显著差异($P<0.05$), 提取溶剂对提取率有极显著影响($P<0.01$), 提取温度、提取次数对提取率有显著影响($P<0.05$), 影响的主次顺序为: 提取溶剂>提取次数>提取温度>料液比。

提取溶剂是制约提取率的主要因素, 分别用纯水和无水乙醇单独提取时, 其提取效果没有两者混合理想, 且纯水的提取率要优于无水乙醇, 这是因为竹叶中含有多种水溶性物质^[5], 根据相似相溶原理, 极性较强的溶剂有较高的提取率, 含水乙醇的提取率高于纯水的提取率, 可能是因为竹叶中弱极性物质含量较多。温度对提取率的影响是因为, 温度升高有利于竹叶中的内含物向提取溶剂中扩散。

通过极差分析, 可得最佳提取率的因素组合为

$A_2B_4C_3D_3$, 即采用 50% 乙醇溶液为提取溶剂, 料液比为 1:8, 于 60℃ 提取 6 h, 然后置于室温下浸提至 24 h, 重复提取 3 次。

表 2 正交试验提取结果

Table 2 Orthogonal experiment result of extraction

序号 No.	提取溶剂(A) Extraction solvent	料液比(B) Liquid ratio	提取温度(C)/℃ Extraction temperature	提取次数(D) Extraction times	提取率/% Extraction rate
1	水 Water	1:5	20	1	4.70 ^e
2	水 Water	1:6	40	2	8.00 ^{cd}
3	水 Water	1:7	60	3	12.70 ^{ab}
4	水 Water	1:8	80	4	11.90 ^{ab}
5	50%乙醇 Ethanol	1:5	40	3	12.35 ^{ab}
6	50%乙醇 Ethanol	1:6	20	4	12.05 ^{ab}
7	50%乙醇 Ethanol	1:7	80	1	9.90 ^{bc}
8	50%乙醇 Ethanol	1:8	60	2	14.45 ^a
9	75%乙醇 Ethanol	1:5	60	4	12.85 ^a
10	75%乙醇 Ethanol	1:6	80	3	12.45 ^{ab}
11	75%乙醇 Ethanol	1:7	20	2	9.45 ^{bc}
12	75%乙醇 Ethanol	1:8	40	1	8.95 ^c
13	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:5	80	2	5.10 ^{de}
14	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:6	60	1	3.80 ^e
15	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:7	40	4	4.00 ^e
16	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:8	20	3	4.60 ^e
	k_1	9.325 ^b	8.750 ^a	7.700 ^c	6.838 ^b
提取率 Extraction rate	k_2	12.188 ^a	9.075 ^a	8.325 ^{bc}	9.250 ^a
	k_3	10.925 ^a	9.012 ^a	10.950 ^a	10.525 ^a
	k_4	4.375 ^c	9.975 ^a	9.838 ^{ab}	10.200 ^a
极差 R		7.813 ^{**}	1.225	3.250 [*]	3.687 [*]

注: 同列数据后字母不同表示 5% 水平差异显著, 在极差值后标有“***”, 表示该因素在 1% 水平差异显著, 极差值后标有“**”, 表示该因素在 5% 水平差异显著。下同。

Note: The data in the same column followed with different letters mean significant difference at 0.05 level. The data of range(R) followed with “***” mean significant difference at 0.01 level, and those followed with “**” mean significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2 对结球生菜幼苗生长的抑制

由于结球生菜发芽率高, 生长周期短, 可以为筛选工作减少劳动时间, 提高工作效率, 是除草剂生物测定试验中的理想选择。从表 3 可以看出, 铺地竹叶提取物对结球生菜根有较好的抑制作用, 而对结球生菜茎的作用方面, 只有以无水乙醇为提取溶剂时, 对结球生菜茎表现为抑制作用, 其他均显示为促进茎的生长。

方差分析结果表明, 提取溶剂对结球生菜根的抑制率的影响达到极显著水平 ($P < 0.01$), 提取次数对结球生菜根的抑制率的影响达到显著水平 ($P < 0.05$)。对根的影响的主次为: 提取溶剂 > 提取次数 > 提取温度 > 料液比。

极差分析表明, 获得对结球生菜根抑制的最佳

生物活性的提取工艺因素组合为 $A_3B_3C_3D_2$, 即采用 75% 乙醇溶液为提取溶剂, 料液比为 1:7, 于 60℃ 提取 6 h, 然后置于室温下浸提至 24 h。重复提取 2 次。

2.3 对匍匐翦股颖幼苗生长的抑制

匍匐翦股颖是国外广泛采用的除草剂生物测定靶标植物。从表 4 可以看出, 铺地竹叶提取物对匍匐翦股颖的根和茎均有抑制作用, 且对根的抑制作用比对茎的抑制作用强。

方差分析结果表明, 提取溶剂和料液比对根抑制率的影响达到了极显著水平 ($P < 0.01$), 提取温度对根抑制率的影响达到显著水平 ($P < 0.05$), 对根影响因素的主次为: 提取溶剂 > 料液比 > 提取温度 > 提取次数。提取溶剂对茎抑制率的影响达到极显著水

平 ($P<0.01$), 料液比和提取次数对茎抑制率影响到显著水平 ($P<0.05$), 对茎影响因素的主次为: 提取溶剂>提取次数>料液比>提取温度。

极差分析表明, 获得对匍匐翦股颖根抑制的最佳生物活性的提取工艺因素组合为 $A_4B_4C_3D_4$, 即采用无水乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:8, 于 60℃提

取 6 h, 然后置于室温下浸提至 24 h。重复提取 4 次; 对匍匐翦股颖茎抑制的最佳生物活性的提取工艺因素组合为 $A_2B_4C_2D_4$, 即采用 50%乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:8, 于 40℃提取 6 h, 然后置于室温下浸提至 24 h。重复提取 4 次。

表 3 铺地竹叶提取物对结球生菜幼苗生长的影响
Table 3 Effects of extracts from *S. argenteastratus* against *Lactuca sativa* L. seedling

序号	提取溶剂(A) Extraction solvent	料液比(B) Liquid ratio	提取温度(C)/℃ Extraction temperature	提取次数(D) Extraction times	根抑制率/% Inhibition rate to roots	茎抑制率/% Inhibition rate to stems
1	水 Water	1:5	20	1	33.68±4.35 ^g	-49.13±3.19 ^g
2	水 Water	1:6	40	2	44.16±1.01 ^{fg}	-53.29±5.88 ^g
3	水 Water	1:7	60	3	36.40±3.06 ^{fg}	-52.71±23.01 ^g
4	水 Water	1:8	80	4	39.25±2.02 ^{fg}	-52.06±12.44 ^g
5	50%乙醇 Ethanol	1:5	40	3	54.59±4.60 ^{cd}	-56.27±10.28 ^g
6	50%乙醇 Ethanol	1:6	20	4	51.26±5.89 ^{de}	-54.64±16.07 ^g
7	50%乙醇 Ethanol	1:7	80	1	58.64±3.03 ^{bc}	-48.52±10.32 ^g
8	50%乙醇 Ethanol	1:8	60	2	51.72±4.15 ^{cd}	-25.68±10.39 ^f
9	75%乙醇 Ethanol	1:5	60	4	59.76±3.39 ^{ab}	-11.00±2.30 ^e
10	75%乙醇 Ethanol	1:6	80	3	52.52±12.29 ^{cd}	5.01±10.20 ^{cd}
11	75%乙醇 Ethanol	1:7	20	2	63.23±3.10 ^a	-12.37±2.20 ^{ef}
12	75%乙醇 Ethanol	1:8	40	1	46.87±4.04 ^{ef}	2.00±4.04 ^{de}
13	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:5	80	2	41.36±2.75 ^{fg}	24.58±5.46 ^a
14	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:6	60	1	45.11±1.18 ^{fg}	19.59±10.26 ^{ab}
15	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:7	40	4	44.30±1.46 ^{fg}	21.43±5.10 ^{ab}
16	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1:8	20	3	50.43±1.57 ^{de}	11.96±9.95 ^{bc}
根抑制率 Inhibition rate to roots						
k_1	38.973 ^c	47.658 ^a	48.992 ^a	45.965 ^b		
k_2	53.613 ^{ab}	47.692 ^a	48.002 ^a	49.973 ^a		
k_3	56.100 ^a	49.535 ^a	49.657 ^a	48.547 ^{ab}		
k_4	45.105 ^{bc}	48.905 ^a	47.138 ^a	49.305 ^a		
极差 R	17.127 ^{**}	1.877	2.519	4.008 [*]		
茎抑制率 Inhibition rate to stems						
k_1	-49.317 ^c	-22.130 ^a	-25.742 ^b	-18.012 ^a		
k_2	-45.798 ^c	-20.098 ^a	-20.545 ^{ab}	-16.123 ^a		
k_3	-4.230 ^b	-21.887 ^a	-16.837 ^a	-22.130 ^a		
k_4	19.715 ^a	-15.515 ^a	-16.505 ^a	-23.365 ^a		
极差 R	69.032 ^{**}	6.615	9.237 [*]	7.242		

注: 表中数据抑制率所在列为平均抑制率(%)±SE, $n=3$ 。Note: The inhibition rates in the table are average values±SE.

2.4 优化参数提取结果

为了检验正交设计试验结果, 根据筛选得到的优化提取工艺, 分别按原实验方法进行验证, 结果见表 5, 优化所得结果 $A_3B_2C_4D_3$, 即采用 75%乙醇为提取溶剂, 料液比为 1:6, 于 80℃提取 6 h, 室温

静置至 24 h, 重复提取 3 次。在此组合下提取率为 9.9%, 当浓度 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对结球生菜根的抑制率为 67.83%, 对匍匐翦股颖根的抑制率为 36.82%, 均达到较高水平, 符合正交试验优选结果。

表 4 铺地竹叶提取物对匍匐剪股颖幼苗生长的影响

Table 4 Effects of extracts from *S. argenteastriatus* against *Agrostis stolonifera* var. *penncross* seedling

序号 No.	提取溶剂(A) Extraction solvent	料液比(B) Solid/liquid ratio	提取温度/℃ Extraction Temperature	提取次数(D) Extraction times	根抑制率/% Inhibition rate to roots	茎抑制率/% Inhibition rate to stems
1	水 Water	1 : 5	20	1	-22.73±11.02 ^f	4.22±3.35 ^{de}
2	水 Water	1 : 6	40	2	-3.45±10.89 ^{ef}	9.47±2.2 ^{de}
3	水 Water	1 : 7	60	3	-7.05±6.14 ^{ef}	6.71±0.37 ^{de}
4	水 Water	1 : 8	80	4	22.58±4.39 ^{bc}	18.58±4.34 ^a
5	50%乙醇 Ethanol	1 : 5	40	3	6.27±6.40 ^{de}	16.11±1.35 ^{ab}
6	50%乙醇 Ethanol	1 : 6	20	4	18.73±4.26 ^{cd}	14.16±2.8 ^{bc}
7	50%乙醇 Ethanol	1 : 7	80	1	16.38±9.78 ^{cd}	9.95±3.11 ^{de}
8	50%乙醇 Ethanol	1 : 8	60	2	30.68±5.90 ^{ab}	13.13±3.08 ^{cd}
9	75%乙醇 Ethanol	1 : 5	60	4	15.33±7.37 ^{de}	8.94±3.33 ^{de}
10	75%乙醇 Ethanol	1 : 6	80	3	16.28±11.05 ^{cd}	2.72±0.68 ^e
11	75%乙醇 Ethanol	1 : 7	20	2	4.93±10.36 ^{de}	5.52±1.47 ^{de}
12	75%乙醇 Ethanol	1 : 8	40	1	24.62±5.15 ^{bc}	9.37±4.43 ^{de}
13	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1 : 5	80	2	20.10±12.18 ^{bc}	7.64±1.02 ^{de}
14	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1 : 6	60	1	36.70±3.94 ^a	6.24±4.33 ^{de}
15	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1 : 7	40	4	11.43±0.99 ^{de}	12.30±4.65 ^{cd}
16	无水乙醇 Anhydrous ethanol	1 : 8	20	3	25.54±7.91 ^{bc}	10.54±4.38 ^{de}
根抑制率 Inhibition rate to roots						
k_1	-1.467c	6.362 ^c	8.063 ^b	15.235 ^a		
k_2	19.290a	18.20 ^{ab}	10.705 ^{ab}	14.282 ^a		
k_3	16.540a	7.280 ^{bc}	20.005 ^a	11.157 ^a		
k_4	23.905b	26.425 ^a	19.495 ^a	17.593 ^a		
极差 R	25.372 ^{**}	20.06 ^{**}	11.942 [*]	6.436		
茎抑制率 Inhibition rate to stems						
k_1	9.598ab	9.398 ^{ab}	8.735 ^a	7.857 ^b		
k_2	13.342a	8.272 ^b	12.190 ^a	9.053 ^{ab}		
k_3	6.897b	8.825 ^{ab}	9.033 ^a	9.260 ^{ab}		
k_4	9.588ab	12.930 ^a	9.467 ^a	13.255 ^a		
极差 R	6.445 ^{**}	4.658 [*]	3.455	5.398 [*]		

表 5 验证试验结果

Table 5 Test of experiment

组合 Combination	结球生菜根/% <i>Lactuca sativa</i> L.	匍匐剪股颖根/% <i>Agrostis stolonifera</i> var. <i>penncross</i>	提取率/% Extraction rate
A ₂ B ₄ C ₃ D ₃	50.34	27.49	14.5
A ₃ B ₃ C ₃ D ₂	64.38	34.26	13.7
A ₄ B ₄ C ₃ D ₄	56.78	35.56	5.9
A ₃ B ₂ C ₄ D ₃	67.83	36.82	9.9

3 小结与讨论

提取溶剂对铺地竹叶的提取率及对结球生菜根和对匍匐剪股颖根、茎的抑制率均有极显著影响 ($P < 0.01$)。提取溶剂对两种植物根的抑制方面存在

差异, 对结球生菜抑制效果最好的提取溶剂为 75% 乙醇, 而对匍匐剪股颖抑制效果最好的提取溶剂为无水乙醇。含水乙醇对铺地竹叶提取率比使用无水乙醇提取效果好, 但是提取溶剂中水的比例含量过高, 导致提取后溶液很难浓缩, 综合考虑 75% 乙醇

为提取溶剂是最理想的选择。

提取温度和提取次数对竹叶的提取率均有显著影响($P < 0.05$)。随着温度的上升,提取率和抑制率都有所提高,所以提取温度选择 80°C 。提取次数对提取率和抑制率也有显著影响,但提取3次和提取4次没有显著差异,从成本考虑,选择3次比较理想。料液比只对匍匐翦股颖的抑制效果有影响,对提取率和结球生菜抑制率没显著差异,综合考虑料液比为1:6。

提取物对结球生菜根的抑制效果明显强于对匍匐翦股颖根的抑制效果,其原因可能是,结球生菜为双子叶植物,而匍匐翦股颖为单子叶植物,因此,方案所得提取物有利于开发双子叶杂草除草

剂,具体原因还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王波,丁雨龙,汪奎宏,等.铺地竹竹鞭生长规律的调查研究[J].林业科技开发,2007,21(6):16-18.
- [2] 张玲,曹帮华,高健,等.5种地被竹光合日变化特性研究[J].山东科学,2009,22(2):22-26;33.
- [3] 王波,丁雨龙,汪奎宏,等.铺地竹叶饲用价值的评定[J].林业科技开发,2008,22(3):58-60.
- [4] 刘翠,陈涛,汤锋,等.竹叶对三种植物幼苗生长的影响研究[J].竹子研究汇刊,2009,28(2):12-18.
- [5] 汤锋.竹叶提取物抗菌活性及竹叶化感作用研究[R].北京:中国林业科学院博士后研究报告.2009.

本刊顾问 陈宗懋院士

陈宗懋(1933-),茶学专家。出生于上海市,原籍浙江省海盐县人。1954年毕业于沈阳农学院植保系。曾任中国农业科学院茶叶研究所所长、中国茶叶学会理事长。现任中国农业科学院茶叶研究所研究员、博导、中国茶叶学会名誉理事长和国际茶叶协会副主席。

20世纪60年代陈宗懋院士开创茶叶农残研究,提出各类农药在茶树上降解规律和预测模型、18项国标和5项部标。首次探明空气漂移是茶叶农残徘徊不降的原因,研究居国际前沿水平。其实验室被欧盟确认为中国茶出口唯一认可检验机构。近年对降低我国茶叶农残有突出贡献,3年全国超标率由80%降至20%。90年代开拓昆虫化学生态学新领域,从茶树-害虫-天敌化学通讯机制着手,明确害虫和天敌定位的化学生态机制,具创新性。论文在《J Chem Ecol》,《J Agricul Food Chem》等重要刊物上发表。培养多名博士生和管理人才,对我国茶业起到推动作用。

2003年当选为中国工程院院士。