

苍耳子中抗寒物质的提取工艺研究

熊海蓉¹, 饶桢楠², 史万杰¹, 熊远福¹, 黄敏^{3*}

(1. 湖南农业大学化学与材料科学学院, 湖南长沙 410128; 2. 扬州大学农学院, 江苏扬州 225000; 3. 湖南农业大学农学院, 湖南长沙 410128)

摘要 [目的]获得苍耳子中抗寒物质的最佳提取工艺条件。[方法]以苍耳子为原料、水稻为试验对象,研究提取剂的筛选,探讨料液比、提取温度、提取时间、提取次数等因素对苍耳子中抗寒物质提取的影响,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取条件。[结果]苍耳子中抗寒物质的最佳提取工艺条件为提取剂50%乙醇、料液比1:9(g:mL)、提取温度80℃、提取时间40 min、提取3次;粉体抗寒物质的产率为10.0%。[结论]该提取工艺简便、成本较低,获得的抗寒物质能显著提高秧苗游离脯氨酸含量。

关键词 苍耳子; 抗寒物质; 提取工艺; 抗寒性; 水稻

中图分类号 Q945.78;S-3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)24-0171-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.24.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Extraction Technology of Cold-resistant Substances in Fructus xanthiiXIONG Hai-rong¹, RAO Ya-nan², SHI Wan-jie¹ et al (1. Chemistry and Materials Science, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 2. Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000)

Abstract [Objective] To obtain optimal conditions of extraction technology of cold-resistant substances in Fructus xanthii. [Method] Using Xanthium as raw material and rice as the test object, the effects of the solid-liquid ratio, extraction temperature, extraction time and extraction times on the extraction of cold-resistant substances in Fructus xanthii were studied, and the optimal extraction conditions were determined by orthogonal experiment $L_9(3^4)$. [Result] The optimal conditions of the extraction technology of cold-resistant substances in Fructus xanthii were as followed: the extractant was 50% ethanol, 1:9 (g:mL) as solid-liquid ratio, 80℃ as extraction temperature, 40 min as extraction time, and extraction 3 times. The yield of powder cold-resistant substances was 10.0%. [Conclusion] The extraction process was simple with low cost, and the subsequent cold-resistant substances could significantly increase the content of proline in rice seedlings.

Key words Fructus xanthii; Cold-resistant substance; Extraction technology; Cold resistance; Rice

低温寒害是农业生产中常见的自然灾害,能影响作物的正常生理代谢,严重时会导致作物死亡造成大面积减产^[1-2]。我国是农业种植大国,每年因低温寒害遭受了巨大的经济损失。如何提高作物抗寒性能,探索相关的耐寒基因,寻求增强作物抗寒能力的抗寒物质是农业科研领域的重要方向,对于预防低温寒冷对作物的危害具有重要意义。抗寒剂或抗寒物质是指在低温胁迫下能够稳定植物细胞膜结构,使其发生一系列的生理生化活动,从而增强其抗寒能力的药品、试剂或植物生长调节剂等的统称^[2]。国内外关于植物抗寒性及抗寒物质的研究取得了不少成果。脯氨酸是植物体内调节渗透压最有效的物质之一,它不仅能低温胁迫下提高细胞液浓度,保持细胞液与环境的渗透平衡,防止水分丧失,还能在低温胁迫过后为植物提供营养^[3];其含量与植物抗寒性呈正相关性^[4]。为了减少低温寒害对植物的伤害,研究者运用水杨酸^[5-6]、脱落酸(ABA)^[7]、脯氨酸^[8]、植物提取物^[1-2]等抗寒物质来增强植物的抗寒能力,取得了良好效果。就水稻而言, Lee 等^[9-10]分别利用 ABA、Tachigrance 预防寒害对水稻的影响,效果明显。张海清等^[11]用抗寒种衣剂处理水稻种子,能提高水稻游离脯氨酸、可溶性蛋白质含量,使水稻在低温胁迫下保持良好的代谢。熊远福等^[12]将从木贼中提取

出的抗寒成分与黏合剂等助剂经过溶解混合,配制成了水稻抗寒剂。熊海蓉等^[13]从小茴香果中提取出抗寒成分,与杀菌剂、杀虫剂等活性成分,成膜剂等非活性成分,经粉碎混合配制出了一种防病防虫抗寒水稻种衣剂,具有良好的抗寒和防病防虫效果。

苍耳(*Xanthium sibiricum* Patr.)为菊科一年生草本植物,具有耐严寒、抗干旱等特殊生物学特性,其果实名为苍耳子。苍耳子含有较多的戊聚糖、苍耳子苷、脂肪酸、维生素 C 等植物抗寒成分,以及氨基酸、矿物质元素等植物营养成分^[2],属于廉价中药材,是提取植物源性抗寒物质较理想的原料之一。该研究以苍耳子为原料、水稻为试验对象,通过提取剂筛选、单因素试验和正交试验,探讨苍耳子中抗寒物质的最佳提取工艺条件,以期对植物源性抗寒物质的提取与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 苍耳子,市售,粉碎后备用;乙醇,95%,食品级;早稻种子,中嘉早 17,湖南省水稻科学研究所。

1.2 主要仪器 PYX-300G-B 光照培养箱,韶关市科力仪器有限公司;DK-S24 恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;Heidolph 旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司;2000 型可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;TF-D-1L 冷冻干燥器,上海拓纷机械设备有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 抗寒物质提取工艺流程。 5.0 g 苍耳子→放入三颈烧瓶(带搅拌、冷凝装置)→加提取剂(料液比 1:8)→水浴恒温

基金项目 国家重点研发计划项目(2017YFD0301503);作物种质创新与资源利用重点实验室(省部共建国家重点实验室培育基地)科学基金开放项目(19KFXM07);湖南农业大学校级大学生研究性学习和创新性实验计划项目(xcx191116)。

作者简介 熊海蓉(1979—),女,湖南常德人,副教授,硕士,从事植物功能成分提取、农用精细化学品研究。*通信作者,教授,博士,博士生导师,从事作物栽培学研究。

收稿日期 2020-04-21

搅拌提取(80℃、40 min)→过滤并收集滤液→滤渣重复提取2次→合并滤液→减压蒸馏乙醇→浓缩至5.0 mL→液体抗寒物质→浓缩至浓稠液→冷冻干燥→粉碎→粉状抗寒物质。

1.3.2 种子包衣、发芽及抗寒试验方法。

1.3.2.1 种子包衣方法。称取25.0 g水稻种子放入烧杯内,按照包衣比(液体抗寒物质:种子,质量比)1:12.5,称取液体抗寒物质2.00 g,缓慢加入装有种子的烧杯中,边加边搅拌,直至种子表面被抗寒物质包衣均匀,置于烘箱内38℃烘干。对照(CK):种子不包衣。

1.3.2.2 发芽及抗寒试验。采用泥床发芽法,处理包括种子包衣(T)和对照(CK),每个处理3次重复,每个重复取100粒种子置于塑料发芽盒内,于湖南农业大学温室中进行发芽试验^[14],播种后第7天测定发芽率,继续培养至2叶1心,然后转入光照培养箱内,在7~8℃低温下处理36 h,采样后按照张殿忠等^[15]方法测定秧苗体内脯氨酸含量,以鲜重计。以脯氨酸含量高低作为液体抗寒物质的抗寒效果优劣的考察指标。

1.3.3 抗寒物质提取剂筛选试验。按照“1.3.1”工艺流程,称取苍耳子3份,分别用提取剂水、50%乙醇和95%乙醇进行提取,其他提取条件固定不变,得到3份液体抗寒物质。按照“1.3.2”方法试验3份液体抗寒物质的抗寒效果,并与CK比较,选出最佳提取剂。

1.3.4 抗寒物质提取单因素试验。以“1.3.3”获得的最佳提取剂为基础,分别探讨料液比(g:mL)、提取温度(T)、提取时间(min)、提取次数4个单因素对抗寒物质提取的影响。

1.3.5 抗寒物质提取正交试验。根据“1.3.4”单因素试验结果,选择料液比、提取温度、提取时间和提取次数共4个因素,每个因素取3个水平,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表1),以确定抗寒物质的最佳提取工艺条件;用正交设计助手II V3.1进行统计分析。

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A(料液比 Solid-liquid ratio)	B(提取温度 Extraction temperature//℃)	C(提取时间 Extraction time//min)	D(提取次数 Extraction times//次)
1	1:8	70	30	1
2	1:9	80	40	2
3	1:10	90	50	3

1.3.6 粉状抗寒物质产率的测定。准确称取苍耳子 $W(g)$,按照“1.3.1”工艺流程,在获得的最佳提取工艺条件下进行提取,得到粉状抗寒物质,质量为 $W_1(g)$ 。粉状抗寒物质的产率按下式计算:产率= $W_1/W \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 抗寒物质提取剂的筛选 由表2可知,用50%乙醇和95%乙醇作提取剂所得到的抗寒物质均能显著提高秧苗脯氨酸含量,其中50%乙醇作提取剂时脯氨酸含量最高,显著优于95%乙醇、蒸馏水,更比CK提高了134.3%;3种提取剂所得到的抗寒物质对种子萌发均无明显抑制作用。可见,提

取剂选50%乙醇较合适。

表2 提取剂筛选结果

Table 2 Screening results of extractant

提取剂 Extractant	发芽率 Germination rate//%	脯氨酸含量 Proline content//μg/g
CK	78.8 a	32.4 d
蒸馏水 Distilled water	78.6 a	64.8 c
50%乙醇 50% ethanol	79.0 a	75.9 a
95%乙醇 95% ethanol	78.5 a	70.9 b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant differences between treatments ($P<0.05$)

2.2 抗寒物质提取单因素试验

2.2.1 料液比的影响。按“1.3.1”工艺流程,称取苍耳子5份,用50%乙醇作提取剂,料液比设置为1:6、1:7、1:8、1:9、1:10,其他提取条件固定不变,得到液体抗寒物质。按“1.3.2”方法试验5份抗寒物质的抗寒效果,结果如图1所示。由图1可知,料液比的大小对提取的抗寒物质的抗寒效果有显著的影响。随着料液比的增加,秧苗脯氨酸含量开始增加较快;当料液比达1:9之后增加缓慢,此时苍耳子中的绝大部分抗寒物质已被提取出来,继续加大料液比脯氨酸含量增加很少。考虑到料液比过大、溶剂回收等成本较高,料液比选1:9较合适。

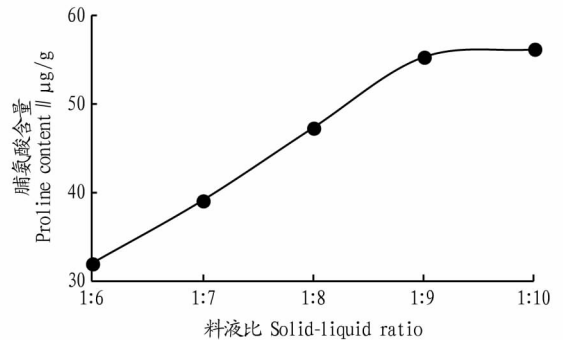


图1 料液比对抗寒效果的影响

Fig.1 Effect of solid-liquid ratio on cold tolerance

2.2.2 提取温度的影响。按“1.3.1”工艺流程,称取苍耳子5份,用50%乙醇作提取剂,提取温度设置为50、60、70、80、90℃,其他提取条件固定不变,得到液体抗寒物质。按“1.3.2”方法试验5份抗寒物质的抗寒效果,结果如图2所示。由图2可知,提取温度对抗寒效果的影响很明显,当提取温度小于80℃时,脯氨酸含量随着提取温度的升高持续上升;但温度超过80℃之后脯氨酸含量有所下降,可能是提取温度过高导致抗寒物质分解了。可见,提取温度选80℃较合适。

2.2.3 提取时间的影响。按“1.3.1”工艺流程,称取苍耳子5份,用50%乙醇作提取剂,提取时间设置为20、30、40、50、60 min,其他提取条件固定不变,得到液体抗寒物质。按“1.3.2”方法试验5份抗寒物质的抗寒效果,结果如图3所示。由图3可知,随着提取时间的增加,秧苗体内脯氨酸含量初期增加较快;提取时间超过40 min之后,脯氨酸含量的增加幅度已很小,说明此时原料苍耳子中的抗寒物质已基本

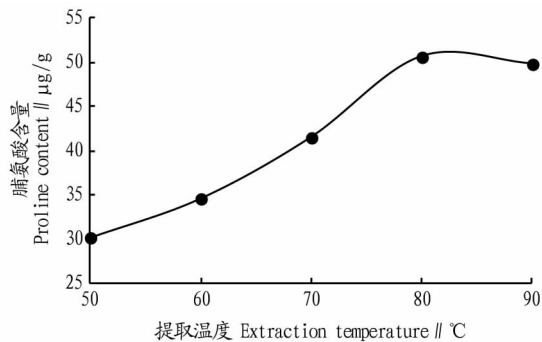


图2 提取温度对抗寒效果的影响

Fig.2 Effect of extraction temperature on cold tolerance

提取出来。可见提取时间选40 min 较合适。

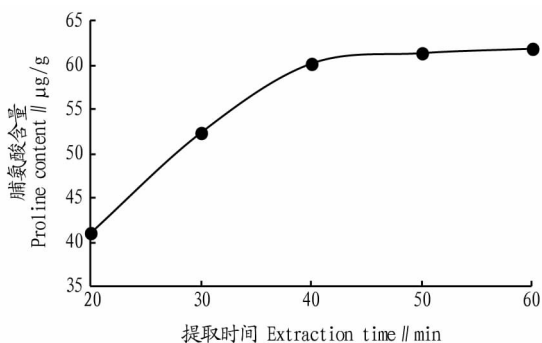


图3 提取时间对抗寒效果的影响

Fig.3 Effect of extraction time on cold tolerance

2.2.4 提取次数的影响。按“1.3.1”工艺流程,称取苍耳子5份,用50%乙醇作提取剂,提取次数设置为1、2、3、4和5次,其他提取条件固定不变,得到液体抗寒物质。按“1.3.2”方法试验5份抗寒物质的抗寒效果,结果如图4所示。由图4可知,随着提取次数的增加,秧苗体内脯氨酸含量开始增加较快,提取次数达2次之后其增加幅度已经比较小。提取次数较多,则提取剂用量大、回收成本较高;为了节约成本,提取次数选2次较合适。

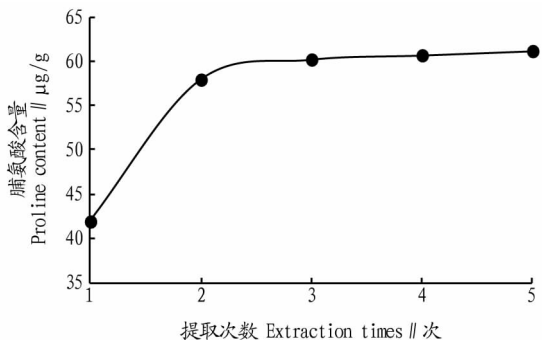


图4 提取次数对抗寒效果的影响

Fig.4 Effect of extraction times on cold tolerance

2.3 抗寒物质提取正交试验 从各因素的极差 R 大小(表3)和方差分析可以看出,影响苍耳子中抗寒物质提取的因素由主到次为 A(料液比)>D(提取次数)>C(提取时间)>B(提取温度),其中影响最大的是料液比,但均没达到显著水平($P>0.05$)。从每个因素3个水平的均值 k 可知,最佳提取工艺条件组合为 $A_2B_2C_2D_3$,即苍耳子中抗寒物质提取的最佳

工艺条件为:用50%乙醇作提取剂,料液比1:9、提取温度80℃、提取时间40 min、提取次数3次。

在最佳提取工艺条件下进行5轮重复提取验证试验,测得粉体抗寒物质的产率平均值为10.0%。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 3 Results of orthogonal experiment $L_9(3^4)$

试验号 No.	A	B	C	D	脯氨酸含量 Proline content // μg/g
1	1	1	1	1	47.7
2	1	2	2	2	52.3
3	1	3	3	3	42.3
4	2	1	2	3	88.5
5	2	2	3	1	60.8
6	2	3	1	2	65.7
7	3	1	3	2	39.3
8	3	2	1	3	78.1
9	3	3	2	1	52.5
k_1	47.418	58.524	63.804	53.679	
k_2	71.675	63.709	64.444	52.416	
k_3	56.640	53.499	47.485	65.638	
R	24.257	10.210	16.595	17.222	

3 讨论与结论

抗寒剂或抗寒物质主要通过提高植物细胞膜结构的稳定性,降低寒冷对细胞膜的通透性,从而提高植物的抗寒性^[16]。许多与植物抗寒性相关的研究均以脯氨酸含量作为判断指标^[17-18]。张海清等^[19]研究表明不能仅仅用脯氨酸含量高低反映抗寒性的强弱,还应参考电解质外渗率和丙二醛含量等指标。夏清柱等^[20]研究发现,正常生理过程中植株内脯氨酸的含量比较低,以维持正常的细胞代谢,当外界温度下降时其含量就会累积,维持细胞液的浓度,可以将脯氨酸含量作为判断植株抗寒性的指标。该试验从苍耳子中提取抗寒物质,用其包衣水稻种子,通过低温胁迫处理,发现能大幅度提高秧苗脯氨酸含量,增强秧苗的抗寒性。

该试验以廉价中药材苍耳子为原料,提取其中的抗寒物质,探讨了提取剂以及4个单因素对抗寒物质提取的影响,正交试验确定了最佳提取工艺条件:用50%乙醇作提取剂,料液比1:9,提取温度80℃,提取时间40 min,提取3次,在该提取工艺条件下粉体抗寒物质的产率为10.0%。获得的抗寒物质属于植物源性抗寒物质,对水稻等植物安全、环境友好,可以克服现有人工合成抗寒物质存在的对植物安全性低、对生态环境存在负面影响等不足;该提取工艺简便,原料价廉,提取剂可回收利用,成本较低;获得的抗寒物质处理水稻种子能大幅度提高秧苗脯氨酸含量,有效增强秧苗的抗寒能力。该试验主要不足之处在于从苍耳子中提取获得的抗寒物质是混合物,其具体成分有待进一步探索。

参考文献

- [1] 熊远福,邹应斌,文祝友,等.水稻抗寒剂:CN201510714777.9[P].2015-12-30.
- [2] 朱东洋,王之霖,陈倩,等.一种水稻抗寒剂及其制备方法:CN201710976916.4[P].2018-02-06.
- [3] 潘瑞炽,董思得.植物生理学[M].3版.北京:高等教育出版社,2000:218-328.
- [4] 王娟,李德全.逆境条件下植物体内渗透调节物质的积累与活性氧代谢[J].植物学通报,2001,18(4):459-465.

的单因子污染指数^[6]。由表 3 可知,40 个样地的板栗果实样品中砷污染指数均低于 1,最大不超过 0.041,处于非污染水平。不同地点的砷单因子污染指数各有差异,28 号样地板栗果实中砷污染指数最大,为 0.041;29 号样地板栗土壤中砷污染指数最大,为 0.583,但 40 个样地的板栗果实和板栗土壤中砷污染指数均处于非污染水平。

3 结论与讨论

该研究首次对安徽省六安、安庆、芜湖和宣城共 40 个板栗产区的 40 份板栗果实及土壤进行抽样分析,进而对板栗果实及土壤中砷含量分布特征及其潜在的生态风险进行研究。实测值为实地抽样检测,来源明确,样本分布具有一定程度上的代表性,分析方法和结果可靠。

研究结果显示,六安、安庆、芜湖和宣城主要产区 40 个样地的板栗果实及板栗土壤样品中砷含量均处于低水平。对板栗果实及板栗土壤样品中砷含量进行单因子污染指数法评价,结果表明,六安、安庆、芜湖和宣城 4 个地市区 40 个样地板栗果实及板栗土壤中砷均处于非污染水平。

板栗大多生长于生态环境较好的山林地区,经营管理措施普遍比较简单,受灌溉、施肥和农药等人造的污染不大;由于取样的区域位置不同,土壤重金属元素的解吸受元素全量、土壤 pH、土壤有机物、植物根系分泌物、土壤中微生物、气温和光等多种因素共同影响;因此,不同地区土壤中砷含

量差异较大,也可能影响到果实中砷含量^[6-10]。安徽主产区 40 个样地的板栗中砷含量均处于国家食品质量标准规定的安全水平,但考虑到芜湖市矿产资源种类丰富,推测芜湖地区土壤中砷含量的本底值比其他地区略高,但测定值均远远低于国家食品质量标准限量值,故推测非人为污染导致,对人体影响并不大。

参考文献

- [1] 倪张林,汤富彬,屈明华,等.山东、河北板栗中重金属元素的背景值及其安全现状研究[J].浙江农业科学,2012,53(11):1522-1525.
 - [2] ATAFAR Z, MESDAGHINIA A, NOURI J, et al. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration [J]. Environmental monitoring and assessment, 2010, 160(1/2/3/4): 83-89.
 - [3] 钟道旭,韩存亮,蒋金平,等.镀锌厂周围农田土壤-水稻中重金属污染及其风险[J].土壤,2011,43(1):143-147.
 - [4] 吴万波,韩华柏,朱益川,等.四川主要干果经济林产品安全性初步研究[J].中国农学通报,2008,24(12):149-152.
 - [5] 杨玉,童雄才,王仁才,等.湖南猕猴桃园土壤重金属含量分析及污染评价[J].农业现代化研究,2017,38(6):1097-1105.
 - [6] 张延平,陈振超,陈松武,等.山东、云面板栗重金属砷、铅、镉含量及风险评估[J].山东农业大学学报(自然科学版),2018,49(3):490-494.
 - [7] 张林森,梁俊,武春林,等.陕西苹果园土壤重金属含量水平及其评价[J].果树学报,2004,21(2):103-105.
 - [8] 袁启凤,李文云,张银,等.贵州都柳江流域柑橘园土壤、柑橘中重金属的分布特征[J].江苏农业科学,2012,40(12):359-361.
 - [9] 白瑞亮,白瑞娟,相珊珊,等.山东省主产区板栗重金属含量分析[J].山东林业科技,2014,44(5):16-18.
 - [10] 李金强,罗祥,柏自琴,等.贵州柑橘园土壤与果实重金属含量特征及其评价[J].贵州农业科学,2017,45(1):99-102.
-
- [5] 杨晓玲,杨晴,刘艳芳,等.水杨酸对黄瓜种子萌发及幼苗抗低温的影响[J].种子,2007,26(1):78-80.
 - [6] 刘晓静,郭凌飞,李鸣,等.水杨酸对低温胁迫下甘蔗苗期抗寒性的效应[J].中国农学通报,2011,27(5):265-268.
 - [7] RASOOL S, SINGH S, HASANUZZAMAN M, et al. Plant resistance under cold stress: Metabolomics, proteomics, and genomic approaches [M] // AH-MAD P, RASOOL S. Emerging technologies and management of crop stress tolerance; Volume 1. Biological techniques. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2014: 79-98.
 - [8] 马文广,崔华威,李永平,等.不同药剂处理对低温逆境下烟草种子发芽和幼苗生长的影响[J].科技通报,2011,27(6):873-880.
 - [9] LEE J Y, LEE J H, RYA I S. Effect of abscisic acid application and its mechanism on the chilling injury of rice plants [J]. Plant environment, 1987, 9(2): 60-65.
 - [10] LEE B K, CHOI W Y. Effect of mixture of hymexazole and metalaxyl on growth and low temperature injury in rice seedlings [J]. Korean journal of crop science, 1990, 35: 201-210.
- [11] 张海清,肖国超,邹应斌,等.抗寒种衣剂对水稻秧苗抗寒性的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2005,31(6):597-601.
 - [12] 熊远福,熊海蓉,邹应斌,等.木贼提取物作为抗寒成分的水稻抗寒剂及其应用;CN201510714637.1[P].2016-03-09.
 - [13] 熊海蓉,文祝友,黄敏,等.一种防病防虫抗寒水稻种衣剂;CN201810467799.3[P].2018-09-21.
 - [14] 颜启传.种子学[M].北京:中国农业出版社,2001:420-438.
 - [15] 张殿忠,汪柿洪,赵会贤.测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法[J].植物生理学通讯,1990(4):62-65.
 - [16] 胡虹远,文卓琼,熊海蓉,等.植物抗寒剂的研究现状及发展趋势[J].化学与生物工程,2015,32(11):14-17.
 - [17] 王荣富.植物抗寒指标的种类及其应用[J].植物生理学通讯,1987(3):49-55.
 - [18] CHU T M, JUSAITIS M, ASPINALL D, et al. Accumulation of free proline at low temperatures [J]. Physiologia plantarum, 1978, 43(3): 254-260.
 - [19] 张海清,邹应斌,肖国超,等.抗寒种衣剂对早稻秧苗抗寒性的影响及其作用机理的研究[J].中国农业科学,2006,39(11):2220-2227.
 - [20] 夏清柱,万红,刘惠民,等.人工低温胁迫下腰果叶片生理生化指标的变化[J].经济林研究,2012,30(12):28-32.

(上接第 173 页)