

杨德亮,徐 凤,刘 秀,等. 地黄耐百草枯的有效成分分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):100-102.

地黄耐百草枯的有效成分分析

杨德亮,徐 凤,刘 秀,张 闯,吴明根

(延边大学农学院,吉林延吉 133002)

摘要:地黄对百草枯除草剂具有较强的耐性,为了解地黄耐百草枯的有效成分,分别以 300 g/hm² 或 600 g/hm² 的百草枯处理地黄。结果表明,处理后 10 d,药害等级分别为 0 级和 2 级,且药害症状恢复较快;当百草枯与地黄提取物或毛蕊花糖苷标准样品混合处理大豆幼苗时,百草枯对大豆叶片的药害症状减轻,说明地黄提取物或毛蕊花糖苷具有解除百草枯氧化毒性的功能。地黄叶片和块根中黄酮含量分别为 2.29% 和 1.59%,毛蕊花糖苷的含量分别是 7.015、0.475 mg/g,叶片中的含量多于块根。

关键词:百草枯;地黄;黄酮;毛蕊花糖苷;耐药性

中图分类号:S451.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0100-02

百草枯(Paraquat)属于高氧化活性的灭生性除草剂,在土壤中易失去活性,无残留^[1]。地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)^[2]为玄参科地黄属植物,是传统的中药植物资源。前期研究表明,地黄生长期具有耐除草剂百草枯特性^[3-4],地黄乙醇提取物具有清除 DPPH 自由基能力的抗氧化特性^[5],地黄等玄参科植物提取物——梓醇、毛蕊花糖苷、多糖等具有清除 DPPH 自由基的能力^[6-7]。因此,本试验进行地黄提取物以及毛蕊花糖苷对减轻百草枯除草剂的药害特征分析,揭示地黄耐百草枯除草剂的机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物 地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)品种为河北省引种品种(代号 85-5)。大豆品种为黑农 48。

1.1.2 供试除草剂与试剂 百草枯:20% 克无踪由先正达南通作物保护有限公司提供。芸香苷标准品:由广州威佳科技有限公司提供,毛蕊花糖苷标准品由上海源叶生物科技有限公司提供;甲酸和甲醇为色谱纯;亚硝酸钠、95%乙醇、硝酸铝、99.5%乙醚、氢氧化钠均为分析纯。

1.1.3 供试仪器 液相色谱仪(Agilent 1100型),电子分析天平(CPA324S型),轨道震荡培养箱(SI500型),分光光度计(UV-1700 PharmaSpec型),减压旋转蒸发器(EYEL4型)和索氏提取器等。

1.2 试 验 方 法

1.2.1 地黄耐百草枯特性观察 地黄出苗后 20 d 进行百草枯田间茎叶处理,剂量分别为 300、600 g/hm²,以喷清水处理为对照。各处理重复 3 次,小区面积 0.01 hm²。施药后 10、20、40 d 分别调查药害症状。

1.2.2 地黄提取物和毛蕊花糖苷标准品的百草枯解毒性测定 将 20% 百草枯 1 mL 与不同量的地黄块根提取液混合,加水定容至 100 mL,利用微型喷雾器均匀喷洒到长出 2 个复叶的大豆叶片上,施药后 20 d 分别调查药害症状观察。

将不同浓度的百草枯分别与不同浓度的毛蕊花糖苷标样混合配比后均匀涂抹在大豆叶片上,处理后 20 d 肉眼观察症状。

1.2.3 地黄体内总黄酮含量的测定 总黄酮类标准曲线制作:称取芸香苷 5.0 mg,用 60% 乙醇定容至 50 mL,得浓度为 0.1 mg/mL 的标准溶液。准确吸取标准溶液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别加入 30% 乙醇至 5 mL。再加 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀放置 6 min;再加 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀放置 6 min;再加 1 mol/L NaOH 溶液 4 mL,再加 0.4 mL 水,摇匀,放置 10~15 min;于 510 nm 波长处测定吸光度,绘制芸香苷浓度(C)与吸光度(D)的标准曲线。

地黄提取、待测液的配制:将新鲜地黄叶片(7月9日取样)和块根(10月18日取样)在 60℃ 烘干箱中烘干 72 h。叶片采用索氏提取法,以无水 99.5% 乙醚为脱脂剂,于 43℃ 水浴中脱脂除去脂类和脂溶性色素,再将其置于烘干箱中 130℃ 烘干备用。称取干燥地黄块根和叶片粉末样品各 1 份 0.5 g,于 50 mL 锥形瓶中,分别加 70% 乙醇,以 50℃ 水浴浸提 4 h,过滤,得测定样液。准确吸取样液 2.5 mL,稀释到 50 mL,再吸取 5 mL 于试管中,加 0.3 mL 5% NaNO₂ 溶液,摇匀,放置 6 min,再加 0.3 mL 10% Al(NO₃)₃ 溶液,摇匀,放置 6 min,再加 1 mol/L NaOH 溶液 4 mL,再加 0.4 mL 蒸馏水,摇匀,放置 10~15 min,同时作空白试剂为对照,于 510 nm 波长处测定吸光度,通过查标准曲线,计算出地黄叶片和块根的总黄酮含量。

$$\text{样品中的黄酮量} = \frac{CV_1V_2}{V_3V_4m} \times 1/10 \quad (1)$$

式中:V₁ 为第 1 次定容的体积(mL);V₂ 为第 2 次定容的体积(mL);V₃ 为从第 1 次定容后的溶液中取出来进行第 2 次定容的体积(mL);V₄ 为从第二次定容后的溶液中取出来进行测定的体积(mL);m 为样品质量(g)。

1.2.4 地黄体内毛蕊花糖苷含量的测定 洗脱程序:Zorbax

收稿日期:2013-05-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160370)。

作者简介:杨德亮(1987—),男,吉林长春,硕士研究生,从事农田杂草防除研究。E-mail:dely1987@foxmail.com。

通信作者:吴明根(1958—),男,吉林龙井人,博士,教授,从事农田杂草防除研究。Tel:(0433)02435566;E-mail:5minggen@163.com。

C₁₈ 色谱柱(4.6 m × 250 mm, 5 μm), 流速 1 mL/min, 检测波长为 332 nm, 以 0.5 % 甲酸溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 按表 1 中的规定进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	70	30
30	55	45
35	5	95

标准样品溶液的制备: 称取毛蕊花糖苷标样 3.0 mg, 加入 3 mL 流动相, 制成 1 mg/mL 的溶液, 将其稀释至 0.25 mg/mL。

地黄待测样品溶液的制备: 称取地黄干块根粉末 0.8 g 和捣碎叶片 3 g, 分别加甲醇 50 mL, 称质量, 震荡 24 h, 静止后再称质量, 加甲醇补足, 摇匀, 过滤, 精密量取滤液 20 mL, 减压回收溶剂近干, 用流动相溶解残渣, 转移至 5 mL 量瓶中, 并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取滤液, 即为待测液。

样品含量测定: 液相色谱检测后按公式(2)计算样品中毛蕊花糖苷的含量。

$$\text{毛蕊花糖苷含量} = \frac{A_{\text{样品}} \times C_{\text{对照品}} \times j_{\text{对照品}}}{A_{\text{对照品}} \times \frac{m_{\text{样品}}}{V} \times j_{\text{样品}}} \quad (2)$$

式中: A 为峰面积; j 为进样量; C 为对照品纯度; m 为样品质量; V 为样品定容体积。

2 结果与分析

2.1 百草枯处理对地黄、大豆的药害

表 2 显示, 高剂量百草枯茎叶处理地黄, 初期出现叶片边缘枯萎的药害症状, 药害等级 2 级(0~10 级分类法^[8]), 20 d 后药害症状消失, 恢复正常生长。当百草枯与地黄块根提取液或毛蕊花糖苷混合后处理大豆幼苗时, 大豆叶片表现正常(表 3、表 4)。可以认为, 地黄植株体内含有抗氧化活性物质, 毛蕊花糖苷可能是这类抗氧化活性物质之一, 遇到百草枯时能够解除百草枯活性氧毒性。

表 2 地黄生长期百草枯处理的药害症状

处理剂量 (g/hm ²)	药害等级(0~10级)		
	10 d	20 d	40 d
300	0	0	0
600	2	0	0

注: 药害等级为 2 级时, 地黄叶边缘、叶尖枯萎。

表 3 百草枯和地黄块根提取液混合后处理的大豆叶片药害症状

地黄块根提取液 (mL)	不同浓度百草枯药害症状	
	0	0.1 mL
0	叶片正常	叶片全部枯死
30	叶片正常	叶片少许枯黄
100	叶片正常	叶片正常

表 4 百草枯与毛蕊花糖苷混合后处理的大豆叶片药害症状

毛蕊花糖苷 (mmol/L)	不同浓度百草枯药害症状		
	0	0.1 mmol/L	0.2 mmol/L
0	叶片正常	叶片萎蔫、枯死	叶片枯死
0.2	叶片正常	叶片大面积枯黄	叶片大面积枯黄
0.4	叶片正常	叶片出现轻微黄斑	叶片出现少许枯黄斑

2.2 地黄体内总黄酮含量

在 510 nm 波长处测定芸香苷标准样品不同浓度(C)与吸光度(D)值, 得到 $D = 1.0206C - 0.0155$ 线性关系(图 1), 其线性范围为 0~0.05 mg/mL, $r^2 = 0.9918$ 。通过样品中的黄酮量计算公式(1)计算出地黄块根、叶的黄酮含量分别为 1.59% 和 2.29%, 叶片中的黄酮含量高于块根(表 5)。

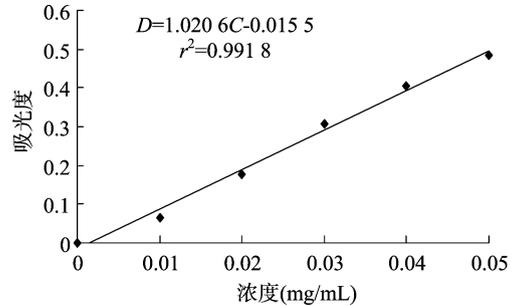


图 1 芸香苷浓度(C)-吸光度(D)的标准曲线

表 5 地黄不同部位的总黄酮和毛蕊花糖苷含量

部位	总黄酮含量(%)	毛蕊花糖苷含量 (mg/g)
块根	1.59	0.475
叶片	2.29	7.015

2.3 地黄中毛蕊花糖苷含量

图 2 至图 4 选用 0.5 % 甲酸溶液为流动相 A、甲醇为流动相 B, 进行梯度洗脱, 毛蕊花糖苷的峰面积值更大, 分离效果更好。根据液相色谱测定和计算结果, 地黄叶片和块根提取物的毛蕊花糖苷含量分别为 7.015 mg/g 和 0.475 mg/g, 叶片提取物中毛蕊花糖苷含量是块根的 14.77 倍(表 5)。

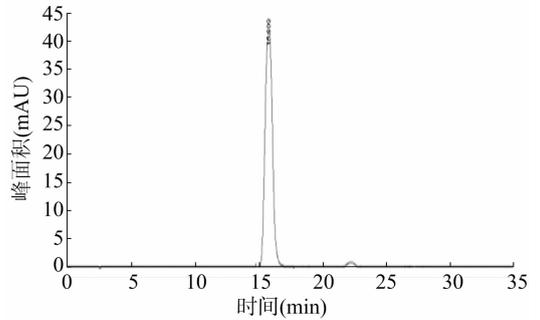


图 2 标准品毛蕊花糖苷的高效液相色谱图

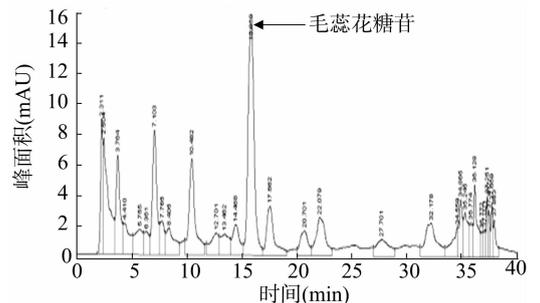


图 3 地黄干块根甲醇提取液的高效液相色谱图

戈林泉,王芳,吴进才. 2种选择性农药的使用对稻纵卷叶螟产卵及生理生化的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):102-105.

2种选择性农药的使用对稻纵卷叶螟产卵及生理生化的影响

戈林泉,王芳,吴进才

(扬州大学园艺与植物保护学院,江苏扬州 225009)

摘要:产卵试验结果表明,扑虱灵能刺激2龄稻纵卷叶螟幼虫产卵。幼虫体重和蛹重的试验结果表明,田间试验中除2龄期施用吡虫啉 37.5 g/hm^2 (有效成分用量)的幼虫体重显著高于对照外,其他处理的幼虫体重与对照之间差异均不显著;但水泥池试验中处理组蛹的平均重量显著低于对照。2种选择性种农药处理后的5龄稻纵卷叶螟幼体内保幼激素含量显著低于对照,蜕皮激素含量除扑虱灵 180 g/hm^2 (有效成分用量)处理显著高于对照外,其他各处理与对照相比差异均不显著。说明扑虱灵能刺激稻纵卷叶螟繁殖与蜕皮激素和保幼激素含量有关,该结果更好地解释了农药诱导稻纵卷叶螟再猖獗的生理生化机制。

关键词:稻纵卷叶螟;选择性农药;产卵;保幼激素;蜕皮激素

中图分类号: S435.112+.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0102-04

稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis* Guenée)原为局部偶发性害虫,1970年以后成为常发性害虫^[1]。自20世纪90年代中后期以来,该害虫在我国稻区尤其是长江中下游的江苏、浙江等地区频繁大发生,2003年超历史性大猖獗,从而造

成近年来粮食大幅度减产,影响粮食生产安全。稻纵卷叶螟致种群周期性涨落的原因通常包括虫源基数、气候条件、耕作制度、品种演变及与生育期吻合性等^[2-5]。农药诱导害虫再猖獗发生已有许多报道,其中最典型的是农药诱导褐飞虱再猖獗^[6-17]。有研究表明,吡虫啉刺激能激螨类^[18]、三化螟生殖^[19-20]。20世纪90年代以后大面积推广农药扑虱灵,稍后又推广吡虫啉,这是否与稻纵卷叶螟的大发生有关还不清楚,选择性农药能否诱导稻纵卷叶螟再猖獗,至今国内外尚无报道。因此,本试验拟通过2种选择性农药扑虱灵和吡虫啉对稻纵卷叶螟成虫产卵及其生理生化指标的影响进行研究,为

收稿日期:2013-05-26

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:200903051)。

作者简介:戈林泉(1978—),男,博士,讲师,主要从事昆虫分子生态与害虫综合治理研究。E-mail:lgge1027@163.com。

通信作者:吴进才,男,博士,教授,博士生导师,主要从事昆虫生态及害虫再猖獗研究。E-mail:jinciwu1952@sina.com。

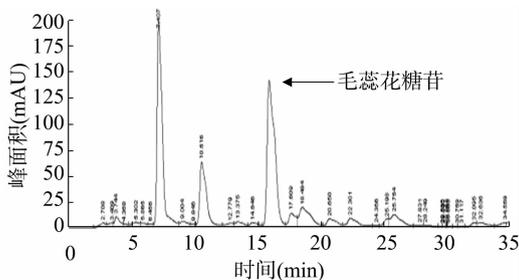


图4 地黄叶片甲醇提取液的高效液相色谱图

3 结论

毛蕊花糖苷是一种很强的抗氧化剂,在动物细胞中已经证实它具有防止脂质过氧化的能力^[9]。高剂量百草枯对大豆叶片产生药害,而地黄提取液和毛蕊花糖苷标准品对大豆叶片无影响,当地黄提取液或毛蕊花糖苷标准品与百草枯混合处理大豆叶片时,百草枯对大豆叶片无药害,说明地黄耐百草枯氧化的有效成分之一是毛蕊花糖苷。

地黄块根和叶的黄酮含量分别为1.59%和2.29%,且叶片中的黄酮含量高于块根;地黄叶片的毛蕊花糖苷含量分别为7.015 mg/g和0.475 mg/g,说明地黄叶片中毛蕊花糖苷含

量高于块根中的含量。

参考文献:

- [1] 朴仁哲,赵洪颜,金玉姬. 地黄田用除草剂百草枯的初步研究[J]. 农药,2008,47(4):288-289,291.
- [2] Jae C C, Sang Y M. Physiological response of *Rehmannia glutinosa* to paraquat and its tolerance mechanisms[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,1997,59:51-63.
- [3] 武宝开, Mitchell E D, Johnson B L, 等. 野生种花生叶片内超氧化物歧化酶及其抗百草枯特性[J]. 植物生理学报,1990,16(2):147-152.
- [4] 赵洪颜,林 昊,金玉姬,等. 地黄叶片提取物抗氧化活性及其薄层色谱的初步研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(4):1458-1459,1462.
- [5] 李寒冰,苗静静,李根林,等. 生、熟地黄的体外抗氧化活性测定方法研究[J]. 中国医药指南,2012,10(9):393-395.
- [6] 苗明三,孙艳红,方晓艳. (怀)熟地黄多糖抗氧化作用[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(10):32-33.
- [7] 魏福香. 除草剂药害试验方法[J]. 杂草科学,1992(3):18-21.
- [8] Liu M J, Li J X, Guo H Z, et al. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study[J]. Life Sciences,2003,73(7):883-892.