



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109105037 B

(45) 授权公告日 2021.01.08

(21) 申请号 201811181141.2

A01P 21/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.11

审查员 贾莹莹

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109105037 A

(43) 申请公布日 2019.01.01

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72) 发明人 吴劲松 宋娜

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务

所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

A01G 7/06 (2006.01)

A01N 57/20 (2006.01)

A01N 37/42 (2006.01)

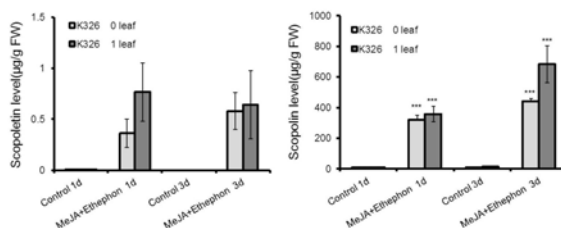
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种诱导烟草生产东莨菪苷的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速高效提高栽培烟草(Nicotiana tabacum)生产东莨菪苷(Scopolin)能力的方法。该方法采用浓度0.25g/L茉莉酸甲脂(MeJA)和7.2g/L乙烯利(Ethephon)对60天叶期的栽培烟草进行喷雾处理。与对照组相比,本发明喷施茉莉酸甲脂和乙烯利后,栽培烟草体内的东莨菪苷的水平大量升高,3天最高可达到约0.682±0.121mg/g鲜重水平。本发明通过喷施低浓度的茉莉酸甲酯和乙烯利,大大提高了烟草体内合成东莨菪苷的能力,操作简单并易于大规模推广,对于工业化生产东莨菪苷具有重要意义。



1. 一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,其特征在于:该方法用0.25g/L茉莉酸甲酯和7.2g/L乙烯利对生长60天叶期的栽培烟草植株叶片进行喷施处理,密封3天。

2. 根据权利要求1所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,其特征在于:用0.25g/L茉莉酸甲酯和7.2g/L乙烯利水溶液对生长60天叶期的栽培烟草植株叶片进行喷施处理,密封3天,诱导栽培烟草组织内的东莨菪苷大量合成,可达0.682 mg/g。

3. 根据权利要求1所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,其特征在于:该方法进一步包括提取栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷步骤:将处理过的栽培烟草叶片取样,称取重量,并在液氮中保存;在液氮中充分研磨样品至粉末状;加入1 mL含有1000 ng/ml 4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferone)的70% 甲醇,震荡10 min后,12000 rpm离心20 min,吸取上清液,放置4℃准备测定。

4. 根据权利要求1所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,其特征在于:该方法进一步包括测定栽培烟草中东莨菪内酯及东莨菪苷含量步骤:采用HPLC-MS/MS法,色谱柱:Hypersil gold C18 column,流动相A:含0.1%甲酸的水相,流动相B:含0.1%甲酸的甲醇,流速0.2 ml/min,东莨菪内酯在m/z 193/133检测,东莨菪苷在m/z 355/193 检测,内标4-甲基伞形酮(4-methylumbelliferone)在m/z 177/77 检测,根据峰面积计算栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷的含量。

## 一种诱导烟草生产东莨菪苷的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术领域,具体涉及提高烟草生产东莨菪苷(Scopolin)能力的一种快速有效方法。

### 背景技术

[0002] 东莨菪苷是东莨菪内酯的糖基化产物,是一种香豆素类化合物。香豆素类化合物广泛存在于植物界中,是一类应用价值很高的次生代谢产物,以伞形科植物如防风、旋花科植物如丁公藤以及芸香科植物多为常见。东莨菪苷也是丁公藤类重要中药材的特征成分。在医学上东莨菪苷具有消炎止痛、抗骨质疏松、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗菌、降压及抗心律失常等多方面活性。在临床上有杀菌、抗肿瘤、抗炎及抗凝血等多种药理活性。在农业上,具有调节植物生长、杀虫、杀螨及抑菌等活性。

[0003] 我国拥有非常丰富的香豆素类化合物的植物资源,但由于这方面的研究起步较晚,香豆素类化合物提取和分离纯化技术目前尚不成熟,不能大规模开发利用。东莨菪苷是许多药用植物的有效成分,目前提取的方法有很多种,如传统溶剂提取法:是从植物中提取包括香豆素类等天然产物最常用的方法,主要包括煎煮、浸渍、渗漉、回流和连续提取。虽然加工成本低但存在加热时间长、提取率低、溶剂消耗多、有机残留等缺点。近年来还陆续发展出很多提取方法如微波辅助提取法、超临界流体提取法、超声波提取法、以及柱层析法,但这些方法均有各自的缺点及不足之处。

[0004] 市场上能够生产东莨菪苷常见的中药材有很多,但这些植物大多数能够提取的东莨菪苷的含量并不高,能够提取较高的东莨菪苷的植物又比较稀少,如:丁公藤中东莨菪苷的含量在0.384~1.920mg/g;宁夏枸杞中东莨菪苷含量在0.05~0.16mg/g水平;华山参药材中东莨菪苷含量在0.2~1.8mg/g水平;藏药风毛菊中东莨菪苷含量较高,在2~10mg/g水平,目前由于提取东莨菪苷成本及技术受到限制,大量生产东莨菪苷仍然面临较多困难。

### 发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术存在的上述问题,提供一种有效的提高烟草积累东莨菪苷的全新方法。本发明利用外施低浓度的植物激素茉莉酸和乙烯利提高烟草生产东莨菪苷的能力。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,该方法用0.25g/L茉莉酸甲酯和7.2g/L乙烯利对生长60天叶期的栽培烟草植株叶片进行喷施处理,密封1天及3天。

[0008] 根据所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,用0.25g/L茉莉酸甲酯和7.2g/L乙烯利水溶液对生长60天叶期的栽培烟草植株叶片进行喷施处理,密封1天及3天,诱导栽培烟草组织内的东莨菪苷大量合成,最高达0.682mg/g。

[0009] 根据所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,该方法进一步包括提取栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷步骤:将处理过的栽培烟草叶片取样,称取重量,并在液氮中

保存;在液氮中充分研磨样品至粉末状;加入1mL含有1000ng/ml 4-methylumbelliferone的70%methanol,震荡10min后,12000rpm离心20min,吸取上清液,放置4℃准备测定。

[0010] 根据所述的一种诱导栽培烟草生产东莨菪苷的方法,该方法进一步包括测定栽培烟草中东莨菪内酯及东莨菪苷含量步骤:采用HPLC-MS/MS法,色谱柱:Hyperil gold C18column,流动相A:水相(0.1%甲酸),流动相B:甲醇(0.1%甲酸),流速0.2ml/min,东莨菪素内酯在m/z 193/133检测,东莨菪苷在m/z 355/193检测,内标4-methylumbelliferone在m/z 177/77检测,根据峰面积计算栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷的含量。

[0011] 本发明与现有技术相比具有的优势及优点:

[0012] 1、本发明能够快速提高栽培烟草体内东莨菪苷的含量:只需较低浓度的茉莉酸甲酯和乙烯利即可诱导栽培烟草产生高浓度的东莨菪苷。

[0013] 2、本发明方法简单、安全可靠,成本低。茉莉酸甲酯是农业上常用的植物激素,乙烯利也是一种常见的植物生长调节剂,同时栽培烟草叶片面积大、数量丰富,可以作为非常理想的生产东莨菪苷的原材料。

## 附图说明

[0014] 图1是茉莉酸甲酯和乙烯利处理栽培烟草不同年龄的植物叶片图,分别为幼嫩叶片(0leaf)及老叶片(1leaf)。

[0015] 图2是低浓度茉莉酸甲酯和乙烯利处理栽培烟草叶片所诱导产生东莨菪内酯和东莨菪苷的含量图。

## 具体实施方式

[0016] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明

[0017] 实施例1

[0018] 用0.25g/L茉莉酸甲酯和7.2g/L乙烯利对生长期60天的栽培烟草进行外源喷施,对烟草幼嫩叶片(0leaf)及较成熟叶片(1leaf)分别进行处理,密闭1天及3天。

[0019] 提取栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷的方法:

[0020] 1、将处理过的栽培烟草叶片取样,称取重量,并在液氮中保存。

[0021] 2、在液氮中充分研磨样品至粉末状。

[0022] 3、加入1mL含有1000ng/ml 4-methylumbelliferone的70%methanol,震荡10min后,12000rpm离心20min,吸取上清液,放置4℃准备测定。

[0023] 测定栽培烟草中东莨菪内酯及东莨菪苷含量的方法:

[0024] 采用HPLC-MS/MS法,色谱柱:Hyperil gold C18column,流动相A:水相(0.1%甲酸),流动相B:甲醇(0.1%甲酸),流速0.2ml/min,东莨菪素内酯在m/z 193/133检测,东莨菪苷在m/z 355/193检测,内标4-methylumbelliferone在m/z 177/77检测。根据峰面积计算栽培烟草中东莨菪内酯和东莨菪苷的含量。

[0025] 本发明发现经过对照水处理栽培烟草叶片后,处理1天和3天植物体内的东莨菪内酯和东莨菪苷的含量均几乎为0mg/L,经茉莉酸甲酯和乙烯利处理后,植物体内东莨菪内酯的含量在1天和3天均没有明显变化,而东莨菪苷的含量在1天和3天均有大幅升高,并且幼

嫩叶片 (0leaf) 及老叶片 (1leaf) 均能够被诱导出大量的东莨菪苷, 幼嫩叶片 (0leaf) 及老叶片 (1leaf) 在处理1天后检测东莨菪苷含量分别为0.322mg/g和0.358mg/g, 幼嫩叶片 (0leaf) 及老叶片 (1leaf) 在处理3天后检测东莨菪苷含量约为0.442mg/g和0.682mg/g。结果显示, 经低浓度茉莉酸甲酯和乙烯利处理栽培烟草叶片后, 能够大量诱导东莨菪苷产生。本发明为工业化大量生产东莨菪苷提供了一种高效安全的新方法。

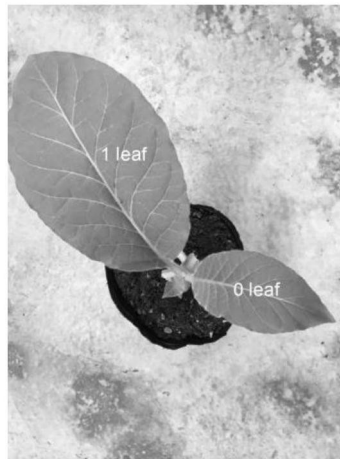


图1

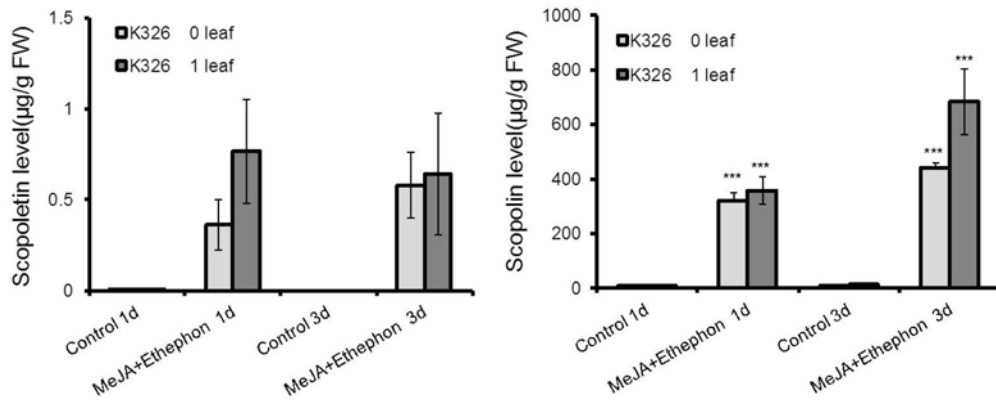


图2