

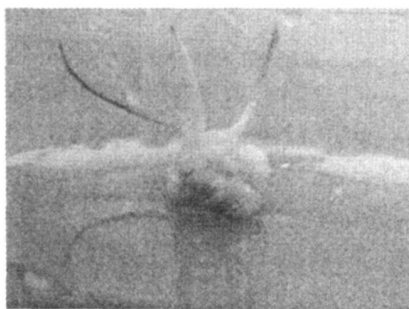


图 4 诱导球茎及球茎生长

Fig. 4 Corms induction and growth

3 讨论与结论

3.1 愈伤组织诱导:一般认为诱导愈伤组织成败关键在于培养的条件。本实验通过考察 3 种不同培养基的影响,确定 MS 为适合番红花愈伤组织诱导的培养基,其结果与陈书安等的报道一致^[4]。植物生长调节剂是诱导愈伤组织极为重要的因素,不同质量浓度激素配比的 MS 培养基中,MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 培养基适合诱导愈伤组织,而且诱导率也高于 MS 培养基。光照条件下愈伤组织生长缓慢,且褐化很严重,暗培养诱导速度较快,不易褐化,说明光照不利于番红花愈伤组织诱导,而暗培养有利于愈伤组织脱分化。

3.2 丛生芽的诱导:组织培养中的器官发生包括外植体直接分化成器官的直接发生方式和外植体先脱分化形成愈伤组织再分化成器官的间接发生方式。脱分化过程从细胞分裂的启动开始,经过分裂形成拟分生组织或分生组织中心,随后形成器官原基。器官原基的形成受外界因素和体内生理生化因素的调节。器官分化对生长调节剂的需要是必不可少的,所以对生长调节剂的研究也是人们进行组织培养工作时关注的焦点之一。本试验采用不同质量浓度配比的 6-BA 和 NAA 诱导丛生芽,在适宜的条件下,脱分化后的愈伤组织能够再分化,诱导出丛生芽。

3.3 球茎诱导:在诱导球茎时,所需时间较长,球茎生长很缓慢,诱导技术有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 江苏中医学院. 中药大词典(下册) [M]. 上海:上海人民出版社, 1977.
- [2] 王康才, 徐德然, 唐晓清, 等. 中药材种养关键技术丛书 [M]. 南京:江苏科学技术出版社, 2002.
- [3] Hyouta H, Matsushima H, Sano K. Scanning electron microscopic study on the *in vitro* organogenesis of saffron stigma and style-like structures [J]. *Plant Sci*, 1988, 58: 93-102.
- [4] 陈书安, 王晓东, 赵兵, 等. 藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究 [J]. *中国药杂志*, 2003, 38: 254-256.

三七及栽培土壤中烯酰吗啉残留降解动态研究

张文斌^{1,2*}, 冯光泉^{1,2*}, 曾鸿超¹, 刘云艺¹, 武中翠¹, 周家明^{1*}

(1. 文山三七研究院, 云南 文山 663000; 2. 文山三七科技创新中心有限公司, 云南 文山 663000)

摘要:目的 确立了烯酰吗啉在三七及其栽培土壤中的一种分析方法。方法 三七和土壤样品用丙酮提取, 正己烷和醋酸乙酯液液萃取, 用固相萃取法(弗罗里硅土小柱)净化, 然后用液相色谱检测。结果 烯酰吗啉在三七块根内的半衰期为 6.2 d, 在三七茎叶内的半衰期为 3.9 d, 在土壤中的半衰期为 5.0 d; 在三七生长过程中, 按常规剂量施用烯酰吗啉农药 6 次, 间隔期 25 d 以上, 最后一次施药距采挖时间 30 d 以上, 三七植株中烯酰吗啉的残留量低于日本肯定列表对三七中烯酰吗啉残留限量标准 (≤ 0.1 mg/kg), 栽培土壤中烯酰吗啉的残留量小于 0.02 mg/kg。结论 在三七上规范喷施烯酰吗啉可溶性粉剂, 烯酰吗啉在三七植株和土壤中的降解较快, 三七质量安全, 不会对土壤环境造成污染。

关键词:三七; 烯酰吗啉; 降解

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0809-04

烯酰吗啉(dimethomorph)商品名安克、Acrobat、WL 127294、CME151 等, 化学名称为 4-[3-(4-氯苯基)-

3-(3,4-二甲氧基苯基)丙烯酰基]吗啉, Z 与 E 两种构型的比一般为 4:1。CAS 号为 110488-70-5, 分子式为

* 收稿日期: 2008-06-29

基金项目: 云南省科技攻关项目(2005NG07)

作者简介: 张文斌(1974-), 男, 苗族, 云南文山人, 助理研究员, 理学学士, 主要从事中药材栽培环境和质量检测分析研究工作, 获省级科技进步奖 1 项, 州级科技进步奖 4 项。

* 通讯作者 冯光泉

$C_{21}H_{22}ClNO_4$, 相对分子质量为 387.9。

烯酰吗啉能阻止孢子形成,对霜霉属、疫霉属病菌有特效,可用于防治黄瓜霜霉病、番茄晚疫病、马铃薯晚疫病、甜椒疫病等^[1];对防治三七霜霉病和疫病效果显著,是目前三七上常用农药之一,也是日本肯定列表针对三七列入的限量农药之一。本实验开展烯酰吗啉在三七植株和土壤中的降解过程和最终残留研究,为三七生产过程中的施药安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料:烯酰吗啉原药,济南普兰德生物科技有限公司生产,农药登记证号:L S20053364,生产批准证号 HNP37091-D3073,产品标准证号 Q/QHK108-2005;供试对象为二年生三七;试验地点在砚山郊址文山州三七研究所试验基地。

1.2 田间试验设计

1.2.1 烯酰吗啉在三七块根、茎叶及土壤中的残留消解试验:根据供试农药试验处理设置为3次重复,1个空白对照,每小区为1空,每空 3.24 m^2 ,试验共有4空。在三年生三七采挖前1个月,将烯酰吗啉兑水稀释成常规使用浓度(计算为 0.85 g/小区)喷洒到三七植株上;于施药后1 h和1、3、5、7、15、20 d在每小区内随机采集三七茎叶、块根和表层0~10 cm的土壤样品,做残留量测定。

1.2.2 烯酰吗啉在三七上的最终残留试验:将供试的烯酰吗啉原药设置两个使用质量浓度,分别为C处理(1.00 g/小区)、D处理(1.25 g/小区),每处理3次重复,每小区为1/2空,每空 1.62 m^2 ,试验共有7个小区,1个空白对照。最后一次施药距离采挖30 d。在距离采挖前3、5、7、15、20 d分别采集三七茎叶、块根和表层0~10 cm的土壤样品一次,进行残留量测定。采集的三七茎叶、块根和土壤样品若不能立即分析,需于零下 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存。

1.3 残留分析

1.3.1 仪器设备:高效液相色谱仪,色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$)柱填充剂为十八烷基甲硅烷基化硅胶(粒径 $5\text{ }\mu\text{m}$);色谱工作站,高速组织捣碎机,超纯水机,预处理小柱,常规玻璃仪器等。

1.3.2 试剂:99.0%烯酰吗啉对照品(货号RBDR-C12710000,德国生产,购自上海楚柏实验室设备有限公司),丙酮、醋酸乙酯、氯化钠、无水硫酸钠等分析纯试剂,甲醇色谱纯,去离子水。

1.3.3 样品提取及净化^[2]

1)提取:现采(或零下 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存)鲜三七样搅碎混合均匀后准确称取 20.0 g 于 150 mL 的磨

口三角瓶,加入 50 mL 丙酮,超声提取 15 min ,用涂布 1 cm 厚硅藻土的滤纸抽滤于磨口减压浓缩器中。取出滤纸上的残留物,再加入 25 mL 丙酮,超声提取 15 min 后,按上述同样操作,合并滤液于减压浓缩器中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下浓缩至约 20 mL 。将其移入预先注入 50 mL 10%氯化钠溶液的 300 mL 分液漏斗中。用 50 mL 醋酸乙酯-正己烷(1:1)混合溶液洗涤上述减压浓缩器的茄型瓶,合并洗液于上述分液漏斗中。用振荡器激烈振荡 5 min 后,静置,醋酸乙酯和正己烷层移入 300 mL 三角瓶中。水层中加入 25 mL 醋酸乙酯-正己烷(1:1)混合溶液,按上述同样操作。合并醋酸乙酯和正己烷层于上述三角瓶中。加入适量无水硫酸钠,不时振荡、混合,放置 15 min 后,滤入磨口减压浓缩器中。再用 20 mL 醋酸乙酯-正己烷(1:1)混合溶液洗涤上述三角瓶,以此洗涤液洗涤滤纸上的残留,重复操作2次。合并两洗涤液于上述减压浓缩器中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下除去醋酸乙酯和正己烷。残留物中加入 10 mL 丙酮-正己烷(3:17)混合溶液溶解。

2)净化:在内径 15 mm 、长 300 mm 色谱管中注入 5 g 悬浮在正己烷中的柱色谱用合成硅酸镁,其上面再装入约 5 g 无水硫酸钠,放出正己烷至柱上端留有少量正己烷。柱中注入提取所得的溶液后,注入 90 mL 丙酮-正己烷(3:17)混合溶液,弃去流出液。再注入 100 mL 丙酮-正己烷(3:7)混合溶液,收集流出液于磨口减压浓缩器中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下除去丙酮和正己烷。残留物中加入 1.5 mL 甲醇溶解,加水定容至 5 mL 。在十八烷基甲硅烷基化硅胶小柱(360 mg)中注入 10 mL 乙醇,弃去流出液。再注入 10 mL 水,弃去流出液。柱中注入上步所得的 5 mL 溶液,加入 15 mL 水-乙醇(7:3)混合溶液,弃去流出液。注入 10 mL 乙腈-水(1:1)混合溶液,收集流出液于磨口减压浓缩器中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下除去乙腈和水。残留物中加入水-乙醇(1:1)混合溶液溶解。准确至 5 mL 待测。

3)土壤样品的处理:取现采(或零下 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜保存)土壤样品 20.0 g ,用 50 mL 丙酮提取,正己烷和醋酸乙酯液液萃取,用固相萃取法(弗罗里硅土小柱)净化^[3]。浓缩残留物中加入水-乙醇(1:1)混合溶液溶解。准确至 5 mL 待测。

1.3.4 色谱条件:流动相为水-甲醇(1:4);柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;检测器:波长 250 nm ;体积流量: 0.8 mL/min ;烯酰吗啉(E体)约 6.5 min 流出,烯酰吗啉(Z体) 7.5 min 流出(图1)。

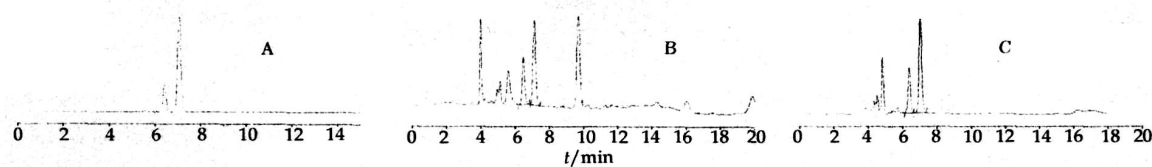


图 1 对照品(A)、三七(B)、土壤样品(C)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of reference substance (A), P. notoginseng (B), and soil sample (C)

1. 3. 5 标准曲线:精密称取 10 mg 烯酰吗啉对照品,用乙醇溶解,逐级稀释,配制成烯酰吗啉(E 体) 0.05、0.1、0.2、0.25、0.5 μg/mL,烯酰吗啉(Z 体) 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0 μg/mL 的标准系列,按色谱条件进样,烯酰吗啉(E 体)在 0.05~0.5 μg/mL 质量浓度,烯酰吗啉(Z 体)0.2~2.0 μg/mL 线性关系良好,回归方程分别为烯酰吗啉(E 体): $Y = 1\,937.6 X + 1\,518.9$, $r = 0.999\,8$;烯酰吗啉(Z 体): $Y = 1\,938 X + 338.1$, $r = 0.999\,3$ 。

1. 3. 6 加样回收率试验:取已知质量浓度的同一三七样品供试液 3 份,每份 10 mL 分别添加 0.5 μg/mL 的烯酰吗啉标准液 5.0、10.0 和 20.0 mL,各取 10 μL 进样,得平均回收率 97.6%,RSD 为 2.93%。

1. 3. 7 精密度试验:取同一三七样品,制备供试品溶液,取 10 μL 连续进样 6 次,色谱峰面积 RSD 为 1.19%。

1. 3. 8 重现性试验:取同一三七样品 6 份,制备供试品溶液,各取 10 μL 进样分析,色谱峰面积的 RSD 为 0.97%。

1. 3. 9 稳定性试验:取同一三七样品,制备供试品溶液,取 10 μL 分别于 1、2、4、8、16、24 h 进样,色谱峰面积 RSD 为 1.53%。

2 结果与分析

2.1 烯酰吗啉在三七块根、茎叶及土壤中的降解规律探讨:从图 2 和表 1 可以看出,烯酰吗啉在土壤和茎叶中 1~5 d 消解速度较快;而三七作为根部吸收,第 5 天达最高值,5 d 后开始降解。根据消解方程 $C_t = C_0 e^{-kt}$ (C_t 为时间 t 时的农药残留量, C_0 为施药后的原始沉积量, k 为消解系数, t 为施药时间),其在三七、茎叶及土壤中的消解方程及半衰期

如下: $C_t = 0.621\,1e^{-0.111\,6t}$, $r^2 = 0.896\,1$, $t_{1/2} = 6.2$;
 $C_t = 0.661\,8e^{-0.175\,7t}$, $r^2 = 0.940\,7$, $t_{1/2} = 3.9$, $C_t = 0.592\,8e^{-0.138\,5t}$, $r^2 = 0.915\,4$, $t_{1/2} = 5.0$ 。

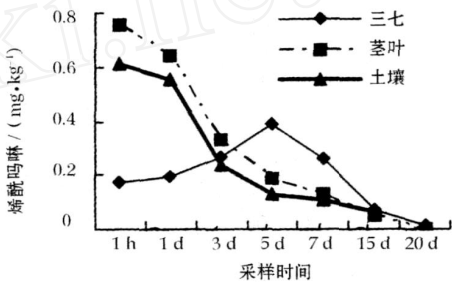


图 2 三七块根、茎叶及土壤中烯酰吗啉残留折线图

Fig. 2 Curves of roots, stems, and leaves of P. notoginseng and dimethomorph residue in soil

表 1 三七块根、茎叶及土壤中烯酰吗啉残留量

Table 1 Roots, stems, and leaves of P. notoginseng and dimethomorph residue in soil

采样时间/d	烯酰吗啉		
	块根/(mg·kg ⁻¹)	茎叶/(mg·kg ⁻¹)	土壤/(mg·kg ⁻¹)
1/24	0.171 2	0.755 1	0.615 8
1	0.195 3	0.642 1	0.565 2
3	0.264 1	0.363 4	0.436 5
5	0.319 6	0.241 6	0.283 2
7	0.278 5	0.135 9	0.145 3
15	0.169 2	0.058 4	0.089 6
20	0.052 1	痕量	痕量

2.2 烯酰吗啉在三七、茎叶及土壤中的最终残留结果:按两个常规浓度施药 6 次后采样检测,从表 2 看出,使用量为 0.617 g/m² (1 000 倍液)时,三七块根、茎叶及土壤中烯酰吗啉残留分别为 0.076、0.012和 0.011 mg/kg;当使用 0.771 g/m² (1 000 倍液)时,其烯酰吗啉残留分别为 0.089、0.028 和 0.015 mg/kg。

表 2 三七块根、茎叶及土壤中烯酰吗啉残留量

Table 2 Roots, stems, and leaves of P. notoginseng and dimethomorph residue in soil

最后一次施药后 采样时间	施 0.617 g/m ² (1 000 倍液) 残留量/(mg·kg ⁻¹)			施 0.771 g/m ² (1 000 倍液) 残留量/(mg·kg ⁻¹)		
	三七	茎叶	土壤	三七	茎叶	土壤
1 h	0.243	0.293	0.265	0.284	0.353	0.271
1 d	0.271	0.263	0.237	0.292	0.287	0.243
3 d	0.325	0.241	0.158	0.356	0.259	0.162
5 d	0.238	0.105	0.119	0.249	0.129	0.128
7 d	0.167	0.086	0.067	0.213	0.108	0.072
15 d	0.113	0.033	0.012	0.175	0.076	0.019
20 d	0.076	0.012	0.011	0.089	0.028	0.015

3 结论

3.1 三七上喷施烯酰吗啉可溶性粉剂,其在三七块根内的半衰期为 6.2 d,茎叶内的半衰期为 3.9 d、在土壤中的半衰期为 5.0 d,尤其在三七植株和土壤中的降解较快。

3.2 三七生长过程中,按常规浓度和频次施用烯酰吗啉,最后一次施药距采挖时间 25 d 以上,其在三七及茎叶中烯酰吗啉残留量小于日本肯定列表规定三七中烯酰吗啉限量 ($\leq 0.1 \text{ mg/kg}$),在土壤中的残留量为低于 0.02 mg/kg 。

按三七传统栽培方法,为节约成本和降低农药残留,在三七采挖前一月左右,不再施用农药,就烯酰吗啉而言,只要控制好用药剂量和间隔期,既可有效防治三七病害,又可保证三七质量安全。

参考文献:

- [1] 宋春国,于建奎,李瑞娟,等. 烯酰吗啉在黄瓜中的残留降解动态 [J]. 中国蔬菜, 2006, 11: 28-29.
- [2] JAP-150 烯酰吗啉检测方法 [S]. 2006.
- [3] 朴秀英,吴凌云,邹积鑫,等. 烯酰吗啉在土壤中残留测定方法研究 [J]. 农药科学与管理, 2006, 27(1): 7-9.

含羞草中 6 种黄酮苷的 RP-HPLC 测定

朱建鑫^{1,2},袁珂^{1*}

(1. 浙江林学院 天然药物研发中心,浙江 临安 311300;2. 河南中医学院药学院,河南 郑州 450008)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 法同时测定含羞草中 6 种黄酮苷的量。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇(A)-1%冰醋酸水溶液(B) (25 : 75),体积流量 0.8 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 340 nm。结果 6 个成分均能达到基线分离,异荭草苷(I)、荭草苷(II)、5,7,3',4'-四羟基-8-G[α-L-鼠李糖-(1→2)]-β-D-葡萄糖苷(III)、牡荆苷(IV)、异牡荆苷(V)、5,7,3',4'-四羟基-8-G[β-D-芹糖-(1→4)]-β-D-葡萄糖苷(VI)的线性范围分别为 0.260~1.300 μg ($r = 0.9999$), 0.490~2.450 μg ($r = 0.9999$), 0.700~3.500 μg ($r = 0.9999$), 0.276~1.380 μg ($r = 0.9998$), 0.266~1.330 μg ($r = 0.9999$), 0.750~3.750 μg ($r = 0.9997$);平均回收率分别为 98.6% (RSD = 2.31%), 98.2% (RSD = 2.04%), 96.4% (RSD = 1.85%), 96.9% (RSD = 1.47%), 97.3% (RSD = 2.19%), 97.5% (RSD = 1.76%)。结论 本研究所建立的方法操作简便、结果可靠,为该类药材的入药及资源的质量评价提供了实验依据。

关键词:含羞草;黄酮苷;RP-HPLC

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0812-03

含羞草为豆科(Leguminosae)含羞草属植物含羞草 *Mimosa pudica* L. 的全草^[1]。原产于热带美洲,现广泛分布于世界热带地区,我国主要分布在华南、华东、西南等地的山坡丛林、湿地、路旁,植物资源丰富。含羞草具有清热利尿、化痰止咳、安神止痛之功效,临床多用于急性肝炎、肺结核咳血及带状疱疹等症^[2]。在前期研究中,已从含羞草全草中分离得到了黄酮苷类、酚类等化合物^[3~7]。在上述研究的基础上建立了含羞草中 6 种黄酮苷的 HPLC 测定方法,并对采自不同地区的含羞草叶及茎进行了定量测定分析,为有效控制含羞草的质量及进一步开发利用含羞草资源提供了参考依据。

1 仪器、试剂与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 PAD 检测器; Empower 色谱工作站; AB265-S 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), Millipore 超纯水机(法国 Millipore 公司), 甲醇、乙腈为色谱纯试剂,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

5,7,3',4'-四羟基-8-G[α-L-鼠李糖-(1→2)]-β-D-葡萄糖苷、5,7,3',4'-四羟基-8-G[β-D-芹糖-(1→4)]-β-D-葡萄糖苷、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷 6 种对照品均由本实验室分离得到,通过¹H-NMR 和¹³C-NMR、MS 测定^[3~7],并与相关文献报道对比确证了结构,且通过 HPLC 峰面积归一化法标定质量分数均在 98% 以上。含羞草样品于 2007 年 8 月分别采自三亚、南宁、广州及福州不同地区,由海南大学药用

* 收稿日期:2008-08-04

基金项目:浙江省森林培育重中之重学科开放基金资助项目(200607)

作者简介:朱建鑫(1984—),男,硕士,主要从事中药化学成分研究。

* 通讯作者 袁珂 Tel:(0571)63743607 E-mail:yuan_ke001@163.com