



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116195443 B

(45) 授权公告日 2023.09.26

(21) 申请号 202310263000.X

KR 20170123079 A, 2017.11.07

(22) 申请日 2023.03.17

CN 112640681 A, 2021.04.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 114010678 A, 2022.02.08

申请公布号 CN 116195443 A

CN 115474550 A, 2022.12.16

(43) 申请公布日 2023.06.02

JP H09220037 A, 1997.08.26

(73) 专利权人 中山大学附属第一医院

KR 20100132621 A, 2010.12.20

地址 510000 广东省广州市中山二路58号

KR 20180007546 A, 2018.01.23

(72) 发明人 张洲 鲍赫楠 余秋华

KR 20220096693 A, 2022.07.07

(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务  
所(普通合伙) 44365

VN 47426 A, 2016.06.27

专利代理师 曾凤云

WO 2018152980 A1, 2018.08.30

(51) Int. Cl.

WO 2022022269 A1, 2022.02.03

A01G 7/04 (2006.01)

何梦玲;何芳;熊洋;马嘉瑜;龚伟骏;严寒  
静. 茉莉酸甲酯对广藿香叶中百秋里醇含量的影  
响. 北方园艺. 2014, (第05期), 第147-150页.

A01H 4/00 (2006.01)

姬生国;蔡佳良;卢慧娟;郑志通. 不同光照  
强度对广藿香中百秋李醇含量的影响. 湖北农业  
科学. 2016, (第02期), 第406-409页.

(56) 对比文件

CN 108901399 A, 2018.11.30

审查员 王企

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

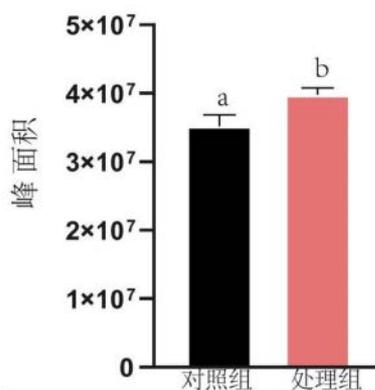
(54) 发明名称

提高广藿香中百秋李醇含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光 $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红光 $12\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红外光 $0.8\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 1.2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 。在本发明中,对广藿香组培苗进行光照处理时,通过去除光质中的蓝光,而保留其他光质,在此构思下,能显著提高广藿香百秋李醇合成酶基因的表达量,从而提高广藿香中百秋李醇的含量。

百秋李醇



1. 一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法,其特征在於,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ~ $24 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红光 $12 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ~ $16 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红外光 $0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ~ $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;所述光照处理的天数为50天~70天;每天所述光照处理的时间为10 h~14 h;所述光照处理的强度为2500 lux~3500 lux;所述广藿香组培苗的株高为5 cm~6 cm;所述光照处理的温度为 $23^{\circ}\text{C}$ ~ $27^{\circ}\text{C}$ 。

2. 根据权利要求1所述的提高广藿香中百秋李醇含量的方法,其特征在於,所述光照处理的天数为55天~65天。

3. 根据权利要求1所述的提高广藿香中百秋李醇含量的方法,其特征在於,每天所述光照处理的时间为11 h~13 h。

4. 一种广藿香的种植方法,其特征在於,应用权利要求1~3任一项所述的提高广藿香中百秋李醇含量的方法。

## 提高广藿香中百秋李醇含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,更具体地,本发明涉及一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法以及一种广藿香的种植方法。

### 背景技术

[0002] 广藿香 *Pogostemon cabin* (Blanco) Benth 为唇形科刺蕊草属植物,具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑等功效。广藿香经蒸馏得到的广藿香挥发油,被广泛应用于食品、药品、日化用品等领域。

[0003] 百秋李醇是一种倍半萜类化合物,是广藿香挥发油中含量最高的组分。《中国药典》规定,广藿香干燥药材中百秋李醇的含量不得少于 0.10%。目前,全球百秋李醇及其精油混合物年产量超过 1000 吨,但年需求量高达 2000 吨,且全球百秋李醇 90% 的产量来自印度尼西亚,我国本土百秋李醇的供应严重不足。

[0004] 有研究表明,外源施用植物激素茉莉酸甲酯可以提高广藿香中百秋李醇的含量,但是,这一方法不仅极大地增加了生产成本,而且植物激素的过度施用,也会影响广藿香的品质和安全。

[0005] 因此,寻找一种经济、安全地提高广藿香中百秋李醇的含量的方法,对于缓解医疗和生产生活对百秋李醇的需求,有着重要的意义。

### 发明内容

[0006] 基于此,本发明的目的在于提供一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法及广藿香的种植方法。

[0007] 实现上述发明目的的技术方案包括如下。

[0008] 本发明的第一方面,提供了一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光  $20\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 24\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红光  $12\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 16\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红外光  $0.8\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 1.2\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0009] 本发明的第二方面,提供了一种广藿香的种植方法,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光  $20\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 24\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红光  $12\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 16\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 、红外光  $0.8\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \sim 1.2\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

[0010] 在本发明中,对广藿香组培苗进行光照处理时,通过去除光质中的蓝光,而保留其他光质,在此构思下,能显著提高广藿香百秋李醇合成酶基因的表达量,从而提高广藿香中百秋李醇的含量。

### 附图说明

[0011] 图1为本发明试验例1中不同光照条件对广藿香叶片中百秋李醇含量的质谱测定

峰图。

[0012] 图2为图1中质谱测定峰图的峰面积结果。

[0013] 图3为本发明试验例2中不同光照条件对广藿香叶片中百秋李醇合成酶基因表达量的检测结果。

### 具体实施方式

[0014] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0015] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0016] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Green和 Sambrook等人,分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2013)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0017] 在本发明的其中一些实施例中,公开了一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光 $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红光 $12\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红外光 $0.8\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 1.2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 。

[0018] 本发明的发明人在实验中意外发现,对广藿香组培苗进行光照处理时,去除光质中的蓝光,而保留其他光质(绿光、红光和红外光保持不变),在此操作下,能显著提高广藿香百秋李醇合成酶基因的表达量,从而提高广藿香中百秋李醇的含量。

[0019] 在其中一些实施例中,所述光照处理的天数为50天~70天。

[0020] 在其中一些实施例中,所述光照处理的天数为55天~65天。

[0021] 在其中一些实施例中,所述每天光照处理的时间为10h~14h。

[0022] 在其中一些实施例中,所述每天光照处理的时间为11h~13h。

[0023] 在其中一些实施例中,所述光照处理的强度为2500lux~3500lux。

[0024] 在其中一些实施例中,所述广藿香组培苗的株高为5cm~6cm。

[0025] 在其中一些实施例中,所述光照处理温度为23℃~27℃。

[0026] 在本发明的另一些实施例中,公开了一种广藿香的种植方法,所述方法包括以下步骤:对广藿香组培苗进行光照处理后,采收广藿香叶片;所述光照处理包括:绿光 $20\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 24\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红光 $12\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 16\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 、红外光 $0.8\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}\sim 1.2\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 。

[0027] 在其中一些实施例中,所述光照处理的天数为50天~70天。

[0028] 在其中一些实施例中,所述每天光照处理的时间为10h~14h。

[0029] 在其中一些实施例中,所述光照处理的强度为2500lux~3500lux。

[0030] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0031] 实施例1一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法

[0032] 包括以下步骤:

[0033] 1、广藿香叶片表面酒精消毒

[0034] 采取广藿香第三对叶片,将摘取的叶片表面清洗干净后,吸干叶片表面残留的水珠。将叶片放入75%乙醇后,来回涮10秒后,将叶片转移至第一瓶无菌水中,摇晃30秒,叶片应跟随水旋转。摇晃完毕后将叶片依次放入第二瓶与第第三瓶无菌水中,摇晃时间均为60秒。

[0035] 2、广藿香叶片表面升汞消毒

[0036] 取0.1g升汞粉末放入100ml纯水,配制成0.1%浓度的升汞溶液,超声至升汞完全溶解,滴加一滴吐温-80,即配制成升汞消毒液。

[0037] 将经酒精消毒过的叶片转移至升汞消毒液中,摇晃8分钟左右。摇晃力度不应过大,叶片能跟随水摇晃起来即可,力度过大叶片损伤加大。摇晃期间注意观察叶片的状态。摇晃完毕后将叶片依次放入第四至第七瓶无菌水中,摇晃时间依次是30秒,60秒,60秒,60秒,即消毒完成。

[0038] 3、广藿香丛生芽的诱导

[0039] 在超净工作台上将消毒后的叶片切成大约0.5cm×0.5cm的小块,置于广藿香丛生芽诱导培养基(培养基组分见表1)上,置于(25±2)℃培养室中进行培养,用日光灯照明,光照时间为12h/d(8:00~20:00),光照强度为2500lux。2~3个月后,诱导出广藿香丛生芽。

[0040] 表1

[0041]

组 成	丛芽诱导培养基	生根培养基
<b>大量元素(mg/L)</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
<b>微量元素(mg/L)</b>		
KI	0.83	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
<b>铁盐(mg/L)</b>		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3
<b>有机成分(mg/L)</b>		

	肌醇	100	100
	烟酸	0.5	0.5
	盐酸吡哆醇(维生素 B6)	0.5	0.5
	盐酸硫胺素(维生素 B1)	1.0	1.0
	甘氨酸	2.0	2.0
[0042]	<b>植物激素(mg/L)</b>		
	6-BA	0.10	0
	NAA	0.20	0
	IBA	0	0.50
	<b>蔗糖</b>	30g/L	30g/L
	<b>pH</b>	5.8	5.8

[0043] 4、广藿香丛生芽诱导生根为组培苗

[0044] 将生长健壮的广藿香丛生芽转移到生根培养基(培养基组分见表1)上,置于(25±2)℃培养室中进行培养,用日光灯照明,光照时间为12h/d(8:00~20:00),光照强度为2500lux,培养约2个月,诱导生根。

[0045] 5、对组培苗进行处理

[0046] 当生根的广藿香组培苗株高达到5~6cm时,即可进行处理。

[0047] 将组培苗放入人工气候培养箱中,接受光照,光照条件为:蓝光:0;绿光:22 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红光:14 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红外光:1 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。培养箱温度调整为25℃,培养两个月,采收广藿香叶片。

[0048] 实施例2一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法

[0049] 包括以下步骤:

[0050] 步骤1~4同实施例1。

[0051] 5、对组培苗进行处理

[0052] 当生根的广藿香组培苗株高达到5~6cm时,即可进行处理。

[0053] 将组培苗放入人工气候培养箱中,接受光照,光照条件为:蓝光:0;绿光:20 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红光:15 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红外光:1.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。培养箱温度调整为26℃,培养两个月,采收广藿香叶片。

[0054] 实施例3一种提高广藿香中百秋李醇含量的方法

[0055] 包括以下步骤:

[0056] 步骤1~4同实施例1。

[0057] 5、对组培苗进行处理

[0058] 当生根的广藿香组培苗株高达到5~6cm时,即可进行处理。

[0059] 将组培苗放入人工气候培养箱中,接受光照,光照条件为:蓝光:0;绿光:24 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红光:12 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ;红外光:0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。培养箱温度调整为24℃,培养两

个月,采收广藿香叶片。

[0060] 对比例

[0061] 本对比例为对照实验,取和实施例1生长期一致、长势一致的广藿香组培苗,放入人工气候培养箱,接受光照,光照条件为正常光照,即:蓝光: $14\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ;绿光: $22\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ;红光: $14\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ;红外光: $1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ 。培养箱温度调整为 $25^\circ\text{C}$ ,培养两个月,采收广藿香叶片。

[0062] 试验例1不同光照条件对广藿香叶片中百秋李醇含量的影响

[0063] 剪取实施例1和对比例的叶片。利用直径为6mm的打孔器在同一叶龄的实施例1和对比例的叶片获取面积一样的样品。采用Agilent 8890-5977B气质联用仪,以固相微萃取-顶空进样-气质联用(SPME-HS-GC-MS)检测方法测定挥发性物质中百秋李醇的含量。

[0064] 具体方法为:将广藿香叶片加入到15mL顶空进样瓶中,在 $50^\circ\text{C}$ 在下孵育10min,用50/30 $\mu\text{m}$  CAR/PDMS/DVB萃取头在 $50^\circ\text{C}$ 下萃取5min,于 $250^\circ\text{C}$ 解吸1min。色谱柱为Agilent HP-5MS毛细管柱(0.25mm $\times$ 30m,0.25 $\mu\text{m}$ )。载气为高纯氦气,载气流速为1.2mL/min,进样口温度 $250^\circ\text{C}$ ,分流比20:1。程序升温:起始温度 $45^\circ\text{C}$ ,保持0.5min,以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $280^\circ\text{C}$ ,保持0.5min。离子源EI源,电子能量为70eV,扫描方式为全扫描,质量范围m/z 50-450。化合物鉴定及数据处理:采用色谱峰面积归一化法计算化合物的相对含量,结合NIST2017标准质谱图库,通过Agilent MassHunter化学工作站进行化合物鉴定。

[0065] 广藿香叶片中挥发性物质的质谱测定峰图如图1所示,图1对应的峰图的峰面积(即百秋李醇含量)结果如图2所示。从图2结果可知,实施例1(图中为处理组)中百秋李醇的含量相对于对比例(图中为对照组)显著上升,说明将光照中的蓝光调为0,可以显著促进广藿香中百秋李醇含量的提升。

[0066] 试验例2不同光照条件对广藿香叶片百秋李醇合成酶的转录水平的影响

[0067] 剪取实施例1和对比例的广藿香叶片,采用荧光定量PCR检测叶片中百秋李醇合成酶基因的表达式,具体方法包括以下步骤:

[0068] 1、提取植物组织总RNA

[0069] 将样品置于1.5ml离心管,液氮研磨后加入1ml Trizol;用力混匀,冰上放置5分钟;加入0.2ml氯仿,震荡或颠倒混匀,冰上放置5分钟; $12000g, 4^\circ\text{C}$ ,离心12分钟;取上清至一新的离心管中,加入0.5ml异丙醇,混匀后 $-20^\circ\text{C}$ 放置10-30分钟; $12000g, 4^\circ\text{C}$ ,离心12分钟;弃上清,75%乙醇漂洗沉淀2~3次,晾干后用适量DEPC水溶解, $-20^\circ\text{C}$ 保存备用。

[0070] 2、逆转录cDNA第一链的合成

[0071] 使用TaKaRa的PrimeScript<sup>®</sup>RT reagent Kit With gDNA Eraser(Takara, RR047A),反转录第一步采用10 $\mu\text{L}$ 反应体系,体系配制如表2。

[0072] 表2

[0073]

Total volume	10 $\mu\text{l}$
Total RNA	1 $\mu\text{g}$
5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2 $\mu\text{l}$
gDNA Eraser	1 $\mu\text{l}$
RNAase Free H <sub>2</sub> O	upto 10 $\mu\text{l}$

[0074] 轻弹EP管使反应液混匀后瞬时离心,42℃温育2分钟(PCR仪上进行)。之后进行反转录第二步,采用20μL反应体系,体系配制如表3。

[0075] 表3

	Total volume	20 μl
	5×PrimeScript ®Buffer 2(for Real Time PCR)	4 μl
[0076]	Prime Scrip ® RT Enzyme Mix I	1 μl
	RT Primer Mix*4	1 μl
	RNAase Free dH <sub>2</sub> O	up to 20μl

[0077] 轻弹EP管混匀试剂,瞬时离心后,在37℃温育15分钟,85℃5秒,于-20℃保存。

[0078] 3、荧光实时定量PCR

[0079] 将反转录所得20μL cDNA产物以ddH<sub>2</sub>O稀释10倍使用。反应体系配制采用10μL反应体系,体系配制如表4。

[0080] 表4

	试剂	体积(μL)
[0081]	2×SYBR Premix Ex Taq	5
	Forward Primer (10 μM)	0.2
[0082]	Reverse Primer (10 μM)	0.2
	cDNA	1
	ddH <sub>2</sub> O	3.6

[0083] 利用Roche荧光定量PCR仪进行扩增,反应程序为:

95°C 5 min

95°C 10 s

55°C 10 s

45 个循环

[0084] 72°C 30 s

95°C 1 s

60°C 15 s

40°C 40 s

[0085] 4、反应完毕数据由LightCycler480 Software1.5处理,然后由 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析方法计算基因表达量。

[0086] 本试验例利用荧光定量PCR检测广藿香叶片中百秋李醇合成酶(PatPTS)的转录水

平,结果如图3所示。从图3可知,相对于对比例中(图中为对照组)百秋李醇合成酶基因的转录水平,实施例1中(图中为处理组)百秋李醇合成酶基因的转录水平有显著上升,说明由于百秋李醇合成酶基因转录水平的提升,使得百秋李醇的含量得以提升。

[0087] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0088] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

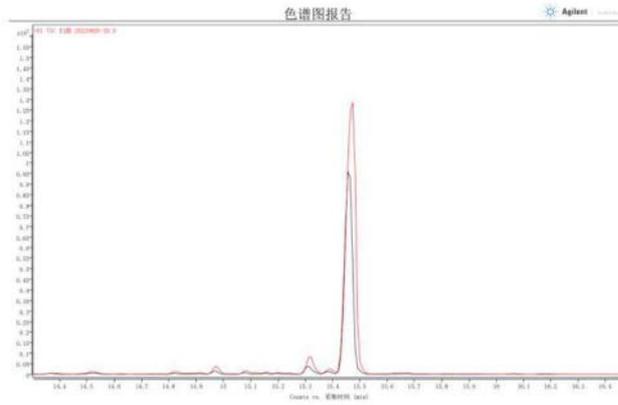


图1

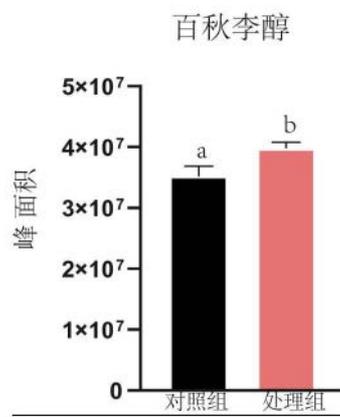


图2

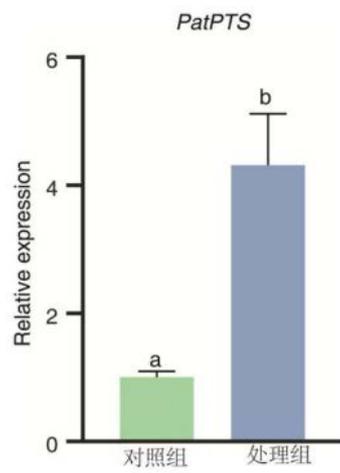


图3