

· 研究论文 ·

高效液相色谱-蒸发光散射检测器检测 24-表芸苔素内酯原药含量

曹立冬¹, 杨晶¹, 郑丽¹, 王冬伟², 黄啟良^{*1}

(1. 农业部作物有害生物综合防治重点实验室/中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;
2. 南京大学化学化工学院, 南京 210093)

摘要:建立了高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)检测24-表芸苔素内酯原药含量的分析方法。在优化的ELSD条件(漂移管温度50℃、增益值10、辅助气压力350kPa)下,采用Eclipse XDB C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm,5μm),以V(乙腈):V(水)=55:45等度洗脱、流速为1.0mL/min、柱温30℃时,24-表芸苔素内酯原药中的有效成分和其他组分在10min内能达到基线分离。在43.8~700.7mg/L范围内,24-表芸苔素内酯峰面积的对数与质量对数间线性关系良好,回归方程的相关系数为0.9993,相对标准偏差(RSD,n=7)为0.75%,平均回收率为99.7%。该方法简单实用,可为24-表芸苔素内酯及其他芸苔素甾醇的质量控制提供一种准确可行的检测方法。

关键词:24-表芸苔素内酯;高效液相色谱;蒸发光散射检测器;定量检测

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2014.01.13

中图分类号:O657.72;S482.8 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2014)01-0072-06

Quantitative determination of 24-epibrassinolide by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector

CAO Lidong¹, YANG Jing¹, ZHENG Li¹, WANG Dongwei², HUANG Qiliang^{*1}

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. School of Chemistry & Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: A rapid high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method for determination of 24-epibrassinolide has been established. The optimized ELSD conditions were as follows: drift tube temperature is 50℃, gain value is 10 and the auxiliary gas pressure is 350 kPa. The determination was carried out on a Eclipse XDB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile and water (V/V = 55:45), column temperature set at 30℃ and flow rate of 1.0 mL/min. Complete separation of the main composition and impurities with similar chemical structures was achieved in 10.0 min under optimized conditions. The developed method was fully validated. The results showed that the regression of logarithmic value

收稿日期:2013-11-13;修回日期:2013-12-30.

作者简介:曹立冬,男,博士,副研究员,主要从事农药剂型加工与质量控制技术研究,E-mail:caolidong@caas.cn;*黄啟良,通信作者(Author for correspondence),男,博士,研究员,主要从事农药剂型加工与质量控制技术研究,E-mail:qlhuang@ippcaas.cn.

of peak area on the logarithmic value of the mass injected fitted a linear relationship well ($r = 0.9993$) at the concentration levels ranging from 43.8 – 700.7 mg/L. The relative standard deviations (RSD, $n = 7$) was 0.75% and the mean recovery was 99.7%. The optimized and validated method is efficient, accurate and easy to use, which provides reliable method for determination and quality control of 24-epibrassinolide and other brassinosteroids.

Key words: 24-epibrassinolide; high-performance liquid chromatography (HPLC); evaporative light scattering detector (ELSD); content determination

Mitchell 等于 1970 年发现一种花粉粗提取物可以促进豆类秧苗生长,将其称之为 Brassins^[1]。1979 年, Grove 等从蜜蜂采集的 40 kg 油菜 (*Brassica napus*) 花粉中分离到 4 mg 高活性物质,经 X-射线晶体衍射分析,首次确定其结构并命名为芸苔素内酯(brassinolide, BL)(图 1a)^[2]。此后,人们陆续发现了超过 60 种天然芸苔素内酯类化合物及其甾醇类似物,统称为芸苔素甾醇(brassinosteroids, BRs)^[3]。1998 年,在日本千叶举行的第 16 届国际植物生长物质学会会议上,BRs 被正式确认为是继生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落

酸、乙烯之后的第六类植物激素^[4]。

在众多的芸苔素甾醇植物激素中,芸苔素内酯类化合物(BLs)因其活性最高而被广泛应用于农业生产^[3]。BLs 虽然在自然界中广泛存在,但含量极微,提取费时费力,因而使其应用受到限制^[5]。以豆甾醇为原料可以合成芸苔素内酯,为芸苔素内酯的应用开辟了新的途径^[6],但豆甾醇价格昂贵,不适合工业化。以自然界广泛存在的麦角甾醇为起始原料可合成芸苔素内酯的立体异构体 24-表芸苔素内酯(24-epi BL,图 1b)^[7],而且 24-表芸苔素内酯具有生物活性高和人工合成效率高等优势^[8]。

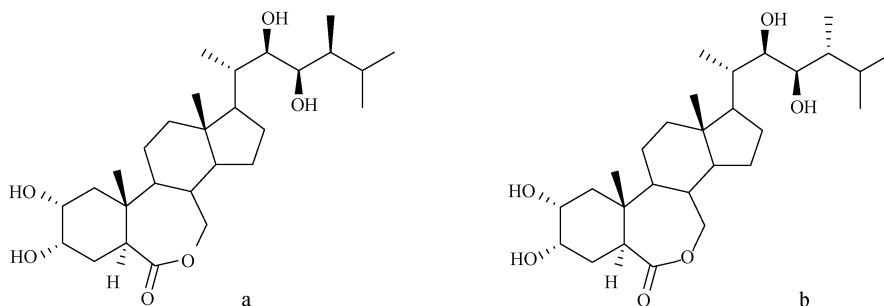


图 1 芸苔素内酯(a)和 24-表芸苔素内酯(b)化学结构

Fig. 1 The chemical structures of brassinolide (a) and 24-epibrassinolide (b)

由于 BLs 分子中缺乏对光、电响应的基团,且挥发性差,较难离子化,其直接质谱响应值不高,因此通常利用 BLs 分子中特征的顺式邻二羟基与烷基硼酸结合,引入生色团或者电活性基团,以甲基硼酸^[9]、苯硼酸^[10]、萘硼酸^[11]、菲硼酸^[12]、二茂铁硼酸^[13]为衍生化试剂,采用质谱、紫外、荧光或电化学检测器进行检测^[14]。虽然利用硼酸衍生化分析可以大大提高检测的灵敏度,但是衍生化操作繁琐,不确定因素较多^[15]。对于原药质量控制而言,如果其中的组分不含有双羟基官能团,则不能与硼酸衍生化试剂反应,在常规的紫外检测条件下没有足够的色谱响应,不能正确反映原药组分及质量信息,不利于 24-表芸苔素内酯原药的质量控制和工艺优

化,因此有必要开发简便高效的检测方法对其进行质量控制。

蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)是基于溶质光散射线性的检测器。色谱柱流出液导入雾化器后,辅助气将其雾化成微细液滴,液滴通过漂移管时,流动相中的溶剂被蒸发掉,只留下溶质,激光束照在溶质颗粒上产生光散射,由光捕集管收集散射光并通过光电倍增管转变成电信号。因为散射光强只与溶质颗粒大小和数量有关,而与溶质本身的物理和化学性质无关,所以 ELSD 属于通用型和质量型检测器,适用于无紫外吸收、无电活性和不发荧光的样品的检测^[16]。关于高效液相色谱-蒸发光散射检测器

测定 BLs 还未见报道,笔者通过对 ELSD 条件的优化,建立了 24-表芸苔素内酯原药快速高效的色谱分析方法,以期为其他芸苔素甾醇植物激素的分析检测提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 仪器、试剂与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱系统,包括 G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G4218A 蒸发光散射检测器(ELSD)、G315D 二极管阵列检测器(DAD)及 Agilent ChemStation 色谱工作站,美国 Agilent 公司;MilliQ 超纯水纯化系统,美国 Millipore 公司;KQ3200B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;MS 电子天平(精确到 0.000 01 g),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

24-表芸苔素内酯标准品(纯度 92.50%,百灵威科技有限公司);苯硼酸(纯度 99.0%,百灵威科技有限公司);24-表芸苔素内酯原药(购于市场);甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher Scientific),水为色谱用超纯水,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 标准溶液配制

准确称取 24-表芸苔素内酯标准品约 7 mg(精确至 1×10^{-5} g),先用甲醇超声溶解并定容至 10 mL,配制成约 700 mg/L 的标准储备液,再用甲醇梯度稀释成 700.7、350.3、175.2、87.6 和 43.8 mg/L 的系列标准溶液,用于 24-表芸苔素内酯标准工作曲线的绘制。

1.3 样品溶液配制

将 24-表芸苔素内酯原药充分混匀后,准确称取约 10 mg(精确至 1×10^{-5} g)置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为 200 mg/L 的母液,作为原药测定的样品溶液。

1.4 HPLC-ELSD 检测条件

色谱柱:Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm,超密键合及双封端,pH 2~9);柱温 30 ℃;流速 1.0 mL/min;进样量 5 μL;流动相 V(乙腈):V(水)=55:45。ELSD 参数:漂移管温度 50 ℃,增益值 10,过滤 5 s,辅助气(氮气)压力 350 kPa。

1.5 标准曲线绘制

取配制好的标准溶液,按照 1.4 节的条件进行测定。以峰面积的对数(y)对质量的对数(x,mg)进行线性回归,得到 24-表芸苔素内酯的线性回归方程和相关系数(r)。

1.6 方法的精密度与准确度

按照 1.3 节方法,在 1.4 节的条件下,连续注入数针标准溶液,待相邻两针的相对响应值变化小于 1.5% 时,进行样品溶液测定,7 次重复。计算测定结果的相对标准偏差(RSD),并与 Horwitz 公式^[17]计算出的 RSD_r 进行比较。

分别准确称取已知含量的 24-表芸苔素内酯原药约 9、10 和 12 mg(精确至 1×10^{-5} g)于 50 mL 容量瓶中,添加 1 mL 700.7 mg/L 芸苔素内酯标准储备液,用甲醇定容至刻度,按照 1.4 节的条件进行分析,测定方法的准确度。

1.7 苯硼酸衍生化 HPLC-DAD 分析

1.7.1 样品溶液配制 称取 24-表芸苔素内酯原药约 0.01 g(精确至 1×10^{-5} g)置于 25 mL 容量瓶中,用 10 mL 甲醇溶解,加入质量浓度为 1.0 mg/mL 的苯硼酸-甲醇溶液 10 mL,于室温下反应 0.5 h。反应完毕,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜即得试样溶液。

1.7.2 HPLC-DAD 检测条件 色谱柱:Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm,超密键合及双封端,pH 2~9);柱温为 30 ℃;流速为 1.0 mL/min;进样量为 5 μL;流动相为 V(乙腈):V(水)=80:20;检测波长为 222 nm。

2 结果与讨论

2.1 ELSD 条件优化

2.1.1 漂移管温度对灵敏度的影响 冯埃生等^[18]考察了影响 ELSD 检测性能的基本因素,发现漂移管温度过低时流动相得不到充分挥发,使基线水平较高;温度过高则可能带来更大的噪声。本研究考察了 40、50、60、70 和 80 ℃ 5 个温度下的信噪比。结果(见图 2a)发现:随着温度升高信噪比呈先升后降的变化趋势,当温度为 50 ℃ 时信噪比最高,因此,选择 50 ℃ 作为最佳的漂移管温度。

2.1.2 增益值对灵敏度的影响 调节增益可以使信号变大,一般当增益调整一个数值时信号强度变为原来的 2 倍,增益的数值较小时对基线噪声的影响比较小,但是当增益的数值较大时噪声也会明显增加,因此需筛选合适的增益值以提高灵敏度。本研究设置 5、6、7、8、9、10、11 和 12 共 8 个增益值,考察了其 对 信 噪 比 的 影 响。结果(见图 2b)发现:随着增益值的增大,信噪比逐渐变大,但达到一定值后则开始变小;其中增益值为 11 和 12 时,基线波动比较大,故确定最佳的增益值为 10。

2.1.3 辅助气压力对灵敏度的影响 本研究考察了 300、310、320、330、340、350、360、370、380、390 和 400 kPa 11 个不同辅助气压力对信噪比的影响。结果(见图 2c)发现:除 300 kPa 外,随压力增加信噪比开始逐渐变大,当信噪比达到一定值时,随着压力增加信噪比反而减小;当辅助气的压力为 300 kPa

时,基线不定时的在各处出现梯形峰,所以选择辅助气压力为 350 kPa。

综合以上结果,最终确定 24-表芸苔素内酯蒸发光散射检测器的最佳检测条件为漂移管温度 50 °C、增益值 10 和辅助气压力 350 kPa。

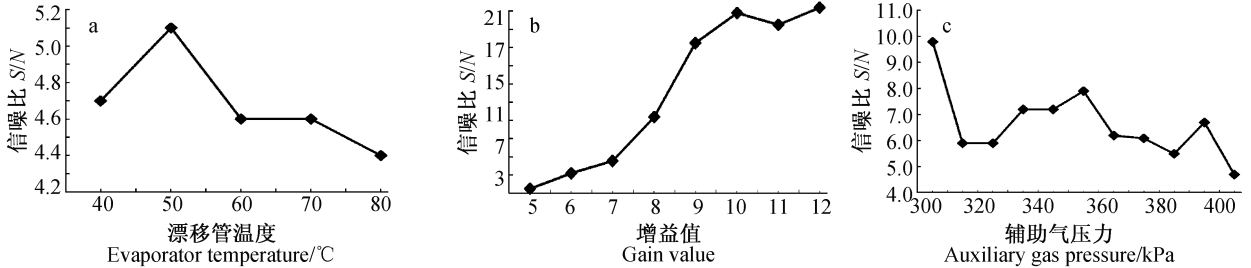


图 2 漂移管温度、增益值和辅助气压力对信噪比的影响

Fig. 2 The effect of evaporator temperature, gain value, auxiliary gas pressure on the ratio of signal to noise (S/N)

2.2 流动相的选择

根据 24-表芸苔素内酯的合成工艺^[7],除有效成分外,其他组分主要是异构体,其极性和 24-表芸苔素内酯接近,为了使有效成分和其他组分充分分离,对流动相进行了优化。结果发现:当流动相为 V(乙腈):V(水) = 55:45 时,24-表芸苔素内酯的峰形对称,且保留时间适中,原药中组分可有效分离。典型的 24-表芸苔素内酯标样和原药的 HPLC-ELSD 色谱图分别见图 3 和 4。

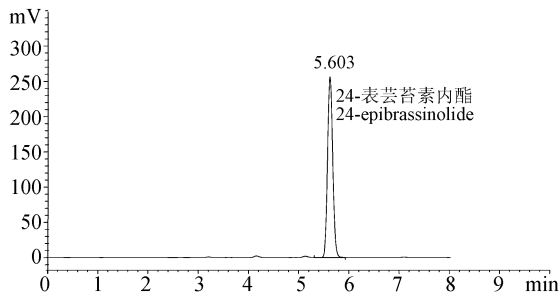


图 3 典型 24-表芸苔素内酯标样(350.3 mg/L) HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 3 Typical HPLC-ELSD chromatogram of 24-epibrassinolide standard solution(350.3 mg/L)

2.3 原药中组分检测与分析

本研究同时进行了 24-表芸苔素内酯原药的 HPLC-ELSD 分析与苯硼酸衍生化的 HPLC-DAD 分析,典型的 HPLC-DAD 色谱图见图 5。比较图 4

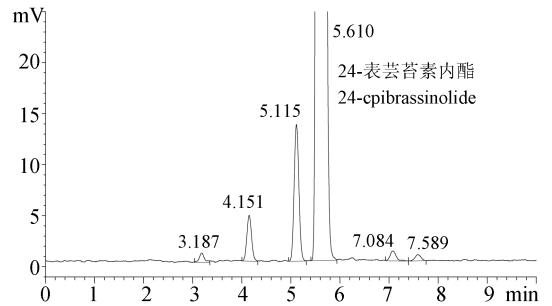


图 4 典型 24-表芸苔素内酯原药(715.5 mg/L) HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 4 Typical HPLC-ELSD chromatogram of 24-epibrassinolide technical solution(715.5 mg/L)

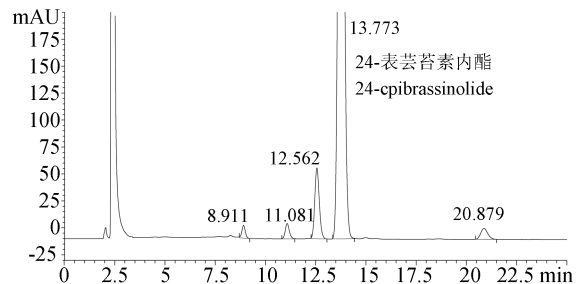


图 5 典型 24-表芸苔素内酯原药(1 950.5 mg/L) 苯硼酸衍生化 HPLC-DAD 色谱图

Fig. 5 Typical HPLC-DAD chromatogram of derivative of 24-epibrassinolide technical solution (1 950.5 mg/L) with phenylboronic acid

和图 5 发现:苯硼酸衍生化后的 24-表芸苔素内酯原

药 HPLC-DAD 色谱图中缺少一个色谱响应,表明其中一个组分未被衍生化,该组分可能不含有顺式邻二双羟基,不能与苯硼酸进行衍生化反应;而 HPLC-ELSD 分析中,24-表芸苔素内酯原药除了稀释溶剂外,没有引入其他组分,其检测也不依赖于特定的化学结构,因此更真实地体现了样品中的组分及含量。

2.4 方法的线性范围和检出限(LOD)

结果表明,在 43.8 ~ 700.7 mg/L 范围内,24-表芸苔素内酯峰面积的对数(y)与质量的对数(x , mg)线性关系良好, $y = 1.5195x + 7.4354$, $r = 0.9993$,符合定量分析要求^[19]。

以 3 倍信噪比计算得本方法的检出限(LOD)为 55 μg 。芸苔素内酯类化合物苯硼酸衍生化后的 LOD 为 20 ng,其他芳基硼酸的 LOD 甚至可以达到皮克级^[14],远低于蒸发光散射方法的 LOD。由于商品化的芸苔素内酯制剂中有效成分质量分数一般低于 0.01%,因此本方法适合于 24-表芸苔素内酯原药及其类似物的分析,对于低含量的制剂,可采用硼酸衍生化的分析方法。

2.5 方法的精密度与准确度

结果(见表 1 和表 2)表明:测定的 $RSDr$ 小于 $RSDr$,平均添加回收率为 99.7%,表明该方法是准确可靠的,符合定量分析要求^[19]。

3 结论

本研究利用蒸发光散射检测器(ELSD)建立了高效、快捷的测定 24-表芸苔素内酯原药含量的高效液相色谱(HPLC)分析方法,并对 ELSD 条件进行了优化,研究其最佳检测条件为:漂移管温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 、增益值 10 和辅助气压力 350 kPa。当流动相为 V (乙腈): V (水) = 55:45 时,24-表芸苔素内酯的峰形对称,保留时间适中,原药中组分可有效分离。与硼酸衍生化方法相比较,本方法无需对样品进行前处理和衍生化,操作也相对简单易行,对于不含有顺式邻二双羟基官能团的组分也可以有效进行检测,同时在 43.8 ~ 700.7 mg/L 质量浓度范围内线性关系良好,精密度和准确度高,可作为 24-表芸苔素内酯原药及其他芸苔素甾醇组分检测及含量测定的一种准确可行的方法。更重要的是,对不同物质,ELSD 响应因子的变化比其他检测器(如紫外检测器)小得多,因此在缺乏标准品而无法作校正曲线的情况下,利用 ELSD 可以近似地提供原药中其他组分的定量测定,为优化合成工艺和质量控制提供了简便高效的方法。但由于本方法的 LOD 值较高,所以比较适宜于 24-表芸苔素内酯原药及其类似物的分析,对于低含量的制剂,可采用硼酸衍生化的分析方法。

表 1 方法精密度测定结果

Table 1 Results of precision studies ($n = 7$)

有效成分质量分数 Content/%							平均质量分数	标准偏差	相对标准	Horwitz,
1	2	3	4	5	6	7	Average content/%	SD/%	偏差 RSD/%	RSDr/%
92.44	93.93	91.90	92.44	91.90	92.77	92.94	92.62	0.70	0.75	1.4

表 2 方法准确度测定结果

Table 2 Results of accuracy studies

序号 Entry	添加前质量 Weight before/mg	添加水平 Spiked weight/mg	实测质量 Tested weight/mg	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	标准偏差 SD/%	相对标准 偏差 RSD/%
1	8.26	0.70	8.97	100.8			
2	9.79	0.70	10.48	98.6	99.7	1.11	1.11
3	11.11	0.70	11.81	99.9			

参考文献(Reference):

- [1] MITCHELL J W, MANDAVA N, WORLEY J F, *et al.* Brassins; A new family of plant ormones from rape pollen[J]. *Nature*, 1970, 225(5237): 1065 - 1066.
- [2] GROVE M D, SPENCER G F, ROHWRDDER W K, *et al.*

Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen[J]. *Nature*, 1979, 281(5728): 216 - 217.

- [3] ANTÓNIO TEIXEIRA ZULLO M, ADAM G. Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications[J]. *Braz J Plant Physiol*, 2002, 14(3): 143 - 181.

- [4] 霍飞凤, 白玉, 刘虎威. 两种油菜素内酯甾醇类植物激素的多级质谱分析[J]. 科学通报, 2010, 55(15): 1459-1464.
HUO Feifeng, BAI Yu, LIU Huwei. Fragmentation study of two brassinolides by ion trap tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Sci Bull*, 2010, 55(21): 2219-2224.
- [5] BAJGUZ A, TRETYN A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(7): 1027-1046.
- [6] FUNG S, SIDDALL J B. Stereo selective synthesis of brassinolide; A plant growth promoting steroidal lactone [J]. *J Am Chem Soc*, 1980, 102(21): 6580-6581.
- [7] THOMSON M J, MANDAVA N, FLIPPEN-ANDERSON J L, et al. Synthesis of brassino steroids; new plant growth promoting steroids [J]. *J Org Chem*, 1979, 44(26): 5002-5004.
- [8] 王广聚, 董服灿, 董建军. 24-表油菜素内酯的合成及应用研究[J]. 农药, 2001, 40(6): 12-15.
WANG Guangju, DONG Fucan, DONG Jianjun. A study on the synthesis and application of 24-epibrassinolide [J]. *Pesticides*, 2001, 40(6): 12-15. (in Chinese)
- [9] KIM S K, ABE H, ANTHONY LITTLE C H, et al. Identification of Two brassinosteroids from the cambial region of Scots Pine (*Pinus silverstris*) by gas chromatography-mass spectrometry, after detection using a Dwarf Rice Lamina inclination bioassay [J]. *Plant Physiol*, 1990, 94(4): 1709-1713.
- [10] 刘国清, 张洪彬, 刘建平, 等. 高效液相色谱法测定 22S, 23S, 24R 表高油菜素内酯 [J]. 色谱, 1995, 13(4): 290-291.
LIU Guoqing, ZHANG Hongbin, LIU Jianping, et al. Determination of brasinolide by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Chin J Chromatogr*, 1995, 13(4): 290-291. (in Chinese)
- [11] GAMOH K, ABE H, SHIMADA K, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization of free brassinosteroids [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1996, 10(8): 903-906.
- [12] GAMOH K, OMOTE K, OKAMOTO N, et al. High performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid [J]. *J Chromatogr*, 1989, 469: 424-428.
- [13] GAMOH K, SAWAMOTO H, KAWATSUTO S, et al. Ferroceneboronic acid as a derivatization reagent for the determination of brassinosteroids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr*, 1990, 515: 227-231.
- [14] 潘加亮, 谭微, 李攻科, 等. 油菜素甾醇激素分析的研究进展 [J]. 色谱, 2011, 29(2): 105-110.
PAN Jialiang, TAN Wei, LI Gongke, et al. Progress in the analysis of brassinosteroids [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(2): 105-110. (in Chinese)
- [15] LIU X, DONG F, HU H, ZHENG Y. Residue analysis of propionylbrassinolide in fruit and vegetables by GC-MS [J]. 2009, 69(11/12): 1453-1456.
- [16] 魏决, 丁明玉. 蒸发光散射检测技术 [J]. 色谱, 2000, 18(5): 398-401.
WEI Yang, DING Mingyu. The technoly of evaporative light scattering detecor [J]. *Chin J Chromatogr*, 2000, 18(5): 398-401. (in Chinese)
- [17] 范玉兰, 杨玮, 王美华, 等. Horwitz 方程在比对试验质量评估中的应用 [J]. 劳动医学, 2001, 18(4): 209-211.
FAN Yulan, YANG Wei, WANG Meihua, et al. Application of Horwitz equation to quality assessment of verification testing [J]. *J Labour Med*, 2001, 18(4): 209-211. (in Chinese)
- [18] 冯埃生, 邹汉法, 汪海林, 等. 影响高效液相色谱/挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(6): 414-417.
FENG Aisheng, ZOU Hanfa, WANG Hailin, et al. Investigation of the influencing factors on the basic performance of HPLC-ELSD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 1996, 16(6): 414-417. (in Chinese)
- [19] THOMPSON M, ELLISON S L R, WOOD R. The International Harmonized Protocol for proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report) [J]. *Pure Appl Chem*, 2006, 78(1): 145-196.

(责任编辑: 曲来娥)

· 书 讯 ·

《尖孢镰刀菌生物学及其生物防治》

刘波, 黄俊生, 肖荣凤, 等著

科学出版社 2013-09-01 出版 16 开本(精装) 500 页

《尖孢镰刀菌生物学及其生物防治》是研究农作物枯萎病及其生物防治技术的专著。全书共 13 章, 综述了农作物枯萎病的研究进展、发生与危害; 系统地从枯萎病病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性、生态学特性、生理学特性、病理学特性、分子生物学特性、种下分化特性等方面进行了研究; 并研究了枯萎病生防菌——短芽胞杆菌、铜绿假单胞杆菌、淡紫拟青霉、哈茨木霉和非致病性尖孢镰刀菌的筛选鉴定、生物学特性、抑菌作用、抑菌机理及其对枯萎病的防治效果等。