

- Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 327-332.
- [10] Yang X W, Zhao J, Hattori M. Studies on the chemical constituents of Japanese buckeye seed (*Aesculus turbinata*), Part 1. Isolation and identification of escin IVc and isoescins Ia, Ib [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(9): 648-651.
- [11] Guo J, Yang X W. Studies on the triterpenoid saponins of the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge var. *chekiangensis* (Hu et Fang) Fang [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2004, 13(2): 87-91.
- [12] Institute of Materia Medica of Chinese Academy of Medical Science. *Modern Study of Chinese Traditional and Herbal Drugs* (I) (中草药现代研究) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Press, 1996.

东北红豆杉内生真菌的分离及产紫杉醇菌的鉴定

金涛¹, 王伟², 刘军¹, 平文祥¹, 周东坡^{1*}

(1. 黑龙江大学生命科学学院 微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 又名紫杉、赤皮松、紫柏松,《本草推陈》记载有利尿、通经作用,现代研究表明含有二萜类化合物,如紫杉宁 (taxinine)、紫杉宁 A、紫杉宁 H、紫杉宁 K、紫杉宁 L 等^[1],另外还含有包括紫杉醇在内的紫杉烷类化合物。紫杉醇 (paclitaxel, 商品名 Taxol) 是提取自红豆杉植物的能够治疗多种癌症的有效药物^[2]。目前已在临床上作为乳腺癌、卵巢癌和非小细胞肺癌的一线用药,其作用机制是抑制微管蛋白的解聚,破坏细胞微管的功能,从而影响纺锤体的形成,抑制肿瘤细胞的有丝分裂^[3]。由于红豆杉天然资源十分有限,通过各种生物工程方法生产紫杉醇已经成为国内外研究和规模开发紫杉醇的热点。通过微生物发酵法生产紫杉醇不仅有利于保护珍稀濒危的红豆杉树种,而且可以完全解决紫杉醇的药源问题,所以说微生物发酵法生产紫杉醇具有十分巨大的经济效益和广阔的开发空间。本实验主要对东北红豆杉内生真菌的分离方法及产紫杉醇菌的鉴定进行了研究。

1 材料和方法

1.1 标本:东北红豆杉树皮采样自黑龙江省穆稜林业局。采集时注意树皮带有木质部并迅速放入无菌材料袋,保存于实验室 4℃ 冰箱。

1.2 培养基:固体培养基包括 PDA 培养基^[4]、查氏培养基^[4]、马丁氏琼脂培养基^[4]。液体发酵培养基是由添加维生素、金属离子的改良培养基组成^[5]。

1.3 仪器与试剂:日本岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,岛津 SPD-10ATvp 检测器,20 μL 进样定量环,日本岛津 SIL-10AD 自动进样器。Waters 2695

液相色谱仪,ZQ2000 质谱检测器(配有电喷雾电离源)。具有显微摄影功能的 Olympus BX51 显微镜。

乙腈为液相色谱纯;高效液相色谱仪用水为双蒸水;其他药品为分析纯;紫杉醇对照品购于 Sigma 公司,质量分数大于 99.8%,配制成质量浓度为 1.079 mg/mL 的对照品保存,使用时适当稀释。

1.4 方法

1.4.1 内生菌分离方法:所采集红豆杉的树皮切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小块,经 75% 酒精表面消毒 2 min,然后用无菌水冲洗 3 遍左右,按 3 点接种法接种于 PDA 培养基平皿上,于恒温箱中 28℃ 倒置培养。3 d 后,经无菌操作挑取新长出的菌丝,划线转接于 PDA 培养基平皿上,经数次划线分离,得到形态完全一致的单菌落即纯化的内生真菌。

1.4.2 液体发酵培养:菌株在 28℃,120 r/min 的摇床上进行培养。500 mL 三角瓶中培养基装置为 200 mL,接种量为 3%,培养周期为 14 d。

1.4.3 发酵液中紫杉醇的薄层色谱初步鉴定:将东北红豆杉内生真菌发酵液滤过,得到的菌丝体研磨破壁,按质量与体积 1:5 的比例用醋酸乙酯萃取,滤去菌丝的澄清滤液用同等体积的醋酸乙酯萃取 3 次,将醋酸乙酯萃取液合并,50℃ 减压蒸干,用 5 mL 甲醇溶解再浓缩至 0.5 mL 得样品液。

取硅胶适量加合适比例水研磨至均匀,倾倒在薄层色谱板(20 cm×20 cm)上,阴干 24 h 后,于干燥箱中 105℃ 活化 30 min 备用。取 50 μL 样品和 5 μL 紫杉醇对照品点样于薄层色谱板上,每个样品间距 2 cm,放入展层剂已饱和的色谱缸中,展层剂为

收稿日期:2006-08-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570025);黑龙江省“十五”重大攻关课题(GA02C101);黑龙江省教育厅资助项目(10533013)

作者简介:金涛,男,博士,主要研究方向为生物制药和微生物学。Tel:13766969566 E-mail:jintaoliu8@yahoo.com.cn

* 通讯作者 周东坡 Tel:13936163985 E-mail:zhoudp@yahoo.com.cn

氯仿-甲醇(7:1)溶液,当前沿跑至距薄层板上端 1 cm 处时终止色谱。将板取出晾干,用 1% 的香草醛浓硫酸溶液显色,观察紫杉醇特征性蓝点出现的有无,即可初步判定是否为产紫杉醇菌株。

1.4.4 高效液相分析和质谱分析:色谱柱为日本岛津 VP-ODS 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(60:40),用磷酸调 pH 3.5;体积流量 0.7 mL/min;柱温为室温;检测波长 227 nm^[6]。

将紫杉醇对照品展层后显色,出现蓝色斑点处作为对照,沿展层方向刮取待测样品相应位置上 1 cm² 正方形面积的硅胶(未经显色剂污染),用 1 mL 甲醇溶解并超声洗脱,微孔滤膜滤过后浓缩至 0.2 mL 得测定液,进行高效液相分析和质谱分析。

1.4.5 形态研究:将菌种接种于 PDA、查氏、马丁氏固体平板上,在 28 °C 倒置培养在 2、3、4 d 观察。无菌挑取 PDA 固体平板上的菌丝,在显微镜下观察并进行显微测量。

2 结果

2.1 薄层色谱初步鉴定:经薄层色谱筛选出一株在紫杉醇对照品相应位置出现蓝色斑点的菌株,命名为 HD104。

2.2 高效液相分析:将 HD104 菌株发酵液萃取后经薄层色谱得到的测定液进行高效液相分析,与图 1-A 紫杉醇对照品出峰位置相比较,测定样品(图 1-B)中也存在时间相近的峰,证明有紫杉醇存在,紫杉醇峰峰形对称,与最近峰达到基线分离,说明高效液相色谱分离良好。将紫杉醇对照品按倍数稀释不同质量浓度进样,以峰面积(Y)为纵坐标,紫杉醇质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得到的标准曲线为 $Y=4 \times 10^7 X + 108\ 305$, $R=0.999\ 5$,同一紫杉醇质量浓度进样 3 次,测得 RSD 为 4.07%。

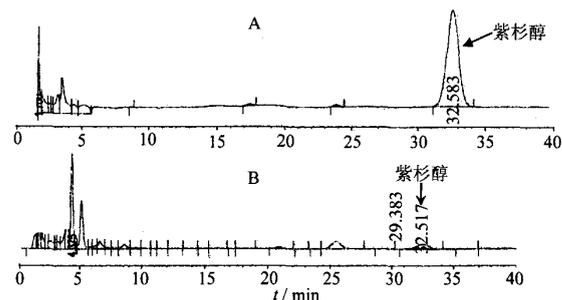


图 1 紫杉醇(A)和紫杉醇发酵提取液 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of taxol (A) and taxol extract of fermentation liquid (B)

2.3 质谱分析:经 Waters 液相色谱-质谱联用分析,保留时间 32.517 min 的组分有紫杉醇(相对分

子质量为 854)特有的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 854.9, $[M+Na]^+$ 为 m/z 875.9, $[M+K]^+$ 为 m/z 892.3,证明保留时间 32.517 min 的组分确定为紫杉醇成分。

2.4 紫杉醇产生菌的形态观察

2.4.1 菌落群体形态:HD104 菌株在 PDA 培养基上生长迅速,培养至 3 d 时,菌落直径就可达约 4 cm,培养至 4 d 时菌落明显比在其他菌落大,见表 1。因此将 PDA 培养基作为固体形态观察培养基,该菌在生长初期,菌落直径较小,边缘较整齐,且呈白色绒毛状。随着培养时间的延长,菌落直径逐步变大,至培养 4 d 时,可达 8 cm,且颜色变深为绿褐色。菌落厚度约 0.3 cm。

表 1 HD104 菌株分别在 PDA、查氏、马丁氏培养基上的生长情况

Table 1 Growth status of HD104 strain on PDA, Czapek, and Martin's media

培养基	菌落直径/cm		
	2 d	3 d	4 d
PDA 培养基	0.8~1.9	3.5~4.3	6.5~8.5
查氏培养基	0.7~0.9	3.2~3.7	5.1~6.5
马丁氏培养基	0.2~0.4	3.4~6.3	5.3~6.6

2.4.2 菌落个体形态:菌丝暗色,多分支,有隔,直径为 2~6 μm,分子孢子梗细长,多呈树状分支,小枝常对生,顶端膨大成球形,上生分生孢子,聚集成葡萄穗状,并呈卵圆形,参照《真菌分类学》^[7]有关形态介绍,初步判断为葡萄孢属(Botrytis)

3 讨论

本实验室对产紫杉醇菌的筛选,采用薄层色谱初步筛选和高效液相分析相结合的方法,成本较低并十分快捷准确,对于一般实验室采用薄层色谱初步筛选仍有较好的借鉴意义。对于紫杉醇的高效液相分析方法,本实验室采用了王文芝测定紫杉醇、10-去乙酰基-7-差向紫杉醇、长嘴蕨碱、10-去乙酰基紫杉醇、浆果赤霉素 III 和 10-去乙酰基浆果赤霉素 III 等 6 种化合物的反相高效液相色谱分析法,用此法分离紫杉醇、10-去乙酰基-7-差向紫杉醇、长嘴蕨碱能达到基线分离,因此用于发酵液中紫杉醇的测定是可行的,但存在的缺点是测定时间较长,本实验室关于新的简便快捷测定方法的研究正在进行中。另外,通过分子生物学研究来确认 HD104 菌株的种属分类有待进一步研究,它的生长特性、培养条件和如何提高其紫杉醇的产量将是今后研究的重点。

References:

[1] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia

Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1983.

[2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. Plant antitumor agents V: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.

[3] Bois A, Luck H J, Werner M, et al. Carboplatin plus paclitaxel as first-line chemotherapy in previously untreated advanced ovarian cancer [J]. *Semin Oncol*, 1997, 24(11): 29-32.

[4] Shen P. *Experimentation in Microbiology* (微生物实验)

[M]. Vol III. Beijing: Advanced Education Press, 2000.

[5] Zhou D P, Ping W X. *Taxol-a New Kind of Anti-cancer Drug Produced by Microbe Fermentation* (微生物发酵法生产抗癌药物紫杉醇) [M]. Beijing: Science Press, 2003.

[6] Wang W Z. Reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) analysis of taxol and related taxanes extracted from *Taxus wallichiana* Zucc. [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1997, 15(3): 254-256.

[7] Shao L P, Shen R X, Zhang S X, et al. *Taxonomy of Fungi* (真菌分类学) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1984.

不同生长期巴戟天中水晶兰苷量的变化

徐吉银, 梁英娇, 丁平*

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

巴戟天是著名的四大南药之一, 来源于茜草科巴戟天属植物巴戟 *Morinda officinalis* How 的干燥根。具补肾阳、强筋骨、祛风湿功效, 临床用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、少腹冷痛、风湿痹痛、筋骨痿软等症^[1]。

巴戟天中含蒽醌^[2~5]、环烯醚萜^[6,7]、寡糖^[8,9]、多糖^[10~13]等成分。到目前为止, 对不同来源的巴戟天中蒽醌^[10,14]、寡糖^[15]、多糖^[9,10,12~14]成分均进行过测定研究, 而对环烯醚萜类化学成分的定量测定未见报道。据文献报道, 巴戟天中的环烯醚萜类成分水晶兰苷在巴戟天中的量较高, 并具有较强的抗炎镇痛作用^[6,7,16,17]。由于对不同生长期巴戟天中水晶兰苷的动态变化研究未见报道, 因此, 本实验以水晶兰苷为指标, 分别测定了不同生长期巴戟天中含水晶兰苷的量, 并研究其变化规律, 为巴戟天的质量标准的制定提供一定的参考资料。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料: 所有的巴戟天样品采集于广东省德庆县巴戟天规范化种植基地, 共 25 个(表 1)。经丁平研究员鉴定为巴戟 *Morinda officinalis* How 的根。凭证标本存于广州中医药大学中药资源研究室。

1.2 仪器与试剂: Dionex summit P680 高效液相色谱仪(德国); Dionex PDA 100 二极管阵列检测器; AS1-100 自动进样系统; Sartorius 电子天平(德国); 超声提取器(220 W, 55 kHz); 水晶兰苷标准品(自制, 质量分数 > 99%); 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Kromalsil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水溶液(5: 95 → 28.8: 71.2, 15 min); 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 231 nm; 柱温: 25 °C。在上述条件下, 供试品溶液中水晶兰苷色谱峰与其他峰分离良好, 峰形对称, 保留时间为 11.50 min 左右(图 1)。

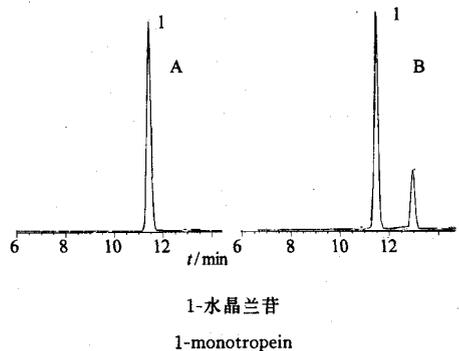


图 1 水晶兰苷对照品(A)和巴戟天(B)HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of monotropein reference substance (A) and *Radix Morindae Officinalis* (B)

2.2 样品溶液制备: 取样品粉末(过 40 目筛)0.5 g, 精密称定, 置 150 mL 带塞三角瓶中, 加入 80% 甲醇 100 mL, 冷浸 1 h, 超声处理 30 min, 滤过, 残渣再超声提取一次。合并提取液, 水浴蒸干, 残渣用 80% 甲醇定容至 10 mL。溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 标准曲线制备: 取水晶兰苷适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度为 0.74 mg/mL 的溶液。

收稿日期: 2006-08-10

基金项目: 2004 年广东省自然科学基金项目(04010057); 2006 年广东省自然科学基金重点项目(06105061)

作者简介: 徐吉银(1978—), 男, 汉族, 硕士, 现在中智药业集团有限公司。 E-mail: twtyfklqvey@126.com

* 通讯作者 丁平, 博士, 研究员, 主要从事中药资源与中药材质量标准的研究。 E-mail: dingpinggz@126.com