

直接离心相比,微滤在原理上有着本质上的不同,它是以相对分子质量大小为基准的分离手段,一些大于截留相对分子质量的物质通过微滤后基本上被除去,所以微滤透过液更有利于后一步的超滤膜分离。而絮凝是靠絮凝剂与药液中相关分子的相互作用而使一些物质絮凝沉降,然而并不是药液中所有的大分子都会与絮凝剂相互作用而被沉降,仍然留在药液中的一些物质极易造成膜污染,导致膜通量下降过快,而高速离心也存在这样的问题。不过,与其他分离方法相比,微滤-超滤整个工艺中异秦皮啉保留率并不是最高的,这主要与微滤预处理时膜组件及导管中滞留了一些药液有关。

References

- [1] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advances in studies on chemical constituents and its quality control of whole plant of *Sarcandra glabra* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (8): a-X II-X IV.
- [2] The Searching Panel of *Herba Sarcandrae* in Guixi Sanitary Bureau, Jiangxi Province. The study of *Herba sarcandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1972, 3 (6): 41.
- [3] Wang J, Yan F, Shen X, et al. Experimental research on anti-tumor function of *Herba Sarcandrae* [J]. *Zhejiang J Chin Tradit Med* (浙江中医杂志), 1999 (10): 450-451.
- [4] Li Y B, Jiang C L, Bo H, et al. Advance on curing IFP by Chinese traditional medicine [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1995, 12 (2): 6-9.
- [5] Liu H Q, Qu L B, Jia J F. Study on ultrafiltration membrane technology for preparing Shengmai Oral Liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27 (4): 209-211.
- [6] Luo F L, Liang G M, Liu Z Y, et al. Exploration of application of large pore size ultrafiltration membrane in Chinese medicine production [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23 (8): 556-559.
- [7] Li S Z, Wu L L, Chen W. New process and its equipment for production of TCM oral liquid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (12): 120-122.
- [8] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol I. 2000.

竹黄无性型菌株产竹红菌素的研究

陈佳佳, 李兆兰, 焦庆才*

(南京大学生命科学学院 药物生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的 获得能稳定产生竹红菌素的竹黄无性型菌株, 通过人工培育获得其活性成分竹红菌甲素。方法 通过组织分离, 从野生竹黄子座中分离筛选出无性型菌株 0258, 进行人工条件下的发酵培养。对其发酵产物进行提取、分离和纯化, 通过理化性质测定和波谱 (UV/VIS, IR, MS) 技术进行结构鉴定。结果 从竹黄子实体分离筛选到一株无性型菌株 0258, 其能产生稳定的竹红菌甲素。结论 首次获得稳定产生竹红菌素的竹黄无性型菌株, 解决了竹黄人工培育的种源问题, 使竹红菌素的工业化生产成为可能。

关键词: 竹黄; 竹红菌甲素; 无性型; 波谱分析

中图分类号: R 284. 2; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0048-03

Hypocrellins produced by anamorphosis fermentation of *Shiraia bambusicola*

CHEN Jia-jia, LI Zhao-lan, JIAO Qing-cai

(Pharmaceutical Biotechnology State Key Laboratory, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: **Objective** To obtain anamorphosis of *Shiraia bambusicola* producing the component, hypocrellin A effectively. **Methods** A strain was isolated from the fruit of *S. bambusicola* by separating its hypha and was cultured by solid-state fermentation. One of the pure chemical compounds isolated from the stroma of wild *S. bambusicola* was studied on the basis of UV/VIS, IR, MS spectrometric analysis and physicochemical constants. **Results** The pigment is proved to be hypocrellin A. The isolate was determined as the stable anamorphosis strain 0258 of *S. bambusicola*. **Conclusion** A anamorphosis strain of *S. bambusicola* is obtained and precisely appraised for the first time. This study will provide basis for the future massively industrialized hypocrellin production.

Key words: *Shiraia bambusicola* P. Henn; hypocrellin A; anamorphosis; spectrometric analysis

收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 国家技术创新基金资助项目 (02CJ-13-01-16)

作者简介: 陈佳佳 (1982—), 女, 江苏苏州人, 南京大学生物系硕士研究生, 主要从事微生物次生活性代谢产物的研究。

Tel: (025) 66813587 E-mail: njucjj@126.com

竹黄 *Shiraia bambusicola* P. Henn 是一种传统的名贵中药材,是寄生于竹子上的一种真菌,多生长在将衰败或已衰败的竹林中,主要分布于江苏、浙江、安徽等地^[1,2],每年4月下旬至6月上旬是其生长季节和最适采集期。竹黄能治疗风湿性关节炎、坐骨神经痛、小儿百日咳和气管炎等病症^[3]。近年来对竹黄的药理和临床试验表明,竹黄具有镇痛、抗菌、抗炎、抗癌、护肝和保护心血管的作用^[4,5]。竹黄的有效成分竹红菌素属于萘醌类化学物质,具有自敏光氧化反应的生物活性,可光敏杀伤肿瘤细胞和抑制艾滋病病毒^[6],是一种新型光疗药物。由于竹黄分布地区局限,生长季节短暂,天然产量低,远不能提供临床用药的要求。本实验从竹黄子实体中分离了一株无性型菌株,通过人工发酵培养,能产生大量的红色素。色素经提取、分离和纯化,波谱分析鉴定,证明为竹红菌甲素。

1 材料

BSZ 自动分步收集器、HL-2 恒流泵、UV-300 紫外可见分光光度计(日本岛津)、Nicolet-Nexus 870 红外分光光度计(KBr 压片)、VG-ZABHS 数据处理系统质谱仪。薄层色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品。色谱用 Sephadex LH-20 为 Pharmacia 产品,其他试剂均为国产分析纯。竹红菌甲素对照品购自 Sigma 公司,质量分数>99.5%。竹黄子实体采自南京浦口老山林场,由南京大学真菌生物实验室李兆兰教授鉴定。母种斜面培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),生产发酵培养基为玉米片综合培养基。

2 方法与结果

2.1 无性型菌株的分离与培养:竹黄子实体用0.1%升汞表面消毒,无菌水漂洗数次,在无菌条件下进行孢子和组织分离,共分离了300管左右。26~28℃恒温恒湿培养,待有菌丝长出,立即转管纯化,进行菌种鉴定,筛选出1株能产生竹红菌素的无性型菌株0258。向母种培养基中加入无菌蒸馏水制备孢子悬液。250 mL 摇瓶中加入40 g 玉米片和50 mL 2%蔗糖溶液。接入孢子悬液,接种量为5%,pH值自然,26℃培养7 d。

2.2 菌株形态观察:通过 Nikon Eclipse E600 显微镜、捷达-801 形态学显微图像分析系统对竹黄子实体和无性型菌株进行形态和构造的特征观察。照片由 Panasonic TK-C1381 数码相机拍摄。

野生竹黄子实体幼嫩时肉质,白色,紧贴竹枝生长,表面平滑。成熟时逐渐膨大,变为块茎状或不规

则瘤形,软木栓质,粉红色,长1.5~4.0 cm,背面隆起,有不规则横沟,腹面凹陷,围抱在茎秆上。显微镜下观察,子囊壳埋于子座边缘,亚球形,直径480~580 μm,子囊圆筒形,侧丝线型,子囊孢子前通常6枚,砖格状分隔,无色,梭形,(48~60) μm × (13~16) μm。

无性型0258菌株在室温26℃下PDA培养基上生长良好,菌丝分化为两种:基质菌丝为红色,较密致,紧贴基质表面;气生菌丝为白色绒状,向四周伸展蔓延,产生分生孢子器和分生孢子。分生孢子器为葫芦形或梨形,颈部明显,孔口较大,(54.5~76.2) μm × (39.0~58.0) μm,颈长18.2~25.4 μm,颈宽18.2~32.7 μm;分生孢子无色,单胞,表面光滑,椭圆至圆柱形,(4.3~5.5) μm × (1.8~2.9) μm。无性型0258分类地位属于半知菌亚门(Deuteromycotina)腔孢纲(Cochymycetes)球壳孢目(Sphaeropsidales),中文学名竹红霉,拉丁学名正在拟定中。竹黄无性型菌株由南京大学真菌生物工程系鉴定,菌种准确可靠。

2.3 竹红菌素的提取、分离、纯化

2.3.1 提取:培养物干燥后先用乙醇浸提48 h,滤过,滤渣重复浸提1次,合并滤液,氯仿萃取,取氯仿相的萃取液薄膜减压浓缩,浓缩物红外干燥,得竹红菌素粗品。

2.3.2 分离纯化: Sephadex LH-20 经预处理后装填于35 cm × 3.0 cm 的柱内,平衡。将色素粗品溶于2 mL 甲醇,上样,用甲醇以0.5 mL/min 的恒定流速洗脱,分步收集,每管5 mL。合并26~33管的洗脱液,浓缩干燥得到结晶粗品,丙酮重结晶得纯品。

2.4 竹红菌素的测定:精密称取竹红菌甲素对照品约5 mg,用95%乙醇定容至100 mL。分别取2、4、6、8、10、12、14 mL,均用95%乙醇定容至50 mL,配成系列对照品溶液。以乙醇作空白,在465 nm 处测定吸光度^[7],绘制吸光度对质量浓度的标准曲线,结果竹红菌甲素在0~15 μg/mL 与吸光度线性关系良好,由标准曲线得回归方程 $Y = 0.03746X - 0.0011$,相关系数 $r = 0.9994$ 。精密称取色素粗提物10 mg,用95%乙醇溶解并定容至100 mL,在465 nm 处测得吸光度为0.512,代入回归方程,求出所对应的质量浓度,计算得色素粗提物中竹红菌素的质量分数为13.9%。

2.5 产物鉴定:分别取纯化产物和竹红菌甲素对照品各5 mg,氯仿定容至2 mL。吸取上述两种溶液各10 μL,点于同一硅胶H-1%枸橼酸薄层板上,用氯

仿-乙醚(9:1)展开。纯化产物在与对照品色谱图相应的位置上显相同红色斑点,证明纯化产物成分为单一的竹红菌甲素。

分离纯化后得紫红色晶体,溶于乙醇、乙醚、氯仿和丙酮,不溶于水。醇溶液呈红色,在紫外灯下观察呈樱红色荧光。Feigl 反应呈阳性(由红变暗紫红色),加入碱液,则发生显著的颜色变化,由红变鲜绿色,加酸又变为红色,这些表明有酚基的存在,显示出醌类化合物的颜色反应。

质谱分析条件:大气压化学电离(APCI),蒸发器温度 395 °C,毛细管温度 150.90 °C,毛细管电压 17.56 V。质谱结果显示分子相关离子峰 547 $[M+1]^+$,表明相对分子质量为 546,与文献报道^[7]的竹红菌甲素的相对分子质量一致。UV/VIS: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 272、341、462、540、579。462 nm 处有一最大吸收峰,此为醌类化合物 π - π 共轭产生的吸收峰,吸收曲线与天然竹红菌甲素吸收曲线^[8]一致。IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3 425、2 929、2 855、1 736、1 614、1 516、1 460、1 262。元素分析C: 66.99%, H: 4.65%。以上数据与文献报道^[8,9]的竹红菌甲素(hypocrellin A)基本一致,定为竹红菌甲素。

2.6 竹红菌素的稳定性:取竹红菌素粗提物 10 mg 溶于 100 mL 95% 乙醇制成供试品溶液,依次进行以下试验:加入缓冲液,调至不同的 pH 值,测定最大吸光度和相应的波长,并观察其颜色变化;分别在强日光、紫外光和散射自然光下照射 0、1、2、3、4、5、6 h,测定吸光度;分别在 20、40、60、80 °C 水浴中加热 1 h,每 20 min 测量吸光度。

竹红菌甲素在 pH 值 1~7.5 呈红色,颜色较稳定,最大吸光度和相应波长无明显变化; pH 值 > 8 时,呈浅绿色,最大吸光度和相应波长均降低; pH 值 > 9 时,呈绿色,最大吸光度和相应波长均无变化(表 1)。强日光对竹红菌甲素的保色率(以加热前、后吸光度值的比值表示)稍有影响。紫外光和散射自然光对竹红菌甲素的保色率几乎无影响(表 2),因此竹红菌甲素的耐光性较好。竹红菌甲素对温度的不同变化亦较稳定(表 3)。

3 讨论

利用天然植物为原料,用微生物发酵法生产优质天然色素是食品色素工业的发展方向,本室分离筛选的竹黄无性型菌株,在人工培养条件下产生红色素,且经波谱分析和结构鉴定证明该色素即野生竹黄子座的有效成分竹红菌素,这对解决人工合成色素对人体不良反应方面极有意义。本实验对竹红

表 1 pH 值对竹红菌甲素稳定性的影响

Table 1 Effect of pH value on stability of hypocrellin A

pH 值	颜色变化	最大吸收波长(λ_{max})/nm	最大吸光度(A_{max})
1~5	鲜红	470	0.506
6	鲜红	465	0.512
7	红	465	0.512
8	浅绿	430	0.335
9	翠绿	480	0.537
11	深绿	480	0.537
13	深绿	480	0.538

表 2 光照对竹红菌甲素稳定性的影响

Table 2 Effect of light on stability of hypocrellin A

光照时间/h	保色率		
	强日光	紫外光	自然光
0(对照)	1	1	1
1	0.982	1	1
2	0.965	0.998	0.998
3	0.951	0.998	0.998
4	0.939	0.998	0.996
5	0.928	0.998	0.996
6	0.922	0.998	0.996

表 3 温度对竹红菌甲素稳定性的影响

Table 3 Effect of temperature on stability of hypocrellin A

加热时间/min	保色率			
	20 °C	40 °C	60 °C	80 °C
0(对照)	1	1	1	1
20	1	1	0.996	0.996
40	1	0.998	0.996	0.994
60	1	0.996	0.996	0.994

菌素的分析研究以及竹红菌素的定性定量的检测,为阐明竹黄的药用机制提供了理论依据。

References

- [1] Zhong S R, Zhao H, Li A M, et al. Potential TCM — *Shiraia bambusicola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (4): 372-374.
- [2] Zhao L Q, Li Z Q, Hou J X, et al. A study on liquid fermentation of *Morchella Conica* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1999, 18 (1): 94-99.
- [3] Wang J X. A Study on *Shiraia bambusicola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (6): 477-479.
- [4] Lin H P, Chen S M, Chen C L. *Shiraia bambusicola*, a medicinal fungi needed to be developed [J]. *J Zhejiang Forest Sci Tech* (浙江林业科技), 2002, 22 (1): 78-80.
- [5] Tien M, Kirk T K. Peroxidase or phanerochaetochryso-*porium* [J]. *Methods Enzymol*, 1988, 161B: 238-249.
- [6] Jiang L J. The structures, properties, photochemical reactions and reaction mechanisms of hypocrellins [J]. *Sci Bull* (科学通报), 1990, 35 (21): 1608-1616.
- [7] Lin H P, Chen H, Ye Y, et al. Determining method for content of hypocrellin A in *Shiraia bambusicola* [J]. *J Zhejiang Coll Forest* (浙江林学院学报), 2002, 19 (2): 157-160.
- [8] Peng J S, Li X L, Sun Z L, et al. Separation and purification of hypocrellin A from *Shiraia bambusicola* [J]. *J Shandong Univ Tech: Sci Tech* (山东理工大学学报: 自然科学版), 2004, 18 (2): 91-94.
- [9] Hu X, Shen L D. The isolation and structure identification of chemical constituents of *Shiraia bambusicola* [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1992, 7 (1): 1-4.