

文章编号:1001-6880(2014)10-1634-04

毛脉酸模内生真菌蒽醌类次生代谢产物的筛选及含量分析

郭 美¹,王谦博²,王宗伟¹,贾力维¹,王振月^{1*}¹黑龙江中医药大学药学院,哈尔滨 150040; ²黑龙江省食品药品检验检测所,哈尔滨 150010

摘要:本文通过对毛脉酸模内生真菌的发酵培养得到其次生代谢产物,采用HPLC法对内生真菌中蒽醌类成分进行筛选。以大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素五种蒽醌类成分为参照,筛选出3株真菌含大黄素,3株真菌含大黄酸,5株真菌含芦荟大黄素,其中含量最高为683 μg/g,最低为8 μg/g。将各菌株所含成分与各菌株分离部位的相应成分进行比较,相对宿主植物而言各菌株均有较高的含量。本实验分析方法准确、快捷,适用于毛脉酸模内生真菌的代谢产物研究。

关键词:毛脉酸模;内生真菌;HPLC;蒽醌类次生代谢产物

中图分类号:Q946.91

文献标识码:A

Screening and Determination of Anthraquinones Secondary Metabolites from Endophytic Fungi of *Rumex gmelini* Turcz.

GUO Mei¹, WANG Qian-bo², WANG Zong-wei¹, JIA Li-wei¹, WANG Zhen-yue^{1*}¹Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;²Heilongjiang Institute for Food and Drug Control, Harbin 150010, China

Abstract: In this paper, the secondary metabolites of anthraquinones were obtained by fermentation of endophytic fungi of *Rumex gmelini* Turcz. HPLC was used to filter different anthraquinones from endophytic fungi of *R. gmelini*. With 5 anthraquinone compounds, including emodin, rhein, chrysophanol, physcion and aloe-emodin as reference, the endophytic fungi with the secondary metabolites of anthraquinones were screened out, in which 3 strains were screened out to contain emodin, 3 strains contained rhein, and 5 strains contained aloe-emodin. Among these fungi, the highest and lowest yield of anthraquinones was 683 μg/g and 8 μg/g, respectively. The strains had higher concentrations of anthraquinones between each strains and its respective separated parts in *R. gmelini*. The developed HPLC method was accurate and fast, and it was applicable to analysis metabolites of endophytic fungi from *R. gmelini*.

Key words: *Rumex gmelini* Turcz.; endophytic fungi; HPLC; anthraquinones secondary metabolites

毛脉酸模(*Rumex gmelini* Turcz.)为蓼科酸模属多年生宿根草本植物,多生于山区沟谷低湿草甸及杂草丛中,广泛分布于黑龙江、吉林长白山等地区。毛脉酸模味甘性寒。有清热解毒、凉血止血、通便利尿之功效,具有抗真菌、抗肿瘤、镇咳祛痰、平喘降压、抗病毒和抗氧化等药理作用。毛脉酸模中含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类以及酸模素类等化学成分^[1,2]。其中蒽醌类化学成分具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、保肝、利胆、免疫抑制、泻下等药理作用^[3-5]。

植物内生真菌(Endophytic fungus)是指生活在健康植物组织内部,不会对宿主造成明显伤害,并与

宿主植物建立和谐关系的一类真菌。内生真菌与宿主植物长期相互作用,建立了平衡关系,很可能遗传物质相互传递。研究表明,内生真菌具有合成和宿主植物相同或相似活性成分的能力^[6,7]。王玉美^[8]等人从喜树内生真菌中筛选出产喜树碱的菌株,喜树碱产量为774 μg/L;艾海新^[9]等从南方红豆杉树皮中分离得到的内生真菌中筛选出一株产紫杉醇的菌株,其产量为53.68 μg/L。药用植物内生真菌具有多样性,可以产生有应用价值的代谢物质,利用内生真菌大规模发酵从而实现工业化生产,可以降低产品成本,满足需求,同时有利于药用植物资源的保护。内生真菌发酵培养作为寻找活性成分的手段之一,日益受到人们的重视。本课题组前期已从不同产地分离得到毛脉酸模内生真菌278株,本实验以不同产地毛脉酸模内生真菌为研究对象,通过

收稿日期:2013-10-15 接受日期:2014-03-18

基金项目:国家自然科学基金项目(30970300);哈尔滨科技创新人才研究专项基金项目(2010rffxs031)

*通讯作者 E-mail:wangzhen_yue@163.com

HPLC 对其次生代谢产物进行研究,以大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素五种蒽醌类成分为参照,寻找有益菌株,并对成分较高的菌株进行含量测定,确定其产量,以确立进一步开发利用的价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

样品为毛脉酸模中分离得到的 278 株内生真菌,由本课题组前期从黑龙江省图强(TQ)、塔河(TH)、新林(XL)、加格达奇(JQ)、绥棱(SL)、乌伊岭(WY)、红星(HX)、上甘岭(SG)、桃山(TS)及黑龙江中医药大学药用植物园(YY)十个产地分离得到。大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素对照品购买于中国药品生物制品检定所。

1.1.2 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪(Waters 600 型泵,2487 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);BSD-100 振荡培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司);二级 B2 型生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司)。

甲醇:色谱纯(美国 DIKMA 试剂公司);磷酸:分析纯(天津市天河化学试剂厂);水:饮用纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养

将活化后的菌株接种于锥形瓶中,28 °C、160 rpm 下震荡培养 7 d。在 60 °C 水浴下,将菌体与发酵液共同蒸干得内生真菌发酵产物。另取适量马铃薯葡萄糖液体培养基,60 °C 下水浴蒸干,作为空白对照。

1.2.2 供试品溶液的制备

取 4 g 蒸干后的内生真菌发酵产物,置于圆底烧瓶中,加入甲醇 20 mL,称重。加热回流,补足损失后滤过。得到内生真菌次生代谢产物的提取物。滤液过 0.45 μm 滤膜,作为供试品溶液备用。同时将空白培养基及毛脉酸模植物根、茎、叶粉末做同样处理。

1.2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素对照品 2.75、4.15、3.10、3.70、

2.50 mg,甲醇溶解,定容至 25 mL 容量瓶内,配制成浓度依次为 110、166、124、148、100 μg/mL 的对照品溶液;参照毛脉酸模根中各成分含量,分别依次精密称取各对照品 2.45、0.50、6.95、3.03、2.97 mg,甲醇溶解,定容至 25 mL 容量瓶内,配成含大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素分别为 98、20、278、121、119 μg/mL 的混合对照品溶液。

1.2.4 色谱条件的选择

色谱柱 Gemini C₁₈ 分析柱(250 mm × 4.60 mm, 5 μm)。流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。流动相为甲醇-0.1% 磷酸水, 梯度洗脱: 0 min, 30% 甲醇; 0 ~ 50 min, 30% ~ 100% 甲醇; 50 ~ 60 min, 100% 甲醇。此条件的混合对照品图见图 1。

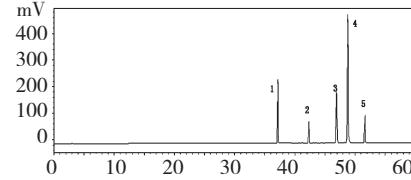


图 1 混合对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference

1:芦荟大黄素;2:大黄酸;3:大黄素;4:大黄酚;5:大黄素甲醚
1: aloe-emodin; 2: rhein; 3: emodin; 4: chrysophanol; 5: physcion

1.2.5 蒽醌类次生代谢产物的筛选及含量分析

按上述色谱条件进样,记录样品色谱图中各色谱峰的保留时间与峰面积,排除空白干扰,与对照品进行比对,进行初步筛选,得到含蒽醌类成分的内生真菌。为保证实验结果的准确性,将含蒽醌类成分内生真菌的供试品溶液与相应成分的对照品溶液进行重复进样比对,减小误差。并进行含量测定。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

分别取五种对照品溶液,按照上述色谱条件进样,依次进 2.5、10、15、20 μL 以进样量 X(μg)为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程得大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的线性回归方程,线性范围分别在 0.220 ~ 2.200、0.332 ~ 3.320、0.248 ~ 2.480、0.296 ~ 2.960、0.200 ~ 2.000 μg 内,进样量与峰面积呈良好的线性关系。回归方程分别为: $Y = 1E + 06X - 128668, R^2 = 0.9996$; $Y = 3E + 06X - 111432, R^2 = 0.9997$; $Y = 2E + 06X - 269995, R^2 = 0.9991$; $Y = 1E +$

$06X-232364, R^2 = 0.9998; Y = 2E + 06X - 146665, R^2 = 0.9997$ 。

2.2 精密度试验

取混合对照品溶液,按上述色谱条件连续进样6次,测定峰面积,计算RSD值,结果大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的RSD值分别为0.6%、0.9%、1.0%、0.8%、1.1%。

2.3 稳定性试验

取混合对照品溶液,按上述色谱条件,分别在0、2、4、8、12和24 h进样,分别测定大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的峰面积,计算RSD值分别为1.2%、1.2%、1.3%、1.3%、1.1%。

2.4 重复性试验

取毛脉酸模根部粉末6份,按供试品溶液制备方法制备6份供试品溶液,按上述色谱条件测定,计算大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素含量平均值的RSD值分别为1.9%、2.0%、1.7%、1.3%、2.1%。

2.5 加样回收率试验

取已知含量的毛脉酸模根部粉末6份,精密加入混合对照品溶液5 mL,按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件进行测定,计算平均回收率,结果大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的平均回收率($n=6$)分别为98.9%、100.4%、99.5%、103.7%、99.1%,RSD值分别为1.14%、1.72%、0.89%、1.22%、0.97%。

2.6 蒽醌类次生代谢产物的筛选结果

按“1.2.2”的方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定。以大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄

素甲醚、芦荟大黄素五种蒽醌类成分为参照,共筛选出11株内生真菌含蒽醌类成分,其中含大黄素的有TH-R2、SL-R3、XL-S9;含大黄酸的有YY-S1、YY-S8、YY-S13;含芦荟大黄素的有TQ-S4、TQ-S5、TQ-S16、JQ-S4、XL-S13。色谱图见图2。图2中各色谱图由下到上依次为TH-R2、SL-R3、XL-S9、大黄素、YY-S1、YY-S8、YY-S13、大黄酸、TQ-S4、TQ-S5、TQ-S16、JQ-S4、XL-S13、芦荟大黄素、空白对照。从图2可以看出,同一产地的菌株成分较为相似,部分菌株除含有测定成分外还含有其他成分。

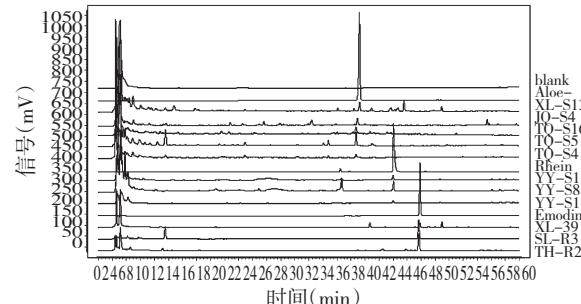


图2 空白、对照品及样品的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank, standards and samples

2.7 菌株概况及含量测定结果

样品及毛脉酸模植物根、茎按“1.2.2”的方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,其中原植物茎中未能直接检测出相应的成分。将根、茎中离得到的内生真菌的含量与原植物根、茎中相应成分进行比对,其中菌除TH-R2外,各菌株所含成分均比其分离部位的相应化学成分含量高,具体数据见表1。

表1 菌株的概况及样品测定结果

Table 1 The overview of endophytic fungi and the determination results of anthraquinones contents in samples

编号 No.	种属 Genus	分离频率(%) Separation frequency	成分 Component	含量(μg/g) Content
TH-R2	青霉属 <i>Penicillium</i>	6.69	大黄素 emodin	245
SL-R3	青霉属 <i>Penicillium</i>	-	大黄素 emodin	683
XL-S9	小尾孢属 <i>Cercospora</i>	5.41	大黄素 emodin	209
YY-S1	链格孢属 <i>Alternaria</i>	22.93	大黄酸 rhein	11
YY-S8	链格孢属 <i>Alternaria</i>	-	大黄酸 rhein	45
YY-S13	链格孢属 <i>Alternaria</i>	-	大黄酸 rhein	20
TQ-S4	色串孢属 <i>Tolura</i>	3.50	芦荟大黄素 aloe-emodin	8
TQ-S5	拟尾孢属 <i>Eriocercospora</i>	0.32	芦荟大黄素 aloe-emodin	29
TQ-S16	色串孢属 <i>Tolura</i>	-	芦荟大黄素 aloe-emodin	23

JQ-S4	色串孢属 <i>Tolura</i>	-	芦荟大黄素 aloe-emodin	74
XL-S13	镰孢属 <i>Fusarium</i>	14.65	芦荟大黄素 aloe-emodin	23
根 root	-	-	大黄素 emodin	500
根 root	-	-	大黄酸 rhein	5
根 root	-	-	芦荟大黄素 aloe - emodin	724
茎 stem	-	-	大黄素 emodin	0
茎 stem	-	-	大黄酸 rhein	0
茎 stem	-	-	芦荟大黄素 aloe - emodin	0

注:分离频率是指样本中分离到的某种内生真菌的菌株数占分离到总菌株数的百分数。R-从根中分离得到,S-从茎中分离得到。

Note: Separation frequency refers to the percentage of strains of endophytic fungus isolated from each sample to the total number of strains. R-obtained from roots, S-obtained from stems.

3 讨论

为了最大限度的提取发酵产物中的有效成分,本实验以毛脉酸模原植物为参照,分别考察了甲醇回流、50%乙醇回流、甲醇超声等提取方法,在同一色谱条件下测定,结果表明,甲醇回流及50%乙醇回流效果较好,考虑到方法操作简便省时,本实验采用甲醇回流后直接进行测定。并采取适合于毛脉酸模化学成分分析的色谱条件进行测定,在五种蒽醌类对照品的基础上,同时可对其它类有效成分进行考察,通过观察液相色谱图,寻找含其它类成分的菌株,在完成目标任务的同时可发现更多的有益菌株,以确立进一步开发利用的价值。

本研究确定有11株内生真菌含有蒽醌类成分,相对宿主植物而言各菌株均有较高的含量,其中含大黄素的菌SL-R3含量高达683 μg/g,为毛脉酸模蒽醌类成分中含量最高的内生真菌。从研究结果我们发现含蒽醌类成分的菌种青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)、色串孢属(*Tolura*)、镰孢属(*Fusarium*)等为分离频率较高的菌种,同样是毛脉酸模的优势菌种。结合各内生真菌的分离产地、分离部位,因此我们可进一步推断,产生与宿主相同或相似化学成分的内生真菌可能与其自身的种属、分离的环境及分离部位有关,接下来我们将进一步研究含量较高的内生真菌的稳定性,以及大规模发酵的可行性,我们将通过优化发酵条件,对菌株进行诱变育种等方式来进一步提高产量,以达到工业化生产的要求。本研究除发现含蒽醌类成分外,部分菌株还含有其它化学成分,这也说明内生真菌次生代谢产物丰富多样,为我们对内生真菌的进一步研究奠定基础。

参考文献

- Wang ZY(王振月), Ye WH(叶万辉), Yang RF(杨润福). Investigation of Resource of *Rumex gmelini*. *J Chin Med Mater*(中药材), 1996, 19:603-605.
- Wang ZY(王振月), Chen JM(陈金铭), Wang QB(王谦博), et al. Chemical components of *Rumex gmelini* (IV). *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 2009, 40;1352-1355.
- Cao L(曹亮), Zhou JJ(周建军). The research progress of anthraquinone compounds. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2009, 24:237-238.
- Karren DB, Razina R, Louisa G, et al. Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*, 2010, 71:948-955.
- Jaw MC, Wen C, Ji HW, et al. Anthraquinones of edible wild vegetable *Cassia tora* stimulate proliferation of human CD4 + T lymphocytes and secretion of interferon-gamma or interleukin 10. *Food Chemistry*, 2008, 107:1576-1580.
- Yan JF(严菊芬), Wang SP(王素萍), Qi NB(齐宁波), et al. Research progress of endophytic fungi from medicinal plants. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24:176-181.
- Chen DJ(陈道金), Liu HM(刘慧敏), Yang J(杨静), et al. Research Process on Active Constituents of Endophyte. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*(时珍国医国药), 2013, 24:1730-1732.
- Ai HX(艾海新), Feng YK(冯玉康), Zhu CY(朱春玉), et al. Isolation and identification of a Taxo-l Producing endophytic fungus LNUF014. *J Microbiol*(微生物学杂志), 2010, 30(4):58-62.
- Wang YM(王玉美), Chen HZ(陈洪章). Isolation and identification of a camptothecin-producing endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*. *Institute of Microbiology*(微生物学通报), 2011, 38:884-888.