

文章编号:1001-6880(2016)11-1758-06

基于 HPLC-ESI-TOF/MS 法分析测定 乌天麻和红天麻中化学成分的研究

李 云¹, 王志伟², 耿岩玲², 周洪雷¹, 刘大会^{3*}, 王 晓^{1,2*}¹山东中医药大学药学院; ²山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省分析测试中心, 济南 250014;³云南省农业科学院药用植物研究所, 昆明 650231

摘要:建立高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱(HPLC-ESI-TOF/MS)联用技术用于指认乌天麻和红天麻中的化学成分,并对天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、腺苷、巴利森苷 A、4,4'-二羟基二苄基醚 6 种成分进行含量测定。采用 Agilent 1120 高效液相系统,YMC-PEAK ODS-A column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇溶液(B),梯度洗脱:0~5 min, 5% B; 5~65 min, 5%~40% B; 65~80 min, 40%~100% B; 分析时间 80 min; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 50 μL。最终指认了天麻提取物中的 15 种成分,其中天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、腺苷、巴利森苷 A、4,4'-二羟基二苄基醚 6 种成分在线性范围内均具有良好的线性关系($r \geq 0.9991$); 平均回收率在 94.90%~99.81% 之间, RSD < 2.40%。在不同品种的天麻饮片中,6 种成分的量存在差异,红天麻各成分含量稍高于乌天麻,一级乌天麻各成分含量高于二级乌天麻。同一品种天麻中,巴利森苷类成分含量较高,腺苷和 4,4'-二羟基二苄基醚含量均较低。建立的 HPLC 测定方法分离效果与重复性好、快速、简便,为天麻饮片的质量控制提供参考。

关键词:天麻; HPLC-ESI-TOF/MS; 天麻素; 对羟基苯甲醇; 巴利森苷 A; 含量测定

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.013

Determination of Chemical Constituents in *Gastrodia elata f. Glauca* and *Gastrodia elata f. Elata* by HPLC-ESI-TOF/MS

LI Yun¹, WANG Zhi-wei², GENG Yan-ling², ZHOU Hong-lei¹, LIU Da-hui^{3*}, WANG Xiao^{1,2*}¹College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; ²Shandong

Analysis and Test Center, Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Jinan 250014, China;

³Medicinal Plant Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650231, China

Abstract: To establish a high performance liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-TOF/MS) method for the identification of chemical ingredients in *Gastrodia elata* Blume, and to determine the content of gastrodin, p-hydroxybenzyl alcohol, p-hydroxybenzaldehyde, adenosine, parishin A and 4,4'-dihydroxydibenzyl ether. The analysis was performed on an Agilent 1120 system using a YMC-PEAK ODS-A column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The 6 components were separated in 80 min with gradient mobile phase consisting of 0.1% CH₃COOH-H₂O (A) and CH₃OH (B): 0~5 min, 5% B; 5~65 min, 5%~40% B; 65~80 min, 40%~100% B. Volume flow rate was 1 mL/min. The temperature was set at 25 °C, and the injection volume was 50 μL. Ultimately, 15 ingredients in *G. elata* was identified, in which the content of 6 components were determined by the developed HPLC-ESI-TOF/MS method. The results showed good linear relationship ($r \geq 0.9991$), the average recoveries were in the range of 94.90%~99.81% with RSD% < 2.40%. There were differences in the amounts of 6 components in different varieties of *G. elata*. The contents of 6 components in *G. elata* f. Elata is slightly higher than those in *G. elata* f. Glauca. In the same variety, the amounts of the 6 compounds in first grade herb were higher than in second grade. The developed HPLC-ESI-TOF/MS method was simple, sensitive and had good repeatability.

Key words: *Gastrodia elata*; HPLC-ESI-TOF/MS; gastrodin; p-hydroxybenzyl alcohol; parishin A; determination of content

收稿日期:2016-06-02

接受日期:2016-07-15

基金项目:山东省科技发展计划(2014GZX219003)

* 通讯作者 E-mail: wangx@sdas.org; juhuacha2007@sohu.com

天麻(*Gastrodia elata* Blume)为兰科天麻属多年

生草本植物,药用部位为其干燥块茎,是我国的贵重中药材。我国著名专家,中科院昆明植物所周铉先生将我国天麻分为如下 5 个变型^[1]:原变型-红天麻、乌天麻、绿天麻、黄天麻和松天麻。现代药理及临床研究表明,天麻对于高血压、偏头痛、失眠及心脑血管疾病等有较好的治疗效果^[2-4]。天麻的化学成分主要包括酚类、有机酸类、多糖类及甾体类等^[5],其中,除天麻素外,天麻昔元、对羟基苯甲醛及巴利森昔类成分均具较强的药理活性^[6-8]。本研究建立了 HPLC-ESI-TOF/MS 法分析测定天麻中化学成分的方法,指认了 15 个成分,并对其中 6 个化合物的含量进行了研究,以期能够为客观、全面评价天麻饮片的质量提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1120 型高效液相色谱仪;G6520A TOF/Q-TOF 质谱仪,配有 ESI 离子源,美国 Agilent 公司。MS205DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),精确到 0.01 mg。SB-3200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。BUCHI 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司)。

天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森昔 A、4,4'-二羟基二苄基醚均为本实验室自制纯品,上述对照品经高效液相色谱法检测,纯度均大于 98.0%。

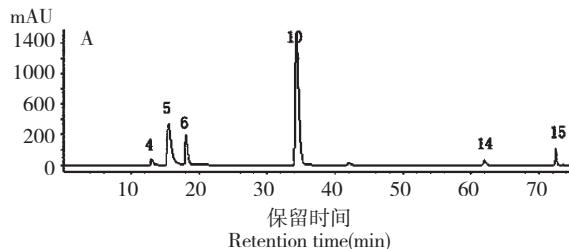


图 1 对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and samples (B)

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源(ESI);采用电喷雾正、负离子模式;全扫描范围 m/z 为 100~1000;喷雾气压:40 psi;干燥气流速:12.0 L/min;干燥气温度:350 °C;

在优化的色谱条件下,采用高分辨电喷雾飞行时间质谱技术,对天麻总样各峰进行指认。根据获得的化合物的精确分子量信息,DAD 检测器获得的紫外吸收信息,并参考相关文献对各化合物进行鉴

别,各化合物精确测量结果见表 1。

甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司),乙腈(色谱纯,美国 Fisher Scientific),甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),实验用水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

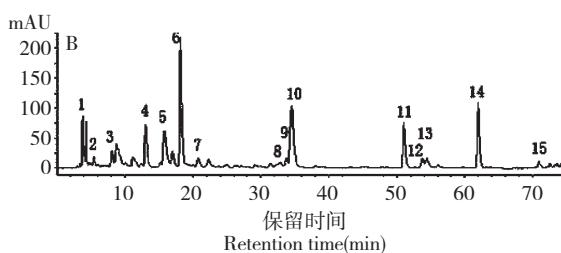
本实验所用天麻均来自于云南省邵通市彝良县小草坝天麻种植基地,收集 9 批(编号为 S1~S9)天麻饮片,S1~S3 为一级乌天麻,S4~S6 为二级乌天麻,S7~S9 为红天麻,经云南省农业科学院药用植物研究所刘大会副研究员鉴定为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 YMC-PEAK ODS-A column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.2% 甲酸水溶液(A)-甲醇溶液(B),梯度洗脱:0~5 min, 5% B;5~65 min, 5%~40% B;65~80 min, 40%~100% B;分析时间 80 min;体积流量 1 mL/min;柱温 25 °C;进样量 50 μL。

在上述色谱条件下,天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森昔 A、4,4'-二羟基二苄基醚理论塔板数均不低于 1 万,分离度与拖尾因子均符合含量测定要求。对照品和天麻样品(S1)色谱图见图 1。



别,各化合物精确测量结果见表 1。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备

分别精密称取天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森昔 A、4,4'-二羟基二苄基醚对照品适量,置同一 25 mL 容量瓶中,加 10% 乙腈适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 30、2、15、2、45、2 mg/mL 的混合对照品溶液。

表1 样品中15个化合物的ESI-TOF/MS精确质量测量结果

Table 1 ESI-TOF/MS accurate mass measurements of 15 compounds in samples

峰号 No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	碎片峰 Fragment peaks	M	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$
1	3.7	L-焦古氨酸 (L-pyroglutamic acid)	C ₅ H ₇ NO ₃	130.04927	129.04259	130.04987	
2	5.4	柠檬酸 (citric acid)	C ₆ H ₈ O ₇	215.01485	192.02710		215.01622
3	8.1	柠檬酸单甲酯 (citric acid monomethyl ester)	C ₇ H ₁₀ O ₇	229.03295	206.04265		229.03187
4	13.0	天麻素 (gastrodin)	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	309.09166	286.10525		309.09447
5	15.8	腺苷 (adenosine)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.1035	267.09675	268.10403	
6	18.1	对羟基苯甲醇 (p-hydroxybenzyl alcohol)	C ₇ H ₈ O ₂	125.05072	124.05243	125.05971	
7	20.7	N6-(4-羟基苄基)-腺苷 (N6-(4-hydroxybenzyl) adenosine)	C ₁₇ H ₁₉ O ₅ N ₅	374.14361	373.13862	374.14590	
8	32.8	巴利森苷 E (Parishin E)	C ₁₉ H ₂₄ O ₁₃	483.11136	460.1269		483.11091
9	33.7	硫-(4-羟基苄基)-谷胱甘肽 (s-(4-hydroxybenzyl)-glutathione)	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₇ S	414.13104	413.12567	414.13295	
10	34.5	对羟基苯甲醛 (p-hydroxybenzaldehyde)	C ₇ H ₆ O ₂	123.04112	122.03678	123.04406	
11	51.0	巴利森苷 B (Parishin B)	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₉	751.20726	728.21638		751.20560
12	53.7	巴利森苷 K (Parishin K)	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉	765.22321	742.23203		765.22125
13	54.3	巴利森苷 C (Parishin C)	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₉	751.20516	728.21638		751.20560
14	61.9	巴利森苷 A (Parishin A)	C ₄₅ H ₅₆ O ₂₅	997.31082	996.31107	997.31834	
15	72.7	4,4'-二羟基二苄基醚 (4,4'-dihydroxydibenzyl ether)	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	231.90627	230.09429	231.10157	

2.3.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过3号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,称定重量,超声处理(功率180 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,滤过,精密量取续滤液20 mL,浓缩至近干无醇味,残渣加乙腈-水(1:9)混合溶液溶解,转移至10 mL量瓶中,用乙腈-水(1:9)混合溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限(LOD)与定量限(LOQ)

分别精密量取混合对照品溶液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL置10 mL容量瓶中,加10%乙腈稀释至刻度,摇匀,即得不同浓度的混合对照品溶液。在“2.1”项色谱条件下进行分析,分别进样1

μ L,每个浓度进3针,测定峰面积平均值。以峰面积Y对浓度X(mg/mL)绘制标准曲线,得天麻素等6种成分的回归方程。将混合对照品溶液稀释至低浓度后分析,得到6种成分的LOD值(S/N≈3)和LOQ值(S/N≈10),结果见表2。从表2可以看出,各标准曲线的相关系数良好,方法灵敏度较高,可以满足天麻提取物中各活性成分的含量测定。

2.4.2 精密度试验

取混合对照品溶液,在上述色谱条件下进样50 μ L,连续进样6次,记录各自峰面积,计算天麻素等6种成分峰面积的RSD分别为1.22%、1.85%、1.12%、1.60%、1.23%、2.10%,表明本法精密度良好。

2.4.3 重复性试验

精密称取编号为S1的天麻饮片粉末2 g,按

表 2 6 种成分的回归方程及 LOD、LOQ 值

Table 2 Regression equations and values of LOD and LOQ of six components

化合物 Compound	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range (mg/mL)	相关系数 R^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
天麻素 Gastrodin	$Y = 2245.5X + 17.243$	3.0 ~ 30	0.9991	2.749	8.265
腺苷 Adenosine	$Y = 1883.8X + 9.0571$	0.2 ~ 2	0.9999	9.167	30.556
对羟基苯甲醇 p-Hydroxybenzyl alcohol	$Y = 5789X + 645.9$	1.5 ~ 15	0.9998	0.448	1.493
对羟基苯甲醛 p-Hydroxybenzaldehyde	$Y = 4917.4X + 63.752$	0.2 ~ 2	0.9999	2.683	8.945
巴利森昔 A Parishin A	$Y = 1710.1X + 830.1$	4.5 ~ 45	0.9993	3.284	10.948
4,4'-二羟基二苄基醚 4,4'-Dihydroxydibenzyl ether	$Y = 2888.9X + 46.951$	0.2 ~ 2	0.9996	0.694	2.313

“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依法测定并计算 6 份样品中 6 种成分的平均质量分数和 RSD。结果,天麻素等 6 种成分的平均质量分数分别为 2.2051、0.2911、1.4013、0.1026、5.9705、0.1346 mg/g, RSD% 分别为 1.52%、1.63%、2.13%、1.80%、1.32%、2.21%, 表明本方法重现性良好。

2.4.4 稳定性试验

取编号为 S1 的天麻饮片粉末制备的供试品溶液,室温放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 50 μL

分析,记录各自峰面积并计算 RSD,结果,天麻素等 6 种成分峰面积的 RSD% 分别为 1.51%、1.90%、1.48%、1.23%、2.21%、2.02%, 表明供试品溶液 6 种成分在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验

称取 S1 编号的天麻粉末 6 份,每份 2 g,精密称定。分别精密加入对照品适量,按“2.3.2”项下方法制成低、中、高 3 个浓度的供试品溶液,依法测定并计算 6 份样品中天麻素等 6 种成分的平均加样回收率和 RSD,详见表 3。

表 3 6 种成分加样回收率($n=3$)Table 3 The recovery of 6 analytes ($n=3$)

化合物 Analyte	样品中量 Original amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Detected amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average recovery (%)	RSD (%)
天麻素 Gastrodin	2305.7	1840	4023.5	97.05	97.13	1.83
		2310	4403.2	95.40		
		2750	5102.4	98.95		
腺苷 Adenosine	280.1	220	478.3	95.64	97.05	1.72
		290	550.9	96.63		
		330	603.3	98.89		
对羟基苯甲醇 p-Hydroxybenzyl alcohol	1301.0	1030	2301.7	98.74	97.63	2.38
		1300	2468.3	94.90		
		1530	2810	99.26		
对羟基苯甲醛 p-Hydroxybenzaldehyde	103.1	80	175.4	95.79	96.78	1.38
		110	205.1	96.25		
		120	219.3	98.30		
巴利森昔 A Parishin A	5870.6	4680	10398.3	98.57	98.53	0.57
		5820	11450.7	97.95		

化合物 Analyte	样品中量 Original amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Detected amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均值 Average recovery (%)	RSD (%)
4,4'-二羟基二苄基醚 4,4'-Dihydroxydibenzyl ether	131.8	7050	12800.5	99.07		
		110	230.9	95.49	97.14	2.40
		130	261.3	99.81		
		150	270.9	96.13		

2.5 样品含量测定

取9批天麻饮片,每批3份,按“2.3.2”项下方法分别制备供试品溶液,各进样50 μL ,以各成分峰

面积按外标法对其中的天麻素等6种成分进行测定,并计算每批3份的平均含量,结果见表4。

表4 9批天麻饮片中6种成分的平均含量

Table 4 Determination of 6 components in Gastrodiae Rhizoma

编号 No.	品种 Species	含量 Content (mg/g)					
		天麻素 Gastrodin	腺苷 Adenosine	对羟基苯甲醇 p-Hydroxybenzyl alcohol	对羟基苯甲醛 p-Hydroxybenzaldehyde	巴利森昔 A Parishin A	4,4'-二羟基二苄基醚 4,4'-Dihydroxydibenzyl ether
S1	一级乌天麻(邵通)	2.3057	0.2801	1.3010	0.1031	5.8706	0.1318
S2		2.0968	0.2809	1.2566	0.0739	4.9990	0.1372
S3		2.4569	0.3180	1.4200	0.0843	6.6142	0.1399
S4	二级乌天麻(邵通)	1.7740	0.1267	1.1380	0.0580	4.6992	0.0675
S5		1.7160	0.1257	1.2506	0.0605	4.8987	0.0621
S6		1.4904	0.1023	1.0939	0.0533	4.7010	0.0534
S7	红天麻(邵通)	3.0135	0.1697	1.1406	0.0780	5.9064	0.1022
S8		2.6545	0.1310	0.9411	0.0695	5.5511	0.0805
S9		2.8746	0.1505	1.0961	0.0601	5.3445	0.0932

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择

对天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森昔 A、4,4'-二羟基二苄基醚6种成分均进行紫外全波长扫描,结果显示最大吸收波长分别为220、260、225、270、220、225 nm,所以本实验选取两个检测波长对这6种成分进行含量测定,天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森昔 A、4,4'-二羟基二苄基醚检测波长为220 nm,腺苷、对羟基苯甲醛检测波长为270 nm。

3.2 流动相的选择

实验中的6种成分极性差异较大,故采用梯度洗脱,流动相比较了乙腈-0.05%磷酸系统和甲醇-0.1%甲酸系统^[9],结果乙腈系统初始梯度调到2%,天麻素与前面一小杂质峰不能基线分离,难以再调整,选择甲醇系统进行梯度洗脱程序优化后,各峰可以达到基线分离,故而确定本实验的洗脱系统

为甲醇梯度洗脱,且分离效果良好,重现性好。

3.3 小结

本实验结果表明,在不同品种的天麻饮片中,红天麻各成分含量稍高于乌天麻,一级乌天麻各成分含量高于二级乌天麻。同一品种天麻中,巴利森昔类成分含量较高,腺苷和4,4'-二羟基二苄基醚含量均较低。本实验天麻均为云南邵通产,天麻素与对羟基苯甲醇的含量均符合2015版《中国药典》对天麻含量测定的标准^[10],并且本实验首次测定了天麻中4,4'-二羟基二苄基醚的含量。另外,在实验中还存在一些结构尚未确定的化合物,总样图中亦可见其有较高含量,这些成分的存在或其含量的高低可能也会影响天麻的质量,因此,需进一步探索它们对天麻药理药效作用的贡献。

参考文献

- 国科学院中国植物志编辑委员会). *China flora Vol. eighteenth orchid(中国植物志第十八卷兰科)*. Beijing: Science Press, 1999. 31.
- 2 Zhang Q, Yang YM, Yu GY. Effects of gastrodin injection on blood pressure and vasoactive substances in treatment of old patients with refractory hypertension: A randomized controlled trial. *J Chin Int Med(中华国际医学杂志)*, 2008, 6: 695-699.
 - 3 Guo J(郭驹), Ma XY(马晓俞), Yu ZX(于朝霞), et al. Observation on efficacy of Yangxueqingnao granules and gasto-dine combined with nimodipine for treating migraine in 60 cases. *China Pharm(中国药业)*, 2014, 23(6): 70-71.
 - 4 Miao K(苗凯), Wang M(王美), Xie W(谢伟). A clinical observation on therapeutic effect of gastrodin injection on angina pectoris. *Tianjin Pharm(天津药学)*, 2009, 21(6): 26-27.
 - 5 Zhu HP(朱会鹏). Studies on chemical constituents of three medicinal herbs from Yunnan Zhaotong. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (云南中医学院), MSc. 2013.
 - 6 Li XF(李秀芳), Dai R(代蓉), Li GH(李国花), et al. An-
 - ti-platelet aggregation function and acute toxicity of 4-hydroxybenzyl aldehyde (4-HBAL) extracted from *Gastrodia elata* Blume. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2013, 25: 317-320.
 - 7 Li Y(李艳), Jiang S(蒋石), Guo YY(郭营营), et al. Anti-thrombotic and anti-inflammatory effects of 4-hydroxybenzyl alcohol from *Gastrodia elata*. *J Kunming Med Univ(昆明医科大学学报)*, 2015, 36(1): 28-31.
 - 8 Shin EJ, Whang WK, Kim SG, et al. Parishin C attenuate Phencyclidine-induced schizophrenia-like psychosis in mice: involvements of 5-HT1A receptor. *J Pharmacol Sci(药理科学杂志)*, 2010, 113: 404-408.
 - 9 Shan MQ(单鸣秋), Zhang L(张丽), Yu S(于生), et al. Simultaneous determination of eight active components in *Gastrodiae Rhizoma* by HPLC-MS. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2015, 46: 2087-2091.
 - 10 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). *Pharmacopoeia of the people's Republic of China(中华人民共和国药典)*. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015. Vol I, 58-59.

(上接第 1740 页)

- 7 Mackintosh JA. The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J Theor Biol*, 2001, 211: 101-113.
- 8 Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*, 2003, 5: 203-223.
- 9 Surwase SN, Patil SA, Jadhav SB, et al. Optimization of L-DOPA production by *Brevundimonas* sp. SGJ using response surface methodology. *Microbial Biotechnol*, 2012, 5: 731-737.
- 10 Guo J, Rao Z, Yang T, et al. High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 357: 85-91.
- 11 Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 99-102.
- 12 Wan X(万霞), Geng J(耿晶), Chen XD(陈向东), et al. Comparison study of L-Dopa melanins produced by five bac-
- terial strains. *J Wuhan Univ, Nat Sci(武汉大学学报,理学版)*, 2005, 51: 472-476.
- 13 Ke GQ(柯冠群), Chun Z(淳泽), Wan B(万波). Isolation and identification of high-yield strain of melanin. *Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报)*, 2005, 11: 760-762.
- 14 Gu MZ(顾敏舟), Tang JC(汤建才), Huang M(黄敏). Screening test and optimization of fermentation conditions for a microbial strain producing high yield of melanin. *J Sichuan Normal Univ, Nat Sci(四川师范大学学报,自然科学版)*, 2006, 29: 735-738.
- 15 Madhusudhan DN, Mazhari BB, Dastager SG, et al. Production and cytotoxicity of extracellular insoluble and droplets of soluble melanin by *Streptomyces sulusitanus* DMZ-3. *BioMed Res Int*, 2014, 2014: 164-165.
- 16 Zhao CH(赵昌会), Ye DZ(叶德赞). Taxonomy of the producing melanin. *Hubei Agric Sci(湖北农业科学)*, 2014, 53: 5146-5148.