

槐耳/板蓝根双向发酵体系物质基础变化

张文意, 张婧, 高鹏飞, 史新元*
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的:分析槐耳/板蓝根双向发酵体系的物质基础变化规律。方法:分别采用三氯甲烷和水提取不同发酵时间菌质中的脂溶性和水溶性成分,并通过 UPLC-MS 对提取物进行成分分析,指认发酵过程中变化明显的色谱峰,确定其分子结构。结果:槐耳/板蓝根菌质的脂溶性部分分离出 11 个色谱峰,经质谱确认出其中的 8 个化合物,分别为 3-甲醛吲哚、次黄嘌呤,2,4-喹唑啉二酮,丁香酸,(*E*)-3-(3',5'-二)甲氧基-4'-(羟基苯亚甲基)-2-吲哚酮,2,5-二羟基吲哚,鸟嘌呤,靛红;水溶性部分分离出 8 个色谱峰,经质谱确认出其中 5 个化合物,分别为精氨酸、甘草素、腺嘌呤、表告依春、色胺酮。结论:分离鉴定出的 13 种化合物具有多方面药效学作用,为后续的药效学研究提供了理论基础。

[关键词] 液质联用;槐耳;板蓝根;双向发酵;物质基础变化

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)16-0066-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016160066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1415.034.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 14:15

Changes in Chemical Component Content of Fungal Substance *Trametes robiniophila*/Isatidis Radix Co-fermentation System

ZHANG Wen-yi, ZHANG Jing, GAO Peng-fei, SHI Xin-yuan*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To study the changes in chemical component content in fungal substance of *Trametes robiniophila*/Isatidis Radix co-fermentation system. **Method:** Chloroform and water were used respectively to extract fat-soluble and water-soluble components in fungal substance at the different fermentation time. The fat-soluble and water-soluble fractions of the co-fermentation system were analyzed by UPLC-MS, and the obviously changed chromatographic peak in the fermentation process was identified to determine the molecular structure. **Result:** There were 11 chromatographic peaks isolated in the fat-soluble part of *Trametes robiniophila*/Isatidis Radix fungal substance, and eight compounds were identified by mass spectrometry. They were 3-formaldehyde indole, hypoxanthine, 2, 4-quinazoline diketone, clove acid, (*E*)-3-(3', 5'-2) methoxy-4'-(hydroxy benzal)-2-indole ketone, 2, 5-2 hydroxy indole, guanine, and indigo red, respectively. In the water-soluble part, eight chromatographic peaks were isolated and identified by mass spectrometry. The five compounds were arginine, licorice essence, adenine, epigoitrin, and lubricious amine ketone, respectively. **Conclusion:** The 13 isolated compounds with various pharmacodynamics effects provide a theoretical basis for follow-up pharmacodynamics studies.

[Key words] UPLC-MS; *Trametes robiniophila*; Isatidis Radix; co-fermentation system; change in chemical component content in fungal substance

[收稿日期] 20150817(006)

[基金项目] 北京市科委科技新星计划交叉学科项目(xxhz201210)

[第一作者] 张文意, 硕士, 从事发酵工程研究, Tel:13718130431, E-mail:zhangwenyi125@163.com

[通讯作者] *史新元, 教授, 博士生导师, 从事中药生物技术研究, Tel: 010-84738621, E-mail:xyshi@126.com

“药用真菌新型(双向型)固体发酵”技术的关键是将具有活性成分的中药材作为真菌生长的药性基质,药性基质不仅满足了真菌的生长需求,又可被真菌的生长代谢改变,从而可能产生新的活性成分,因而被称为“双向发酵”^[1]。若发酵组合设计正确、生产工艺合理,双向发酵可起到对中药的减毒、增效、扩效等作用^[2]。王身艳等^[3]用槐耳等 19 种药用真菌对川乌进行双向发酵,在高效液相色谱图中发现乌头碱类的含量明显降低,其他未知成分含量明显高于市售制川乌,并且发酵后的“药性菌质”镇痛作用明显增强。庄毅等^[4]研究的“槐芪菌质”,其所提成分在促进机体免疫力与抗病毒功效上与槐耳菌质相比有较大提高,也证实了双向发酵的产物“药性菌质”经常比该真菌或药性基质本身或两者简单相加产生更良好的药效。

槐耳作为已被卫生部批准并在临床广泛使用的抗癌药物,具有抗肿瘤、抗病毒、提高免疫力等功效^[5]。板蓝根作为有代表性的清热解毒类中药,其相关成分及药效学作用已有较多研究^[6]。实验室前期工作表明槐耳在板蓝根上发酵,其适应性良好,并已优化了该体系的固体双向发酵工艺^[7]。本文以槐耳/板蓝根为研究载体进行双向发酵,采用超高效液相色谱质谱联用法(UPLC-MS)分析发酵过程中相应的有效成分及其变化规律,为进一步的药效学研究提供理论基础。

1 材料

Waters Acquity™ UPLC-Quattro Premier XE QQQ-Acquity™ PDA 色谱质谱联用仪(Waters 公司),XP205 型电子天平(Mettler 公司),Q-10 型纯水仪(Millipore 公司),VV2000 型旋转蒸发器(Heidolph 公司)。

无水葡萄糖(批号 20100923),琼脂(批号 20110721),酵母粉(批号 20100813),麦麸, KH_2PO_4 (批号 20110123), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (批号 20110312),三氯甲烷(批号 20121123),以上试剂均为分析纯;甲酸,甲醇光谱纯;蒸馏水(实验室自制, $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

槐耳购自东北食药真菌研究所。板蓝根购自安国药材市场,经北京中医药大学中药学院刘颖副教授鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 槐耳板蓝根双向发酵

2.1.1 菌种的活化 将槐耳保藏菌种接种于 PDA

试管斜面, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 80% 下活化 5 d 备用。

2.1.2 液体菌种制备 采用文献[7]方法制备种子液。

2.1.3 双向发酵 将板蓝根药材粉碎,过 40 目筛,称取板蓝根粉末 10 g 装于 500 mL 锥形瓶中,加入蒸馏水 12 mL 浸湿药材粉末, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。每个固体发酵瓶接种液体菌种 8 mL,置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 75% 恒温恒湿箱避光培养。空白对照为板蓝根生药。阴性对照为不添加液体菌种,加入与液体菌种等量的无菌水,其他操作同发酵样品。每个条件作 3 个平行。

2.2 样品溶液的制备 由于槐耳/板蓝根化学成分复杂,分别用三氯甲烷和水提取脂溶性和水溶性部分。

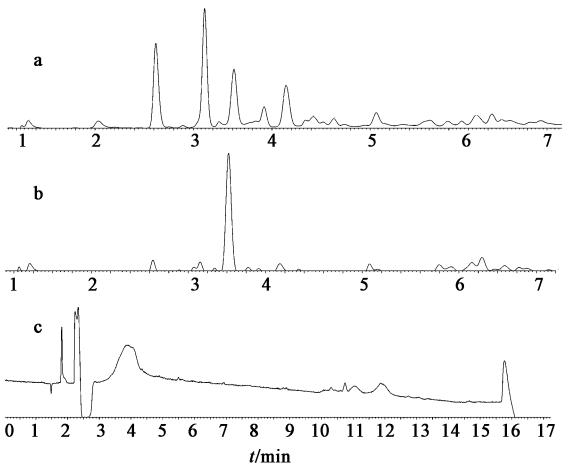
2.2.1 脂溶性成分的制备 取粉碎过 60 目筛后的空白对照、阴性对照、槐耳、发酵 3, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 d 样品约 1 g,精密称定,置 100 mL 圆底烧瓶中,加三氯甲烷 25 mL,水浴回流 1 h,滤过,残渣加三氯甲烷 25 mL,继续水浴回流 1 h,滤过,合并 2 次滤液,旋转蒸发浓缩并定容至 2 mL, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 水溶性成分的制备 取与制备脂溶性成分等量的样品,置 100 mL 圆底烧瓶中,加水 25 mL,水浴回流 2 h,滤过,加无水乙醇至醇体积分数为 65%,放置过夜,滤过,取滤液,旋转蒸发浓缩并定容至 2 mL, $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件 BEH C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \text{ }\mu\text{m}$),流速 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;脂溶性成分分析流动相 0.1% 甲酸(A)-甲醇(B)梯度洗脱色谱条件 ACQUITY UPLC® BEH C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \text{ }\mu\text{m}$),流速 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$;脂溶性成分分析流动相 0.1% 甲酸(A)-甲醇(B)梯度洗脱($0 \sim 10 \text{ min}$, $100\% \sim 70\% \text{ A}$; $10 \sim 25 \text{ min}$, $70\% \sim 90\% \text{ A}$; $25 \sim 26 \text{ min}$, $90\% \sim 100\% \text{ A}$; $26 \sim 30 \text{ min}$, $100\% \text{ A}$; $30 \sim 31 \text{ min}$, $100\% \sim 0\% \text{ A}$; $31 \sim 40 \text{ min}$, $0\% \text{ A}$; $40 \sim 41 \text{ min}$, $0\% \sim 100\% \text{ A}$; $41 \sim 45 \text{ min}$, $100\% \text{ A}$),检测波长 265 nm;水溶性成分分析流动相 0.2% 甲酸(A)-甲醇(B)梯度洗脱($0 \sim 10 \text{ min}$, $100\% \sim 80\% \text{ A}$; $10 \sim 15 \text{ min}$, $80\% \sim 70\% \text{ A}$; $15 \sim 25 \text{ min}$, $70\% \text{ A}$; $25 \sim 31 \text{ min}$, $70\% \sim 100\% \text{ A}$; $31 \sim 40 \text{ min}$, $100\% \text{ A}$),检测波长 254 nm。检测波长 265 nm;水溶性成分分析流动相 0.2% 甲酸(A)-甲醇(B)梯度洗脱,检测波长 254 nm。

2.4 质谱条件 正离子模式检测,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V,源温度 150 °C,脱溶剂温度 350 °C,脱溶剂气流速 600 L·h⁻¹,扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000。

2.5 脂溶性成分的 UPLC-MS 分析 发酵菌质、板蓝根空白对照及槐耳的三氯甲烷提取成分色谱见图 1。发酵菌质分离出的色谱峰较板蓝根空白对照多,表明在双向发酵过程中有新的脂溶性成分产生;发酵菌质与槐耳色谱图差异较大,发酵产生的化学成分变化主要来自于槐耳在板蓝根上生长带来的生物转化。发酵不同时间双向发酵体系的脂溶性成分色谱见图 2。随着发酵时间的变化,不同天数色谱图也存在一个渐变的过程,整体变化主要发生在第 3 ~ 20 天之间,而第 25 ~ 35 天其色谱图不再发生变化。以各色谱峰的峰面积(*A*)与样品称样量(*W*)的比值(*A/W*)为纵坐标,发酵天数为横坐标,绘制发酵时间 *A/W* 变化图,见图 3。

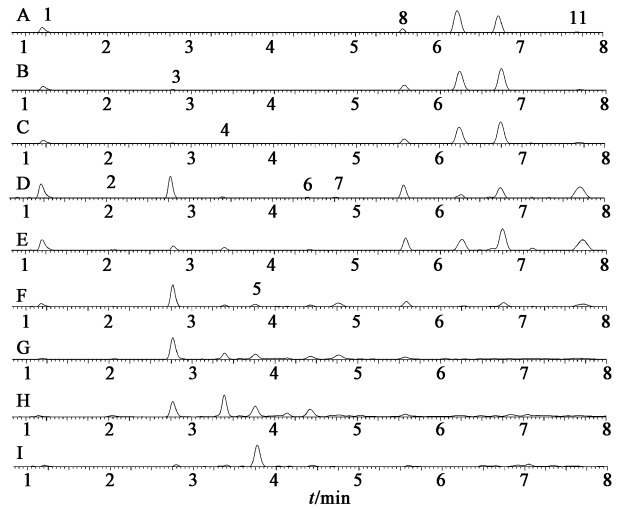


a. 发酵 3 d 菌质; b. 板蓝根; c. 槐耳

图 1 脂溶性成分 UPLC

Fig. 1 UPLC of fat-soluble components *Trametes robiniophila*

由图 3 可知,变化较明显的 11 个色谱峰中,峰 2,峰 7,峰 9,峰 10,峰 11 是发酵过程新产生的。峰 1 的 *A/W* 值无规律变化;而峰 3,峰 4,峰 6,峰 7 同峰 2 的 *A/W* 值变化规律一致,均在发酵初期迅速增加,3 ~ 6 d 时达最大值后,迅速下降,在发酵过程后期逐渐消失;峰 8 与上述 5 个峰变化趋势相似,但下降幅度较小,且最终未全消失;峰 5 的 *A/W* 值在 0 ~ 10 d 期间变化不大,但在 10 d 后迅速下降,至第 15 天时该峰已完全消失;峰 9 与峰 10 在发酵第 10 天出现,25 ~ 30 d 时 *A/W* 值出现最大值后开始下降;峰 11 的 *A/W* 值在发酵第 15 天达最大值后开始下降。11 个色谱峰含量的明显变化表明双向发酵体



A ~ H. 分别为发酵 35, 30, 25, 20, 15, 10, 6, 3 d 的药用菌质; I. 阴性对照(从左至右共计 11 个峰)

图 2 发酵不同天数脂溶性成分叠加 UPLC

Fig. 2 UPLC chromatograms of fat-soluble components in fermentation of each day

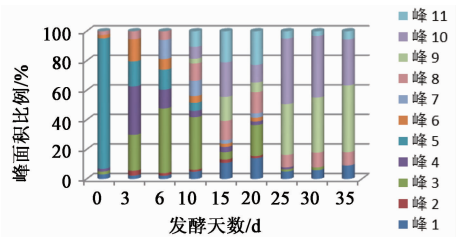


图 3 脂溶性部分色谱图中各峰的 *A/W* 随发酵时间变化情况

Fig. 3 Changes of *A/W* of peaks in fat-soluble components chromatogram with time of fermentation

系对这 11 个色谱峰所代表的化合物含量具有显著影响。采用质谱确认化合物的相对分子质量从而指认色谱图中变化较大的化合物结构。

UPLC 分析出来的 11 个色谱峰在质谱的总离子流色谱图并未全部出现,总离子流色谱图中只检出峰 3,峰 4,峰 5,峰 6,峰 8,峰 9,峰 10,峰 11 共计 8 个峰,指认出结构分别为 3-甲醛吡啶、次黄嘌呤、2,4-啉啉二酮、丁香酸、(E)-3-(3',5'-二)甲氧基-4'-(羟基苯亚甲基)-2-吡啶酮,2,5-二羟基吡啶、鸟嘌呤、靛红,具体化合物见图 4,表 1。

2.6 水溶性成分的 UPLC-MS 分析 发酵过程也产生了新的水溶性成分,主要原因是槐耳在板蓝根上生长产生的生物转化见图 5。水提液的 UPLC 图谱中分离出 8 个变化较为明显的色谱峰见图 6。结果表明,峰 1,峰 5,峰 7 均为发酵初期出现的新色谱峰,峰 1 的 *A/W* 值在整个发酵过程呈现上升趋势,峰 5,峰 7 分别在发酵第 15 天和第 3 天出现最大 *A/W* 值后呈现下降趋势,在发酵 30 d 时出现回升现

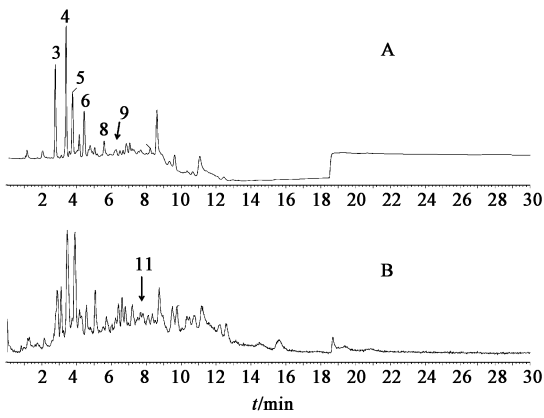


图 4 脂溶性样品典型 UPLC (A) 和总离子流 MS (B)

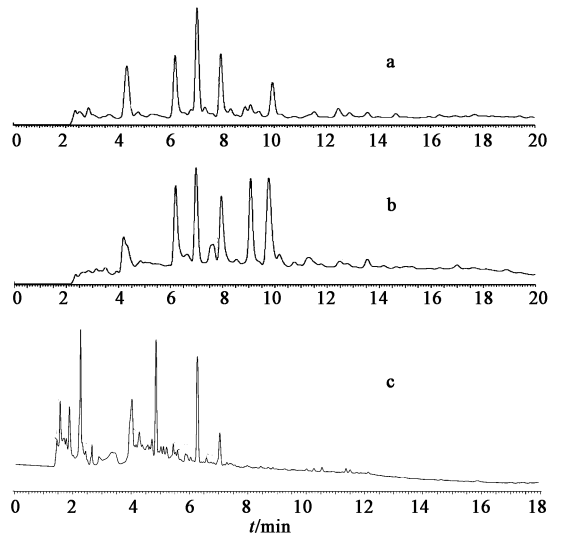
Fig. 4 Typical UPLC of fat-soluble sample (A) and total ions MS (B)

表 1 脂溶性提取液中各化合物

Table 1 Various compounds in fat-soluble extract

峰号	t_R /min	相对分 子质量	MS m/z	来源	化合物	分子式
峰 3	2.77	145	146 [M + H] ⁺ 168 [M + Na] ⁺		3-甲醛吲哚	C ₉ H ₇ NO ₂
峰 4	3.39	136	137 [M + H] ⁺		次黄嘌呤	C ₅ H ₄ N ₄ O
峰 5	3.77	162	163 [M + H] ⁺ 185 [M + Na] ⁺		2, 4-喹唑啉 二酮	C ₈ H ₆ N ₂ O ₂
峰 6	4.43	198	237 [M + K] ⁺		丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅
峰 8	5.57	298	299 [M + H] ⁺		(E)-3-(3', 5'-二)甲氧基- 4'-(羟基苯亚 甲基)-2-吲 哚酮	C ₁₇ H ₁₆ NO ₄
峰 9	6.24	149	150 [M + H] ⁺ 172 [M + Na] ⁺		2, 5-二羟基 吲哚	C ₈ H ₇ NO ₂
峰 10	6.74	151	152 [M + H] ⁺ 174 [M + Na] ⁺		鸟嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅ O
峰 11	7.68	147	170 [M + Na] ⁺		靛红	C ₈ H ₅ NO ₂

象;峰 2 与峰 6 变化趋势相似,均在发酵第 10 天出现最小 A/W 值后开始回升,至 30 d 后再次下降;峰 3,峰 4 分别在发酵第 15 天和第 10 天出现最小 A/W 值后呈现上升趋势,至 25 d 后均再次下降;发酵至第 3 天时,峰 8 开始出现肩峰,表明该位置有新色谱峰产生,且随着发酵天数的增加该峰的 A/W 值不断增大,但在现在条件下无法将其与峰 8 完全分离。8 个色谱峰的 A/W 值随着发酵的进行出现了明显变化,说明双向发酵对 8 个色谱峰所代表的化合物具有显著影响,见图 7。采用质谱确认化合物的相对

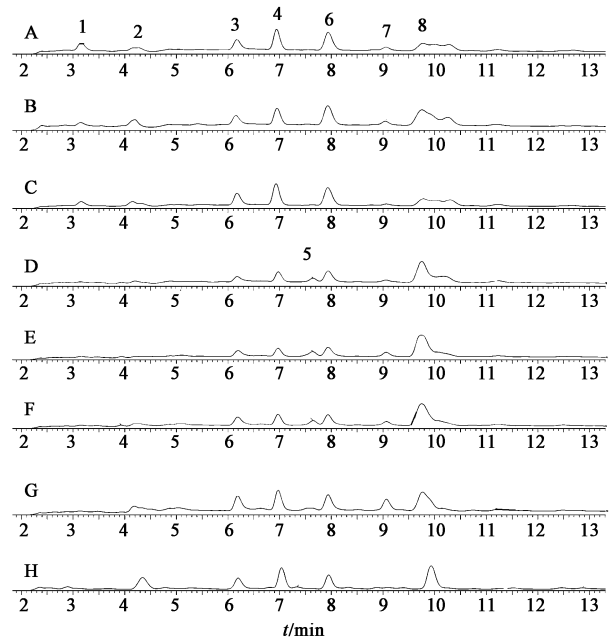


a. 板蓝根; b. 发酵 15 d 菌质; c. 槐耳

图 5 水溶性成分 UPLC 分析

Fig. 5 UPLC of water-soluble components

分子质量从而指认色谱图中变化较大的化合物结构。



A ~ G. 分别为发酵 35, 30, 25, 15, 10, 6, 3 d 的药性菌质; H. 阴性对照色谱; 从左至右共计 8 个峰

图 6 水溶性提取液每天发酵提取液叠加 UPLC

Fig. 6 UPLC of water-soluble components in fermentation of each day

UPLC 分析出来的 8 个色谱峰在质谱的总离子流图并未全部出现,见图 8。总离子流图中只检出峰 2, 峰 3, 峰 4, 峰 6, 峰 8 共 5 个峰, 指认出为精氨酸、甘草素、腺嘌呤、表告依春、色胺酮。具体化合物见表 2。

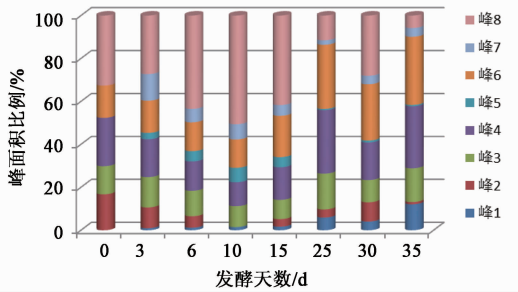


图 7 水溶性部分色谱图中各峰 A/W 随发酵时间变化情况
Fig. 7 Changes of A/W of peaks in the water-soluble components chromatogram with time of fermentation

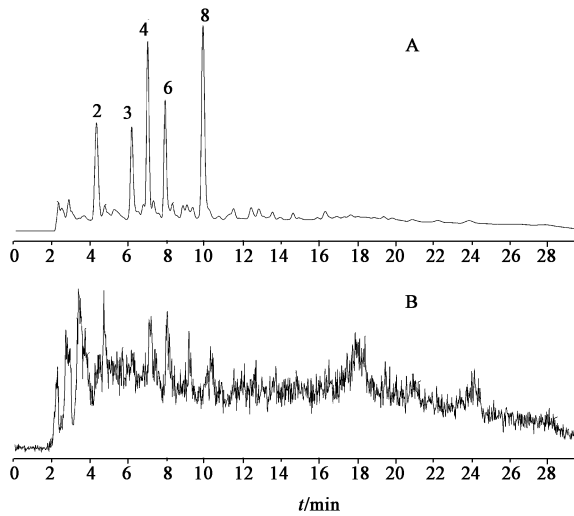


图 8 水溶性样品典型 UPLC (A) 和总离子流 MS (B)
Fig. 8 Typical UPLC of water-soluble sample (A) and total ions MS (B)

表 2 水提取液中各化合物
Table 2 Various compounds in water-soluble extract

峰号	t_R /min	相对分子 质量	MS (m/z)	来源	化合物	分子式
峰 2	4.36	174	175	$[M+H]^+$	精氨酸	$C_6H_{14}N_4O_2$
峰 3	6.20	256	257	$[M+H]^+$	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$
峰 4	7.04	135	136	$[M+H]^+$	腺嘌呤	$C_5H_5N_5$
峰 6	7.95	129	152	$[M+Na]^+$	表告依春	$C_8H_6N_2O_2$
峰 8	9.93	248	249	$[M+H]^+$	色胺酮	$C_{15}H_8N_2O_2$

3 讨论

本文采用 UPLC-MS 对槐耳板蓝根双向发酵进行成分分析,结果表明,特征化合物随着发酵的进行发生了明显变化,经质谱确认 13 种化合物含量的变化预示着槐耳/板蓝根双向发酵体系药效的变化。如作为板蓝根质量控制指标的表告依春,其含量的增加提示双向发酵体系抗病毒药效有可能增强。而板蓝根另一种主要药效成分——丁香酸的减少可能

导致体系抗内毒素药效的降低^[8]。板蓝根中含量较高的色胺酮^[9]能在抗肿瘤、抗菌、抗病毒等方面发挥良好作用,其含量增加表明双向发酵体系这方面的药效会有所提高。具有抗黄疸作用和免疫抑制的甘草素^[10]在体系中含有变化不明显,该方面药效可能不会受太大影响。靛红具有镇静、抗焦虑、抗肿瘤、抗衰老等作用^[11],其含量略有增加可能导致菌质药效的增强。嘌呤类化合物次黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤以及精氨酸作为细胞生长代谢的必要合成原料,含量增加可能有助于提高细胞代谢。这些化合物含量的变化可能对槐耳板蓝根体系的药效产生积极影响。后续研究可着重于槐耳/板蓝根双向发酵体系的抗病毒、抗肿瘤、抗菌等药效方面的研究。本研究拟通过分析各化合物的变化规律,寻求最佳药效的时间点,并为后续药效研究提供理论依据。

[参考文献]

[1] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 3-6.
 [2] 张普照, 杨雨娟, 侯志帆, 等. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 59-62.
 [3] 王身艳, 潘扬, 蒋亚平, 等. 双向发酵对川乌指纹图谱及乌头碱类成分含量的影响[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3712-3714.
 [4] 庄毅, 池玉梅, 陈慎宝. 药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质的研制[J]. 中国药学杂志, 2004, 29(3): 175-178.
 [5] 杨爱琳, 胡仲冬, 屠鹏飞. 槐耳抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4805-4810.
 [6] 方建国, 万进, 汤杰, 等. 板蓝根防治病毒性感染性疾病的研究概况[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3169-3172.
 [7] 张婧, 郭明晔, 程亦雄, 等. 响应面法优化槐耳/板蓝根双向发酵条件[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 34-37.
 [8] 陈凯, 窦月, 陈智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 275-278.
 [9] 缪珊, 孙纪元, 谢艳华, 等. 色胺酮的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 152-155.
 [10] 陈红. 甘草药理作用概述[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 37-41.
 [11] 陈刚, 郝小江. 靛红生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(2): 356-360.

[责任编辑 顾雪竹]