

文章编号:1001-6880(2011)06-1163-04

发酵生产龙血竭中龙血素 A 和 B 的分析

赵 洁 李尚真 宋启示*

中国科学院西双版纳热带植物园,昆明 650223

摘 要:以高效液相色谱法检测血竭诱导菌在不同发酵时间下发酵龙血树干粉和龙血树愈伤组织的产物中龙血素 A 和龙血素 B 的含量。干粉发酵产物中,龙血素 A 的含量大于愈伤组织发酵产物中的含量,并且在第四周时达到最大值 0.253 mg/g;龙血素 B 在第三周时达最大值 0.519 mg/g。愈伤组织发酵产物也含有少量的龙血素 A 和龙血素 B。虽然发酵产物中的龙血素 B 远远高于龙血树根、茎、叶中的含量,但还是低于 0.4% 的质量标准,因此不能应用于生产。

关键词:龙血树;龙血竭;发酵;高效液相色谱法;龙血素 A;龙血素 B

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

Analysis of Loureirins A and B in the Dragon's Blood Produced by Fermentation

ZHAO Jie, LI Shang-zhen, SONG Qi-shi*

Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: In this study, the contents of loureirins A and B in the fermentation products from the dry powder and the callus of *Dracaena cochinchinensis* were determined by HPLC with different fermentation time. The results showed that the dry powder produced more loureirin A during fermentation comparing with the callus of *Dracaena cochinchinensis*, and the content of loureirin A reached a peak of 0.253 mg/g by four-week fermentation. Loureirin B reached a peak of 0.519 mg/g after three weeks' fermentation with the dry powder. Yet, the callus produced a small amount of loureirins A and B during the fermentation process. Although the content of loureirin B obtained by fermentation was much higher than those in the roots, stems and leaves of *Dracaena cochinchinensis*, this process can still not be applied in drug production since the produced amount was lower than the quality standard of 0.4%.

Key words: *Dracaena cochinchinensis*; Dragon's Blood; fermentation; HPLC; loureirin A; loureirin B

现代医学研究证实,血竭具有改善机体微循环、调节机体新陈代谢、增强机体免疫功能等作用。它既能活血化淤,又能收敛止血,在治疗中医血症方面具有双向调节作用。在自然界中,龙血竭的形成是一个非常缓慢的过程,需要几年甚至几十年的时间。而目前用于龙血竭生产的原料是直接取自于野生成体剑叶龙血树的茎干部分。由于多年来大量的采集应用,剑叶龙血树资源已日渐稀少^[1]。

关于血竭的形成,国内部分学者做过一定的实验,发现血竭的形成就是一种植物与真菌等微生物相互作用产物。我国 90 年代以来,对龙血树共生真菌及其与血竭形成的关系有少量的初步探讨^[2-4],提出真菌诱导血竭产生假说。而应用真菌在含有龙血

树材料的培养基中发酵来生产龙血竭,国内外都未曾有报道。因此本实验研究利用剑叶龙血树茎干干粉和愈伤组织与真菌相互作用来发酵生产龙血竭。并通过 HPLC 来检测发酵产物中龙血素 A 和龙血素 B 的含量,进而比较不同的发酵时间,不同发酵材料下产生的龙血竭成分的含量。为以后合理利用发酵来生产龙血竭提供一定的技术和理论依据,从而更好的保护龙血树资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

龙血树干粉和愈伤组织来源于云南省勐仑镇中国科学院西双版纳热带植物园内自然生长的剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的茎干和茎尖。

1.2 愈伤组织培养

龙血树茎尖诱导产生的呈淡黄色,较酥松的愈

收稿日期:2010-02-03

接受日期:2010-06-12

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目子课题(07ZK171K01);国家 863 项目子课题(2007AA021504)

* 通讯作者 Tel: 86-871-5160902; E-mail: songqs@xtbg.ac.cn

伤组织,培养于 26 °C 恒温培养箱中。所用培养基为改良 B5 培养基。

1.3 真菌的培养

菌株来源于本实验室于 2002 年从剑叶龙血树茎杆损伤带红色脂块部位分离得到的一株真菌(代号 brwg),经中国科学院微生物研究所鉴定为镰刀属真菌 *Fusarium graminearum*,菌种保藏于中国科学院微生物研究所。在发酵前活化菌种,培养于 28 °C 恒温箱中 3 d 左右。菌种培养所用培养基为改进的马铃薯固体培养基。

1.4 龙血树干粉发酵培养

在含有龙血树干粉的 PDA 培养基(每 1000 mL 中加入龙血树干粉 2.5 g,培养一周所用培养基为 5000 mL)中加入活化的龙血竭诱导菌株 brwg 后于发酵罐内发酵培养(温度: 28 °C,转速: 300 r/min, PH: 6.8)。在发酵过程中,每隔一周增加 1000 mL 的 PDA 培养基。不同的发酵批次其发酵时间不同,都是以一个周为时间单位,培养一周、两周、三周、四周、五周。取出发酵液后,用正丁醇萃取发酵液。蒸馏浓缩后再用纯净水和正丁醇(比例为 1:1)溶解,取正丁醇部分蒸干后用适量的二氯甲烷充分溶解、过滤、蒸馏得到发酵产物。

1.5 龙血树愈伤组织发酵培养

将愈伤组织和活化的 brwg 真菌一起分别加到 16 瓶装有 200 mL 的 PDA 培养基的三角瓶中,在摇床上发酵培养(每 200 mL 培养基中加愈伤组织 1.5 ~ 2.0 g)。发酵条件、时间及发酵后的提取方法同龙血树干粉的发酵培养,但在培养的过程中不再加入培养基。

2 仪器与试剂

BIOTECH-10BGZ 发酵罐、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台、LDZX-40BI 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器、GNP-9080 型隔水式恒温培养箱、HZQ-F160 型全温振荡培养箱、BüCHI 旋转蒸发仪、Waters 高效液相色谱仪、摇床、电子天平、超声波振荡仪等。龙血素 A 对照品(实验室前期分离得到)、龙血素 B 对照品(中国药品生物制品检定所)、甲醇、乙腈均为色谱纯、水为娃哈哈纯净水、其余试剂均为分析纯。

3 HPLC 检测方法与结果

3.1 溶液制备

3.1.1 对照品溶液

分别取龙血素 A、B 对照品适量,精密称定。加流动相溶解配制成每 1 mL 含龙血素 A 190 µg/mL、龙血素 B 130 µg/mL 的对照品溶液。

3.1.2 发酵样品溶液

取发酵所得到的样品约 0.1 g 精密称定。置于 5 mL 容量瓶中,加入甲醇(色谱纯)溶解,超声处理 30 min,放冷。加甲醇到容量瓶刻度,离心,取滤液部分用微孔滤膜(0.45 µm)滤过,即得。

3.2 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 µm);流动相:冰醋酸溶液(水:醋酸 = 100:1):乙腈 = 63:37,流速为 1 mL/min;检测波长为 274 nm;柱温为 40 °C。在上述色谱条件下,理论塔板数按龙血素 A、B 峰计算均不低于 10000,龙血素 A 峰和 B 峰的分离度大于 1.27,龙血素 A 的保留时间约为 28 min,龙血素 B 的保留时间约为 31 min。

3.3 线性关系考察

精密吸取浓度为 190 µg/mL 的对照品龙血素 A 溶液 0.5 mL;浓度为 130 µg/mL 的对照品溶液龙血素 B 溶液 1 mL 分别于 10 mL 的容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。分别进样 2、4、5、6、8 和 10 µL,按上述色谱条件测定色谱峰面积。以峰面积为纵坐标,对照品进样量(µL)为横坐标,绘制标准曲线。结果表明龙血素 A 在 19 ~ 95 ng、龙血素 B 在 26 ~ 130 ng 呈现良好的线性关系。龙血素 A、B 的回归方程分别为: $Y = 6 \times 10^6 X - 9896.6$, $r = 0.9998$; $Y = 10^6 X - 4599.4$, $r = 0.9995$ 。

3.4 样品测定

分别精密吸取浓度为 190 µg/mL 的龙血素 A、

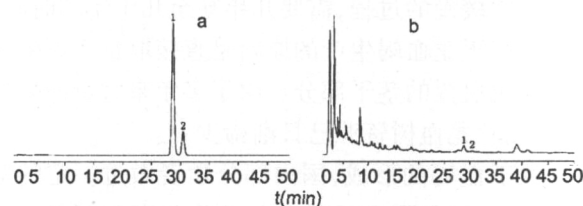


图1 龙血素 A 和 B 对照品与龙血树发酵产物的 HPLC 图
Fig.1 HPLC Chromatogram of loureirins A and B and fermentation product

a-龙血素 A (1) 和 B (2) 对照品; a-loureirins A and B; b-龙血树干粉发酵 2 号; b-the sample 2 fermentation product with dry powder of *D. cochinchinensis*

浓度为 130 ug/mL 的龙血素 B 的对照品混合液与发酵样品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪。按上述“3.2”色谱条件测定 ,记录色谱图 ,按外标法计算样品中龙血素 A 和龙血素 B 的含量 ,见表 1 和表 2。

4 实验结果

4.1 HPLC 谱图显示发酵样品中含有少量的龙血素 A 和龙血素 B ,极性大的杂质较多(图 1)。

表 1 龙血树干粉发酵产物中龙血素 A 和 B 的含量 (n = 3)

发酵产物编号 Sample number	培养基总量 Culture medium volume (mL)	发酵时间 Fermentation time (d)	发酵产物 Fermentation products (g)	龙血素 A Loureirin A (mg/g)	龙血素 B Loureirin B (mg/g)
1	5000	7	7.33	0.076	0.090
2	6000	14	5.46	0.132	0.113
3	7000	21	3.10	0.069	0.519
4	8000	28	1.40	0.253	0.309
5	9000	35	2.68	0.073	0.007

4.3 龙血树愈伤组织发酵 龙血树愈伤组织发酵产物的总量随发酵时间增加反而减少 ,龙血素 A 的含量在 0.034 ~0.068 mg/g 之间 ,发酵四周时达最大值 0.068 mg/g; 龙血素 B 的含量在 0.067 ~0.261

4.2 龙血树干粉发酵 通过对比不同发酵时间下龙血树干粉发酵产物的总量及其中的龙血素 A 和龙血素 B 的含量 ,发现即使每隔一周增加一定的培养基 ,龙血树干粉发酵产物总量随着发酵时间的增加反而呈减少的趋势。龙血素 A 的含量在 0.069 ~0.253 mg/g 之间 ,发酵四周时达最大值 0.253 mg/g; 龙血素 B 含量在 0.007 ~0.519 mg/g 之间 ,并且在发酵三周时达最大值 0.519 mg/g(表 1)。

mg/g 之间 ,发酵四周时达最大值 0.261 mg/g(表 2)。愈伤组织发酵培养中龙血素 A 和 B 的含量总体要低于龙血树干粉发酵中的含量。

表 2 龙血树愈伤组织发酵产物中龙血素 A 和 B 的含量 (n = 3)

发酵产物编号 Sample No.	培养基总量 Culture medium volume (mL)	发酵时间 Fermentation time (d)	发酵产物 Fermentation products (g)	龙血素 A Loureirin A (mg/g)	龙血素 B Loureirin B (mg/g)
1	3200	7	1.76	0.034	0.227
2	3200	14	1.58	0.060	0.067
3	3200	21	1.39	0.025	0.211
4	3200	28	1.19	0.068	0.261
5	3200	35	1.16	0.034	0.256

5 讨论

5.1 发酵液只用正丁醇提取后进高效液相 ,图谱显示前面极性较大的杂质峰较多。因此把浓缩后的发酵液又用正丁醇和水以 1:1 的比例溶解后取正丁醇部分蒸干 ,再用二氯甲烷充分溶解过滤后蒸干得到发酵产物。从而减少了部分极性较大的杂质。

5.2 在愈伤组织发酵培养过程中 ,混合愈伤组织生长的 B5 培养基和真菌生长的 PDA 培养基来寻找兼顾愈伤组织和真菌发酵生长的条件时 ,发现真菌在含有 B5 的培养基中生长较差 ,发酵液未转红。

这可能是愈伤组织生长是一个长期的过程 ,而真菌生长周期较短 ,因此在以后的发酵过程中就以真菌生长条件来确定。

5.3 实验结果表明 ,即使在发酵过程中每隔一周增加一定的培养基 ,龙血树干粉发酵产物总重量随着发酵时间的增加仍呈减少趋势; 而愈伤组织发酵培养蒸馏后的产物总量也随着发酵时间的增加逐渐减少。原因可能是在发酵过程中 ,由于培养基里的营养物质不断减少 ,真菌为维持生长消耗了部分代谢物。另一方面 ,我们在取出发酵液时发现菌体均呈块状 ,发酵液内通气较好 ,营养丰富 ,菌丝体聚集

成块状即形成菌球后会形成营养梯度,使菌球内部的细胞受到挤压导致养分扩散不能自由进行,菌球的中心由于细胞的自溶作用而形成空心^[5],真菌代谢产物减少,这可能是造成发酵产物下降的另一个主要原因。

5.4 剑叶龙血树根、茎、叶中龙血素 B 的含量分别为 0.000 mg/g, 0.000 mg/g 和 0.0002 mg/g^[6]其中所用的龙血树材料与本实验中所用的龙血树材料均来源于云南省勐仑镇中国科学院西双版纳热带植物园内自然生长的剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* 而发酵结果显示,龙血素 B 的含量均远远大于剑叶龙血树根、茎、叶中的含量。龙血素 B 具有较好的抗血栓、抗血瘀、抗凝血等活血化瘀药理作用^[7],它是龙血竭的活性部分和有效成分。这也将为以后发酵生产龙血竭提供一定的研究方向和指导意义。

5.5 龙血树干粉和龙血树愈伤组织发酵中龙血素 A 和 B 的含量没有明显的差异。虽然通过发酵产物中龙血素含量均有增加,但是增加的量还是太少,发酵生产龙血竭的方法和技术还要有进一步的改进提高。本次方法对以后实验有一定的指导意义。

参考文献

- 1 Zheng QA(郑庆安), Chen JT(陈江弢), Zhang YJ(张颖君), *et al.* The Chemical Constituents and Pharmaceutical Activities of Dragon's Blood, a Famous Traditional Medicinal Herb. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(B06): 84-95.
- 2 Wang JL(王锦亮), Li XC(李兴从), Jiang DF(江东福). Chemical Constituents of Dragon's Blood Resin From *Dracaena cochinchinensis* in Yunnan And Their Antifungal Activity. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 1995, 17: 336-340.
- 3 Wang JL(王锦亮), Ruan DC(阮德春), Cheng ZY(程治英), *et al.* Phytoalexins in *Dracaena cochinchinensis* resin. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), 1999, 10: 255-256.
- 4 Yang J(杨靖), Jiang DF(江东福), Ma P(马萍). Study on formation of Dragon's blood in *Dracaena cochinchinensis* inoculated with *Fusarium* 9568D. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2004, 35: 572-574.
- 5 Yang HL(杨海龙), Wu TX(吴天祥), Zhang KC(章克昌). Filamentous fungi in the form of fermentation and fermentation design. *Biotechnology*(生物技术), 2003, 13: 45-47.
- 6 Chen DF(陈定芳), Song QS(宋启示). Analysis of loureirins in roots, stems and leaves of *Dracaena cochinchinensis*. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2005, 36: 1545-1547.
- 7 Deng JG(邓家刚), Hang HB(黄海滨), Nong YQ(农毅清). Experimental study on pharmacological effects of Loureirin B. *Guangxi J Tradit Chin Med* (广西中医药), 2004, 27: 44-46.
- 8 Gong SX(龚苏晓), Gao Z(高展), Zhang TJ(张铁军), *et al.* Microwave extraction and content determination of polysaccharides of *Radix Astragali*. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19: 785.
- 9 Liu ZG(刘志刚), Yan RL(颜仁梁), Luo JB(罗佳波). Study on deproteinization-technology of polysaccharides in *Hedyotis Diffusa*. *China Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2008, 26: 2283-2284.
- 10 Liu XH(刘小华), Zhang MX(张美霞), Yu CM(于春梅), *et al.* The determination of protein in chitosan with coomassie brilliant Blue G-250. *China Transport Med J* (中国交通医学杂志), 2006, 20: 159-160.
- 11 Qiang YZ(强亦忠), Wang CD(王崇道), Shao Y(邵源), *et al.* Study of preparation of sulfated polysaccharide and its properties. *J Shuzhou Univ Med Sci*(苏州大学学报, 医学版), 2003, 23: 293.
- 12 Zhang SJ(张赛金), Li WQ(李文权), Deng YZ(邓永智), *et al.* Study on the IR spectroscopy of polysaccharide from Marine microalgae. *J Xiamen Univ Nat Sci*(厦门大学学报, 自然科学版), 2005, 44(Suppl): 212-214.
- 13 Xia ZH(夏朝红), Dai Q(戴奇), Fang W(房韦), *et al.* Research on the IR spectroscopy of kinds of polysaccharide. *J Wuhan Univ Technol*(武汉理工大学学报), 2007, 29: 45-47.
- 14 Dong QN(董庆年). Infrared Spectroscopy(红外光谱法). Beijing: Petroleum Chemical Industry Press, 1977. 9.
- 15 Xie JX(谢晶曦). The Application of Infrared Spectroscopy in Organic Chemistry and Drug Chemistry(红外光谱在有机化学和药物化学中的应用). Beijing: Science Press, 1987. 11.

(上接第 1162 页)