



展青霉素产生菌对中药材的侵染及其毒素生物合成的研究

江曙^{1*}, 杨美华², 段金赓¹, 陶金华³, 钱大玮¹

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 南通大学 医学院, 江苏 南通 226019)

[摘要] **目的:**研究展青霉素产生菌对不同种类药材侵染的影响以及毒素积累规律。**方法:**采用微生物学及 HPLC 的分析方法研究不同环境条件下展青霉素产生菌侵染及毒素生物合成的特性。**结果:**展青霉素产生菌容易侵染富含淀粉以及其他糖类物质的药材,且在 25 ℃,95% 湿度和散装的条件下,菌体生长良好,毒素产量较高,较低的光照度对菌体生长和毒素生物合成没有明显的影响;此外,进行样品稳定性、精密度、重复性和回收率实验,建立了展青霉素 HPLC 的分析方法,检测方法可靠、稳定。**结论:**建立适宜的药材贮藏条件能有效控制产毒素微生物对中药材的侵染,因此开展产毒素微生物的生长特性及毒素生物合成机制的研究具有重要的实践指导意义,为建立中药安全性的系统评价体系奠定基础。

[关键词] 展青霉素;药材;侵染

展青霉素是由青霉属 *Penicillium*、曲霉属 *Aspergillus* 和丝衣霉属 *Byssochlamys* 等多种真菌产生的一种次生代谢产物^[1-2]。其具有潜在的细胞和动物毒性,存在致畸性、致癌性和免疫毒性,广泛存在于苹果、葡萄、梨子、橘子等多种水果及其制品中,食品中展青霉素的残留问题已引起世界卫生组织的高度关注,对其最低限量做了严格规定($< 50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),并有不断降低的趋势。瑞典、挪威、瑞士等国家规定展青霉素在苹果汁中的最大容许浓度(MPC)为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[3-5]。而目前关于展青霉素对中药材的污染、其产生菌对中药材的侵染以及展青霉素对中药临床应用的安全性研究还未见相关的报道。随着国内外关于中药不良反应报道的增多,加强中药安全性的基础研究迫在眉睫。尤其是某些真菌侵染药材后产生展青霉素、黄曲霉素等多种真菌毒素,严重影响了中药临床用药的安全性。

本文通过研究展青霉素产生菌对中药材侵染的影响及毒素积累规律,以期建立中药安全性的系

统评价体系提供依据,制定和形成药材生产、流通过程中防治展青霉素产生菌侵染的共性技术体系。

1 材料与方法

1.1 药材样品

本实验所选取的药材样品采自安徽亳州药材市场。

1.2 展青霉素产生菌的培养

采用 PDA 培养基^[6]。

1.3 展青霉素产生菌对药材的侵染

将 4 ℃ 冰箱中保藏的展青霉素产生菌接种到新鲜的 PDA 斜面上,25 ℃ 培养 6~7 d 后,挑取少许菌块接种到不同的药材表面,25 ℃,95% 湿度进行培养。

1.4 供试品溶液的制备

称取被展青霉素产生菌侵染的药材粉末 0.5 g,加入 60% 甲醇溶液 50 mL 超声提取 2 次,每次 30 min,合并提取液,低温蒸干后,采用 20 mL 乙酸乙酯超声提取 2 次,每次 10 min,合并提取液后,加 2 mL 2% NaCO₃ 溶液,振摇 2 min,静置分层后,弃去碳酸钠层,有机相于 40 ℃ 水浴蒸干,加入 200 μL 的甲醇溶液溶解,离心后供 HPLC 分析。

1.5 对照品溶液的制备

精密称取展青霉素对照品适量,用乙腈定容至 10 mL 量瓶中,得 $101 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的展青霉素标准溶

[稿件编号] 20110323006

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-025)

[通信作者] * 江曙,博士,副教授,主要从事微生物与中药品质的相关研究,E-mail:jiangshu1970@yahoo.com.cn



液。分别精密量取上述标准溶液 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 mL 定容至 25 mL 量瓶中, 得 0.404, 1.212, 2.02, 2.828, 3.636 mg · L⁻¹ 的标准溶液。

1.6 色谱条件

Agilent 1100 液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器; 色谱柱:Packing Material HederaODS-2 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(10:90), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 276 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 展青霉素检测方法学考察

2.1.1 标准曲线的制备 以展青霉素质量浓度 (mg · L⁻¹) 为横坐标, 所得峰面积为纵坐标作图, 即得标准曲线 $Y = 83.75X + 39.305$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 展青霉素在 0.40 ~ 3.64 mg · L⁻¹ 呈现良好的线性关系。

2.1.2 稳定性试验 分别选取受展青霉素产生菌侵染的葛根、山药和五味子 3 种样品, 进行稳定性实验。精密吸取同一浓度样品溶液 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进行测定, 展青霉素的 RSD 分别为 1.1%, 2.3%, 1.6%, 结果表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.1.3 精密度试验 分别选取受展青霉素产生菌侵染的葛根、山药和五味子 3 种样品, 进行精密度实验。精密吸取同一浓度样品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 测峰面积, 展青霉素的 RSD 分别为 0.95%, 1.0%, 2.0%。

2.1.4 重复性试验 分别选取受展青霉素产生菌侵染的葛根、山药和五味子 3 种样品, 进行重复性实

验。取同批受侵染的药材粉末 5 份, 按样品测定项下所述方法测定, 展青霉素的 RSD 分别为 1.1%, 1.1%, 1.4%, 表明本方法重复性较好。

2.1.5 回收率试验 称取不含展青霉素的葛根、山药和五味子粉末约 0.05 g 各 6 份, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加入适量展青霉素对照品溶液, 按样品处理方法进行展青霉素的提取, 按色谱条件, 每次进样 10 μL, 测定展青霉素含量, 展青霉素回收率在 82% ~ 93%, RSD 在 1.0% ~ 2.6%。

2.2 不同展青霉素产生菌生长特性及毒素生物合成的分析

本实验测试菌种由本实验室从土壤以及霉变的水果、中药材和植物中分离所得, 包括扩展青霉 *Penicillium expansum* 15 株, 展青霉 *P. patulum* 8 株, 圆弧青霉 *P. cyclopium* 6 株, 产黄青霉 *P. chrysogenum* 6 株, 棒曲霉 *Aspergillus clavatus* 4 株。在测试的 39 株菌中, 检出 21 株为产毒阳性菌, 阳性率为 53.8%, 在展青霉素阳性样品中 52.4% 分离于扩展青霉, 表明造成水果、中药材等含展青霉素的主要霉菌为扩展青霉, 其次是展青霉产毒阳性率和产毒量较高, 其中一株扩展青霉产毒量达到 109.8 μg · L⁻¹。此外, 考察了不同的展青霉素产生菌的生长及侵染性能, 即采用 75% 乙醇消毒新鲜无病伤的苹果表皮, 再用无菌小镊子扎破其表皮, 于破口处接种待检菌, 置 25 °C 培养 7 ~ 10 d, 产生棕色腐斑后, 测量腐斑直径。结果表明, 不同的展青霉素产生菌生长及侵染性能存在显著差异, 扩展青霉的生长和侵染能力较强(表 1)。因此, 选择一株展青霉素产量高的扩展青霉进行侵染相关药材的研究, 并考察其在药材中毒素合成与积累规律。

表 1 不同菌株侵染性能及展青霉素合成与积累的分析($\bar{x} \pm s, n = 5$)

菌株	菌株数	阳性菌株数	阳性率/%	产毒量/μg · L ⁻¹	腐斑直径/cm
扩展青霉	15	11	73.3	96.2 ± 4.89	2.02 ± 0.91
展青霉	8	5	62.5	77.6 ± 5.12	1.89 ± 1.02
圆弧青霉	6	2	33.3	48.3 ± 3.71	1.76 ± 0.96
产黄青霉	6	1	16.7	26.9 ± 2.16	1.72 ± 1.01
棒曲霉	4	2	50.0	59.7 ± 3.02	1.82 ± 1.03

2.3 药材种类对展青霉素产生菌侵染及产毒素能力的影响

根据药材不同的药用部位, 选择根及根茎类、果实及种子、全草类、花类、皮类、动物药等 16 种不同

的药材, 考察展青霉素产生菌对药材侵染以及毒素合成的情况, 结果表明, 容易受到展青霉素产生菌侵染的药材多为根及根茎类、果实及种子类药材, 且在这类药材中检测出展青霉素。因此, 在上述研究基

基础上,进一步探讨展青霉素产生菌对上述2类药材侵染的影响及毒素合成与积累规律,结果表明,选定的相关药材都较容易受到该菌的侵染,且展青霉素

产生菌在大多数药材中都能够进行毒素的合成(表2,图1)。由此可见,展青霉素产生菌容易侵染富含淀粉以及其他糖类物质的药材。

表2 展青霉素产生菌侵染根茎类、果实及种子类药材及毒素的生物合成($\bar{x} \pm s, n=5$)

药材	侵染情况	质量分数/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	药材	侵染情况	质量分数/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
巴乾天	+	-	牛膝	卅	16.78 ± 1.52
白及	+	-	砂仁	++	9.88 ± 0.63
白术	++	15.92 ± 0.89	山茱萸	卅	15.26 ± 0.67
白芷	+	8.82 ± 0.53	生地黄	++	8.17 ± 0.46
百合	卅	18.01 ± 1.02	酸枣仁	++	12.37 ± 0.85
槟榔	++	10.05 ± 0.66	天麻	+	-
苍术	+	9.62 ± 0.49	太子参	卅	22.77 ± 1.09
川芎	+	8.07 ± 0.61	香附	++	9.79 ± 0.59
丹参	卅	17.22 ± 1.07	玄参	卅	20.92 ± 1.32
党参	卅	18.86 ± 0.92	益智仁	+	8.05 ± 0.37
枸杞子	卅	32.49 ± 1.76	泽泻	卅	25.63 ± 1.14
桔梗	+	-	浙贝母	卅	19.03 ± 1.27
木瓜	卅	20.56 ± 1.29	栀子	+	-
牛蒡子	+	-	枳实	+	9.64 ± 0.41

注: + 表示侵染的强弱; + 越多表示侵染能力越强(表3~6同)。

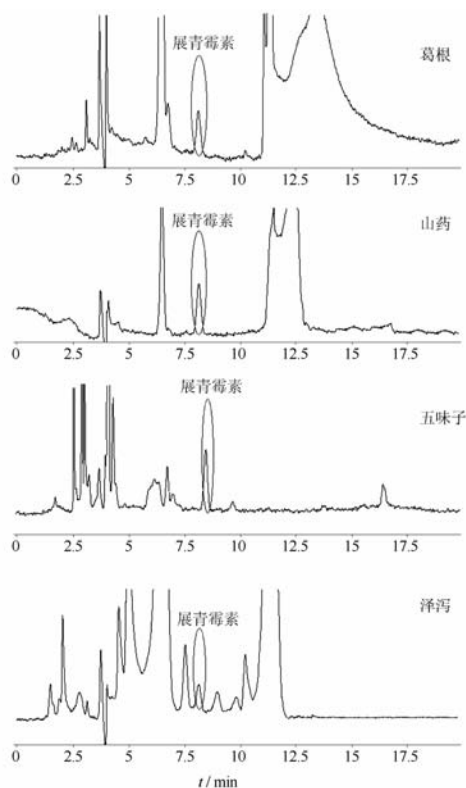


图1 展青霉素产生菌侵染部分根茎类、果实及种子类药材的HPLC图谱

基于上述研究结果,选用葛根、山药和五味子作为研究对象,考察不同的温度、湿度、光照以及包装方式等环境因子对展青霉素产生菌侵染药材以及产毒素的影响,结果表明,在25℃,95%湿度和散装的情况下,菌体生长较好,毒素产量较高,较低的光照度对菌体生长和毒素形成的影响不明显(表3~6)。

表3 不同温度对展青霉素产生菌侵染药材及毒素生物合成的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

药材	温度/℃	侵染情况	毒素/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
葛根	15	+	9.13 ± 0.62
	20	++	9.66 ± 0.83
	25	卅	25.79 ± 2.01
	30	卅	18.72 ± 1.24
	35	++	11.03 ± 0.98
山药	15	+	6.27 ± 0.46
	20	++	7.81 ± 0.51
	25	卅	17.59 ± 1.16
	30	卅	14.86 ± 0.93
	35	++	8.35 ± 0.52
五味子	15	+	4.55 ± 0.31
	20	++	5.79 ± 0.42
	25	卅	13.24 ± 0.89
	30	++	6.18 ± 0.37
	35	+	4.68 ± 0.24

2.4 环境因子对展青霉素产生菌侵染药材及毒素生物合成的影响



表4 不同湿度对展青霉素产生菌侵染药材及毒素生物合成的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

药材	湿度/%	侵染情况	毒素/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
葛根	65	+	7.16 ± 0.43
	75	++	7.58 ± 0.36
	85	+++	26.82 ± 1.91
	95	++++	26.15 ± 1.28
山药	65	+	6.09 ± 0.46
	75	++	7.03 ± 0.39
	85	+++	17.88 ± 1.04
	95	++++	17.12 ± 1.26
五味子	65	+	5.14 ± 0.32
	75	++	5.79 ± 0.41
	85	+++	14.28 ± 0.95
	95	++++	13.94 ± 1.02

表5 不同光照对展青霉素产生菌侵染药材及毒素生物合成的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

药材	光照/lx	侵染情况	毒素/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
葛根	0	+++	26.28 ± 1.29
	1 000	+++	25.76 ± 2.02
	2 000	+++	26.01 ± 1.79
	3 000	++	13.87 ± 0.96
山药	0	+++	18.09 ± 1.16
	1 000	+++	18.36 ± 1.24
	2 000	+++	17.51 ± 1.59
	3 000	++	10.84 ± 0.92
五味子	0	+++	15.02 ± 1.23
	1 000	+++	14.57 ± 0.98
	2 000	+++	15.31 ± 1.17
	3 000	++	8.71 ± 0.51

表6 不同包装方式对展青霉素产生菌侵染药材及毒素生物合成的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

药材	包装方式	侵染情况	毒素/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
葛根	散装	+++	25.89 ± 1.47
	纸袋	+++	17.91 ± 1.35
	塑料袋	++	14.66 ± 1.09
山药	散装	+++	16.97 ± 1.06
	纸袋	+++	13.52 ± 1.02
	塑料袋	++	10.21 ± 0.74
五味子	散装	+++	14.82 ± 0.81
	纸袋	+++	11.65 ± 0.73
	塑料袋	++	9.12 ± 0.61

3 讨论

3.1 加强展青霉素不同产生菌的生物学特性研究 真菌的生长及其各种代谢活动均需从周围环境

中吸取碳源、氮源、无机盐、生长因子等营养物质,尤其是碳源和氮源比例(C/N比)对真菌生长和代谢产物形成具有重要的影响。碳氮比不当,会影响菌体按比例吸收营养物质,碳氮比的变化还会影响分支代谢途径的走向。外部环境条件如温度、湿度、光照、氧气、pH等也会影响菌体生长和代谢产物的生物合成,适宜的外部环境条件可促进真菌特定基因的过量表达,从而积累特定的代谢产物。此外,不同真菌的生长及代谢所需的外界环境因素可能存在一定的差异。因此,需进一步加强碳氮源种类、金属离子、温度、湿度等环境因素对展青霉素不同产生菌生长及毒素生物合成的影响研究,探讨菌体生长及毒素生物合成的动力学特性,揭示展青霉素不同产生菌生长及毒素生物合成的共性规律,从而有助于建立展青霉素产生菌侵染药材及其制剂的共性防治技术体系。

3.2 建立中药材及其制剂生产、流通过程中的适宜条件

中药材及其制剂受展青霉素产生菌等微生物侵染是造成药材品质下降及安全隐患的重要因素之一,关系到中药能否实现临床用药的安全。近年来,国内外对中药材中农药残留及重金属含量超标等问题比较重视,而对中药材采收、流通环节中,其被展青霉素产生菌等微生物侵染的危害性认识不足。中药制剂使用的药材来自动物、植物、矿物,其中动、植物富含营养源,若没有严格执行GMP标准,存储环境差(高温、高湿等),则容易受到展青霉素产生菌等微生物的侵染。在中药材的生产、流通环节中,至今仍缺乏规范化的控制展青霉素产生菌等微生物侵染的措施,如根茎类药材采收后,主要采用简单水洗的方法洗去其表面的土壤,但药材表面微生物残留仍然较多;在中药材干燥、饮片加工过程中,应用现代方法与技术控制展青霉素产生菌等微生物侵染的研究较少;在中药材贮藏过程中,主要是采用干燥法控制微生物的繁殖,但易受干燥程度、贮藏环境湿度、温度和通风程度等多种因素影响,因此,若干燥后的药材贮藏不当,仍然会受到微生物的侵染,结果导致药材发霉、变质和腐烂。因此,应用现代微生物学、物理学和化学的方法与技术,研究展青霉素产生菌等产毒素真菌的侵染及其毒素生物合成的机制,对于中药材及其制剂的生产、流通过程中防止真菌毒素的污染具有重要的实践指导意义。



[参考文献]

- [1] Dombink-Kurtzman M A, Blackburn J A. Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species[J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 98:241.
- [2] 江曙, 杨美华, 段金殿, 等. 展青霉素研究现状及其对中药安全性的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2010, 26(5):398.
- [3] Saxena N, Ansari K M, Kumar R, et al. Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p(53) and p(21/WAF1) proteins in skin of mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 234(2):192.
- [4] 刘盼红, 岳田利, 袁亚宏, 等. 贮藏苹果中展青霉素产生菌的分离及其 ITS 序列分析鉴定[J]. *西北农林科技大学学报*, 2008, 36(8):197.
- [5] 高振鹏, 岳田利, 袁亚宏, 等. 苹果汁中展青霉素的超声波降解[J]. *农业机械学报*, 2009, 40(9):138.
- [6] 江曙, 陈代杰, 戈梅, 等. 药用植物内生真菌对三种农作物病原真菌的拮抗作用[J]. *江苏农业科学*, 2008, 1:82.

Research on patulin biosynthesis and infection of Chinese medicinal materials by its producing strains

JIANG Shu^{1*}, YANG Meihua², DUAN Jin'ao¹, TAO Jinhua³, QIAN Dawei¹

(1. *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China*;

2. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China*;

3. *Medical School, Nantong University, Nantong 226019, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of patulin producing strains on the different Chinese medicinal materials and the toxin biosynthesis mechanism. **Method:** Microbiology and HPLC analytical methods were adopted in this paper. **Result:** It was showed that the materials rich in starch and other polysaccharides were easily polluted by the patulin producing strain. This strain grew well and produced more toxins under 25 °C, 95% moisture content and bulk package. And the effect of low illumination intensity on the strain growth and toxin biosynthesis was not notable. Sample stability, precision, repeatability and rate of recovery were studied. HPLC analytical method was established and it revealed that the test method was suitable. **Conclusion:** The pollution of Chinese medicinal materials by toxin producing microbes will be effectively controlled through establishing the suitable storage methods. So the study on the growing characteristics and toxin biosynthesis mechanism of toxin producing strains will be an important practical significance for controlling the toxin pollution of herbal medicines and contribute to establish the evaluation system of Chinese medicine safety.

[Key words] patulin; Chinese medicinal materials; infection

doi:10.4268/cjcm20111420

[责任编辑 吕冬梅]