

HPLC 法检测蛇足石杉内生真菌胶胞炭疽发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙的含量

胡莉琴^{1,2}, 康信聪^{1,2}, 沈鹏原^{1,2}, 陈田^{1,2}, 张家银^{2,3}, 刘东波^{1,2,3,4}

1 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128

2 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128

3 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128

4 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128

胡莉琴, 康信聪, 沈鹏原, 等. HPLC 法检测蛇足石杉内生真菌胶胞炭疽发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙的含量. 生物工程学报, 2018, 34(5): 777-784.

Hu LQ, Kang XC, Shen PY, et al. Detection of Huperzine A and Huperzine B in fermentation broth of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* from *Huperzia serrate* by HPLC. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 777-784.

摘要:建立了高效液相色谱 (HPLC) 测定蛇足石杉 (*Huperzia serrate*) 内生真菌胶胞炭疽发酵液中石杉碱甲 (*Huperzina A*) 和石杉碱乙 (*Huperzine B*) 含量的方法, 并以此方法检测胶胞炭疽发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙含量的积累。内生真菌发酵液经氯仿萃取、甲醇溶解、过滤后进行高效液相检测分析, 选用 Agilent Eclipse plus-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.015 mol/L 乙酸铵 (pH 6.8) 和甲醇溶液 (70:30) 为流动相进行等度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长为 308 nm, 连续检测内生真菌胶胞炭疽发酵液中第 6-15 天石杉碱甲和石杉碱乙的含量积累。结果表明, 发酵提取液中的石杉碱甲和石杉碱乙可在 25 min 内进行很好的分离和分析, 石杉碱甲在 1.50-48.00 μg/mL 范围内线性关系良好 (相关系数 r 为 0.999 5), 石杉碱乙在 0.25-7.50 μg/mL 范围内线性关系良好 (相关系数 r 为 0.999 7), 石杉碱甲和石杉碱乙的平均加标回收率分别为 106.83%、108.06%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 3.34%、3.60%。该方法简便、快速、精密度高、结果准确, 适用于内生真菌发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙含量检测。在发酵过程中, 内生真菌发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙的含量呈现先增后减, 随后有所增加继而又减少的趋势。石杉碱甲和石杉碱乙的含量分别在内生真菌发酵第 14 天、第 8 天达到最高, 分别为 12.417 0 μg/mL、4.660 3 μg/mL。该方法学的建立为内生真菌胶胞炭疽合成石杉碱甲与石杉碱乙的机制研究提供了检测手段, 从而有利于药物新资源的开发。

关键词: 高效液相色谱, 次生代谢产物, 千层塔, 内生真菌, 石杉碱甲, 石杉碱乙

Received: October 2, 2017; **Accepted:** November 21, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81773850).

Corresponding author: Dongbo Liu. Tel/Fax: +86-731-84635293; E-mail: chinasaga@163.com

国家自然科学基金 (No. 81773850) 资助。

网络出版时间: 2017-12-15

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171215.0930.001.html>

Detection of Huperzine A and Huperzine B in fermentation broth of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* from *Huperzia serrate* by HPLC

Liqin Hu^{1,2}, Xincong Kang^{1,2}, Pengyuan Shen^{1,2}, Tian Chen^{1,2}, Jiayin Zhang^{2,3}, and Dongbo Liu^{1,2,3,4}

¹ Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

² State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, Hunan, China

³ Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, Hunan, China

⁴ Hunan Co-innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: In this study, we established a rapid and efficient HPLC method to determine the accumulation of Huperzine A and Huperzine B in the fermentation broth of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* from *Huperzia serrate*. The chloroform extracts of fermentation broth were dissolved in methanol and filtered before injection for HPLC analysis. The analysis was performed on an Agilent Eclipse plus-C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by isocratic elution. The mobile phase was 0.015 mol/L ammonium acetate-methanol (70:30, V/V), the flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was set at 308 nm. Huperzine A and Huperzine B could be well separated within 25 min. Good linearity of Huperzine A was found in the range of 1.50–48.00 μg/mL ($r=0.999\ 5$), and that of huperzine B was in 0.25–7.50 μg/mL ($r=0.999\ 7$). The average recoveries of Huperzine A and Huperzine B were 106.83% and 108.06%, respectively (RSD=3.34%, 3.60%). The results demonstrate that this method can detect the content of huperzine A and huperzine B in fermentation broth simply, rapidly, accurately and in good reproducibility. Under the optimized conditions, the accumulated content of huperzine A and huperzine B were measured from the sixth to the fifteenth day. Huperzine A and Huperzine B reached the highest (12.417 0 μg/mL and 4.660 3 μg/mL, respectively) at the fourteenth and eighth days. The analysis methodology could contribute to the future study of huperzine A and huperzine B biosynthesis in *C. gloeosporioides*, consequently facilitate the development of new drug resources.

Keywords: HPLC, secondary metabolites, *Huperzia serrate*, endophytic fungi, Huperzine A, Huperzine B

石杉碱甲 (Huperzine A, 简称 Hup A) 是一种我国自主研发的高效、低毒、可逆且高选择性抑制乙酰胆碱酯酶的石松类生物碱, 常用于老年痴呆症、记忆障碍、重症肌无力的治疗^[1-2]。在老年痴呆症的治疗中, 与美国 FDA 批准的同类药物他克林、多奈哌齐、利斯的明及加兰他敏相比, Hup A 的抗胆碱酯酶活性更高, 作用持续时间更长, 口服生物利用度更高, 毒性作用更小^[3-5]。石杉碱乙 (Huperzine B, 简称 Hup B) 抑制活性为石杉碱甲的

1/10, 但 Hup B 具有更长的活性持续时间^[6]。

显著的疗效与巨大的商业价值使得 Hup A 的价格节节攀升, 纯度为 98% 的 Hup A 出口价格已从 2012 年的 200 万元/kg 增至 400 多万元/kg。虽然 Hup A、Hup B 在植株内含量很低 (最高含量分别为 0.090 0%、0.018 3%), 但目前 Hup A、Hup B 仍主要从野生蛇足石杉 (*Huperzia serrate* T.) 等石松类石杉科石杉属植物中直接提取。蛇足石杉生长条件苛刻、生长周期长^[7-8], 过度开采导致该

物种濒临灭绝,组织培养尚未成功;Hup A 人工全合成步骤繁琐、价格昂贵,无法获得纯光学活性合成物质,Hup A 至今未能实现产业化^[9],无法满足市场用药需求,制约了 Hup A、Hup B 的临床发展。

自 Stierle 等首次从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* N. 的树皮中分离到一种产紫杉醇的内生真菌——安德紫杉菌 *Taxomyces andreanae*^[10]以来,内生真菌合成与宿主植物相同或相似的次生代谢产物受到了极大的关注,为解决资源短缺、产量极低的药物开发提供了新的思路。迄今,有关蛇足石杉内生真菌的研究已有不少报道,2005 年石玮等^[11]从采自安徽青阳的 *H. serrata* 中分离出 4 株内生真菌,分别属于顶孢霉属、单轴霉属、酵母和青霉属,韩文霞等^[12-13]从浙江衢州乌巨山的 *H. serrata* 中分离出产 Hup A 的青霉菌与镰孢菌。本实验室从福建南平 *H. serrata* 中分离出具有合成 Hup A、Hup B 能力的内生真菌胶胞炭疽 *tanju* (*Colletotrichum gloeosporioides* P. *tanju*)。目前 Hup A、Hup B 的 HPLC 方法学考察主要集中于石杉科植物 *H. serrata*^[6,14],对内生真菌发酵液中的 Hup A、Hup B HPLC 检测方法的考察未见报道。本文建立了内生真菌 *tanju* 发酵液中 Hup A、Hup B 的 HPLC 测定方法,并以此方法检测了 *tanju* 菌发酵过程中次生代谢产物 Hup A、Hup B 的积累过程。Hup A、Hup B HPLC 快速检测方法的建立为后期内生真菌胶胞炭疽合成 Hup A、Hup B 的机制研究奠定基础,从而有利于药物新资源的开发。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

蛇足石杉(采自福建南平);内生真菌胶胞炭疽(本实验室分离);Hup A 标准品(Aladdin);Hup B 标准品(上海源叶生物科技有限公司);甲醇为色谱纯,醋酸铵、氟仿均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);Mettler Toledo pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

主要仪器和设备:Agilent-1260 Infinity 高效液相色谱;Mettler Toledo XS205 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配制

马铃薯葡萄糖肉汤(Potato dextrose broth, PDB)培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,加蒸馏水定容至 1 L。

PDB 加富培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,酵母粉 2 g,蛋白胨 2 g, KH_2PO_4 1.5 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.3 g,加蒸馏水定容至 1 L 后调节 pH 至 6.5。

1.2.2 诱导子的制备

将新鲜的蛇足石杉去除根部,用自来水冲去泥土、腐叶,用超纯水洗净,吹干水分称重,然后切碎。加入少许水将叶片打成浆汁,用 8 层纱布过滤,最后用超纯水按 1:10 的质量体积比定容至一定体积,分装 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, -20 °C 冰箱冻存备用。

1.2.3 内生真菌 *tanju* 发酵培养和发酵液中 Hup A、Hup B 提取

内生真菌炭疽 *tanju* 置 PDB 培养基中活化

3 d, 取 1 mL 菌丝于 PDB 加富培养基中培养 5 d 使菌丝量达到最高, 加入诱导子 5 mL 后继续培养 (空白对照: PDB+5 mL 诱导子)。加入诱导子培养至一定时间后采用真空泵分离菌液和菌丝, 将分离的 100 mL 菌液用旋转蒸发器减压浓缩至体积为 30 mL, 加等体积 30 mL 氯仿萃取 1 次, 再体积减半氯仿再次萃取 1 次, 合并滤液, 挥干后加入 2 mL 色谱甲醇溶解, 超声 10 min, 混匀后过 0.22 μm 的微孔滤膜, 滤液样品待测。

1.2.4 HPLC 检测条件

Agilent Eclipse plus-C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.015 mol/L 乙酸铵-甲醇溶液 (70:30), 流速 1 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。在波长选择上, Hup A 在 308–310 nm 均有很好的紫外吸收, 而 Hup B 在 308 nm 上有很好的紫外吸收, 故波长选用 308 nm。在此色谱条件下, 样品中的 Hup A、Hup B 与其他峰能达到基线分离。

1.2.5 对照品制备

Hup A 对照品 精密称取 Hup A 对照品 2.40 mg 于 25 mL 容量瓶中以甲醇溶解并定容, 得浓度为 0.096 mg/mL 对照品溶液, 再分别稀释成 48.0、24.0、12.0、6.0、3.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品供试液, 待测。

Hup B 对照品: 精密称取 Hup B 对照品 2.50 mg 于 25 mL 容量瓶中以甲醇溶解并定容, 得浓度为 0.1 mg/mL 对照品溶液, 再分别稀释成 7.50、5.00、2.50、1.00、0.50、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品供试液, 待测。

1.2.6 仪器精密性、样品稳定性、检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和样品加标回收率检测方法

仪器精密: 取制备好的 Hup A 和 Hup B 标准品, 分别以进样量 10 μL 连续进样 6 次, 计算其相对标准偏差 (RSD)。样品稳定性、LOD、LOQ: 取供试样品 1 份, 将样品于 0、2、4、6、8、12 h 进样 10 μL , 按“1.2.4” HPLC 条件测定峰面积, LOD 和 LOQ 的测定是根据响应的标准偏差以及标准曲线的校准曲线所得到的斜率^[15], LOD 和 LOQ 分别表示为 3.3 a/S 和 10 a/S (a 表示响应的标准偏差, S 表示回归线的斜率)。样品加标回收率: 取已测 Hup A 样品加入 0.4 mL Hup A 对照品溶液 (浓度 16.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、取 Hup B 样品加入 0.4 mL Hup B 对照品溶液 (浓度 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 得供试品样液, 微孔滤膜滤过, 得加样回收液, 进样 10 μL , 测定峰面积, 回收率计算公式如下:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{测得对照品量}(\mu\text{g}) - \text{样品中原有量}(\mu\text{g})}{\text{加入对照品量}(\mu\text{g})} \times 100\%$$

1.2.7 内生真菌 tanju 发酵特性研究

在内生真菌 tanju 菌株培养稳定期 (菌培养至第 5 天) 加入诱导子 5 mL, 连续检测内生真菌发酵液中第 6–15 天次生代谢产物 Hup A、Hup B 的含量, 每天 3 个平行; 同时检测诱导子中 Hup A、Hup B 的含量。内生真菌 tanju 菌诱导后 Hup A/Hup B 的含量=发酵液中总 Hup A/Hup B 含量-诱导子中 Hup A/Hup B 含量。

将从发酵液分离出的菌丝 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重, 冷却称重为干重, 重复 3 次取平均值即为其生物量, 菌液测定其 pH。

2 结果与分析

2.1 线性关系的考察

将已制备的 Hup A 和 Hup B 对照品按“1.2.4”色谱条件测定,以进样浓度对峰面积进行回归,得标准曲线方程为:

$$\text{Hup A: } Y = 21.331X - 14.899 \quad (r = 0.9995)$$

$$\text{Hup B: } Y = 15.371X - 0.4102 \quad (r = 0.9997)$$

其校准图的相关系数 r 大于 0.9985^[16-17],可知当进样量位于 1.50–48.00 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25–7.50 $\mu\text{g/mL}$

0.30 $\mu\text{g/mL}$ 、0.62 $\mu\text{g/mL}$ 。加样回收率试验结果见表 1,结果表明 Hup A 的平均回收率为 106.83% (RSD=3.34%, $n=3$)、Hup B 的平均回收率为 108.06% (RSD=3.60%, $n=3$)。

2.3 样品中 Hup A、Hup B 检测结果

将已制备好的样品按“1.2.4”色谱条件重复分析 3 次,测得 Hup A 标准品的保留时间 22.517 min (图 1A), Hup B 的保留时间 10.413 min (图 1B),内生真菌发酵液中 Hup A、Hup B 的保留时间分

表 1 Hup A 和 Hup B 加样回收率试验结果

Table 1 Recoveries of Hup A and Hup B in samples

Component	Content of sample (μg)	Reference substance content (μg)	Total content (μg)	Recovery (%)	Average (%)	RSD (%)
Hup A	8.1233	6.6	14.9153	102.91	106.83	3.34
	7.3189	6.6	14.5703	109.87		
	7.2270	6.6	14.5666	107.71		
Hup B	2.5770	2.2	4.9450	108.06	108.06	3.60
	2.5180	2.2	4.8148	104.40		
	2.3892	2.2	4.8564	112.15		

之间时, Hup A、Hup B 的进样量与峰面积呈良好线性关系。

2.2 仪器精密性、样品稳定性、LOD、LOQ 和样品加标回收率结果

Hup A、Hup B 标准品分别连续进样 6 次,其中 Hup A 标准品的峰面积 RSD 为 0.31%, Hup B 标准品的峰面积 RSD 为 1.01%,结果表明仪器精密性良好。样品按“1.2.6”测定峰面积, Hup A 的峰面积 RSD 为 1.23%; Hup B 的峰面积 RSD 为 2.40%,结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定。同时, Hup A 的检测限和定量限分别为 0.42 $\mu\text{g/mL}$ 、0.81 $\mu\text{g/mL}$; Hup B 的检测限和定量限分别为

分别为 22.513 min、10.312 min (图 1C),空白对照中 Hup A、Hup B 的保留时间分别为 22.430 min、10.308 min (图 1D),结果显示发酵液和空白对照中 Hup A、Hup B 的保留时间和其对应的标准品的保留时间基本一致。通过标准曲线计算诱导子和发酵液提取物中 Hup A、Hup B 的含量,测得发酵液中 Hup A、Hup B 的平均浓度分别为 19.2489 $\mu\text{g/mL}$ 、6.4424 $\mu\text{g/mL}$,诱导子中 Hup A、Hup B 平均浓度分别为 5.7710 $\mu\text{g/mL}$ 、2.1610 $\mu\text{g/mL}$,因此,胶胞炭疽合成 Hup A、Hup B 产量分别为 13.4779 $\mu\text{g/mL}$ 、4.2814 $\mu\text{g/mL}$ 。

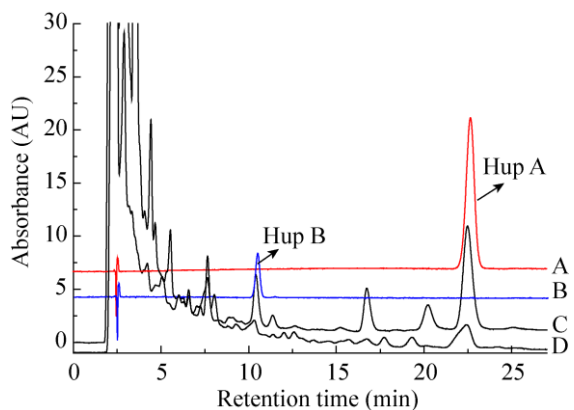


图1 Hup A 标准品 (A)、Hup B 标准品 (B)、内生真菌 *tanju* 发酵液提取物 (C) 和诱导子提取物 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 The HPLC chromatograms of the Hup A standard (A), the Hup B standard (B), sample extracted from endophytic fungi *tanju* (C) and sample extracted from elicitor (D). The standard content of Hup A is 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and that of Hup B is 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4 诱导子作用时间对内生真菌 *tanju* 发酵液中 Hup A、Hup B 含量影响曲线

在前期研究中发现现在生长稳定期加入诱导子, 其次生代谢产物 Hup A、Hup B 的含量更高, 所以本试验在 *tanju* 菌生长至第 5 天加入诱导子。结果如图 2 所示, 内生真菌 *tanju* 发酵液中 Hup A、Hup B 的含量在诱导子加入后均有明显提高, 其含量均先增加后减少, 随后又升高继而再继续减少, 发酵液中 Hup A 含量在第 14 天达到最高 (12.417 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Hup B 在第 8 天达到最高 (4.660 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

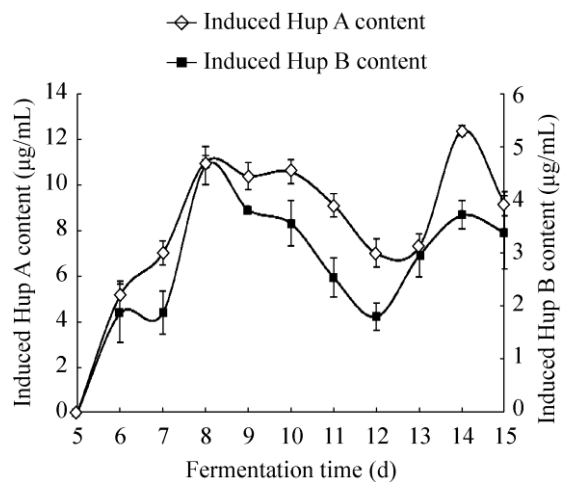


图2 内生真菌 *tanju* 发酵液中 Hup A、Hup B 含量的变化

Fig. 2 Effects of Hup A and Hup B contents in fermentation broth of endophytic fungus *tanju*.

2.5 内生真菌 *tanju* 发酵培养特性研究

从图 3 可以看出, 菌株从第 1 天开始进入对数生长期, 第 4 天生物量达到最大值, 随后进入稳定生长期, 第 8 天后菌株进入衰亡期。在对数生长前期, 随着菌丝量的迅速增加, 对营养物质的消耗和胞外降解导致发酵液 pH 值由 6.50 降至 4.69, 在酸性条件下, 内生真菌 *tanju* 生长状况良好。随后由于次生代谢产物的积累, 发酵液 pH 值回升, 在菌丝生物量达到最高时, 发酵液酸碱度趋于中性, 进入衰亡后期培养液 pH 值继续缓慢上升, Hup A、Hup B 积累期间培养液呈弱碱性 (图 3)。

3 讨论

本文建立了 HPLC 测定内生真菌 *tanju* 发酵液中 Hup A、Hup B 含量的方法。本课题组曾采用 Agilent ZORBAX SB-C18 进行 Hup A、Hup B 的检测,但受色谱柱残余硅羟基的影响,Agilent ZORBAX SB-C18 对分析物产生强烈吸附而造成色谱峰严重拖尾。虽然本实验室在流动相乙酸铵中加入 1%–3% 的三乙胺 (pH 4–5),可减少 Hup A、Hup B 和残余硅羟基的相互作用,峰形更尖锐、对称性更高,有效减轻了色谱峰的拖尾现象,但

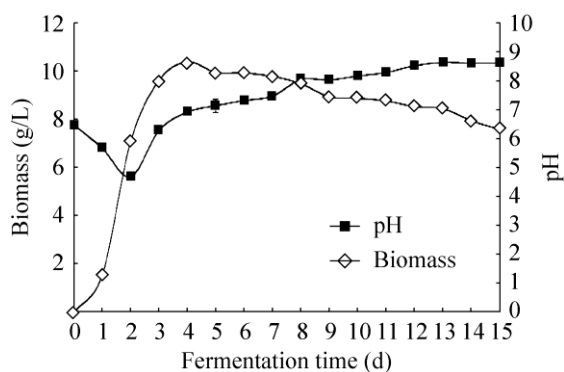


图 3 内生真菌 *tanju* 发酵生长曲线

Fig. 3 Fermentation curves of endophytic fungi *tanju*.

保留时间大大减少,不利于各组分的分离,且易对色谱柱造成不可逆的损伤。因此,本实验室选用了适合生物碱分离的 Agilent Eclipse plus-C18 色谱柱,该色谱柱改进了硅胶制造和键合技术,对于难分离的碱性化合物可获得出色的峰形。本试验证明该色谱柱在分离 Hup A、Hup B 时,峰对称性良好,且与其他物质能达到很好的基线分离。

本试验所分离的内生真菌 *tanju* 在分离初期即使未诱导也可合成 Hup A 和 Hup B,但随着菌株保存时间的延长、传代次数的增加,*tanju* 菌在

未添加诱导子的情况下,发酵液中检测不到 Hup A 与 Hup B。本课题组在内生真菌 *tanju* 发酵的第 5 天 (生长稳定期) 添加诱导子,较生长初期添加诱导子 Hup A、Hup B 含量高。这可能是由于在早期添加诱导子,诱导子被用于合成初级代谢产物,或者生长早期细胞还没有合成太多功能酶,诱导子的利用率较低,而在生长稳定期添加,生物量有了一定的积累,受诱导子刺激后,即可合成次级代谢产物^[18]。然而,Ballica 等^[19]曾提出诱导子在达指数生长期之前加入效果最好,可见添加诱导子因种属不同而有所差别。另外,诱导子的种类、添加时间及浓度对内生真菌次生代谢产物产量均有影响^[20–22]。

相比直接从 *H. serrata* 等石松类植物提取获得 Hup A、Hup B,能够合成 Hup A、Hup B 的内生真菌具有更大的发展潜力,因为内生真菌培养简单、周期短,可进一步优化培养条件^[23]。此外,还可通过多种手段改造、提高菌种性能,例如诱变育种、深入研究 Hup A 合成关键酶、构建 Hup A 高产工程菌^[24–26]。通过内生真菌发酵合成 Hup A、Hup B 是解决濒危植物药物开发的有效途径。

REFERENCES

- [1] Xu HB, Wang XP, Liu GL. Pharmacological studies and clinical application of huperzine A. *World Clin Drugs*, 2014, 35(1): 60–63 (in Chinese).
徐红冰, 王晓平, 刘皋林. 石杉碱甲的药理研究及临床应用. *世界临床药物*, 2014, 35(1): 60–63.
- [2] Yu HY, Sun YM, Yang YJ. Advances in studies on *Huperzia serrata*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2001, 32(3): 279–281 (in Chinese).
余红英, 孙远明, 杨跃进. 草药蛇足石杉的研究进展. *中草药*, 2001, 32(3): 279–281.
- [3] Zhu D, Wang J, Zeng Q, et al. A novel endophytic

- Huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(4): 1469–1478.
- [4] Damar U, Gersner R, Johnstone JT, et al. Huperzine A: a promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 2017, 99: 57–62.
- [5] Yang GY, Wang YY, Tian JZ, et al. Huperzine a for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e74916.
- [6] Zhou XL, Yuan JQ, Wang S, et al. Determination of huperzine A and huperzine B in *Huperzia serrata* collected at different collecting times by HPLC. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2013, 28(2): 504–506 (in Chinese).
周小雷, 袁经权, 王硕, 等. HPLC 法测定不同季节千层塔中石杉碱甲和石杉碱乙含量. *中华中医药杂志*, 2013, 28(2): 504–506.
- [7] Yuan JQ, Zhou XL, Wang S, et al. Simultaneous determination of huperzine A and huperzine B in different parts of *Huperzia serrata* from different habitats by HPLC. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(9): 1541–1544, 1549 (in Chinese).
袁经权, 周小雷, 王硕, 等. HPLC 测定不同产地与不同部位千层塔中石杉碱甲和石杉碱乙含量. *药物分析杂志*, 2012, 32(9): 1541–1544, 1549.
- [8] Ma XQ, Gang DR. *In vitro* production of Huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease. *Phytochemistry*, 2008, 69(10): 2022–2028.
- [9] Ma XQ, Tan CH, Zhu DY, et al. A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1/2): 54–67.
- [10] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260(5105): 214–216.
- [11] Shi W, Luo JP, Ding ZH, et al. Isolation and identification of endophytic fungi of *Huperzia serrata*. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2005, 36(2): 281–283 (in Chinese).
石玮, 罗建平, 丁振华, 等. 千层塔内生真菌分离鉴定的初步研究. *中草药*, 2005, 36(2): 281–283.
- [12] Han WX, Song T, Yang SZ, et al. Identification of alkaloids and huperzine A-producing endophytic fungi isolated from wild *Huperzia serrata*. *J Int Pharm Res*, 2015, 42(4): 507–512 (in Chinese).
韩文霞, 宋涛, 杨时珍, 等. 野生蛇足石杉产生物碱和石杉碱甲内生真菌分离鉴定. *国际药学研究杂志*, 2015, 42(4): 507–512.
- [13] Han WX, Li WZ, Li XF, et al. Detection and identification of high producing Huperzine A by an endophytic fungus from *Huperzia serrata*. *J Int Pharm Res*, 2016, 43(6): 1112–1116 (in Chinese).
韩文霞, 李伟泽, 李高峰, 等. 蛇足石杉内生真菌产石杉碱甲含量检测及真菌的鉴定. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(6): 1112–1116.
- [14] Zhang JC, Wei J, Zhong HM, et al. Determination of Huperzine A in the extract of *Huperzia serrata* by high performance liquid chromatography. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(1): 79–82 (in Chinese).
张敬彩, 魏杰, 钟虹敏, 等. 高效液相色谱法定量测定中药千层塔提取物中的石杉碱甲. *色谱*, 2013, 31(1): 79–82.
- [15] Francisco MLD, Resurreccion AVA. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. *Food Chem*, 2009, 117(2): 356–363.
- [16] Li CC, Farn SS, Yeh YH, et al. Development and validation of an anion-exchange HPLC method for the determination of fluoride content and radiochemical purity in [¹⁸F]NaF. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(4): 605–612.
- [17] Ji M, Li Q, Ji H, et al. Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chem*, 2014, 142: 61–65.
- [18] Li JR, Liu MX, Cao MD, et al. Effects of *Penicillium citrinum* elicitor on the biosynthesis of taxol in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Bull Bot Res*, 1998, 18(1): 78–82 (in Chinese).
李家儒, 刘曼西, 曹孟德, 等. 桔青霉诱导子对红豆杉培养细胞中紫杉醇生物合成的影响. *植物研究*, 1998, 18(1): 78–82.
- [19] Ballica R, Ryu DDY. Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance: production of tropane alkaloids. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 42(10): 1181–1189.
- [20] Wang C, Tan YY, Yang SW, et al. Effects of different

- inducers on endophytic fungi of *Cinnamomum longepaniculatum*. *J Anhui Agri Sci*, 2017, 45(20): 14–17, 45 (in Chinese).
- 汪超, 谭韵雅, 杨胜伟, 等. 不同诱导子对油樟内生菌次生代谢产物的影响. *安徽农业科学*, 2017, 45(20): 14–17, 45.
- [21] Chen YQ, Zhu WH, Wu YQ, et al. Effects of fungus elicitors on taxol production in suspension cells of *Taxus yunnanensis*. *Chin J Biotech*, 1999, 15(4): 522–524 (in Chinese).
- 陈永勤, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 几种真菌诱导子对云南红豆杉细胞产生紫杉醇的影响. *生物工程学报*, 1999, 15(4): 522–524.
- [22] Li Y, Zhao L, Cui L, et al. Effects of elicitors on growth of adventitious roots and contents of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *Chin J Biotech*, 2015, 31(5): 734–743 (in Chinese).
- 李琰, 赵磊, 崔蕾, 等. 诱导子对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响. *生物工程学报*, 2015, 31(5): 734–743.
- [23] Ji ZD, Tu YS, Chen M, et al. Conditional optimization and kinetic research on producing huperzine A using *Huperzia serrata* in vitro. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2016, 47(3): 488–492 (in Chinese).
- 吉枝单, 涂艺声, 陈曼, 等. 蛇足石杉离体培养产石杉碱甲的条件优化及动力学研究. *中草药*, 2016, 47(3): 488–492.
- [24] Zhang XM, Wang ZQ, Jan S, et al. Expression and functional analysis of the lysine decarboxylase and copper amine oxidase genes from the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* ES026. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2766.
- [25] Yang MQ, You WJ, Wu SW, et al. Global transcriptome analysis of *Huperzia serrata* and identification of critical genes involved in the biosynthesis of huperzine A. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 245.
- [26] Du C, Li J, Tang YT, et al. Cloning, prokaryotic expression and characterization of lysine decarboxylase gene from *Huperzia serrata*. *Chin J Biotech*, 2014, 30(8): 1299–1307 (in Chinese).
- 杜次, 李菁, 唐云涛, 等. 蛇足石杉赖氨酸脱羧酶基因的克隆、原核表达及其功能分析. *生物工程学报*, 2014, 30(8): 1299–1307.

(本文责编 陈宏宇)