

不同药(食)用真菌固体发酵对黄芪中黄芪甲苷的影响

阮 鸣

南京晓庄学院药用菌物研究所, 江苏 南京 211171

摘 要:目的 研究黄芪经不同真菌固体发酵后黄芪甲苷的变化, 为开发新型中药及其制剂提供参考。方法 选用灵芝、桑黄、姬松茸、香菇4种药(食)用真菌对黄芪进行固体发酵, 用HPLC-ELSD法检测黄芪和4种黄芪固体发酵物中黄芪甲苷和异黄芪甲苷的量。结果 黄芪经4种真菌固体发酵后, 黄芪甲苷均不同程度地转化成异黄芪甲苷。结论 在固体发酵过程中, 药(食)用真菌将黄芪中黄芪甲苷主要转化为异黄芪甲苷, 且转化率差异较大。

关键词: 黄芪; 固体发酵; 黄芪甲苷; 异黄芪甲苷; 灵芝; 桑黄; 姬松茸; 香菇

中图分类号: R282.15 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)07-1421-04

Influence of solid fermentation of various medicinal and edible fungi on astragaloside IV in *Astragali Radix*

RUAN Ming

Institute of Medicinal Fungi, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China

Key words: *Astragali Radix*; solid fermentation; astragaloside IV; iso-astragaloside IV; *Ganoderma lucidum* (Leyss.ex Fr) Karst; *Phellinus igniarius* (Murr.) Imaz; *Agaricus blazei* Murrill; *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler

药(食)用真菌是指对疾病有治疗、预防及抑制作用或具有保健功效的一类真菌, 它可分为两类: 一类是药食兼用型, 如香菇、姬松茸、平菇等; 另一类为医药专用型, 如灵芝、桑黄、冬虫夏草等。其主要成分真菌多糖是一类重要的保健食品功能因子, 具有抗肿瘤、降血压、调血脂、抗血栓、抗衰老、健胃保肝、抗病毒、促进蛋白质与核酸的合成, 抗溃疡、抗炎, 增强骨髓的造血功能等作用^[1]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.)Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bunge 的干燥根, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌的功效, 用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、久泻脱肛、便血崩漏、表虚自汗、气虚水肿、内热消渴、血虚萎黄、半身不遂、痹痛麻木、痈疽难溃、久溃不敛等症^[2-3]。现代药理研究表明黄芪可提高免疫功能, 具有抗氧化、抗辐射和抗癌、保护心脑血管、提高记忆力等作用^[4]。临床上黄芪被广泛用于

治疗循环系统、神经系统、消化系统、呼吸系统、内分泌系统和血液系统疾病^[5-8]。本课题组前期以黄芪为培养基, 药用真菌灵芝为发酵菌种, 进行双向性固体发酵, 在发酵产物中分离得到了6-O-β-D-葡萄糖基-环黄芪醇, 并被证实是黄芪甲苷的生物转化物^[9]。该转化物可提高机体免疫力, 且活性高于黄芪甲苷^[10-11]。本实验在前期工作基础上, 以黄芪为培养基, 选用灵芝、桑黄、姬松茸、香菇为发酵菌种, 分别进行固体发酵, 比较发酵前后黄芪甲苷的生物转化情况, 为中药加工开辟新的手段, 为开发包含多种活性成分的新型中药制剂提供借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1379A 在线脱气机, G1311A 系列四元梯度泵, G1313A 全自动进样器, G1314AVWD 可变波长紫外检测器, Agilent 1100 色谱工作站, TGL—16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂), RE—52A 型旋转浓缩蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

收稿日期: 2010-10-08

作者简介: 阮 鸣(1979—), 女, 安徽省六安市人, 硕士研究生, 博士在读, 讲师, 研究方向为中药化学和分析, 在该领域已发表多篇论文, 获南京市科技进步奖1项。Tel: 13813006367 E-mail: yubinruming@sina.com

1.2 试药

黄芪采集于甘肃, 经南京中医药大学吴启南教授鉴定为豆科草本植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根。黄芪甲苷对照品(质量分数 > 99%) 购于中国药品生物制品检定所(批号 0781-200311), 异黄芪甲苷对照品(质量分数 > 99%) 为南京晓庄学院药用菌物研究所自制。发酵菌种灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fries) Karst、桑黄 *Phellinus yucatanensis* (Murr.) Imaz、姬松茸 *Agaricus blazei* Murrill、香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 均购于中国科学院微生物研究所。甲醇(色谱纯), 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪固体发酵物的制备

2.1.1 液体摇瓶种子的制备 分别取灵芝、桑黄、姬松茸、香菇发酵菌接种于 PDA 培养基上, 待长满斜面后, 将其接种于摇瓶培养基中培养生长, 活

化后备用。按上述培养基配方配制液体摇瓶培养基, 灭菌后取出放凉备用。在接种室内, 将已活化好的发酵菌种接入已配制好的液体摇瓶培养基中进行液体摇瓶发酵。具体发酵参数见表 1。

2.1.2 固体发酵 将黄芪粉碎, 灭菌后取出放凉备用, 即为固体培养基。在接种室内, 将已发酵培养好的液体摇瓶种子接入已灭菌的固体培养基中, 进行固体发酵培养。转种量为 10%~15%, 发酵的温度均为 28 ℃, 发酵 35~40 d。以固体发酵产物的产量为指标进行优选确定。经液相初步检测分析, 4 种黄芪固体发酵物中的黄芪甲苷均已不同程度转化为异黄芪甲苷。

2.2 黄芪甲苷和异黄芪甲苷的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 ℃, 流动相甲醇-水(80:20), 体积流量 0.6 mL/min。ELSD 参数: 漂移管温度 44 ℃, 载气压 300 kPa。色谱图见图 1、2。

2.2.2 线性关系的考察 取黄芪甲苷、异黄芪甲苷对照品各 9~10 mg, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中,

表 1 液体发酵参数

Table 1 Parameters of liquid fermentation

发酵菌种	pH 值	装液量/mL	接种量/%	培养时间/d	培养温度/℃	摇瓶转速/(r·min ⁻¹)
灵芝	5.5	160	10	8	25	150
桑黄	6.5	140	15	5	26	130
姬松茸	自然	80	10	10	25	200
香菇	6	200	10	8	26	125

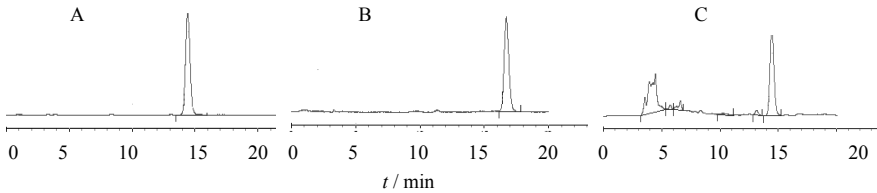


图 1 黄芪甲苷(A)、异黄芪甲苷(B)和黄芪药材(C)的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of astragaloside IV (A), iso-astragaloside IV (B), and *Astragalus Radix* (C)

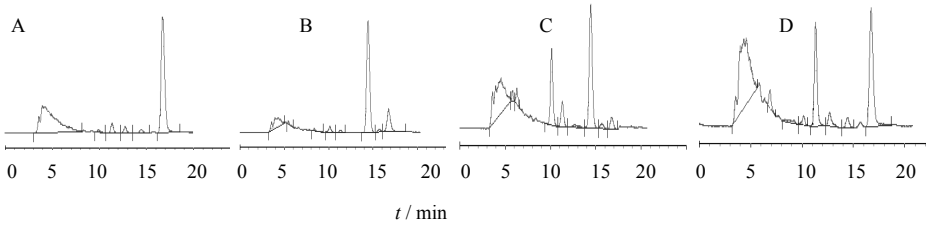


图 2 黄芪的灵芝(A)、桑黄(B)、姬松茸(C)和香菇(D)固体发酵物色谱图

Fig. 2 Chromatogram on solid fermentation product of *G. lucidum* (A), *P. igniarius* (B), *A. blazei* (C), and *L. edodes* (D)

用甲醇溶解并稀释至刻度,分别配制成 2.120 mg/mL 黄芪甲苷、1.925 mg/mL 异黄芪甲苷的对照品储备液。采用逐级稀释法再分别配成质量浓度为 1 060、530、265、132.5 $\mu\text{g/mL}$ 黄芪甲苷系列对照品溶液和质量浓度为 962.5、481.25、240.63、120.31 $\mu\text{g/mL}$ 异黄芪甲苷系列对照品溶液,分别吸取上述溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,测定。以峰面积与进样量的自然对数进行线性回归,黄芪甲苷的回归方程为 $Y=2.1004X-0.1821$, $r=0.9998$,线性范围 132.5~2 120.0 $\mu\text{g/mL}$;异黄芪甲苷的回归方程为 $Y=1.2435X+5.4413$, $r=0.9995$,线性范围 120.3~1 925.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取黄芪粗粉与黄芪固体发酵物各约 5.0 g,精密称定,70%乙醇 50 mL 加热回流 2 h,放冷,滤过,滤液备用,药渣加 70%乙醇 40 mL 加热回流 1 h,放冷,滤过,合并滤液,蒸干,加水 20 mL 使溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇振摇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用 1% NaOH 溶液充分洗涤 2 次,每次 30 mL,再用正丁醇饱和的水 30 mL 洗涤 1 次,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,离心,即得,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存备用。

2.2.4 精密度试验 分别取黄芪甲苷、异黄芪甲苷对照品溶液,连续重复进样 6 次,按上述条件测得峰面积, RSD 分别为 0.9% 和 0.8%。

2.2.5 稳定性试验 分别取黄芪甲苷、异黄芪甲苷对照品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样 1 次,按上述条件测得峰面积, RSD 分别为 0.8% 和 0.9%。

2.2.6 重现性试验 取黄芪及其灵芝固体发酵物,分别重复取样 5 次,按“2.2.3”项方法处理样品,液相测定,黄芪中黄芪甲苷为 0.150 7%, RSD 为 0.61%,黄芪的灵芝固体发酵物中异黄芪甲苷为 0.359 6%, RSD 为 1.02%,说明方法的重现性良好。

2.2.7 回收率试验 取已测定的黄芪粗粉约 2.0 g,平行 6 份,精密称定,分别精密加入黄芪甲苷对照品 1.5、1.5、3.0、3.0、4.5、4.5 mg,按“2.2.3”项方法处理,得 6 份供试品溶液,液相测定,黄芪甲苷平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.21%。

取已测定的黄芪灵芝固体发酵物约 0.3 g,平行 6 份,精密称定,分别精密加入异黄芪甲苷对照品 0.5、0.5、1.0、1.0、1.5、1.5 mg,按“2.2.3”项方法处理,得 6 份供试品溶液,液相测定,异黄芪甲苷平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.42%。

2.3 发酵前后黄芪甲苷和异黄芪甲苷量的比较

将各样品按“2.2.3”项方法处理后进样检测,结果见表 2 (同一样品设 2 个平行样)。可以看出,灵芝和香菇均使黄芪甲苷发生了明显的生物转化,转化率(黄芪甲苷转化率=1-固体发酵物中黄芪甲苷的量/黄芪药材中黄芪甲苷的量)分别为 72.95% 和 76.57%;姬松茸对黄芪甲苷的影响不大,仅使 7.43% 的黄芪甲苷发生了生物转化;灵芝、香菇和姬松茸的黄芪固体发酵物中,异黄芪甲苷的得率[异黄芪甲苷得率=固体发酵物中异黄芪甲苷的量/(黄芪药材中黄芪甲苷的量-固体发酵物中黄芪甲苷的量)]均超过 100%,说明在此 3 种发酵过程中,异黄芪甲苷的来源不完全是黄芪甲苷,可能由于各种酶的作用,黄芪甲苷以及与其结构相似的化学成分均

表 2 黄芪固体发酵前后黄芪甲苷和异黄芪甲苷量的比较

Table 2 Content comparison of astragaloside IV and iso-astragaloside IV in *Astragali Radix* samples before and after solid fermentation

样 品	称样量/g	黄芪甲苷/%	黄芪甲苷平均值/%	黄芪甲苷转化率/%	异黄芪甲苷/%	异黄芪甲苷平均值/%	异黄芪甲苷得率/%
黄芪 1	5.041 5	0.151 2	0.150 5	72.95	0	0	329.14
黄芪 2	5.032 2	0.149 8			0		
灵芝发酵黄芪 1	5.046 8	0.038 4	0.040 7	—	0.357 3	0.361 4	—
灵芝发酵黄芪 2	5.003 5	0.043 0			0.365 6		
桑黄发酵黄芪 1	5.038 5	0.210 8	0.219 7	76.57	0.112 7	0.116 8	—
桑黄发酵黄芪 2	5.028 2	0.228 5			0.121 0		
香菇发酵黄芪 1	5.014 5	0.033 6	0.035 3	7.43	0.129 1	0.131 6	114.24
香菇发酵黄芪 2	5.024 0	0.036 9			0.134 2		
姬松茸发酵黄芪 1	5.003 0	0.138 5	0.139 3	—	0.032 9	0.036 0	321.43
姬松茸发酵黄芪 2	5.021 1	0.140 1			0.039 1		

转化成异黄芪甲苷；桑黄菌发酵黄芪较为特殊，不仅使黄芪甲苷的量增加了 45.96%，而且还生成了一定量的异黄芪甲苷。

3 讨论

综上所述，不同药（食）用真菌对黄芪固体发酵物中黄芪甲苷的影响不同，生物转化的机制存在显著差异，但生物转化物均含有异黄芪甲苷，这一点似乎不受发酵菌种的限制。其中黄芪的灵芝固体发酵物中异黄芪甲苷量最高，因此该发酵物可作为异黄芪甲苷对照品分离制备的原料；黄芪经桑黄发酵后，不仅使黄芪甲苷的量增加了 45.96%，而且还生成了一定量的异黄芪甲苷，因此该发酵物可被开发为包含多种活性成分的新型中药制剂。

根据本实验结果，灵芝、桑黄、姬松茸和香菇 4 种药（食）用真菌发酵黄芪都有着各自独特的生物转化机制，这些机制可能是^[12-13]：以黄芪甲苷或一些非有效物质为前体，经药（食）用真菌的代谢形成新的化合物；药（食）用真菌在生长过程中能产生丰富的初生或次生代谢产物，这些代谢产物与黄芪中的有些物质发生反应形成新的化合物；药（食）用真菌可直接对黄芪中的某些成分进行转化，形成新的化合物；黄芪中的成分与药（食）用真菌的生长代谢间存在相互作用，从而形成新的成分；药（食）用真菌在生长过程中能对黄芪中的纤维、糖类、蛋白等物质加以利用，并对其细胞进行破壁使有效成分溶出，这样就可以提高其活性成分的单位浓度。因此，利用药（食）用真菌发酵可开发包含多种活性成分的新型中药制剂，有利于大规模生产及质量控制^[14]。此外，药（食）用真菌的次生代谢产物还可以和中药的有效成分发生复方、协同作用，达到提高药效或产生新的保健、预防或治疗的作用，为新型中药及其制剂的开发开辟新的方法。

黄芪固体发酵机制还需深入而具体的研究，这些机制的研究有利于促进中药成分的生物转化过

程，也有利于发酵过程的规范化操作。

参考文献

- [1] 赵春海, 阚振荣. 食(药)用真菌多糖的研究 [J]. 发酵科技通讯, 2008, 37: 14-16.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, *et al.* Effects of astragaloside IV derivative on heart failure in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53.
- [4] 陈虎虎, 龚苏晓, 张铁军, 等. 黄芪茎叶的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 134-137.
- [5] 陈国辉, 黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008 17(17): 1482-1485.
- [6] 刘成军, 桑国优, 韦世秀, 等. 黄芪注射液对人鼻咽癌 CNE2 裸鼠移植瘤的抑制作用 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 968-970.
- [7] 关凤英, 李红, 杨世杰. 黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1146-1150.
- [8] 李湘晖, 航鹏洲, 郭薇, 等. 黄芪提取物对糖尿病大鼠冠状小动脉平滑肌张力的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1488-1492.
- [9] 阮鸣, 张李阳, 喻斌, 等. 黄芪双向性固体发酵过程中黄芪甲苷的转化 [J]. 中药材, 2010, 33(3): 339-343.
- [10] Verotta L, Guerrini M, El-Sebakhy N A, *et al.* Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 986-994.
- [11] Yesilada E, Bedir E, Calis I, *et al.* Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on *in vitro* cytokine release [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 71-77.
- [12] 杨海龙, 陈高洪, 章克昌. 利用药用真菌深层发酵加工中药 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1717-1719.
- [13] 王宝庆. 发酵在生药学的研究进展 [J]. 生命科学仪器, 2008(6): 8-10.
- [14] 孙静, 马琳, 吕斯琦, 等. 中药发酵技术研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 49-52.