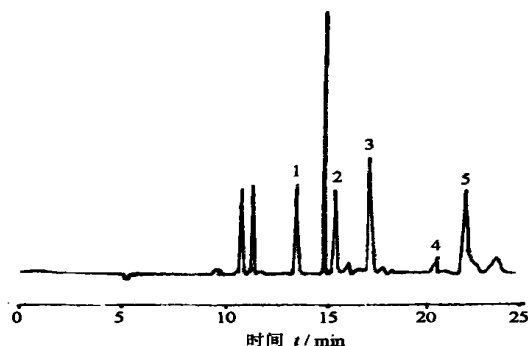




1-内标 2-大黄素 3-大黄酚 4-大黄素甲醚 5-大黄酸
1-internal standard 2-emodin 3-chrysophanol 4-phycion 5-rhein

图 2 温脾汤中大黄游离蒽醌的 HPCE 图谱

Fig. 2 HPCE chromatogram of free anthraquinone in WPD

4. 2 试验结果表明,附子先煎 15~ 60 min 后,再经复方煎煮,其乌头碱含量已远低于《中华人民共和国药典》2000 年版一部乌头碱限量规定,日服汤剂中乌头碱的总量也低于口服乌头碱的中毒限量^[4]。综合考虑,认为附子以先煎 30 min 为宜,能保证临床用药的安全有效。

4. 3 比较了附子单煎与混煎对乌头碱含量的影响,结果表明混煎液中乌头碱含量明显低于单煎液,说明在复方煎煮过程中有可能发生化学反应,导致乌头碱含量降低,从而为附子与干姜、甘草共煎可降低其毒性的理论提供了试验依据。

4. 4 温脾汤复方中大黄的后下试验结果与单味大黄煎煮的结果基本一致^[5],表明大黄无论是单味煎煮,还是在复方后下,煎煮时间都不宜过长。考虑到大黄若不经浸泡,直接投入煮沸的水中,容易产生“寒热隔滞”的效应^[6],因此在本试验中大黄均浸泡 30 min 后再入汤剂。

4. 5 内标物选择对氨基苯磺酸,是由于其在水中的溶解度较大,且在 254 nm 处有较大吸收,对各待测成分峰不产生干扰,重现性好。

References

- [1] Xu J Q. *Prescriptions of Traditional Chinese Medicine* (方剂学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1995.
- [2] Zhong Y Y, Yu M T, Zhu Z Q, *et al.* Micellar electrokinetic capillary chromatography separation and determination of Chinese traditional medicine—several *Rheum* Species [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 1995, 30(8): 594-597.
- [3] Zheng H Z, Dong Z H, She J. *Modern Application of Chinese Materia Medica* (中药现代研究与应用) [M]. Vol III. Beijing: Xueyuan Press, 1998.
- [4] Jin A P. Study on toxicity and decoction time of *Radix Aconiti Preparata* [J]. *Shizhen J Tradit Chin Med Res* (时珍国药研究), 1997, 2(4): 367.
- [5] Jin Y L, Liu C H, Li S Y. Study on the effect of decocting condition of *Radix et Rhizomea Rhei* on chrysophanol content with orthogonal design [J]. *J China Pharm* (中国药房), 1997, 8(6): 254-255.
- [6] Wang Q X, Qu M. Experimental observation of *Radix et Rhizomea Rhei* be decocted later [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 1996, 15(8): 371-372.

甘草皂苷生物转化的研究

吴少杰¹, 杨志娟¹, 朱丽华¹, 金凤燮^{2*}

(1. 华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000; 2. 大连轻工业学院, 辽宁 大连 114001)

摘要: 目的 对甘草皂苷糖链进行有选择的部分水解,以得到单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元。方法 生物酶水解法和液体发酵转化法。结果 利用试验菌最佳产酶条件所产的酶水解甘草皂苷,获得产物的产率为 23.7%。在液体发酵法中,产物的产率约为 10%。产物可用 85% 乙醇从 HP20 树脂柱上洗脱下来,同时未转化的甘草皂苷可用 50% 乙醇洗脱而循环利用。结论 该方法简洁方便,提高了甘草皂苷的转化率。

关键词: 甘草皂苷;甘草皂苷元;单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元;生物转化

中图分类号: R282.15; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-0516-03

Study on biotransformation of glycyrrhizin

WU Shao-jie, YANG Zhi-juan, ZHU Li-hua, JIN Feng-xie

(1. North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 2. Dalian College of Light Industry, Dalian 114001, China)

Key words glycyrrhizin; glycyrrhetic acid; monoglucuronyl-glycyrrhetic acid (MGA); biotransformation

甘草皂苷是甘草中主要的生理活性成分,其基本结构是由一个齐墩果烷型五环三萜在第 3 位连接 2 分子的葡萄糖醛酸构成的。研究表明皂苷上的糖链对其生理功能有重要影响,去除部分糖基往往能改变或提高其生理功能^[1,2]。在甘草皂苷中也得到类似结果:甘草皂苷失去 2 分子糖基得到的甘草皂苷元,某些生理活性要强于甘草皂苷^[3]。相对甘草皂苷元,如果仅去除 1 分子糖基,就得到单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元 (MGGA),但对其研究很少,一个重要原因就是制备困难,虽然糖链化学水解方法很多,但一般只形成皂苷元,很难有选择地去除部分糖基^[4]。为了有选择性地部分水解甘草皂苷糖链制备 GAMG,我们尝试了生物转化的方法,分别利用酶水解法及液体发酵转化法进行转化,并利用柱色谱技术提纯产物。

1 设备与材料

UV-102-02 型分光光度计 (日本岛津); HSC-20R-A 高速冷冻离心机 (吉林图们市离心机厂); CS-930 薄层扫描仪 (日本岛津); 薄层色谱板 Silica Gel 60-F₂₅₄ (德国 Merck 公司); HP20 树脂 (日本三菱化工)。

甘草皂苷、甘草皂苷元 (池田糖化株式会社); 菌种为米曲霉 39 和黑曲霉 UV-48 药材甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fischer. 购自新疆石河子地区。其他药品均为分析纯。

(诱导产酶) 固体培养基: 甘草粉 5 g, 麦麸皮 20 g, 水 20 mL; 液体发酵培养基: 含 0.3% 甘草皂苷的 5°麦芽汁。

2 方法与结果

2.1 酶的提取及酶活测定: 经预试验, 两种菌都能被甘草皂苷诱导出较高活力的甘草皂苷水解酶, 故将两菌接入固体培养基培养 3 d 后用 pH5.0 的醋酸缓冲液浸提出酶蛋白, 再经离心、硫酸铵 (饱和度 65%) 盐析、透析得酶液。

测定酶活时, 反应底物为甘草皂苷, 根据预试验, 两种酶的水解产物均含甘草皂苷元, 故以甘草皂苷元的量来反映甘草皂苷水解的酶活力。测定方法见文献^[5]。

酶活力定义为: 在 40℃ pH5.0 的条件下, 每小时生成 1 μ g 甘草皂苷元所需的酶液量 (mL) 为一个酶活力单位。

2.2 酶诱导产生的条件

2.2.1 酶诱导的培养温度: 不同培养温度下两种菌所产生的酶水解甘草皂苷的活性见表 1

表 1 培养温度对酶活的影响

Table 1 Influence of culture temperature on enzyme activity

温度 /℃	酶 活	
	米曲霉 39	黑曲霉 UV-48
20	77.4	16.7
25	82.2	22.6
30	97.8	26.1
35	76.5	14.7
40	54.4	14.1

表明: 两种菌在 30℃ 时都显示出较高的酶活力, 因此两种菌的最佳培养温度都定为 30℃。

2.2.2 酶诱导的培养时间: 在实验中, 发现两种菌生长速度不一样, 米曲霉 39 比黑曲霉 UV-48 要快一些, 因此取样时间稍做调整。结果见表 2

表 2 培养时间对酶活的影响

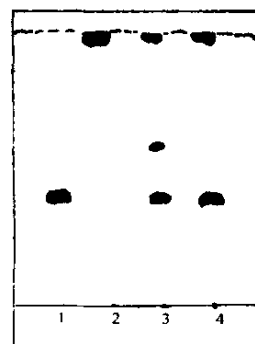
Table 2 Influence of culture time on enzyme activity

时间 /h	米曲霉 39 酶活	时间 /h	黑曲霉 UV-48 酶活
24	59.4	22	11.8
33	57.2	45	17.0
40	108.9	59	25.0
60	98.4	70	23.1
70	58.2	83	11.3

因此, 两种菌的最佳培养时间分别为米曲霉 39 为 40 h, 黑曲霉 UV-48 为 59 h

2.3 酶解产物分析: 将甘草皂苷用 pH5.0 的醋酸缓冲液配成 2 mg/mL 的溶液, 取 0.5 mL, 加入酶液 0.5 mL, 于 40℃ 反应 24 h 后取 0.1 mL 反应液于小离心管中, 加入 0.2 mL 甲醇以沉淀酶蛋白, 离心, 取上清液进行薄层色谱分析。展开剂为正丁醇: 冰醋酸: 水 (4: 1: 2), 展距约 6 cm, 然后参照文献^[6]进行薄层扫描, 其中 $\lambda_s = 254$ nm, $\lambda_R = 360$ nm, 反射锯齿法扫描步距 0.1 mm, 狭缝 2 mm $\times$ 2 mm, $SX = 2$ 结果见图 1 和表 3

由图 1 可见, 甘草皂苷的 R_f 值为 0.42, MGGA 的 R_f 值为 0.64, 甘草皂苷元 R_f 值为 0.98。因此, 米曲霉 39 的酶水解甘草皂苷只能产生甘草皂苷元, 不产生 MGGA, 而黑曲霉 UV-48 的酶能生成 MGGA, 故后者是我们所希望的菌种。另外黑曲霉 UV-48 的



1 甘草皂苷 2 甘草皂苷元
3 黑曲霉 UV-48 酶解液
4 米曲霉 39 酶解液
1-glycyrrhizin 2-glycyrrhizin
3-zymolysis by
Asperillus niger UV-48
4-zymolysis by *A. oryzae* 39
图 1 甘草皂苷酶解液
的薄层色谱图

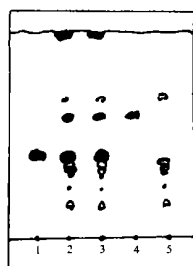
Fig. 1 TLC chromatogram of glycyrrhizin after zymolysis

酶还能进一步将 MGGA 水解为甘草皂苷元,故还需摸索条件以尽量减少这一反应。

表 3 甘草皂苷的各种物质的转化率

Table 3 Transformation rate of various substances in glycyrrhizin

菌种	MGGA/%	甘草皂苷元/%
米曲霉 39	0	48.8
黑曲霉 UV-48	23.7	31.7



1-甘草皂苷 2、3-发酵液 4-MGGA 5-培养基
1-glycyrrhizin 2、3-fermentation solution 4-MGGA 5-medium

图 2 发酵液的薄层色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of fermentation solution

2.4 液体发酵转化及产物的鉴定:由于酶转化法需分离提纯酶,较烦琐,因此我们直接利用菌体发酵法转化甘草皂苷,进行了初步的液体发酵实验。菌种为黑曲霉 UV-48。

取含甘草皂苷的液体培养基 100 mL 置于 250 mL 摇瓶中,接入菌种在 30 ℃ 的恒温摇床中培养,一定时间后取出,过滤除去菌体得发酵液。取少许发酵液进行薄层色谱分析,结果见图 2。可见经过发酵转化,产生了目的产物 MGGA,但其转化率较低,约为 10%,有待进一步提高。

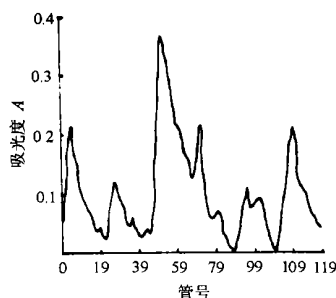
2.5 发酵产物的分离:利用 HP20 树脂柱进行分离。将处理好的树脂浸泡在发酵液中充分吸附后,再装柱洗脱。先用水洗去部分

杂质,然后用 40%、50%、60%、70%、85% 乙醇溶液进行梯度洗脱,收集洗脱液,通过测定 A_{252} 来快速了解甘草皂苷及其衍生物含量^[7],再结合薄层色谱以确定所含甘草皂苷及其衍生物的种类。见图 3,4。

从图 3,4 可以看出,利用不同浓度乙醇梯度洗脱,可以实现产物的分离。虽然每改变一次乙醇浓度,都出现一个峰值,但并非每个梯度都能将 MGGA 洗脱下来,只有 85% 乙醇才能将 MGGA 选择性地洗下。而在 50% 乙醇浓度下,可以将甘草皂苷选择性地洗脱下来;另外,在 85% 乙醇浓度下,部分副产物——甘草皂苷元也洗脱下来了,因此 MGGA 与甘草皂苷元的分离有待进一步研究。

3 讨论

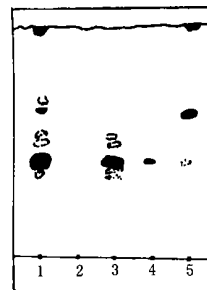
天然成分的生物转化是利用生物体系包括微生物和动、植物细胞或酶对外源性底物进行结构修饰。本实验表明,通过酶法或发酵法,能将甘草皂苷转化为单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元(MGGA),但液体发



1~20- 水 21~40-40% 乙醇
41~60-50% 乙醇 61~80-60%
乙醇 81~100-70% 乙醇 101~
120-85% 乙醇
1~20-water 21~40-40% alco-
hol 41~60-50% alcohol 61~
80-60% alcohol 81~100-70%
alcohol 101~120-85% alcohol

图 3 不同浓度乙醇洗脱发酵液的洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of fermentation solution with different concentration of alcohol



1-发酵液 2-水洗脱液
3-50% 乙醇洗脱液
4-70% 乙醇洗脱液
5-85% 乙醇洗脱液
1-fermentation solution
2-solution eluated by
water 3-solution eluated
by 50% alcohol 4-
solution eluated by 70%
alcohol 5-solution eluated
by 85% alcohol

图 4 HP20 树脂柱的分离效果

Fig. 4 Effect of separation by HP20 resin column

酵转化率较低,有待探索优化条件加以提高。另外,未转化的甘草皂苷可用树脂柱回收并循环利用,将大大提高实际的转化率。利用树脂柱色谱技术,可以将 MGGA 分离出来。但产物中含有少量甘草皂苷元,因此还需对 MGGA 的分离作进一步的研究。

本实验提供了一个单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元的制备方法,为其生理活性研究提供了条件,今后除进一步完善制备工艺外,还需对其生理功能作深入研究,以寻找糖基对甘草皂苷的生理活性影响的规律。

References:

- [1] Wang B X. *Development of Ginseng Research* (人参研究进展) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Publishing House, 1991.
- [2] Kimura S. The revelation of toxicity which is caused by poisonous substances derived from foodstuffs and its modification under nutritional conditions [J]. *Yukugaku Zasshi*, 1998, 104 (5): 423.
- [3] Zhang Z L, Wu D. The inhibition of acetylcholinesterase by glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(2): 21-23.
- [4] Yao X S. *Natural Drug Chemistry* (天然药物化学) [M]. Beijing: People's Education Publishing House, 1999.
- [5] Tetsuo M. Purification and some properties of glycyrrhizic acid hydrolyse from *Asperillus niger* GRM₃ [J]. *Agric Boil Chem*, 1986, 50(3): 687-692.
- [6] Ren J L, Li P, Yu J. Determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza* from Xinjiang [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(1): 17-18.
- [7] Sakailu M, Kakimizho Y. The quantitative analysis of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* [J]. *Bull Drug*, 1958, 78(7): 795-797.