

- (10): 793-795.
- [3] Li G S, Ma C J, Liu Z F, *et al.* Extraction of essential oil from *Angelica sinensis* by supercritical- CO_2 fluid in comparison with that by steam distillation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (7): 581-583.
- [4] Zhang J L, Xie F Z, Li N, *et al.* HPLC determination of two main active constituents in plants of genus *Ligusticum* [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20 (5): 301-303.
- [5] Chen W, Wang Q F, Zhang Z X, *et al.* Study on the stability of volatile oil in Fengshikang Capsules [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001, 21 (3): 158-160.
- [6] Xu X L, Zhang Z R, He Z X, *et al.* Study on preparation of β -cyclodextrin inclusion complex of volatile oil in Xiongdan Xiaoyan Capsules [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29 (7): 644-646.
- [7] Nagarsenker M S, Mesbham R N, Ramprakash G. Solid dispersion of hydroxypropyl beta-cyclodextrin and ketorolac, enhancement of *in vitro* dissolution rates, improvement in anti-inflammatory activity and reduction in ulcerogenicity in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52 (8): 949-956.

叶黄素酯的生物转化研究

陈龙胜, 忻 旻, 周 斌

(安徽省分析测试中心, 安徽 合肥 230031)

摘要:目的 对叶黄素酯进行微生物降解, 以获得游离态叶黄素。方法 采用青霉菌摇瓶发酵转化法, 并考察了 pH、发酵时间、接种量对转化结果的影响。结果 青霉菌在 pH 值为 6.0, 接种量为 2 菌塞, 发酵 24 h 叶黄素酯转化彻底, 所得叶黄素纯度为 91.6%, 延长转化时间使叶黄素纯度增加, 但是叶黄素质量浓度降低。结论 青霉菌在发酵过程中会产生能转化叶黄素酯为游离态叶黄素的酶, 发现制备叶黄素的一种新方法。

关键词: 叶黄素; 叶黄素酯; 生物转化; 青霉菌

中图分类号: R282.15; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)10-1486-03

Biotransformation of lutein esters

CHEN Long-sheng, XIN Yang, ZHOU Bin

(Anhui Analysis and Test Center, Hefei 230031, China)

Key words: lutein; lutein esters; biotransformation; *Penicillium sp.*

叶黄素是一种优良的抗氧化剂, 在预防年龄相关性视黄斑退化, 降低结肠癌发病率, 预防心血管疾病的发生等方面有着广泛应用^[1]。自然界中叶黄素主要以酯形式存在于金盏菊中。目前都是通过用强碱性甲醇溶液皂化金盏菊提取物中叶黄素酯分离得到游离态叶黄素^[2], 反应产率不高, 同时由于大量使用有毒溶剂, 造成极大的环境污染, 也使得产品难以达到食品标准。生物转化是利用微生物培养过程中释放一此酶体系对外源化学成分进行结构改造, 有底物选择性高, 无环境污染、反应条件温和及成本低廉等优点。叶黄素生产工艺研究也集中在化学转化^[3]。本实验通过青霉菌摇瓶发酵转化法制备叶黄素, 研究了 pH 值、发酵时间和接种量等发酵条件对转化过程的影响。

1 仪器与材料

HPLC 色谱仪: Waters 600E System contro-

ler, Knauer K-2501 紫外可见检测器, Shimadzu C-R6A 色谱数据处理机, 叶黄素对照品 (Sigma 公司), 叶黄素酯由长沙华欣科技有限公司提供, 青霉菌种由中南大学矿物工程学院提供; 去离子水 (自制), 甲醇、乙腈、醋酸乙酯为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

(诱导产酶) 培养基: 2.0 g NH_4NO_3 , 2.0 g K_2HP_4 , 1.0 KH_2PO_4 , 0.2 g MgSO_4 , 0.14 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g NaCl, 去离子水 1.0 L, 以 triton 100 为分散剂, 叶黄素酯溶于其中, 质量浓度为 26.7 mg/mL。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Knauer Eurospher-100 C_{18} (300 mm $\times$ 3.9 mm, 4.6 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-醋酸乙酯 (45:10:45); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 460 nm; 进样量: 10 μL ; 柱温: 25 $^\circ\text{C}$ 。文献

收稿日期: 2004-12-31

基金项目: 国家星火计划 (2004EA710012)

作者简介: 陈龙胜 (1980—), 男, 安徽省安庆市人, 硕士研究生, 从事天然产物的提取与衍生研究。Tel: (0551) 5145589

E-mail: formatsky@tom.com

报道^[4],叶黄素及其酯类衍生物具有相同的光谱学性质,且金盏菊中其他色素质量分数小,不会干扰叶黄素和其酯类衍生物的测定。

2.2 标准曲线的制备^[5]:精密称取叶黄素对照品10 mg,加入流动相超声溶解,定容至25 mL,0.45 μm微孔膜滤过。用流动相依次稀释成8、16、32、48、64 mg/L,依次进样,按上述色谱条件测定。以峰面积(Y)为纵坐标,叶黄素的质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=16.231+11\,648\,X$, $r=0.999\,9$ 。

2.3 转化率(R)的计算:按下式计算。

$$R=(N_{L_1}-N_{L_0})/(N_{E_0}-N_{E_1})$$

N_{L_0} -转化开始时溶液中叶黄素物质的量, N_{L_1} -转化结束时溶液中叶黄素物质的量, N_{E_0} -转化开始时溶液中叶黄素酯类衍生物物质的量, N_{E_1} -转化结束时溶液中叶黄素酯类衍生物物质的量

2.4 转化条件对转化效果的影响

2.4.1 pH值对转化效果的影响:取100 mL含叶黄素培养基3份,置于250 mL药瓶中,分别以HCl和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调发酵液的pH值为6.0、7.0、8.0,在26℃置于摇床上发酵,在4、8、12、24 h取发酵液进行分析。见图1。可以看出酸性条件有利于转化,在碱性条件下,转化不能进行。提示这个转化过程是通过细胞培养过程释放出的酶对底物进行转化,而弱酸性条件有利于酶展开其空间构型,发挥对叶黄素酯水解的催化作用。碱性条件下叶黄素的质量分数降低是因为叶黄素降解造成的。

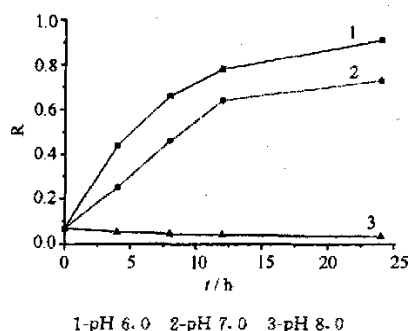
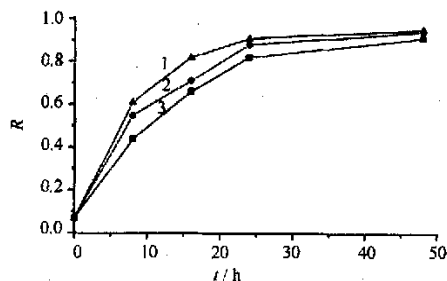


图1 pH值对叶黄素酯转化的影响

Fig. 1 Effect of pH value on the transformation of lutein esters

2.4.2 接种量对转化效果的影响:取100 mL含叶黄素培养基3份,置于250 mL药瓶中,分别以HCl调节pH值为6.0,分别接种2、4、6菌塞,置于摇床上发酵,在4、8、12、24 h取发酵液进行分析。结果见图2。可以看出接种量在4~12 h对转化速度影响较大,而在4 h前和12 h后对转化速度的影响不大。

提示在反应开始发酵液中青霉产酶的质量浓度低,对叶黄素酯的转化速度过慢,转化产物累计效果差别不大;而在4~12 h,酶的质量浓度升高,催化作用增强,转化速度非常大,因而接种量的影响比较明显;12 h后转化产物质量浓度增加对转化过程产生反馈抑制作用,降低了反应速度,产物累计变化差异不明显。



1-6 菌塞 2-4 菌塞 3-2 菌塞

1-6 bacteria plugs 2-4 bacteria plugs 3-2 bacteria plugs

图2 接种量对转化速度影响

Fig. 2 Effect of quantity of incubation on transformation velocity

2.4.3 转化时间对转化效果的影响:取100 mL含叶黄素培养基1份,置于250 mL药瓶中,以HCl调节pH值为6.0,接种2菌塞,置于摇床上发酵,在10、20、30、40、50 h取发酵液进行分析。结果见图3。可以看出,叶黄素的质量浓度随着发酵时间一直增长,但叶黄素的质量浓度却在12~24 h出现最大值,此后随着发酵时间增加反而会导致叶黄素质量浓度的降低。比较叶黄素的生成和衰减速度,可以看出青霉对叶黄素酯和叶黄素的降解具有选择性,对叶黄素降解能力较弱,而对酯转化能力非常强。

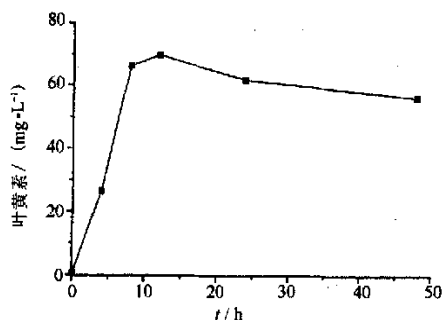


图3 叶黄素的质量浓度与转化时间的关系

Fig. 3 Relationship between content of lutein and transformation time

3 讨论

由于天然产物活性物质稳定性差,化学转化法收率不高,甚至可能完全得不到目标产物,且大量化

学试剂的使用会带来溶剂残留和环境污染等问题。微生物转化法对天然产物进行结构修饰,是通过生物酶对底物作用,获得更高活性、低不良反应的目标产物。研究表明,青霉菌培养过程所产酶能对叶黄素酯选择性降解,并能将其转化为游离态叶黄素,通过反应前后叶黄素及其酯的峰面积计算,叶黄素的质量分数可达到 91.6%。

本实验研究了微生物转化法制备叶黄素的可能性,为生产叶黄素提供一个新思路,但由于转化体系与化学方法完全不同,其后续分离纯化工作还有待进一步研究。

References

- [1] Li M H. Lutein and its biological function [J]. *Chin Food Addit* (中国食品添加剂), 2001, 29 (4): 31-33.
- [2] Zhang C, Song H, he Z C, et al. Research of analysis method of lutein in *Tagetes erecta* L. [J]. *J Sichuan Univ, Eng Sci* (四川大学学报:工程科学版) 2001, 33 (6): 114-116.
- [3] Subagio A, Morita N. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein [J]. *Food Res Int*, 2001, 34: 315-320.
- [4] Gregory Q, Chen G K. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography [J]. *J Food Sci*, 2002, 51 (10): 1093-1094.
- [5] Chen L S, Zhou C S, Xiang H Y, et al. Determination of lutein in marigold flowers with high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Spectrosc Lab* (光谱实验室), 2004, 21 (5): 866-868.

麦冬多糖的单糖组成研究

林 晓, 徐德生*, 冯 怡, 沈 岚

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 具有养阴生津、润肺清心的功能, 可用于热病伤津、心烦口渴等症。药理学研究表明, 麦冬及其制剂具有一定的抗心肌缺氧、抗心肌缺血作用, 临床用于治疗冠心病、心绞痛取得一定疗效。麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮、多糖、氨基酸等成分。小鼠⁶⁵Rb心肌营养血流量实验表明, 麦冬皂苷、麦冬总多糖可能是麦冬抗心肌缺血的主要有效部位^[1], 相对分子质量小于 1×10^4 的麦冬多糖有较显著的抗心肌缺血作用^[2]。通过测定多糖全水解后水解液中的单糖种类和数量可以对多糖的组成有所了解, 目前常用 0.5~2 mol/L 硫酸或三氟乙酸进行全水解, 且一般不对水解程度进行监测。由于单糖在酸性条件下会脱水成糠醛, 且不同种类单糖的反应速率不同, 若水解条件下不合适或水解时间过长, 都会造成在确定单糖组成比例时产生误差或错误。因此, 本实验采用 HPGPC-ELSD 法监测多糖水解程度, 比较了两种全水解条件下麦冬多糖的单糖组成。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, PL-ELS 1000 蒸发光散射检测器(英国 Polymer 公司), LC-5A

液相色谱泵, CTO-2A 柱温箱, RF-530 荧光检测器(日本岛津公司), N2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所), Shodex Sugar KS-802 色谱柱(日本昭和电工株式会社)。

浙麦冬(产地: 浙江慈溪), 经上海中医药大学药教研室鉴定。DEAE SepharoseTM Fast Flow, Sephadex G25 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, 瑞典); 盐酸胍(上海化学试剂公司); 果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和鼠李糖对照品为 Fluka 产品。

2 实验方法

2.1 麦冬总多糖的提取: 取干燥麦冬块根 1 kg, 压扁, 水煎 3 次(每次加 10 倍量水, 每次煮沸 0.5 h), 合并水提液并减压浓缩至 1 g/mL, 加乙醇至乙醇体积分数为 80%, 静置过夜, 倾去上清液, 沉淀冷冻干燥, 即得(得率约为药材的 25%)。

2.2 麦冬多糖(POJ)的分离纯化: 取麦冬总多糖, 稀释 15 倍, 1×10^4 相对分子质量膜超滤, 压力为 0.3 MPa, 取相对分子质量小于 1×10^4 部分, 依次上 DEAE Sepharose 柱和 Sephadex G25 柱, 水洗脱, 蒽酮-硫酸法检测, 合并峰位, 冷冻干燥, 即得(得率约为总多糖的 35%)。

收稿日期: 2004-12-29

作者简介: 林 晓(1974—), 男, 福建莆田人, 博士, 讲师, 主要从事中西药药剂学研究。

* 通讯作者 徐德生 Tel: (021) 51322493 E-mail: duotang@163.com