

图 7 底物质量浓度对 C-K 的影响

Fig. 7 Effects of various substratum concentrations on C-K

结果原样品中 C-K 的质量分数为 0.60 mg/g, 转化后样品中 C-K 的质量分数为 24.99 mg/g。在最佳转化条件下, 菌株 m_{14} 对 SFPG 转化后目标产物 C-K 的量是转化前的 41.65 倍, 说明菌株 m_{14} 对 SFPG 的具有较强的转化作用。

3 讨论

3.1 本实验利用从人参种植土壤中筛选的野生菌株对人参果总皂苷进行转化, 以生成人参皂苷化合物 K 的量为指标, 确定镰刀霉属霉菌 m_{14} 为最佳转化菌株。据国内外的文献报道, 通常进行生物转化的微生物除了肠道菌外, 主要有曲霉属、根霉属、毛霉属、红曲霉菌属等霉菌^[3~6]。镰刀霉属中的微生物大多数是对作物产生毒害作用^[7], 在植物抗肿瘤有效活性成分转化中的应用鲜有报道。本研究说明的镰刀霉属中的某些菌株也可以产生能水解糖苷键的酶, 进一步的研究工作尚在进行。

3.2 菌株 m_{14} 的最佳转化条件与最佳生长条件相似, 说明在微生物生长情况较好的情况下对底物的

转化效果较好, 这是因为微生物的生物转化反应, 实际上就是利用微生物含有的一种或几种酶的专一催化功能, 对用作底物的某个有机化合物的分子结构的特定位置起催化作用, 使其转化成结构相似的更有价值的活性产物。所以只有在微生物生长良好的条件下获得的转化效果为最强。

3.3 本研究利用从土壤中筛选出的野生菌株对二醇组皂苷的量相对较多的人参果总皂苷进行转化可以得到较高量的抗肿瘤活性成分人参皂苷化合物 K, 为单体制剂人参皂苷化合物 K 的工业化生产提供了一条新的途径, 说明微生物转化法是一种较有开发前景的有效方法。

References:

- [1] Xu S Z, Zhang G G, Chen Y J, *et al.* Study on the chemical constituents of *Panax ginseng* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1988, 5(1):59.
- [2] Kazuhito S, Koji M, Jun M, *et al.* An intestinal bacterial metabolite (M1) of ginseng protopanaxadiol saponins inhibits tumor-induced neovascularization [J]. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2000, 17:144-150.
- [3] Ma J S, Zhou Q L, Fei X F, *et al.* Metabolism of ginsenoside Rb₁ and panaxadiol saponins by fungi [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(8):603-605.
- [4] Liu K. Preparation and anti-tumor activities of rare ginsenoside [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (Suppl):57-59.
- [5] Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration—measurement of compound K by enzyme immunoassay [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3):245-249.
- [6] Wang L P. *In vitro* metabolism of ginseng saponins [J]. *J Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(4):4-6.
- [7] Mahapatra S N, Swain P K. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on blackgram [J]. *Annals Plant Protection Sci*, 2001, 9: 92-94.

微量热法研究板蓝根的生物热力学特征

赵艳玲^{1,2}, 王伽伯^{1,3}, 肖小河^{1*}

(1. 解放军第 302 医院, 北京 100039; 2. 军事医学科学院, 北京 100850; 3. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

摘要:目的 选取大肠杆菌做为工具菌, 建立板蓝根不同萃取部位的生物热力学研究方法。方法 采用微量热法测定大肠杆菌在板蓝根不同萃取部位作用下的生长热曲线特征谱图, 得到相应的生物热力学参数, 评价板蓝根不同萃取部位的差异性。结果 板蓝根不同萃取部位能够不同程度地抑制或促进大肠杆菌的生长, 其中水提物、萃取后残渣促进其生长, 而有机溶剂萃取物则抑制其生长; 在热力学参数上表现为随着有机溶剂萃取物的极性降低, 萃取物的抑制率下降、细菌传代时间延长; 在生长热特征曲线上则表现为最大产热峰强度和对应的培养时间具有

收稿日期: 2006-04-11

基金项目: 国家中医药管理局面上项目 (04-05ZP70)

* 通讯作者 肖小河

显著的差异,其中水提物、萃取后残渣的最大产热峰强度不变或略下降、达峰时间提前,有机溶剂萃取物的最大产热峰强度明显下降、达峰时间滞后,且存在特异的后期产热现象,可以较好的表征提取物间的差异性。结论 微量热法可以较好的反映板蓝根的生物热力学参数及特征,该方法可为其他生物模型的研究提供参考和指导。

关键词:板蓝根;微量热法;大肠杆菌;生物热力学

中图分类号:R282.15; R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0193-04

Biothermodynamic characteristics of *Radix Isatis* by microcalorimetry

ZHAO Yan-ling^{1,2}, WANG Jia-bo^{1,3}, XIAO Xiao-he¹

(1. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract; Objective To establish the characteristic biothermokinetic methods in different extract fractions of *Radix Isatis* using *Escherichia coli* as model bacteria under biothermodynamics. **Methods** Microcalorimetry was used to obtain the characteristic metabolic growth power-time curves and biothermodynamic parameters of bacteria affected by different extract fractions of *Radix Isatis*, and evaluate the differences among the different extract fractions of *Radix Isatis*. **Results** Different extracting fractions of *Radix Isatis* could inhibit or promote the growth and metabolism of *E. coli* in different levels. Water-extract fractions and residues could promote its growth while organic solvent extract fractions did the opposite. Furthermore, with the decline of the solvent polarity, the inhibiting rate of organic solvent extract fraction was decreased and the generation time of bacteria was prolonged. There were steady and distinct differences among the different extract fractions in the characteristic metabolic growth power-time curves, such as the maximum power value's decrease and peak time's delay of water-extract fraction and residue, the specific power enhancement in later stage of organic solvent extract fraction. **Conclusion** Microcalorimetry is a new and useful mean for the study on the biothermodynamic parameters and characteristics of *Radix Isatis* which can be helpful to investigate the other models using microcalorimetry.

Key words: *Radix Isatis*; microcalorimetry; *Escherichia coli*; biothermodynamics

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,清热解毒、凉血利咽,具有抑菌、抗细菌内毒素、抗病毒、解热、抗炎等作用^[1]。板蓝根的清热解毒作用具有多靶点、多途径的特点,可选的评价模型有病毒、细菌、各种免疫细胞、线粒体等,分别体现板蓝根的抗病毒、提高免疫力等临床作用。尽管板蓝根的抑菌作用不是临床的主要应用目的,但考虑到细菌模型培养技术较简单,且结果对其他生物模型具有一定的指导意义,因此作为初筛模型较合适。生物热力学技术是一种新型的高通量筛选技术,通过微量热仪精确检测药物与微生物(如细菌)、细胞、细胞器(如免疫细胞、癌细胞、线粒体)或组织器官作用的热量变化,反映药物对生物生长的抑制或促进作用及随时间变化的关系,具有精确、微量、实时、在线的特点,可用于表征和鉴别中药的生物学效应。因此本实验选择大肠杆菌作为工具菌,采用微量热仪测定了 37℃ 下正常生长条件及给予板蓝根的不同萃取部位后的生物热力学参数及生长热特征曲线,建立生物热力学评价方法,探讨板蓝根的生物学效应,并为板蓝根对免疫细胞和线粒体的生物热力学作用研究提供方法支持。

1 仪器与材料

瑞典 Thermometric 公司 TAM Air Isotherma Calorimeter 微量热仪,系统控温于 37℃。

大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* CCTCAB91112 由中国典型培养物保藏中心提供。培养基为 LB 培养基(取 10 g 蛋白胨,5 g 酵母膏,10 g NaCl,溶于 1 000 mL 蒸馏水中,调 pH 7.2 后分装 121℃ 高压蒸气灭菌 20 min,冰箱中放置备用)。板蓝根为解放军 302 医院中药房提供,并经肖小河研究员鉴定。配制药用品用无菌水,聚山梨酯 80(北京化学试剂公司),所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 板蓝根不同萃取部位的制备:板蓝根药材粗粉,水煎煮 2 次,合并煎煮液,减压浓缩,依次以石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取数次,分别收集各有机溶剂液,减压浓缩至干膏,得到不同的萃取部位,灭菌后备用。

2.2 供试品溶液的制备:临测前称取干膏 200 mg 加水溶解(必要时加聚山梨酯 80 适量),定容至 100 mL,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.3 生长热谱曲线的制备:采用安瓿法。每个安瓿

瓶精确加入 5 mL 培养基,接种大肠杆菌,菌接种量为 1×10^6 / mL,加入一定量药液,加盖瓶塞,密封。

上述均为无菌操作。放入微量热仪中跟踪记录 37 °C 细菌生长热谱曲线($P-t$ 曲线)。结果见图 1。

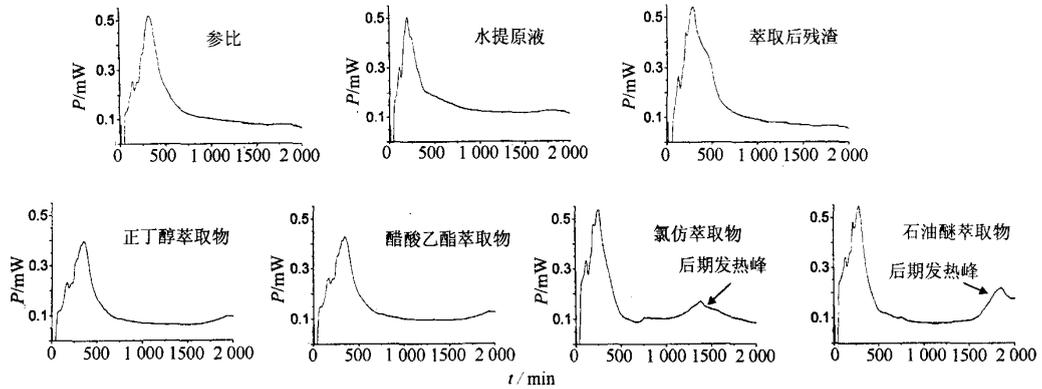


图 1 板蓝根不同萃取部位的典型生物热力学特征曲线

Fig. 1 Typical biothermodynamic characteristic curves in different extract fractions of *Radix Isatis*

2.4 大肠杆菌生物热力学参数的确定:在细菌的指数生长期中,有 $P_t = P_0 \cdot \exp(kt)$ 或 $\ln P_t = \ln P_0 + kt$ (P_0 、 P_t 分别是细菌在指数生长的起始点和 t 时的热功率)。将热谱曲线上指数生长期的 P_t 、 t 值代入 Origin 软件(美国 OriginLab 公司),线性拟合可得大肠杆菌指数生长期的生长速率常数(k), k 反映细菌增值的速度^[2]。同时由 $t_G = (\ln 2)/k$,可得到不同条件下的细菌传代时间 t_G ,并且从肠杆菌的热谱曲线可以直观地得到指数生长期的最大发热功率(P_{max})。大肠杆菌在不同供试药物作用下的 k 、 t_G 和整个生长期的热焓(ΔH)、 P_{max} 见表 1。

2.5 细菌生长抑制率的确定:细菌生长抑制率 I 定义为^[3,4]: $I = (k_1 - k_2)k_1 \times 100\%$ (k_1 为空白对照组细菌的生长速率常数, k_2 为试药组的生长速率常数),不同的药物对大肠杆菌的生长抑制率见表 1。

3 讨论

由生长速率常数 k 可以看到,有机溶剂萃取组的值均低于参比组,表明低极性成分对工具菌大肠杆菌有不同程度的抑制作用,其中正丁醇和醋酸乙酯萃取物抑制工具菌的生长速率有显著意义;萃取后残渣组 k 值极显著高于参比组,说明萃取残渣(含极性较大或大分子物质)具有极显著的促进工具菌生长的作用;而水提原液对比参比组无显著意义,说明极性或相对分子质量大小可以分离板蓝根对工具菌的作用,这一思路对于研究板蓝根抗病毒或促进淋巴细胞增殖模型时如何分离和凸显板蓝根的特异生物作用具有指导意义。从抑制率来看,同样是低极性的有机溶剂组相对于总提物抑制工具菌生长,高级性组分正好相反。传代时间与生长速率常数变化规律相同。从整个生长期的热焓和最大发热功

表 1 板蓝根不同萃取部位作用于大肠杆菌的生物热力学参数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Biothermodynamic parameters in different extract fractions of *Radix Isatis* acted on *E. coli* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	$C/(mg \cdot mL^{-1})$	$k \times 10^{-3}/min$	$I/\%$	t_G/min	$\Delta H/J$	P_{max}/mW
参比	0	14.11 ± 0.50	—	49.12 ± 2.35	141.1 ± 9.2	0.5188 ± 0.0483
水提原液	2	14.53 ± 1.42	$-2.98 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$	47.7 ± 4.08	$196.5 \pm 3.9^{**}$	0.5062 ± 0.0304
萃取后残渣	2	$19.35 \pm 1.44^{**}$	$-37.14 \pm 1.24^{\Delta\Delta}$	$35.82 \pm 0.85^{**}$	138 ± 9.6	0.5410 ± 0.0388
正丁醇萃取物	2	$10.62 \pm 0.77^{**}$	$24.73 \pm 1.04^{\Delta\Delta}$	$65.27 \pm 3.84^{**}$	$125.3 \pm 3.0^*$	$0.3979 \pm 0.0251^*$
醋酸乙酯萃取物	2	$11.73 \pm 0.86^*$	$16.87 \pm 1.1^{\Delta\Delta}$	$59.09 \pm 5.28^*$	142.2 ± 12.6	$0.4279 \pm 0.0197^*$
氯仿萃取物	2	12.58 ± 1.08	$10.84 \pm 1.15^{\Delta\Delta}$	55.1 ± 3.1	$187.4 \pm 10.2^{**}$	0.5352 ± 0.0434
石油醚萃取物	2	13.71 ± 0.54	$2.83 \pm 0.13^{\Delta\Delta}$	50.56 ± 3.52	$184.2 \pm 15.2^*$	0.5481 ± 0.0562

与参比组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与水提原液组相比: $\Delta\Delta P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs water extract solution

率两个指标来看,水提原液、氯仿和石油醚萃取物均可显著增加整个生长期的放热量,尽管后两者表现出略抑制工具菌生长的作用,但总发热量呈升高趋

势;正丁醇和醋酸乙酯萃取物显著抑制工具菌的生长,同时表现为最大发热峰高度显著下降和总发热功率降低,尤其是正丁醇萃取物表现更加明显。

另外,临床上通常并不将板蓝根划归为抑菌药物,其抑菌作用较黄连等典型的抑菌药弱,因此与先前研究的黄连^[5]不同,其抑制率较后者相对较低,对细菌作用的热力学参数变化规律不如黄连明显甚至异常,如氯仿和石油醚萃取物虽然有较弱的抑菌作用,但其最大发热功率和焓变值却高于对照组,与常规的抑菌药(如黄连)作用趋势相反,并且有明显而特异的后期放热现象,这在大肠杆菌的相关研究中是不多见的^[4]。

尽管对细菌的作用不是板蓝根的特异生物作用,但本实验的结果仍表现出规律性,建立的方法可为腮腺炎病毒和淋巴细胞等生物模型的评价工作提供技术支持,其中前者可体现板蓝根抗病毒作用,后者则反映板蓝根提高免疫力的作用。

References:

- [1] Xiao S S, Jin Y, Sun Y Q. Recent progress in the studies of chemical constituents, pharmacological effects and quality control methods on the roots of *Isatis indigotica* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(6): 455-459.
- [2] Xie C L, Tang H K, Qu S S, et al. Microcalorimetric study of bacterial growth [J]. *Thermochim Acta*, 1988, 123: 33.
- [3] Liu Y, Liang H G, Qu S S, et al. Kinetics of the action of Na_2SeO_3 on bacillus subtilis growth as studied by microcalorimetry [J]. *Chin J Chem*, 2002, 20: 117.
- [4] Zhao R M, Liu Y, Qu S S, et al. Microcalorimetric study of the action of $\text{Ce}(\text{III})$ ions on the growth of *E. coli* [J]. *Biol Trace Elem Res.*, 2002, 86: 167.
- [5] Zhou S H, Pan W J, Xiao X X, et al. Thermodynamic studies on four properties of preparations and compatibilities of *Coptis root* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(11): 1230-1232.

HPLC 法测定罗汉果中罗汉果苷 V 和 11-氧化罗汉果苷 V

周 兢^{1,2}, 王梦月², 李晓波^{2*}, 屠鹏飞³, 王 强¹

(1. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210038; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 3. 北京大学医学部, 北京 100083)

摘要:目的 建立 HPLC 法测定不同产地、不同栽培品系的罗汉果药材中罗汉果苷 V 和 11-氧化罗汉果苷 V。方法 采用 ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 体积流量: 0.75 mL/min, 检测波长: 210 nm, 柱温: 40 ℃。结果 罗汉果苷 V 在 0.804 6~20.115 0 μg 线性关系良好 ($r=0.999 8$), 平均回收率为 104.6%, RSD 为 3.28% ($n=6$)。11-氧化罗汉果苷 V 在 0.598 5~14.962 5 μg 线性关系良好 ($r=0.998 4$)。结论 本方法简便、快速、准确, 可作为罗汉果药材的质量控制方法。

关键词: 罗汉果; 罗汉果苷 V; 11-氧化罗汉果苷 V; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)02-0196-03

Determination of mogroside V and 11-oxomogroside V in dried mature fruits of *Momordica grosvenori* by HPLC

ZHOU Jing^{1,2}, WANG Meng-yue², LI Xiao-bo², TU Peng-fei³, WANG Qiang¹

(1. Department of Chinese Materia Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To establish an optimal HPLC method for determining the contents of mogroside V and 11-oxomogroside V in the dried mature fruits of *Momordicae grosvenori* from various habitats and breeds. **Methods** ODS Column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water as mobile phase in a gradient program, flow rate was 0.75 mL/min, detection wavelength was set at 210 nm, column temperature was 40 ℃. **Results** The liner range of mogroside V was 0.804 6–20.115 0 μg ($r=0.999 8$) and the average recovery of mogroside V was 104.6%, RSD was 3.28% ($n=6$). The liner range

收稿日期: 2006-05-02

基金项目: 国家“863”资助项目(2004AA2Z3730-19)

作者简介: 周 兢(1982—), 男, 江西人, 中国药科大学在读硕士研究生, 研究方向: 中药的质量控制。

E-mail: markgraf0927@hotmail.com

* 通讯作者 李晓波 Tel: (021) 34202804 E-mail: xbli@sytu.edu.cn