

缘静脉注射,发现家兔有抽搐现象,而以0.2 g/kg剂量给药后,家兔在实验过程中状态正常。兼顾实验仪器的灵敏度,将给药剂量定为0.2 g/kg。

3.2 内标法在气相色谱定量分析中是一种重要的技术。采用内标法定量时,要求内标物与待测组分结构相似,并且在色谱条件下与待测物质能够较好的分离。实验参考相关文献报道^[6],选择正十五烷为内标物。

3.3 血浆样品的预处理:实验曾使用乙腈沉淀蛋白,效果较好,但由于甲基正壬酮溶于乙腈,致使药物在蛋白沉淀过程中大量损失,影响药物浓度的测定。故采取液-液萃取法,以正己烷为萃取剂^[6]。由于在液-液萃取中尽可能采用极性溶剂,这样可得到合适的回收率,又使干扰杂质的提取量减至最小。为了克服碳氢化合物的弱极性,溶剂中常加少量醇类^[7]。故本实验中对照品、内标物均由无水乙醇配制,大大

提高了药物的萃取率。

References:

- [1] Wu W. Advances in studies on *Houttuynia cordata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 367-368.
- [2] Gong Y Q, Wu Y J. Advances in studies on clinical pharmacology *Houttuynia cordata* [J]. *China Pharm* (中国药业), 2005, 14(3): 73-74.
- [3] Wei L P, Wu M H. Pharmacokinetics of β -asarone and β -asarone in volatile oil from *Acrous tatarinowii* Schott in rabbits [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2005, 26(15): 1431-1434.
- [4] Yu J D, Hu Y X. Determination of methyl-n-nonylketone in *Houttuynia cordata* [J]. *Chin J Med Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(1): 50-51.
- [5] Zheng X Y. *Investigation & Directions Principle of Chemicals and Biological Product for Therapy* (化学药品和治疗用生物用品研究指导原则(试行)) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2005.
- [6] Shi C Y, Fang J G. Determination of methyl-n-nonylketone in Yuxingcao Injection by SPE-GC [J]. *Herald Med* (医药导报), 2005, 24(3): 225-226.
- [7] Zhang J R, Zang H C. *Medicine Analysis In Vivo* (体内药物分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶催化酸水解盾叶薯蓣薯蓣皂苷元的研究

张裕卿, 李滨县

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:目的 提高纤维素酶在催化过程中的稳定性,并考察聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶在盾叶薯蓣薯蓣皂苷转化为薯蓣皂苷元过程中的可行性。方法 采用聚氧乙烯-马来酸酐共聚物对纤维素酶进行化学改性,并以相对酶活考察改性酶的稳定性。以薯蓣皂苷元的提取率和熔点为指标,比较了纤维素酶和改性酶的辅助催化作用。对改性酶催化所得薯蓣皂苷元产品进行元素分析和HPLC分析。结果 改性酶在高温下的活力衰减速率减小,在50℃ pH 4.8的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中放置100 min,保持了初始酶活的69.4%。改性酶辅助催化盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的转化时,较未改性酶的效果好,所得薯蓣皂苷元产品提取率为97.6%以上,为白色或乳白色,熔点为200~203℃,元素分析结果为H:77.96%,O:10.11%,HPLC法测定的质量分数高达96.03%。结论 聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶在较高温度下能够保持较高的催化活性,可以更有效地促进盾叶薯蓣薯蓣皂苷向薯蓣皂苷元的转化。

关键词:盾叶薯蓣;聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶;薯蓣皂苷;薯蓣皂苷元

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2007)04-0527-04

Biocatalytic acid hydrolysis of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* through polyoxethylene oxide-maleic acid anhydride modified cellulose enzyme

ZHANG Yu-qing, LI Bin-xian

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; polyoxethylene oxide-maleic acid anhydride modified cellulose enzyme (PEO-MA); dioscin; diosgenin

收稿日期:2006-08-19

基金项目:中国博士后科学基金资助项目(413395-0306);天津市科技攻关计划项目(033180811);天津大学青年教师基金资助项目(411716)

作者简介:张裕卿(1963—),男,天津人,生物化工专业博士后,副教授,研究生导师,研究方向为生物催化医药、化工新型材料和分离。

Tel: (022)27890470 E-mail: zhangyuqing@tju.edu.cn

薯蓣皂苷元(diosgenin, 25R-spirost-5-en-3 β -ol)俗称薯蓣皂素,属异螺旋甾烷的衍生物,为薯蓣科薯蓣属植物根茎中薯蓣皂苷(dioscin)的水解产物,其以糖苷的形式广泛存在于自然界的植物中,是合成甾体激素药物重要的医药中间体,其经裂解、氧化和消除反应后生成的醋酸孕甾双烯醇酮再经过改造后可以得到数千种甾体药物,在医药界被称为“药用黄金”^[1,2]。近年来,国内外一些研究学者采用纤维素酶^[3]、淀粉酶^[4]等单一的酶制剂对薯蓣原料进行酶处理后结合酸水解进行研究,结果能够使药材中70%左右的薯蓣皂苷元成分提取出来。考虑到生物酶的专一性不同,笔者利用阶梯生物催化转化薯蓣皂苷元,产品的收率和质量均得到了较大地改善^[2]。由于催化环境的复杂性,生物酶在催化过程中随着时间、热作用和产物的影响,生物活性会逐渐的衰减,致使催化效率降低。为了提高酶的热稳定性和抗原性,应国清等^[5]采用单甲氧基聚乙二醇修饰蚓激酶,修饰后热稳定性优于天然酶;Park等^[6]利用亲水和疏水性共聚物修饰纤维素酶,结果亲水性共聚物的引入提高了酶糖化纤维素的转化速率和改变了酶的吸附参数。本实验选用聚氧乙烯-马来酸酐聚合物改性纤维素酶一方面提高了纤维素酶的稳定性和降低酶的失活速率,另一方面应用到薯蓣皂苷元的转化中,证实了酶改性在薯蓣皂苷元转化过程中的可行性。

1 药品与材料

薯蓣由陕西省旬阳县黄姜研究所提供,标本由该所陈钢鉴定为盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 的根茎;纤维素酶(酶活 1.0×10^4 U/g)由天津诺奥生物技术有限公司提供;120#汽油由天津石油公司提供;定性滤纸由天津市科威仪器公司提供;聚氧乙烯、马来酸酐、葡萄糖等均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 改性酶的制备:纤维素酶的改性依据马来酸酐与蛋白质中氨基的反应原理^[7]。马来酸酐提供功能性基团与蛋白质中的氨基发生反应,而聚氧乙烯则改变化合物周围的亲水性环境。反应条件为:温度为4℃,pH 7.9~8.2(加入0.2 mol/L NaOH溶液调节),聚合物逐步加入到纤维素酶溶液之中,缓慢搅拌混合溶液。聚氧乙烯与马来酸酐通过醚化、酯化和缩合反应合成聚合度和支链不同的聚氧乙烯-马来酸酐(polyethylene oxide-maleic acid anhydride, PEO-MA)共聚物^[8]。本实验选择 $k=30$ 、 $n=10$ 的共聚物

作为纤维素酶的改性剂。改性剂的结构式见图1。

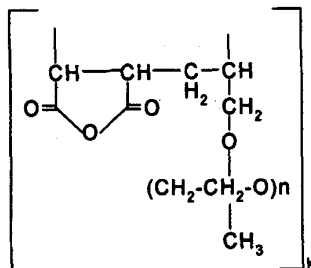


图1 PEO-MA聚合物的结构

Fig.1 Structure of PEO-MA copolymer

2.2 薯蓣皂苷元的转化:称取干燥盾叶薯蓣粉末25.0 g,加定量水于三口烧瓶中,搅拌均匀充分润湿30 min,平行实验两组。然后分别在两原料液中按照酶与底物的比例为0.1%加入改性纤维素酶和未改性纤维素酶,调节反应体系温度为60℃,催化作用2.0 h,然后用H₂SO₄水解料液,烘干,提取结晶,即得薯蓣皂苷元^[2]。

2.3 未改性酶与改性酶的稳定性比较:酶的稳定性是通过测定一定温度下保温一段时间残留酶的相对酶活反映。酶的活力测定方法参照文献报道^[9]。本实验选择定性滤纸为底物,定义1.0 mg酶1 min产生1.0 mg葡萄糖作为一个酶活单位。葡萄糖质量浓度的测定采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法。规定原纤维素酶的酶活为100%,其他各种条件下的酶活以此作为基准,以相对酶活表示。

未改性酶和改性酶分别溶解在pH 4.8的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,恒温50℃下放置一段时间,在不同的时间间隔测定相对酶活,结果见表1。可以看出,相对于未改性酶,改性酶的活力有所降低,但是稳定性明显提高。未改性酶50℃恒温100 min后的残留酶相对酶活仅为初始酶活的32.8%,而改性酶经过同样的处理后,残留酶相对酶活仍能够保持在原来的69.4%左右。改性酶活力降低的原因可能是由于部分活性基团参与了与大分子的结合反应,但是大分子引入的同时也大大提高了酶的相对稳定性。

由于天然纤维素酶的最适宜催化温度一般为45~60℃,在低于或者高于此温度范围时纤维素酶都不能有效地催化降解纤维物质,通过表1可以看出在50℃下天然酶的活力衰减速率比较大,仅保持为原来的32.8%,可以推测在更高温度条件下酶活力衰减会更大。

通过测定残留酶相对酶活研究改性酶的耐温性,考察改性酶在55、60、65℃下的酶活力变化趋势,结果见图2。可见随着温度的升高和反应时间的

延长,酶的活力逐渐降低。相对于未改性酶,虽然初始酶活力低于未改性酶,糖化速率较未改性酶慢一些,但是改性酶具有较高的稳定性,随着反应的进行还能够保持较高的酶活,总催化效率高于未改性酶。

表 1 50 ℃ 恒温一定时间后未改性酶和改性酶残留酶相对酶活的比较

反应时间/min	残留相对酶活/%	
	未改性酶	改性酶
0	100	86.2
20	87.4	79.6
40	64.3	72.4
60	57.2	67.8
80	43.9	61.7
100	32.8	59.8

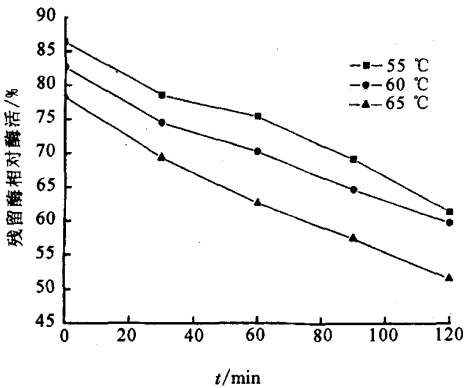


图 2 不同温度下改性酶残留酶相对酶活随时间的变化
Fig.2 Remaining relative enzymic activity of modified enzyme vs time at various temperatures

2.4 改性酶和未改性酶辅助催化转化薯蓣皂苷元: 在应用硫酸水解薯蓣皂苷之前,对原料粉末进行酶的预催化处理,改性纤维素酶和未改性纤维素酶的2组重复性实验结果见表2。可见改性酶催化得到的薯蓣皂苷元有较好的收率和熔点,并且均高于未改性酶的结果。

表 2 酶催化所得薯蓣皂苷元的提取率和熔点

组 别	提取率/%	颜色	熔点/℃
改性酶 1	97.6	白色	201~203
2	98.2	乳白	200~203
未改性酶 1	84.7	黄色	190~194
2	82.4	浅黄	190~195

纤维素酶在催化过程中的失活主要是由于热作用和底物或者产物与酶的强吸附弱脱附作用造成的。反应体系中自由酶的浓度较高,则表现出较高的

生物活性,底物的转化速率也随之增大。Park 等^[10]报道非离子表面活性剂的引入会提高纤维素酶对底物的转化和糖化作用,从而提高生物酶的循环催化速率,即转化成自由酶的速率。因此,提高纤维素酶对底物的糖化作用和纤维素表面的吸附和解吸过程中表面活性剂提供的亲水环境非常重要。同样本实验中亲水性物质聚氧乙烯的加入对纤维素酶在温度较高的情况下的解吸和吸附起到了积极的作用,能够加快纤维素酶在产物上的解吸,提高了自由酶的浓度,进而使得体系中酶的活性始终保持较高的活性,提高了酶的催化效率。

在实验过程中,相应的减小了纤维素酶的作用时间和降低了硫酸的浓度与用量相对于文献报道^[2]中的时间和用量,结果也具有很好的重现性。因此可以说明纤维素酶改性在催化薯蓣皂苷元的转化中起了很好的作用,较大程度地软化了纤维组织和破坏了坚固的植物细胞壁结构,为薯蓣皂苷的酸水解减小了阻力,更有利于薯蓣皂苷元的浸出。

2.5 薯蓣皂苷元产品的表征:改性酶生物催化酸水解得到的薯蓣皂苷元产品的元素分析结果见表3。可见皂苷元中所含碳元素和氢元素的实验值与理论计算值基本相符。薯蓣皂苷元产品和对照品的HPLC 色谱图中薯蓣皂苷元的保留时间分别为23.029、23.100 min,通过积分峰面积归一化法可得产品的质量分数为96.03%,见图3。

表 3 薯蓣皂苷元产品的元素分析

元素	理论值/%	实验值/%
C	78.21	77.96
H	10.21	10.11

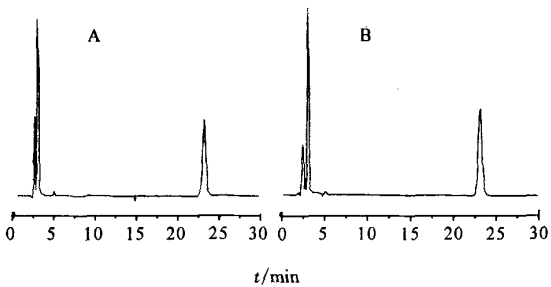


图 3 薯蓣皂苷元产品(A)和对照品(B)的 HPLC 色谱图
Fig.3 HPLC Chromatograms of diosgenin sample (A) and reference substance (B)

3 讨论

综上所述,对纤维素酶利用聚氧乙烯-马来酸酐亲水性共聚物进行化学改性,改性后纤维素酶在高温下的稳定性得到了提高,并且能够保持较高的生

物催化活性。利用修饰后纤维素酶催化薯蓣原料酸水解转化薯蓣皂苷元具有很好的应用价值,提取率可以达到 98.2%,产品质量分数和熔点分别为 96.03%和 201~203 ℃。

References:

- [1] Huang Y X. Research progress of the production processes of diosgenin [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2004, 38(4): 56-58.
- [2] Zhang Y Q, Wang D Q, Li B X, et al. Extraction of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* through stepwise biocatalysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 688-691.
- [3] Liu G J, Luo N, Chen J Y, et al. Study on several enzyme methods of extracting diosgenin [J]. *J Zhengzhou Univ: Eng Sci* (郑州大学学报:工学版), 2005, 26(4): 48-50.
- [4] Tong L, Zhang S K, Li J, et al. Extracting sapogenins from *dioscorea zingiberensis* through enzymatic hydrolysis [J]. *J Shaanxi Norm Univ: Nat Sci* (陕西师范大学学报:自然科学版), 2003, 31(2): 81-83.
- [5] Ying G Q, Yi Y, Shi L E, et al. Preparation and properties of earthworm fibrinolytic enzyme modified with mPEG [J]. *J Chem Eng Chin Univ* (高校化学工程学报), 2005, 19(8): 527-531.
- [6] Jin W P, Kwinam P, Hocheol S, et al. Saccharification and adsorption characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers [J]. *J Biotechnol*, 2002, 93:203-208.
- [7] Butler P J G, Harris J I, Hartley B S, et al. The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains [J]. *Biochem J*, 1969, 112: 679-689.
- [8] Kwi N P, Jin W P. Modification of cellulase by synthesized copolymer with polyethylene oxide and maleic acid anhydride [J]. *J Appl Polym Sci*, 2000, 77: 368-373.
- [9] Liu M L, Wang J. The influence factors in the measurement of the activity of the cellulase [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2006, 26(6): 37-39.
- [10] Park J W, Takahata Y, Kajiuchi T, et al. Effects of non-ionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(1): 117-120.

聚酰胺对紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化研究

刘铁琛^{1,2}, 曾建国^{1,2}, 陈波^{1*}, 姚守拙¹

(1. 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 湖南师范大学, 湖南 长沙 410081;

2. 湖南省中药提取工程研究中心, 湖南 长沙 410331)

摘要:目的 采用聚酰胺柱色谱分离纯化紫锥菊提取物中菊苣酸。方法 采用 50%乙醇溶液洗脱, HPLC 法对产物中菊苣酸进行检测分析。结果 该法能把紫锥菊提取物中菊苣酸的质量分数(4.9%)提高 10 倍左右, 回收率达到 98%以上。结论 该法操作简单, 可用于紫锥菊提取物中菊苣酸的分离纯化。

关键词:紫锥菊提取物; 菊苣酸; 聚酰胺柱色谱; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)04-0530-04

Isolation and purification of cichoric acid from extracts of *Echinacea purpurea* by polyamide column chromatography

LIU Yi-chen^{1,2}, ZENG Jian-guo^{1,2}, CHEN Bo¹, YAO Shou-zhuo¹

(1. Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Hunan Engineering Research Center

of Botanical Extract, Changsha 410331, China)

Key words: the extracts of *Echinacea purpurea* Moench; cichoric acid; polyamide column chromatography; HPLC

紫锥菊为菊科松果菊属多年生草本植物,原产于北美洲的中西部地区,有 9 个品种,主要药用种是狭叶松果菊 *Echinacea angustifolia* DC.、紫花松果菊 *E. purpurea* (L.) Moench 和淡紫松果菊

E. pallida (Nutt.) Nutt.。紫锥菊是目前国际上受到普遍重视的一种免疫促进剂和免疫调节剂^[1],也是极少数具有免疫力增强和抗炎双重作用的植物药之一^[2,3]。菊苣酸为咖啡酸衍生物,是紫锥菊中重要

收稿日期:2006-12-11

基金项目:“973”项目(2006CB504701);湖南省重点科技项目(05SK2006)

作者简介:刘铁琛(1980—),男,湖南新化人,在读硕士,主要从事中草药与保健食品的研究与开发。E-mail: lyc6666666@163.com

*通讯作者 陈波 Tel:(0731) 8865515 E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com