

黑曲霉转化牛蒡子水提液中牛蒡子苷的研究

欧志敏¹, 隋志红¹, 石寒冰², 孙兴元²

1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

2. 齐齐哈尔医学院附属第三医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000

摘要: 目的 采用黑曲霉 *Aspergillus niger* ZJUT302 产生的 β -葡萄糖苷酶水解牛蒡子水提液中的牛蒡子苷, 提高牛蒡子苷元的量。方法 *A. niger* ZJUT302 在培养基成分为稻草粉 50 g/L、麦麸 15 g/L、大麦粉 15 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, 温度 30 °C, 初始 pH 5.0, 添加 0.1% 聚乙二醇 5000, 摇床转速 150 r/min 的优化反应条件下转化牛蒡子水提液 7 d。结果 牛蒡子苷在初始浓度 0.06 mmol/L 时, 转化率可达 92.3%。结论 本方法是一种有效的牛蒡子生物炮制技术。

关键词: 牛蒡子苷; 牛蒡子苷元; 黑曲霉 ZJUT302; β -葡萄糖苷酶; 生物转化技术

中图分类号: R283.1; R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)04-0698-03

Transformation of arctiin in water extract of *Arctii Fructus* with *Aspergillus niger*

OU Zhi-min¹, SUI Zhi-hong¹, SHI Han-bing², SUN Xing-yuan²

1. College of Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. The Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, China

Key words: arctiin; arctigenin; *Aspergillus niger* ZJUT302; β -glucosidase; biotransformation technology

牛蒡子是菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实^[1], 牛蒡子苷是其有效成分之一, 牛蒡子苷必须经过代谢转化为牛蒡子苷元才能直接被人体吸收^[2-3]。牛蒡子苷元可以直接与其他药物组合用于治疗或预防慢性肾功能衰竭及肾纤维化, 具有抗病毒、抗肿瘤作用^[4]。牛蒡子中牛蒡子苷的量是牛蒡子苷元量的 4~5 倍, 若将牛蒡子中的牛蒡子苷转化为牛蒡子苷元, 可以加快牛蒡子摄入后起效速度, 提高药效。

临床上, 牛蒡子多用炮制品。牛蒡子的传统炮制方法有单炒、酒炒、酒拌蒸、隔纸炒等, 以清炒为主流。微生物法炮制牛蒡子是现代生物技术与传统中药炮制技术相结合的产物。牛蒡子苷在 β -葡萄糖苷酶的水解作用下生成牛蒡子苷元^[5-6]。本实验对 β -葡萄糖苷酶产生菌^[7]炮制牛蒡子水提液, 提高牛蒡子苷元量的工艺进行研究, 为牛蒡子的生物炮制提供一种可行的方法。

1 仪器与材料

安捷伦高效液相色谱 HPLC 1200。黑曲霉

Aspergillus niger ZJUT302 保藏于浙江工业大学生物制药研究所。牛蒡子药材购于浙江中医药大学中药饮片厂, 产地山东, 由浙江工业大学唐岚副教授鉴定为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实; 药材中牛蒡子苷和牛蒡子苷元的质量分数分别为 0.374%、0.074%。牛蒡子苷和牛蒡子苷元对照品分别购自天津一方科技有限公司(批号 200606, 质量分数 $\geq 98\%$) 和上海融禾医药科技发展有限公司(批号 061108, 质量分数 $\geq 98\%$)。

2 方法

2.1 牛蒡子水提液的制备

将牛蒡子磨成粉末, 分别称取 10、20、30、40、50、60 g 加适量水, 煮沸 1 h, 滤过后取滤液适量定容至 100 mL。

2.2 培养基的制备

2.2.1 斜面培养基(PDA)的配制 称取马铃薯 200 g, 洗净去皮切碎, 加水 1 L 煮沸 30 min, 纱布滤过, 再加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂, 充分溶解后趁热纱布滤过, 分装试管, 121 °C 灭菌 20 min。

收稿日期: 2010-07-01

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2007CA100)

作者简介: 欧志敏 (1973—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术制药。Tel: (0571)88871077 13018950216 E-mail: oozmm@163.com

2.2.2 发酵培养基 稻草粉 50 g/L、麦麸 15 g/L、大麦粉 15 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

2.3 转化方法

2.3.1 方法 I 将生理盐水冲洗黑曲霉斜面菌种得到的 1 mL 孢子悬液(含孢子数约为 100 个/mL)接种于盛有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C 摇床振荡(150 r/min)培养 1~9 d。将三角瓶取出加入牛蒡子水提液 10 mL, 置于 30 °C 摇床振荡(150 r/min)转化牛蒡子苷 1~5 d。转化结束后用 HPLC 分析转化液中牛蒡子苷和牛蒡子苷元。

2.3.2 方法 II 在盛有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中加入牛蒡子水提液 10 mL, 再将生理盐水冲洗黑曲霉斜面菌种得到的 1 mL 孢子悬液(含孢子数约 100 个/mL)接种于三角瓶中, 30 °C 摇床振荡(150 r/min)培养 7~14 d。转化结束后用 HPLC 分析转化液中牛蒡子苷和牛蒡子苷元。

2.4 牛蒡子苷和牛蒡子苷元的分析^[8]

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相为甲醇-水(1:1.1), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C。色谱图见图 1。

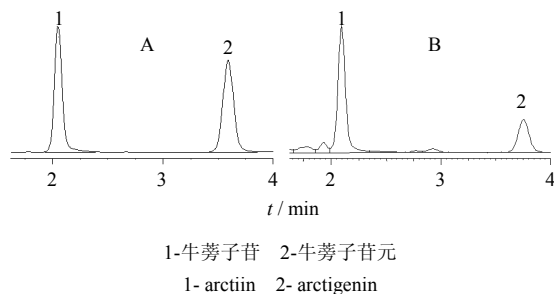


图1 对照品(A)和牛蒡子水提液(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and water extract of *Arctii Fructus* (B)

2.4.2 线性关系考察 精密称取牛蒡子苷对照品 8.51 mg、牛蒡子苷元对照品 2.5 mg, 甲醇溶解并定容至 100 mL。精密吸取上述对照品溶液 2、4、6、8、10 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 分别进样测定, 记录峰面积, 以进样量(mg/mL)对峰面积进行线性回归, 得回归方程: 牛蒡子苷 $Y = -0.00459 + 9.27356 \times 10^{-4}X$, $R = 0.9998$; 牛蒡子苷元 $Y = 0.002 + 0.00183X$, $R = 0.9999$; 表明牛蒡子苷、牛蒡子苷元分别在 17.02~85.10、5~25 μg/mL 线性关系良好。

3 结果与讨论

3.1 黑曲霉最佳产酶时间的确定

将黑曲霉按照方法 I 培养 1~9 d, 每天取出 2 只三角瓶, 分别在发酵液中加入 10 mL 牛蒡子水提液, 使牛蒡子苷初始浓度为 0.06 mmol/L, 转化 5 d 后测定转化率(图 2)。培养至第 7 天的黑曲霉发酵液转化牛蒡子苷的产率达到最高, 培养第 8、9 天与培养第 7 天的产率接近, 黑曲霉发酵培养 7 d 可以获得较佳的 β-葡萄糖苷酶水解活力。

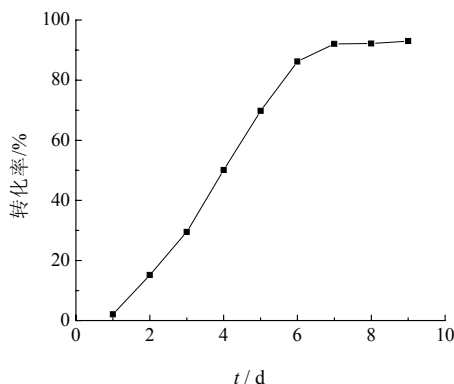


图2 黑曲霉最佳产酶时间

Fig. 2 Optimum time of β-glucosidase production by *A. niger* ZJUT302

3.2 转化方法 I 和 II 的比较

将“2.1”项中获得的 6 种牛蒡子水提液分别按照“2.3”项方法进行生物转化, 转化率结果见图 3、4。按照方法 I 将黑曲霉发酵产酶 7 d 后进行生物转化, 方法 II 中黑曲霉发酵产酶与生物转化同时进行。方法 II 获得的转化率比方法 I 略高, 方法 II 的最佳转化时间为 7 d, 方法 I 的菌体发酵产酶与转化时间的总和为 10 d。方法 II 比方法 I 更有利于牛蒡子水提液的生物转化, 发酵产酶同时进行生物转化有利于缩短转化时间, 提高转化效率。

3.3 炮制温度对黑曲霉水解牛蒡子苷的影响

采用方法 II 进行转化, 牛蒡子苷初始浓度 0.06 mmol/L, 调整转化温度分别为 25、30、35、40、45、50 °C, 转化 7 d 后测定转化率分别为 90.8%、91.5%、91.5%、85.2%、80.1%、72.3%。30、35 °C 获得的产率最高, 确定 30 °C 为最佳的转化温度。

3.4 转化液初始 pH 对黑曲霉水解牛蒡子苷的影响

采用方法 II 进行转化, 牛蒡子苷初始浓度 0.06 mmol/L, 调节转化液初始 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10, 转化 7 d 后测定转化率分别为 80.1%、91.5%、91.2%、88.5%、86.9%、78.2%、65.5%。初

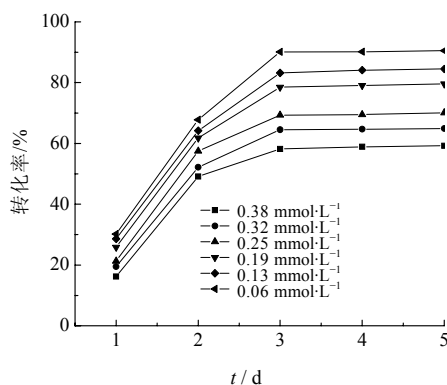


图 3 不同初始浓度牛蒡子苷水提液按方法 I 进行转化的结果

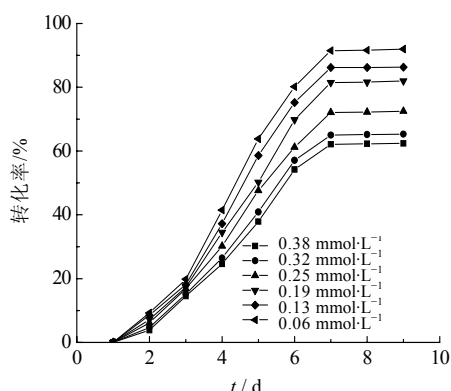
Fig. 3 Transformation of *Arctii Fuctus* water extract with different initial concentrations of arctiin according to method I

图 4 不同初始浓度牛蒡子苷水提液按方法 II 进行转化的结果

Fig. 4 Transformation of *Arctii Fuctus* water extract with different initial concentrations of arctiin according to method II

始 pH 值为 5 和 6 时产率最高, 转化液的自然初始 pH 值为 5, 确定最佳 pH 值为 5。

3.5 不同表面活性剂对黑曲霉水解牛蒡子苷的影响

表面活性剂能改变细胞膜的通透性, 增加细胞内酶的分泌, 提高酶活。采用方法 II 水解, 初始浓度分别为 0.06、0.13、0.19、0.25、0.32、0.38 mmol/L 牛蒡子苷, 转化前在发酵液中预先加入 1 mg/mL 的聚山梨醇酯、聚乙二醇 5000 及 SDS, 转化 7 d 后测定转化率 (表 1), 可见聚乙二醇 5000 对转化率的提高幅度最大。

4 结论

本实验采用黑曲霉在菌体生长和产生 β -葡萄糖苷酶的同时转化牛蒡子水提液中的牛蒡子苷, 提高牛蒡子苷元的量。最佳转化条件为: 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 初始 pH 5, 0.1% 聚乙二醇 5000, 150 r/min 转化 7 d。

表 1 不同表面活性剂对黑曲霉水解牛蒡子苷的影响

Table 1 Effect of various surfactants on transformation of arctiin hydrolyzed by *A. niger* ZJUT302

牛蒡子苷 初始浓度/ (mmol·L ⁻¹)	转化率/%			
	空白	聚山梨醇酯	聚乙二醇 5000	SDS
0.06	91.5	92.1	92.3	91.9
0.13	86.2	88.2	88.5	87.9
0.19	81.5	83.4	83.6	82.7
0.25	72.1	74.2	75.5	73.6
0.32	65.0	66.2	67.9	65.7
0.38	62.1	63.9	64.5	63.0

黑曲霉在培养基组成成分为稻草粉 50 g/L、麦麸 15 g/L、大麦粉 15 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L、 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、牛蒡子苷初始浓度 0.06 mmol/L 时, 按照方法 II 转化牛蒡子水提液中的牛蒡子苷转化率可达 92.3%。牛蒡子中有效成分牛蒡子苷元的量较低, 采用本方法, 可将牛蒡子中的牛蒡子苷转化为牛蒡子苷元, 有利于提高牛蒡子水提液中的牛蒡子苷元的量, 提高药物的起效速度, 是一种可行的牛蒡子生物炮制技术。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 蒋淑敏. 牛蒡化学成分和药理作用的研究现状 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 941-942.
- [3] 王 璐, 赵 烽, 刘 珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 467-470.
- [4] Lv W J, Chen Y L, Zhang Y X, et al. Microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of arctiin and arctigenin in *Fructus Arctii* and its herbal preparations [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860(1): 127-133.
- [5] 徐非一, 孙启玲. 微生物转化牛蒡子机理及应用的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [6] 周涓涓, 刘振国, 单 淇, 等. 牛蒡子中牛蒡子苷元的分离及结构表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 279-283.
- [7] 吴志梅, 梁华正, 李佳春, 等. 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及发酵栀子蓝色素的研究 [J]. 现代食品科技, 2005, 21(3): 53-57.
- [8] 欧志敏, 杨根生, 冯 海. β -葡萄糖苷酶水解牛蒡子苷制备牛蒡子苷元 [J]. 药物生物技术, 2009, 16(5): 443-446.