

# 黄芩中黄芩苷生物转化工艺优化

姚磊, 张敏, 王鹏娇, 龙厚宁, 贺欢, 高秀丽\*  
(贵阳医学院药学院, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 优选黄芩经纳豆菌发酵后黄芩苷转化生成黄芩素的工艺条件。方法: 采用 HPLC 测定黄芩素含量, 流动相甲醇(A)-乙腈(B)-0.2%磷酸水(C)梯度洗脱(0~28 min, 20%~35% A, 20%~35% B; 28~32 min, 35%~20% A, 35%~20% B), 检测波长 278 nm。在单因素试验基础上, 通过正交试验考察菌龄、粉碎度、料液比及接种量对黄芩发酵工艺的影响。结果: 最佳发酵工艺为菌龄 12 h, 液料比 3:1, 培养温度 37 °C, 粉碎度 40 目, 接种量 30%, 发酵时间 7 d。黄芩素质量分数 10.02%, 平均转化率 96.5%。结论: 优选的发酵工艺稳定可行, 黄芩经纳豆菌发酵后黄芩苷基本转化为黄芩素, 可提升黄芩的药用价值和生理活性。

**[关键词]** 纳豆菌; 黄芩; 黄芩素; 生物转化

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; TQ920.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0022-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090022

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1044.005.html>

**[网络出版时间]** 2015-03-17 10:44

**Optimization of Bioconversion Process of Baicalin in Scutellariae Radix** YAO Lei, ZHANG Min, WANG Peng-jiao, LONG Hou-ning, HE Huan, GAO Xiu-li\* (School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize bioconversion process of baicalin to baicalein in Scutellariae Radix by bacillus natto. **Method:** HPLC was employed to determine the content of baicalein with mobile phase of methanol (A) -acetonitrile (B) -0.2% phosphoric acid water solution (C) for gradient elution (0-28 min, 20% -35% A, 20% -35% B; 28-32 min, 35% -20% A, 35% -20% B) and detection wavelength at 278 nm. Based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize fermentation process by taking bacteria age, grinding degree, solid-liquid ratio and inoculation amount as factors. **Result:** Optimum fermentation process was as following: bacteria age of 12 h, solid-liquid ratio of 1:3, grinding degree of 40 mesh, inoculation amount of 30%, fermentation temperature of 37 °C and fermentation time of 7 d. Mass fraction of baicalein was 10.02% and conversion rate of baicalin was 96.5%. **Conclusion:** This optimized fermentation process is feasible and stable, baicalin in Scutellariae Radix basic transforms into baicalein by bacillus natto, it can upgrade medicinal value and physiological activity of Scutellariae Radix.

**[Key words]** bacillus natto; Scutellariae Radix; baicalein; biotransformation

黄芩的主要活性成分黄芩苷和黄芩素具有明显的清除自由基、抗氧化、抗肿瘤、抗抑郁等药理作用<sup>[1]</sup>。黄芩苷在肠道内经菌群作用水解生成苷元黄芩素后, 疏水性和脂溶性增加, 更容易穿过生物膜而被吸收入血发挥药效, 且黄芩素的生物利用度高

于黄芩苷<sup>[2-4]</sup>。纳豆菌是枯草芽孢杆菌的一个亚种, 能分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质, 该菌在大豆发酵过程中还会生成纳豆激酶、大豆异黄酮、超氧化物歧化酶等生理活性物质。此外, 纳豆菌还能分泌各种酶和维生素。纳豆菌具备多种益生

**[收稿日期]** 20140826(023)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160413)

**[第一作者]** 姚磊, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel:15086970517, E-mail:yaolei881168@163.com

**[通讯作者]** \*高秀丽, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂质量研究与新药研发, Tel:0851-6780461, E-mail:1550434689@qq.com

功能,属于益生菌<sup>[5]</sup>。黄芩苷中含有葡萄糖醛酸键,这类糖苷键不易水解,通常使用酸、碱等化学方法进行水解<sup>[6]</sup>。本实验利用纳豆菌发酵黄芩,纳豆菌代谢产生的酶能水解葡萄糖醛酸键,将黄芩苷转化为黄芩素,以增加药材中黄芩素的含量,提高黄芩的资源利用率。

## 1 材料

1100型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),SG8200H型超声仪(上海冠特超声仪器有限公司),TB-215D型电子分析天平(德国赛多利斯股份公司),SDYA30型恒温发酵柜(广东顺麦仪器有限公司),GZX-9246型电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。纳豆菌种(自制),黄芩素、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111595-200905,110715-201117),黄芩(购自贵阳同济堂药店,经贵阳医学院药学院龙庆德副教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根),甲醇、乙腈为色谱级,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 培养基的制备及菌种培养** 称取氯化钠6g,牛肉膏6g,蛋白胨12g,加水1L,用1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠调pH 7.0,得液体培养基;称取营养琼脂3.3g,加水100 mL,得斜面培养基。2种培养基均于121℃高压灭菌30 min。将纳豆菌菌种接种于斜面培养基上,于37℃培养12 h,将活化的枯草芽孢杆菌转接于液体培养基中,于37℃,180 r·min<sup>-1</sup>培养,即可用于接种发酵。

**2.2 供试品溶液的制备** 取同批发酵的黄芩药材(过40目筛)于50℃干燥12 h至恒重,精密称取6份,每份0.5 g,各加入甲醇25 mL,超声提取30 min,过滤,滤渣加甲醇25 mL超声提取30 min后过滤,合并2次滤液,吸取滤液1 mL用甲醇定容至10 mL,经0.45 μm微孔滤膜滤过,4℃冰箱储存备用。

### 2.3 黄芩素的含量测定

**2.3.1 检测色谱条件** Dikma-Diamonsil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇(A)-乙腈(B)-0.2%磷酸水(C)梯度洗脱(0~28 min,20%~35% A,20%~35% B;28~32 min,35%~20% A,35%~20% B),柱温35℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长278 nm,进样量10 μL。

**2.3.2 标准曲线的绘制** 精密称取黄芩苷、黄芩素对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为145.6,129.8 mg·L<sup>-1</sup>的混合液。将该混合液稀释为6个不

同质量浓度的样品,按2.3.1项下条件测定,得回归方程分别为  $Y = 1998X - 60.7 (r = 0.9998)$ ,  $Y = 5296.7X - 59.7 (r = 0.9998)$ ,线性范围分别为27~1456,35~1298 ng。

**2.3.3 方法学考察** 取同一对照品溶液重复进样6次,计算指标成分峰面积的RSD 0.5%。取同一供试品溶液,室温下于24 h内连续检测6次,计算指标成分峰面积的RSD 0.2%,表明供试品溶液室温24 h内稳定。取同批纳豆菌发酵的黄芩,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算RSD 0.3%,表明该方法重复性良好。取同批发酵黄芩药材9份,等分为3组,分别按80%,100%,120%加入黄芩素对照品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算平均加样回收率99.90%,RSD 0.9%,表明该方法准确可靠。

**2.4 单因素试验考察** 将黄芩药材粉碎后过40目筛,高压灭菌,加适量水混匀,接入菌种,于37℃恒温条件下发酵。黄芩药用部位为根部,含有大量淀粉和纤维,分解后能为菌种的生命活动提供充足碳源和氮源。

**2.4.1 发酵时间** 称取粉碎过40目筛的黄芩药材适量,固定菌龄12 h,料水比1:3,接种量30%。发酵黄芩每24 h取样1次,于50℃烘干,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,结果见图1。

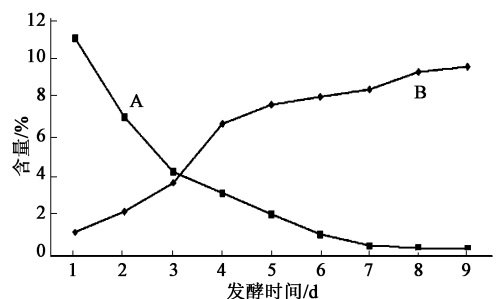


图1 黄芩中黄芩素(A)和黄芩苷(B)随发酵时间的变化  
Fig.1 Changes of baicalein (A) and baicalin (B) in *Scutellariae Radix* with fermentation time

**2.4.2 菌龄** 称取粉碎后过40目筛黄芩4份,每份10 g,以培养12,24,36,48 h的菌种发酵7 d,发酵样品按2.2项下方法处理,结果黄芩素质量分数分别为9.77%,10.12%,9.07%,8.54%。

**2.4.3 粉碎度** 称取黄芩药材4份,每份10 g,固定菌龄24 h,设定颗粒大小为原药材和20,40,60目,结果黄芩素质量分数分别为6.58%,8.96%,

10.21%, 10.19%。

**2.4.4 料液比** 发酵过程中含水量会影响微生物的生长和氧气的传送,适当含水量能起到增效作用,提高黄芩素含量;但含水量过高则会使发酵黄芩结团变成黑褐色硬块,不利于发酵的继续。称取粉碎后过40目筛黄芩药材4份,每份10g,菌龄固定24h,分别按发酵液料比1:1,3:1,5:1,7:1发酵7d,结果黄芩素质量分数分别为8.76%,10.02%,7.92%,5.96%。

**2.4.5 接种量** 称取粉碎后过40目筛黄芩药材4份,每份10g,将菌龄、液料比分别固定为24h,1:3,接种量依次为10%,20%,30%,40%,结果黄芩素质量分数分别为8.98%,9.85%,10.13%,10.17%。

**2.5 正交试验** 在单因素试验基础上,称取黄芩药材9份,每份10g,选择菌龄、水料比、粉碎度、接种量为考察因素,发酵后黄芩中黄芩素质量分数为评价指标,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表进行试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。由直观分析可知,各因素对黄芩素转化率的顺序顺序为B>C>A>D。以极差最小的D因素为误差项进行方差分析,结果表明因素A,B,C均具有极显著性差异,确定最佳发酵条件为A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即菌龄12h,液料比3:1,培养温度37℃,粉碎度40目,发酵时间7d,接种量30%。称取黄芩药材10g,共3份,按优选的工艺条件进行发酵,结果黄芩素质量分数分别为9.99%,10.04%,10.02%,平均转化率96.5%,RSD 0.2%,证明该工艺稳定可行。

表1 黄芩发酵工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of fermentation process of Scutellariae Radix

No.	A 菌龄 /h	B 液料比 /mL·g <sup>-1</sup>	C 粉碎度 /目	D 接种量 /%	黄芩素 /%
1	12	2:1	20	20	5.54
2	12	3:1	40	30	10.16
3	12	4:1	60	40	9.97
4	24	2:1	40	40	6.25
5	24	3:1	60	20	8.50
6	24	4:1	20	30	6.62
7	36	2:1	60	30	6.12
8	36	3:1	20	40	6.54
9	36	4:1	40	20	8.40

### 3 讨论

HPLC 结果显示黄芩药材中黄芩苷质量分数10.67%,黄芩素质量分数0.61%,经纳豆菌发酵后黄芩苷质量分数0.37%,而黄芩素质量分数达10.02%。说明黄芩经纳豆菌发酵后黄芩苷基本转

表2 黄芩发酵工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of fermentation process of Scutellariae Radix

方差来源	SS	MS	F	P
A	4.43	2.21	119.62	<0.01
B	11.48	5.74	310.24	<0.01
C	8.01	4.00	216.43	<0.01
D(误差)	0.04	0.02	1.00	

注:F<sub>0.01</sub>(2,2)=99。

化为黄芩素。文献报道利用侧耳菌<sup>[7]</sup>、黑曲霉<sup>[8]</sup>、米曲霉<sup>[9]</sup>、蓝藻<sup>[10]</sup>对黄芩和黄芩苷进行生物转化,但转化率大多较低,而本文中黄芩苷的转化率达96.5%。霉菌发酵容易产生一些对机体有害的次级代谢产物,对发酵产品的质量会造成一定影响。本文利用纳豆菌发酵黄芩,纳豆菌属于益生菌,发酵过程中不会产生对机体有害成分,且发酵方法简便,易于控制。通过该菌发酵黄芩可将黄芩苷基本转化为黄芩素。

### [参考文献]

[1] 粟俞程,沈继朵,刘亚敏,等.黄芩主要黄酮成分的抗抑郁活性筛选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):166-169.

[2] 车庆明,黄新积,李艳梅,等.黄芩苷的药物代谢产物研究[J].中国中药杂志,2001,26(11):768-769.

[3] Muto R, Motozuka T, NaKano M. The chemical structure of new substance as the metabolite of baicalin and time profiles for the plasma concentration after oral administration of sho-saiko-to in human[J]. Yakugaku Zasshi, 1998, 118(3):79-87.

[4] 刘太明,蒋学华.黄芩苷和黄芩素大鼠在体胃、肠的吸收动力学研究[J].中国中药杂志,2006,31(12):999-1001.

[5] 尹聪,许啸.纳豆菌微生态制剂的研究进展[J].北方牧业,2011(1):14.

[6] 蒋建军,董慧茹.高纯度黄芩素的制备及表征[J].北京化工大学学报:自然科学版,2008,35(3):31-34.

[7] 陈丽艳,张迎,金爽,等.黄芩经侧耳菌和黑曲霉发酵后黄酮类成分的变化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):63-65.

[8] 汪红,高陪,廖勇,等.微生物发酵转化黄芩苷生成黄芩素的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2009,46(3):795-798.

[9] 贺美,邱德全,柏仕杰.米曲霉两步活化法对黄芩苷的生物转化及转化产物的纯化与鉴定[J].广东海洋大学学报,2007,27(6):41-44.

[10] 陈斌.蓝藻对黄芩苷生物转化研究初探[D].北京:北京中医药大学,2009.

[责任编辑 刘德文]