

· 工艺与制剂 ·

知母皂苷 AⅢ 酶解工艺优选

刘艳平, 杨轶舜, 张彤*, 丁越, 张李赢, 蔡贞贞
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 优选知母皂苷 AⅢ 的酶解工艺。方法: 采用 β -葡萄糖苷酶水解知母皂苷制备知母皂苷 AⅢ, 以知母皂苷 AⅢ 转化率为指标, 通过单因素和正交试验考察反应温度、反应时间、pH 及酶用量对知母皂苷 AⅢ 酶解工艺的影响。结果: 最佳酶解工艺条件为温度 55 $^{\circ}\text{C}$, pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液, 酶用量 600 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, 反应时间 3 h。结论: 优选的酶解工艺简单可靠, 反应条件温和, 适用于工业化生产。

[关键词] 知母皂苷; 知母皂苷 AⅢ; β -葡萄糖苷酶; 知母皂苷 BⅡ

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0001-04

Optimization of Enzymatic Technology of Timosaponin AⅢ

LIU Yan-ping, YANG Yi-shun, ZHANG Tong*, DING Yue, ZHANG Li-ying, CAI Zhen-zhen
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzymatic technology of timosaponin AⅢ. **Method:** Taking bioconversion rate of timosaponin AⅢ as index, β -glycosidase enzyme was used to hydrolysis timosaponin, effect of reaction temperature, reaction time, pH and dosage of enzyme on enzymatic technology of timosaponin AⅢ was investigated by single factor test and orthogonal test. **Result:** Optimum enzymatic technology conditions were as follows: reaction temperature of 55 $^{\circ}\text{C}$, pH of acetic acid-sodium acetate buffer solution 5.0, dosage of enzyme 600 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, reaction time 3 h. **Conclusion:** Optimized enzymatic technology was simple and reliable with moderate reaction conditions, it was suitable for industrial production.

[Key words] timosaponin; timosaponin AⅢ; β -glycosidase enzyme; timosaponin BⅡ

知母皂苷 AⅢ 为螺甾皂苷类成分, 其母核为菝葜皂苷元。药理研究表明, 知母皂苷 AⅢ 具有抗血小板聚集^[1-2]、抗老年痴呆^[3]、抗肿瘤^[4] 和降糖^[5-7] 等作用。尤其在抗肿瘤方面, 知母皂苷 AⅢ 表现出很强的药理活性, 对结肠癌^[8]、宫颈癌^[9]、乳腺癌^[4]

等均有抑制作用。但知母皂苷 AⅢ 在知母药材中含量较低(约 0.3%), 而以知母皂苷 AⅢ 为母核的知母皂苷 BⅡ 的含量很高, 2010 年版《中国药典》一部规定, 知母药材中知母皂苷 BⅡ 的含量 $\geq 3\%$, 文献报道药材中知母皂苷 BⅡ 含量多在 5% 左右, 最高可达 10.25%^[10]。故可通过水解糖苷键制备知母皂苷 AⅢ。

β -葡萄糖苷酶能水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基。酶水解反应具有选择性高、产物完整、工艺简单等特点。本试验以知母皂苷 AⅢ 转化率为指标, 选取反应温度、反应时间、pH 及酶用量为考察因素, 采用单因素和正交试验考察知母皂苷 AⅢ 的酶解工艺。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent

[收稿日期] 20120920(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173561); 教育部新世纪人才计划(NCET-10-0944); 上海市教委曙光计划及创新团队项目(10SG40)

[第一作者] 刘艳平, 在读博士, 从事中药制药技术及体内过程研究, Tel: 021-51322324, E-mail: lyp1066@hotmail.com

[通讯作者] * 张彤, 教授, 博士, 从事中药制药及中药分析技术研究, Tel: 13512129873, E-mail: zhangtdmj@yahoo.com.cn

公司), Alltech 3300 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司), BS110S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), SH-Z 型水浴恒温振荡器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实业设备公司)。

知母皂苷 B II 粗提取物(实验室自制, HPLC 测定质量分数 78.95%), β -葡萄糖苷酶(上海宝丰生化有限公司), 知母皂苷 A III 对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 YY20110426, 纯度 > 98%), 知母药材(上海康桥药业有限公司, 批号 20120321), 经上海中医药大学教学实验中心李俊松高级实验室鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 知母皂苷 A III 转化率的测定

2.1.1 色谱条件 Alltima™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水(85:15), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测器温度 60 $^{\circ}$ C, 雾化气体流速 1.5 L·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取知母皂苷 A III 对照品适量, 用甲醇溶解, 制成 0.5, 0.05 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取知母皂苷 20 mg, β -葡萄糖苷酶 12 U, 加入 20 mL 缓冲液, 于 55 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 85 $^{\circ}$ C 水浴加热 5 min, 灭活。用 20 mL 正丁醇萃取 3 次, 回收正丁醇, 水浴蒸干, 用甲醇复溶, 定容至 25 mL, 0.45 μ m 滤膜过滤, 即得。吸取 20 μ L 进行 HPLC 测定。

2.1.4 线性考察 配置质量浓度分别为 56.5, 113, 226, 452, 904, 1 130 mg·L⁻¹ 的系列知母皂苷 A III 对照品溶液, 进样量 20 μ L, 以知母皂苷 A III 峰面积平均值的常用对数为纵坐标, 对照品质量浓度的常用对数为横坐标, 得回归方程 $Y = 1.376 4X - 1.681 6$ ($R^2 = 0.999 5$), 表明知母皂苷 A III 在 56.5 ~ 113 0 mg·L⁻¹ 与峰面积的常用对数呈良好线性关系。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 知母皂苷 A III 的制备和转化率的计算 称取知母皂苷 20 mg, 置具塞锥形瓶中, 加入一定量 β -葡萄糖苷酶和乙酸-乙酸钠缓冲溶液 20 mL, 水浴恒温摇床中振摇一定时间, 于 85 $^{\circ}$ C 水浴中加热 5 min, 使酶灭活, 用水饱和正丁醇(每次 20 mL) 萃取 3 次, 合并回收正丁醇, 水浴蒸干, 加甲醇定容至 25 mL,

计算知母皂苷 A III 的转化率。

$$\text{转化率} = m_1 M_2 / m_2 M_1 \times 100\%$$

m_1 知母皂苷中知母皂苷 B II 的含量; m_2 知母皂苷 A III 的实际测得量; M_1 知母皂苷 B II 的相对分子质量; M_2 知母皂苷 A III 的相对分子质量。

2.2.2 pH 对转化率的影响 配置 pH 分别为 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液, 称取知母皂苷 20 mg, β -葡萄糖苷酶 12 U, 加入缓冲液 20 mL, 于 50 $^{\circ}$ C 反应 2 h。测定知母皂苷 A III 的转化率分别为 63.3%, 62.6%, 59.6%, 59.9%, 57.0% ($n = 3$)。表明酶解反应的最适 pH 为 3.5 ~ 4.0。

2.2.3 温度对转化率的影响 称取知母皂苷 20 mg, β -葡萄糖苷酶 12 U, 加入 pH 4.0 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 20 mL, 分别于 37, 45, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}$ C 反应 2 h。测得知母皂苷 A III 的转化率分别为 66.9%, 68.7%, 71.8%, 71.0%, 70.2%, 42.6% ($n = 3$)。表明酶解反应在 50 $^{\circ}$ C 时转化率最高, 之后随温度升高至 80 $^{\circ}$ C, 转化率降低明显, 说明温度太高可能会使酶活性减弱。

2.2.4 反应时间考察 称取知母皂苷 20 mg, β -葡萄糖苷酶 12 U, 加入 pH 4.0 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 20 mL, 分别于 55 $^{\circ}$ C 反应 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h。测得知母皂苷 A III 转化率分别为 47.4%, 62.3%, 66.8%, 71.9%, 68.7% ($n = 3$)。表明酶解反应最适时间为 2 h。

2.2.5 加酶量考察 称取知母皂苷 20 mg, 分别加入 β -葡萄糖苷酶(相对于知母皂苷的量) 100, 200, 300, 600, 1 200 U·g⁻¹, 加入 pH 4.0 乙酸-乙酸钠缓冲溶液 20 mL, 于 55 $^{\circ}$ C 反应 2 h。测得知母皂苷 A III 转化率分别为 32.5%, 51.2%, 68.8%, 70.0%, 70.5% ($n = 3$)。表明知母皂苷 A III 转化率随加酶量的增大而增加, 但当加酶量 ≥ 600 U·g⁻¹ 时, 转化率增加不是很明显。

2.3 正交试验优选 称取知母皂苷 20 mg, 在单因素试验基础上, 按 L₁₆(4⁵) 正交表进行试验, 以知母皂苷 A III 的转化率为指标, 选取酶解介质的 pH, 酶解温度、水解时间和加酶量为考察因素, 每个因素设 4 个水平, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

由表 2, 3 可知, 各因素影响水平大小依次为 $C > B > D > A$ 。因素 C 对知母皂苷 A III 转化率有显著性影响, 其余因素影响不显著。最佳酶解工艺条件为 A₄B₄C₄D₄。由于酶用量影响不显著, 结合单因素试验结果及生产成本考虑, 确定加酶量为 600 U·

表 1 知母皂苷 A III 的酶解工艺正交试验因素水平

水平	A 介质 pH	B 酶解温度 /°C	C 水解时间 /h	D 加酶量 /U·g ⁻¹
1	3.5	40	0.5	100
2	4.0	45	1	300
3	4.5	50	2	600
4	5.0	55	3	1 200

表 2 知母皂苷 A III 的酶解工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	E(空白)	转化率/%
1	1	1	1	1	1	5.05
2	1	2	2	2	2	46.45
3	1	3	3	3	3	72.72
4	1	4	4	4	4	69.24
5	2	1	2	3	4	36.21
6	2	2	1	4	3	30.44
7	2	3	4	1	2	67.80
8	2	4	3	2	1	68.40
9	3	1	3	4	2	55.25
10	3	2	4	3	1	68.91
11	3	3	1	2	4	22.59
12	3	4	2	1	3	61.22
13	4	1	4	1	3	59.48
14	4	2	3	2	4	50.40
15	4	3	2	4	1	65.69
16	4	4	1	3	2	42.53
K ₁	48.365	38.997	25.152	46.117	52.013	
K ₂	50.712	49.050	52.392	49.230	53.008	
K ₃	51.992	57.200	61.693	55.093	55.965	
K ₄	54.525	60.347	66.358	55.155	44.610	
R	6.160	21.350	41.206	9.038	11.365	

表 3 酶解工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	79.202	3	0.283	>0.05
B	1 092.169	3	3.906	>0.05
C	4 078.315	3	14.586	<0.05
D	241.393	3	0.863	>0.05
E(误差)	279.61	3		

注: $F_{0.05}(3,3) = 9.28$ 。

g⁻¹。最终确定最佳工艺条件为 A₄B₄C₄D₃, 即 pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲溶液为酶解介质, 酶用量为每 g 知母皂苷粉加 600 U β-葡萄糖苷酶, 酶解温度 55 °C, 水解时间 3 h。

2.4 验证试验 按优选的最佳酶解工艺制备 3 批知母皂苷 A III 样品, 结果转化率分别为 66.69%, 63.95%, 65.67%, 说明该优选工艺稳定性、重复性好。

3 讨论

化学水解知母皂苷糖苷键, 会直接水解为菝葜皂苷元, 不易于得到知母皂苷 A III, 且对环境污染较大。而酶解法具有条件温和、易于得到目标产物、转化率较高等优点, 可使知母皂苷 B II 转化为知母皂苷 A III, 为制备知母皂苷 A III 提供试验依据。

随着国内外对中药有效成分体内代谢研究的深入, 逐渐明确中药汤剂口服后, 其有效成分除以原形化合物被机体吸收发挥作用外, 还有一部分需在肠内菌群作用下转化为代谢产物后, 才能被机体吸收而发挥活性作用。许多中药有效成分被肠道菌群代谢转化后, 产生出具有较强药理活性的代谢产物, 尤其是具有水溶性糖基的葡糖苷类成分, 通常被人肠道菌群产生的糖苷酶水解脱去糖基生成苷元后, 才能进入血液循环中而发挥其药理作用。采用传统化学水解方法, 不易得到目标产物, 而酶解法可解决这一难点。本课题组成功地利用葡萄糖苷酶水解法制备了梔子苷元^[11]和牛蒡苷元^[12], 为体外制备此类药物提供了试验依据。

[参考文献]

- [1] Zhang J Y, Meng Z Y, Zhang M Y, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood [J]. Clinica Chimica Acta, 1999, 289(5): 79.
- [2] 李素燕, 赵振虎, 裴海云, 等. 知母皂苷 A III 抗血栓作用研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(4): 340.
- [3] Lee B, Jung K, Kim D H. Timosaponin A-III, a saponin isolated from Anemarrhena asphodeloides, ameliorates learning and memory deficits in mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 93(2): 121.
- [4] Frank King, Sylvia Fong, Chandi Griffin, et al. Timosaponin A III is preferentially cytotoxic to tumor cells through inhibition of mTOR and induction of ER stress[J]. Plos One, 2009, 4(9): 326.
- [5] 韩昌均, 林光津, 宣垣硕, 等. 用于预防和治疗 2 型糖尿病的包含知母皂苷 AIII 的组合物. 中国: CN101180065A[P]. 2006-08-24.
- [6] 黄成刚, 王新亮, 张振秋, 等. 知母皂苷 AIII 作为制备治疗 II 型糖尿病药物的应用. 中国: CN1513463A[P]. 2006-07-26.
- [7] Nakashima N, Kimura I, Kimura M, et al. Isolation of pseudoprotimosaponin AIII from rhizomes of Anemarrhena asphodeloides and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. J Nat Prod, 1993, 56(3): 345.

壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分的影响

战兵, 张超, 盛华刚, 林桂涛*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分的影响。方法: 选择大黄为研究对象, 采用壳聚糖沉降法处理大黄水提液, 以大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数和浸膏率为指标, 选取药液质量浓度、壳聚糖加入量、药液 pH 为考察因素, 通过正交试验优选壳聚糖絮凝沉降工艺; 并与乙醇沉淀法比较。结果: 优选的壳聚糖絮凝沉降工艺为药液质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 壳聚糖加入量 10%, 药液 pH 6。壳聚糖沉淀法和乙醇沉淀法均能较好地使水提液沉淀, 但两者均会造成蒽醌类成分的损失, 前者在降低浸膏率、保留有效成分方面优于后者。2 种沉淀法纯化后, 药液中蒽醌类成分与未纯化药液比较无显著性差异。结论: 壳聚糖絮凝沉降法对蒽醌类成分影响较乙醇沉淀法小, 可用于含蒽醌类成分中药的沉淀, 但是否适合于大生产有待进一步研究。

[关键词] 壳聚糖; 絮凝沉降法; 乙醇沉淀法; 蒽醌; 大黄

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0004-04

Effect of Chitosan Flocculation Sedimentation Method on Anthraquinones

ZHAN Bing, ZHANG Chao, SHENG Hua-gang, LIN Gui-tao*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To study on effect of chitosan flocculation sedimentation method on anthraquinones. **Method:** Taking *Rheum palmatum* as research object, water extracting liquid of *R. palmatum* was handled by chitosan sedimentation, with the mass fraction of rhein, emodin, aloe-emodin, chrysophanol, physcion and extract rate as indexes, orthogonal test was used to optimize chitosan flocculation sedimentation by taking the mass concentration and pH of water extracting liquid, the amount of chitosan as factors; And compared with ethanol precipitation method. **Result:** Optimized chitosan flocculation sedimentation technology was: the mass concentration of water extracting liquid $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with pH 6, the amount of chitosan 10%. Both chitosan flocculation sedimentation method and ethanol precipitation method could precipitate water extract preferably, but also lead to loss of anthraquinones. The former was better than the latter in reducing extract rate and retaining

[收稿日期] 20120606(005)

[基金项目] 国家科技重大专项——“重大新药创制”(2009ZX09301-013)

[第一作者] 战兵, 在读硕士, 从事中药炮制原理及中药新药研究, Tel: 15053121623, E-mail: zhanbing1022@126.com

[通讯作者] * 林桂涛, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制原理及中药新药研究, Tel: 0531-89628590, E-mail: linguitaoli@163.com

[8] Kang Y J, Chung H J, Nam J W, et al. Cytotoxic and antineoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 701.

[9] Sy L K, Yan S C, Lok C N, et al. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10229.

[10] 梁雷, 边宝林, 王宏洁. 不同产地知母药材中芒果苷和知母皂苷 B II 的含量测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(16): 49.

[11] Yang Y S, Zhang T, Yu S C, et al. Transformation of geniposide into genipin by immobilized beta-glucosidase in a two-phase aqueous-organic system [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 4295.

[12] 张李赢, 杨铁彝, 张彤, 等. 牛蒡苷元制备方法的研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(3): 467.

[责任编辑 全燕]