

基于生物转化的附子减毒增效考察

孙鹏,李玲*,吴丽,童永鑫
(西华大学生物工程学院,成都 610039)

[摘要] **目的:**通过固态发酵筛选能使附子减毒增效的微生物,并初步探讨其生物转化机制。**方法:**选用附子粉为原料,以菌种生长情况、双酯型生物碱含量变化及物质成分变化为评价指标,通过固态发酵方式筛选适合附子生物转化的菌种。采用 HPLC-MS 初步鉴定新增物质的结构,为附子生物转化的可行性提供理论依据。**结果:**采用黑曲霉对附子进行生物转化,可使乌头碱含量减少,新增 1 种毒性较小的苯甲酰乌头原碱。**结论:**黑曲霉发酵附子实现了减毒增效的目的,为附子炮制新方法的深入研究提供理论依据。

[关键词] 生物转化;附子;黑曲霉;减毒增效

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0016-04

Research on Attenuated Efficiency of *Aconitum carmichaeli* Based on Biotransformation

SUN Peng, LI Ling*, WU Li, TONG Yong-xin
(School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China)

[Abstract] **Objective:** To screen microbial with attenuated efficiency for *Aconitum carmichaeli* by solid-state fermentation, and preliminary explore its biotransformation mechanism. **Method:** With *A. carmichaeli* powder as raw material, bacteria growth, the content of diester alkaloid and material composition changes as

[收稿日期] 20120718(012)

[基金项目] 教育部春晖计划项目(Z2010102);四川省中医药管理局项目(2010-69)

[第一作者] 孙鹏,硕士,Tel:15882189401,E-mail:793243748@qq.com

[通讯作者] *李玲,博士,副教授,从事药物新制剂与新剂型研究,Tel:028-87720584,E-mail:lily1188@126.com

同途径凝血均有明显的抑制作用。湿法组提取所得蛋白能明显抑制大鼠体内血栓的形成,表现出了其体内抗血栓作用。通过以上分析,湿法超微粉碎-超滤法快速提取浓缩所得全蝎蛋白口服后对大鼠有明显的抗凝血和抗血栓作用,从药效学上证明了该方法可应用于全蝎蛋白的提取浓缩过程。本研究为湿法超微粉碎-超滤法应用于全蝎蛋白的快速提取浓缩过程提供了药效学依据,大大地简化了全蝎蛋白提取浓缩过程,为全蝎粗蛋白的提取和富集提供了新方法。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:133.

[2] 王晶娟,张贵君,李奇豫.全蝎蛋白药效组分的生物鉴

定法研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):94.

[3] 黄小英,赵海梅,左志琴,等.全蝎蜈蚣对 CIA 大鼠外周血协同刺激分子 B7-1,B7-2 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):132.

[4] 代龙.全蝎不同工艺提取物抗凝血及溶栓作用的比较研究[J].西北药学杂志,2009,24(2):114.

[5] O'Neill E E, Brock C J, von Kriesheim A F, et al. Towards complete analysis of the platelet proteome[J]. Proteomics,2002,2(3):288.

[6] 陈洲,黄自强,许建华,等.葡萄球菌激酶对大鼠颈动脉血栓的溶栓作用[J].心血管康复医学杂志,2006,15(1):33.

[7] 彭延古,雷田香,付东云,等.全蝎抗凝活性成分的定性分析[J].湖南中医学院学报,2005,25(6):10.

[责任编辑 仝燕]

evaluation indexes, suitable bacteria for biotransformation of *A. carmichaeli* was screened by solid-state fermentation. Structure of new substances were preliminary identified by HPLC-MS, and in order to provide a theoretical basis for biotransformation feasibility of *A. carmichaeli*. **Result:** Biotransformation with aspergillus could reduce the content of aconitine, and added a new compound of benzoyleaconitine with less toxic. **Conclusion:** Benzoyleaconitine could achieve purpose of attenuated efficiency for *A. carmichaeli*, which provided a theoretical basis and feasibility to depth study of new processing method for *A. carmichaeli*.

[**Key words**] biotransformation; *Aconitum carmichaeli*; aspergillus; attenuated efficiency

附子具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效^[1],主要功效成分和毒性成分为有剧毒的双酯型二萜类生物碱^[2],如乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等,人只要口服乌头碱约 2~4 mg 即能致死,因此,临床上均采用经炮制后的附子入药,因为附子炮制后可降低有毒生物碱含量^[3],但同时降低了附子的药效,且传统炮制工艺大多依赖经验,缺乏统一标准,使得附子饮片的质量参差不齐。为探求一种既能保留其功效又能降低毒性的附子炮制工艺,本研究根据中药炮制理论,结合现代生物转化工程及酶工程的研究方法和技术,以附子为生物转化底物,对多种工业菌进行筛选,意图通过生物体内酶系统对附子有毒组分进行结构改造和修饰^[4],以得到新或增强药效的转化产物,降低药物的毒副作用同时提高药效,达到提高药物综合疗效和临床用药安全性的目的。

1 材料

生附子产自四川省江油市,经成都中医药大学中药鉴定教研室鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* debx. 的子根,将生附子清水洗净,切片,约 2 cm 厚,60 ℃ 烘干,打碎,过 40 目筛,备用。

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Frankland, 变形杆菌 *Proteusba-cillus vulgaris*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 金黄葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 黑曲霉 *Aspergillus niger*, 红曲霉 *Monascus purpureus* Went, 毛霉 *Mucor racemosus*, 青霉菌 *Penicillium*, 酵母菌 *Saccharomyces Siccum* 等 15 种微生物,购自广东微生物研究所。

乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110797-200404, 110798-200404, 110799-200404), 甲醇、乙腈、乙酸铵为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

LC-20 型高效液相色谱仪(日本岛津), Milli-Q 型超纯水仪(苏州赛恩斯仪器有限公司), BT423S 型电子天平(Sartorius 公司)。

2 方法及结果

2.1 附子生物转化

2.1.1 菌种的扩大培养 土豆斜面培养基 土豆去皮,切块 200 g,加入 1 L 水中,煮沸 30 min(注意火力的控制,可适当补水),用纱布过滤,每 100 mL 滤液加蔗糖 2 g,加热,加入琼脂 2 g,搅拌融化,pH 自然。趁热进行分装,液体分装高度以不超过管高 1/5 为宜,高压蒸气灭菌 20 min(121.3 ℃)。将灭菌的试管培养基冷至 50 ℃ 左右,搁置斜面,斜面长度以不超过试管总长 2/3 为宜。将健康菌落接入上述培养基中,8 ℃ 下恒温培养 6~7 d。

牛肉蛋白胨斜面培养基 准确称取牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂 15 g,水 1 L,将称好的牛肉膏、蛋白胨、NaCl 依次放入烧杯,烧杯中先加入少量水,搅匀,在石棉网上加热溶解,加入琼脂,待完全溶解后补足水至所需体积,pH 自然。趁热进行分装,液体分装高度以不超过管高 1/5 为宜,于 121.3 ℃ 下高压蒸汽灭菌 20 min,制成斜面。将灭菌的试管培养基冷至 50 ℃ 左右,搁置斜面,斜面长度以不超过试管总长 2/3 为宜。将健康菌落接入上述培养基中,37 ℃ 下培养 3~5 d。

2.1.2 菌悬液的制备及药材接种 取经过扩大培养的菌种,加入 3~5 mL 0.9% 无菌 NaCl 溶液,制成菌悬液。吸出孢子悬液(用管口带有薄的无菌棉花或纱布能过滤菌丝的无菌毛细吸管)至无菌试管内备用。取附子粉末 4.0 g,加无菌水至刚好呈流动态,121 ℃ 灭菌 20 min,将菌种以菌悬液的形式接种到药材中,接种量为 1 mL·g⁻¹(以药材量计)菌悬液,混匀^[5-6],30 ℃ 下培养生物转化 5~7 d。观察并记录菌种生长情况。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 生附子供试品溶液制备 取附子粉末 4.0 g,精密称定,置具塞 100 mL 锥形瓶中,加 25% 氨溶液 4 mL,浸润 30 min,精密加入乙酸乙酯-异丙醇(1:1)混合液 100 mL,摇匀,称定质量,超声 60 min,放冷称量,用上述混合试剂补足减失的质量,摇匀,

滤过,精密称取滤液 50 mL,40 ℃ 下减压回收溶剂至干,用 0.05% 盐酸-甲醇(1:1)溶解残渣,过滤,定容至 10 mL,用 0.45 μm 滤膜过滤,备用^[1]。

2.2.2 生物发酵附子供试品溶液制备 将经生物转化的附子按 2.2.1 项下方法进行制备。

2.2.3 微生物发酵空白溶液制备 取生物转化的附子适量,加入相应量无菌水,置于锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 20 min,将菌种以菌悬液形式接种无菌水中,接种量与相应微生物发酵加入菌悬液量一致,混匀,于 30 ℃ 下培养生物转化 5~7 d,按 2.2.1 项下方法制备微生物发酵空白溶液。

2.2.4 对照品溶液制备 分别精密称取乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇-0.05% 盐酸(1:1)溶液溶解,摇匀,定容至刻度,制得乌头碱、次乌头碱及新乌头碱的对照品

质量浓度分别为 0.34,0.52,0.6 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液,乌头碱对照品 1 mL,次乌头碱 0.5 mL,新乌头碱 0.5 mL 置于 10 mL 量瓶,加甲醇-0.05% 盐酸(1:1)溶液定容,制得混合对照品溶液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品质量浓度依次为 0.17,0.13,0.15 g·L⁻¹,0.45 μm 滤膜过滤,备用。

2.3 3 种乌头碱的含量测定^[7-9] 在预试验及相关文献基础上,确定 3 种乌头碱的含量测定方法如下: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm,5 μm),检测波长 240 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,流动相乙腈-0.4 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液(氨试液调 pH 8.0)进行梯度洗脱(0~13 min,15% A;13~14 min,24% A;17~68 min,40% A),进样量 20 μL,计算含量,结果见表 1。

表 1 附子生物转化试验考察

No.	生物转化菌种	菌种生长情况 (n=2)	乌头碱/μg·g ⁻¹			新增成分 /个	减少成分 /个
			新乌头碱	次乌头碱	乌头碱		
S1	生附子		9.125	3.975	0.805		
S2	枯草芽孢杆菌	-	3.524 ↓	0.867 ↓	0.082 ↓	1	2
S3	蜡状芽孢杆菌	-	1.027 ↓	1.422 ↓	0 ○	0	0
S4	变形杆菌	+	5.324 ↓	2.263 ↓	0.223 ↓	0	0
S5	大肠杆菌	+	7.569 ↓	3.718 ●	0.743 ●	1	3
S6	金黄葡萄球菌	+	0.315 ↓	1.371 ↓	0 ○	0	3
S7	酵母菌	+	9.766	2.528 ↓	0.345 ↓	0	2
S8	黑曲霉	+++	5.352 ↓	3.210 ↓	0.127 ↓	4	1
S9	红曲霉	++	10.235 ↑	4.256 ↑	0.965 ↑	1	2
S10	毛霉	+++	10.987 ↑	4.696 ↑	1.134 ↑	3	2
S11	青霉	+++	12.250 ↑	5.185 ↑	1.093 ↑	2	2
S12	立枯丝核菌	++	8.519 ↓	4.232 ↑	0.774 ↓	2	2
S13	灰葡萄孢菌	+++	12.044 ↑	4.950 ↑	0.865 ●	1	4
S14	小麦赤霉	++	8.11 ↓	3.257 ↓	0.319 ↓	0	2
S15	油菜核菌	+	5.032 ↓	2.497 ↓	0.266 ↓	0	4

注:+++表示生长极好,菌落长满整个基质;++表示生长很好,菌落基本长满或占了大部分基质,+表示生长一般,肉眼可见菌落,-表示不生长或者基本看不到菌落;与生附子相比,↑表示含量升高,↓表示含量降低,●表示含量变化不大,○表示不出峰或出峰不明显,增加(减少)成分是发酵附子与生附子色谱图相比较得出的结果。

2.4 HPLC 指纹图谱比较 将上述试验所得色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年版 A”中^[10],以生附子图谱作为参照图谱,次乌头碱和新乌头碱为参照峰,对各生物转化样品进行分析比较,考察各生物转化样品成分的变化,见图 1。

由图 1 可知,综合菌种生长情况、有效成分含量及新增物质情况对霉菌类菌种生物转化的附子进一

步分析,经比较,最终选定以黑曲霉为附子的生物转化菌种。

2.5 生物转化附子 HPLC-MS 分析 对以黑曲霉为转化菌种进行附子生物转化后产生的新物质进行 HPLC-MS 分析,该物质初步分析应为苯甲酰乌头原碱,是单酯型乌头碱,其毒性为双酯型生物碱的 1/1000,乌头碱降解断掉一个酯基团就转化成苯甲酰乌

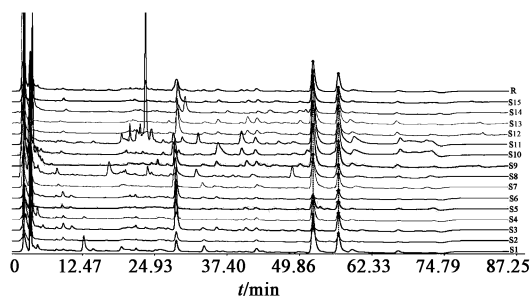


图1 附子生物转化指纹图谱

头原碱,故黑曲霉发酵附子新增物质很可能是乌头碱降解产生的,也可能是新乌头碱经过黑曲霉的生物转化产生的,或是其他成分在黑曲霉发酵过程中产生的,具体的转化机制还需要进一步试验研究来确定。

3 讨论

微生物生物转化结果表明,细菌类菌种在附子中生长情况较差,经其发酵后附子中3种乌头碱含量变化较大,霉菌类菌种在附子中生长情况较好,附子经生物转化后,有效成分含量普遍增加,产生新物质个数较多。最终发现黑曲霉发酵附子中乌头碱含量明显降低,且发酵过程中黑曲霉生长良好,新增成分较多。对新增物质进行HPLC-MS分析,结合相关文献对乌头类生物碱的裂解规律进行追踪,初步判定增加的新物质之一应该为苯甲酰乌头原碱。黑曲霉发酵后的附子乌头碱、新乌头碱都大量减少,毒性降低,但新生成的苯甲酰乌头原碱是毒性很小的单酯型生物碱,且是附子中重要药效成分,达到了减毒增效的目的。

目前在临床用药中附子一般都是以复方形式出现,合理配伍能抑制附子生物碱的溶出和增加机体对有害刺激的非特异性抵抗力等^[11-13],黑曲霉发酵附子可使附子以单味药出现,提高了附子的临床治疗效果及安全性。

HPLC-MS鉴定只是一种初级的鉴定方法,如需

进一步确定附子生物转化新增物质结构,应对生物转化附子样品中的新成分进行分离纯化,结合核磁共振的氢谱、碳谱等方法做进一步研究,本试验下一步将进行黑曲霉发酵附子的工艺优化,以确定新增的各物质具体结构,分析其降解机制。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:177.
- [2] 王永高,朱元龙,朱任宏.中药乌头的研究[J].药学报,1980,15(9):526.
- [3] 王昌利,杨景亮,雷建林,等.附子炮制机制及制品药效毒理研究[J].现代中医药,2009,29(1):53.
- [4] 王兴红,李旗德,曹秋娥.微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J].中草药,2001,32(3):267.
- [5] 庄毅.药用真菌新型(双向型)固态发酵工程[J].中国食用菌,2002,21(4):3.
- [6] 张普照,杨丽娟,侯志帆,等.雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):59.
- [7] 刘岚,范智超,张志琪.HPLC同时测定成药中4种乌头类生物碱含量[J].药物分析杂志,2010,30(2):236.
- [8] 贾金艳,彭小冰,杨卫平,等.附子中新乌头碱的含量测定[J].时珍国医国药,2010,21(5):1102.
- [9] 马芳,赵东,吴晓霞,等.LC-MS-MS法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):95.
- [10] 王海慧,金杰,孙国祥,等.中药指纹图谱专家系统知识库构架研究[J].黑龙江医药,2010,23(1):13.
- [11] 何伟,秦林,司淑媛.川乌与防己配伍前后乌头碱和粉防己碱煎出量的测定[J].中草药,2002,33(7):600.
- [12] 张宇,陈丽艳,杨义.四逆汤口服液中附子与甘草配伍前后有效成分变化[J].佳木斯医学院学报,1996,19(3):27.
- [13] 陈建萍,谭炳炎,吴伟康,等.四逆汤中附子甘草配伍规律研究[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(3):16.

[责任编辑 全燕]