

雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究

张普照, 杨丽娟, 侯志帆, 谢小梅*, 舒任庚*, 庄毅
(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究雷公藤双向固体发酵过程中化学成分的变化规律。方法: 采用紫外分光光度法测定雷公藤双向发酵过程中总二萜和总生物碱含量; 采用高效液相色谱法测定雷公藤双向发酵过程中雷公藤甲素和两个单体生物碱含量。结果: 在发酵 90 d 时, 雷公藤总二萜发酵下降了 46% 而总生物碱含量仅下降约 13%, 雷公藤甲素含量降低了 89.4% 而 wilforine 和 wilforine 含量降级幅度较小。结论: 双向发酵过程中真菌对雷公藤生物碱含量影响较小, 而对二萜类化合物含量影响较大。

[关键词] 双向固体发酵; 雷公藤; 生物碱; 二萜; 雷公藤甲素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 10-0059-04

Study on Changes of Chemical Constituents in *Tripterygium wilfordii* during Process of Fermenting

ZHANG Pu-zhao, YANG Li-juan, HOU Zhi-fan, XIE Xiao-mei*, SHU Ren-geng*, ZHUANG Yi
(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] The content of total diterpenoids and total alkaloids were determined by UV spectrophotometry and triptolide and two main alkaloids contents were assayed by HPLC in order to study on the changes of chemical constituents in *Tripterygium wilfordii* during the process of fermenting. The results showed that after materials being fermented for 90 days, the content of total diterpene and total alkaloids decreased by 46% and 13%, respectively, at the same time, triptolide content decreased by 89.4%, while the contents of wilforine and wilforine decreased by little. It were concluded that fungi have large influence on the content of total diterpene in *T. wilfordii* F and less influence on total alkaloid during bi-directional fermentation in this paper.

[Key words] Bi-directional fermentation; *Tripterygium wilfordii*; alkaloid; diterpene; triptolide

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* HooK. 为卫茅科植物, 别名黄藤木、断肠草等。性味苦, 有大毒, 常以去

两层皮的根木质部入药, 具有免疫抑制、抗肿瘤、抗生育等多种药理活性。目前雷公藤及其制剂在临床上已应用于治疗类风湿性关节炎、成人各种肾炎、系统性红斑狼疮等多种自身免疫性疾病, 是首选的中药免疫抑制剂, 但其临床应用毒副作用大的问题一直未得到解决。国内外学者从多个方面探索了降低雷公藤的毒副作用的方法, 但均不能从根本上解决雷公藤的毒性问题^[1]。

本课题组在前期的研究中, 采用“药用真菌新型固体发酵工程”(简称双向发酵) 用药用真菌对雷公藤进行整体固体发酵, 探索雷公藤的减毒持效(毒性降低但仍然保持免疫抑制作用), 已筛选出了有效发酵药用真菌菌种; 建立了最佳发酵菌种工艺, 得到

[收稿日期] 20100328(004)

[基金项目] 国家科技部国际合作项目(2006DFA33060); 江西省卫生厅中医药科研基金项目(2007A023); 江西省教育厅项目(GJJ08334)

[第一作者] 张普照, 硕士, 讲师, 从事天然药物化学研究, Tel: 0791-7118657, E-mail: zhpuzh@163.com

[通讯作者] * 谢小梅, 博士, 教授, 从事中药双向固体发酵研究, Tel: 0791-7118707, E-mail: 1990xxm@sohu.com
* 舒任庚, 博士, 教授, 从事天然药物化学研究, Tel: 0791-7118657, E-mail: shurg@163.com

了毒性降低并且仍然保持免疫抑制效果的灵雷菌质(G_{30})。测定了 G_{30} 急性毒性并观察了对抗炎、免疫器官及细胞免疫的影响,并进一步研究了 G_{30} 对佐剂性类风湿关节炎及阿霉素诱导的大鼠肾炎的作用,结果已有文章发表^[2-4]。本文进一步采用多种检测手段从不同角度研究雷公藤双向发酵过程中化学成分的变化规律,旨在探讨双向发酵雷公藤的解毒持效机制,同时为确定灵雷菌质中主要药效/毒性物质基础及灵雷菌质新药材的质量控制提供实验依据。

1 材料

BS124S 电子天平(Sartorius);UV-2102 紫外-可见分光光度计(Unico);Agilent 1100 液相色谱仪。中性氧化铝(100~200目);甲醇,乙酸乙酯均为分析纯;分析用 Merk 甲醇和乙腈为色谱醇;生物碱 wilforgine 和 wilforine 对照品为本实验室自制;雷公藤甲素(111567-200502)购自中国药品生物制品鉴定所。

6 年生雷公藤生药材采自福建泰宁 GAP 种植基地,切片,60℃烘干粉碎。雷公藤生药材经高温灭菌 2 h 后得灭菌药材;灭菌药材经药用真菌分别发酵 0, 10, 20, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 90 d 后 60℃烘干得不同发酵时间的发酵药材 G_0 , G_{10} , G_{20} , G_{25} , G_{30} , G_{50} , G_{60} , G_{70} , G_{80} , G_{90} 。

2 双向固体发酵过程中总有效成分含量测定

2.1 雷公藤总二萜含量测定^[5] 标准曲线制作 配制质量浓度梯度为 0.00, 9.86, 19.72, 29.58, 39.44, 49.30, 59.16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷公藤甲素标准液,精密吸取 7 mL 置于具塞试管,分别加入 2.5% 3,5-二硝基苯甲酸 1.5 mL 和 10% KOH 1.5 mL,放置 10 min 后测定吸光度(A),绘制标准曲线。

2.2 供试液制备及测定 精密称取药材 0.5 g, 95% 乙醇超声提取 3 次,每次乙醇用量为 40 mL,时间为 20 min,合并 3 次提取液,减压回收乙醇得浸膏,加蒸馏水 50 mL 溶解后,用乙酸乙酯萃取 3 次,每次 30 mL,合并 3 次萃取液减压回收得雷公藤粗总二萜。甲醇溶解雷公藤粗总二萜并定容至 50 mL,精确吸取样品制备液 7 mL 置于具塞试管,分别加入 2.5% 3,5-二硝基苯甲酸 1.5 mL 和 10% KOH 1.5 mL,摇匀,静置 10 min,以样品制备液为对照,测定 A。

2.3 雷公藤总生物碱含量测定^[6] 标准曲线制作 配制质量浓度梯度为 0.571 0, 0.342 6, 0.228 4,

0.114 2, 0.091 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 雷公藤吉碱标准液,以甲醇为空白,在 268 nm 测定各 A,标准曲线 $Y = 0.239 1X - 0.040 6$, $r = 0.997 2$,线性范围 0.091 4~0.571 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 供试液制备及测定 精密称取药材 0.25 g,置磨口三角瓶中,加乙酸乙酯超声提取 3 次,每次提取时间 20 min,乙酸乙酯用量为 25 mL,合并 3 次上清液,减压浓缩,过中性氧化铝柱(3.5 g 氧化铝,15 mL 乙酸乙酯洗脱),减压回收乙酸乙酯,用甲醇溶解并定容至 5 mL,摇匀,在 268 nm 测定各 A。

3 双向固体发酵过程中雷公藤中代表性单体化合物含量测定

3.1 雷公甲素含量测定^[7] 色谱条件 色谱柱 Diamon sil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);流动相 30% 乙腈;流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 218 nm;柱温 40℃;进样量 10 μL 。

3.2 标准曲线制作 精密称取雷公藤甲素标准品 5 mg,配制成 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,然后依次稀释配制成 5, 10, 15, 20, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;每个浓度平行进样 3 次,每次 10 μL ,线性方程为 $Y = 29.412 0X + 8.176 9$, $r = 0.997 5$ 。

3.3 供试液制备及测定 精密称取药材 5 g 置于预先叠好的滤纸桶,再将装有药材的滤纸桶放入索氏提取器中,先用 100 mL 乙酸乙酯提取,提取物过中性氧化铝柱,氧化铝用量为 6 g,100 mL 甲醇洗脱后减压浓缩至干,无水乙醇溶解定容至 5 mL。每个样品重复 3 次,按标准曲线制备项方法测定。

3.4 两种单体生物碱含量测定 色谱条件 Diamon sil C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相乙腈-水线性梯度洗脱(0~30 min,乙腈 45%~55%),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 268 nm;柱温 25℃;进样量 20 μL 。

3.5 标准曲线制作 精确称取 wilforine 0.85 mg,配制成 0.17 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液,然后依次稀释配制成 170, 85, 38.25, 12.75 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;每个浓度平行进样 3 次,每次 10 μL ,线性方程为 $Y = 0.003 7X + 0.002 3$, $r = 0.999 8$;精密称取 wilforgine 1.94 mg,配制成 0.388 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液,然后依次稀释配制成 194, 93.12, 62.08, 31.04 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;每个质量浓度平行进样 3 次,每次 10 μL ,线性方程为 $Y = 0.004 3X + 0.001 3$, $r = 0.999 5$ 。

3.6 供试液制备 精密称取雷公藤生药、灭菌生药

和不同发酵时间的药材各 1 g, 置磨口三角瓶中超声提取 3 次, 每次加甲醇 7 mL, 超声时间为 60 min, 静置, 合并 3 次上层澄清提取液定容 25 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按标准曲线制备项方法测定。

4 结果与分析

4.1 双向固体发酵过程中总有效成分含量变化规律 雷公藤二萜类化合物具有五元内酯环结构, 紫外分光光度计测定方法正是利用这一结构特点和显色剂反应, 测定 A; 雷公藤生物碱类成分结构相近, 具有共同的紫外吸收特征, 在 225 nm 及 268 nm 两个波长处均有较高吸收, 而雷公藤甲素在 219 nm 附近有最大吸收, 为了排除干扰, 测定灵雷菌质总生物碱含量合适检测波长为 268 nm; 其次在计算包括后述的所有含量时均换算为未发酵药材含量。

总二萜和总生物碱含量变化趋势见图 1~2, 可知发酵对雷公藤总二萜含量影响比较大, 随发酵时间延长持续下降, 且下降幅度较大, 到发酵 90 d 时下降了 46%; 而发酵对总生物碱含量变化影响较小, 到发酵 90 d 时仅下降约 13%。

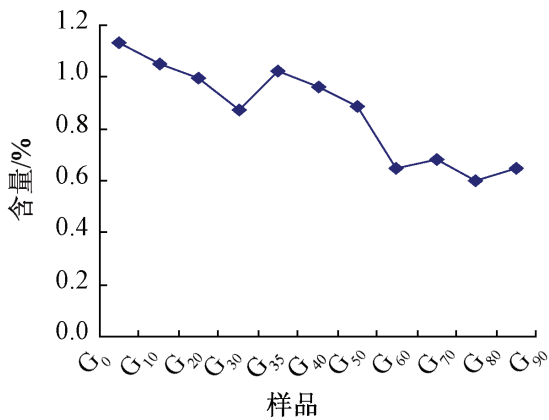


图 1 总二萜含量变化趋势

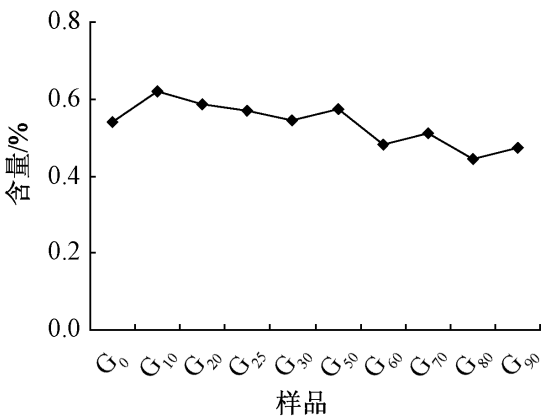


图 2 总生物碱含量变化趋势

4.2 双向固体发酵过程中代表性单体化合物含量变化规律

4.2.1 发酵过程中雷公甲素含量变化规律 雷公藤甲素是免疫抑制活性和毒性最强的成分, 一直以来雷公藤甲素含量作为评价药材质量的重要标志之一。采用高效液相色谱法测定在发酵过程中雷公藤甲素含量的变化规律, 试图解释毒性降低原因。含

量趋势见图 3, 可知雷公藤经发酵后雷公藤甲素总体上呈下降趋势, 当然高温灭菌也可降低雷公藤甲素含量, 但仅降低了 28.9%, 而发酵降低雷公藤甲素为 89.4%, 特别是在发酵 15 d 时雷公藤甲素含量下降幅度较大, 为 73.0%, 从发酵 20 d 到发酵 50 d 时甲素含量下降幅度小, 发酵 50 d 后甲素含量变化不大。

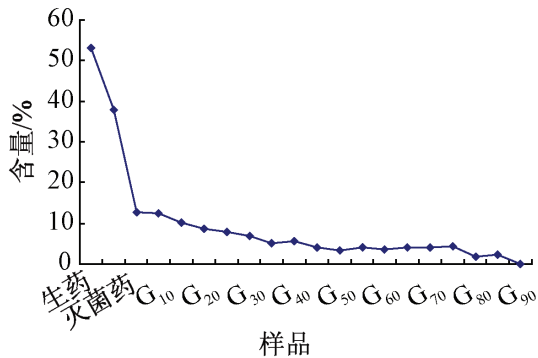


图 3 雷公藤甲素含量变化趋势

4.2.2 发酵过程中雷公藤次碱和雷公藤精碱含量变化规律 雷公藤生物碱的活性和毒性仅次于雷公藤甲素, 具有免疫抑制、抗肿瘤、抗雄性生育等作用, 洪冬起、黄文华等人已将总生物碱含量作为雷公藤生药及其制剂的质量控制指标。本实验采用高效液相色谱法同时测定雷公藤次碱和雷公藤精碱含量, 变化趋势如图 4~5。雷公藤生药中雷公藤次碱的含量较高, 经高压灭菌后的生药中雷公藤次碱的含量下降幅度大, 从发酵 0 d 开始, 随着发酵时间的延长, 雷公藤次碱的含量下降缓慢且幅度小; 而雷公藤生药中雷公藤精碱的含量很低, 经高压灭菌后的生药中雷公藤精碱的含量上升幅度大, 从发酵 0 d 开始, 随着发酵时间的延长, 灵雷菌质中 wilforfine 的含量上升缓慢且幅度小。

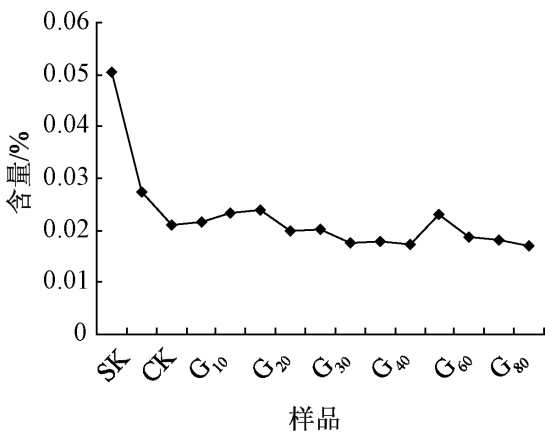


图 4 雷公藤次碱含量变化趋势

5 讨论

笔者应用双向性固体发酵技术处理雷公藤后得到的灵雷菌质, 是在人工严密控制下以药材为固体发酵的药性基质, 药用真菌为发酵菌种, 共同构成发酵组合, 在特定条件下进行发酵, 真菌的酶催化药材

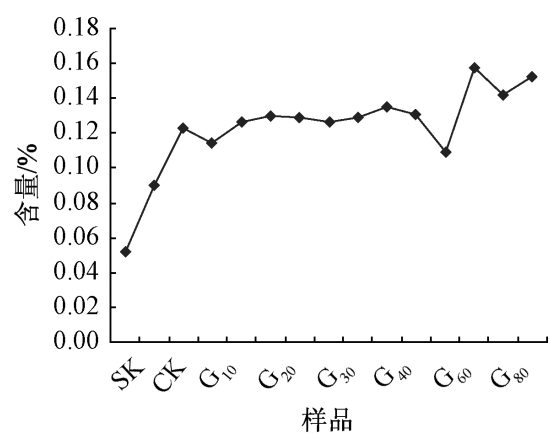


图 5 雷公藤精碱含量变化趋势

中的化学成分发生反应,在某一时间点产生具有最佳功效的发酵药材称做菌质。

本文系统地研究了雷公藤双向发酵过程中的化学成分变化规律,其中总有效成分含量测定结果表明双向发酵技术对雷公藤总生物碱含量影响较小,而对总二萜类化合物含量影响较大;雷公藤中代表性单体化合物含量测定结果表明在发酵过程中雷公藤甲素含量持续下降,特别在发酵 0~15 d 雷公藤甲素含量下降幅度较大,而两个单体生物碱含量测定表明高温灭菌对其含量影响较大,而发酵对其含量影响较小。

文献[9-12]报道,雷公藤中二萜类化合物免疫抑制活性和毒性强于生物碱类的,其中雷公藤甲素免疫抑制活性和毒性最强,但是二萜类化合物的免疫抑制活性和毒性剂量接近,生物碱类的免疫抑制活性和毒性剂量相差较大,治疗窗口大。上述实验结果可知:在发酵过程中总二萜类化合物含量大幅度降低,而生物碱含量降低较慢,证明真菌中的酶只对二萜类化合物起作用而对生物碱不起作用,转化了大毒性成分,保留了活性较好且毒性低的生物碱,扩大了雷公藤的治疗窗口,所以双向发酵技术处理雷公藤后得到的菌质的毒性比雷公藤原药材低,同时又保持了雷公藤免疫抑制活性。

[参考文献]

[1] 李波,周昕欣,梁茂新,等.雷公藤配伍减毒增效研究与展望[J].中国中西医结合杂志,2006,26(11): 1045.

[2] 周雪娥,刘敏亮,谢小梅.灵雷菌质抗炎镇痛作用的研究[J].时珍国医国药,2009,20(7): 1595.

[3] 熊浩仲,谢小梅,苏明声,等.灵雷菌质提取物体内抗肿瘤作用的实验研究[J].中国食用菌,2009,28(1): 45.

[4] 王卫倩,戴丹丹,罗阎丹,等.灵雷菌质的急性毒性实验研究[J].中国食用菌,2008,27(3): 36.

[5] 胡晓雪,卢平,陈洪燕.雷公藤根醋酸乙酯提取物总二萜含量测定[J].时珍国医国药,1999,10(3): 117.

[6] 黄文华,张蕊,郭宝林,等.雷公藤药材总生物碱含量及影响因素的研究[J].中国中药杂志,2008,33(1): 15.

[7] 蔡皓,池玉梅,姜海英,等.雷公藤药材存贮期间成分变化的研究[J].南京中医药大学学报,2006,22(4): 265.

[8] 庄毅,谢小梅.菌新型(双向性)固体发酵工程对雷公藤解毒持效的初步研究[J].中国中药杂志,2009,34(16): 2083.

[9] 虞海燕,秦万章.雷公藤活性单体的筛选及毒性研究[J].浙江中医学院学报,2000,24(2): 70.

[10] 郑幼兰,徐娅,陈文雄.雷公藤“硷 C”的免疫功能及其毒性观察[J].福建医药杂志,1985,3: 27.

[11] 李玲,张益鹄,黄光照.雷公藤主要植物化学成分对大鼠生殖器官的影响[J].华中科技大学学报:医学版,1988,1: 49.

[12] 李玲,张益鹄,刘良,等.雷公藤主要植物化学成分中毒的实验病理学研究[J].华中科技大学学报:医学版,1988,2: 114.

[责任编辑 邹晓翠]