

生物与化学转化黄芩苷为黄芩素的研究

刘 超¹, 江慧玲², 王鸿飞², 巴塔拿¹, 奥斯曼·科拉³, 罗海波¹, 陈育如¹

(1.南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023)

(2.南京师范大学江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023)

(3.阿达纳阿尔帕斯兰科技大学工程学院, 土耳其 阿达纳 01180)

[摘要] 研究了对黄芩根和黄芩茎叶成份的分析和转化, 用生物与化学转化方法将黄芩苷转化为黄芩素. 研究发现, 生物转化中黑曲霉效果最佳, 黄芩苷转化率为 89.5%, 黄芩素得率为 85.8%. 化学酸水解法得到黄芩苷转化率为 98.3%, 黄芩素得率为 51.6%, 比传统的直接酸水解法转化率提高了 6.2%, 简化了酸水解过程, 实验重现性更好. 虽然化学转化的转化率略高于生物转化, 但生物转化的得率远高于化学转化, 且成本更低, 过程中无需强酸, 对于环境更为友好, 绿色安全.

[关键词] 黄芩, 黄芩素, 黄芩苷, 生物转化, 化学转化

[中图分类号] TS201.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2021)04-0056-05

Study on Biological and Chemical Transformation of Baicalin into Baicalein

Liu Chao¹, Jiang Huiling², Wang Hongfei², Mohamed Hawali Bata Gouda¹,
Osman Kola³, Luo Haibo¹, Chen Yuru¹

(1.School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2.Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Engineering and Technology Research Center for Industrialization of Microbial Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(3.Faculty of Engineering, Adana Alparslan Türkeş Science and Technology University, Adana 01180, Turkey)

Abstract: *Scutellaria baicalensis*, a valuable herb with plentiful flavonoid, root is mainly used as medicine in traditional Chinese medicine. In this paper, the analysis and transformation of components of *Scutellaria baicalensis*' roots and stems and leaves are studied. The biological and chemical methods are selected to convert baicalin into baicalein. The results show that *Aspergillus Niger* has the best biotransformation effect with 89.5% of baicalin conversion rate, while the yield of baicalein is 85.8%. Meanwhile, the conversion rate of baicalin and baicalein are 98.3% and 51.6% by chemical acid hydrolysis, respectively. In addition, the conversion rate of the acid hydrolysis method and the traditional direct acid hydrolysis method is increased by 6.2%, and the whole process of acid hydrolysis is simplified, which makes it easier to control and the experiment reproducibility is better. These results indicate that although the conversion rate of chemical transformation is slightly higher than that of biotransformation, the yield of biotransformation is much higher than that of chemical transformation, and the cost is lower; no strong acid is needed in the process, which is friendlier to the environment and green and safe. The results of this investigation also provide technical basis for the industrial production of baicalein.

Key words: *Scutellaria baicalensis*, baicalein, baicalin, biotransformation, chemical transformation

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)属唇形科黄芩属植物, 别称苦芩、山茶根、条芩等, 适宜生长在海拔 500~1 500 m 的向阳且较干燥的地区^[1-2], 分布较广, 在我国北方多数省区如黑龙江、辽宁、内蒙古、河南、河北等地及日本、朝鲜、俄罗斯等地^[3-4]均可种植. 黄芩是中国和东亚国家常用的一种重要的传统药材, 通过传统医学的“清热”机制治疗呼吸道和胃肠道的细菌感染^[5]. 黄芩茎叶可药用也可做茶饮^[6]. 近年来, 除地下部分根外, 其地上部分的研究受到广泛关注^[7]. 植化和药理学研究发现, 黄芩根及茎叶中主要成分为黄酮类化合物^[8], 具有抗氧化、抗炎、抑制肿瘤等作用^[9-11]. 黄芩根成分的研究主要集中于黄酮类、苷类、萜类、有机酸、微量元素等方面^[12-14], 已分离出 70 多种黄酮类化合物, 包含黄酮、黄酮醇、二氢黄酮及其苷

收稿日期: 2021-06-09.

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(20)3176)、江苏省政策引导类计划项目(BX2019014).

通讯作者: 陈育如, 博士, 教授, 研究方向: 植物天然产物与药物. E-mail: chenyruru@njnu.edu.cn

类成分、1个双黄酮、1个查尔酮类成分,同时还分离得到10多种木脂素及其苷类成分,以及汉黄芩素、白杨素、芹菜素等^[15-18]。

传统的黄芩素制备有酸水解法、热裂解法及化学合成法。酸水解法过程需要消耗大量的酸,环境污染大。热裂解方法所需温度高,能耗大且产率较低。本工作对生物转化和改良酸水解转化黄芩苷为黄芩素进行了探讨,以期低成本、高效率地制备黄芩素。

1 材料、设备与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种与培养基

黑曲霉(*Aspergillus niger*)、根霉(*Rhizopus chinensis*)、嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)、木霉(*Trichoderma viride*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等均由本课题组分离保藏。

斜面保藏培养基:200 g 土豆、20 g 葡萄糖、1.5%~2%琼脂、1 000 mL 水。

固体发酵培养基:3 g 甘蔗渣、4 g 豆渣、7 g 麸皮、15 mL 营养液(硫酸镁 0.08%、硫酸铵 2.0%、磷酸二氢钾 0.04%,pH6.5)。

1.1.2 材料与试剂

黄芩根,市购;黄芩根提取物,山东天华制药,含量 92.6%;土豆,市购。

黄芩苷标准品、黄芩素标准品,上海源叶生物科技有限公司,HPLC \geq 98%;无水磷酸氢二钠,天津市科密欧化学试剂有限公司,AR;柠檬酸、无水磷酸二氢钾,国药集团化学试剂有限公司,AR;浓硫酸、无水硫酸镁、硫酸铵,西陇化工股份有限公司,AR。

1.2 仪器与设备

CJ-1D 垂直超净工作台,天津市泰斯特仪器有限公司;高压蒸汽灭菌锅,日本 TOMY 公司;Agilent1100 组合式高效液相色谱仪、Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS 液质联用仪,美国安捷伦公司;数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SHB III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;DK-8D 电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 黄芩根成分分析

1.3.1.1 黄芩根提取液制备

准确称取黄芩根粉末 1 g,按 1:20 料液比加入 20 mL 体积浓度 70%乙醇,经超声辅助浸提 1 h 后,0.22 μ m 微孔滤膜精密过滤,置于-4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,供 HPLC 分析。

1.3.1.2 高效液相色谱条件

色谱柱:UltimateAQ-C18;检测器:VWD(DEAAD02884) detector;检测波长:335 nm;进样量:20 μ L;流动相:0.1%甲酸水-乙腈(A-B);流速:0.6 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C,等梯度洗脱。

1.3.1.3 质谱条件

电喷雾电离(ESI)接口;负离子模式检测;加热毛细管温度 300 $^{\circ}$ C;扫描范围 m/z 100~1 000;吹扫气压力 2.41×10^5 Pa;雾化气压 3.5 kV;一级质谱碰撞能量为 135 V,二级质谱碰撞能量为 10、20、30、40 eV。

1.3.2 转化菌株的筛选

1.3.2.1 菌株培养

孢子悬液的制备:在黑曲霉、木霉、根霉、嗜松青霉和米曲霉斜面菌种中分别加入 5 mL 无菌水,用接种环将孢子刮入水中制得孢子菌悬液。

固体培养基培养:在固体培养基中分别接入上述孢子菌悬液,搅匀,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 5 d。

1.3.2.2 酶液制备

将发酵好的物料按曲:水=1:4(质量比)的比例加入 pH 5.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠、0.1 mol/L 柠檬酸),在 45 $^{\circ}$ C 的水浴中浸提 40 min,抽滤后即得酶液。

1.3.3 标准溶液的配制

黄芩苷标准品:精密称取黄芩苷标准品 25 mg,溶解于 100 mL 70%乙醇溶剂中,精确配制成浓度为

0.25 mg/mL 的黄芩苷标准品溶液. 用 70%乙醇溶液稀释成以下浓度:0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL,以黄芩苷浓度(mg/mL)为横坐标,峰面(mAU * s)为纵坐标,绘制标准曲线.

黄芩素标准品:精密称取黄芩素标准品 10 mg,溶解于 100 mL 的 70%乙醇溶剂中,精确配制成浓度为 0.1 mg/mL 的黄芩素标准品溶液. 用 70%乙醇溶液稀释成以下浓度:0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL,以黄芩素浓度(mg/mL)为横坐标,峰面积(mAU * s)为纵坐标,绘制标准曲线.

1.4 转化产物分析

黄芩苷转化率的计算:

$$y_{\text{Conversion}}(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%,$$

式中, C_0 为黄芩苷的初始浓度,由黄芩苷的标准曲线按照一定系数比计算得到; C_1 为转化后黄芩苷的浓度,由黄芩苷的标准曲线得到.

黄芩素得率的计算:

$$y_{\text{Yield}}(\%) = (C_2 - C_3) / C_4 \times 100\%,$$

式中, C_2 为转化后黄芩素的浓度,由黄芩素的标准曲线计算得到; C_3 为转化前黄芩素的浓度,由黄芩素的标准曲线得到; C_4 为转化后黄芩素的理论浓度^[19].

2 结果与讨论

2.1 黄芩根黄酮类化合物的鉴定

黄芩根提取液经 HPLC 分析,有 4 个较明显的峰(见图 1a),经与标准品进行对比和 LC-MS 分析,得到其中 13.4 min 出现的峰对应的是黄芩苷,18.4 min 出现的峰对应的是黄芩素.

图 1a 为黄芩根按照 1.3.1 的方法经超声辅助提取 1 h 后提取液的 HPLC 分析图. 在 1.3.1.2 的检测条件下,黄芩根提取液中有 4 种醇溶性物质被检出,出峰时间分别为 13.3、14.4、14.9 和 18.3 min. 与标准对照品对照(图 1b 和 c),图中最高峰为黄芩苷(13.3 min),含量为 5.13%;18.4 min 的峰是黄芩素,含量为 0.40%.

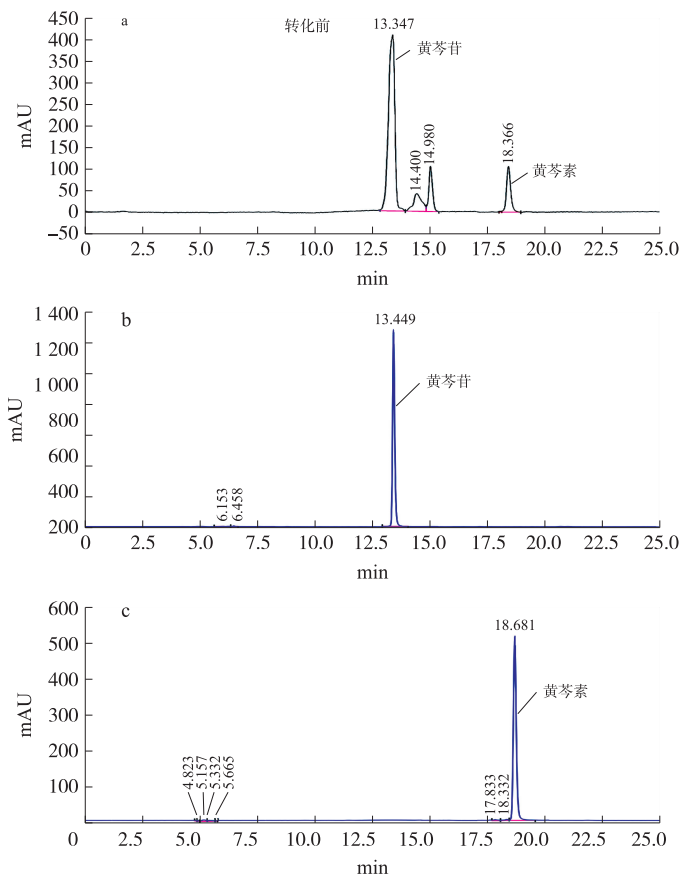


图 1 黄芩根提取液和标准品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of *Scutellaria* root extract and standards

2.2 黄芩根提取物化学酸水解

配置浓度分别为 60%、70%、80%、90%、98% 的硫酸,于 40 ℃ 分别水解黄芩根提取物 15 min,考察硫酸浓度对水解效果的影响,结果如图 2 所示。

选择 98% 浓硫酸,分别于 0、20、40、60、80、100 ℃ 分别水解黄芩根提取物 15 min,考察温度对化学酸水解黄芩苷的影响,结果如图 3 所示。

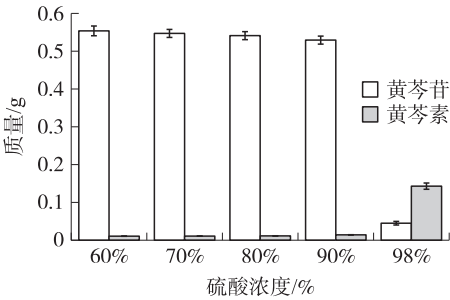


图 2 硫酸浓度对黄芩素生成量的影响

Fig. 2 The effect of sulfuric acid concentration on the concentration of baicalein

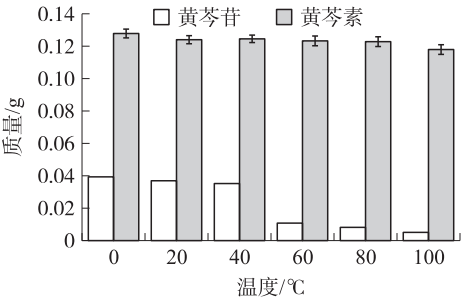


图 3 反应温度对黄芩素生成量的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the concentration of baicalein

从图 2 可见,98% 的硫酸水解时,黄芩苷的减少量和黄芩素的增加量最多,与其他浓度条件下有明显差异,说明 98% 的强酸对黄芩苷的快速水解最为有利。

从图 3 可见,起始温度为 0 ℃ 时,转化率为 95.1%,产物得率为 51.5%;起始温度为 100 ℃ 时,转化率为 98.8%,产物得率为 38.6%。可见,温度过高导致原料分解,使产物得率低,故起始温度较低较为合适。考虑到 0 ℃ 与 40 ℃ 的转化率与得率无明显差异,从工业生产的经济成本考虑,40 ℃ 或常温更为经济。

40 ℃ 98% 硫酸水解反应 15 min 转化黄芩根提取物 2 g,得到黄芩苷转化率为 98.3%,产物黄芩素得率为 51.6%,与传统的化学水解方法相比得率提高了 6.2%。

2.3 黄芩苷的微生物酶法转化

2.3.1 微生物转化的菌种筛选

选取实验室保存的 5 株真菌转化黄芩苷,发酵培养 5 d,浸提酶液的 pH 调至 5.0,按质量浓度比为 1:5(g/mL) 的比例浸提酶液,所得酶液 10 mL 加入黄芩根提取物 2 g,于 55 ℃ 恒温水浴中反应,0.5 h 后测定原料及产物浓度,结果如表 1 所示。

由表 1 可见,转化黄芩根提取液 0.5 h 后,5 种菌株均能将黄芩苷转化为黄芩素。空白样中黄芩素的浓度为 0.01 mg/mL。经米曲霉酶液转化后,黄芩素浓度为 0.11 mg/mL,是转化前原样中黄芩素原始浓度的 11 倍;木霉转化后黄芩素浓度为 0.05 mg/mL,为原始浓度的 5 倍;根霉转化后黄芩素浓度为 0.04 mg/mL,为原始浓度的 4 倍;嗜松青霉基本无转化效果。经黑曲霉酶液转化 0.5 h 后,黄芩苷浓度降为 0.29 mg/mL,为原始浓度的 58%;黄芩素浓度从 0.01 mg/mL 提高至 0.15 mg/mL,为原始浓度的 15 倍。可见,5 种菌株中以黑曲霉转化黄芩根提取液中黄芩苷的转化率最高,故后续选择黑曲霉为转化菌株。

2.3.2 黑曲霉酶液转化结果

黑曲霉所提酶液在适宜条件下,转化 2 g 黄芩根提取物 8 h,共转化黄芩苷 1.7 g,得到产物黄芩素 0.7 g;转化 10 h,共转化黄芩苷 1.79 g,得到产物黄芩素 0.93 g。与马宗敏等^[20] 将 18.58 mg 黄芩苷转化为 9.43 mg 黄芩素、转化率为 83.8% 相比,本工作将 1.79 g 黄芩苷转化为 0.93 g 黄芩素,转化率为 89.5%。

2.4 不同转化方法的效果比较

化学水解和生物转化黄芩素的对比结果如表 2 所示。

表 1 不同菌株转化黄芩根提取液 0.5 h 后原料及产物浓度
Table 1 Concentration of raw materials and products after transformation of *Radix Scutellariae* extract

by different strains for 0.5 h mg/mL		
样品	原料黄芩苷浓度	产物黄芩素浓度
空白对照样	0.50	0.01
木霉转化样	0.42	0.05
米曲霉转化样	0.37	0.11
根霉转化样	0.45	0.04
嗜松青霉转化样	0.49	0.01
黑曲霉转化样	0.29	0.15

由表 2 可见,利用优化后的化学水解法对 1.97 g 黄芩苷进行转化,得到 0.61 g 黄芩素,转化率为 98.3%,得率为 51.6%,比许闽等^[21]报道的转化率提高了 6.2%;利用本实验室筛出的黑曲霉所提酶液对 1.79 g 黄芩苷进行转化,得到 0.93 g 黄芩素,转化率为 89.5%,得率为 85.8%,与郭艳霞等^[19]用纤维素酶和果胶酶混合将黄芩苷转化为黄芩素,转化率为 62.1%进行对比,本工作的转化率高出 27.4%,得率更高。

3 结论

本文采用生物转化法和化学水解法将黄芩苷转化为黄芩素。化学水解法能够高效转化原料黄芩苷,转化率达到 98.3%,但产物得率仅为 51.6%,且易造成环境污染。生物转化法的转化率与得率分别达到 89.5%与 85.8%,在保证转化率和得率的情况下,生物转化法克服了强酸的缺点,是更为高效且绿色环保的方法。

[参考文献](References)

- [1] 包倩倩,陈西,张森,等. 黄芩提取物制备工艺的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2021,37(7):174-176.
- [2] ZHANG L L,CAO B,BAI C K,et al. Predicting suitable cultivation regions of medicinal plants with Maxent modeling and fuzzy logics:a case study of *Scutellaria baicalensis* in China[J]. Environmental Earth Sciences,2016,75(5):361.
- [3] 谷婧,黄玮,张文生. 黄芩野生与栽培资源分布调查研究[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(12):42-45.
- [4] LIANG J,GUO Q J,CHANG T Y,et al. Reliable origin identification of *Scutellaria baicalensis* based on terahertz time-domain spectroscopy and pattern recognition[J]. Optik-International Journal for Light and Electron Optics,2018,174:7-14.
- [5] YU H S,HAN Y T,LIU C Y,et al. Preparation of baicalein from baicalin using a baicalin- β -D-glucuronidase from *Aspergillus niger* b.48 strain[J]. Process Biochemistry,2020,97:168-175.
- [6] 余伊榄,谢国勇,秦民坚. 黄芩叶茶生产过程中杀青工艺探究[J]. 中国野生植物资源,2019,38(2):16-21,28.
- [7] LIU X Y,YE Y Y,LIU Q Q,et al. Pharmacological activity and application of roots, stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Medicinal Plant,2019,10(6):4-5.
- [8] 朱琳,孙红,陈素娥,等. 反相 HPLC 法同时测定黄芩标准汤剂中黄芩苷、汉黄芩苷和黄芩素的含量[J]. 中医药导报,2021,27(7):65-68.
- [9] 方誉民,崔孟颖,柳洁,等. 黄芩属植物黄酮生物合成研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,45(20):4819-4826.
- [10] LIAO H F,YE J,GAO L L,et al. The main bioactive compounds of *Scutellaria baicalensis* Georgi. for alleviation of inflammatory cytokines:a comprehensive review[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2021,133(3):110917.
- [11] PARK J R,LEE M C,MOON S C,et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi induces caspase-dependent apoptosis via mitogen activated protein kinase activation and the generation of reactive oxygen species signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells[J]. Molecular Medicine Reports,2017,16(2):2302-2308.
- [12] 单慧,杜胤骁,白鹤群,等. 黄芩素的研发进展及其临床药理学[J]. 中国临床药理学与治疗学,2020,25(6):701-708.
- [13] ZHAO T T,TANG H L,XIE L,et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology,2019,71(9):1353-1369.
- [14] LONG H,ZHANG H J,DENG A J,et al. Three new lignan glucosides from the roots of *Scutellaria baicalensis* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2016,6(3):229-233.
- [15] WANG B M,HUANG T,FANG Q F,et al. Bone-protective and anti-tumor effect of baicalin in osteotropic breast cancer via induction of apoptosis[J]. Breast Cancer Research and Treatment,2020,184(3):711-721.
- [16] WANG L Q,CAI C Y,LIU J J,et al. Selective separation of the homologues of baicalin and baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgi using a recyclable ionic liquid-based liquid-liquid extraction system[J]. Process Biochemistry,2021,103:1-8.
- [17] MA X D,ZHANG X G,GUO S J,et al. Application of enzyme-assisted extraction of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology,2020,51(3):241-251.
- [18] OOMEN W W,BEGINES P,MUSTAFA N R,et al. Natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids of *Scutellaria baicalensis* as a replacement for conventional organic solvents[J]. Molecules,2020,25(3):617.
- [19] 郭艳霞,袁莹,王文科. 黄芩的中性甲醇提取物及酶转化的研究[J]. 山西师范大学学报(自然科学版),2018,32(4):57-65.
- [20] 马宗敏,苗文丽,段绪红,等. 一株发酵转化黄芩苷菌株的筛选及鉴定[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(2):230-235.
- [21] 许闽,肖功胜,杨云. 黄芩素制备工艺研究[J]. 中国实用医药,2008,3(12):3-4.

[责任编辑:严海琳]