

果胶酶水解法对栀子提取液中环烯醚萜类成分的影响

孟硕,张鹏,刘建勋*

(中国中医科学院西苑医院实验研究中心,北京 100091)

[摘要] 目的:研究不同条件下栀子水提液特性黏度在果胶酶处理后的变化。方法:利用乌氏黏度计测量栀子水提液在不同密度、果胶酶用量、温度、时间等条件处理后特性黏度的变化,同时测定了去乙酰基车叶草苷酸甲酯、京尼平-β-D-龙胆双糖苷、栀子苷 3 个成分的变化。结果与结论:溶液相对密度、加酶量能显著影响栀子水提液酶处理的特性黏度,同时果胶酶也能影响京尼平-β-D-龙胆双糖苷与栀子苷的含量。

[关键词] 果胶酶;栀子;特性黏度

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0010-03

Intrinsic Viscosity Difference of Gardenia Abstract Treated with Pectinase

MENG Shuo,ZHANG Peng,LIU Jian-xun*

(Center for Research,Xiyuan Hospital,China Academy of China Medical Sciences,Beijing 100091,China)

[Abstract] Objective:This paper describes the intrinsic viscosity difference of Gardenia extract treated with pectinase. Method: The intrinsic viscosity analysis was carried out on an Ubbelohde viscometer to determine the change after treated with different relatively density, amount of pectinase, time, temperature, etc. And the changes of geniposide, genipin-1-β-D-gentiobioside and deacetyl-asperulosidic acid methyl ester were also detremined respectively. Conclusion:Pectinase brought about the change of content of geniposide, genipin-1-β-D-gentiobioside and deacetyl-asperulosidic acid methyl ester, the maximum change rate of them was genipin-1-β-D-gentiobioside.

[Key words] pectinase; Gardenia jasminoides ellis; intrinsic viscosity

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,性苦寒,无毒,入心、肝、肺、胃经。栀子具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒等作用,在中医临床中治疗高血压病、扭挫伤、糖尿病、高热黄疸等症。栀子果实主要含有黄酮类、环烯醚萜类、环烯醚酮类、有机酸酯类等化合物,还含有果胶、多糖、挥发油等成分。其中为国内外所公认的中药栀子有效成分为环烯醚萜类物质。栀子所含的环烯醚萜类物质包括栀子苷、羟异栀子苷、栀子苷酸等,其中活性成分最高的是栀子苷。栀子苷又是生产栀

子蓝、栀子红、栀子紫的中间体和生产药品有效单体。因此,对栀子苷的分离、纯化、结晶和含量测定成为对栀子深度开发的关键技术。目前,较为成熟的方法是采用大孔树脂吸附解吸的技术。然而栀子水提液黏度特别大,过滤相当困难,大大降低了树脂的使用效率和寿命,而使用醇提又大大增加了成本,严重制约了栀子的产业化发展。本方法研究了在栀子水提液中加入果胶酶,通过正交分析确定了合适的温度、时间、加酶量,大大降低了栀子提取液的黏度,为栀子的工业化研究提供了一个好的方法。

1 材料

安捷伦 1200 高效液相色谱仪 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm);AE240 电子天平(瑞士 METTLER);乌氏黏度计;Delta 320 pH 计(METTER TOLEDO)

栀子购自安国市神农中药饮片有限公司,经内蒙古

[收稿日期] 20101022(004)
[基金项目] 国家自然科学基金(30772755,30830118);“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-317)
[第一作者] 孟硕,本科,研究方向:中药学,Tel:010-62835640
[通讯作者] *刘建勋,研究员,研究方向:中药药理学,Tel/Fax:010-62835601, E-mail:liujx0324@sina

民族大学蒙医药学院图雅教授鉴定为茜草科植物梔子 *G. jasminoides* 的果实;梔子苷 (geniposide, GS) 对照品 (中国药品生物制品检定所,批号 11079-200410);梔子苷酸 (geniposidic acid, GA) 对照品 (和光纯药工业株式会社,批号 CDR4496);去乙酰基车叶草苷酸甲酯 (deacetyl-asperulosidic acid methyl ester, DA)、京尼平-β-D-龙胆双糖苷 (genipin-1-O-β-gentiobioside, GG) 对照品均为自制,纯度 >99.0%;果胶酶 (上海楷洋生物技术有限公司,批号 090303);乙腈 (色谱纯) Fisher 产品;其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸水梯度 (0 ~ 20 min, 乙腈 5% ~ 15%), 柱温 25 °C, 检测波长 238 nm。以 DA, GG, GS 为对照品,进样量 10 μL。见图 1。

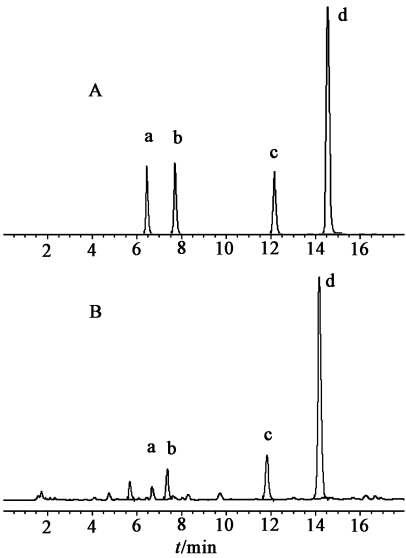


图 1 梔子含量测定 HPLC

A. 对照品; B. 供试品; a. GA; b. DA; c. GG; d. GS

2.2 标准曲线 分别精密称取 DA, GG, GS 对照品 1.00, 4.96, 15.86 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 混匀。分别取 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按照色谱条件进样 10 μL。以峰面积 (Y) 对照品浓度 (X) 进行回归, 回归方程和线性范围分别为:

DA: $Y = 12.91X - 1.40$ ($r = 0.999\ 4, n = 6$), 线性范围 4.00 ~ 24.00 mg·L⁻¹。

GG: $Y = 10.44X - 0.14$ ($r = 0.9999, n = 6$), 线性范围

19.84 ~ 119.04 mg·L⁻¹。

GS: $Y = 14.34X + 25.25$ ($r = 0.9999, n = 6$), 线性范围 63.44 ~ 380.64 mg·L⁻¹。

2.3 精密性 精密吸取适宜质量浓度的同一标准品溶液 10 μL, 连续测定 6 次, 记录峰面积, 其变化 RSD DA 0.88%, GG 0.23%, GS 0.03%。

2.4 重复性 取同一梔子提取液, 按照含量方法, 平行制备 6 份, 测定。RSD DA 0.56%, GG 1.09%, GS 0.22%。

2.5 样品回收率 取已知质量浓度的提取液 6 份, 分别加入对照品适量, 测定含量, 计算回收率。分别为 DA 99.08% (RSD 2.19%), GG 102.13% (RSD 0.20%), GS 101.14% (RSD 0.28%)。

2.6 含量测定 取梔子提取液, 按照适当倍数稀释, 使质量浓度在线性范围内, 分别按照色谱条件进样 10 μL, 测定, 计算含量。

3 梔子提取与黏度测定

称取梔子 1.0 kg, 加 10 倍量水浸泡 1 h, 加热保持微沸 2 h, 100 目不锈钢筛滤过, 滤液浓缩到密度 1.047。分别取 200 mL 溶液按 1:2.5, 1:5 稀释以及未稀释制成 3 种质量浓度的溶液, 测定相对密度分别为 1.012, 1.018, 1.047; 特性黏度分别为 2.62, 2.78, 2.90 mL·g⁻¹。

配制好的供试品液倒入乌氏黏度计, 然后将黏度计垂直固定于 25 °C 恒温水槽中, 使溶液的温度与水浴温度达到平衡, 保温 25 min。记录供试品在乌氏黏度计中流出时间 (t), 并重复测量几次, 直到 2 次读数偏差不超过 0.2 s, 取 t 的平均值, 计算供试品的特性黏数。

4 酶处理正交试验

选用 L₉ (3⁴) 正交表进行试验, 以酶解时间、酶解温度、加酶量和溶液密度为影响因素, 每个因素取 3 个水平, 见表 1; 正交试验设计及结果见表 2; 以 A 因素为误差项的方差分析见表 4。

表 1 酶处理正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	酶解时间/min	温度/°C	加酶量/%	溶液相对密度
1	150	60	0.01	1.012
2	120	50	0.05	1.018
3	90	40	0.10	1.047

表 2 酶处理正交试验结果

No	A	B	C	D	特性黏数/mL·g ⁻¹
1	1	1	1	1	0.960
2	1	2	2	2	0.626
3	1	3	3	3	0.634
4	2	1	2	3	0.916
5	2	2	3	1	0.657
6	2	3	1	2	0.661
7	3	1	3	2	0.661
8	3	2	1	3	1.124
9	3	3	2	1	0.734
K ₁	0.74	0.85	0.92	0.78	
K ₂	0.74	0.80	0.76	0.65	
K ₃	0.84	0.68	0.65	0.89	
R	0.10	0.17	0.27	0.24	

表 3 特性黏数方差分析

误差来源	SS	f	S	F
A(误差)	0.019	2	0.009	
B	0.047	2	0.023	2.47
C	0.106	2	0.053	5.59
D	0.089	2	0.044	4.68

5 结果与讨论

在梔子中梔子苷酸含量相对较低,本文未做为试验考察指标(试验结果略)。

ZORBAX SB-Aq 柱更适合流动相中含水比例较大的溶剂。

3 种成分的变化,F 检验没有显著差别(统计结果略)。但从图 2 直观分析看出酶水解对于 GG 影响最大,最大值超过 60%;对 GS 的影响最小,没有超过 10%,但从结果比较来看,GG 变化和 GS 变化程反比趋势,推测 GG 水解生成 GS。从二者的结构上看,相差一个葡萄糖,很可能果胶酶水解掉一个葡萄糖所致。

酶解前后提取液黏度发生了显著变化,果胶酶确实可以大大降低提取液的特定黏度,最佳的试验组合条件:酶解时间 90 min,温度 60 ℃,加酶量 0.01%,溶液密度 1.047。通过结果可以看出梔子中 3 个有效成分在不同条件下变化并不一致。本试验

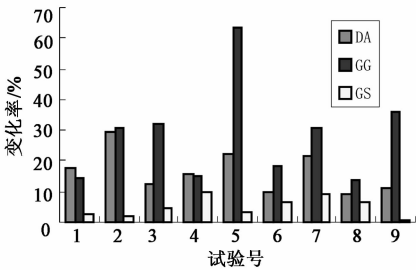


图 2 3 种主要成分的变化率

根据果胶酶的特性,固定 pH 3.5,没有考察 pH 对试验的影响。

果胶酶是催化植物细胞间质(即果胶质)水解成半乳糖醛酸和果胶酸一类酶的通称,通常包括原果胶酶(protopectinase)、果胶酯酶(pectin methylesterase, PE)、果胶酸酶(pectin polygalacturonase,PG)3 种^[1]。果胶酶能使果胶或果胶酸中 α-1,4 键分解,高分子的聚半乳糖醛酸降为小分子物质。早在 1979 年,Ishii. S 等成功地研究了在完全没有果胶解聚酶的黑曲霉培养基上提取果胶酯酶,并用它将高甲氧基果胶转化成低甲氧基果胶^[2]。多用于果汁加工(澄清果汁)及制造浓缩果汁、果粉和低糖果冻。也可用于加强果酒的澄清效果,提高酒的收率^[3],还可用于麻料脱胶和木材防腐等^[4]。工业上主要采用曲霉菌生产。多采取纤维素酶-果胶酶联用,而纤维素酶可水解葡萄糖苷,本试验中证明单一果胶酶对苷键亦有一定的水解作用。

[参考文献]

[1] 董云舟,赵政,堵国成,等. 碱性果胶酶及其在棉纺织预处理中的应用[J]. 工业微生物,2004(34),2:30.
[2] Ishii S,Kho K,Sugiyama S, et al. Low methoxyl pectin prepared by pectinesterase from *Aspergillus japonicus*[J]. Food Sci,1979,44(2):611.
[3] 张应玖,金成日,王红梅,等. 果胶酶的固定化研究[J]. 生物技术,1966,6(2):26.
[4] 贾月,弓爱君,邱丽娜,等. 果胶酶分离纯化及分析方法的研究进展[J]. 工业微生物,2005,35(1):55.

[责任编辑 全燕]