

5.5125X₂X₃ - 4.176667X₃²

表3 响应面分析因素水平表

Table 3 List of levels and factors

编码	因素	水平		
		-1	0	+1
X ₁	葡萄糖(%)	1.8	2.0	2.2
X ₂	酵母膏(%)	1.8	2.0	2.2
X ₃	玉米浆(%)	3.8	4.0	4.2

表4 响应面试验设计及结果

Table 4 Experiment design and result of response surface analysis

编码	X ₂	X ₃	X ₅	酶活实际值(U/mL)	酶活预测值(U/mL)
1	1	-1	0	152.54	151.45
2	-1	1	0	160.78	160.13
3	1	-1	0	179.54	178.24
4	1	1	0	182.56	183.37
5	0	-1	-1	160.45	158.65
6	0	-1	1	177.98	178.56
7	0	1	-1	174.76	174.66
8	0	1	1	170.24	171.07
9	-1	0	-1	153.18	154.98
10	1	0	-1	177.43	176.77
11	-1	0	1	170.96	171.09
12	1	0	1	178.46	177.46
13	0	0	0	180.43	184.25
14	0	0	0	181.12	181.89
15	0	0	0	179.54	178.28

式中 Y 是赖氨酸脱羧酶的酶活 (U/mL), X₁、X₂、X₃ 分别为葡萄糖、酵母膏和玉米浆添加量。从该方程的方差分析表(表略)可知,本试验所采用的模型高度显著, Radj² 值为 0.9165,表明酶活的 91.65% 的变异分布在方程的 9 个因子中,总变异中仅有 8.35% 不能由模型解释, R² 值为 97.02%,表明酶活的预测值和实际值之间具有较好的拟合度。该模型可用于预测蜂房哈夫尼菌的赖氨酸脱羧酶酶活的实际情况。

将回归方程(1)分别对其自变量(X₁、X₂、X₃)求一阶偏导并均令其为 0,即可得到一个三元一次方程组,通过借此方程组得到比酶活的最大值和对应的极值点。极值点为 X₁ = 0.035, X₂ = 0.4013, X₃ = -0.05515,相当于三者的最适浓度分别为葡萄糖 1.84%、酵母膏 2.20%、玉米浆 3.66%。

2.5 拟合优化的验证

在上述求得的最优条件下,预测酶活的最高值,验证试验

的设计及结果见表 5。由表 5 可知酶活的预测最高值为 204.53U/mL。为了验证模型的准确性和有效性,在预测最优条件下进行发酵试验,得到酶活为 203.14 ± 0.2U/mL(试验重复 3 次,3 次试验结果分别为 202.16U/mL、204.08U/mL、203.18U/mL,进一步证明了该模型能准确预见实际发酵情况。

表5 模型验证试验

Table 5 Test for the model

编 号	葡 萄 糖	酵 母 膏	玉 米 浆	NaCl	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	赖氨酸	VB ₆	酶活(U/mL)	
									真实值	预测值
1	1.84	2.20	3.66	0.30	0.03	0.01	0.50	0.10	203.14	204.53
2	2.00	2.00	3.66	0.30	0.03	0.01	0.50	0.10	183.87	182.95
3	1.84	2.20	4.00	0.30	0.03	0.01	0.50	0.10	170.23	169.54
4	1.84	2.20	3.66	0.30	0.03	0.01	0.50	0.10	184.98	185.12

3 讨论

石油价格不断增长并在不久的将来可能面临枯竭,这使许多原料依赖石油的化工生产必须寻找石油替代品。微生物具有培养方便,快速繁殖,可再生等诸多优点,成为很多化工原料理想的“生产者”。作者以赖氨酸这种微生物代谢产物为原料,利用微生物的赖氨酸脱羧酶将其转化成合尸胺。目前一些日本学者在从事此方面的研究,并取得一定成果,国内关于此方面研究极少,此课题在实验室水平上初步探讨生产尸胺的方法,为今后我国拥有自主知识产权的尸胺工业化生产技术奠定基础。酶活达到 203.14U/mL,比优化前的比酶活提高 28.9 倍。

参考文献:

[1] David Gani. A structural and mechanistic comparison of pyridoxal 5'-phosphate dependent decarboxylase and transaminase enzymes[J]. *Biological Sciences*, 1991, 1263(332): 131-139.
 [2] Nishi Kyohiko, Endo Shuichi, Muri Yukiko, et al. Method for producing cadaverine dicarboxylate and its use for the production of nylon [P]. *EP*: 20040010711, 2004-12-01.
 [3] 陈学好, 于杰, 李伶俐. 高等植物开花结实的多胺研究进展[J]. *植物学报*, 2003, 20(1): 36-42.
 [4] 刘宽灿, 梁秋芬, 赵丽红, 等. 多胺在植物生长发育过程中的生理作用[J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(1): 22-26.
 [5] 王晓云, 邹琦. 多胺与植物衰老关系研究进展[J]. *植物学通报*, 2002, 19(1): 11-20.
 [6] 蒋丽丽, 吴晓燕, 刘毅, 等. 赖氨酸脱羧酶发酵工艺及其酶学性质[J]. *精细化工*, 2006, 23: 1060-1067.
 [7] Y Kikuchi, H Kojima, T Tanaka, et al. Characterization of a Second Lysine Decarboxylase Isolated from *Escherichia coli*. [J]. *Bacteriol*, 1997, 179(21): 4486-4492.

罗汉果皂甙类成分代谢转化规律分析

向秋¹, 雷迅^{1*}, 黄岚珍^{1**}, 王建红¹, 黄江¹, 孙步祥²

(1. 桂林医学院科学实验中心, 广西 桂林 541004; 2. 桂林莱茵生物科技有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要: 目的: 分析组织培养苗罗汉果皂甙类成分在果实成熟过程中的代谢转化规律, 为罗汉果甜甙代谢关键酶的研究提供基础。方法: 采用微波炉水煮法提取不同生长期罗汉果总甙, 高相液相色谱(HPLC)分析各生长期罗汉果二糖甙(甙₂)、三糖甙(甙₃)和五糖甙(甙₅)的含量。结果: 果龄 10d 的罗汉果中, 能检测到甙₂ (3 666.4μg/100mg) 及甙₃ (48.4μg/100mg), 甙₅ 检测不到; 果龄 50d 时, 能检测到甙₂ (95.1μg/100mg) 和高含量的甙₃ (1 213.8μg/100mg); 随着果龄增长和果实逐渐成熟, 低糖苦甙₂、甙₃ 含量逐渐减少, 高糖甜甙₅ 含量逐渐升高。果龄 70d 时, 苦甙₂、甙₃ 基本检测不到, 而甜甙₅ (1 331.4μg/100mg) 含量达到高水平。结论: 罗汉果高糖甜甙₅ 可能是从低糖苦甙₂ 代谢转化而来。

关键词: 罗汉果; HPLC; 甜甙₅; 代谢转化

中图分类号: Q945.18; Q946.83 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2009)04-0049-03

Study of Metabolic Conversion of Mogrol Glycosides in Fruit of *Siraitia Grosvenorii*

XIANG Qiu¹, LEI Xun^{1*}, HUANG Lan-zhen^{1**}, WANG Jian-hong¹, HUANG Jiang¹, SUN Bu-xiang²

(1. Center Laboratory of Guilin Medical College, Guilin 541004, China; 2. Guilin Layn Natural Ingredients Corporation, Guilin 541004, China)

Abstract: Objective: Studying metabolic conversion of mogrol glycosides in the tissue culture related *Siraitia grosvenorii* fruit during the course of fruit maturity, so that key clues could be found for the research of mogrol glycosides associated metabolic enzymes. Method: Mogrol glycosides were extracted from *Siraitia grosvenorii* fruit of different growing ages by boiling water with microwave oven. Mogrol glycosides₂,₃ were determined by HPLC. Result: Bitter mogrol glycoside₂ and tasteless mogrol glycoside₅ were 3 666.4μg/100mg and 48.4μg/100mg respectively,



without mogrol glycoside detected in 10 day - old fruit. Mogrol glycoside was 1 213. 8 μ g/100mg and mogrol glycoside was detected 95. 1 μ g/100mg in 50 day - old fruit. Mogrol glycoside increased rapidly and reached high level. 1 331. 4 μ g/100mg without mogrol glycosides and detected in 70day - old fruit. **Conclusion:** High glucose sweet mogrol glycosides might come from low glucose bitter mogrol glycosides via metabolic conversion. This conclusion can provide scientific evidence for the study of glycosyl transferase of *Siraitia grosvenorii* mogrol glycosides. **Key words:** *Siraitia grosvenorii*; HPLC; glycoside V; metabolic conversion

罗汉果[*Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey]是我国珍贵、稀有的葫芦科植物,主要产于广西桂林地区,成熟的罗汉果,味极甜,具有润肺止咳、祛痰平喘和润肠通便等药理作用^[1,2]。药理研究证实,罗汉果甜甙能提高免疫功能,降低血糖,是肥胖者和糖尿病患者理想的糖替代品,甜甙的主要成分是罗汉果甜甙^[3,4]。日本学者木岛孝夫的研究表明,罗汉果甜甙具有抗癌作用^[5]。

罗汉果特有的经济、药用价值引起了国内外学者的极大兴趣,罗汉果的综合开发和研究具有广阔的发展前景。随着罗汉果应用领域的拓宽,罗汉果甜甙需求量越来越大,组培苗罗汉果的种植面积及地域越来越广。因此,开展组培苗罗汉果次生代谢产物罗汉果皂甙的代谢转化规律分析与研究,将对罗汉果皂甙代谢关键酶的研究、应用与开发,提高罗汉果皂甙的产量与品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

罗汉果样品采集于广西永福,同一果园同一组培苗品种罗汉果。选择7月中旬同一天授粉的罗汉果,授粉后分别采集生长10、20、30、40、50、60、70d罗汉果果实。

1.1.2 仪器

LC-6A高效液相色谱仪,包括LC-6A输液泵,SCL-6A系统控制器,SL-6A自动进样器,SPD-6AV紫外检测器,CTO-6A柱温箱,Hw-2000数据站。

1.1.3 试剂

对照品:五糖甙(甙)、三糖甙(甙)、二糖甙(甙)(由桂林莱茵生物制品有限公司提供);乙腈、甲醇为色谱纯(浙江临海市浙东特种试剂厂),试验用水为二重蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱为Thermo C₁₈(150mm×4.6mm,5 μ m),流动相为:乙腈-双蒸水(23:77,体积分数),使用前经0.45 μ m的膜过滤,超声脱气,流量为1.0mL·min⁻¹,纵坐标量程为20mV,进样量为20 μ l,柱温35℃,紫外检测波长为210nm。

1.2.2 对照品溶液的制备

称取五糖甙、三糖甙、二糖甙对照品30.0、27.1、26.8mg分别置于10mL容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制质量浓度分别为3.00、2.71、2.68mg·mL⁻¹储备液,应用前用流动相稀释至相应的浓度。

1.2.3 样品溶液的制备

罗汉果皂甙成分提取,将罗汉果鲜果70g捣碎,转入圆底烧瓶中,加450mL超纯水,置于电子调温电热套中加热煮沸2h,40目过滤。滤渣加450mL超纯水再煮沸2h,过滤。合并滤液,抽滤,滤液上旋转蒸发仪浓缩至150mL,冷却后,进行冷冻干燥得到罗汉果皂甙成分提取物。精密称取果龄10d、20d、30d、40d、50d、60d、70d罗汉果皂甙提取物96、180、64、63、50、104、66mg,置于10mL容量瓶中,然后加甲醇适量,超声10min,取出,冷却至室温,最后用甲醇定容至刻度,测定前取溶液经

0.45 μ m的过滤膜过滤后使用。

1.2.4 罗汉果皂甙的含量测定

取样品溶液20 μ l,依照上述色谱条件测定,按外标法定量。

2 结果与分析

2.1 罗汉果标准品色谱图

罗汉果甙 检出时间 14.4min, 罗汉果甙 检出时间 31.4min, 罗汉果甙 检出时间 54.5min。

2.2 10d、50d和70d罗汉果皂甙色谱图

果龄10d后的罗汉果有明显甙峰,同时,也观察到一个小的小的甙峰(图2);果龄50d罗汉果甙峰降低,甙峰明显变高,并有小的甙V峰出现(图3);果龄70d罗汉果甙、峰消失,罗汉果甙V峰明显升高(图4)。

2.3 罗汉果皂甙代谢转化规律

从授粉的第10d开始,随果龄延长,罗汉果苦甙含量逐渐下降至检测不到。甙含量开始逐渐升高,然后逐渐下降至检测不到。50d时,罗汉果甜甙V出现,随着果龄期延长,甙V含量逐渐升高。至果龄70d时,甙含量达到高水平,甙、甙检测不到(表1)。

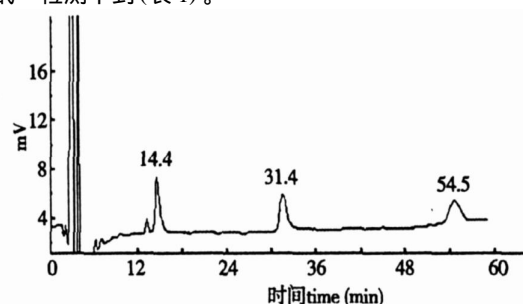


图1 罗汉果甙、标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of mogrol glycosides, reference substance
Mogrol glycosides :14.4;Mogrol glycosides :31.4;Mogrol glycosides :54.5.

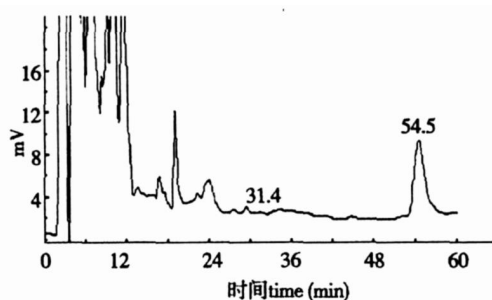


图2 10d罗汉果皂甙色谱图

Fig.2 10d Chromatogram of mogrol glycosides
Mogrol glycosides :31.4;Mogrol glycosides :54.5.

3 讨论

分子结构分析表明,罗汉果甙类成分的基本结构是甙元,均为葫芦烷型四环三萜,即罗汉果醇(Mogrol),甙元通常糖基化。不同罗汉果甙的差异仅在于甙元上连接的葡萄糖数目和连接位置的不同。甙元上连接三个或三个以下的葡萄糖称低糖甙,这些罗汉果甙有苦味或无味。罗汉果甙元含四个或四个以上葡萄糖称高糖甙,有甜味,甙V甜度约为蔗糖的300倍。罗汉果甙类成分水解后,产生甙元和葡萄糖^[6]。陈全斌等^[7]研究不同生长期罗汉果鲜果中,罗汉果甙V与总黄酮含

收稿日期:2009-05-21;修回日期:2009-07-03

作者简介:向秋(1965-),男,博士,副研究员,硕士生导师,从事生物技术研究,发表论文20余篇,Email:guilin339@163.com; *并列第一作者:雷迅(1956-),男,教授,硕士生导师,从事医药生物技术研究,Email:yypeng_7@hotmail.com. *通讯作者:黄岚珍(1968-),女,实验师,从事生物技术研究,Email:huanglz@126.com.

量变化规律,发现以坐果 50d 作为转折点,鲜果中的甙 V 含量急剧上升,而总黄酮的含量下降。在生产实践中也发现,果龄少于 50d 的罗汉果,均以苦味为主,随着罗汉果生长期的增加,罗汉果的味道逐渐由苦变甜。

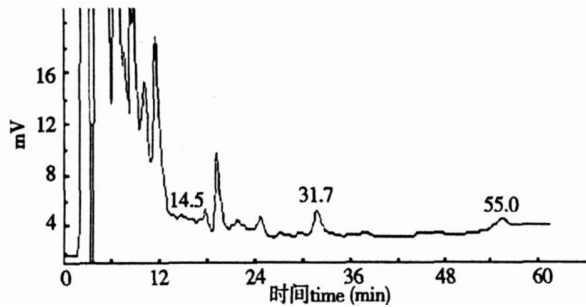


图3 50d 罗汉果皂甙色谱图

Fig. 3 50d Chromatogram of mogrol glycosides

Mogrol glycosides : 14. 5; Mogrol glycosides : 31. 7; Mogrol glycosides : 55. 0.

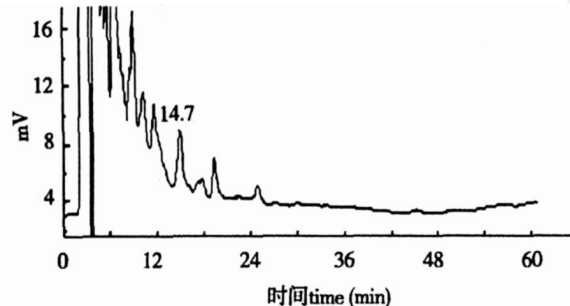


图4 70d 罗汉果皂甙色谱图

Fig. 4 70d Chromatogram of mogrol glycosides

Mogrol glycosides : 14. 7.

为进一步研究罗汉果皂甙的代谢转化规律,本研究拟采集不同生长期罗汉果鲜果,并对二糖甙(甙)、三糖甙(甙)和五糖甙(甙V)进行分析。结果表明,罗汉果在授粉 10d 后,已有罗汉果甙和甙次生代谢物产生,随着果龄增加,甙逐渐减少,甙逐渐增加。果龄 50d 的罗汉果中,能检测出低含量的甜甙 V。果龄 70d 时,罗汉果皂甙成分主要是甙 V,甙与甙检测不到。这种现象提示,罗汉果五糖甙(甙 V)可能是以幼果中低糖甙(苦甙)作为前体,经历生物代谢转化途径形成的,这条代谢转化途径可能与葡萄糖基转移酶(Glucosyltransferase)有关。葡萄糖基转移酶在许多活性植物次生代谢物

合成中起重要作用,史玲玲等^[8]报道,葡萄糖基转移酶在红景天甙生物合成中起重要作用,葡萄糖基转移酶催化葡萄糖和酪醇合成红景天甙。因此,可以推测葡萄糖基转移酶参与了罗汉果皂甙的代谢转化,在糖基转移酶作用下,葡萄糖残基逐步转移至罗汉果甙元或低糖甙,逐步糖基化,最后形成呈强甜味的四糖甙、五糖甙。根据现有研究资料,目前尚不清楚有几种葡萄糖基转移酶参与了罗汉果甜甙的生物合成以及具体的合成过程。因此,探索罗汉果甜甙的生物合成与糖基转移酶之间的关系,分离、克隆罗汉果糖基转移酶基因,并研究其功能将是下一阶段的主要工作。

表1 不同果龄罗汉果皂甙成分分析(n=3)

Table 1 Analysis of mogrol glycosides at different growing period(Content: $\mu\text{g}/100\text{mg}$ extract)

果龄 (d)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)
10	0.0	48.4	3 666.4
20	0.0	40.8	3 195.9
30	0.0	476.0	2 329.8
40	0.0	530.5	1 284.9
50	95.1	1 213.8	828.9
60	549.3	41.6	0.0
70	1 331.4	0.0	0.0

参考文献:

- [1]广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志第二辑[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,1983:195.
- [2]李坚,李沛波,袁干军. 罗汉果水提取物的止咳作用研究[J]. 海南医学院学报,2008,14(1):16-18.
- [3]赵燕,刘国艳,史贤明,等. 罗汉果浓缩汁及罗汉果甜甙对小鼠血脂代谢的影响[J]. 中国食品学报,2008,8(1):9-12.
- [4]张俐勤,戚向阳,陈维军,等. 罗汉果皂甙提取物对糖尿病小鼠血糖、血脂及抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(2):237-240.
- [5]Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, et al. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003,198(1):37-42.
- [6]李典鹏,陈月圆,潘争红,等. 不同生长日龄罗汉果皂甙类成分变化研究[J]. 广西植物,2004,24(6):546-549.
- [7]陈全斌,义祥辉,余丽娟,等. 不同生长周期的罗汉果鲜果中甜甙 V 和总黄酮含量变化规律研究[J]. 广西植物,2005,25(3):274-277.
- [8]史玲玲,王莉,张艳霞,等. 红景天甙的生物合成及其关键代谢酶研究[J]. 生命科学,2008,20(2):287-290.

高效液相色谱法测定大鼠血清染料木素浓度

任国峰¹, 汤凌¹, 谭鸿毅², 杨爱青¹, 阳国平², 黄忆明¹

(1. 中南大学公共卫生学院, 湖南长沙 410078; 2. 中南大学湘雅三医院, 湖南长沙 410013)

摘要:目的:建立大鼠血清中染料木素浓度的 HPLC 测定方法。方法:大鼠血清以叔丁基甲醚萃取,萃取物用氮气吹干后,用甲醇溶解用于色谱分析。色谱条件:采用 Thermo C18 柱(250mm \times 4.6mm, 5 μm);以乙腈 - 0.02mol/L 磷酸二氢钾(35:65, pH=4.3)为流动相;流速为 1.0mL/min;检测波长为 260nm;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 10 μL 。结果:染料木素最低检测浓度为 0.01mg/L;标准曲线线性范围为 0.01~10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9998$);相对回收率为(101.31 \pm 3.47)%;日内 RSD 与日间 RSD 均小于 10.00%。结论:该方法简便、快速、灵敏度高,重现性及稳定性较好,适用于大鼠血清染料木素浓度测定和药代动力学的研究。

关键词:高效液相色谱法;染料木素;大鼠;血清浓度

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2009)04-0051-03

Determination of Genistein in Rat Serum by HPLC

REN Guo-feng¹, TANG Ling¹, TAN Hong-yi², YANG Ai-qing¹, YANG Guo-ping², HUANG Yi-ming¹

(1. School of Public Health, Central South University, Changsha 410078; 2. Xiangya 3rd Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective: An assay method for genistein in rat serum by high performance liquid chromatography was established. **Method:** Serum sample was extracted with tert-butyl methyl ether (TBME) for HPLC analysis. The HPLC assay was conducted using Thermo C18 column (4.6mm \times 250mm, 5 μm) with acetonitrile - 0.02mol/L potassium dihydrogen phosphate (35:65) as mobile phase at a flow-rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. 10 μL of sample solution were injected into the C18 column where the temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. The detection wave length was 260nm. **Result:** The limit of detection for genistein was 0.01mg \cdot L⁻¹ in serum sample. The linearity range for genistein was obtained from 0.01mg \cdot L⁻¹ to 10.00mg \cdot L⁻¹, $r=0.9998$. The recoveries of genistein were 100.1% \pm 1.8%. The relative standard deviations of the intra-day and inter-day