

· 化学成分研究 ·

连翘苷的提取分离与微生物转化

辛秀兰¹, 陈亮¹, 张强¹, 赵小曼¹, 吴志明¹, 马海燕² (1. 北京电子科技职业学院, 北京 100029; 2. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘要: **目的** 研究一种从连翘果实中分离连翘苷的有效方法, 并利用提取分离出的连翘苷作为底物, 为其转化产物连翘脂素的工业化生产提供研究基础。 **方法** 利用 70% 乙醇对 2.5 kg 连翘干燥果实进行粗提, 萃取乙酸乙酯部位, 经过层析得到连翘苷纯品; 选择 32 种菌株对连翘苷进行微生物转化, 以连翘脂素的产量为指标, 利用微生物转化工艺, 筛选出有较强的转化能力且专一性的菌株。 **结果** 分离纯化得到目标化合物连翘苷 6.8 g, 经高效液相色谱分析显示连翘苷纯度在 98% 以上。经初筛、复筛获得 2 种菌株具有较强的转化能力且有专一性, 分别为雅致小克银汉霉(CGMCC 3.1207)和产黄青霉(CGMCC 3.521)。 **结论** 该实验为连翘脂素的制备探索出一条适用于工业化的生产方法, 筛选出了能将连翘苷转化为连翘脂素的高效专一性菌株, 具有一定的工业化价值。

关键词: 连翘; 分离方法; 微生物转化; 连翘苷; 连翘脂素

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)11-1705-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.015

Isolation and Microbial Bioconversion of Phillyrin

XIN Xiulan¹, CHEN Liang¹, ZHANG Qiang¹, ZHAO Xiaoman¹, WU Zhiming¹, MA Haiyan² (1. College of Bioengineering, Beijing Polytechnic, Beijing 100029, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To develop an effective method for the separation of phillyrin from fruits of *Forsythia suspensa* and study the biotransformation of phillyrin by different microbial strains. The aim is to provide a foundation for industrialization of phillygenin transformed from phillyrin. **Methods** In this study, 70% ethanol was used to extract 2.5 kg of *Forsythiae fructus*. The pure phillyrin was separated from ethyl acetate extract by chromatography. 32 strains were selected for microbial transformation of phillyrin. Strains with good transformation ability and specificity were screened by using the yield of phillygenin as an indicator. **Results** Phillyrin (6.8 g) were obtained after separation and purification. The purities of the compound were above 98% evaluated by HPLC analysis. The microbial transformation of phillyrin results showed that there were two strains with strong transformation ability and specificity, which were *Cunninghamella elegans* (CGMCC 3.1207) and *Penicillium chrysogenum* (CGMCC 3.521). **Conclusion** This study explored a suitable method for industrial production of phillyrin, and screened out highly efficient and specific strains which could convert phillyrin into phillygenin.

Keywords: *Forsythia suspensa*; isolation; microbial bioconversion; phillyrin; phillygenin

收稿日期: 2021-04-22

作者简介: 辛秀兰, 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与产品创新。Email: xiulanxin@163.com。

基金项目: 北京电子科技职业学院天然产物国家标准样品研制及产品技术开发技术研究项目(SG030801); 北京电子科技职业学院院内科技类一般课题(2019Z002-015-KXB)。

连翘为木犀科连翘属落叶灌木连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) vahl] 的干燥果实, 收载于历版《中国药典》^[1-2] 中。连翘已有 2000 多年的中医临床药用历史, 最早记载于《神农本草经》, 具有清热解毒, 消肿散结, 疏散风热等功效, 被称为“疮家圣药”^[3]。连翘分布在中国、日本、朝鲜及欧洲的许多国家, 在中国主要产于山西、河北、河南、陕西等地^[4]。随着分离技术的不断提高, 连翘中越来越多的类木脂素化合物被发现。值得注意的是, Takizawa 等^[5] 于 1981 年在连翘中分离得到的苯丁酸 (benzenebutanoic acid) 是目前在连翘中发现的唯一一个二苄基丁烷类木脂素化合物。在连翘中已分离得到了 230 多个化合物, 包括木脂素类、苯乙醇苷类、萜类、环己烷乙醇衍生物、黄酮类及挥发性成分等^[6]。其中木脂素类化合物是连翘的主要特征物质和主要药效成分^[7]。

连翘脂素于 1977 年从连翘中分离得到, 也是在连翘中最早发现的木脂素类成分^[8]。作为连翘抗炎作用的药效物质基础之一, 连翘脂素解热作用优于连翘主成分连翘苷及连翘酯苷 A^[9]。现有的研究表明连翘脂素具有抗炎^[10]、抗肿瘤^[11]、保肝^[12]、降压^[13]、改善肾功能^[14]及抑制 cAMP 磷酸二酯酶^[15]等药理作用, 具有较高的研究价值, 但是其在连翘中含量比较低, 如何高效快速获得连翘脂素是其工业化生产的关键。微生物在生长过程中会产生一系列酶, 可应用于化合物的结构修饰, 具有成本低、转化得率高的特点。连翘苷作为连翘脂素的糖苷类化合物, 其口服吸收利用度低, 口服后大多经过体内微生物或酶的作用下形成连翘脂素而发挥效用, 且连翘苷在连翘中含量高, 为其主成分之

一。本研究以连翘苷为底物, 利用微生物转化连翘苷制备连翘脂素, 筛选出具有高效专一性的菌株, 从而探索出适用于连翘脂素制备的且适用于工业化生产的方法。

1 试剂和仪器

1.1 仪器 Mettler Toledo-AB265-S 电子分析天平 (梅特勒-托利多公司); 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 循环真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); Agilent-1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 超净工作台 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司), 恒温培养箱、恒温振荡培养箱 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司)。

1.2 试剂 连翘苷 (批号: AF9080602), 成都埃法生物公司; 连翘脂素 (批号: B20726), 上海源叶生物科技有限公司; 乙酸乙酯、正丁醇、石油醚、磷酸, 北京化工厂; 乙醇、甲醇, 天津市大茂化学试剂厂; 去离子水, 杭州娃哈哈公司; 乙腈, 色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂; AB-8 大孔吸附树脂、柱层析硅胶、聚酰胺粉, 沧州博恩吸附材料科技有限公司; 马铃薯肉汤培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基, 北京奥博星生物有限公司。

1.3 药材 连翘果实于 2019 年 5 月采自山西运城, 经辽宁大学桑育黎副教授鉴定为木犀科连翘属植物连翘 [*Forsythia suspensa* (Thunb.) vahl] 的干燥果实, 凭证标本 (20190501) 存放于辽宁大学药学院天然药物化学实验室。

1.4 菌种 32 种微生物保藏菌株, 中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 及中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC), 均为真菌, 菌株目录见表 1。

表 1 微生物菌种目录及初筛结果

Table 1 List of microbial strains and preliminary screening results

序号	拉丁学名	菌株编号	中文名	筛选结果	序号	拉丁学名	菌株编号	中文名	筛选结果
1	<i>Absidia coerulea</i>	CGMCC 3.3389	蓝色梨头霉	-	17	<i>Curvularia lunata</i>	CGMCC 3.4381	新月弯孢	+
2	<i>Absidia coerulea</i>	CGMCC 3.3382	蓝色梨头霉	-	18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	CGMCC 3.1029	长枝木霉	+
3	<i>Penicillium melinii</i>	CGMCC 3.4474	梅林青霉	-	19	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	CGMCC 3.4261	长枝木霉	+
4	<i>Beauveria bassiana</i>	CGMCC 3.2473	球孢白僵菌	-	20	<i>Backusella lamprospora</i>	CGMCC 3.3435	闪孢巴克斯霉	+
5	<i>Cephalotrichum stemonitis</i>	CGMCC 3.1411	具柄矛束霉	-	21	<i>Absidia corymbifera</i>	CGMCC 3.2892	伞枝梨头霉	-
6	<i>Mucor plumbeus</i>	CGMCC 3.3450	密丛毛霉	++	22	<i>Aspergillus niger</i>	CGMCC 3.1858	黑曲霉	-
7	<i>Cunninghamella echinulata</i>	CGMCC 3.2004	刺孢小克银汉霉	-	23	<i>Rhizopus japonicus</i>	CGMCC 3.0795	日本根霉	-
8	<i>Cunninghamella echinulata</i>	CGMCC 3.3400	刺孢小克银汉霉	-	24	<i>Aspergillus melleus</i>	CICC 40330	蜂蜜曲霉	+
9	<i>Acremonium potronii</i>	CGMCC 3.4008	波特枝顶孢	+	25	<i>Rhizopus microsporus var. chinensis</i>	CICC 41052	小孢根霉华变种	++
10	<i>Fusarium solani</i>	CGMCC 3.1829	腐皮镰孢	+	26	<i>Penicillium expansum</i>	CICC 41063	扩展青霉	-
11	<i>Mucor polymorphosporus</i>	CGMCC 3.3443	多型孢毛霉	+	27	<i>Absidia coerulea</i>	CICC 40302	蓝色梨头霉	-
12	<i>Cunninghamella elegans</i>	CGMCC 3.1207	雅致小克银汉霉	+++	28	<i>Aspergillus niger</i>	CICC 2114	黑曲霉	++
13	<i>Cunninghamella elegans</i>	CGMCC 3.2028	雅致小克银汉霉	+	29	<i>Trichoderma reesei</i>	CICC 2626	里氏木霉	++
14	<i>Penicillium chrysogenum</i>	CGMCC 3.521	产黄青霉	+++	30	<i>Aspergillus sp.</i>	CICC 2699	曲霉属	++
15	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	CGMCC 3.264	总状共头霉	++	31	<i>Penicillium griseofulvum</i>	CICC 4015	灰黄青霉	+
16	<i>Mucor plumbeus</i>	CGMCC 3.2450	密丛毛霉	++	32	<i>Candida parapsilosis</i>	CICC 1973	近平滑假丝酵母	+

注: “-” 连翘苷无法被转化; “+” 连翘苷少量转化; “++” 连翘苷较多转化; “+++” 连翘苷大量转化

2 方法与结果

2.1 连翘苷的富集 取连翘干燥果实 2.5 kg, 粉碎, 按料液比 1:3(g:mL) 加入质量浓度为 70% 的乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1.5 h。提取液静置过滤除去滤渣, 滤液在 45 °C 下旋蒸浓缩至无醇味。浓缩液分别经石油醚、乙酸乙酯、饱和正丁醇萃取。将提取所得的乙酸乙酯部分(194.58 g)经预处理后的聚酰胺柱、大孔树脂和硅胶色谱柱^[16]反复层析分离, 得到白色粉末(6.8 g)。

2.2 微生物培养基的配置

2.2.1 固体斜面培养基 称取 38 g 马铃薯葡萄糖琼脂培养基粉末加入 1 L 水中, 搅拌均匀后, 加热煮沸至澄清, 分装至干净的试管中, 121 °C 高温灭菌 20 min, 倾斜放置使其冷却, 放置于 28 °C 培养箱中待用。

2.2.2 液体培养基 称取 35 g 马铃薯肉汤培养基粉末加入 1 L 蒸馏水中, 搅拌均匀后, 加热煮沸至澄清, 分装至三角瓶中, 每瓶 100 mL, 121 °C 高温灭菌 20 min, 放冷待用。

2.3 微生物转化

2.3.1 菌种复苏 在无菌条件下, 用 75% 酒精对装有菌种冻干粉的安瓿瓶进行消毒后, 用火焰加热顶端, 滴加少量无菌水至加热的安瓿瓶顶端使其破裂, 敲下已经破裂的安瓿瓶顶端。用无菌吸管吸取约 0.3 ~ 0.5 mL 无菌水, 滴入瓶中, 轻轻振荡, 使冻干粉混合均匀。吸取全部菌液, 移植于“2.2.1”项下的斜面培养基中, 置于 28 °C 培养箱中静止培养。待菌株长出后进行继代培养, 直至菌株长势良好, 完全复苏。

2.3.2 菌种培养 在无菌条件下, 将复苏好的菌株接种于“2.2.2”项下的培养基中, 放置于恒温振荡培养箱中, 28 °C, 135 r·min⁻¹ 下培养 1 d, 观察到菌株生长旺盛后可将底物投入。

2.3.3 微生物转化菌株的初筛 在无菌条件下, 向“2.2.2”项下的培养液中投入底物连翘苷(溶于 75% 乙醇中, 浓度为 5 mg·mL⁻¹, 用无菌注射器取 1 mL 打入培养基中), 放置于恒温振荡培养箱中, 在 28 °C 以 135 r·min⁻¹ 培养 5 d。此为转化组, 每种菌株设两个平行, 且以不加底物的培养液作为空白对照。将转化好的样品经过滤除去菌体得转化液, 将转化液用 2 倍量的乙酸乙酯萃取两次。合并两次萃取液, 置于 45 °C 的旋转蒸发仪中, 旋蒸至干。用 5 mL 甲醇复溶, 用 0.25 μm 的微孔滤膜过滤后, 置于液相小瓶中, 过夜。

2.3.4 微生物转化菌株的复筛 根据初筛结果对有转化能力的菌株进行复筛, 在无菌条件下, 将筛选的转化菌株接入液体培养基中, 在 28 °C, 135 r·min⁻¹ 培养 2 d 作为种子液。取 1 mL 的菌丝接入“2.2.2”项下的培养基中, 在 28 °C 以 135 r·min⁻¹ 的条件下培养, 菌株生长旺盛后可投入底物。在无菌的环境中, 向上述菌株生长旺盛的培养液中投入底物连翘苷, 投入量为 5 mg, 放置于恒温振荡培养箱中培养 5 d(28 °C, 135 r·min⁻¹), 将转化好的样品经过滤除去菌体得转化液, 将转化液用 2 倍量的乙酸乙酯萃取两次。合并两次萃取液, 置于 45 °C 的旋转蒸发仪中, 旋蒸至干。用 5 mL 甲醇复溶, 用 0.25 μm 的微孔滤膜过滤后, 置于液相小瓶中, 过夜。

2.4 液相色谱分析

2.4.1 连翘苷高效液相色谱(HPLC)分析 色谱条件: Agilent 1260 HPLC 色谱仪, 使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ packing (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 330 nm; 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸(17:83); 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C。

2.4.2 转化产物 HPLC 分析 色谱条件: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1 % 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~30 min, 10%~100% A; 30~35 min, 100% A; 35~40 min, 100%~10% A); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 检测波长: 277 nm; 进样量: 10 μL。

3 结果

3.1 化合物纯度测定及成分鉴定 经连翘中分离得到的化合物经 HPLC 分析, 所得液相图谱如图 1 所示。面积归一法结果显示本实验分离得到的化合物纯度在 98% 以上, 见表 2。采用 ¹H-NMR 对所分离得到的化合物进行结构确证(见图 2)。与文献报道^[18]的连翘苷的数据一致, 进一步验证了所得化合物为连翘苷。

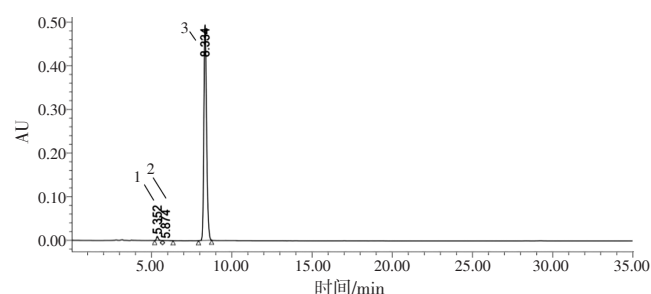


图 1 连翘苷的高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of phillyrin

表 2 连翘苷的峰面积百分比

Talbe 2 Peak area percentage of phillyrin

色谱峰	t_R /min	峰面积	峰面积百分比/%
1	5.352	83 296	1.41
2	5.874	5 973	0.10
3	8.334	583 3024	98.49

3.2 连翘苷的微生物转化初筛和复筛结果

3.2.1 初筛结果 将初筛获得的转化样品进行 HPLC 分析, 发现有 20 种菌株的转化产物中有连翘脂素 ($t_R = 18.5 \text{ min}$)。以发酵液中连翘脂素和连翘苷峰面积比值作为转化率高低的评价指标。转化反应见图 3, 结果见表 1。

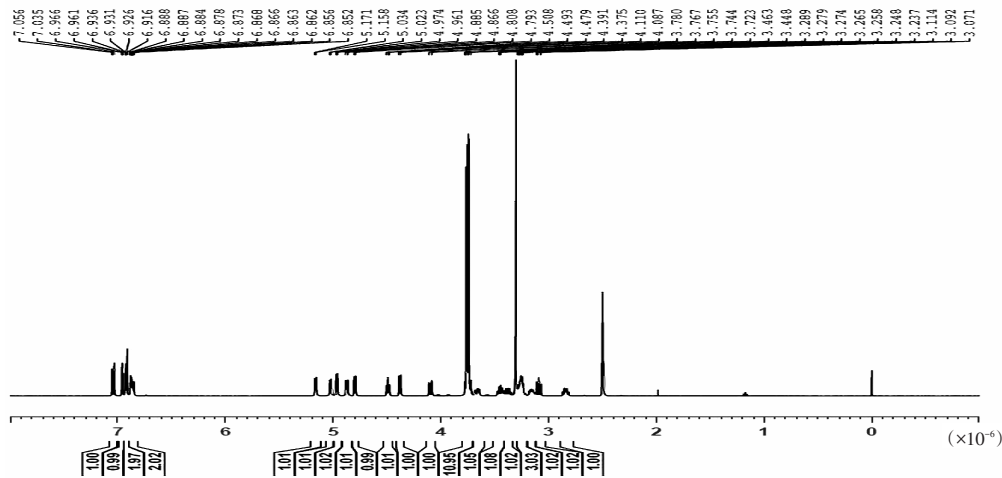


图 2 连翘苷的 ^1H -NMR 图
Figure 2 ^1H -NMR spectrum of phillyrin

3.2.2 复筛结果 将初筛中具有转化能力的 20 种菌株进行复筛, 结果有 9 种菌株转化率较高, 分别为雅致小克银汉霉 (CGMCC 3.1207)、产黄青霉 (CGMCC 3.521)、总状共头霉 (CGMCC 3.264)、密丛毛霉 (CGMCC 3.3450)、腐皮镰孢 (CGMCC 3.1829)、密丛毛霉 (CGMCC 3.2450)、小孢根霉华变种 (CICC 41052)、里氏木霉 (CICC 2626)、曲霉属 (CICC 2699)。其中雅致小克银汉霉 (CGMCC 3.1207) 和产黄青霉 (CGMCC 3.521) 的转化率高且无副产物, 具有较强的专一性, 见图 4 和图 5。

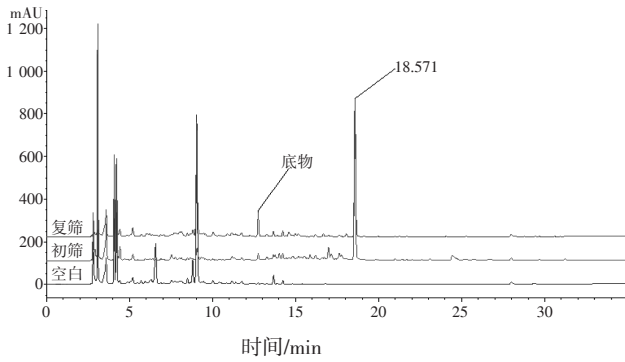


图 4 雅致小克银汉霉 (CGMCC 3.1207) 转化发酵液的 HPLC 图
Figure 4 HPLC Chromatogram of *Cunninghamella elegans* (CGMCC 3.1207) fermentation liquid

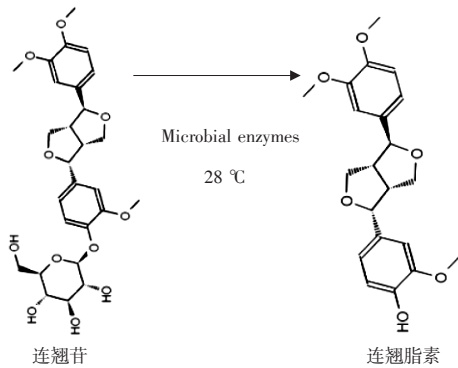


图 3 连翘苷转化为连翘脂素的微生物转化过程
Figure 3 Microbial transformation of phillyrin into phillygenin

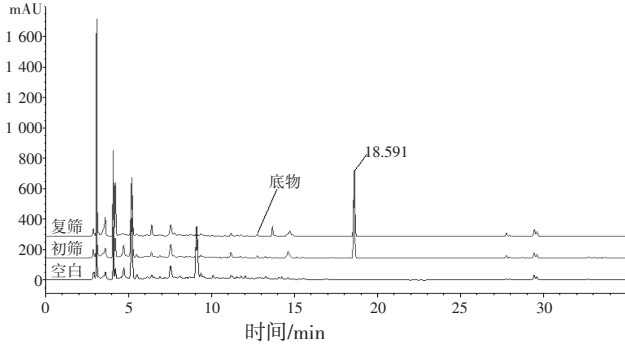


图 5 产黄青霉 (CGMCC 3.521) 转化发酵液的 HPLC 图
Figure 5 HPLC Chromatogram of *Penicillium Chrysogenum* (CGMCC 3.521) fermentation liquid

4 讨论

本实验利用 70%乙醇对连翘果实进行粗提,并分别经石油醚、乙酸乙酯及正丁醇萃取,所得的乙酸乙酯部位经反复层析分离后,得精制化合物连翘苷,得率可达 3%以上。通过微生物转化实验,筛选出可将连翘苷转化为连翘脂素的专一性菌株。为保证转化结果的稳定性,菌株经过初筛确定出具有转化能力的菌株,然后将筛选出的菌株进行复筛,最终筛选出初筛与复筛结果一致的菌株。初筛结果表明在 32 种菌株中有 20 种菌株具有将连翘苷转化为连翘脂素的能力,然后这 20 种菌株进行复筛,其中有 9 种菌株具有较强的转化能力,筛选的菌株中雅致小克银汉霉(CGMCC 3.1207)及产黄青霉(CGMCC 3.521)的转化率高。本实验为连翘脂素的制备探索出了一条适用于工业化生产的道路。实验筛选出了能将连翘苷转化为连翘脂素的高效专一性菌株,具有一定的工业化价值。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 267.
- [2] 汪青波. 连翘叶中连翘脂素的制备工艺研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- [3] 周敏. 《神农本草经》之森立之辑本探析[C]//全国第十一届中医医史文献学术研讨会论文集, 2008: 58-60.
- [4] 冯治朋, 高秀强, 韩颜超, 等. 连翘的研究进展[J]. 现代农业科技, 2018, 47(12): 60-62, 64.
- [5] TAKIZAWA Y, SUZUKI E, MITSUHASHI T. Studies on naturally occurring antioxidant (i): isolation and determination of natural phenolic antioxidants from *Forsythia suspensa* Vahl[J]. Bulletin of Tokyo Gakugei University, 1981, 33: 119-123.
- [6] WANG Z, XIA Q, LIU X, et al. Phytochemistry, pharmacology, quality control and future research of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 210: 318.
- [7] 宋建平, 张立伟. 连翘木脂素研究进展[J]. 文山学院学报, 2019, 32(6): 28-34.
- [8] NISHIBE S, CHIBA M, HISADA S. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae fructus." I. on the constituents of *Forsythiae fructus* on the market[J]. Yakugaku Zasshi, 1977, 97(10): 1134-1137.
- [9] 全云云, 袁岸, 龚小红, 等. 连翘抗炎药效物质基础筛选研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 435-438, 471.
- [10] HU N H, WANG C, DAI X Y, et al. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 248: 112361.
- [11] 毛威. 连翘化学成分及其抗肿瘤活性的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2009.
- [12] 王恩力, 姚景春, 刘铮. 连翘苷元对大鼠免疫性肝纤维化的影响[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 161-164.
- [13] LIU W J, LU Y J, CHU S M, et al. Phillygenin, a lignan compound, inhibits hypertension by reducing PLC β 3-dependent Ca^{2+} oscillation[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 60: 103432.
- [14] 杨捷玲, 李琛, 刘青, 等. 连翘苷元对老年大鼠氧化应激和肾功能的改善作用[J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(1): 77-82.
- [15] NIKAIIDO T, OHMOTO T, KINOSHITA T, et al. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by lignans[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin[J], 1981, 29(12): 3586-3592.
- [16] 徐娜, 许凯扬, 方芳, 等. 聚酰胺分离纯化黄栌叶漆黄素工艺研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(12): 160-163.
- [17] 杜凯, 马养民, 郭林新, 等. 大孔吸附树脂纯化杏仁皮单宁工艺的研究[J]. 应用化工, 2020, 49(5): 1183-1186, 1190.
- [18] 田燕泽. 中药连翘化学成分分离及其抗氧化活性评价[D]. 北京: 中央民族大学, 2011.

(编辑: 梁进权)