

综合静电场、立体场等因素引入氢键受体羰基，设计得化合物 35-36(图 6)。

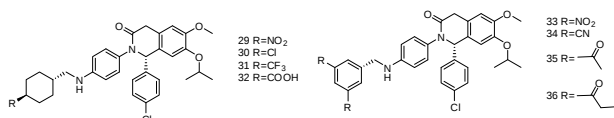


图 6 根据模型所设计的新型小分子

Fig 6 The designed new molecules with modifications on phenyl groups.

3 结论

应用 3D-QSAR 方法分别对一系列具有异喹啉酮结构的 p53-MDM2 结合抑制剂进行了结构与活性的研究，得到了具较高预测及拟和能力的 CoMFA 和 CoMSIA 模型，两者结论基本一致，但 CoMSIA 模型得到的结论更参考价值，结合五大场信息给出了满足高活性化合物的基本因素，其中静电场和氢键受体场影响较大，立体场影响较小，该模型为设计、合成高活性的小分子 p53-MDM2 结合抑制剂提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] FAKHARZADEH S S, ROSENBLUM-VOS L, MURPHY M, et al. Structure and organization of amplified DNA on double minutes containing the MDM2 oncogene [J]. Genomics, 1993, 15(2): 283-290.
- [2] FREEDMAN D A, WU L, LEVINE A J. Functions of the MDM2 oncoprotein [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(1): 96-107.
- [3] MOMAND J, ZAMBETTI G P, OLSON D C, et al. The MDM2 oncogene product forms a complex with the p53

- protein and inhibits p53-mediated transactivation [J]. Cell, 1992, 69(7): 1237-1245.
- [4] BOND G L, HU W W, LEVINE A J. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(1): 3-8.
- [5] CHENE P, FUCHS J, BOHN J, et al. A small synthetic peptide, which inhibits the p53-MDM2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines [J]. J Mol Biol, 2000, 299(1): 245-253.
- [6] GARCIA-ECHEVERRIA C, CHENE P, BLOMMERS M J J, et al. Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute 2 and tumor suppressor p53 [J]. J Med Chem, 2000, 43(17): 3205-3208.
- [7] DUNCAN S J, GRUSCHOW S, WILLIAMS D H, et al. Isolation and structure elucidation of chlorofusin, a novel p53-MDM2 antagonist from a fusarium sp [J]. J Am Chem Soc, 2001, 123(4): 554-560.
- [8] KLEIN C, VASSILEV L T. Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer [J]. Br J Cancer, 2004, 91(8): 1415-1419.
- [9] WANG S M, DING K, LU Y P, et al. Structure-based design of potent, non-peptide small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction starting from an inactive lead [J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2005, 230: U2700-U2700.
- [10] DING K, LU Y, NIKOLOVSKA-COLESKA Z, et al. Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors [J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(29): 10130-10131.
- [11] LU P, XIA W, ZHANG R S. CoMFA and CoMSIA 3D-QSAR studies on quionolone carboxylic acid derivatives inhibitors of HIV-1 integrase [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45(8): 3413-3419.
- [12] GUGAN K, CHANGDEV G G, THIRUMURTHY M, et al. Binding site analysis of CCR2 through in silico methodologies: docking, CoMFA, and CoMSIA [J]. Chem Biol Drug Des, 2011, 78(1): 161-174.
- [13] BERGHAUSEN J, BUSCHMANN N, FURET P, et al. Substituted isoquinolines and quinazolinones: US, PCT/EP2010/070364 [P]. 2011-06-30.

收稿日期: 2012-11-30

半仿生-酶法提取甘草中甘草酸的工艺研究

张卉, 赵婷婷, 戴柳江, 尤晓娟, 郭增军* (西安交通大学医学院药理学系, 西安 710061)

摘要: 目的 研究半仿生-酶法提取甘草中甘草酸的最佳工艺。方法 分别采用β-葡聚糖酶, 果胶酶, 提取用酶, 纤维素酶以及半仿生-纤维素酶对甘草进行提取, 通过高效液相色谱法检测甘草酸得率。以甘草酸得率和干膏收率为考察指标, 对半仿生酶法进行正交试验优化。结果 该法的最佳提取条件为提取温度 80 ℃, 料液比 1:18, 提取时间为 2 h。结论 半仿生-纤维素酶提取甘草酸的方法经济有效, 可作为甘草酸提取工艺应用。

关键词: 甘草; 甘草酸; 半仿生-酶法; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0969-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81172957)

作者简介: 张卉, 女, 博士, 讲师 Tel: (029)82655137
教授 Tel: (029)82655133 E-mail: guozj@mail.xjtu.edu.cn

E-mail: zhanghuilinda@mail.xjtu.edu.cn

*通信作者: 郭增军, 男, 博士,

Semi-bionic Enzyme Extraction Method of Glycyrrhizic Acid in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

ZHANG Hui, ZHAO Tingting, DAI Liujiang, YOU Xiaojuan, GUO Zengjun* (Faculty of Pharmacy, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the suitable semi-bionic enzyme extraction method of glycyrrhizic acid in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **METHODS** β -Dextranase, pectinase, extraction enzyme and cellulase were tested to determine which one was the most appropriate enzyme for glycyrrhizic acid extraction. The cellulase was selected and the semi-bionic cellulase extractions were performed in orthogonal experiment with three levels for three factors. Content of the glycyrrhizic acid in all the extracts were tested with HPLC. **RESULTS** Based on the content of glycyrrhizic acid and the extract yield, the preferred process of the orthogonal experiment was determined as: extraction temperature of 80 °C, extraction time of 2.0 h and solid-liquid ratio of 1 : 18. **CONCLUSION** Semi-bionic enzyme extraction is an economical and effective method for glycyrrhizic acid, which can be used in the extraction process of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma.

KEY WORDS: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; glycyrrhizic acid; semi-bionic enzyme method; extraction process

甘草(*Glycyrrhizae*)为豆科(*Leguminosae* sp.)甘草属(*glycyrrhiza*)植物,以根茎入药,是中药中应用最广泛的药材之一,有着悠久的药用历史,其药性和缓,有调和诸药之功^[1]。甘草的主要成分包括甘草酸、甘草次酸^[2-3]、黄酮类化合物、多糖^[3]等,其中以甘草酸为其主要有效成分。甘草酸具有抗病毒、消炎、抗过敏和抗肿瘤等作用^[3-7],近年来,有研究表明甘草酸也有抗艾滋病作用,引起医药界的广泛注意^[3,5]。甘草酸还是天然的甜味剂,其甜味是蔗糖的 200~300 倍,常用作食品添加剂^[7]。此外,甘草酸还用于化妆品、烟草等领域,是一个十分重要的医药和精细化工产品,需求量很大。为此很多天然药物研究者投入到甘草酸提取精制工艺的研究中。

目前,甘草酸的提取工艺除传统的醇提法,稀氨水提取法^[7]外,研究者们还将更多的提取中药的先进方法用于甘草酸的提取,如超声提取法、微波萃取法、超临界流体萃取法^[3, 5-6, 8-9]及三液相萃取法^[10]等。

半仿生-酶法(semi-bionic enzyme extraction)是建立在半仿生提取法的基础上与生物酶结合起来的一种新的中药提取方法,目前该法仍在进一步研究中^[11]。其原理是先选择合适的酶对中药材进行预处理,破坏其细胞壁结构,加快有效成分溶出速率,提高提取效率,缩短提取时间,然后,再按半仿生法模拟胃肠道环境,对中药有效成分进行提取。此法既考虑到了单体成分,又考虑到活性混合部位,而且为了保证酶的活性,提取温度应在 37~60 °C 之间^[11],这样也可以避免高温对化合物结构的破坏。

本实验主要通过对半仿生-酶法进行正交设计

与条件优选,获得最佳提取工艺条件,为甘草酸的提取工艺提供一种新的方法。

1 仪器与试剂

PHS-3C 型 pH 计(上海佑科仪器仪表有限公司); Mellter AE240 电子天平(Mellter-Toledo Group); Thermo Spectra System P2000 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司),色谱柱为 Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社)。

甘草,购自陕西省药材批发市场,经西安交通大学医学院药学系郭增军教授鉴定为药用植物甘草的根茎。甘草酸对照品(含量:99.98%),购于中国药品生物制品检定所,批号 110731-201116。果胶酶、纤维素酶、提取用酶、 β -葡聚糖酶、甲醇、乙醇、磷酸、冰醋酸、高氯酸、十二水合磷酸氢二钠、一水合柠檬酸等化学试剂均为分析纯;液相用乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的建立

精密称取 10 mg 甘草酸对照品于 50 mL 量瓶中,加乙腈-0.05%磷酸水溶液(40 : 60)作溶剂定容至刻度,摇匀。分别精密量取上述对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 置于 10 mL 量瓶中,加溶剂定容至刻度,摇匀。用 0.25 μ m 滤膜过滤,然后分别进样 25 μ L,每个浓度进样 3 次。流动相与样品溶剂相同,检测波长为 247 nm,色谱柱为 Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流速为 1.0 mL·min⁻¹。以平均峰面积值为纵坐标,甘草酸浓度为横坐标,绘制标准曲线,获得线性方程为 $Y=409\ 6021.43X-4\ 249.02$, $r=0.998\ 6$,浓度范围是 0.004~0.024 mg·min⁻¹。

2.2 提取方法

2.2.1 酶的选择 分别称取 4 份甘草粉末 10 g, 用 50 mL 蒸馏水浸泡 24 h, 用柠檬酸和磷酸氢二钠将 pH 调为约 4.5, 再分别加入 0.05 g β -葡聚糖酶、果胶酶、提取用酶或纤维素酶, 然后 50 °C 水浴酶解 2 h。酶解后过滤, 药渣加入 100 mL 70%乙醇回流 2 次, 每次 2 h。合并提取液, 旋蒸干燥得浸膏。分别取 40 mg 浸膏置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂定容至刻度, 摇匀。用 0.25 μ m 滤膜过滤, 进样 25 μ L, 测定甘草酸的含量, 结果见表 1。根据干膏和甘草酸得率, 选择纤维素酶作为半仿生-酶法的生物酶。

表 1 酶提取干浸膏与甘草酸得率

Tab 1 Comparison of extracting process by four zymolysis methods

酶	干膏得率/%	甘草酸提取率/%
β -葡聚糖酶	39.29	0.806
果胶酶	39.53	0.830
提取用酶	40.61	0.867
纤维素酶	43.21	0.870

2.2.2 半仿生-酶法正交设计 选取提取温度、提取时间和料液比作为 3 个因素, 每个因素各取 3 个

表 2 酶提取干：浸膏与甘草酸得率半仿生-纤维素酶法 L9(33)正交实验及结果分析

Tab 2 Orthogonal design and results of semi-bionic-cellulase zymolysis

实验号	A 温度/°C	B 料液比	C 时间/h	干膏得率/%	甘草酸提取率/%
1	60	1 : 10	1.5	62.00	0.685
2	60	1 : 14	2.0	72.83	0.796
3	60	1 : 18	2.5	85.46	0.900
4	70	1 : 10	2.0	61.81	0.678
5	70	1 : 14	2.5	76.32	0.830
6	70	1 : 18	1.5	82.52	0.895
7	80	1 : 10	2.5	62.14	0.758
8	80	1 : 14	1.5	77.31	0.945
9	80	1 : 18	2.0	85.07	1.093
K1	0.238 1	0.212 1	0.252 5		
K2	0.240 3	0.257 1	0.256 4		
K3	0.279 3	0.288 5	0.248 8		
k1	0.079 4	0.070 7	0.084 2		
k2	0.080 1	0.085 7	0.085 5		
k3	0.093 1	0.096 2	0.082 9		
R	0.013 7	0.025 5	0.002 5		
主次顺序		B>A>C			
优水平	A ₃	B ₃	C ₂		
优组合		A ₃ B ₃ C ₂			

水平: 水浴温度(60, 70, 80 °C), 提取时间(1.5, 2.0, 2.5 h), 料液比(1 : 10, 1 : 14, 1 : 18 g·mL⁻¹)。采用 L9(3⁴)正交表进行试验^[12]。

2.2.3 半仿生-酶法提取 取甘草粉 10 g, 加入 pH 2.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, 50 °C 恒温振荡 2 h, 然后升温至 85 °C, 保持 30 min, 调 pH 到 4.5, 再加入 0.05 g 纤维素酶, 于 50 °C 水浴酶解 40 min 后, 过滤, 滤渣依次加入 pH 值分别为 7.5, 8.3 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液作为提取液, 分别于不同的温度下水浴不同时间(根据正交表决定), 合并三次提取液, 蒸干。

2.2.4 甘草酸提取量测定 分别取 10 mg 上述半仿生-酶法提取的浸膏置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂定容至刻度, 摇匀, 过滤, 每个浸膏溶液进样 3 次, 每次进样 25 μ L, 流速为 1 mL·min⁻¹, 测定浸膏中甘草酸含量。半仿生-酶正交实验分析结果见表 2。以甘草酸得率为判定指标, 根据结果分析可知, 影响最大的因素是料液比, 其次是提取温度, 影响最小的是时间, 最佳的工艺条件为 A₃B₃C₂, 即提取温度 80 °C, 料液比 1 : 18, 提取时间为 2 h。

2.3 方法学考察

2.3.1 仪器精密度 精密量取 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草酸对照品溶液 1.2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂至刻度, 摇匀, 过滤, 重复进样 6 次。RSD 为 1.89%。

2.3.2 重复性 取上述半仿生-酶法提取浸膏 101.18 mg , 置于 25 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂至刻度, 摇匀。再精密移取 2 mL 上述溶液至 10 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂定容至刻度, 摇匀, 过滤, 进样。重复 5 次, RSD 为 0.62%。

2.3.3 加样回收率 精密称取上述半仿生-酶法提取浸膏 186.18 mg , 分别加入其中甘草酸含量 80%, 100% 和 120% 的甘草酸对照品, 置于 25 mL 量瓶中, 加流动相溶液作溶剂定容至刻度, 摇匀。精密移取 5 mL 该溶液置于 50 mL 量瓶中, 加流动相溶液至刻度, 摇匀。过滤。进样 $25\text{ }\mu\text{L}$, 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。计算加样回收率。加样回收率=(加样试样测定值-试样测定值)/加标量 $\times 100\%$ 。平均加样回收率为 97.50%, RSD 为 3.35%。

2.4 半仿生-酶法验证试验

分别称取 10 g 甘草, 加入 80 mL pH 2.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡 2 h 后升温至 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 30 min, 然后调 pH 4.5, 再分别加入 0.05 g 纤维素酶, 于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴酶解 40 min 后, 过滤, 滤渣依次加入 50 mL pH 值分别为 7.5, 8.3 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液作为提取液, 分别在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 h。蒸干得浸膏。分别取 10 mg 浸膏置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶液至刻度, 摇匀。过滤, 分别进样 $25\text{ }\mu\text{L}$, 结果见表 3。可以看出半仿生-纤维素酶提取法工艺稳定, 具有可行性。

表 3 验证实验结果

Tab 3 Verification of three batches of medicinal materials

批次	干膏得率/%	甘草酸提取率/%
1	73.01	1.009
2	72.35	1.212
3	85.04	1.121
平均值	76.80	1.114

3 讨论

甘草属根茎类药材, 质地较坚硬, 纤维素含量高, 故采用纤维素酶进行酶解可以破坏植物纤

维, 使药效成分更易溶出, 再结合半仿生提取, 模拟胃肠道环境, 更加促进了药效成分的顺利溶出, 提高了提取效率, 且提取过程不需要使用乙醇, 降低了提取成本, 提高了经济效益。

半仿生-纤维素酶提取甘草, 大大提高了干膏收率, 说明该提取方法极大地破坏了纤维组织结构和植物细胞壁, 使细胞内容物大量释放, 对于这些成分的种类, 它们是否可以增加甘草的药效, 以及在复方中能否起到协同作用等, 还需要进一步的分析研究。

REFERENCES

- [1] LI S Z. Compendium of Materia Medica(本草纲目白话本) [M]. Chongqing: Chongqing Press, 2006: 23.
- [2] YUAN K W, BAI F, YANG B. Extraction and purification methods of glycyrrhizic acid [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2002, 33(7): 362-364.
- [3] LU S P, SUN Q, WANG J H. Survey of study on the extraction, purification and determination methods of glycyrrhizic acid in licorice [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 31(5): 357-360.
- [4] WANG S, HUANG Y, CAO L. Determination and extraction of glycyrrhizic acid in licorice [J]. Sci Tech Chem Ind(化工科技), 2010, 18(1): 76-80.
- [5] CHARPE T W, RATHOD V K. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies [J]. Chem Eng Proc, 2012, 54(4): 37-41.
- [6] ZHANG H Y, LI W, FAN C L. Study on the extraction of glycyrrhizic acid from licorice [J]. Henan Sci(河南科学), 2009, 27(9): 1069-1071.
- [7] ZHOU Y Z, HAN L, LIU X H, ET AL. Study on HPCE fingerprint of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(5): 405-409.
- [8] LING X J, WAN D J, WU Q Z. Research on extraction technology of glycyrrhizic acid [J]. J Hubei Univ Tech(湖北工业大学学报), 2006, 21(2): 12-16.
- [9] LIU M Y, WANG B C. Advances in new technologies applying to Chinese materia medica extraction [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41(2): 169-175.
- [10] SHEN S F, CHANG Z D, LIU J. Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extract by three-liquid-phase extraction systems [J]. Sep Purif Technol, 2007, 53(3): 216-223.
- [11] FU Q. Modern Technology of Drug Separation and Analyzing (现代药物分离与分析技术) [M]. Xi'an: Xi'an Jiaotong Univ Press, 2011: 115.
- [12] CONG H X, LIU J, ZHANG Y J. Semi-bionic enzyme extraction method of arasaponin [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40(6): 905-907.

收稿日期: 2012-12-25