

试品溶液中仍然有与聚乳糖酸结合的粉防己碱,随着时间的推移,逐渐将防己碱释放出来,导致溶液中粉防己碱的测量值升高。提示在今后研究中,应当在供试溶液稳定后再取样测定,以免产生误差。

粉防己碱对照品在190~400 nm作光谱扫描,最大吸收波长有2个,分别为224 nm和282 nm。由于282 nm处干扰少,故选择282 nm作为粉防己碱的检测波长。

References:

[1] Woodfield T B, Bezemer J M, Pieper J S, et al. Scaffolds for

tissue engineering of cartilage [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2002, 12 (3): 29-36.
 [2] Ma P X, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 46 (1): 60-72.
 [3] Xu Y G, Hu S X, Bu Y S, et al. Content of tetrandrine determined by RP-HPLC [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2004, 7 (3): 186-188.
 [4] Zhen P, Chen R R, Wang H Q. Analysis of tetrandrine and demethyltetrandrine in Chinese medicinal herbs *Stephania tetrandra* S. Moore by high performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 1994, 10 (1): 20-23.
 [5] Wang T Y, Yang W Y. RP-HPLC determination of tetrandrine in three Chinese medicinal herb [J]. *Anal Test Tech Instru (分析测试技术与仪器)*, 1995, 1 (1): 31-34.

漆酶提取黄芪中黄芪皂苷的研究

蒲 军,郭 梅,杜连祥*,路福平

(天津科技大学生物工程学院 工业微生物重点实验室,天津 300222)

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,是最主要的3种木质素降解酶之一,可以催化氧化酚类化合物脱去羟基上的电子或质子,形成自由基,导致酚类及木质素类化合物裂解,有效的降解木质素。近年来,有关漆酶的研究越来越受到国际上的重视,它在保护环境、造纸工业、食品工业及其他领域均有很大的研究价值和潜力。

中药中的杂质大多为淀粉、果胶、蛋白质等,可选用合适的酶予以分解除去。目前,应用较多的是纤维素酶。大部分的中药材的细胞壁是由纤维素构成,植物的有效成分往往包裹在细胞壁内,用纤维素酶酶解破坏植物细胞壁,有利于有效成分的提取。将漆酶等木质素降解酶应用于中药提取的报道较少。本实验将漆酶用于黄芪中有效成分的提取,以期达到提高提取率、缩短提取时间、减少能耗和有效保存中药有效成分生物活性的目的。

1 材料

漆酶生产菌来自杂色云芝 *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel,购自中国科学院;黄芪甲苷对照品,购自中国药品生物制品检定所,批号 0781-9908;黄芪饮片购自天津中新药业公司,经本校王海宽鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;其他试

剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 漆酶粗酶液的制备:取保藏的杂色云芝斜面进行活化培养,挑取适量菌丝转接于PDA培养基平板上,25℃静置培养6d;用打孔器取直径为8mm琼脂块按一定的接种量接入三角瓶中,25℃振荡培养(150 r/min),定期检测酶活;到第13天下摇床,发酵液经8层纱布滤过后于12 000 r/min离心2 min,取上清液,测定酶活后-70℃保存,使用前再测酶活。

2.2 黄芪饮片的水浸提取及酶解浸提^[1]:将黄芪饮片粉碎后过40目筛,称取1g加入适量水混匀,置于一定温度的水浴锅中,保温水浸提取一定时间后滤过,取滤液。同样取1g黄芪粉加入适量水混匀,用盐酸将pH值调至漆酶反应的最适pH值,温度调至漆酶反应的最适温度,单独加入漆酶粗酶液处理一定时间,然后浸提,滤过,取滤液。

2.3 供试品溶液的制备^[2,3]:取全部滤液用15 mL水饱和正丁醇萃取3次,合并萃取液,用15 mL 40%氨试液洗涤2次,用15 mL正丁醇饱和水洗涤2次,于70℃旋转蒸干正丁醇,用2 mL甲醇溶解残渣,即得。

2.4 标准曲线的制备^[4]:称取5 mg黄芪甲苷对照

收稿日期:2005-02-25

作者简介:蒲 军(1979—),男,四川达州人,硕士研究生,研究方向为微生物与生化制药。Tel: (022) 60270040

E-mail: pj0701@sina.com

* 通讯作者 杜连祥 Tel: (022) 60270037

品,用无水乙醇溶解并定容至 10 mL,分别吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,并用无水乙醇补足体积至 0.5 mL,然后分别吸取 100 μ L 用香草醛-硫酸比色法测定其吸光度值,以吸光度值为纵坐标,黄芪甲苷质量为横坐标绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 3.136 X + 0.015 8$, $R^2 = 0.998 3$;线性范围:0.05~0.25 mg。

2.5 黄芪皂苷的测定^[5]:以香草醛-硫酸比色法测定黄芪皂苷。取适量样品挥干溶剂,加入新配制的 8%香草醛 0.5 mL 摇匀,置冰浴中缓缓加入 72%硫酸 5 mL 摇匀,62 $^{\circ}$ C 水浴保温 20 min,冰浴中止反应,于 538 nm 处测吸光度。

2.6 漆酶活力的测定:在 3 mL 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 4.5)和 100 μ L 0.5 mmol/L 丁香醛连氮(醇溶)中加入 50 μ L 粗酶液,于 25 $^{\circ}$ C 准确反应 5 min,冰浴终止反应,在 525 nm 处测定吸光度值。漆酶活力单位的定义:以 1 min 内催化氧化 1 μ mol 底物的酶量为 1 个酶活单位。(525 nm 处丁香醛连氮的摩尔消光系数 $\epsilon_{525} = 65\ 000\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

3 结果

3.1 黄芪水浸提取条件的确定:根据预试验,取 1 g 黄芪加水 50 mL,100 $^{\circ}$ C 煎煮 90 min,测得黄芪皂苷为 2.587 mg/g。

3.2 黄芪酶解条件研究

3.2.1 漆酶的加入量对提取率的影响:加入不同量的漆酶粗酶液(83 U/L)对黄芪进行酶解,考察漆酶对提取效果的影响,结果见表 1。由表 1 可知:加入漆酶可以有效的提高黄芪皂苷的提取效果,并且提取效果随着漆酶粗酶液加入量的递增而呈递增趋势,考虑到 10 mL 和 15 mL 相差不大,故选择最佳漆酶粗酶液加入量为 10 mL。

表 1 漆酶加入量对黄芪甲苷提取率的影响

Table 1 Effect of laccase volume on extraction of astragaloside

漆酶加入量/mL	黄芪甲苷/(mg · g ⁻¹)
0	2.579
5	3.423
10	4.281
15	4.298

3.2.2 漆酶酶解条件正交试验:采用 L₉(4³)正交表进行试验,因素与水平设计见表 2,试验安排和结果见表 3。结果表明:影响黄芪皂苷提取率的主要因素是反应温度,其次是 pH 和反应总体积,影响最小的是时间,所以优选最佳工艺为:A₁B₃C₃D₁。按此最佳条件试验,测得黄芪皂苷提取率为 4.322 mg/g。本

实验添加漆酶时需将 pH 值调至 3.5,所以必须考察不加漆酶而在 pH 3.5 酸性条件下对黄芪提取率的影响。为此以优化的漆酶酶解工艺条件,不加入漆酶的情况下,测得黄芪皂苷为 2.987 mg/g。结果表明黄芪经过酸处理后提取率有一定的提高,但与经漆酶酶解的提取率相比相差很大,所以漆酶才是提取率提高的主要因素。

表 2 漆酶酶解因素与水平

Table 2 Factor and level of laccase enzymolysis

水平	因素			
	A 温度/ $^{\circ}$ C	B pH 值	C 时间/min	D 反应总体积/mL
1	30	3.5	30	10
2	40	4.5	60	20
3	50	5.5	90	30

表 3 漆酶酶解正交试验安排和结果

Table 3 Orthogonal test design and results of laccase enzymolysis

试验号	A	B	C	D	黄芪皂苷/(mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	1	4.279
2	1	2	2	2	3.730
3	1	3	3	3	3.691
4	2	1	2	3	3.512
5	2	2	3	1	4.225
6	2	3	1	2	3.150
7	3	1	3	2	3.327
8	3	2	1	3	2.740
9	3	3	2	1	3.208
K ₁	3.883	3.689	3.390	3.887	
K ₂	3.612	3.548	3.483	3.386	
K ₃	3.075	3.333	3.698	3.298	
R	0.808	0.356	0.308	0.589	

4 讨论

将黄芪经漆酶酶解处理后再进行提取可以有效的提高黄芪皂苷的提取率。这是因为木质素包裹纤维素、半纤维素等物质形成的木质纤维素是植物类中药材的主要成分,植物类药材的有效成分往往被包裹在其中,由于木质素结构复杂、难以降解,从而影响了中药有效成分的提取利用。而漆酶可以有效地降解木质素,将其应用于中药的提取可以解脱木质素的束缚,大大增进中药有效成分的释放,如果再加入纤维素酶和果胶酶将中药材中的相应杂质酶解掉,更可大幅度提高中药的提取效率。

本实验结果提示,其他植物类中药材均可通过漆酶酶解提取法来提高其有效成分的提取效率,尤其是以木质纤维素为主要成分的中药材。将中药材经漆酶酶解后,除了水浸提取外还可对其他的提取方法进行研究,如乙醇回流、渗漉、超声波、微波等提取方法,考察漆酶处理对提取率的影响。

某些中药用酶法提取时收率明显提高,具有较大的应用潜力,但该技术同时也存在着一定的局限性。酶法提取对实验条件要求较高,为使酶发挥最大作用,需先通过实验确定通过最适温度、pH 及最适作用时间等。能否将其用于工业化的中药提取中,还需综合考虑酶的浓度、底物的浓度、抑制剂和激动剂等对提取物有何影响,故有待进一步深入研究探讨。

References:

- [1] Jiang S T, Pan L J, Zhang Z, *et al.* Experimental study on the extraction of instant green tea with enzymes [J]. *Transact Chin Soci Agric Eng* (农业工程学报), 1998, 14 (4): 234-238.
- [2] Jia X B, Chen Y, Cai B C, *et al.* Study on the method of purifying astragaloside [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25 (11): 866-868.
- [3] Liu Z F, Liu X P, Liang X Y, *et al.* Extraction and separation of general flavones and general saponins in *Astragalus* [J]. *Acta Univ Nankai; Nat Sci* (南开大学学报:自然科学版), 2003, 36 (3): 22-25.
- [4] Han L J, Yan Q J, Jian Z Q, *et al.* Study on extracting technology of astragalin polysaccharide and astragaloside [J]. *Transact Chin Soci Agric Eng.* (农业工程学报), 2000, 16 (5): 118-121.
- [5] Wu Y P, Cao Y, Cao Z Z, *et al.* Technology optimization of extracting activity components from *Astragalus membranaceus* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12 (10): 876-877.

茵陈蒿汤颗粒的质量标准研究

刘 晟, 徐 宇*, 李 芳, 边 原, 王 谦

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

茵陈蒿汤出自于《伤寒论》,以茵陈蒿、大黄、山栀子 3 味药材组成,具有清热、利湿等作用,主治湿热黄疸、面目俱黄、口中渴以及各种肝胆疾患^[1]。番泻苷 A 为大黄中所含的具有泻下作用的有效成分。为了更简便、快速、准确地控制产品质量,本实验对该制剂中的茵陈蒿、大黄、山栀子进行了定性鉴别,并采用 HPLC 法对该制剂中的有效成分番泻苷 A 进行测定。

1 仪器和材料

日本岛津 LC-9A 高效液相色谱仪;SPD-6AV 紫外可见光检测器;SIL-6B 自动进样器;C-R4A 数据处理机;瑞士 Buchi 旋转薄膜蒸发器;SB3200 超声波仪。

硅胶 G 预制板(20 cm×10 cm);番泻苷 A 对照品(日本松浦药业股份公司,04Q4);乙腈(色谱纯);高纯水;茵陈蒿、大黄、山栀子对照药材均由四川大学华西药学院生药教研室王天志教授鉴定,茵陈蒿为茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thunb. 的干燥地上部分,大黄为药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎,山栀子为栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实;茵陈蒿汤颗粒(贵州省宏宇药业有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 定性鉴别

2.1 供试品溶液的制备:取茵陈蒿汤颗粒 2.0 g,加甲醇 20 mL,超声提取 30 min,滤过,滤液减压浓缩至干,残留物用甲醇 5 mL 溶解,即得供试品溶液 I。取本品 5.5 g,按供试品溶液 I 的制备方法同样操作,得供试品溶液 II。

2.2 对照药材溶液的制备:分别称取各味对照药材,加 10 倍量水提取 2 次(0.5、1 h),浓缩,喷雾干燥,得各味药材的浸膏粉。分别取茵陈蒿浸膏粉 1.0 g、大黄浸膏粉 0.5 g、山栀子浸膏粉 1.0 g,按供试品溶液 I 的制备方法同样操作,分别得茵陈蒿、大黄、山栀子的对照药材溶液。

2.3 空白对照溶液的制备:按处方比例称取生药,并依次去掉其中一味生药提取,加 10 倍量水提取,浓缩,喷雾干燥,得各味生药的空白对照干浸膏粉。分别取茵陈蒿空白干浸膏粉 1.0 g,大黄空白干浸膏粉 6.5 g,山栀子空白干浸膏粉 1.2 g,按供试品溶液 I 的制备方法同样操作,分别得茵陈蒿、大黄、山栀子的空白对照溶液。

2.4 TLC 鉴别

2.4.1 茵陈蒿的鉴别:取供试品溶液 I、茵陈蒿对照药材溶液和茵陈蒿空白对照溶液各 5 μ L,点样于

收稿日期:2005-02-11

作者简介:刘 晟(1980—),男,四川绵阳三台县人,正攻读药物分析专业的硕士学位,研究方向为中药质量标准化和中药新药研究。

Tel: (028) 85434102 E-mail: liusheng-liusheng@tom.com

* 通讯作者 徐 宇 Tel: (028) 85503028