

始终控制温度为 30℃, 所得复乳较稳定, 囊形较好。

多囊脂质体粒径较大, 对机械损伤、挤压较为敏感, 采用低速离心即能方便有效地达到分离的目的。本实验考察了不同离心转速对包封率的影响, 最终确定的条件为 2 500 r/min 离心 5 min。

参考文献:

- [1] 刘强, 周莉玲, 李锐. 青藤碱的研究概况[J]. 中草药, 1997, (4): 247-249.
- [2] Zhong H J, Deng Y J, Wang X M, *et al.* Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1-2): 15-24.
- [3] Katre N V, Asherman J, Schaefer H, *et al.* Multivesicular liposome (DepoFoam) technology for the sustained delivery of insulin-like growth factor-I (IGF-I) [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87(11): 1341-1346.
- [4] Stephen B. H. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system: DepoFoam™ technology [J]. *Cancer J*, 2001, 3(7): 219-227.
- [5] Qiang Y, John A, Mark S, *et al.* DepoFoam™ technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs [J]. *J Controlled Release*, 2000, 64: 155-166.
- [6] 肖超菊, 齐宪荣, 艾尼瓦尔, 等. 顺铂缓释多囊脂质体的制备和体外释放性能研究[J]. 药学报, 2003, 38(2): 133-137.
- [7] Sankaram M. A lipid based depot (DepoFoam 1 technology) for sustained release drug delivery [J]. *Prog Lipid Res*, 2002, 41: 392-406.
- [8] Ain S K, Jain R K. Design and development of multivesicular liposomal Depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium [J]. *Pharm Sci Tech*, 2005, 6(1): 35-41.
- [9] Jia-ai A Z, John P. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50: 357-364.
- [10] Laugel C, Chaminade P, Baillet A, *et al.* Moisturizing substance entrapped in w/o/w emulsions analytical methodology for formulation, stability and release studies [J]. *J Controlled Release*, 1996, 38(1): 59-67.
- [11] 王晓梅, 唐星, 何海冰. 多囊脂质体的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(15): 1242-1246.

复合酶法提取丹参中丹参素的研究

杨皓明, 齐 巍, 何志敏*, 王红蕾

(天津大学化工学院化学工程研究所, 天津 300072)

摘要:目的 研究酶在丹参提取过程中的作用, 确定不同因素对酶解提取效果的影响。方法 采用单因素实验方法与紫外检测分析方法, 以丹参素提取率为评价指标, 对原药粒度、酶用量、固液比、第一步酶解时间及第二步水提时间 5 个工艺参数分别进行实验, 以确定酶法提取的最佳工艺条件。结果 酶法提取丹参素的最佳工艺条件为: 酶解温度 50℃; pH=4.6; 粒度为 20~35 目; 酶底物质量比 1:200; 第一步酶解时间为 80 min, 固液比为 1:15; 第二步水提时间为 40 min, 固液比为 1:9。结论 通过本工艺得到的丹参素提取率为 84.61%, 且工艺条件温和, 对设备要求低, 不仅可以降低能耗, 还可以避免多糖类物质的糊化, 并减小丹参素在提取过程中被氧化的可能。

关键词:丹参素; 酶提取; 工艺条件

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)08-1161-04

Process of multi-enzyme assisted extraction of Danshensu from *Salvia miltiorrhiza*

YANG Hao-ming, QI Wei, HE Zhi-min, WANG Hong-lei

(Chemical Engineering Research Center, School of Chemical Engineering and Technology,

Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of enzyme in the extraction of *Salvia miltiorrhiza* and the influence of different factors on enzymatic extraction. **Methods** Monofactorial experiments were employed to examine the effects of the substrate size, enzyme consumption, ratio of solid to liquid, 1st enzymatic extraction time, and 2nd water extraction time on the extraction of *S. miltiorrhiza*. Ultraviolet-visible spectrophotometry was used to analyze the results and Danshensu extraction rate was regarded as standard. **Results** The data showed that the highest Danshensu extraction rate (84.61%) could be achieved at: $t=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4.6$, $\text{granularity}=20-35$ meshes, $\text{E-S}=1:200$, 1st enzymatic extraction time ≈ 80 min, $\text{S-L}=1:15$, 2nd water extraction time ≈ 40 min, $\text{S-L}=1:9$. **Conclusion** This process could be conducted

收稿日期: 2007-10-30

基金项目: 天津市应用基础研究计划面上项目(05YFJMJC09500)

作者简介: 杨皓明(1981—), 男, 天津市人, 天津大学化工学院 2003 级硕士研究生。

* 通讯作者 何志敏 Tel: (022)27407799 E-mail: zhe@tju.edu.cn

under mild conditions and in relatively simple equipment, which could help reduce energy cost, alleviate gelatinization, and lower the possibility of product oxidation, and thus it is considerably feasible.

Key words: Danshensu; enzymatic extraction; process conditions

丹参是唇形科鼠尾草属丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根,是中医常用的一味历史悠久的活血化瘀药^[1],具有行气止痛、宁心安神的功效^[2]。丹参的有效成分可分为脂溶性二萜类化合物和水溶性酚性化合物两种,其中水溶性成分丹参素[(D)-(+)- β -3,4-二羟基苯乳酸]是丹参发挥抗心肌缺血、改善微循环等作用的主要功效成分^[1]。虽然有学者通过(R)-(+)- β -3,4-二羟基苯丙酮酸还原制得丹参素^[3],或是从天然产物红根草^[4]、黄连^[5]、华尾鼠^[6]中提取出丹参素,但大多数研究还是将丹参作为丹参素的主要来源。在各种提取方法中,水煎法、冷凝回流法、索氏提取法的能耗过大,而超临界 CO₂ 循环逆流萃取^[7]、密闭微波辅助萃取^[8]、毛细管电泳处理^[9]存在设备要求高、处理能力低等缺点。本实验针对细胞壁这一阻碍目标物溶出的主要因素,采用复合纤维素酶对丹参细胞壁进行降解,在平衡生产成本和提取效果的基础上,确定一套高效、温和、环保、节能的丹参素提取工艺。

1 材料

U-2001 紫外可见分光光度计(日本日立);D-8401 型多功能调速器、搅拌器(天津利华仪器厂)。

丹参饮片购至天津协和药店,经过笔者鉴定,符合《中国药典》2005 年一部丹参项下要求;丹参素对照品购自复旦大学药学院天然药化研究所,质量分数>99%;Viscozyme L 酶制剂(诺维信公司)。

2 方法与结果

2.1 丹参素的测定

2.1.1 标准曲线的绘制:精密称取 9.9 mg 丹参素钠(相当于 8.91 mg 丹参素),用蒸馏水定容至 50 mL。准确移取 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 mL 置于 10 mL 量瓶,定容,摇匀。在 280 nm 下测定吸光度值。以吸光度对质量浓度进行回归,得标准曲线方程 $Y = 12.659 X, R^2 = 0.9987$ 。结果表明丹参素在 0.01~0.07 mg/mL 与吸光度的线性关系良好。

2.1.2 丹参中丹参素的测定:称取一定量丹参粉末,以药材与水比例为 1:50 g/mL 在 50℃下提取 90 min,共提取 3 次,抽滤,合并滤液,测定,得药材中丹参素的质量分数为 115.8 mg/g。

2.2 酶法提取工艺:将丹参适度粉碎为颗粒;按一定比例将酶液加入浸有丹参的水提液中,恒温、恒

pH 值酶解提取;所得提取液抽滤除渣;滤渣再按一定固液比进行二次纯水抽提;合并两次提取液,旋蒸浓缩;浓缩液经喷雾干燥或冷冻干燥制得丹参水溶性提取物干粉。

2.3 衡量指标的计算:以提取率为指标进行考察。提取率=丹参水提液中丹参素的总质量/所用丹参饮片片丹参素的总质量 $\times 100\%$ 。

2.4 最佳提取工艺参数的确定:由于植物细胞壁含有纤维素、半纤维素等多种成分^[10],组成比较复杂,而 Viscozyme L 酶制剂具有纤维素酶、 β -葡聚糖酶、半纤维素酶、木聚糖酶等多种酶活性,可有效降解植物细胞壁中的生物大分子,所以选用此酶作为实验用酶制剂。由于纤维素是植物细胞壁的主要成分,而纤维素酶又是 Viscozyme L 中的主要酶种,所以根据纤维素酶的特性确定最适酶解温度为 50℃、pH 4.6^[11]。提取试验在醋酸-醋酸钠缓冲溶液中进行,分别对原药粒度、酶用量、固液比、第一步酶解时间、第二步水提时间进行单因素试验考察,并以相同条件下不加酶粉的实验组作为对照。

2.4.1 药材粒度的选择:将不同粒度药材按照酶法提取工艺条件进行提取,结果见图 1。可以看出,无论是酶法提取还是溶剂(水)提取,提取率均随丹参原药粒度的减小而增大,且各粒度下酶作用效果显著,提取率均明显提高。药材粒度越小,与溶剂接触面积越大,且颗粒内纤维素结晶度越小,酶作用效果越强,均有利于目标溶质进入溶液主体;当药材粒度达到 35 目时,尽管酶对丹参中生物大分子的绝对降解作用将进一步增强,但酶解对提取效果的相对贡献却显著下降,表现为酶解提取率与纯水提取率之差明显减小,酶的部分作用被药材颗粒的粉碎所抵消。因此,为了充分发挥酶对底物的降解作用以促进丹参素的提取,选择提取率差值最大时的药材粒度,即 20~35 目。

同时考察了提取液终质量浓度随丹参药材粒度的变化趋势,见图 2。可见药材粒度越小,提取液中产物质量浓度越高,但酶解对提取过程的强化作用并未体现在产物终质量浓度上,在不同粒度下,酶解提取的产物质量浓度略低于纯水提取。

提取液体积随丹参药材粒度的变化趋势见图 3。可见粒度越小,酶提液体积越大,而水提液体积明

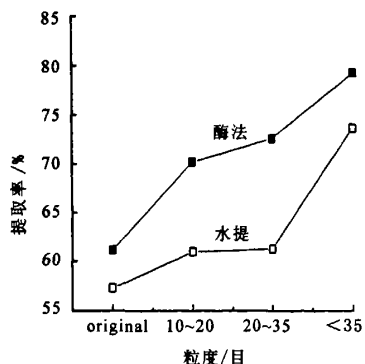


图 1 原药粒度对丹参素提取率的影响

Fig. 1 Effects of substrate size on extraction rate of Danshensu

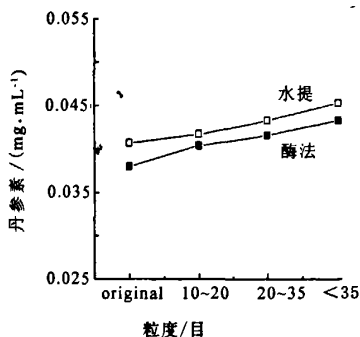


图 2 原药粒度对丹参素提取液浓度的影响

Fig. 2 Effects of substrate size on extract concentration of Danshensu

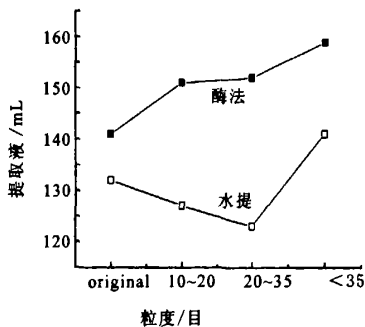


图 3 药材粒度对提取液体积的影响

Fig. 3 Effects of substrate size on extract volume

显低于酶提液。在提取初始阶段,溶剂首先通过细胞壁渗入胞内,使可溶性物质溶解,形成细胞内外浓度差^[12],以促进目标组分向溶液主体溶出;提取过程达平衡后,由于经过晾晒的丹参药材吃水能力很强,可吸收相当于其干重 2 倍以上的水分,使得此部分溶剂水连同溶解于其中的丹参素均滞留在胞内,因而影响了提取效果;而在酶法提取过程中,由于纤维素酶的破壁作用,丹参素溶出阻力减小,且药材颗粒持水能力大幅降低,初期渗入并驻留在胞内的水分

及溶于其中的可溶性成分被释放回溶液主体,因而明显增加了提取液体积,强化了丹参素的提取效果,这才是酶法提取率高于纯水提取率的真正原因。

2.4.2 酶用量的确定:酶与底物质量比对提取率的影响见图 4。可见随酶用量减少,提取率显著降低,说明酶解破壁作用在强化丹参素提取效果中的重要作用,尤其是当酶与底物质量比小于 1:150 后,提取率下降速度加快,酶与底物质量比为 1:500 时,酶已无作用,提取率与非酶法相当。综合考虑提取效果和提取成本两方面因素,选取提取率下降速度加快后的第一个点,即酶与底物质量比为 1:200。

2.4.3 两步法提取工艺中固液比的确定:两步法提取工艺中不同固液比对提取率的影响见图 5。根据相关文献报道设计的配比原则为:两次或一次提取总用水量不超过药材质量的 24 倍,第 2 次提取用水量应不多于第 1 次。

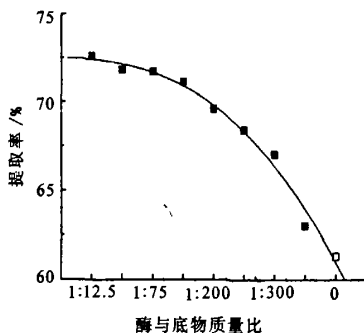
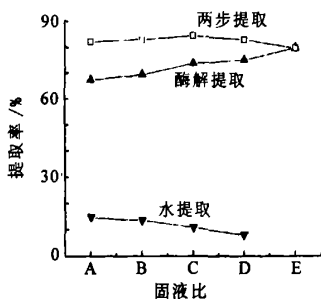


图 4 酶用量对提取率的影响

Fig. 4 Effects of enzyme consumption on extraction rate of Danshensu



A-1:10,1:10 B-1:12,1:12 C-1:15,1:9
D-1:18,1:6 E-1:24

图 5 固液比对丹参素提取率的影响

Fig. 5 Effects of ratio of solid to liquid on extraction rate of Danshensu

可见第 1 步酶解提取率随溶剂水的增多而增大;第 2 步纯水提取率却呈相反趋势,即第 1 步提取率越高,则第 2 步中无论溶剂水多寡,提取率反而越小。由此可见,一次酶解提取后药渣中丹参素残存量

是影响第 2 步提取效率的关键因素之一。在 5 种配比中,方案 C(两步提取分别采用 1 : 15 和 1 : 9 的固液比组合)可得到最高的总提取率 84.61%。值得一提的是:虽然方案 E(24 倍量水一步酶解提取)的效果要低于其他方案,但仍高达 79.9%,且提取总时间明显缩短,能耗降低,并省去了两次提取之间的固液分离,简化了操作工序。因此,实际应用中可根据不同需求选择提取率最高的方案 C 亦或操作简便的方案 E。

2.4.4 第 1 步酶解提取时间的确定:两步法提取工艺中第 1 步酶解时间对提取率的影响见图 6。设计原则为:选定不同酶解时间进行第 1 次提取;再以完全相同的条件进行长时间(100 min)第 2 次提取,以确保二次提取充分,最后,以两次总提取率为标准选择最佳酶解时间。

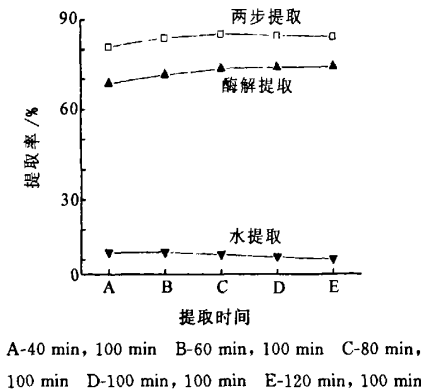


图 6 酶解时间对提取率的影响

Fig. 6 Effects of enzymatic hydrolysis time on extraction rate of Danshensu

可见酶解时间愈长,第 1 步提取率越高,但药渣中丹参素残存量越少,将会降低第 2 步水提的推动力与提取率,因此,较高的酶解提取率并不意味着较高的总提取率。实验结果表明:方案 C 即酶解 80 min 提取效果最佳。

2.4.5 第 2 步水提时间的确定:将丹参原药酶解提取 80 min 后,水提 30、40、50、60、100 min,结果丹参素的提取率分别为 10.54%、11.01%、10.91%、10.73%、11.24%。达到充分提取的最短用时即为最佳二次提取时间。二次提取率在水提 40 min 后已基本恒定。

2.5 不同提取工艺的比较:根据文献报道^[13],采用多步水煎法提取,操作过程为取 20~35 目丹参 15 g,以固液比 1 : 12 在沸水中提取 90 min,共提取两次,抽滤,合并滤液,测定吸光度值,计算丹参素的提取率。同时采用试验优化得到的最佳复合酶法进行提

取,最佳工艺参数:采用 viscozyme L 酶制剂,50 ℃,pH 4.6,粒度 20~35 目,酶用量为 1 : 200,第一步酶解提取时间 80 min,固液比 1 : 15;第二步水提时间 40 min,固液比 1 : 9。结果见表 1。

表 1 多步水煎提取与复合酶法提取的比较

Table 1 Comparison of multistep extraction between boiling water and enzyme-assisted extraction

方法	提取率/%	时间/min	能耗	设备要求	产物氧化程度
多步水煎法	86.59	180	高	高	严重
复合酶法	84.61	120	低	低	较轻

3 讨论

本工艺所得丹参素提取率比多步高温沸水煎煮法仅低 1.98%,比传统溶剂水提法高 3.55%,且提取时间比传统工艺缩短 1 h,温度从 100 ℃降至 50 ℃,大幅度降低了能耗,减轻了设备损害,避免了多糖类物质的糊化,也减小了丹参素在提取过程中被氧化的可能。

参考文献:

[1] 徐仁生. 丹参生物学及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990.

[2] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 第 2 卷. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1996.

[3] Pabsch K, Petersen M, Rao N N, et al. Chemo-enzymatic synthesis of rosmarinic acid [J]. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 1991, 110(5): 199-205.

[4] Zhao L M, Liang X T, Li L N. Prionitisides A and B, two phenolic glycosides from *Salvia prionitis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(3): 899-902.

[5] Shoji Y, Mayumi S, Itsuo N, et al. Isolation and characterization of phenolic compounds from *Coptidis rhizome* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(2): 527-531.

[6] Qian T X, Li L N. Isosalvianolic acid C, a depside possessing a dibenzoxepin skeleton [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(3): 1068-1070.

[7] 萧效良, 甘海寿, 廖幼鸣, 等. 中药丹参中活性成分超临界二氧化碳萃取工艺方法[P]. 中国专利: CN1256142, 2000-06-14.

[8] 陈雷, 杨屹, 张新祥, 等. 密闭微波辅助萃取丹参中有有效成分的研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(1): 35-38.

[9] 芮建中, 邹汉法, 袁倚盛, 等. 毛细管电泳法分离丹参水溶性有效成分——丹参素, 原儿茶酚和原儿茶酸 [J]. 中草药, 2000, 31(5): 337-340.

[10] Murashima K. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation [J]. *Bacteriol Rev*, 2003, 185(5): 1518-1524.

[11] 张瑞平. 纤维素的初步酶特性研究 [J]. 纺织学报, 2002, 21(6): 46-48.

[12] 陈业高. 植物化学成分[M]. 北京: 化工出版社, 2004.

[13] 刘重芳, 张钰泉, 戴居云, 等. 丹参不同提取工艺比较 [J]. 中成药, 1999, 21(8): 385-388.

作者: 杨皓明, 齐崴, 何志敏, 王红蕾
作者单位: 天津大学化工学院化学工程研究所, 天津, 300072
刊名: 中草药 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39 (8)
被引用次数: 3次

参考文献(13条)

1. 徐仁生 丹参生物学及其应用 1990
2. 中国医学科学院药物研究所 中草药现代研究 1996
3. Pabsch K; Petersen M; Rao N N Chemo-enzymatic synthesis of rosmarinic acid 1991 (05)
4. Zhao L M; Liang X T; Li L N Prionitisides A and B, two phenolic glycosides from Salvia prionitis 1996 (03)
5. Shoji Y; Mayumi S; Itsuo N Isolation and characterization of phenolic compounds from Coptidis rhizome 1985 (02)
6. Qian T X Li L N Isosalvianolic acid C, a depside possessing a dibenzoxepin skeleton 1992 (03)
7. 萧敦良; 甘海涛; 廖幼鸣 中药丹参中活性成分超临界二氧化碳萃取工艺方法 2000
8. 陈雷; 杨屹; 张新祥 密闭微波辅助萃取丹参中有效成分的研究[期刊论文]-高等学校化学学报 2004 (01)
9. 芮建中; 邹汉法; 袁倚盛 毛细管电泳法分离丹参水溶性有效成分—丹参素, 原儿茶酚和原儿茶酸[期刊论文]-中草药 2000 (05)
10. Murashima K Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from Clostridium cellulovorans on plant cell wall degradation 2003 (05)
11. 张瑞平 纤维素的初步酶特性研究 2002 (06)
12. 陈业高 植物化学成分 2004
13. 刘重芳; 张钰泉; 戴居云 丹参不同提取工艺比较 1999 (08)

本文读者也读过(5条)

1. 邹晓军, 高小利 丹参中丹参素和原儿茶醛的微波提取工艺研究[期刊论文]-中药材 2007, 30 (6)
2. 陈瑞战, 张守勤, 张永宏, 白鹤龙, 孟繁磊, Chen Ruizhan, Zhang Shouqin, Zhang Yonghong, Bai Helong, Meng Fanlei 超高压提取丹参素的研究[期刊论文]-农业工程学报 2008, 24 (1)
3. 杨皓明, 齐崴, 何志敏, 王红蕾 复合酶法水解丹参提取丹参素新工艺研究[会议论文]-2005
4. 金勇, 李英姬, JIN Yong, LI Ying-ji 丹参中丹参酮IIA及丹参素提取工艺的优化[期刊论文]-延边大学医学学报 2009, 32 (2)
5. 关昕, 吴立军 丹参注射剂提取工艺研究[期刊论文]-中医药学报 2005, 33 (3)

引证文献(3条)

1. 李骅, 王四旺, 张邦乐, 谢艳华, 杨倩 丹参素的药理活性与药物动力学研究进展[期刊论文]-西北药学杂志 2011 (4)
2. 赵啸虎, 张红梅, 杨金崴, 郭建鹏 正交试验优选人参中人参皂苷Rg1的酶解工艺研究[期刊论文]-中草药 2010 (8)
3. 刘明言, 王帮臣 用于中药提取的新技术进展[期刊论文]-中草药 2010 (2)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200808016.aspx