

图3 生物显微镜观察微囊形态
Fig. 3 Morphology of microcapsules observed with microscope

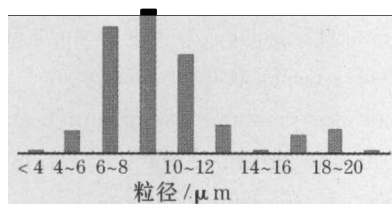


图4 微囊的粒径分布图
Fig. 4 Particle size distribution of microcapsules

3 讨论

本实验采用二次回归通用旋转组和设计,确定了进风温度和进样速率两个自变量和因变量微囊产率间的回归方程,并通过回归方程确定自变量的最佳取值,优化了喷雾干燥法制备丹参素微囊的工艺。在验证实验中,同时考察了包封率、载药量、微囊产率、微囊形态、粒径,结果表明,优化的工艺适合于丹参素微囊的制备。体外释放试验表明,丹参素制备成微囊剂后释放减慢,有利于延长药物在体内的存留时间,从而使药效延长,并且可以进一步制备成胶囊剂、片剂等缓释制剂。

药物和辅料的混合液喷雾干燥后,产品中存在3种物态,一种是含药微囊,一种是干燥的药物粉末,一种是干燥的囊材粉末。包封率是评价含药微囊在3种物态中所占比例的主要因素,而包封率主要由囊材以及囊材与药物的比例决定,因此囊材的

选择和囊材与药物比例的确定是微囊制备工艺中首先考虑的因素。本实验首先考察了囊材与药物的比例,结果表明,使用PVA作囊材时,囊材与囊心物比例高于3:1时,包封率基本达到最大值;而使用CMC-Na时,若囊材的用量较少难以有效包封药物。微囊产率反映药物微囊化的比例以及投料产出情况,是考察喷雾干燥条件的主要指标。包封率和微囊产率结合能较好地反映制备条件对微囊产品的影响。载药量是产品应用时需要考虑的重要指标,合理的载药量需结合制剂、药理等指标综合考虑。关于载药量的计算,本实验将微囊吸附的药物考虑在内,更能反映微囊中的实际药物量。

参考文献:

- [1] Lin H C, Chang W L. Diterpenoids from *Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53 (6): 951-953.
- [2] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000.
- [3] Pei W J, Zhao X F, Zhu Z M, *et al.* Study of the determination and pharmacokinetics of Compound Danshen Dripping Pills in human serum by column switching liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 809 (2): 237-242.
- [4] Li X C, Chen Y, Cai Y B, *et al.* Simultaneous determination of six phenolic constituents of danshen in human serum using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 820(1): 41-47.
- [5] 刘琦,晁若冰. 尿中丹参素的测定及其在人体的药代动力学[J]. *药学报*, 2003, 38(10): 771-774.
- [6] Nizar A Z, Hatim S, AlKhatib, *et al.* Sustained-release of buspirone HCl by co spray-drying with aqueous polymeric dispersions European [J]. *J Pharm Biopharm*, 2008, 69 (5): 735-742.
- [7] Xu J C, Bovet L L, Zhao K. Taste masking microspheres for orally disintegrating tablets [J]. *Int J Pharm*, 2008, 359 (1): 63-69.
- [8] 冯怡,张瑛,杨胤,等. 喷雾干燥法制备陈皮挥发油微囊的影响因素考察[J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1480-1484.
- [9] 储茂泉,刘国杰. 喷雾干燥法制备载药微球时的形貌与粒度控制[J]. *化工学报*, 2004, 55(11): 1093-1097.
- [10] 潘丽军,陈锦权. 实验设计与数据处理[M]. 南京:东南大学出版社, 2008.

川乌的纤维素酶酶解提取工艺研究

李永生^{1,2}, 林强^{2*}, 郑来丽², 田平芳¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100292; 2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要:目的 比较纤维素酶、半仿生、乙醇回流提取方法对川乌中乌头碱、乌头总碱的影响,筛选最佳方法。方法 利用纤维素酶辅助提取川乌生物碱,以乌头碱、乌头总碱提取率为指标,正交试验优化纤维素酶的最佳提取条件,再

收稿日期:2009-02-12

基金项目:北京市人才强教计划一中青年骨干教师资助项目

作者简介:李永生(1981—),男,硕士研究生,研究方向为天然药物化学。

* 通讯作者 林强 Tel/Fax: (010)67373086 E-mail: linqiang@buaa.com.cn

与半仿生、乙醇提取方法进行比较。结果 提取乌头碱、乌头总碱的最佳酶解条件为:温度 45 ℃, pH 值 4.5, 酶用量 8 mg/g, 酶解时间 5 h, 乌头碱提取率为 0.002 447%, 乌头总碱提取率为 0.244 410%, 半仿生提取乌头碱、乌头总碱的提取率分别为 0.001 735%、0.189 340%, 乙醇回流提取乌头碱、乌头总碱提取率分别为 0.001 869%、0.200 720%, 纤维素酶提取法具有明显的优势。结论 酶解提取法可显著提高乌头碱、乌头总碱的提取率, 可在实际生产中推广应用。

关键词: 川乌; 纤维素酶; 乌头碱; 乌头总碱; 正交设计

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1735-05

Study on cellulose enzyme extraction technology of *Radix Aconiti*

LI Yong-sheng¹, LIN Qiang², ZHENG Lai-li³, TIAN Ping-fang¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100292 China;

2. Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: Objective To compare the extraction methods of cellulose enzyme, semi-bionic and alcohol reflux for the impact of aconitine and aconitum alkaloids yields, and to optimize the extraction method.

Methods The optimum condition of enzymatic extraction has been obtained by orthogonal test and compared with semi-bionic and alcohol reflux extraction by taking the contents of aconitine and aconitum alkaloids as indexes. **Results** The optimum extraction conditions were as follows: the temperature was 45 ℃, pH value was 4.5, the amount of cellulose enzyme was 8 mg/g, the extracting time was 5 h and the extraction rate of aconitine was 0.002 447%, aconitum alkaloids was 0.244 410%. The extraction rates of aconitine and aconitum alkaloids of semi-bionic extraction were 0.001 735% and 0.189 340%, respectively. The extraction rates of aconitine and aconitum alkaloids of alcohol reflux extraction were 0.001 869% and 0.200 720% respectively. The enzymatic extraction has a significant advantage. **Conclusion** The enzymatic extraction significantly improve the extraction rates of aconitine and aconitum alkaloids, it could be applied in practice.

Key words: *Radix Aconiti*; cellulose enzyme; aconitine; aconitum alkaloids; orthogonal design

川乌为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根, 祛风除湿, 温经止痛, 用于风湿麻痹, 关节疼痛, 心腹冷痛, 寒疝作痛, 麻醉止痛等^[1]。此类药均含有毒性很强的乌头类生物碱, 其中乌头碱为该属植物中广泛存在且量较高的一种, 但由于其治疗量与中毒量很接近, 用药不当或不慎易产生不良反应, 导致严重心律失常与休克, 甚至中毒致死。乌头生物碱的提取一般采用半仿生提取法^[2]、乙醇回流提取^[3,4]等方法, 但是这些方法耗能、耗时, 部分的生物碱因温度过高会分解, 提取率并不高。酶工程技术是近年来用于天然植物有效成分提取的一项生物工程技术。选用恰当的酶, 可较温和地将植物组织分解, 加速有效成分的释放, 提高提取率^[5]。因此本实验选用纤维素酶进行提取, 研究纤维素酶作用的时间、pH 值、浓度、温度对乌头生物碱提取率的影响, 并通过正交试验优化纤维素酶提取的最佳条件。

1 材料与仪器

川乌由陕西省汉中市第二药材公司提供, 经北

京联合大学生物化学工程学院制药工程教研室鉴定为毛茛科植物乌头 *A. carmichaeli* Debx 的干燥母根。纤维素酶(1×10^4 U/g)(天津诺奥生物技术有限公司), 乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所), 色谱纯甲醇, 磷酸二氢钠、醋酸钠、乙醇、乙醚、氯仿、二氯甲烷均为分析纯。

Waters600 高效液相色谱仪(600 Controller; 600 Pump; 2487 Dual λ Absorbance Detector; EC2000); TU—1810PC 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 80—2 离心机(上海浦东物理光学仪器厂), RE—52C 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 6002 型高速粉碎机(永环瓷电有限公司), DW—3—60W 数显无极恒速搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂), AE100 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多), PHB—4 便携式 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 提取方法: 取川乌粉末 50 g, 加 500 mL 水, 在一定温度下, 调 pH 值, 加入定量纤维素酶, 水浴搅

拌进行反应,离心,弃上清液,取残渣用 10 倍量无水乙醇浸提 3 次,旋转蒸发浸提液,回收乙醇,得浓缩物,调 pH 值为 1~2,离心,滤过,取上清液,加入 3 倍量石油醚萃取 2 次,收集酸水层,并用碱调 pH 值为 9~10,加入 2 倍量氯仿萃取 3 次,收集氯仿层,旋蒸得浓缩物,烘干,称定质量。精密称取烘干的浓缩物,加入二氯甲烷定容至 25 mL,即得样品溶液。

2.2 酸性染料比色法测定乌头总生物碱

2.2.1 标准曲线的制备:精密称取乌头碱对照品 3.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用 0.01 mol/L 盐酸配成 0.3 mg/mL 的对照品溶液。分别精密量取乌头碱对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于 250 mL 分液漏斗中,加 pH 3.5 醋酸盐缓冲液 5.0 mL 与溴甲酚绿指示液 2.0 mL,摇匀,静置再精密加入氯仿 8.0 mL,充分振摇,静置,分取氯仿层,加无水 Na_2SO_4 脱水后,于 416 nm 下测定吸光度值。以 0.01 mol/L 盐酸同法作空白。以吸光度值对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $A = 0.053\,555C - 0.589$, $r = 0.999\,7$ 。表明乌头碱在 60~300 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系。

2.2.2 精密度试验:精密量取样品溶液 0.2 mL,连续 5 次测定乌头总碱吸光度,计算得其 RSD 为 0.971%。

2.2.3 稳定性试验:精密移取样品溶液,室温下放置,在 0、2、4、8、10、12 h 进样,记录吸光度,结果乌头总碱吸光度的 RSD 为 1.40%,可见供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.4 重现性试验:精密量取样品溶液 0.2 mL,平行 6 份,测定吸光度,结果乌头总碱吸光度的 RSD 为 1.83%。

2.2.5 回收率试验:精密称取已测量的川乌样品粉末 25 g,6 份,每份加入乌头碱对照品 0.612 mg,制备样品溶液,进行测定,结果回收率的 RSD 为 2.47%。

2.2.6 样品测定:取样品溶液加定量的 0.01 mol/L 盐酸溶解,制备样品溶液,计算乌头总碱提取率(提取率=提取出来的目标成分的质量/投药量 $\times$ 100%)。

2.3 高效液相色谱法测定乌头碱

2.3.1 色谱条件:Diamondsil C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm) 色谱柱;流动相:甲醇-水(0.01 mol/L 磷酸二氢钠)(65:35);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL ;检测波长:235 nm。

2.3.2 标准曲线的制备:精密称取乌头碱对照品 2.7 mg,二氯甲烷定容至 10 mL 量瓶,得 0.27 mg/mL 的储

备液。精密移取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别定容至 10 mL 量瓶,进样测定。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线,回归得标准方程 $Y = 2.379\,2\,X + 0.666\,5$, $r = 0.999\,8$,表明乌头碱在 13.5~67.5 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验:精密移取样品溶液,连续进样测定 5 次,结果乌头碱峰面积的 RSD 为 1.27%。

2.3.4 稳定性试验:精密移取样品溶液,室温下放置,在 0、2、4、8、10、12 h 进样,记录峰面积,结果乌头碱峰面积 RSD 为 1.33%,可见供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重现性试验:平行制备样品溶液 6 份,测定乌头碱的峰面积,结果其 RSD 为 1.61%。

2.3.6 加样回收率试验:精密称取川乌样品粉末 25 g,6 份,每份加入乌头碱对照品 0.612 mg,制备样品溶液,进行测定,结果乌头碱的平均回收率为 99.8%,RSD 为 2.51%。

2.3.7 样品测定:精密移取二氯甲烷溶解的样品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,进样测定,计算乌头碱的提取率。

2.4 各因素对乌头碱、乌头总碱提取率的影响

2.4.1 酶解 pH 值对乌头碱、乌头总碱提取率的影响:称取 50 g 川乌粉末,在酶解时间为 5 h、酶解温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 和酶量为 10 mg/g 川乌的条件下,pH 值分别为 2.5、3.5、4.5、5.5,测定乌头碱、乌头总碱的提取率,结果见图 1。

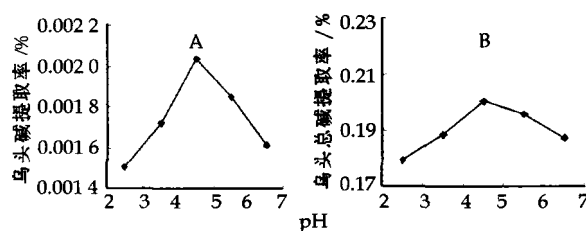


图 1 酶解 pH 值对乌头碱(A)和乌头总碱(B)提取率的影响

Fig. 1 Effect of pH value on extracting rates of aconitine (A) and aconitum alkaloids (B)

可以看出,在酶解时间、酶解温度和酶量一定的条件下,乌头碱、乌头总碱的提取率随酶解液 pH 值增大而增大,在 pH 4.5 时达到最大值。当 pH 值大于 4.5 时,提取率反而降低。这是因为酶的活力受环境 pH 值的影响,每一种酶都有最适合的 pH 值。在本实验中,最佳 pH 值为 4.5 时,乌头碱、乌头总碱的提取率最高。

2.4.2 酶解温度对乌头碱、乌头总碱提取率的影响:称取 50 g 川乌粉末,在酶解液 pH 值为 4.5、酶

量为 10 mg/g 乌头和酶解时间为 5 h 的条件下,温度依次取 35、40、45、50、55 ℃,测定乌头碱、乌头总碱的提取率,结果见图 2。

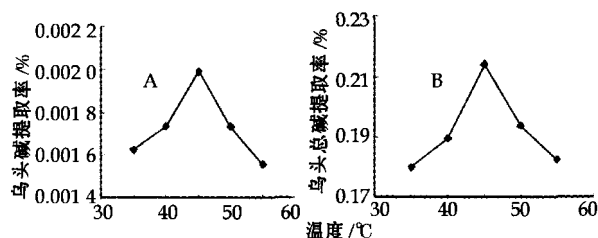


图 2 酶解温度对乌头碱(A)和乌头总碱(B)提取率的影响
Fig. 2 Effect of enzyme temperature on extracting rates of aconitine (A) and aconitum alkaloids (B)

可以看出,在酶解液的 pH 值、酶量和酶解时间一定的条件下,在 45 ℃之前,乌头碱、乌头总碱的提取率随温度的升高而升高,在 45 ℃达到最大值,温度再升高提取率反而降低。这是因为酶反应的活力受温度的影响,当温度升高时,酶的活力增大,达到一定的温度后,再升高温度酶活力迅速丧失。因此本实验最佳的酶解温度为 45 ℃。

2.4.3 酶量对乌头碱、乌头总碱提取率的影响:称取 50 g 川乌粉末,在酶解液 pH 值为 4.5、温度为 45 ℃和时间为 5 h 条件下,提取率依次取 4、6、8、10、12 mg/g 乌头,测定乌头碱、乌头总碱的提取率,结果见图 3。

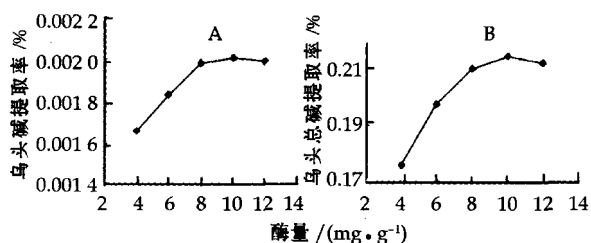


图 3 酶量对乌头碱(A)和乌头总碱(B)提取率的影响
Fig. 3 Effect of enzyme dosage on extracting rates of aconitine (A) and aconitum alkaloids (B)

可以看出,在酶液的 pH 值、温度和时间一定的条件下,乌头碱、乌头总碱的提取率随着酶量的增加而升高,达到 8 mg/g 时,乌头碱、乌头总碱的提取率达到最大值,此时再增加酶量两者基本不变。这是因为酶反应受底物浓度的影响,酶量低于最佳量时,底物过量,酶解反应不完全,当达到最佳值时,酶解比较彻底,如果再继续增加酶量对产物提取率的影响不大。因此最佳酶量为 8 mg/g。

2.4.4 酶解时间对乌头碱、乌头总碱提取率的影响:称取 50 g 川乌粉末,在酶液的 pH 值为 4.5、温度 45 ℃和酶量为 8 mg/g 乌头的条件下,时间依次取 1、2、3、4、5 h,测定乌头碱、乌头总碱的提取率,

结果见图 4。

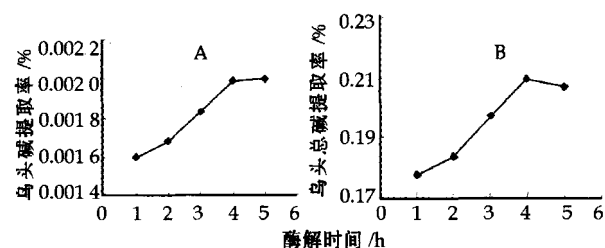


图 4 酶解时间对乌头碱(A)和乌头总碱(B)提取率的影响
Fig. 4 Effect of enzyme time on extracting rates of aconitine (A) and aconitum alkaloids (B)

可以看出,在酶液的 pH 值、温度和酶量一定的条件下,乌头碱、乌头总碱的提取率随着时间的增加而增加,4 h 时达到最大值,此后随时间的增加二者提取率不再变化。因此选择最佳酶解时间为 4 h。

2.5 正交试验设计与结果:在上述单因素试验的基础上,选定酶解温度、pH 值、酶量和酶解时间,各选择 3 个水平,见表 1。分别称取川乌粉末 50 g,按表 2 安排进行乌头碱、乌头生物碱提取。在一定温度下,加入 500 mL 水、定量纤维素酶,水浴搅拌进行反应,离心,弃上清液,取残渣用 10 倍量无水乙醇浸提 3 次,旋蒸浸提液,回收乙醇溶剂,在浓缩物中加入酸调 pH 值为 1~2,离心,滤过,取上清液,加入 3 倍量石油醚萃取 2 次,收集酸水层,并用碱调 pH 值为 9~10,加入 2 倍量氯仿萃取 3 次,收集氯仿层,旋蒸得浓缩物,测定样品中乌头碱和乌头总碱的提取率。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 温度/℃	B pH 值	C 酶量/(mg·g ⁻¹)	D 时间/h
1	40	3.5	6	3
2	45	4.5	8	4
3	50	5.5	10	5

由乌头碱的极差可得到各因素对提取效果的影响程度:A>C>D>B,由乌头总碱的极差分析可得到各因素对提取效果的影响程度:A>C>D>B。可见酶解温度为主要因素,酶用量为次要因素,其次是酶解时间,而 pH 值影响最小。因此得到的最佳提取条件为:提取温度为 45 ℃,pH 值为 4.5,酶量为 8 mg/g 川乌,酶解时间为 5 h。在水平组合 A₂B₂C₂D₃ 的条件下,做 3 组重复试验,结果见表 3。可以看出,在最佳提取条件下,乌头碱和乌头总碱的提取率明显提高,而且重现性较好。

2.6 酶法与其他提取方法比较

2.6.1 半仿生提取(SBE)^[3]:称取川乌粉末 50 g,分别用 pH 2.0、6.5、9.0 的水溶液为溶剂加热回流

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号	A	B	C	D	乌头碱 提取率/%	乌头总碱 提取率/%
1	1	1	1	1	0.001 592	0.195 52
2	1	2	2	2	0.001 793	0.207 53
3	1	3	3	3	0.001 868	0.212 06
4	2	1	2	3	0.002 031	0.221 79
5	2	2	3	1	0.001 920	0.215 20
6	2	3	1	2	0.001 802	0.208 10
7	3	1	3	2	0.001 821	0.209 24
8	3	2	1	3	0.001 813	0.208 78
9	3	3	2	1	0.001 798	0.207 87
乌头碱提取率						
K_1	0.001 751	0.001 815	0.001 736	0.001 770		
K_2	0.001 918	0.001 842	0.001 874	0.001 805		
K_3	0.001 811	0.001 823	0.001 870	0.001 904		
R	0.000 167	0.000 027	0.000 138	0.000 134		
乌头总碱提取率						
K_1	0.205 037	0.208 850	0.204 130	0.206 200		
K_2	0.215 060	0.210 503	0.212 400	0.208 290		
K_3	0.208 640	0.209 343	0.212 170	0.214 210		
R	0.010 023	0.001 653	0.008 270	0.008 010		

表 3 验证试验结果

Table 3 Results of varification test

试验组	乌头碱提取率/%	乌头总碱提取率/%
1	0.002 481	0.246 530
2	0.002 403	0.242 090
3	0.002 458	0.244 610

提取 3 次(固液比分别为 1:10、1:6、1:6;浸 0.5 h;提取 3、1.5、1 h),提取液经滤过、合并、浓缩后制得 SBE 液,用 3%氢氧化钠溶液调 pH 值为 9~10,加入两倍量氯仿萃取 3 次,收集氯仿层,旋蒸得浓缩物,计算样品中乌头碱和乌头总碱的提取率,见表 4。

2.6.2 乙醇回流提取^[4,5]:称取川乌粉末 50 g,加 500 mL 无水乙醇,浸提静置过夜,倒出上层浸提液,再加入 500 mL 无水乙醇,回流提取 2 次,每次提取 2 h,收集浸提液,旋蒸浓缩,回收无水乙醇,得浓缩物。加入 1%的盐酸调 pH 值为 1~2,离心,滤过,取上清液,加入 3 倍量石油醚萃取 2 次,收集酸水层,并用 3%氢氧化钠溶液调 pH 值为 9~10,加入 2 倍量氯仿萃取 3 次,收集氯仿层,旋蒸得浓缩物,计

算样品中乌头碱和乌头总碱的提取率,见表 4。

表 4 酶法与其他提取方法比较结果

Table 4 Comparison between enzymatic extraction and other methods

提取方法	乌头碱提取率/%	乌头总碱提取率/%
半仿生提取法	0.001 735	0.189 340
乙醇回流提取法	0.001 869	0.200 720
酶解提取法	0.002 447	0.244 410

3 讨论

通过正交试验筛选出了酶辅助提取工艺的最优条件为温度 45 ℃,pH 值 4.5,酶量 8 mg/g 川乌,酶解时间 5 h,在此条件下,可得到乌头碱提取率为 0.002 447%,乌头总碱提取率为 0.244 410%。

从本实验的结果可看出,酶法提取比现有提取方法提取的乌头碱、乌头总碱提取率明显提高。与半仿生提取比较,酶法提取的乌头碱、乌头总碱提取率分别提高 41.0%、29.1%。与乙醇回流提取比较,酶法提取分别提高了 30.9%、21.8%。传统乙醇回流提取法,温度过高容易造成有效成分流失,常用多种有机溶剂反复进行多次萃取,提取率并不高,造成产品成本高,且对环境造成污染。

酶解提取与半仿生、醇提取进行比较,提取率从高到低依次是酶法提取、乙醇提取、半仿生提取,综合成本、环保、产量等因素认为酶法提取最具有实际应用性。由此看来,纤维素酶在川乌提取中发挥了生物技术这一优势,降解并破坏植物纤维素,促进有效成分的溶出,提高了有效成分收率,同时酶法提取工艺简单、操作方便、节省时间,在天然产物有效成分的提取中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 张兆旺. 川乌两种方法提取液的成分比较[J]. 中成药,1999, 21(1):5-7.
- [3] 宋小妹,唐志书. 中药化学成分提取分离与制备[M]. 北京:人民卫生出版社,2004.
- [4] 孙文基. 天然药物成分提取分离与制备[M]. 第 3 版. 北京:中国医药科技出版社,2006.
- [5] 杨莉,刘亚娜. 酶法在中药提取制备中的应用[J]. 中草药, 2001,24(1):71-73.