

微生物发酵对川乌、附子中生物碱含量的影响

苏建树¹ 刘白宁² 田平芳¹ 林 强² 赵有玺² 葛喜珍^{2*}

(1. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

摘 要: 探讨了微生物发酵对川乌、附子中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱含量的影响。将菌种以孢子悬液的形式接入灭菌生川乌、生附子、制川乌、制附子药材中, 30℃ 固态发酵培养 7 d 提取生物碱, 对照组为未发酵药材。采用高效液相色谱法测定其含量。研究发现发酵药材中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量分数明显低于原药材: 生川乌中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的质量分数分别为 0.1390%、0.0195%、0.0320%, 而发酵生川乌中分别为 0.0231%、0.0039%、0.0117%; 生附子中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的质量分数分别为 0.2750%、0.0670%、0.0550%, 而发酵生附子中分别为 0.0633%、0.0552%、0.0291%; 生川乌 + 附子中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的质量分数分别为 0.1395%、0.0075%、0.0078%, 而发酵生川乌 + 附子中分别为 0.0202%、0.0022%、0.0026%。该结果表明微生物发酵有助于降低川乌、附子中生物碱的含量。

关键词: 川乌; 附子; 微生物发酵; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 液相色谱

中图分类号: O629.3

引 言

川乌为毛茛科植物卡氏乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx) 的母根^[1], 用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛。附子为毛茛科植物卡氏乌头的子根, 具有回阳救逆, 补火助阳, 散寒止痛之功效。二者含剧毒成分——双酯型二萜类生物碱^[2], 如乌头碱 (aconitine)、新乌头碱 (mesaconitine)、次乌头碱 (hypoaconitine)。由于乌头碱中毒频繁发生^[3], 制约了乌头属中药的应用。《中国药典》从 1995 版到 2005 版规定的川乌的单位用量由 10 g 递减到 3 ~ 5 g 以减量减毒^[4]。

目前川乌、附子主要是通过传统炮制来减小毒性^[5], 经传统炮制后毒性较大的双酯型生物碱可转化为毒性较小的单酯型生物碱, 但往往在炮制过程中质量失控, 导致乌头碱含量过高或过低。有研究表明中药经微生物发酵可减小其毒性, 如对马钱子进行发酵处理后生物碱含量明显低于未经发酵处理

的^[6]; 用复合微生物菌剂对菜籽饼进行堆积保温发酵脱毒, 脱毒率在 99% 以上^[7]。

本文首次以黑曲霉直接对川乌、附子进行发酵, 并提取生物碱, 比较发酵前后主要生物碱质量分数的变化, 以其为有毒中药的减毒增效研究提供理论基础。

1 实验部分

1.1 原料和仪器

乌头碱对照品 (批号 110720-200410)、次乌头碱对照品 (批号 110798-200404)、新乌头碱对照品 (批号 110799-200404) 均购自中国药品生物制品检定所; 生附子、制附子、生川乌、制川乌均由河北省安国市天下康制药有限公司提供, 经北京联合大学制药工程教研室鉴定为正品; 甲醇, 色谱纯, 天津市西华特种试剂厂; 二氯甲烷、乙醚、正己烷、乙酸乙酯, 分析纯, 北京化学试剂厂。

Shimadzu 高效液相色谱仪, 岛津公司; TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Mettler AX105 型电子分析天平, 瑞士梅特勒公司; KQ-250B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 药材发酵

1.2.1 菌种扩大培养

培养基为牛肉膏 5 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 氯

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 北京市教育委员会科技发展计划 (KM200911417011); 北京联合大学生物化学工程学院生物化工重点建设学科项目 (51102630815)

第一作者: 女, 1983 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: gexizhen@163.com

化钠 2.5 g, 琼脂粉 10 g 加入 500 mL 蒸馏水中, 加热搅拌煮沸, 121 °C 灭菌 20 min, 待用。将单个健康菌落接入上述斜面培养基, 30 °C 恒温扩大培养 6 ~ 7 d。

1.2.2 孢子悬液制备

取菌种加入适量无菌水, 将孢子振荡打散成茶状菌液, 吸取菌液于无菌试管, 振荡 10 min, 滤纸过滤除去短菌丝, 将所得滤液振荡混匀, 血球计数板计数, 无菌水稀释至细胞密度为 $1.8 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。

1.2.3 川乌、附子发酵

称取适量药材, 加水润湿(湿度以手捏成团, 松手即散为度), 121 °C 灭菌 20 min, 将菌种以孢子悬液的形式接入药材, 接种量为每 g 药材 0.5 mL 菌液, 30 °C 培养发酵 7 d。

1.3 供试品的制备

1.3.1 原药材提取

精密称取生川乌、制川乌、生附子、制附子、生川乌 + 生附子、制川乌 + 制附子粉末(过 40 目筛)各 2 g, 加 10% 氨水 2 mL 浸润, 加乙醚 25 mL, 振荡, 静置 16 h, 吸取上清液, 残渣用乙醚洗涤 3 次, 每次 5 mL, 合并洗涤液, 0.45 μm 滤膜过滤备用。

1.3.2 发酵药材提取

将发酵好的药材按原药材提取步骤提取, 30 °C 水浴挥干乙醚, 0.01% 盐酸 5 mL 溶解, 0.45 μm 滤膜过滤备用。

1.4 分析方法

1.4.1 3 种乌头碱定性检测

采用硅胶(GF254)层析法定性检测未发酵药材和发酵药材提取液。分别配制乌头碱、新乌头碱、次乌头碱标准品, 采用 $V_{\text{正己烷}} : V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{\text{乙醇}} = 16 : 9 : 2.5$ 为展开剂, 氨蒸汽饱和, 喷以碘化铯钾显色^[8]。

1.4.2 3 种乌头碱质量分数测定

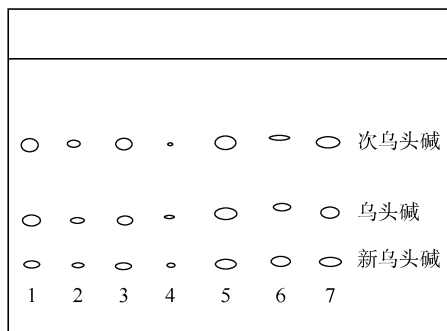
采用高效液相法测定川乌、附子提取液中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量分数。Platisil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, $V_{\text{甲醇}} : V_{0.2\% \text{ 三乙胺}} = 70 : 30$ 为流动相, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C。

乌头碱在 0.0007 ~ 0.07 μg 内呈现良好的线性关系, 回归方程为 $y = 2.48 \times 10^6 x + 17723.75$, $r^2 = 0.9997$; 次乌头碱在 0.0008 ~ 0.08 μg 内呈现良好的线性关系, 回归方程为 $y = 4.48 \times 10^6 x - 2817.76$, $r^2 = 0.9995$; 新乌头碱在 0.0006 ~ 0.06 μg 内呈现良好的线性关系, 回归方程为 $y = 2.00 \times 10^6 x + 5462.08$, $r^2 = 0.9998$ 。

2 结果与讨论

2.1 薄层色谱定性检测 3 种乌头碱

图 1 为样品中 3 种乌头碱薄层色谱图, 标准品新乌头碱 R_f 为 0.24, 乌头碱 R_f 为 0.36, 次乌头碱 R_f 为 0.58。样品斑点与对照品 R_f 值斑点比较, 结果见表 1。发酵川乌、附子提取液中斑点 R_f 值与 3 种对照品斑点 R_f 值吻合, 说明发酵药材中仍含有新乌头碱、乌头碱、次乌头碱。



1—生川; 2—发酵生川乌; 3—生附子; 4—发酵生附子; 5—生川 + 附; 6—发酵生川 + 附; 7—标对照品

图 1 川乌、附子中 3 种乌头碱薄层色谱图

Fig. 1 TLC of three kinds of aconitine from radix aconiti and aconite

表 1 川乌、附子薄层色谱图 R_f 值

Table 1 The R_f values in the TLC of radix aconiti and aconite

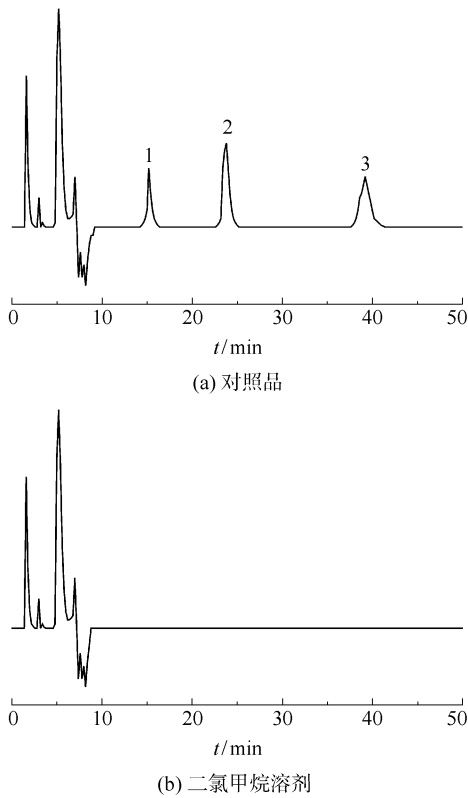
药材	R_f					
	新乌头碱		乌头碱		次乌头碱	
	原药材	发酵药材	原药材	发酵药材	原药材	发酵药材
生川乌	0.24	0.23	0.36	0.35	0.58	0.58
生附子	0.25	0.24	0.36	0.37	0.57	0.55
生川 + 附	0.24	0.25	0.35	0.36	0.58	0.56

2.2 高效液相色谱定量分析 3 种乌头碱

在 1.4.2 节省谱条件下, 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱分离效果较好, 分离度均大于 1.5, 混合对照品色谱图见图 2。

取对照品溶液重复进样 6 次, 每次间隔 2 h, 作精密度和稳定性试验。精密度试验测得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱峰面积的相对标准偏差分别为 0.54%、0.28%、0.36%, 表明测定方法的精密度良好。稳定性试验测得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的峰面积相对标准偏差分别为 0.43%、0.28%、0.76%, 表明样品中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱在 12h 内稳定。乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的回收率

分别为 98.49%、99.62%、99.76%；相对标准偏差分别为 1.25%、1.09%、1.84%。



1—新乌头碱；2—乌头碱；3—次乌头碱

图 2 对照品 (a) 和二氯甲烷溶剂 (b) 的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the three reference substances (a) and methylene dichloride (b)

2.3 微生物发酵对川乌、附子中 3 种乌头碱的影响

表 2 可见,发酵药材中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量分数明显低于原药材。为进一步验证发酵后乌头碱的变化,本文将生川乌、生附子混合发酵,结果混合发酵的新乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量分数从原有的 0.1395%、0.0075%、0.0014% 降低到 0.0202%、0.0022%、0.0027%。说明混合发酵川乌、附子,三种乌头碱质量分数也明显降低。

2.4 微生物发酵对川乌、附子中化合物的影响

对原药材和发酵药材 HPLC 图谱进行比较(图 3),结果生川乌中的 2 号峰在发酵后未检出,生附子中的 2、4 号小峰在发酵附子中均未检出,说明微生物发酵改变了原药材的化学成分组成。而与生川乌、生附子相比,发酵药材的 1 号峰为新增加的峰,推测 1 号峰可能是药材经微生物发酵后新产生的化学成分。是否在发酵过程中部分有毒双酯型二萜类生物碱分解为单酯型生物碱,因未得到单酯类生物碱标准品故未对其进行含量测定,此工作有待进一步进行。

2.5 炮制对川乌、附子中 3 种乌头碱的影响

文献[5]已基本阐明川乌、附子炮制减毒的机理,即药材在炮制过程中,毒性较大的乌头类生物碱 8 位上的乙酰基被脂肪酰基置换,生成毒性较小的单酯生物碱类。表 2 进一步验证了炮制的减毒作用,即炮制川乌、附子中的 3 种有毒乌头碱含量明显低于生药材。

表 2 川乌、附子中 3 种乌头碱测定结果(n=3)

Table 2 Results of determination of alkaloid contents of radix aconiti and aconite

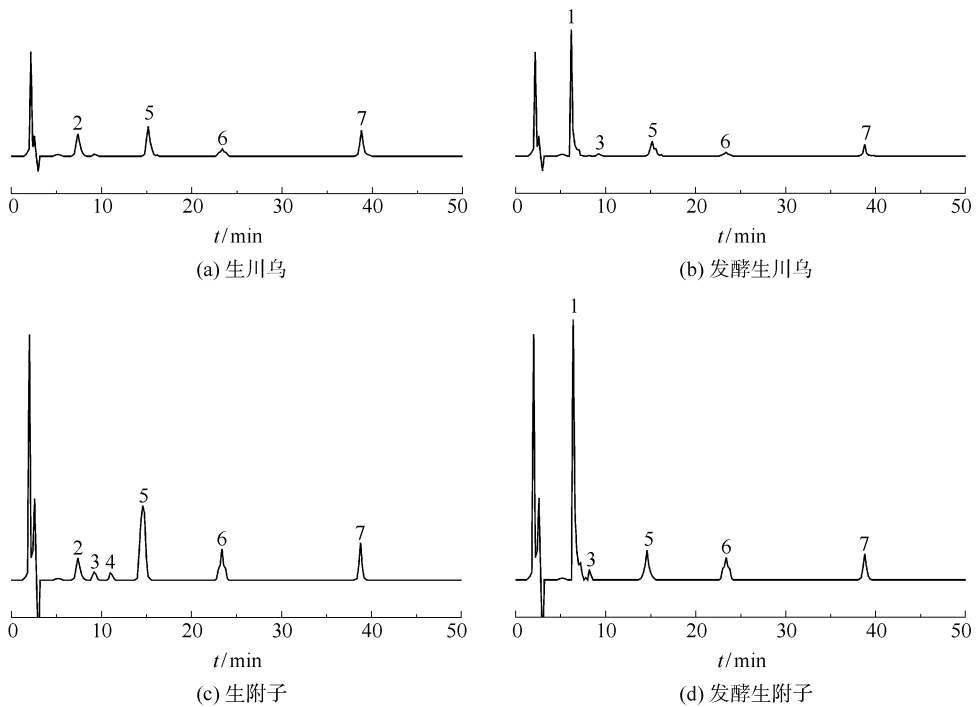
药材	$w_{\text{新乌头碱}}/\%$			$w_{\text{乌头碱}}/\%$			$w_{\text{次乌头碱}}/\%$		
	原药材	发酵药材	减少率/%	原药材	发酵药材	减少率/%	原药材	发酵药材	减少率/%
生川乌	0.1390	0.0231	83.37	0.0195	0.0039	80.00	0.0319	0.0117	63.17
制川乌	0.0619	0.0068	88.87	0.0056	0.0024	58.26	0.0125	0.0071	43.36
生附子	0.2750	0.0632	77.00	0.0670	0.0552	17.55	0.0550	0.0291	47.13
制附子	0.1878	0.0194	87.71	0.0013	0.0004	71.20	0.0014	0.0010	24.44
生川+附	0.1395	0.0202	85.51	0.0075	0.0022	71.26	0.0074	0.0027	66.41
制川+附	0.0935	0.0146	84.37	0.0028	0.0014	50.55	0.0006	0.0003	46.55
生川乌	0.1390	0.0231	83.37	0.0195	0.0039	80.00	0.0319	0.0117	63.17

2.6 菌种的选择及发酵对菌质质量的影响

本文筛选的微生物在酸性条件下生长良好,而中药材固体发酵基质的 pH 偏低且很难调控,可见黑曲霉的耐酸特征可为中药材的发酵研究提供一个

有利条件。

本文是将川乌、附子作为“药性基质”的双向固态发酵^[8],图 4 得出在发酵过程中川乌、附子、川乌+附子菌质质量随发酵的天数逐渐减少,由此可见,



1~4—未知; 5—新乌头碱; 6—乌头碱; 7—次乌头碱

图3 发酵与未发酵川乌、附子的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of radix aconiti and aconite with and without fermentation

在微生物生长代谢过程中消耗了部分药材,“药性基质”可为微生物提供生长所需的营养成分。

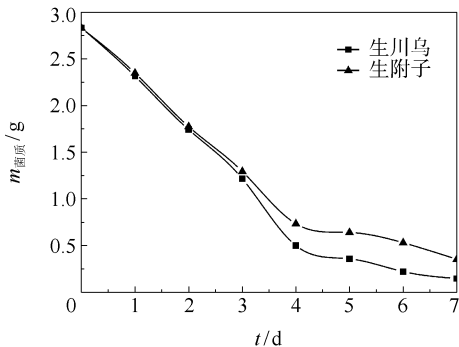


图4 微生物发酵时间对菌质质量的影响

Fig. 4 Effect of fermentation time on dry biomass of mycoplasma

3 结论

采用 $V_{\text{甲醇}} : V_{0.2\% \text{三乙胺}} = 70 : 30$ 系统分离新乌头碱、乌头碱、次乌头碱效果良好,分离度均大于 1.5。首次用黑曲霉对川乌、附子进行固态发酵,经发酵可显著降低川乌、附子中具有毒性的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量分数。生川乌中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的质量分数分别为 0.1390%、

0.0195%、0.0320%; 发酵生川乌中分别为 0.0230%、0.0039%、0.0117%, 减少率分别为 83.38%、80.00%、63.17%。生附子中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的质量分数分别为 0.2750%、0.0670%、0.0550%; 发酵生附子中分别为 0.0633%、0.0552%、0.0291%, 减少率分别为 77.00%、17.55%、47.13%。

参考文献:

[1] 王文采. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1979: 27.
 Wang W C. Flora reipublicae popularis sinicae [M]. Beijing: Science Press, 1979: 27. (in Chinese)

[2] 王永高,朱元龙,朱任宏. 中药乌头的研究[J]. 药学报, 1980, 15(9): 526-531.
 Wang Y G, Zhu Y L, Zhu R H. Alkaloids of the Chinese druges aconitum[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1980, 15(9): 526-531. (in Chinese)

[3] Ono T, Hayashida M, Uekusa K, et al. An accidental case of aconite poisoning due to Kampo herbal medicine ingestion[J]. Legal Medicine, 2009, 11: 132-135.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia: volume 1[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. (in Chinese)
- [5] 王昌利, 杨景亮, 雷建林, 等. 附子炮制机理及制品药效毒理研究[J]. 现代中医药, 2009, 29(1): 53 - 54.
- Wang C L, Yang J L, Lei J L, et al. Mechanism of radix aconiti carmichaeli processing and drug action and toxicity [J]. Modern Traditional Chinese Medicine, 2009, 29(1): 53 - 54. (in Chinese)
- [6] 潘扬, 张弦, 蒋亚平, 等. 双向发酵前后马钱子生物碱含量及其 HPLC 指纹谱的比较[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(6): 362 - 365.
- Pan Y, Zhang X, Jiang Y P, et al. A comparison of content of alkaloid of semen strychni and its HPLC fingerprint chromatography before and after bidirectional fermentation [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2006, 22(6): 362 - 365. (in Chinese)
- [7] 张宗舟. 发酵法莱籽饼脱毒机理研究[J]. 中国医学生物技术应用, 2004, 3(3): 34 - 38.
- Zhang Z Z. Studies on RSM detoxicated theory by fermentation [J]. The Chinese Academic Medical Magazine of Organisms, 2004, 3(3): 34 - 38. (in Chinese)
- [8] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固态发酵工程[J]. 中国食菌, 2002, 21(4): 3 - 5.
- Zhuang Y. Solid state fermentation technology of medicinal fungi[J]. Edible Fungi of China, 2002, 21(4): 3 - 5. (in Chinese)

Effect of microbial fermentation on the extraction of alkaloids from radix aconiti and aconite

SU JianShu¹ LIU BaiNing² TIAN PingFang¹ LIN Qiang² ZHAO YouXi² GE XiZhen²

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

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

Abstract: To study the effects of microbial fermentation on the extraction of mesaconitine, aconitine, and hypaconitine from the medicinal materials radix aconiti, aconite and their fermentation products, a strain was inoculated in sterilized radix aconiti and aconite and fermented at 30 °C for 7 days. Subsequently, the alkaloids were extracted and monitored by HPLC, with the materials without fermentation being used as the control. The results showed that the contents of mesaconitine, aconitine and hypaconitine in the fermented materials were significantly lower than the corresponding values for the control. The contents of mesaconitine, aconitine and hypaconitine in crude radix aconiti were 0.1390%, 0.0195% and 0.0320%, respectively, whereas the contents in fermented radix aconiti were 0.023%, 0.0039%, and 0.0117%, respectively. Similarly, the contents of mesaconitine, aconitine and hypaconitine in crude aconite were 0.2750%, 0.0670% and 0.0550%, respectively, whereas the corresponding values in fermented crude aconite were 0.0633%, 0.0552% and 0.0291%, respectively. These results highlight the role of microbial fermentation in reducing the alkaloid content of the material via a bioconversion mechanism.

Key words: radix aconiti; aconite; microbial fermentation; mesaconitine; aconitine; hypaconitine; HPLC