

# 超声波辅助双水相体系提取竹叶椒总生物碱的工艺优选

郭涛, 孙莉, 黄艳, 吕光耀, 张丙云\*

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州 730050)

**[摘要]** **目的:** 优选超声波辅助双水相体系提取竹叶椒总生物碱的工艺条件。**方法:** 采用超声波辅助丙醇-硫酸铵双水相体系提取竹叶椒总生物碱, 选择提取时间、醇水质量比和盐用量为自变量, 总生物碱提取率为因变量, 通过三因素三水平的响应面优选提取工艺。**结果:** 最佳提取工艺为提取时间 40 min, 醇水质量比 0.5:1, 盐用量 7.79 g; 总生物碱提取率 1.704%, 与模型预测值(1.711%)偏差很小, 纯度 19.8%。**结论:** 超声波辅助双水相体系法提取总生物碱具有效率高、纯度高的特点, 可避免不稳定或易变性的生物活性分子变性。

**[关键词]** 双水相体系; 竹叶椒; 总生物碱; 响应面试验; 超声波提取工艺; 回流提取法

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0008-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130008

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1531.018.html>

**[网络出版时间]** 2014-05-13 15:31

## Optimization of Extraction Process for Total Alkaloids from *Zanthoxylum armatum* by Ultrasonic Assisted Aqueous Two-phase System

GUO Tao, SUN Li, HUANG Yan, LV Guang-yao, ZHANG Bing-yun\*

(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic assisted aqueous two-phase system extraction technology of total alkaloids from *Zanthoxylum armatum*. **Method:** Total alkaloids from *Z. armatum* was extracted by ultrasonic extraction technology coupling with propyl-alcohol ammonium sulfate aqueous two-phase system, taking extracting time, mass ratio of alcohol to water and salt dosage as independent variables, extraction rate of total alkaloids as dependent variable, a three response factors and three levels composite design of response surface methodology was employed to optimize extraction technology. **Result:** Optimal extraction process was as following: extracting time of 40 min, mass ratio of alcohol to water 0.5:1, salt dosage 7.79 g. Under these conditions, extraction rate of total alkaloids was up to 1.704%, which was agreed with model predicted value (1.711%), purity of total alkaloids was 19.8%. **Conclusion:** Ultrasound assisted aqueous two-phase system for total alkaloids from *Z. armatum* had advantages of high extraction rate and high purity, which could avoid denaturation of bioactive molecules with instability or volatility.

**[Key words]** aqueous two-phase system; *Zanthoxylum armatum*; total alkaloids; response surface methodology; ultrasound-assisted extraction technology; reflux extraction

竹叶椒性温, 味辛、微苦, 有小毒<sup>[1]</sup>, 具有祛风除湿、温中理气、清热解毒、活血止痛的功效<sup>[2]</sup>, 化

学成分包括木脂素、生物碱、酰胺、黄酮、香豆素等<sup>[3]</sup>, 其中生物碱类成分主要存在于根及根皮中。

**[收稿日期]** 20130926(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360476); 甘肃自然科学基金项目(1112RJA016)

**[第一作者]** 郭涛, 博士, 副教授, 从事食品、制药工程研究, Tel:13366372608, E-mail:gt010010@163.com

**[通讯作者]** \* 张丙云, 硕士, 副教授, 从事食品贮藏与保鲜技术研究, Tel:13919376704, E-mail:494467885@qq.com

目前已从竹叶椒根皮中分离得到了白鲜碱、茵芋碱和木兰花碱<sup>[4]</sup>,洪美芳等<sup>[5]</sup>从其根和茎的乙醚及二氯甲烷提取物中首次分离得到了花椒明碱,根中尚含有崖椒碱、竹叶椒碱等<sup>[2,4]</sup>。

传统的聚合物-盐双水相体系需使用黏度较大的聚合物,导致成本高、不易后续处理和回收等问题;而水溶性低级醇如乙醇、丙醇与盐双水相体系可克服以上问题,且过程易于放大、生物亲和性好<sup>[6-7]</sup>。本实验联合超声波法和丙醇-硫酸铵双水相体系<sup>[8-9]</sup>提取竹叶椒中总生物碱,具有价廉、低毒、操作简便等特点<sup>[10]</sup>,为竹叶椒的开发利用和提取分离技术的选择提供参考。

## 1 材料

AB104-N型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),Varian Cary 50型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安技术中国有限公司)。竹叶椒于2010年采于广西南宁,经复旦大学潘胜利教授鉴定为芸香科植物 *Zanthoxylum armatum* DC. 的根茎藤,凭证标本(ZA#09121)保存于兰州理工大学制药系教研室;木兰碱对照品(纯度>98%,天津中新药业集团股份有限公司),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 检测波长考察** 将配制好的木兰碱对照品溶液于200~800 nm扫描,结果显示在278 nm处有最大吸收峰,故选定检测波长278 nm。

**2.2 标准曲线绘制** 精密称取木兰碱对照品1.0 mg,加甲醇溶解并定容至10 mL量瓶中,得储备液。精密吸取储备液0.05,0.1,0.2,0.3,0.4 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,分别于278 nm处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得回归方程  $A = 197C + 0.0051$  ( $R^2 = 0.9998$ ),线性范围0.0005~0.004 g·L<sup>-1</sup>。

**2.3 pH对总生物碱提取率的影响** 固定提取时间、醇水质量比及盐用量,调节双水相体系的pH分别为6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,超声提取后得6组浸膏,分别于278 nm处测定A,计算总生物碱提取率分别为1.373%,1.479%,1.594%,1.511%,1.315%,1.287%。结果显示当pH呈酸性时,总生物碱提取率随pH的上升而增加,于pH 7.0时达最大值,继续增大pH,总生物碱提取率开始下降,故双水相体系pH定7.0。

**2.4 丙醇-硫酸铵双水相体系的制备** 预试验探索了丙醇-硫酸铵双水相体系,丙醇为水溶性有机溶剂,加入硫酸铵后,利用硫酸铵的水化作用可形成双

水相体系,改变丙醇与水的质量比和盐用量可控制双水相体系的形成,经调试,选择丙醇与水的初始质量比0.5:1,硫酸铵用量6 g。

**2.5 总生物碱的超声提取与含量测定** 准确称取竹叶椒粉末10.0 g置于圆底烧瓶中,加入一定量丙醇-硫酸铵双水相体系,置于超声波装置中,调节温度25℃,功率250 W进行超声提取,提取液过滤以除去残渣,将滤液置于分液漏斗中静置30 min分层,待分层后取上层丙醇提取层减压浓缩,得竹叶椒提取物浸膏,称定质量,取适量浸膏并加甲醇充分溶解,经0.22 μm微孔滤膜滤过,于278 nm处测定A,以木兰碱为对照,按标准曲线法计算总生物碱提取率。

**2.6 响应面分析试验<sup>[11-12]</sup>** 在单因素试验基础上,根据Box-Behnken中心组合设计的试验原理,选择提取时间、丙醇水质量比、盐用量为自变量,总生物碱提取率为因变量,安排三因素三水平共17个试验点的响应面分析试验,因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

表1 竹叶椒总生物碱超声波辅助双水相体系提取工艺响应面试验因素水平

编码水平	A 提取时间 /min	B 丙醇-水 质量比	C 盐用量 /g
-1	40	0.5:1	6
0	60	0.65:1	8
1	80	0.8:1	10

采用Design-Expert 8.05软件对表2中数据进行回归分析,方差分析见表3,通过对各因素进行回归拟合,得总生物碱提取率与各自变量的回归方程为  $Y = -6.63289 - 0.02424A + 0.71806B + 2.28042C + 0.02508AB - 2.8750 \times 10^{-4}AC - 8.33333 \times 10^{-3}BC + 7.84375 \times 10^{-5}A^2 - 2.00556B^2 - 0.14534C^2$ 。

由表3可知,回归方程模型极显著,方程失拟项不显著,说明该回归模型与实际试验拟合良好,证明应用响应面法优化的提取工艺是可行的。方程回归系数  $R^2 = 0.9985$ ,说明模型的相关度好,采用该模型对总生物碱提取率进行分析和预测是可行的。方差分析表明A,B,C,AB,A<sup>2</sup>,B<sup>2</sup>,C<sup>2</sup>均达到显著水平,其中B,C因素影响极显著,A因素影响则显著。

采用Design-Expert 8.05软件绘制响应面图及等高线图,考察拟合的响应面曲线形状,见图1~3。结果显示A与C,B与C间交互作用显著,而A与B

表 2 竹叶椒总生物碱超声辅助  
双水相体系提取工艺响应面试验安排

No.	A	B	C	总生物碱提取率/%
1	0	0	0	1.547
2	1	0	-1	1.134
3	0	0	0	1.534
4	1	0	1	0.854
5	0	0	0	1.571
6	-1	-1	0	1.697
7	1	-1	0	1.499
8	0	1	1	0.705
9	-1	1	0	1.429
10	0	-1	-1	1.143
11	0	0	0	1.568
12	0	-1	1	0.863
13	0	1	-1	0.995
14	-1	0	-1	1.129
15	-1	0	1	0.895
16	1	1	0	1.532
17	0	0	0	1.545

表 3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.66	9	0.18	522.11	<0.000 1
A	$2.145 \times 10^{-3}$	1	$2.145 \times 10^{-3}$	6.09	0.043 0
B	0.037	1	0.037	103.80	<0.000 1
C	0.15	1	0.15	416.73	<0.000 1
AB	0.023	1	0.023	64.26	<0.000 1
AC	$5.290 \times 10^{-4}$	1	$5.290 \times 10^{-4}$	1.50	0.260 2
BC	$2.500 \times 10^{-5}$	1	$2.500 \times 10^{-5}$	0.071	0.797 7
A <sup>2</sup>	$4.145 \times 10^{-3}$	1	$4.145 \times 10^{-3}$	11.76	0.011 0
B <sup>2</sup>	$8.574 \times 10^{-3}$	1	$8.574 \times 10^{-3}$	24.33	0.001 7
C <sup>2</sup>	1.42	1	1.42	4 037.70	<0.000 1
残差	$2.467 \times 10^{-3}$	7	$3.525 \times 10^{-4}$		
失拟误差	$1.457 \times 10^{-3}$	3	$4.858 \times 10^{-4}$	1.92	0.267 3
纯误差	$1.010 \times 10^{-3}$	4	$2.525 \times 10^{-4}$		
总和	1.66	16			

间交互作用不显著;等高线较为陡峭,说明各自变量对总生物碱提取率均具有显著性影响。

**2.7 模型验证** 通过 Design-Expert 8.05 软件得预测的总生物碱最佳提取工艺为提取时间 40 min,醇水质量比 0.48:1,盐用量 7.79 g,总生物碱提取率最高值达 1.711%。为验证该模型的有效性,同时

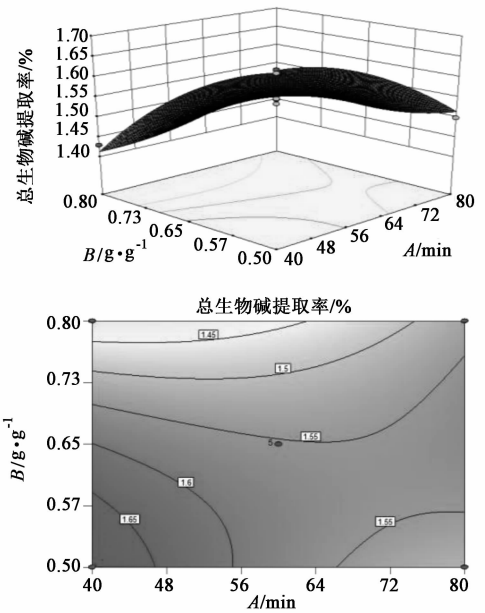


图 1 提取时间和醇水质量比的交互作用  
对竹叶椒总生物碱提取工艺的影响

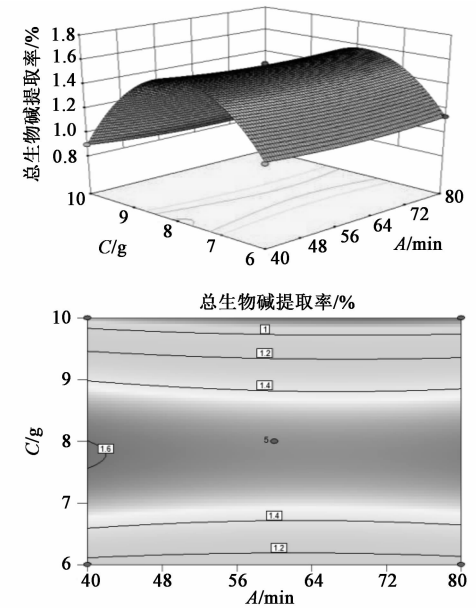


图 2 提取时间和盐用量的交互作用  
对竹叶椒总生物碱提取工艺的影响

结合实际情况考虑,将提取条件修正为提取时间 40 min,醇水质量比 0.5:1,盐用量 7.79 g。按优选的工艺条件于 25 °C,250 W 进行 3 次验证试验,计算总生物碱平均提取率 1.704%,RSD 0.29%,与预测值相差较小,说明优选的提取工艺稳定可行,预测性良好。

**2.8 提取工艺比较** 为验证双水相法提取总生物碱的有效性,选择与传统回流提取法进行比较。称取竹叶椒药材粉末 10.0 g,置于 500 mL 圆底烧瓶

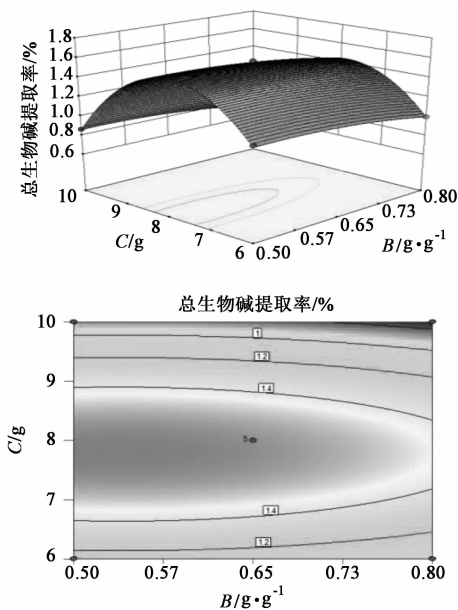


图3 醇水质量比和盐用量的交互作用对竹叶椒总生物碱提取工艺的影响

中,加入95%乙醇200 mL于80℃回流提取2次,每次60 min,过滤,减压浓缩,得浸膏1.684 g,计算总生物碱提取率1.499%,纯度8.9%。称取竹叶椒药材粉末10.0 g,按优选的超声辅助双水相法进行提取,得浸膏0.86 g,计算总生物碱提取率1.704%,纯度19.8%,说明超声辅助双水相法较传统回流法更优良。

### 3 讨论

在双水相体系中,上相为丙醇相,下相为水溶液相,当 $\text{pH} < 7.0$ 时,双水相体系中水相呈酸性,较单纯的丙醇相,虽然生物碱更溶于酸性丙醇相中,但在酸性条件下生物碱类成分也易成盐而溶于水相,故酸性丙醇相中总生物碱提取率降低;随着 $\text{pH}$ 升高,生物碱离子化程度受到抑制。当 $\text{pH}$ 呈碱性时,生物碱极不易于在提取过程中扩散进入水溶液相,亦不能较好地进入丙醇相,使上相的总生物碱含量降低,总生物碱提取率亦随之降低。

超声波法与传统回流法相比,除操作简单、提取时间短外,还能有效提高提取效率。将超声提取温度设定为室温条件,提供了温和的操作条件,可降低高温加热的能耗,亦可避免不稳定或易变性的生物活性分子变性。传统有机溶剂萃取法往往会造成生物分子变性,而双水相系统的界面应力远远低于溶

剂萃取的水-有机溶剂体系<sup>[13]</sup>,大大减少了对被萃取分子的伤害,且有机溶剂残留低,较有机溶剂萃取法更加安全低毒。丙醇-硫酸铵双水相体系是一种低级醇-盐双水相体系,相比传统双水相体系不易乳化、相分离时间更短、成相聚合物成本更低,且溶剂易回收。

### [参考文献]

- [1] 程友斌,王庆林,杨茹. 竹叶椒的研究进展[J]. 安徽医药,2011,15(1):11.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:258.
- [3] 李航,李鹏,朱龙社,等. 竹叶椒的化学成分研究[J]. 中国药房,2006,17(13):1035.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997:10.
- [5] 洪美芳,潘竞先,郝美荣,等. 竹叶椒抑制血小板活化因子(PAF)的活性成分[J]. 植物资源与环境,1993,2(2):25.
- [6] Liu X H, Gao Y T, Tang R S, et al. On the extraction and separation of iodide complex of cadmium(II) in propyl-alcohol ammonium sulfate aqueous biphasic system[J]. Sep Purif Technol, 2006, 50(2):263.
- [7] 高云涛,吴立生,王伟. 丙醇-硫酸铵-水液-液体系萃取分离铂、钨、铈和金[J]. 分析化学, 2001, 29(8):901.
- [8] 钟振声,冯焱,孙立杰. 超声波法从葡萄籽中提取原花青素[J]. 精细化工, 2005, 22(1):41.
- [9] Ma Y Q, Ye X Q, Hao Y B, et al. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from penggan (*Citrus reticulata*) peel[J]. Ultrason Sonochem, 2008, 15(3):227.
- [10] 王志华,马会民,马泉莉,等. 双水相萃取体系的研究[J]. 应用化学, 2001, 18(3):173.
- [11] 初正云,郑永芹,程军. 响应面法优选刺槐花中刺槐苷提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):24.
- [12] 徐伟,凌伟坚,褚克丹,等. 响应面法优化车前子油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23):3253.
- [13] 林东强,朱自强,姚善泾,等. 生化分离过程的新探索—双水相分配与相关技术的集成化[J]. 化工学报, 2000, 51(1):1.

[责任编辑 刘德文]