

两面针的超声-酶法辅助半仿生提取工艺优选

陆世惠^{1*}, 李秀霞², 卢红梅¹, 林瑶¹, 陈楠¹

(1. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000; 2. 右江民族医学院附属医院妇科, 广西 百色 533000)

[摘要] 目的: 优选两面针的超声-酶法辅助半仿生提取工艺条件。方法: 以氯化两面针碱、总生物碱得率和干膏收率为评价指标, 通过正交试验考察超声功率、提取时间及溶剂用量对两面针半仿生超声提取工艺的影响, 利用动态过程优选提取时间。运用 HPLC 测定氯化两面针碱含量, 流动相乙腈-水-磷酸-三乙胺 (30:70:0.15:0.15), 检测波长 271 nm; 采用 UV 测定总生物碱含量, 检测波长 328 nm。结果: 最佳提取工艺为复合酶预处理后于 250 W 超声提取, 第 1 次加 5 倍量 pH 2.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液提取 18 min, 第 2 次加 5 倍量 pH 7.5 缓冲液提取 15 min, 第 3 次加 5 倍量 pH 8.3 缓冲液提取 12 min; 氯化两面针碱得率 0.135% (RSD 1.86%), 总生物碱得率 1.20% (RSD 1.75%), 干膏收率 14.65% (RSD 1.23%)。结论: 本法的氯化两面针碱和总生物碱得率与乙醇回流法接近或稍低, 而干膏收率显著提高, 可为两面针的大生产提供参考。

[关键词] 超声-酶法; 半仿生提取工艺; 两面针; 动态过程; 氯化两面针碱; 总生物碱

[中图分类号] R282.4; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0011-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014160011

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0946.100.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 11:07

Optimization of Ultrasonic Wave-enzymatic Assisted Semi-biotic Extraction Technology for Zanthoxyli Radix

LU Shi-hui^{1*}, LI Xiu-xia², LU Hong-mei¹, LIN Yao¹, CHEN Nan¹

(1. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; 2. Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasonic wave-enzymatic assisted semi-biotic extraction technology for Zanthoxyli Radix. **Method:** With yields of total alkaloids, nitidine chloride and dry extract as indexes, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology by taking ultrasonic power, extraction time and solvent

[收稿日期] 20131203(013)

[基金项目] 右江民族医学院课题(右医科学[2011]1号)

[通讯作者] *陆世惠, 实验师, 硕士, 从事天然产物的提取分离鉴定及其生物活性研究, Tel: 0776-2829035, E-mail: lushihui0818@126.com

[5] 刘艳华, 马妍妮, 隋宏. 魔芋中魔芋葡甘聚糖的提取纯化及其含量测定影响因素的分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34(11): 1133.

[6] 马妍妮, 韩欣, 隋宏, 等. 葫芦巴胶及其改性材料对盐酸小檗碱片剂崩解和溶出性能的影响[J]. 中成药, 2012, 34(3): 446.

[7] Dorkoosh FA, Burssee J, Verhoef J C, et al. Preparation and NMR characterization of superporous hydrogels (SPH) and SPH composites [J]. Polymer, 2000, 41(23): 8213.

[8] 陈立贵, 王忠, 付蕾, 等. 魔芋葡甘聚糖/聚丙烯酸水凝胶的溶胀动力学及性能影响因素[J]. 安徽农业科技, 2007, 35(29): 9134.

[9] Park H, Park K, Kim D. Preparation and swelling behavior of chitosan-based superporous hydrogels for gastric retention application [J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 76A(1): 144.

[责任编辑 刘德文]

amount as factors, then extraction time was selected by dynamic process. HPLC was employed to determine the content of nitidine chloride with mobile phase of acetonitrile-water-phosphoric acid-triethylamine (30:70:0.15:0.15) and detection wavelength at 271 nm; UV was adopted to determine the content of total alkaloids at 328 nm. **Result:** Optimal extraction process of *Zanthoxyli Radix* was as follows: after pretreated by cellulase-pectinase, extracted thrice by 5 times the amount of sodium hydrogen phosphate-citric acid buffer with pH of 2.0, 7.5 and 8.3, extraction time of 18, 15, 12 min, respectively; ultrasonic power of 250 W; yields of total alkaloids, nitidine chloride and dry extract were 1.20%, 0.135% and 14.65% with RSD of 1.75%, 1.86% and 1.23%, respectively. **Conclusion:** Dry extract yield of this optimized process is significantly higher than ethanol reflux process, while extracting rates of nitidine chloride and total alkaloids are equal with or little lower than the later, this study could provide a reference for industrial production of *Zanthoxyli Radix*.

[**Key words**] ultrasonic wave-enzymatic; semi-biotic extraction technology; *Zanthoxyli Radix*; dynamic process; nitidine chloride; total alkaloids

两面针主要分布于广西、广东、云南等地,常用于治疗风湿骨痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、毒蛇咬伤等症,具有抗癌作用^[1]。半仿生提取法是模仿口服药物在胃肠道的转运过程,采用一定 pH 的酸水和碱水依次煎煮,可提取和保留较多的有效成分,充分体现了中医临床用药的综合作用特点。前期研究^[2]通过酶预处理两面针药材后采用半仿生温浸提取,与半仿生煎煮法相比更接近“仿生”,又保护了活性成分免受破坏,但该工艺能耗较高,提取时间较长。超声法能利用空化效应、热效应和机械振动等作用促进提取的进行^[3],动态过程优化工艺则能大幅减少提取时间,降低生产成本^[4]。综合运用酶法、超声法和半仿生法中 2 种方式提取中药有效成分的研究已有报道,但综合运用这 3 种方式的研究尚未见报道。故本实验拟采用酶法预处理两面针药材,结合正交试验和动态过程优化半仿生超声法提取两面针的工艺条件,探索综合运用多种方法提取中药有效成分模式的可行性。

1 材料

LC-10AT VP 型高效液相色谱仪 (SPD-10A VP 型紫外检测器,日本岛津),N2000 型色谱工作站 (浙江大学智达信息工程有限公司),TU1800 型紫外-可见分光光度计 (北京普析通用公司),101-3 型电热鼓风干燥箱 (上海圣欣科学仪器公司)。两面针药材购自广西南宁市药材市场,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的根和茎;氯化两面针碱对照品 (中国食品药品检定研究院,批号 110848-200502),纤维素酶和果胶酶 (酶活力均为 10 000 U·g⁻¹,南宁东恒华道生物制品公司),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 氯化两面针碱的含量测定^[5]

2.1.1 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水-磷酸-三乙胺 (30:70:0.15:0.15),检测波长 271 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取氯化两面针碱对照品 10.5 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL,得 210 mg·L⁻¹贮备液。精密吸取贮备液适量,分别加流动相定容至 10 mL,制备系列对照品溶液,以质量浓度为横坐标,平均峰面积积分值 ($n=3$) 为纵坐标,得回归方程 $Y=4.756 \times 10^4 X + 2.102 \times 10^3$ ($r=0.9998$),线性范围 1.05~10.50 mg·L⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 0.5 mL,加流动相定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 总生物碱的含量测定^[6]

2.2.1 标准曲线的制备 精密吸取 210 mg·L⁻¹氯化两面针碱贮备液适量,分别加 95% 乙醇-pH 5.0 乙酸-乙酸钠 (6:4) 缓冲液定容至 10 mL,制备系列对照品溶液,以缓冲液或水 (两者吸光度相同) 为参比,于 328 nm 处测定吸光度 (A),重复测定 3 次,以 A 平均值为纵坐标,质量浓度 (C) 为横坐标,得回归方程 $A=0.09574C-0.0102$ ($r=0.9996$),线性范围 1.05~10.50 mg·L⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 4 mL,加 2.2.1 项下缓冲液定容至 10 mL,于 1 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,即得。

2.3 干膏收率的计算 精密取提取液 50 mL,水浴挥干,置干燥箱中 105 °C 烘 3 h 至恒重,置于干燥器中冷却 30 min,称定质量,扣除相应缓冲溶质干重,

计算干膏收率。

2.4 药材中总生物碱和氯化两面针碱的含量测定

将两面针药材粉碎(粒径 ≤ 0.5 mm),精密称取 2 g,置索氏提取器中,加入甲醇 100 mL,加热回流提取至提取液无色(约 8 h),提取液加甲醇定容至 100 mL,按 2.1 和 2.2 项下方法测定,计算总生物碱、氯化两面针碱质量分数分别为 2.372%, 0.2517%。

2.5 半仿生超声提取工艺考察 称取两面针药粉 100 g,加入 4 倍量 pH 5 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,用纤维素酶和果胶酶(酶与底物质量比均为 1:250)于室温(30 ℃)预处理 30 min^[5,7],滤过,滤渣进行半仿生提取,依次加 pH 2.0,7.5,8.3 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液超声提取。经单因素试验发现超声提取时间 >30 min 后氯化两面针碱和总生物碱得率未

见增加,总溶剂量 >21 倍(不包括预处理溶剂)后二者得率增加亦不明显。故选择超声功率、时间及溶剂用量(3 次提取平均分配溶剂)为考察因素,氯化两面针碱、总生物碱得率和干膏收率为评价指标,因素水平见表 1。按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,将 3 次提取液与酶解液合并,加相应缓冲液定容至 2.50 L,取样测定。为提高统计分析的可靠性,重复试验 1 次,测定结果取均值,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 两面针半仿生提取工艺正交试验因素水平

水平	A 超声功率/W	B 超声时间/min	C 溶剂用量/倍
1	150	10	15
2	200	20	18
3	250	30	21

表 2 两面针半仿生提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	氯化两面针碱得率	总生物碱得率	干膏收率
1	1	1	1	1	0.086	0.74	10.87
2	1	2	2	2	0.104	0.93	12.37
3	1	3	3	3	0.113	1.04	13.62
4	2	1	2	3	0.103	0.89	12.41
5	2	2	3	1	0.131	1.24	14.52
6	2	3	1	2	0.112	1.12	13.02
7	3	1	3	2	0.128	1.15	14.20
8	3	2	1	3	0.134	1.20	14.61
9	3	3	2	1	0.147	1.28	15.12
氯化两面针碱得率	K_1	0.101	0.106	0.111	0.123		
	K_2	0.115	0.123	0.118	0.115		
	K_3	0.136	0.124	0.124	0.117		
	R	0.035	0.018	0.013	0.007		
总生物碱得率	K_1	0.903	0.927	1.020	1.087		
	K_2	1.083	1.123	1.033	1.067		
	K_3	1.210	1.147	1.143	1.043		
	R	0.307	0.220	0.123	0.044		
干膏收率	K_1	12.29	12.49	12.83	13.50		
	K_2	13.32	13.83	13.30	13.20		
	K_3	14.64	13.92	14.11	13.55		
	R	2.35	1.43	1.28	0.35		

由直观分析可知,各因素对评价指标的影响顺序均为 $A > B > C$ 。以氯化两面针碱得率和干膏收率为指标,方差分析表明 A 因素具有显著性影响, B, C 因素则均无显著性影响,以 $A_3B_1C_1$ 为佳;以总生物碱得率为指标,方差分析表明 A, B 因素具有显著性影响, C 因素则影响不显著,以 $A_3B_2C_1$ 为佳;综

合考虑,确定最佳提取工艺组合为 $A_3B_2C_1$,即超声功效 250 W,提取时间 20 min,溶剂用量 5 倍。

2.6 动态过程优化提取时间 按正交试验优选的工艺进行半仿生提取,提取时间延长至 24 min,在提取过程中每隔 3 min 抽取提取液 5 mL,并补足等体积的相应溶剂,依法测定各样品液中氯化两面针碱

表 3 半仿生提取工艺方差分析

指标	方差来源	SS	F	P
氯化两面 针碱得率	A	0.189	27.00	<0.05
	B	0.064	9.14	>0.05
	C	0.027	3.86	>0.05
	D(误差)	0.007		
总生物碱 得率	A	0.142	47.33	<0.05
	B	0.088	29.33	<0.05
	C	0.027	9.00	>0.05
	D(误差)	0.003		
干膏收率	A	8.375	38.42	<0.05
	B	3.838	17.61	>0.05
	C	2.518	11.55	>0.05
	D(误差)	0.218		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$, f 均为 2。

和总生物碱质量浓度,见表 4,结果表明第 1,2,3 次提取稳态期分别为 18,15,12 min。

表 4 两面针半仿生工艺各时间点提取液中有效成分测定

取样时间 /min	氯化两面针碱/ $g \cdot L^{-1}$			总生物碱/ $g \cdot L^{-1}$		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次
3	0.038	0.022	0.015	0.314	0.232	0.186
6	0.064	0.043	0.028	0.607	0.425	0.307
9	0.088	0.061	0.037	0.852	0.628	0.397
12	0.106	0.075	0.045	1.103	0.744	0.401
15	0.121	0.083	0.047	1.224	0.743	0.399
18	0.128	0.082	0.046	1.233	0.740	0.403
21	0.130	0.084	0.047	1.227	0.747	0.401
24	0.127	0.082	0.045	1.231	0.742	0.398

2.7 验证试验及提取方式比较 称取两面针药粉 100 g,共 9 份,按优选的半仿生超声提取工艺进行 3 次验证试验,另按半仿生温浸法^[2]和乙醇回流法(加 12 倍量 60% 乙醇提取 2 次,每次 1 h)提取,平行 3 份,计算氯化两面针碱、总生物碱得率和干膏收率,见表 5。采用 SPSS 13.0 软件对 3 种方法的试验数据进行完全随机设计的单因素方差分析,按 $\alpha = 0.05$ 水准,结果表明优选的提取工艺稳定可行,3 种方法中

氯化两面针碱得率和干膏收率两两间均存在显著差别;半仿生温浸法中总生物碱得率与其他 2 种方法具有显著性差异,而其他 2 种方法间无显著性差异。

表 5 两面针的不同提取工艺比较

提取方法	氯化两面针碱		总生物碱		干膏	
	得率	RSD	得率	RSD	收率	RSD
半仿生超声	0.135	1.86	1.20	1.75	14.65	1.23
半仿生温浸	0.095	1.58	0.93	1.61	13.18	1.69
乙醇回流	0.141	1.79	1.24	1.62	10.57	1.72

3 讨论

本文综合运用酶法、半仿生法和超声法提取两面针中有效成分,与酶法预处理后半仿生温浸提取相比,提取温度更接近体温,更具仿生学特点,氯化两面针碱和总生物碱得率明显提高,干膏收率亦有所提高,且节能省时。与乙醇回流法相比,本法氯化两面针碱和总生物碱得率稍低或接近,而干膏收率显著提高,这正是半仿生提取法的特点。本文局限于一定 pH 的酸水、碱水依次提取的经典半仿生提取模式,鉴于生物碱水溶性较差的特点,可进一步探索采用一定 pH 的醇水等溶剂依次提取的方法。

[参考文献]

- [1] 黄治勋,李志和. 两面针抗肿瘤有效成分的研究[J]. 化学学报,1980,38(6):535.
- [2] 陆世惠. 正交设计和动态过程优化两面针半仿生提取工艺[J]. 医药导报,2013,32(10):1337.
- [3] 王甫成. 超声技术在中药化学成分提取中的研究进展[J]. 广州化工,2010,38(8):11.
- [4] 王东喆,章军,张丽艳,等. 基于动态过程的提取工艺优化方法研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(10):1388.
- [5] 陆世惠,李秀霞. 超声-酶法提取两面针中氯化两面针碱的研究[J]. 中成药,2013,35(4):841.
- [6] 陆世惠,龙盛京. UV 测定两面针提取液中总生物碱的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(6):350.
- [7] 陆世惠,邓凤云,卢红梅,等. 酶解法辅助浸渍提取两面针中总生物碱的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):43.

[责任编辑 刘德文]