

酶解法辅助提取钩藤中钩藤碱的工艺优选

吴卫¹, 唐振祥², 李素珍^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 桂林市妇女儿童医院, 广西 桂林 541001)

[摘要] 目的: 优选酶解法辅助提取钩藤中钩藤碱的工艺条件, 为该药材的资源利用提供参考。方法: 采用 HPLC 测定钩藤碱含量, 流动相甲醇-水 (60:40), 检测波长 254 nm。以钩藤碱提取率为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察加酶量、酶解温度、酶解时间、酶解 pH 对酶解提取工艺的影响。结果: 最佳酶解提取工艺条件为纤维素酶用量 1%, pH 4.5, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 2 h。钩藤碱提取率 0.54%, 较加热回流法提高了 54.29%。结论: 酶解法有利于提高钩藤碱的得率, 优选的提取工艺稳定可行, 适合推广于药材中生物碱类成分的提取。

[关键词] 钩藤; 钩藤碱; 酶解工艺; 纤维素酶

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0023-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0920.005.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:20

Optimization of Extraction Process of Rhynchophylline from Uncariae Ramulus Cum Uncis by Enzymolysis

Method WU Wei¹, TANG Zhen-xiang², LI Su-zhen^{1*} (1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 2. Women and Children's Hospital of Guilin, Guilin 541001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extracting process of rhynchophylline from Uncariae Ramulus Cum Uncis by enzymolysis method. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of rhynchophylline with mobile phase of methanol-water (60:40) and detection wavelength at 254 nm. With extraction rate of rhynchophylline as index, on the basis of single factor tests, effects of enzyme dosage, pH, enzymolysis temperature and time on extraction process were investigated by orthogonal test. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: dosage of cellulase 1%, pH of 4.5, enzymolysis temperature of 50 ℃, enzymolysis time of 2 h. Extraction rate of rhynchophylline was 0.54%, it increased 54.29% by comparing with heating reflux method. **Conclusion:** Enzymolysis method is suitable for extracting rhynchophylline from Uncariae Ramulus Cum Uncis, this optimized extraction process is stable and feasible, it is worthy of popularization and application for extraction of alkaloids from herbs.

[Key words] Uncariae Ramulus Cum Uncis; rhynchophylline; enzymatic process; cellulase

钩藤具有降血压、镇静、镇痛抗炎等作用^[1], 主要活性成分为吲哚类生物碱, 其中钩藤碱约占总生物碱的 28%~50%, 是该药材中含量最多的有效成分^[2]。钩藤的提取常采用水煮法、醇提法及有机溶剂提取法^[3-4], 钩藤碱提取率 0.1%~0.4%, 效率较低^[5-7]。生物酶解技术是利用酶破坏植物细胞壁结

构, 使植物细胞内的成分更容易溶解、扩散出来, 进而提高有效成分的提取率^[8]。由于大多数生物碱类成分结构中无苷键存在, 不存在被酶水解的问题, 目前已利用酶解辅助技术提取黄柏、两面针、黄连等药材中的生物碱类成分^[9-11]。本实验采用生物酶解法提取钩藤中钩藤碱, 通过正交试验优化酶解浸提

[收稿日期] 20140809(011)

[基金项目] 广西省自然科学基金项目(2014GXNSFB A118190); 广西省高等教育教学改革工程项目(2013JGB194); 广西省教育厅科研项目(201203YB123)

[第一作者] 吴卫, 博士, 副教授, 从事药物制剂研究与开发, Tel:0773-2295251, E-mail:wuwei_2007@126.com

[通讯作者] * 李素珍, 主管护师, 从事临床医学实验及药物开发研究, E-mail:1512483913@qq.com

工艺,为钩藤药用资源的开发与利用提供参考。

1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BS110S型电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司)。钩藤药材(安徽国鑫中药饮片有限公司,批号120621,经桂林医学院吴琼副教授鉴定为茜草科植物钩藤 *Uncaria macrophylla* 的带钩茎枝),钩藤碱对照品(纯度 >99%,上海研晶生化试剂有限公司,批号120420),纤维素酶(广州市齐云生物技术有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 钩藤碱的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取钩藤碱对照品 5.2 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取钩藤提取物 0.1 g,置于锥形瓶中,加甲醇 40 mL 超声提取 30 min,加甲醇定容至 50 mL,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

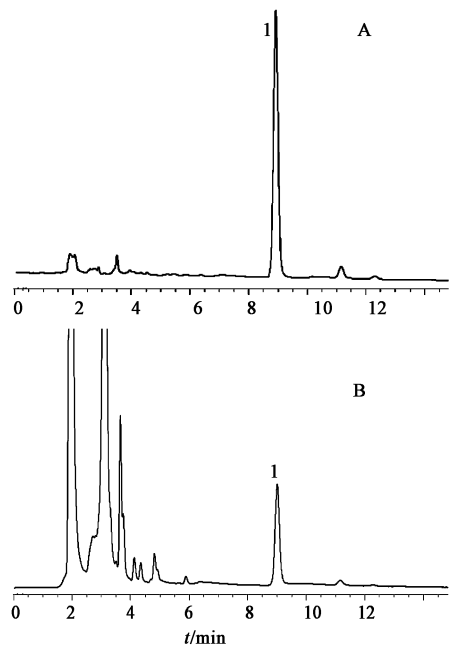
2.1.3 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(60:40,含 10 mmol \cdot L⁻¹ 三乙胺,用冰乙酸调 pH 7.5),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 254 nm,进样量 20 μL 。

2.1.4 线性关系考察 取钩藤碱对照品储备液,加甲醇配成质量浓度分别为 10.4, 20.8, 41.6, 62.4, 83.2, 104.0 mg \cdot L⁻¹ 的系列溶液,按 2.1.3 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 5398.1X - 6651.5$ ($r = 0.9993$),线性范围 10.4 ~ 104 mg \cdot L⁻¹。

2.1.5 精密性及回收率试验 取 3 种不同质量浓度(10.4, 41.6, 83.2 mg \cdot L⁻¹)的钩藤碱对照品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件重复测定 5 次,结果 RSD 均 < 2.0%。称取钩藤提取物样品 10 mg,分别加入质量浓度为 41.6, 62.4, 83.2 mg \cdot L⁻¹ 钩藤碱对照品溶液 5 mL,计算平均回收率 98.45%,RSD 1.2%。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 加酶量 取钩藤药材粉碎过 20 目筛,精密称取 5 g,共 6 份,分别加入药材质量 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0% 的纤维素酶,充分混合,加 3 倍量水,用乙酸-乙酸钠缓冲液调 pH 5,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡酶解处理 1 h,分别加 8, 10 倍量 70% 乙醇水浴回流提取 2 次,每次 1 h,减压回收乙醇,浓缩成稠膏状,置真空干燥箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重,得钩藤



A. 对照品; B. 供试品; 1. 钩藤碱

图1 钩藤提取物 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Uncariae Ramulus Cum Uncis* extract

提取物,按提取率 = 提取物中钩藤碱质量/钩藤质量 \times 100% 计算钩藤碱提取率分别为 0.39%, 0.44%, 0.42%, 0.38%, 0.39%, 0.37%。

2.2.2 酶解温度 取钩藤药材粉碎过 20 目筛,精密称取 5 g,共 6 份,分别加入药材质量 1% 的纤维素酶,用乙酸-乙酸钠缓冲液调 pH 5,分别于 35, 40, 45, 50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$ 酶解反应 1 h,其他条件同 2.2.1 项,计算钩藤碱提取率分别为 0.37%, 0.39%, 0.45%, 0.46%, 0.41%, 0.39%。

2.2.3 酶解时间 精密称取粉碎过 20 目筛的钩藤药材粉末 5 g,共 6 份,分别置于锥形瓶中,各加入药材质量 1% 的纤维素酶,调 pH 5,分别于 45 $^{\circ}\text{C}$ 酶解反应 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 h,其他条件同 2.2.1 项,计算钩藤碱提取率分别为 0.37%, 0.45%, 0.50%, 0.46%, 0.47%, 0.45%。

2.2.4 酶解 pH 称取钩藤药材粉末(过 20 目筛) 5 g,共 5 份,置不同锥形瓶中,加入药材质量 1% 的纤维素酶,分别用乙酸-乙酸钠缓冲液调 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 酶解处理 2 h,其他条件同 2.2.1 项,计算钩藤碱提取率分别为 0.48%, 0.51%, 0.50%, 0.47%, 0.45%,考虑生物碱类成分在较低 pH 溶液中稳定性可能会降低,故酶解 pH 选择 4.5 ~ 5.5。

2.3 正交试验优选 称取钩藤药材粉末(过 20 目

筛)5 g,共 27 份,在单因素试验基础上,选择加酶量、酶解温度、酶解时间和 pH 为考察因素,以钩藤碱提取率为指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排与结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对钩藤碱提取率影响顺序为 $A > C > B > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A, C 对提取效果有显著性影响,因素 B 则无显著性影响。综合考虑,确定最佳酶法提取工艺条件为 $A_2B_3C_2D_1$,加酶量 1%,pH 4.5,酶解温度 50 °C,酶解时间 2 h。

表 1 钩藤酶解提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of enzymatic process of Uncariae Ramulus Cum Uncis

No.	A 加酶量 /%	B 酶解温度 / °C	C 酶解时间 /h	D 酶解 pH	钩藤碱 提取率/%
1	0.5	40	1	4.5	0.37
2	0.5	45	2	5.0	0.41
3	0.5	50	3	5.5	0.39
4	1.0	40	2	5.5	0.54
5	1.0	45	3	4.5	0.47
6	1.0	50	1	5.0	0.46
7	1.5	40	3	5.0	0.43
8	1.5	45	1	5.5	0.39
9	1.5	50	2	4.5	0.51

表 2 酶解工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of enzymatic process

方差来源	SS	F	P
A	0.015 0	35.58	<0.05
B	0.001 5	3.53	>0.05
C	0.010 2	24.05	<0.05
D(误差)	0.000 4	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.4 验证试验 精密称取同一批样品 3 份,每份 5.0 g,按优选的工艺进行酶解提取;另取同等质量样品 3 份,不加纤维素酶,其他操作均与酶解法相同。结果表明钩藤经酶法提取后,钩藤碱提取率 0.54%,而未经酶处理的钩藤碱提取率 0.35%。酶解法与加热回流法相比,钩藤碱提取率提高了 54.29%。

3 讨论

细胞壁的主要成分为纤维素,纤维素能被纤维素酶水解。纤维素酶是由多种水解酶组成的复合酶,包括内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶等,各种酶能相互协同作用,降解纤维素生成葡萄糖,将植物细胞壁分解,使有效成分充分溶解、扩散出来,可极大地提高有效成分的提取率。纤维素酶作为一种复合酶,不同厂家不同批次的酶在组

成上可能存在一定差异,酶解反应时所需的酶量也可能不一样。本文使用的纤维素酶购自同一厂家同一批次,故应用时通过质量比称取加酶量。

酶促反应有最适宜的酶用量,当反应液中酶浓度较低时,反应速度与酶浓度成正比,但当酶浓度过大时,酶的水解作用反而受到抑制。酶解时间与药材结构有关,钩藤茎枝质地坚硬,表皮结构致密,提取溶剂短时间内很难渗入,随着细胞壁逐渐被纤维素酶水解,钩藤碱加速溶出,当细胞壁完全被酶解时,成分的溶出不再增加。酶解温度的影响主要表现在 2 个方面,一方面温度升高可使分子运动速度加快,有利于活性物质由细胞内向溶液扩散;另一方面过高的温度会影响纤维素酶活性,抑制酶的催化作用。酶在最适 pH 范围内会表现出最大活性,过高或过低的 pH 则会影响酶分子与底物分子的带电状态,进而影响酶和底物的结合。文献报道植物纤维素酶最适宜反应温度 40 ~ 60 °C,最适宜 pH 4 ~ 5^[8,12],故本文确定酶解反应温度 50 °C, pH 4.5,此时钩藤碱的提取率比溶剂浸提法提高了 54.29%。

[参考文献]

[1] 叶齐,齐荔红. 钩藤的主要成分及生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志,2012,27(5):508-509.

[2] 汪江涛,丁伯平. 钩藤碱和异钩藤碱药理作用研究进展[J]. 中国医药导刊,2012,14(7):1224-1225.

[3] 王盟,刘卫,邱庆浩,等. 正交实验法优选钩藤总碱提取工艺[J]. 医药导报,2009,28(9):1200-1201.

[4] 窦月,周洪雷,蔡梅超,等. 钩藤总生物碱提取工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(5):944-945.

[5] 张军,宋军. 钩藤提取物制备工艺研究[J]. 食品与药品,2011,13(5):201-202.

[6] 何昱,黄家卫,杨维. 钩藤 HPLC 指纹图谱的构建[J]. 中国药房,2011,22(11):1007-1009.

[7] 张鹏,覃冬杰,黄瑞松,等. HPLC 测定广西产钩藤药材中的钩藤碱[J]. 华西药学杂志,2012,27(2):209-211.

[8] 于敬,周晶. 生物酶解技术在中药提取中的应用[J]. 现代药物与临床,2010,25(5):340-344.

[9] 林静,高卫真,李卓燕,等. 酶解辅助提取关黄柏生物碱的工艺研究[J]. 天津医科大学学报,2012,18(3):388-391.

[10] 陆世惠,邓风云,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):43-45.

[11] 张华. 黄连有效成分酶解法提取工艺研究[J]. 山东中医杂志,2013,32(6):425-426.

[12] 杨再,陈佳铭,郝志坤,等. 天然植物有效成分的提取新技术——生物酶解技术[J]. 饲料博览,2006(1):40-42.

[责任编辑 刘德文]