

超声-酶法提取两面针中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的工艺优选

陆世惠^{*}, 林瑶, 陈冉, 卢红梅

(右江民族医学院药学院, 科学实验中心, 广西百色 533000)

[摘要] 目的:优化超声-酶法提取两面针中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的工艺条件。方法:采用 HPLC 测定白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物提取率,流动相乙腈-水-磷酸-三乙胺(25:75:0.2:0.25),检测波长 284 nm。通过单因素试验考察溶剂加酸和酶解预处理对有效成分提取率的影响,利用正交试验优化提取次数、超声功率和溶剂用量,通过动态过程优化超声时间。结果:最佳工艺条件为复合酶预处理后,加 40% 乙醇(含盐酸 0.5%)于 250 W 超声提取 3 次,每次的溶剂用量分别为 6,3,3 倍,提取时间依次为 18,15,12 min。白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物提取率 90.5%。结论:该工艺经济、高效、节能、省时,可为开发利用两面针中白屈菜红碱等成分提供实验基础。

[关键词] 两面针;白屈菜红碱;乙氧基白屈菜红碱;超声法;酶解法

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1;Q814.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0023-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160512.1603.010.html>

[网络出版时间] 2016-05-12 16:03

Optimization of Ultrasonic Wave-enzymes Extraction Technology for Chelerythrine and Its 6-Alkoxy Derivatives from Zanthoxyli Radix

LU Shi-hui^{*}, LIN Yao, CHEN Ran, LU Hong-mei

(Science Experiment Center, School of Pharmacy, Youjiang Medical
University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technological conditions of ultrasonic wave-enzymes extraction for chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives from Zanthoxyli Radix. **Method:** HPLC was employed to determine contents of chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives with mobile phase of acetonitrile-water-phosphoric acid-triethylamine (25:75:0.2:0.25) and detection wavelength at 284 nm. Orthogonal test and single factor tests were adopted to optimize extraction process of chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives from Zanthoxyli Radix. **Result:** The optimal process was as follows: pretreated Zanthoxyli Radix powder with cellulase (1:250) and pectinase (1:250) for 30 min in 3.7 times volume of acetic acid-sodium acetate buffer (pH 5) at ambient temperature (≥ 30 °C), and then extracted 3 times by ultrasonic-wave (250 W) with 40% ethanol (containing 0.5% hydrochloric acid) as solvent, extracted 18 min with 6 times solvent at the first time, extracted 15 min with 3 times solvent at the second time, extracted 12 min with 3 times solvent at the third time. The extraction rate of chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives was 90.5%. **Conclusion:** This optimized process can improve economical benefit and efficiency, save energy and time, which provides experimental base for industrial production of chelerythrine from Zanthoxyli Radix.

[Key words] Zanthoxyli Radix; chelerythrine; ethoxy chelerythrine; ultrasonic method; enzymic method

[收稿日期] 20150827(011)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118185)

[通讯作者] ^{*}陆世惠,高级实验师,在读博士,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

两面针又名入山虎、麻药藤、入地金牛等,主要分布于广西、广东等地^[1],主治风湿骨痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、毒蛇咬伤等^[2]。其含有较丰富的白屈菜红碱、乙氧基白屈菜红碱(即 6-乙氧基-5,6-二氢白屈菜红碱)和 6-甲氧基-5,6-二氢白屈菜红碱,这些成分具有良好的抗肿瘤活性^[3-5]。雷欣潮等^[6]综合考察乙氧基白屈菜红碱产率等 3 项指标,认为两面针最佳提取工艺为加 14 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 60 min,但该工艺提取效率不佳,且能耗很大。另有研究表明酶解药材、溶剂加 0.5% 盐酸,都能提高氯化两面针碱和总生物碱的提取率^[7-9],但是否提高白屈菜红碱等的提取率尚未明确。基于此,本实验拟通过正交试验等方法优选两面针中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的提取工艺,为该药材的开发利用提供实验基础。

1 材料

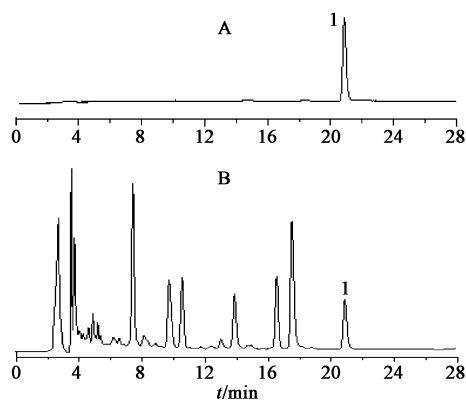
LC-20AT 型高效液相色谱仪和 SPD-20A 型紫外检测器(日本岛津),FA2004N 型电子分析天平(上海民析精密科学仪器公司),101-3 型电热鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器公司)。两面针药材购自广西南宁市,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* 的根;白屈菜红碱、乙氧基白屈菜红碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111718-201402,110847-200601),纤维素酶和果胶酶(10 000 U·g⁻¹,南宁东恒华道生物制品公司),水为超纯水,乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的含量测定

2.1.1 色谱条件 Luna C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水-磷酸-三乙胺(25:75:0.2:0.25),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 284 nm,柱温 30 ℃。6-烷氧基白屈菜红碱(无色或白色)在流动相的酸性条件下迅速转化为白屈菜红碱(橙黄色)^[4],乙氧基白屈菜红碱和白屈菜红碱在该条件下具有相同保留时间,对照品混合物表现为单峰。故测定结果计算为白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的总和。见图 1。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取白屈菜红碱对照品 10.4 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,得储备液。精密吸取储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL, 分别加甲醇定容至 50 mL,取 20 μL 进样,重复测定 3 次,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 5.394 \times$



A. 对照品; B. 供试品; 1. 白屈菜红碱

图 1 两面针提取液 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Zanthoxyli Radix* extract

$10^4 X + 2.148 \times 10^4$ ($r = 0.9993$), 线性范围 0.416 ~ 41.6 mg·L⁻¹。

2.1.3 样品测定 取提取液 0.5 ~ 2.5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 20 μL 进样, 计算白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的提取率。提取率 = 提取的白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物质量 / 药材中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物质量 × 100%。

2.1.4 精密度试验 取 2.08 mg·L⁻¹ 白屈菜红碱对照品溶液按 2.1.1 项下条件重复测定 6 次, 计算峰面积的 RSD 0.8%。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试液, 分别于 0, 4, 8, 16, 24, 48 h 按 2.1.1 项下条件测定, 计算白屈菜红碱峰面积的 RSD 1.1%。

2.1.6 重复性试验 取同一样品按 2.1.3 项下方法制备供试液, 平行 6 份, 按 2.1.1 项下条件测定, 计算白屈菜红碱峰面积的 RSD 1.3%。

2.1.7 加样回收率试验 取白屈菜红碱质量浓度 52.8 mg·L⁻¹ 的样品溶液 2.5 mL, 平行 5 份, 加入 41.6 mg·L⁻¹ 白屈菜红碱对照品 2.5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 按 2.1.1 项下条件测定, 计算平均加样回收率 99.1%, RSD 1.4%。

2.2 药材中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物含量的测定 将两面针药材粉碎(粒径 ≤ 0.5 mm), 精密称取 6.0 g, 置索氏提取器中, 加入 95% 乙醇(含 0.5% 盐酸) 100 mL, 加热回流提取至提取液无色(约 3 h), 提取液加 95% 乙醇(含 0.5% 盐酸) 定容至 100 mL, 依法测得药材中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物质量分数 0.310%。

2.3 药材酶解预处理 称取两面针粉末(粒径 ≤ 0.5 mm) 100 g, 加入 3.7 倍量 pH 5 乙酸-乙酸钠缓

冲液 [(0.1 mol·L⁻¹ 乙酸-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸钠 (1:2)], 用纤维素酶、果胶酶 (酶底物质量比均为 1:250) 于室温 (≥30 ℃) 下预处理 30 min^[7-8], 100 ℃ 烘干 (部分试验不烘干, 直接加入计算量无水乙醇配成相应提取溶剂) 后进行提取。

2.4 超声工艺的优化

2.4.1 提取溶剂的选择 称取两面针粉末 100 g, 加 18 倍量溶剂 (正丁醇, 丙酮, 无水乙醇, 80% 乙醇, 60% 乙醇, 40% 乙醇, 20% 乙醇) 超声 (250 W) 提取 3 次, 每次 20 min, 滤过, 合并滤液, 定容至 2 L, 取样按 2.1.1 项下条件测定, 计算提取率分别为 4.2%, 5.6%, 10.9%, 19.0%, 26.1%, 35.7%, 25.5%。故选择 40% 乙醇。

2.4.2 加酸对提取的影响 称取两面针粉末 100 g, 在 40% 乙醇中加质量分数 0.5% 的盐酸、硫酸或乙酸, 按 2.4.1 项下方法提取, 结果提取率分别为 95.0%, 89.4%, 68.8%。表明加酸可大大促进白屈菜红碱等的提取。另在 40% 乙醇中加不同体积分数 (0.1%, 0.2%, 1.0%) 的盐酸, 同法提取, 结果提取率分别为 80.6%, 88.7%, 95.4%, 表明 0.5% 盐酸即可获得良好提取率。

2.4.3 酶解对提取的影响 称取未经酶解预处理的两面针粉末 (粒径 ≤0.5 mm) 100 g, 以 40% 乙醇 (含 0.5% 盐酸) 按 2.4.1 项下方法提取, 计算提取率 86.8%。证明酶解预处理可促进白屈菜红碱等的提取。

2.4.4 正交试验考察 确定选择 40% 乙醇 (含 0.5% 盐酸) 为提取溶剂, 每次提取时间 20 min, 设计 L₉(3⁴) 正交试验考察提取次数、超声功率及溶剂用量对工艺的影响。酶解后加入 2.4 倍量无水乙醇配成 6 倍量 40% 乙醇, 各次提取时溶剂用量分配为 12 = 6 + 6 = 6 + 3 + 3, 15 = 9 + 6 = 6 + 5 + 4, 18 = 10 + 8 = 7 + 6 + 5。合并滤液, 定容至 2 L, 取样测定, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。由直观分析可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为 A > B > C。方差分析表明 A 和 B 因素均有显著性影响, C 因素则无显著影响, 以 A₃B₃C₁ 为最佳, 即超声功率 250 W, 加 12 倍量 40% 乙醇 (含 0.5% 盐酸) 提取 3 次, 提取溶剂用量分别为 6, 3, 3 倍)。

2.4.5 动态过程优化超声时间 称取两面针粉末 100 g, 按正交试验优化的条件超声提取, 超声时间 24 min, 在提取过程中每隔 3 min 抽取提取液 5 mL, 同时补足相同体积溶剂。测定各样品液中白屈菜红碱浓度, 见表 3。结果显示第 1, 2, 3 次提取稳态期

表 1 两面针中白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物超声提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of ultrasonic-wave assisted extraction for chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives from Zanthoxyli Radix

No.	A 提取数 / 次	B 功率 / W	C 溶剂用量 / 倍	D (空白)	提取率 / %
1	1	150	12	1	64.3
2	1	200	15	2	73.2
3	1	250	18	3	80.8
4	2	150	15	3	75.4
5	2	200	18	1	85.7
6	2	250	12	2	80.8
7	3	150	18	2	82.7
8	3	200	12	3	84.1
9	3	250	15	1	94.2

表 2 超声提取工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of extraction rate of chelerythrine and its 6-alkoxy derivatives

方差来源	SS	F	P
A	305.01	32.52	<0.05
B	189.31	20.18	<0.05
C	69.55	7.41	>0.05
D(误差)	9.38		

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.00。

分别为 18, 15, 12 min, 这就是各次提取的最佳超声时间。

表 3 超声提取各时间点提取液中白屈菜红碱质量浓度

Table 3 Concentration of chelerythrine in Zanthoxyli Radix extract at different time of ultrasonic-wave assisted extraction mg·L⁻¹

超声时间/min	第 1 次提取	第 2 次提取	第 3 次提取
3	224	174	96
6	438	358	188
9	641	521	286
12	818	604	323
15	903	646	328
18	967	642	324
21	973	645	330
24	969	647	327

2.5 验证试验 称取两面针粉末 100 g, 共 3 份, 按优化的工艺条件进行试验, 结果白屈菜红碱及其 6-烷氧基衍生物的平均提取率 90.5%, RSD 1.3%。另称取未经酶解预处理的两面针粉末 (粒径 ≤0.5

mm)100 g,共3份,加14倍量80%乙醇回流提取3次,每次60 min^[6],白屈菜红碱等的平均提取率37.4%,RSD 2.3%。对2种方法的提取率均数进行成组设计资料的 t 检验, $t = 64.224, P < 0.001$,说明差别具有极显著性。

3 讨论

本研究发现加0.5%盐酸能使白屈菜红碱及其6-烷氧基衍生物的提取率从35.7%提高到95.0%,还能使95%乙醇索氏提取产率从0.174%提高到0.310%,提高幅度都很大。在两面针中,6-烷氧基白屈菜红碱(叔胺,乙醇溶解度低)与白屈菜红碱(季铵盐,乙醇溶解度好)共存,两者动态平衡可相互转化,40%乙醇可提取到大部分白屈菜红碱及小部分6-烷氧基白屈菜红碱,加0.5%盐酸后6-烷氧基白屈菜红碱几乎全部转化为白屈菜红碱,以后者形式提取出来。若再以氨性乙醇(或甲醇)处理白屈菜红碱,则恢复为6-烷氧基白屈菜红碱。正因二者有这样的化学性质,有人认为两面针中可能没有6-烷氧基白屈菜红碱,而是白屈菜红碱经溶剂处理转化而来^[3-4]。但从0.5%盐酸对白屈菜红碱提取率的提高很大来看,两面针中应该含有6-烷氧基白屈菜红碱。

纤维素酶水解细胞壁上纤维素中的糖苷键,使细胞松弛、破裂,超声波再以其特有的空化效应促使细胞破裂,使其内容物易于溶出,本文综合运用了这2种现代化手段促进提取。原文献酶解用4倍量缓冲液^[7-8],为使工艺更简便、节能,本实验用3.7倍量

缓冲液,预处理后直接加2.4倍量无水乙醇即可进行超声提取。正交试验结合动态过程优化工艺条件是本实验的另一特色,动态过程优化超声时间,可准确把握每次提取的最短有效时间,使整个工艺进一步节能省时。

[参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第四十三卷. 第二分册[M]. 北京:科学出版社,1997:13-16.
- [2] 中国药科大学. 中药辞海. 第一卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:129-130.
- [3] 刘延成,程风杰,蒙衍强,等. 两面针化学成分、药理活性及抗肿瘤机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(4):550-555.
- [4] 王玫馨. 两面针化学成分的研究[J]. 中山医学院学报,1980,1(4):341-349.
- [5] 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):535-542.
- [6] 雷欣潮,刘华钢,赖茂祥,等. 正交实验法优选两面针的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(10):2494-2495.
- [7] 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):841-844.
- [8] 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.
- [9] 陆世惠,龙盛京. 从两面针中提取总生物碱的工艺研究[J]. 西北药学杂志,2012,27(6):514-516.

[责任编辑 刘德文]