

酶解法辅助浸渍提取两面针中总生物碱的工艺优选

陆世惠^{1*}, 邓风云², 卢红梅¹, 陈楠¹, 林瑶¹

(1. 右江民族医学院药理学系, 广西 百色 533000; 2. 广西百色市中医医院, 广西 百色 533000)

[摘要] 目的: 优选酶解法辅助浸渍提取两面针中总生物碱的工艺。方法: 以总生物碱提取率为指标, 采用单因素试验考察酶的种类、加酶量、pH、酶解温度及时间对酶解工艺的影响; 以总生物碱提取率为指标, 采用正交试验考察提取次数、提取时间及乙醇体积分数对两面针总生物碱浸渍提取工艺的影响。结果: 酶解工艺条件为纤维素酶、果胶酶与底物质量比均为 1: 250, 4 倍量 pH 5 缓冲液, 室温 (30 ℃) 下酶解 30 min; 最佳浸渍提取工艺为以 12, 4, 3 倍量 60% 乙醇溶液 (盐酸质量浓度 5 g·L⁻¹) 室温下浸渍 3 次, 每次 2 h, 总生物碱提取率 85.22%。结论: 该优选的工艺简单高效、节能环保, 为工业生产提供实验依据。

[关键词] 两面针; 总生物碱; 酶法; 正交试验; 浸渍

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2012) 23-0043-03

Optimization of Extracting Technology for Total Alkaloids from
Zanthoxylum nitidum by Enzymatic Hydrolysis
Assisted Immersion Method

LU Shi-hui^{1*}, DENG Feng-yun², LU Hong-mei¹, CHEN Nan¹, LIN Yao¹

(1. Department of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;

2. Chinese Medicine Hospital in Baise City, Baise 533000, China)

[Abstract] Objective: To optimize extracting process of total alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by enzymatic hydrolysis assisted immersion. Method: With extraction rate of total alkaloids as index, effect of 5 factors on enzymatic technology was investigated by single factor test, including kind of enzyme, enzyme dosage, pH, temperature and time; extraction times, extraction time and the concentration of ethanol were chosen as factors, effects of 3 factors on immersion technology of total alkaloids from *Z. nitidum* was optimized by orthogonal test. Result: Optimized enzymatic hydrolysis process was as following: cellulase-substrate and pectinase-substrate of 1: 250, 4 times buffer with pH 5, enzyme pretreating for 30 min at ambient temperature (30 ℃); Optimum immersion extracting technology was following: extracted 3 times with 60% ethanol of 12, 4, 3 times amount (hydrochloric acid of 5 g·L⁻¹), at ambient temperature, 2 h each time. Extraction rate of total alkaloids of 85.22% by this process. Conclusion: This optimized process was simple, efficient, energy saving and environmentally friendly, and it could provide experimental base for industrial production.

[Key words] *Zanthoxylum nitidum*; total alkaloids; enzymatic; orthogonal test; immersion

两面针又名钉板刺、入山虎、入地金牛等, 主要分布于广西、广东、云南、贵州等地^[1], 主治风湿骨痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、毒蛇咬伤等症^[2], 现代医学证明其有抗癌作用^[3]。其主要有效成分为苯并

[收稿日期] 20120808(012)
[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

菲啶类生物碱^[4-5]。酶法辅助提取是低能耗技术,近年来被逐步应用到中草药提取中^[6-7]。以纤维素酶、果胶酶等作用于植物细胞,使细胞壁及细胞间质中的纤维素、半纤维素、果胶质等物质降解,破坏细胞壁的致密结构,可提高有效成分的提取率^[8]。故本实验研究两面针经酶解预处理后,浸渍法提取总生物碱的工艺,以探索节能环保的两面针总生物碱提取技术。

1 材料

TU1800 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司),FA2004N 型电子分析天平(上海民析精密科学仪器公司),LD4-2A 型低速离心机(北京医用离心机厂),CU-600 型电热恒温水槽(上海齐欣科学仪器公司),氯化两面针碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 848-9901),纤维素酶(10 000 U·g⁻¹,南宁东恒华道生物制品公司),果胶酶(10 000 U·g⁻¹,南宁东恒华道生物制品公司),其他试剂均为分析纯。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两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的根和茎。

2 方法与结果

2.1 总生物碱的测定^[9]

2.1.1 标准曲线的制备 精密称取氯化两面针碱对照品 10.4 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL,精密吸取 50,100,200,300,400,500 μ L,加 60% 乙醇-pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液定容至 10 mL,以水为参比(溶剂空白吸光度为 0),于 328 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $A = 0.095\ 68X - 0.008\ 3$ ($r = 0.999\ 5$),线性范围 1.04 ~ 10.40 mg·L⁻¹。

2.1.2 样品测定 将样品溶液中乙醇体积分数调节至 60%,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,倾出上清液作为供试液,精密取供试液适量,以标准曲线制备法测定总生物碱含量,计算总碱提取率。

总碱提取率 = 提取得的总生物碱质量/药材中总生物碱质量 × 100%。

2.1.3 精密度试验 取 5.20 mg·L⁻¹ 的对照品溶液反复测定 A 6 次,计算溶液的总生物碱浓度,结果 RSD 0.12%。

2.1.4 稳定性试验 取样品溶液适量,依法分别于 0,4,8,16,24,48 h 测定 A,结果 RSD 0.35%。

2.1.5 重复性试验 取样品溶液适量,平行 5 份,依法测定 A,结果 RSD 0.23%,说明该方法重复性良好。

2.1.6 加样回收率试验 取已知质量浓度的样品溶液适量,平行 5 份,加入对照品适量,依法测定 A,结果平均加样回收率 99.6%,RSD 0.93%。

2.2 酶解工艺考察

2.2.1 预处理 将两面针药材粉碎(粒径 ≤ 0.5 mm),加入一定 pH 的乙酸-乙酸钠缓冲液,加入酶,充分搅拌,在恒温水浴下保温一定时间。预处理完成后立即把溶剂配成 10 倍量 60% 乙醇溶液-5 g·L⁻¹ 盐酸,于室温下浸渍 4 h,过滤,取滤液进行检测。结果表明加入纤维素酶、果胶酶对两面针可提高总生物碱提取率。

2.2.2 酶种类的选择 在其他参数一致的情况下,按 2.2.1 项下方法进行酶解,结果未加酶、加纤维素酶、加果胶酶和加复合酶(纤维素酶 + 果胶酶)的总生物碱提取率分别为 52.74%,58.30%,55.45%,60.79%。说明加复合酶效果较好。

2.2.3 加酶量考察 在其他参数一致的情况下,按 2.2.1 项下方法加复合酶进行酶解,纤维素酶、果胶酶与底物质量比均为 1:500,1:250,1:125,1:60 时总生物碱提取率分别为 58.21%,60.79%,60.90%,61.12%。故选择 2 种酶与底物质量比均为 1:250。

2.2.4 pH 的选择 在两种酶与底物质量比均为 1:250 条件下,按 2.2.1 项下方法加复合酶进行酶解,考察酶解 pH,结果 pH 为 3,4,5,6 时总生物碱提取率分别为 55.15%,60.27%,60.79%,60.19%。说明酶解 pH 5 较好。

2.2.5 酶解温度的选择 在两种酶与底物质量比均为 1:250,pH 5 的条件下,对酶解温度进行考察,结果在室温(30℃),40,50,60℃条件下总生物碱提取率分别为 60.08%,60.45%,60.79%,60.48%。说明不低于 30℃时温度影响较小,故选取室温(30℃)下酶解。

2.2.6 酶解时间的选择 在两种酶与底物质量比均为 1:250,pH 5,室温的条件下,对酶解时间进行考察,结果酶解 15,30,60,120 min 时总生物碱提取率分别为 58.05%,60.18%,60.79%,60.88%。故确定酶解时间 30 min。

2.3 浸渍提取工艺优选 经酶解(加入约 4 倍量缓冲液)预处理后,立刻进行浸渍法提取。经预试验发现,溶剂中乙醇体积分数和提取次数对提取工艺的影响较大,提取时间 > 4 h 后提取率未见增加,溶剂量对试验影响较小。在保持溶剂含 5 g·L⁻¹ 盐酸^[5]的条件下进行 L₉(3⁴) 正交试验,考察乙醇体积

分数、提取次数及提取时间对总生物碱提取率的影响,因素水平见表 1。第 1,2,3 次提取的溶剂量分别为 12,4,3 倍量,由于第 1 次提取溶剂由原缓冲液直接加乙醇配成,故至少配制 12 倍量才能达到设计的乙醇体积分数。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 两面针总生物碱浸渍提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 提取数/次	C 提取时间 /h
1	50	1	1
2	60	2	2
3	70	3	4

表 2 两面针总生物碱浸渍提取工艺优选正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	总生物碱 提取率/%
1	1	1	1	1	51.96
2	1	2	2	2	64.92
3	1	3	3	3	73.38
4	2	1	2	3	65.68
5	2	2	3	1	73.10
6	2	3	1	2	82.61
7	3	1	3	2	63.32
8	3	2	1	3	71.14
9	3	3	2	1	79.74
K ₁	63.42	60.32	68.57	68.27	
K ₂	73.80	69.72	70.11	70.28	
K ₃	71.40	78.58	69.93	70.07	
R	10.38	18.26	1.54	2.01	

表 3 浸渍提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	177.10	2	24.08	<0.05
B	500.11	2	68.01	<0.05
C	4.27	2	0.58	
D(误差)	7.35	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对浸渍工艺的影响大小为 $B > A > C$; 方差分析表明提取次数和乙醇体积

分数对试验结果的影响均有显著性。因此,确定最佳浸渍工艺为 $A_2B_3C_2$,即用 60% 乙醇-5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸于室温下浸渍 3 次,每次 2 h。

2.4 验证试验 称取一定量两面针药材,按优选的酶解法辅助浸渍提取工艺进行 3 次验证试验,结果总生物碱提取率分别为 85.58%, 85.71%, 84.36%。同时称取等量两面针药材,不经酶解预处理直接进行浸渍提取,即加 6,6,6 倍量 60% 乙醇-5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸浸渍 3 次,每次 2 d,结果总生物碱提取率依次为 66.89%, 68.15%, 67.10%。说明两组试验的重复性良好,加酶组总碱提取率较不加酶组提高 17.84%,且大大缩短了提取时间。

3 讨论

60% 乙醇-5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸是两面针总生物碱的优良溶剂,在不进行酶解预处理时,总生物碱浸渍提取率已 >52%,用纤维素酶和果胶酶破坏细胞壁以提高提取率的空间有限,故在单因素试验设计中各水平的差异较小,体现其广泛的适用性,酶解温度 30 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$, pH 4 ~ 6 均可行。

[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 43 卷. 第 2 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 13.

[2] 中国药科大学. 中药辞海. 第 1 卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 129.

[3] 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.

[4] 孙小文, 段志兴. 花椒属药用植物研究进展[J]. 药学报, 1996, 31 (3): 231.

[5] 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.

[6] 蓝峻峰, 谢济运, 玉澜. 纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (16): 26.

[7] 赵一璐, 许云峰, 周建芹, 等. 内生青霉菌纤维素酶在银杏总黄酮提取中的应用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (16): 13.

[8] 陈栋, 周永传. 酶法在中药提取中的应用和进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (2): 99.

[9] 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.

[责任编辑 全燕]