

两面针生物碱不同提取方法的比较

李秀霞¹, 卢红梅², 陆世惠^{2*}¹右江民族医学院附属医院妇科; ²右江民族医学院药学院, 百色 533000

摘要: 复合酶预处理两面针药材后, 以氯化两面针碱、总生物碱得率和干膏收率为指标, 采用正交试验和动态过程优化半仿生-超声法、渗漉法和回流法提取工艺, 对其提取效果进行比较。各以 4 倍量枸橼酸-三乙胺 60% 乙醇缓冲液 (pH 2.0、7.5 和 8.3) 为溶剂, 依次超声 (250 W) 提取 15、12 和 9 min, 氯化两面针碱得率 2.52%, 总生物碱得率 2.15%, 干膏收率 16.14%。以 60% 乙醇 (5 g/L 盐酸) 为溶剂, 浸润 10 min 后以 10 mL/min 流速渗漉 16 倍量溶剂, 氯化两面针碱得率 2.30%, 总生物碱得率 2.18%, 干膏收率 14.86%。分别用 6、5 和 4 倍量 60% 乙醇 (5 g/L 盐酸) 依次回流 15、12 和 9 min, 氯化两面针碱得率 2.46%, 总生物碱得率 2.36%, 干膏收率 15.37%。半仿生-超声法和渗漉法比回流法经济, 可为工业生产提供参考依据。

关键词: 两面针; 氯化两面针碱; 总生物碱; 半仿生提取; 渗漉

中图分类号: Q932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.004

Comparison of Extraction Technologies for Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*LI Xiu-xia¹, LU Hong-mei², LU Shi-hui^{2*}¹Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities;²Department of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

Abstract: *Zanthoxylum nitidum* powder was pretreated with cellulase (1:250) and pectinase (1:250) for 30 min in 4 times volume of disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer (pH 5) at ambient temperature (≥ 30 °C), and then extracted by semi-bionic (ultrasonic-wave assisted), percolation and reflux extraction methods. The extraction conditions were optimized by orthogonal test and in dynamic process, with extraction yields of nitidine chloride, total alkaloids and dry extract as evaluation indexes. The optimized conditions of different extraction methods were compared for their extraction performances. When the powder was extracted by ultrasonic-wave (250 W) with 4 times volume of citric acid-triethylamine buffer (pH 2.0, 7.5 and 8.3, in 60% alcohol) for 15, 12 and 9 min, the extraction yields of nitidine chloride, total alkaloids and dry extract was 2.52%, 2.15% and 16.14%, respectively. When the powder was percolated with 16 times volume of 60% (V/V) alcohol (5 g/L hydrochloric acid) at 10 mL/min (impregnated for 10 min at first), the three indexes were 2.30%, 2.18% and 14.86%. When the powder was refluxed with 6, 5 and 4 times volume of 60% (V/V) alcohol (5 g/L hydrochloric acid) for 15, 12 and 9 min, the three indexes were 2.46%, 2.36% and 15.37%. The semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction and percolation extraction, are more economic than reflux extraction. This study provides reference for industrial production.

Key words: *Zanthoxylum nitidum*; nitidine chloride; total alkaloids; semi-bionic extraction; percolation

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 系芸香科花椒属植物, 主要分布于广西、广东、云南、贵州等地, 主治风湿骨痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、毒蛇咬伤等症, 其主要有效成分是多种生物碱, 其中最重要的是氯化两面针碱, 具有良好的抗肿瘤等多种作用^[1]。雷欣潮^[2]以 80% 乙醇回流提取氯化两面针

碱等; 黄晓燕^[3]加入盐酸到 75% 乙醇中回流提取, 氯化两面针碱提取率比不加酸回流高, 这些工艺耗能很高。已有研究^[4]采用超声-酶法辅助半仿生提取两面针活性成分, 是节能工艺, 但由于生物碱水溶性较差, 提取效率较低。为此, 本实验探索用乙醇缓冲液替换纯水缓冲液进行半仿生提取, 以正交试验和动态过程^[5]优化工艺条件, 同时与渗漉法、回流法进行比较, 试图找出高效经济的两面针提取工艺, 为含两面针的中药制剂的工业生产提供参考。

收稿日期: 2014-09-26 接受日期: 2015-02-02

基金项目: 广西自然科学基金 (2014GXNSFBA118185)

* 通讯作者 Tel: 86-776-2829035; E-mail: lushihui0818@126.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-10AT 高效液相色谱仪和 SPD-10A 紫外检测器(日本岛津), TU1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用), KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山), FA2004N 型电子分析天平(上海民析), 101-3 型电热鼓风干燥箱(上海圣欣)。

1.2 试药

氯化两面针碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110848-200502), 纤维素酶与果胶酶(10000 U/g, 南宁东恒华道), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。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两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的根和茎。

2 实验方法

2.1 样品酶解预处理

将两面针药材粉碎(粒径 ≤ 0.5 mm), 称取药粉

100 g, 加入 4 倍量 pH 5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠: 0.1 mol/L 柠檬酸 = 10.30: 9.70), 用纤维素酶和果胶酶(酶底物质量比均为 1: 250)于室温(≥ 30 °C)下预处理 30 min^[6,7], 滤过, 取滤渣进行以下各种方法的提取。

2.2 半仿生-超声工艺的优化

2.2.1 正交试验

以乙醇-水为溶剂, 用枸橼酸和三乙胺调节 pH 为 2.0、7.5 和 8.3^[8](0.1 mol/L 枸橼酸: 0.1 mol/L 三乙胺 = 15.13: 1、1: 2.93、1: 2.98), 依次进行超声提取, 每次提取 20 min。经预试验, 70% 乙醇提取的氯化两面针碱和总碱得率低于 60% 乙醇, 总溶剂量大于 18 倍(不包括预处理溶剂)氯化两面针碱和总碱得率增加不明显。因此, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验考察超声功率(A)、乙醇体积分数(B)及溶剂量(C, 3 次提取平均分配溶剂)对氯化两面针碱、总碱得率和干膏收率的影响, 因素水平见表 1。把 3 次提取液与酶解液合并, 定容至 2000 mL, 取样测定, 重复试验 1 次, 测定结果取均值。

表 1 半仿生-超声提取因素水平表

Table 1 Factors and levels of semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction

水平 Level	因素 Factor		
	A 功率 A power (W)	B 乙醇体积分数 B Alcohol conc. (%)	C 溶剂量 C solvent (times)
1	150	40	12
2	200	50	15
3	250	60	18

2.2.2 动态过程优化提取时间

按正交试验优选出的工艺进行半仿生-超声提取, 超声时间 21 min, 在提取过程中每隔 3 min 抽取提取液 5 mL, 每次补足相同体积的相应溶剂。测定各样品液中氯化两面针碱和总生物碱浓度。

2.3 正交试验优化渗漉工艺

将酶解液放出渗漉筒的同时加入 3 倍量 60% 乙醇(5 g/L 盐酸)^[7,9], 浸润一定时间后继续滴加 60% 乙醇(5 g/L 盐酸)同时以相同流速渗漉。经试验, 浸润时间大于 30 min, 氯化两面针碱和总生物碱得率未见增加; 渗漉流速大于 20 mL/min, 氯化两面针碱和总生物碱得率明显下降; 溶剂量(包括浸润

溶剂, 不包括缓冲液)大于 20 倍量, 氯化两面针碱和总生物碱得率增加很少。据此设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察浸润时间(E)、渗漉流速(F)和溶剂量(G)对氯化两面针碱、总生物碱得率和干膏收率的影响, 因素水平见表 2。把渗漉液与酶解液合并, 定容至 2000 mL, 取样测定, 重复试验 1 次, 测定结果取均值。

2.4 动态过程优化回流时间

用 6、5 和 4 倍量 60% 乙醇(5 g/L 盐酸)回流提取 3 次, 每次 30 min^[9], 在回流过程中每隔 3 min 抽取提取液 5 mL, 每次补足同体积溶剂。测定各样品液中的氯化两面针碱和总生物碱浓度。

表2 渗漉提取因素水平表

Table 2 Factors and levels of percolation extraction

水平 Level	因素 Factor		
	<i>E</i> 浸润时间 <i>E</i> Impregnation time (min)	<i>F</i> 渗漉流速 <i>F</i> Percolation rate (mL/min)	<i>G</i> 溶剂量 <i>G</i> Solvent (times)
1	10	5	12
2	20	10	16
3	30	20	20

2.5 测定方法

2.5.1 氯化两面针碱^[6]

色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺(30:70:0.15:0.15), 检测波长 271 nm。吸取样品液 0.5 mL, 以流动相定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液 20 μL 进样, 按 $Y = 4.778 \times 10^4 X + 2.307 \times 10^3$ ($r = 0.9997$, 线性范围 1.16 ~ 11.60 μg/mL) 计算氯化两面针碱得率(氯化两面针碱得率 = 提取得的氯化两面针碱质量/药材原料质量 × 100%)。

2.5.2 总生物碱^[10]

吸取样品液适量, 调节乙醇体积分数为 60%, 1000 rpm 离心 5 min, 取上清液适量, 以体积分数 60% 乙醇-pH5.0 醋酸-醋酸钠缓冲液定容至 10 mL, 以溶剂为参比, 于 328 nm 处测定吸光度, 按 $A = 0.09586X - 0.0057$ ($r = 0.9996$, 线性范围 1.16 ~ 11.60 μg/mL) 计算总生物碱得率(总生物碱得率 = 提取得的总生物碱质量/药材原料质量 × 100%)。

2.5.3 干膏收率

量取样品溶液 50 mL 于水浴上挥干, 置干燥箱中 105 °C 烘 3 h 至恒重, 于干燥器中冷却 30 min, 称重, 扣除相应缓冲溶质干重, 得样品干膏质量, 计算干膏收率(干膏收率 = 干膏质量/药材原料质量 × 100%)。

3 实验结果

3.1 半仿生-超声工艺

3.1.1 正交试验

正交试验结果见表 3, 计算总评分[总评分 = (氯化两面针碱得率/2.65 + 总碱得率/2.17 + 干膏收率/16.31)/3], 方差分析见表 4。可见, 影响因素 $B > A > C$, A 和 B 因素均有显著影响, C 因素的影响无显著性, 从节能方面考虑以 $A_3B_3C_1$ 为佳, 即超声提取功率为 250 W, 以一定 pH 的 60% 乙醇为提取溶剂, 总溶剂量为 12 倍。

表3 半仿生-超声提取 L₉(3⁴) 正交试验结果Table 3 Results of L₉(3⁴) orthogonal test of semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction

No.	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	氯化两面针碱得率 Yield of nitidine chloride (%)	总碱得率 Yield of alkaloids (%)	干膏收率 Yield of dry extract (%)	总评分 Total score
1	1	1	1	1	1.89	1.51	11.44	70.35
2	1	2	2	2	2.16	1.74	13.12	80.71
3	1	3	3	3	2.37	1.91	14.68	89.15
4	2	1	2	3	2.08	1.74	13.35	80.18
5	2	2	3	1	2.38	1.99	15.34	91.86
6	2	3	1	2	2.36	1.94	14.51	89.14
7	3	1	3	2	2.20	1.86	14.07	85.00
8	3	2	1	3	2.42	1.96	14.55	90.28
9	3	3	2	1	2.65	2.17	16.31	100.00
<i>k</i> ₁	80.07	78.51	83.26	87.40				

k_2	87.06	87.62	86.96	84.95
k_3	91.76	92.76	88.67	86.54
R	11.69	14.25	5.41	2.45

表4 半仿生-超声提取方差分析

Table 4 Analysis of variance of semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction

方差来源 Source	SS	f	F	P
A	207.606	2	22.354	<0.05
B	312.577	2	33.657	<0.05
C	45.956	2	4.948	
D(误差 error)	9.287	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.000$ 。

3.1.2 动态过程优化提取时间

稳态期为 15 min,第 2 次提取稳态期为 12 min,第 3

动态过程检测结果见表 5。可见,第 1 次提取 次提取稳态期为 9 min,这就是各次最佳超声时间。

表5 半仿生-超声提取各时间点提取液中氯化两面针碱和总生物碱浓度

Table 5 Concentrations of nitidine chloride and total alkaloids in extract at different time of semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction

取样时间(min) Extraction time	第一次 First (g/L)		第二次 Second (g/L)		第三次 Third (g/L)	
	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids
3	0.078	0.65	0.054	0.44	0.045	0.35
6	0.154	1.17	0.103	0.86	0.088	0.68
9	0.220	1.73	0.151	1.35	0.117	0.97
12	0.285	2.31	0.195	1.61	0.119	0.97
15	0.312	2.58	0.197	1.63	0.116	0.96
18	0.314	2.60	0.194	1.62	0.120	0.99
21	0.311	2.57	0.196	1.63	0.118	0.98

3.2 正交试验优化渗漉工艺

正交试验优化渗漉工艺结果见表 6,计算总评分[总评分=(氯化两面针碱得率/2.45+总生物碱得率/2.33+干膏收率/15.84)/3],方差分析见表 7。可见,影响因素 $F > G > E$, F 和 G 因素的影响具

有显著性, E 因素的影响无显著性。 F 因素的差异主要体现在水平 2 和 3 之间, G 因素的差异主要体现在水平 1 和 2 之间,为了提高工作效率和节能,以 $E_1F_2G_2$ 为佳,即 2 号实验:浸润 10 min,以 10 mL/min 流速渗漉,渗漉溶剂量为 16 倍。

表6 渗漉提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 6 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test of percolation extraction

No.	E	F	G	H	氯化两面 针碱得率 Yield of nitidine chloride (%)	总碱得率 Yield of alkaloids (%)	干膏收率 Yield of dry extract (%)	总评分 Total score
1	1	1	1	1	2.04	1.92	13.37	83.36
2	1	2	2	2	2.24	2.17	14.85	92.77
3	1	3	3	3	2.07	1.95	13.59	84.66
4	2	1	2	3	2.37	2.28	15.17	96.79

5	2	2	3	1	2.33	2.19	15.23	95.08
6	2	3	1	2	1.86	1.79	11.88	75.91
7	3	1	3	2	2.45	2.33	15.84	100.00
8	3	2	1	3	2.12	2.04	13.52	86.48
9	3	3	2	1	2.06	1.93	13.43	83.90
k_1	86.93	93.38	81.92	87.45				
k_2	89.26	91.44	91.15	89.56				
k_3	90.13	81.49	93.25	89.31				
R	3.20	11.89	11.33	2.11				

表7 渗漉提取方差分析

Table 7 Analysis of variance of percolation extraction

方差来源 Source	SS	f	F	P
E	16.399	2	2.050	
F	244.284	2	30.532	<0.05
G	218.067	2	27.255	<0.05
H (误差 error)	8.001	2		

3.3 动态过程优化回流提取时间

动态过程优化回流时间结果见表8。可见,第1次回流稳态期为15 min,第2次回流稳态期为12

min,第3次回流稳态期为9 min,这就是各次回流的提取的最佳时间。

表8 回流提取各时间点提取液中氯化两面针碱和总生物碱浓度

Table 8 Concentrations of nitidine chloride and total alkaloids in extract at different time of reflux extraction

取样时间 Extraction time (min)	第一次 First (g/L)		第二次 Second (g/L)		第三次 Third (g/L)	
	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids	氯化两面针碱 Nitidine chloride	总碱 Total alkaloids
3	0.068	0.65	0.045	0.37	0.021	0.25
6	0.134	1.21	0.061	0.58	0.037	0.42
9	0.201	1.82	0.086	0.88	0.054	0.51
12	0.255	2.41	0.109	1.04	0.055	0.51
15	0.277	2.64	0.111	1.06	0.053	0.50
18	0.279	2.67	0.109	1.07	0.055	0.51
21	0.274	2.63	0.112	1.03	0.053	0.51
24	0.278	2.68	0.11	1.05	0.054	0.5
27	0.275	2.63	0.113	1.06	0.054	0.51
30	0.279	2.67	0.109	1.07	0.055	0.51

3.4 不同提取方法的验证与对比

按以上各法的优化工艺平行进行3份实验,测定结果取均值,结果见表9。用SPSS 13.0软件对三种方法的均数进行完全随机设计的单因素方差分析,按照 $\alpha = 0.05$ 水准可以认为:对于氯化两面针碱

得率,渗漉法低于其他二法,而其他二法间没有显著差异;对于总碱得率,回流法高于其他二法,而其他二法间也没有显著差异;对于干膏收率,三法两两间均有显著差别。

表9 不同提取方法的结果($n=3$)Table 9 Results of different extraction methods($n=3$)

提取方法 Extraction method	氯化两面针碱 Nitidine chloride		总碱 Total alkaloids		干膏 Dry extract	
	得率 Yield (%)	RSD (%)	得率 Yield (%)	RSD (%)	收率 Yield (%)	RSD (%)
半仿生-超声法 Semi-bionic coupled with ultrasonic-wave assisted extraction	2.52	1.79	2.15	1.63	16.14	1.34
渗漉法 Percolation extraction	2.30	1.15	2.18	2.07	14.86	1.22
回流法 Reflux extraction	2.46	1.43	2.36	1.07	15.37	1.44

4 结论与讨论

本实验用枸橼酸-三乙胺的60%乙醇溶液代替纯水缓冲液模拟胃肠道pH,对两面针中的生物碱等有效成分进行半仿生提取,克服了经典半仿生法对水溶性较差的生物碱提取率较低的问题,取得了与回流法同等的氯化两面针碱提取效果(总碱得率稍低),同时干膏收率高于回流法和渗漉法,体现了其能提取较多有效成分的特点。此外,这些提取物中大多数脂溶性比纯水缓冲液提取物强,可能获得更高的生物利用度,因为口服药物的吸收除了在胃肠道pH环境下呈分子状态之外,还要有适当的脂溶性以穿过生物膜的脂质双分子层。另一方面,与回流法相比,半仿生-超声法具有经济节能的优点,是工业化生产值得考虑的方法。需要说明的是,在预实验中发现,磷酸盐难溶于乙醇溶液,用盐酸和氢氧化钠调节乙醇溶液的pH没有缓冲能力,都不适于半仿生提取。

渗漉法是另一种节能的提取手段,但其对两面针总碱的提取效率远低于回流法^[9]。不过,药材经酶解预处理后再提取,渗漉法的提取效率比较接近回流法,即复合酶预处理促进了渗漉法和回流法的提取,而且提取效率都提高到相近的水平。虽然渗漉法氯化两面针碱得率和干膏收率稍低于半仿生-超声法,且提取时间较长,但对总碱提取效果相当,也无能耗,无须特殊设备,操作简易,也适合于大规模生产。

参考文献

1 Liu YC(刘延成), Cheng FJ(成风杰), Meng YQ(蒙衍强), *et al.* Research progresses on the chemical components, pharmacological activity, and antitumoral mechanism of *Zanthoxylum nitidum*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 550-555.

2 Lei XC(雷欣潮), Liu HG(刘华钢), Lai MX(赖茂祥), *et al.* Optimization of extraction technology of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. by orthogonal test. *Lishizhen Med and Mater Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22: 2494-2495.

3 Huang XY(黄晓燕), Huang GW(黄光伟), Qin QY(覃青云), *et al.* Comparison of two different extraction technologies for nitidine chloride from *Zanthoxylum nitidum*. *Oral Care Ind*(口腔护理用品工业), 2011, 21(5): 21-22.

4 Lu SH(陆世惠), Li XX(李秀霞), Lu HM(卢红梅), *et al.* Optimization of ultrasonic wave-enzymatic assisted semi-bionic extraction technology for *Zanthoxyli Radix*. *Chin J Exp Trad Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(16): 11-14.

5 Wang DZ(王东喆), Zhang J(章军), Zhang LY(张丽艳), *et al.* Research on the dynamic process optimization method of extraction technology. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37: 1388-1391.

6 Lu SH(陆世惠), Li XX(李秀霞). Extraction study of nitidine chloride from *Zanthoxylum nitidum* by ultrasonic wave-enzymes. *Chin Trad Pat Med*(中成药), 2013, 35: 841-844.

7 Lu SH(陆世惠), Deng FY(邓凤云), Lu HM(卢红梅). Optimization of ultrasonic extraction technology for *Zanthoxylum nitidum* by orthogonal design and in dynamic process. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25: 1130-1132.

8 Lan JF(蓝峻峰), Xie JY(谢济运). Semi-biotic extraction technology for flavones from *Phyllanthus urinaria*. *Chin Trad Pat Med*(中成药), 2012, 34: 742-744.

9 Lu SH(陆世惠), Long SJ(龙盛京). Study on the extraction of total alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2012, 27: 514-516.

10 Lu SH(陆世惠), Long SJ(龙盛京). Determination of total alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* in extraction solution by UV. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2008, 23: 350-352.