

超声-酶法提取两面针中别隐品碱的工艺优选

陆世惠^{1*}, 陈冉², 卢红梅¹, 林瑶¹, 韦健全¹

¹右江民族医学院药学院; ²右江民族医学院科学实验中心, 百色 533000

摘要:以别隐品碱提取率为指标, 先考察提取溶剂加酸和酶解预处理对两面针超声提取的适用性, 再用正交试验优化超声功率、提取次数和溶剂量, 最后动态过程优化超声提取时间。结果证明提取溶剂 pH ≤ 3 不利于别隐品碱的提取。最佳工艺条件为: 复合酶预处理后, 以体积分数 60% 乙醇超声 (250 W) 提取 3 次, 第 1 次以 7 倍量溶剂提取 18 min, 第 2 次以 3 倍量溶剂提取 12 min, 第 3 次以 2 倍量溶剂提取 12 min, 别隐品碱提取率为 89.5%。该工艺经济、高效、节能、省时, 可为开发利用别隐品碱提供实验基础。

关键词: 两面针; 别隐品碱; 超声; 酶法; 工艺

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.3.025

Optimization of Ultrasonic-Enzyme Extraction Technology for Allocryptopine from *Zanthoxylum nitidum*

LU Shi-hui^{1*}, CHEN Ran², LU Hong-mei¹, LIN Yao¹, WEI Jian-quan¹

¹Department of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities; ²Science experiment center, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

Abstract: In this study, the ultrasonic-assisted extraction technology for allocryptopine from *Zanthoxylum nitidum* was investigated. Extraction with acidic solvent and pretreatment performance with enzymes were compared. The effects of ultrasonic power, times of extraction and solvent volume on extraction performance were optimized by orthogonal test. Extraction duration was optimized in dynamic process, with extraction yield of allocryptopine as the evaluation index. The results showed that the extraction yield of allocryptopine with neutral solvent was better than that with acidic (pH ≤ 3) solvent. The optimal extraction process was as follows: *Z. nitidum* powder was pretreated with cellulase (1:250) and pectinase (1:250) for 30 min in 3 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 60% ethanol as solvent, extracted 18 min with 7 times solvent at the first time, extracted 12 min with 3 times solvent at the second time, extracted 12 min with 2 times solvent at the third time. Under the optimized extraction procedure, the extraction yield of allocryptopine was 89.5%. The optimized extraction process is economic, efficient, energy and time saving. It provides experimental basis for industrial production.

Key words: *Zanthoxylum nitidum*; allocryptopine; ultrasonic; enzymatic method; technology

两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., 又名入山虎、麻药藤、入地金牛、叶下穿针、红倒钩筋等, 系芸香科花椒属植物, 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], 2010 年版中国药典收载, 其中含有丰富的别隐品碱 (图 1)。近年来, 刘朝亮等人^[3]发现, 别隐品碱通过抑制 TOPO 异构酶 I 而发

挥抗肿瘤作用。目前, 两面针的提取工艺研究主要集中于氯化两面针碱^[4,6] (图 1), 对于别隐品碱的提取笔者未见报道。酶法辅助提取是以纤维素酶等降解植物细胞壁及细胞间质中的纤维素等物质, 破坏细胞壁的致密结构, 从而促进有效成分的提取, 是低能耗而廉价的技术。已有研究^[6,7]表明, 用纤维素酶和果胶酶预处理两面针药材, 可以促进氯化两面针碱、总生物碱和某些其他成分的提取, 但是否促进别隐品碱的提取尚未明确。还有研究^[7,8]提示, 加酸于乙醇中, 可以提高两面针总生物碱和氯化两面针碱的提取率, 但是否提高别隐品碱提取率还不清

收稿日期: 2015-08-24 接受日期: 2015-10-21

基金项目: 广西自然科学基金 (2014GXNSFB118185)

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

楚。为此,本实验研究从两面针中提取别隐品碱的工艺,明确纤维素酶和酸对其提取的影响,探索高效节能的别隐品碱提取技术,为别隐品碱的开发利用提供实验基础。

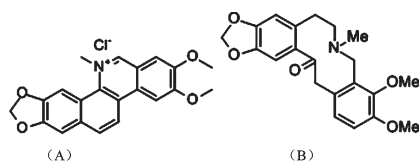


图1 氯化两面针碱(A)和别隐品碱(B)的结构

Fig. 1 Chemical structures of nitidine chloride (A) and allocryptopine (B)

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪和 SPD-20A 紫外检测器(日本岛津),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 试剂

别隐品碱对照品(北京盛世康普化工技术研究院,批号:B-059-140727),纤维素酶与果胶酶(10000 U/g,南宁东恒华道),乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,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。

2 实验方法

2.1 别隐品碱的测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Luna C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺(25:75:0.2:0.25, V/V/V/V),流速 1 mL/min,检测波长 284 nm,柱温箱 30 °C。

2.1.2 标准曲线的制备

精密称取别隐品碱对照品 10.0 mg,甲醇溶解定容至 10 mL 得储备液。精密吸取储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 和 2 mL,以甲醇定容至 10 mL,取 20 μL 进样,重复测定 3 次。

2.1.3 样品的测定

取提取液 2.5 mL,以甲醇定容至 10 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 20 μL 进样,重复测定 2 次,以平均积分峰面积根据回归方程计算别隐品

碱的提取率(提取率 = 提取得的别隐品碱质量/药材中别隐品碱质量 × 100%)。

2.2 药材中别隐品碱含量的测定

将两面针药材粉碎(粒径 ≤ 0.5 mm),精密称取 6 g,置索氏提取器中,加入 95% 乙醇 100 mL,加热回流提取至提取液无色(约 7 h),提取液定容至 100 mL,依法测定。

2.3 药材酶解预处理

称取经粉碎的两面针(粒径 ≤ 0.5 mm) 100 g,加入 3 倍量 pH 5 的醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1 mol/L 醋酸:0.1 mol/L 醋酸钠 = 1:2),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],100 °C 烘干(部分实验不烘干,直接加入计算量无水乙醇配成相应提取溶剂)后进行以下超声提取实验。

2.4 超声工艺的优化

2.4.1 提取溶剂的选择

以 18 倍量不同浓度乙醇(平均分配)超声(250 W)提取 3 次,每次超声 20 min,滤过,合并滤液,定容至 2000 mL,取样测定。

2.4.2 溶剂酸碱性对提取的影响

在 60% 乙醇中添加盐酸(pH 1)、硫酸(pH 1)、醋酸(pH 3)或醋酸(pH 5),按 2.4.1 法提取。

2.4.3 酶解预处理对提取的影响

称取未经酶解预处理的两面针(粒径 ≤ 0.5 mm) 100 g,以 60% 乙醇为溶剂,按 2.4.1 法提取。

2.4.4 正交试验

经预实验发现,超声功率、提取次数对提取率影响较大,溶剂量大于 18 倍提取率提高很少,设计 L₉ (3⁴) 正交试验考察超声功率(A)、提取次数(B)及溶剂量(C)。酶解预处理后加入 4.2 倍量无水乙醇恰好配成 7 倍量 60% 乙醇,故各次提取溶剂量分配为 12 = 7 + 5 = 7 + 3 + 2, 15 = 9 + 6 = 7 + 4 + 4, 18 = 10 + 8 = 7 + 6 + 5) 对别隐品碱提取率的影响,以 60%

表1 超声提取因素水平表

Table 1 Factors and levels of ultrasonic-assisted extraction

水平 Level	因素 Factor		
	A 功率 Power (W)	B 提取次数 Times of extraction	C 溶剂量(倍) Solvent volume (multiple)
1	150	1	12
2	200	2	15
3	250	3	18

乙醇超声提取,每次提取 20 min,因素水平见表 1。把各次滤液合并,定容至 2000 mL,取样测定,重复试验 1 次。

2.4.5 动态过程优化提取时间

按正交试验优选出的工艺进行超声提取,超声时间 24 min,在提取过程中每隔 3 min 抽取提取液 5 mL,同时补足相同体积的 60% 乙醇。测定各样品液中别隐品碱浓度。

2.5 最佳提取工艺的验证

按以上优化出的最佳工艺条件平行进行 3 份实验。

3 实验结果

3.1 别隐品碱的测定

3.1.1 标准曲线的制备

以质量浓度为横坐标,平均积分峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 2.052 \times 10^4 X + 8.041 \times 10^3$ ($r = 0.9995$,线性范围 10.0 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$)。

3.1.2 精密度试验

取 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液反复测定 6 次,以积分峰面积计算,RSD 为 0.71%。

3.1.3 稳定性试验

取一样品供试液,依法分别于 0、4、8、16、24、48 h 测定,计算别隐品碱浓度,RSD 为 0.87%。

3.1.4 重复性试验

取一样品制备供试液,平行 5 份,依法测定,计算别隐品碱浓度,RSD 为 1.28%。

3.1.5 加样回收率试验

取已知浓度的样品溶液适量,平行 5 份,加入对照品适量,依法测定,计算别隐品碱浓度,结果平均加样回收率为 99.2%,RSD 为 1.37%。

3.2 药材中别隐品碱含量的测定

依法测得两面针药材中别隐品碱含量为 0.109%。

3.3 超声工艺的优化

3.3.1 提取溶剂的选择

不同体积分数乙醇的别隐品碱提取率见图 2。可见,最佳溶剂是 60% (体积分数) 乙醇。

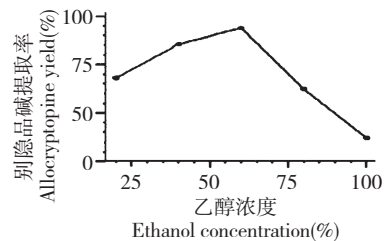


图 2 不同浓度乙醇的别隐品碱提取率

Fig. 2 Effects of different ethanol concentrations on the extraction yield of allocryptopine

表 2 超声提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test of ultrasonic-assisted extraction

No.	A	B	C	D	提取率 Extraction yield (%)
1	1	1	1	1	64.5
2	1	2	2	2	75.4
3	1	3	3	3	82.9
4	2	1	2	3	73.5
5	2	2	3	1	83.3
6	2	3	1	2	83.2
7	3	1	3	2	76.8
8	3	2	1	3	82.7
9	3	3	2	1	92.8
k_1	74.27	71.60	76.80	80.20	
k_2	80.00	80.47	80.57	78.47	
k_3	84.10	86.30	81.00	79.70	
R	9.83	14.70	4.20	1.73	

表3 超声提取方差分析

Table 3 Analysis of variance of ultrasonic-assisted extraction

方差来源 source	SS	f	F	P
A	146.376	2	30.648	<0.05
B	328.736	2	68.831	<0.05
C	30.016	2	6.704	
D(误差 error)	4.78	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.000$.

3.3.2 溶剂酸碱性对提取的影响

在60%乙醇中添加盐酸(pH 1)、硫酸(pH 1)、醋酸(pH 3)或醋酸(pH 5),别隐品碱提取率分别为45.8%、41.5%、57.2%、93.1%。表明 $\text{pH} \leq 3$ 不利于别隐品碱的提取, $\text{pH} = 5$ 对提取无影响。

3.3.3 酶解预处理对提取的影响

以60%乙醇提取未经酶解预处理的两面针,别隐品碱提取率为78.4%,比经酶解预处理时明显降低。证明酶解预处理可促进别隐品碱的提取。

3.3.4 正交试验

正交试验结果见表2,方差分析见表3。可见,影响因素 $B > A > C$, A和B因素均有显著影响,C因素无显著影响,以 $A_3B_3C_1$ 为最佳,即超声功率为

250 W,以12倍量60%乙醇为提取溶剂,提取3次(各次提取溶剂量分别为7、3和2倍量)。

3.3.5 动态过程优化提取时间

动态过程优化试验结果见图3。可见,第1次提取稳态期为18 min,第2次和第3次提取稳态期均为12 min,这就是各次提取最佳超声时间。

3.4 最佳提取工艺的验证

按以上优化出的最佳工艺条件平行进行3份实验,别隐品碱平均提取率为89.5%,RSD为1.24%。根据方差分析,该提取率与优化前的93.9%没有显著差异,且减少了提取溶剂的使用,缩短了超声提取时间。

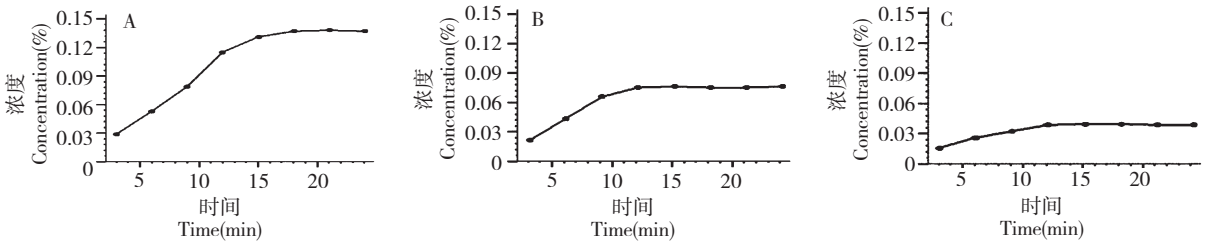


图3 第1(A)、2(B)、3(C)次超声提取各时间点提取液中别隐品碱浓度

Fig. 3 Concentration of allocryptopine in extract of the first (A), second (B), third (C) ultrasonic-assisted extraction

4 结论与讨论

一般情况下,乙醇中添加0.1%~1%的酸可以促进生物碱(成盐或游离)的提取,如氯化两面针碱^[5],然而本实验发现加酸($\text{pH} \leq 3$)不利于别隐品碱的提取,这个问题值得探讨。对比两者的结构可以发现,氯化两面针碱是亚胺型季铵盐,两面针碱(氯化两面针碱的氯离子换成氢氧根离子)与其在药材中存在动态平衡,在盐酸条件下可以实现质子与氢氧根结合^[9],从而转化为氯化两面针碱,因此提高氯化两面针碱产率。而别隐品碱是叔胺,一般叔胺上的氮在酸性条件下与质子可逆结合而带正

电,在不破坏母核结构的条件下提高水溶性,从而提高醇水提取率,但是该结构中氮在空间上靠近羰基产生跨环效应,在酸性条件下质子与羰基上的氧结合,同时氮与羰基碳结合^[9],从而破坏了别隐品碱的母核结构。另一方面,反应形成的醇羟基酸性很弱,一般的碱难以与其反应恢复别隐品碱结构。酸性越强,破坏越严重,别隐品碱产率越低。

纤维素酶等仅破坏植物细胞壁、细胞间质上纤维素中的糖苷键,促使细胞松弛、破裂,有利于细胞内容物的溶出,对别隐品碱的结构没有影响,因此酶解预处理药材可以提高其产率。原文献中酶解的缓冲液用量是4倍量^[6,7],为使工艺流程更简便、节

能、减少溶剂,本实验用最少的3倍量缓冲液刚好浸没药材,预处理后不必烘干直接加4.2倍量无水乙醇即可进行超声提取。而动态过程优化超声时间,则可准确把握每次提取的最短时间,进一步节能省时。

参考文献

- 1 Flora Republicae Popularis Sinicae Editorial Committee of CAS(中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora Republicae Popularis Sinicae(中国植物志). Beijing: Science Press, 1997. 43(2), 13-16.
- 2 China Pharmaceutical University(中国药科大学). Word-ocean of Traditional Chinese Medicine(中药辞海). Beijing: China Medical Science Press, 1993. 1, 129-130.
- 3 Liu CL(刘朝亮), Cheng XX(程轩轩), Wang DM(王冬梅). Inhibitory activity of protopine and allocryptopine to TOPO I. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21: 2376-2377.
- 4 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 Mater Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22: 2494-2495.
- 5 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.
- 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), et al. Optimization of extraction technology for total alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by enzymatic hydrolysis assisted immersion method. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(23): 43-45.
- 8 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.
- 9 Wang FP(王锋鹏). Modern Chemistry of Natural Products(现代天然产物化学). Beijing: Science Press, 2009. 862-891.
- 10 Tang HG(唐浩国). Flavonoids Research(黄酮类化合物研究). Beijing: Science Press, 2009.
- 11 Liu RC(刘榕城), Hu W(胡炜), Deng GH(邓光辉), et al. Study on the ultrasonic extraction of flavone with ethanol from *Phyllanthus urinaria* L. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2008, 19: 1599-1601.
- 12 Wang WN(王万能), Quan XJ(全学军), Zhen YM(郑一敏), et al. Lye extraction of *Erigeron breviscapus* flavonoids by ultrasonic. *Tech Acoustics*(声学技术), 2006, 25: 214-217.
- 13 National Health and Family Planning Commission of PRC(中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会). National Food Safety Standard, Food Additive Standard(食品安全国家标准,食品添加剂使用标准). GB2760-2014.
- 14 Li CX(李彩霞), Li FX(李复兴), Li P(李鹏), et al. Study on antioxidant of flavonoids from *Sophora japonica* Linn leaves. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25: 676-680.
- 15 Wei XY(韦献雅), Yin LQ(殷丽琴), Zhong C(钟成), et al. Advances in the DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity evaluation. *Food Sci*(食品科学), 2014, 35: 317-322.
- 16 Yan J(颜军), Gou XJ(苟小军), Zou QF(邹全付), et al. Determination of hydroxyl radical generating from Fenton reaction by spectrophotometry. *J Chengdu Univ, Nat Sci*(成都大学学报, 自科版), 2009, 2: 91-93.
- 17 Xiang ZB(项昭保), Zhao S(赵顺), He CL(何从林), et al. Study on ultrasonic extraction techniques of total flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2013, 13: 202-204.
- 18 Chen LH(陈莉华), Zhang Y(张焯), Li SY(李三艳). Ultrasonic assisted ethanol extraction of flavonoids from *Scutellaria barbatae* and their antioxidant activity. *Chin J Bioproc Eng*(生物加工过程), 2013, 4(11): 36-41.
- 19 Wang ZW(王振伟), Shen S(申森), Hu XB(胡晓冰). Extracting total flavonoids from *Rosa roxburghii* Tratt. with ultrasonic wave and determination by HPLC. *Hubei Agri Sci*(湖北农业科学), 2014, 53: 4684-4687.
- 20 De Queiroz Ferreira R, Greco SJ, Delarmelina M, et al. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochim Acta*, 2015, 163: 161-166.
- 21 Li XJ(李铨军), Cui SY(崔胜云). DPPH radical scavenging mechanism of ascorbic acid. *Food Sci*(食品科学), 2011, 23: 86-90.
- 22 Luo ZM(罗宗铭), Fang YX(方岩雄), Zhang K(张焯), et al. Comparison of antihydroxyl free radical for flavones and vitamin C. *China Oil Fat*(中国油脂), 2003, 28(3): 58-60.

(上接第456页)