

超声-酶法提取两面针中芝麻素的工艺优选^①

陆世惠^{1,2}

- [1. 右江民族医学院药学院, 广西 百色 533000 E-mail: lushihui0818@126.com;
2. 广西高校右江流域地道中药材(民族医药)研究重点实验室, 广西 百色 533000]

摘要: **目的** 优化超声-酶法提取两面针中芝麻素的工艺条件。 **方法** 采用 HPLC 测定芝麻素提取率, 流动相乙腈-水-磷酸-三乙胺(60:40:0.2:0.25), 检测波长 287 nm。通过单因素试验考察提取溶剂加酸和酶解预处理对芝麻素提取率的影响, 利用正交试验优化超声功率、提取次数和溶剂量, 通过动态过程优化超声提取时间。 **结果** 最佳工艺条件为: 复合酶预处理后, 以体积分数 60% 乙醇(含盐酸 1%) 超声(功率 250 W) 提取 3 次, 第 1 次以 7 倍量溶剂提取 21 min, 第 2 次以 6 倍量溶剂提取 18 min, 第 3 次以 5 倍量溶剂提取 15 min, 芝麻素提取率为 95.40%。 **结论** 该工艺经济、高效、节能、省时, 可为开发利用两面针中芝麻素提供实验基础。

关键词: 两面针; 芝麻素; 超声; 酶法; 工艺

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0566-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.004

Optimization of ultrasonic wave-enzymes extraction technology for L-sesamin from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.

Lu Shihui

- [1. College of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail: lushihui0818@126.com;
2. The key Laboratory of Guangxi Colleges and Universities for Studying Traditional Chinese Medicinal Herbs (folk Medicine) in Youjiang River Drainage Area, Baise 533000, Guangxi, China]

Abstract: **Objective** To optimize the technological conditions of ultrasonic wave-enzymes extraction for L-sesamin from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. **Methods** A high pressure liquid chromatography (HPLC) technique was employed to detect the extraction rate of L-sesamin with mobile phase of acetonitrile-water-phosphoric acid-triethylamine (60:40:0.2:0.25) and detection wavelength at 287 nm. Extraction with acidic solvent and pretreatment with enzymes were compared by single factor test. The effects of ultrasonic power, extraction times and solvent volume on extraction performances were optimized by orthogonal test. Extraction time was optimized in dynamic process. **Results** The optimal process was as followings: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. powder was pretreated with cellulase and pectinase, and then extracted 3 times by ultrasonic-wave (250 W) with volume fraction of 60% ethanol (containing 1% hydrochloride) as solvent, extracted 21 min with 7 times as that of solvent volume at the first time, extracted 18 min with 6 times as that of solvent volume at the second time, extracted 15 min with 5 times as that of solvent volume at the third time. The extraction yield of L-sesamin was 95.40%. **Conclusion** The optimized process is economic, highly efficient, saving energy and time, which can provide experimental basis for exploitation and utilization of L-sesamin from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC..

① 基金项目: 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118185)

Key words: *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.; L-sesamin; ultrasound; enzymic method; technology

两面针 [*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.], 又名钉板刺(福州)、入山虎、麻药藤、入地金牛、叶下穿针、红倒钩筋、大叶猫爪筋(广东、广西)等,系芸香科花椒属植物,主要分布于我国的广西、广东、云南、贵州、福建、海南及台湾等地^[1],主治风湿骨痛、跌打损伤、胃痛、牙痛、喉痹、瘰疬、毒蛇咬伤和汤、火烫伤等多种病症^[2],2015 年版《中国药典》收载,其中含有较丰富的芝麻素(L-芝麻脂素)。芝麻素有抗肿瘤、抗菌等多方面活性^[3],具有开发利用价值。刘华钢等^[4]以芝麻素、氯化两面针碱和乙氧基白屈菜红碱的提取效率为指标来优化提取工艺,认为最佳工艺是用 60 倍量氯仿回流 3 次,每次 120 min。不过,从雷欣潮等^[5]的实验数据看,芝麻素的最佳提取溶剂为 60%。已有研究^[6-9]表明,用纤维素酶、果胶酶预处理两面针药材,在提取溶剂中加盐酸,可以提高氯化两面针碱、总生物碱和某些其他成分的提取效率,但能否促进芝麻素的提取还不清楚。近年来,超声波技术日益广泛应用于中药有效成分的提取^[10-11]。因此,本实验探索用超声-酶法从两面针中提取芝麻素的工艺,明确纤维素酶、果胶酶和酸对其提取的影响,寻求高效节能的芝麻素提取技术,为芝麻素的开发利用提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-20A 型紫外检测器(日本岛津),LabSolutions 色谱数据处理软件,DFY-800 打粉机(温岭市林大机械有限公司),KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),101-3 型电热鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司),FA2004N 型电子天平(上海民析精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 芝麻素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110836-201005),纤维素酶(10000 U·g⁻¹,广西南宁东恒华道生物制品有限公司,批号 14070811),果胶酶(10000 U·g⁻¹,广西南宁东恒华道生物制品有限公司,批号 14030805),甲醇、乙腈、磷酸为 HPLC 级,水为哇哈哈纯净水,三乙胺等其他试剂为分析纯。两面针药材购自广西贵港市绿之源种药发展有限公司中药饮片厂,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定是两面针 [*Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.] 的根和茎。

2 方法与结果

2.1 芝麻素的测定方法^[12-13]

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(60 : 40 : 0.2 : 0.25),流速 1 ml·min⁻¹,检测波长 287 nm,柱温箱 30 °C。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取芝麻素对照品 11.8 mg,甲醇溶解定容至 100 ml 得储备液。精密吸取储备液 0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.2 ml、1.6 ml 和 2 ml,以甲醇定容至 10 ml,取 20 μl 进样,重复测定 3 次,以质量浓度为横坐标,积分峰面积平均值为纵坐标,求得回归方程为 $Y = 1.406 \times 10^4 X + 1.145 \times 10^3$ ($r = 0.9993$,线性范围 1.18~23.60 μg·ml⁻¹)。

2.1.3 样品测定方法 取提取液 2 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,以积分峰面积平均值根据回归方程计算芝麻素的提取率(提取率 = 提取所得的芝麻素质量/药材中芝麻素质量 × 100%)。

2.1.4 精密度试验 取 5.90 μg·ml⁻¹ 的芝麻素对照品溶液反复测定 6 次,以积分峰面积计算,RSD 为 0.97%。

2.1.5 稳定性试验 取一样品供试液,依法分别于 0 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h 测定,计算芝麻素浓度,RSD 为 1.29%。

2.1.6 重复性试验 取一样品制备供试液,平行进行 5 份试验,依法测定,计算芝麻素浓度,RSD 为 1.62%。

2.1.7 加样回收率试验 取已知芝麻素浓度的样品溶液适量,平行进行 5 份试验,加入芝麻素对照品适量,依法测定,计算芝麻素浓度,结果平均加样回收率为 101.18%,RSD 为 1.76%。

2.2 药材中芝麻素含量的测定 粉碎两面针药材(50 目),精密称取 5 g,装入索氏提取器中,加入 95%乙醇 100 ml(其中含质量浓度 0.50%盐酸),90 °C 水浴回流 4 h 至提取液无色,滤过,滤液以 95%乙醇定容至 100 ml,依 2.1 法测得该药材中芝麻素含量为 0.0912%。

2.3 药材酶解预处理 称取两面针粉末(50 目)100 g,加入 3 倍量 pH 5 的醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ 醋酸 : 0.1 mol·L⁻¹ 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,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^[12-13]。

2.4 超声工艺的优化

2.4.1 提取溶剂的选择 取经酶解预处理的两面针粉末(50目)100 g,分别以正丁醇、丙酮、不同浓度乙醇等溶剂超声(功率250 W)提取3次,每次提取均用6倍量溶剂,每次超声时间均为20 min,滤过,合并滤液,以相应溶剂定容至2 000 ml,取样依法测定,各种溶剂的芝麻素提取率如表1所示。最佳提取溶剂为60%(体积分数)乙醇。

表1 不同溶剂的芝麻素提取率

溶剂	提取率(%)
正丁醇	4.83
丙酮	12.41
无水乙醇	22.76
80%乙醇	34.38
60%乙醇	74.72
40%乙醇	35.56
20%乙醇	28.80

2.4.2 溶剂酸碱度对芝麻素提取的影响 分别把质量浓度为0.50%的盐酸、硫酸和乙酸加到60%乙醇中,按2.4.1法提取、测定,所得芝麻素提取率依次为93.41%、91.64%、80.12%,均比不加酸时有所提高,表明酸性条件有利于两面针中芝麻素的提取,且加盐酸效果最佳。另将60%乙醇中盐酸的质量浓度调整为0.10%、0.20%、1.00%、2.00%,按2.4.1法提取、测定,所得芝麻素提取率依次为80.37%、86.82%、95.41%、95.22%,表明1.00%盐酸可获得良好提取率。

2.4.3 酶解预处理对芝麻素提取的影响 称取两面针粉末(50目,未经酶解预处理)100 g,以60%乙醇(其中含1%盐酸)为溶剂,按2.4.1法提取、测定,所得芝麻素提取率为80.23%,比经酶解预处理时低。证明酶解预处理有利于两面针中芝麻素的提取。

2.4.4 正交试验 依据以上所得结果,取经酶解预处理的两面针粉末(50目)100 g,以60%乙醇(其中含1.00%盐酸)为溶剂进行超声提取,每次超声时间均为20 min,依照 $L_9(3^4)$ 正交试验,考察超声功率(A)、提取次数(B)及溶剂量(C)等因素对芝麻素提取的影响,各因素的水平见表2。考虑到药材经3倍量缓冲液的酶解预处理后,直接加入4.2倍量无水乙醇正好可以配成7倍量的60%乙醇,所以设计各次提取的溶剂量配比为 $12=7+5=7+3+2$, $18=10+8=7+6+5$, $24=13+11=9+8+7$ 。

将各次提取的滤液合并,以溶剂定容至2 000 ml,取样测定。为减少随机误差,重复试验1次,以测定结果的平均值进行统计,直观分析结果见表3,方差分析结果见表4。通过分析表3、表4可以认为,各因素的影响大小顺序为 $B>A>C$,3个因素都有显著性的影响,同时因为C因素各水平的差异主要体现在水平1与2之间,以 $A_3B_3C_2$ 为最佳条件,即9号试验:超声功率为250 W,以18倍量60%乙醇(其中含1%盐酸)为提取溶剂,提取3次(各次提取的溶剂量依次为7、6和5倍量)。

表2 超声提取两面针中芝麻素因素水平

水平	因素		
	A 功率(W)	B 提取次数	C 溶剂量(倍)
1	150	1	12
2	200	2	18
3	250	3	24

表3 超声提取两面针中芝麻素的 $L_9(3^4)$

正交试验结果					
No.	A	B	C	D	芝麻素提取率(%)
1	1	1	1	1	64.23
2	1	2	2	2	78.31
3	1	3	3	3	85.74
4	2	1	2	3	76.84
5	2	2	3	1	86.57
6	2	3	1	2	81.93
7	3	1	3	2	80.20
8	3	2	1	3	82.09
9	3	3	2	1	95.24
k_1	76.09	73.76	76.08	82.01	
k_2	81.78	82.32	83.46	80.15	
k_3	85.84	87.64	84.17	81.56	
R	9.75	13.88	8.09	1.86	

注:表中A为功率/W,B为提取次数,C为溶剂量/倍,D为空白

表4 超声提取两面针中芝麻素的方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	143.911	2	25.332	<0.05
B	294.274	2	51.800	<0.05
C	120.358	2	21.186	<0.05
D	5.68	2		

注:表中A为功率/W,B为提取次数,C为溶剂量/倍,D为误差, $F_{0.05}(2,2)=19.000$

2.4.5 动态过程优化提取时间^[12-13] 按正交试验确

定的条件进行超声提取,超声时间 30 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(其中含 1%盐酸)。测定各样品液中芝麻素浓度,结果见表 5。可见,第 1 次提取稳态期为 21 min,第 2 次提取稳态期为 18 min,第 3 次提取稳态期为 15 min,这就是各次提取最佳超声时间。

表 5 两面针超声提取各时间点提取液中芝麻素浓度

提取时间 (min)	第一次提取 (mg · L ⁻¹)	第二次提取 (mg · L ⁻¹)	第三次提取 (mg · L ⁻¹)
3	24.4	8.7	5.7
6	38.5	13.8	9.4
9	54.1	18.4	12.1
12	75.6	25.7	15.7
15	91.3	31.4	17.5
18	105.0	35.8	16.9
21	111.6	35.2	18.2
24	113.4	36.3	17.8
27	112.6	34.7	18.0
30	113.5	36.2	18.4

2.5 最佳工艺条件的验证 根据以上试验确定的最佳工艺条件平行进行 3 份实验,取样测定,结果芝麻素平均提取率为 95.40%,RSD 为 1.47%。

3 讨论

对于两面针中芝麻素的提取,单纯的超声法、索氏提取法都不如回流法^[5]。本实验通过多种辅助手段提高超声法、索氏提取法的效率。一方面,本实验通过加盐酸来促进芝麻素的提取。加 0.50%盐酸即可最大限度提高氯化两面针碱和两面针总生物碱的提取率^[9],而两面针中芝麻素提取率的提高需要加 1.00%盐酸,这是因为芝麻素与生物碱共存于两面针药材中,盐酸优先与生物碱反应成盐,过量的盐酸继续与芝麻素中的醚键反应成盐,增加其水溶性,提高其提取率。另一方面,本实验通过酶解预处理两面针药材来提高芝麻素的提取率。纤维素酶可以辅助水解植物细胞壁上纤维素中的糖苷键,促使细胞壁松弛、破裂,从而使细胞内容物更易于溶出,对芝麻素的结构没有影响,因此酶解预处理可以提高其产率。

原文献用 4 倍量缓冲液对两面针进行酶解预处理^[7-8],本研究把缓冲液减少至 3 倍量,就可以在预处理后不经滤过或烘干,直接加入适量的无水乙醇即可

进行超声提取,让整个工艺流程更简便更节能。最后,动态过程优化超声提取时间,能够在保证提取效率前提下,把每次提取的时间压缩至最小限度,使提取工艺进一步节省时间和能量。

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] 余传隆,黄泰康,丁志遵,等. 中药辞海:第一卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993:129-130.
- [3] Kong X, Ma MZ, Zhang Y, et al. Differentiation therapy: sesamin as an effective agent in targeting cancer stem-like side population cells of human gallbladder carcinoma [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14:254-255.
- [4] 刘华钢,叶月华,冯看. 星点设计-效应面法优选两面针活性成分的提取工艺[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(4): 493-495.
- [5] 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.
- [6] 黄晓燕,黄光伟,覃青云,等. 两面针两种不同提取工艺方法氯化两面针碱含量的比较[J]. 口腔护理用品工业, 2011, 21(5): 21-22.
- [7] 陆世惠,李秀霞. 酶法辅助浸渍提取两面针中的氯化两面针碱[J]. 医药导报, 2013, 32(3): 363-366.
- [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.
- [10] 林瑶,谭冰,韦文荣,等. 不同提取法对广金钱草总黄酮抗氧化活性的影响研究[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(4): 364-367.
- [11] 潘廷啟,文全泰,肖林彬,等. 正交设计优化金樱子多糖的超声提取工艺[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(4): 465-467.
- [12] 陆世惠,陈冉,卢红梅,等. 超声-酶法提取两面针中别隐品碱的工艺优选[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 457-461.
- [13] 陆世惠,林瑶,陈冉,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 23-26.

收稿日期:2016-10-12;修回日期:2016-11-03