

结果使用甲醇超声提取、过中性氧化铝柱,所得样品的澄明度明显好转、黏度下降,使5-O-甲基维斯阿米醇苷色谱峰的分离符合测定要求,并减少对分离柱系统的污染,保证分离柱有足够的柱效并延长其使用寿命。

References:

[1] Xue B Y, Li W, Li L, *et al.* A pharmacodynamic research on

chromone glucosides of Fangfeng [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(5): 297-299.

[3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

[3] Tian J, Li F M. Determination of prim-O-glucosylecimifugin and 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisaminol in Ganmaoqingre Granules by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(9): 671-673.

[4] Wan J H, Tian Z, Lou Z Q, *et al.* Determination of chromone glucosides in Fangfeng by RP-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1988, 8(6): 325-327.

酶法提取贝母中总生物碱的工艺研究

魏金莹, 朱宏吉*, 魏静娜, 于晓艳, 张 达, 陈 希

(天津大学化工学院, 天津 300072)

贝母来源于百合科贝母属多种植物的鳞茎,具有清热润肺,化痰止咳之功效。贝母中的生物碱种类多,是贝母止咳、化痰作用的有效成分^[1,2]。贝母中生物碱多为脂溶性碱^[3],可以采用传统醇提方法,但收率很低,并且贝母药材价格较高,因此为了有效成分、生物碱的进一步开发利用,本实验在醇提工艺前加一步酶解过程,使纤维素酶降解细胞壁中的纤维素,促进有效成分溶出,提高贝母总生物碱的收率。

1 试剂与仪器

纤维素酶由天津科健技术有限公司提供,活力为1 033.3 U/g;贝母药材购自天津市中药饮片厂,贝母素乙对照品(批号110751-200303)由中国药品生物制品检定所提供,所用试剂均为分析纯。

UV754 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);HZS—H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);FZ102 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);德国赛多利斯 Sartorius BP211D 微量天平。

2 方法与结果

2.1 贝母提取总生物碱的原工艺:20 g 贝母药材用60%乙醇250 mL 室温浸提4 d。

2.2 贝母提取总生物碱的新工艺:20 g 贝母药材加5倍量水,用HCl调pH 4.5,加入一定量的纤维素酶,在水浴振荡器中反应一定时间,振荡速度为100 r/min,温度为(50±1)℃,其他工艺同原工艺。

2.3 总生物碱的测定

2.3.1 供试品溶液的制备:取提取液挥去乙醇后用氯仿萃取2次,将萃取液移入50 mL 量瓶中,加氯

仿至刻度,即得。

2.3.2 标准曲线的制备:精密称取贝母素乙对照品2.59 mg,置100 mL 量瓶中,用氯仿溶解并加至刻度,摇匀,作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置60 mL 分液漏斗中,加pH 5.0 缓冲液2 mL,溴麝香草酚蓝试液2 mL,再加一定量氯仿,萃取2次,使2次氯仿加入量与对照品溶液之和为12 mL,充分摇匀,放置分层。将下层液经中速滤纸滤过后移入25 mL 量瓶中,加氯仿至刻度,作测试液。以氯仿同法操作做空白对照,采用分光光度计测定吸光度(A)值。以A为纵坐标,生物碱质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程 $A=0.039\ 19\ C+0.008\ 2$, $r=0.999\ 2$,结果贝母素乙在2.072~6.216 μg/mL 线性关系良好。

2.3.3 样品的测定:分别精密吸取供试品溶液2 mL 置60 mL 分液漏斗中,加pH 5.0 缓冲液2 mL,溴麝香草酚蓝试液2 mL,再加氯仿萃取,剧烈震荡后静置30 min,将下层液移入试管中,萃取2次,萃取液用滤纸滤过后移入25 mL 量瓶中,加氯仿至刻度。另取氯仿2 mL 作为空白溶液。在414 nm 波长处测定A值,根据标准曲线的回归方程计算出贝母总生物碱的质量浓度。

2.4 纤维素酶辅助提取工艺

2.4.1 相关影响因素的考察:取贝母药材20 g,共4份,按照2.2项下方法进行提取,酶用量分别为0.10、0.20、0.25、0.30 g,结果见图1。

结果显示,在不同的酶用量下,随着酶解时间的延长,贝母总生物碱的收率存在由低到高的趋势。这

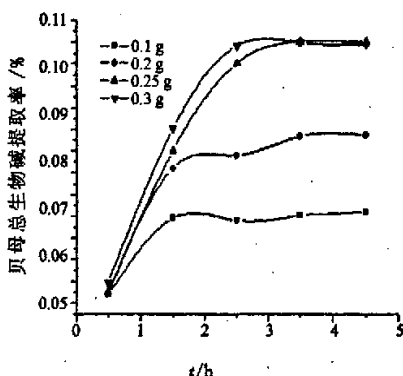


图 1 不同酶用量和酶解时间对贝母总生物碱收率的影响

Fig. 1 Effects of cellulase in various amounts at different enzymolysis times on total alkaloids yields of *F. cirrhosa*

是因为纤维素酶降解细胞壁中的纤维素存在一个由吸附到不断酶解的过程。但反应一段时间后,贝母总生物碱的收率基本不变,说明酶解已经完成。从酶用量的影响来看,除初始时刻提取效果基本相同外,贝母总生物碱的提取率随着酶用量的加大而升高。酶用量为 0.1、0.2、0.25 g 之间增加幅度很大,之后再增加酶用量效果并不明显,3.5 h 后 0.25 g 与 0.3 g 酶用量时的贝母总生物碱的质量浓度曲线基本重合。这是由于酶用量为 0.25 g 时底物与酶的作用已达到饱和,因此酶用量取 0.25 g 比较适合。在此条件下,随着酶解时间的延长,提取率不断增大,3.5 h 后细胞壁已基本被破坏掉,再延长提取率变化接近平衡。因此 3.5 h 为最佳酶解时间。另外纤维素酶的作用效果还同温度、pH 值有关,厂家提供的酶的最适活性温度为 40 ~ 60 ℃, pH 值为 3.5 ~ 4.5。

2.4.2 正交试验的优化:为进一步优化工艺,以酶解温度(A),pH 值(B),酶用量(C)和酶解时间(D)为因素,各选择 3 个水平,进行正交试验,见表 1、2。

由极差分析得到各因素对提取效果的影响程度: A>D>B>C,由此可见,酶解温度为主要因素,酶解时间为次要因素,其次是 pH 值,而酶用量的影响最小。因此得到最佳提取条件:提取温度为 60 ℃, pH

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/℃	B	C/(g·L ⁻¹)	D/h
1	40	3.5	0.15	2.5
2	50	4.5	0.25	3.5
3	60	5.5	0.35	4.5

表 2 正交试验的结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	贝母总生物碱收率/%
1	1	1	1	1	0.060 0
2	1	2	2	2	0.080 0
3	1	3	3	3	0.063 0
4	2	1	2	3	0.103 0
5	2	2	3	1	0.100 0
6	2	3	1	2	0.100 0
7	3	1	3	2	0.105 1
8	3	2	1	3	0.106 0
9	3	3	2	1	0.100 1
K ₁	0.067 7	0.089 5	0.088 7	0.086 8	
K ₂	0.101 3	0.095 5	0.094 5	0.095 0	
K ₃	0.103 7	0.087 7	0.089 5	0.090 8	
R	0.036 0	0.007 8	0.005 8	0.008 2	

值为 4.5,酶用量为 2.5 g/L,提取时间为 3.5 h。

2.4.3 验证试验:按原醇提取工艺进行 3 次试验,同时根据正交试验优选结果对酶解工艺进行 3 次重复试验,结果见表 3。可见,两工艺重现性良好,但是加酶工艺比不加酶收率提高了 39.2%。

表 3 两种提取方法的结果比较

Table 3 Comparison of two extracting methods

加酶组	贝母总生物碱提取率/%	未加酶组	贝母总生物碱收率/%
1	0.106 5	1	0.076 5
2	0.105 9	2	0.076 0
3	0.107 1	3	0.077 0

3 讨论

实验中采用的是由黑曲霉菌株生产的纤维素酶,经测定纤维素酶活为 1 033.3 U/g。通过正交试验找出了酶辅助提取工艺的最优条件,比较未加酶和加酶两种工艺所得的有效成分收率,发现贝母中总生物碱收率由原来的 0.076 5% 上升到 0.106 5%,提高了 39.2%。

贝母有浙贝、湖北贝母、新疆贝母和平贝等不同品种,刑卫等^[4]采用氨水饱和的乙醚提取了 7 种贝母中的总生物碱,结果平贝中的量为 0.085%,低于本实验中的酶解辅助工艺的结果。由此来看,纤维素酶在贝母提取中发挥了生物技术这一优势,降解并破坏植物纤维组织,促进有效成分的溶出,提高了有效成分的收率。同时酶法只是在传统醇提工艺上增加一步酶解过程,工艺简单、操作方便,具有一定的应用价值,可以考虑用于生产实际中。

植物药尤其是根、茎、皮类药材的细胞壁中纤维素的量很大,植物的有效成分往往被包裹在细胞壁内,纤维素则是由 β-D-葡萄糖以 1,4-β-葡萄糖苷键

连结,采用纤维素酶可酶解破坏 β -D-葡萄糖键,使植物细胞壁破坏,增加了有效成分的溶出率^[5]。纤维素酶作为一种蛋白质,其酶解效果受酶解温度、pH值、底物浓度、激动剂、抑制剂等多种因素的影响,因此提示在将纤维素酶用于其他中药材提取和工业化生产中,应综合考虑这些因素的影响。

References:

- [1] Yu X L, Ji H, Wang C L, et al. Research on pharmacology of *Bulbus fritillaria* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(4): 313-315.
- [2] Wang C Z, Li P. Research on determination of alkaloid and gluco-alkaloid in *Bulbus fritillaria* [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(6): 415-418.
- [3] Dai G Y, Liu Z H. Studies on the effect on the quantities of alkaloids of *Bulbus fritillaria thunbergii* in different Menstruum [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2001, 12(9): 779-780.
- [4] Xin W, Zhao Q. Comparison of the contents of alkaloid in *Bulbus fritillaria* from different places [J]. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 1998, 19(5): 305-306.
- [5] Ma T T. Primary study on the extraction of traditional Chinese medicine using cellulase [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(3): 123.

和胃饮合剂中橙皮苷和厚朴酚的 HPLC 测定

林华清¹, 李楠^{1*}, 韩国柱², 白长川³

(1. 大连理工大学, 辽宁 大连 116023; 2. 大连医科大学, 辽宁 大连 116027; 3. 大连长川中医药研究中心有限公司, 辽宁 大连 116021)

和胃饮合剂由党参、白术、陈皮、厚朴等10味中药组成,补泄兼施,辛散消痞,益气健脾、和胃降逆,主治功能性消化不良,疗效显著。陈皮、厚朴为本方的主药,其活性成分为橙皮苷和厚朴酚。因此本实验参考文献报道^[1,2]采用HPLC法建立了在同一色谱条件下同时检测和胃饮合剂中橙皮苷、厚朴酚的测定方法,方法简单易行、快捷、重现性好。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪, 津腾公司 0.45 μ m 微孔过滤膜。

橙皮苷、厚朴酚对照品购自中国药品生物制品检验所, 甲醇、醋酸为色谱纯, 和胃饮合剂以及相关药材由大连长川中医药研究中心有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 精确称取橙皮苷对照品 10.3 mg、厚朴酚对照品 10.8 mg, 用甲醇配制成 0.412 mg/mL 橙皮苷对照品溶液, 2.16 mg/mL 厚朴酚对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备: 准确量取 5 mL 和胃饮合剂, 水浴蒸干, 加入 2 mL 石油醚洗涤残渣, 以滤纸吸干(保留滤纸), 洗涤 3 次。待石油醚挥干, 以甲醇洗涤残渣, 并淋洗滤纸, 定容至 25 mL, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 再以 ODS 前柱滤过, 备用。

2.3 阴性对照溶液的制备: 按处方取除陈皮、厚朴两味药材之外的 8 味药材, 按和胃饮合剂原工艺制备阴性对照样品, 并按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.4 色谱条件: 分析柱: Hypersil C₁₈ 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-1% 醋酸溶液, 线性梯度洗脱, 0~30 min, 甲醇 30% 递升至 70%, 30~40 min, 甲醇 70% 递升至 80%, 40~50 min, 甲醇 80% 递减至 30%; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 294 nm; 柱温: 室温。

采用上述色谱条件, 阴性对照、和胃饮合剂和橙皮苷、厚朴酚对照品的 HPLC 谱图见图 1。橙皮苷和厚朴酚的保留时间分别为 11.97、37.70 min, 在橙皮苷、厚朴酚的保留时间位置处阴性对照没有干扰吸收。

2.5 标准曲线的考察: 分别精密吸取 0.412 mg/mL 橙皮苷对照品溶液 1、2、5、10、15 μ L 进样测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 139.718 X + 4.5108$, $r = 0.9999$, 线性范围为 0.412~6.18 mg/mL。分别精密吸取 2.16 mg/mL 厚朴酚对照品溶液 0.2、0.6、1、2、3 μ L 进样测定。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y =$

收稿日期: 2006-11-20

基金项目: 大连市科技局 2005 年科技计划项目 (2005E11SF062)

作者简介: 林华清 (1984—), 女, 黑龙江省鸡西人, 2006 年毕业于大连理工大学, 获理学学士学位, 复旦大学化学系分析化学专业在读硕士生。E-mail: qing3354@163.com

* 通讯作者 李楠 Tel: (0411) 83683309 E-mail: linan1946@hotmail.com