

超声波辅助酶解法制备宝藿苷 I

于海帅*

(吉林工业职业技术学院质量与安全系,吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:优选宝藿苷 I 的超声波辅助酶解工艺。方法:采用 HPLC 测定宝藿苷 I 含量,色谱条件为 Diamond C₁₈ 色谱柱(4.60 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(25:75),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 270 nm。以宝藿苷 I 转化率为指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察超声功率、pH、温度、酶用量及反应时间对超声酶解工艺的影响。结果:最佳酶解条件为超声功率 200 W,pH 5.0,温度 40 ℃,酶用量 5%,反应时间 4 h;宝藿苷 I 转化率 97.4%。结论:超声波辅助酶解法制备宝藿苷 I 具有转化率高、反应温度低、反应时间短、酶用量少等优点,优选的工艺简单稳定,适合工业化生产。

[关键词] 淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 超声波; 转化效率

[中图分类号] R283.6;R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0011-03

[doi] 10.11653/syfy2013200011

Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis Technology for Baohuoside I from Icariin

YU Hai-shuai*

(Department of Quality and Safety, Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[收稿日期] 20130320(005)

[基金项目] 吉林省中医药管理局项目(2010-pt064)

[通讯作者] * 于海帅,硕士,讲师,从事中药化学研究,Tel:13844631856,E-mail:yuhaishuaijl@163.com

[4] XIE F,ZHANG M,ZHANG C F,et al. Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanolic extract and two limonoids from *Melia toosendan* fruit [J]. J Ethnopharmacol,2008,117(3):463.

[5] Breksa A P,Manners G D. Evaluation of the antioxidant capacity of limonin,nomilin,and limonin glucoside[J]. J Agric Food Chem,2006,54(11):3827.

[6] Maneerat W, Laphookhieo S, Koysomboon S, et al. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*[J]. Phytomedicine,2008,15(12):1130.

[7] Kim W,FAN Y Y,Smith R,et al. Dietary curcumin and limonin suppress CD4⁺ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice[J]. J Nutr,2009,139(5):1042.

[8] Manners G D,Jacob R A,Schoch T K,et al. Bioavailability of citrus limonoids in humans[J]. J Agric Food Chem,2003,51(14):4156.

[9] TIAN Q G,Kent K D,Bomser J A,et al. Characterization of limonin glucoside metabolites from human prostate cell culture medium using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2004,18(24):3099.

[10] LIANG Y, XIE L, LIU X D, et al. Determination of limonin in rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed,2005,39(5):1031.

[11] 张军霞,仲平,卢来春. 克林霉素磷酸酯乳膏的制备与质量控制[J]. 中国药房,2010,21(21):1979.

[责任编辑 全燕]

[**Abstract**] **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis technology of baohuoside I . **Method:** The content of baohuoside I was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Diamond C₁₈ column (4.60 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-water (25:75), flow rate 1.0 mL · min⁻¹, column temperature 30 ℃, detection wavelength 270 nm. Taking bioconversion rate of baohuoside I as index, based on single factor tests, effects of ultrasonic power, pH, temperature, enzyme dosage and reaction time on preparation technology were investigated L₉ (3⁴) orthogonal design. **Result:** Optimal enzymatic conditions were: ultrasonic power of 200 W, pH of 5.0, reaction temperature at 40 ℃, reaction time of 4 h, enzyme dosage 5%. Under these conditions, conversion rate of baohuoside I was 97.4%. **Conclusion:** Ultrasonic-assisted enzymatic method could improve conversion rate of baohuoside I with low reaction temperature, short reaction time, little enzyme and other advantages, optimized process was stable, simple and suitable for industrial production.

[**Key words**] icariin; baohuoside I; ultrasonic wave; conversion efficiency

宝藜苷 I 为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 中一种多羟基黄酮类单体成分,具有抗肿瘤、抗骨质疏松等作用^[1-2],在植物中一般以淫羊藿苷形式存在,且含量很低,但可通过酶解淫羊藿苷制备宝藜苷 I。研究表明将酶法与超声、微波等现代提取技术结合用于制备单体,可达到节能、高效的目的^[3-4]。本实验以淫羊藿苷为原料,考察超声波辅助酶解法对宝藜苷 I 转化率的影响,为酶解制备宝藜苷 I 的工艺优化提供参考。

1 材料

LC-10ADVP 型高效液相色谱仪(日本岛津), ZD-85 型数显气浴恒温振荡器(武汉格莱莫检测设备有限公司)。淫羊藿苷、宝藜苷 I 对照品(四川省维克奇生物制药有限公司,批号分别为 289-12-1, 113568-17-9),蜗牛酶(上海沪峰生化试剂有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 宝藜苷 I 的含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamond C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(25:75), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 270 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 取宝藜苷 I 5 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加适量无水乙醇溶解, 超声除去气泡, 用无水乙醇补足至刻度, 即得 0.198 g · L⁻¹ 对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取一定量淫羊藿苷和蜗牛酶, 加入一定 pH 缓冲液定容至一定体积, 于一定温度和超声调节功率下反应一段时间, 即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品储

备液 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0 μL 注入高效液相色谱仪, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程 $Y = 5.73 \times 10^5 X - 15.26 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9999$), 线性范围 0.594 ~ 2.970 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取宝藜苷 I 对照品溶液 20 μL, 重复进样 6 次, 测定宝藜苷 I 峰面积值, 结果 RSD 1.72%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时测定宝藜苷 I 对照品溶液峰面积, 结果 RSD 0.86%, 说明对照品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 按 2.1.2 项下平行制备 5 份供试品溶液, 按 2.1.1 项下方法分别进样 20 μL, 测定宝藜苷 I 含量, 结果 RSD 1.12%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 回收率试验 精密量取已知含量的宝藜苷 I 转化液样品 0.1 mL, 精密加入对照品储备液 0.5 mL, 用无水乙醇定容至 10 mL, 测定, 计算平均回收率 98.45%, RSD 1.32%。

2.2 单因素试验考察 将超声功率、pH、温度、酶用量及反应时间分别固定为 100 W, 3, 30 ℃, 1%, 2 h, 只改变其中某个条件进行考察, 计算宝藜苷 I 转化率($n = 3$)。分别考察超声功率 50, 100, 200, 300, 400 W, 结果转化率分别为 70.0%, 75.8%, 95.1%, 80.1%, 67.9%; 分别考察 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 结果转化率分别为 60.6%, 71.9%, 77.0%, 84.2%, 64.9%; 分别考察 10, 20, 30, 40, 50 ℃, 结果转化率分别为 25.6%, 46.4%, 62.7%, 89.8%, 51.6%; 分别考察酶用量 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 结果转化率分别为 29.9%, 38.3%, 56.4%, 72.7%, 88.4%; 分别考察反应时间 2, 3, 4, 5, 6 h, 结果转化率分别为 16.7%, 29.8%, 58.1%,

93.6% ,77.4% 。

2.3 正交试验优化 在单因素试验基础上,固定反应液 pH 5.0,选取超声功率(100,200,300 W)、反应温度(30,40,50 ℃)、酶用量(3%,4%,5%)和反应时间(4,5,6 h)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以转化率为评价指标,筛选最佳制备工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 超声波辅助酶解法制备宝藿苷 I 正交试验安排

No.	A	B	C	D	转化率/%
1	1	1	1	1	65.1
2	1	2	2	2	67.3
3	1	3	3	3	72.8
4	2	1	2	3	83.6
5	2	2	3	1	97.2
6	2	3	1	2	78.9
7	3	1	3	2	82.7
8	3	2	1	3	79.6
9	3	3	2	1	66.2
K_1	68.40	77.13	74.53	76.17	
K_2	86.57	81.37	72.37	76.30	
K_3	76.17	72.63	84.23	78.67	
R	18.17	8.73	11.87	2.50	

表 2 转化率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	498.51	2	47.00	<0.05
B	114.44	2	9.64	>0.05
C	239.60	2	20.19	<0.05
D(误差)	11.87	2	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$ 。

由直观分析可知,影响宝藿苷 I 转化率的 4 个因素主次顺序为 $A > C > B > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,表明 A,C 因素对超声酶解工艺具有显著影响,B 因素则无显著影响,最佳组合为 $A_2B_2C_3D_1$,即超声功率 200 W, pH 5.0, 温度 40 ℃,酶用量 5%,反应时间 4 h。按最佳工艺条件制备 3 批样品,结果宝藿苷 I 平均转化率 97.4%,

表明该工艺稳定性、重复性良好。

3 讨论

张振海等^[5]利用 β -葡萄糖苷酶酶解淫羊藿苷制备宝藿苷 I,淫羊藿苷 100% 转化为宝藿苷 I;贾东升等^[6]利用纤维素酶转化淫羊藿苷制备宝藿苷 I,转化率(94.38 ± 1.02)%。与二者相比,优选的工艺具有反应温度低,酶用量显著减少且反应时间明显缩短等优势,适合工业化生产。

超声波作为一种能量形式具有加热作用和空化作用,对酶反应可产生促进和抑制双重作用^[7]。正交试验结果表明超声功率和酶用量对宝藿苷 I 转化率有显著影响,在一定超声功率范围内,酶活力最强且酶促反应速度最大,选取超声功率 200 W,原因是超声功率较大时会破坏酶的活性,降低宝藿苷 I 转化率。利用超声波辅助酶解制备宝藿苷 I,在保证高转化率的同时,可降低反应温度、缩短反应时间且减少酶用量。

[参考文献]

[1] HUANG J, YUAN L, WANG X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity *in vitro* [J]. Life Sci, 2007, 81 (10) : 832.

[2] XIE F, WU C F, LAI W P, et al. The osteoprotective effect of Herba Epimedii (HEP) extract *in vivo* and *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2005, 2 (3) : 353.

[3] 阴冠秀, 杜冰, 华洋林, 等. 超声波辅助酶解法提取五味子乙素 [J]. 食品科学, 2011, 32 (6) : 115. .

[4] 张艳, 刘杰, 周静姝, 等. 超声波加酶法提取玉米须黄酮的工艺研究 [J]. 西北药学杂志, 2012, 27 (2) : 98.

[5] 张振海, 陈玲玲, 贾晓斌, 等. β -葡萄糖苷酶酶解淫羊藿苷制备宝藿苷 I 的工艺研究 [J]. 中国药房, 2011, 22 (43) : 4059.

[6] 贾东升, 贾晓斌, 赵江丽, 等. 纤维素酶转化淫羊藿苷制备宝藿苷 I 的研究 [J]. 中草药, 2010, 41 (6) : 888.

[7] 杨进妹, 王婷, 何荣海. 超声对酶解反应的影响 [J]. 农产品加工·综合刊, 2010 (7) : 70.

[责任编辑 全燕]