

菟丝子的酶法提取工艺优选

周蓉¹, 王洛临^{1,2*}, 徐文杰², 谢媛¹, 涂瑶生^{1,2}, 程学仁²

(1. 广州中医药大学, 广州 510105; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广州 510095)

[摘要] **目的:**优选菟丝子的酶法提取工艺,以提高菟丝子中金丝桃苷及总黄酮的提取率。**方法:**以金丝桃苷提取量为指标,通过单因素试验考察酶种类、酶用量、酶解时间、酶解 pH 及温度对酶解效果的影响;以金丝桃苷与总黄酮提取量的综合评分为指标,采用正交试验考察酶用量、酶解 pH 及酶解温度对酶解工艺的影响。采用 HPLC 测定金丝桃苷含量,流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(17:83),检测波长 360 nm。**结果:**选择纤维素酶,最佳提取工艺为酶用量 2.0%,酶解时间 2.0 h,酶解 pH 4.0,酶解温度 45 ℃;金丝桃苷、总黄酮提取量分别为 1.408,26.966 mg·g⁻¹。**结论:**优选的酶法提取工艺稳定合理,适用于菟丝子的工业生产。

[关键词] 菟丝子; 金丝桃苷; 总黄酮; 酶解水提法

[中图分类号] R282.71;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0033-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230033

Optimization of Enzymatic Extraction Technology of Cuscutae Semen

ZHOU Rong¹, WANG Luo-lin^{1,2*}, XU Wen-jie², XIE Yuan¹, TU Yao-sheng^{1,2}, CHENG Xue-ren²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510105, China; 2. Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzymatic extraction process of Cuscutae Semen, in order to increase extracting rates of hyperin and total flavonoids. **Method:** With the content of hyperin as index, effects of enzyme species, enzyme dosage, enzymolysis time, pH and temperature on enzymatic extraction process were investigated by single factor test. With composite score of extracting amounts of hyperin and total flavonoids as index, orthogonal test was used to optimize enzymatic extraction process with enzyme dosage, enzymolysis pH and temperature as factors. HPLC was employed to determine the content of hyperin with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (17:83) and detection wavelength at 360 nm. **Result:** Cellulase was selected, its optimum extraction technology was as follows: enzyme dosage 2.0%, enzymolysis time of 2 hours, enzymatic hydrolysis of pH 4.0, enzymolysis temperature at 45 ℃; extracting amounts of hyperin and total flavonoids were 1.408, 26.966 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This optimized extracting process is stable, reasonable and applicable to industrial production of Cuscutae Semen.

[Key words] Cuscutae Semen; hyperin; total flavonoids; enzyme extraction

菟丝子为寄生性种子植物,来源广泛,功效补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻,外用可用于消风祛斑^[1]。研究报道菟丝子的主要成分为黄酮类,具有保护组织缺血再灌注损伤、抗运动性疲劳、改善排卵障碍、缓解肾间质纤维化、促进成骨细胞的增殖与分化等药理活性^[2-4],还具备抗癌、抗衰老等功效^[5]。菟丝子质地坚硬,难以粉碎,且包被有致密的种皮,导致水提取过程中种子内有效成分转移与

[收稿日期] 20140426(001)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2012A030100017);广东省教育部科技部产学研结合项目(2012B091100183)

[第一作者] 周蓉,在读硕士,从事中药制剂研究,Tel:020-83501292,E-mail:455542291@qq.com

[通讯作者] *王洛临,硕士生导师,主任中药师,从事中药制剂研究,Tel:020-83501292,E-mail:tcmgdp@163.com

渗出过程较缓慢,存在提取率低的问题。酶解水提法是一种环保而又经济的辅助提取手段,在温和的条件下,可破坏菟丝子种皮上致密的细胞壁和厚角组织,使有效成分快速溶出,以达到提高生产效益的目的。本实验结合常规提取方法和酶解技术,通过单因素试验及正交试验优化提取工艺,以提高菟丝子药材中金丝桃苷及总黄酮的提取效果。

1 材料

UV 2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),XS205DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),Seven Compact 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

生菟丝子(广东省药材公司中药饮片厂,经广东省中医药工程技术研究院王洛临主任中药师鉴定为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* 的干燥成熟种子),纤维素酶($10\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)、果胶酶($30\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$)(阿拉丁试剂有限公司),金丝桃苷、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111521-201205,10080200707),乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 菟丝子的提取

2.1.1 常规回流法^[6] 称取菟丝子 100 g,加 10 倍量水回流提取 2 次,每次 1.0 h,滤过,合并滤液,常压浓缩成每 1 mL 含生药 0.2 g 的浓缩液。

2.1.2 酶法^[7] 称取菟丝子 20 g,加 2 倍量 pH 4.5 的冰乙酸溶液,加入适量酶,于 45 ℃ 水浴中酶解 1.0 h,加入 10 倍量水提取 2 次,每次 1.0 h,过滤,合并滤液,常压浓缩成每 1 mL 含生药 0.2 g 的浓缩液。

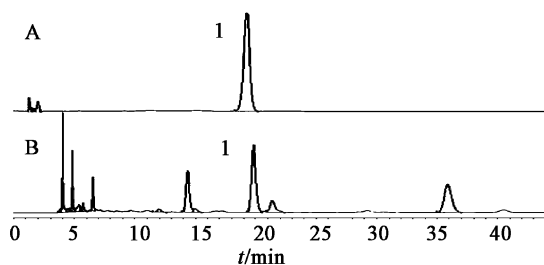
2.2 金丝桃苷的含量测定

2.2.1 色谱条件^[1] Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(17:83),柱温 25 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 360 nm,进样量 10 μL,见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取金丝桃苷对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,制成 0.258 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取浓缩液 2.0 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 金丝桃苷

图1 菟丝子 HPLC

用甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 21\,068.496X + 4.827$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.010 32 ~ 0.103 2 g·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,计算金丝桃苷峰面积积分值的 RSD 0.32%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液适量,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算金丝桃苷峰面积积分值的 RSD 1.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一份浓缩液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算金丝桃苷峰面积积分值的 RSD 1.1%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的浓缩液 6 份,各精密加入一定量的金丝桃苷对照品溶液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率 98.35%,RSD 1.4%。

2.3 总黄酮的含量测定

2.3.1 对照品溶液配制 精密称取芦丁对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得 0.140 2 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液配制^[8] 量取浓缩液 0.2 mL,置 10 mL 量瓶中,加入适量 70% 乙醇,摇匀,加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL,摇匀后放置 6 min,加入 10% 硝酸铝 0.6 mL,摇匀后放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠 3.0 mL,加 70% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min,即得。

2.3.3 空白样品溶液的制备 量取适量 70% 乙醇至 10 mL 量瓶中,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液

1,2,3,4,5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,于 510 nm 处测定吸光度(*A*),以 *A* 为纵坐标,质量浓度(*C*)为横坐标,得回归方程 $A = 0.118\ 8C - 0.006\ 1$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围 0.014 02 ~ 0.070 1 g·L⁻¹。

2.3.5 精密度试验 精密吸取 6 份芦丁对照品溶液,每份 2 mL,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,于 510 nm 处测定 *A*,计算 RSD 1.5%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取浓缩液 0.2 mL,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,在 0 ~ 15 min 内,每隔 3 min 于 510 nm 处测定 1 次 *A*,计算 RSD 1.8%,表明供试品溶液在 15 min 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密吸取浓缩液 0.2 mL,共 6 份,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,于 510 nm 处测定 *A*,计算 RSD 1.2%,表明该方法重复性好。

2.3.8 加样回收率试验 取已知含量浓缩液 6 份,各精密加入一定量芦丁对照品溶液,按 2.3.2 项下自“加入 5% 亚硝酸钠 0.6 mL”开始操作,于 510 nm 处测定 *A*,计算平均加样回收率 98.06%,RSD 1.1%。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 酶种类 称取菟丝子 5 g,共 6 份,等分为 3 组,分别加入 1% 纤维素酶,1% 果胶酶,1.0% 纤维素酶和 1.0% 果胶酶的复合酶,按 2.1.2 项下方法操作,结果菟丝子中金丝桃苷常规回流法提取量 0.614 mg·g⁻¹,酶法提取量依次为 0.926,0.897,0.623 mg·g⁻¹,说明加入复合酶后金丝桃苷提取量增加不明显,纤维素酶的提取效果最好,故选择纤维素酶。

2.4.2 酶用量 固定酶解温度 45 ℃,酶解时间 1.0 h,使用冰乙酸调节 pH 4.5,称取菟丝子 20 g,共 7 份,分别加入菟丝子用量 0.5%,1.0%,2.0%,3.0%,4.0%,5.0%,10.0% 的纤维素酶进行酶解,按 2.1.2 项下方法操作,结果金丝桃苷提取量分别为 0.624 8,0.931 1,1.117 9,0.828 9,0.876 9,0.843 8,0.835 6 mg·g⁻¹,故确定酶用量 1.0% ~ 3.0%。

2.4.3 酶解 pH 固定酶解温度 45 ℃,纤维素酶用量 2.0%,酶解时间 1.0 h,称取菟丝子 20 g,共 5 份,加入冰乙酸分别调节 pH 至 2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,按 2.1.2 项下方法操作,结果金丝桃苷提取量分别为

0.611 1,0.752 1,1.142 5,0.905 9,0.707 4 mg·g⁻¹,故确定酶解 pH 3.0 ~ 5.0。

2.4.4 酶解温度 固定纤维素酶用量 2.0%,酶解 pH 4.0,酶解时间 1.0 h,称取菟丝子 20 g,共 5 份,分别置于酶解温度 40,45,50,55,60 ℃ 的水浴震荡仪中,按 2.1.2 项下方法操作,结果金丝桃苷提取量分别为 0.897 3,0.931 1,1.133 9,0.728 8,0.601 3 mg·g⁻¹,说明温度过高可能会导致酶失活,故确定酶解温度 40 ~ 50 ℃。

2.4.5 酶解时间 固定酶解温度 50 ℃,酶解 pH 4.0,纤维素酶用量 2.0%,称取菟丝子 20 g,共 5 份,分别置于水浴震荡仪中酶解 1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 h,按 2.1.2 项下方法操作,结果金丝桃苷提取量分别为 0.611 1,1.157 9,1.112 0,0.997 5,0.984 7 mg·g⁻¹,故确定酶解时间 2.0 h。

2.5 正交试验 称取菟丝子 9 份,每份 20 g,在单因素试验基础上,选择酶用量、酶解 pH 和酶解温度为考察因素,每个因素选取 3 个水平,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,以金丝桃苷及总黄酮提取量的综合评分为指标,设定二者的权重系数均为 0.5,综合评分 = 金丝桃苷提取量/金丝桃苷提取量最大值 × 0.5 + 总黄酮提取量/总黄酮提取量最大值 × 0.5,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 菟丝子酶解水提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加酶量 /%	B 酶解 pH	C 酶解 温度 /℃	D (空白)	金丝桃苷 /mg·g ⁻¹	总黄酮 /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	1	3	40	1	1.019	16.347	0.639
2	1	4	45	2	1.228	27.547	0.912
3	1	5	50	3	1.269	18.910	0.769
4	2	3	45	3	1.139	17.464	0.700
5	2	4	50	1	1.489	23.993	0.936
6	2	5	40	2	1.164	19.243	0.740
7	3	3	50	2	1.043	18.115	0.679
8	3	4	40	3	1.260	24.796	0.873
9	3	5	45	1	0.929	16.752	0.616
K ₁	0.773	0.672	0.751	0.730			
K ₂	0.792	0.907	0.743	0.777			
K ₃	0.723	0.708	0.795	0.781			
R	0.069	0.235	0.052	0.051			

由直观分析可知,各因素对菟丝子中金丝桃苷及总黄酮提取量的影响顺序为 B > A > C。方差分析表明因素 B 对酶解水提工艺具有显著性影响,其

表 2 综合评分方差分析

方差来源	<i>SS</i>	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>A</i>	0. 008	2	0. 004	1. 614	>0. 05
<i>B</i>	0. 096	2	0. 048	20. 111	<0. 05
<i>C</i>	0. 005	2	0. 002	0. 985	>0. 05
<i>D</i> (误差)	0. 005	2			

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

他因素则均无显著性影响,综合大生产成本考虑,确定最佳工艺条件为酶解温度 45 ℃,酶解 pH 4. 0,加酶量 1. 0%,置水浴震荡仪中酶解 2. 0 h,加 10 倍量水提取 2 次,每次 1. 0 h。

2. 6 验证试验 称取菟丝子 3 份,每份 60 g,根据最佳酶解工艺重复提取 3 次,结果金丝桃苷提取量分别为 1. 409,1. 400,1. 414 mg·g⁻¹,总黄酮提取量分别为 26. 855,27. 084,26. 960 mg·g⁻¹,表明该方法稳定可行。

3 讨论

预试验比较了乙酸盐、磷酸盐、冰乙酸等调节酶解 pH 的溶液,结果发现使用乙酸盐与冰乙酸调节 pH 时,菟丝子中有效成分提取量最高,同时根据文献报道,通过酸提取菟丝子,其金属元素提取量为最高^[9]。冰乙酸作为一种挥发性溶液,在浓缩过程中能迅速挥发,化学试剂残留较少,对临床药物的使用影响较小,故选用冰乙酸作为调节 pH 的试剂。

通过 HPLC 比较分析,发现酶处理与否、常规回流液与酶解提取液的色谱图基本一致,说明酶解并未改变菟丝子的提取成分,提示酶解法处理菟丝子的方法是可行的。

菟丝子通过酶解处理,能够破坏细胞壁的阻碍,使之提取过程中种皮能迅速破裂,显露出黄白色卷旋的胚,同时菟丝子中有效成分亦能快速溶出,与常规回流提取法相比,金丝桃苷与总黄酮提取量均有显著增加,有效地提高了生产效率。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:290.

[2] 杨迪,王桂敏,翟宏颖. 菟丝子黄酮对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织中炎症反应的影响[J]. 中国药房,2013,24(11):979.

[3] 徐瑜萍,向铮,潘瑜,等. 菟丝子水提物对肾间质纤维化大鼠肾组织保护作用的研究[J]. 中成药,2013,35(10):2103.

[4] 刘芳. 菟丝子总黄酮对成骨细胞骨代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):232.

[5] 夏卉芳,李效红. 菟丝子的药理研究进展[J]. 现代医药卫生,2012,28(3):402.

[6] 李道中,彭代银,张睿,等. 正交试验优选菟丝子多糖的提取工艺[J]. 安徽医药,2008,12(6):496.

[7] 严优苻,廖华卫,郭丽冰. 酶法辅助提取补骨脂中总黄酮的工艺研究[J]. 中药材,2012,35(7):1144.

[8] 李春雨,郭晓伟,王树,等. 均匀设计优选菟丝子半仿生提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(10):813.

[9] 廖建华,金奇,李银保,等. 不同方法提取菟丝子微量元素 Fe,Mn 和 Mg 的比较研究[J]. 广东微量元素科学,2012,19(4):54.

[责任编辑 刘德文]