

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.6.04

酶法辅助超声提取功劳木中小檗碱的工艺优化

宁娜^{1,2}, 韩建军^{1,2}, 胡宇莉³

(1. 铜仁职业技术学院药学院, 贵州铜仁 554300; 2. 贵州省中兽药工程研究中心, 贵州铜仁 554300;

3. 重庆市动物疾病预防控制中心, 重庆 401120)

[收稿日期] 2017-03-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 06-0027-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了优化酶法辅助超声提取功劳木中小檗碱的工艺, 在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 采用 4 因素 3 水平的响应面分析法, 以小檗碱收率为响应值进行回归分析。结果表明, 酶解最佳工艺条件为: 酶解 pH 值 3.5、酶用量 10.6 mg/g、酶解温度 51 ℃、酶解时间 97 min。在此条件下, 小檗碱收率为 22.46 mg/g。优选的提取工艺稳定可行、收率高, 为功劳木的工业化生产提供参考。

[关键词] 功劳木; 小檗碱; 纤维素酶; 超声提取

Optimization of Emzyme-assisted Ultrasonic Extraction Process for Berberine from *Mahonia bealei*

NING Na^{1,2}, HAN Jian-jun^{1,2}, HU Yu-li³

(1. Department of Pharmacy, Tongren Vocational and Technical College, Tongren, Guizhou 554300, China;

2. Engineering Research Center of Veterinary Traditional Chinese Medicine in Guizhou, Tongren 554300, China;

3. Animal Disease Prevention and Control Center of Chongqing, Chongqing 401120, China)

Abstract: To optimize emzyme-assisted ultrasonic extraction process of berberine from *Mahonia bealei*. Experimental factors and their levels were determined by one-factor tests. Subsequently, the Box-Behnken experimental design with 4 factors and 3 levels was performed, and the factors influencing the extraction process were estimated by means of regression analysis with the berberine yield as the response value. The optimal conditions were as follows: pH 3.5, cellulase dosage 10.6 mg/g, enzymolysis temperature 51 ℃, enzymolysis time 97 min. Under this condition, the berberine yield was up to 22.46 mg/g. The optimized extraction technique is stable and feasible, with a high extraction rate, providing reference for industrialized production of *Mahonia bealei*.

Key words: *Mahonia bealei*; berberine; cellulase; ultrasonic extraction

基金项目: 贵州省农业类工程技术研究中心项目; 黔科合农 G 字[2015]4001 号; 贵州省铜仁市科技局科研计划项目; 铜仁市科研 2016(98) 号

作者简介: 宁娜, 博士, 副教授, 从事药用资源的开发利用工作。E-mail: ningnaok@163.com

功劳木为小檗科植物阔叶十大功劳 *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. 或细叶十大功劳 *Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde 的干燥茎, 其性寒味苦, 具清热燥湿、泻火解毒的作用, 主治肠黄泻痢、湿热黄疸等症^[1]。功劳木含多种生物碱类成分, 其中小檗碱为主要药效成分^[1-2]。研究表明小檗碱可促进肉鸡的生长代谢^[3]、提高肉兔屠宰率^[4]、改善肉兔脂质代谢及增强机体抗氧化机能^[5]等作用。

酶法辅助超声提取作为植物有效成分提取的一种联用技术, 通常先用适宜的酶对植物进行预处理, 继而利用超声仪进行有效成分的提取^[6]。酶法辅助超声提取作为一种新型联用提取技术, 已被应用于两面针^[7]、蓖麻叶^[8]、紫苏叶^[9]等多种植物有效成分提取中。目前已报到的功劳木提取方法主要有回流法^[10]和超声法^[11]。本文首次将超声波法和酶法联合应用于功劳木小檗碱的提取中, 在单因素试验基础上, 利用响应面法优化酶解工艺, 为功劳木深度开发和综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 FA1004B 电子天平 (奥克斯国际贸易上海有限公司); KQ-500DE 台式数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Agilent1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); PHS-25 型数字式显示酸度计 (上海伟业仪器厂); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂 功劳木药材 (采自贵州省安顺市布依族苗族自治县六马乡), 经本院梁玉勇教授鉴定; 小檗碱对照品 (批号: 110713-201212), 中国食品药品检定研究院; 纤维素酶 (酶活力: 11000 U/g), 宁夏夏盛实业集团有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 水为双蒸水。

1.3 方法

1.3.1 小檗碱的提取

1.3.1.1 酶法辅助超声提取 取干燥的功劳木药材粉碎并过 60 目筛。准确称取 15 g 置于装有 150 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液的锥形瓶中, 按照设定酶解条件 (酶解 pH 值、酶用量、酶解温度、酶解时间) 进行酶解后, 过滤, 并向经过酶解处理的功劳木药材中加入 120 mL 70% 乙醇, 在超声功率为 400 W 的

条件下超声提取 30 min, 过滤, 合并提取液, 即得到功劳木提取液。

1.3.1.2 回流法提取 取干燥的功劳木药材粉碎并过 60 目筛。准确称取 15 g 置于圆底烧瓶中, 加入 120 mL 70% 乙醇, 乙醇热回流提取 3 次, 每次 120 min。合并 3 次提取液, 即得到功劳木提取液。

1.3.1.3 超声法提取 取干燥的功劳木药材粉碎并过 60 目筛。准确称取 15 g 置于装有 150 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液的锥形瓶中, 在提取 pH 值为 3.5, 提取温度为 51 °C 的条件下提取 97 min 后收集滤液, 向药材中加入 120 mL 70% 乙醇, 在超声功率为 400W 的条件下超声提取 30 min, 过滤, 合并提取液, 即得到功劳木提取液。

1.3.2 小檗碱的含量测定

1.3.2.1 测定条件 采用 HPLC 法测定小檗碱含量^[1], 色谱条件为: Diomansil-C18 柱 (4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (用磷酸调 pH 值至 3.0) (30 : 70) 为流动相, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 265 nm, 进样体积 10 μL。

1.3.2.2 测定方法 将功劳木提取液浓缩至 100 mL, 然后精密吸取 0.3 mL 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。供试品溶液按照 1.3.2.1 色谱条件进行测定, 记录峰面积并计算小檗碱收率。其中, 小檗碱收率 (mg/g) 是指从每克功劳木药材粉末中提取得到的小檗碱的量 (mg)。

1.3.3 功劳木小檗碱提取的响应面优化 基于前期单因素预试验的结果, 采用 Box-Behnken 设计方法, 对影响酶法辅助超声提取功劳木中小檗碱的关键因素进行研究。以小檗碱收率为响应值, 以酶解 pH 值、酶用量、酶解温度和酶解时间为自变量, 试验设计见表 1。

2 结果与分析

2.1 小檗碱的含量测定结果 小檗碱对照品及功劳木药材按照 1.3.2.1 项下色谱条件测定得到色谱图, 见图 1。以峰面积 Y 对小檗碱浓度 X (μg/mL) 进行回归, 得到回归方程为: $Y = 99.51X + 450.47$ ($R^2 = 0.9999$), 线性范围为: 5.00~50.00 μg/mL。

表 1 响应面试验设计因素及水平表

Tab 1 Factors and levels used in response surface design

Code	Factor	Level		
		-1	0	+1
X ₁	pH value	3.0	3.5	4.0
X ₂	Cellulase dose/(mg·g ⁻¹)	8	11	14
X ₃	Emzymolysis temperature/℃	45	50	55
X ₄	Emzymolysis time/min	60	90	120

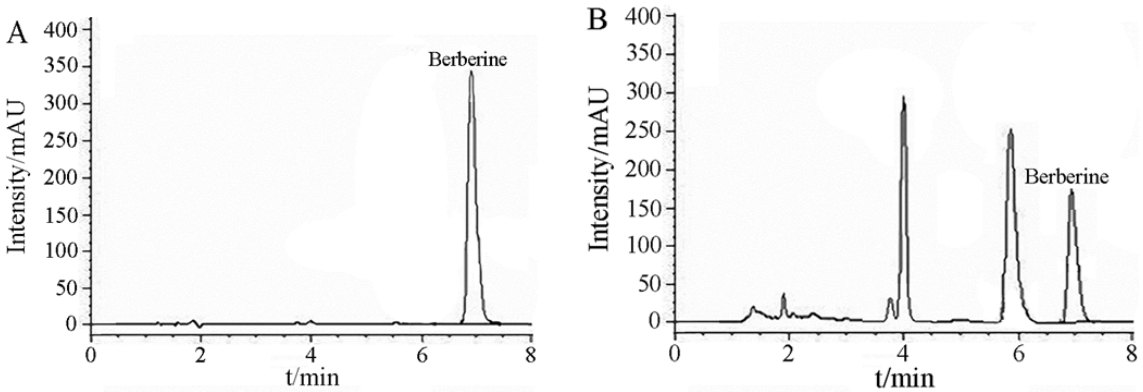


图 1 小檗碱对照品 (A) 和功劳木药材 (B) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of berberine in standard (A) and *Mahonia bealei* (B)

2.2 酶法辅助超声提取功劳木中小檗碱的工艺优化

2.2.1 响应面分析及试验结果 超声辅助酶法提取功劳木小檗碱的响应面试验结果见表 2, 对各因素进行回归拟合, 得到二次回归方程:

$$Y = -861.8588 + 212.2317X_1 + 13.9836X_2 + 15.2670X_3 + 1.1884X_4 + 0.3117X_1X_2 - 0.3280X_1X_3 - 0.0155X_1X_4 - 0.0858X_2X_3 - 0.0117X_2X_4 - 0.0109X_3X_4 - 28.6350X_1^2 - 0.4506X_2^2 - 0.1201X_3^2 - 0.0024X_4^2$$

利用 Design-Expert 8.0.6 对该回归模型进行方差分析, 结果表明: 该模型达极显著水平, 失拟项不显著, 模型总决定系数 $R^2 = 0.9841$, 校正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9655$, 说明该模型拟合情况较好, 可用该模型适宜用于超声辅助酶法提取功劳木小檗碱工艺条件的优化。通过方差分析结果中的 P 值可知: X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_4 均对小檗碱收率的影响显著 ($P < 0.05$), X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 、 X_2X_3 、 X_3X_4 均对小檗碱收率的影响极显著 ($P < 0.01$)。通过方差分析结

果中的 F 值可知: 各因素对小檗碱收率影响的顺序依次为: 酶解 pH 值 > 酶解时间 > 酶解温度 > 酶用量。

2.2.2 响应面分析 响应面图可直观反映两两因素交互作用对响应值的影响程度, 其坡度陡峭程度与两两因素交互作用对响应值影响大小呈正比关系^[12]。根据回归方程得到两两因素之间交互作用对小檗碱收率影响的响应面图, 见图 2。由图 2 和方差分析结果可知, 酶解 pH 值与酶解温度、酶用量与酶解时间对小檗碱收率的影响达到显著水平, 而酶用量与酶解温度、酶解温度与酶解时间对小檗碱收率的影响达到极显著水平。

2.2.3 最佳工艺条件验证 通过响应面优化得到酶法辅助超声提取功劳木小檗碱的酶解最优参数为: 酶解 pH 值 3.45、酶用量 10.62 mg/g、酶解温度 50.67 ℃、酶解时间 97.02 min, 该条件下模型预测小檗碱的理论收率为 22.64 mg/g。考虑实际可操作性, 将酶解最优工艺参数修正为: 酶解 pH 值 3.5、酶用量 10.6 mg/g、酶解温度 51 ℃、酶解时间 97 min。

在该修正条件下进行 3 次平行试验,得到小檗碱的平均收率为 22.46 mg/g, $RSD = 0.52\%$ ($n = 3$), 试验结果与模型预测相对误差为 0.80%, 与理论值接近, 表明建立的数学模型对功劳木小檗碱提取工艺具有实用价值。另取同质量功劳木药材粉末 6 份,

其中 3 份按照 1.3.1.2 回流法提取, 其余 3 份按照 1.3.1.3 超声法进行提取。结果表明, 回流法中小檗碱平均收率为 17.27 mg/g, $RSD = 0.41\%$ ($n = 3$); 超声法中小檗碱平均收率为 8.24 mg/g, $RSD = 0.61\%$ ($n = 3$)。

表 2 响应面试验设计及结果

Tab 2 Experimental design and results for response surface analysis

Test number	Factor				Y Berberine yield/(mg · g ⁻¹)
	X ₁ pH value	X ₂ Cellulase dose / (mg · g ⁻¹)	X ₃ Emzymolysis temperature/℃	X ₄ Emzymolysis time/min	
1	0	-1	0	-1	14.99
2	0	1	1	0	14.05
3	-1	0	0	-1	13.12
4	1	0	-1	0	10.77
5	-1	0	0	1	14.99
6	1	0	0	1	11.71
7	-1	1	0	0	11.71
8	1	-1	0	0	10.30
9	0	0	-1	-1	13.58
10	0	1	-1	0	15.46
11	-1	-1	0	0	13.58
12	0	-1	1	0	16.86
13	0	0	1	-1	19.20
14	1	0	1	0	11.24
15	0	0	0	0	22.48
16	1	0	0	-1	10.77
17	-1	0	1	0	15.46
18	0	0	-1	1	19.20
19	0	0	0	0	22.12
20	0	1	0	1	15.46
21	0	0	1	1	18.27
22	0	-1	-1	0	13.12
23	0	-1	0	1	19.67
24	1	1	0	0	10.30
25	0	0	0	0	22.47
26	0	1	0	-1	14.99
27	-1	0	-1	0	11.71

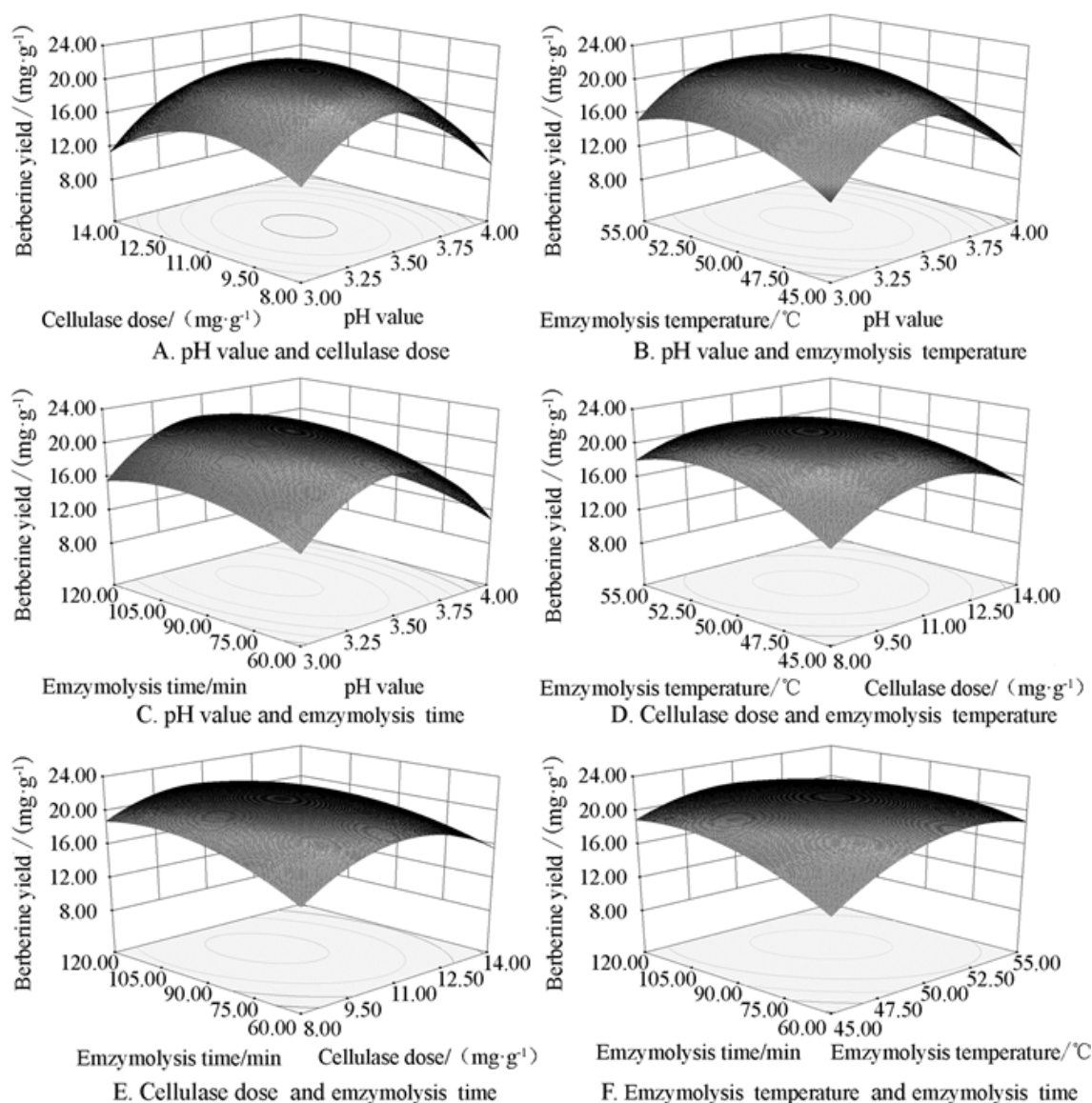


图 2 各因素相互作用对小檗碱收率影响的响应面

Fig 2 Response surface of interaction between every two factors on extraction rate of berberine

3 讨论与小结

小檗碱作为功劳木的主要有效成分,已被广泛应用于兽医临床实践中。如硫酸小檗碱注射液、盐酸环丙沙星盐酸小檗碱预混剂、诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂等常用兽药均含有小檗碱成分。目前功劳木中小檗碱的提取主要有常规的回流提取法^[10]和超声法^[11],其他提取方法鲜有报道。超声波是利用震动波增强提取溶剂对植物药材的渗透力,从而达到高效提取的目的,同时避免高温对植物药材有效成分的影响。将酶法与超声波结合,可在低温环境下加速植物细胞内有效成分溶出,从而使提取

时间及有效成分得率得到最优化。基于上述优点,本研究采用酶法辅助超声这一新型联用技术提取功劳木小檗碱成分,为功劳木的资源开发利用提供参考。

单因素试验中,小檗碱收率随着酶解 pH 值和酶解温度的增大而增大,但当酶解 pH 值 3.5 以上、酶解温度 50 ℃ 以上,小檗碱收率反而下降,可能与酶的空间结构改变、酶失活等因素有关。小檗碱收率随着酶用量的增加而增大,但当酶用量 11 mg/g 以上,小檗碱收率反而下降,可能当纤维素酶相对于功劳木达到饱和后继续增加纤维素酶用量会阻

碍小檗碱的溶出。小檗碱收率随着酶解时间的延长而增大,但当酶解时间 90 min 以上,小檗碱收率增加趋势趋于平缓。

通过响应面法及验证试验得到超声辅助酶法提取功劳木小檗碱的酶解最佳工艺条件为:酶解 pH 值 3.5、酶用量 10.6 mg/g、酶解温度 51 ℃、酶解时间 97 min。通过响应面法得到的功劳木小檗碱超声辅助酶法提取工艺与常规的回流法相比,小檗碱收率提高了 31%,耗时仅为回流法的 1/3;与常规的超声法相比,酶解预处理步骤使功劳木中小檗碱收率提高了 2.7 倍。综上所述,本研究优选的酶法辅助超声提取功劳木中小檗碱工艺具有提取时间短、提取效率高等优点,为功劳木的工业化生产提供参考。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典2010年版二部[S].
Veterinary Pharmacopoeia commission of the People's Republic of China. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China volume II 2010 edition[S].
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草[M].
上海:上海科学技术出版社,1999.
The Compiling Committee of China Herbals of State Administration of Traditional Chinese Medicine. China Herbals[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1999.
- [3] 孙镇平,周保华,王秋生,等. 小檗碱促进肉鸡生长代谢的试验观察[J]. 中国兽医杂志,2009,45(1):69-71.
Sun Z P, Zhou B H, Wang Q S, *et al.* Experimental observation of berberine as growth promoter in broiler chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(1):69-71.
- [4] 汪水平,王文娟,刘凯,等. 盐酸小檗碱对肉兔屠宰性能及肉质的影响[J]. 中国畜牧杂志,2013,49(9):50-53.
Wang S P, Wang W J, Liu K, *et al.* Effect of berberine hydrochloride on slaughter performance and meat quality of rabbit[J]. Chinese Journal of Animal Science,2013,49(9):50-53.
- [5] 汪水平,王文娟,彭希豪,等. 盐酸小檗碱对肉兔脂质代谢、内分泌及抗氧化功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(5):745-753.
Wang S P, Wang W J, Peng X H, *et al.* Effect of berberine hydrochloride on lipid metabolism, endocrine and antioxidant function of meat rabbit [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica

Sinica, 2013, 44(5):745-753.

- [6] 蔡延渠,朱盛山,李润萍. 新型提取联用技术在中药提取中的应用进展[J]. 中成药,2011,33(5):863-866.
Cai Y Q, Zhu S S, Li R P. Progress of novel hyphenated techniques in Chinese materia medica extraction[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(5):863-866.
- [7] 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.
Lu S H, Chen R, Lu H M, *et al.* Optimization of ultrasonic-enzyme extraction technology for allocryptopine from Zanthoxylum nitidum[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(3):457-461.
- [8] 穆莎茉莉,陈永胜,李国瑞,等. 酶法提取蓖麻叶总黄酮工艺优化[J]. 饲料研究,2016,(7):54-57.
Musha M L, Chen Y S, Li G R, *et al.* Optimization of enzymatic extraction of total flavones from Castor leaves[J]. Feed Research, 2016, (7):54-57.
- [9] 王柏强,何效平,曾芝兰. 酶法协同超声提取紫苏叶总黄酮工艺条件优化[J]. 中华中医药学刊,2015,33(7):1741-1743.
Wang B Q, He X P, Zeng Z L. Optimization on extraction technology of flavonoids from Folium Perillae[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2015, 33(7):741-1743.
- [10] 邢俊波,吴禾,刘云. 正交设计优选功劳木中盐酸小檗碱提取工艺[J]. 中华中医药学刊,2005,23(10):1829-1830.
Xing J B, Wu H, Liu Y. Study on extract technology of berberine hydrochloride in Caulis Mahoniae by orthogonal design[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2005, 23(10):1829-1830.
- [11] 白靖文,叶非. 超声辅助提取功劳木中盐酸小檗碱工艺研究[J]. 食品工业科技,2011,32(2):245-247,250.
Bai J W, Ye F. Ultrasonic-assisted extraction of berberine from Caulis Mahonia[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(2):245-247,250.
- [12] 许珍,牛黎莉,周美,等. 响应面法优化高吸油性淀粉制备工艺[J]. 甘肃农业大学学报,2015,50(2):151-156.
Xu Z, Niu L L, Zhou M, *et al.* Preparation optimization on high oil absorption microporous starch by response surface methodology [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2015, 50(2):151-156.

(编辑:陈希)