

酶法提取云南萝芙木中阿吗碱的研究

董旭杰, 曹福祥, 邓明, 龙绛雪

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004)

摘要: 研究3种纤维素酶法提取云南萝芙木中阿吗碱的最佳工艺。结果表明: 酶解最适条件为: pH 5.0, 酶用量 5 mg/5g, 时间 2 h, 温度 50℃; 酶解处理后的阿吗碱提取率比直接用甲醇提取提高了 29.3%; 说明酶解处理更有利于阿吗碱的提取。

关键词: 阿吗碱; 纤维素酶; 云南萝芙木

中图分类号: Q 946.88 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)12-0048-03

云南萝芙木(*Rauvolfia yunnanensis* Tsiang)为夹竹桃科萝芙木(*Rauvolfia*)属植物^[1]。萝芙木含有利血平(Reserpine)、育亨宾(Yohimbine)、阿吗碱(Ajmalicine)、利血胺、坎尼生等多种吲哚生物碱^[2]。目前对于萝芙木的利用主要集中在生物总碱和利血平上, 对阿吗碱的相关研究报道较少。阿吗碱有抗高血压、镇静、血管扩张和抗菌的作用^[3], 在夹竹桃科植物长春花中也有存在^[4]。

在中药提取过程中酶法应用的越来越多, 而纤维素酶是一组能够降解纤维素生成葡萄糖的酶的总称, 利用纤维素酶能有效提高中药中有效成分的提取率^[5]。该试验对比了传统有机溶剂提取和酶法辅助提取对阿吗碱提取效率的影响, 探讨了影响酶法提取的各因素对提取率的影响, 采用正交实验设计, 得到酶法提取云南萝芙木中阿吗碱的最佳工艺条件, 为酶技术在萝芙木中有效成分提取方面提供了依据。

1 材料与方

1.1 试验材料

云南萝芙木根、茎、根皮、茎皮(产自云南省德宏州畹町地区)粉碎后过 40 目筛, 备用。纤维素酶(30 U/mg 博美), 阿吗碱标准品(Sigma), 色谱甲醇, 二乙胺, 其它试剂为分析纯。

1.2 试验仪器

岛津 LC2010AHT 高效液相色谱仪, 岛津 VP-ODS C18 色谱柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm), 植物粉碎机, 超声波清洗仪, 气浴恒温振荡器, 电子天平, pH 计。

1.3 试验方法

1.3.1 阿吗碱的提取 有机溶剂提取法: 准确称取云南萝芙木粉末 5 g, 分别用甲醇、乙醇进行提取。提取方式为震荡提取(145 r/min, 2 次, 每次 3 h, 每次加入溶剂量为 50 mL)、超声提取(3 次, 每次 20 min, 每次加入溶剂量为 50、30、20 mL)。提取后抽滤, 合并滤液定容, -4℃保存备用。酶水解后甲醇提取法: 准确称取云南萝芙木根皮粉 5 g, 加 50 mL 水, 在一定温度下, 加入 10%乙酸调节 pH 值, 加入一定量的纤维素酶酶解, 震荡提取转速为 145 r/min, 处理一定时间后加入 50 mL 甲醇震荡提取 2 次, 每次 3 h。提取后抽滤, 合并滤液后定容, -4℃保存备用。

1.3.2 阿吗碱定量分析方法 高效液相色谱条件: 色谱柱: 岛津 ODS-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: A, 甲醇; B, (0.004 mol/L 二乙胺)水; 梯度洗脱程序: 0~20 min, 60%A~40%B; 20~40 min, A, 60%线性变为 95%, B, 40%线性变为 5%; 流速: 1 mL/min; 检测波长 278 nm; 柱温: 30℃。阿吗碱标准曲线线性方程的建立: 取阿吗碱标准品 2.4 mg, 用 1 mL 氯仿溶解后用甲醇定容到 50 mL, 用上述色谱条件分别进样 2.4、6、8、10 μL, 以峰面积为纵坐标, 标准品含量为横坐标进行线性回归, 得利血平回归方程为: $y=198\ 402x+104\ 009$, $r=0.9987$, 线性范围为: 0.096~0.48 μg。阿吗碱含量测定: 分别取适量提取液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 按上述色谱条件进行测定, 进样量为 10 μL。

1.3.3 正交实验对酶解反应条件的优化 影响酶法提取阿吗碱的主要因素有酶解 pH、加酶量、酶解时间、酶解温度等。以云南萝芙木根皮为材料, 经过预试验的单因素考察后, 为了进一步优化提取工艺, 找到酶解最佳工艺条件, 试验采用了正交实验设计, 考察了酶解 pH(A)、加酶量(B)、酶解时间(C)、酶解温度(D)4 个因素对阿吗碱产量的影响。因素水平表见表 1。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂和提取方式的选择

结果表明, 在以甲醇为提取溶剂, 固液比为 1:10 的条件下震荡提取 3 h, 提取 2 次, 得到的阿吗碱产量

第一作者简介: 董旭杰(1980), 女, 辽宁葫芦岛人, 硕士, 讲师, 现主要从事蛋白质与酶学方面的研究工作。E-mail: dxj801230@163.com.

基金项目: 湖南省教育厅学科带头人培养对象基金资助项目(2004559); 云南萝芙木良种培育和规范化种植关键技术开发项目(云发改高科 2007 1718 号)。

收稿日期: 2011-03-25

表 1 酶解反应因素水平

水平	因素			
	A pH	B 酶用量/mg	C 时间/h	D 温度/°C
1	4.0	4	2	40
2	4.5	5	2.5	45
3	5.0	6	3	50

最多,为0.29501 mg/g。以该方法提取云南萝芙木根、根皮、茎、茎皮中阿吗碱,在根皮中阿吗碱含量最高,为0.35202 mg/g,其次是茎皮,含量为0.32143 mg/g,茎中含量较少为0.12305 mg/g。

2.2 正交实验结果

采用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行试验,以阿吗碱产量为评价指标。正交实验结果见表 2。从正交实验极差分析可知,酶解 pH 值、加酶量、酶解时间、酶解温度对阿吗碱产量的影响程度为:酶解温度 > 加酶量 > 酶解时间 > 酶解 pH 值。正交实验所得最佳酶解条件为 $A_3 B_2 C_1 D_3$,温度对阿吗碱提取率的影响最大,在 50°C 时阿吗碱的提取率最高;加酶量为 5 mg/5g 时阿吗碱提取率达到最大,酶解时间和酶解 pH 值对阿吗碱的提取率影响较小,综合考虑选择酶解最优条件为酶解 pH 5.0,酶用量为 5 mg,时间为 2 h,温度为 50°C 。

在此最佳条件下进行 3 次平行实验,取平均值得阿吗碱产量为 0.45512 mg/g,比用甲醇提取法提取率提高了 29.3%。

表 2 正交实验结果

实验号	因素				阿吗碱得率 /mg·g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.35854
2	1	2	2	2	0.40582
3	1	3	3	3	0.37515
4	2	1	2	3	0.41019
5	2	2	3	1	0.35247
6	2	3	1	2	0.35026
7	3	1	3	2	0.34713
8	3	2	1	3	0.45023
9	3	3	2	1	0.34639
<i>k</i> 1	0.37983	0.37195	0.38634	0.35247	
<i>k</i> 2	0.37097	0.40284	0.38746	0.36773	
<i>k</i> 3	0.38125	0.35726	0.35825	0.41185	
<i>R</i>	0.01028	0.04558	0.02921	0.05938	

2.3 对照品和提取样品液色谱图 见图 1。

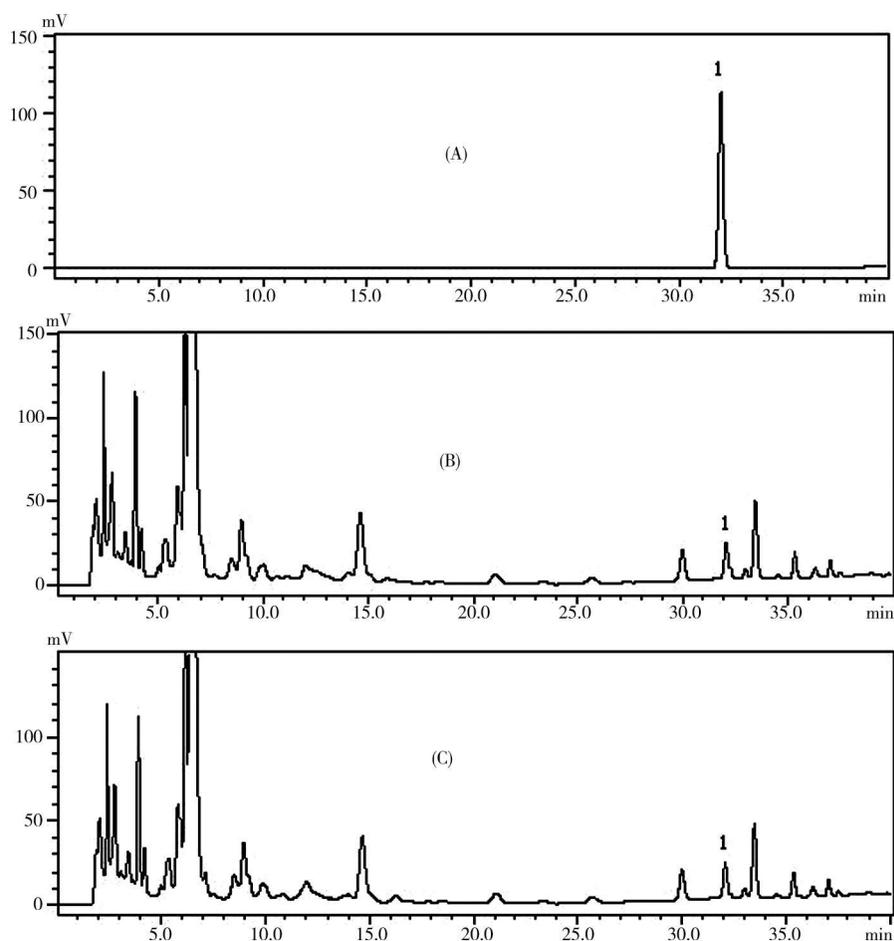


图 1 (A)阿吗碱对照品色谱;(B)未酶解提取液色谱;(C)酶解后提取液色谱

日光温室西番莲不平茬状态下生育规律调查

王国东, 张力飞

(辽宁农业职业技术学院 辽宁 营口 115009)

摘要:以紫果西番莲为试材, 对其在日光温室不平茬状态下的生长发育规律进行了研究。结果表明: 在辽宁熊岳地区日光温室栽培条件下, 以6月下旬到7月上旬日生长量最大, 9月份增长缓慢或基本停长。5月下旬初花, 6月上旬开花株率可达90%。果实成熟提前至7月上旬, 主要集中在8、9、10月份, 以8、9月份居多, 约占全年果实的92%。

关键词:日光温室; 西番莲; 生育规律

中图分类号: S 668.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)12-0050-02

西番莲 (*Passiflora edulis* Sims) 是西番莲科 (Passifloraceae) 西番莲属 (*Passiflora*) 多年生常绿藤本植物, 共有 400 多种^[1], 大都原产于热带美洲, 我国有 19 种, 其中原产 13 种。果实可供食用的约 60 多种。作为商业性栽培的主要有紫果西番莲 (*Passiflora edulis* Sims), 黄果西番莲 (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener) 及其杂交种^[1]。为典型的热带、亚热带果树。紫果西番莲营养价值高, 富含多种有机酸、氨基酸和微量元素。西番莲果汁中氨基酸种类多达 17 种以上。果皮除可加工成蜜饯、果酱外, 还是提取果

胶和加工饲料的好原料; 此外, 种子含油率高达 21%~25%, 可供食用, 为优质的食用油^[4]。种壳可提取 2.3%~3.0% 的果胶。总之, 西番莲具有很高的营养价值, 是具有多种营养成分及用途的优质水果。

西番莲在北方地区无法露地越冬, 不能进行正常栽培。而自然成熟的紫果西番莲很难保鲜^[3], 因此, 紫果西番莲鲜果在东北地区很难见到。在 2004~2007 年日光温室研究的基础上, 2008、2009 年又对其进行不平茬处理, 以期达到提早开花、提早上市的目的。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于 2006 年 12 月至 2007 年 9 月在辽宁农业职业技术学院实训基地 1 号日光温室中进行。该日光

第一作者简介: 王国东(1971-), 男, 辽宁朝阳人, 硕士, 副教授, 研究方向为设施果树栽培。E-mail: wgd789@126.com。

收稿日期: 2011-04-01

3 结论与讨论

该试验结果表明, 酶解处理后阿吗碱的提取率比直接使用有机溶剂法增加了 29.3%; 在云南萝芙木中阿吗碱含量以根皮和茎皮中的含量较高, 建议在对云南萝芙木进行利用时可以增加对茎皮的开发利用; 纤维素酶能酶解植物细胞壁中的纤维素, 破坏细胞壁, 用纤维素酶预处理能够减少细胞的束缚作用, 通过对比酶解和非酶解的高效液相色谱图, 表明酶解没有对生物碱成分产生破坏。应用纤维酶解有效地提高了植物中有效成分的提取率, 并且随着酶技术的发展和在中草药有效成分提取方面的应用, 酶法辅助提取将成为中药提取的一种有效途径。

参考文献

- [1] 曹福祥, 徐庆军, 王承南, 等. 萝芙木属植物的物种和分布[J]. 中南林业科技大学学报 2007(6): 154-158.
- [2] 田学军, 龙云惠, 何英, 等. 绿春萝芙木资源薄层色谱鉴别[J]. 红河学院学报 2005(6): 23-24.
- [3] 杨秀伟. 生物碱[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 260.
- [4] 张琳, 祖元刚, 牛卉颖, 等. 长春花中吲哚类生物碱含量的比较[J]. 植物研究 2008, 28(2): 240-243.
- [5] 尹蓉莉, 杨军宣. 黄柏中盐酸小檗碱提取实验方法的改进[J]. 基层中药杂志 2000, 14(6): 27.
- [6] 杨军宣, 尹蓉莉. 纤维素酶在三七提取工艺中的应用[J]. 中国中医药科技, 2001(5): 12.
- [7] 李倩霞, 赵青, 蒋林, 等. 酶法提取岩黄连总生物碱的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(4): 47-49.

Study on Extraction Ajmalicine from *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang by Cellulose

DONG Xu-jie, CAO Fu-xiang, Deng Ming, LONG Jiang-xue

(Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: To study the optimal enzymatic extraction of ajmalicine from *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang. The results showed that the best enzymatic hydrolysis conditions for extracting ajmalicine were as follows: pH value of enzyme solution of 5.0, the enzyme dosage of 5 mg/5g, the reaction time of 2 h, and the reaction temperature of 50 °C. Compared with the MeOH extraction method, the extraction yield of ajmalicine with cellulose increased by 29.3%.

Key words: ajmalicine; cellulose; *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang