

酶法辅助提取迷迭香中三萜酸的工艺研究

李开泉^{1,2}, 陶华蕾²

(1. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000; 2. 宜春学院 化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000)

摘要: 为探讨迷迭香中三萜酸的最佳提取工艺条件, 采用纤维素酶法, 通过单因素试验和正交设计对迷迭香中三萜酸的提取工艺进行研究。酶解法提取迷迭香中三萜酸的最佳条件为: 加酶量 6.5 mg/g, 酶解时间为 2.5 h, 酶解温度 45 °C, 体系 pH 值 6.5。在此条件下, 所得迷迭香中三萜酸干质量为 4.58 g。纤维素酶能有效地破坏细胞壁, 加速有效物质的释放, 纤维素酶酶解条件温和, 工艺简单, 值得推广应用。

关键词: 迷迭香; 三萜酸; 纤维素酶; 提取工艺

中图分类号: R284.1; Q946.33 文献标志码: A 文章编号: 1000 - 2286(2012)05 - 1049 - 04

Study on Extraction Process of Triterpene Acids form Rosemary

LI Kai-quan^{1,2}, TAO Hua-lei²

(1. Key Laboratory for Research on Active Ingredients in Natural Medicines of Jiangxi Province, Yichun 336000, China; 2. Chemical and Biological Engineering Department of Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract: To explore the optimum conditions for extraction of Triterpenoid acid in rosemary. Use of cellulose enzyme to research the extraction process of triterpenoid acid from rosemary by single factor experiments and orthogonal design. The best conditions for enzymatic extraction of triterpenoid acids from rosemary: the amount of enzyme 6.5 mg/g, hydrolysis time 2.5 h, reaction temperature 45 °C, pH value 6.5. Under these conditions, the proceeds of triterpene acid dry weight were 4.58 g. Cellulase could effectively destroy the cell walls, to accelerate the release of active substances. The hydrolysis conditions of cellulase are mild, the process is simple, and worthy of wide application.

Key words: rosemary; triterpene acid; cellulose; extraction

迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.) 为唇形科多年生宿根草本、大型丛生常绿灌木植物, 具有强烈芳香气味。迷迭香原产南欧各国, 我国亦有栽培, 且资源丰富。迷迭香性温、味辛、无毒、具有健胃、发汗、安神等功效^[1]。现代研究表明, 迷迭香具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、保肝、治疗心血管等作用^[2-4]。迷迭香油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、霍乱弧菌等有中等强度抗菌作用。迷迭香制剂有健胃、发汗、安神、亢进消化机能, 治疗各种头痛^[5]。研究表明, 迷迭香中主要活性成分为三萜酸, 而三萜酸是植物界分布较广、毒副作用较小的天然药物, 能通过细胞毒作用、增殖抑制、诱导凋亡、抑制肿瘤血管形成等多种机制发挥其抗肿瘤活性, 对人结肠癌细胞系 HT-29、白血病细胞系 HL-60、肺癌细胞系 A549、表皮样癌细胞系 A431 等多种肿瘤细胞均有较强的抑制作用^[6-7]。因而三萜酸已成为国内外普遍关注、研

收稿日期: 2012-03-21 修回日期: 2012-07-30

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)重点资助项目(2002AA2Z3217)

作者简介: 李开泉(1954—) 男 研究员 硕士生导师 主要从事天然药物化学研究与新药开发 E-mail: lkq541024@163.com。

究活跃的天然药物。三萜酸的主要来源为植物,但由于在植物体内含量较低,加上其同分异构体齐墩果酸的存在,给提取分离带来很大困难。提取迷迭香中的三萜酸一般采用冷浸法、超声法、乙醇回流法等,这些方法各有其优缺点。冷浸法无需加热,有效成分不易破坏,但存在提取时间长、溶剂用量大、操作费时等缺点。超声法提取具有快速、完全、溶剂用量小、有效成分得率高、无需加热、能避免高温对有效成分的破坏等优点,但目前超声技术仅在实验室使用,规模化生产尚需时日。而酶法已广泛用于植物有效成分的辅助提取中。如纤维素酶法提取黄酮、多糖、色素、生物碱等,具有操作简单、高效稳定等优点^[8-10]。为了促进国产迷迭香资源的开发利用,为三萜酸的规模化生产提供科学依据,以迷迭香为原料对酶法辅助提取三萜酸的工艺进行了实验研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料试剂

迷迭香叶原料购自北京远馨芬芳科技有限公司(产地新疆),经江西省天然药物活性成分研究重点实验室鉴定为唇形科植物迷迭香(*Rosmarinus officinalis* L.)。纤维素酶(40 000 U/g,枣庄市杰诺生物酶有限公司产);体积分数为 95% 乙醇(食用级广西糖厂);NaOH、HCl 均为分析纯;蒸馏水。

1.2 仪器设备

FW-100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);FC-204 分析天平(上海天平分析器厂);TG16-WS 高速离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);RE-3000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);202-26A 型数显电热恒温干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司);标准型 pH 计(赛多利斯科学仪器有限公司);电热恒温水浴锅(天津市中环实验电炉有限公司)。

1.3 提取工艺

迷迭香叶→烘干→粉碎→过 60 目筛→加温水润湿→加酶剂水解→高温灭酶→抽滤→乙醇浸提→提取液→回收溶剂→浸膏→烘干→称量→计算得率。浸膏得率按下式计算:

$$\text{浸膏得率} = \frac{\text{提取所得沉降物质量}}{\text{迷迭香叶干粉质量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 单因素试验

影响酶解效果的主要因素有:酶剂用量、酶解时间、酶解温度和体系 pH 值。采用加酶量(3 4 5 6, 7 mg/g)、酶解时间(1.5 2 2.5 3 3.5 h)、酶解温度(40 45 50 55 60 ℃)、体系 pH 值(4.5 5 5.5 6, 6.5)各 5 个水平进行实验。

1.5 正交设计试验

根据单因素试验结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交设计试验,得出最佳提取工艺条件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶剂用量的影响 在固定酶解时间、酶解温度和酶解 pH 值等因素不变的情况下,按酶剂用量进行试验,不同酶量对迷迭香三萜酸提取率的影响见图 1。酶用量是影响酶促反应的重要因素,当用量较小时,由于固定了酶解时间,故酶解不完全。当酶用量为 3~5 mg/g 时,三萜酸提取率迅速上升,至用量 6.0 mg/g 时提取率最大,继续增加酶量提取率反而下降。

2.1.2 酶解时间的影响 在固定酶剂用量、酶解温度和酶解 pH 值等因素不变的情况下,按酶解时间进行试验,不同酶解时间对迷迭香三萜酸提取率的影响见图 2。酶解时间影响酶解效率,反应时间过短破壁效果差,酶解不充分;时间过长,有效成分的结构可能受到破坏。随着提取时间的延长,三萜酸提取率呈上升趋势,当达到 3.0 h 后提取率增长趋缓。

2.1.3 酶解温度的影响 在固定酶剂用量、酶解时间和酶解 pH 值等因素不变的情况下,按酶解温度进行试验,不同酶解温度对迷迭香三萜酸提取率的影响见图 3。温度对酶活性的发挥具有较大影响,三萜酸得率随着酶解温度的增加而增加,当酶解温度达到 55 ℃ 时得率最高。

2.1.4 酶解 pH 值的影响 在固定酶剂用量、酶解时间和酶解温度等因素不变的情况下,按 pH 值进行

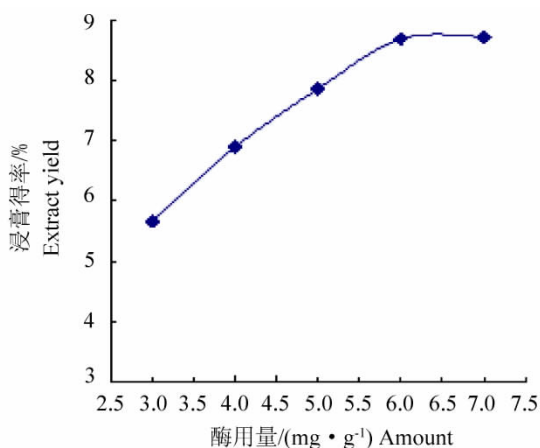


图 1 酶剂用量对三萜酸提取率的影响

Fig. 1 Affect of amount of enzyme on triterpene extraction rate

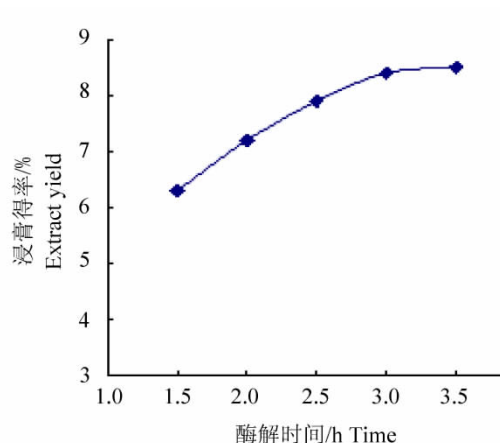


图 2 酶解时间对三萜酸提取率的影响

Fig. 2 Affect of Hydrolysis time on triterpene extraction rate

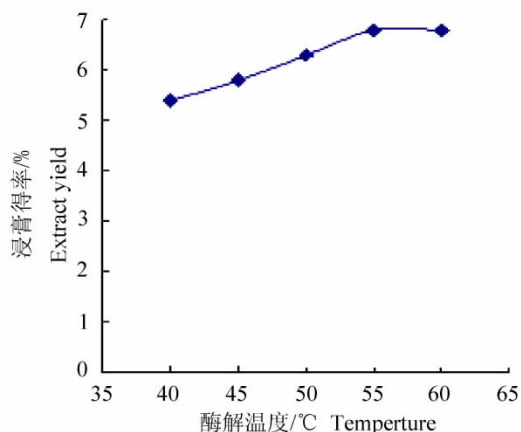


图 3 酶解温度对三萜酸提取率的影响

Fig. 3 Affect of Reaction temperature on triterpene extraction rate

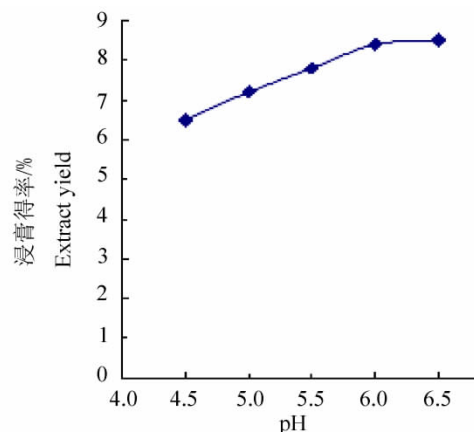


图 4 酸碱度对三萜酸提取率的影响

Fig. 4 Affect of pH value on triterpene extraction rate

试验,不同酶解 pH 值对迷迭香三萜酸提取率的影响见图 4。体系的 pH 值对三萜酸得率有一定影响,在体系 pH 值 6.0 左右时,三萜酸得率基本稳定,当体系 pH 值过小或过大时三萜酸得率均有所下降。

单因素研究结果为:加酶量 6 mg/g、酶解时间 3.0 h、酶解温度 55 °C、体系 pH 值 6.5。

2.2 正交设计试验

采用 $L_9(3^4)$ 正交表,以酶剂用量、酶解时间、酶解温度和酶解 pH 值为研究对象,各取 3 水平。每用迷迭香叶干粉 50 g,以提取物干质量为指标进行正交试验。因素水平设计见表 1,试验结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 因素水平设计

Tab. 1 Factors and levels

水平 Level	A/酶剂用量/(mg · g ⁻¹) Amount of enzyme	B/酶解时间/h Hydrolysis time	C/酶解温度/°C Hydrolysis temperature	D/酶解 pH 值 pH value
1	6.5	3.0	45	6.0
2	6.0	3.5	50	5.5
3	5.5	2.5	55	6.5

结果表明,酶剂用量、酶解 pH 值对提取率影响具有显著性差异,因素 A 取 A_1 为好,D 取 D_3 为好,B 与 C 不显著,其水平可任取。确定其最佳工艺为 $A_1B_3C_1D_3$,即酶剂用量 6.5 mg/g、酶解时间 2.5 h、酶解温度 45 °C、酶解 pH 值为 6.5。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果
Tab.2 Results of L₉(3⁴) orthogonal experimen test

试验号 No.	A	B	C	D	提取物干质量/g Extract dry weight	干质量
1	1	1	1	1	4.29	0.29
2	1	2	2	2	3.74	-0.26
3	1	3	3	3	4.22	0.22
4	2	1	2	3	4.09	0.09
5	2	2	3	1	3.66	-0.34
6	2	3	1	2	3.23	-0.77
7	3	1	3	2	3.78	-0.22
8	3	2	1	3	3.93	-0.07
9	3	3	2	1	3.81	-0.17
K ₁	0.25	0.16	-0.55	-0.22		G = -1.23
K ₂	-1.02	-0.67	-0.34	-1.25		G ² = 1.513
K ₃	-0.46	-0.72	-0.34	0.24		CT = 0.168
R	1.27	0.88	0.21	1.49		
优水平 Optimal level	A ₁	B ₁	C ₃	D ₃		
主次因素 Primary secondary actors				D > A > B > C		
最优组合 Optimal combination				D ₃ A ₁ B ₁ C ₂		

表 3 方差分析
Tab.3 Variance analysis

方差来源 Souces of variation	离均差平方和 Square deviation	自由度 Freedom	方差 Variance	F 值 F value	显著性
A	0.29 0	2	0.135	27.0	*
B	0.163	2	0.082	16.4	
C	0.010	2	0.005		
D	0.388	2	0.194	38.8	*
误差 E Error	0.01	2	0.005		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0。$

2.3 工艺验证

取迷迭香叶干粉各 800 g 共 3 份 照优选出的工艺条件进行提取。结果浸膏干重在 4.03 ~ 4.63 g , 均值为 4.58 g $RSD = 1.88\% (n = 3)$ 。表明酶法辅助提取迷迭香中三萜酸的工艺条件是稳定的。

3 结 论

(1) 本研究首次采用纤维素酶法 ,通过单因素试验和正交设计对迷迭香三萜酸的提取工艺进行了初步探讨 ,优化了酶法辅助提取迷迭香三萜酸的提取条件 ,其适宜提取参数为: 酶剂用量 6.5 mg/g ,酶解温度 45 ℃ ,酶解时间 2.5 h ,酶解 pH 值为 6.5。在上述提取条件下迷迭香浸膏的干质量为 4.58 g。

(2) 正交实验的极差结果表明 A 个因素对迷迭香三萜酸得率的影响顺序为: 酶解 pH 值 > 酶剂用量 > 酶解温度 > 酶解时间。

(3) 纤维素酶能有效地破坏细胞壁 ,加速了有效物质的释放。纤维素酶价格低廉 ,酶解条件温和 ,工艺简单 ,生产安全性好 ,值得推广应用。本结果为迷迭香三萜酸工业化生产提供了参考依据。

参考文献:

[1]江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1738 - 1739.
[2]孙权, 崔长旭, 全吉淑. 迷迭香提取物的抗肿瘤作用[J]. 食品科技, 2008(4): 156 - 157.

(下转第 1057 页)

蒸馏技术将皂化制得的二十八烷醇的初提混合物进行纯化。然后通过气相色谱分析检测所制得二十八烷醇的纯度为 89.78% (图 6 和图 7)。

3 结 论

通过正交实验表明,对于精制蜂蜡的皂化时间 3.5 h,皂化温度为 95 °C,NaOH 体积分数为 8%,固液比 1:8 为最佳配置。经过测定证明,使用传统的皂化工艺将精制蜂蜡皂化后使用分子蒸馏技术纯化制备的二十八烷醇产品纯度高达 89.78%,完全符合医药和食品等行业的需求。

参考文献:

- [1]毛佳,陈建华,黄少烈.二十八烷醇的研究进展[J].广东化工,2007,34(3):57-58.
- [2]陈芳.米糠中二十八烷醇的提取精制及其抗疲劳功能的研究[D].北京:中国农业大学,2003.
- [3]颜伟玉,曾星凯,谢国秀.蜂王浆中不同活性组分对大鼠降血脂效果影响[J].江西农业大学学报,2009,31(5):826-829.
- [4]杨新跃,刘志勇,汪礼国.蜂花粉多糖液抑制肿瘤作用的实验研究[J].江西农业大学学报,2006,27(2):293-294,303.
- [5]Cureton T K. Effects of wheat germ oil on human in exercise[M]. U S: Illinois, Charles Thomas Publishesr,1972.
- [6]何新益.二十八烷醇的研究状况及应用[J].现代食品科技,2005(2):219-220.
- [7]刘方波,王兴国.分子蒸馏技术分离米糠活性物质二十八烷醇的研究[J].中国油脂,2006,31(11):50-52.
- [8]刘法锦,孙冬梅.GC法测定蜂蜡总烷醇中两种烷醇的含量[J].时珍国药研究,1998,9(2):128.

(上接第 1052 页)

- [3]Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T et al. Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo(*Perilla herba*) [J]. Japanese Journal of Psychopharmacology 2002, 22(1): 15-22.
- [4]饶光宇,陈秀芬,张高等.迷迭香二萜酚提取物对几种肝损伤的保护作用[J].中草药,2001,32(5):434-436.
- [5]Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis* [J]. Oncology reports, 2007, 17(6): 1525-1531.
- [6]曾超珍,郭玉,孙丽香.纤维素酶法提取构骨叶熊果酸的工艺研究[J].北方园艺,2009(9):216-218.
- [7]Steiner M, Priel I, Giat J et al. Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 125-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid[J]. Nutrition and cancer 2001, 41(1/2): 135-144.
- [8]尹怀霞,黎锡流,潘兆广等.纤维素酶提取仙草多糖的研究[J].食品科技,2007(5):126-128.
- [9]钟世安,乔蓉,李维等.采用酶法提取荷叶中的荷叶碱[J].中南大学学报,2007,38(6):1135-1139.
- [10]吕晓玲,张琳琳,马立强等.迷迭香挥发油的酶法辅助提取工艺研究[J].食品工业科技,2010(7):233-234.