

水解原位萃取分离刺五加异秦皮啶

杨磊, 郝婧玮, 刘洋, 刘婷婷, 祖元刚^{*} (东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 对刺五加 80% 体积分数乙醇提取物采用水解原位萃取的方法将结合态异秦皮啶转化成游离态异秦皮啶。方法 确定的工艺条件为每克 80% 体积分数乙醇浸膏按固液比 1 : 100 加入 0.6 mol·L⁻¹ 盐酸, 加入同体积的 1,2-二氯乙烷, 搅拌下 85 °C 回流水解 2.5 h。结果 在此条件下, 刺五加根皮、茎皮和根茎混合异秦皮啶分别由原来的 0.042 4、0.011 2 和 0.005 3 mg·mL⁻¹ 增加到 1.264 1、0.441 2 和 0.260 0 mg·mL⁻¹, 分别增加 28.81、38.39 和 48.06 倍; 根木质部和茎木质部由水解前检测不到异秦皮啶增加到 0.023 3 和 0.009 7 mg·mL⁻¹。结论 将水解原位萃取法分离异秦皮啶工艺与目前常用的传统酸水解-有机溶剂萃取工艺进行了对比, 水解温度由原来的 100 °C 降低到 85 °C, 处理时间由原来的 14.5 h 降低到 2.5 h, 溶剂使用量仅为原来的 3/4。

关键词: 异秦皮啶; 刺五加; 水解原位萃取

中图分类号: TQ460.6

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)05-0401-05

Isolated Isofraxidin from *Acanthopanax Senticosu* Extract by Extraction in Combination Hydrolysis in Situ

YANG Lei, HAO Jingwei, LIU Yang, LIU Tingting, ZU Yuangang^{*} (Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

ABSTRACTS: OBJECTIVE The method of simultaneous hydrolysis and extraction in situ was applied to process 80% of the volume fraction of ethanol extract of *Acanthopanax senticosus*, in order to convert the bound isofraxidin into free isofraxidin.

METHODS The optimum conditions were confirmed as follows: the hydrochloric acid concentration of 0.6 mol·L⁻¹, the ratio of solid to liquid was 1 : 100 by adding hydrochloric acid, the same volume of 1,2-dichloroethane for extraction, reflux temperature 85 °C, hydrolysis time 2.5 h. **RESULTS** Under these conditions, the isofraxidin content in the root bark, stem bark and root-stem mixture product had increased from 0.042 4, 0.011 2 and 0.005 3 mg·mL⁻¹ to 1.264 1, 0.441 2 and 0.260 0 mg·mL⁻¹, which were 28.81-fold, 38.39-fold and 48.06-fold of those in the untreated extracts, respectively; the isofraxidin content in the root xylem and stem xylem were 0.023 3 and 0.009 7 mg·mL⁻¹, which can't detect the concentration without treatment.

CONCLUSION Using the process of simultaneous extraction and hydrolysis for separation of isofraxidin, hydrolysis temperature decreased from 100 °C to 85 °C, hydrolysis time shortened from 14.5 h to 2.5 h and the solvent amount was only the three-quarter of traditional method, comparing with the traditional acid hydrolysis and then extract with organic solvents method.

KEY WORDS: isofraxidin; *Acanthopanax senticosus*; extraction in combination hydrolysis in situ

刺五加[*Acanthopanax senticosus*(Rupr.et Maxim.) Harms. Syn. *Eleutherococcus Senticosus* (Rupr.et Maxim.) Maxim]主要分布在俄罗斯、朝鲜、日本和我国的东北及河北等地。是一种散生或丛生于山地阔叶混交林下及林缘或采伐迹地上的常见灌木, 根及根茎为主要的药用部位。在俄罗斯称为“西伯利亚人参(Siberian ginseng)”^[1-3], 日本称为“Ezo-ukogi”^[3-4], 美国称为“Adatogen”^[5]。刺五

加全株含有多种具有生理活性的次生代谢产物, 是具有悠久应用历史的著名植物药。现代临床用于治疗神经官能症、肾上腺皮质功能低下症、糖尿病、肿瘤患者因放疗和化疗引起的白细胞减少、风湿性及类风湿性关节炎、慢性支气管炎、肺心病、心绞痛、高血压高血脂症、局部贫血、脑血栓形成、低血压和糖尿病等多种疾病^[1-3, 6-10]。近年来, 国内外对刺五加的化学成分及其药理作用

基金项目: 科技部科研条件升级改造项目(JG-2004-09)

作者简介: 杨磊, 男, 博士, 副教授 Tel: (0451)82192392
Tel: (0451)82192392

E-mail: yanglei_nefu@126.com

^{*}通信作者: 祖元刚, 男, 博士, 教授

E-mail: zygorl@126.com

进行了广泛的研究,证明它们具有较高的药用价值。刺五加的主要活性成分有异秦皮啶、无梗五加苷、刺五加苷、chiisanoside、senticoside、三萜皂苷、紫丁香苷、黄酮类、 β -谷甾醇、芝麻素和新疆圆柏素等^[4,11-12]。异秦皮啶是刺五加含有的重要的次生代谢产物之一,1991年我国学者赵余庆等首次分离鉴定^[12]。异秦皮啶具有明显的镇静安神作用,异秦皮啶不仅使入睡时间明显缩短,而且睡眠持续时间也显著延长,有效改善睡眠质量^[13-14]。异秦皮啶具有明显的抗炎作用^[15-16],具有弱的抗肿瘤作用,对S₁₈₀的抑制率为37%~38%,对淋巴细胞白血病P₃₈₈有效,其ED₅₀为1.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}^[13],韩国学者用异秦皮啶治疗肝炎^[8-10]。我国通常把异秦皮啶作为刺五加制剂的检验标准。刺五加药材中异秦皮啶以游离型和结合型的形式存在,而结合型主要为刺五加苷B₁,如图1所示。如何选择更加合理的方法增加浸膏中异秦皮啶的含量,以达到现代制剂的要求,是目前刺五加新制剂研究中的一个重要课题。目前国内外一般是采用酸水解-有机溶剂萃取法转化和分离异秦皮啶,即直接将刺五加提取物加酸水解其中所含的结合态异秦皮啶,然后用有机溶剂提取。该工艺操作繁琐,多次萃取且易乳化,收率低。本研究采用水解原位萃取法分离异秦皮啶,单次萃取即可获得高得率的产品,且工艺简单,实用性强。$

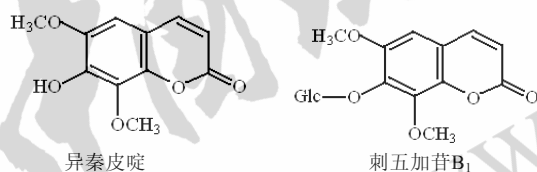


图1 异秦皮啶及刺五加苷B₁的结构

Fig 1 The structure of isofraxidin and eleutheroside B₁

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜刺五加根和茎2007年10月采集于黑龙江省尚志市苇河镇,经本室聂绍荃教授鉴定为*A. senticosus*。于60℃烘干后手工分成根皮、茎皮、根木质部、茎木质部及根茎混合样。分别粉碎并筛分250~850 μm 粒径作为异秦皮啶的提取原料。

1.2 仪器

1525高效液相色谱仪(Waters公司),2487紫外检测器(Waters公司),HiQ SiL C₁₈V 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm , KYA TECH公司),DK-98-I

电子恒温水浴锅(南京泰特化工设备有限公司),RE-52A型旋转蒸发水浴槽(上海青浦沪西仪器厂),SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),HX-200A型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金模具厂)。

1.3 试剂

异秦皮啶对照品批号:110837-200304,纯度为98%;刺五加对照药材批号:120927-200512。异秦皮啶对照品与刺五加对照药材均购自中国药品生物制品检定所。色谱纯乙腈,购于J&K CHEMICA公司,其余试剂均为国产分析纯。色谱分析用二次重蒸馏水自制。

1.4 异秦皮啶的测定

采用高效液相色谱法:Waters1525高效液相色谱仪, Waters2487紫外检测器, HiQ SiL C₁₈V (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,乙腈-水=2:8,等度洗脱,洗脱流速为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温30℃,检测波长245 nm,进样体积10 μL 。在上述色谱条件下,异秦皮啶保留时间10.7 min,主色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于1.5,理论塔板数不低于4 000。

1.5 游离和结合态异秦皮啶的提取

取干燥的刺五加根粉末1 kg,加入20 L圆底烧瓶中,然后按料液比1:7加入80%体积分数乙醇,水浴中70℃回流提取2 h,提取3次,合并3次提取液,旋转蒸发器60℃减压浓缩至干,得刺五加浸膏74.6 g,异秦皮啶含量0.83 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

1.6 影响水解原位萃取效果的因素试验

分别准确称取刺五加浸膏各1 g置于500 mL圆底烧瓶中,分别考察酸性催化剂种类、浓度和用量、水解时间、萃取溶剂种类及用量等因素对水解原位萃取效果的影响,以确定各因素变化范围以及各因素的适宜值,每个条件重复3次实验,取平均值。

1.7 传统先水解后萃取法分离异秦皮啶

取刺五加浸膏按固液比1:100加入0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸混悬,水浴中100℃回流水解2.5 h,冷却,然后分4次加入1,2-二氯乙烷萃取,总用量为0.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸体积的4倍,合并萃取液,旋转蒸发器60℃减压浓缩至干。

2 结果与讨论

2.1 异秦皮啶的提取工艺

考察了不同提取溶剂甲醇、80%体积分数乙

醇、95%体积分数乙醇和水, 结果见表1。考虑到95%体积分数乙醇溶剂回收后工业重复恒定浓度使用难度大以及甲醇的毒性, 选用80%体积分数乙醇作为提取溶剂。1 kg刺五加根茎混合原料经80%体积分数乙醇回流提取得刺五加浸膏74.60 g, 异秦皮啶纯度0.83 mg·g⁻¹。

表1 不同溶剂的提取结果

Tab 1 The results of different solvent extraction

溶剂种类	浸膏重/g	纯度/mg·g ⁻¹	回收率%
甲醇	106.29	0.63	93
80%体积分数乙醇	74.60	0.83	86
95%体积分数乙醇	72.82	0.88	89
水	105.06	0.49	71.5

2.2 水解原位萃取异秦皮啶因素考察

2.2.1 萃取溶剂 考察了三氯甲烷、1,2-二氯乙烷、乙酸乙酯、石油醚(沸程60~90 °C)和正丁醇的萃取效果。1 g刺五加浸膏用100 mL去离子水混悬, 加入萃取剂分次萃取, 每次用量100 mL。结果表明, 三氯甲烷和1,2-二氯乙烷等量萃取4次可将异秦皮啶萃取完全, 异秦皮啶在石油醚中溶解度小, 萃取不完全, 而乙酸乙酯和正丁醇由于与水部分互溶, 导致异秦皮啶在水相中残留较多, 萃取不完全, 而1,2-二氯乙烷沸点较高, 在水解原位萃取时可适当提高水解温度, 加速结合态异秦皮啶的转化, 因此选择1,2-二氯乙烷作为水解原位萃取的溶剂, 见图2。

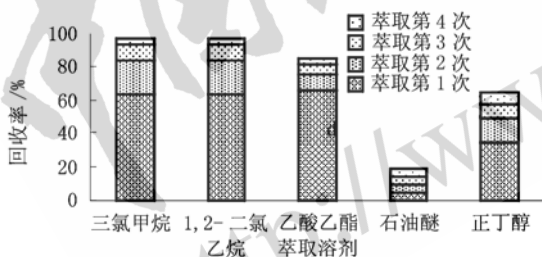


图2 不同溶剂对异秦皮啶的萃取效果

Fig 2 Effect of isofraxidin extraction by different solvents

2.2.2 酸种类及浓度 选用硫酸和盐酸作为备选催化剂。1 g刺五加浸膏用100 mL不同浓度酸混悬, 加入100 mL 1,2-二氯乙烷后85 °C搅拌下原位水解萃取2 h, 测定下层1,2-二氯乙烷相异秦皮啶浓度。酸种类及浓度对结合态异秦皮啶水解的影响见图3。由图3可以看出, 随着酸液浓度的增加, 溶液中异秦皮啶浓度均先呈增加的趋势, 并在氢离子浓度0.6 mol·L⁻¹时达到最大。氢离子浓度在

1 mol·L⁻¹以后盐酸溶液中异秦皮啶浓度下降较快, 硫酸溶液则基本维持不变。由图中还可看出, 在不加酸催化条件下, 溶液中异秦皮啶浓度只有0.005 3 mg·mL⁻¹, 当氢离子浓度同为0.6 mol·L⁻¹时, 盐酸和硫酸溶液中异秦皮啶浓度分别为0.248和0.204 mol·L⁻¹, 盐酸催化转化结合态异秦皮啶的效率明显好于硫酸, 可增量46.6倍。

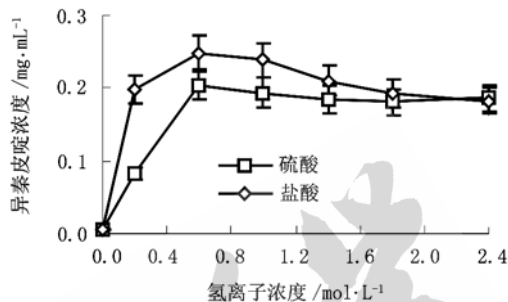


图3 酸种类及浓度的影响

Fig 3 Effect of acid type and concentration

2.2.3 水解时间 选用盐酸和硫酸调节氢离子浓度0.6 mol·L⁻¹作为原位水解萃取催化剂, 1 g刺五加浸膏用100 mL 0.6 mol·L⁻¹盐酸或0.3 mol·L⁻¹硫酸混悬, 加入100 mL 1,2-二氯乙烷后85 °C搅拌下原位水解萃取, 定时取样测定下层1,2-二氯乙烷相异秦皮啶浓度, 结果如图4所示。可以看出, 硫酸做催化剂水解速度慢, 5 h才能达到与盐酸催化2.5 h相当的水平, 进一步延长水解时间, 异秦皮啶浓度无下降趋势, 表明硫酸催化副反应较少。盐酸作为催化剂水解速度快, 在2.5 h异秦皮啶浓度即可达到0.26 mg·mL⁻¹, 进一步延长水解时间, 异秦皮啶浓度反而降低, 推测有较多的副反应产生。控制好水解时间, 选用盐酸作为催化剂是可行的, 有利于提高效率, 降低成本。

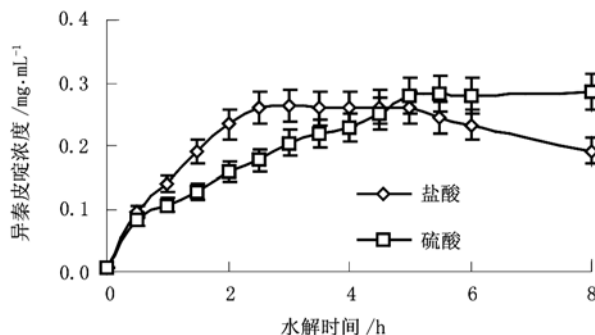


图4 水解时间的影响

Fig 4 Effect of hydrolysis time

2.2.4 固液比 1 g刺五加浸膏用0.6 mol·L⁻¹盐酸

分别按固液比1:40, 1:70, 1:100, 1:150和1:200溶解, 加入与0.6 mol·L⁻¹盐酸相同体积的1,2-二氯乙烷85℃搅拌下原位水解萃取2.5 h, 分出有机相, 计量体积, 测定异秦皮啶浓度, 计算有机相中含有的异秦皮啶质量, 如图5所示。表明在固液比为1:100时, 目标产物的浓度较高, 可达26 mg·mL⁻¹, 进一步增加固液比, 异秦皮啶增加趋势变缓, 因此选用固液比1:100用于结合态异秦皮啶的水解过程。

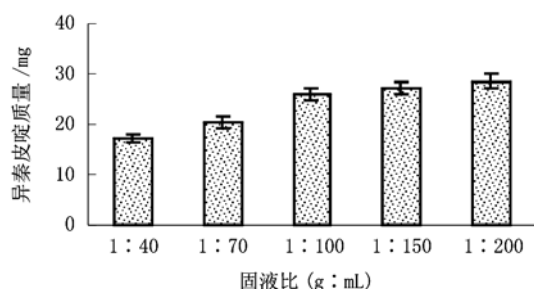


图5 固液比的影响

Fig 5 Effect of solid-liquid ratio

2.2.5 液液比 1 g刺五加浸膏用0.6 mol·L⁻¹盐酸按固液比1:100溶解, 然后加入不同体积的1,2-二氯乙烷85℃搅拌下原位水解萃取2.5 h, 分出有机相, 计量体积, 测定异秦皮啶浓度, 计算有机相中含有的异秦皮啶质量, 如图6所示。表明在液液比(水相-有机相)为1:1时, 目标产物的浓度较高。进一步增加液液比, 异秦皮啶增加趋势变缓, 因此选用液液比1:1用于结合态异秦皮啶的水解萃取过程。

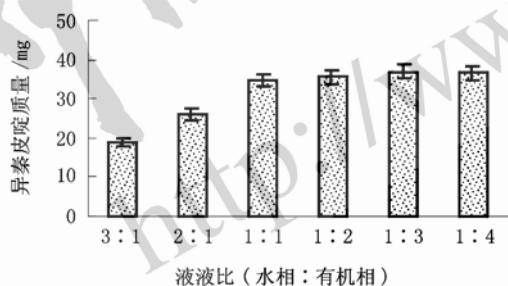


图6 萃取剂用量的影响

Fig 6 Effect of the amount of extractant

2.2.6 酸浓度和水解时间的交互影响 上述各因素中, 对于固液比和液液比来说, 结合态异秦皮啶的水解效率均随固液比和液液比的增加而增高, 对这类因素的选择只需从经济成本来考虑, 并不是以工艺最优来判定; 需要考虑交互影响的因素主要是酸浓度和水解时间。1 g刺五加浸膏分

别用100 mL 0.4、0.6和0.8 mol·L⁻¹盐酸混悬, 加入100 mL 1,2-二氯乙烷后85℃搅拌下原位水解萃取, 定时取样测定下层1,2-二氯乙烷相异秦皮啶浓度, 结果如图7所示。可以看出, 0.4 mol·L⁻¹盐酸催化, 4.5 h异秦皮啶浓度可达0.247 mg·mL⁻¹, 并始终保持在0.25 mg·mL⁻¹以上; 0.6 mol·L⁻¹盐酸催化, 2.5 h异秦皮啶浓度可达0.26 mg·mL⁻¹, 保持在0.25 mg·mL⁻¹以上3 h; 0.8 mol·L⁻¹盐酸催化, 2 h异秦皮啶浓度可达0.252 mg·mL⁻¹, 保持在0.25 mg·mL⁻¹以上只有1.5 h。0.4 mol·L⁻¹盐酸催化效率稍差, 用时长, 不可取。由于规模化生产液液分离等卸料工序往往用时较长, 在1.5 h内完成难度较大, 因此选用0.6 mol·L⁻¹盐酸作为水解催化剂, 水解时间2.5 h。

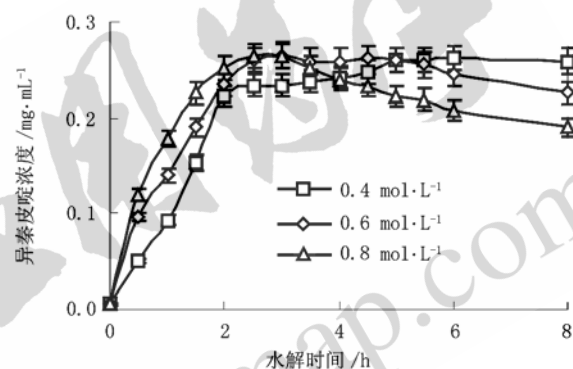


图7 酸浓度和水解时间的影响

Fig 7 Interaction of acid concentration and hydrolysis time

2.3 刺五加不同药材部位水解原位萃取分离异秦皮啶

分别用刺五加根皮、茎皮、根木质部、茎木质部及根茎混合原料的80%体积分数乙醇提取物1 g, 加入0.6 mol·L⁻¹盐酸100 mL混悬, 加入1,2-二氯乙烷100 mL, 搅拌下85℃回流水解2.5 h, 在此条件下, 刺五加根皮、茎皮和根茎混合异秦皮啶分别由原来的0.042 4, 0.011 2和0.005 3 mg·mL⁻¹增加到1.264 1, 0.441 2和0.260 0 mg·mL⁻¹, 分别增加28.81, 38.39和48.06倍; 根木质部和茎木质部由水解前检测不到异秦皮啶增加到0.023 3和0.009 7 mg·mL⁻¹, 效果显著。

2.4 水解原位萃取法与传统酸水解-有机溶剂萃取法分离异秦皮啶的工艺比较

水解原位萃取法分离工艺和目前常用的传统酸水解-有机溶剂萃取工艺, 对同一批根茎混合样品进行处理, 对处理条件及异秦皮啶增量情况进

行比较,见表2。结果表明,与酸水解-有机溶剂萃取法相比,水解原位萃取法的条件温和,生产成本明显降低,生产周期大大缩短,异秦皮啶含量与其相当,操作简便,实用性强。

表2 水解原位萃取法与酸水解-有机溶剂萃取法的比较
Tab 2 The comparison of extraction in combination hydrolysis in situ with acid hydrolysis-organic solvent extract

工艺参数	水解原位 萃取法	酸水解-有机溶剂 提取法
温度/℃	85	100
压力	常压	常压
时间/h	2.5	2.5(水解)/12(萃取)
萃取溶剂相对用量	3	4
是否乳化	不乳化	易乳化
异秦皮啶增加倍数	48.95	48.45

3 结论

对刺五加80%体积分数乙醇提取物采用水解原位萃取的方法将结合态异秦皮啶转化成游离态异秦皮啶。确定的工艺为每克80%体积分数乙醇浸膏按固液比1:100加入0.6 mol·L⁻¹盐酸,加入同体积的1,2-二氯乙烷,搅拌下85℃回流水解2.5 h,在此条件下,刺五加根皮、茎皮和根茎混合异秦皮啶分别由原来的0.042 4, 0.011 2和0.005 3 mg·mL⁻¹增加到1.264 1, 0.441 2和0.260 0 mg·mL⁻¹,分别增加28.81, 38.39和48.06倍;根木质部和茎木质部由水解前检测不到异秦皮啶增加到0.023 3和0.009 7 mg·mL⁻¹,效果显著。

将水解原位萃取法分离异秦皮啶工艺与目前常用的传统酸水解-有机溶剂萃取工艺进行了对比,水解温度由原来的100℃降低到85℃,处理时间由原来的14.5 h降低到2.5 h,溶剂使用量仅为原来的3/4,而异秦皮啶得率与传统方法相比无统计学差异,且避免了萃取乳化的风险,因此水解原位萃取分离刺五加中异秦皮啶,反应条件温和、成本低、周期短、操作简便、实用性强,为规模化制备提供了新的方法。

REFERENCES

[1] BREKHMANN I I, DARDOMV I V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1969, 9(4): 419-430.

[2] PERRY L M. Medicinal plants of East and Southeast Asia [M]. Cambridge, Massachusetts and London: MIT Press, 1980: 41.

[3] YOOK C S. Coloured Medicinal Plants of Korea [M]. Seoul: Academy Book Co., 1990: 377.

[4] DAVYDOV M, KRIKORIAN A D. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look [J]. J Ethnopharm, 2000, 72(3): 345-393.

[5] FRASNSWORTH N R, KINGHORN D, SOEJARTO D D, et al. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*): current status as an adaptogen [C]. London: Wagner H, Hikino H, Fransworth N R. Academic Press, 1985: 155-215.

[6] BUNOUT D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease [J]. Nutrition, 1999, 15(7/8): 583-589.

[7] CARDIN R, D'EFFICO A, FIORENTINO M, et al. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease [J]. Alcohol Alcohol, 2002, 37(1): 43-48.

[8] KANG H S, KIM Y H, LEE C S, et al. Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11), 15-dien-19-oic acid, and its antifibrotic effects *in vivo* [J]. Cell Immunol, 1996, 170(2): 212-221.

[9] LEE Y S, LEE E B, KIM Y H. Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from *Acanthopanax koreanum* root bark [J]. J Appl Pharmacol, 2001, 9(2): 176-182.

[10] SHIN K H, LEE S. The chemistry of secondary products from *Acanthopanax* species and their pharmacological activities [J]. Nat Prod Sci, 2002, 8(4): 111-126.

[11] GALLI A, PINAIRE J, FISCHER M, et al. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor α is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver [J]. J Biol Chem, 2001, 276(1): 68-75.

[12] ZHAO Y Q, YANG S S, SUN Y D, et al. Isolation and Identification about the isofraxidin and stilbenic compounds from *Acanthopanax senticosus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1991, 22(11): 516-518.

[13] LI Q Y. Extraction, depuration and utilization about the composition of *Acanthopanax senticosus* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2001.

[14] LIU Q H, ZHU L, LI W L. The chemistry and pharmacology research of active composition from *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 1999, 10(4): 305-306.

[15] TAISUKE YAMAZAKI, SHIGEHIO SHIMOSAKA, MASAYUKI SAKURAI, et al. Anti-inflammatory effects of a major component of *Acanthopanax senticosus* Harms, isofraxidin [J]. J Electrophoresis, 2004, 48(2): 55-58.

[16] LIU J T, TIAN J N, TIAN X, et al. Interaction of isofraxidin with human serum albumin [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(2): 469-474.