

正交实验研究白刺种子尿囊素提取工艺

王洪伦¹, 李玉林^{1,2}, 丁晨旭^{1,2}, 索有瑞^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用高效液相色谱法测定尿囊素的含量, 本文采用正交实验, 对白刺种子尿囊素的提取工艺进行了优化。结果表明各因素对尿囊素的提取效果的影响程度为乙醇浓度 > 温度 > 料液比 > 提取时间 > 提取次数。从而确定白刺种子中尿囊素的最佳提取工艺为乙醇浓度为 60%, 料液比为 1:12 (W/V), 提取温度为 80℃, 提取时间为 1 h, 重复提取 3 次。

关键词: 唐古特白刺; 尿囊素; 正交实验; 提取工艺

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Study on Extraction Process of Allantoin from *Nitraria* Seed by Orthogonal Experiment

WANG Hong-lun¹, LI Yu-lin^{1,2}, DING Chen-xu^{1,2}, SUO You-ru^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: To optimize the extraction condition of allantoin from *Nitraria* seed, extraction was studied by orthogonal experiment and the concentration of allantoin was determined by HPLC. The results show that the order of factors to affect the allantoin extraction was ethanol concentration > temperature > solid-liquid ratio > extraction time > extraction number. The optimal means for extraction of allantoin from *Nitraria* seed was to extract with 60% alcohol at 80℃ for 1 h, solid liquid ratio 1:12 for 3 times.

Key words: *Nitraria*; allantoin; orthogonal experiment; extraction process

白刺 (*Nitraria*) 是蒺藜科 (Zygophyllaceae) 的旱生或超旱生典型荒漠植物, 其抗逆性强, 耐干旱盐碱、能适应高温低寒, 自然分布在干燥、盐碱、多风、植被稀少的严酷生境中, 是防风固沙的优良灌木^[1,2]。全世界有 12 个种, 我国有 8 个种。在我国主要分布在青海、新疆、甘肃、宁夏、内蒙古等地, 资源十分丰富。其中唐古特白刺 (*Nitraria tangutorun* Bobr.) 为我国的特有种。白刺是西部蒙、藏、维等少数民族的传统药材, 广泛用于多种疾病的治疗, 同时具有广谱的营养作用^[3,4], 经常在中藏药复方上出现。据对产地农牧民的访问, 白刺果实成熟时, 群众采集鲜果连核一起吞食, 可治疗胃病, 有助消化, 还可治伤风感冒、头痛头晕等; 其叶在民间作为药用, 具抗痉挛、抑制神经痛、降压安神等功效。研究发现白刺种子含有尿囊素 (Allantoin), 尿囊素属于咪唑类杂环化合物, 由于其分子上含有海因, 具有麻醉、减痛、抗刺激物的作用, 而且尿囊素具有刺激组织生长, 促进细胞繁殖, 加快伤

口愈合, 软化角质层蛋白等生理功能和增殖作用, 广泛用于生产治疗糖尿病、肝硬化及癌症等多种药物和用于皮肤干燥症, 治疗鳞屑性皮肤病疾患及抗溃疡病^[5]。

尿囊素的制备方法主要包括植物提取法和化学合成法, 化学合成法的优点是可以大规模生产, 但是存在合成成本偏高等问题^[5], 且合成的尿囊素常带有副产物。从植物中提取所得尿囊素为天然提取物, 更有利于医药和化妆品应用及安全性。我们对白刺果实的功效作用及籽油进行了系列研究, 研究发现尿囊素为白刺种子中主要的活性物质^[6,8]。利用超临界 CO₂ 萃取白刺种子油后会产生大量的果核残渣, 为了充分利用柴达木白刺果实资源, 确定其最佳的活性物质提取工艺, 以便适于生物产品的进一步开发, 形成白刺产业链, 通过开发达到保护白刺, 最终达到改善柴达木生态环境的目的, 本文对白刺种子中尿囊素的提取工艺进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器、试剂

唐古特白刺种子: 采自青海柴达木地区, 白刺果

收稿日期: 2005-05-30 接受日期: 2005-07-11

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才培养计划

* 通讯作者 Tel: 86-971-6143857; E-mail: yrsuo@nwipb.ac.cn

实榨汁后洗净、粉碎,超临界 CO₂ 萃取种子油后得实验所需样品。

Waters 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司,515 泵,2487 紫外检测器,Millennium32 色谱管理站。

尿囊素对照品,中国药品生物制品鉴定所;甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其它试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱:AT.Chrom C₁₈ 5 μm 柱(250 mm ×4.6 mm);流动相:甲醇:水(10:90);流速:0.5 mL/min;检测波长:224 nm;进样量:10 μL。

1.3 标准溶液的制备

精确称取干燥恒重的尿囊素对照品 20.0 mg 置

于 50 mL 容量瓶中,加入双蒸水溶解,定容至刻度并摇匀,即可得到浓度为 0.40 mg/mL 的尿囊素标准溶液。将 0.40 mg/mL 的尿囊素标准溶液依次稀释得 0.20,0.10,0.05,0.025,0.0125,0.00625 mg/mL 的标准溶液。

1.4 标准曲线的制备

取各种浓度的标准溶液 10 μL 按上述色谱条件进样分析,以标准溶液的浓度 X (mg/mL) 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 6.420 \times 10^6 X - 20833.05$, $R = 0.9998$,尿囊素浓度在 0.00625 ~ 0.40 mg/mL 范围内线性关系良好。对照品色谱图见图 1A。

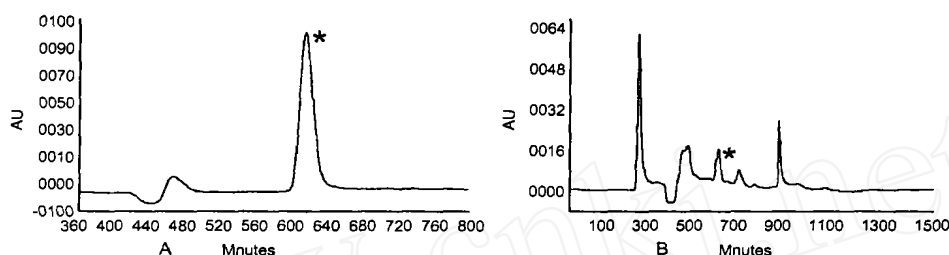


图 1 对照品及样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance and sample

*-尿囊素, A-对照品, B-样品

*-allantoin, A-reference substance, B-sample

1.5 样品溶液的制备及测定

称取超临界 CO₂ 萃取种子油后的残渣 5.000 g,按正交试验设定的条件加入乙醇溶液,水浴中回流提取,合并各次提取液,浓缩后用 70%乙醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,作为供试品溶液。取上述供试品溶液于离心管中,4000 rpm 高速离心 10 min,取上清液,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取 10 μL 进样测定(色谱图见图 1b)。利用回归方程计算出尿囊素的浓度 C (mg/g),按下列公式计算白刺种子内尿囊素的含量。

$$\text{尿囊素含量 (mg/g)} = C \times 100 / 5.000$$

2 实验结果与讨论

2.1 正交实验因素水平

影响提取效果的因素主要有:浸提溶剂种类、溶剂浓度、温度、溶剂用量(料液比)、提取时间与提取次数。实验证明乙醇提取尿囊素的效果较好^[9],因此在实验中采用乙醇作为提取溶剂,并选择温度、料液比、乙醇浓度、提取时间、提取次数 5 个因素,每个因素选取 4 个水平,采用 L₁₆(4)⁵ 正交表安排实验,

因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factor levels list

水平 Levels	A 温度 (°C) Temperature	B 料液比 Solid liquid ratio (W/V)	C 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	D 提取时间 Extraction time (h)	E 提取次数 Extraction times
1	60	1:4	0	0.5	1
2	70	1:8	30	1.0	2
3	80	1:12	60	1.5	3
4	90	1:16	90	2.0	4

表 2 正交试验结果及数据分析

Table 2 Results of orthogonal experiment and data analysis

顺序 No.	A 温度 (°C)	B 料液比 Solid liquid ratio (W/V)	C 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	D 提取时间 Extraction time (h)	E 提取次数 Extraction times (h)	尿囊素 含量 Allantoin content (mg/g)
1	1	1	1	1	1	0.1509
2	1	2	2	2	2	0.8715
3	1	3	3	3	3	0.9863
4	1	4	4	4	4	0.5297
5	2	1	2	3	4	0.8450

6	2	2	1	4	3	0.8424
7	2	3	4	1	2	0.4928
8	2	4	3	2	1	1.0163
9	3	1	3	4	2	0.9002
10	3	2	4	3	1	0.4920
11	3	3	1	2	4	1.5604
12	3	4	2	1	3	0.9268
13	4	1	4	2	3	0.6482
14	4	2	3	1	4	1.2550
15	4	3	2	4	1	0.8400
16	4	4	1	3	2	0.7473
k1	0.6346	0.6361	0.8253	0.7064	0.6248	
k2	0.7991	0.8652	0.8708	1.0241	0.7530	
k3	0.9699	0.9699	1.0395	0.7677	0.8509	
k4	0.8726	0.8050	0.5407	0.7781	1.0475	
R	0.3353	0.3338	0.4849	0.3177	0.4227	

2.2 正交实验结果与讨论

正交实验结果见表2。从表2中极差分析可知,各种因素对白刺种子中尿囊素的提取效果影响的程度从高到低为:乙醇浓度 > 温度 > 料液比 > 提取时间 > 提取次数。结合k值确定的最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3D_2E_4$,即60%乙醇于80℃回流提取4次,料液比为1:12(W/V),每次提取1h。从正交实验方差分析表(表3)可知,乙醇浓度的差异最大,呈显著性水平($P < 0.05$),其他四个因素温度、料液比、提取时间与提取次数在选定的水平范围内未呈显著性差异。方差分析的结果说明:乙醇浓度是影响提取效果的最重要的因素,对白刺种子尿囊素的提取起主要作用;其他四个因素温度、料液比、提取时间与提取次数对提取效果影响不大。在实际生产中应尽量减少提取次数,从而减小生产成本,因此选择最佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_3D_2E_3$,即乙醇浓度为60%,料液比为1:12(W/V),提取温度为80℃,提取时间为1h,重复提取3次。

表3 正交试验方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment

变异来源 SV	偏差平方和 SS	自由度 f	均方 S	F值 F value	显著水平 P
温度 Temperature	0.204	3	0.080	0.703	>0.10
料液比 Solid liquid ratio	0.234	3	0.078	0.682	>0.10
乙醇浓度 Ethanol concentration	0.563	3	0.188	4.668	<0.05
提取时间 Extraction time	0.236	3	0.079	0.689	>0.10
提取次数 Extraction times	0.381	3	0.127	1.224	>0.10
总和 total	1.618	15	-	-	-

3 结论

本文利用正交实验对白刺种子尿囊素的提取工艺进行了研究,通过结果分析及实际生产考虑确定的提取工艺为:乙醇浓度为60%,料液比为1:12,提取温度为80℃,提取时间为1h,重复提取3次。

本实验确定的提取工艺以60%乙醇为提取溶剂,具有安全、实用和经济科学的特点,同时该工艺操作简单、步骤少,容易实现产业化生产。从而为白刺种子的进一步开发提供了基础依据。

参考文献

- Zhao KC(赵克昌), Qu JS(曲金声), Guo JL(郭劲玲). Review of the research and development of the shrub. *Soil and Water Conservation in China* (中国水土保持), 1995, 16: 38-40.
- Li BH(李必华). Research and development of *Nitraria*. *J Shandong Fores Sci and Tech* (山东林业科技), 1994, 24(3): 7-12.
- Gao H(高航), Suo YR(索有瑞). Amino acid content and its nutritional evaluation of *Nitraria sibirica* Pall. and *Nitraria tangutorum* Bobr. in Tsaidam basin. *Amino Acids and Biotic Resource* (氨基酸和生物资源), 2002, 24(4): 4-7.
- Gao H(高航), Li TC(李天才), Suo YR(索有瑞). Analysis on the mineral elements in *Nitraria sibirica* Pall. and *Nitraria Tangutorum* Bobr. in Tsaidam region. *Guangdong Weiliang Yuansu Kexue* (广东微量元素科学), 2002, 9(8): 52-54.
- Sun HL(孙华林). Development and application of allantoin. *Jingxi Huagong Huaxian Xinxi Tongxun* (精细化工化纤信息通讯), 2002, (3): 10-11.
- Suo YR, Gao H, Wang HQ. Chinese: Chemical Constituents of Seed Oil Extracted by SFE-CO₂. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 16-18.
- Suo YR(索有瑞), Wang HL(王洪伦), Wang HQ(汪汉卿). Research on decreasing blood lipid and anti-oxidative effect of fruit of *Nitraria Tangutorum* Bobr. from Tsaidam basin. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 54-58.
- Suo YR(索有瑞), Wang HQ(汪汉卿). Studies on hypoglycemic effect fruit of *Nitraria Tangutorum* Bobr. from qinghai Tsaidam basin. *Food Sci* (食品科学), 2004, 25: 164-167.
- Bai Y(白雁), Zhu FY(朱风云), Wang D(王东). Determination of allantoin in *Rhizoma dioscoreae* collected from different regions by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34, 179-180.