

刘畅,王芳,张蓉,等. 正交试验优选金雀花碱提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):266-268.

正交试验优选金雀花碱提取工艺

刘畅,王芳,张蓉,南宁丽

(宁夏农林科学院植物保护研究所,宁夏银川 750002)

摘要:以金雀花碱含量为评价指标,采用正交试验法筛选金雀花碱的最佳提取工艺条件。结果表明,最佳提取工艺为乙醇体积分数 70%、料液比 1 g : 6 mL、提取时间 1.5 h、提取次数 3 次。其中,提取次数是影响披针叶黄华中金雀花碱得率的最主要因素,最优条件下提取浸膏得率为 32.02%,披针叶黄华中金雀花碱含量为 20.05 mg/g。优化的提取工艺科学、合理,可以作为金雀花碱的最佳提取方法。

关键词:披针叶黄华;金雀花碱;加热回流法;正交试验

中图分类号: TQ453.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0266-03

披针叶黄华(*Thermopsis lanceolata*)是我国西部地区早春的重要野生蜜源植物,也是一种重要的固沙植物^[1]。披针叶黄华属豆科野决明属,主要分布在中国西北地区,20 世纪 60 年代前苏联人对其生物碱研究较多^[2],近 20 年有关这方面的报道较少。该植物全草可祛痰,所含生物碱有药用价值,具有潜在的应用前景。披针叶黄华中的生物碱具有一定的毒性,其中金雀花碱具有强烈的兴奋呼吸作用^[3-5],其 0.15% 注射液相当于 1% 山梗菜碱注射液的效果,并有升高血压的作用^[6],且金雀花碱对山楂叶螨、橘全爪螨均表现出较好的拒食活性^[7]。在已有的药理研究中,水提法对披针叶黄华中金雀花碱的提取率很低。本试验改变了传统的提取方法,获得了较高含量的金雀花碱,可为披针叶黄华资源的开发利用提供实用技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

披针叶黄华采于宁夏自治区盐池县,金雀花碱对照品购于陕西大河药业有限责任公司。甲醇为色谱纯,水为超纯水,乙醇为分析纯。

主要仪器:Agilent 1260 高效液相色谱仪(手动进样器、DAD 检测器、在线脱气机、四元泵和 Agilent 化学工作站,安捷伦科技有限公司);HX501T 电子天平(浙江省慈溪市天东衡器厂);HDM 数显调温电热套(江苏省金坛市白塔新宝仪器厂);RE-6000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(Ⅲ)循环水多用真空泵(上海予英仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 金雀花碱含量的测定

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱 C₁₈,流动相甲醇-水(体积比 85:15),流速 1 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 256 nm。

1.2.1.2 溶液制备 (1)对照品溶液制备。精确称取金雀花碱对照品适量,加甲醇溶解制成 0.02 g/L 的溶液。(2)供试品溶液制备。称取披针叶黄华,乙醇回流,取醇提干膏,加甲醇溶解,用微孔滤膜(0.45 μm)过滤。

1.2.1.3 检测方法^[8] 分别精确吸取金雀花碱对照品溶液、供试品溶液、样品溶液各 10 μL,注入液相色谱^[9],检测,金雀花碱对照品和供试品在 1.8 min 左右出现金雀花碱吸收峰,对照无干扰。高效液相色谱图见图 1。

1.2.1.4 线性关系考察^[10] 吸取 0.4 g/L 对照品溶液适量,稀释,配成浓度为 0.02、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32 g/L 的溶液,并测定。以峰面积为纵坐标、进样量为横坐标绘制标准曲线,在金雀花碱浓度为 0.02~0.32 g/L 时,曲线线性关系良好,回归方程为 $y = 1\,653.226x + 1.561\,6$, $r = 0.998\,4$ 。

1.2.1.5 精密度试验 精确吸取金雀花碱对照品溶液 10 μL,重复进样 5 次,以计算金雀花碱峰面积, RSD 为 0.86%。

1.2.1.6 稳定性考察 精确吸取同一供试品 10 μL,分别在 0、2、4、6、8、10 h 测定峰面积, RSD 为 1.20% ($n = 6$),表明供

收稿日期:2012-12-10

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关(编号:KGX-09-10-10);国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201003079)。

作者简介:刘畅(1985—),女,辽宁沈阳人,硕士,研究实习员,研究方向为植物源农药的开发与利用。Tel:(0951)6882367;E-mail:liuchangamy@126.com。

通信作者:张蓉,研究员,主要从事生物农药研究。Tel:(0951)6886823;E-mail:zhangrong_nx@yahoo.com.cn。

[4]李文生,王峰,韩淑英. 水提取荞麦叶总黄酮的工艺研究[J]. 华北煤炭医学院学报,2008,10(4):476-477.

[5]延玺,刘会青,邹永青,等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学,2008,28(9):1534-1544.

[6]刘光德,李名扬,祝钦洸,等. 资源植物野生金荞麦的研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(10):380-389.

[7]张岩,曹国杰,张燕,等. 黄酮类化合物的提取以及检测方法

的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):154-158.

[8]国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:256.

[9]李敏晶,游景艳,刘忠英,等. 微波辅助流动萃取槐花中的黄酮类成分[J]. 高等学校化学学报,2004,25(5):850-852.

[10]王景峰. 超声波法提取山竹皮中总黄酮的研究[J]. 化工科技,2011,19(6):47-50.

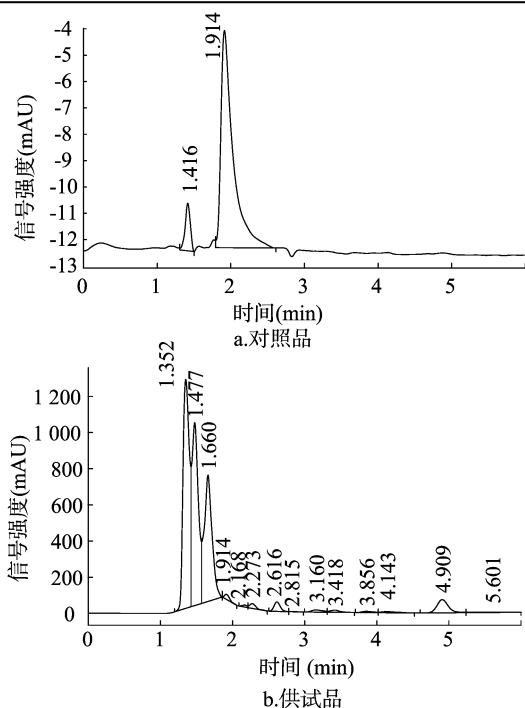


图1 披针叶黄华中金雀花碱高效液相色谱

样品在 10 h 内稳定。

1.2.2 单因素试验 披针叶黄华风干至恒重,粉碎,过 40 筛,精确称取 50 g 干粉,按不同乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数进行加热回流提取,过滤,定容,得样品溶液,按照“1.2.1”测定峰面积,以标准曲线法计算披针叶黄华中金雀花碱含量。分别确定最适乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数^[11]。

1.2.3 正交试验及优选 在披针叶黄华金雀花碱提取单因素试验基础上,对影响金雀花碱提取的主要因素(乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数)^[12]进行 $L_9(3^4)$ 正交试验^[13],确定披针叶黄华金雀花碱提取最佳条件。披针叶黄华经粉碎后按比例称取,共 9 份,每份 50 g,加入不同体积分数的乙醇,加热回流提取,过滤,定容,即得 1~9 号样品溶液,测定金雀花碱含量。分别吸取定容后的样品溶液 20 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速称重,计算干膏得率。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对金雀花碱提取的影响 在其他条件相同的情况下,分别研究 60%、70%、80%、90%、100% 乙醇对金雀花碱提取的影响。由图 2 可知,当乙醇体积分数为 70% 时,金雀花碱得率最大。

2.1.2 料液比对金雀花碱提取的影响 在其他条件相同的情况下,研究不同料液比(1 g : 4.5 mL、1 g : 6.0 mL、1 g : 7.5 mL、1 g : 9.0 mL、1 g : 12.0 mL)对金雀花碱提取的影响。由图 3 可知,当料液比在 1 g : 6.0 mL 时,金雀花碱的提取量最高,为 15.4 mg/g,说明一定量的溶剂可将有效成分完全溶出,再增加乙醇量,提取效果变化不明显。因此,为节省原料,料液比宜为 1 g : 6.0 mL。

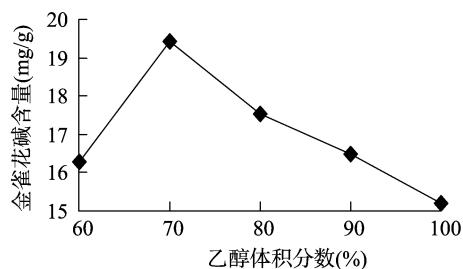


图2 乙醇体积分数对金雀花碱提取的影响

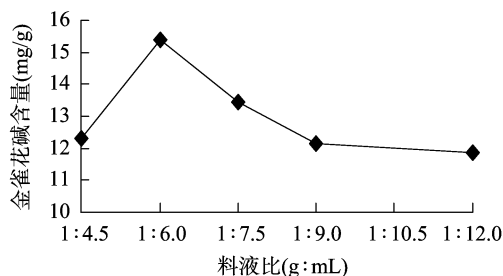


图3 料液比对金雀花碱提取的影响

2.1.3 提取时间对金雀花碱提取的影响 由图 4 可知,在其他条件相同情况下,分别提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,测得的金雀花碱含量分别为 10.87、13.54、15.21、15.98、16.21 mg/g。可见在 1.5 h 内,披针叶黄华中金雀花碱提取量随着提取时间延长而提高;当提取时间超过 1.5 h 时,金雀花碱提取量增加缓慢。因此,为实现高效提取,应提取 1.5 h。

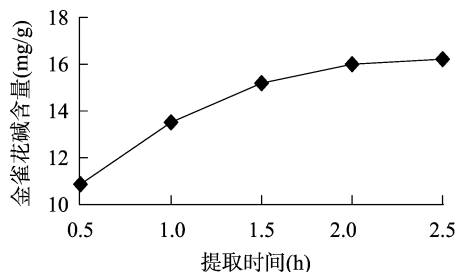


图4 提取时间对金雀花碱提取的影响

2.1.4 提取次数对金雀花碱提取的影响 由图 5 可知,在其他条件相同的情况下提取 1、2、3、4、5 次,测得的金雀花碱含量分别为 10.57、12.78、16.56、16.8、17.23 mg/g。由此可见,提取 1~3 次时,金雀花碱提取量随着提取次数增加而提高;当提取超过 3 次时,金雀花碱提取量增加缓慢,因此,为节约成本,宜提取 3 次。

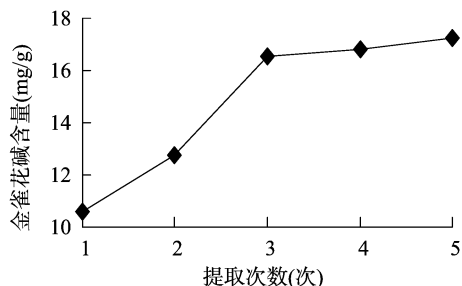


图5 提取次数对金雀花碱提取的影响

2.2 正交试验

根据单因素试验结果,以乙醇体积分数(A)、料液比

(B)、提取时间(C)和提取次数(D)为指标,进一步研究各因素对披针叶黄华金雀花碱提取的影响,采用 $L_9(3^4)$ 4 因素 3 水平正交试验,确定金雀花碱提取的最佳工艺,各因素水平见表 1。由极差分析(表 2)可知,各因素作用主次分别为 $D > C > B > A$,说明提取次数是影响披针叶黄华金雀花碱提取的最重要变异因素,最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$,即乙醇体积分数 70%、料液比 1 g : 6.0 mL、提取时间 1.5 h、提取次数 3 次。各因素方差分析(表 3、表 4)结果表明,提取次数对披针叶黄华金雀花碱提取浸膏得率的影响达到显著水平($P < 0.05$)。

表 1 乙醇提取工艺正交试验因素水平

| 水平 | A:乙醇体积分数(%) | B:料液比(g : mL) | C:提取时间(h) | D:提取次数(次) |
|----|-------------|---------------|-----------|-----------|
| 1 | 60 | 1 : 6 | 1.0 | 1 |
| 2 | 70 | 1 : 9 | 1.5 | 2 |
| 3 | 80 | 1 : 12 | 2.0 | 3 |

表 2 乙醇提取金雀花碱工艺正交试验结果

| 试验号 | A | B | C | D | 浸膏得率(%) | 金雀花碱含量(mg/g) |
|--------------|----------|----------|----------|----------|---------|--------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 20.92 | 10.846 5 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 24.10 | 12.057 6 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 37.72 | 11.174 6 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 32.30 | 20.040 1 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 21.56 | 11.021 5 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 25.06 | 10.377 9 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 19.92 | 10.412 6 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 26.32 | 11.837 8 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 19.32 | 10.711 2 |
| 浸膏得率(%) | | | | | | |
| k_1 | 27.58 | 24.38 | 24.10 | 20.60 | | |
| k_2 | 26.31 | 24.00 | 25.24 | 23.03 | | |
| k_3 | 21.85 | 27.37 | 26.40 | 32.11 | | |
| R_1 | 5.73 | 3.37 | 2.30 | 11.51 | | |
| 金雀花碱含量(mg/g) | | | | | | |
| k_1 | 11.359 6 | 13.766 4 | 11.020 7 | 10.859 7 | | |
| k_2 | 13.813 1 | 11.639 0 | 14.269 6 | 10.949 4 | | |
| k_3 | 10.987 2 | 10.754 6 | 10.869 6 | 14.350 8 | | |
| R_2 | 2.825 9 | 3.011 8 | 3.400 0 | 3.491 1 | | |

表 3 浸膏得率方差分析

| 变异来源 | SSA | df | F | P |
|--------|---------|----|--------|-------|
| 乙醇体积分数 | 54.248 | 2 | 6.837 | >0.05 |
| 料液比 | 20.449 | 2 | 2.577 | >0.05 |
| 提取时间 | 7.935 | 2 | 1.000 | >0.05 |
| 提取次数 | 221.013 | 2 | 27.853 | <0.05 |

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

表 4 金雀花碱含量方差分析

| 变异来源 | SSA | df | F | P |
|--------|--------|----|-------|-------|
| 乙醇体积分数 | 14.145 | 2 | 1.000 | >0.05 |
| 料液比 | 14.379 | 2 | 1.017 | >0.05 |
| 提取时间 | 22.139 | 2 | 1.565 | >0.05 |
| 提取次数 | 23.766 | 2 | 1.680 | >0.05 |

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

2.3 验证试验

为了验证最佳工艺的准确性,保证醇提工艺的合理和稳定,按确定的提取工艺进行平行 3 次验证试验,结果 3 次浸膏得率平均值为 32.02%,金雀花碱含量平均值为 20.05 mg/g,表明该提取工艺稳定可行。

3 结论

本试验通过单因素试验和正交试验优选出披针叶黄华金雀花碱的最优工艺 $A_2B_1C_2D_3$,即醇体积分数 70%、料液比 1 g : 6 mL、提取时间 1.5 h、提取次数 3 次,验证试验证明结果具有良好的重复性和较高准确率。该提取工艺条件稳定,作为中药提取新工艺具有良好的应用前景和实际的指导意义。

参考文献:

[1] 萨 仁,陈家瑞. 豆科黄华属的植物地理研究[J]. 植物分类学报,2000,38(2):148-166.

[2] 陈冀胜,郑 硕. 中国有毒植物[M]. 北京:科学出版社,1987:340-341.

[3] 达能太,李忠德,赵巧娥,等. 绵羊披针叶黄华中毒病的研究[J]. 动物毒物学,2003(1):71-75.

[4] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997.

[5] 李扬汉. 中国杂草志[M]. 北京:中国农业出版社,1998.

[6] 魏启华,赵博光. 披针叶黄华生物碱及其生物活性[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2000,24(5):73-76.

[7] 韩俊艳,张立竹,纪明山. 植物源杀虫剂的研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(21):229-233.

[8] 韩忠明,刘翠晶,胡顺波,等. 中华苦蕒菜总黄酮微波提取工艺研究[J]. 北方园艺,2011(24):207-210.

[9] 徐 媛,张 琰,刘新友,等. 正交试验法优选黄连中小檗碱提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(5):60-62.

[10] 杜连平,刘 巍. HPLC 测定牧马豆中不同部位金雀花碱的含量[J]. 食品与药品,2012,14(2):123-125.

[11] 牛 炜,潘东明,贾媛颖. 水仙鳞茎中粗多糖的提取工艺优化[J]. 北方园艺,2012(10):64-66.

[12] 扶庆权,李 健,徐 鉴. 正交试验法优化花生白藜芦醇的提取工艺[J]. 安徽农业科学,2012,40(14):8165-8167.

[13] 代玉玲,杨美林,秦小萍,等. 正交试验优选坡柳总皂苷提取工艺[J]. 农药,2012,51(7):499-500.