

李钦玲,陈玉乾.微波辐射法提取藏药唐古特乌头总生物碱的工艺[J].江苏农业科学,2019,47(21):260-262.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.062

# 微波辐射法提取藏药唐古特乌头总生物碱的工艺

李钦玲,陈玉乾

(青海民族大学化学化工学院,青海西宁 810007)

**摘要:**采用微波辐射提取法对藏药唐古特乌头中的总生物碱进行提取,并用紫外分光光度法测定唐古特乌头提取物中总生物碱的含量,用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方法对提取工艺进行优化。结果表明,微波辐射提取唐古特乌头中总生物碱的最佳工艺条件如下:料液比为1 g:15 mL,浸泡时间为2 h,提取时间为15 min,提取温度为40℃。在最佳工艺条件下,提取液中的生物碱含量最高,平均提取率为1.014%,表明该提取工艺耗时短,效率高,稳定可行。

**关键词:**唐古特乌头;生物碱;正交试验设计;微波辐射法

**中图分类号:** R284      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2019)21-0260-03

藏药唐古特乌头 [*Aconitum tanguticu* (Maxmi.) Stapf] 为毛茛科植物,多分布在青海、甘肃甘南、四川藏区等海拔为3 200~4 200 m的高山草地或山顶多石砾处<sup>[1]</sup>。唐古特乌头又称甘青乌头,藏药名为榜噶,具有清热解毒、生肌收口、燥湿等功效,多用于治疗肝热、胆热、肺热、肝炎、肺炎、胃肠炎以及疮疮、蛇蝎咬伤等<sup>[2-3]</sup>。据报道,唐古特乌头中的主要生物碱成分为毒性较小的内酯型二萜生物碱<sup>[4-6]</sup>,具有广泛的药用价值。近年来,对唐古特乌头抗病毒、抗炎作用的研究均有报道<sup>[7-9]</sup>,哈文秀等做了唐古特乌头中多糖的提取研究<sup>[10]</sup>,但是对其生物碱提取工艺的研究少见报道。

本试验采用微波辐射法对藏药唐古特乌头干燥全草的生物碱进行提取,用紫外分光光度法测定其含量,通过正交试验设计方法对其提取工艺进行研究,旨在获得唐古特乌头总生

物碱的最佳提取工艺条件,在此基础上建立简单快捷的检测手段,为开发和利用特色药物、提取和分离该种植物的有效成分提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验所用药材于2016年采自青海互助北山林场,经青海民族大学药学院藏药专家毛继组老先生鉴定为毛茛科乌头属植物唐古特乌头 [*Aconitum tanguticu* (Maxmi.) Stapf] 全草;生物碱对照品,由青海民族大学药学院中藏药研究室提供;主要试剂为95%乙醇[分析纯(AR)]、三氯甲烷(AR)、盐酸(AR)、氨水(AR),试验用水为蒸馏水。

### 1.2 仪器设备

752N型紫外-可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);XH-100A微波催化合成/萃取仪(北京祥鸽科技发展有限公司);FZ102微型植物试样粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂);FA2204型电子分析天平(上海安亭电子仪器厂);RE-52A旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-DC(Ⅲ)

收稿日期:2019-04-06

基金项目:教育部春晖计划(编号:2010070)。

作者简介:李钦玲(1962—),女,山西襄汾人,硕士,教授,研究方向为天然有机化学。E-mail:qhmdlql@126.com。

## 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 肖志伟,乐智勇,朱国雪,等. 人参多糖检测方法 & 提取工艺优选[J]. 中国现代中药,2016,18(1):106-109.
- [3] 吴发玲,施小妹,钱 华,等. 人参多糖抗肿瘤作用机制研究新进展[J]. 西北药学杂志,2010,25(5):390-391.
- [4] 戴秀娟,吴 铁,崔 燎. 人参须超微粉提取液对去卵巢大鼠血脂的影响[J]. 中医中药:中西医结合,2010,23(6):157-158.
- [5] 瞿星光,张朝晖,周 刚,等. 人参多糖对创伤脓毒症患者免疫功能 and 细胞因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(23):2866-2868.
- [6] 危建安,程志安,温建炫,等. 人参多糖与人参皂苷诱导大鼠骨髓间充质干细胞造血细胞因子表达的作用比较[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(3):372-375.
- [7] 翟 琨,向东山. 提取条件对竹节人参多糖得率的影响[J]. 湖

- 北农业科学,2008,47(10):1201-1203.
- [8] 元国锋. 湿法粉碎提取人参中有效成分的研究[J]. 光明中医,2011,26(7):1353-1354.
- [9] 吴 琼,代永刚,邹险峰,等. 正交试验优化微波辅助提取人参根茎和人参须多糖[J]. 食品科学,2012,33(24):156-159.
- [10] 张 波,李 然,孙 德,等. 微波法提取人参多糖及纯化的工艺研究[J]. 食品科技,2008,33(8):134-136.
- [11] 任雪峰,吴冬青,王永生,等. 人参多糖超声提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发,2010,31(1):9-11.
- [12] 夏 陈,宋 艳,曹 阳,等. 超声波辅助提取人参渣中多糖的研究[J]. 广东化工,2012,39(1):20-21.
- [13] 黄礼德,郭立强,潘廷啟,等. 正交设计优化土人参多糖的超声提取工艺[J]. 中国酿造,2012,31(3):105-107.
- [14] 葛 岩,郑 飞,李 晶,等. 人参多糖提取的最佳工艺考察[J]. 人参研究,2016,28(5):7-11.
- [15] 宋利华,萧 伟,鹿丽丽,等. 正交试验优选人参多糖的提取工艺[J]. 中草药,2012,43(2):283-287.

循环水式真空泵(巩义市英峪华仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品的处理 取干燥的唐古特乌头全草,去杂质、干燥、粉碎后备用。

1.3.2 样品溶液的制备及检验 准确称取 5.00 g 粉碎后的唐古特乌头,用 75 mL 95% 乙醇浸泡 4 h,再用微波萃取仪提取 3 次,每次 15 min,合并萃取液,用旋转蒸发仪回收乙醇得浸膏。往浸膏内加入 2% HCl 溶液使之充分溶解,减压抽滤,重复操作 2~3 次。合并滤液,用浓氨水调节 pH 值至 6~7,加活性炭脱色,用三氯甲烷萃取 3 次,再将 pH 值调至 ≥12,用三氯甲烷进一步萃取 3 次,合并萃取液,旋蒸回收三氯甲烷,另加三氯甲烷定容至 100 mL,得待测溶液。用显色剂碘化铋钾检测生物碱含量。

1.3.3 样品最大吸收波长的确定 取 1 mL“1.3.2”节中制备好的样品溶液,用三氯甲烷稀释并定容至 25 mL,在 210~450 nm 范围内扫描溶液的紫外吸收光谱,间隔 10 nm 扫描,得最大波长范围为 240~300 nm,然后在此范围内间隔 2 nm 继续扫描,测得该溶液在 268 nm 处有最大吸收峰,因此选择 268 nm 作为检测波长。

1.3.4 唐古特乌头标准溶液的制备和线性关系考察

1.3.4.1 标准溶液的制备 准确称取唐古特乌头生物碱对照品 1.545 mg,加适量三氯甲烷,微热溶解,移入 25 mL 容量瓶中,冷至室温后稀释至刻度处,摇匀,即得浓度为 0.061 8 mg/mL 的标准溶液。

1.3.4.2 标准曲线的绘制 准确量取“1.3.4.1”节的标准溶液 0.1、2.3、4.5、6 mL,分别置于 25 mL 容量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度处,摇匀,静置。以三氯甲烷为空白对照,于 268 nm 波长处测其吸光度(表 1)。以生物碱对照品浓度  $C$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标、吸光度( $D_{268\text{ nm}}$ )为纵坐标绘制标准曲线(图 1),进行线性回归,得回归方程: $D_{268\text{ nm}} = 0.060\ 6C - 0.001\ 1$ , $r^2 = 0.999\ 6$ 。结果表明,生物碱对照品在 2.00~15.00  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系。

表 1 不同浓度生物碱标准溶液的吸光度

处理	标准溶液浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	吸光度( $D_{268\text{ nm}}$ )
1	0.00	0.000
2	2.47	0.146
3	4.94	0.296
4	7.41	0.451
5	9.88	0.601
6	12.36	0.750
7	14.83	0.889

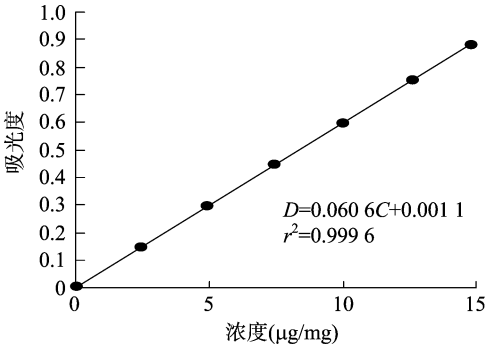


图1 唐古特乌头对照品的标准曲线

1.3.5 生物碱的提取及含量测定

1.3.5.1 生物碱的提取及含量测定方法 准确称取 1.000 g 唐古特乌头药材粉末,用“1.3.2”节的方法进行提取、处理,定容至 50 mL 容量瓶中,待测。准确量取 1.25 mL 待测液,用三氯甲烷定容至 25 mL 容量瓶中,在 268 nm 处测定吸光度,根据回归方程计算出唐古特乌头提取液中的生物碱含量。

1.3.5.2 生物碱提取条件的优化 根据单因素试验结果和对各种因素的考察,以提取物中的总生物碱含量为考察指标,以药材浸泡时间、料液比(质量比)、提取时间、提取温度为考察因素,采用  $L_9(3^4)$  设计进行正交试验,考察其最佳提取条件。试验的因素水平设置见表 2。

表 2 正交试验的因素水平设置

水平	因素			
	A:料液比(g : mL)	B:提取时间(min)	C:提取温度( $^{\circ}\text{C}$ )	D:浸泡时间(h)
1	1 : 5	10	≤25(室温)	2
2	1 : 10	15	40	4
3	1 : 15	20	60	6

2 结果与分析

2.1 唐古特乌头总生物碱最佳提取工艺的确定

2.1.1 直观分析 由表 3 可知,各因素对唐古特乌头中总生物碱提取率的影响大小顺序为  $A > C > B > D$ ,即料液比 > 提取温度 > 提取时间 > 浸泡时间;料液比对提取唐古特乌头中生物碱提取率的影响较大,浸泡时间的影响较小,最佳提取工艺为  $A_3B_2C_2D_1$ ,即当料液比为 1 g : 15 mL、浸泡时间为 2 h、提取温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 15 min 时,提取效果最佳。

2.1.2 方差分析 由表 4 可知,A 因素对提取指标的影响显著( $P < 0.05$ ),与直观分析结果一致。

2.2 最佳提取工艺条件的验证

为了考察和验证最佳提取工艺条件的稳定性和试验结

果,在料液比为 1 g : 15 mL、浸泡时间为 2 h、提取温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间为 15 min 的条件下,进行 3 组平行试验。由表 5 可以看出,3 次试验结果指标均高于正交试验中的任何 1 组,藏药唐古特乌头中总生物碱含量为 1.014%,相对标准偏差为 0.74%,说明筛选的最佳工艺条件稳定可靠。

3 结论

微波辅助萃取(microwave assisted extraction,简称 MAE)是利用介质在微波作用下高速运动产生的热效应<sup>[11]</sup>,使细胞壁破裂,从而使得胞外溶剂易于进入细胞内,溶解并释放胞内产物,具有强力、瞬时、高效、耗时短等特点<sup>[12]</sup>。本试验采用微波辐射法提取唐古特乌头中的生物碱,大大缩短了提取时间和溶剂用量,以紫外分光光度法测定其含量,并通过正交试

表3 正交试验分析结果

处理	A:料液比 (g : mL)	B:提取时间 (min)	C:提取温度 (℃)	D:浸泡时间 (h)	总生物碱提取率 (%)
1	1 : 5	10	≤25	2	0.479
2	1 : 5	15	40	4	0.566
3	1 : 5	20	60	6	0.510
4	1 : 10	10	60	6	0.682
5	1 : 10	15	40	2	0.721
6	1 : 10	20	≤25	4	0.626
7	1 : 15	10	60	4	0.765
8	1 : 15	15	≤25	6	0.911
9	1 : 15	20	40	2	0.981
均值 1	0.518	0.642	0.672	0.727	
均值 2	0.676	0.733	0.756	0.652	
均值 3	0.886	0.706	0.652	0.701	
极差	0.368	0.091	0.104	0.075	

表 4 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度 $df$	$F$ 值	$F$ 临界值	显著性
A( 料液比)	0.203	2	5.441	4.460	$P < 0.05$
B( 提取时间)	0.013	2	0.220	4.460	
C( 提取温度)	0.011	2	0.186	4.460	
D( 浸泡时间)	0.009	2	0.153	4.460	
误差	0.240	8			

表5 优选工艺试验结果

处理	$D_{268\text{ nm}}$	提取率 (%)	平均值	相对标准偏差 $RSD(\%)$
1	0.618	1.022	1.014	0.74
2	0.609	1.007	1.014	0.74
3	0.613	1.013	1.014	0.74

试验设计确定了藏药唐古特乌头中生物碱的最佳提取工艺条件。试验结果表明,料液比为 1 g : 15 mL、浸泡时间为 2 h、提取时间为 15 min、提取温度为 40 ℃ 时,总生物碱提取率可达 1.014%,具有较高的提取效率。本研究方用时长、效率高、稳定性好,为唐古特乌头中总生物碱的进一步应用和开发提供了一定的参考和科学依据。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005;附录 24.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001;307.

- [3] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997: 65-66.
- [4] 王海垣, 蒋山好, 杨培明, 等. 甘青乌头的生物碱[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 13-15.
- [5] 肖培根, 王锋鹏, 高峰. 中国乌头属植物药用亲缘学研究[J]. 植物分类学报, 2006, 44(1): 1-46.
- [6] 林玲, 陈东林. 毛果甘青乌头中生物碱成分的提取和鉴定[J]. 四川生理科学杂志, 2009, 31(2): 69-72.
- [7] 曾锐, 侯新莲, 高宇明. 榜嘎总碱对关节炎模型大鼠炎症因子表达的影响[J]. 中国中医急症, 2009, 18(3): 427-428.
- [8] 瞿燕. 藏药榜嘎总生物碱的抗炎实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2412-2413.
- [9] 张春江, 李薇, 孙振鹏, 等. 藏药甘青乌头抗单纯疱疹病毒Ⅱ型体内外作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(1): 26-31.
- [10] 哈文秀, 利毛才让. 超声法提取藏药唐古特乌头中多糖的研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(7): 63-65.
- [11] 谢正礼, 徐世荣, 吴云鹏. 微波辅助萃取技术及其在中草药研究中的应用[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1326-1329.
- [12] 刘婷婷, 鄯颖佳, 段更利, 等. 离子液体-微波辅助提取钩藤中生物碱的工艺研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(6): 482-486.

(上接第 253 页)

- 氧化的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 35-38.
- [29] 蒲健, 郭文萍, 赵榕. 肉食品中脂类氧化的测定方法综述[J]. 肉类研究, 1999(2): 43-45.
- [30] 李成梁, 靳国锋, 马素敏, 等. 辐照对肉品品质影响及控制研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 271-278.
- [31] 哈益明, 王锋, 李淑荣, 等. 辐照处理对冷却肉脂肪氧化影响的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 303-306.
- [32] Xiao S, Zhang W G, Lee E J, et al. Effects of diet, packaging and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation of raw broiler thigh

- meat[J]. Poultry Science, 2011, 90(6):1348-1357.
- [33] 杨萍, 冯敏, 严建民, 等. 辐照杀菌对猪肉脯品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12):287-289.
- [34] 汪昌保, 赵永富, 王志东, 等.  $\gamma$ 射线与电子束辐照肉制品的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6):425-427.
- [35] 韩晶, 李开雄, 李丽华. 食品辐照技术的特性及在肉制品中的应用研究[J]. 肉类研究, 2009, 23(1):57-62.
- [36] Nam K C, Du M, Jo C, et al. Cholesterol oxidation products in irradiated raw meat with different packaging and storage time[J]. Meat Science, 2001, 58(4):431-435.