

- 31(4): 615-619.
- [17] 韩荣荣,白云娥,陈益,等. 非支配排序遗传算法多目标优化金莲花水提工艺的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2082-2086.
- [18] 韩荣荣. 基于遗传算法的BP神经网络在多目标药物优化分析中的应用[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
- [19] 王晓美,刘春艳,吴小娟,等. 基于多目标遗传算法优化刺五加根提取工艺的研究[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(7): 825-828.
- [20] 郝云云,吴巧凤. 基于遗传算法的香薷总黄酮提取工艺优化[J]. 中国中医药科技, 2013, 20(2): 157-159.
- [21] 刘鑫,宓嘉琪,吴巧凤. 基于遗传算法优化黄连中盐酸小檗碱的提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3645-3648.
- [22] 朱文瑞,吴巧凤,宓嘉琪,等. 基于遗传算法的土香薷总黄酮提取工艺优化研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(10): 1207-1211.
- [23] 徐洲,李旭,郭军伟,等. 响应面优化超声辅助醇碱法提取厚朴总酚的工艺条件[J]. 四川农业大学学报, 2013, 31(1): 93-98.

浙贝母花总生物碱微波提取工艺的优化

陈 焯, 赵永钦, 梅紫薇, 胡锦涛, 王秀敏, 石森林*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 优化浙贝母花总生物碱微波提取工艺。方法 在单因素试验基础上,以提取温度、乙醇体积分数、料液比为影响因素,总生物碱含有量和转移率为评价指标,正交试验优化提取工艺。结果 最佳条件为提取温度 70 ℃,提取时间 25 min,乙醇体积分数 80%,料液比 1:40,总生物碱含有量 5.583 mg/g,转移率 98.46%。结论 该方法快速节能,稳定高效,可用于微波提取浙贝母花总生物碱。

关键词: 浙贝母;花;总生物碱;微波提取;正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1074-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.013

Microwave extraction optimization for total alkaloids from *Fritillaria thunbergii* flowers

CHEN Ye, ZHAO Yong-qin, MEI Zi-wei, HU Jin-xiang, WANG Xiu-min, SHI Sen-lin*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

KEY WORDS: *Fritillaria thunbergii* Miq.; flowers; total alkaloids; microwave extraction; orthogonal test

浙贝母花为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 干燥带梢的花^[1],在浙江鄞州、磐安、东阳等地均有产收。该药材药用部位长期为鳞茎,主要成分为甾体类生物碱,其中又以贝母素甲和贝母素乙为主,现代研究表明,浙贝母生物碱具有抗炎、止咳、平喘、化痰等作用^[2]。在浙贝母培育过程中,一般为了增加地下鳞茎产量,在每年3~4月花期时进行打顶,但由此导致大量浙贝母花被当做废物丢弃,既造成了资源浪费,也加大了环境压力。

最新研究表明,浙贝母花中含有生物碱^[3]、氨基酸^[4]、皂苷^[5]、生育酚^[6]等活性成分,陈文君等^[3]对浙贝母鳞茎及花中的主要活性成分总碱及皂苷含有量进行对比,发现后者生物碱含有量是前者的53.4%,皂苷含有量是前者的3倍;闵会等^[6]测定来自不同地区的14批浙贝母花中贝母素甲、贝母素乙的含有量,发现两者含有量与鳞茎中相似^[7],具有与鳞茎相似的活性,因此,对该资源作进一步开发利用具有重大意义。本实验将通过正交试验优化浙贝母花生物碱微波提取工艺,为其

收稿日期: 2017-10-23

作者简介: 陈焯(1993—),男,硕士生。Tel: 18858162262, E-mail: 531489353@qq.com

*通信作者: 石森林(1971—),男,博士,教授,从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 13157106148, E-mail: pjstone@163.com

进一步利用提供一定参考。

1 仪器与试剂

UV-Vis 2450 型紫外-可见分光光度仪 (日本岛津公司); MAS-II plus 型常压微波提取器 (上海新仪微波化学科技有限公司); XS105 DualRange 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); DFY-500 型高速万能粉碎机 (温岭市林大机械有限公司); JA2003N 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。浙贝母花采自东阳, 批号 20170319, 经专家鉴定为正品。贝母甲素对照品 (含有量 98.70%, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 MUST-17021101)。乙醇、甲醇、氯仿等试剂均为分析纯 (成都科龙化工试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 总生物碱含量测定

2.1.1 检测波长选择 精密移取对照品、供试品溶液各 2 mL, 于 200 ~ 600 nm 波长处进行扫描, 发现分别在 410、412 nm 处有最大吸收, 故确定检测波长为 412 nm。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取贝母素甲对照品约 5 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 (0.206 8 mg/mL)。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取药材粉末约 2 g (过 60 目筛), 4 mL 25% 氨水润湿 1 h, 加氯仿-甲醇 (4:1) 40 mL, 称定质量, 80 °C 水浴提取 2 h, 放冷, 溶剂补足减失的质量, 过滤, 精密吸取上清液 5 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0、1.5、3、4.5、6、7.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 各取 2 mL 置于分液漏斗中, 加入 pH 4.5 的邻苯二甲酸氢钾缓冲液 5 mL、溴甲酚绿溶液 2 mL、氯仿 10 mL, 充分混匀, 静置 40 min 后分取氯仿液, 置于含有 0.4 g 无水硫酸钠的容器中, 随行试剂作为空白, 在 412 nm 波长处测定吸光度。以贝母素甲质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行线性回归, 得回归方程为 $A = 5.296 6X + 0.017 7$ ($r = 0.999 9$), 在 31.02 ~ 155.10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密移取对照品溶液 2 mL, 按“2.1.4”项下方法测定吸光度, 测得其 RSD 为 0.10%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 精密移取 2 mL, 按“2.1.4”项下方法于 0、15、30、45、

60、75 min 测定吸光度, 测得其 RSD 为 0.36%, 表明溶液在 75 min 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取药材粉末 6 份, 每份约 1.5 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.4”项下方法测定吸光度, 测得总生物碱含量 RSD 为 1.82%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 称取 6 份药材粉末, 每份约 0.5 g, 加入适量对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.4”项下方法测定吸光度, 计算回收率, 测得平均加样回收率为 102.66%, RSD 为 2.82%。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取温度 称取药材粉末 15 份, 均分成 5 组, 每组 3 份, 每份 1 g, 加入 30 倍量 70% 乙醇, 于 40、50、60、70、80 °C 微波提取 25 min, 提取液过滤, 精密移取 5 mL 置于蒸发皿中, 水浴挥干, 残渣用甲醇定容至 10 mL, 按“2.1.4”项下方法测定吸光度, 结果见图 1。由图可知, 随着提取温度升高总生物碱提取率也相应增加, 但在 60 °C 时略有降低, 在 70 °C 时达到最高, 故选择 70 °C 进行后续试验。

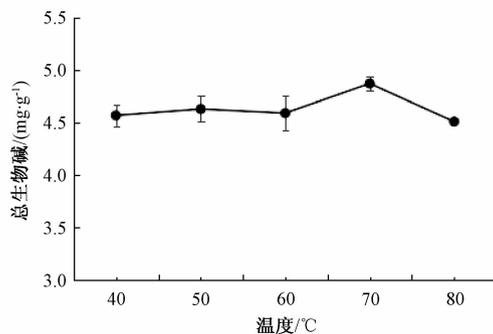


图 1 提取温度对总生物碱提取的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on total alkaloids extraction

2.2.2 提取时间 称取药材粉末 12 份, 均分成 4 组, 每组 3 份, 每份 1 g, 加入 30 倍量 70% 乙醇, 于 70 °C 微波提取 15、20、25、30 min, 提取液过滤, 精密移取 5 mL 置于蒸发皿中, 水浴挥干, 残渣用甲醇定容至 10 mL, 按“2.1.4”项下方法测定吸光度, 结果见图 2。由图可知, 提取时间为 25 min 时, 总生物碱提取率相对较高, 但该时间前后变化不显著, 故确定 25 min, 不再进行后续试验。

2.2.3 乙醇体积分数 称取药材粉末 12 份, 均分成 4 组, 每组 3 份, 每份 1 g, 加入 30 倍量 50%、

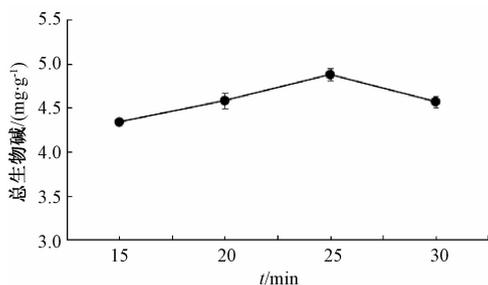


图2 提取时间对总生物碱提取的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on total alkaloids extraction

60%、70%、80%乙醇，于70℃微波提取25 min，提取液过滤，精密移取5 mL置于蒸发皿中，水浴挥干，残渣用甲醇定容至10 mL，按“2.1.4”项下方法测定吸光度，结果见图3。由图可知，乙醇体积分数为80%时，总生物碱提取率最高，故选择80%乙醇进行后续试验。

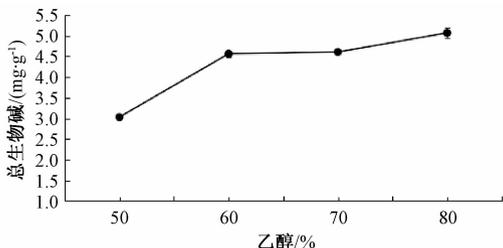


图3 乙醇体积分数对总生物碱提取的影响

Fig. 3 Effect of ethanol concentration on total alkaloids extraction

2.2.4 料液比 称取药材粉末12份，均分成4组，每组3份，每份1 g，加入20、30、40、50倍量80%乙醇，于70℃微波提取25 min，提取液过滤，精密移取5 mL置于蒸发皿中，水浴挥干，残渣用甲醇定容至10 mL，按“2.1.4”项下方法测定吸光度，结果见图4。由图可知，当料液比为1:50时，总生物碱提取率最高，但考虑到成本问题，最终选择1:40进行后续试验。

2.3 正交试验 选择提取温度(A)、乙醇体积分数(B)、料液比(C)作为影响因素，总生物碱含有量和转移率为评价指标(Y)，采用L₉(3⁴)正交设计表优化，因素水平见表1。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取温度/℃	B 乙醇/%	C 料液比
1	50	60	1:30
2	60	70	1:40
3	70	80	1:50

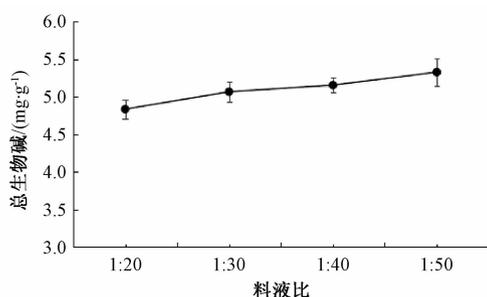


图4 料液比对总生物碱提取的影响

Fig. 4 Effect of solid-liquid ratio on total alkaloids extraction

取药材1 g，按表1安排试验，按“2.1.4”项下方法测定总生物碱含有量，并计算转移率(提取物中总生物碱含有量/原药材中总生物碱含有量×100%)。结果见表2，方差分析见表3。

表2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	因素				总生物碱/ (mg·g ⁻¹)	转移率/ %
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	4.260	75.132
2	1	2	2	2	4.872	85.918
3	1	3	3	3	5.201	91.730
4	2	1	2	3	4.525	79.814
5	2	2	3	1	5.123	90.347
6	2	3	1	2	5.211	91.905
7	3	1	3	2	4.688	82.684
8	3	2	1	3	5.264	92.832
9	3	3	2	1	5.585	98.509
K ₁	4.778	4.491	4.912	4.989		
K ₂	4.953	5.086	4.994	4.924		
K ₃	5.179	5.332	5.004	4.997		
R	0.401	0.841	0.092	0.073		

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F比	F临界值	P值
A	0.243	2	24.3	19	<0.05
B	1.123	2	112.3	19	<0.01
C	0.015	2	1.5	19	>0.05
D(误差)	0.01	2	—	—	—

注: F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00

由表3可知，提取温度(A)和乙醇体积分数(B)对总生物碱提取率有显著性影响(P < 0.05, P < 0.01)，而料液比无显著性影响(P > 0.05)。最终确定，最优提取工艺为A₃B₃C₂，即40倍量80%乙醇70℃下微波提取25 min。

2.4 验证试验 称取药材3份，每份4 g，按照最优工艺进行提取，平行3次，结果见表4，可知该工艺稳定可行。

表 4 验证试验结果 (n=3)

Tab. 4 Results of verification tests (n=3)

试验号	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	转移率/%
1	5.550	97.889
2	5.656	99.744
3	5.543	97.757
平均值	5.583	98.463

3 讨论

微波提取主要是利用不同组分吸收微波能力的差异,使机体物质某些区域或提取体系某些组分被选择性加热,被提取物质从机体或体系中分离进入到介电常数较小、微波吸收能力较差的提取溶剂中,从而获得较高提取率^[8]。该方法是里外同时加热,热量可以在短时间内穿透浙贝母花细胞内部,使提取时间大大缩短,提取质量明显提高,并能有效保护药材在提取过程中的功能性成分,与水浴回流提取相比,具有效率更高、提取更充分、提取次数更少、使用更方便等特点。

目前,相关研究基本都集中在贝母总生物碱提取^[9],而鲜有关于浙贝母花总生物碱提取工艺的报道,前期有通过水浴回流提取该成分^[10],但存在耗时长、提取不充分、成分含有量低等问题。本实验以浙贝母花总生物碱含有量和转移率为评价指标优化其微波提取工艺,研究表明^[11],贝母素甲含有量会随着乙醇体积分数的升高而升高,而贝母素乙恰好相反,但综合考虑到成本等问题,最终选择80%乙醇。实验结果显示,该工艺下浙贝母花总生物碱提取率较高,但也存在纯度较低的问题,今后将对调节pH、萃取、大孔树脂纯化等步骤作

进一步优化以提高其浸膏纯度。

参考文献:

- [1] 张贵君. 现代中药材商品通鉴[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 1451.
- [2] 卓诗勤, 张 浩, 丁弋娜, 等. 硫熏和鲜切浙贝母的化学成分及其药理作用的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(3): 618-621.
- [3] 陈文君, 郑卫红, 项颖华. 浙贝母花、地上茎与鳞茎总生物碱、总皂苷含量测定的比较[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(4): 530-531.
- [4] 闫精杨, 刘 培, 江 曙, 等. 浙贝母花期地上部分核苷类、氨基酸类及无机元素类成分分析与评价[J]. 中国现代中药, 2016, 18(8): 967-973.
- [5] 蒋欣杭, 梁君玲, 李建伟, 等. 浙贝母花及花粉中8种E族维生素的高效液相色谱-荧光分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8319-8321.
- [6] 闵 会, 吴 健, 楼芳芳, 等. HPLC测定浙贝母花中的贝母素甲和贝母素乙[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(3): 307-309.
- [7] 姜 艳, 李 萍. HPLC-ELSD测定浙贝母中贝母素甲、贝母素乙的含量[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(16): 1257-1259.
- [8] 叶陈丽, 贺 帅, 曹伟灵, 等. 中药提取分离新技术的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(3): 457-464.
- [9] 董 洁, 朱会敏, 胡凯文, 等. 浙贝母总生物碱提取分离工艺研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(2): 140-143.
- [10] 牛 犇, 陈 瑶, 杨性民, 等. 响应面法优化贝母花中生物碱的提取[J]. 药物生物技术, 2015, 22(3): 237-242.
- [11] 崔文霞. 超临界提取浙贝母生物碱的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.