

博落回中生物碱的超声提取和分离

王 欣¹,周 乐^{1*},季春燕¹,刘拉平²

(1. 西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学测试中心,陕西杨凌 712100)

摘 要: 运用超声波辅助提取技术,通过 $L_9(3)^4$ 正交试验考察了乙醇浓度(A)、液固比(B)和超声时间(C)3个因素对博落回生物碱提取的影响,同时还研究了D101大孔树脂对粗提液中生物碱的吸附和分离效果。结果表明最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3$,即用9倍量的90%的乙醇超声提取45 min。D101大孔树脂能从博落回的pH2~3的盐酸提取液中以游离碱形式全部吸附其生物碱,分别采用50%乙醇和丙酮洗脱能有效地将极性和弱极性生物碱分离开来。

关键词: 博落回; 超声提取; 生物碱; D101大孔树脂; 正交试验

中图分类号: Q946.88

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2005)05-0118-03

Ultrasonic Extraction and Separation of Alkaloids from *Macleaya cordata*

WANG Xin¹, ZHOU Le^{1*}, JI Chun-yan¹ and LIU La-ping²

(1. College of Life Science; 2. Test center, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of alcohol concentration, liquid-solid ratio and ultrasonic times on the extraction yields of alkaloids from *Macleaya cordata* were studied by means of $L_9(3)^4$ orthogonal test, and the effects of adsorption and separation of alkaloids in extract with macroporous resins D101 were investigated in the present paper. It was found that the optimal extraction conditions were $A_3B_1C_3$, i. e. 9 times amount of 90% ethanol for ultrasonic extracting 45 minutes, that all alkaloids in the hydrochloric acid solution of pH2~3 were abstracted in the form of free base, and that the polar alkaloids and weak polar alkaloids were separated efficiently by means of 50% ethanol elution and acetone respectively.

Key words: *Macleaya cordata* (willd.) R. Br; Ultrasonic extraction; Alkaloid; Macroporous resins D101; Orthogonal test

博落回 *Macleaya cordata* (willd.) R. Br 为罂粟科多年生草本植物,其全草可作药用。临床上主要用于治疗指疗、脓肿以及一些恶疮及皮肤病等^[1]。博落回的全草中富含10余种苜蓿基异喹啉类生物碱,如血根碱(Sanguinaine)、白屈菜红碱(Chelerythrine)、原阿片碱(Protopine)、别隐品碱(Allocryptopine)等^[2~5]。博落回总碱具有杀菌、杀虫、抗肿瘤等多种药理作用^[6,7],其硫酸盐已被开发成兽用注射液并应用于临床。根据各生物碱

的溶解性不同,博落回生物碱可分为极性生物碱和弱极性生物碱两类。将两类生物碱有效地提取出来并分离开已成为博落回生物碱研究和开发的重要内容之一。超声波辅助提取技术因其具有显著的高效性而越来越受到天然产物化学工作者的重视和青睐,大孔吸附树脂则因其具有适用面广,使用方便和可重复使用的优点而在天然产物的分离方面受到人们的偏爱,目前关于博落回生物碱的超声提取及大孔树脂分离的研究尚少见报道。

收稿日期:2005-05-27 修回日期:2005-07-01

作者简介:王 欣(1979—),女,河北石家庄人,在读硕士研究生,主要从事生物化学方面的研究。

* 通讯作者:周乐, E-mail: betterzl@163.com

本文主要研究了超声波辅助提取博落回总生物碱的工艺及大孔树脂对总生物碱的分离效果,以期为博落回生物碱的规模化提取和分离提供一定的理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、仪器和试剂

博落回全草干粉,2004 年 6 月采自陕西杨凌渭河滩,自然通风晾干后粉碎。西北农林科技大学苗芳博士鉴定为 *Macleaya cordata* (willd.) R. Br。

隆达 HF-100B 型超声循环提取机(北京弘祥隆生物技术开发有限公司),RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),玻璃层析柱:Φ2×45 cm,TLC 板为自制板(硅胶 GF₂₅₄,0.5%CMC 为粘合剂,9 cm×9 cm 玻璃板,自然晾干)。

蒸馏水,无水乙醇,丙酮,氯仿,甲醇,石油醚和乙酸乙酯等均为分析纯,D101 型大孔树脂(南开大学)。

1.2 试验方法

1.2.1 超声波辅助提取总生物碱的正交试验
因素及水平设置根据博落回中生物碱的种类和溶解性的特点,选择乙醇浓度、液固比、超声时间为

考察因素,提取温度均为 30℃,以总生物碱提取率为评价指标,三因素的水平设置见表 1。

正交提取试验:依据 L₉(3)⁴ 正交试验表进行正交提取试验(取正交表前三列)。在所有超声试验中均采用间歇式超声方式进行,每次超声时间为 2 s,两次超声之间的时间间隔 0.5 s,超声功率 1600 W,提取温度为 30℃。

称取博落回粉 27 份,每份 40 g。按照表 1 进行试验,每份样品提取 1 次,每个处理重复 3 次。提取结束后,抽滤,残渣用少量提取液洗涤,合并滤液和洗涤液并进行减压浓缩,所得浸膏供总生物碱分离使用。

1.2.2 总生物碱的分离及提取率的计算
向每个试验所得的浸膏中分别加入 80 mL 蒸馏水,然后分别用 3.7%(V/V)盐酸调 pH 至 2~3,静置过夜,抽滤,所得滤液直接流经处理好的 D101 型大孔树脂,流速控制在 1 BV/h。上样完毕后先用蒸馏水洗脱至流出液 pH 为中性,然后依次换用 200 mL 50%(V/V)乙醇和 100 mL 丙酮洗脱,流速控制在 2 BV/h。分别收集乙醇洗脱液和丙酮洗脱液并减压蒸除溶剂,分别得生物碱的乙醇洗脱物(S-1)和丙酮洗脱物(S-2),二者之和为总生物碱(S)。生物碱的提取率按照下式计算:生物碱提取率% = 生物碱量(g)/原材料量(g)×100

表 1 正交试验表及试验结果

Table 1 Orthogonal test design and experiment results

序号 Test number	因素 Factors			S 得率% Received yield of S	S-1 得率% Received yield of S-1	S-2 得率% Received yield of S-2
	A(乙醇浓度/%) Alcohol con.	B(液固比/mL·g ⁻¹) Liquid-solid ratio	C(超声时间/min) Ultrasonic times			
1	1(70)	1(9)	1(15)	1.78	1.31	0.47
2	1	2(10)	2(30)	2.11	1.60	0.51
3	1	3(11)	3(45)	2.51	2.27	0.24
4	2(80)	1	2	2.13	1.70	0.43
5	2	2	3	2.18	1.78	0.40
6	2	3	1	1.75	1.37	0.38
7	3(90)	1	3	2.65	1.77	0.88
8	3	2	1	1.77	1.26	0.51
9	3	3	2	2.40	1.65	0.75
	S			S-1		S-2
K ₁	6.40	6.56	5.30	5.18	4.77	3.94
K ₂	6.06	6.06	6.64	4.84	4.64	4.95
K ₃	6.82	6.66	7.34	4.68	5.29	5.82
R	0.76	0.60	2.04	0.50	0.64	1.88

1.1.3 正交试验分析
对正交试验结果分别采用极差分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 极差分析

极差分析结果见表 1。从表 1 中的 R 值大小可以看出,3 种因素对总生物碱(S)的影响为:C>A>B。3 种因素的 K 值显示各因素不同水平的影响

程度为 $A_3>A_1>A_2$, $B_3>B_1>B_2$, $C_3>C_2>C_1$,即最佳的提取条件为: $A_3B_3C_3$;3种因素对S-1的影响为: $C>B>A$,最佳提取条件为 $A_1B_3C_3$;3种因素对S-2的影响为: $A>B>C$,最佳提取条件为 $A_3B_1C_2$ 。上述结果说明提高乙醇浓度,增大液固比和延长提取时间有助于提高总碱和生物碱S-2的提取率,但高醇浓度却不利于生物碱S-1的提取。其原因可能是50%乙醇洗脱物(S-1)主要是极性生物碱(见2.3),高浓度乙醇不利于该类成分的溶解,相反,丙酮洗脱物(S-2)则主要是弱极性生物碱(见2.3),因而在高浓度乙醇中溶解度提高。

2.2 方差分析结果

表2显示,超声提取时间(C)呈极显著差异($P<0.01$),乙醇浓度(A)呈显著差异($P<0.05$),液固比(B)差异不显著($P>0.05$)。这与极差分析的结果一致,说明因素A、C为影响总生物碱提取率的主要因素,尤其是提取时间。基于这一结果,同时考虑到经济因素,认为亦可选择 $A_3B_1C_3$ 作为合适的提取条件。为此,笔者比较了 $A_3B_3C_3$ 和 $A_3B_1C_3$ 两个提取工艺(每个工艺重复2次)并对试验结果进行t检验。结果表明2个工艺对总生物碱的平均提取率分别为2.69%和2.71%,二者之间差异不显著($t=2.20$, $P=0.2716>0.05$)。本着经济实用的原则确定 $A_3B_1C_3$ 为最佳提取工艺,即用样品9倍量的90%的乙醇超声提取45 min。

表2 方差分析

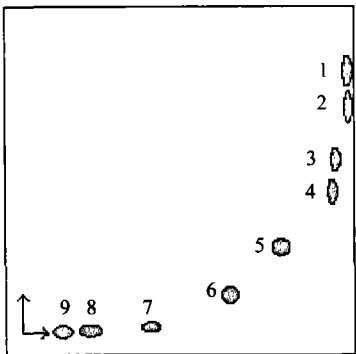
Table 2 Variance analysis

变异来源 Source	DF	SS	MS	F	F _α
A	2	0.096622	0.048311	24.84	F _{0.05} =19.00
B	2	0.068889	0.034444	17.71	F _{0.01} =99.00
C	2	0.716356	0.358178	184.20	
误差 Error	2	0.003889	0.001945		

2.3 总生物碱的分离效果

采用方形硅胶板对博落回乙醇提取液、大孔树脂50%(V/V)乙醇洗脱物S-1和丙酮洗脱物S-2分别进行双向薄层层析,它们纵向和横向展开剂均相同,以便于比较。图1为博落回乙醇提取液的薄层色谱图,其中S-1双向薄层层析板上含有3个点,即图1上的斑点7~9。S-2双向薄层层析板上含有6个点,即图1上斑点1~6。由此可见,D101大孔吸附树脂可以较好的将极性生物碱和弱极性生物碱分离开。结合表1的试验结果,可以确定博落回中的极性生物碱的含量高于弱极性生

物碱,但弱极性生物碱的种类却多于极性生物碱。



纵向展开剂:石油醚-乙酸乙酯(11:3),横向展开剂为氯仿-甲醇(13:1);显色剂:碘化铋钾
y-axis developing solvent: petroleum ether-ethylacetate(11:3),x-axis developing solvent:chloroform-methanol(13:1);developing agent: potassium bismuth iodide

图1 博落回乙醇提取的双向TLC图
Fig.1 Double dimensions TLC of ethanol extract of *Macleaya cordata*

3 讨论

3.1 超声波辅助提取技术已越来越广泛地应用于天然化学成分提取之中,但是对于不同的材料和不同的目的物来说,超声提取的最佳条件常常不同。影响超声提取的因素主要有超声波频率、超声时间、超声波强度、提取温度、料液比、材料的细度等。本研究结果(表1)显示,博落回中存在两类极性差异较大的生物碱,提取溶剂乙醇浓度的变化对两类生物碱的提取率的影响是相反的,即高醇有助于弱极性生物碱S-2的提出,但不利于极性较大的生物碱S-1的提出。对此,可以采用延长提取时间的办法来有效补偿高醇对S-1提取的不良影响($R=1.88$)。

3.2 博落回中的血根碱和白屈菜红碱等季铵盐在碱性条件下不稳定易变为叔胺碱^[8],因此一般酸提碱沉并结合有机溶剂萃取的方法不适宜于博落回生物碱的提取。本研究首次采用将酸提液直接上D101大孔树脂的方法可有效地解决碱化处理对血根碱和白屈菜红碱等季铵盐的破坏,同时还能非常满意地将S-1和S-2两类生物碱分离开来。生物碱在酸水上样液中是以离子状态存在的,但是本试验发现流经D101柱子后则以游离态形式被完全吸附于树脂上。其根据有三,首先是上样

(下转第124页)

的分布包括延伸及东南亚的亚洲大部分地区,远东秆野螟 *O. orientalis* Mutuura & Munroe 及豆秆野螟 *O. scapularis* (Walker) 分布范围仅限于亚洲的最东部。而关于该属其余种类在世界范围的分布情况,缺乏系统资料,有必要对其做进一步的调查研究。

3.4 秆野螟属昆虫因外部形态及雌雄外生殖器特征极其相似、种间关系复杂、地理分布相互交叉、亚种分化等原因,分类研究中单从外部形态、内部解剖构造及生物学等方法区分该属昆虫近缘种较为困难,经常难于区分甚至误鉴。我国对于该属昆虫的研究由于认识不足和资料有限,长期将研究的重点放在与农业生产有密切关系的少数种类上,对于该属其它种类的研究和记述只有零星报道,几乎没有系统的分类研究。因此对于该属昆虫在我国的种类、寄主、地理分布基础调查资料,尚需做进一步的研究,建立秆野螟属的数据库,丰富世界秆野螟属昆虫区系,并为防治该类钻蛀性害虫提供准确的种类鉴定和生物学特性资料,为我国农业生产和生物多样性研究服务。

参考文献:

- [1] Akira Mutuura, Eugene Munroe. Taxonomy and distribution of the European corn borer and allied species; Genus *Ostrinia* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Memoirs of Entomological Society of Canada*, 1970, 71: 1~55.
- [2] Ohno, Suguru. A new knotweed-boring species of the genus *Ostrinia* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) from Japan [J]. *Entomological Science*, 2003, 6(2): 77~83.
- [3] 王平远.《中国经济昆虫志》(第二十一册) 鳞翅目: 螟蛾科 [M]. 北京: 科学出版社, 1980, 201~205.
- [4] 全国玉米螟综合防治研究协作组. 我国玉米螟优势种的研究 [J]. *植物保护学报*, 1988, 15(3): 145~151.
- [5] 姜仲雪, 罗梅浩, 田娟, 等. 河南郑州、许昌两地区秆野螟属 (Genus *Ostrinia*) 的近缘种研究 [J]. *河南农业大学学报*, 1990, 24(3): 293~300.
- [6] 李文德, 唐德智. 克什米尔玉米螟-中国新记录 [J]. *昆虫分类学报*, 1985, 7(1): 24.
- [7] 李伟华, 高芬. 秆野螟属 (*Ostrinia*) 中国已知种的识别 [J]. *植物保护*, 1996, 22(4): 40~41.
- [8] 卢美榕, 杨本立, 罗佑珍, 等. 亚洲玉米螟一近缘种云南新记录 [J]. *云南农业大学学报*, 1992, 7(1): 43~45.
- [9] 中国科学院《中国自然地理》编委会. 中国自然地理——动物地理 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [10] Yukio Ishikawa, Takuma Takanashi, Choong-gon kim, et al. *Ostrinia* spp. in Japan: their host plants and sex pheromones [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999, 91: 237~244.

(上接第 120 页)

液的柱流出液中经试管法和 TLC 法检测证明不存在生物碱。其次醇洗液和丙酮洗液均呈现比较明显的碱性。其三是 TLC 证明醇洗脱物和丙酮洗脱物中的生物碱与中性乙醇粗提液中的相应生物碱均有完全相同的 R_f 值。这种现象可能是由于所含生物碱的碱性较弱, 其盐酸盐为强酸弱碱盐, 在溶液中存在电离平衡, 由于大孔树脂对游离碱的吸附力远大于对生物碱盐的吸附力, 致使平衡不断地向电离方向移动, 直至吸附完全。这一结果表明非极性大孔树脂能够从酸水中有效地吸附弱碱性生物碱, 这将为弱碱性生物碱的脱盐或非碱性条件下游离出弱碱性生物碱提供一种有效的方法。

参考文献:

- [1] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 商务印书馆, 1955. 4744.
- [2] 郭小庄. 有毒中草药大辞典 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992. 541.
- [3] 曾建国, 张胜, 侯团章, 等. 不同生长期博落回果实中血根碱与白屈菜红碱的含量 [J]. *中药材*, 1999, 22(5): 229.
- [4] Takao N, Yasumoto, Iwaso K. Studies on the alkaloids of papaveraceous plants. XV. On the alkaloids of *Bocconia cordata* [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1973, 93(2): 242~244.
- [5] 胡之璧, 徐垠, 冯胜初, 等. 博落回果实中有效成分的研究 [J]. *药学报*, 1979, 14(9): 525~540.
- [6] 张昌纯. 白屈菜药理及临床研究进展 [J]. *中药材*, 1987, (5): 46.
- [7] 张胜菊, 柯治国, 南玉生. 博落回抽提物对黄守瓜、菜青虫的田间药效评价 [J]. *华中农业大学学报*, 2003, 22(5): 450~451.