

洋金花种子中总生物碱提取工艺的研究

韩晓琳,张旭,谭勇,田丽萍,王恒
(石河子大学药学院,新疆石河子 832002)

摘要:为了建立洋金花种子中总生物碱的最佳提取工艺。比较冷浸法、超声法、回流法和索氏提取法的提取率;以乙醇浓度、提取时间、提取次数、料液比及 pH 为参数进行 L16 (4^5) 正交试验;使用紫外分光光度法测定总生物碱及阿托品的含量。结果表明:回流法提取率最高;最佳提取工艺为无水乙醇回流提取 2 次,每次 3 h,固液比 1:25, pH 为 5。乙醇浓度、固液比对生物碱的提取有显著影响;优选得到的提取工艺简单易行,稳定性良好。

关键词:洋金花种子;生物碱;提取工艺;正交试验

中图分类号:S567.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)04-0104-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.04.0104

洋金花为茄科(Solanaceae)植物白花曼陀罗(*Datura metel* L.)的干燥花^[1],又名闹洋花、风茄花和白花曼陀罗等。具有平喘止咳,解痉定痛的功效^[2]。现代研究多以其花为药用,因需求量的增加及产量的下降,对扩大药源,提高产量,研究洋金花其它部位的药用价值显得尤为重要^[3]。洋金花种子是众多维吾尔中草药中的一种,维吾尔药物名衣提·洋克·欧如合,别名节维子·马斯力^[4-5]。药性四级干寒,味辛苦,有毒。具有生干生寒、安神镇痛、固涩壮阳、催眠抗炎等功能。洋金花种子中主要有效成分为生物碱类,占 0.2%~0.5%,其中东莨菪碱含量最高,其次为阿托品及莨菪碱^[6-9]。检索国内外相关数据库,对洋金花种子总生物碱提取工艺的研究少之又少,对新疆地产洋金花种子的提取工艺研究尚未见报道。

本试验选择新疆地产洋金花种子为研究对象,以洋金花总生物碱为指标^[10-11],阿托品为含测标准物质,使用紫外分光光度法进行测定。从实验室 4 种常用提取方法中,优选出最优提取方法。以乙醇浓度,提取时间、提取次数、料液比及 pH 为参数,运用正交试验法建立最优提取工艺^[12-15]。通过对新疆地产洋金花种子进行系统

的提取工艺研究,为拓展洋金花类药材的要用部位及后期其活性成分筛选奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验仪器 DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、Mettler EL104 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、P300 超声提取器(天鹏电子新技术有限公司)、RE-2000A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、紫外分光光度计(UV-2401PC)、水浴锅、圆底烧瓶、球形冷凝管、布氏漏斗、分液漏斗、容量瓶、烧杯、漏斗、量筒、胶头滴管和 pH 试纸等。

1.1.2 药材与试剂 洋金花种子于 2012 年 9-10 月采自新疆石河子南山,经石河子大学药学院谭勇教授鉴定为白花曼陀罗。除杂后得到种子部分,70℃烘干备用;硫酸阿托品(标准品)、溴甲酚绿、氢氧化钠、盐酸、邻苯二甲酸氢钾、氨水、氯仿、甲醇、乙醇等,均为化学纯。

1.2 方法

1.2.1 硫酸阿托品对照品溶液的配制 取 103℃干燥至恒重的硫酸阿托品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解定容到刻度,即得^[16]。

1.2.2 0.5 g·mL⁻¹ 溴甲酚绿溶液的配制 精密称取溴甲酚绿 50 mg,邻苯二甲酸氢钾 1.021 g,加 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 6.0 mL 使溶解,再加水稀释至 100 mL,摇匀,必要时滤过,即得^[17]。

1.2.3 硫酸阿托品酸性染料分光光度法标准曲线的制备 精密量取硫酸阿托品对照品溶液 0.2、

收稿日期:2016-02-25

基金项目:兵团社会发展科技攻关与成果转化计划资助项目(2015AD032);新疆研究生科研创新资助项目(XJGRI 2013069)

第一作者简介:韩晓琳(1989-),女,新疆维吾尔自治区额敏县人,在读硕士,从事天然产物化学研究。E-mail:83463336@qq.com。

通讯作者:王恒(1980-),女,新疆维吾尔自治区阜康市人,硕士,讲师,从事药用植物资源开发与利用。

0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于5个分液漏斗中,各依次加0.500 g·mL⁻¹酸性染料溴甲酚绿溶液3 mL,三氯甲烷10 mL,用水补充至等体积,振摇提取2 min,静置5 min,分取三氯甲烷层溶液,再加入0.5 g无水硫酸钠(脱水)^[18-19],放置20 min,取另一已精密加入三氯甲烷10.0 mL的分液漏斗,精密加入水1.0 mL,同法制成空白对照溶液,于波长420 nm处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,以硫酸阿托品含量为横坐标作标准曲线,计算回归方程为 $y=0.472x-0.0654$,相关系数 $R^2=0.999$ (见图1)。

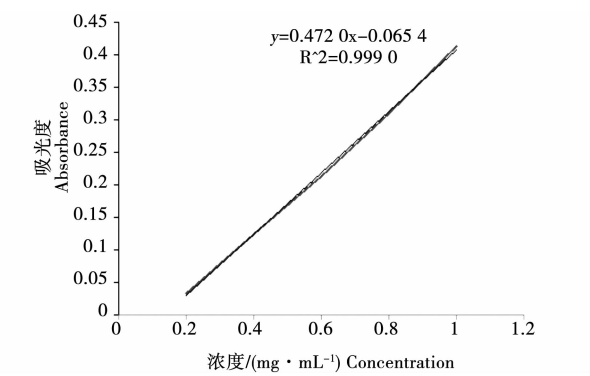


图1 硫酸阿托品酸性染料分光光度法标准曲线
Fig.1 Standard curve of atropine sulfate acid dye by spectrophotometry

1.2.4 四种提取方法优选 ①冷浸法。种子3份,每份20 g,粉碎,80%乙醇200 mL,浸渍24 h,抽滤,旋转蒸发仪回收溶剂,同法浸渍3次,合并浸膏,水浴蒸干,得干膏,合并3份,干燥称重得样品1,计算提取率。

②超声提取法。种子3份,每份20 g,粉碎,80%乙醇200 mL,超声提取,每次3 h,抽滤,旋转蒸发仪回收溶剂,提取3次,合并浸膏,水浴蒸干,得干膏,合并3份,干燥称重得样品2,计算提取率。

③回流提取法。种子3份,每份20 g,粉碎,80%乙醇200 mL,水浴回流提取水浴3次,分别3、2、2 h,抽滤,旋转蒸发仪回收溶剂,提取3次,合并浸膏,水浴蒸干,得干膏,合并3份,干燥称重得样品3,计算提取率。

④索氏提取法。种子3份,每份20 g,粉碎,80%乙醇200 mL,索氏提取,分别3、2、2 h,水浴加热,抽滤,旋转蒸发仪回收溶剂,提取3次,合并浸膏,水浴蒸干,得干膏,合并3份,干燥称重得样品4,计算提取率。

1.2.5 4种提取方法提取总生物碱的定量测定

精密称取样品1、样品2、样品3、样品4各0.2 g,加水10 mL使溶解,调节pH至2~3,滤过,滤液用氨水调pH至9~10,再用氯仿萃取4次,每次6 mL,合并定容至25 mL,即得供试品溶液1、2、3、4。于420 nm波长处测定吸光度,计算总生物碱质量浓度及4种提取方法生物碱提取率。总生物碱提取率(%)=总生物碱质量浓度×25×干膏量/干膏取样量/药材量×100。

1.2.6 正交试验 采用L16(4⁵)表格进行正交试验,以乙醇浓度、提取时间、提取次数、固液比及pH为考察因素,设计5因素4水平的正交试验。

2 结果与分析

2.1 洋金花种子中生物碱最佳提取方法的确定

采用4种提取方法提取洋金花种子提取物提取率和消耗比较及总生物碱提取率比较,由表1、表2可知,回流提取法对洋金花种子提取物的提取率最高,且总生物碱的提取率也是最高的,由此可以确定洋金花种子中生物碱的最佳提取方法为回流提取法。

表1 四种方法提取洋金花种子得浸膏提取率及消耗比较
Table 1 Comparison on extraction rate and time-consuming of four methods to extract datura flower seed

提取方法 Extraction method	提取物质 量/g Weight of extract	提取率/% Extraction rate	耗时/h Time-consuming	溶剂用 量/mL Solvent volume
冷浸法	3.6131	6.02	72	1800
超声提取法	5.7837	9.64	9	1800
回流提取法	9.4934	15.82	7	1800
索氏提取法	7.5152	12.53	7	1800

表2 总生物碱质量浓度及提取率比较
Table 2 Mass concentration and extraction rate of total alkaloid

提取方法 Extraction method	质量浓度/(μg·mL ⁻¹) Mass concentration	提取率/% Extraction rate
冷浸法	4.9873	0.37
超声提取法	8.0298	0.97
回流提取法	9.9873	1.98
索氏提取发	6.9788	1.09

2.2 正交试验结果

试验结果表明,第15组试验 A4B3C2D4E1

条件下洋金花种子中总生物碱提取率最高,即:无水乙醇回流提取,每次 3 h,提取 2 次,固液比为 1:25,pH 为 5。

由 R 值可知,对生物碱提取影响因素大小主次顺序为 A>D>B>C>E,即乙醇浓度和固液比对洋金花种子中生物碱提取率影响较为显著。

表 3 正交试验因素水平
Table 3 Factor and level of L₁₆(4⁵) orthogonal test

水平 Level	因素 Factor				
	A 乙醇浓度/% Ethanol concentration	B 提取时间/h Extraction time	C 提取次数 Extraction times	D 固液比 Ratio of solid and liquid	E pH
1	60	1	1	1:10	5
2	70	2	2	1:15	6
3	80	3	3	1:20	7
4	100	4	4	1:25	8

表 4 洋金花种子提取正交试验结果(n=3)
Table 4 L₁₆(4⁵) orthogonal test results

编号 No.	A	B	C	D	E	总生物碱含量/ (mg·g ⁻¹) Total alkaloid content
1	1	1	1	1	1	0.6102
2	1	2	2	2	2	0.7055
3	1	3	3	3	3	0.7346
4	1	4	4	4	4	0.7108
5	2	1	2	3	4	0.8194
6	2	2	1	4	3	0.7135
7	2	3	4	1	2	0.7505
8	2	4	3	2	1	0.7849
9	3	1	3	4	2	0.7373
10	3	2	4	3	1	0.7558
11	3	3	1	2	4	0.7399
12	3	4	2	1	3	0.7505
13	4	1	4	2	3	0.9147
14	4	2	3	1	4	0.8909
15	4	3	2	4	1	1.2352
16	4	4	1	3	2	1.1716
K ₁	0.9204	1.0272	1.0784	1.0007	1.1287	
K ₂	1.0228	1.0219	1.1702	1.0483	1.1216	
K ₃	0.9945	1.1534	1.0492	1.1323	1.0378	
K ₄	1.4041	1.1399	1.0439	1.1605	1.0537	
R	0.4837	0.1315	0.1263	0.1598	0.0909	
F	21.8161*	83.2344*	1.5885	25.2206*		

3 结论与讨论

目前实验室采用的提取方法主要包括:回流法、浸渍法、超声法以及索氏提取法^[9]。本试验通过对其进行比较,为更加充分、有效地提取洋金花种子中生物碱类化学成分提供了理论依据。通过对种子中提取得到总浸膏及总生物碱的重量进行分析,同时结合耗时、提取溶剂用量、实验仪器便捷等因素进行综合考虑,回流提取法得到种子的总生物碱最大提取率为 1.98%,其次为索氏提取法,提取率为 1.09%。

2014 年李万林对陕西地产洋金花种子进行了生物碱及油脂的提取工艺研究^[20],试验中采用索氏提取法进行提取,以时间、料液比、乙醇浓度为变量进行式验。本试验通过对多种提取方法进行比较,筛选出回流法为最优提取方法。通过增加提取次数、以 pH 为变量,使用紫外分光光度法进行检测,使试验结果更加全面、精准。

洋金花种子为众多新疆特色民族中草药中的一种,维吾尔医学中表明其归属于安神止痛药,具有安神麻醉、止痛催眠、除狂等作用^[10]。本研究旨在建立科学合理的提取工艺,为今后洋金花类药材的合理开发利用奠定试验基础,同时对新疆地区的生态建设、经济发展以及新疆特色植物的充分开发利用提供了一条可行的途径。

参考文献:

[1] 黄泰康,丁志遵,赵守训. 现代本草纲目[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000:2049-2052.
[2] 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,2015:267.
[3] 姜文燕,马小春. 洋金花研究进展[J]. 现代医药卫生,2012,28(16):2500-2503.
[4] 易沙克江·马合穆德. 中国医学百科全书—维吾尔医

- 学[M].上海:上海科学技术出版社,2005:219.
- [5] 伊德里斯·巴克.中华人民共和国卫生部药品标准——维吾尔药分册[S].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:95.
- [6] 艾克拜尔·买买提,热比姑丽·伊斯拉木,斯拉甫·艾白.曼陀罗及其主要化学成分研究进展[J].中国民族医药杂志,2009,9(1):61-62.
- [7] 刘艳.洋金花种子的化学成分研究Ⅱ[J].中医药学报,2013,41(2):49-51.
- [8] 刘高峰.洋金花的化学成分研究[J].中国中医药科技,2010,17(6):522-524.
- [9] 杨炳友.洋金花种子的化学成分研究Ⅰ[J].中草药,2013,44(14):1877-1880.
- [10] 江恒,林开忠.民间毒性草药曼陀罗种子中托烷类生物碱的含量测定[J].药物分析杂志,1998,18(S):147-148.
- [11] Mendel Friedman. Analysis of biologically active compounds in potatoes, tomatoes, and jimson weed seeds[J]. Journal of Chromatography, 2004, 1054: 143-155.
- [12] 唐前,唐玲.正交实验优选金花茶种子总多酚的最佳提取工艺[J].时珍国医国药,2010,21(4):792-793.
- [13] 努尔阿米娜·阿尤甫.曼陀罗种子中总黄酮含量测定及提取工艺研究[J].食品科学,2008,29(3):260-263.
- [14] Mohamed Fawzy Ramadan, Raway Zayed, Hesham El-Shamy. Screening of bioactive Lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants[J]. Food Chemistry, 2007, 103: 885-890.
- [15] Elisabetta Miraldi, Alessandra Masti, Sara Ferri, et al. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*[J]. Fitoterapia, 2001, 72: 644-648.
- [16] 彭拓华,钟世顺.三种提取方法提取洋金花生生物碱的比较研究[J].中成药,2012,34(5):832-835.
- [17] 朱月琴.洋金花总生物碱提取工艺研究[J].时珍国医国药,2000,11(11):965-966.
- [18] 彭拓华,张少俊.洋金花有效成分的微波提取最佳工艺考察[J].广州中医药大学学报,2006,23(3):265-271.
- [19] 李建文,林彬彬,王国凯.曼陀罗种子化学成分研究[J].中国中药杂志,2012(3):319-321.
- [20] 李万林.洋金花种子中有效成分提取工艺的研究[J].广东饲料,2014,3(23):24-27.

Study on the Extraction Technology of Total Alkaloid from the Seeds of *Datura*

HAN Xiao-lin, ZHANG Xu, TAN Yong, TIAN Li-ping, WANG Heng
(College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002)

Abstract: In order to establish the optimize extraction technology of total alkaloid from seed of *Datura*, the extraction ratio of cold soak extraction, ultrasonic extraction, reflux extraction, and soxhlet extraction was compared; the extraction technology was optimized by $L_{16}(4^5)$ orthogonal test with concentration of ethanol, duration of extraction, times of extraction, solid-liquid ratio and pH as parameters, UV was adopted to detect the content of total alkaloids and atropine. The results showed that reflux extraction had the highest extraction ratio. The best extraction technology was as followd: reflux 3 hours with 2 times, solid-liquid ratio with 1:25, pH value with 5. Ethanol concentration and solid-liquid ratio had the significant impact on the extraction of alkaloids. This optimized extraction technology is simple, stable and feasible.

Keywords: seeds of *Datura metel* L.; alkaloid; extraction technology; orthogonal experiment

玉米田使用长残留除草剂的后茬作物安排

1、莠去津(阿特拉津)及含有莠去津的混配制剂,或莠去津与其它除草剂混用,用药量 38% 莠去津悬浮剂 5 250 mL·hm⁻²(有效成分用量 1 995 g·hm⁻²)以下时,

第二年可以种的作物有:玉米、高粱。

第二年不能种的作物有:小麦、大麦、水稻、谷子、大豆、菜豆、花生、烟草、苜蓿、甜菜、油菜、亚麻、向日葵、马铃薯、万寿菊、南瓜、西瓜、洋葱、番茄、黄瓜等蔬菜。

2、玉农乐(烟嘧磺隆),用药量 4% 玉农乐悬浮剂 1 500 mL·hm⁻²(有效成分用量 60 g·hm⁻²)以下时,

第二年可以种的作物有:玉米、小麦、大麦、水稻、大豆、花生、苜蓿。

第二年不能种的作物有:高粱、亚麻、向日葵、马铃薯、万寿菊、南瓜、西瓜、甜菜、油菜、洋葱、甘蓝、番茄、胡萝卜、黄瓜等蔬菜。

3、氯磺隆(绿磺隆)及含有氯磺隆的混配制剂,或氯磺隆与其它除草剂混用,用药量 20% 氯磺隆可湿性粉剂 75 g·hm⁻²(有效成分用量 15 g·hm⁻²)以下时,

第二年可以种的作物有:小麦、大麦、亚麻、大豆、水稻、油菜、菜豆。

第二年不能种的作物有:玉米、甜菜、高粱、谷子、向日葵、马铃薯、万寿菊、南瓜、西瓜、洋葱、番茄等蔬菜。