

西藏垫状点地梅总生物碱提取工艺研究

白玛卓嘎, 何文斌, 刘可可, 普布赤列, 伏江南, 孟飞雄, 大达瓦次仁* (西藏大学理学院, 西藏拉萨 850000)

摘要 [目的]研究垫状点地梅生物碱热回流提取的较优方法。[方法]采用热回流提取、单因素对比试验、正交试验和紫外-可见分光光度分析,提出了垫状点地梅生物总碱的合理提取方案。[结果]乙醇体积分数75%、回流温度75℃、料液比(m/v)1:15、回流时间3h为最佳提取条件,此时提取垫状点地梅生物总碱提取率将达1.257%。[结论]该试验方法简便、科学可靠,可对垫状点地梅生物碱工业提取起到一定的参考价值。

关键词 垫状点地梅;总生物碱;提取工艺

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12073-02

Research on the Extraction Technology of Total Alkaloids from *Androsace tapete* in Tibet

PAMA Droga, HE Wen-bin, LIU Ke-ke, DADAWA Ci-ren* et al (College of Science, Tibet University, Lhasa, Tibet 850000)

Abstract [Objective] The research aimed to study the optimum method of alkaloids hot reflux extraction from *Androsace tapete*. [Method] The alkaloids reasonable extraction scheme of *Androsace tapete* was proposed by heat reflux extraction, single factor comparative experiment, orthogonal experiment and UV-Vis spectrophotometric analysis. [Result] While the volume fraction of ethanol was 75%, the reflux temperature was 75℃, the ratio of material to liquid(m/v) was 1:15, and the reflux time was 3 hours, we can get the best extraction effect to the total Alkaloids of *Androsace tapete*. The extraction rate of alkaloids from *Androsace tapete* would reach 1.257%. [Conclusion] This experimental method was simple, scientific and reliable, and can have a certain reference value for the industrial extraction of alkaloids from *Androsace tapete*.

Key words *Androsace tapete*; Total alkaloids; Extraction technology

垫状点地梅(藏药名噶蒂慕布),报春花科点地梅属,多年生矮小草本^[1],常生于山野草地或路旁,是青藏高原较为常见的一种植物。其药用价值主要表现为清热解毒、消肿止痛,主治扁桃体炎、咽喉炎、口腔炎、急性结膜炎、跌打损伤^[2],可全草入药,有极高的开发前景和利用价值。西藏垫状点地梅具有较强的生理活性^[3],但对其活性成分的研究尚未见报道。该试验对西藏垫状点地梅所含生物碱类化合物的含量及其提取工艺进行初步研究,为垫状点地梅的生物资源开发提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料 垫状点地梅由笔者2013年7月采自西藏自治区拉萨市南次角林生态公园内(海拔4370m),经鉴定为垫状点地梅。样品全株采集,洗净置于60℃干燥箱中烘干,过120目筛粉碎,密封备用^[3]。

1.2 仪器及试剂 756MC紫外可见光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)、90-2型定时恒温磁力搅拌器(上海精科实业有限公司)、800离心机(上海科技实验仪器厂)、PHS-2C数字式PH计、恒温干燥箱(上海科技实验厂)、电子天平(上海上平仪器公司)、恒温水浴锅(上海科技实验仪器公司)、RE-52旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂)、SHD-Ⅲ循环水式多用真空泵(保定高新区阳光科技仪器厂)。95%乙醇、氯仿、溴酚蓝、硫酸、氢氧化钠、丙酮等试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 总生物碱提取及纯化方法。精确称取垫状点地梅试样10g,加入适量体积及浓度乙醇,置于索氏提取器中,在恒温水浴情况下进行回流提取^[4]。得到提取母液,调节pH3~

4,利用回旋蒸发器浓缩至无明显乙醇^[5]。搅拌后利用保鲜膜密封静置12h,取出溶液,过滤去不溶于酸的物质,同时用氢氧化钠调节pH至10~11,加入等量的氯仿,振荡,利用分液漏斗分出氯仿层,并重复萃取3次,以达到除去杂质和色素的效果^[6]。最后合并氯仿萃取液,利用回旋蒸发器减压回收氯仿至干,得到总生物碱^[7]。将所得生物碱置于100ml的容量瓶中加入95%乙醇溶液至刻度,定溶摇匀,备用^[8]。

1.3.2 单因素试验设计。

1.3.2.1 乙醇体积分数对生物总碱提取的影响。分别采用体积分数为55%、65%、75%、85%、95%的乙醇,利用上述热回流法,在水浴温度为65℃情况下回流提取3次,提取时间设定为3h,料液比(m/v)采用1:20。利用紫外分光光度法测定提取液总生物碱含量,确定最佳的乙醇提取体积分数。

1.3.2.2 提取温度对提取效率的影响。分别采用45、55、65、75、85℃水浴条件下,利用95%乙醇对试样进行热回流提取3h,料液比1:20。利用紫外分光光度法测定提取液总生物碱含量,确定最佳的生物碱提取温度。

1.3.2.3 热回流提取时间对生物提取率的影响。分别将热回流时间设定为1、2、3、4、5h条件下,利用95%乙醇液在65℃水浴温度、1:20的料液比下提取。利用紫外分光光度法测定提取液生物碱总含量,确定最佳生物碱提取回流时间。

1.3.2.4 热回流提取物料比对提取效率的影响。分别采用试样/乙醇(m/v)为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25为条件,利用95%乙醇在65℃水浴温度下,回流提取3h。利用紫外分光光度法测定提取液生物碱总含量,确定最佳生物碱提取回流物料比。

1.3.3 正交试验设计。通过利用热回流单因素试验对上述不同提取条件进行初步的筛选,分析各参数影响主次因素,得到最佳的提取工艺进行正交试验。参照单因素试验结果,以影响总生物碱提取率的乙醇体积分数、提取温度、回流提

基金项目 2013年国家大学生创新创业训练项目(201310694008)。
作者简介 白玛卓嘎(1965-),女,藏族,西藏亚东人,副教授,从事有机化学研究及其应用。*通讯作者,副教授,从事有机化学及其试验方面的研究。

收稿日期 2014-10-24

取时间、料液比为 4 个影响因素,5 个水平 $L_9(5^4)$ 进行正交试验(表 1)^[9],选最佳提取工艺。

表 1 热回流提取因素及水平

水平	A(乙醇体积 分数/%)	B(提取温 度/℃)	C(回流提 取时间/h)	D(料液比)
1	55	45	1	1:5
2	65	55	2	1:10
3	75	65	3	1:15
4	85	75	4	1:20
5	95	85	5	1:25

1.3.4 垫状点地梅生物碱总碱提取率的测定。

1.3.4.1 标准曲线的配制。精密称取盐酸小檗碱对照品 0.003 0 g,置于 50 ml 容量瓶中,用 0.05 mol/L 的硫酸溶解,并稀释至刻度,定容摇匀备用。分别精密量取 0.05、0.10、0.15、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 ml 配成每 1 ml 含有盐酸小檗碱 0.124、0.248、0.372、2.480、4.960、7.440、9.920、12.400 mg 的对照品溶液,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为空白液,在波长为 345 nm 处分别测定其吸收度,以浓度为横坐标、吸收度为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为 $y = 0.067\ 16x + 0.023\ 54(r = 0.999\ 9)$ 。

1.3.4.2 样品液的制备与生物碱含量测定。将已经提取纯化的各母液取出,各量取 5 ml 置于 10 ml 容量瓶中,利用 95% 乙醇定容,摇匀;再取上述配制溶液 5 ml 置于 10 ml 容量瓶中加 0.05 mol/L 硫酸至刻度摇匀,备用。以 0.05 mol/L 硫酸为空白液,将制备好的生物碱样品溶液在波长 345 nm 处分别测定其吸收度。所测样品吸收度于标准曲线回归方程换算后,得出试样中总生物碱浓度,然后按下式进行计算,得出各条件下生物碱提取率,即提取率 = $(C \times N \times V) / M = (C \times 25 \times 5) / 10\ 000$,式中, C 为提取液中总生物碱质量浓度(mg/ml); N 为稀释倍数; V 为初始定容体积(ml); M 为样品质量(mg); C 为根据提取液的吸光度代入回归方程计算出的总生物碱质量浓度(mg/ml)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 乙醇体积分数对生物总碱提取的影响。由图 1 可见,在利用不同体积分数的乙醇对垫状点地梅的生物碱进行回流提取时,随着乙醇体积分数的不断升高,提取率也在不断升高,当到达浓度为 75% 时达到最大,以后随着乙醇浓度的不断升高,提取率略微有所下降。笔者推测可能是因为乙醇含量的不断增加,使得乙醇中可挥发性生物碱容量不断增加,影响到回流萃取的效率,而如果存在一些水分则可以溶解一部分可挥发组分,这样来就增加了提取的效率。所以在选取垫状点地梅生物碱提取乙醇体积分数时,75% 体积分数的乙醇较为适宜。

2.1.2 提取温度对生物碱产率的影响。由图 2 可知,在利用不同温度条件对垫状点地梅生物碱提取试验中,生物碱总碱的提取率随温度的升高不断升高,到 75 ℃ 达到最高的 0.885%,高于此温度的 85 ℃ 时就有所下降。笔者分析认为

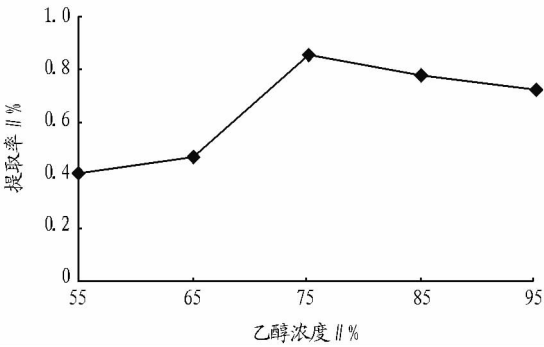


图 1 乙醇浓度对提取率的影响

乙醇在拉萨汽化温度为 68 ℃,75 ℃ 的水浴温度可以使乙醇以均匀的速度汽化,于仪器中产生适宜的蒸汽压,有利于生物碱的提取;而高于此温度的 85 ℃ 使乙醇激烈的汽化,回流速度加快降低了回流提取的效率。因此,垫状点地梅生物碱回流提取的温度应选择 75 ℃ 为宜。

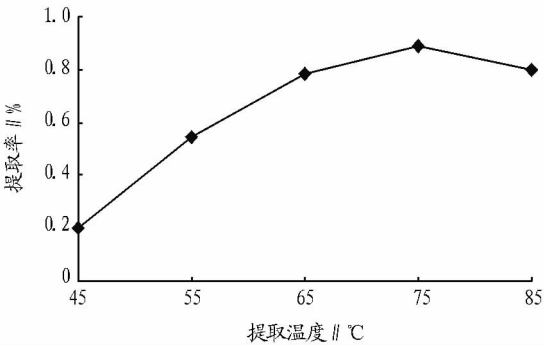


图 2 提取温度对提取率的影响

2.1.3 提取回流时间对生物碱提取率的影响。在对垫状点地梅的生物碱回流提取试验中,随着回流时间的不断增加,生物碱的提取率也在不断的增加。在 1~3 h 过程中提取效率变化较快,3 h 以后虽有增加,但变化趋于平缓(图 3)。如果仅以提取率为参考因素,则可以采用较长提取时间;而综合成本而言,可选择 3~4 h 较为适宜。

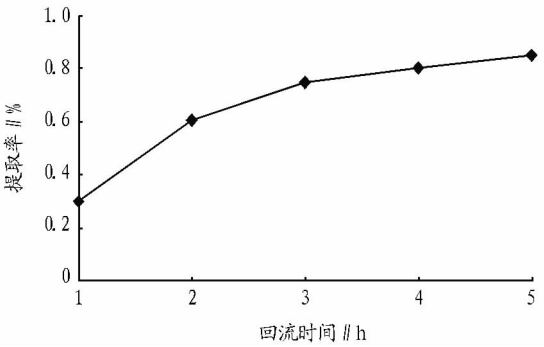


图 3 回流时间对提取率的影响

2.1.4 提取料液比对提取率的影响。由图 4 分析可得,在垫状点地梅生物碱回流提取试验中,采用不同的料液比所得到的提取率有差异,但总体而言,料液比选择 1:15 时,提取率可高达 0.751%。

活性差异很大,相同酶在伐林栽参土壤中活性显著高于农田栽参的活性。2 种育参地土壤 pH 均在人参生长的适宜范围内,土壤酶活性能够准确反映土壤营养供应状况,结合土壤有机质、氮磷钾及 pH 可以准确评价人参土壤肥力状况。因此农田栽参土壤改良应该综合考虑人参地土壤养分和土壤酶活性,通过调节土壤养分含量来调节土壤肥力状况。

表 5 农田栽参和伐林栽参土壤 4 种酶活含量比较

土壤类型	脲酶//mg/(g·d)	过氧化氢酶//ml/(g·20 min)	蔗糖酶//mg/(g·d)	磷酸酶//mg/(g·d)
农田栽参对照	0.45±0.03b	0.60±0.03b	8.94±3.62c	7.63±2.87c
农田栽参	0.63±0.05b	0.65±0.04b	14.32±7.63b	17.32±6.37bc
伐林栽参对照	1.74±0.28ab	0.85±0.05a	12.71±3.78bc	23.66±8.16b
伐林栽参	2.80±0.36a	0.94±0.07a	30.62±9.37a	32.25±10.17a

参考文献

[1] 曹广成. 中国人参发展潜力与价值类比探讨[J]. 中草药,2009,40(7): 1170-1172.

[2] 程海涛. 土壤环境与人参生长关系的研究进展[J]. 中草药,2011,34(2):313-317.

[3] ROBERT E H, ALLEMAN B C, HOEPEL R E, et al. Hydro-carbon bioremediation[M]. Lewis, 1994.

[4] DOELMAN P, HAANSTRA L. Short and long term effects of heavy metals on urease activity in soils[J]. Biol Fertil Soils, 1986, 2: 213-218.

[5] 刘翔, 赵和, 吕凤华, 等. 追施无机氮对人参产量和品质影响的研究[J]. 中草药, 1994, 25(4): 536-560.

[6] 许永华, 刘晓红, 王彦. 农田栽参技术要点[J]. 人参研究, 2002, 14(2): 43-44.

[7] 李勇, 黄小芳, 丁万隆. 营养元素亏缺对人参根分泌物主成分的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(8): 1688-1693.

[8] 赵英, 王秀全, 郑毅男, 等. 施用化肥对人参产量性状的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(4): 56-59.

[9] KERNAGHAN G, REELEDER R D, HOKE S M T. Quantification of Pythium populations in ginseng soils by culture dependent and real-time PCR methods[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 40(3): 447-455.

[10] 孟立君, 吴凤芝. 土壤酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(5): 622-626.

[11] 孙海. 人参主要养分及酶研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.

[12] 林大义. 土壤学实验指导[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 42-123.

[13] 关松荫. 土壤酶及其活性研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 273-339.

[14] 张勇, 庞学勇, 包维楷, 等. 土壤有机质及其研究方法综述[J]. 世界科学研究与进展, 2005, 27(5): 72-78.

[15] 郑应泽. 土壤酸碱性对农作物生长的影响[J]. 玉溪师专学报, 1994, 10(3/4): 64-67.

[16] ZHONG Y L, FAN J B, WANG D S. Genotypic differences in grain yield and physiological nitrogen use efficiency among rice cultivars[J]. Pedosphere, 2009, 19(6): 681-691.

[17] 谢忠凯, 杨振玲. 长白山区人参土壤钾素营养状况及钾肥肥效[J]. 人参研究, 1996(3): 4-6.

[18] 宋晓霞. 人参土壤微生物群落结构研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

(上接第 12074 页)

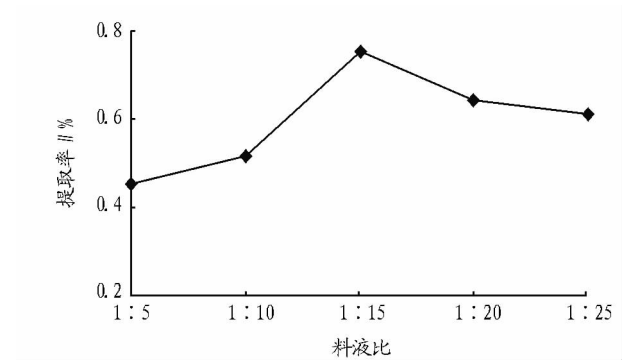


图 4 料液比对提取率的影响

2.2 正交试验结果分析 通过对已测数据的正交分析,可得到影响垫状点地梅中总生物和提取的因素顺序为乙醇体积分数>回流时间>回流温度>回流料液比,则在工艺选择上,可选择乙醇体积分数 75%、回流温度 75℃、料液比 1:15、回流时间 3 h 为最佳提取条件,此时提取垫状点地梅生物总碱提取率将达 1.257%。

3 结论

该试验以西藏自治区拉萨市次角林生态公园内的垫状点地梅为试验材料,综合运用了热回流提取、单因素对比试

验、正交试验分析、紫外-可见光分光光度分析,提出了垫状点地梅生物总碱的合理提取方案。乙醇体积分数 75%、回流温度 75℃、料液比 1:15、回流时间 3 h 为最佳提取条件,此时提取垫状点地梅生物总碱提取率将达 1.257%。

在方法选择上,采用乙醇为回流液,利用索氏提取器回流提取生物碱是较为实用的一种提取方法。而利用盐酸小檗碱为参照建立的紫外可见光分光光度计的总生物碱分析法是科学可行的。

参考文献

[1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994.

[2] 西藏自治区革命委员会卫生局, 西藏军区后勤部卫生处. 西藏常用中草药[M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 1971.

[3] 吴征镒. 曾建飞西藏植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 2950.

[4] 梁生旺. 生物碱类成分分析[M]. 北京: 学苑出版社, 1999.

[5] 尚宇光, 李淑芬, 肖鸯. 植物中生物碱的提取工艺[J]. 现代化工, 2002, 22(S1): 51-54.

[6] 南京大学化学系有机化学教研室. 有机化学(下册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988: 329.

[7] 张德华, 黄仁术, 白露, 等. 生物碱的提取方法研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5): 15-19.

[8] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 32-33.

[9] 胡传荣, 李云雁. 试验设计与设计与数据处理[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2008.