

微波辅助提取 /HPLC 分析石蒜中的生物碱

范华均^{1,2}, 栾伟¹, 李攻科¹

(1. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 广东药学院 药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用微波辅助提取法提取石蒜中的石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱, 建立了微波辅助提取 /HPLC 测定石蒜中这 3 种生物碱的分析方法。用正交试验设计结合单因素试验优化了样品颗粒度、提取温度、提取时间、固液比等微波提取条件。采用三乙胺水溶液 (pH 9.0) - 乙腈 - 甲醇作为流动相对石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏进行 HPLC 测定, 方法的线性范围为 5.0~400 mg/L, 检出限分别为 5.0、5.1、10.2 ng, RSD 分别为 2.2%、5.7% 和 4.4%。与传统的溶剂回流法比较, MAE 提取法快速、高效。用本法分析了 10 个不同产地石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏。

关键词: 微波辅助提取; HPLC; 石蒜; 石蒜碱; 力可拉敏; 加兰他敏

中图分类号: O657.72; Q949.718.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)03-0027-04

Determination of Alkaloids in *Lycoris radiata* with Microwave-assisted Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography

FAN Hua-jun^{1,2}, LUAN Wei¹, LI Gong-ke¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering Sun Yat-sen University Guangzhou 510275 China
2. College of Pharmacy Guangdong Pharmaceutical University Guangzhou 510006, China)

Abstract Lycorine, lycoramine and galanthamine in *Lycoris radiata* were microwave-assisted extracted (MAE) and determined by HPLC using triethylamine aqueous solution (pH 9.00) - acetonitrile - methanol as the mobile phase. The MAE operating conditions were optimized by the orthogonal test design combined with the one-factor test. The linear ranges of the calibration curves for lycorine, lycoramine and galanthamine were 5.0-400 mg/L, respectively. Their detection limits were 5.0, 5.1 and 10.2 ng, respectively and the RSD were 2.2%, 5.7% and 4.4%, respectively. Compared with the results obtained by the conventional solvent reflux extraction method, the MAE was time saving and more efficient. The method was successfully applied to the extraction and determination of Lycorine, lycoramine and galanthamine in 10 *Lycoris radiata* samples from different regions.

Key words Microwave-assisted extraction; HPLC; *Lycoris radiata*; Lycorine; Lycoramine; Galanthamine

石蒜科石蒜属 (amaryllidaceae) 植物, 含有石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏 (图 1) 等生物碱, 具有镇静、镇痛、解热、降压、抗炎、催吐、抗病毒、抗癌等作用^[1]。目前石蒜生物碱的提取主要采用溶剂回流法 (SRE), 但 SRE 提取效率低、耗时、耗溶剂, 而且有效成分易被破坏^[2-3]。微波辅助提取法 (MAE) 是利用微波与介质的离子和偶极子分子的相互作用, 具有加热快速、高效等特点, 因此 MAE 应用于植物有效成分的提取, 可缩短提取时间、减少污染、提高效率^[4-5]。张俊梅等^[6]采用 TLC 鉴别石蒜生物碱, 用 HPLC 测定生物碱中加兰他敏的含量, Kreh 等^[7]报道采用 GC-MS 分析石蒜生物碱, 由于热分解未得到较好的结果。栾伟等^[8]采用 MAE 提取石蒜中加兰他敏, 与 SRE 比较显示了 MAE 法的优势。

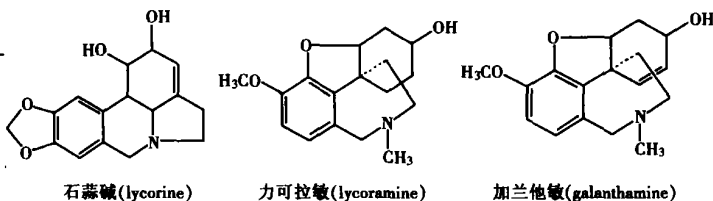


图 1 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的化学结构
Fig 1 Chemical structures of lycorine, lycoramine and galanthamine

收稿日期: 2005-11-13 修回日期: 2006-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20375050); 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000026302)

作者简介: 范华均 (1963-), 男, 四川富顺人, 副教授, 在职博士研究生; 李攻科, 联系人, Tel 020-84110922

E-mail: cesk@mail.sysu.edu.cn

本文建立了 MAE 提取/HPLC 分析石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱分析方法, 用正交试验设计结合单因素试验优化了 MAE 提取条件, 以三乙胺水溶液 (pH 9.0) - 乙腈 - 甲醇作为 HPLC 的流动相, 在 232 nm 处进行检测。与传统的溶剂回流法进行了比较研究, 结果表明 MAE 法快速、高效。该法被应用于 10 个不同产地石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱的提取和分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

MARX-X 微波炉 (美国 CEM 公司); LG-2010C 液相色谱仪 (日本岛津公司); XMTA 数显恒温水浴 (余姚市远东数控仪器厂); E-201C 型 pH 酸度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

石蒜碱、加兰他敏 (Sigma 公司) 和力可拉敏标准品 (广东天普药业有限公司提供); 甲醇、乙腈 (色谱纯, Meik 公司); 三乙胺、无水甲醇、95% (V/V) 乙醇、氯仿、HCl 氨水 (分析纯, 广州化学试剂厂)。

标准溶液: 将石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏分别配制成 0.8、0.4 和 0.8 g/L 的甲醇溶液。

0.7% 三乙胺水溶液 (V/V, pH = 9.0): 取 3.5 mL 三乙胺于 500 mL 水中, 用醋酸调节至 pH 为 9.0。

1.2 实验方法

1.2.1 MAE 提取石蒜生物碱 将石蒜剥开、自然凉干、粉碎、过筛, 得到 0.43~0.13 mm 不同粒度的样品, 备用。

MAE 提取: 准确称取 2.0 g 粒度为 0.18 mm 样品于微波萃取罐中, 加入 30 mL 95% (V/V) 乙醇, 放入搅拌子, 在微波功率 300 W、温度 80 °C、搅拌速度中速、提取时间 10 min 下进行 MAE 的提取。

SRE 提取: 准确称取 2.0 g 粒度为 0.18 mm 样品于烧瓶中, 加入 30 mL 95% (V/V) 乙醇, 装上回流冷凝管, 于 80 °C 恒温水浴中溶剂回流 10 min 进行提取。

提取液净化: 将 MAE 或 SRE 提取液减压蒸发至近干, 用 10 mL 2% (V/V) HCl 溶液浸取, 用 10 mL 氯仿萃取 3 次除去杂质; 调节水相至碱性, 用 10 mL 氯仿萃取 3 次, 合并氯仿液, 减压蒸发至近干, 用甲醇溶解、定容; 再通过 0.45 μm 滤膜, 进行 HPLC 测定。

1.2.2 HPLC 测定条件 色谱柱: 250×4.6 mm Luna 5 μ C18(2) 100A (美国 Phenomenex 公司); 检测波长: 232 nm; 柱温: 40 °C; 流动相: 0.7% (V/V) 三乙胺水溶液 (A) - 乙腈 (B) - 甲醇 (C); 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μL, 4 min 后开始检测。

梯度洗脱程序: 0~20 min, A 与 B 的体积比为 85:15 至 80:20; 20~40 min, A、B、C 的体积比为 80:20:0 至 70:15:15; 40~50 min, 100% B。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择

本文分别以水、甲醇、95% (V/V) 乙醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、乙醚和正己烷作为溶剂, 研究了不同溶剂对石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏提取率的影响。

实验结果表明, 极性较大的水、甲醇和乙醇, 生物碱的提取率较高; 极性较小的乙酸乙酯、丙酮和乙醚生物碱的提取率明显较低, 而在非极性的正己烷提取液中检测不到生物碱。由于 3 种生物碱含有胺基和羟基, 主要以盐的形式存在于细胞中, 因此选择极性溶剂有利于微波的吸收和生物碱的提取。水提取液颜色深、粘稠、混浊、杂质多, 不利于后续的净化和分析; 而乙醇尽管提取率略低于甲醇, 但无毒、污染小、价格低, 本文选择 95% (V/V) 乙醇作为提取溶剂。

2.2 微波辅助提取条件的优化

2.2.1 微波提取条件的正交试验优化 采用正交试验设计四因素三水平 $L_9(3^4)$ 方法, 对石蒜颗粒度、提取温度、提取时间和固液比等 MAE 提取条件进行了优化, 试验设计见表 1。

根据石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的提取率进行直观分析和方差分析, 其正交优化提取条件分别是

表 1 微波辅助提取 $L_9(3^4)$ 正交实验设计表

Factor level	A	B	C	D
	Ratio	Extracting time <i>t</i> /min	Temperature <i>θ</i> /°C	Particle size <i>l</i> /mm
1	1:20	20	90	0.43
2	1:15	10	70	0.25
3	1:10	5	50	0.18

$A_2B_2C_2D_2$ 、 $A_2B_1C_2D_3$ 和 $A_2B_1C_1D_3$, 其中提取温度是最显著的影响因素。由于是多目标的正交试验, 影响因素较多, 在实验次数较少的情况下正交试验往往不能得到最优条件, 因此在此实验基础上进行了单因素试验, 进一步考察了 3 种生物碱在上述因素不同水平下的微波提取行为。

2.2.2 提取温度和提取时间的影响 根据正交试验结果, 提取温度是影响较大的因素, 但提取温度和提取时间密切相关。本文进一步研究了在 70、80 和 90 °C 下不同提取时间对 3 种生物碱提取率的影响, 结果见图 2。

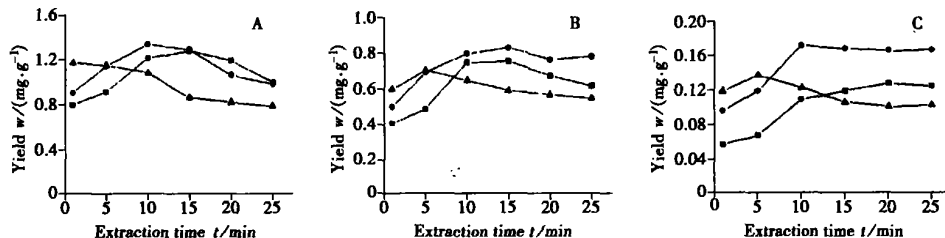


图 2 提取温度和提取时间的影响

Fig. 2 Effects of extraction temperature and time on the MAE yields

A 石蒜碱 (Lycorine); B 力可拉敏 (Lycoramine); C 加兰他敏 (Galanthamine); (■) 70 °C; (●) 80 °C; (▲) 90 °C

由图 2 可知, 当提取时间一定时, 加兰他敏、石蒜碱和力可拉敏的提取率随着温度升高而提高, 且温度越高, 所需的提取时间越短, 这可能是由于微波的“体加热”方式有利于细胞内提取物的扩散, 缩短了扩散平衡的时间。当温度一定时, 随着提取时间增加, 提取率迅速达到最大, 增加提取时间有利于提高提取物的传质^[9]。但当超过一定提取时间后, 提取率反而降低, 可能化合物不稳定发生了分解, 因此选择合适的温度和提取时间尤为重要。本文选择提取温度 80 °C, 提取时间 10 min。

2.2.3 颗粒度和固液比的影响 本文试验了样品颗粒度、固液比及微波功率对石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏提取率的影响。

结果表明, 3 种生物碱的提取率随着颗粒度的减小而增大, 当颗粒度大于 0.25 mm 时, 提取浓度逐渐达到恒定, 因此选择样品颗粒度 0.18 mm。

固液比在 1:10~1:20 之间提取率高。增加溶剂用量有利于传质和提高溶解度, 但用量太多微波能与质量比会减小, 也会影响提取效果, 故选择固液比为 1:15。

另外在选择微波功率时, 功率不易过高, 否则容易产生过热, 而导致温度“超载”。

综合考虑石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的提取, 优化的提取条件为: 微波功率 300 W, 固液比 1:15, 提取温度为 80 °C, 提取时间为 10 min, 石蒜颗粒度为 0.18 mm。

2.3 HPLC 分析

2.3.1 HPLC 色谱分析条件的选择 以 0.1% (v/v) 三乙胺水溶液-乙腈-甲醇体系作为流动相, 将水相 pH 控制在 9.0, 采用梯度洗脱, 在 232 nm 处进行紫外检测, 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的色谱保留时间分别为 10.06、13.41 和 19.88 min, 色谱图见图 3。

2.3.2 方法的线性范围、检出限、回收率和精密度 分别配制石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏标准溶液系列, 绘制标准工作曲线, 并取 3 份样品按实验方法进行了加标回收实验和重复性实验, 其结果见表 2。

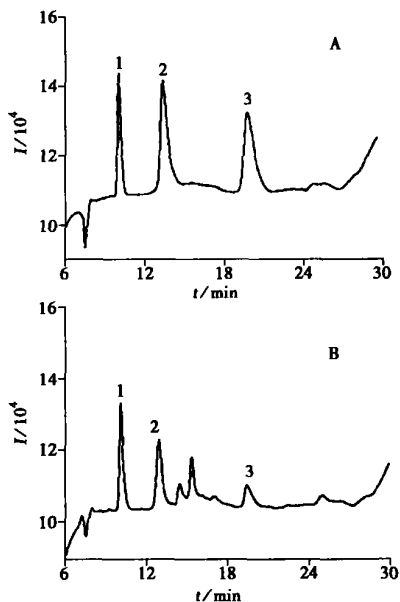


图 3 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏标准溶液 (100 mg/L) (A) 和 MAE 提取液 (B) 的色谱图

Fig. 3 The chromatograms of the standard solutions (100 mg/L) (A) and the extract (B)

1. Lycorine; 2. Lycoramine; 3. Galanthamine

表 2 标准工作曲线、线性范围、检出限、回收率和精密度

Table 2 The calibration curves, detection limits, linear ranges, recoveries and precision of alkaloids

Compound	Calibration curve*	Correlation coefficient	Linear range	Detection limit	Recovery	RSD
			$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	m / ng	$R / \%$	$s_r / \%$
Lycorine	$A = 6.904\rho - 6.092$	0.999 9	5.0~400	5.0	85	2.2
Lycoramine	$A = 11.557\rho + 50.825$	0.999 2	5.0~400	5.1	91	5.7
Galanthamine	$A = 13.376\rho - 2.827$	0.999 6	5.0~400	10.2	92	4.4

* A is peak area, ρ is content, mg/L

2.4 微波辅助提取法与溶剂回流提取法的比较

采用 SRE 法与 MAE 法在相同提取条件下比较研究了石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的提取率, 结果见图 4。

结果表明, 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的提取率 SRE 法约为 MAE 法的 2/3。SRE 要达到相当的提取率则要 30 min 以上。与传统的 SRE 法相比, 在具有搅拌装置的密闭微波系统中进行提取, 溶剂和细胞内的极性物质在微波作用下迅速“体加热”, 因而溶剂回流效果、传热效率以及提取的重复性更高, 因此采用 MAE 提取石蒜中生物碱, 快速、高效。

2.5 样品分析

本文对湖南、广东等 10 个不同地区的石蒜样品按实验方法提取石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱, 然后采用 HPLC 法测定了它们的含量, 结果分别见表 3。结果表明, 不同产地的石蒜提取液颜色深浅各不相同, 其石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏含量相差较大, 分别在 0.23~1.43、0.09~0.76 和 0.03~0.23 mg/g 之间, 这与石蒜的生长、气候及环境有关。

表 3 样品分析结果 ($n=3$)Table 3 The analytical results of samples from different regions ($n=3$)

Origin	Lycorine		Lycoramine		Galanthamine	
	Determined value	RSD	Determined value	RSD	Determined value	RSD
	$w / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$s_r / \%$	$w / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$s_r / \%$	$w / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$s_r / \%$
Qitouping(企头坪)	0.49	2.9	0.29	6.4	0.03	4.7
Huangpu(黄圃)	0.23	0.5	0.09	3.5	0.11	1.2
Yangshan(阳山)	1.00	1.1	0.57	0.9	0.05	3.2
Xiushui(秀水)	1.17	4.6	0.60	0.5	0.04	1.4
Shanxi(三溪)	0.33	3.0	0.10	2.4	0.23	2.6
Qingyun(庆云)	0.34	0.6	0.48	4.0	0.10	1.5
Pingshi(坪石)	1.43	3.0	0.76	2.2	0.07	4.1
Hunan(湖南)	1.03	5.1	0.56	1.9	0.18	2.6
Guangdong(广东)	0.97	1.4	0.46	2.7	0.09	3.8

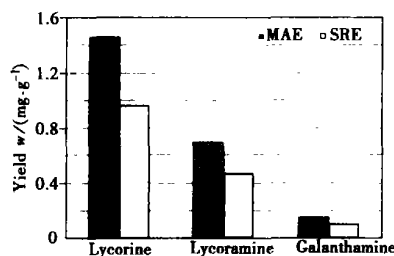


图 4 MAE 与 SRE 法提取率的比较
Fig. 4 Comparison of the extraction yields of alkaloids obtained with MAE and SRE. sample mass 2.0 g; particle size 0.18 mm; solvent volume 30 mL; temperature 80 °C; extraction time 10 min

参考文献:

- [1] 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, 1999: 207-210
- [2] 中国科学院上海药物研究所编. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 276-277.
- [3] 王晓燕, 黄敏仁, 韩正敏. 石蒜属植物中加兰他敏的分离提取及其应用[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(4): 79-82
- [4] GANZLER K, SZNAJI SALGO A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique[J]. 1990, 520: 257-262
- [5] 李核, 李攻科, 张展霞. 微波辅助萃取技术的进展[J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1261-1268
- [6] 张俊梅, 王明新, 申雅维, 等. 石蒜科生物碱的研究. 薄层色谱鉴别石蒜生物碱和高效液相色谱法测定加兰他敏的含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(6): 993
- [7] KREH M, MATUSCH R, WILTE L. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of *Amaryllidaceae* alkaloids[J]. Photochemistry, 1995, 38: 773-776
- [8] 栾伟, 李攻科. 石蒜中加兰他敏的微波辅助提取分离和分析研究[D]. 广州: 中山大学硕士研究生毕业论文, 2004
- [9] 汤大卫. 微波提取[J]. 医药工程设计杂志, 2003, 24(5): 5-6