

微波辅助提取龙葵中总生物碱的研究

刘 覃,陈晓青*,蒋新宇,吴升德

(中南大学化学化工学院,长沙 410083)

摘 要:本文对龙葵中总生物碱(Total steroidal alkaloids, TSA)的微波辅助提取(Microwave-assisted extraction, MAE)工艺、作用机理及对成分的结构影响进行了系统的研究。以酸性染料比色法为分析手段,设计正交试验得到了最佳提取工艺:以 95%乙醇为溶剂,料液比 1:20,在 585 W 下提取 8 min;用扫描电镜(SEM)对样品处理前后形貌进行了观察,揭示了微波作用机理与细胞结构变化有关。同时薄层色谱(TLC)、反相高效液相色谱(RP-HPLC)定性分析显示,微波对有效成分的结构没有造成影响。

关键词:龙葵;总生物碱(TSA);微波辅助提取(MAE)

中图分类号:R284.2;Q946.88

Study on the Microwave-Assisted Extraction of the Total Steroidal Alkaloids from *Solanum nigrum* L.

LIU Qin, CHEN Xiao-qing*, JIANG Xin-yu, WU Sheng-de

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: The microwave-assisted extraction (MAE) of the total steroidal alkaloids (TSA) from *Solanum nigrum* L. was systematically studied, including the optimum condition, mechanism of the extraction and the effect on the active components. The extract was analysed by acidic dye colorimetry and the optimized procedure determined by the orthogonal experiments are as follows: extraction with the 95% ethanol for 8 min under the power of 585 W. The Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs revealed that the difference of the extraction was related to the structural changes of the plant cells. Meanwhile, the results of the TLC and RP-HPLC showed MAE has no effect on the structures of the TSA.

Key words: *Solanum nigrum* L.; total steroidal alkaloids; microwave-assisted extraction

龙葵(*Solanum nigrum* L.),茄属,一年生草本植物,全国大部分省区均有分布。近年来,含龙葵的复方药物广泛用于治疗各种肿瘤^[1],对肝癌^[2]、肺癌^[3]、膀胱癌^[4]和胃癌有显著疗效。寻找行之有效的的方法来得到其抗癌活性成分是医学界和化学界的共同课题。受大多数生物碱具有生物活性的启示及几十年来对生物碱的研究表明,龙葵的抗癌活性成分可能为其中的生物碱成分。它主要由澳洲茄碱(如图 1)和澳洲茄边碱组成^[5],甙元均为澳洲茄胺。而目前国内除梁生旺等^[6],对龙葵的研究极少,相关的提取工艺及快速测定研究更是未见报导。生物碱的提取方法常见为回流提取法。但存在费时多、

且提取效率低下的问题。新兴起的超临界提取法又由于设备要求较高等原因未能普及。微波辅助提取相对来说,自 Ganzler^[7]1986 年首次应用于天然植物活性成分的浸提过程之后,以其简便易行、省时高效的特点在实验室研究中得到广泛采纳。但是有关其提取机理的报导却甚少^[8,9],对原料组织的细胞结构变化研究更是屈指可数。基于以上,本文选择微波辅助提取法对龙葵(*Solanum nigrum* L.)中总生物碱的最佳提取工艺条件及作用机理进行了系统研究。以酸性染料比色法对 TSA 进行了定量分析,同时以 SEM 以及 TLC、RP-HPLC 分析手段对微波的作用机理进行了相关研究。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

收稿日期:2004-07-23

接受日期:2004-10-19

*通讯作者 Tel:86-731-8879558;E-mail:xqchen@263.net

龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 全草干燥品, 购于长沙市九芝堂药房, 粉碎后过 200 目筛, 备用。标准品澳洲茄胺 (Solasodine) 标准品 (纯度 > 95%), MP Biomedicals, Inc; 硅胶 (100 ~ 140 目) 购于青岛海洋化工厂。乙腈为 CR 级, 95% 乙醇、甲醇、三氯甲烷、冰醋酸、浓氨水及其它试剂均为 AR 级。

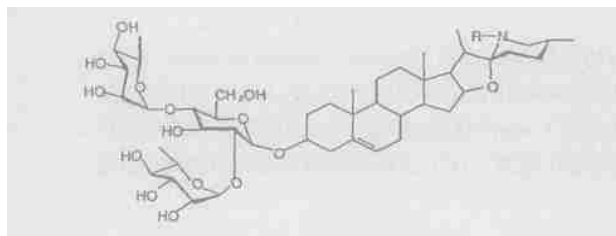


图 1 澳洲茄碱的结构式

Fig. 1 The structure of solasodine

1.2 仪器

紫外可见分光光度计 756 C 型, 上海分析仪器厂; WP650D 型微波反应器, 南京 Sanle 电器公司 (总输出功率为 650 W); 高效液相色谱仪 (LC-10AT); 检测器 (SPD-10A); 色谱柱 (ODS 4.6 × 250 m, 5 m); FZI02 型微型植物试样粉碎机, 河北省黄骅市齐家务科学仪器厂。

1.3 提取方法

回流提取: 准确称取干燥龙葵全草粉 5.0 g, 加入一定量 95% 乙醇, 一定温度下回流提取不同时间 (2、3、4、5、6 h), 进行测定。

微波提取 (MAE): 准确称取干燥龙葵粉 5.0 g, 浸泡 5 min 后按预先设定好的提取条件 (时间、功率和料液比) 进行提取。流水冷却待测。

提取液经减压蒸干后溶于 10 mL 10% HAc 溶液中, 准确移取等体积氯仿进行萃取, 弃去氯仿层。用浓氨水调 pH 值至 9 ~ 10, 再用 10 mL 氯仿萃取, 取氯仿层待测。该氯仿层与浓硫酸有显色反应, 与碘-碘化钾试剂有沉淀反应^[10,11]。

1.4 分析测定方法

1.4.1 酸性染料比色法测定 TSA 含量^[10]

准确称取澳洲茄胺 (Solasodine) 0.0100 g 溶于 25 mL 氯仿, 得 0.4 mg/mL 标准品溶液。分别移取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 到 25 mL 容量瓶中, 定容。再各移取 5.0 mL 至分液漏斗中, 加入 2.0 mL 溴甲酚绿指示液和 2.5 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液进行萃取, 取氯仿层。以空白液为参比, 在所扫描到的最大吸收处 418 nm 处 (如图 2) 测定不同浓度标准品的吸

光度, 绘制标准工作曲线, 如图 3 所示。回归方程 $Y = 0.1528 + 0.04406X$ (Y 为吸光度 A , X 为溶液浓度 c)。回归系数 $R = 0.99943$, $SD = 0.00869$, $P < 0.0001$ 。样品液同以上操作进行测定。

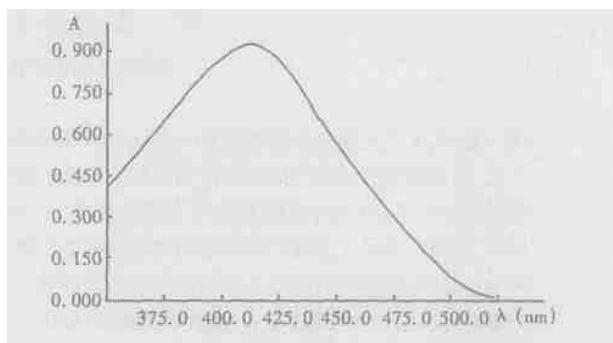


图 2 标准溶液显色后的吸收光谱

Fig. 2 Absorbance spectra of standard solution after color reaction

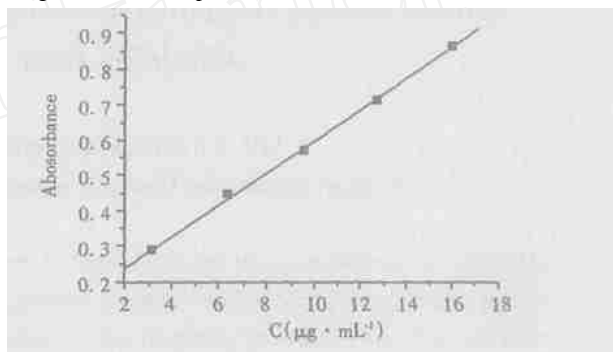


图 3 澳洲茄胺的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of the solasodine

1.4.2 SEM 分析

使用 JSM-6460LV 型扫描电镜观察在各种条件下处理过的龙葵样品的纤维横截面的显微形貌。加速电压设为 10 kV。同时, 为了增强龙葵样品的导电性能, 用 JCM 自动覆膜仪在样品的观察面上溅射一层金膜, 并用导电碳胶带固定在样品台上。

1.4.3 TLC 分析

将 1.3 项下所得氯仿层于硅胶板 (GF₂₅₄) 上点样。展开剂为 9:1 (V/V) 的氯仿: 甲醇溶液。碘蒸气显色^[12]。

1.4.4 RP-HPLC 分析

准确称取 0.0100 g 澳洲茄胺溶于 25 mL 甲醇 (AR) 中备用。将 1.3 项下所得样品液拌入硅胶, 蒸干后上柱, 收集 10 mL 氯仿: 甲醇 (1:1, V/V) 洗脱液, 减压蒸干后用甲醇 (AR) 定容后经 0.4 μm 微孔膜过滤后进样, 以峰高增加法定性。色谱流动相为乙腈-磷酸二氢钾 (0.02 mol/L, 75:25, V/V); 检测波

长 208 nm;柱温:30 ;进样量:20 μL 。

1.5 正交试验设计

微波辅助提取的预备实验结果表明,提取时间、提取功率及料液比对提取效率的影响较大。因此我们选择三因素三水平的正交试验来寻求最佳工艺条件。由单因素实验知在固定其它条件的情况下,TSA的得率在8 min后开始下降,而随着功率和料液比的增加而增加。以此为依据,考虑到仪器的损耗和溶剂的用量,我们确定了因素的水平范围并根据正交试验结果进行了方差分析(如表3~5)。

2 结果与讨论

2.1 回流提取法与微波法提取 TSA 的比较

对于回流提取法,在预实验的单因素试验中,我们发现 TSA 的得率分别在5 h后趋于稳定(见表1)、在40 及1:20后开始下降。因此,准确称取5.0 g龙葵粉末,以1:20料液比分别进行回流提取(Reflux extraction)(40 下)和微波提取(MAE)(325 W下),不同时间的提取量见表1。

表1 回流提取与MAE提取法的比较

Table 1 Comparison of conventional reflux extraction and MAE on yield

回流提取(Reflux extraction)		MAE	
提取时间 Extraction time(/h)	产率 Yield ($\mu\text{g/g}$)	提取时间 Extraction time(/min)	产率 Yield ($\mu\text{g/g}$)
2	2.188	4	5.048
3	4.684	6	7.635
4	7.000	8	10.77
5	8.316	10	9.178
6	8.403	12	7.952

比较实验结果表明,回流提取5 h后基本趋于

表4 方差分析

Table 4 ANOVA analyses

变异来源 Variance origin	误差平方和 Sum of square error	自由度 Freedom	均方和 Mean square	均方和比 Mean square rate	F0.05
时间 Time	114.843	2	57.422	0.923	
功率 Power	236.808	2	118.404	1.904 **	5.140
料液比 Process ratio	21.523	2	10.762	0.173	
方差 Variance	373.17	6			

由直观分析知,得率最高组合为 $A_2B_1C_2$,达到26.38 $\mu\text{g/g}$ 。经方差分析,影响显著性顺序为:功率>时间>料液比。因此提取的最佳工艺条件为: $A_2B_3C_2$,即以料液比1:20,在585 W功率下提取8 min。

2.3 扫描电镜分析结果

不同的提取方法对龙葵的细胞组织的结构影响是

稳定,6 h时的提取量为8.403 $\mu\text{g/g}$ 。而MAE在8 min时已达到最高产率10.77 $\mu\text{g/g}$,8 min后产率下降,可能是活性成分由于温度过高而导致分解的缘故,具体原因有待下一步的研究工作。

2.2 正交实验结果

因素水平表及方差分析结果如表2~4所示。

表2 因素水平表

Table 2 Factors and levels table

水平 Levels	微波辐射时间 Microwave radiation time (T) / min	微波辐射功率 Microwave radiation power (P) / W	料液比 Process ratio (c) / mL
1	6	325	1 16
2	8	455	1 20
3	10	585	1 24

表3 正交试验结果

Table 3 The result of orthogonal experiments

No.	A	B	C	提取得率 Extraction yield/ ($\mu\text{g/g}$)
	微波辐射时间 Microwave radiation time (T) / min	微波辐射功率 Microwave radiation power (P) / W	料液比 Process ratio (C) / mL	
1	1	1	1	22.25
2	1	2	2	13.26
3	1	3	3	6.863
4	2	1	2	26.38
5	2	2	3	17.76
6	2	3	1	9.860
7	3	1	3	10.22
8	3	2	1	12.90
9	3	3	2	4.684
k_1	14.146	19.600	14.987	
k_2	17.987	14.627	14.761	
k_3	9.255	7.121	11.599	
R	8.732	12.479	3.388	

不同的。图4为未经处理的龙葵样品的SEM图,图5~7为经过不同方法提取处理后的样品SEM图。

显然,经不同处理过的样品组织形貌差异较大。未处理过的样品组织细胞呈密闭状态,表面粗糙(如图5)。而回流提取3 h后的样品组织(如图6)细胞呈扩张状态,有效成分释放出来。但各个细胞保持

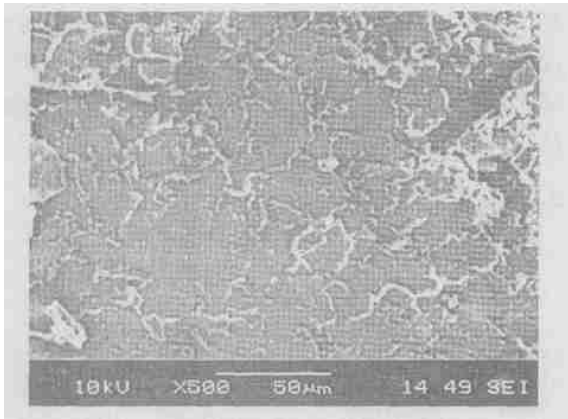


图5 未处理过的样品组织

Fig. 5 Untreated specimen

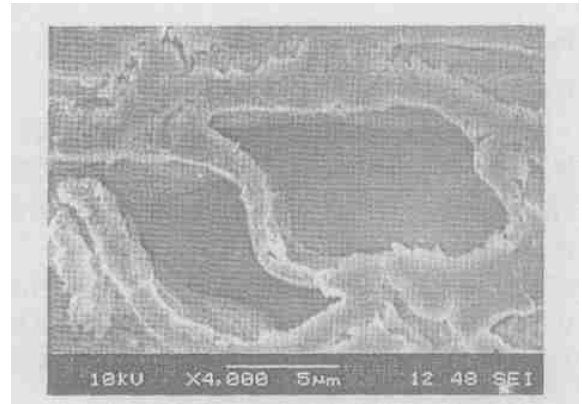


图7 微波提取 3 min 后的样品组织

Fig. 7 Specimen after MAE for 3 min

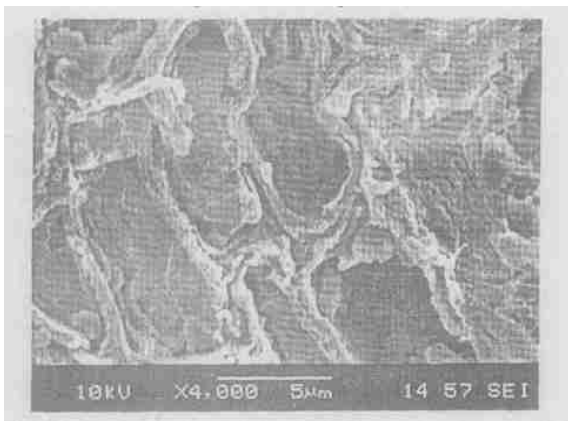


图6 回流提取 3 h 的样品组织

Fig. 6 Specimen after reflux extraction for 3 h

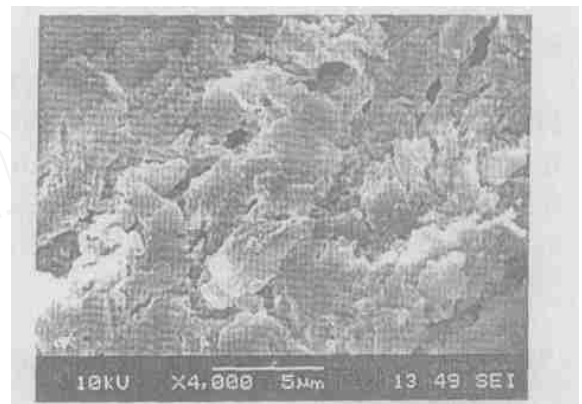


图8 微波提取 8 min 后的样品组织

Fig. 8 Specimen after MAE for 8 min

规则形态。

而微波提取后的样品组织细胞形态变化差异更为显著(如图 7,8),微波提取 3 min 后的样品组织细胞与回流提取处理结果一样呈扩张状态,所不同的是细胞壁好像由于温度的突然升高而发生扭曲,形状不再规则且细胞内显现中空状态。微波处理 8 min 后的样品组织(如图 8),细胞壁已经完全破碎而不再有规则形状存在,有效成分从而大量涌出,证实了 Pare^[8]等人所提出的微波作用机理与分子水平的细胞破壁作用有关,同时也解释了微波提取效率高于回流提取的原因。

2.4 MAE 对生物碱结构的影响

将经过回流提取和微波提取后的提取液按 1.3 项下处理后进行显色反应,并按 1.4.3 项下进行 TLC 检测。两者与硫酸及碘-碘化钾试剂反应均显阳性。TLC 的展开结果也表明(如图 9),两种提取方式所得的生物碱成分显色位置与标准品基本一致,所不同的是微波提取液显色点面积稍大于回流

提取液,即前者得率稍高。这也符合前面表 1 的数据。

在此基础上,将微波处理后的提取液按 1.4.4 项下进行 RP-HPLC 检测(如图 10~12)。标准品与提取处理液的色谱分离图基本一致,保留时间相同,为 6.51 min。追加标准后(如图 12),保留时间不变,峰高增加,证实为同一物质。

因此,根据所有分析结果证实,我们判定微波作用并没有改变 TSA 的结构。

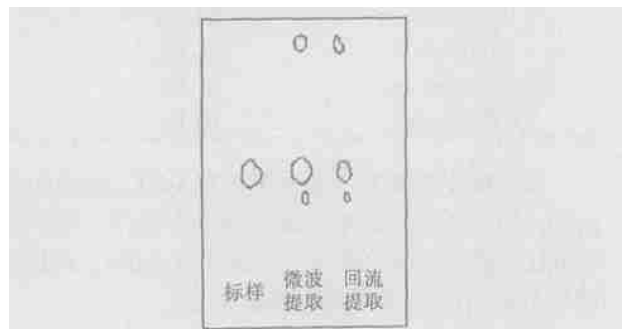


图9 TSA 的 TLC 展开图

Fig. 9 The result of TLC for TSA

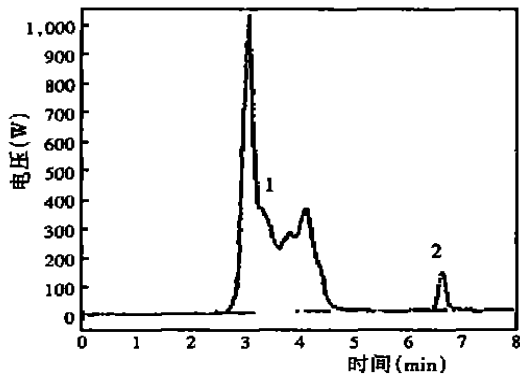


图 10 Solasodine 标准品的色谱图

Fig. 10 HPLC Chromatogram of solasodine standard

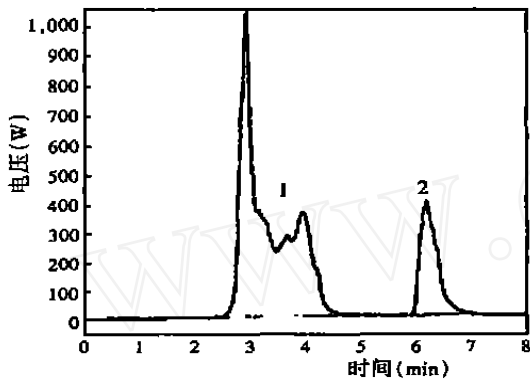


图 11 微波处理后的样品色谱图

Fig. 11 HPLC Chromatogram of sample after MAE

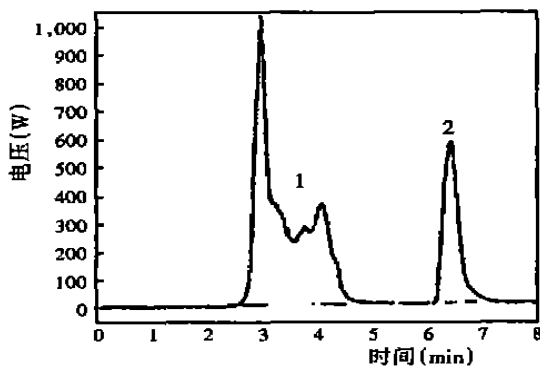


图 12 标准品 + 微波处理后样品色谱图

1-甲醇 2-澳洲茄胺

Fig. 12 HPLC Chromatogram of standard and sample

1-Methanol 2-Solasodine

3 结论

3.1 微波提取时间短,提取效率高。微波提取因素影响显著性顺序为:功率 > 时间 > 料液比。提取的最佳工艺为料液比 1:20,585 W 功率下提取 8 min。

3.2 微波作用机理与细胞结构变化有关。通过细

胞破壁作用,使有效成分溢出从而提高提取效率。

3.3 微波作用对于总生物碱结构基本无影响。

参考文献

- 1 LU CX(吕翠霞),LI XR(李秀荣). The general study of clinic and experiment on the treatment of hepatic cellular carcinoma in middle or advanced stage with Chinese heat-clearing and detoxifying herb. *Journal of Shandong University of Traditional Chinese medicine* (山东中医药大学学报),1999,23(3):224-227
- 2 Ding GD(丁国栋),Yang GW(杨广文),Zhang XI(张晓健), et al. The evaluation on the clinical efficacy of the treatment on hepatic carcinoma in middle or advanced stage with Dongshen injection. *Study and Clinical Application on Tumor*(肝癌研究与临床),1999,11(2):123-124
- 3 Wang YQ(王云启). The clinical study of treatment on hepatic cellular carcinoma with pleural liquid by Chinese and Western medicine. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine* (辽宁中医杂志),2000,27(3):129-129
- 4 Lei XM(雷相明). 30 examples of treatments on bladder carcinoma with Chinese and Western medicine. *China's Naturopathy* (中国民间疗法),1999,12:16
- 5 Liu CM(刘成梅),You H(游海). The separation and application of the active components in natural products(天然产物有效成分的分离与应用). Beijing: Chemistry Industry Press, 2003. 154-155
- 6 Liang SW(梁生旺),Wang YM(王浴铭),Zhang CQ(张广强). Determination of solasodine in *Solanum nigrum* L. by TLC. *Chinese Pharmaceutical Journal* (中国药学杂志),1997,32(8):494-493
- 7 Ganzler K A novel sample preparation method for chromatography. *J Chromatography*,1986(371):299
- 8 Pare J RJ, Signomin M, Lapointe J. Microwave-assisted natural products extraction. US Patent. 5002784,1991-03-26
- 9 Pare J RJ. Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore. European Patent Application 0485668 A1,1992-2-11
- 10 Feng F(冯芳). *Pharmaceutical analysis* (药物分析). Beijing: Chemistry Industry Press. 2003. 148,158-160
- 11 Zhou CY(周成勇),Feng WC(冯武臣),Zhang BX(张宝秀). Alkaloids in Chinese herbal drugs. *Journal of Southeast Shanxi Teachers College* (晋东南师专学报),1999,3:62-63
- 12 Xiao CH(肖崇厚). *Chemistry of Chinese Medicine* (中药化学). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1996. 103-107