

不同提取方法对小花棘豆 总生物碱提取率的影响^①

王帅 陈根元 吴书奇 胡建军 马春晖^②

(新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室/塔里木大学动物科学学院 新疆阿拉尔市虹桥南路1号 843300)

摘要 采用乙醇浸提-有机溶剂萃取法、超声波辅助提取法、乙醇浸提-柱层析分离法3种方法提取小花棘豆中的总生物碱,比较3种方法总生物碱的提取率。3种方法的总生物碱提取率分别为0.0008%、0.0032%、0.0080%。故选用乙醇浸提-柱层析分离法。通过正交试验,得到乙醇浸提最佳工艺条件为:提取温度30℃,乙醇浓度75%,物料比1:15(g/mL)。表明以75%乙醇为溶剂,用乙醇浸提-柱层析分离法制备小花棘豆总生物碱,获得率最高。

关键词 小花棘豆;总生物碱;提取方法

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)06-2892-06

1 引言

小花棘豆(*Oxytropis Glabra* DC)是豆科棘豆属植物,形态变异较大。多生长于海拔1500—2500m、降雨量为200—300mm的天山草原,广泛分布于天山东部的昌吉回族自治州呼图壁县、昌吉市及乌鲁木齐县,天山南部巴音郭楞蒙古自治州的焉耆县、和静县、和硕县和乌什县等地区^[1]。每年各地牲畜因采食该草而大批中毒^[2,3],严重危害了新疆草原畜牧业的发展。

现已发现导致家畜小花棘豆中毒的主要物质是生物碱。目前从小花棘豆中已分离鉴定出的生物碱按照其结构特征大体上可分为三大类:一类是吲哚里西啶生物碱类,代表性化合物为苦马豆素和氧化氮苦马豆素;二类是喹诺里西啶生物碱类,代表性化合物为臭豆碱、黄华碱、羽扇豆碱、N-甲基基金雀花碱等;三类是哌啶生物碱类,代表性化合物为2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮^[4,5]。

在一定程度上经典的生物碱提取分离方法是凭经验摸索进行,方法相对简单。为了弄清新疆南疆的小花棘豆生物碱成分,更好地防治家畜中毒,采用乙醇浸提-有机溶剂萃取法、超声波协助提取法、乙醇浸提-柱层析分离法3种方法提取小花棘豆中的总生物碱,比较3种方法的提取率,旨在找到一种周期短、简便、易于操作提取总生物碱的方法。

2 实验部分

2.1 实验材料、仪器与试剂

小花棘豆样品于2010年8月采于新疆阿拉尔市托喀依乡(40°33'24"N,81°15'30"E),样品由塔里木大学动物科学学院草业科学学科组鉴定。采用随机取样法,取地上部分,阴干、粉碎、过20目筛。样品采集时正值结实期。

① 新疆生产建设兵团博士基金项目(08BB08);新疆兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(HS20904)

② 联系人,电话:(0997)4681616;E-mail:chunhuima@126.com

作者简介:王帅(1985—),男,山西省长治市人,在读硕士,主要研究方向为饲料新资源开发与利用。

收稿日期:2011-01-10;接受日期:2011-02-24

4001 型旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司); 2006-11(Db-2) 型电热板(常州国华电器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Carry 100 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 Varian 公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海博讯实业有限公司); GCD-136x 型油回转真空泵(日本东京理化器械株式会社); Direct-Q3 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

薄层层析硅胶 G(青岛海洋化工有限公司); 羧甲基纤维素钠 800-1200(天津市博迪化工有限公司); 盐酸小檗碱标准品(纯度 99%, 美国 Sigma 公司); 其余试剂均为国产分析纯。实验用水为去离子水。

2.2 实验方法

2.2.1 总生物碱的提取方法

(1) 乙醇浸提-有机溶剂萃取法: 称取已处理好的小花棘豆粉 1kg, 按物料比(g/mL) 1:10 加入 75% 乙醇浸提, 浸提 24h, 更换溶媒反复 3 次。收集浸提液, 减压回收乙醇, 得到小花棘豆醇粗提物。粗提物阴干后应用石油醚、乙酸乙酯、氯仿、正丁醇 4 种有机溶剂依次萃取, 减压回收试剂, 结合生物碱颜色反应与薄层层析检查, 得到小花棘豆总生物碱, 计算提取率。

(2) 超声波辅助提取法: 称取已处理好的小花棘豆粉 1kg, 按物料比(g/mL) 1:10 加入蒸馏水浸渍 12h, 然后用 40kHz 超声波处理 1h, 更换溶媒并在相同条件下重复 1 次, 浓缩后 1500r/min 离心 10min 除杂, 加入适量 1mol/L 氨水调 pH 至 8—10, 用氯仿萃取多次; 减压回收氯仿, 即得小花棘豆总生物碱, 计算提取率。

(3) 乙醇浸提-柱层析分离法: 小花棘豆醇提取物制备同方法(1)。得到的提取物用 1mol/L HCl 溶解后过滤, 滤液上 732 强酸性阳离子交换树脂, 用 1mol/L 氨水洗脱, 收集洗脱液, 浓缩后阴干。使用氯仿多次溶解, 直至生物碱反应为阴性。回收氯仿后即得到总生物碱, 计算提取率。

2.2.2 薄层层析检查

常规方法制备硅胶板: 取不同方法制备的小花棘豆总生物碱用适量甲醇溶解, 毛细管点样, 分别经氯仿: 甲醇: 氨水: 水(70:26:2:2)、乙酸乙酯: 乙醇: 氨水(4:1:1)、丙酮: 乙醇: 氨水(6:1:1) 3 种展开剂^[6-11]上行法展开, 取出后挥干溶剂。喷洒碘化铋钾试剂, 记录斑点颜色及形状, 计算 R_f 值(比移值)。

2.2.3 样品中生物碱含量的测定

样品的准备: 分别称取 3 种提取方法得到的总生物碱 0.1g 左右。用 95% 乙醇溶解并定容至 100mL, 备用。

样品吸收波长的确定: 全波长(190—800nm)扫描确定待测液检测波长。通过小花棘豆总生物碱紫外-可见(190—800nm)全波长扫描(图 1), 样品在 210nm 处有最大吸收峰值。

标准品的制备: 准确称取盐酸小檗碱标准品 10.0mg, 95% 乙醇完全溶解后, 再用 95% 乙醇定容于 50mL 棕色容量瓶中, 摇匀后做为盐酸小檗碱标准品母液, 准确移取标准品母液 10.0mL 于另一 50mL 棕色容量瓶中, 95% 乙醇定容至刻度并摇匀, 即得盐酸小檗碱标准品工作液。标准品母液与工作液均保存于 4℃ 恒温冰箱中。

校准曲线的绘制: 准确移取盐酸小檗碱标准品工作液 1.0、2.0、4.0、8.0、10.0、20.0mL, 分别置于 50mL 容量瓶中, 95% 乙醇定容至刻度并摇匀。以 95% 乙醇作为参比液, 于 345nm 波长下测定吸光度(A)值, 以吸光度值为纵坐标 y , 标准生物碱质量为横坐标 x , 得出回归方程 $y = 7.031x$, $R^2 = 0.9998$ (图 2)。

样品检测: 取 20.0mL 待测溶液于 50mL 容量瓶中, 95% 乙醇定容至刻度并摇匀, 于测得的最佳吸收波长值下检测。

2. 2. 4 数据分析及采用软件

实验数据用 Excel 进行处理, 数据分析用 SPSS 11. 5 中 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析。

3 结果与讨论

3. 1 最佳测定波长的选择

通过小花棘豆总生物碱紫外-可见(190—800nm) 全波长扫描(见图 1), 样品在 210nm 处有最大吸收峰值。

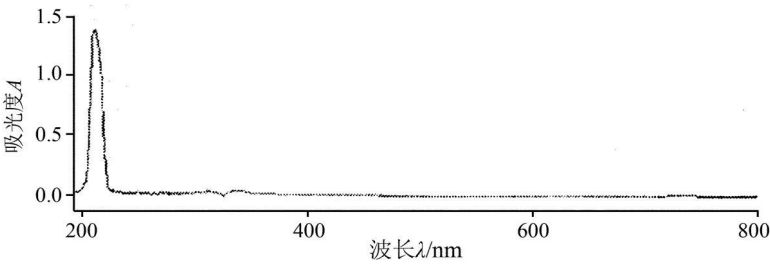


图 1 小花棘豆总生物碱全波长(190—800nm) 扫描

3. 2 校准曲线的绘制

使用盐酸小檗碱作为标准品, 在紫外 345nm 波长下测定吸收值, 以吸光度值为 y , 小檗碱质量为横坐标 x 得出回归方程 $y = 7. 031x$, $R^2 = 0. 9998$ (见图 2) 。

3. 3 不同提取方法的总生物碱得率

根据表 1, 乙醇浸提-柱层析分离法总生物碱得率最高, 乙醇浸提-有机溶剂萃取法总生物碱得率最低。

3. 4 薄层层析(TLC) 检查小花棘豆总生物碱

使用选定的展开剂体系进行薄层层析分析, 硅胶板显色后样品的斑点和 R_f 值见表 2。不同提取方法得到的总生物碱在不同展开剂体系下使用碘化铍钾显色, 显色较为明显, 但有些斑点有拖尾现象。根据表 2 显示, 乙醇浸提-有机溶剂萃取法得到的总生物碱在乙酸乙酯: 乙醇: 氨水(体积比, 4: 1: 1) 和丙酮: 乙醇: 氨水(体积比, 6: 1: 1) 的展开条件下效果相对较好, 均可呈现出 5 个斑点; 超声波辅助提取法和乙醇浸提-柱层析分离法得到的总生物碱在 3 种展开体系下呈现出的斑点数相同, 分别为 6 个和 8 个。乙醇浸提-柱层析分离法得到的斑点数最多, 从一定程度上说明该方法提取生物碱较为完全。另外, 根据王占新^[7] 报道, 薄层层析采用 Ehrlich's 试剂显色效果较好, 本实验仅采用了碘化铍钾显色, 是需要以后改进的地方。

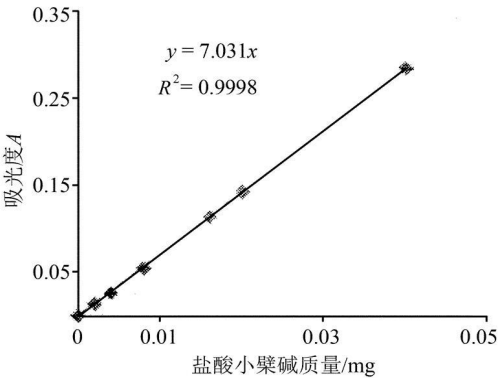


图 2 盐酸小檗碱校准曲线

表 1 不同提取方法生物碱提取率的比较 (%)

提取方法	提取率
乙醇浸提-有机溶剂萃取法	0. 0008
超声波协助提取法	0. 0032
乙醇浸提-柱层析分离法	0. 0080

表 2 小花棘豆总生物碱的薄层层析

展开剂体系	氯仿：甲醇：氨水：蒸馏水 (体积比, 70：26：2：2)	乙酸乙酯：乙醇：氨水 (体积比, 4：1：1)	丙酮：乙醇：氨水 (体积比, 6：1：1)
乙醇浸提-有机溶剂萃取法	0. 84(深红色)0. 69(淡红色) 0. 57(淡红色)0. 21(淡红色)	0. 89(深红色) 0. 73(淡红色) 0. 66(淡红色) 0. 29(淡红色) 0. 06(红色)	0. 91(深红色) 0. 74(淡红色) 0. 69(淡红色) 0. 31(淡红色) 0. 07(红色)
超声波辅助提取法	0. 90(深红色)0. 84(深红色) 0. 70(淡深色)0. 57(淡红色) 0. 49(淡红色)0. 21(淡红色)	0. 94(深红色) 0. 89(深红色) 0. 77(红色) 0. 58(淡红色) 0. 52(淡红色)0. 29(淡红色)	0. 92(深红色) 0. 79(红色) 0. 57(淡红色) 0. 54(淡红色) 0. 33(淡红色)
乙醇浸提-柱层析分离法	0. 92(深红色)0. 86(深红色) 0. 69 (红色) 0. 48 (红色) 0. 36(淡红色) 0. 29(淡红色) 0. 23(淡红色)0. 11(淡红色)	0. 95(深红色) 0. 88(深红色) 0. 70 (红色) 0. 51 (红色) 0. 39(淡红色) 0. 32(淡红色) 0. 24(淡红色)0. 10(淡红色)	0. 98(深红色)0. 87(深红色) 0. 74 (红色) 0. 57 (红色) 0. 43(淡红色) 0. 32(淡红色) 0. 23(淡红色)0. 13(淡红色)

3. 5 乙醇浸提法最佳工艺的选择

为了获得以乙醇为提取剂时, 提取小花棘豆总生物碱的最佳工艺条件, 在做预试验的基础上, 利用正交法“均衡分散”的特点, 选取浸提温度、乙醇浓度、物料比, 以此 3 因素作为考察因素, 并结合多次提取的经验每因素又选取 3 个水平安排试验, 以总生物碱的得率为衡量提取效率的客观指标, 优选最佳提取工艺。因素水平见表 3。

根据总生物碱提取率的高低(表 4), 乙醇提取工艺的排列如下: 处理 7> 处理 6> 处理 5> 处理 2> 处理 1> 处理 3> 处理 8> 处理 9> 处理 4。实验所得最佳提取条件为处理 7, 即提取温度 30℃, 乙醇浓度 75%, 物料比 1:15(g/mL)。实验路线和正交试验因素的设计在参考文献资料的基础上^[5,6]确定, 并通过了预实验初选。乙醇的浓度设计在 75%—95% 是因为小花棘豆中生物碱种类较多, 仅使用水或乙醇做溶剂不能完全提取出小花棘豆中所有种类的生物碱。而且小花棘豆为草本植物, 材料的吸湿性比较强, 所以选择的物料比相对比较大, 在第一次浸提时加的量比较多。游离的生物碱及生物碱盐一般能溶于甲醇和乙醇^[12]。虽然甲醇的沸点低于乙醇, 而且极性比乙醇大, 对生物碱盐类的溶解性强于乙醇; 但甲醇对人体的毒害亦较大, 而且甲醇的价格高于乙醇。故本实验使用乙醇作为溶剂。与陈绍淑^[5]、赵宝玉^[8]的报道一致。在提取过程中发现 95% 乙醇提取的成分中所含色素非常多, 测定生物碱之前需用石油醚将色素除掉; 85% 乙醇提取的成分较为粘稠, 对生物碱的纯化有不利的影响; 75% 乙醇提取的成分数量比较少, 颜色也淡。由此可见, 如果需要色素可以使用 95% 乙醇做提取溶剂; 如果考虑节约成本, 可以使用 75% 乙醇做提取溶剂。

表 3 因素水平表

水平	因素		
	乙醇浓度 A(%)	物料比 B(g/ mL)	浸提温度 C(℃)
1	75	1：5	20(室温)
2	85	1：10	30
3	95	1：15	40

根据多重比较分析结果(表 5), 因素 A(乙醇浓度) 总生物碱含量和吸光度的方差值与其它几种因素差异显著, 即因素 A(乙醇浓度) 对小花棘豆总生物碱提取率的影响较其他因素显著, 所以溶媒浓度是本次提取实验的第一限制性因素。根据总生物碱和吸光度的方差值分析, 提取率的影响因素排名为乙醇浓度>物料比>浸提温度。

表 4 小花棘豆提取物中总生物碱含量

序号	乙醇浓度 (%)	物料比 (g/mL)	浸提温度 (℃)	总碱含量 (%)
1	75	1 : 5	20	0.0295
2	85	1 : 10	30	0.0321
3	95	1 : 15	40	0.0242
4	75	1 : 10	40	0.0060
5	85	1 : 15	20	0.0396
6	95	1 : 5	30	0.0450
7	75	1 : 15	30	0.0591
8	85	1 : 5	40	0.0224
9	95	1 : 10	20	0.0130
均值 1	0.0315	0.0323	0.0274	
均值 2	0.0313	0.0170	0.0454	
均值 3	0.0274	0.0410	0.0175	
极差	0.0057	0.0145	0.0152	

表 5 实验影响因素多重分析比较表

方差来源	平方和 (总碱含量与 OD 值)		自由度	方差 (总碱含量与 OD 值)		F 值 (总碱含量)	F 值 (OD 值)
A(乙醇浓度)	0.196	0.544	2	0.172	0.699	3.866 ^A	4.216 ^A
B(物料比)	0.015	0.032	2	0.007	0.004	0.686 ^B	0.173 ^B
C(浸提温度)	0.038	0.054	2	0.016	0.009	0.342 ^C	0.041 ^C
误差项	0.221	0.675	6	0.041	0.046		

注：F_{0.05(2,2)} = 19; 同列数据肩标大写字母不同时表示差异极显著(P< 0.01)。

3.6 验证性试验

根据试验结果,按最佳优化条件进行 3 次试验,测得小花棘豆总生物碱提取率为 0.058±0.004%,符合实验预期,说明该方法稳定可行。

4 结论

对比 3 种提取方法,乙醇浸提-柱层析分离法提取的效果最好,总生物碱得率最高。对该方法进行优化,得到最佳提取工艺为提取温度 30℃,乙醇浓度 75%,物料比 1 : 15(g/mL)。在实验过程中,溶剂回收后还可以再重复利用,周期缩短,易于操作,是目前提取小花棘豆总生物碱最为经济简便的工艺。

参考文献

[1] 米吉提·胡达拜尔地,徐建国.新疆高等植物检索表[M].乌鲁木齐:新疆大学出版社,2000.352—355.

[2] 赵宝玉,樊月圆,樊泽峰等.我国西部草原疯草的危害及其动物中毒病的控制[J].当代畜牧,2004,24(11):31—36.

[3] 黄玉茜,张恩然,潘维锋等.疯草中毒的研究进展[J].山东科学,2003,16(4):34—36.

[4] 陈绍淑.家畜小花棘豆中毒的研究进展[J].动物医学进展,2003,24(4):36—38.

[5] 陈绍淑.小花棘豆生物碱系统分析及其活性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2003.

[6] 张伟.醉马草有毒成分的提取研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,2006.

[7] 王占新.小花棘豆化学成分、营养成分评价及疯草苦马豆素动态变化规律[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.

[8] 赵宝玉.疯草中生物碱系统分析及其毒性的比较病理学研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2001.

[9] 卢萍,赵萌莉,韩国栋等.小花棘豆毒性的危害与利用[J].草业科学,2009,26(3):97—101.

[10] 赵延涛, 万学攀, 赵宝玉等. 黄花棘豆生物碱薄层层析分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, 17(3): 51—53.

[11] 张德华, 黄仁术, 耿朝辉等. 生物碱的提取方法研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(5): 16—20.

[12] 申金龙, 孙良顺, 李峰等. 钩藤中总生物碱提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 358—375.

Effects of Different Extraction Methods on Extracting Ratios of Total Alkaloids of *Oxytropis Glabra* DC

WANG Shuai CHEN Gen-Yuan WU Shu-Qi HU Jian-Jun MA Chun-Hui

(Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology, Xinjiang Production & Construction Corps, College of Animal Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, P.R. China)

Abstract Total alkaloids of *Oxytropis Glabra* DC were extracted by 3 methods, including ultrasonic wave assisting extraction, ethanol digestion-organic solvent extraction process and ethanol digestion-column chromatography separation. The extracting ratios of total alkaloids for the methods were compared. The extraction ratios were 0.0008%, 0.0032% and 0.0080%. The third extraction is best. The optimum conditions were extraction temperature of 30℃, ethanol concentration of 75% and the ratio of mass to volume of 1:15(g/mL) through orthogonal tests. The extracting ratio of total alkaloids of *Oxytropis Glabra* DC was high by ethanol digestion-column chromatography separation with ethanol concentration of 75% as solution.

Key words *Oxytropis Glabra* DC; Total Alkaloids; Extraction Method

如何上网查阅《光谱实验室》上发表的论文 (你的论文在发表后约 1- 2 个月, 上网才能检索到)

1. 在浏览器的地址栏上输入“核心期刊”。当出现菜单后, 点击“核心期刊目录”, 再点击“中文核心期刊要目总览(2008版)”, 即可查阅各学科的“核心期刊”。若要查阅《光谱实验室》, 请查第4编: 自然科学, 再查06/07—化学/晶体学”, 第21号即是。
也可以在浏览器的地址栏上输入 www.google.cn 或 www.baidu.com, 再输入“核心期刊”后, 点击“中文核心期刊要目总览(2008版)”, 即可查阅各学科的“核心期刊”。
 2. 上中国期刊网(中国知网 cnki.net), 点击“核心期刊导航”。
 - 1) 在浏览器上输入 www.cnki.net 然后回车, 进入中国知网(即中国期刊网)首页。
 - 2) 找到“学术文献总库特色导航”, 点击“期刊大全(9268种)”, 进入“中国学术文献网络出版总库”。
 - 3) 点击左侧“核心期刊导航”, 首页出现后, 找到“第四编自然科学(351种期刊)”, 即可查阅自然科学各学科的“核心期刊”。若要查阅《光谱实验室》, 请点击“化学/晶体学类”, 出现期刊的“图形方式”(即期刊的封面)后, 在第1页的第3排左起第2图即为《光谱实验室》。点击《光谱实验室》即可查阅有关内容。
- 目前, 《光谱实验室》是中国期刊网/中国知网独家网上出版期刊, 因而在其他网站上将有可能查不到本刊内容。

《光谱实验室》编辑部