

微波萃取-分光光度法研究 关黄柏中小檗碱的提取^①

张海容^② 赵芳慧 陈金娥

(忻州师范学院生化分析技术研究所 山西省忻州市 034000)

摘要 微波萃取是利用微波能来提高萃取率的一种新技术,用正交法优化微波萃取条件,与传统的酸碱法浸提小檗碱进行了对比研究,确定了微波萃取技术用于中药关黄柏中提取小檗碱的工艺条件。结果表明,使用微波萃取的优化条件为:80℃萃取温度,固液比为1:15,时间1.5min,传统溶剂法:萃取温度70℃,固液比为1:20,时间24h,与稀硫酸浸泡提取法相比,微波萃取工艺提取时间大大缩短,产量可提高30%,工艺操作简便、省时、节能,易于控制。

关键词 微波萃取, 关黄柏, 分光光度法, 小檗碱。

中图分类号: R284.2; O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)03-0526-04

1 前言

黄柏(*Phellodendron Amurense Rupr*)是芸香科植物,因产地不同分为川黄柏(四川省产),关黄柏(我国东北地区产)等。现代药理研究证明,黄柏所含的有效成分为小檗碱(Berberine)。小檗碱是毛茛科植物黄连中的有效成分,也是芸香科植物黄柏中的主要有效成分^[1],也可人工合成。常用于治疗痢疾、急性肠胃炎、慢性胆囊炎,以及眼结膜炎、化脓性中耳炎等疾病,均有显著疗效,深受人们青睐。近几年来,通过医药学家的深入研究,又开拓了一些新的用途^[2],比如:抗心律失常,抗心力衰竭,抗血小板聚集,治原发性高血压,治糖尿病等,在临床上有广泛的用途。

小檗碱是黄色的针状结晶,微溶于水 and 乙醇,较易溶于热水和热乙醇中,几乎不溶于乙醚。盐酸盐难溶于水,但易溶于热水,而硫酸盐则易溶于水^[3]。根据这些特性,传统提取小檗碱一般采用酸浸泡法、酸醇法、碱提取法、醇提取法^[4],固液热提取法^[5],并用柱层析加以分离等。其中共同特点是:将药品粉碎,用所选试剂浸泡、回流、抽滤、加食盐到饱和,调节pH为8—10,抽滤后再加HCl,调pH值为1—2,静置,经水重结晶,或一些特殊的工艺得晶体。在传统的方法中酸醇法的提取率比较高^[4],但在操作中存在着有效成分损失大、周期长、工序多等缺点。

近年来,在中药提取方面出现了许多新方法、新技术^[6—10]。比如:微波萃取技术、超临界流体萃取技术、超声提取技术、酶法、半仿生提取法、破碎提取法,这些方法使得中草药提取既符合传统的中医理论,又能达到提高有效成分的收率和纯度的目的。其中,微波萃取是利用微波能来提高萃取率的一种最新发展起来的新技术。它的原理是在微波场中,吸收微波能力的差异使得物质的某些区域或萃取体系中的某些组分被选择性加热,从而使得被萃取物质从基体或体系中分离,进入到介电常数小、微波吸收能力相对差的萃取剂中。经文献调研,未见有关微波萃取技术从关黄柏中提取小檗碱^[5—8]的研究报道。本文对比研究了单因素法和正交试验法优化微波萃取小檗碱工艺,分别对微

① 基金项目:山西省归国留学基金(2004-67)、教育部归国留学人员科研启动基金(2005383)资助

② 联系人,电话:(0350)3048913;手机:(0)13453005076;E-mail:biochem@xztc.edu.cn

作者简介:张海容(1957—),男,山西河曲县人,博士,教授,主要从事发光分析和天然植物有效成分的分离和研究工作。

收稿日期:2005-12-28;接受日期:2006-01-18

波功率,浸提时间,固液比等进行了初步探讨,结果表明微波技术明显优于常规酸碱法。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

756MC型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器总厂);AB204-N电子分析天平(美国Mettler-Toledo公司);WD900 MG-5513M LG烧烤型微波炉(天津电器有限公司);800低速离心机(常州国华电器有限公司);H.H.S电热恒温水浴锅(山西省文水医疗器械厂);SHB-A循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);SY电热鼓风干燥箱(天津市三水科学仪器有限公司)。

无水乙醇(分析纯,天津市北辰方正试剂厂);浓盐酸(分析纯,天津市化学试剂六厂);浓硫酸(分析纯,太原硫酸厂劳动服务公司);氢氧化钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心);盐酸小檗碱标准品(生化试剂,第二军医大学朝晖制药厂);关黄柏干燥皮状薄片(山西省忻州市五台山大酒店)。

2.2 最大吸收波长测定和校准曲线绘制

在325—365nm波长范围内,用紫外分光光度计测定其特征吸收光谱。盐酸小檗碱在345nm处有最大吸收峰。分别取小檗碱标准液(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0mL于25mL容量瓶中,用蒸馏水定容,浓度分别为1.6、2.4、3.2、4.0、5.6、6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以蒸馏水作空白,在吸收波长 $\lambda_{\text{max}}=345\text{nm}$ 处,分别测得吸光度(y)为0.096、0.148、0.202、0.252、0.304、0.335、0.404,最小二乘法线性回归,得方程 $y=0.065x-0.0076$ (x ,小檗碱浓度), $r=0.9999$ 。

2.3 实验方法

称取关黄柏每份0.2g,分别加入体积比1:49的硫酸溶液2mL、8mL水浸润,用不同温度水浴加热一定时间或不同频率的微波处理,抽滤、静置24h,吸取1mL样品液,稀释100倍,测其吸光度。

3 结果与讨论

3.1 单因素法

3.1.1 浸泡时间对吸光度的影响

分别吸取硫酸浸泡12、24、36、48h的供试液各1mL,用二次水稀释100倍,摇匀,用蒸馏水作空白,在吸收波长为345nm下测其吸光度,结果见图1。由图1看出,用硫酸溶液浸泡提取关黄柏中的小檗碱,浸泡时间不同,吸光度也不同,以浸泡24h的吸光度最高。

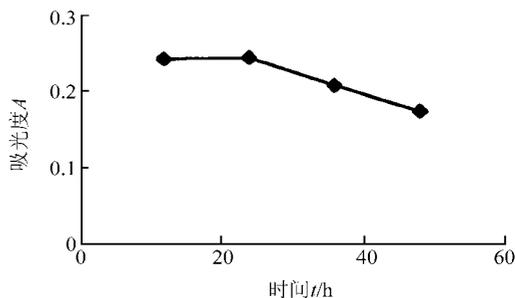


图1 硫酸浸泡时间与吸光度关系

3.1.2 不同温度对吸光度的影响

分别吸取硫酸浸泡24h时样品液,分别在40、60、70、80、95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热后的供试液各1mL,用二次水稀释100倍,摇匀,用蒸馏水作空白,在吸收波长为345nm测其吸光度,结果见图2。

由图2可以看出,温度对小檗碱的吸光度影响较大,以70 $^{\circ}\text{C}$ 时的吸光度最高。

3.1.3 不同微波处理时间对小檗碱的影响

取功率为180W处理10、30、50、70、90、110s的供试液各1mL,用蒸馏水稀释100倍,摇匀,测得微波处理不同时间的吸光度,结果见图3。从图3可以看出,随微波提取时间增加,小檗碱吸光度缓慢增大,超过90s后,吸光度不再变化。

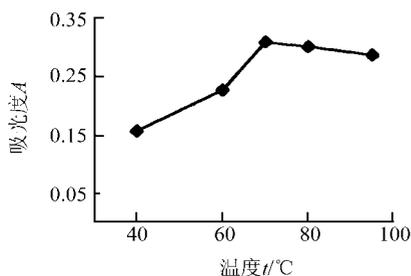


图 2 温度对小檗碱吸光度的影响度关系

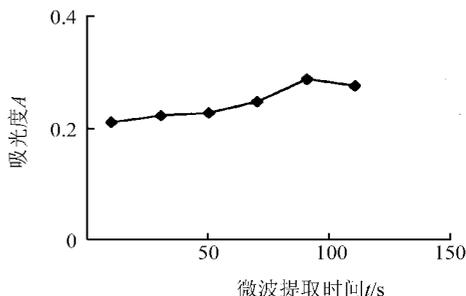


图 3 微波处理时间对小檗碱吸光度的影响

3.1.4 微波功率对小檗碱吸光度的影响

取功率为 180、360、540、720、900W 处理 90s 的供试液各 1mL, 再用蒸馏水稀释 100 倍, 摇匀, 用以上方法测得不同功率微波处理相同时间小檗碱的吸光度, 结果见图 4。由图 4 易知, 从关黄柏中提取小檗碱, 微波功率达 360W 时, 吸光度最大。

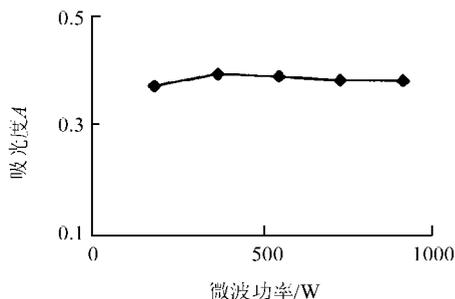


图 4 微波功率对小檗碱吸光度的影响

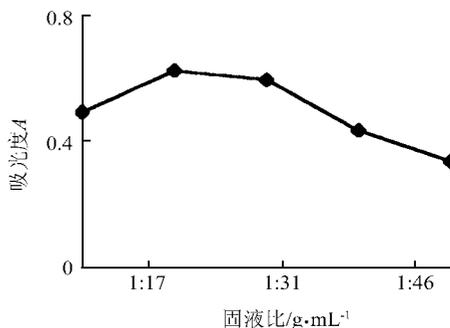


图 5 固液比对小檗碱吸光度的影响

3.1.5 固液比对小檗碱吸光度的影响

微波 360W 处理 90s 的固液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 的供试液, 各取 1mL, 稀释 100 倍, 摇匀, 测其固液比不同的吸光度, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 随固液比变化, 吸光度出现了先增大, 后减少的变化, 其固液比为 1:20 时的吸光度最高。

3.2 正交法优化微波提取小檗碱

微波法中影响小檗碱提取的因素很多, 如提取时间、温度、微波功率、固液比等。选取影响较大的三个因素: 温度、时间和固液比, 运用正交法设计实验, 选用 3 因素 3 水平来确定微波法提取小檗碱的最佳条件。根据表 1 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验。

从表 1 的正交结果可以得出结论: 因为 R 的数值中 A 的最大, B 的次之, 所以对小檗碱的提取率的影响程度从大到小的排列是: 温度 > 时间 > 固液比, 固液比对微波萃取影响较小, 其最佳条件: 温度 80 $^\circ\text{C}$, 时间 90s, 固液比 1:15。

表 1 正交法选择影响微波提取小檗碱的因素及水平表

No	A 温度 ($^\circ\text{C}$)	B 时间 (s)	C 固液比 (g/mL)	吸光度 A
1	60	50	1:15	0.441
2	70	50	1:30	0.456
3	80	50	1:45	0.438
4	60	70	1:30	0.314
5	70	70	1:45	0.516
6	80	70	1:15	0.495
7	60	90	1:45	0.334
8	70	90	1:15	0.490
9	80	90	1:30	0.603
K_1	0.363	0.445	0.475	
K_2	0.487	0.441	0.456	
K_3	0.512	0.476	0.429	
R	0.149	0.066	0.046	

3.3 两种不同方法产率比较

按照实验方法确定的最优化条件提取小檗碱,两种不同方法的优化条件和测定关黄柏中小檗碱含量,结果见表2。

由表2可知,两种不同提取方法的小檗碱产量:微波法>硫酸浸提;提取时间:微波法是硫酸浸提的1/960,固液比减少1/4,产量提高30%左右。微波萃取法明显优于硫酸浸提法,具有选择性高,提取时间短、易挥发性成分的提取得率高等优点,

由于溶剂及细胞液吸收微波能,细胞内部温度升高,压力增大,细胞壁破裂,有效成分从细胞中释放出来,传递转移到溶剂周围被溶剂溶解。传统提取中草药有效成分采用的是煎煮法,容易使药材细粉凝聚、焦化,而且时间比较长。微波萃取法作为一种新的萃取技术,很容易克服这些缺点,具有非常诱人的发展前景^[10]。

表2 两种不同方法提取小檗碱的优化条件和产率比较

比较项	硫酸浸泡法	微波法
温度(℃)	70	80
时间	24h	1.5min
固液比(g/mL)	1:20	1:15
功率(W)	-	360
吸光度A	0.34	0.46
浓度(mg/mL)	5.51	7.19
产量(mg/g)	110.2	143.8
产率(%)	1.10	1.44

参考文献

- [1] 郭孝武,王蕊娥.超声对川黄柏中小檗碱提出率的影响[J].陕西师范大学学报(自然科学版),1998,26(2):36—38.
- [2] 周保国,李红梅.黄连素在心血管疾病中的应用研究进展[J].实用中西医结合杂志,1997,10(7):609.
- [3] 华南师范学院、东北师范大学、上海师范学院、江苏师范学院、广西师范学院主编.曾昭琼.《有机化学实验》[M].1985.177—178.
- [4] 高红旺,张文希,田济民,许英爱.不同工艺对黄柏中黄连素提取的含量[J].第四军医大学吉林军医学院学报,2003,25(1):29—30.
- [5] 王杰,任仲皎,伍明.从黄连中提取小檗碱的新方法研究[J].中国药学杂志,1994,29(08):490—491.
- [6] 席国萍,何照范.黄连中小檗碱的提取工艺[J].山地农业生物学报,2004,23(6):502—506.
- [7] 吴宝华.超声技术对关黄柏中盐酸小檗碱提出率的影响[J].中医药学报,2004,32(4):29—30.
- [8] 岑志芳.正交设计法优化川黄柏中盐酸小檗碱的提取工艺[J].中成药,2005,27(6):732—733.
- [9] 许晓菁,闻建平,毛国柱.微波辅助萃取技术在现代中药生产中的应用[J].中草药,2002,33(12):1141—1143.
- [10] 丰理象,洪小军,庄林芳.葛根中葛根素提取工艺优化[J].中草药,2003,34(9):812—813.

Study of Microwave-Assisted Extraction and Spectrophotometry on Berberine from *Phellodendron Amurense Rupr*

ZHANG Hai-Rong ZHAO Fang-Hui CHEN Jin-E

(Lab. of Biochemical Analysis, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000, P. R. China)

Abstract The berberine was extracted from *Phellodendron Amurense Rupr* by microwave-assisted extraction (MAE) method. The optimal extraction conditions were determined by orthogonal array design as the extraction temperature of 80°C, microwave irradiation time of 1.5min, and ratio of solid to liquid 1:15(g/L). Compared with acid-alkali method, the MAE shows shorter extracting time, 30% higher of output, less solvent consumption, and easier control of the process.

Key words Microwave-Assisted Extraction, *Phellodendron Amurense Rupr*, Spectrophotometry, Berberine.