

• 专 栏 •

• 中药与天然药 •

微波辐射-溶剂回流提取农吉利中农吉利甲素

张煜帆¹, 樊轻亚¹, 黄晓文¹, 黄勇², 范华均^{1*} (1.广东药学院药科学院, 广州 510006; 2.广州多谱科学仪器有限公司, 广州 510080)

摘要: 目的 利用微波辐射引起农吉利药材细胞破壁, 研究在微波辐射-溶剂回流提取中各因素对生物碱农吉利甲素提取的影响, 探讨其最佳实验条件及工艺方法, 以提高其提取效率。方法 采用微波辐射处理含有一定水分的药材, 再以甲醇为溶剂回流提取农吉利中农吉利甲素, 用高效液相方法测定提取液的含量。结果 微波辐射-溶剂回流提取农吉利甲素的实验条件为: 药材颗粒度 80 目, 加水量 21.0 mL, 微波功率 40%, 辐射时间 2 min, 提取温度 80 ℃, 提取时间 2 h, 料液比 1:20。结论 经过微波辐射农吉利药材, 再溶剂回流提取, 农吉利甲素的提取率明显提高, 优于直接溶剂回流提取和超声提取方法, 且方法简单, 操作简便。

关键词: 农吉利; 农吉利甲素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2009)10-0819-05

Microwave Irradiation Coupled to Solvent Reflux Extraction of Monocrotaline in *Crotalaria Sessiliflora* L

ZHANG Yufan¹, FAN Qingya¹, HUANG Xiaowen¹, HUANG Yong², FAN Huajun^{1*} (1.College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2.Guangzhou Top Scientific Instrument Limited, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Through microwave irradiation caused the cells ruptured, and then monocrotaline in *Crotalaria sessiliflora* L was extracted by solvent reflux method to improve extraction yield of the alkaloid. **METHODS** The material of *crotalaria Sessiliflora* L containing a certain amount of water was irradiated by microwave. Using methanol as solvent, monocrotaline was extracted and determined by high performance liquid chromatography. **RESULTS** Optimum experimental conditions ware: 80 mesh of particle size, 21.0 mL of water volume added, 40% of microwave power, 2 minutes of irradiation time, 80 ℃ of extraction temperature, 2 h of extraction time and 1:20 of ratio of material to solvent. **CONCLUSION** The extraction of monocrotaline in *Crotalaria Sessiliflora* L was performed successfully by using microwave irradiation couple to solvent reflux extraction. The alkaloid yield was higher than conventional solvent reflux extraction and ultrasonic extraction, and the method is simple, easy to operate.

KEY WORDS: *Crotalaria sessiliflora* L; monocrotaline; HPLC

农吉利为豆科植物野百合(*Crotalaria Sessiliflora* L)的干燥全草, 含有生物碱、黄酮类及氨基酸等有效化学成分^[1-4]。其中生物碱多为吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids), 含量较多的有农吉利甲素(monocrotaline, 也称野百合碱), 农吉利乙素及农吉利丙素。研究表明: 农吉利甲素具有抗癌活性, 对多种实验性肿瘤有抑制作用, 对心脏有抑制和降压作用, 且能增加平滑肌收缩作用。此外, 农吉利甲素可暂时轻度抑制呼吸频率和深度^[5-7]。

微波辅助提取技术(microwave-assisted extraction,

MAE), 具有加热效率高、耗时少、选择性好、提取效率高的特点, 近年来应用于中药有效成分的提取的报道越来越多^[8-10]。微波辅助提取技术包括高压密闭微波提取系统和开放式聚焦微波提取系统。笔者以药材农吉利作为研究对象, 利用微波与介质偶极分子的作用可以引起细胞破壁, 研究了微波辐射处理药材使其细胞破壁再进行溶剂提取农吉利甲素的过程, 并对其实验条件进行了优化, 采用 HPLC 测定农吉利甲素的含量, 旨在研究适合于微波辐射细胞破壁-溶剂回流提取农吉利甲素的工艺条件, 应用于农吉利甲素的提取、分析。

基金项目: 广东省社会发展领域科技计划项目(73060)

作者简介: 张煜帆, 男 *通信作者: 范华均, 男, 博士, 教授

Tel: (020)39352135

E-mail: junhuafan@126.com

1 实验仪器和试剂

LC-10A 液相色谱仪(日本岛津公司); UV-1101 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); HH-6 恒温水浴锅(江苏金坛宏华仪器厂); pH5-25 数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); RE52CS-1 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); P8023CTL-K4 微波炉(1050 kW, 格兰仕公司); DL-360A 超声清洗器(上海之信仪器有限公司, 35 kHz)。

农吉利甲素标准品(New Jersey 公司, USA, 纯度 99.9%); 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 甲醇、乙醇、盐酸、氨水、三乙胺、磷酸、四氯化碳、氯仿、乙酸乙酯(分析纯, 广州化学试剂厂)。

农吉利甲素标准品溶液: 准确称取农吉利甲素标准品 10.0 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 配成浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 置于 4°C 冰箱内保存。

0.5% 三乙胺水溶液(pH 7.0): 取 2.5 mL 三乙胺于 500 mL 水中, 用磷酸调节至 pH 为 7.0。

2 实验方法

2.1 样品的提取

取经干燥后的农吉利药材于粉碎机中粉碎, 得到细粉, 密封, 然后贮存于干燥器中, 备用。

2.1.1 微波辐射细胞破壁-溶剂回流提取 称取农吉利药材 5.0 g(80 目)于培养皿中, 加入 21.0 mL 蒸馏水, 搅拌均匀, 铺平, 放置浸泡 20 min 后, 再放入微波炉中以 40%微波功率辐射 2.0 min, 然后转入

烧瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 在 80°C 水浴回流提取 2 h, 提取 2 次, 过滤, 合并滤液。

2.1.2 超声提取 称取农吉利药材 5.0 g(80 目), 置于具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 甲醇, 在水温 40°C 条件下超声(频率为 35 kHz)提取 20 min, 提取 2 次, 收集滤液。

2.2 提取液的净化

将上述得到的提取液旋干, 用 50 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液溶解浸膏; 然后用 20 mL 氯仿萃取 3 次, 除去杂质, 酸溶液用氨水调至 pH 10~11, 再用氯仿萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并氯仿液, 减压蒸干溶剂, 用甲醇溶解并定容至 2 mL, 备用。

2.3 含量测定

将上述处理过的生物碱提取液通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 在 LC-10A 液相色谱仪上按下述条件进行测定。色谱柱: UltimateTM C₁₈(4.6 mm×250 mm, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-0.5%三乙胺水溶液(pH 7.0)(30:70); 检测波长: 216 nm; 柱温: 室温; 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 10 μL 。

3 结果与讨论

3.1 HPLC 分析条件

以甲醇为参比溶液对农吉利甲素标准溶液进行了紫外扫描, 发现农吉利甲素在 216 nm 处吸收最大, 选择 216 nm 作为检测波长; 以三乙胺作为抑制剂, 选择甲醇-三乙胺水溶液为流动相, 试验了不同配比及 pH 对分离的影响, 结果见图 1。

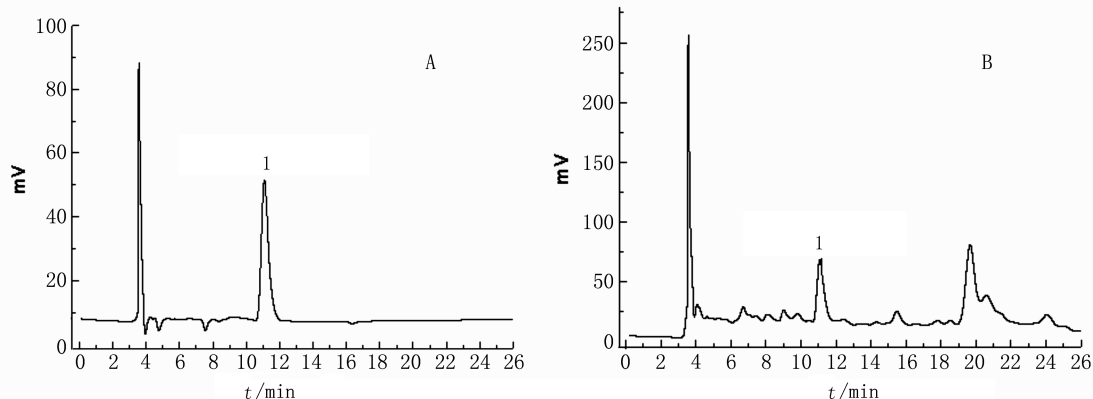


图 1 农吉利甲素标准溶液(A)和生物碱提取液(B)的色谱图
1-农吉利甲素

Fig 1 The chromatograms of monocrotaline standard solution (A) and extraction solution of *Crotalaria Sessiliflora* L(B)
1-monocrotaline

结果表明, 甲醇与 0.5%三乙胺(pH 7.0)溶液的比例为 30:70 时, 农吉利甲素得到较好的分离, 其保留时间为 11.282 min, 且农吉利甲素的浓度在 $3.0 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与色谱峰面积呈现良好线性关系, 其回

归方程: $A = 4852.3C + 4213.9$, $r = 0.9995$, 且方法稳定性和重复性良好, 可满足分析的要求。

3.2 微波破壁条件的选择

微波与介质的作用与其极性大小、质量大小和

穿透深度有关, 介质分子的极性越大与微波的相互作用越强。本实验用 HPLC 测定, 试验了药材颗粒度、加水量、微波功率和微波辐射时间对药材细胞破壁对农吉利甲素提取的影响。

3.2.1 微波功率和微波时间的影响 微波功率和微波辐射时间是细胞破壁的关键因素。微波与细胞内的水分子等极性物质作用, 产生大量的热量使胞内温度迅速升高, 水汽化产生的压力有助于冲破细胞膜和细胞壁, 形成微小的孔洞和裂纹, 以利于有效成分的溶剂提取。笔者试验了不同的微波功率和微波辐射时间对农吉利甲素提取的影响, 以了解微波破壁的效果, 结果见图 2 和图 3。

由图 2 和图 3 可知, 随着微波功率, 提取率增大, 当微波功率超过额定功率 40%, 提取率明显降低, 在该功率下提取效果最佳; 选择在 40% 额定功率下辐射药材, 辐射时间增加, 提取率增大, 超过 2 min 提取率急剧下降, 因此微波辐射时间以 2 min

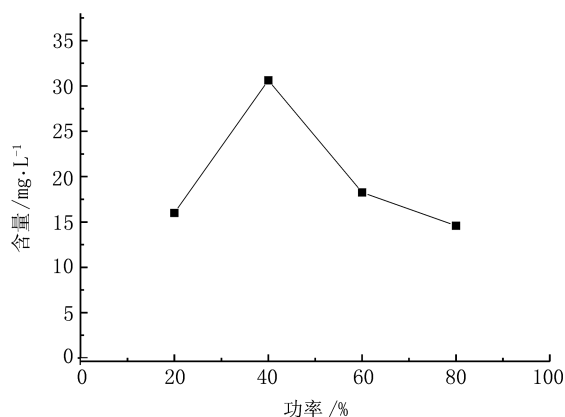


图 2 微波功率的影响

Fig 2 Effect of power of microwave on extraction yield of monocrotaline

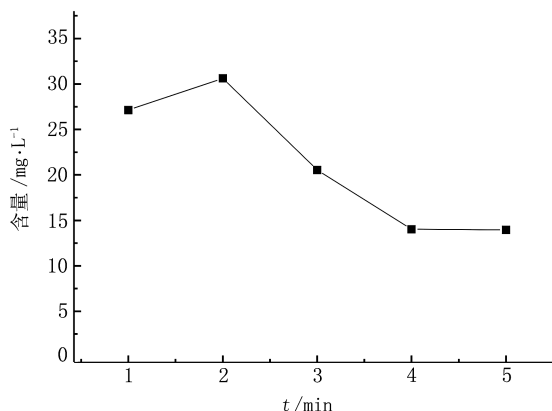


图 3 微波辐射时间的影响

Fig 3 Effect of microwave irradiation time on extraction yield of monocrotaline

适宜。结果表明, 微波功率和微波辐射时间增大都有利于提高提取率, 但达到一定“极限”提取率反而降低, 说明与微波辐射的“剂量”有关。微波功率大, 辐射时间长有利于微波破壁, 但细胞易过热、药材表面容易焦化; 微波功率减小, 辐射时间可延长, 也容易引起成分分解, 提取率减小。因此微波细胞破壁条件与药材的组织结构及提取成分性质有关, 只有合适的“剂量”才能达到较好的提取效果。笔者选择微波时间为 2.0 min, 微波功率为额定功率的 40%。

3.2.2 加水量及浸泡时间的影响 有效化学成分包埋在有表皮保护的内部薄壁细胞或液泡内, 经过干燥的药材含水量较低, 与微波的作用较小, 细胞破壁效果差。笔者试验了加入不同量的水以不同的时间浸泡药材, 然后进行微波辐射, 使药材细胞充分溶胀增强微波与药材细胞的作用, 结果见图 4。

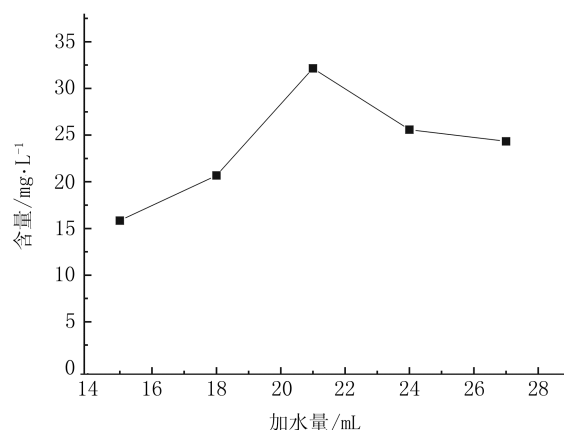


图 4 加水量的影响

Fig 4 Effect of water volume added on extraction yield of monocrotaline

从图 4 可知, 加水量增加提取率增大, 表明从细胞溶出的农吉利甲素增多, 当加水量为 21.0 mL, 浸泡 20 min 农吉利甲素提取率最高, 细胞破壁效果好。实验发现加水太多浸泡时间长, 药材易黏结, 且过量水易引起过热, 导致物质分解, 因此对于 5.0 g 药材, 加水量 21.0 mL 浸泡 2 min 较适宜。

3.2.3 颗粒度的影响 笔者试验了药材颗粒度大小的影响, 结果见图 5。

由图 5 可知, 随着颗粒度的减小, 提取率增大, 当颗粒度超过 80 目时提取率会减小, 这是由于颗粒小易引起药材焦化板结, 不利于提取, 选择颗粒度为 80 目适宜。

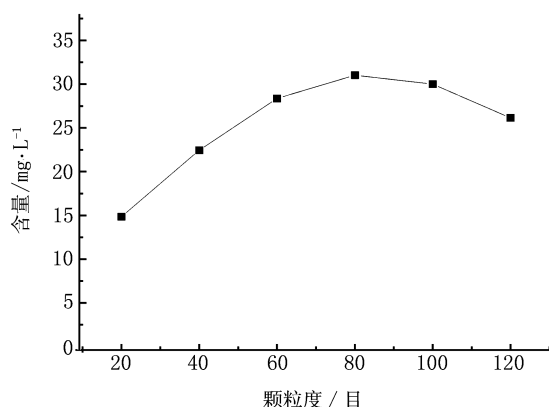


图5 颗粒度的影响

Fig 5 Effect of granularity on extraction rate of monocrotaline

3.3 提取条件优化

笔者经过溶剂筛选,以甲醇作为提取溶剂,采用正交实验设计 $L_9(3^4)$ 对溶剂回流的提取温度、提取时间和料液比进行了优化,实验设计和实验结果分别见表1,表2,表3。

表1 正交实验设计 $L_9(3^4)$

Tab 1 The orthogonal test design $L_9(3^4)$

水平	因素		
	A/℃	B/h	C/g:mL
1	70	1.0	1:10
2	80	2.0	1:20
3	90	3.0	1:30

注: A-提取温度; B-提取时间; C-料液比

Note: A-extraction temperature; B-extraction time; C-ratio of material to solvent.

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

Tab 2 The orthogonal test result $L_9(3^4)$

No	A/℃	B/h	C(g:mL)	含量/mg·mL ⁻¹
1	1	1	1	16.231
2	1	2	2	24.322
3	1	3	3	25.429
4	2	1	2	23.556
5	2	2	3	28.569
6	2	3	1	25.220
7	3	1	3	18.962
8	3	2	1	23.362
9	3	3	2	23.962
K1	21.994	19.583	21.604	
K2	25.782	25.418	23.947	
K3	22.095	24.870	24.320	
R	3.788	5.835	2.716	

表3 方差分析结果

Tab 3 The results of variance analysis

因素	$\sum d^2$	f_i	F	$F_{0.1}(2,2)$	P
A	27.946	2	0.812	3.14	> 0.1
B	62.299	2	1.810	3.14	> 0.1
C	13.001	2	0.378	3.14	> 0.1
Error	103.25	6			

经过直观分析及方差分析可知,在溶剂提取过程中对农吉利甲素提取的影响程度依次为:提取温度>提取时间>料液比。其提取的优化条件为 $A_2B_2C_2$ 作为最优提取条件,即提取温度 80 ℃,提取时间 2 h,料液比 1:20 适宜。

综上所述,微波辐射破壁及溶剂回流提取农吉利甲素的最佳条件为:药材颗粒度 80 目,加水量 21.0 mL,微波功率 40%,微波辐射时间 2 min,提取温度 80 ℃,提取时间 2 h,料液比 1:20。

3.4 提取分析

精密称取 5.0 g 农吉利药材,按实验方法分别采用微波辐射-溶剂回流提取、直接溶剂回流法提取和超声提取法提取农吉利甲素,并分别在样品中加入农吉利甲素标准品测定各提取方法的加标回收率,结果见表4。

表4 农吉利甲素提取分析结果(n=3)

Tab 4 Results of extraction of monocrotaline in *Crotalaria Sessiliflora* L(n=3)

提取方法	平均提取率/mg·g ⁻¹	RSD/%	加标回收率/%
微波辐射-溶剂回流	0.045 0	0.58	97.6
直接溶剂回流	0.031 5	1.1	96.0
超声提取	0.039 5	1.8	99.7

由表4可知,微波辐射破壁-溶剂提取法提取率明显高于常规的溶剂回流提取方法,也高于超声提取方法,这表明采用微波辐射细胞破壁方法处理药材,可明显提高农吉利甲素的提取率,且方法简单,操作简便、具有较好的应用价值。

REFERENCES

- [1] FAN C S. The application book of identification in the traditional Chinese medicine [M]. Nanchang: Jiangxi science and technology publishing house, 1995: 517.
- [2] HUN S Y, JI S L, CHUL Y K, et al. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(5): 544-546.
- [3] ABDUL M IM, OSAMU N, TETSUO O. Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(2): 410-414.

- [4] JING Y Q, LI H S, CHEN R H. Studies on the composition of Amino acids on *Crotalaria sessiliflora* L[J]. Bull Chin Mater Med, 1987, 12(7): 41-43.
- [5] HANG L, WU K M, XUE Z, et al. The isolation of antitumor active principle of *crotalaria sessiliflora* and synthesis of its derivatives [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 1980, 15(5): 278-283.
- [6] STEVAN P, TOFOVIC, ZHANG X C, et al. 2-Methoxyestradiol mediates the protective effects of estradiol in monocrotaline induced pulmonary hypertension [J]. Vasc Pharmacol, 2006, 45(6): 358-367.
- [7] CHIHIRO S, MASAFUMI T, HAJIME M, et al. Mycophenolate mofetil attenuates pulmonary arterial hypertension in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(2): 781-788.
- [8] WANG Y, ZHANG T J. Application of microwave extraction of active ingredients in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(3): 470-473.
- [9] LI H, LIN G K, ZHANG Z X. Development of microwave assisted extraction [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2003, 31(10): 1261-1268.
- [10] FAN H J, XIAO X H, LIU Y Z, et al. Post-microwave-irradiated reflux extraction of Lycorine, Lycoramine and Galanthamine from *Lycoris radiata* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni(中山大学学报: 自然科学版), 2006, 45(3): 46-49, 53.

收稿日期: 2008-12-04