

超声法提取长春花中长春碱的工艺研究

祖元刚, 罗 猛, 牟瑞松, 付玉杰

(东北林业大学 森林植物生态学教育部重点实验室, 林业生物制剂教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040)

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是夹竹桃科长春花属植物, 原产于非洲东海岸, 现广泛分布于世界各地, 我国广东、广西、云南、海南、贵州、四川以及江浙一带均有栽培。长春花中含有大量的生物碱, 长春碱是其中最主要的一种。长春碱在临床上主要用于治疗何杰金氏病和绒毛上皮癌, 对淋巴肉瘤、黑色素瘤、卵巢癌、白血病等也有一定疗效^[1], 是目前广泛应用的抗肿瘤植物药之一。长春花中的长春碱的提取通常采取乙醇回流法或甲醇浸提法来获得^[2,3]。超声提取技术是利用超声波产生的强烈的空化效应和机械振动加速药物有效成分进入溶剂, 促进提取的进行, 可以缩短提取时间, 增加有效成分的溶出率, 提高药材的利用率, 节约能源并且避免了高温对提取成分的影响^[4]。本研究采用 KQ—250DB 型超声装置提取长春花中的长春碱, 采用 RP-HPLC 法测定, 以提取液中长春碱的提取率为提取效果的参考标准。

1 实验材料

日本 Jasco 高效液相色谱仪, 瑞士 AB—104 型电子天平, KQ—250DB 型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司), DGW—99 型台式高速微型离心机(宁波新芝科器研究所)。

长春花取自海南, 经本室聂绍荃教授鉴定为夹竹桃科植物长春花 *C. roseus* (L.) G. Don; 长春碱对照品购于 Sigma 公司, 质量分数为 99%; HPLC 法测定所用甲醇和乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水, 流动相经过 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2 方法和结果

2.1 长春碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 380 mL 水-二乙胺(986:14, 用磷酸调节 pH 7.2)与 620 mL 甲醇-乙腈(4:1)混合; 体积流量: 2 mL/min; 进样

量: 10 μL ; 柱温: 23 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 220 nm。

2.1.2 标准曲线的建立: 精密称取长春碱对照品 5 mg 置于 5 mL 量瓶中, 用无水甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 得到 1 mg/mL 长春碱对照品储备液。分别精密吸取长春碱对照品储备液 0.5、0.25、0.125、0.062 5 mL 置于 1 mL Doff 管中, 用无水甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 进样测定。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并进行回归分析, 得回归方程 $Y=22\,489\,190.956\,5\,X+130\,543.869\,6$, $R^2=0.999\,7$, 线性范围为 0.06~0.5 mg/mL。

2.2 超声提取条件的确定: 取一定量的干长春花粉碎, 过 80 目筛, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 6 h, 备用。精确称取一定量过筛后的长春花粉, 放入三角瓶中, 按不同的液固比加入甲醇, 放入超声波发生器中, 调节提取温度、提取时间和超声频率, 进行提取。收集提取液, 离心后分别进行 HPLC 法分析, 并按得到的回归方程计算出样品液中长春碱的质量浓度, 计算长春碱的得率[长春碱得率=长春碱质量浓度×提取液体积/长春花原料投料量×100%]。长春碱对照品和提取液的 HPLC 色谱图见图 1。

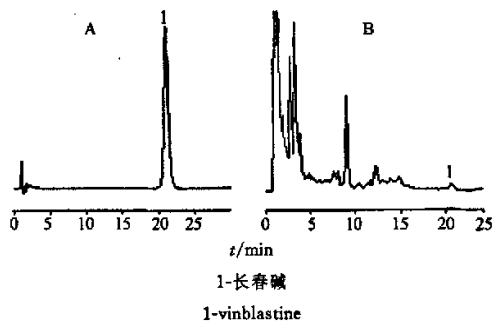


图1 长春碱对照品(A)和样品液(B)的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC Chromatograms of vinblastine reference substance (A) and sample solution (B)

为了获得更适合的提取条件, 在已有实验的基础上进行了 $L_9(3^4)$ 正交试验优选。因素水平见表 1, 正交试验结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

收稿日期: 2006-11-27

基金项目: 东北林业大学青年科研基金资助项目(07021)

作者简介: 祖元刚(1954—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 教授, 1987 年获东北林业大学理学博士学位, 主要从事药用植物的研究与开发。

Tel: (0451)82191517 Fax: (0451)82102082 E-mail: zygori@vip.hl.cn

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A 提取温度/℃	B 提取时间/h	C 固液比	D 超声频率/kHz
1	25	2	1:5	15
2	35	3	1:10	20
3	45	4	1:15	25

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	长春碱得率/%
1	1	1	1	1	0.002 350
2	1	2	2	2	0.003 562
3	1	3	3	3	0.004 036
4	2	1	2	3	0.006 012
5	2	2	3	1	0.006 632
6	2	3	1	2	0.006 601
7	3	1	3	2	0.008 220
8	3	2	1	3	0.009 598
9	3	3	2	1	0.008 133
I	0.003 316	0.005 527	0.006 183	0.005 705	
II	0.006 415	0.006 597	0.005 902	0.006 128	
III	0.008 650	0.006 257	0.006 296	0.006 594	
R	0.005 334	0.001 070	0.000 394	0.000 844	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	43.056	2	21.528 0	42.212	$P < 0.05$
B	1.793	2	0.896 5	1.758	
C	0.247	2	0.123 5	0.242	
D	1.068	2	0.534 0	1.047	
误差	2.040	4	0.510 0		

$$F_{0.05}(2,4) = 6.940$$

可以看出,4 种因素的影响次序为 $A > B > D > C$ 。根据方差分析结果,确定最佳工艺条件为 $A_3B_2C_1D_3$,即温度 45℃,固液比 1:5,提取时间 3 h,超声频率 25 kHz。

2.3 验证试验:按上述试验确定的工艺条件重复 3 次,结果长春碱的收率稳定,平均值为 0.009 603%,收率高,表明实验所得到的工艺适合于长春花中长春碱的提取。

2.4 不同提取方法的比较

2.4.1 超声提取法:称取一定量的长春花干粉,用上述确定的工艺进行超声提取,并采用 RP-HPLC 法测定长春碱的质量浓度,计算收率,见表 4。

2.4.2 乙醇回流提取法:称取一定量的长春花干粉,以固液比 1:10 加入 95%乙醇,回流提取 3 h,分离提取液,采用 RP-HPLC 法测定长春碱的质量浓度,计算收率,见表 4。

2.4.3 苯渗漉法:称取一定量的长春花干粉,加入适量水,以固液比 1:10 加入苯渗漉提取 24 h,分离提取液,采用 RP-HPLC 法测定长春碱的质量浓度,计算收率,见表 4。

2.4.4 甲醇浸提法:称取一定量的长春花干粉,以固液比 1:10 浸提 24 h,分离提取液,采用 RP-HPLC 法测定长春碱的质量浓度,计算收率,见表 4。

表 4 不同提取方法提取长春碱的结果比较($n=3$)

Table 4 Comparison of vinblastine extracted by different methods

方 法	提取时间/h	液固比	长春碱收率/%
超声提取法	3	1:5	0.009 598
乙醇回流法	6	1:10	0.009 015
苯渗漉法	24	1:10	0.005 311
甲醇浸提法	24	1:10	0.003 478

可见,超声提取法较苯渗漉法和甲醇浸提法收率高出很多,分别达到它们的 1.8 倍和 2.76 倍,略高于乙醇回流法;提取所耗费的时间短,超声所用的时间分别是乙醇回流法、苯渗漉法和甲醇浸提法的 1/2、1/8 和 1/8;所用溶剂量也较其他方法少。超声法提取长春碱较其他 3 种方法具有明显的优越性,是一种高效、高收率的提取方法。

3 讨论

超声提取技术主要是利用超声波具有的高速的击碎和搅拌作用来增大物质分子运动频率和速度,并增强溶剂的穿透力,从而加速提取物的溶出。超声提取法是中药提取的一个重要的发展方向,已经广泛的应用于中药植物中的有效成分的提取。本实验采用超声提取技术获得长春花中的生物碱,较回流法、浸提法和渗漉法具有明显的优势。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Zhou Y L, Yang Q R, Yang X T. New technology for extracting anticancer composition from *Catharanthus roseus* [P]. CN: 1365978A. 2002-08-28.
- [3] Liu H L, Tang M L, An L Y, et al. New technology for extracting composition from Chinese herbal medicine [J]. *Guangzhou Chem* (广州化学), 2003, 28(2): 59-64.