

## 不同微波辅助法提取苦参生物碱的比较

张薇<sup>1</sup>, 陈浩浩<sup>3</sup>, 范华均<sup>2\*</sup>, 刘小琴<sup>2</sup>, 余旭辉<sup>2</sup>, 罗少健<sup>2</sup>

(1. 广东药学院基础学院, 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院, 广州 510006;  
3. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515041)

**[摘要]** **目的:**比较密闭微波辅助提取法(PMAE)、聚焦微波辅助提取法(FMAE)及微波辐射-溶剂回流提取法(PMIRE) 3种微波辅助方法用于提取苦参生物碱的差异,探讨PMAE、FMAE、PMIRE的提取过程及其微波作用机制。**方法:**以苦参碱与氧化苦参碱为目标物,采用HPLC测定,通过优化微波功率、提取温度、提取时间、药材颗粒度、固液比等试验因素,计算其热力学函数,电子扫描电镜观察药材表面结构变化。**结果:**与常规的回流提取(SRE)法相比,PMAE、FMAE、PMIRE的提取效率明显提高,其热力学函数 $\Delta H^\circ$ 和 $\Delta S^\circ$ 明显增大, $\Delta G^\circ$ 更小。微波作用能使药材表面结构发生细胞破壁,强化提取过程。**结论:**微波辅助提取苦参生物碱的提取效率均优于常规的溶剂回流提取法;微波辅助的方式、作用程度、提取过程不同,提取效率有较大差异;PMAE提取时间最短;PMIRE由于微波直接作用强,细胞破壁效果更好,提取率最高,且仪器设备简单,操作简便。

**[关键词]** 微波辅助提取; 苦参; 生物碱; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0034-05

## Comparison of Extraction for Alkaloids from *Sophora flavescens* by Different Microwave Assisted Method

ZHANG Wei<sup>1</sup>, CHEN Hao-hao<sup>3</sup>, FAN Hua-jun<sup>2\*</sup>, LIU Xiao-qin<sup>2</sup>,  
SHE Xu-hui<sup>2</sup>, LUO Shao-jian<sup>2</sup>

(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;  
2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;  
3. Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare differences of pressurized microwave-assisted extraction method (PMAE), focused microwave-assisted extraction method (FMAE) and post microwave irradiated-reflux extraction method (PMIRE) in extracting alkaloids from *Sophora flavescens*, and investigate extraction process and microwave mechanism of these 3 kinds of microwave assisted extraction methods. **Method:** With oxymatrine and matrine as target alkaloids, which were determined by HPLC, thermodynamic functions were calculated by optimizing microwave power, extraction temperature, extraction time, solid-liquid ratio, medicinal granule and other factors, surface structural change of herbs was observed by electronic scanning microscope. **Result:** Compared with conventional solvent reflux extraction (SRE), extraction efficiency of PMAE, FMAE and PMIRE increased significantly,  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  of alkaloids increased obviously, but  $\Delta G^\circ$  became smaller. Microwave irradiation could enable cell wall of herbs surface structure to rupture, and strengthen extraction process. **Conclusion:** Extraction efficiency of alkaloids from *S. flavescens* with microwave assisted extraction was superior to SRE; Extraction efficiency had large differences by different microwave assisted manners, irradiation degree and extraction process; PMAE had shortest extraction time in the closed system; Because of strong microwave direct role, PMIRE had the

**[收稿日期]** 20120613(003)

**[基金项目]** 广州市科技支撑计划项目(2008Z1-E301);广东药学院师资队伍建设项目(52104109)

**[第一作者]** 张薇,副教授,从事微波、中药干燥及质量控制研究,Tel:020-39352197,E-mail:gzzhangw@163.com

**[通讯作者]** \*范华均,博士,教授,Tel:020-39352135,E-mail:junhuafan@126.com

best cell-rupture and extraction yield, and its equipment was simple and easy-operating.

**[Key words]** microwave-assisted extraction; comparative study; *Sophora flavescens*; alkaloids; HPLC

苦参是豆科槐属植物的干燥根,含有丰富的生物碱等有效成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗心律失常等药理作用<sup>[1-2]</sup>。苦参碱和氧化苦参碱是苦参生物碱中最主要的2种生物碱,已被广泛用于临床上多种疾病的治疗,其药理活性、临床研究及提取分离一直是备受关注<sup>[3-10]</sup>。

微波辅助提取技术近年来由于快速、高效,已广泛应用于中药有效成分的提取,目前主要有2种微波辅助提取方法,即可控制温度和压力的密闭微波辅助提取(PMAE)及开放式常压聚焦微波辅助提取(FMAE)。前者由于是高温高压可大大缩短提取时间,且同时处理多个样品,但安全性要求高;后者是常压下进行微波聚焦辐射提取,设备简单、安全、处理量大<sup>[11-14]</sup>。限于微波提取装置要求较高,价格不低,目前大多用家用微波炉改装,利用微波与微波介质的热效应提供能源以替代常规加热方式。本课题组曾提出利用微波辐射-溶剂回流提取法(PMIRE)提取石蒜<sup>[15]</sup>、农吉利<sup>[16-17]</sup>、苦参<sup>[18-19]</sup>等药材中有效成分,提取效率明显增加。PMIRE是将微波辐射药材和溶剂回流提取分别进行,装置要求简单、容易实施、组合灵活。

目前有关微波辅助提取中药有效成分的报道越来越多,但比较不同微波辅助提取方法的研究和机制探讨还较少,本文在前期工作基础上,以苦参药材为研究对象,乙醇作为提取溶剂,采用PMAE, FMAE, PMIRE 3种微波辅助方法用于苦参生物碱的提取,用HPLC测定。分别优化3种方法提取苦参生物碱的工艺条件,比较和分析不同的微波作用方式及过程对苦参生物碱提取效率的差异和特点,利用扫描电镜观察苦参药材的表面结构,从热力学角度初步探讨3种微波辅助提取苦参生物碱过程的机制,为微波辅助提取苦参生物碱在不同用途和规模上的应用提供理论依据。

## 1 材料

EXCEL型多功能微波化学工作平台(上海屹尧微波化学有限公司),PJ21C-AN型微波炉(广东美的微波炉制造有限公司),Zeiss EVO 18型扫描电镜(德国卡尔蔡司公司),LC-10 ATvp型液相色谱仪(日本岛津公司),pHS-25型数显酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。

苦参碱和氧化苦参碱对照品(中国药品生物制

品检定所,批号分别为110805-200507, 0780-200004),三乙胺、甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

苦参药材购于广州采芝林药业,产地山西,批号20080801,经本校中药学院刘基柱副教授鉴定为*Sophora flavescens* Ait.,药材机械粉碎后过筛,按不同目数分别保存,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 苦参生物碱的提取

**2.1.1 密闭微波提取(PMAE)** 准确称取0.5 g过80目的药材于提取罐中,加入15 mL无水乙醇,密封。设定微波功率780 W,提取温度110℃,于EXCEL多功能微波化学工作平台内腔中提取5 min。

**2.1.2 聚焦微波提取(FMAE)** 准确称取2.0 g过100目的药材于圆底烧瓶中,加入80 mL无水乙醇,设定微波功率310 W,装上冷凝管,置于PJ21C-AN微波炉中回流提取45 min。

**2.1.3 微波辐射-溶剂回流提取(PMIRE)** 准确称取5.0 g过100目的药材于培养皿中,加入22.0 mL蒸馏水,混匀,铺平,充分浸润,放入微波炉中以微波功率900 W辐射90 s,然后将其转移到圆底烧瓶中,加入125 mL乙醇,于90℃水浴中回流提取45 min。

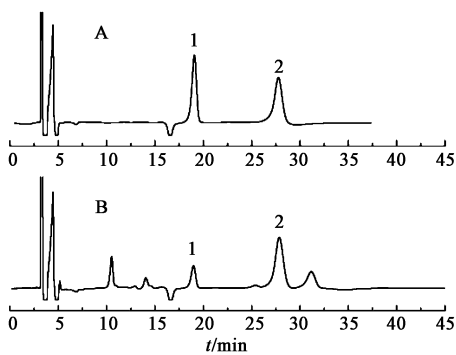
### 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件** 将上述处理液按文献[18]方法净化后过0.45 μm滤膜,按以下色谱条件测定, Geminin C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国Phenomenex公司),流动相乙腈-0.1%乙酸溶液(pH 5.8)(4:96),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长220 nm,进样量20 μL,柱温室温。

**2.2.2 方法学考察** 以乙腈-0.1%乙酸溶液(pH 5.8)为流动相可较好地实现苦参生物碱的分离(图1),苦参碱和氧化苦参碱的保留时间分别为18.90, 28.85 min,其质量浓度均在5.0~850 mg·L<sup>-1</sup>呈良好线性关系,标准曲线分别为 $A = 9\ 825.1C - 64\ 992$  ( $R^2 = 0.999\ 3$ ),  $A = 10\ 773C - 73\ 972$  ( $R^2 = 0.999\ 2$ ),检出限分别为1.50, 1.52 mg·L<sup>-1</sup>,重复测定精密度RSD分别为1.92%, 1.33%,提取液在室温下12 h内稳定。

### 2.3 微波辅助提取苦参生物碱

**2.3.1 提取条件的优化** PMAE, FMAE, PMIRE是



A. 苦参碱、氧化苦参碱混合对照品; B. 苦参生物碱提取液;  
1. 苦参碱; 2. 氧化苦参碱

图 1 苦参提取液 HPLC

3 种不同微波辅助提取方式, 本文采用单因素试验结合正交试验考察微波功率、提取温度、提取时间、药材颗粒度、固液比等对苦参生物碱的提取的影响, 以确定最佳提取条件, 结果见表 1。

表 1 不同微波辅助提取法提取苦参生物碱的试验条件优化

方法	微波功率 /W	温度 /℃	提取时间 /min	药材颗粒度 /目	固液比 /g·mL <sup>-1</sup>
PMAE	780	110	5	80	1:30
FMAE	310	90	45	100	1:40
PMIRE	900	90	45	100	1:25

由表 1 结果表明, PMAE, FMAE, PMIRE 由于微波辅助提取方式不同, 提取条件相差较大。其中 PMAE 提取时间最短, 仅需 5 min, PMIRE 提取率最高, 但提取时间长, 需要 45 min。

2.3.2 苦参生物碱的提取测定 根据表 1 中 PMAE, FMAE, PMIRE 提取苦参生物碱的优化试验条件, 比较 3 种微波辅助提取苦参生物碱的提取率, 同时与常规溶剂回流提取法 (SRE) 作对比 (试验条件同 PMIRE, 提取时间 60 min), 采用 HPLC 测定, 结果见图 2。

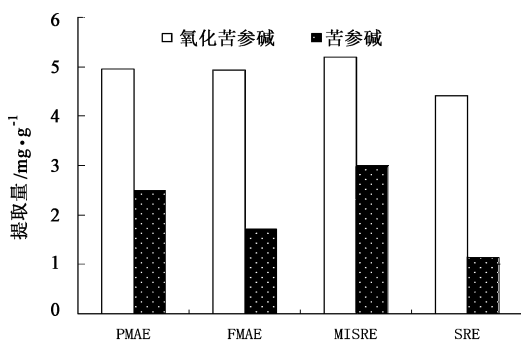


图 2 不同方法提取苦参生物碱的比较

由图 2 可知, 与 SRE 相比, 采用微波辅助提取

苦参生物碱, 苦参碱和氧化苦参碱的提取率均会明显提高, 表明微波的特殊作用, 体现在对药材细胞结构的变化<sup>[13-14]</sup>。但在 3 种微波辅助提取方法中, 由于提取过程中微波作用方式不同, PMAE, FMAE, PMIRE 在各自优化条件下苦参碱和氧化苦参碱的提取率又表现出一定差异性。其中以 PMIRE 提取率最高, FMAE 提取率最低; 对提取目标物而言, 氧化苦参碱的提取率接近, 但采用 FMAE 提取苦参碱, 提取率仅为 PMIRE 的 57.3%。

## 2.4 微波辅助提取机制探讨

2.4.1 苦参生物碱提取的热力学过程 苦参生物碱的提取过程均属于恒温恒压过程, 根据热力学原理计算 PMAE, FMAE, PMIRE 提取苦参碱和氧化苦参碱的热力学函数  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ <sup>[19-20]</sup>, 在与 SRE 比较的同时对其提取过程的热力学机制进行探讨, 结果分别见表 2, 3。

表 2 不同提取方法提取苦参生物碱的  $\Delta H^\circ$  和  $\Delta S^\circ$

提取方法	$\Delta H^\circ$ /kJ·mol <sup>-1</sup>		$\Delta S^\circ$ /J·mol <sup>-1</sup>	
	苦参碱	氧化苦参碱	苦参碱	氧化苦参碱
PMAE	47.04	16.30	131.4	55.33
FMAE	34.66	10.32	100.1	36.16
PMIRE	36.71	8.51	109.5	39.10
SRE	28.75	11.03	76.91	32.65

表 3 不同方法提取苦参生物碱的  $\Delta G^\circ$

温度 /℃	苦参碱 /kJ·mol <sup>-1</sup>				氧化苦参碱 /kJ·mol <sup>-1</sup>			
	PMAE*	FMAE	PMIRE	SRE	PMAE*	FMAE	PMIRE	SRE
50	-	2.31	1.33	2.90	-	-1.37	-4.13	0.48
60	-	1.31	0.25	2.13	-	-1.73	-4.52	0.15
70	-	0.31	-0.85	1.36	-	-2.09	-4.91	-0.17
80	0.64	-0.69	-1.94	0.59	-3.24	-2.45	-5.30	-0.50
90	-0.68	-1.69	-3.04	-0.18	-3.79	-2.81	-5.29	-0.83
100	-1.99	-	-	-	-4.35	-	-	-
110	-3.31	-	-	-	-4.90	-	-	-
120	-4.62	-	-	-	-4.45	-	-	-

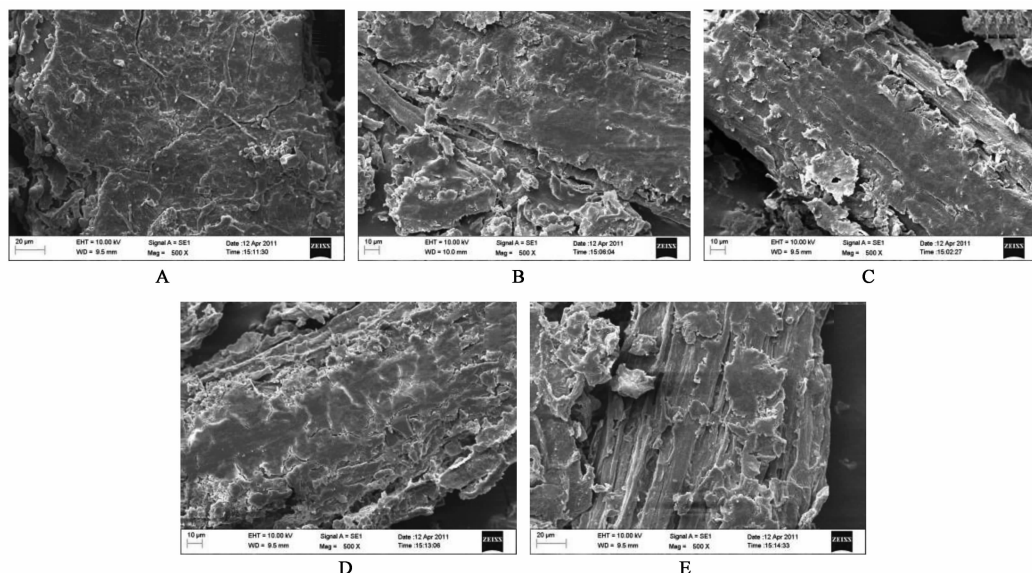
注: -表示低于 80℃ 密闭微波装置温度难以控制。

从热力学角度来看, 在提取过程中焓变  $\Delta H^\circ$  主要包括药材细胞内化学成分挣脱药材束缚溶剂化过程吸收的能量、化学成分溶解于溶剂的溶解热、提取过程是否发生化学反应的能量和提取过程分子扩散运动需要的能量等的总和; 熵变  $\Delta S^\circ$  主要表现提取过程中化学成分在溶剂中的混乱程度。由表 2, 3 结果可知, 提取苦参生物碱的  $\Delta H^\circ$  和  $\Delta S^\circ$  均  $> 0$ , 其过程属于吸热熵增过程, 在所选择的提取温度下提取

过程  $\Delta G^\circ < 0$ ,可自发进行,但在微波作用下  $\Delta H^\circ$ 和  $\Delta S^\circ$ 更大, $\Delta G^\circ$ 更小,说明微波辅助提取更容易进行。

**2.4.2 扫描电镜分析** 取少量药材撒在导电胶上,用吸耳球将表面上未粘住的粉末吹去,将导电胶置于 SBC-12 型离子溅射仪上喷金 5 min,在 Zeiss EVO

18 型扫描电镜上抽真空进行电子扫描观察拍照(加速电压 0.2 ~ 30 kV,分辨率 3.0 nm,放大倍数 50 ~ 10 000 倍),通过电镜扫描观察不同方法提取后的药材的表面结构,结果见图 3。



A. 药材原样;B. SRE;C. PMAE;D. FMAE;E. PMIRE

图 3 不同方法提取的药材电镜扫描

由图 3 可知,与药材原样相比,经过提取后的药材表面结构均有变化,出现表面裂纹或孔洞;与 SRE 相比,经过 PMAE, FMAE, PMIRE 提取的药材表面的裂纹、孔洞和收缩等变化更明显,表明微波对药材和溶剂提取体系有明显作用,有助于药材细胞破壁和溶剂对溶质的溶出;但 PMIRE 提取后药材细胞表面收缩和破坏程度更大,与提取过程不同有关。因为

PMIRE 要分别经历微波辐射和溶剂提取 2 个过程:微波辐射用水浸泡过的药材,与极性强的水分子发生强烈的偶极子高频耦合作用,可引起药材溶胀、细胞破壁,再经溶剂提取,药材结构破坏变化更大。

**2.5 微波辅助提取方法的比较** 分别采用 PMAE, FMAE, PMIRE 用于苦参中主要生物碱的提取,并比较了 3 种不同微波辅助提取方法的差异(表 4)。

表 4 PMAE, FMAE, PMIRE 提取苦参生物碱的的比较 (n = 3)

方法	微波辅助提取过程				生物碱含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		RSD/%	
	微波作用介质	作用强度	微波功率	提取加热方式	氧化苦参碱	苦参碱	氧化苦参碱	苦参碱
PMAE	溶剂	中强	功率高	密闭、高温、高压、微波加热回流	4.96	2.49	1.3	1.9
FMAE	溶剂	较弱	功率低	开放、常压、微波加热冷凝回流	4.94	1.72	2.8	3.0
PMIRE	水	强	功率适中	微波辐射药材,常压下常规加热冷凝回流	5.20	2.99	2.6	2.7

### 3 讨论

3 种微波提取方式的提取过程不同, PMAE 属于密闭提取系统,药材和溶剂在微波的作用下,极性溶剂吸收微波能可产生较强热效应,在高温高压的环境中药材溶胀容易破壁、溶质溶出,高温高压的溶剂回流加速了这一过程; FMAE 则属于开放系统,微波辐射同样能使溶剂产生较强的热效应,在回流状

态下有利于浸没在溶剂的药材溶胀、细胞破壁使溶质浸出; PMIRE 由于有微波辐射前处理过程,经水浸泡的药材可以与微波强烈作用,导致细胞破壁效率更高,使细胞内的组分在后续的溶剂提取更容易、提取效果更好<sup>[19-20]</sup>。

从 3 种方法比较可看出, PMAE 和 FMAE 的提取主要是溶剂与微波的相互作用产生的热效应的影

响,由于微波作用的“分子搅拌”,加热均匀、快速。PMIRE 由于细胞辐射前处理与提取可分开处理,药材破壁效果好、处理量更大、设备简单、组合及操作简便、方便实用。

[致谢]感谢上海屹尧微波化学有限公司的大力支持。

### [参考文献]

- [1] 战渤玉,李东霞,高明. 苦参的现代研究进展[J]. 中医药信息,2009,26(1):23.
- [2] 刘雪花. 苦参生物碱的药理研究进展[J]. 中国实用医药,2009,14(4):232.
- [3] 陈曙霞. 苦参生物碱的药理研究进展[J]. 中成药,2003,25(1):75.
- [4] Zhang L, Liu W T, Zhang R W, et al. Pharmacokinetic study of matrine, oxymatrine and oxysophocarpine in rat plasma after oral administration of *Sophora flavescens* Ait. extract by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(4/5): 892.
- [5] Ling J Y, Zhang G Y, Cui Z J, et al. Supercritical fluid extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. and purification by high-speed counter-current chromatog[J]. J Chromatogr A, 2007, 1145(1/2): 123.
- [6] 高鹏. 离子交换树脂法纯化苦参总生物碱的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):39.
- [7] Liu G Q, Dong J, Wang H, et al. Characterization of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(5): 1065.
- [8] Yin J Y, Xu Y H, Li J, et al. Analysis of quinolizidine alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by capillary electrophoresis with tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II)-based electrochemi-luminescence detection[J]. Talanta, 2008, 75(1): 38.
- [9] Tang F, Zhang Q L, Nie Z, et al. Sample preparation for analyzing traditional Chinese medicines [J]. Trends Anal Chem, 2009, 28(11): 1253.
- [10] 涂瑶生,李绍林,孙冬梅,等. 星点设计-效应面法优选苦参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):34.
- [11] Chung-Hung Chan, Rozita Yusoff, Gek-Cheng Ngoh, et al. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(37): 6213.
- [12] Katarzyna Madej. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds [J]. Trends Analy Chem, 2009, 28(4): 436.
- [13] Tang F, Zhang Q L, Nie Z, et al. Sample preparation for analyzing traditional Chinese medicines [J]. TrAC Trends Anal Chem, 2009, 28(11):1253.
- [14] 李攻科,杜甫佑,肖小华. 微波辅助萃取技术在中药现代化中的应用[J]. 精细化工,2007,24(12):1184.
- [15] 范华均,肖小华,刘玉竹,等. 微波辐射溶剂回流法提取石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏[J]. 中山大学学报:自然科学版,2006,45(3):46.
- [16] 张煜帆,樊轻亚,黄晓文,等. 微波辐射-溶剂回流提取农吉利中农吉利甲素[J]. 中国现代应用药学,2009,26(10):819.
- [17] 樊轻亚,范华均,黄晓文,等. 微波辐射/HPLC 测定农吉利中牡荆素和异牡荆素的含量[J]. 中成药,2010,32(2):326.
- [18] 黄晓文,范华均,黄庆华,等. 气相色谱-质谱法测定苦参中生物碱[J]. 理化检验:化学分册,2009,45(2):190,230.
- [19] 范华均,林广欣,肖小华,等. 微波辅助提取石蒜和虎杖中有效化学成分的热力学机制研究[J]. 高等学校化学学报,2006,27(12):2271.
- [20] 余旭辉,陈浩浩,黄晓文,等. 微波辐射对苦参碱提取的影响及其动力学和热力学机制研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(3):260.

[责任编辑 全燕]