



超声法提取卢豆茎中胡芦巴碱

杨玉焕,葛强,王洋,郭娜,常醉

(东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心/东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室,哈尔滨 150040)

摘要:为了研究超声法提取卢豆茎中胡芦巴碱的最佳工艺条件,以胡芦巴碱的提取率为指标,采用高效液相色谱法测定样品中的胡芦巴碱含量。在单因素试验结果的基础上,选择提取温度、提取时间、超声功率和甲醇浓度4个主要影响因素进行了4因素15水平的均匀设计试验,通过SPSS统计软件分析试验结果。确定了卢豆茎中胡芦巴碱的最佳工艺条件:以48%甲醇为溶剂在64℃、120 W频率下超声波提取75 min。超声波法提取卢豆中的胡芦巴碱操作简单,用时短,提取率高。

关键词:胡芦巴碱;超声提取;高效液相色谱

中图分类号:S567.21+9,R284.2

文献标志码:A

论文编号:2011-0470

Ultrasonic Extraction of Trigonelline from *Trigonella coerulea* Stem

Yang Yuhuan, Ge Qiang, Wang Yang, Guo Na, Chang Zui

(Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University/Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The optimal conditions were studied for the ultrasonic extraction of trigonelline from *Trigonella coerulea* stem. Taking the yield of trigonelline as index, the content of trigonelline was determined by HPLC. On the basis of single factor experiments, four major influential factors, i.e., extraction temperature, extraction time, ultrasonic power and methanol concentration, were selected to optimize the extraction conditions using uniform design. The results were analyzed through SPSS software. The optimal conditions for trigonelline extraction were explored to be ultrasonically extracted by 48% methanol at 64℃ and 120 W ultrasonic power for 75 min. The ultrasonic extraction is efficient and rapid for trigonelline with high yield.

Key words: Trigonelline; Ultrasonic Extraction; HPLC

0 引言

卢豆(*Trigonella coerulea* (Desv.) Ser.)是豆科胡芦巴属植物,原产于欧洲中南部,在中国黑龙江、吉林、江苏等地有栽培,种子药用。卢豆的用途同胡芦巴,具有补肾利水,理气止痛的功效。此外卢豆中含有多种甾体皂苷,清蛋白,球蛋白,谷蛋白等,有较高营养价值^[1]。

通过对卢豆乙醇提取物的化学成分分析,发现卢豆中含有生物碱成分,经过高效液相色谱分离和紫外光谱分析,并与胡芦巴碱(Trigonelline)标准品对照,初鉴定卢豆生物碱主要成分为胡芦巴碱。胡芦巴碱是一种广泛分布于动植物中的季铵盐生物碱,具有降血糖、降血脂、抗肿瘤、杀菌等生物活性^[2-5]。胡芦巴碱作为卢

豆同属植物胡芦巴的主要化学成分^[6-8],在2010版中华人民共和国药典中作为鉴别胡芦巴的主要质量控制指标^[7]。目前国内外对卢豆的研究报道较少,对于卢豆药材中胡芦巴碱的提取和检测方法尚无报道。本研究参照中华人民共和国药典,以卢豆为研究材料,对卢豆茎中胡芦巴碱的超声提取方法进行了优化,旨在建立卢豆中胡芦巴碱的最佳超声提取工艺,以为建立卢豆药材的质量控制方法以及卢豆资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

卢豆茎,2009年9月采自哈尔滨市栽培区,105℃

基金项目:黑龙江省博士后启动基金资助项目(520-415027)。

第一作者简介:杨玉焕,女,1957年出生,副教授,硕士,主要从事植物化学的科研和教学工作。通信地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心/东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, Tel: 0451-82191247, E-mail: qianggenefu@126.com。

收稿日期:2011-06-20, **修回日期:**2011-09-22。

杀青 30 min 后 60℃ 烘干至恒重, 粉碎备用。胡芦巴碱对照品购自中国药品生物制品检定所(批号: 110883-200502), 乙腈为色谱纯(Sigma-Aldrich 公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

高效液相色谱系统, 包括 1525 型泵、717 型自动进样器、2996 型二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); DL-120B 型智能超声波发生器(上海立信仪器有限公司); TDL-40B 型沉降过滤式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); Legend Micro-17 型微量离心机(赛默飞世尔科技有限公司); Multitemp-III 型恒温循环水浴泵(瑞典 Amersham Bioscience)。

1.2 分析方法

1.2.1 液相色谱分析条件 色谱柱为大连伊利特氨基柱(Hypersil NH₂ 5 μm, D 4.6 mm×250 mm); 流动相为乙腈/水(体积比 85/15); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 265 nm; 进样量: 20 μL。胡芦巴碱对照品和提取样品的 HPLC 色谱图见图 1。

1.2.2 标准曲线建立 精密称取胡芦巴碱对照品 10.0 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 得到 1.0 mg/mL 胡芦巴碱对照品储备液。分别精密吸取胡芦巴碱对照品储备液 25、50、100、200、400、800、1600 μL 置于 10 mL 容量瓶中, 无水甲醇稀释至刻度, 摇匀, HPLC 法测定。以峰面积(y)为纵坐标, 质量浓度(x)为横坐标, 绘制标准曲线, 并进行回归分析。

1.2.3 分析样品的制备 精密吸取 1 mL 提取液于离心

管中, 13000 r/min 离心 30 min, 取上清 200 μL 加入进样瓶, 进样, HPLC 法测定。按得到的标准曲线回归方程计算样品液中胡芦巴碱的质量浓度, 并计算胡芦巴碱的提取率:

$$\text{胡芦巴碱提取率} = \text{胡芦巴碱浓度} \times \frac{\text{提取液体积}}{\text{卢豆茎质量}}$$

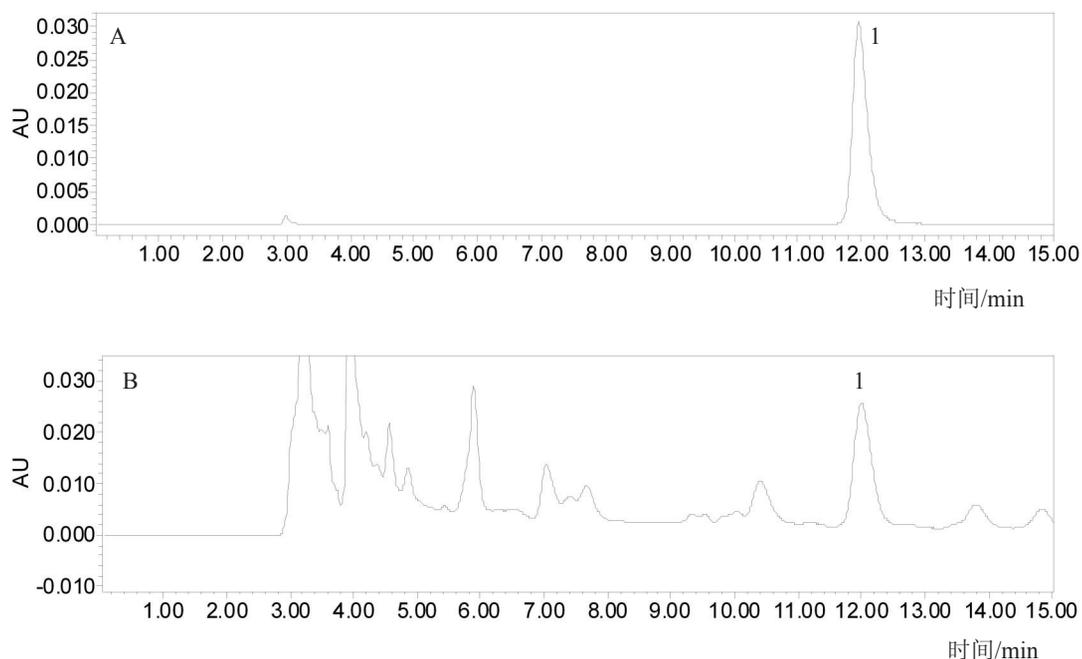
1.3 试验设计

1.3.1 单因素试验设计

(1) 提取溶剂的选择。精密称取卢豆茎粉 0.5 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 在室温 28℃ 条件下分别以水、无水甲醇、无水乙醇、甲醇-水(1:1)、乙醇-水(1:1)为提取溶剂进行超声处理 40 min, 按 1.2 节分析方法测定胡芦巴碱提取率, 考察不同类型溶剂对胡芦巴碱提取率的影响。

(2) 固液比的选择。精密称取卢豆茎粉末 0.5 g, 在室温 17℃ 条件下分别以 1:10、1:20 和 1:50 的固液比进行超声处理 40 min, 按 1.2 节分析方法测定胡芦巴碱提取率, 考察不同固液比对胡芦巴碱提取率的影响。

1.3.2 均匀试验设计 根据单因素试验及相关资料, 选取 4 个因素即提取温度(X₁)、提取时间(X₂)、超声功率(X₃)、甲醇浓度(X₄)进行均匀试验。均匀设计 15 个水平, 按 U15*(15⁷) 均匀设计表安排试验。做 15 个样本, 每个样本精确称取卢豆茎粉 0.5 g, 放入 10 mL 容量瓶中, 按均匀设计表中参数进行超声提取, 按 1.2 节分析方法测定胡芦巴碱提取率, 每个样本试验重复 3 次。



A. 对照品; B. 样品; 1. 胡芦巴碱

图 1 对照品及样品的 HPLC



各试验因素和水平见表1。

表1 U15*(15⁷)均匀设计表及试验结果(偏差值:0.1551)

试验号	提取温度/℃	提取时间/min	超声功率/W	甲醇浓度/%	胡芦巴碱提取率/(μg/g)	RSD/%
1	20	25	77	80	498.4	0.5
2	24	50	26	62	545.6	7.1
3	28	75	91	44	583.2	1.2
4	32	20	41	26	518.2	2.0
5	36	45	105	8	535.2	3.1
6	40	70	55	86	540.1	3.0
7	44	15	120	68	560.2	0.8
8	48	40	69	50	534.2	1.4
9	52	65	19	32	523.4	6.5
10	56	10	84	14	479.6	6.0
11	60	35	33	92	461.0	6.3
12	64	60	98	74	567.6	3.3
13	68	5	48	56	374.8	5.2
14	72	30	113	38	539.8	4.3
15	76	55	62	20	480.2	2.8

1.3.3 提取条件优化 用SPSS 17.0统计软件对均匀设计试验数据进行多元回归分析,求得回归方程,通过方程推导出最优理论条件及胡芦巴碱提取率。

1.3.4 验证试验 按1.3.3节提取条件优化推导所得最优理论条件进行试验,按1.2节分析方法测定胡芦巴碱提取率,重复3次,并与预测值比较。回收提取残渣在最优理论条件下进行二次提取,测定残渣中胡芦巴碱提取率,考察提取是否完全。

2 结果与分析

2.1 标准曲线建立

胡芦巴碱的标准曲线见图2。其线性回归方程为

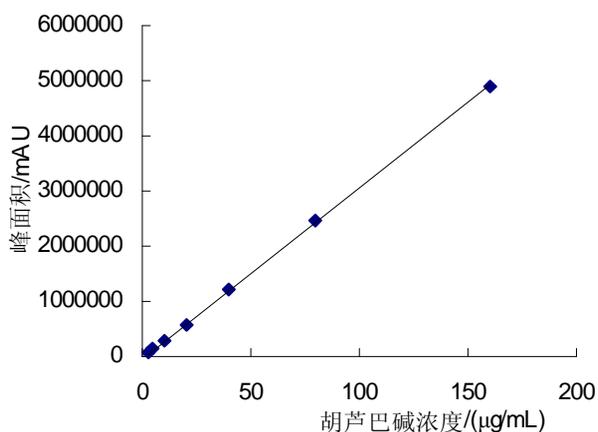


图2 胡芦巴碱的标准曲线

$y=30868x-24791$, 相关系数 $R^2=0.9999$ 。胡芦巴碱在质量浓度为2.5~160.0 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2 提取溶剂的选择

由表2可以看出,以不同的溶剂进行超声提取,甲醇-水(1:1)超声提取胡芦巴碱提取率最高,无水乙醇提取率最低,故选择甲醇与水的混合溶剂作进一步考察。

表2 提取溶剂的选择

No.	提取溶剂	胡芦巴碱提取率/(μg/g)	RSD/%
1	水	542.8	9.3
2	无水甲醇	345.6	14.0
3	无水乙醇	38.8	7.5
4	甲醇-水(1:1)	550.8	2.3
5	乙醇-水(1:1)	460.2	8.0

2.3 固液比的选择

由表3可以看出,以不同的固液比进行超声处理,1:10的固液比胡芦巴碱提取率较低,1:50的固液比胡芦巴碱提取率略高于1:20的固液比,但并无显著差异,因而选择1:20的固液比。

表3 固液比的选择

No.	固液比	胡芦巴碱提取率/(μg/g)	RSD/%
1	1:10	347.2	11.6
2	1:20	427.6	5.9
3	1:50	429.6	3.1

2.4 均匀设计试验结果

均匀试验结果见表1。对均匀设计试验结果进行直观分析,可以看出各实验结果中3号试验胡芦巴碱提取率最高,3号试验各因素水平值很可能在最优提取条件附近。

2.5 提取条件优化

用SPSS 17.0统计软件对均匀设计试验结果进行多元回归分析,求得回归方程:

$$Y=267.5327-1.0672X_3+0.5596X_4-0.0237X_1^2+0.0054X_3^2-0.0058X_4^2+0.0145X_1X_2+0.0198X_1X_3$$

其相关系数 $R=0.9822$, $F=27.2821$, $***P=0.0001<0.01$, 方程在 $\alpha=0.05$ 水平上显著。根据回归方程分析,最优提取条件为 $X_1=64$, $X_2=75$, $X_3=120$, $X_4=48$, 即提取温度64℃,提取时间75 min,超声功率120 W,甲醇浓度48%。最优提取条件与均匀设计3号试验对比,可以看出,除温度水平差异较大外,其他因素水平并无明显差异。



2.6 验证试验

按2.5节提取条件优化中推导出的最优提取条件提取卢豆样品,测得卢豆茎胡芦巴碱提取率为625.2 $\mu\text{g/g}$,与回归方程预测值653.6 $\mu\text{g/g}$ 接近。重复试验相对标准偏差为1.53%,试验重现性良好,表明所得优化条件适于卢豆胡芦巴碱的提取。对残渣进行二次超声提取,测得残渣的胡芦巴碱提取率为31.6 $\mu\text{g/g}$,残渣所含胡芦巴碱的量小于5%,表明提取较完全。此超声波提取法适用于卢豆中胡芦巴碱的提取。

3 结论与讨论

本研究以胡芦巴碱提取率为指标,采用HPLC法测定胡芦巴碱含量,通过对提取温度、提取时间、超声功率、甲醇浓度对胡芦巴碱提取率影响的研究,确定了卢豆胡芦巴碱超声法提取条件:以48%甲醇为溶剂在64 $^{\circ}\text{C}$ 、120 W频率下超声波提取75 min。该方法操作简单,用时短,提取率高,适用于卢豆茎中胡芦巴碱的提取。

目前国内对于胡芦巴属植物的开发主要集中在胡芦巴上,背景资料相对比较齐全,而对其同属植物卢豆的研究报道较少。本研究旨在建立卢豆中胡芦巴碱的快速提取和分析检测方法,为卢豆应用和质量控制提供科学依据。参阅相关文献,胡芦巴碱的提取方法多采用超声提取法^[9-11],在前人的研究基础上,本研究对卢豆中胡芦巴碱的提取方法及测定方法进行了考察,试验结果表明,在提取溶剂中加入适量的水有助于胡芦巴碱的提取,这与刘广学等^[9]研究结果相符,但提取温度的优化未见报道,本研究结果表明,适当提高提取温度有助于提高胡芦巴碱的提取率。胡芦巴碱含量的测定多采用反相高效液相色谱法^[12-15],但研究中发现胡芦巴碱在反相C18柱难以达到理想的分离度,而采用氨基柱能够实现良好的分离,这说明由于胡芦巴碱极性较强,采用极性柱有利于获得良好的分离效果。本研究为了快速和完全提取卢豆中胡芦巴碱,选用了甲醇和水混合溶剂,只适用于实验室检测分析,而乙醇和水混合溶剂作为一种安全无毒的提取溶剂亦有较好提取效果,可作进一步研究。

在中国东北地区,卢豆籽也被作为中药胡芦巴来源使用,人们一般在卢豆果实成熟后,采收种子,地上部分一直作为废弃物,本研究表明卢豆茎中亦含有一

定量的胡芦巴碱,尽管含量较低,作为提取来源的意义不大,但用于开发卢豆其他产品(例如制保健茶)仍具有一定意义。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第四册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:674.
- [2] Nobuhiro H, Rieko O, Yutaka M, et al. Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells[J]. Biosci, Biotechnol, Biochem, 2005, 69(3): 653-658.
- [3] Allred K F, Yackley K M, Jairam V, et al. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans[J]. The Journal of Nutrition, 2009, 139(10): 1833-1838.
- [4] Amuta O P, Nnamani P O, Musa A D, et al. Three pyridinium alkaloids may account for the antibiotic effect of the seed of *Abrus precatorius*[J]. Pelagia Research Library, 2011, 2(2): 42-45.
- [5] Yoshinari O, Igarashi K. Anti-Diabetic Effect of Trigonelline and Nicotinic Acid, on KK-Ay Mice[J]. Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(20): 2196-2202.
- [6] Margreet R O, Aimee E D. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on incretin hormones[J]. Nutrition & Metabolism, 2011, 8: 10.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 第一部[S]. 中国医药科技出版社, 2010: 225.
- [8] 姜华, 尹焜, 赵余庆. 胡芦巴碱的生物分布与药理作用[J]. 中草药, 2008, 39(4): 638-640.
- [9] 刘广学, 尚明英, 李辉, 等. 胡芦巴药材中胡芦巴碱的提取方法及其含量测定[J]. 中国药品标准, 2005, 6(4): 11-14.
- [10] 徐雅琴, 刘春生, 崔崇士. 超声波法提取南瓜果肉中胡芦巴碱最佳工艺的研究[J]. 现代农业科技, 2009(10): 7-13.
- [11] 刘衡, 姚春芬, 陈英. HPLC法测定不同种天南星中胡芦巴碱的含量[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(18): 177-178.
- [12] Roman L, Erkan F Y, Rudolf E, et al. Quantitative Investigation of Trigonelline, Nicotinic Acid, and Nicotinamide in Foods, Urine, and Plasma by Means of LC-MS/MS and Stable Isotope Dilution Analysis[J]. Food Chemistry, 2008, 56(23): 114-121.
- [13] Wu X, Skog K, Jagerstad M, et al. Trigonelline, a naturally occurring constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee[J]. Mutat Res, 1997, 391(3): 171.
- [14] Casal S, Beatriz O M, Margarida A F, et al. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee[J]. Food Chemistry, 2000, 68(4): 481-485.
- [15] 赵怀清, 曲燕, 王学娅, 等. 高效液相色谱法测定胡芦巴中胡芦巴碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 194-196.