第 35卷

离子液体微波辅助萃取石蒜中生物碱的研究

杜甫佑 肖小华 李攻科

(中山大学化学与化学工程学院,广州 510275)

摘 要 以离子液体溶液为溶剂,研究了离子液体微波辅助萃取石蒜中石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏生物碱。考察了离子液体的种类和浓度对萃取石蒜生物碱的影响,并与传统有机溶剂和传统萃取技术进行了对比研究。结果表明, $1.0\,\mathrm{mol/L}\,[\,\mathrm{bm\,im}\,]\,\mathrm{Cl}$ 溶液为溶剂,液固比 ($\mathrm{mL}\,\mathrm{g}$) 15 1,80 微波辅助萃取 $10\,\mathrm{m\,in}$,石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏生物碱的萃取率分别为 2 730、0.857和 0.179 $\mathrm{mg/g}$ 。与传统的萃取方法比较,本方法快速高效、环境友好。

关键词 离子液体,微波辅助萃取,石蒜,生物碱

1 引 言

自 1986年 Ganzler等[1]首次报道采用微波辅助萃取 (MAE)天然产物中化学成分以来,微波辅助萃取技术在食品、环境和天然产物等领域得到了广泛的应用[2~5],它以萃取时间短、溶剂用量少、选择性强、萃取效率高等优点在中药有效成分的萃取分离方面得到广泛关注[5.6]。在微波辅助萃取中草药中有效活性成分时,萃取溶剂需要有一定的极性才能吸收微波进行内部加热,通常选用极性较强的溶剂或者是极性溶剂和非极性溶剂的混合液,如甲醇、乙醇、二氯甲烷 甲醇、水 甲苯等。但这些挥发性有机溶剂在样品前处理过程中会引起环境污染。离子液体非常适合做 MAE萃取溶剂,因为离子液体是由离子组成的,具有蒸汽压低、挥发性小、溶解能力强、萃取能力好、液态范围宽等独特的物理化学性质,同时对微波具有强的吸收和热转换能力[7]。离子液体作为一种可设计的绿色溶剂广泛应用在液液萃取、液相微萃取、固相微萃取、膜分离和双水相萃取等样品预处理方面[8~11]。与有机溶剂相比,离子液体做溶剂可以减少萃取分离过程中的环境污染,但在常温下离子液体的粘度较大,扩散能力较差,难以直接应用于中草药等固体基质中有效成分的萃取分离。通过添加共溶剂或者升高温度,可以显著降低离子液体的粘度,提高溶剂的扩散能力,而离子液体仍能保持好的溶解和萃取能力。文献报道离子液体溶液可作为 MAE溶剂,萃取中药材中有效活性成分[12]。本研究在有机溶剂 MAE萃取石蒜中生物碱的研究工作

基础上^[13,14],以离子液体溶液为溶剂, 微波辅助萃取石蒜中的石蒜碱、力克拉 敏和加兰他敏三种生物碱(图 1),并与 传统萃取方法进行对比研究。

H,CO OH H,CO OH T 表緘 Lycorine 力可拉敏 Lycoramine 加兰他敏 Galanthamine

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

图 1 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的化学结构

Fig 1 Chemical structures of lycorine, lycoram ine and galantham ine MAS-I微波合成 萃取仪 (上海新仪

微波化学科技有限公司), XMTA数显恒温水浴(余姚市远东数控仪器厂); LC-VP液相色谱仪(日本岛津公司), Hypersil ODS C₁₈色谱柱(150 mm x4.6 mm i d , 5 µm,大连依利特公司), Mercury-Plus 300核磁共振仪(美国 Varian公司)。

甲基咪唑、氯代正丁烷、溴代正丁烷、溴乙烷和 $NaBF_4$ (化学纯),三乙胺、95% (V/V)乙醇、HCLNaOHA $AgNO_3$ (分析纯),乙腈 (色谱纯),石蒜碱和加兰他敏标准品(Sigma公司),力可拉敏标准品

2007-02-09 收稿; 2007-04-09 接受

本文系国家自然科学基金 (Na 20375050)和"十一五 国家科技支撑计划重点 (Na 2006BA K03A08)资助项目

^{*} E-mail: cesgkl@mail sysu edu cn

(广东天普药业有限公司)。

2.2 实验方法

- **2.2.1** 离子液体的合成 氯化 1·丁基 -3 甲基咪唑盐([bm im]Cl)、溴化 1·丁基 -3 甲基咪唑盐([bm im]Br)、1·丁基 -3 甲基咪唑四氟硼酸盐([bm im]BF4])和 1·乙基 -3 甲基咪唑四氟硼酸盐([em im]BF4]) 4种离子液体参照文献 [15,16]方法合成,所合成的离子液体在 80 真空干燥。用 1 H NMR 和 13 C NMR 检测离子液体的纯度,各离子液体的 NMR 谱图表明离子液体中没有其它有机杂质。 AgNO3 滴定实验没有检测到 [bm im][BF4]和 [em im][BF4]中卤离子的存在。离子液体溶液直接由相应的离子液体和水配置而成。
- 2.2.2 石蒜生物碱的萃取 将石蒜 (湖南省采集)剥开、自然晒干、粉碎、过筛,得到粒径为 0.18 mm 样品。 (1)微波辅助萃取 (MAE) ^[13] 准确称取 1.000 g粒度为 0.18 mm 石蒜样品于圆底烧瓶中,加入 15 mL溶剂,放入搅拌子,80 下微波辅助萃取 10 min。 (2)加热回流萃取 (HRE) 准确称取 1.000 g石 蒜样品于圆底烧瓶中,加入 30 mL溶剂,搅拌,在80 下恒温加热提取 4 h。 (3)室温浸泡萃取 (ME) 准确称取 1.000 g石蒜样品于圆底烧瓶中,加入 30 mL溶剂,搅拌,在80 下恒温加热提取 4 h。 (3)室温浸泡萃取 (ME)
- **2 2 3** 色谱分析 将石蒜提取液调至 pH 8 0并定容。取部分上述滤液过 0 45 μ m 滤膜 ,用 Hypersil ODS C_{18} 色谱柱进行分析。检测波长为 232和 289 nm ,流动相为 0 7% (V/V)三乙胺水溶液(醋酸调溶液 pH为 8 0) (A)和乙腈 (B) ,流速为 1 mL /m in ,进样量为 10 μ L。梯度洗脱程序:0 ~ 20 m in ,85% A ~ 80% A; 20 ~ 30 m in ,80% A ~ 0% A ,然后再持续 10 m in 。

3 结果与讨论

3.1 离子液体的选择及优化

利用 [bm im]Cl, [bm im]Br, [bm im][BF,]和 [em im][BF,] 4种离子液体溶液分别在相同实验条件下微波辅助萃取石蒜样品,结果如图 2所示。通过对比石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏 3种生物碱对应峰的峰面积,可知 4种离子液体溶液都能萃取石蒜中的生物碱,但离子液体中阳离子和阴离子对石蒜中生物碱的萃取能力是有区别的,其中阳离子对石蒜生物碱的萃取起主要作用,而阴离子起着次要作用,这与咪唑基阳离子具有多种作用力有着密切关系 [17]。咪唑基阳离子与石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏之间存在 -、氢键、离子化等作用,这些作用力有利于石蒜生物碱的溶解和萃取。

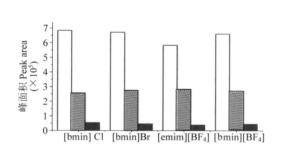


图 2 不同离子液体溶液对萃取石蒜中生物碱的影响 Fig. 2 Effects of different room temperature ionic liquids (RTILs) solutions on the extraction of alkaloid

□: 石蒜碱(lycorine);
□: 力克拉敏(lycramine);
□: 加兰他敏 (galanthamine)。

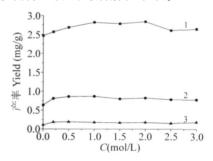


图 3 溶剂中 [bm in]Cl浓度对萃取石蒜生物碱的影响 Fig 3 Effects of the concentration of 1-butyl-3-methylim idazolium chloride ([bm in]Cl) on the microwave assisted extraction (MAE) yields 1. 石蒜碱(lycorine); 2 力克拉敏(lycramine); 3. 加兰他敏

从图 2可知,[bm im]Cl, [bm im]B和 [bm im][BF4]溶液对石蒜中 3种生物碱都有很好的萃取效率,因 [bm im]Cl对加兰他敏的萃取效果略好于其它 3种离子液体溶液,因此,选择离子液体 [bm im]Cl,用浓度为 $0 \sim 3$. $0 \mod 1$ L的 [bm im]Cl溶液做溶剂,在 MAE条件下分别萃取石蒜中生物碱,结果如图 3所示。[bm im]Cl浓度从 0增加到 1. $0 \mod 1$ L,石蒜碱的萃取量明显增加,在离子液体浓度为 $2 \mod 1$ L

(galanthamine).

时,石蒜碱的萃取率达最大,之后萃取率降低。力克拉敏和加兰他敏的萃取量开始随离子液体浓度的增加而增加,[bmim]Cl浓度为 1.0 mol/L 时达最大,之后萃取量稳定。因石蒜的 MAE提取过程动力学受内部扩散传质控制^[14],当离子液体浓度增加时,离子液体溶液的溶解能力增强,但该溶剂的扩散能力随之降低,溶剂则较难扩散进入石蒜基质内,被萃取出的生物碱在基质界面也不易扩散。因此,综合考虑3种生物碱的萃取率,选择 1.0 mol/L [bmim]Cl溶液作为微波辅助萃取石蒜的溶剂。

3.2 HPLC色谱分析条件的优化

石蒜碱在 232和 289 nm 处有强的吸收,力克拉敏和加兰他敏在 232 nm 处有强的吸收。 [bm in]Cl 在 232 nm 处吸收较强,而在 289 nm 处吸收很弱,因而石蒜碱在 232 nm 处测定时受 [bm in]Cl吸收峰的干扰,在 289 nm 处测定时不受 [bm in]Cl吸收峰的干扰 (见图 4)。因此,选择 232 nm 波长处检测力克拉敏和加兰他敏,289 nm 波长处检测石蒜碱。

石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏具有弱碱性,弱碱性流动相有利于 3种生物碱的 HPLC分析。比较三乙胺醋酸水溶液 pH在 7.0, 7.5, 8.0, 8.5和 9.0时对检测 3种生物碱的影响,选择流动相水溶液 pH值 为 8.0。将石蒜萃取液的 pH值调至 6.5, 7.0, 8.0, 8.5和 9.0, 石蒜碱在萃取液 pH 7.0时检测信号较强,而力可拉敏和加兰他敏在 pH 8.0时检测信号较强。综合考虑,将萃取液的 pH值调至 8.0。

在上述分析条件下,石蒜萃取液的色谱图如图 5所示,其中石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏的色谱峰保留时间分别为 6.7、10.8和 14.5 m in。

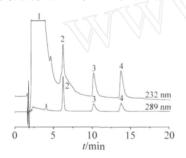


图 4 石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏标准溶液的色谱图 (80 mg/L, 0.5 mol/L [bm in]Cl溶液配制)

Fig 4 Chromatograms of the standard solution ($80\,mg/L$, 0. 5 mol/L [bm im]C1 solution prepared)

1. [bm im]Cl; 2. Lycorine; 3. Lycoram ine; 4. Galantham ine

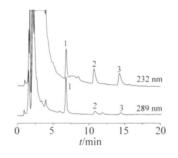


图 5 1.0 mol/L [bm in]Cl石蒜萃取液的色谱图 Fig 5 Chromatograms of Lycoris radiate extract 1. 石蒜碱(lycorine); 2. 力可拉敏(lycoramine); 3. 加兰他敏(galanthamine)。

3.3 方法的标准曲线、检出限、回收率及精密度

按照选定的色谱分析条件,分别以石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏的峰面积对浓度绘制标准曲线,并根据信噪比 S/N=3测得各组分检出限。标准曲线、相关系数及检出限见表 1所示。3种生物碱在设定的浓度范围内线性关系良好,检出限较低。

表 1 3种生物碱的标准工作曲线、线性范围、相关系数和检出限

Table 1 Calibration curves, correlation coefficients and detection limits of alkaloids

生物碱 标准曲线 * Alkabids Calibration curve *		线性范围 Linear range (mg/L)	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 Detection limit (mg/L)	
石蒜碱 Lycorine	$Y = 7089. \ 3X + 1360. \ 6$	0. 800 ~ 200	0. 9999	0. 20	
力克拉 Lycoramine	Y = 9851. 7X - 12367	4. 00 ~ 200	0. 9994	0. 13	
加兰他敏 Galanthamine	Y = 12970X - 12190	2 00 ~ 200	0. 9993	0. 053	

^{*} Where X was alkaloid concentration as mg/L and Y was peak area

吸取 10 mg/L的混合标准溶液 10 µL,重复测定 7次。结果表明,3种生物碱在此方法下,对应峰的保留时间波动小于 0.1 min,石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏三者峰面积的相对标准偏差 (RSD)分别为 0.7%、3.1%和 4.0%。将 [bmin]Cl溶液配制的混合标准溶液和萃取液在 4 下保存,20 d内每隔 3 d

测试一次,每次重复 5次。石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏 3种生物碱峰面积的日内 RSD分别为 1.0%、 2.6%和2.4%,日间 RSD分别为3.5%,6.2%和6.5%。另准确称取4份石蒜样品,每份1.000g,按照 确定的微波辅助萃取方法平行处理后,分别进样 10 µL,按照外标法测定其含量并计算 RSD,石蒜碱、力 克拉敏和加兰他敏 3种生物碱含量测定的 RSD分别为 5.7%、6.8%和 5.4%,方法精密度良好。

准确称取石蒜样品 9份各 1.000 g,分 3个水平分别加入一定量对照品,按照建立的微波辅助萃取 方法提取,每个实验重复 3次,结果见表 2。石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏的回收率分别为 86.8% ~ 95.7%、81.3%~100.2%和78.0%~90.5%,相对标准偏差在1.8%~11.2%之间。

表 2 石蒜中三种生物碱的回收率实验

Table 2 Test results of the recovery experiment (n = 3)

生物碱 Alkaloids	样品中含量 Content (mg/g)	样品中添加量 Added (mg/g)	检测量 回收率 Found (mg/g) Recovery (%)		相对标准偏差 RSD(%)	
石蒜碱 Lycorine		0. 80	3. 42	86. 8	2. 7	
	2. 73	0. 40	3. 11	95. 7	1. 8	
		0. 080	2 80	92. 5	10. 7	
力克拉敏 Lycoramine	0. 859	0. 80	1. 63	96. 3	8. 6	
		0. 40	1. 26	100. 2	2. 1	
		0. 080	0. 924	81. 3	11. 2	
加兰他敏 Galanthamine	0. 174	0. 40	0. 486	78. 0	9. 4	
		0. 20	0. 355	90. 5	5. 8	
		0. 080	0. 245	88. 5	6. 0	

3.4 离子液体和有机溶剂对石蒜中生物碱萃取的比较

采用 95%() 乙醇为溶剂萃取石蒜中生物碱具有较好的效果[13]。研究中分别用 1.0 mol/L [bm in]C]溶液和 95% ()乙醇溶液做萃取溶剂,利用微波辅助萃取法、溶剂加热回流法和室温浸泡法 分别萃取石蒜中石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏生物碱,结果如表3所示。

表 3 不同条件下石蒜中石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏生物碱的萃取率

Table 3 Yields of lycorine, lycoram ine and galantham ine under different extraction conditions (n = 3)

萃取方式 Sample preparation	萃取溶剂 Solvent	石蒜碱 Lycorine		力克拉敏 Ly	力克拉敏 Lycoramine		加兰他敏 Galanthamine	
		产率 Yield (mg/g)	RSD (%)	产率 Yield (mg/g)	RSD (%)	产率 Yield (mg/g)	RSD (%)	
微波辅助萃取	95% 乙醇 Ethanol	1. 621	1. 5	0. 485	3. 1	0. 084	6. 9	
MAE	1. 0 mol/L [bm im]C1	2. 730	5. 7	0. 857	6. 8	0. 179	5. 4	
加热回流萃取	95% 乙醇 Ethanol	2 601	3. 1	0. 683	3. 7	0. 127	7. 6	
HRE	1. 0 mol/L [bm im]C1	2 084	0. 4	0. 694	1. 9	0. 132	8. 3	
室温浸泡萃取	95% 乙醇 Ethanol	1. 022	1. 2	0. 280	7. 7	0. 068	2. 2	
ME	1. 0 mol/L [bm im]C1	1. 665	4. 9	0. 554	5. 8	0. 110	2. 9	

HRE: heating reflux extraction; ME: maceration extraction; [bm in]Cl: 1-butyl-3-methylimidazolium chloride

对比 MAE, HRE和室温浸泡法,在萃取石蒜样品时,MAE具有较特别的热力学和动力学机理[14,18], 在相同萃取条件下具有显著的优势。从表 3可知,采用 MAE技术.利用 1.0 mol/L [bm in]Cl做溶剂不 仅石蒜生物碱的萃取率高,并可避免挥发性有机溶剂的使用。在液固比为 15 1,80 下微波辅助萃取 10 m in 时, 石蒜碱、力克拉敏和加兰他敏的萃取量分别为 2 73、0 857和 0 179 mg/g。

对于不同的萃取方法,用 1.0 mol/L [bm in]Cl做溶剂,采用 MAE方法比 HRE和室温浸泡方法都 要好,溶剂用量小,萃取时间短,3种生物碱的萃取量明显高于两种传统方法。 其原因是 MAE萃取机理 与传统萃取方法的机理有明显的不同[4],它可以直接迅速加热溶剂和样品中的极性物质,对极性目标 物具有很好的选择性。离子液体不同于有机溶剂分子,它在溶液中成为离子,具有较强的极性,对微波 具有很强的吸收和热转换能力^[7],因而对石蒜生物碱具有很好的萃取效果。另外,在 MAE中,对比 95%乙醇,离子液体溶液做溶剂可显著提高石蒜生物碱的萃取率,原因可能是离子液体与石蒜生物碱形 成多种分子间作用力[17],如 -、n-、氢键等作用力,这些作用力可促使溶质的溶出。用 95%乙醇做溶 剂 ,在萃取时间较短 ,溶剂用量较少时 ,加热回流萃取石蒜生物碱的萃取效果低于采用 MAE的萃取效 果^[15],但用较多溶剂加热回流萃取较长时间,3种生物碱的萃取量也较高(见表 3)。无论用离子液体溶液还是 95%乙醇做溶剂,采用室温浸泡萃取技术,即使在较长时间用较多溶剂,其萃取效果都是最差的。因此,采用离子液体溶液微波辅助萃取石蒜中的生物碱,快速、高效,无环境污染。

References

- 1 Ganzler K, Salgo A, Valko K J. Chromatogr, 1986, 371 (2): 299 ~ 306
- 2 Young J C. J. Agric Food Chan., 1995, 43 (11): 2904 ~ 2910
- 3 Xie Hong-Xue (谢洪学), He Li-Jun (何丽君), Wu Yan (伍 艳), Lu Kui (卢 奎), Si Xue-Zhi (司学芝). Chinese J. Anal Chen. (分析化学), **2007**, 35(2): 187~190
- 4 Eskilsson C S, B jörklund E J. Chron atog r A, 2000, 902: 227 ~ 250
- 5 Li He (李 核), Li Gong-Ke (李攻科), Zhang Zhan-Xia (张展霞). Chinese J. Anal Chem. (分析化学), 2003, 31(10): 1261~1268
- 6 Wang Yan(王 艳), Zhang Tie-Jun (张铁军). Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2005, 36(3): 470~473
- 7 Hoffmann J, Nüchter M, Ondruschka B, Wasserscheid P. Green Chon., 2003, 5: 296~299
- 8 Zhao H, Xia S, Ma P. J. Chem. Technol Biotechnol, 2005, 80: 1089 ~ 1096
- 9 Baker GA, Baker SN, Pandey S, Bright FV. Analyst, 2005, 130: 800 ~ 808
- 10 Pandey S Anal Chin. Acta, 2006, 556: 38 ~ 45
- 11 Liu J F, Jönsson J Á, Jiang G B. Trends Anal Chen., 2005, 24 (1): 20~27
- 12 Du F Y, Xiao X H, Li G K J. Chromatogr A, 2007, 1140: 56 ~ 62
- 13 Fan Hua-Jun (范华均), Luan Wei (栾 伟), Li Gong-Ke (李攻科). Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2006, 25 (3): 27~30
- 14 Fan Hua-Jun (范华均), Lin Guang-Xin (林广欣), Xiao Xiao-Hua (肖小华), Li Gong-Ke (李攻科). Chinese J. Anal Chem. (分析化学), 2006, 34(9): 1260~1264
- 15 Huddleston J G, Visser A E, Reichert W M, Willauer H D, Broker G A, Rogers R D. Green Chan. , 2001, 3: 156 ~ 164
- 16 Kim K S, Park S Y, Choi S, Lee H. J. Chem. Eng. Data, 2004, 49: 1550 ~ 1553
- 17 Anderson J L, Ding J, Welton T, Arm strong D W. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124: 14247 ~ 14254
- 18 Fan Hua-Jun (范华均), Lin Guang-Xin (林广欣), Xiao Xiao-Hua (肖小华), Li Gong-Ke (李攻科). Chem. J. Chinese University (高等学校化学学报), 2006, 27(12): 2271~2276

M icrowave-assisted Extraction of Alkaloids in Lycoris Radiata Using Ionic Liquids Solution

Du Fu-You, Xiao Xiao-Hua, Li Gong-Ke*

(School of Chon istry and Chon ical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)

Abstract The application of ionic liquids aqueous solutions as solvents in the microwave-assisted extraction (MAE) technique was developed for the extraction of lycorine, lycoramine and galanthamine from *Lycoris* Effects of different ionic liquids and the concentration of selected ionic liquids on MAE were investigated, and tradition organic solvent and extraction techniques were compared. The optimal MAE conditions were that the solvent was 1.5 mol/L 1-buthyl-3-methylimidazolium chloride [bmin] Cl solution, the ratio of liquid/solid (mL g) was 15 1, the extraction temperature was 80 and time was 10 min. Under these MAE conditions, the yields of lycorine, lycoramine, galanthamine were 2.730, 0.857 and 0.179 mg/g respectively. This proposed method was a good, rapid and environmentally-friendly alternative technique to extract and analyze alkaloids in lycoris as compared with traditional extraction technique.

Keywords bnic liquids, microwave-assisted extraction, Lycoris radiata, alkabids

(Received 9 February 2007; accepted 9 April 2007)