

Surfactant—Mediated Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Alkaloids of *Plumula Nelumbinis*

Ping Luo, Junjie Sun, Shasha Wang, Jun Zhang

School of Chemistry and Chemical Engineering, CQU, Chongqing
Email: cstpw@163.com, cqujunjie@163.com

Received: Jun. 29th, 2014; revised: Jul. 4th, 2014; accepted: Jul. 11th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Ultrasonic assisted ethanol extraction of alkaloids from *Plumula Nelumbinis* was studied. The effects of ultrasonic power, ultrasonic time, immersion time, ethanol volume fraction and solid-liquid ratio on the extraction rate of alkaloids were investigated by single factor experiment, and the extraction parameters were optimized by orthogonal test. Under the best conditions, the influence of surfactants of Tween20, Tween60, Tween80, Span80, APG0810 and APG1214 on the extraction rate of alkaloids were illustrated. The results showed that under the best conditions of ultrasonic power 105 W, ultrasonic time 40 min, immersion time 30 min, ethanol volume fraction 70% and solid-liquid ratio 1:30, the extraction rate of alkaloids was 138.231 mg/g. By adding APG0810 0.02 g/mL, the extraction rate of alkaloids could be improved by 13.8% to 157.268 mg/g, which indicated that surfactant could improve the effect of ultrasonic extraction of alkaloids from *Plumula Nelumbinis* markedly.

Keywords

Alkaloids, *Plumula Nelumbinis*, Surfactant, Ultrasonic Extraction

表面活性剂——超声提取莲子心总生物碱 工艺研究

罗平, 孙俊杰, 王莎莎, 张均

重庆大学化学化工学院，重庆
Email: cstp@163.com, cqujunjie@163.com

收稿日期：2014年6月29日；修回日期：2014年7月4日；录用日期：2014年7月11日

摘要

对超声辅助乙醇提取莲子心总生物碱的工艺进行了研究。考察超声功率、超声时间、浸泡时间、乙醇体积分数、料液比对生物碱提取率的影响，在此基础上用正交试验进行条件优化。并在优化的工艺条件下，考察吐温20、吐温60、吐温80、司盘80、APG0810、APG1214表面活性剂对提取率的影响。结果表明，在超声功率105 W、超声时间40 min、浸泡时间30 min、乙醇体积分数70%、料液比1:30、APG08103加入量0.02 g/mL的条件下，生物碱提取率为157.268 mg/g，比单纯超声提取(138.231 mg/g)提高13.8%，证明表面活性剂可显著提高超声提取莲子心生物碱的效果。

关键词

生物碱，莲子心，表面活性剂，超声提取

1. 引言

莲子心为睡莲科植物莲成熟种子中的干燥幼叶及胚根，古名薏，味苦，性寒[1]。主要产于湖南、湖北、福建、江苏、浙江等地，具有清心安神、交通心肾、涩精止血之功效[2]，其内含有黄酮、生物碱、叶绿素、有机酸及微量元素等多种化学成分[3]。研究表明，含有莲心碱、甲基莲心碱、异莲心碱和莲心季铵碱的莲子心生物碱具有重要的药用价值，有降血糖降血脂，保护心肌缺血，抗血小板聚集，保护心脏及抗菌等生物活性，对心率失常有一定治疗效果[4]-[5]。因此莲子心中总生物碱的提取具有重要的研究价值。

超声提取是利用超声波的空化作用加速有效成分的溶出与扩散，由于具有提取时间短、温度较低、收益率高等特点，因而在生物碱的提取中被广泛采用[6]-[8]。

本文旨在利用表面活性剂的增溶效果[9]-[10]，以莲子心为原料，通过超声辅助乙醇提取生物碱，采用正交设计优化超声提取工艺，在此基础上考察加入表面活性剂对提取效果的影响，以期为莲子心生物碱的进一步开发提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

莲子心，由重庆百农网投资有限公司提供；莲心碱，深圳市美荷生物科技有限公司，色谱纯；吐温20、吐温60、吐温80、司盘80、APG08103、APG12143、无水乙醇、石油醚、盐酸、氨水、三氯甲烷等，均为分析纯。

2.2. 仪器与设备

KQ-3200DB 超声波清洗器昆山市超声仪器有限公司；T6 新世纪紫外可见分光光度计北京普析通用仪器有限责任公司；D2F-6050 型真空干燥箱上海一恒科学仪器有限公司；FW-100 型植物粉碎机天津泰斯特仪器有限公司。

2.3. 试验方法

2.3.1. 原料预处理

将莲子心晾晒、整理干净，干燥至恒重，植物粉碎机粉碎，置于玻璃干燥器中保存。

2.3.2. 莲子心总生物碱的提取

精确称取 1.00 g 莲子心粉末于具塞锥形瓶中，30 mL 石油醚脱脂，除去石油醚，加入定量百分浓度的乙醇，浸泡一段时间后，将锥形瓶固定在超声波清洗器中超声提取。提取液用砂芯漏斗抽滤后，吸取 5 mL 滤液水浴蒸干，在残渣中加入 5% 盐酸溶液溶解，过滤，滤液加等量氯仿萃取 3 次，分出氯仿层，取水层用氨水调 pH 至 9~10，再用氯仿萃取至生物碱反应至阴性为止(采用碘化铋钾)。合并氯仿液，水浴蒸干，残渣用无水乙醇溶解，过滤，定溶于 50 mL 容量瓶中，得总生物碱。

2.3.3. 标准曲线的绘制

精密称取 10.00 mg 莲心碱标准品，用无水乙醇溶解定容至 10 mL，配制成浓度为 1.000 mg/mL 的溶液，分别量取 0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80 mL 标准品溶液置于 10 mL 的容量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，溶液浓度分别为 20.00, 30.00, 40.00, 50.00, 60.00, 70.00, 80.00 $\mu\text{g/mL}$ ，以无水乙醇为空白，在最大波长处测吸光度，以吸光度 A 为纵坐标，浓度(c, $\mu\text{g/mL}$)为横坐标，绘制标准曲线如图 1，得回归方程， $Y = 0.0152X - 0.0025$ ， $R^2 = 0.9998$ 。

2.3.4. 莲子心总生物碱含量的测定

按照 2.3.2 的方法制备样品提取液，稀释一定比例，在 275 nm 波长测吸光度。然后根据标准曲线，计算相应的生物碱浓度，进而计算总生物碱的含量。

$$\text{提取率 } Y(\%) = \frac{X \times 10^{-3} \times \text{稀释倍数} \times V}{m} \times 100\%$$

式中： m 为样品质量(g)， X 为样品中生物碱浓度(mg/mL)， V 为最初定容体积(mL)。

2.3.5. 单因素试验设计

分别考察料液比、乙醇浓度、超声功率、超声时间、提取次数、浸泡时间对莲子心总生物碱提取率的影响。

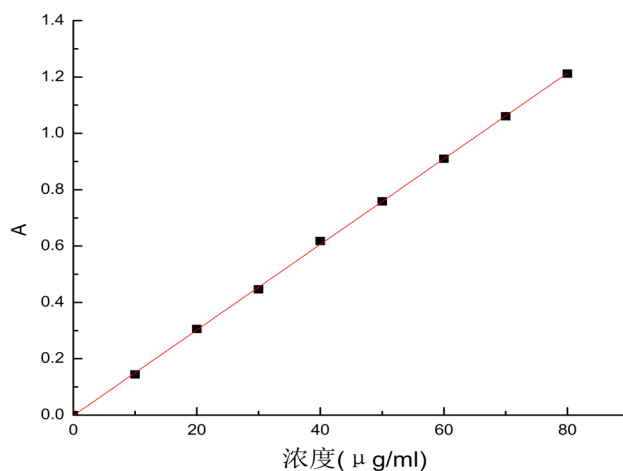


Figure 1. Calibration curve of liensinine

图 1. 莲心碱标准曲线

2.3.6. 正交试验设计

在单因素实验的基础上，对超声功率、超声时间、浸泡时间、乙醇体积分数、料液比 5 个因素进行正交试验优化，以生物碱提取率为指标，确定超声提取莲子心中总生物碱的最佳工艺条件。因素水平表见表 1。

2.3.7. 表面活性剂对莲子心总生物碱提取率的影响

在优化的工艺条件下，考察不同表面活性剂对莲子心总生物碱提取率的影响。

3. 结果与讨论

3.1. 单因素试验

3.1.1. 乙醇浓度对总生物碱提取率的影响

在料液比 1:30(g/mL)，提取温度(25 ± 2)℃，超声功率 90 W，超声提取时间 15 min，提取前无浸泡，提取 1 次的条件下，考察不同乙醇浓度对提取效果的影响，结果见图 2。

由图可知，当乙醇体积分数在 70% 以下时，随提取剂浓度的不断增加，生物碱与提取剂的极性越靠近，接触机会在逐渐增加，生物碱的溶出率不断提高。当乙醇体积分数超过 70% 时，得率反而降低，这是因为莲心中有机杂质种类多，溶解度范围大，随提取剂浓度的增加，细胞中色素、脂溶性成分的溶出不断增加，因此，选择乙醇体积分数为 70%。

Table 1. Factors and levels of L16(45) orthogonal experiment
表 1. L16(45)正交试验因素水平

因素水平	A 超声功率 W	B 超声时间 min	C 浸泡时间 min	D 乙醇体积分数%	E 料液比
1	90	30	15	50	1:20
2	105	35	20	60	1:25
3	120	40	25	70	1:30
4	135	45	30	80	1:35

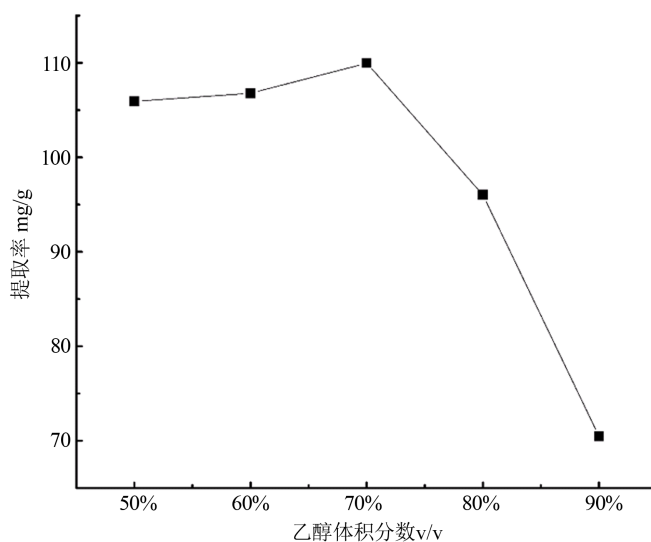


Figure 2. Effect of ethanol concentration on extraction rate
图 2. 乙醇浓度对提取率的影响

3.1.2. 超声功率对总生物碱提取率的影响

在料液比 1:30(g/mL), 乙醇浓度 70% vol, 提取温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 超声时间 30 min, 提取前无浸泡, 提取 1 次的条件下, 考察不同超声功率对提取效果的影响, 结果见图 3。

由图可知, 随超声功率的不断增强, 空化效应逐渐增强, 生物碱的溶出率不断提高。但当超声功率超过 105 w 时, 得率下降, 这是因为莲心中有机杂质种类多, 随功率的增强, 细胞破碎时里面的色素、脂溶性成分的溶出不断增加, 而生物碱成分则因功率过高, 结构遭到一定的破坏, 因此, 选择超声功率 90 w 为下一步实验的优选值。

3.1.3. 超声时间对总生物碱提取率的影响

在料液比 1:30(g/mL), 乙醇浓度 70% vol, 提取温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 超声功率 105 W, 提取前无浸泡, 提取 1 次的条件下, 考察不同超声时间对提取效果的影响, 结果见图 4。

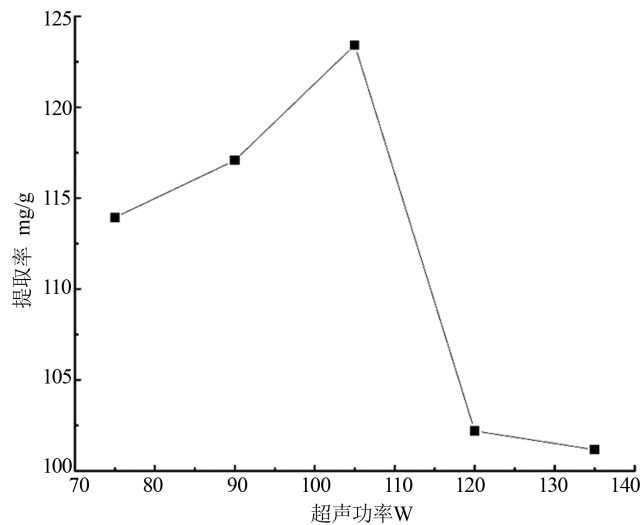


Figure 3. Effect of ultrasonic power on extraction rate

图 3. 超声功率对提取率的影响

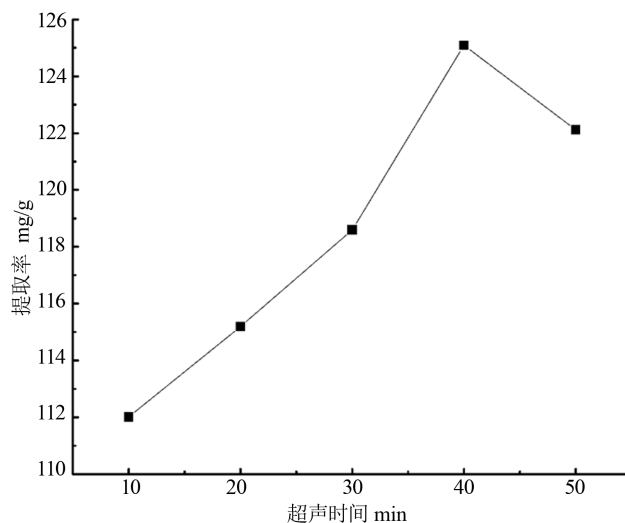


Figure 4. Effect of ultrasonic time on extraction rate

图 4. 超声时间对提取率的影响

由图可知, 超声时间从 10 min 到 40 min 之间, 因莲子心中总生物碱浓度高, 渗透压大, 总生物碱量得率随提取时间增加而持续增加, 40 min 时达到提取量的最大值, 继续增加超声时间, 不会再提高提取率, 反而会由于加热时间过长导致生物碱中某些受热不稳定的成分被分解破坏, 导致总生物碱得率的损失。所以选取提取时间 40 min 进入下一步实验。

3.1.4. 料液比对总生物碱提取率的影响

在乙醇浓度 70% vol, 提取温度 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 超声功率 105 W, 超声提取时间 40 min, 提取前无浸泡, 提取 1 次的条件下, 考察不同料液比对提取效果的影响, 结果见图 5。

由图可知, 总生物碱得率随液料比增加而增加, 但液料比超过 1:30 时, 由于总生物碱的溶出率趋于饱和, 随液料比增加总生物碱得率未明显增长, 因此, 选用 1:30 的液料比作为后续试验的参考值。

3.1.5. 浸泡时间对总生物碱提取率的影响

在料液比 1:30(g/mL), 乙醇浓度 70% vol, 提取温度 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 超声时间 40 min, 超声功率 105 W, 提取 1 次的条件下, 考察提取前不同浸泡时间对提取效果的影响, 结果见图 6。

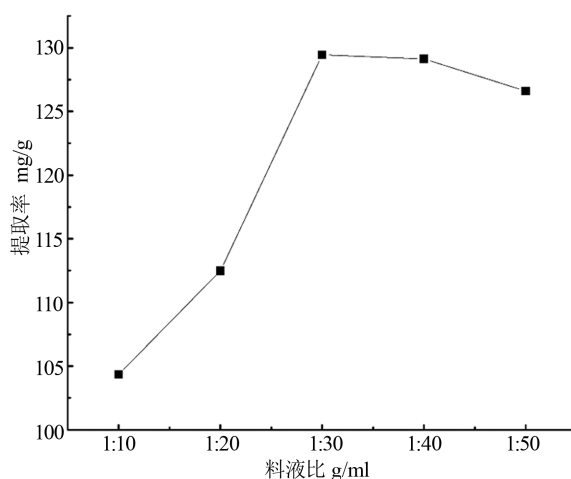


Figure 5. Effect of liquid-to-solid ratio on extraction rate
图 5. 料液比对提取率的影响

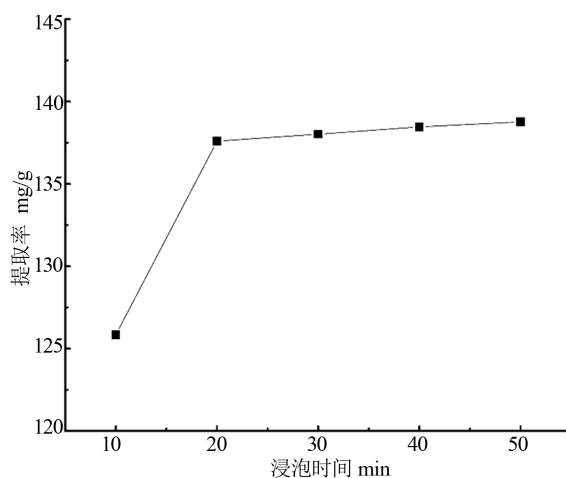


Figure 6. Effect of immersion time on extraction rate
图 6. 浸泡时间对提取率的影响

由图可知,当浸泡时间超过 20 min 时,随浸泡时间的不断增长,生物碱的溶出率提高缓慢。因此,从经济的角度出发,选择提取前浸泡 20 min 为下一步实验的优选值。

3.2. 正交试验

通过表 2 中的极差分析可以得出各因素对结果的影响主次顺序为 $D > E > A > C > B$, 最佳工艺组合为 A2B3C4D3E3。

3.3. 最优条件验证

对组合 A2B3C4D3E4 进行验证试验,重复试验 5 次,取平均值 138.231, RSD 小于 1%。证明此正交试验得出的最优水平是可靠的,优化工艺稳定可行。

3.4. 表面活性剂对莲子心总生物碱提取率的影响。

3.4.1. 表面活性剂种类对总生物碱提取率的影响

在乙醇浓度 70% vol,提取温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,超声功率 105 W,超声提取时间 40 min,料液比 1:30(g/mL),提取前浸泡 30 min,提取 1 次的条件下,考察相同浓度(0.01 g/mL)不同表面活性剂对莲子心总生物碱得率的影响,并以不添加任何表面活性剂的空白样做对比,结果如图 7。

Table 2. The orthogonal experiment results and poor analysis
表 2. L16(4⁵)正交试验结果与极差分析

试验号	A	B	C	D	E	生物碱提取率 mg/g
1	1	1	1	1	1	103.201
2	1	2	2	2	2	109.769
3	1	3	3	3	3	126.191
4	1	4	4	4	4	123.109
5	2	1	2	3	4	133.013
6	2	2	1	4	3	121.006
7	2	3	4	1	2	124.217
8	2	4	3	2	1	108.688
9	3	1	3	4	2	117.154
10	3	2	4	3	1	118.147
11	3	3	1	2	4	128.361
12	3	4	2	1	3	104.343
13	4	1	4	2	3	120.257
14	4	2	3	1	4	109.895
15	4	3	2	4	1	102.726
16	4	4	1	3	2	129.828
K1	115.567	118.406	120.599	110.414	108.191	
K2	121.731	114.704	112.463	116.769	120.242	
K3	117.001	120.374	115.482	126.795	123.949	
K4	115.677	116.492	121.433	115.999	123.534	
R	6.164	5.670	8.970	16.381	15.403	

试验结果表明,加入表面活性剂,均增大了提取率,这是由于表面活性剂特有的双亲分子结构使溶剂分子更易渗入颗粒中,加快了内部扩散过程,具有很好的增溶作用,由于 APG0810 增溶效果最好且是绿色环保非离子表面活性剂[11],故选择 APG0810 为后续试验使用的表面活性剂。

3.4.2. APG 浓度对总生物碱提取率的影响

在乙醇浓度 70% vol,提取温度 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,超声功率 105 W,超声提取时间 40 min,料液比 1:30(g/mL),提取浸泡 30 min,提取 1 次的条件下,考察 APG0810 浓度对莲子心总生物碱得率的影响,结果如图 8。

由图可知,随着 APG0810 浓度的提高,总生物碱得率呈现先增加后缓慢减少的趋势。这是因为随着 APG0810 浓度增大,形成胶束增多,对生物碱的增溶作用增强。但达到一定浓度后,不仅对生物碱

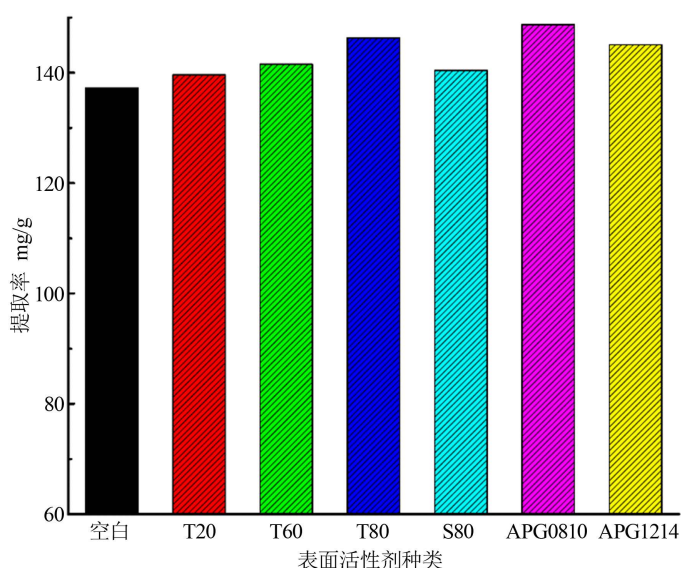


Figure 7. Effect of different surfactants on extraction rate

图 7. 表面活性剂种类对提取率的影响

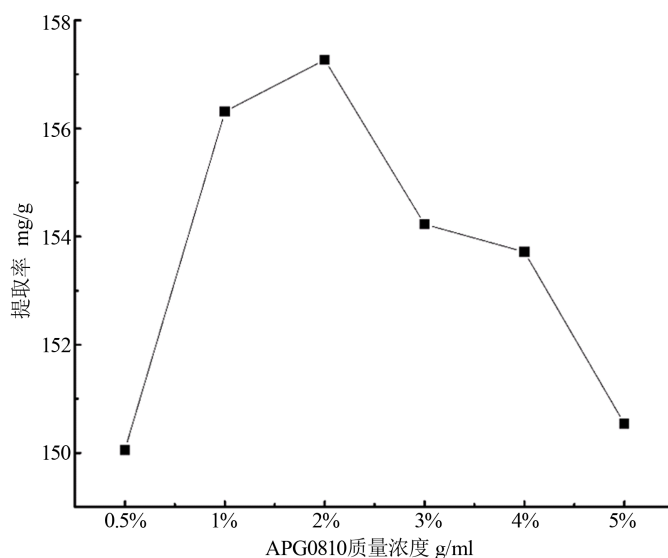


Figure 8. Effect of APG0810 concentration on extraction rate

图 8. APG0810 浓度对提取率的影响

增溶作用增加,同时对其他杂质的增溶作用也在加强,生物碱纯度降低,导致总生物碱得率下降。因此选择 APG08103 浓度为 0.02 g/mL,提取率为 157.268 mg/g。

4. 结论

通过对超声功率、超声时间、浸泡时间、乙醇体积分数、料液比 5 个因素进行优化,得到超声提取莲子心总生物碱的最佳工艺条件:超声功率 105 W、超声时间 40 min、浸泡时间 30 min、乙醇体积分数 70%、料液比 1:30。在最佳工艺条件下,加入质量浓度 2%的 APG0810 进行提取,与单纯超声提取相比,总生物碱提取率提高 13.8%,说明表面活性剂协同超声提取莲子心总生物碱具有较好的提取效果。

参考文献 (References)

- [1] 张弦,潘扬 (2002) 植物莲中生物碱类成分的研究概况. *南京中医药大学学报*, **6**, 382-384.
- [2] 潘竞先,陆军,张建军 (1989) 莲子心钙拮抗活性成分的研究. *北京医科大学学报*, **5**, 401-403.
- [3] 李娟,夏延斌 (2010) 莲心生物碱保健功能研究进展. *粮食与油脂*, **1**, 40-43.
- [4] 王嘉陵,胡学民,尹武华 (1991) 莲子心中生物碱成分的研究. *中药材*, **6**, 36-38.
- [5] 刘大群,冯启利 (2005) 莲子心中保健成分的研究概况. *江西食品工业*, **1**, 20-23.
- [6] 杨昱,白靖文,俞志刚 (2011) 超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用. *食品与机械*, **1**, 170-174.
- [7] 杨再,陈佳铭,黄晓兰 (2008) 天然植物有效成分的超声提取技术. *饲料博览*, **2**, 41-44.
- [8] Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M. and Cintas, P. (2008) Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, **5**, 898-902.
- [9] Do, L.D. and Sabatini, D.A. (2010) Aqueous extended-surfactant based method for vegetable oil extraction: Proof of concept. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **10**, 1211-1220.
- [10] 谢国莲 (2003) 超声提取法提高益母草总碱提出率的研究. *青海畜牧兽医杂志*, **1**, 5-6.
- [11] 王培义,徐宝财,王军 (2007) 表面活性剂——合成性能应用. 化学工业出版社,北京,31-37.