

红花中总生物碱回流提取工艺优化

方振峰, 简德乾, 熊诗波

(江汉大学 医学部药理学系, 湖北 武汉 430056)

摘要: **目的** 筛选红花中总生物碱最优回流提取工艺。 **方法** 以盐酸五羟色胺为对照品, 红花中总生物碱含量为指标, 采用单因素实验, 考察了温度、时间、料液比和甲醇体积分数等对红花中总生物碱含量的影响。通过正交试验, 对红花中总生物碱的提取工艺进行了优化, 并对最优提取工艺进行了实验验证。 **结果** 最佳工艺条件为温度 65 °C, 液料比 (v/w) 50:1, 甲醇体积分数 40%, 提取时间 60 min。在优化的工艺条件下, 总生物碱平均含量为 35.99 mg/g, RSD 为 0.26% ($n=3$)。 **结论** 本研究所得最优提取工艺简单、易行, 工艺参数可靠, 提取效果良好, 为红花中总生物碱进一步开发利用提供了实验依据。

关键词: 红花; 总生物碱; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2024)04-0055-07

DOI: 10.16389/j.cnki.cn42-1737/n.2024.04.006

Optimization of the Reflux Extraction Process of Total Alkaloids from *Carthamus tinctorius*

FANG Zhenfeng, JIAN Deqian, XIONG Shibo

(Department of Pharmacy, School of Medicine, Jianghan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: **Objective** To screen out the best reflux extraction process of total alkaloids from *Carthamus tinctorius* (*C. tinctorius*). **Methods** The effects of temperature, times, solid-liquid ratio, and methanol volume fraction on the extraction rate of alkaloids from *C. tinctorius* were investigated by a single-factor experiment with serotonin hydrochloride as reference substance and total alkaloid content of *C. tinctorius* as index. The extraction process of total alkaloids from *C. tinctorius* was optimized by an orthogonal experiment, and the verification experiment was carried out. **Results** The optimal process conditions were as follows: a temperature of 65 °C, a liquid-to-material ratio (v/w) of 50:1, a methanol volume fraction of 40%, and an extraction time of 60 minutes. Under optimized process conditions, the average content of total alkaloids was 35.99 mg/g with an RSD of 0.26% ($n=3$). **Conclusion** The optimal extraction process obtained in this study is simple and feasible, with reliable process parameters and good extraction results, providing an experimental basis

收稿日期: 2023-08-25

作者简介: 方振峰(1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 天然产物活性成分及中药质量控制。

for the further development and utilization of total alkaloids in *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius*; total alkaloids; orthogonal test; extraction process

红花为菊科(Asteraceae)红花属(*Carthamus* L.)植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,夏季采摘,阴干或晒干后入药^[1]。红花作为中国传统中药,有近2 000年用药历史^[2],其性温、味辛,归心、肝经,具有活血通经,散瘀止痛之功效。现代药理研究表明,红花具有保护脑组织^[3]、改善心肌缺血^[4]、降血压^[5]、抗凝血和抗血小板聚集^[6]等作用。目前,从红花中分离得到的化合物主要为黄酮、生物碱、多炔、亚精胺、木脂素、倍半萜、多糖等类型^[7],其中黄酮类化合物为红花主要的药效成分,研究比较多。近年来,红花中生物碱类成分逐渐被发现,到目前已得到11个生物碱,其结构以5-羟色胺衍生物为主^[8]。经查阅文献,目前对红花中生物碱的研究还比较少,除了发现它具有天然的抗氧化活性外^[9],其他活性的研究、含量测定等均未见报道。为了进一步研究红花生物碱化学成分、功效及其质量评价,很有必要对红花中总生物碱的提取工艺进行研究。本研究以盐酸五羟色胺为对照品,红花总生物碱含量为指标,分别考察了温度、时间、料液比、甲醇体积分数等因素对回流提取红花总生物碱的影响,同时,在单因素试验基础上进行了正交试验,优选出红花总生物碱回流提取最佳工艺条件,并进行了验证。本研究为红花总生物碱质量控制提供了实验依据,也为红花总生物碱后续开发与利用提供一定的实验指导。

1 材料

1.1 仪器设备

UVMI-1204型紫外可见光分光光度仪(岛津仪器(苏州)有限公司);旋转式蒸发仪(上海申生技术公司);ME104E电子天平(梅特勒-托利多设备(上海)有限公司,精确度为0.1 mg);LCD超声波清洗机KM-500DE(美美超声波设备有限公司);岛津AUX120D电子天平(岛津国际贸易上海股份有限公司,精确度为0.01 mg);SHZ-D(III)循环水真空泵(巩义市予华仪表公司)。

1.2 试剂

盐酸五羟色胺对照品(四川省维克奇生物技术公司,批号wkq220122606-10 mg,HPLC \geq 98.0%);分析甲醇、石油醚(60~90℃)、浓盐酸等均购自国药集团化学试剂有限公司;Fisher色谱甲醇购自于美国赛默飞世尔科技公司。纯化水为实验室自制蒸馏所得。

1.3 药材

红花产于新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州(20220504),江汉大学医学院药学系张涛教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取盐酸五羟色胺标准品2.56 mg,置于25 mL的容量瓶中,加适量纯化水超声溶解后,用水定容,即得质量浓度为0.102 4 mg/mL的对照品溶液。

供试品溶液的制备:精密称取红花干粉1.0 g,按照料液比1:50(g/mL)加入70%甲醇溶液,在温度70℃时回流提取1.5 h,过滤,回收溶剂后得到浸膏,将浸膏以适量盐酸水溶液(1:100, v/v)超声溶解后过滤,滤液定容至50 mL容量瓶,即得供试品溶液。

2.1.2 最大吸收波长的测定 分别精密量取1 mL对照品溶液和10 mL的供试品溶液,然后再分

别置于60 mL的分液漏斗中,分别加入石油醚10 mL,以纯化水补足20 mL,充分摇荡2 min后静置1 h,弃去石油醚层溶液。从处理后对照品水溶液中精密量取5 mL至10 mL容量瓶中,用纯化水定容,即得对照品检测溶液;从处理后样品水溶液中精密量取1 mL至50 mL容量瓶中,用纯化水定容,即得样品检测溶液;同时,以纯化水作为空白溶液。在200~600 nm范围内进行紫外分光光度法检测,结果显示,对照品溶液和供试品溶液的最大吸收波长值均为275 nm。因此,确定275 nm是紫外分光光度法最适宜的检测波长。

2.1.3 标准曲线的绘制 分别精密量取盐酸五羟色胺对照品溶液1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mL于分液漏斗内,按2.1.2项中对照品溶液处理方法同法操作,在检测波长275 nm处测量其吸光度值。以对照品溶液的浓度(C)作为横轴,吸光度(A)为纵轴,绘制标准曲线,得到的盐酸五羟色胺对照品的回归方程为 $A = 0.0209C + 0.0087$ ($r = 0.9995$)。结果表明,盐酸五羟色胺在5.12~25.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下,具有良好的线性关系,结果见图1。

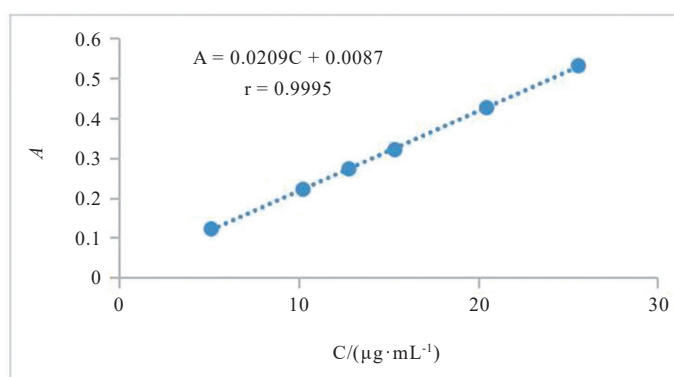


图1 盐酸五羟色胺标准曲线

Fig. 1 Standard curve of serotonin hydrochloride

2.1.4 重复性实验 同一批红花的干燥粉末称取6份,每份约1.0 g,精密称量,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测量溶液的吸光度值。结果所得到吸光度值RSD为1.95% ($n = 6$),表明该方法的重现性良好。

2.1.5 精密度实验 精密量取1 mL对照品溶液,按2.1.2项中对照品溶液处理方法同法操作,在检测波长275 nm处测量其吸光度值6次,记录吸光度值。结果所得到吸光度值RSD为1.51% ($n = 6$),表明该仪器具有良好的精度。

2.1.6 稳定性实验 取供试品溶液10 mL,按照2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,分别在0、3、6、9、12、24 h时,在检测波长275 nm处测量其吸光度值。结果所得吸光度值RSD为1.49% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h以内稳定性良好。

2.1.7 加标回收试验 取药材粉末约0.5 g,共9份,精密称定,分别按照样品中总生物碱含量的80%、100%、120%加入标准品,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定,记录吸光度,计算加标回收率及RSD值,结果见表1。

2.2 单因素试验

2.2.1 不同液料比对红花生物碱提取含量的影响 取红花粉末7份,每份约1 g,精密称定,甲醇体积分别按液料比(v/w)10:1、20:1、30:1、40:1、60:1、80:1、100:1计算,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定,记录吸光度,得到红花总生物碱含量。平行3次试验,得各条件下红花总生物碱平均含量,结果见图2。

表 1 加标回收试验结果

Tab. 1 Results of the standard addition recovery test

样品量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.500 2	15.51	12.40	27.98	100.55		
0.500 4	15.52	12.40	28.12	101.63		
0.500 1	15.51	12.40	28.18	102.19		
0.499 9	15.50	15.50	31.21	101.34		
0.500 2	15.51	15.50	30.99	99.86	100.76	0.98
0.499 8	15.50	15.50	31.19	101.23		
0.500 1	15.51	18.60	34.32	101.14		
0.499 9	15.50	18.60	34.02	99.56		
0.499 8	15.50	18.60	33.98	99.36		

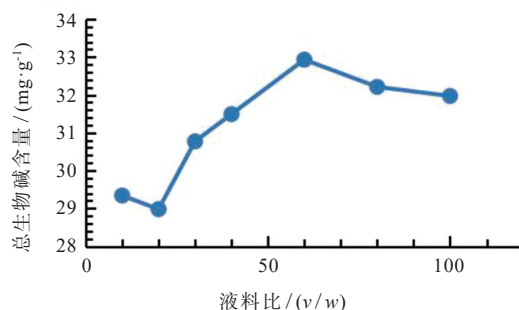


图 2 不同液料比对总生物碱含量的影响

Fig. 2 Effects of different liquid material ratios on the content of total alkaloids from *C. tinctorius*

从图 2 可知,红花中总生物碱的含量总体上随着液料比的增加而增加,当液料比为 60:1 时,总生物碱的含量最高,为 32.93 mg/g。之后,随着液料比的增加,呈现出逐渐降低的趋势,可能是因为在料液比最大时,溶剂能将红花中总生物碱完全溶解出来,趋近饱和。随后再增加液料比,总生物碱含量不会增多,并且会导致其他杂质的溶出也增多,导致含量逐渐下降。因此,取液料比 60:1 为单因素试验最佳料液配比。

2.2.2 不同甲醇体积分数对总生物碱提取含量的影响 取红花粉末 7 份,每份约 1 g,精密称定,分别加入体积分数为 10%、25%、40%、55%、70%、85%、95% 的甲醇,按照 2.1.1 项中供试品溶液的制备以及 2.1.2 项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长 275 nm 处测定,记录吸光度,得到红花中总生物碱含量。平行 3 次试验,得各条件下红花中总生物碱平均含量,结果见图 3。

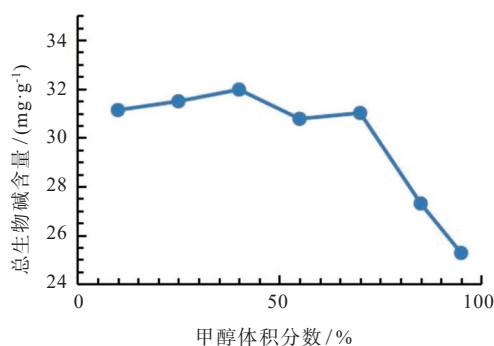


图 3 不同甲醇体积分数对总生物碱含量的影响

Fig. 3 Effects of different alcohol volume fractions on the content of total alkaloids from *C. tinctorius*

从图3可知,随着甲醇体积分数的增加红花中总生物碱含量逐渐增加,在甲醇体积分数为40%时,含量达到最高32.93 mg/g。然后随甲醇浓度增大而缓慢下降,可能是当甲醇浓度增大后,红花中存在的其他成分或杂质被提取出来,导致总生物碱含量有所降低。因此,选择甲醇体积分数40%作为单因素试验最合适中甲醇体积分数。

2.2.3 不同提取时间对总生物碱提取含量的影响 取红花粉末5份,每份约1 g,精密称定,提取的时间分别为0.5、1、1.5、2、2.5、3 h,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定,记录吸光度,得到红花总生物碱含量。平行3次试验,得各条件下红花中总生物碱平均含量,结果见图4。

由图4可知,随着提取时间增加总生物碱含量随之增高,在提取1 h时,含量最高,为33.76 mg/g。随后总生物碱含量随着时间的延长而减少。可能是在1 h时,总生物碱提取量接近饱和,再延长提取时间,红花中其他物质逐渐被提取出来,导致总生物碱含量下降。因此,选取提取时间1 h作为单因素试验最适合的提取时间。

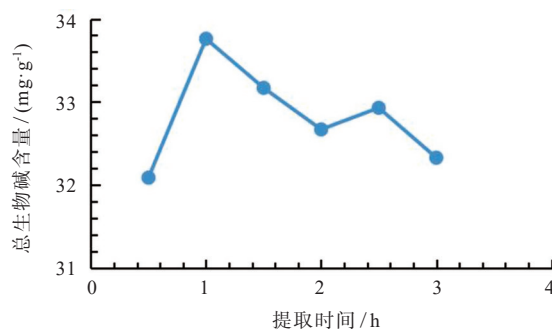


图4 不同提取时间对红花总生物碱含量的影响

Fig. 4 Effects of different extraction times on the content of total alkaloids from *C. tinctorius*

2.2.4 不同温度对总生物碱提取含量的影响 取红花粉末6份,每份约1 g,精密称定,提取温度分别为40、50、55、60、65、70 °C,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定,记录吸光度,得到红花总生物碱含量。平行3次试验,得各条件下红花中总生物碱平均含量,结果见图5。

从图5可知,随着提取温度的升高,红花中总生物碱含量也随之增加,在65 °C时达到了最大值32.69 mg/g,之后随温度的上升而降低,其原因可能是由于提取温度过高导致总生物碱类成分发生破坏,从而使含量下降。因此,选取温度65 °C作为单因素试验最适合的提取温度。

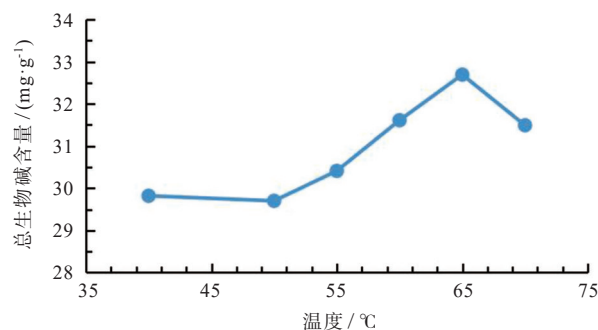


图5 不同温度对红花中总生物碱含量的影响

Fig. 5 Effects of different temperatures on the content of total alkaloids from *C. tinctorius*

2.3 正交试验

为了筛选出红花中总生物碱含量最优回流提取条件,根据单因素试验结果,以温度(A, °C)、

液料比(B, mL/g)、甲醇体积分数(C, %)、提取时间(D, min)为因素水平,各单因素试验中最佳值为中间水平,采用 $L_9(3^4)$ 四因素三水平进行正交试验,因素水平表如表2所示。正交试验按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定,记录吸光度,得到红花中总生物碱含量。具体正交试验结果及极差分析结果见表3。

从表3中极差分析结果可知,由于极差值 $1.99 > 1.51 > 0.71 > 0.04$,因此,四个因素对红花中总生物碱含量的影响为A(温度) $>$ D(提取时间) $>$ B(料液比) $>$ C(甲醇体积分数),即提取温度对红花中总生物碱含量影响最大,其次为提取时间,而甲醇体积分数对总生物碱含量的影响最小。同时,通过极差分析可知,最佳提取工艺条件为: $A_2B_1C_2D_2$ 或 $A_2B_1C_3D_2$ 。由于 C_2 表示甲醇体积分数为40%, C_3 表示甲醇体积分数为50%,因此,从节约试剂角度考虑,选择甲醇体积分数40%作为最优组合的组成。综上所述,正交试验筛选出红花中总生物碱回流提取最佳工艺条件为: $A_2B_1C_2D_2$,即温度为65℃,液料比为50:1,甲醇体积分数为40%,提取时间为60 min。

表2 正交试验因素水平表

Tab. 2 Table of orthogonal test factor level

水平	A(温度,℃)	B(液料比,(mL·g ⁻¹))	C(甲醇体积分数,%)	D(提取时间,min)
1	60	50:1	30	40
2	65	60:1	40	60
3	70	70:1	50	80

表3 正交试验结果及方差分析表

Tab. 3 Table of orthogonal test results and analysis of variance

试验号	A	B	C	D	总生物碱含量/(mg·g ⁻¹)
1	60	50:1	30	40	31.73
2	60	60:1	50	60	32.57
3	60	70:1	40	80	31.49
4	65	50:1	50	80	34.12
5	65	60:1	40	40	33.05
6	65	70:1	30	60	34.60
7	70	50:1	40	60	33.88
8	70	60:1	30	80	31.97
9	70	70:1	50	40	31.73
k_1	31.93	33.24	32.77	32.17	
k_2	33.92	32.53	32.81	33.68	
k_3	32.53	32.61	32.81	32.53	
极差	1.99	0.71	0.04	1.51	
最佳水平	A2	B1	C2或C3	D2	

2.4 验证试验

称取红花干燥粉末3份,每份约1.0 g,精密称定,在最优提取工艺条件 $A_2B_1C_2D_2$ 下,按照2.1.1项中供试品溶液的制备以及2.1.2项中供试品溶液处理方法同法操作,在最大吸收波长275 nm处测定吸光度,计算红花中总生物碱含量。结果在最佳的工艺条件下,所得红花中总生物碱平均含量为35.99 mg/g, RSD为0.26%($n=3$),超过正交试验最高值34.60 mg/g,表明该工艺条件参数可靠,方法可行。

3 结论与讨论

本研究以盐酸五羟色胺为对照品,红花中总生物碱含量为考察指标,分别考察了温度、时间、液料比、甲醇体积分数等因素对回流提取红花中总生物碱含量的影响,并筛选出各因素的最佳条件;同时,在此基础上进行了正交试验,优选出红花中总生物碱最佳提取工艺条件,即温度为65℃,液料比为50:1,甲醇体积分数为40%,提取时间为60 min,并进行了实验验证,结果所得红花中总生物碱含量最高,为35.99 mg/g。本研究中优化工艺所得总生物碱含量高,工艺简单、可靠,为红花中生物碱类成分的后续开发与利用提供实验依据。

在测定红花中总生物碱含量时,本研究对盐酸五羟色胺标准品溶液和供试品溶液采用两种不同方法(酸性染料比色法^[10]和直接测定法)进行处理。结果显示,酸性染料比色法处理后,用UV-Vis分光光度计对200~600 nm的波段进行了扫描,结果显示标准品和供试品溶液在此范围均无吸收。采用改变缓冲液类型、酸性染料用量、缓冲液的pH值以及萃取静置时间等条件,标准品和供试品溶液均无明显吸收峰。酸性染料比色法在中药总生物碱含量测定中运用较广泛,但其使用效果容易受到缓冲液类型、酸性染料用量、缓冲液的pH值等因素的影响,必须对各个条件进行考察才能获得较好的实验结果。本研究中红花的生物碱采用酸性染料法未得到较好的实验结果,可能是因为未找到酸性染料最佳显色条件,但由于红花中生物碱主要是以5-羟色胺类衍生物为主,而采用未染色直接测定法,结果显示盐酸五羟色胺标准品和供试品溶液均在275 nm处有最大吸收峰,表明红花中总生物碱含量的测定采用未染色直接测量法是可行的。因此,本实验总生物碱含量测定选择未染色直接测定法。

参考文献(References)

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:157.
- [2] 郑东方,陈鑫伟,吕树立. 药食两用红花研究进展及开发利用前景[J]. 南方农业,2022,16(23):111-115.
- [3] LIANG Y, WANG L. *Carthamus tinctorius* L.: A natural neuroprotective source for anti-Alzheimer's disease drugs [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 298: 115656.
- [4] AO H, FENG W, PENG C. Hydroxysafflor yellow A: A promising therapeutic agent for a broad spectrum of diseases [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 8259280.
- [5] YAO D, WANG Z, MIAO L, et al. Effects of extracts and isolated compounds from safflower on some index of promoting blood circulation and regulating menstruation [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 191: 264-272.
- [6] 刁丽,苏素文,赵敏,等. 红花黄色素抗血栓作用研究进展[J]. 海峡药学,2017,29(7):124-126.
- [7] 刘宁,刘媛,潘蕾,等. 红花的研究进展[J]. 中国医药导刊,2017,19(5):527-530.
- [8] 杨宇,黄兴琳,江忠敏,等. 中药红花化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中华中医药学刊,2023,41(10):119-126.
- [9] 李娅兰,白皓天,梁霄,等. 红花中抗氧化活性成分及其作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床,2022,37(8):1879-1885.
- [10] 方晓玥,李竹君,张雨心,等. 星点设计响应面法优化滇南美登木总生物碱超声提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2023,43(1):53-60.

(责任编辑:范建凤)