

崔光芬, 杜文文, 金鹏程, 等. 秋水仙碱提取分离研究进展[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 295-304.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.033

秋水仙碱提取分离研究进展

崔光芬^{1,2}, 杜文文¹, 金鹏程², 段青¹, 王祥宁¹, 贾文杰¹, 马璐琳¹, 王继华¹

(1. 云南省农业科学院花卉研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南省农业科学院农产品加工研究所, 云南 昆明 650221)

摘要: 秋水仙碱是一种功能较多的植物源生物碱, 在医药行业发挥着重要作用。系统地了解秋水仙碱提取、分离的技术类型有助于推动高纯度秋水仙碱的生产。本文介绍了秋水仙碱不同提取技术的特点、原理和应用效果, 阐述了秋水仙碱在不同种类植物、植物不同部位中的含量以及影响含量的因素, 总结了传统的浸提法、回流法与超声波提取、超临界 CO₂ 提取、微波提取、酶促提取等新提取方法, 以及膜分离法、色谱分离法等秋水仙碱分离纯化方法的研究进展, 分析了不同提取分离技术的效果和影响因素, 探讨了秋水仙碱提取技术的发展方向, 以期秋水仙碱的提取分离技术的研究和应用提供参考。

关键词: 秋水仙碱; 嘉兰属; 提取方法; 分离纯化

中图分类号: R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0295-10

Advances in extraction and separation of colchicine

CUI Guang-fen^{1,2}, DU Wen-wen¹, JIN Peng-cheng², DUAN Qing¹, WANG Xiang-ning¹, JIA Wen-jie¹, MA Lu-lin¹, WANG Ji-hua¹

(1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2. Agro-Products Processing Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650221, China)

Abstract: Colchicine is a plant-derived alkaloid with many functions, which plays an important role in the pharmaceutical industries. Systematic understanding of the technology types for extraction and separation of colchicine is helpful for promoting the production of high-purity colchicine. In this article, the characteristics, principles and application effects of different extraction techniques of colchicine were introduced, and the research progresses on colchicine content in different plants and different parts of plants as well as the affecting factors were described. Traditional extraction methods such as maceration extraction and reflux extraction were summarized. New extraction methods such as ultrasonic extraction, supercritical CO₂ extraction, microwave extraction and enzymatic extraction were also summarized. Besides, research progress on separation and purification methods of colchicine such as membrane separation and chromatographic separation were generalized. The effects and influencing factors of different extraction and separation technologies were analyzed, and the development direction of colchicine extraction technology was discussed to provide reference for the research and application of colchicine extraction and separation technology.

Key words: colchicine; *Gloriosa*; extraction methods; separation and purification

收稿日期: 2021--

基金项目: 云南省重大科技专项(202002AA100007); 云南省绿色食品品牌打造科技支撑行动(花卉)专项(530000210000000-13742)

作者简介: 崔光芬(1979-), 女, 云南曲靖人, 硕士, 研究员, 从事球根花卉资源评价与开发研究。(E-mail) 1095768476@qq.com

通讯作者: 王继华, (E-mail) wangjh0505@sohu.com

秋水仙碱是一种三环脂溶性生物碱, 于 1820 年由法国化学家从秋水仙属(*Colchicum*) 植物^[1]中分离获得, 其化学结构见图 1。秋水仙碱作为治疗痛风的药物应用历史悠久, 近年来, 其药用价值被不断挖掘并被广泛用于治疗家族性地中海热^[2]、皮肤病^[3]、心脏病^[4]等疾病, 甚至用于治疗新冠肺炎引起的急性呼吸窘迫综合征^[5]。秋水仙碱在细胞中

可与微管蛋白 β 亚基上第1~46位和第214~241位2段氨基酸残基发生交联,抑制微管聚合进而影响细胞信号转导、细胞分裂、迁移和细胞运输等多种细胞过程^[6-8]。除药用价值外,秋水仙碱还可用于植物多倍体育种,作为诱变剂诱导植物的茎尖、花粉、根尖、种子等器官或组织获得多倍体品种,进而得到更高的作物产量^[9-10],或通过改变基因组倍性水平来影响植物代谢物的浓度^[11-12],甚至在水果保鲜领域也有所应用^[13]。随着秋水仙碱的用途不断拓展,人们对秋水仙碱的需求也快速增长。

生物碱是植物体内产生的次生代谢物,能够保护植物免受食草动物采食和病原体侵害,其传统提取方法包括煎煮、浸渍、渗漉等^[14]。秋水仙碱作为生物碱的一类,常用提取方法有溶剂提取、超声提取等^[15-16]。目前,生物碱提取技术不断创新和发展,更多含秋水仙碱的植物被发现,秋水仙碱的提取范围不断扩大,提取效率也得到较大提升。本研究通过对不同植物中秋水仙碱含量及其影响因素、提取方法、分离纯化等相关研究进行综述,结合目前国内有关秋水仙碱合成的最新进展,以期阐明不同提取技术的优势和适用范围,为促进秋水仙碱的生产和应用提供参考。

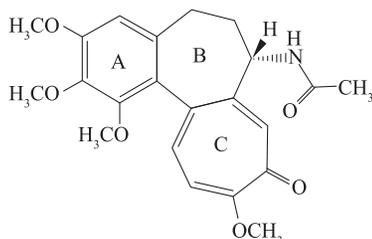


图1 秋水仙碱的化学结构

Fig.1 Chemical structure of colchicine

1 秋水仙碱的植物来源

1.1 含秋水仙碱的植物种类

秋水仙碱最早是从秋水仙属植物中提取获得的。近年来,人们在山慈姑属(*Iphigenia*)^[17]、宫灯百合属(*Sandersonia*)^[18]、摇船花属(*Androcymbium*)^[19]、安圭拉氏兰属(*Wurmbea*)^[20]等秋水仙科不同属植物中发现了秋水仙碱,Vinnersten等^[21]研究认为秋水仙科的植物中普遍含有秋水仙碱,因此提出秋水仙碱可作为秋水仙科植物分类扩展的化学标志物。秋水仙科植物分布于非洲、亚洲、澳大利亚、欧洲和北美的温带和热带地区,科内各属植物均为

多年生,地下球茎或块茎发达,全株含秋水仙碱^[22],除秋水仙科外,百合科百合属(*Lilium*)^[23]、萱草属(*Heimerocallis*)^[24]的多种植物中也含秋水仙碱,秋水仙科与百合科是含秋水仙碱植物中最丰富的2个科。另外,菊科风毛菊属的水母雪莲(*Saussurea medusa*)^[25]和唐古特雪莲(*Saussurea tangutica*)^[26],天南星科天南星属的曲序南星(*Arisaema curvatum*)^[27],泽泻科慈姑属的慈姑(*Sagittaria sagittifolia*)^[28]也曾有关于秋水仙碱被提取分离的报道。目前秋水仙碱生产上常用的提取植物为秋水仙属(*Colchicum*)、山慈姑属(*Iphigenia*)和嘉兰属(*Gloriosa*)^[29-30]。嘉兰是一类攀缘植物,在印度分布广泛,其种子和块茎被大量出口至欧美用于药用秋水仙碱提取^[31],而山慈姑属的丽江山慈姑则是中国药企生产秋水仙碱常用的基源植物^[32]。

1.2 不同植物中的秋水仙碱含量

秋水仙碱虽然在越来越多的植物中被发现和提取,但已报道的不同种类植物在秋水仙碱含量上差别较大(表1)。商业用途的秋水仙碱最早从秋水仙(*Colchicum autumnale*)中提取获得,该物种的种子中秋水仙碱质量分数为0.5%~0.6%^[33]。Pandey等^[34]从嘉兰(*Gloriosa superba*)的干燥块茎中提取秋水仙碱,其质量分数可高达0.91%。除秋水仙属和嘉兰属外,前人还在山慈姑属、宫灯百合属和摇船花属植物中发现了一些秋水仙碱含量高的种类,如宫灯百合(*Sandersonia aurantiaca*)的块茎中秋水仙碱含量为1.07%(质量分数)^[18],山慈姑属植物(*Iphigenia indica*)球茎中秋水仙碱含量为3.250 mg/g^[17],摇船花属植物(*Androcymbium hierrense*)的种子中秋水仙碱含量为4.500 mg/g^[21]。即使是在相同属内,不同种间植物的秋水仙碱含量差异也较大,在6种安圭拉氏兰属植物中,*Wurmbea deserticola*和*W. tenella*的秋水仙碱含量分别为1.700 mg/g和0.300 mg/g^[20]。

1.3 影响植物秋水仙碱含量的因素

1.3.1 环境因素 在不同气候土壤条件下生长的植物种群其生化代谢方面存在差异。李慧芳等^[35]采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)法分析野罂粟(*Papaver nudicaule*)不同居群的生物碱含量,结果表明,野罂粟中主要的3种生物碱包括野罂粟碱、黑龙辛甲醚和瑞芙热米定的含量在不同居群中各不相同,前2种生物碱含量最大值均出现在乌兰

布统居群,分别为2.018 5 mg/g和1.138 2 mg/g。而瑞芙热米定含量的最大值则出现在多伦居群(1.287 8 mg/g)。综合比较各居群间生物碱含量差异,结果显示,乌兰布统地区的野罌粟品质最佳,生物碱类成分含量最高,由此说明生物碱在植物中的含量与生长区域相关。Pandey 等^[36]对来自印度 32 个不同地理位置的嘉兰居群进行秋水仙碱含量检测,结果显示,在印度 11 个州 32 个不同地区的嘉兰居群中,秋水仙碱含量为2.12~7.58 mg/g。秋水仙碱含量最高的居群为印度东部地区的大吉岭-西孟加拉邦居群(7.58 mg/g)和甘托克-锡金居群(7.37 mg/g),东喜马拉雅高海拔地区嘉兰居群的秋水仙

碱含量明显高于西喜马拉雅地区和印度-恒河平原的居群,说明在2 045 m 海拔范围内生长的嘉兰居群的秋水仙碱含量受到生境海拔的调控,这种受海拔影响次生代谢物合成的变化归因于一些生理、生态和环境因素,即紫外线辐射水平的高低、温度水平差异等。袁理春等^[37]对云南西北部及四川越西县分布的 22 个丽江山慈姑(*I. indica*)居群中秋水仙碱含量的测定结果表明,分布在金沙江两岸贫瘠砂砾土壤上的丽江红岩居群秋水仙碱质量分数最高,达0.61%,而生长在较肥沃的草丛中的永胜县板桥乡居群质量分数仅为0.13%,说明丽江山慈姑秋水仙碱含量与生境土壤的土质关系较大。

表 1 不同植物中的秋水仙碱含量

Table 1 Colchicine content in different plants

序号	植物属名	植物拉丁名	植株器官	秋水仙碱含量	参考文献
1	秋水仙属 (<i>Colchicum</i>)	<i>C. autumnale</i>	种子	0.500%	[33]
2	嘉兰属 (<i>Gloriosa</i>)	<i>G. superba</i>	块茎	0.910%	[34]
3	山慈姑属 (<i>Iphigenia</i>)	<i>I. indica</i>	球茎	3.250 mg/g	[17]
4	摇船花属 (<i>Androcymbium</i>)	<i>A. gramineum</i>	全株	2.880 mg/g	[19]
		<i>A. hierrense</i>	种子	4.500 mg/g	
		<i>A. Palaestinum</i>	种子	0.810 mg/g	
		<i>A. Psammophilum</i>	种子	0.780 mg/g	
		<i>A. rechingerii</i>	种子	0.710 mg/g	
		<i>A. wyssianum</i>	种子	3.270 mg/g	
5	安圭拉氏兰属 (<i>Wurmbea</i>)	<i>W. deserticola</i>	全株	1.700 mg/g	[20]
		<i>W. dioica</i>		1.200 mg/g	
		<i>W. inframediana</i>		1.200 mg/g	
		<i>W. tenella</i>		0.300 mg/g	
6	百合属 (<i>Lilium</i>)	<i>L. brownie</i> var. <i>viridulum</i>	鳞茎	3.640 mg/g	[23]
7	萱草属 (<i>Heimerocallis</i>)	<i>H. Minor</i>	花蕾	0.255 μg/g	[24]
		<i>H. Lilioasphodelus</i>	花蕾	0.301 μg/g	
8	宫灯百合属 (<i>Sandersonia</i>)	<i>S. aurantiaca</i>	块茎	1.070%	[18]
9	凤毛菊属 (<i>Saussurea medusa</i>)	<i>S. medusa</i>	全株	0.002%	[25]
10	慈姑属 (<i>Sagittaria</i>)	<i>S. sagittifolia</i>	球茎	0.406 mg/g	[28]

%为质量百分比含量。

1.3.2 生长周期和栽培措施 植物中的生物碱含量受生长年限和季节的影响。Akram 等^[38]研究石蒜球茎中生物碱含量时发现,两年生球茎中的加兰他敏和石蒜宁碱的含量最高,而在三年生球茎中网球花胺的含量最高,一年生球茎中的高石蒜碱含量较高,综合比较可知,两年生球茎中的生物碱含量最高。在约旦原产的 2 种秋水仙属植物中,Alali 等^[39]发现 *C. tunicatum* 在花期、营养生长期和苗期的秋

水仙碱含量较高,而在 *C. brachyphyllum* 中,花期和苗期的秋水仙碱含量较高。此外,在栽培过程中,施肥也有利于秋水仙碱在球茎和叶片中的积累。Al-Fayyad 等^[40]按照氮磷钾 5 : 10 : 5 的施用比例,在种植 10 d 后施用 3 种用量的配方肥,结果显示,在不同施肥水平下,*C. hierosolymitanum* 和 *C. tunicatum* 球茎中的秋水仙碱含量均高于对照,尤其是氮磷钾配比为 75 : 100 : 75 的处理秋水仙碱含量最

高,秋水仙碱含量分别为 0.806 mg/g 和 0.803 mg/g, *C. hierosolymitanum* 球茎中秋水仙碱含量甚至高于未施肥(对照)80%以上,说明施肥能够促进植物中秋水仙碱的合成。

2 秋水仙碱的提取方法

生物碱为含氮有机物,传统提取方法包括煎煮、浸渍、渗漉等,由于大多数生物碱能溶于三氯甲烷、乙醚、乙醇、丙酮等有机溶剂,也能溶于酸性、碱性水溶液形成盐类,因此可选用不同溶剂提取植物中的生物碱。随着提取技术不断发展,双水相萃取^[41]、低共熔溶剂提取^[42]等新技术也被应用到生物碱提取中。天然秋水仙碱在植物中的分布因器官组织不同而不同,因此提取方法也可根据原材料特点及提取效率等要素进行选择。

2.1 浸提法

2.1.1 水提取法 水提法直接以水为溶剂,适用于提取在水中溶解度较高的化合物。秋水仙碱易溶于水, Agrawal 等^[15]以水为溶剂在室温下浸渍嘉兰茎块的干燥粉末,获得的秋水仙碱质量分数可达 0.31%。除纯水外,酸和碱的水溶液也常用于生物碱提取。生物碱通常与盐酸形成生物碱氯化物,其在水中的溶解性优于碱性生物碱, Çankaya 等^[43]用浓度 0.1 mol/L 的盐酸提取 *C. autumnale* 球茎中的秋水仙碱,提取过程辅以超声技术,结果表明,提取时间、提取介质的 pH 值、液料比、提取温度和超声功率对提取效率影响较大。在 pH 值为 1、料液比为 1:30(质量体积比)、超声时间为 40 min、温度为 64 °C 时,提取效率最高,秋水仙碱质量分数达 0.238%。黄晨熙等^[44]以 pH 2.8~4.5 的柠檬酸或苹果酸水溶液烫漂百合花瓣干粉,将烫漂液制作成浸膏后加入乙醇制成提取液,浸膏与乙醇的料液质量比为 1:15~1:30,提取温度为 40~60 °C,提取时间为 30~50 min,提取液经固相萃取后可获得秋水仙碱提取物,纯度 78% 以上。

2.1.2 有机溶剂提取法 甲醇、乙醇、三氯甲烷等有机溶剂是秋水仙碱提取中常用的提取溶剂。针对不同的提取材料,秋水仙碱提取剂可选用单一的有机溶剂,也可用混合溶剂。

姚红锐等^[45]用百合鳞茎干粉和乙醇混合物(1:3,体积比)进行冷浸提,提取时间 4 h,提取 3 次后秋水仙碱的提取率为 1.96%。而陈莉华等^[46]

同样以百合干燥粉末为材料,以体积分数 95% 的乙醇浸泡后在 80 °C 下提取 8 h,提取液浓缩溶于水后再分别用石油醚、乙醚和三氯甲烷萃取,将每种萃取剂获得的萃取物合并得到秋水仙碱粗提物,分步提取使百合原料中秋水仙碱的提取率最大化,此试验结果说明,对百合中秋水仙碱提取率产生影响的因素按其作用大小排序分别为:提取温度>料液比>乙醇体积分数>提取时间。

2.2 回流法

回流提取是以乙醇等沸点低的有机溶剂与原料混合后在水浴中加热,溶剂挥发后经冷凝作用重新回流到提取容器中提取目标成分。田素英等^[17]以一定粒度范围内的山慈姑药粉为原料,以体积比 75% 的乙醇溶液作为提取剂,经 4 次回流提取后,秋水仙碱提取量为 2 983.6 mg/kg。对于山慈姑中秋水仙碱回流提取的效果而言,粉末的粒径越小,提取效果越好,并且乙醇浓度、提取次数、乙醇用量对提取得率的影响较大。管伦兴等^[47]以体积比 70% 的甲醇对丽江山慈姑粉末中的秋水仙碱进行回流提取,结果表明,回流 2 次可将原料中的秋水仙碱完全提取出来,提取效率明显高于超声提取法。

2.3 超声提取法

超声波是一种高频机械波,可产生高速、强烈的空化效应高效破碎细胞,增强细胞壁和细胞膜的通透性及溶剂的穿透力,使提取溶剂更易接触目标成分,从而提高目标化合物的溶出速度和溶出量^[48]。Ou 等^[28]采用超声法对慈姑球茎干粉中的秋水仙碱进行提取,体积分数为 60% 的乙醇溶液在 50 °C 的温度条件下超声提取 30 min,料液比(质量体积比)为 1:25,秋水仙碱的平均提取得率可达 0.27%,在此研究中秋水仙碱的提取率随超声时间增加而增加,但超声时间为 30 min 时,秋水仙碱的提取率达到峰值,之后虽然提取时间延长但秋水仙碱提取率逐渐降低,原因可能与提取物中非靶标物质的增加有关。Çankaya 等^[43]以超声辅助法提取 *C. autumnale* 球茎中的秋水仙碱,结果显示,超声波功率为 602.4 W、提取时间为 42 min、温度为 64 °C 时,秋水仙碱的得率最高,超声处理 40 min 后提取率升高,表明超声波可促进目标化合物在溶剂中扩散,并在短时间内实现溶解平衡。同时,当料液比(质量体积比)从 1:15 增加到 1:30 时,提取效率提高 21%,但是料液比大于 1:30(质量体积比)以后,提

取效率变化不显著,原因可能是溶剂与溶质比增加时,溶质扩散过程加快,且迅速达到溶解力最大值。

2.4 超临界 CO₂ 萃取法

超临界 CO₂ 萃取法以处于临界状态的 CO₂ 为媒介,其具有双重优点,既有液体对物料的高渗透性和溶解能力,又有气体的高扩散性和低黏度,仅通过控制压力和温度即可选择性地不同极性、不同沸点和不同相对分子质量的成分萃取出来,而且在提取物中溶剂无残留^[49]。Bayrak 等^[16]将 *C. speciosum* 的种子磨碎后经脱脂处理去除油分,以超临界 CO₂ 技术萃取秋水仙碱,选用 0.5 ml/min 甲醇为改性剂,CO₂ 流速为 1.50 ml/min,CO₂ 密度为 0.90 g/ml,获得的萃取物中只含有秋水仙碱,得率为 1.44%,说明超临界 CO₂ 流体对秋水仙碱具有选择性,脱脂和添加甲醇改性剂可提高种子中秋水仙碱的萃取率。对于含有大量淀粉和多糖的百合鳞茎而言,经过氨水充分碱化后,更多的秋水仙碱可从原料中释放出来,有利于后续的超临界 CO₂ 流体萃取。此外使用提携剂萃取也可提高秋水仙碱萃取率,乙醇因渗透力较强,与秋水仙碱之间以氢键结合有利于萃取,适合作为超临界 CO₂ 流体萃取百合中秋水仙碱的提携剂^[50]。Ellington 等^[33]通过考察 CO₂ 不同密度、改性剂百分比、提取温度和萃取时间,建立从 *C. autumnale* 种子中提取秋水仙碱的超临界 CO₂ 萃取法,即在恒定的 CO₂ 密度(0.90 g/ml)和通量(1.5 ml/min)条件下,以体积分数 3% 的甲醇为改性剂,可在 110 min 内提取 98% 的秋水仙碱,与传统提取方法相比,超临界 CO₂ 萃取法更高效、快速、环保。

2.5 微波助提法

微波辅助提取的作用力主要来源于微波对细胞膜的生物效应。微波能穿透组织细胞,导致细胞内压力和温度升高,当压力超过细胞承受能力时细胞膜破裂,各种有效成分将从细胞进入溶剂中^[51]。Pandey 等^[36]以微波助提法对嘉兰中的秋水仙碱进行提取,主要参数设置为:微波功率 300~600 W,提取时间 3~9 min,溶剂为 20%~40% (体积分数) 的乙醇水溶液,溶剂 pH 为 2~6。通过比对获得最优提取条件:微波功率 460 W,微波处理时间 6.4 min,乙醇水溶液的体积分数为 30%,pH 值为 3,在此条件下获得的秋水仙碱含量达到最大值(7.51 mg/g)。Agrawal 等^[15]同样以微波助提法提取嘉兰块茎中的秋水仙碱,结果显示,在最佳提取条件下,即微波功

率 245 W、微波处理时间 15 min、提取溶剂为 100% 甲醇时,秋水仙碱的质量分数为 0.64%。

2.6 酶促提取法

酶在提取过程中可降解细胞壁及细胞间质中的成分,通过破坏细胞渗透阻力,将细胞内的有效成分分离出来^[52]。黄旖旋等^[53]将百合粉与磷酸盐缓冲液混合加热糊化,之后采用 NaOH 溶液碱化和 α -淀粉酶溶液恒温酶解,最后以三氯甲烷萃取,结果显示,在 2~10 U 的酶量范围内,随着酶量提高,提取液中葡萄糖浓度增加,秋水仙碱的提取率也相应提高。淀粉酶不同用量处理的秋水仙碱提取率均高于对照,原因可能是 α -淀粉酶在降解淀粉时,淀粉被水解成较小的葡萄糖分子,能够使更多被淀粉结构包围的秋水仙碱释放出来,由此说明加入淀粉酶可提高百合鳞茎中秋水仙碱的提取率。

2.7 双水相萃取法

双水相萃取系统是由 2 种化学结构不同的亲水性聚合物,或一种亲水性聚合物、低相对分子质量亲水性有机溶剂与无机盐在水中以适当浓度形成的互不相容的两水相系统,当目标物进入双水相体系后,因相对分子质量大小、电荷作用和各种力的存在以及环境影响使其在上相和下相中浓度不同而实现分离^[41]。石瑶等^[30]以聚乙二醇(PEG)与 (NH₄)₂SO₄ 形成的双水相体系萃取丽江山慈姑中的秋水仙碱,发现 PEG 相对分子质量大小与双水相成相体系的组成及成相后的相比有关,随着 PEG 相对分子质量增加,相同浓度的 PEG 成相所需的盐量逐渐减少,成相能力为 PEG6000>PEG4000>PEG2000>PEG600>PEG400。当 pH 为 7.0、PEG6000 质量分数为 8%、(NH₄)₂SO₄ 质量分数为 20% 时,秋水仙碱主要集中于上相(PEG 相),质量浓度为 0.749 6 mg/ml。双水相体系对丽江山慈姑粗提液中秋水仙碱的萃取率达 82.09%,富集倍数为 6.84 倍。此方法与传统的液液萃取、固相萃取等方法相比,具有操作简单、萃取条件温和、不使用有机溶剂等优点,除在蛋白质、酶、核酸的分离和纯化方面具有广阔的应用前景外^[54],也为生物碱类化合物的萃取分离提供了一种有效方法。

2.8 其他方法

除上述方法外,生物碱提取已从使用单一方法演变为多种方法的集成应用。李璐等^[55]采用正交试验法建立了淫羊藿生物碱的超声波-微波协同提取工艺,淫羊藿叶片粉末密封浸泡 40 min 后在超声

波-微波协同作用下萃取 18 min,微波功率 250 J/s,液固比为 30 ml/g,乙醇溶液体积分数为 70%,淫羊藿生物碱的提取率可达 16.146 mg/g,显著高于超声波提取法、微波提取法和加热提取法。刘谋盛等^[56]采用超声波辅助双水相萃取系统从山慈姑中提取秋水仙碱,原料中加入其质量 3~5 倍的乙醇(80%~95%,体积分数)和原料质量 4~6 倍的水,浸泡后加入原料质量 0.5~2.0 倍的硫酸铵、硫酸钠或甲酸钠中的一种,在温度 40~70 °C、频率 30~200 kHz 的超声波作用下进行双水相萃取 30~60 min。富含秋水仙碱的上层溶液减压浓缩形成含秋水仙碱的浸膏,经脱盐纯化和大孔吸附树脂柱分离后得到纯度大于 95% 的高纯度秋水仙碱。此方法以超声波辅助萃取,提高了秋水仙碱的萃取率,双水相萃取同时又对目标化合物起到分离纯化的作用,在秋水仙碱的生产上具有一定的应用前景。

2.9 不同提取方法的比较

秋水仙碱的不同提取方法均具有各自的优点和局限性,并且由于含秋水仙碱的植物种类多样且含量差异较大,因此相同提取方法在不同植物上的应用效果也有一定差别。Agrawal 等^[15]同时采用 5 种方法提取嘉兰茎块中的秋水仙碱,结果显示,与其他方法相比,微波助提法的用时最短,溶剂消耗量最少,提取效率最高。浸提法以水为提取剂经 24 h 提取得到的秋水仙碱质量分数为 0.310%,超声提取法以体积分数 50% 的甲醇水溶液提取 4 h,秋水仙

碱得率为 0.270%,而微波助提法在功率 245 W 时以甲醇为提取剂仅需提取 15 min,秋水仙碱含量即可达 0.640% (质量分数)。Bayrak 等^[16]通过对比超临界 CO₂ 萃取与传统提取法对 *C. speciosum* 种子中秋水仙碱的提取差异时发现,经过脱脂处理的种子膏状物用 200 ml 体积比为 95:5 的甲醇-水混合液振荡浸提 24 h,同时在提取过程中采用 2 次各 30 min 的超声波辅助提取,可获得最高的提取得率(4.12%),但所得提取产物中除秋水仙碱外还含有秋水仙苷、3-去甲秋水仙碱 2 种秋水仙碱的衍生物,秋水仙碱的提取率取决于溶剂体积和振荡周期。而超临界 CO₂ 萃取在 35 °C、CO₂ 流速 1.50 ml/min、CO₂ 密度 0.90 g/ml 提取 5 h 的条件下,秋水仙碱的得率为 1.44%,提取物仅含有秋水仙碱和另一种未知化合物。由于超临界 CO₂ 萃取过程使用甲醇作为改性剂,因此除节约时间外,超临界 CO₂ 萃取并未体现出更多区别于传统提取法的优势。黄旖旎等^[53]将百合粉末在 85 °C 高温下糊化处理后用 α-淀粉酶进行酶解,再以三氯甲烷为溶剂浸提原料中的秋水仙碱,结果证实 α-淀粉酶酶解可以提高百合粉末中秋水仙碱的提取得率,此方法操作步骤简便,用时较短,但需使用三氯甲烷为提取溶剂,对环境有一定污染。表 2 简要比对了各种提取方法的提取时间、试剂、技术要点及秋水仙碱提取得率,微波助提法在提取时间和得率方面显示出极大的优势,具有较高的实际应用价值。

表 2 不同方法提取秋水仙碱的差异

Table 2 Differences in colchicine extraction by different methods

序号	提取方法	提取试剂	提取时间	技术要点	秋水仙碱含量 (%,质量分数)	参考文献
1	浸提法	水	24 h	振荡提取时间、料液比	0.310	[15]
		乙醇水溶液	8 h		0.036	[46]
2	回流法	甲醇水溶液	6 h	高温加热回流、回流次数	0.480	[15]
		甲醇	4 h		0.223	[47]
3	超声波辅助提取法	甲醇	4 h	超声波功率、提取时间及提取温度	0.270	[15]
		盐酸溶液	1 h		0.238	[43]
4	超临界 CO ₂ 萃取法	二氧化碳流体	5 h	CO ₂ 流速、密度、改性剂种类	0.260	[16]
			2 h		0.049	[50]
5	微波助提法	甲醇	15 min	微波功率、提取剂浓度、料液比	0.640	[15]
		甲醇	10 min		0.758	[36]
6	酶促提取法	三氯甲烷	2 h	恒温糊化、碱化、酶解	0.080	[53]
7	双水相萃取法	聚乙二醇及硫酸铵水溶液	5 min	聚乙二醇相对分子质量大小、双水相成相体系的相比	0.090	[30]

3 秋水仙碱的分离纯化

3.1 膜分离技术

膜分离技术是以选择性透过膜为分离介质,借助液体的浓度差或电位差为推动力,对混合物中的特定组分实现分离、提纯和浓缩的分离技术^[57]。在药物分离上常用的膜技术主要包括微滤(滤膜孔径 $\geq 0.1\ \mu\text{m}$)、超滤(滤膜孔径 $10.0\sim 100.0\ \text{nm}$)、纳滤(滤膜孔径 $1.0\sim 10.0\ \text{nm}$)和反渗透(滤膜孔径 $\leq 1.0\ \text{nm}$)4类。微滤膜为均匀的多孔薄膜,厚度为 $90\sim 150\ \mu\text{m}$,操作压力为 $0.01\sim 0.20\ \text{MPa}$,过滤粒径为 $0.025\sim 10.000\ \mu\text{m}$,常用于截留粒径大于 $0.1\ \mu\text{m}$ 的微粒^[58]。以微滤膜过滤粗提液是秋水仙碱提取纯化中常用的方法, $0.45\ \mu\text{m}$ 的微滤膜适用于对不同提取方法获得的秋水仙碱粗提液进行分离纯化,为后续采用 HPLC 定量测定秋水仙碱的浓度提供高纯度溶液^[15,24,37,43]。Gumustas 等^[59]从 *C. speciosum* 和 *G. superba* 的种子中提取秋水仙碱时发现,以甲醇为溶剂稀释秋水仙碱提取物再以 $0.45\ \mu\text{m}$ 的微滤器进行过滤,在随后的浓度检测中没有观察到由基质引起的其他化合物干扰,说明选择甲醇溶剂和微滤分离结合的提取效果较好。

3.2 色谱法

3.2.1 薄层色谱法 薄层色谱利用涂布于平板上的物质的吸附能力的差异,使混合溶液流经固定相时被吸附,从而获得目标提取物。Alali 等^[60]以石油醚提取 2 种秋水仙球茎、叶和花中的秋水仙碱,将粗提物溶于体积分数 70% 的乙醇并以硅胶制备的薄层色谱板进行分离,秋水仙碱经分离后显示为黄色区域,将其从平板上取出溶于乙醇盐酸溶液即可用紫外分光光度法测定秋水仙碱含量。Bodoki 等^[61]为检测秋水仙种子中秋水仙碱的含量,采用薄层色谱法分离秋水仙碱的乙醇提取物,在温度 $20\sim 24\ ^\circ\text{C}$ 和湿度 $46\%\sim 56\%$ 的条件下以三氯甲烷-丙酮-二乙胺(5:4:1,体积比)的溶剂体系作为流动相,混合物分离后在 $350\ \text{nm}$ 反射率和 $254\ \text{nm}$ 荧光模式下进行密度扫描测定,结果显示,对于来源未知的待检样品,薄层色谱法更容易消除其背景干扰,可作为快速、准确定性和定量测定不同基质中秋水仙碱的标准技术,具有样品预处理流程简单、成本较低和可高通量检测样品的优点。

3.2.2 柱色谱分离法 柱色谱分离原理与薄层色谱法相同,但柱色谱分离通量大且效率高、适用范围广、操作更简单。柱色谱常用的吸附剂或载体主要有硅胶、

聚酰胺、葡聚糖凝胶、环糊精键合凝胶、氧化铝、大孔树脂、纤维素粉和离子交换树脂等^[62]。Kannan 等^[63]采用柱色谱法分离得到嘉兰种子的秋水仙碱粗提物,分离柱填充中性氧化铝,洗脱剂为体积比 97:3 的三氯甲烷和甲苯混合液,分离后的秋水仙碱结晶纯度高达 99.9%。Joshi 等^[64]用体积分数为 90% 的甲醇对嘉兰种子中的秋水仙碱进行第一次提取,甲醇提取物通过真空浓缩后再用二氯甲烷进行第二次提取,获得的干物质经多步清洗去除酚类杂质之后溶于乙醇,乙醇溶液经过活性炭柱洗脱,得到分数为 96.7% 的秋水仙碱,再经中性氧化铝柱进一步纯化,最终获得质量分数为 99.82% 的秋水仙碱。由此说明氧化铝柱可分离高纯度的秋水仙碱,并且氧化铝柱色谱可与其他分离手段结合使用,将氧化铝柱分离作为最后的纯化步骤能够使化合物的分离效果达到最优。

3.3 树脂吸附法

常规树脂分为离子交换树脂和吸附树脂,大孔吸附树脂是一类高分子聚合物,具有大孔网状结构和较大的比表面积,理化性质稳定,吸附力强且易洗脱,可循环使用^[65]。李晓静等^[66]以秋水仙碱提取液为大孔树脂的上样液,比较 5 种不同型号的大孔树脂(D101 为非极性,LSA5B、LSA21 为弱极性,HPD600 和 LSD001 为极性大孔吸附树脂)的吸附解吸性能,不同极性的大孔吸附树脂依次用 NaOH 溶液、HCl 溶液和 95% (体积分数)乙醇浸泡、水洗后再进行筛选,结果表明,树脂的极性、比表面积和平均孔径的大小直接影响树脂的吸附容量和解析率,非极性树脂 D101 和弱极性树脂 LSA5B 和 LSA21 对秋水仙碱的吸附量较大,但 LSA21 和 D101 吸附达到平衡所需时间较长,LSA5B 吸附达到平衡所需时间较短,且有较高解析率。在 pH 值 2.5、上样体积流量 1.5 BV/h、秋水仙碱饱和吸附量 26.49 mg/g 时,用体积分数 70% 的乙醇洗脱,洗脱体积流量 1.5 BV/h 的条件下,LSA5B 大孔树脂对秋水仙碱的吸附率达 98.16%,秋水仙碱的质量浓度比富集前提高 25 倍。近年来,树脂吸附应用在分离纯化粉末状原料中的秋水仙碱外,用树脂吸附培养基中的秋水仙碱也有相关研究报道。Nasreen 等^[67]在秋水仙种子的培养基中发现,占总含量 40%~70% 的秋水仙碱是由标记前体合成的秋水仙碱,表明在种子内合成的秋水仙碱被释放到培养基中。Aroud^[68]对 *C. autumnale* 和 *G. superba* 进行愈伤组织及根组织的悬浮培养,用非极性的大孔树脂 XAD-

4、XAD-16 和中极性的大孔树脂 XAD-7 吸附液体培养基中的秋水仙碱,将树脂封闭在尼龙网袋中与细胞悬浮培养物一起孵育,XAD-4 和 XAD-16 2 种树脂对秋水仙碱的吸收率分别达到 98.0% 和 99.5%,由此说明树脂吸附不仅可以高效纯化分离物,在细胞工程中还可以大大提高目标化合物的生产效率。

3.4 秋水仙碱不同分离纯化方法的特点

秋水仙碱的分离纯化研究多集中于膜分离技术、色谱分离和树脂吸附 3 类方法。膜分离技术在生物碱的分离纯化方面应用广泛,秋水仙碱分离纯化常采用 0.45 μm 孔径的微滤膜进行初级纯化,滤液需协同其他分离手段再经过进一步纯化才能得到纯度更高的秋水仙碱产品^[37,43]。色谱法利用待分离物在固定相中吸附分配的微小差别,将各种性质极相似的组分彼此分离。Bodoki 等^[61]采用以硅胶 60 为固定相的薄层色谱分离从 *C. autumnale* 中获得的秋水仙碱粗提物,证实此法可消除秋水仙碱因光照产生降解产物的干扰,将有生物活性的秋水仙碱准确地分离出来,说明薄层色谱法可作为定性、定量分离秋水仙碱的标准技术,广泛应用于制药工业中快速、准确地分离秋水仙碱。柱色谱分离可使用的吸附剂种类较多,秋水仙碱常用的吸附剂为中性氧化铝,由柱色谱分离获得的秋水仙碱纯度高达 98% 以上^[63-64]。大孔树脂在生物碱的分离纯化领域应用广泛,但因其种类繁多,选择时应满足目标成分对树脂吸附容量和解析率的要求。在秋水仙碱纯化时筛选过的树脂型号包括 LSA5B、LSA21、LSD001、HPD600、D101 等^[66],非极性和弱极性的大孔吸附树脂显示出对秋水仙碱吸附量更大、过滤速度更快、解析更容易等优点。由于树脂吸附性能稳定,可回收再利用,与膜分离技术集成联用,可充分发挥各自的工艺优势,获得纯度更高的化合物单体。

4 结论与展望

目前大多数植物次生代谢物产品的获取都是通过田间栽培或从自然栖息地收集的植物材料中提取纯化^[69],秋水仙碱的生产仍然以从栽培植物中提取为主,因此,秋水仙碱含量高的植物一直是人们寻找的热点植物。嘉兰的秋水仙碱质量分数(0.90%)高于秋水仙的秋水仙碱质量分数(0.62%)^[60],且种植范围较广,逐步成为生产秋水仙碱的主要基源植物^[18]。在提取方法上,对于种子类原料, Bayrak

等^[16]在提取前增加脱脂步骤,提高了秋水仙碱的提取率,而对球茎、块茎类材料,采用酶解或碱化等^[50,53]处理方法去除淀粉和多糖成分,减少此类物质对提取过程的干扰,可获得更高的秋水仙碱提取得率。随着秋水仙碱的提取方式越来越多样,仅凭单一提取技术常常难以满足多个目标。传统提取方法效率低,耗时较长,提取过程需要使用大量对环境有污染的试剂,而单独使用超声辅助、超临界 CO_2 萃取、酶辅助、双水相萃取等方法虽能加快提取速度,但并不能大幅提升秋水仙碱的提取得率。因此,由不同提取技术组合而成的协同提取法应用价值极高,可针对各种技术优势互补的原则形成高效的协同提取法,减少使用有毒试剂,降低生产成本,以利于秋水仙碱提取技术的工业化应用将是今后研究的主要方向。

在秋水仙碱的分离纯化研究方面,膜分离、色谱分离和树脂吸附技术取得了一定的研究进展。膜分离过程操作简单,常用于秋水仙碱粗提液的分离纯化,与色谱分离或大孔树脂吸附协同作用可得到高纯度的秋水仙碱。大孔树脂因具有吸附量大、分离高效快速等优点,最宜于在工业生产中使用。随着 Nett 等^[70]阐明嘉兰(*G. superba*)中完整的秋水仙碱生物合成途径,并在烟草中成功重现秋水仙碱的合成过程,后续针对生物合成秋水仙碱的特异性分离将会成为一项必要的研究,将不同分离纯化技术的优势整合,减少操作步骤,降低成本,筛选环保型的分离介质,是下一步秋水仙碱分离纯化需要开展的工作。

参考文献:

- [1] ADE R, RAI M K. Review: colchicine, current advances and future prospects[J]. Nusantara Bioscience, 2010, 2(2): 90-96.
- [2] DASGEB B, KORNREICH D, MCGUINN K, et al. Colchicine: an ancient drug with novel applications[J]. British Journal of Dermatology, 2018, 178(2): 350-356.
- [3] KOLKHIR P, GRAKHOVA M, BONNEKOH H, et al. Treatment of urticarial vasculitis: a systematic review[J]. Journal of Allergy & Clinical Immunology, 2019, 143(2): 458-466.
- [4] SAMUEL M, TARDIF J C, BOUABDALLAOUI N, et al. Colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2021, 37(5): 776-785.
- [5] ELSHAFEI M N, KHALIL A, EL-BARDISSY A, et al. The efficacy of colchicine in the management of coronavirus disease 2019: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(36): e21911.

- [6] 王亚茹,邓高松,李 云,等.秋水仙碱对微管蛋白的作用机制及其细胞效应研究进展[J].西北植物学报,2010,30(12):2570-2576.
- [7] DALBETH N, LAUTERIO T J, WOLFE H R. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout[J]. *Clinical Therapeutics*, 2014, 36(10): 1465-1479.
- [8] ANGELIDIS C, KOTSIALOU Z, KOSSYVAKIS C, et al. Colchicine pharmacokinetics and mechanism of action[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(6): 659-663.
- [9] 李 赞,郭 倩,王 君,等.秋水仙碱诱导银白杨花粉染色体加倍及其细胞学效应研究[J].核农学报,2014,28(5):749-756.
- [10] LIMERA C, WANG K, XU L, et al. Induction of autotetraploidy using colchicine and its identification in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2016, 91(1): 63-70.
- [11] DIXIT V, CHAUDHARY B R. Colchicine-induced tetraploidy in garlic (*Allium sativum* L.) and its effect on allicin concentration [J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2014, 89(5): 585-591.
- [12] DIXIT V, VERMA S, CHAUDHARY B R. Changes in ploidy and its effect on thymoquinone concentrations in *Nigella sativa* L. seeds [J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2015, 90(5):537-542.
- [13] 李文文,吴光斌,陈发河.秋水仙碱处理对采后莲雾果实在冷藏期间品质, 活性氧代谢和能量代谢的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(16): 272-279.
- [14] YANG L Q, STOCKIGT J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(10): 1469-1479.
- [15] AGRAWAL P, LADDHA K. Extraction of colchicine from *Gloriosa superba* tubers: a comparison of conventional and microwave-assisted extraction[J]. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 2019, 53(1):1-10.
- [16] BAYRAK S, SOKMEN M, AYTAC E, et al. Conventional and supercritical fluid extraction (SFE) of colchicine from *Colchicum speciosum*[J]. *Industrial Crops & Products*, 2019, 128(3): 80-84.
- [17] 田素英,陈周全.山慈菇中秋水仙碱醇提工艺的优选[J]. *中草药*, 2002, 33(8): 708-710.
- [18] KITAJIMA M, TANAKA A, KOGURE N, et al. Metacolchicine, a new colchicinoid from *Sandersonia aurantiaca*[J]. *Heterocycles*, 2011, 83(8): 1903-1907.
- [19] ELLINGTON E, BASTIDA J, VILADOMAT F, et al. Occurrence of colchicine derivatives in plants of the genus *Androcymbium* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, 31(7): 715-722.
- [20] POTESILOVA H, MACFARLANE T D, GUENARD D. Alkaloids and phenolics of *Wurmbea* and *Burchardia* species [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(4): 1031-1032.
- [21] VINNERSTEN A, LARSSON S. Colchicine is still a chemical marker for the expanded Colchicaceae[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(6): 1193-1198
- [22] BOZYEL M E, MERDAMERT-BOZYEL E, BENEK A, et al. Ethnomedicinal uses of colchicaceae and liliaceae taxa in turkey, advances in scientific research: engineering and architecture [M]. Sofia:St. Kliment Ohridski University Press, 2020.
- [23] 唐湘伟. 高效液相色谱法检测不同采收期邵阳龙牙百合的秋水仙碱含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(5): 1013-1016.
- [24] 张 宁,李 森,王金耀,等.萱草属植物花蕾中秋水仙碱含量 HPLC 检测体系的优化 [J]. *河北农业大学学报*, 2017, 40(5): 48-54.
- [25] 王慧春,李 毅,王 环,等.光照对水母雪莲愈伤组织合成生物碱的影响[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(1): 69-73.
- [26] 徐 彦,吴春蕾,刘 圆,等.唐古特雪莲的化学成分研究[J]. *中草药*, 2010, 41(12): 1957-1960.
- [27] 何达海,丁克毅,王晓玲.天南星属植物化学成分研究进展[J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2014, 40(6): 861-865.
- [28] OU L L, ZHU Y, SHUI P X, et al. Extraction and anti-inflammatory effects of colchicine from *Sagittaria sagittifolia* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2017, 18(7): 1208-1212, 1216.
- [29] ALEMU I D, DABA T M. *Gloriosa*, a source of colchicine review article[J]. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 2016, 10(4): 1888-1893.
- [30] 石 瑶,杨亚玲,李晚谊,等.双水相萃取丽江山慈菇中的秋水仙碱[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(10): 1412-1416.
- [31] JANA S, SHEKHAWAT G S. Critical review on medicinally potent plant species: *Gloriosa superba* [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(3): 293-301.
- [32] 杨 雄,金兆元,李 维.一种秋水仙碱的提取方法: CN102276493B [P]. 2013-12-11.
- [33] ELLINGTON E, BASTIDA J, VILADOMAT F, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of colchicine and related alkaloids from seeds of *Colchicum autumnale* L. [J]. *Phytochemical Analysis*, 2003, 14(3): 164-169.
- [34] PANDEY D K, BANIK R M. Optimization of extraction conditions for colchicine from *Gloriosa superba* tubers using response surface methodology [J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2012, 8(4): 1301-1315.
- [35] 李慧芳,庄 丽,董又溧,等.野罂粟不同产地不同部位中生物碱类成分的比较研究[J]. *中草药*, 2017, 48(23): 4986-4993.
- [36] PANDEY D K, KAUR P, KUMAR V, et al. Screening the elite chemotypes of *Gloriosa superba* L. in India for the production of anticancer colchicine: simultaneous microwave-assisted extraction and HPTLC studies[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21: 1-18.
- [37] 袁理春,徐中志,赵 琪,等.丽江山慈菇秋水仙碱 HPLC 测定 [J]. *西南农业学报*, 2007, 20(1): 120-122.
- [38] AKRAM M N, VERPOORTE R, POMAHACOVA B. Effect of bulb age on alkaloid contents of narcissus pseudonarcissus bulbs [J]. *South African Journal of Botany*, 2021, 136: 182-189.
- [39] ALALI F Q, EL-ALALI A, TAWAHA K, et al. Seasonal variation of colchicine content in *Colchicum brachyphyllum* and *Colchicum tunicatum* (Colchicaceae) [J]. *Natural Product Research*, 2006,

- 20(12): 1121-1128.
- [40] AL-FAYYAD M, ALALI F, ALKOFARI A, et al. Determination of colchicine content in *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum* under cultivation[J]. Natural Product Letters, 2002, 16(6): 395-400.
- [41] 樊轻亚,许卫军,代春美. 双水相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定倒提壶中8种生物碱[J]. 分析测试学报, 2019, 38(11): 1328-1334.
- [42] KANG X, DENG L L, QUAN T, et al. Selective extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Aiton root using tailor-made deep eutectic solvents and magnetic molecularly imprinted polymers[J]. Separation and Purification Technology, 2021, 261: 118282.
- [43] ÇANKAYA N, BULDUK I, ÇOLAK A M. Extraction, development and validation of HPLC-UV method for rapid and sensitive determination of colchicine from *Colchicum autumnale* L. bulbs[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(2): 345-351.
- [44] 黄晨熙,黄赣辉,郭勇辉. 提取秋水仙碱的方法;CN104610084B [P]. 2016-06-01.
- [45] 姚红锐,尚靖,柳军,等. 百合各株系中秋水仙碱提取方法优化及含量测定[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(5):729-731.
- [46] 陈莉华,张丽,徐果. 百合粉中秋水仙碱的提取及抑菌性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 57-60.
- [47] 管伦兴,储益平. 云南丽江山慈菇品种考证及有效成分秋水仙碱含量的研究[J]. 中药与临床, 2015, 6(3): 1-3.
- [48] 吴剑夫,程安玮,孙金月,等. 超声波辅助提取秋葵果胶工艺优化及理化性质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(10): 2002-2011.
- [49] 石一飞,陈巧青,徐永进,等. 超临界流体CO₂萃取浙贝母花生物碱的工艺研究[J]. 农产品加工, 2017(10): 34-36.
- [50] 李新社,王志兴. 溶剂提取和超临界流体萃取百合中的秋水仙碱[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2004, 35(2): 244-248.
- [51] 王远,郑雯,袁田青,等. 辣木叶总黄酮微波辅助提取工艺优化及其抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究[J].核农学报, 2018, 32(1):84-94.
- [52] 宋成英. 酶解技术在中药提取中的应用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 1934-1935.
- [53] 黄旖旎,索绪斌,邓妍芳,等. α -淀粉酶水解百合的动力学及对秋水仙碱提取得率影响的研究[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(1): 14-19.
- [54] 刘丽丽,程利明,车红霞,等. 双水相萃取技术提取牛乳过氧化氢酶[J]. 中国食品学报, 2016, 16(10): 93-98.
- [55] 李璐,安叶娟,乔春雷,等. 淫羊藿生物碱的超声波-微波协同提取及其对HeLa细胞的抑制作用[J]. 植物学报, 2018, 53(3): 341-352.
- [56] 刘谋盛,石瑶,杨亚玲. 一种秋水仙碱的制备方法;CN102627576A [P]. 2012-08-08.
- [57] 徐龙泉,彭黔荣,杨敏,等.膜分离技术在中药生产及研究中的应用进展[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1989-1994.
- [58] 谢慧荣,罗忠圣,钱余,等.膜分离技术在天然产物中的应用[J]. 食品科技, 2021, 46(5): 104-107.
- [59] GUMUSTAS M, POLAT D Ç, KILIC D S, et al. Comparison of seeds of *Colchicum speciosum* and *Gloriosa superba* in respect to colchicine and colchicoside contents by RP-LC[J]. Natural Product Communications, 2016, 11(3): 397-400.
- [60] ALALI F, TAWAHA K, QASAYMEH R M. Determination of colchicine in *Colchicum steveni* and *C. hierosolymitanum* (*Colchicaceae*): comparison between two analytical methods[J]. Phytochemical Analysis, 2004, 15(1): 27-29.
- [61] BODOKI E, OPREAN R, VLASE L, et al. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 37(5): 971-977.
- [62] 杨发容,景联鹏,顾丽莉,等. 色谱技术在黄酮类化合物分离纯化中的应用研究进展[J]. 食品与机械,2021,37(12):202-208.
- [63] KANNAN S, WESLEY S D, RUBA A, et al. Optimization of solvents for effective isolation of colchicines from *Gloriosa superba* L. seeds[J]. Natural Product Research, 2007, 21(5): 469-472.
- [64] JOSHI C S, PRIYA E S, MATHELA C S. Isolation and anti-inflammatory activity of colchicinoids from *Gloriosa superba* seeds[J]. Pharmaceutical Biology, 2010, 48(2): 206-209.
- [65] 杨敏,张天锡,史磊,等. 大孔吸附树脂分离纯化中药成分影响因素探讨[J]. 中草药, 2020, 51(15): 4050-4058.
- [66] 李晓静,李岩,程雪梅,等. 大孔树脂分离纯化秋水仙总生物碱的研究[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1667-1671.
- [67] NASREEN A, GUNDLACH H, ZENK M H. Incorporation of phenethylisoquinolines into colchicine in isolated seeds of *Colchicum autumnale* [J]. Phytochemistry, 1997, 46(1): 107-115.
- [68] AROUD G. Production of colchicine by using plant cell culture [D]. Dublin: Dublin City University, 2005.
- [69] KEFI S. A novel approach for production of colchicine as a plant secondary metabolite by in vitro plant cell and tissue cultures[J]. Journal of Agricultural Science and Technology A, 2018, 3: 121-128.
- [70] NETT R S, LAU W, SATTELY E S. Discovery and engineering of colchicine alkaloid biosynthesis[J]. Nature, 2020, 584(7819): 148-153.

(责任编辑:陈海霞)