

高乌甲素提取工艺的优化及抗氧化活性的电化学研究

张应强, 陈 博, 史高峰

(兰州理工大学, 甘肃 兰州 730050)

摘 要: 确立乌头类生物碱高乌甲素的最优提取工艺及其体外抗氧化能力。采用正交实验设计, 考察了溶剂浓度、提取温度、提取时间、料液比对高乌甲素提取效果的影响并利用循环伏安法, 以峰电流的变化为对比参数, 详细研究了高乌甲素在静电纺丝碳纳米管纤维修饰玻碳电极上的抗氧化性能。高乌甲素最佳提取条件为, 溶剂选用无水乙醇和 3%乙醇体积的冰乙酸、提取温度 70℃、提取时间为 3h、料液比为 1:10。该提取工艺合理, 稳定, 在最佳条件下浸膏得率为 18.42%, 高乌甲素含量为 0.86%。高乌甲素对自由基具有一定的清除作用, 对羟基自由基的清除率为 47.8%, 对超氧阴离子自由基的清除率为 32.1%。

关键词: 生物碱; 高乌甲素; 正交设计; 电化学; 自由基
中图分类号: O646

高乌头(*Aconitum sinomontanum Nakai*)属毛茛科(*Ranunculaceae*)乌头属(*Aconitum*)植物, 多年生草本, 俗称九连环、麻布七、统天袋, 其根药用^[1], 主治风湿痹痛、关节肿痛、跌打损伤、胃痛、胸腹胀满、急慢性菌痢、急慢性肠炎等。生物碱是中草药重要有效成分之一, 高乌甲素作为生物碱的一种, 普遍存在于毛茛科植物高乌头中。现代医学研究表明, 高乌甲素氢溴酸盐的一水化合物具有明显的抗炎、消肿、解热、局部麻醉和镇痛作用, 无成瘾性, 不良反应少^[2], 何志超等^[3]提出, 化合物抗氧化活性高, 可能是该植物主要的抗炎活性成分, 但是对乌头类生物碱高乌甲素及其盐类化合物抗氧化活性的研究笔者未见国内外文献报道, 而对生物碱抗氧化活性的研究报道较多, 有研究表明, 生物碱具有一定的抗氧化活性^[4-6]。

现已表明, 适量的自由基在免疫反应、细胞分化、细胞凋亡和其它生化代谢过程中起着重要的作用, 然而过量的自由基则在机体中引起一系列生化反应, 导致组织细胞、亚细胞和分子结构的破坏, 并随着破坏层次逐渐扩展造成功能损伤, 引起心血管疾病、癌症和衰老等^[7,8], 它是构成很多疾病的病理学基础。因此合理地使用抗氧化剂, 可以有效地预防和治疗某些疾病, 延缓衰老^[9], 避免因自由基过量引起的酶失活、蛋白质变性、DNA 断裂、多糖降解、细胞解体、损伤生物膜结构、以及机体病变和死亡^[10]。

合成抗氧化剂往往具有一定的毒副作用, 使得它们的使用受到严格控制。而天然抗氧化剂副作用较小, 因此, 寻找高效、价廉、低毒甚至无毒的天然抗氧化剂的工作备受关注^[4]。抗氧化剂作为一种电活性物质, 在体内进行的清除氧自由基的过程与电极上发生的氧化还原过程类似, 亦是电子转移来实现的, 可以认为抗氧化活性实质上是一种电学性质。因此, 电化学方法在天然抗氧化剂的研究中大有可为^[11]。因此, 本实验以甘肃高乌头为原材料, 采用正交设计法对高乌头中高乌甲素的提取工艺进行了系统的优化, 进一步纯化并采用电化学方法探讨了乌头类生物碱高乌甲素体外清除自由基的能力, 评价乌头类生物碱高乌甲素的抗氧化活性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

高乌头: 产自甘肃天祝。风干、粉碎、过筛, 备用。

1.2 实验仪器与试剂

紫外-可见分光光度计(日本 Hitachi); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 三用紫外灯(北京智源通生物技术研究); SHP 生化培养箱(扬州鸿都电子有限公司); 电热恒温鼓风干燥箱(上海市实验仪器总厂); CHI660 电化学工作站(上海辰华仪器公司)。

高乌甲素(中国药品生物制品检定所);核黄素、甲硫氨酸(天津市天新精细化工开发中心);七水硫酸亚铁、过氧化氢(天津市凯通化工有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 高乌甲素标准曲线的绘制

准确称取高乌甲素标准品 0.0034 g 置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容制得 0.068 mg/mL 的标准溶液,精密吸取该对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶液稀释至刻度,以甲醇为空白,在 252 nm 波长处测定吸光度^[12]。以吸光值 A 为纵坐标,浓度 C(mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线。

1.3.2 高乌甲素的提取及含量的测定

高乌甲素的提取及测定选用单因素及正交试验。单因素选取溶剂、乙醇浓度、料液比、温度、回流时间和提取次数。正交试验选取乙醇浓度、固液比、回流时间、提取温度 4 个因素,以 L₉(4³)进行正交实验设计。准确称取高乌头粉末 25.0 g,转移至 500 mL 的圆底烧瓶中,加入 3% V_{溶剂}的冰乙酸和相应浓度、相应体积的溶剂,封口静置,在室温下浸泡 12 h。

首先固定料液比 1:8、提取温度 70 °C、提取时间 3 h、提取 1 次的条件下,将提取液减压抽滤,浓缩至浸膏状,将浸膏转入玻璃皿中,烘干,计算浸膏得率,然后取一定质量的浸膏溶解,在 252 nm 处测定吸光度值,对照标准曲线,计算高乌甲素的含量,考察不同溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯)对高乌甲素提取率的影响。然后在上述条件下考察不同浓度(40%、60%、80%、100%)的乙醇溶液、不同温度(50°C、60°C、70°C、80°C)、不同料液比(1:6、1:8、1:10、1:12)、不同提取时间(1h、2h、3h、4h)和不同提取次数(1次、2次、3次、4次)对高乌甲素提取率的影响。将每次优选后的最佳条件固定,再逐次筛选其余最佳条件,直至结束。

1.3.3 高乌甲素抗氧化活性的电化学研究

羟基自由基反应体系的配制:准确称取 0.1510g 七水硫酸亚铁晶体、0.0564g 30%的 H₂O₂,用蒸馏水定容至 50 mL,分别标记为 A 液、B 液,储存于 0~4°C 冰箱中,备用。

超氧自由基反应体系的配制:准确称取 0.1060g 核黄素,用 70% 甲醇溶解定容至 10 mL,标记为 C 液;精确称取 0.0102g 甲硫氨酸溶解于 10 mL 甲醇中,标记为 D 液,储存于 0~4°C 冰箱中,备用。

高乌甲素用无水甲醇配制成 0.1 mg/mL,标记为 X 液,储存于 0~4°C 冰箱中,备用。

羟基自由基的实验方法:实验组:准确量取 5.0 mL X 液、2.0 mL A 液、2.0 mL B 液,依次加入并混合均匀,37°C 恒温避光孵化 2 h;对照组:准确量取 5.0 mL X 液、2.0 mL A 液、2.0 mL 去离子水,依次加入并混合均匀,37°C 恒温避光孵化 2 h。

超氧自由基的实验方法:实验组:准确量取 2.0 mL X 液、1.0 mL C 液、1.0 mL D 液,依次加入并混合均匀,在 254 nm 和 365 nm 紫外灯下孵化 2 h;对照组:准确量取 2.0 mL X 液和 2.0 mL 甲醇,混合均匀,在 254 nm 和 365 nm 紫外灯下孵化 2 h。

在清除自由基的实验中,具有抗自由基的组分与自由基反应后,其含量有一定的变化,反映在循环伏安曲线上其对应的峰电流也会发生变化,一般而言,能够清除自由基的组分含量会降低或者消失,而没有清除自由基效果的组分含量基本不变,对应峰电流液基本没有变化。对于一个自由基实验体系,通过实验组和对照组对应峰电流的变化,就可以利用计算公式来评价相应组分的自由基清除率^[13],其计算公式如下:

$$\text{Radical scavenging(\%)} = \frac{I_p(\text{control}) - I_p(\text{exp})}{I_p(\text{control})} \times 100\%$$

注: I_p(control): 对照组峰电流, I_p(exp): 实验组峰电流

2 方法与结果

2.1 高乌甲素含量测定结果

根据高乌甲素标准品溶液系列浓度梯度,以吸光度 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标绘制标准曲线如图 1 所示,得回归方程: $y = 0.0497x + 0.0220$, $R^2 = 0.9993$ (n=5),根据标准曲线计算样品高乌甲素的含量。

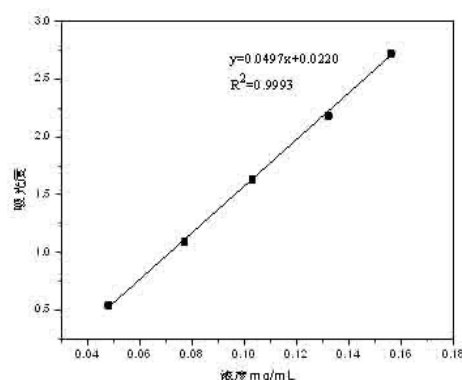


图 1 高乌甲素标准曲线

2.2 单因素实验

在 1.3.2 实验条件下,单因素的选择结果如图 2 所示。由图可知,甲醇、乙醇对高乌甲素的提取效果较好,而丙酮和乙酸乙酯的极性较低,将大量的脂溶性物质提出,导致高乌甲素含量较低。对于甲醇和乙醇两种溶剂,甲醇的提取浸膏得率稍高,但高乌甲素的含量偏低,所含杂质较多,为后续纯化带来不便,因此,本实验选用乙醇作为提取高乌甲素的溶剂。浸膏得率和高乌甲素的含量随着乙醇浓度的增加而增大,当乙醇浓度达到 80%时,再增加乙醇浓度,浸膏得率增加并不明显,高乌甲素的含量反而下降,因此,综合考虑选用 80%乙醇作为本实验的提取溶剂。温度对高乌甲素的提取也有较大的影响,当温度达到 70℃时,浸膏得率和高乌甲素的含量最高,分别可达 15.23%和 0.79%。当温度超过 70℃时,高乌甲素含量和浸膏得率反而降低,因此,本实验的提取温度应取 70℃。随着料液比的增大,浸膏得率及高乌甲素含量都会随之增加,当料液比为 1:10 时,高乌甲素含量最高,为 0.80%,当料液比超过 1:10 时,高乌甲素含量反而降低了,因此,选用 1:10 的料液比,既可以避免造成溶剂的浪费,降低经济成本,也可以减少杂质的溶出,减少后续纯化难度。随着提取时间的增长,浸膏得率和高乌甲素含量都在增大,当提取时间为 3h 时浸膏得率和高乌甲素含量最高,分别为 18.16%和 0.80%,然后继续增大提取时间,高乌甲素含量反而降低,故本次实验的提取时间选择为 3h。随着提取次数的增加,浸膏得率随之增加,而高乌甲素含量基本不变。当提取次数为两次时,浸膏得率增加趋势明显,当提取次数为 2 次及以上时,浸膏得率基本不再增加,为避免造成溶剂和能耗的浪费,增加生产成本,故取最佳提取次数为 2 次。

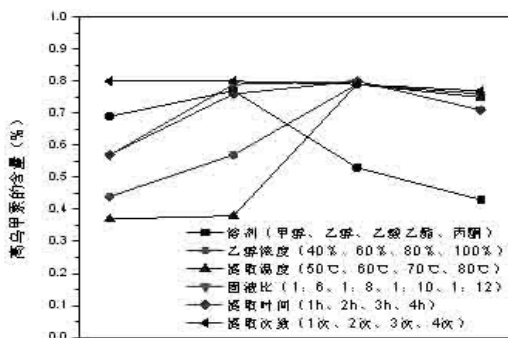


图 2 不同提取条件对乌甲素含量的影响

2.3 正交实验

本实验在单因素实验的基础上,针对这些因素的变化规律,选用乙醇浓度(A)、固液比(B)、提取时间(C)、提取温度(D),设计 3 个实验水平,采用 L9(3⁴) 正交表进行实验,确定提取高乌甲素的最佳工艺。因素水平表的设计见表 1,正交实验结果见表 2。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 乙醇浓度 (%)	B 固液比 (g/mL)	C 时间 (h)	D 温度 (°C)
1	60	1:8	1	60
2	80	1:10	2	70
3	100	1:12	3	80

表 2 正交实验结果

实验号	因素				高乌甲素含量/%
	A 浓度 (%)	B 固液比 (g/mL)	C 时间 (h)	D 温度 (°C)	
1	1	1	1	1	0.38
2	1	2	2	2	0.68
3	1	3	3	3	0.61
4	2	1	2	3	0.58
5	2	2	3	1	0.62
6	2	3	1	2	0.77
7	3	1	3	2	0.80
8	3	2	1	3	0.76
9	3	3	2	1	0.64
K ₁	0.557	0.587	0.637	0.547	
K ₂	0.687	0.687	0.633	0.750	
K ₃	0.733	0.673	0.677	0.650	
R	0.176	0.100	0.044	0.203	

由正交试验结果分析比较,得到 D>A>B>C,即影响高乌甲素提取效果各因素的主次顺序为:提取温度、溶剂浓度、固液比、提取时间。通过本次正交实验筛选出高乌甲素提取的最佳工艺组合为 A3B2C3D2,即:乙醇浓度为 100%,料液比为 1:10,提取时间为 3h,提取温度为 70℃。

2.3 验证试验

分别称取 25.0g、50.0g、75.0g 高乌头粉末,在上述最优工艺条件下提取高乌头中的高乌甲素,提取 2 次,计算浸膏得率并测定高乌甲素含量,结果如表 3。

表3 最佳工艺验证试验

高乌头质量/g	浸膏得率/%	高乌甲素含量/%	平均含量/%
25.0	28.25	0.82	0.81
50.0	28.31	0.80	
75.0	28.23	0.81	

从表3可看出,此最佳提取工艺条件重复性较好,高乌头中高乌甲素提取率均高于正交试验中的高乌甲素提取率,说明该最佳工艺条件具有可靠性。

综上所述,在最优工艺条件下提取高乌头中的高乌甲素,采用100%乙醇作溶剂,料液比为1:10,提取时间为3h,提取温度70℃,提取2次,其提取率

为0.81%,并且乙醇易于回收再利用,成本低廉,高乌甲素提取率高,有利于工业化生产。

2.4 抗氧化活性的电化学测定结果

高乌甲素清除自由基的实验现象如图3所示,其中,图3(A)为高乌甲素清除羟基自由基的循环伏安曲线,图3(B)为清除超氧阴离子自由基的循环伏安曲线。

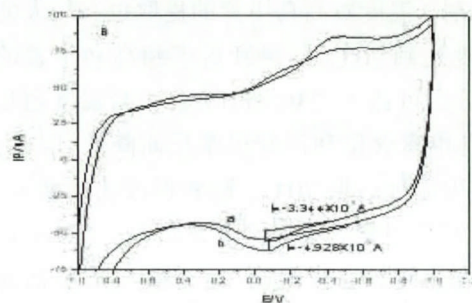
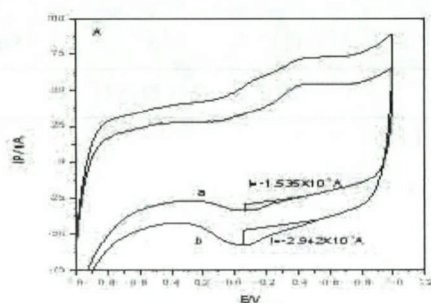


图3 高乌甲素清除羟基自由基(A)和超氧阴离子自由基(B)实验(a实验组,b对照组)

在图3(A)中,曲线a为实验组的循环伏安图。在-0.2~0 V之间,出现了一个氧化峰,与对照组相比,实验组的氧化峰电流较弱,说明实验组在清除自由基反应过程中消耗了部分高乌甲素。羟基自由基是由Fenton反应产生的,该反应产生的羟基自由基可破坏生物碱高乌甲素的苯环。在实验组中生物碱是用来清除自由基的,因此,对照组样品的峰值电流大于实验组样品的峰值电流^[14],清除率为47.8%

(表4)。

图3(B)中,a为实验组的循环伏安曲线,b为对照组的循环伏安曲线,由图可知,在-0.2~0 V之间,出现了一个氧化峰,且实验组的氧化峰电流小于对照组的氧化峰电流,表明高乌甲素对超氧阴离子的生成具有明显的抑制作用^[15],清除效果见表4,清除率为32.1%。

表4 高乌甲素清除自由基效果对照表(n=3)

自由基类型	高乌甲素		
	实验组/ $\times 10^{-6}A$	对照组/ $\times 10^{-6}A$	清除率/%
羟基自由基	-1.535±0.062	-2.942±0.046	47.8%
超氧阴离子自由基	-3.344±0.371	-4.928±0.082	32.1%

3 讨论

使用正交试验设计,可以减少试验次数,达到较全面地反映各因素水平的效果。以甘肃天祝高乌头为原料,采用正交试验设计对高乌甲素的提取工艺进行优化,得到合理、科学、稳定的提取工艺。目前,有关生物碱抗氧化活性研究报道的较多,但对于乌头类生物碱高乌甲素抗氧化活性的报道国内外几乎没有。因此本实验运用电化学循环伏安法,以峰电流

的变化为对比参数,详细研究了高乌甲素在静电纺丝碳纳米管纤维修饰玻碳电极上的抗氧化性能,证明高乌甲素对羟基自由基和超氧阴离子自由基具有一定的清除作用。但由于条件有限,本实验仅限于高乌甲素对生物体外的自由基具有清除作用,而对体内抗氧化效果如何,本课题组正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 王文采.中国植物志(第28卷)[M].北京:科学出版社,1980. (下转第35页)

的光伏发电量在 10 月份以后才开始明显下降,相比发电量最高的 6 月,下降的幅度约为 18%~25%。

5 天气对光伏发电量的影响

结合天气状况观察某一阶段的日发电量,如图 6 所示。

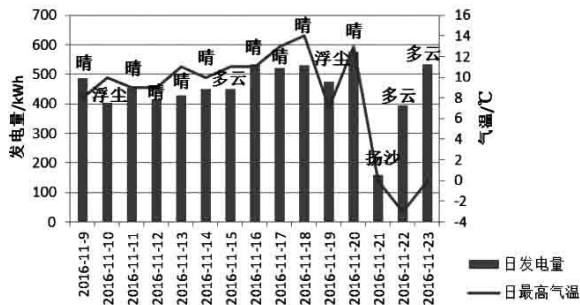


图 6 天气对光伏发电量的影响

可以看出,日最高气温与发电量的变化趋势有一定的正相关性,这是由于空气温度取决于太阳辐射强度,而光伏发电量也是取决于太阳辐射强度。同时,浮尘、多云等状况对光伏发电量的影响也是不容忽视的,尤其是扬沙天气,对光伏发电量的影响非常大。

6 结论

本文借助光伏系统设计软件 PVSYS,研究了

分布式光伏阵列的最佳倾角、阵列间距、阴影遮挡等问题,并对实际发电量与理论发电量进行了对比,得出以下结论:

1)兰州地区并网光伏阵列的最佳倾角以 30°为宜,在获得最大全年发电量的同时,四季发电量也比较均衡。

2)当光伏阵列以最佳倾角布置时,南北向双坡屋面需要考虑适当增大北面坡屋面的光伏阵列间距以避免组件间产生遮挡。

3)对兰州地区, Meeonorm 数据的冬季辐射值显著偏小。因此,在使用 Meeonorm 数据时,需要根据项目地点的具体情况做进一步的修正。

4)日最高气温与发电量的变化趋势有一定的正相关性。此外,扬沙等恶劣天气对光伏发电量的影响非常大。

参考文献:

- [1] 王丽娟,王吉生.不同安装方式太阳能电池板倾斜面上辐射量分析计算[J].太阳能,2010(6):20-21.
- [2] 杨金焕.固定式光伏方阵最佳倾角的分析[J].太阳能学报,1992,13(1):86-92.
- [3] 陈建国.屋顶光伏组件阵列间距计算的深入分析[EB/OL].[2014-10-13].
- [4] 匡蓁,杨昭宇,周永云.关于定向光伏电池阵列布置间距的探讨[J].太阳能学报,2004,25(5):633-636.

(上接第 30 页)

- [2] 唐庆年,莫桂花.高乌甲素的药理作用及临床应用进展[J].山东医药,2007,25(47):116-117.
- [3] 何志超,王冬梅,李国成,等.岩黄连生物碱类成分及其抗氧化活性研究[J].中草药,2014,11(45):1526-1531.
- [4] 任祎,任贵兴,马挺军,等.燕麦生物碱的提取及其抗氧化活性研究[J].农业工程学报,2008,5(24):265-269.
- [5] 肖桂青,田云,卢向阳.荷叶总生物碱清除氧自由基作用的研究[J].化学与生物工程,2011,10(28):35-38.
- [6] 何晋浙,冯婷婷,孙培龙.香菇总生物碱提取工艺优化及其抗氧化研究[J].食品与发酵工业,2014,5(40):229-234.
- [7] 吴青,黄娟,罗兰欣,等.15 种中草药提取物抗氧化活性的研究[J].中国食品学报,2006,1(6):284-289.
- [8] Gao Feng Shi,Xin Ming Lei,Hai Xiao Liu,et al.Electrochemical Characterization of the Free Radical Scavenging of Baicalein[J].J.Analytical Letters,2016,53(6):1841.
- [9] Huang D,Ou B,Prior RL.The chemistry behind antioxidant capacity assays[J].J.Agric,Food Chem,2005,53(6):1841.
- [10] 何建波,徐红梅,朱燕舞,等.电化学方法研究天然抗氧化剂[J].化学与生物工程,2004,5(12):10-12.
- [11] 钟秀倩.氧自由基与疾病[J].韶关学院报,2006,6(27):87-90.
- [12] 陈如进,杨岗,丁寅芳,等.紫外风光光度法测定高乌甲素贴片的含量[J].中草药,1992,4(23):187-188.
- [13] 杨青.黄花菜中黄酮的提取及其对自由基清除作用的研究[D].中南大学,2004.
- [14] Song LX,Pang H.Electrostatic self-assembly for preparation of sulfonated graphene/gold nanoparticle hybrids and their application for hydrogen peroxide sensing.Electrochimica Acta,2012,85(6):28-35.
- [15] 赵静.骆驼蓬总生物碱正交提取工艺与抗自由基活性研究[J].中兽医医药杂志,2014(1):48-52.