

高压脉冲电场法快速提取黄花乌头中关附甲素的工艺研究

白永智, 李昌禹, 赵景辉, 王英平*

中国农业科学院特产研究所, 吉林 吉林 130000

摘要:目的 研究高压脉冲电场法对黄花乌头中关附甲素的最佳提取工艺,为工业化生产提供可靠的实验数据和理论依据。方法 采用正交试验设计优化高压脉冲电场法快速提取方法,HPLC法测定关附甲素的量。结果 提取黄花乌头关附甲素的最佳提取工艺条件为以90%乙醇为提取溶剂,电场强度20 kV/cm,脉冲数为10,料液比1:14,影响因素由大到小依次为电场强度、料液比、脉冲数;此法提取黄花乌头中的关附甲素提取率达到0.391%,浸膏得率为39.92%。结论 本提取工艺可行、经济、省时、回收率高。

关键词: 黄花乌头; 关附甲素; 正交试验; 高压脉冲电场; 浸膏得率

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1267-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.011

Extracting technology of guanfubase A from *Aconitum coreanum* by high-voltage pulsed electric field method

BAI Yong-zhi, LI Chang-yu, ZHAO Jing-hui, WANG Ying-ping

Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 130000, China

Abstract: Objective To optimize the extracting technology for guanfubase A from *Aconitum coreanum* by high-voltage pulsed electric field method and to provide the reliable experimental data and theoretical basis for the industrial production. **Methods** The content of guanfubase A was detected by HPLC in orthogonal test. **Results** The optimal formulation was as follows: high voltage of 20 kV/cm, impulsion frequency of 10, and solid-to-solvent ratio of 1:14, with 90% ethanol as extracting solvent, and the influence factor in size was voltage, impulsion frequency, and solid-to-solvent ratio. The guanfubase A content and extract yield were up to 0.391% and 39.92% in *A. coreanum*, respectively. **Conclusion** The extracting technology is feasible and economic, which has the advantage of time-saving and high recovery rate.

Key words: *Aconitum coreanum* (Lévl.) Raipaics; guanfubase A; orthogonal test; high-voltage pulsed electric field; extract yield

黄花乌头 *Aconitum coreanum* (Lévl.) Raipaics 系毛茛科 (Ranunculaceae) 乌头属 *Aconitum* L. 植物, 称关白附, 白附子^[1], 大多以根、块根入药, 少数以全草入药。现代药理研究表明, 其根在镇痛、抗炎、抗心律不齐和强心作用等方面功能显著, 其内含叔胺类二萜生物碱——关附甲素 (guanfubase A), 具有明显的抗心律失常作用, 而被称为“特异性减慢心率药”, 已开发成我国的原创一类新药, 即盐酸关附甲素注射液^[2-4]。目前, 在实验研究与生产中, 大多用酸水、加热回流、超声、微波等常规提取方法, 不仅费时费力, 而且耗能巨大。高压脉冲电场

辅助提取动植物有效成分是新兴起的一种非热源提取技术^[5], 起初主要用于牛奶灭菌, 原理是高压脉冲电场在瞬间击穿细胞壁和细胞膜, 使其发生不可逆破坏, 从而增大膜透性使其有效成分流出, 进而有助于天然产物的提取。该法由于常温提取、传递均匀、耗能较低、瞬时提取、对环境无污染等特点, 可有效避免天然物质化学结构被破坏, 同时也容易实现工业连续化生产。

近几年, 高压脉冲电场辅助提取植物有效成分已有研究^[6-9], 但尚未见采用此技术提取黄花乌头块根中关附甲素的文献报道。本实验采用高压脉冲电

收稿日期: 2012-11-14

基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目 (201115131); 吉林市科技局项目 (201222306)

作者简介: 白永智 (1985—), 男, 在读硕士, 研究方向为药用植物资源及天然活性组分。Tel: 13944272307 E-mail: byz2075503@163.com

*通信作者 王英平 E-mail: yingpingw@126.com

网络出版时间: 2013-03-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130328.2015.018.html>

场辅助提取黄花乌头块根中的有效成分关附甲素,以关附甲素提取率和浸膏得率为指标,采用正交试验法^[10]优化高压脉冲电场提取工艺,为黄花乌头中关附甲素的提取和开发提供实验基础。

1 仪器与材料

R-201 旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司); LDT-100/4-25.2 型中药高压电场发生器(长春华迪生物科技开发有限公司); AL204 型电子分析天平(美国梅特勒公司); 101-3C 型烘箱(上海实验仪器厂); 美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪。

黄花乌头块根于 2011 年 9 月采集于吉林省吉林市左家镇,经中国农业科学院特产研究所孔祥义副研究员鉴定为 *Aconitum coreanum* (Lévl.) Raipaics 的根,自然晾干,粉碎备用。

盐酸关附甲素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100665-200901),乙腈、甲醇为色谱纯,乙醇、甲酸均为国产分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 关附甲素的测定

2.1.1 色谱条件 美国 Agilent 公司 TC C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.2% 甲酸水溶液, B 为 0.2% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱: 0~5 min, 10% B; 5~10 min, 10%~16% B; 10~15 min, 16% B; 15~16 min, 16%~10% B; 16~21 min, 10% B; 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取盐酸关附甲素对照品适量,精密称定,加 95% 乙醇制成 0.5 mg/mL 溶液,再将其稀释为 0.05 mg/mL 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取黄花乌头块根干样约

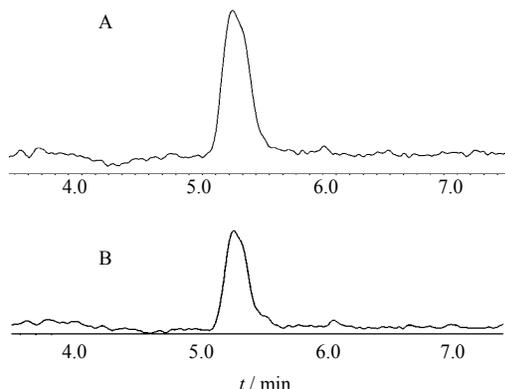


图 1 关附甲素对照品 (A) 和供试品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of guanfubase A reference substance (A) and sample (B)

50.0 g, 粉碎并过 80 目筛,加入 500 mL 95% 乙醇浸湿混匀并隔夜,然后泵入高压脉冲电场提取器(电场强度 15 kV/cm, 脉冲数 10)进行提取,滤液减压浓缩并定容至 100 mL,精确量取 2 mL 转移至 10 mL 容量瓶中,用 95% 乙醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取 0.05 mg/mL 盐酸关附甲素对照品溶液 2、4、8、16、20、30 μL 注入液相色谱仪,按照“2.1.1”项色谱条件测定。以进样量为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=15.97X-1.7241$, $r=0.9924$,结果表明盐酸关附甲素在 0.10~1.50 μg 呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 0.05 mg/mL 盐酸关附甲素对照品溶液 5 μL,在“2.1.1”项色谱条件下重复进样 6 次,测定盐酸关附甲素峰面积,结果其峰面积的 RSD 为 0.13%。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 5 μL,测定盐酸关附甲素峰面积,结果其峰面积的 RSD 为 0.29%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液 5 份,在“2.1.1”项色谱条件下测定,结果样品中盐酸关附甲素质量分数的 RSD 为 1.49%。

2.1.8 加样回收率试验 取黄花乌头 25.0 g,精密称定,加入 0.05 mg/mL 盐酸关附甲素对照品溶液适量,按“2.1.3”项方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定盐酸关附甲素的峰面积,计算其回收率,结果平均回收率为 100.86%,RSD 为 0.92%。

2.1.9 样品测定 取黄花乌头块根 5 份,每份约 50.0 g,精密称定,按“2.1.3”方法制备供试品溶液,然后各取 5 μL,按“2.1.1”项色谱条件检测关附甲素的峰面积,并用外标法计算其质量分数分别为 0.386%、0.393%、0.381%、0.376%、0.370%。

2.2 溶剂浓度选择及样品处理

本实验选择 8 种溶液为提取溶剂,分别为水及 40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 乙醇。提取参数为电场强度 15 kV/cm, 脉冲数 8, 料液比 1:10。取黄花乌头块根干样,粉碎并过 80 目筛,分别称取 100 g,加入上述不同提取溶液浸湿混匀并隔夜,然后通过高压脉冲电场提取器进行提取,滤液减压浓缩并定容至 100 mL,精确量取 2 mL 用于检测关附甲素的量,其他浓缩后烘干,计算浸膏得率及关附甲素提取率。结果见表 1。结果显示提取溶

表1 乙醇体积分数对提取效果的影响

乙醇 / %	浸膏 / g	浸膏得率 / %	关附甲素提取率 / %
0	43.05	43.93	0.054
40	61.25	62.50	0.045
50	67.87	69.25	0.231
60	44.35	45.25	0.242
70	52.68	53.75	0.239
80	49.25	50.25	0.317
90	39.69	40.50	0.432
95	40.06	40.88	0.406

液为90%乙醇时，关附甲素提取率最高，所以选取90%乙醇为最佳提取溶剂。

浸膏得率 = (提取液浓缩后烘干的质量 / 黄花乌头块根质量) × 100/98

提取率 = 提取液中关附甲素的质量 / 黄花乌头块根质量

2.3 提取工艺优化

2.3.1 正交试验 在预试验基础上，以影响黄花乌

头提取的主要因素电场强度(A)、脉冲数(B)及料液比(C)为考察对象，选用L₉(3⁴)正交表优化提取条件，以黄花乌头块根浸膏得率和关附甲素提取率为考察指标，采用综合评分法评价。

综合评分 = 浸膏得率 × 0.1 + 关附甲素提取率 × 0.9

取样品9份，每份100g，按正交表L₉(3⁴)所列试验因素及水平进行试验，计算各提取液浸膏得率及关附甲素提取率，进行综合评分，并以综合评分为考察指标进行方差分析。试验设计与结果见表2，方差分析见表3。

由直观分析可知，影响黄花乌头块根提取的主次因素依次为A>C>B，即电场强度>料液比>脉冲数；由方差分析可知，因素A、C具有极显著性差异(P<0.01)，因素B具有显著性差异(P<0.05)，故选定最佳工艺条件组合为A₃B₂C₃。综合“2.2”中选取出的最佳提取溶剂可知，黄花乌头块根提取最佳工艺条件为以90%乙醇为提取溶剂，电场强度20kV/cm，脉冲数为10，料液比1:14。

表2 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A / (kV·cm ⁻¹)	B	C	D (误差)	浸膏得率 / %	关附甲素提取率 / %	综合评分
1	10 (1)	8 (1)	1 : 10 (1)	(1)	32.50	0.348	29.60
2	10 (1)	10 (2)	1 : 12 (2)	(2)	35.55	0.293	32.29
3	10 (1)	12 (3)	1 : 14 (3)	(3)	36.75	0.285	33.36
4	15 (2)	8 (1)	1 : 12 (2)	(3)	33.60	0.305	30.54
5	15 (2)	10 (2)	1 : 14 (3)	(1)	37.23	0.292	33.80
6	15 (2)	12 (3)	1 : 10 (1)	(2)	32.50	0.302	29.55
7	20 (3)	8 (1)	1 : 14 (3)	(2)	39.53	0.390	35.97
8	20 (3)	10 (2)	1 : 10 (1)	(3)	37.25	0.300	33.83
9	20 (3)	12 (3)	1 : 12 (2)	(1)	38.45	0.394	35.00
K ₁	95.25	96.11	92.98	98.40			
K ₂	93.89	99.92	97.83	97.81			
K ₃	104.80	97.91	103.13	97.73			
R	10.91	3.81	10.15	0.67			

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	离偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	23.564	2	264.764	P<0.01
B	2.422	2	27.213	P<0.05
C	17.182	2	193.056	P<0.01
D (误差)	0.089	2		

F_{0.05}(2, 2)=19.0 F_{0.01}(2, 2)=99.0

2.3.2 验证试验 取3份样品各100g，按“2.3.1”项中最佳工艺条件进行试验，计算浸膏得率及关附甲素提取率。重复验证试验，得黄花乌头块根浸膏得率为39.32%，RSD为1.17% (n=3)，关附甲素提取率为0.391%，RSD为0.68% (n=3)。结果表明该工艺稳定可行。

2.4 与常规提取方法比较

2.4.1 渗漉法 称取黄花乌头块根干样100g，粉碎

并过 80 目筛,以 90%乙醇为渗漉溶剂(用量为药材干质量的 12 倍),以 2.0 mL/min 的体积流量渗漉 24 h,收集渗漉液,其他操作按“2.2”项方法,重复测定 3 次,计算浸膏得率及关附甲素提取率,结果见表 4。

2.4.2 乙醇加热回流法 称取黄花乌头块根干样 100 g,粉碎并过 80 目筛,置于圆底烧瓶中,以 90%乙醇为溶剂,加热回流提取 3 次,溶剂用量分别为 1 000、800、800 mL,提取时间分别为 2.0、1.5、1.5 h。合并 3 次滤液,其他操作按“2.2”项方法,重复测定 3 次,计算浸膏得率及关附甲素提取率,结果见表 4。

2.4.3 超声法 称取黄花乌头块根干样 100 g,粉碎并过 80 目筛,置于圆底烧瓶中,以 90%乙醇为提取溶剂,置于超声波发生器中,超声功率为 100 W,溶剂用量为 800 mL,提取时间为 40 min。收集滤液,其他操作按“2.2”项方法,重复测定 3 次,计算浸膏得率及关附甲素提取率,结果见表 4。

2.4.4 几种方法结果比较 渗漉法、乙醇加热回流法和超声法提取时间均较长,特别是乙醇加热回流法提取温度较高,导致关附甲素结构破坏,使得关附甲素提取率较低;而高压脉冲电场法提取时间短,无需加热高温,关附甲素提取率最高,浸膏得率也较高,结果见表 4。

表 4 不同提取方法比较

Table 4 Extraction efficacies by different methods

提取方法	时 间	提取温度	浸膏得率 / %	关附甲素提取率 / %
渗漉法	24 h	常温	27.00	0.256
乙醇加热回流法	4 h	90 °C	42.13	0.093
超声法	40 min	常温	40.50	0.343
高压脉冲电场法	30~60 s	常温	39.32	0.391

3 讨论

本实验以黄花乌头块根浸膏得率和关附甲素提取率为考察指标,采用加权评分法进行综合评分,并通过正交试验进行极差和方差分析,得出了黄花乌头块根关附甲素的最佳提取工艺条件,并得到了验证。

同时,考察了不同提取方法对浸膏得率和目标产物含量的影响,结果表明,乙醇加热回流法浸膏得率最大,但是关附甲素提取率最低,可见在提取过程中,温度过高会导致目标物质结构遭到破坏,所以实验过程应尽量在常温下进行。而高压脉冲法提取关附甲素提取效率最高,浸膏得率也较高,并且提取时间短,无需高温,可以避免活性成分结构被破坏,有较好的应用前景。因此,该提取方法是一种较为理想的提取方法,可适用于黄花乌头浸膏及关附甲素工业化生产。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (27 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 后德辉, 邬利娅, 徐为人, 等. 关附庚素与关附甲素及壬素抗心律失常的比较 [J]. 中国药科大学学报, 1987,

18(4): 268-272.

- [3] 张陆勇, 季惠芳, 王秋娟, 等. 关附甲素对心肌细胞电生理特性的影响 [J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(6): 354-358.
- [4] 周立红, 王乃利, 姚新生, 等. 中药关白附抗血小板聚集活性成分的研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(4): 280-285.
- [5] 曾新安, 陈 勇. 脉冲电场非热灭菌技术 (第一版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.
- [6] 赵景辉, 王再幸, 赵伟刚, 等. 高压脉冲电场法快速提取北五味子中五味子醇甲的工艺研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 755-757.
- [7] 赵景辉, 王再幸, 王英平, 等. 葛根提取物的快速提取工艺研究 [J]. 中国林副特产, 2010, 10(5): 11-13.
- [8] 吴小辉, 龚雪梅, 贺苏岚, 等. 高压脉冲电场在食品加工及天然产物提取中的研究现状和前景展望 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(24): 24-26.
- [9] 孙建华, 韦泽沼, 刘 斌, 等. 响应面法优化高压脉冲电场提取匙羹藤总皂苷 [J]. 广西大学学报: 自然科学版, 2011, 36(3): 363-368.
- [10] 程江雪, 王 荣, 王晓娟, 等. 正交试验设计优选九节龙皂苷 I 聚乳酸微球的制备工艺 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1923-1927.