

乙醇-硫酸铵双水相提取马齿苋总黄酮工艺研究

郝红英,牛美兰,王 研,樊亚蕾,孙莉红 (黄河科技学院医学院,河南郑州 450063)

摘要 [目的]优化乙醇-硫酸铵双水相提取马齿苋总黄酮工艺。[方法]采用乙醇-硫酸铵双水相体系提取马齿苋中主要成分黄酮,以总黄酮得率为指标,采用单因素和正交试验,考察提取溶剂浓度、料液比、提取时间、提取温度对总黄酮提取工艺的影响,确定乙醇-硫酸铵双水相体系提取马齿苋总黄酮的工艺。[结果]试验最佳提取条件为脱脂马齿苋粉末 2.0 g,乙醇用量 27.50% (W)、硫酸铵 16.00% (W)、料液比 1:20、温度 60 ℃、时间 40 min,在此条件下,马齿苋总黄酮提取率为 7.23%。[结论]乙醇-硫酸铵双水相提取法提取效率高、操作简便,提取剂价格便宜,是一种很有发展前途的提取方法。

关键词 乙醇-硫酸铵双水相;马齿苋;总黄酮;提取工艺;正交设计

中图分类号 S567.21*9;R284.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)11-145-03

Extraction of Total Flavonoids from Purslane Using Ethanol-Ammonium Sulfate Aqueous Two Phase System
HAO Hong-ying, NIU Mei-lan, WANG Yan et al (Medical School, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou, Henan 450063)
Abstract [Objective] The aim was to optimize the extraction technology of total flavonoids from purslane using ethanol / ammonium sulfate aqueous two phase system. [Method] The flavonoids from purslane was extracted by using ethanol / ammonium sulfate aqueous two phase system. With total flavonoids yield as indicator, adopting single factor and orthogonal test, effects of solvent concentration, solid-liquid ratio, time, temperature on extraction process were investigated. [Result] The optimal extraction conditions were: 2.0 g non-fat purslane powder, ethanol 27.50% (W), ammonium sulfate 16.00% (W), solid-liquid ratio 1:20, temperature 60 ℃, and time was 40 min. Under the above conditions, the extraction rate of total flavonoids was 7.23%. [Conclusion] The extraction efficiency of ethanol-ammonium sulfate aqueous two phase system is high, the operation is simple, and the extracting solvent is cheap, so it is a promising extraction method.
Key words Ethanol-ammonium aqueous two phase system; Purslane; Total flavonoids; Extraction technology; Orthogonal design

马齿苋又名马齿草、长寿菜、五行草等,为马齿苋科一年生肉质草本植物^[1],具有清热解毒、散血消肿、抗菌的功效,主治肠炎、菌痢、痈肿、恶疮、丹毒、蛇虫咬伤、痔疮肿毒、湿疹、急性和亚急性皮炎等多种疾病^[2]。马齿苋中的主要成分为黄酮类物质,其具有抗氧化、降糖、抗病毒、抗菌、消炎、抗溃疡的药理作用^[3-4]。马齿苋黄酮的提取工艺包括有机溶剂提取法^[5]、超声波法^[6]、微波法^[7]、酶解法^[8]、树脂法^[9]等。近几年,双水相萃取技术因设备投资少、操作简单,被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域,且双水相萃取体系具有价廉、低毒、较易挥发等特点^[10]。笔者采用乙醇-硫酸铵双水相体系提取马齿苋中主要成分黄酮,以总黄酮得率为指标,采用单因素和正交试验,考察提取溶剂浓度、料液比、提取时间、提取温度对总黄酮提取工艺的影响,确定乙醇-硫酸铵双水相体系提取马齿苋总黄酮的工艺,为马齿苋的合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 芦丁标准样品(中国药品生物制品检定所,生化试剂),其他试剂均为分析纯。马齿苋(药店所受中草药)。电热恒温水箱(北京市永光明医疗仪器厂),SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司),7230G 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制。马齿苋中黄酮类化合物含量的测

定参照文献[11-12]的方法,以芦丁为标样测定马齿苋黄酮类化合物的含量,所得标准曲线回归方程为 $Y=0.0938X+0.0001$ ($R^2=0.9998$),式中, Y 为芦丁质量浓度(g/mL); X 为吸光度。

1.2.2 马齿苋总黄酮的提取。称取马齿苋干细粉(过 60 目筛)于索氏提取器中,经石油醚脱脂,并除去部分色素。称取处理样品 2.0 g 于 250 mL 碘量瓶中,按一定的料液比加入乙醇-硫酸铵双水相溶液,置于恒温水箱,提取一段时间后,过滤,静置分层,将滤液用分液漏斗将两相分开,将醇相提取液高速离心 25 min,即得马齿苋黄酮类化合物提取液,后经微孔滤膜过滤,精密称取一定量用甲醇定容至 250 mL,以供分析测试用。

1.2.3 马齿苋总黄酮的测定。取 2.5 mL 样品溶液至 25 mL 容量瓶中,加 5% (W) 的 NaNO_2 1 mL,摇匀,放置 5 min 后加入 10% (W) 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 1 mL,5 min 后再加入 4% (W) 的 NaOH 10 mL,摇匀,用蒸馏水稀释至刻度,10 min 后于 7230G 型分光光度计上在 510 nm 处测定吸光度 A ,根据芦丁标准曲线回归方程,得到提取液浓度,总黄酮提取率按照公式 $Et = (C \times V \times D) / W \times 100\%$ 计算,式中, Et 为提取率, C 为测得的提取液浓度, V 为提取液体积, D 为稀释倍数, W 为原料的质量。

1.2.4 单因素试验。

1.2.4.1 乙醇浓度对马齿苋总黄酮提取率的影响。水浴温度为 40 ℃,固定硫酸铵用量 6.4 g[16.00% (W)]、料液比 1:20[m(马齿苋):m(双水相溶剂)],提取时间 30 min 的条件下,称取处理样品 2.0 g,选择不同浓度乙醇[25.00%、27.50%、30.00%、32.50%、35.00% (W)],分别考察其对马齿苋总黄酮提取率的影响。

基金项目 郑州市科技局科研项目(20140787);黄河科技学院大学生实践创新项目(2015XSCXCXY008)。
作者简介 郝红英(1979-),女,河南商丘人,副教授,硕士,从事制药工程与天然产物提取研究。
收稿日期 2016-03-15

1.2.4.2 料液比对马齿苋总黄酮提取率的影响。水浴温度为 40 ℃,在恒定的乙醇浓度 32.50%、硫酸铵用量 16.00%、提取时间 30 min 的条件下,称取处理样品 2.0 g,选择不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30),分别考察其对马齿苋总黄酮提取率的影响。

1.2.4.3 提取温度对马齿苋总黄酮提取率的影响。在恒定的乙醇浓度 32.50%、硫酸铵用量 16.00%、料液比 1:25、提取时间 30 min 的条件下,称取处理样品 2.0 g,选择不同超声波处理温度(30、40、50、60、70 ℃),分别考察其对马齿苋总黄酮提取率的影响。

1.2.4.4 提取时间对马齿苋总黄酮提取率的影响。水浴温度为 40 ℃,在恒定的乙醇浓度 32.50% (W)、硫酸铵用量 16.00% (W)、料液比 1:25 的条件下,称取处理样品 2.0 g,选择不同提取时间(20、30、40、50、60 min),分别考察其对马齿苋总黄酮提取率的影响。

1.2.5 正交试验。称取处理样品 2.0 g,以乙醇质量浓度、提取温度、料液比、提取时间为考察因素设计 $L_9(3^4)$ 正交表,并按照此正交表安排试验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对马齿苋总黄酮提取率的影响。由图 1 可知,在硫酸铵用量一定的情况下,随着乙醇用量的增加,总黄酮提取率逐渐增加,当无水乙醇的用量为 32.50% 时达最大;此后,随着无水乙醇用量的增加,总黄酮提取率显著下降。其主要原因可能是:乙醇浓度过低不利于黄酮的浸出,随着乙醇浓度的增加,双水相体系的分相能力增加,乙醇在上层的体积也逐渐增加,总黄酮的溶解度增加,一些脂溶性有机物的溶出量也会增加,抑制了总黄酮的浸出,综合考虑这些因素,确定最佳的无水乙醇含量为 32.50%。

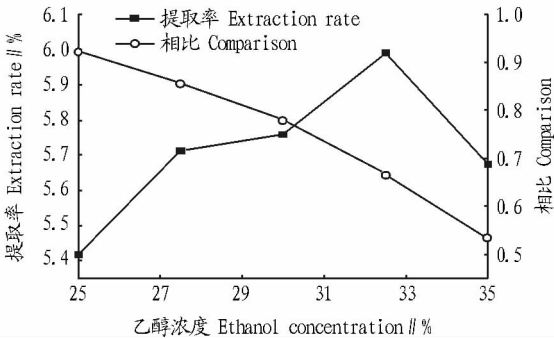


图 1 乙醇浓度对马齿苋总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol concentration on extraction rate of total flavonoids from purslane

2.1.2 料液比对马齿苋总黄酮提取率的影响。由图 2 可知,在硫酸铵和无水乙醇用量比例一定的情况下,随着料液比的增加,总黄酮的提取率逐渐增加,当料液比为 1:25 时达最大;此后,随着料液比的增加,总黄酮提取率开始降低。原因可能是:料液比较小时,溶剂渗透并扩散到细胞内的速度以及黄酮化合物向溶剂中扩散的速度小,如果料液比较大时,虽然有利于溶剂进入细胞内破坏疏水键,利于黄酮化合

物向溶剂中扩散,但会耗费大量的溶剂和硫酸铵,综合考虑,料液比选 1:25 较好。

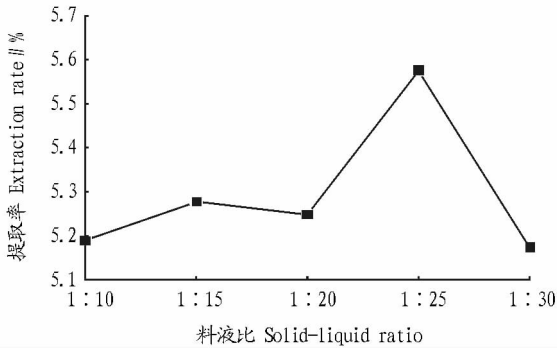


图 2 料液比对马齿苋总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effects of solid-liquid ratio on extraction rate of total flavonoids from purslane

2.1.3 提取温度对马齿苋总黄酮提取率的影响。从图 3 可看出,当提取温度为 40 ℃ 时,马齿苋中总黄酮提取率达最大;此后,温度继续升高,马齿苋中总黄酮提取率开始下降。其主要原因是:虽然温度增加能使分子运动加快,能增加黄酮类化合物的浸出,但也增加了乙醇的挥发,导致总黄酮提取率下降。另外温度过高时,一定量的总黄酮可能会被氧化破坏。综合考虑这些因素,选取最佳提取温度为 40 ℃。

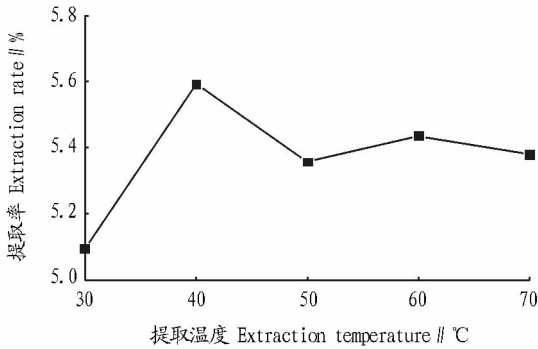


图 3 提取温度对马齿苋总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of temperature on extraction rate of total flavonoids from purslane

2.1.4 提取时间对马齿苋总黄酮提取率的影响。由图 4 可见,马齿苋中总黄酮提取率在 20~50 min 时随着提取时间的延长而升高,在 50 min 时达最大,继续延长提取时间总黄酮提取率反而下降。原因可能是:在提取初期,马齿苋中的总黄酮不断浸出,随着提取时间的延长,总黄酮的浸出率逐渐达到最大。如果继续延长,乙醇挥发量增加,会引起总黄酮提取率降低。考虑到提取率以及节约能耗等方面的因素,选取最佳提取时间为 50 min。

2.2 正交试验 在单因素考察的基础上,为了得到更好的条件,采用 $L_9(3^4)$ 正交表来安排正交试验。由表 1 可知,各因素对马齿苋总黄酮提取率影响由大到小依次为提取温度、料液比、乙醇含量、提取时间,其中提取温度对马齿苋中总黄酮提取率的影响最大。由分析结果初步认为,乙醇-硫酸铵双水相体系提取马齿苋总黄酮的最佳条件为:在马齿苋为

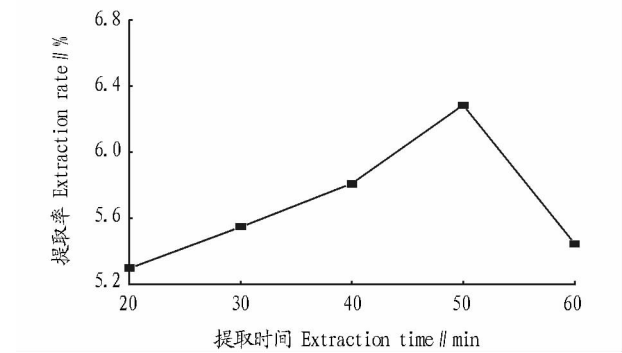


图4 提取时间对马齿苋总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of time on extraction rate of total flavonoids from purslane

2.0 g 的情况下,硫酸铵为 16.00%,无水乙醇用量 27.50%、料液比 1:20、温度 60 ℃、时间 40 min。

表1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and result of orthogonal test

试验号 Test No.	乙醇含量 Ethanol content // %	料液比 Solid-liquid ratio	提取温度 Temperaure ℃	提取时间 Time min	提取率 Extraction rate // %
1	27.50(1)	1:15(1)	40(1)	30(1)	6.62
2	27.50(1)	1:20(2)	50(2)	40(2)	7.03
3	27.50(1)	1:25(3)	60(3)	50(3)	6.78
4	30.00(2)	1:15(1)	50(2)	50(3)	6.50
5	30.00(2)	1:20(2)	60(3)	30(1)	7.10
6	30.00(2)	1:25(3)	40(1)	40(2)	6.47
7	32.50(3)	1:15(1)	60(3)	40(2)	6.89
8	32.50(3)	1:20(2)	40(1)	50(3)	6.44
9	32.50(3)	1:25(3)	50(2)	30(1)	6.23
k ₁	6.810	6.670	6.510	6.650	
k ₂	6.690	6.857	6.587	6.797	
k ₃	6.520	6.493	6.923	6.573	
R	0.290	0.364	0.413	0.224	

2.3 平行试验 为进一步验证正交试验结果的可考性和重

(上接第 100 页)

学求解,得到椰子油的活化能为 60.50 kJ/mol,与常用食用油脂菜子油、花生油和豆油相比,具有较好的氧化稳定性。该研究可为椰子油的加工和储藏提供理论依据。

参考文献

[1] 王兴国,金青哲. 油脂化学[M]. 北京:科学出版社,2012.

[2] 夏秋瑜,赵松林,李从发,等. 中碳链脂肪酸甘油三酯的研究进展[J]. 食品研究与开发,2007,28(7):150-153.

[3] MONICA L A,HAROLDO S F,ALDENIR F,et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity[J]. Lipids,2009,44(7):593-601.

[4] 陈华,李秋菊,赵松林,等. 椰子油:21 世纪的营养保健品[C]//2004 中国热带作物学会年会会议论文集. 海口:中国热带作物学会,2004.

[5] 金霞,余纲哲. 食用油脂与人体健康[J]. 生物学通报,2000,35(2):35-37.

[6] CARRASCO F,PAGES P. Thermogravimetric analysis of polystyrene:Influence of sample weight and heating rate on thermal and kinetic parameters[J]. J Appl Polym Sci,1996,61(1):187-197.

[7] KISSINGER H E. Reaction kinetics in differential thermal analysis[J]. Analytical chemistry,1957,29(11):1702-1706.

[8] ABATE L,CALANNA S,POLICINO A,et al. Thermal stability of a novel

现性,按照所得最佳条件做了 3 次平行试验。结果表明,使用该方法优化出了乙醇-硫酸铵双水相提取马齿苋总黄酮最佳工艺条件,在该条件下提取率为 7.23%,不但提取率高,且试验的重现性好。

3 讨论

(1)乙醇-硫酸铵双水相提取法是一种新型的液-液萃取技术,反应条件温和,萃取时间短,提取效率高,操作简便,乙醇、硫酸铵价格便宜,几乎不存在有机残留问题,是一种很有发展前途的提取方法。

(2)通过单因素试验、正交试验法,优选出马齿苋总黄酮的双水相最佳提取工艺:脱脂马齿苋粉末 2.0 g,无水乙醇含量 27.50%、硫酸铵 16.00%、料液比 1:20、温度 60 ℃、时间 40 min,在此条件下,马齿苋总黄酮提取率为 7.23%。

参考文献

[1] 郑智音,贾晓斌,舒雯,等. 鲜马齿苋多糖、生物碱和多酚类组分的制备及其降血糖活性研究[J]. 中草药,2014,45(18):2673-2677.

[2] 洪海. 马齿苋药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中外健康文摘,2010,7(27):104-105.

[3] 章爱华,邓斌,蒋刚彪,等. 马齿苋黄酮提取液抗氧化活性的初步研究[J]. 食品科技,2008,33(8):140-143.

[4] 张华芳. 羊栖菜提取物的降血糖作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):3-4.

[5] 章爱华,邓斌,陈小原. 马齿苋中黄酮类化合物的提取工艺研究[J]. 农产品加工·学刊,2008(5):18-19.

[6] 张特立,于春月. 马齿苋中总黄酮的提取工艺研究[J]. 黑龙江医药科学,2013,36(4):37-38.

[7] 章爱华,邓斌,陈小原,等. 马齿苋黄酮类化合物的微波提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(7):1-4.

[8] 翟硕莉,付艳梅. 马齿苋黄酮提取方法研究进展[J]. 衡水学院学报,2012,14(4):39-41.

[9] 周毅,曾少娴,王成蹊,等. 大孔吸附树脂分离纯化马齿苋总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):755-757.

[10] 汪建红,廖立敏,王碧. 乙醇-硫酸铵双水相体系提取柠檬渣中总黄酮研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2013,41(1):78-81.

[11] 王仲英,李香兰. 马齿苋中黄酮类化合物含量的测定[J]. 太原理工大学学报,2004,35(1):95-96.

[12] 赵晨晨,承伟,王立冬. 微波辅助提取络石藤总黄酮的工艺研究[J]. 中草药,2012,43(4):718-720.

poly(ether ether Ketone Ketone)[J]. Polymer engineering and science, 1996,36(13):1782-1788.

[9] COATS A W,REDFEM J P. Kinetics parameters from thermogravimetric data[J]. Nature,1964,201:68-69.

[10] 胡荣祖,高胜利,赵凤起,等. 热分析动力学[M]. 北京:科学出版社,2008.

[11] 顾敏芬,王盼,金宜英. 热重分析法在油脂氧化稳定性研究中的应用[J]. 中国油脂,2012,37(9):85-87.

[12] 张巧智,李杨,齐宝坤,等. 基于热重法的植物油氧化动力学研究[J]. 食品工业科技,2016,37(2):103-107.

[13] SANTOS J C O,SANTOS I M G,SOUZA A G,et al. Thermal stability and kinetic study on thermal decomposition of commercial edible oils by thermogravimetry[J]. Journal of food science,2002,67(4):1393-1398.

[14] SANTOS J C O,SANTOS I M G,CONCEIÇÃO M M,et al. Thermoanalytical,kinetic and rheological parameters of commercial edible vegetable oils[J]. Journal of thermal analysis and calorimetry,2004,75(2):419-428.

[15] DWECK J,SAMPAIO C M S. Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous tg/dta[J]. Journal of thermal analysis and calorimetry,2004,75(2):385-391.

[16] 王新红. 植物油脂的热分析及动力学研究[J]. 食品工业科技,2010,31(3):151-154.