

文章编号: 1674-7054(2016)02-0270-04

双水相体系萃取油楠种子总皂苷的研究

梁振益, 嵇莎莎, 陈祎平, 林昭华, 刘平怀

(海南大学 材料与化工学院/热带岛屿资源先进材料教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 利用双水相萃取技术提取分离油楠种子中的总皂苷, 以乙醇/硫酸铵为双水相萃取体系, 研究乙醇质量分数、硫酸铵质量分数、pH 值、温度等因素对萃取效果的影响。结果表明: 在乙醇质量分数为 30%, 硫酸铵质量分数为 20%, pH 6.0, 温度为 30 °C 的萃取条件下, 油楠总皂苷在两相的分配系数为 12.60, 回收率为 94.8%。该方法可用于油楠种子中总皂苷的提取分离。

关键词: 油楠种子; 总皂苷; 双水相萃取; 双水相体系

中图分类号: R 93

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.022

油楠(*Sindora glabra* Merr. ex de Wit) 系常绿阔叶乔木, 隶属于苏木科(Caesalpiniaceae) 油楠属(*Sindora*), 主要分布于东南亚的越南、泰国、马来西亚、菲律宾等国和我国的海南岛^[1]。油楠是热带森林珍稀树种, 为国家 2 类保护野生植物, 不仅其木材和种子珍贵(种子也可治皮肤病等), 而且体内含有可直接点燃的油脂, 可作为柴油的代用品^[2-3]。然而, 目前对于油楠的化学研究主要限于树脂油^[4-6]。双水相萃取技术(aqueous two-phase extraction, ATPS) 是指亲水性聚合物水溶液在一定条件下可以形成双水相, 利用被分离物在两相中分配的不同而分离的技术^[7]。双水相萃取技术以其萃取条件温和、分相快速、处理容量大、回收率高、能耗低、萃取原理简便、设备投资费用少、操作简单, 且不存在有机溶剂残留问题等优点, 在天然药物活性成分的规模化生产方面具有很大的潜力。国内外有将双水相体系用于天然活性成分提取分离的研究^[8-9], 但利用其从油楠种子中萃取总皂苷的研究未见报道。皂苷具有抗肿瘤、抗炎、抑菌、调节免疫、心血管保护等多种生物活性^[10]。本研究采用乙醇/硫酸铵双水相体系萃取分离油楠种子中的总皂苷, 探讨了乙醇质量分数、硫酸铵质量分数、pH 以及温度对总皂苷在该体系的分配系数 K 和回收率 Y 的影响, 旨在为油楠资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂 油楠种子采自海南岛中部山区, 并经海南省林业科学研究所李大周高级工程师鉴定, 样品存放于海南大学材料与化工学院。人参皂苷 Re 标准品购自中国药品生物制品检定所; 硫酸铵和香草醛等试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器 R 系列旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); KQ218 超声波清洗仪(昆山市超声波仪器有限公司); DZF 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司); FLBP-250 型万能高速粉碎机(上海菲力博食品机械有限公司); UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); UP200S 超声波处理机(德国 Hielsher 公司)。

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 海南省高等学校科研基金项目(Hjkj2013-04); 海南省中西部高校提升综合实力项目(201328)

作者简介: 梁振益(1969-), 男, 高级工程师。研究方向: 天然产物化学与分析。E-mail: liangzhenyi@163.com

通信作者: 陈祎平(1958-), 男, 教授。研究方向: 天然产物化学与应用。E-mail: chen-yiping@tom.com

1.3 油楠种子浓缩液制备 精密称取粉碎的油楠种子 50.0 g, 加入体积分数为 73% 的乙醇溶液加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 真空抽滤, 滤渣用少量热水洗涤, 合并滤液后进行减压蒸馏, 将残渣用水定容至 200.0 mL, 冷却低温保存备用。

1.4 双水相萃取过程

(1) 将乙醇和硫酸铵配成一定浓度的成相物质溶液;

(2) 在 30 ℃ 下, 取油楠种子浓缩液 1.0 mL 置于 100 mL 的烧杯中, 加入一定体积的成相物质浓溶液, 用磁力搅拌器振荡摇匀, 静置 10 min, 使其分相;

(3) 分别读取上下相体积, 并取样分析上下相中油楠总皂苷的含量。根据与标准样品吸光度值的对照计算上下相中油楠种子总皂苷的浓度。皂甙的回收率(Y) 按照下式子计算:

$$Y = RK / (1 + RK) \times 100\%,$$

式中: R 为相比, $R = V_{\text{上}}/V_{\text{下}}$; K 为分配系数, $K = \rho_{\text{上}}/\rho_{\text{下}}$; $V_{\text{上}}, V_{\text{下}}$ —上、下相的体积(mL); $\rho_{\text{上}}, \rho_{\text{下}}$ —上、下相油楠种子总皂甙的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.5 总皂苷的分析方法^[1] 采用高氯酸比色法测定油楠种子中总皂苷的含量。

1.5.1 标准曲线绘制 精密称取人参皂苷对照品 9.3 mg, 置于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得质量浓度为 $1.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密吸取人参皂苷对照品储备液 20, 50, 100, 150, 200 μL , 分别置于具塞试管中, 于水浴中挥尽溶剂, 冷却, 加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 盖塞, 于 60 ℃ 水浴上加热反应 10 min, 立即冷却, 加冰乙酸 5.0 mL, 摇匀, 以试剂为空白对照, 在 $(550 \pm 1) \text{ nm}$ 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线, 求线性回归方程, 结果表明, 在 $37 \sim 370 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

1.5.2 样品含量测定 吸取样品溶液, 挥干溶剂, 按照“标准曲线绘制”项操作, 测定吸光度, 计算含量。

1.6 萃取条件的选择 对影响油楠种子总皂苷回收率的因素: 乙醇质量分数、硫酸铵质量分数、pH 和温度进行了考察研究, 确定萃取条件。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵质量分数对油楠种子总皂苷萃取分配的影响 硫酸铵质量分数的变化会改变体系的成相行为, 进而影响总皂苷在两相中的分配。乙醇质量分数为 30% 时分配系数 K 和回收率 Y 随硫酸铵质量分数的变化关系如图 1 所示。

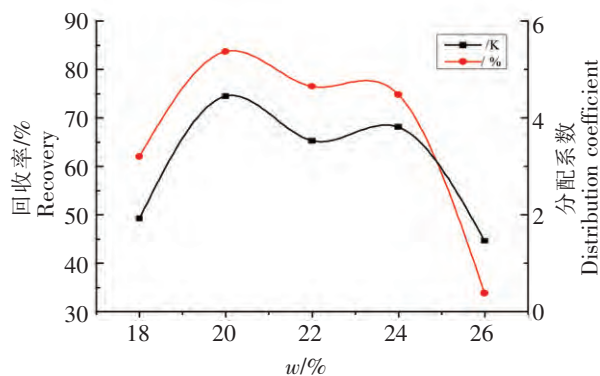


图 1 回收率、分配系数与硫酸铵质量的关系
Fig.1 The relation between the recovery rate and distribution coefficient and the mass fraction of ammonium sulfate

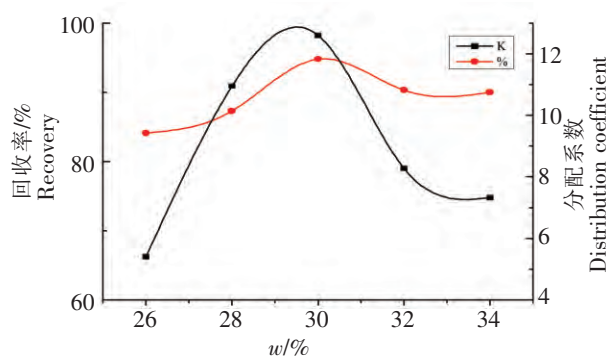


图 2 回收率、分配系数与乙醇质量的关系
Fig.2 The relation between the recovery rate and distribution coefficient and the mass fraction of ethanol

从图 1 可知, 对于同一初始质量分数的乙醇, 分配系数 K 和回收率 Y 均随着硫酸铵质量分数的增加而先增大后减小, 并且分配系数 K 可达 4.45, 回收率 Y 可达 83.7%。这是因为乙醇的初始质量分数相同

时,硫酸铵的质量分数增大,分相能力也增大,上相中乙醇的质量分数也随之增加,而总皂苷在乙醇中的溶解度比在水中的大,故分配系数 K 和回收率 Y 增大。随着硫酸铵质量分数的进一步增大,系统的浓度变大,分子间相应碰撞增加,分相困难,分相时间延长。因此硫酸铵质量分数增大时,溶液中分子间的作用力增大,使皂苷分子不易进入上相。故确定最佳的硫酸铵质量分数为 20%。

2.2 乙醇质量分数对油桶中皂苷萃取分配的影响 乙醇质量分数的变化会改变体系的成相行为,进而影响总皂苷在两相中的分配。硫酸铵质量分数为 20% 时分配系数 K 和回收率 Y 随乙醇质量分数的变化关系如图 2 所示。从图 2 可知,对于同一初始质量分数的硫酸铵,分配系数 K 和回收率 Y 都随乙醇质量分数的增大而增大,且分配系数 K 可达 12.60,回收率 Y 可达 94.8%。这是因为硫酸铵的初始质量分数相同时,乙醇质量分数增大,分相能力也就增大,上相中乙醇质量分数也就随之增加,而皂苷在乙醇中的溶解度比水大,故 K 和 Y 都增大。但当乙醇浓度超过 30% 后,上相中皂甙含量下降,这是因为高浓度的乙醇会引起油桶中多糖、蛋白质等大分子物质的沉淀,从而使皂甙产生沉淀,导致上下相中皂甙的含量反而降低,故乙醇的最佳质量分数为 30%。

2.3 pH 对油桶中皂苷萃取分配的影响 pH 值的变化会使组成体系的物质电性发生改变,也会使被分离物质的电荷发生改变,从而影响分配的进程。本研究用氨水和冰醋酸来调节 pH 值,考察了不同 pH 值对油桶总皂苷萃取效果的影响,实验结果见图 3。皂苷分子结构中有羟基和甲基,pH 值的变化改变了油桶总皂苷的电性和表面性质。从图 3 可知,随着 pH 值的增大,分配系数 K 和回收率 Y 先增大后减小。而在 pH 值为 6.0 时,分配系数和回收率都比较高,分别为 7.88 和 86.5%。通过对分配系数 K 和回收率 Y 进行综合考虑,选取 pH 值为 6.0。

2.4 温度对油桶中皂甙萃取分配的影响 在乙醇质量分数为 30%,硫酸铵质量分数为 20%,pH 为 6.0 时,考察温度对双水相体系分配平衡的影响。结果如图 4 所示。

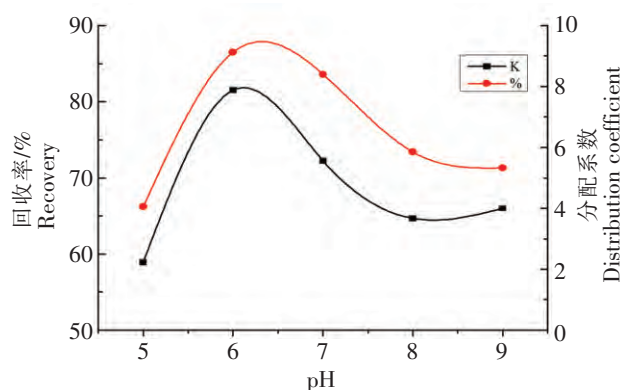


图 3 回收率、分配系数与 pH 值的关系

Fig.3 The relation between the recovery rate and distribution coefficient and the pH

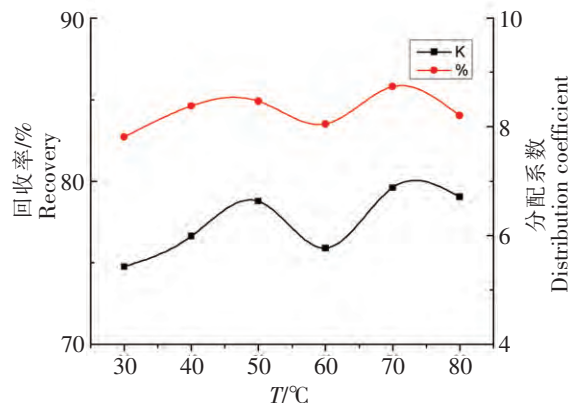


图 4 回收率、分配系数与温度的关系

Fig.4 The relation between the recovery rate and distribution coefficient and the temperature

由图 4 可以看出,温度对分配系数 K 和回收率 Y 的影响并不大。但是温度过高可能会破坏总皂苷中的有效成分。因此选择在 30 °C 下进行双水相萃取。

3 讨论

结果表明,利用乙醇/硫酸铵双水相体系萃取油桶中的总皂苷,最大分配系数可达 12.60,最大回收率为 94.80%,说明在乙醇/硫酸铵双水相体系中总皂苷大部分被分配在乙醇相(上相)。另外,通过单因素单水平实验,考察了乙醇质量分数、硫酸铵质量分数、pH 值和温度对分配系数与总皂苷回收率的影响。结果表明,萃取条件为乙醇质量分数为 30%,硫酸铵质量分数为 20%,pH 6.0,温度为 30 °C 时,油桶总皂

苷在两相的分配系数为 12.60,回收率为 94.80%。

双水相萃取技术是一种新开发的提取分离方法,通过以上研究分析可以看出,与传统的有机溶剂萃取法相比,双水相体系具有分相速度快,使用温度低,易于操作等特点,且所使用的乙醇及盐类对人体及环境无毒害,萃取率高,溶剂可以循环利用,这不仅可以降低成本,而且有利于环保,为油楠中总皂苷分离纯化的一种有效方法。

参考文献:

- [1] 中国林业科学编委会. 中国林业: 第 39 卷 [M]. 北京: 科学出版社,1988.
- [2] 顾龚平,张卫明,肖正春,等. 燃油植物油楠的资源开发利用 [J]. 中国野生植物资源,2008,27(4): 14-16.
- [3] Hossain A K, Davies P A. Plant oils as fuels for compression ignition engines: A technical review and life-cycle analysis [J]. Renewable Energy, 2010, 35: 1-13.
- [4] 陆碧瑶,李毓敬,麦浪天,等. 油楠挥发成分的研究 [J]. 林产化学与工业, 1982(1): 26-30.
- [5] 杨锦昌,尹光天,吴仲民,等. 海南尖峰岭油楠树脂油的主要理化特性 [J]. 林业科学, 2011, 47(9): 21-27.
- [6] 张安菊,梁振益,陈祎平,等. 油楠树脂油化学成分的研究 [J]. 化学分析计量, 2013, 22(3): 33-35.
- [7] Shi J J, Liu Y Z, Yu H B. Technology and application of new type solvent extraction [J]. Journal of Chemical Industry & Engineering, 2005, 26(5): 15-18.
- [8] 李佳,苟兰亭,陈俊,等. 双水相体系提取欧李种仁蛋白的初步研究 [J]. 种子, 2014, 33(3): 82-85, 86.
- [9] Bi P Y, Dong H R, Yuan Y C. Application of aqueous two-phase flotation in the separation and concentration of puerarin from puerariae extract [J]. Separation and Purification Technology, 2010, 75(3): 402-406.
- [10] 王楠,宋小骏. 皂苷生物活性的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2007(2): 105-108.
- [11] 白敏,毛茜,徐金娣,等. 人参属药用植物地上部位皂苷类成分的化学和分析研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 412-422.

Extraction of the Total Saponins from *Sindora glabra* Seeds by Aqueous Two-phase System

LIANG Zhenyi, JI Shasha, CHEN Yiping, LIN Zhaohua, LIU Pinghuai
(Material & Chemical Engineering College of Hainan University, Key Laboratory of Ministry of
Education for Advanced Materials in Tropical Island Resources, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The ethyl alcohol / ammonium sulfate aqueous two-phase system was used to extract the total saponins from *Sindora glabra* seeds. Effectes of the mass fraction of ethyl alcohol, mass fraction of ammonium sulfate, pH, temperature on the extraction of saponins were studied. The results indicate that the better condictiones were obtained as the mass fraction of ethyl alcohol was 30%, mass fraction of ammonium sulfate was 20%, pH was 6, temperature was 30 °C, partition coefficient of the total saponins in the two-phase system was 12.60, the recovery rate was 94.8%. The method is suitable for extraction and separation of saponins from *Sindora glabra* seeds.

Keywords: *Sindora glabra* seeds; total saponins; ATPE (aqueous two-phase extraction); aqueous two-phase system