

文章编号: 1674-8085(2016)01-0040-06

乙醇/硫酸铵双水相体系分离纯化款冬花总黄酮

王建全, 张亚娜, *林 敏

(河西学院化学化工学院, 甘肃, 张掖 734000)

摘 要: 以低温烘干的款冬花为原料, 利用乙醇/硫酸铵双水相体系分离纯化款冬花总黄酮。首先对无水乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、黄酮粗提取液、NaCl 质量分数和 pH 值进行单因素研究, 然后利用 Box-Behnken Design 实验对 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数、无水乙醇质量分数、黄酮粗提取液质量分数、pH 值进行了优化; 结果表明: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 15.5%、无水乙醇质量分数为 32.2%、黄酮粗提取液质量分数为 20.4%、pH = 4.1 时款冬花总黄酮萃取率可达 99.21%, 与预测的 99.44% 非常接近。

关键词: 款冬花; 纯化; 总黄酮; 双水相

中图分类号: TG914.1/R284

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2016.01.009

SEPARATION AND PURIFICATION OF TOTAL FLAVONOIDS FROM *TUSSILAGO FARFARA* FLOWER WITH ETHANOL/AMMONIUM SULPHATE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM

WANG Jian-quan, ZHANG Ya-nai, *LIN Min

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

Abstract: Purification and isolation of flavonoids from traditional Chinese medicine is an important technology in biological research. In the present study, purification of flavonoids of *Tussilago farfara* flower were carried out simultaneously by using an aqueous two-phase system of ethanol/ammonium sulphate. The effects of crude extract concentration, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ amount, pH and ethanol amount on the extraction efficiency of total flavonoids were explored by single factor and Box-Behnken design methods. The optimal aqueous two-phase extraction conditions were mass crude extract 20.4%, pH 4.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mass fraction 15.5%, ethanol mass fraction 32.2%. The highest extraction rate was up to 99.21%, which was very close to the prediction of 99.44%. This method is simple, easy to implement, using anhydrous ethanol toxicity, environmentally friendly.

Key words: *Tussilago farfara*; purification; flavonoids; aqueous two-phase system

款冬花为菊科款冬属植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 又称冬花、八角乌、九九花、虎须等^[1]。款冬花是止咳平喘方剂中的常用药, 近代研究表明, 款冬花中具有润肺下气、止咳化痰等功效的有效化学成分款冬二酮、芦丁、槲皮素等黄酮类化合物, 但是其中又含有具有肝脏毒性的吡咯

里西啶类生物碱, 导致款冬花的使用受限^[2], 所以必须将款冬花的总黄酮粗提取液进行纯化。目前报道了大孔树脂等方法纯化工艺^[3-4], 但未见双水相体系纯化工艺。本方法探究了硫酸铵/无水乙醇双水相体系分离纯化款冬花总黄酮的萃取工艺, 对款冬花的开发利用和工业化生产具有一定指导意义。

收稿日期: 2015-11-12; 修改日期: 2015-12-16

基金项目: 甘肃省高校河西走廊特色资源利用省级重点实验室科研项目(XZ1203)

作者简介: 王建全(1990-), 男, 甘肃陇南人, 河西学院化学化工学院化学专业 2012 级本科生(E-mail: 1213331045@qq.com);

张亚娜(1994-), 女, 甘肃金昌人, 河西学院化学化工学院化学专业 2012 级本科生(E-mail: 1327809561@qq.com);

*林 敏(1967-), 女, 甘肃张掖人, 副教授, 主要从事天然产物有效成分提取与分析(E-mail: linmin0936@163.com).

双水相萃取法^[5-6]是一种新型的液-液萃取纯化技术,条件温和,萃取时间短,操作简便,提取效率较高,且几乎不存在有机溶剂残留问题,还避免了超声波、微波等对人体的伤害,受到人们极大的关注,它是一种很有发展前途的萃取方法。无水乙醇和硫酸铵组成的双水相体系萃取款冬花中的总黄酮,并通过单因素实验和正交试验,考察 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数,无水乙醇质量分数,粗提取液质量分数,NaCl质量分数和pH值对款冬花总黄酮萃取率的影响,确定出此双水相体系萃取款冬花中总黄酮的最佳工艺条件。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要仪器

试剂: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、NaOH、HCl、纯水、芦丁标准品。

仪器: FW177型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); WFJ2100型分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司); BSA224S型电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); DK-98-II型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); RE-2000A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 雷磁 PHS-2F型 pH计(上海精密科学仪器有限公司); BCD-206STX型冷藏冷冻箱(青岛海尔股份有限公司); PO-1000单道移液器(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的绘制^[7]

精确称取芦丁对照品 0.0250 g,用体积分数 50%乙醇溶解配制成 50.00 mL,即浓度为 0.5 mg/mL的乙醇溶液。分别取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.20 mL于 6 个 10.00 mL 容量瓶中,加入 0.30 mL 质量分数 5% NaNO_2 溶液,静置 6 min,加入 0.30 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,静置 6 min,再加入 4.00 mL 质量分数 4% NaOH 溶液,静置 15 min 后,用水定容至刻度。分别用分光光度计于 510 nm 测定吸光度 A,绘制标准曲线方程: $A = 0.5304x - 0.0005$, $R = 0.9994$ 。式中 A 为吸光度值, x 为溶液中芦丁的质量(mg)。

1.2.2 款冬花粗提取液的制备

生药处理: 2014 年春采于甘肃陇南的款冬花低

温烘干、粉碎、过筛。

粗提取液的制备^[4]:在回流装置中以提取款冬花总黄酮最佳条件: 50% (V/V) 乙醇、1:20 料液比、80℃提取温度、提取时间 1 h 的条件制备粗提取液。

1.2.3 双水相萃取方法

称取一定量无水乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、粗提取液、蒸馏水于比色管中,使双水相体系总质量固定,加热振荡使成相物质溶解,并调节体系 pH,静置,两相达到相分离(20℃),款冬花总黄酮富集于双水相系统的上相中,测定相比 R 和上下相中款冬花总黄酮的含量,并计算其分配系数 K 及萃取率 Y,如下式:

$$R = \text{上相体积}(V_t) / \text{下相体积}(V_b)$$

$$K = \text{上相总黄酮浓度}(C_t) / \text{下相总黄酮浓度}(C_b)$$

$$Y/\% = R * K / (1 + R * K)$$

1.2.4 乙醇/硫酸铵双水相体系的确定

通过改变硫酸铵质量分数和无水乙醇质量分数确定双水相体系组成。

1.2.5 单因素实验设计

确定双水相组成后,研究 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、无水乙醇、粗提取液、NaCl 质量分数和 pH 值对款冬花总黄酮萃取率的影响。

1.2.6 Box-Benhnken Design 实验设计

根据单因素实验结果设计 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、无水乙醇、粗提取液、NaCl 质量分数和 pH 值四因素三水平 29 个组合 Box -Benhnken Design 实验,确定最佳款冬花萃取工艺条件。

1.2.7 数据分析

单因素试验结果的分别采用 Excel、Originproprable9.0 和 Design-Expert 8.0.6 处理数据和作图。所有试验均重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

分别选取 11.8%、13.2%、14.6%、16.0%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 27.5%无水乙醇和 13.4%款冬花总黄酮粗提取液分别组成双水相体系, pH 为 5.3, 加热搅拌至两相充分混匀, 20℃下待完全分相后对上下相

溶液进行分析,结果见图1。由图可知,随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数的增加,分配系数和萃取率逐渐上升,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数达到16.0%时分配系数和萃取率达到最大,但 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不能完全溶解,会造成试剂损失。可见, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数影响双水相,可以改变各相中成相物质的组成和相比^[8],从而影响黄酮在上相中的分配;并且试验中发现下相黄酮浓度太低测不出数值,上相出现过饱和现象,同时 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数为14.6%时萃取率为94.03%,相对较高,因此,选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的最佳质量分数为14.6%。

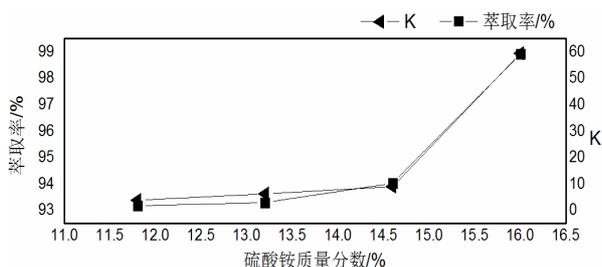


图1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

Fig.1 Effect of ammonium sulfate concentration on the extraction rate of Coltsfoot total flavonoid

2.2 无水乙醇质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为14.6%时,选择24.7%、27.5%、30.2%、33.0%无水乙醇分别组成双水相,粗提取液质量分数13.4%,pH为5.3,加热搅拌至两相充分混匀,20℃下对上下相溶液进行分析,结果见图2。由图可知, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数一定的情况在下,随着无水乙醇质量分数的增加,总黄酮提取率和分配系数都增加。当无水乙醇质量分数达到33.0%时,总黄酮萃取率分配系数都达到最大;当无水乙醇质量分数继续增加时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从双水相中析出。因此,确定无水乙醇质量分数为33.0%。

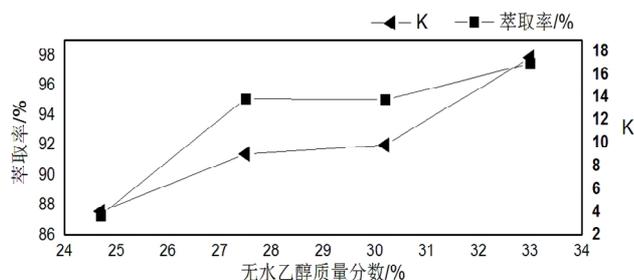


图2 无水乙醇质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

Fig.2 Effect of the ethanol concentration on the extraction rate of Coltsfoot total flavonoid

2.3 粗提取液质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

在14.6%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、33.0%的无水乙醇双水相体系中,分别加入质量分数为11.6%、13.4%、15.6%、17.6%、20.4%的粗提取液,pH为5.3,加热搅拌至两相充分混匀,20℃下对上下相溶液进行分析,结果见图3。粗提取液加入量是双水相萃取的一个重要参数,从成本考虑多加入一些。如图所示,粗提取液的质量分数影响上下相的分配,当粗提取液质量分数为17.6%时萃取率和分配系数都最大。因此,确定粗提取液质量分数为17.6%。

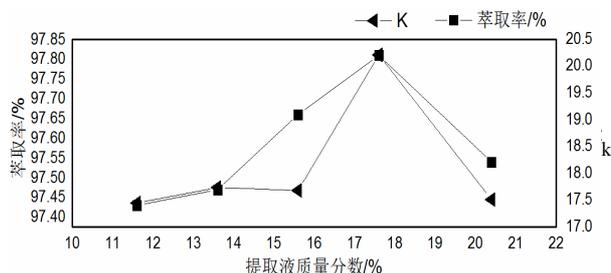


图3 粗提取液质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

Fig.3 Effect of crude extract concentration on the extraction rate of Coltsfoot total flavonoids

2.4 NaCl质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响

在14.6%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、33.0%的无水乙醇、17.6%的粗提取液,pH为5.3的双水相体系中,考察NaCl质量分数对款冬花总黄酮萃取率的影响。实验结果表明,在此双水相体系中加入少量NaCl会析出大量试剂,因此不考察NaCl质量分数的影响。

2.5 pH值对款冬花总黄酮萃取率的影响

在14.6%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、33.0%的无水乙醇、17.6%的粗提取液组成的双水相体系中,利用氢氧化钠溶液和盐酸溶液调节体系pH值。pH分别为3.0、3.5、4.3、5.3、7.7、8.8时,萃取率和分配系数的变化情况如图4。在pH=3.5时,萃取率和分配系数都达到最大,最大萃取率为99.16%。在无水乙醇/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系中,上相电位为正,下相电位为负。pH值较低时,当黄酮的电离平衡受到影响,并吸附 H^+ 而携带正电荷,pH值改变了黄酮的电荷性质,黄酮开始向电位为负的下相富集,分配系数下降;但碱性过强时,会破坏黄酮母核^[8-9],且氢氧化钠与硫酸铵发生反应使硫酸铵的量减少而导致黄酮的萃取率降低,因此,选择pH=3.5。

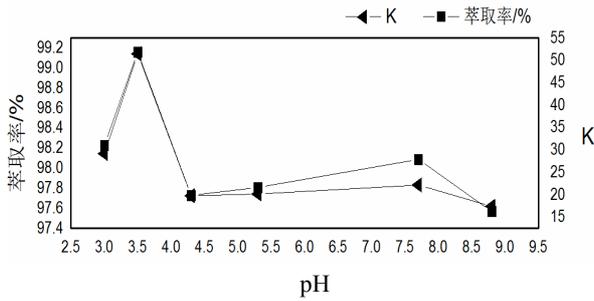


图4 pH值对款冬花总黄酮萃取率的影响

Fig.4 Effect of pH value on the extraction rate of Coltsfoot total flavonoids

3 Box-Behnken Design 试验设计

3.1 试验设计及结果

在单因素试验基础上用 Box-Behnken 试验设计优化工艺条件。设计因素水平表见表 1；四因素三水平的设计方案及试验结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of Box-Behnken Design

因素	-1	0	1
A((NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数/%)	13.2	14.6	16.0
B(无水乙醇质量分数/%)	30.2	33.0	35.7
C(粗提取液质量分数/%)	15.6	17.6	20.4
D(pH)	3.0	3.5	4.3

表 2 Box-Behnken 设计方案与结果

Table 2 Arrangement and results of Box-Behnken Design

序号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	98.27
2	1	-1	0	0	99.12
3	-1	1	0	0	98.51
4	1	1	0	0	97.77
5	0	0	-1	-1	97.11
6	0	0	1	-1	95.46
7	0	0	-1	1	97.73
8	0	0	1	1	98.81
9	-1	0	0	-1	95.72
10	1	0	0	-1	95.45
11	-1	0	0	1	98.52
12	1	0	0	1	99.27
13	0	-1	-1	0	98.99
14	0	1	-1	0	98.11
15	0	-1	1	0	98.51
16	0	1	1	0	98.43
17	-1	0	-1	0	99.04
18	1	0	-1	0	98.67
19	-1	0	1	0	99.01
20	1	0	1	0	98.68
21	0	-1	0	-1	96.72
22	0	1	0	-1	96.17
23	0	-1	0	1	98.17
24	0	1	0	1	98.05
25	0	0	0	0	98.73
26	0	0	0	0	99.24
27	0	0	0	0	99.82
28	0	0	0	0	98.87
29	0	0	0	0	98.72

3.2 响应面交互作用分析与优化^[10-12]

以款冬花总黄酮萃取率 Y 为响应值，根据表 2 的试验结果，利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元回归分析，具体结果见表 3。经回归拟合后，试验因子对响应值的影响可用以下回归方程表示： $Y = 99.08 - 9.167 \times 10^{-3} A - 0.23 B - 0.062 C + 1.16 D - 0.40 AB + 0.25 AD + 0.20BC + 0.11 BD + 0.68 CD - 0.21 A^2 - 0.36 B^2 - 0.15 C^2 - 1.57 D^2$ 。

表 3 Box-behnken 试验结果的回归分析

Table 3 The regression analysis of Box-Behnken Experiment results

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F
模型	35.99907684	13	2.769159757	14.51961372	< 0.0001
A	0.001008333	1	0.001008333	0.005287023	0.9430
B	0.625633333	1	0.625633333	3.280400963	0.0902
C	0.046875	1	0.046875	0.245781014	0.6272
D	16.1472	1	16.1472	84.66507075	< 0.0001
AB	0.632025	1	0.632025	3.31391457	0.0887
AD	0.2601	1	0.2601	1.363789691	0.2611
BC	0.16	1	0.16	0.838932528	0.3742
BD	0.046225	1	0.046225	0.242372851	0.6296
CD	1.863225	1	1.863225	9.769500375	0.0069
A ²	0.294285405	1	0.294285405	1.543034995	0.2332
B ²	0.860614459	1	0.860614459	4.512484152	0.0507
C ²	0.14208	1	0.14208	0.744972085	0.4017
D ²	15.97326851	1	15.97326851	83.75309087	< 0.0001
残差	2.860778333	15	0.190718556		
失拟项	1.991458333	11	0.181041667	0.83302658	0.6357
纯误差	0.86932	4	0.21733	14.51961372	< 0.0001
总和	38.85985517	28			
决定系数	0.9264				

由表 3 可知，模型 $P < 0.0001$ ，说明模型拟合程度显著。失拟项 $P = 0.6357 > 0.05$ ，失拟项不显著，模型决定系数为 92.64%，说明回归方程拟合程度好。A、B、C、D 对黄酮萃取率均有一定影响，影响排序为：D(pH) > B(无水乙醇质量分数) > C(提取液质量分数) > A(硫酸铵质量分数)。

利用 Design-Expert 8.0.6 软件根据回归方程进行响应面分析，绘制等高线图，结果如图 4 所示，利用 Design-Expert 软件对黄酮萃取率的一次多项式数学模型进行求导，可获得该模型极值点，对函数进行分析，获得了各个因素的最佳条件组合：

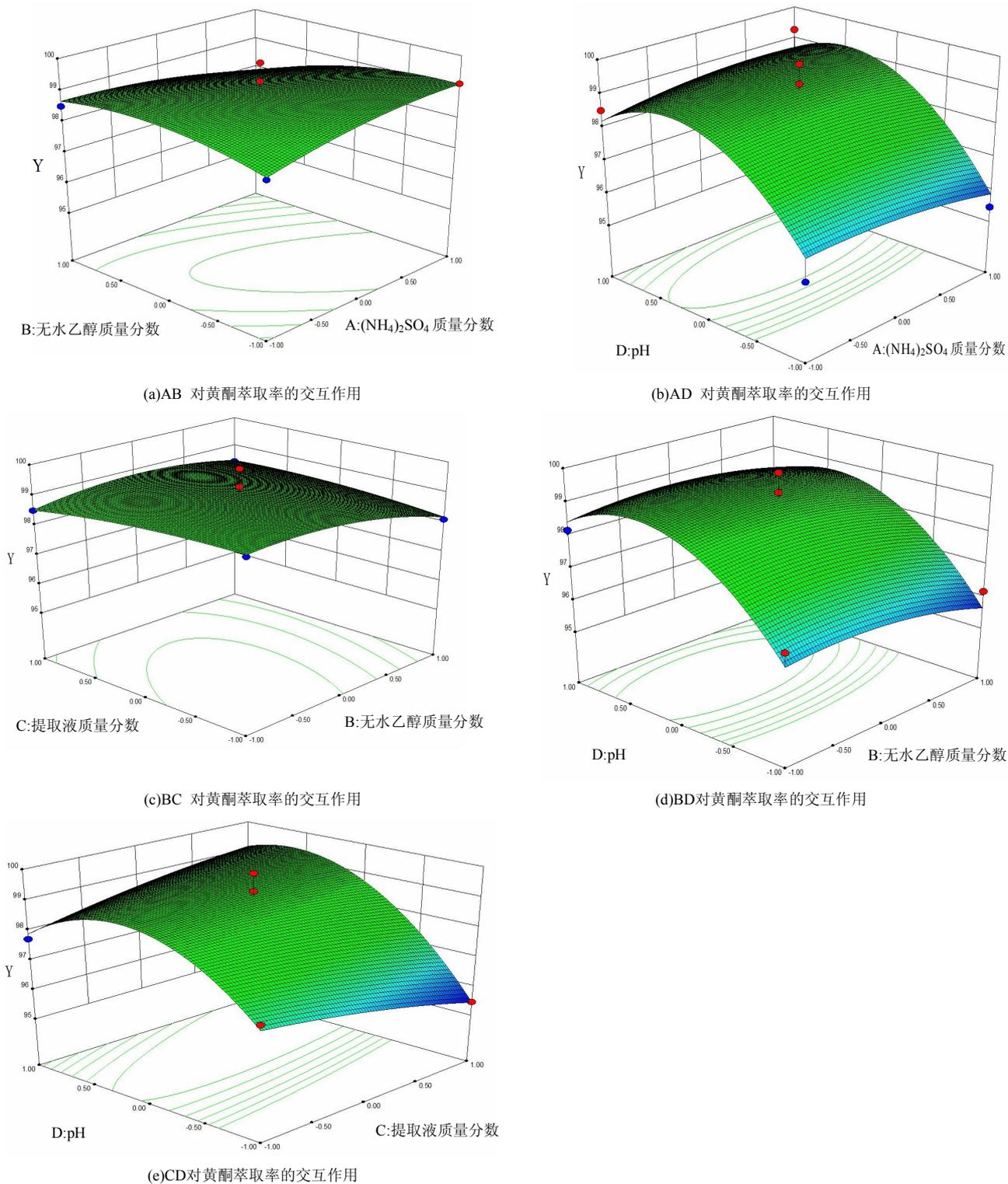


图5 各因素交互作用的等高线图
 Fig.5 Response plots for the pairwise interactive effects

硫酸铵质量分数 15.47%，无水乙醇质量分数 32.17%，粗提取液质量分数 20.40%，pH = 4.06。此时模型预测极大值为 99.44%。为检验响应曲面法所得结果的可靠性，我们采用上述优化条件进行萃取，考虑到实际操作的便利，将萃取工艺参数修

正为：硫酸铵质量分数 15.5%，无水乙醇质量分数 32%，粗提取液质量分数 20.40%，pH = 4.1。在此条件下平行做 5 组验证试验，得平均萃取率 99.21%，与优化结果 99.44% 接近，因此，基于响应曲面法所得的优化萃取工艺参数准确可靠，具有实用价

值。

不同试验条件结果比较结果见表 4, 当双水相体系组成硫酸铵质量分数 15.5%, 无水乙醇质量分数 32.2%, 粗提液质量分数 20.40%, pH 为 4.1。萃取率达到 99.21%。

表 4 不同试验条件结果比较

Table 4 Results comparing different test conditions

试验项目	硫酸铵质量分数/%	无水乙醇质量分数/%	提取液质量分数/%	pH	萃取率/%
单因素实验	14.6	33.0	17.6	3.50	99.16
响应面优化	15.47	32.17	20.40	4.06	99.44
响应面优化验证	15.5	32.2	20.40	4.1	99.21

4 小结

双水相体系中无水乙醇质量分数、硫酸铵质量分数、pH 值、粗提液质量分数对黄酮萃取率和分配系数均有影响。单因素实验结果与响应面优化结果对提取率无显著性影响。

该方法对天然产物有效成分的提取和纯化有一定的参考意义, 并且操作简单, 易于实施, 采用低毒的无水乙醇, 利于环保和节约试剂。

参考文献:

[1] 濮社班,徐德然,张勉,等. 中药款冬中肝毒吡咯里西啶生物碱的LC/MSⁿ 检测[J].中国天然药物,2004, 2(5): 293-297.

- [2] 张可越,张铁军,高文远,等. 款冬花的化学成分及药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2006, 31(22): 1837-1841.
- [3] 丁彩丽,吴明建,程向红,等. SP825大孔树脂纯化款冬花中总黄酮的研究[J].食品科学,2009,34(6): 220-223.
- [4] 闫克玉,贾玉红. 乙醇提取款冬花中总黄酮的工艺研究[J].现代食品科学,2008, 24(9): 901-910.
- [5] 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,2013,47(1): 78-81.
- [6] 张喜峰,杨春慧,罗光宏. 乙醇/硫酸铵双水相体系分离纯化葡萄籽总黄酮[J].食品发酵工程,2013,39(10): 254-258.
- [7] 刘香,曹娟. 分光光度法测定不同产地款冬花的总黄酮含量[J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(6): 572-574.
- [8] 王倩,贾长虹,常丽新,等. 双水相萃取法分离纯化狗枣猕猴桃叶总黄酮[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 167-171.
- [9] 朱庆英,黄勇潮. 双水相萃取玉米须黄酮的研究[J].中药材,2012, 35(2): 310-313.
- [10] 贾贵华,任雪峰,吴冬青,等. 响应面分析法优化党参总黄酮提取工艺研究[J]. 中兽医医药杂志,2013,(1): 12-16.
- [11] 戴一,宋祖荣,李静. 冬凌草茶中多糖、总黄酮及冬凌草甲素浸出特性研究[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2015,36(3): 93-98.
- [12] 曾建军,周兵,姚灵. 剑叶金鸡菊植株不同器官总黄酮和总皂甙含量的测定[J].井冈山大学学报:自然科学版,2011,32(2): 50-53.