

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 03. 025

双水相萃取红景天苷的研究

郭青锋, 王凤薇, 陈东辉, 王道武

(长春工业大学化学工程学院吉林省石化资源与生物质综合利用工程实验室, 长春 130012)

摘要: 聚乙二醇(PEG)/盐的水溶液双相体系(ATPS)形成双相行为和双相分配行为的研究. 研究了聚乙二醇(PEG)的分子量和质量分数, 盐种类, 盐的质量分数, 离子强度, 红景天初始浓度对红景天提取率的影响. 并通过正交试验, 确定最佳双水相 PEG/(NH₄)₂SO₄ 体系的条件, 产生一个简单的预处理方法为提取和测定红景天苷. 当双水相体系是 20%PEG1000, 20%(NH₄)₂SO₄ 和 1%KCl 时, 提取效果最好, 提取率是 95.32%.

关键词: 红景天苷; 萃取; 双水相体系; 聚乙二醇(PEG); 分离纯化; 分析

中图分类号: TQ041 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)02-0403-06

Study on aqueous two-phase extraction of salidroside

GUO Qing-Feng, WANG Feng-Wei, CHEN Dong-Hui, WANG Dao-Wu

(Jilin Provincial Engineering Laboratory for Complex Utilization of Biomass and Petroresources, School of Chemical Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

Abstract: Based on aqueous two-phase system of polyethylene glycol (PEG)/salt, a simple pretreatment approach was developed for the extraction and determination of salidroside in Rhodiola. The influence factors on phase behavior of forming biphasic and partition behavior of the ATPS was investigated. Studied the factors such as polyethylene glycol (PEG) molecular weight and the mass fraction, the kinds of salt, the salt mass fraction, ionic strength, salidroside initial concentration influence on salidroside extraction rate. Determine the optimum extraction conditions with orthogonal experiment, when the aqueous two-phase system is 20%PEG1000, 20% (NH₄)₂SO₄ and 1% KCl, the extracting effect is best; the extracting rate is 95.32%. Compared with the conventional liquid-liquid extraction or solid-phase extraction, this method was more environmentally, more cost effective.

Key words: Salidroside; Extraction; Aqueous two-phase system; Polyethylene glycol(PEG); Separation and purification; Analysis

1 前言

红景天(学名:Rhodiola rosea)是景天科红景天属的植物. 属多年生的草本或亚灌木植物, 具有肉质厚实的根状茎, 是很珍稀的药用植物. 全世界红景天属的植物大概有 90 多种, 我国就有约 70 多种^[1], 主要分布在华北、东北、西南、西北和华中等

地, 生长的环境恶劣, 主要生长在海拔 1800-2700 米的地区, 多长于山坡林下或草坡上, 具有很强的生命力和特殊的适应性. 它具有适应原样作用, 可以协助身体回复稳态, 具有很高的药用价值. 具有抗肿瘤、抗疲劳、抗缺氧、抗寒冷、抗微波辐射等功效^[2-6]. 药理研究表明, 红景天可全株入药, 尤以其根及根茎为佳^[7], 红景天苷(Salidroside, C₁₄H₂₀O₇)

收稿日期: 2014-12-25

基金项目: 吉林省科技厅自然科学基金(2013010276JC)

作者简介: 郭青锋, 女, 硕士, 主要从事红景天苷萃取研究. E-mail: qing0517feng@163.com

通讯作者: 王道武. E-mail: wangdaowu@163.com

是红景天的主要药用活性成分. 红景天具有与人参、刺五加类似的“适应原样”作用, 而且不会出现人参的过度兴奋作用和刺五加致便秘的作用. 因而越来越受到人们的广泛重视. 军事医学、航空医学、运动保健医学等领域均具有十分重要的应用价值^[2,6,7]. 由于红景天生长环境恶劣, 找到一种有效的方法萃取红景天苷是有必要的. 目前, 萃取红景天苷的方法很多, 如微波提取方法^[8,9]、水浴回流提取法^[7]、超高调压技术^[10]、响应面法^[11]、热密封高压提取红景天^[12]等. 然而, 这些方法能很好的提取红景天苷但存在着低的提取率、萃取效果差和存在杂质等问题. 因此, 应该找一种新方法萃取红景天苷.

双水相萃取技术于 20 世纪 50 年代后期由 Albertsson 开发的, 70 年代以后, 双水相技术在生物分离过程中得到广泛应用. 双水相体系由两种不相容的水溶性聚合物或者是一种聚合物和一种无机盐, 还有用有机盐如柠檬酸钠、酒石酸钾钠、表面活性剂、或者是离子液体的^[15-17], 由于聚合物与盐之间的空间位阻, 聚乙二醇分子之间能形成水化膜^[18], 有利于分离; 双水相体系的萃取能力与其水合作用, 争夺水分子的能力有关^[19-22]. 双水相体系中 70-90% 都是水, 具有温和的环境, 可以保持奋力物质的活性, 常用于分离生物分子^[23,24] (蛋白质、抗体、生物酶、RNA 和 DNA), 也可以分离病毒和细胞. 目前, 还未见关于双水相萃取红景天苷的报道.

实验的目的是找出一种简单环保的预处理方法. 主要研究了聚乙二醇(PEG)与无机盐双水相体系成相行为, 并通过一些可调节因素, 包括 PEG 的分子量和质量分数、盐的量和质量分数、盐的种类、离子强度和红景天苷的初始浓度, 通过 UV 检测, 研究红景天苷在双水相体系中的萃取分离特性.

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

红景天(购自吉林大药房), 红景天苷标准品购自阿拉丁公司; PEG600、PEG1000、PEG2000、PEG6000、硫酸铵、磷酸氢二钾、柠檬酸钠均为分析纯购自天津市光复精细化工研究所, 纯度 $\geq 99\%$. UV1901 双光束紫外分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司), QYC-211 全温培养摇床(上海新苗医疗器械制造有限公司), 离心机(湖南凯达科学仪器有限公司), 分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司).

2.2 实验方法

采用紫外-可见分光光度计法, 在 275nm 处

检测红景天苷的吸光度, 并用标准曲线计算出其质量浓度. 当红景天苷的浓度在 0 ~ 1 g/L 的范围时, 红景天苷的吸光度 A 和浓度 C 之间有很好的线性关系, 线性回归方程: $A = 4.459586C + 0.004151$, 线性相关系数 $R^2 = 0.999313$. 萃取率 (Y)为:

$$Y = \frac{V_t V_i}{C_t V_t + C_b V_b}$$

3 实验过程

3.1 红景天苷粗提液的提取

红景天根粉末, 用 80% 的乙醇 80 °C 水浴回流, 提取 3 次, 每次 80min, 合并提取物, 冷却后, 抽滤, 过滤, 滤液旋蒸, 分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进一步纯化, 得到比较纯的红景天苷水溶液.

3.2 相图的制备

本实验采取浊点滴定法. 向浓度为 40% 的醇的试管中滴加浓度为 30% 的盐, 直至溶液出现浑浊, 形成双相, 记录此时混合物中化合物的量. 然后向试管中滴加水, 直至溶液变成澄清, 记录此时的混合物的量. 然后再往试管中滴加盐直至变浑浊形成双相, 记录此时混合物中化合物的量, 反复几次, 得到数据. 然后换不同的醇重复上述过程, 得到数据. 根据数据绘制成相图.

3.3 萃取工艺条件对红景天苷萃取率的影响

向 10ml 的离心管中加入聚乙二醇和盐制备双水相体系, 加入一定体积的红景天苷的标准溶液, 放在摇床上振荡 2h, 使其混合均匀, 用离心机离心 10min, 加速其上下相的分离, 读取上下相体积, 测上下相吸光度值(红景天苷大部分分布于双水相体系的上相中), 并绘制相应的曲线.

双水相萃取参数选择实验 分别设定 PEG 相对分子量为 600、1000、2000、6000, 质量分数为 12%、16%、20%、24%、28%, 盐的种类采用硫酸铵、磷酸氢二钾、柠檬酸钠和酒石酸钾钠, 盐质量分数为 12%、16%、20%、24%、28%, 外加盐为 KCl 和 NaCl, 外加盐质量分数为 0%、1%、2%、3%、4%、5%, 提取液初始浓度为 0.02g/L、0.06g/L、0.10g/L、0.14g/L、0.18g/L、0.22g/L.

4 结果与讨论

4.1 聚乙二醇/硫酸铵的成相行为

聚乙二醇和硫酸铵的成相关系可以从图 1 看出. 相分离的聚合物采用 PEG600、PEG1000、

PEG2000、PEG6000. 如图所示 线右侧是形成双相的区域,线左侧是均相区域;聚合物 PEG 的分子量越大,成相时所需盐的浓度越小,越易行成双相,越接近原点. 这是可能是聚乙二醇的分子量越大,含有的疏水基团越多,系统中的不相容性也会增加;由于斥力电子的镜象力,PEG 的水化膜和盐的离子之间是不相容的. 当 PEG 的分子量越大,其水化膜的面积就越大,在水中能融合或重叠的总量就减少,就越容易形成双相.

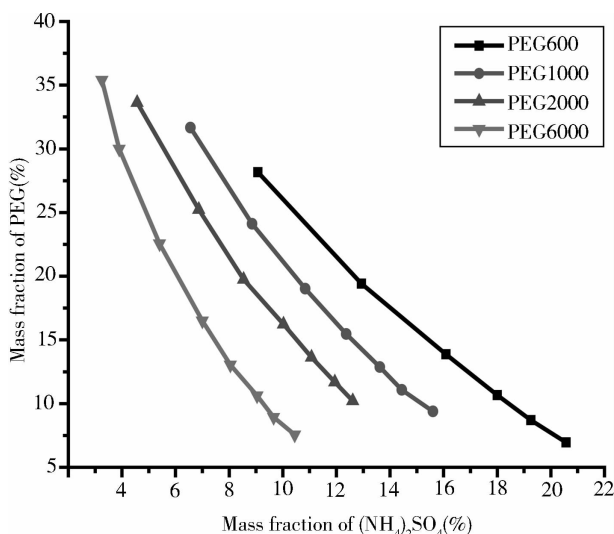


图 1 聚乙二醇/硫酸铵的相图

Fig. 1 PEG-(NH₄)₂SO₄ phase diagrams

4.2 聚乙二醇分子量及质量分数对红景天苷萃取率的影响

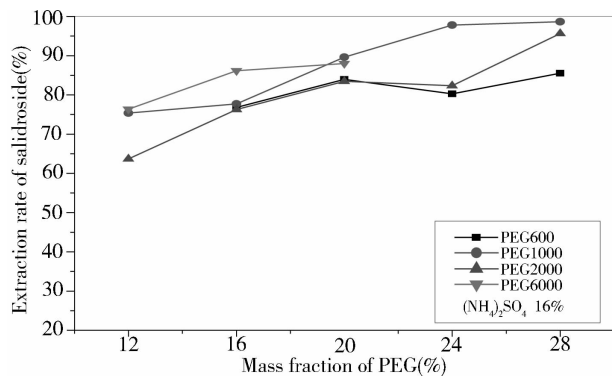


图 2 聚乙二醇分子量及质量分数对红景天苷萃取率的影响

Fig. 2 Effect of the molecular weight and mass fraction of PEG on extraction efficiency of salidroside

用不同质量分数的聚乙二醇和质量分数为 16% 的硫酸铵构成的双水相体系,测定红景天苷在

不同双水相体系中的萃取率,结果如图所示. 从图 2 中可以看出,质量分数小于 20% 时,聚乙二醇萃取能力是: PEG6000 > PEG1000 > PEG600 > PEG2000. 质量分数大于 20% 时,PEG6000 出现析出现象,这是因为聚合物的分子量越大,浓度越大,含有的疏水基团越多,很容易从水溶液中析出. 增水集团和氢键是影响双水相萃取率的两大重要因素. 增加聚乙二醇的浓度,萃取率也会随着上升的,PEG1000 变化最明显,当萃取率升到一定程度基本上不怎么变化. 随着分子量的增加,浓度的增加,聚乙二醇所在的上相中氢键也会随之增加,而红景天苷是极性比较强的,所以萃取率也增加,当浓度过高时,溶液中的疏水链会增加,使很多疏水基团在上相中聚集,影响红景天苷的萃取率. 最大萃取率是 98.67%,此时双水相条件是 PEG1000 质量分数为 28% 与硫酸铵质量分数为 16%.

4.3 盐的种类及盐的浓度对红景天苷萃取率的影响

聚乙二醇 1000 的质量分数为 16%,分别采用硫酸铵、柠檬酸钠、磷酸氢二钾、酒石酸钾钠四种盐制成双水相体系,其中硫酸铵、磷酸氢二钾是无机盐,柠檬酸钠、酒石酸钾钠是有机盐. 从图中可以看出,两种无机盐变化趋势相同,两种有机盐变化趋势相同;同等条件下,硫酸铵的萃取率较高. 盐对萃取率的影响,是因为阴阳离子的吉布斯自由能 ($-\Delta G$) 的水合作用, $-\Delta G$ 的值越大,其与水化合的能力也就越大,也就是说,水化作用越大的离子,其在溶液中争夺水分子的能力也就越强,更能使聚合物浓缩盐析,根据其不相容性,使聚合物的水化膜变大,氢键也增加,从而,萃取率也增加. 所以 PEG1000/硫酸铵体系萃取率优于 PEG1000/磷酸氢二钾体系. 相较于无机盐,有机盐的相形成区域比较小,PEG1000 质量分数为 16% 时,柠檬酸钠质量分数为 16% 时出现双相,而酒石酸钾钠到质量分数为 20% 时才出现双相,到质量分数为 28% 时,就开始出现盐析现象了. 阴离子的价态 ($C_6H_5O_7^{3-}$ 、 $C_4H_4O_6^{2-}$) 越高,形成双相的浓度也就越低,争夺水分子也就越强烈,也就更促进聚合物的浓缩盐析,所以 PEG1000/柠檬酸钠体系萃取率比 PEG1000/酒石酸钾钠要高. 随着盐浓度的增加,红景天苷的萃取率也增加. 盐离子增加,争夺水分子,使上相聚合物浓度增加,其水化膜变大,氢键增多,从而提高红景天苷的萃取率.

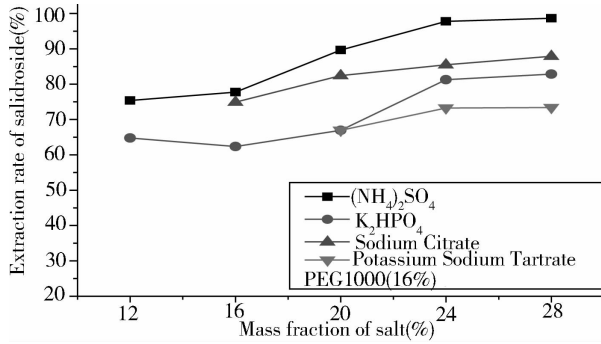


图 3 盐的种类及盐的浓度对红景天苷萃取率的影响
Fig. 3 Effect of different salts and mass fraction on extraction efficiency of salidroside

4.4 离子强度对红景天苷萃取率的影响

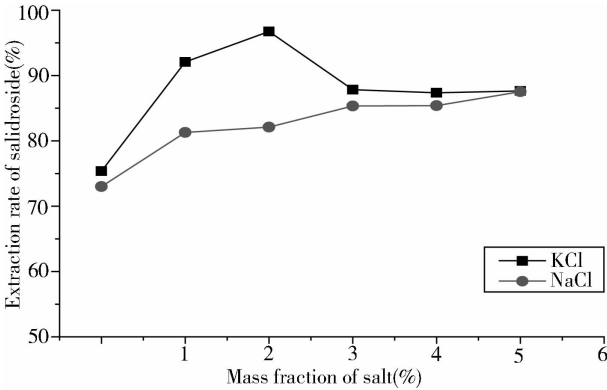


图 4 离子强度对红景天苷萃取率的影响
Fig. 4 Effect of ionic strength on extraction efficiency of salidroside

PEG1000 质量分数为 12% 与硫酸铵质量分数为 16% 的双水相体系中, 分别加入不同质量分数的 NaCl 或 KCl, 结果如图所示. 加入 NaCl 或 KCl 后, 萃取率都有所提高, 萃取率随着 NaCl 的加入逐渐增加, 随着 KCl 增加先增加后下降然后趋于常数. 增加盐的加入量, 可影响系统中两相的疏水性 and 静电性, 使聚合物内部获得水的容量减少, 盐在下相中的含量增加, 争夺更多的水分子, 从而提高萃取率; 但 Na⁺ 离子对体系有一定的盐析作用, K⁺ 离子对体系有一定的盐溶作用, 故体系中加入 KCl 对红景天苷的萃取率较高; 加入 NaCl 更容易出现析盐现象. 当加入质量分数为 2% 时, 萃取率可达到 96.75%.

4.5 初始浓度对红景天苷萃取率的影响

采用聚乙二醇 1000(12%) 与硫酸铵 16% 的双水相体系, 分别测不同浓度的红景天苷标样的萃取率. 如图所示, 随着样品加入量增加, 萃取率反而下降, 这主要依据 PEG 和样品的性质, 是因为 PEG 之间的空间排斥阻力和 PEG 和样品之间的疏水作用^[20], 使样品的萃取率降低. 当样品浓度为 0.02mg/ml 时, 萃取率最高, 为 82.57%.

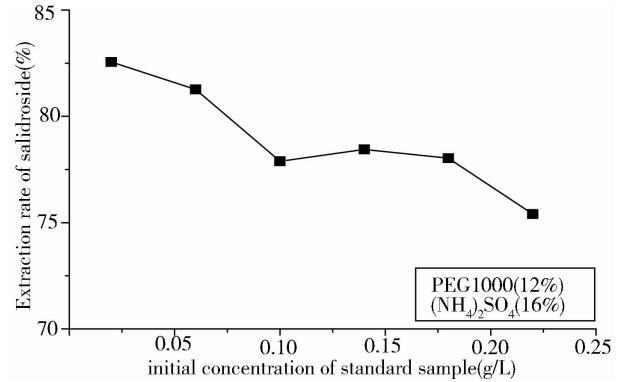


图 5 初始浓度对红景天苷萃取率的影响
Fig. 5 Effect of different initial concentration on extraction efficiency of salidroside

4.6 萃取红景天苷的最佳工艺条件的选择

根据上述的各种因素的分析, 进行了正交实验, 其结果如表 1. 正交实验采用 L₉(3⁴) 表来进行, 四个影响因素: PEG 分子量 (PEG600, PEG1000, PEG2000)、PEG 质量分数 (16%, 20%, 24%)、(NH₄)₂SO₄ 质量分数 (16%, 20%, 24%) 和 KCl 质量分数 (0, 1%, 2%). 实验组 2 中, 双水相条件是: 20% PEG1000, 20% (NH₄)₂SO₄ 和 1% KCl, 红景天苷的萃取效果最好, 萃取率为 95.32%.

5 结论

一种新型的双水相提取技术应用于分离纯化红景天苷. 在这项研究中, 研究了聚乙二醇 (PEG) 的分子量和质量分数, 盐的种类, 盐的质量分数, 离子强度, 红景天初始浓度对红景天提取率影响. 结果表明, 当双水相体系是 20% PEG1000, 16% (NH₄)₂SO₄, 2% 氯化钾和红景天初始浓度是 0.02 克/升时, 提取效果最好, 提取率是 95.44%. 因此, 这种技术对产业发展前景良好.

表 1 正交实验最佳条件选择

Tab. 1 Optimal extraction conditions by orthogonal experiment

实验组	影响因素				取率(%)
	PEG 分子量	PEG 质量分数	(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数	KCl 质量分数	
1	1	1	1	1	91.81
2	1	2	2	2	95.32
3	1	3	3	3	95.27
4	2	1	2	3	91.57
5	2	2	3	1	77.32
6	2	3	1	2	91.50
7	3	1	3	2	76.19
8	3	2	1	3	85.42
9	3	3	2	1	92.37

参考文献:

- [1] 王家明. 红景天的药理作用研究进展[J]. 中医医学报, 2003, 31(4): 57.
- [2] 宋学伟. 多糖优先股从大花红景天的纯化及成分分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(3): 642.
- [3] 唐诚芳, 蒋思萍. LC—MS/MS 法分析西藏不同产地大花红景天中主要化学组成[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2013, 52(6): 99.
- [4] Zhi L, Liang Z. Comparison on the dissolution regular pattern of salidroside and tyrosol from the extract and monomer of rhodiola rosea[J]. Chin Hosp Pharm J, 2013, 33(6): 425.
- [5] 姜文华, 孟晓婷. 红景天素抗老化和抗痴呆效应的实验研究[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 2: 127.
- [6] Yu D, Geng G. Effects of Rhodiola Polysaccharides on Proliferation of Spermatogonial Stem Cells in vitro[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici 2013, 34(7): 54.
- [7] Zeng Q. Optimization of Salidroside Extraction with Hot Reflex by Response Surface[J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2013, 41(1): 309.
- [8] Wang W, Liu C. New technology for the extraction of Salidroside from Rhodiola sachalinensis[J]. Chinese Tradition and Herbal Drugs, 1999, 30(11): 824
- [9] Mao Y, Li Y. Simultaneous determination of salidroside and tyrosol in extracts of Rhodiola L. by microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 45(3): 510
- [10] 陈坚. 超高压提取的红景天甙从大花红景天中心复合设计/响应曲面法优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 19
- [11] Cheng Z, Chen Y. Study on the extraction technology of salidroside from the root of rhodiola rosea L. under high pressure[J]. J Anhui Agricultural Sci, 2008, 36(19): 8139
- [12] Fu Y. Parameters optimization of salidroside from Rhodiola rosea using response surface methodology [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(10): 101
- [13] Tubio G. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycols) of different molecular weight and sodium citrate[J]. J Chem Eng Data, 2006, 51: 209.
- [14] Luciana pellegrini malpiedi. liquid-liquid equilibrium phase diagrams of polyethyleneglycol + sodium tartrate + water two-phase systems[J]. J Chem Eng Data, 2008, 53: 1175.
- [15] Zhang J. Extraction of theanine from waste liquid of tea polyphenol production in aqueous two-phase systems with cationic and anionic surfactants[J]. Chin J Chem Eng, 2013, 21(1): 31.
- [16] Li. Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 826: 58.
- [17] Freire M G. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids[J]. Green Chem, 2010, 12: 1715.
- [18] Cao Q. Extraction and determination of papaverin in pericarpium papaveris using aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)-(NH₄)₂SO₄ coupled with high-performance liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 590: 187.

- [19] Silverio S C. Effect of aqueous two-phase system constituents in different poly(ethylene glycol)-salt phase diagrams [J]. *J Chem Eng Data*, 2012, 57: 1203.
- [20] 于晔. 水溶液中铵离子 pKa 值的理论计算[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28: 709.
- [21] Sun C. Study on aqueous two-phase extraction of L-phenylalanine by polyethylene glycol/salt system [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(06): 324
- [22] Madeira P P. Salt effects on solvent features of co-existing phases in aqueous polymer/polymer two-phase systems [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 229: 38.
- [23] Asenjo J A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 8826.
- [24] Gan L. Aqueous two-phase extraction for enrichment and separation of phycocyanin from nostoc [J]. *Journal of Huaqiao University: Natural Science*, 2011, 32(6): 672.