

# 丙酮/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系提取芦丁影响因素研究\*

## Study on the Influence Factors of Rutin Extraction by Acetone-ammonium Sulfate Aqueous Two-phase System

罗亚东<sup>1,2</sup>, 胡吉卓<sup>1</sup>, 杨银月<sup>1</sup>, 韦万兴<sup>1\* \* \*</sup>

LUO Ya-dong<sup>1,2</sup>, HU Ji-zhuo<sup>1</sup>, YANG Yin-yue<sup>1</sup>, WEI Wan-xing<sup>1</sup>

(1. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004; 2. 南宁市一锋生物科技有限公司, 广西南宁 530004)

(1. School of Chemistry & Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Nanning Yifeng Biotechnology Co., Ltd, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**【目的】研究丙酮/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相萃取体系对分离槐米中芦丁的影响因素。【方法】利用正交设计法进行优化, 并把 28.57% 的硫酸铵溶液与等体积的 70% 的丙酮混合溶液, 调至  $\text{pH}=9$  形成的双水相, 两相的体积比 ( $V_{\text{上}}/V_{\text{下}}$ ) 是 1.62。【结果】萃取体系的上相中芦丁含量达到 95.92%。【结论】丙酮/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  双水相萃取体系分离芦丁具有良好的选择性。

**关键词:** 槐米 芦丁 双水相

**中图分类号:** TQ460.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2014)03-0185-05

**Abstract:**【Objective】Study on the influence factors of Rutin Extraction from *Flos Sophorae Immaturus* by acetone-ammonium sulfate aqueous two-phase system. 【Methods】The technique conditions was optimized by orthogond test. The aqueous two-phase system ( $\text{pH} 9.0$ ) consisted of aqueous  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution (28.57%, W%) and acetone (70%, W%) in equal volume, and ratio of volume of two phases ( $V_1/V_h$ ,  $V_1$  is light phase,  $V_h$  is heavy phase) is 1.62. 【Results】By this extract system, the content of rutin in light phase is 95.92%. 【Conclusion】This result revealed that the aqueous liquid two-phase system was effective for separating rutin.

**Key words:** *Flos sophorae*, rutin, aqueous liquid two-phase

【研究意义】芦丁(Rutin)来源于芸香科和石楠科等植物, 其中槐米(*Flos sophorae*)中含量最大, 是提取芦丁的主要原料。芦丁物理特性明确<sup>[1]</sup>, 还有降低毛细血管通透性和脆性, 促进细胞增生和防止血细胞凝聚, 以及抗炎、抗过敏、利尿、解痉、镇咳、降血脂等功效<sup>[2,3]</sup>。芦丁还作为抗氧化剂和天然食用

黄色素应用于食品工业中<sup>[4]</sup>。【前人研究进展】目前, 已经报道了多种芦丁制备方法: 利用碱水提槐米, 然后酸沉淀法得到芦丁粗产品<sup>[5]</sup>; 利用壬酚基聚氧乙烯醚和碳酸氢钠混合溶液湿润处理原料后, 再用硼酸-石灰水溶液进行反复萃取, 提取液经过酸化后得到芦丁粗产品<sup>[6]</sup>; T型关联度分析法用于芦丁纯化, 先加热失活酶, 后用碱溶液渗漉提取, 再酸化提取液, 最后结晶得到芦丁, 含量可达 94.2%<sup>[7]</sup>; 利用 70% 的乙醇提取, 然后经过反复结晶可得到 89% 纯度的芦丁产品<sup>[8]</sup>; 芦丁粗产品经过葡聚糖凝胶色谱柱分离可得到高纯度芦丁(纯度 98% 以上)<sup>[9]</sup>; 醇提取得的溶液经过苯乙烯基大孔树脂吸附, 洗脱后结晶可得到 95% 纯度的芦丁<sup>[10,11]</sup>; 用 D16 大孔吸

收稿日期: 2014-04-10

修回日期: 2014-04-25

作者简介: 罗亚东(1968-), 男, 硕士, 主要从事天然有机化学研究。

\* 广西自然科学基金项目(2011GXNSFD018016), 广西高校大学生创新创业计划项目(1301053)资助。

\* \* 通讯作者: 韦万兴(1963-), 男, 教授, 主要从事天然有机化学研究。E-mail: wxwei@gxu.edu.cn.

附树脂对苦荞中芦丁进行吸附,洗脱后可得到纯度为 38.76% 芦丁<sup>[12]</sup>。用高速逆流色谱法分离石椒草中芦丁,从粗提取物中得到纯度高于 99% 的芦丁<sup>[13]</sup>。利用以上的方法,要得到高纯度的芦丁,存在分离过程复杂,制备量少等问题。近年来,双水相萃取技术因具有简单易行、低温、容易放大和生物活性保持较好等特点被广泛应用于生物产品的分离和纯化过程。传统的双水相体系多为水溶性高分子化合物,其成本较高,回收利用困难。随着双水相技术的不断发展,以低分子有机溶剂代替高分子有机溶剂的普通有机物型双水相体系,具备价廉、低毒、溶剂的回收利用及环保处理简单等特点,又由于组成成分的极性较大,尤其适用于极性物质的提取和纯化<sup>[14]</sup>。这使双水相萃取工艺工业化有可能成为现实<sup>[15]</sup>。【本研究切入点】通过实验筛选适合于芦丁萃取的双水相体系:丙酮/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>双水相体系,利用芦丁在水中溶解度较小、在极性有机溶剂中溶解度较大的性质将芦丁转入到丙酮有机相中,以期获得较为理想的提纯率,为芦丁纯化的工业化生产提供一种新方法。【拟解决的关键问题】由于在双水相萃取分离中,萃取体系中两相的组成会影响分离效率,所以我们通过研究双水相组成与分离效率的关系,确定分离条件和方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

槐米购于桂林市,芦丁标准品由中国药品生物制品检定所提供(100080-200707),丙酮、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等均为分析纯。

SHIMADZU UV2450 紫外可见分光光度计, WATERS e2695 高效液相色谱仪, METTLER TOLEDO AB304-S 电子分析天平, HH-H6 数显恒温水浴锅由金坛市医疗仪器厂提供; SARTORIUS PB-10 酸度计。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 粗提取物的制备

称取槐米粉 100g,加至 700g 饱和 Ca(OH)<sub>2</sub> 溶液中,混合,调节 pH 值为 9,恒温水浴加热至 60℃。提取时间 60min,趁热过滤。滤渣重复提取两次,合并滤液,用旋转蒸发器进行减压蒸发浓缩,盐酸试液调节 pH 值为 4,得到芦丁粗品沉淀,过滤取沉淀真空干燥至衡重,用 1.2.3 节的方法计算得芦丁含量为 61.625%。

#### 1.2.2 总黄酮含量 UV 测定

参考《中国药典》2010 年版第 1 部槐花项<sup>[16]</sup>中的方法。标准品溶液的制备:取芦丁标准品 50mg,精密称定,置 25mL 量瓶中,加甲醇适量,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀。再精密量取 10mL,置 100mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得(每 1mL 中含芦丁 0.2mg)。标准曲线的绘制:精密量取标准品溶液 1mL、2mL、3mL、4mL、5mL 与 6mL,分别置 25mL 量瓶中,各加水至 6.0mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1mL,混匀,放置 6min,加 10% 硝酸铝溶液 1mL,摇匀,放置 6min,加氢氧化钠试液 10mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15min,以相应的试剂为空白,按照紫外-可见分光光度法(中国药典 2010 年版一部附录 V A),在 500nm 波长处测定吸收度,其回归方程为  $y = 12.553x - 0.0304$ ,相关系数为 0.999。

#### 1.2.3 芦丁含量 HPLC 测定方法

同样参考《中国药典》2010 年版第 1 部槐花项<sup>[16]</sup>中的方法。标准品溶液的制备:取芦丁标准品适量,精密称定,加甲醇制成 0.1mg/mL 芦丁溶液。色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱(5μm, 4.6mm × 250mm);以甲醇-1% 冰醋酸溶液(32:68)为流动相;流动相流速为 1.0mL/min;检测波长为 257nm。标准品溶液与供试品溶液进样量各 10μL。

#### 1.2.4 芦丁在丙酮/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>双水相体系中的实验

在丙酮/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>双水相体系中改变丙酮浓度、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液浓度、体系 pH 值和粗提取物加入量,研究芦丁在双水相中的分配行为,以芦丁含量接近 100% 为最佳条件进行单因素实验,在单因素实验的基础上进行正交实验。

##### 1.2.4.1 丙酮浓度对芦丁双水相萃取的影响

分别称取 5 份粗提取物 0.5g,溶解在 10mL 28.57% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液中,分别加入等体积含量为 100%, 90%, 80%, 70% 的丙酮溶液超声 2min,震荡溶解,静置分相。

##### 1.2.4.2 pH 值对芦丁双水相萃取的影响

分别称取 6 份粗提取物各 0.5g,溶解在 10mL 28.57% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液中,加入等体积的 70% 的丙酮溶液中超声 2min,分别用盐酸或 NaOH 试液调 pH 值为 5、6、7、8、9,静置分相。

### 1.2.4.3 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液浓度对芦丁双水相萃取的影响

分别称取 5 份粗提取物 0.5g, 分别溶解在 10mL 16.67%、23.08%、28.57%、33.33%、37.50% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液中, 加入等体积的 70% 的丙酮溶液中超声 2min, 分别调 pH 值为 9, 震荡溶解, 静置分相。

### 1.2.4.4 粗提物的量对芦丁双水相萃取的影响

分别称取粗提取物各 0.3g、0.4g、0.5g、0.6g、0.7g、0.8g, 分别加入 10mL 33.33% 的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液, 加入等体积的 70% 的丙酮溶液中超声 2min, 分别调 pH 值为 9, 震荡溶解, 静置分相。

## 2 结果与分析

### 2.1 丙酮浓度对芦丁双水相萃取的影响

图 1 结果显示, 当丙酮浓度小于 70% 时, 不形成双水相。加入 100%, 90%, 80%, 70% 的丙酮溶液与 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液所形成的双水相的相比 ( $R = V_{上}/V_{下}$ ) 分别为 5.88, 3.70, 2.13 和 1.67。当丙酮浓度等于 60% 时, 与等体积的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液完全互溶不分层。初提物在 100%, 90%, 80%, 70% 丙酮溶液与等体积的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液形成的双水相中进行分配达到平衡后, 分别取上相溶液, 用紫外分光光度计测量总黄酮的含量, 用 1.2.2 节的方法计算出总黄酮的含量。可以看出, 随着两相中丙酮含量的增大 (70%~80%), 总黄酮含量上升。但丙酮含量的进一步提高 ( $\geq 80\%$ ), 黄酮和其它成分在上下两相中的分配系数 ( $K = C_{下}/C_{上}$ ,  $C_{下}$  为下相中总黄酮及其它成分的浓度,  $C_{上}$  为上相中总黄酮的浓度) 降低, 更容易进入上相溶液, 从而导致了萃取液 (上相溶液) 中总黄酮含量的降低。

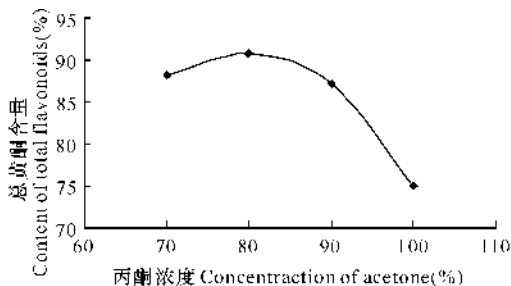


图 1 丙酮浓度对分离效果的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of acetone on the content of total flavonoids

### 2.2 pH 值对芦丁双水相萃取的影响

图 2 结果显示, 在  $pH \leq 6$  时, 槐米提取物不完全溶解在溶液中, 不在两相中进行分配, 不能用于萃

取分离。在较高酸度的溶液中, 芦丁完全处于游离的状态, 极性相对较弱的芦丁难以溶解在酸性含盐溶液中。但 pH 值提高至中性和弱碱性时, 极性增大使得芦丁变得较容易溶解在溶剂中。

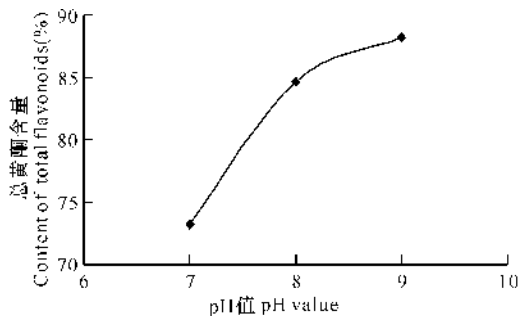


图 2 pH 值对分离效果的影响

Fig. 2 Effect of pH value of total flavonoids

### 2.3 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度对芦丁双水相萃取的影响

图 3 结果显示, 当 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度大于 33.33% 时, 有 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 晶体析出。再分别测定不同浓度 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液双水相体系中分离效果, 结果显示 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度对两相的体积比和组分在两相中分配系数产生影响: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度变大时, 使得上相中更多的水进入下相, 并使得上相溶液的极性相对下降, 使得芦丁在上相的溶解度增大, 但过大的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度将使得其它杂质更多的进入上相, 导致芦丁含量的降低。

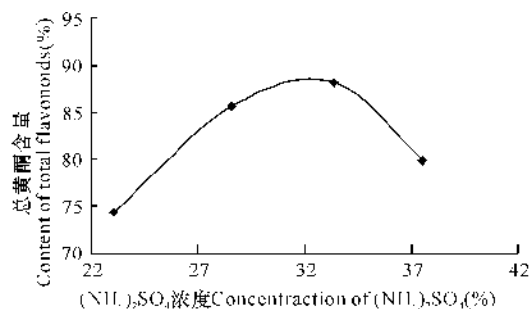


图 3 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度对分离效果的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the content of total flavonoids

### 2.4 粗提物的量对芦丁双水相萃取的影响

当芦丁粗提物加入量过大时会产生沉淀, 在加入量为 0.5g 时, 芦丁溶解度最大, 大于 0.5g 时出现溶不完全现象。

### 2.5 正交实验

根据单因素实验结果, 双水相萃取芦丁受到 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液浓度 (I)、pH 值 (II)、丙酮浓度

(Ⅲ)、芦丁粗提物的量等因素的影响,芦丁粗提物最大溶解量为 0.5g/10mL,为优化提取工艺条件,对其余 3 个因素渐进行正交实验,选择  $L_9(3^4)$  进行实验设计,实验因素、水平安排如表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平/因素 Levels/Fac- tors	I (%)	II	III (%)
1	23.08	7	90
2	28.57	8	80
3	33.33	9	70

根据表 1 正交实验的因素、水平安排,实验选择正交表进行实验安排,用 1. 2. 3 节的方法计算出芦丁的含量,实验结果及极差分析结果见表 2。

表 2 正交实验结果及极差分析表

Table 2 Result of the orthogonal experiment and range analysis

水平/ 因素 Levels/ Factors	I (%)	II	III (%)	芦丁 含量 Content of rutin (%)
1	1	1	1	82.72
2	1	2	2	73.75
3	1	3	3	84.63
4	2	1	2	86.89
5	2	2	3	92.98
6	2	3	1	89.42
7	3	1	3	87.52
8	3	2	1	84.17
9	3	3	2	83.61
$K_1$	80.37	85.71	85.44	
$K_2$	89.76	83.63	81.42	
$K_3$	85.1	85.89	88.38	
R	9.4	2.31	7	

从表 2 结果可以看到,在  $(NH_4)_2SO_4$  水溶液浓度、溶液 pH 值、丙酮浓度 3 个因素中,在考察的水平范围内,对芦丁含量的影响的主次关系为 I ( $(NH_4)_2SO_4$  水溶液浓度) > III (丙酮浓度) > II (溶液 pH); 再通过比较各因素的 3 个水平芦丁含量  $K$  值的大小,可以得出在考察的因素水平范围内,最佳工艺条件为 I 2 II 3 III 3,即浓度为 28.57%  $(NH_4)_2SO_4$  水溶液 10mL, 70% 丙酮为 10mL, pH 值为 9,粗提物加入量为 0.5g,混合后形成双水相,可得到芦丁含量较高。

## 2.6 重复验证实验结果

根据正交实验的极差分析可得到最佳工艺条件,用上述最佳工艺条件重复实验 2 次,用 HPLC

法测芦丁的含量。从实验结果(表 3)可知,该工艺可行,重复性较好。

表 3 验证实验结果

Table 3 Result of confirmatory test ( $n=2$ )

序号 No.	芦丁含量 Content of rutin (%)	平均值 Average value (%)	RSD (%)
1	96.116		
2	95.720	95.918	0.3

## 3 结论

丙酮作为双水相中的一相时,  $(NH_4)_2SO_4$  水溶液浓度、溶剂 pH 值、丙酮浓度均对芦丁含量产生影响。本文通过单因素实验和 3 因素 3 水平正交实验,确定丙酮双水相提纯芦丁最佳工艺条件为浓度为 28.57%  $(NH_4)_2SO_4$  水溶液 10mL, 70% 丙酮为 10mL, pH 值为 9,粗提物加入量为 0.5g,混合后形成双水相,上、下相体积比是 1.62,取上相减压浓缩真空干燥得芦丁的含量为 95.92%。丙酮/ $(NH_4)_2SO_4$  双水相萃取体系分离芦丁具有良好的选择性。

## 参考文献:

- [1] 刘布鸣,黄艳,李齐修,等. 瑶药白背清风藤的化学成分研究[J]. 广西科学,2014,21(3):257-259.  
Liu B M, Huang Y, Li Q X, et al. Chemical constituents of *Sabia discolor dunn*[J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(3):257-259.
- [2] Oetti P R, Borgoglio A, De Paslale A, et al. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-lined fluorescence by aminoguanidine and rutin[J]. Diabetes, 1990, 39(7):796-801.
- [3] 陈丽,葛为公,裴世成,等. 芦丁壳聚糖缓释片体外释放度研究[J]. 广西科学,2009,16(4):438-440.  
Chen L, Ge W G, Pei S C, et al. Study on the in vitro release rate of Rutin Sustained-release Tablets containing chitosan[J]. Guangxi Sciences, 2009, 16(4):438-440.
- [4] 杨云. 芸香苷天然食用黄色素的改性研究[J]. 食品科学,1992,8:6-8.  
Yang Y. Study on modification of rutin natural edible yellow pigment[J]. Food Science, 1992, 8:6-8.
- [5] 纪大泽. 碱水冷浸提取芦丁[J]. 四川大学学报:自然科学版,1991,28(2):265-267.  
Ji D Z. Alkaline water immersion extraction of rutin[J]. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 1991, 28(2):265-267.

- [6] 翟广玉,寇娴,王桂红,等.连续萃取法从槐米中提取芦丁的新工艺[J].精细化工,2003,20(8):498-500.  
Zhai G Y, Kou X, Wang G H, et al. A new technology of continuous extraction of rutin from *Sophora japonica* buds[J]. Fine Chemicals, 2003, 20(8): 498-500.
- [7] 李玉山,王经安. T型关联度分析法优化芦丁提取纯化工艺[J]. 化学试剂, 2009, 31(4): 305-306.  
Li Y S, Wang J A. Optimization for extraction and purification of rutin by T's correlation degree method[J]. Chemical Reagents, 2009, 31(4): 305-306.
- [8] 涂瑶生,施之琪. 槐米中芦丁提取纯化工艺研究[J]. 海峡药学, 2010, 1: 49-51.  
Tu Y S, Shi Z Q. Study on extraction and purification of rutin from *Fos sophorae* [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 1: 49-51.
- [9] 赵文彬,许玉华,王鲁石,等. 芦丁的纯化及其含量测定[J]. 时珍国医国药, 2007(4): 876-878.  
Zhao W B, Xu Y H, Wang L S, et al. The purification and determination of rutin[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007(4): 876-878.
- [10] Kim K H, Lee K W, Kim D Y, et al. Optimal recovery of high-purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckwheat) by extraction, fractionation, and recrystallization[J]. Biore-sour Technol, 2005, 96: 1709-1712.
- [11] Zhao Z, Dong L, Wu Y, et al. Preliminary separation and purification of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold extracts by macroporous resins[J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89: 266-272.
- [12] 刘金玉,吴秀华,商雪娇,等. 不同大孔吸附树脂对苦荞芦丁分离纯化效果的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 22-24.  
Liu J Y, Wu X H, Shang X J, et al. Study of the effect of separation and purification of rutin from tartary buckwheat with different macro-porous resin [J]. Food Research and Development, 2008, 29(7): 22-24.
- [13] 尹连红,许丽娜,韩旭,等. 高速逆流色谱快速分离制备石椒草中高纯度芦丁对照品[J]. 大连医科大学学报, 2007, 29(6): 532-534.  
Yin L H, Xu L N, Han X, et al. Preparative isolation and purification of rutin from *Boenninghausenia sessilicarpa* Lévl by high speed counter-current chromatography [J]. Journal of Dalian Medical University, 2007, 29(6): 532-534.
- [14] 卢俊彩,崔岩岩,陈火林,等. 丙酮-硫酸铵双水相体系分离纯化红花红色素[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(6): 679-682.  
Lu J C, Cui Y Y, Chen H L, et al. Separation and purification of carthamine from *carthamus tinctorius* by acetone-ammonium sulfate aqueous two-phase system [J]. Chemical Research and Application, 2007, 19(6): 679-682.
- [15] 王吉辉. 双水相体系对葛根中葛根素的萃取技术的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2007.  
Wang J H. Study on the extraction technology of Puerarin in aqueous two phase system of radix puerariae [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007.
- [16] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 2010年版一部. 北京:中国医药科技出版社.  
State Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia [M]. 2010 Part I. Beijing: China Medical Science Press.

(责任编辑:尹 闯)