

甲醇氨水提取黄木中桑色素含量的方法优化

秦玲 任一诺 陈佳佳 张嫚玲 张伊敏 孙建永*

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的 探究黄木中桑色素提取和检测方法。方法 以四个不同产地黄木为样品,经除脂、提取后用固相萃取柱净化,用高效液相色谱仪检测桑色素的含量。结果 氨水-75%甲醇作为除脂溶液能够优化除脂过程。甲醇氨水提取液提取效果较好。20%甲醇-80%乙酸铵梯度洗脱使五种色素分离明显。在特征波长 254nm、柱温 30℃条件下桑色素的分离效果好,灵敏度和准确度高。结论 黄木样品经氨水-75%甲醇除脂、甲醇氨水提取后,在 20%甲醇-80%乙酸铵溶液流动相梯度洗脱、柱温 30℃条件下分离桑色素效果较好,特征波长 254nm 条件下检测桑色素效果较好。

关键词: 黄木; 桑色素; 提取; 检测

Optimization of extraction method of mulberry pigment from Yellow wood with methanol and ammonia

QIN Ling, REN Yi-nuo, CHEN Jia-jia, ZHANG Man-ling, ZHANG Yi-min, SUN Jian-yong

(Changsha Medical university, Changsha 410219, China)

Abstract: Objective To explore the extraction and detection methods of mulberry pigment in yellow wood. Methods Four yellow wood samples from different origin were purified by solid phase extraction column after fat removal, and the content of mulberry pigment was detected by high performance liquid chromatography. Result Ammonia -75% methanol as a defat solution can optimize the defat process. The extraction effect of methanol ammonia water was better. The separation of five pigments was evident by gradient elution of 20% methanol and 80% ammonium acetate. Under the condition of characteristic wavelength 254nm and column temperature 30℃, the separation effect of mulberry pigment is good, and the sensitivity and accuracy are high. Conclusions The yellow wood samples were delipified by ammonian-75% methanol and extracted by methanol-ammonia water. The results showed that the separation of mulberry pigment was better under the condition of mobile phase gradient elution of 20% methanol-80% ammonium acetate solution and column temperature of 30℃, and the characteristic wavelength of 254nm was better for the detection of mulberry pigment.

Keywords: Yellow wood; Mulberry pigment; Extract; detection

桑色素是由黄木植物中提取获得的天然活性物质,因富含黄酮等抗氧化、抗癌活性物质,其药用价值在祖国医学相关实践或理论中得到确证^[1-2]。当前关于桑色素药理作用方面,其对免疫系统的调节、抗肿瘤效应、捕获自由基发挥抗氧化作用机制越发明确,但关于桑色素提取和检测的研究相对较少,不利于该物质广泛提取应用^[3]。桑色素的检测方法有高效液相色谱法、薄层色谱法、紫外-可见分光光度法等,很多方法包括前处理只适用于检测基质比较简单的食品,对于一些蛋白质含量高且基质复杂的物质却不能准确测定其中的含量^[4]。桑色素作为医药保健和植物化学领域研究的热点之一,不断优化黄木中桑色素提取和检测方法,意义广泛而深远。

1 材料和方法

1.1 实验材料:为湖南、广东、四川、贵州四地种植黄木。

1.2 仪器和试剂:①主要仪器包括:天恒 HNSP-2017-050 电子天平、岛津 LC-2017A 高效液相色谱仪、美国 SI-T246 涡流混合器、湘仪 H1850R 台式高速冷冻离心机、塞普瑞 SPR-SPE24 固相萃取装置。②主要试剂包括:氨水-75%甲醇(1:99)、甲醇、15%氨水甲醇、桑色素标准混合溶液、流动性 A 相(乙酸铵溶液)、流动相 B 相(色谱甲醇)。

1.3 色谱条件:色谱柱:C18 柱(4.6mm×250mm,5μm)。流动相:甲醇-乙酸铵溶液(0.02mol/L)梯度洗脱,流速 1.0mL/min,检测波长为 254nm。柱温:30℃。进样量:10μL。

1.4 样品处理:①称量:样品经绞碎机绞碎后称取 5g 于 50ml 离心管。②提取上清液:分为样品组和样品加标组。在样品加标组中加入适量混合标准品溶液。样品组和样品加标组加入 20ml 氨水-75%甲醇溶液,混合均匀,在混合涡旋器涡旋 1min,后放入超声清洗器中超声 30 分钟。超声完再次涡旋 1 分钟混合均匀,经高速离心机(6000r/min)离心 3min,取上清液 5mL 用 20%柠檬酸溶液调 pH 至 3~4,再次高速离心(6000r/min)3min 即得上清液。③过柱处理:安装食品中合成着色剂专用 SPE 小柱于固相萃取装置上,先用甲醇溶液清洗一遍小柱,加入 5mL 甲醇溶液活化,加入 5mL 去离子水平衡,取上清液以约 1ml/min 的流速过柱,待上清液全部过柱后,加入 5mL 甲醇:甲酸:水(4:2:4)进行淋洗柱子,最后加入 5mL 氨水(15%)甲醇洗脱,分两次进行。洗脱完之后直接在 10mL 管中加入去离子水定容至 5mL,供高效液相色谱分析。④标准曲线的配制和测定:配制浓度分别为 1、2、5、10、20μg/mL 的混合标准品溶液,进样量为 10μL,上机测定,记录保留时间和峰面积,外标峰面积法定量^[5-6]。

1.5 质量控制:每次样品检测时都需绘制校准曲线,与样品平行操作,消除样品本身的其它因素影响,标准系列制作 6 个点,根据浓度和吸光值绘制校准曲线,列出回归方程,其相关系数应不小于 0.995;当样品的吸光度不在标准曲线范围内时,适当对样品浓度进行稀释,使样品的吸光度值控制在标准曲线范围内^[7]。

1.6 统计分析: 用 SPSS 20.0 统计分析软件进行分析, 结果用均数、标准差、方差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线性关系和检出限

用移液枪准确吸取一定量色素标准品溶液, 混合去离子水定容至 10 mL, 制成混合标准溶液。配制浓度分别为 1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准曲线溶液至进样小瓶, 上机进样。浓度做横坐标, 峰面积做纵坐标, 计算线性方程和相关系数, 结果显示线性系数为 0.9997, 线性关系良好 ($Y = 0.1826X + 0.0404$, 检出限 0.50 mg/kg), 符合实验要求。

2.2 回收率和相对标准偏差

样品加标组和样品组上机检测, 计算回收率和相对标准偏差。重复实验 6 次, 计算相对标准偏差。采用基质曲线定量, 计算加标回收率, 以回收率的相对标准偏差 RSD 作为方法的精密度。

表 1 回收率和相对标准偏差

样品来源	加标量 (mg/kg)	平均测定 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
湖南	5.0	4.55	91.7	2.36
广东	5.0	4.56	92.5	1.54
四川	5.0	4.52	86.5	1.73
贵州	5.0	4.55	91.2	2.66

2.3 检测方法优化

①除脂溶液的选择优化: 选择用氨水-75%甲醇作为除脂溶液, 与腊肉中脂肪发生皂化反应, 生成可溶于水的甘油和脂肪酸盐, 除去脂肪。选择氨水-75%甲醇溶液与石油醚作除脂液比较实验回收率, 说明氨水-75%甲醇溶液可以达到除脂要求, 且回收率较高。

②样品提取液的优化: 通过比较甲醇、水、甲醇氨水作为提取液提取腊肉样品中的色素, 用去离子水提取效果较差, 回收率仅 30%~40%, 用甲醇提取, 回收率为 50%~70%, 表明甲醇氨水的提取效果最好, 回收率为 85%~98%, 对色谱柱的使用寿命也伤害较小。但在调节 pH 时应用柠檬酸溶液调至 3~4, 易于样品提取液过 SPE 小柱, 保持回收率良好。③检测波长和色谱条件的选择: 采用梯度洗脱的方式很容易实现基线分离, 选择 254 nm 为特征检测波长进行样品中色素的定量分析, 缩短检测时间, 提高检测灵敏度和准确。④柱温的选择: 结果显示, 不同柱温对应柱压分别是: 25℃ (24 MPa)、30℃ (20 MPa)、35℃ (15 MPa)、40℃ (11 MPa)。在不影响分离且 not 损坏色谱柱的基础上, 选用 30℃ 作为分析的柱温条件, 既接近常温, 又有较合适的柱压。

3 讨论

本实验样品加标组加标回收率在 86%~97% 之间, 回收率良好, 相对标准偏差均小于 4%, 表明优化后的检验方法适用于检测黄木中的色素。采用氨水-75%甲醇溶液作为除脂溶液, 操作简便, 优化除脂过程, 回收率良好。有研究先用乙醚混合样品振荡除脂, 后弃去乙醚, 反复处理 3 次后用氮气将乙醚挥尽再提取, 除脂步骤

冗长, 用氮气挥发乙醚需要一定时间, 不适用于快速检测色素^[8-9]。

本实验通过比较甲醇、水、甲醇氨水作为提取液提取样品中的色素, 回收率结果比较表明甲醇氨水的提取效果最好, 与除脂溶液成分相同, 减少提取过程中不同溶液造成的干扰, 优化提取过程。有相关实验通过比较水、乙醇、乙醇氨水作为提取液的提取效果, 乙醇氨水的提取效果最好, 并在提取过程中发现加入 1% 浓度氨水的提取效率最高, 后通过聚酰胺吸附法提取合成色素, 聚酰胺吸附提取效果较不稳定, 对回收率有影响^[10]。本实验采用甲醇-乙酸铵溶液进行梯度洗脱, 不同组分的流动相直接影响着色剂的分离效果。乙酸铵的初次洗脱比例为 80%, 缩短洗脱时间, 提高了检测的灵敏度和准确性。

参考文献:

- [1] 邵艳, 黄英, 浦锦宝. 高效液相色谱一测多评法同时测定益肺胶囊中苦杏仁苷、新芒果苷、芒果苷、异芒果苷、桑皮苷 A、桑辛素 M 和二氢桑色素的含量 [J]. 中国药物应用与监测, 2021, 18(4): 220-224.
- [2] 黄婷. 桑椹红色素的双水相生物转化及分离纯化研究 [D]. 江苏科技大学, 2021.
- [3] 丁晓远. 桑黄总黄酮提取工艺及桑色素 pH 敏感脂质体的研究 [D]. 安徽农业大学, 2019.
- [4] 张齐. 桑叶黄酮的提取及黄酮类成分桑色素的抗癌活性研究 [D]. 合肥工业大学, 2018.
- [5] 夏克东, 刘斯博, 李林芽, 等. HPLC 测定星油藤饼和蛋白中桑色素、橙皮素、柚皮素和单宁的含量 [J]. 中国油脂, 2017, 42(3): 131-134, 139.
- [6] 杨迎春, 冯媛媛, 印红玲, 等. 基于过氧化氢-桑色素化学发光体系的硫化物检测 [J]. 发光学报, 2011, 32(2): 194-199.
- [7] 周林, 徐立, 余茂德, 等. 新疆药桑枝中桑色素的提取分离及鉴定 [J]. 食品科学, 2011, 32(2): 76-78.
- [8] 吕宁, 张培培, 吴丽娜, 等. 桑色素的药理作用研究进展 [J]. 山东化工, 2022, 51(16): 84-88.
- [9] 冉丹, 罗苏苏, 张可欣, 肖玥惠子, 王淑霞, 徐思敏, 李萌. HPLC 法检测蜜饯中 20 种合成着色剂含量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(16): 281-289.
- [10] 白玛桑姆, 杨晓雯, 马烽, 周启武, 刘晓学, 王磊, 赵宝玉. 苦马豆生物碱成分薄层色谱分析 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(6): 58-61.

作者简介: 秦玲 (2000 年-), 女, 湖南永州人, 本科, 研究方向为溃疡性结肠炎临床治疗及机制。

通信作者: 孙建永 (1979 年-), 男, 内蒙古兴安盟乌兰浩特人, 本科, 高级实验师, 研究方向为临床应用解剖学。

基金项目: 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (湘教通 [2021] 197 号, 编号 3878; 湘教通 [2020] 191 号, 编号 3966); 湖南省教育厅科研项目 (编号 20C0190)。