

双水相体系萃取虎舌红皂苷及稳定性研究

韩春然¹, 庄星光¹, 邵金华^{1,2}, 王鑫¹, 黎晨晨¹

(1.哈尔滨商业大学 食品工程学院省高校食品科学与工程重点实验室, 哈尔滨 150076;

2.湖南科技学院, 永州 425199)

摘要: **目的** 选用聚乙二醇(PEG)-硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系萃取虎舌红皂苷,并研究皂苷的稳定性。**方法** 以萃取率为指标,考察水浴时间、水浴温度、PEG平均分子量、PEG质量分数、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数、体系pH值对萃取效果的影响,采用响应曲面法对萃取条件进行优化,并对虎舌红皂苷进行稳定性研究。**结果** 得到了最佳萃取条件,水浴时间为40 min,水浴温度为70℃,PEG600质量分数为25.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为21.0%,pH值为6.20,此时虎舌红皂苷的萃取率为4.73%。研究表明,虎舌红皂苷适于保存在20℃以下、pH为6的低温微酸性环境中。**结论** 此体系的建立能有效萃取虎舌红皂苷,为其后续研究提供参考依据。

关键词: 皂苷;双水相体系;虎舌红;萃取率;稳定性

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:1001-3563(2019)05-0026-08

DOI:10.19554/j.cnki.1001-3563.2019.05.004

Extraction of Saponins from *Ardisia Mamillata* by Aqueous Two-phase System and Stability of Saponins

HAN Chun-ran¹, ZHUANG Xing-guang¹, SHAO Jin-hua^{1,2}, WANG Xin¹, LI Chen-chen¹

(1.Key Laboratory of Food Science and Engineering, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076,China; 2.Hunan University of Science and Technology, Yongzhou 425199, China)

ABSTRACT: The paper aims to extract saponins from *Ardisia mamillata* by polyethylene glycol (PEG)-ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ two-phase system to study the stability of saponin. The effects of water bath time, temperature, PEG average molecular weight, PEG mass fraction, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mass fraction and pH on the extraction efficiency were observed with the extraction rate of saponins in the system as index. The optimum extraction conditions were optimized by response surface methods, and the stability was studied. The results showed that the water bath time was 40 minutes and the temperature was 70℃, PEG600 mass fraction, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mass fraction and pH was 25.0%, 21% and 6.20, respectively. Under these conditions, the extraction rate of saponins was 4.73%. *Ardisia mamillata* saponins was suitable for preservation at temperatures below 20℃ and pH 6. The establishment of this system can effectively extract saponins from *Ardisia mamillata* and provide reference for its follow-up study.

KEY WORDS: saponins; aqueous two-phase system; *Ardisia mamillata*; extraction rate; stability

收稿日期:2019-01-11

基金项目:湖南省自然科学基金(2018JJ3194)

作者简介:韩春然(1970—),女,博士,哈尔滨商业大学教授,主要研究方向为果蔬贮藏与加工。

通信作者:王鑫(1984—),女,博士,工程师,主要研究方向为食品生物技术。

虎舌红 (*Ardisia mamillata*) 为紫金牛科 (*Myrsinaceae*) 紫金牛属 (*Ardisia*) 植物, 又称红毛毡、宝鼎红、天仙红衣、毛凉伞、金丝红珠, 常见于岭南山区, 药用价值较高, 有治跌打, 清利热, 治疗肝炎、胆囊炎等功效^[1]。目前关于虎舌红活性成分的研究多集中于挥发油^[2]、多糖^[3]、黄酮类^[4]等, 关于皂苷的研究报道较为少见。研究表明, 紫金牛属植物中皂苷类化合物含量最高^[5], 且具有多种药理作用^[6] (抗肿瘤、抗病原生物、抗炎镇痛等), 所以探索一种高效、简捷、方便的虎舌红皂苷提取方法, 对于虎舌红皂苷的组成、结构及功能研究具有重要意义。

双水相体系萃取技术 (Aqueous Two Phase Extraction, ATPE) 是一种高效率、性温和的新型生物分离技术, 其特点是传质和分相速度快, 溶剂安全易回收处理, 分相操作简便, 加上其体系温和的特点也能起到保护生物物质活性的作用^[7]。双水相萃取技术应用领域广, 多用于分离生物活性物质, 例如黄酮^[8]、多糖^[9]、蛋白^[10]、皂苷^[11]等。植物中的天然成分被分离后, 在贮藏期间发生的变化对其生理活性的影响巨大。皂苷类化合物生理活性多样, 温度、时间、pH 等贮藏条件是影响其贮藏稳定性的重要因素。皂苷在稳定性降低后可能会发生降解或转化, 对于贮藏研究来说是不利的变化。研究贮藏稳定性后可为虎舌红皂苷在提取及纯化处理时提供参考, 为虎舌红药材和皂苷产品的制备提供科学依据, 这样才能更好地保证药材和制剂的质量。文中拟研究探索 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取虎舌红皂苷的条件, 并对其进行贮藏稳定性研究, 该研究对虎舌红的开发利用具有重要意义, 能为研究虎舌红皂苷功能奠定理论基础。

1 实验

1.1 材料与试剂

主要材料与试剂: 虎舌红, 采摘自湖南省永州市湖南科技学院西山; 人参皂苷 Rg1 标准品, 成都曼思特生物科技有限公司; 香草醛、高氯酸、各分子量 PEG、氢氧化钠、盐酸、(NH₄)₂SO₄ 等, 均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

主要仪器和设备: FW177 型中草药粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; HWS-26 型电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; FA1104B 型电子分析天平, 上海越平科学仪器有限公司; UV-5200 型紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; TG16-WS 型台式高速离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 皂苷含量的测定

采用香草醛-高氯酸显色法^[12], 准确吸取 100 μ L

待测液于具塞试管, 热风风干溶剂, 量取质量分数为 5% 的香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL 加入试管, 封口后 60 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 取出后立即置于冰水中冷却, 再加冰醋酸 5 mL 后摇匀静置 10 min, 甲醇溶液作为空白对照, 在波长 548 nm 处进行比色测定。

1.3.2 标准曲线的绘制

标准品人参皂苷 Rg1 干燥至恒质量后, 称取 5 mg 置于 5 mL 容量瓶中, 甲醇定容后作为标准品溶液。分别精密量取标准品溶液 30, 60, 90, 120, 150, 180 μ L 置于具塞试管中, 采用热风风干溶剂, 按方法 1.3.1 进行显色测定, 绘制标准曲线 (横坐标为皂苷质量, 纵坐标为吸光度值), 得出相关回归方程 $y=6.0819x+0.2204$ ($R^2=0.9984$, y 为吸光度值, x 为皂苷质量)。

1.3.3 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图的绘制

采用浊点滴定法绘制相图^[13]。操作方法: 室温条件下, 称取质量分数为 50% 的 PEG 溶液 10 g 置于锥形瓶中后, 逐滴滴入质量分数为 25% 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液, 同时摇晃锥形瓶, 当体系中出现浑浊时, 记录 (NH₄)₂SO₄ 溶液的滴加量; 再滴加去离子水至完全澄清, 记录所加水的质量, 重复操作至体系不再发生浑浊; 计算各个浊点时 PEG 和 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数, 绘制 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图。

1.3.4 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取虎舌红皂苷

将 PEG 和 (NH₄)₂SO₄ 溶液按照一定质量分数与虎舌红干粉混合并摇匀, 恒温水浴震荡处理一段时间后, 在 8000 r/min 条件下离心 10 min, 精确分离两相, 并测量上相体积和皂苷含量, 测定方法见 1.3.1。计算萃取率 R :

$$R=C_1V_1/m$$

式中: C_1 为上相中皂苷浓度 (mg/mL); V_1 为上相体积 (mL); m 为虎舌红干粉质量 (g); R 为皂苷萃取率 (%)。

1.3.4.1 单因素实验

以萃取率为指标, 对 PEG 平均分子量 (400, 600, 2000, 6000)、PEG 质量分数 (20%, 25%, 30%, 35%, 40%)、(NH₄)₂SO₄ 质量分数 (15%, 18%, 21%, 24%, 27%)、pH (4, 5, 6, 7, 8)、水浴温度 (30, 40, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}$ C)、水浴时间 (20, 30, 40, 50, 60 min) 进行单因素实验, 各进行 3 次平行实验。

1.3.4.2 响应曲面优化实验

基于单因素实验结果, 根据 Box-Behnken 设计原理, 确定实验的因素与水平。以皂苷萃取率为响应值, 通过响应曲面优化双水相萃取虎舌红皂苷条件, 实验因素和水平见表 1。

1.3.5 虎舌红皂苷稳定性研究

在温度为 30 $^{\circ}$ C, 保存时间为 48 h 的条件下, 考

表1 响应曲面实验设计因素和水平
Tab.1 Design factors and levels of response surface experimental design

水平	PEG 质量 分数/%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数/%	pH 值
-1	20	18	5
0	25	21	6
1	30	24	7

察不同 pH 值 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 对虎舌红皂苷保留率的影响。

在 pH 为 6, 保存时间为 48 h 的条件下, 考察不同温度 (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C) 对虎舌红皂苷保留率的影响。

在温度为 20 °C, pH 为 6 的条件下, 考察不同时间 (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d) 条件下虎舌红皂苷的保留率。

观察各组变化情况, 得出各因素对虎舌红皂苷稳定性的影响程度^[14-15]。各因素分别进行 3 次平行实验。保留率计算公式:

$$\text{保留率} = C_{\text{后}} / C_{\text{前}} \times 100\%$$

式中: $C_{\text{后}}$ 为保留后皂苷的质量浓度 (mg/mL); $C_{\text{前}}$ 为保留前皂苷的质量浓度 (mg/mL)。

1.4 数据分析

使用 SPSS17.0 软件分析实验数据, 以平均值±标准差表示。响应曲面实验设计使用 Design-Expert 8.0.6 软件进行。

2 结果与讨论

2.1 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图

PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图见图 1。各分子量 PEG 与 (NH₄)₂SO₄ 在质量分数较大的情况下均能形成双相, 但分子量不同的 PEG 与 (NH₄)₂SO₄ 构成的双水

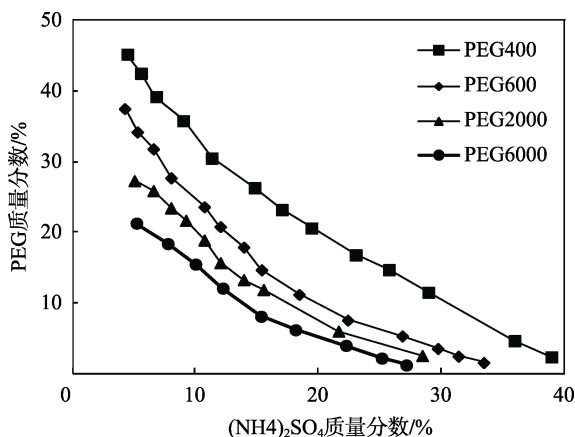


图1 PEG-(NH₄)₂SO₄ 双水相相图
Fig.1 Diagram of PEG-(NH₄)₂SO₄ two-phase phase

相体系双结线不同, 且分子量越小双结线越高。根据相图, 可以发现当成相物质的质量分数都处于双结线之上时才能成两相, 处于双结线之下时不能成两相, 或者说双结线之上为两相区, 之下为均相区。在相图绘制实验中发现, 随着 PEG 分子量的增大, 成相时间增加, 体系粘度增大, 相比减小。MURARI 等人^[16]在研究 PEG+(NH₄)₂SO₄+水形成的体系相图平衡数据和热力学模型时同样发现, 随着聚合物摩尔质量的增加, 两相区增大。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 PEG 平均分子量的确定

在室温 22~25 °C, (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 15%, PEG 质量分数为 35%, pH 为 7 的条件下, 考察 PEG 不同分子量对萃取效果的影响, 结果见图 2。

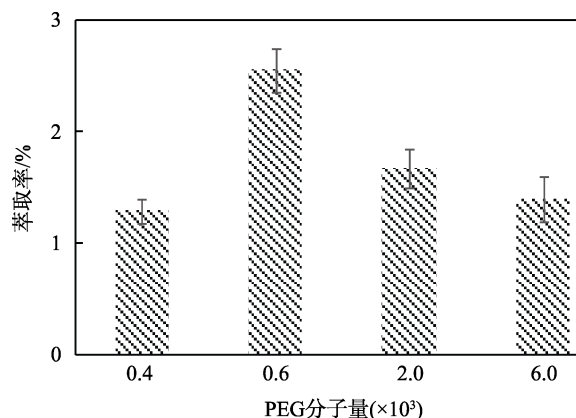


图2 PEG 平均分子量对萃取效果的影响
Fig.2 Effects of average molecular weight of PEG on extraction efficiency

当 PEG 分子量发生改变, 虎舌红皂苷萃取率发生变化。理论上 PEG 分子量出现增大时会影响疏水性, 并导致其增大, 使得分相时皂苷更容易集中于上相, 但大分子量 PEG 粘度很大, 会影响传质, 导致皂苷萃取率反而会下降。杜梦扬等^[17]在采用 PEG-无机盐体系进行萃取水榆花楸叶中总黄酮的实验中, 考察了 PEG 分子量从 1000~10 000 对萃取率的影响, 结果显示当 PEG 分子量为 1000 时萃取率最高, 与文中研究趋势相符。结果表明, 虎舌红皂苷在 PEG600-(NH₄)₂SO₄ 体系中的萃取率最高, 确定 PEG600 为后续实验的成相组成。

2.2.2 PEG600 质量分数的确定

在室温 22~25 °C, (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 15%, pH 为 7 的条件下, 考察 PEG600 质量分数对萃取效果的影响, 结果见图 3。

当体系中 PEG600 质量分数在 20%~40% 范围内时, 皂苷萃取率呈现先升高后降低的趋势。当 PEG600 质量分数为 20%, 萃取率较低, 而当质量分数为 25%, 萃取率达到最高 (3.69%), 随后随着质量分数的增加,

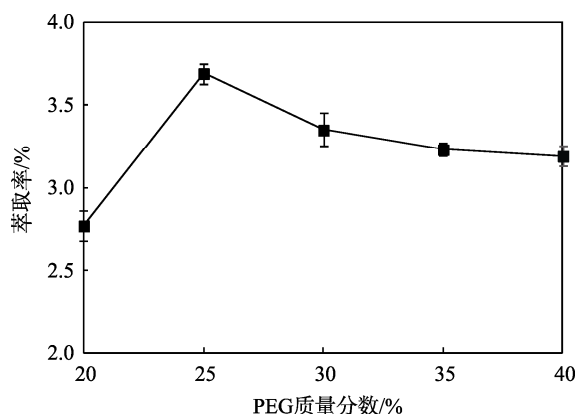


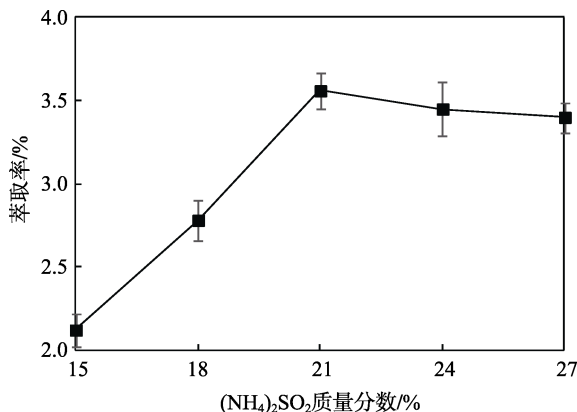
图 3 PEG 质量分数对萃取效果的影响

Fig.3 Effects of PEG mass fraction on extraction efficiency

萃取率又逐渐降低。出现此现象的原因是当质量分数增加时,体系中的疏水性也增大,使得皂苷趋于上相分布。当 PEG 质量分数过大时,体系中粘度也会增大,从而导致皂苷向上相运动过程受阻,出现萃取率又降低的现象。综上所述,选取 PEG600 质量分数 25% 作为体系构成。

2.2.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数的确定

在室温 22~25 °C, PEG600 质量分数为 25%, pH 为 7 的条件下,考察 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对萃取效果的影响,结果见图 4。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数的增大,体系中皂苷萃取率在质量分数 15%~27% 的区间内呈现先升高后降低的趋势,并且在 21% 时达到最高,所以选择 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 21% 作为体系构成。

图 4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对萃取效果的影响Fig.4 Effects of mass fraction of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on extraction efficiency

2.2.4 体系 pH 的确定

在室温 22~25 °C, PEG600 质量分数为 25%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为 21% 的条件下,考察体系 pH 对萃取效果的影响,结果见图 5。

当体系中 pH 逐渐增大,皂苷萃取率在 pH 为 4~8 的区间内先增大后减小,并且在 pH 为 6 时达到最大。出现此结果的原因可能是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为强酸弱碱盐,在双水相体系 pH 逐渐接近中性甚至达到弱碱性的过

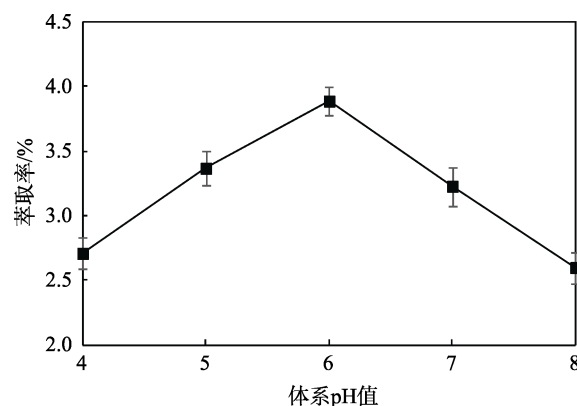


图 5 体系 pH 对萃取效果的影响

Fig.5 Effects of pH on extraction efficiency

程中,体系中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 有可能会发生中和反应,导致 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数减小,下相体积减小,从而导致萃取率呈现下降趋势^[8]。综上所述,将 6 选为体系 pH 值。

2.2.5 水浴温度及时间的确定

在考察水浴温度及水浴时间对 PEG600- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系萃取虎舌红皂苷的过程中,得到温度及时间对萃取效果的影响,结果见图 6。随着温度及时间的增加,萃取率逐步上升,达到

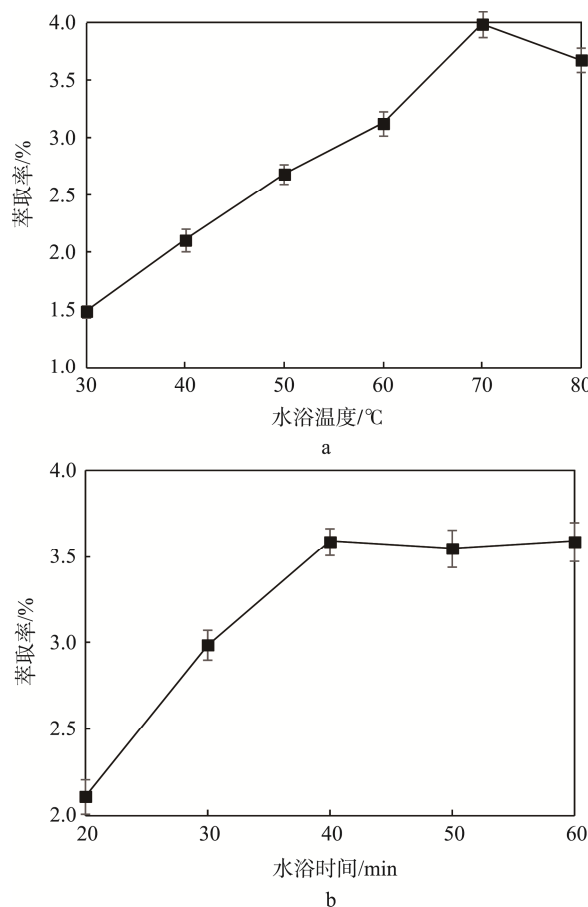


图 6 水浴温度及时间对萃取效果的影响

Fig.6 Effects of water bath temperature and time on extraction efficiency

一定程度时均不再增加。在后续实验设计中不再对温度和时间进行探讨,固定为温度 70 ℃,时间 40 min。

2.3 响应曲面优化双水相分离体系

2.3.1 响应曲面实验设计与实验结果

采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应曲面实验设计,选取 PEG600 质量分数、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数和体系 pH 这 3 个因素进行响应曲面实验。试验设计与结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果
Tab.2 Design and results of Box-Behnken test

试验号	PEG600 质量分数/%	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数/%	pH	萃取率/%
1	0	0	0	4.57±0.10
2	0	1	1	3.99±0.09
3	1	0	-1	3.87±0.09
4	-1	-1	0	3.76±0.11
5	0	-1	1	4.00±0.10
6	-1	0	-1	4.01±0.07
7	0	0	0	4.56±0.13
8	0	1	-1	4.23±0.11
9	0	0	0	4.55±0.12
10	-1	1	0	4.52±0.09
11	0	0	0	4.60±0.08
12	0	0	0	4.58±0.11
13	-1	0	1	4.09±0.09
14	1	0	1	3.99±0.09
15	1	1	0	4.41±0.10
16	1	-1	0	4.16±0.10
17	0	-1	-1	3.60±0.08

2.3.2 回归方程与方差分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 的数据进行多元回归拟合,并进行方差分析,结果见表 3。表 3 方差分析表明,模型的 F 值为 19.07, P 值小于 0.001,说明模型对体系分离效果极显著。获得关于体系中 PEG600 质量分数 (X_1)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 (X_2) 和 pH (X_3) 的二次多项回归模型方程:

$$Y=4.57+0.006X_1+0.2X_2+0.037X_3-0.13X_1X_2+$$

$$0.0001X_1X_3-0.15X_2X_3-0.17X_1^2-0.19X_2^2-0.41X_3^2$$

式中: Y 为萃取率 (%); X_1 为 PEG600 质量分数 (%); X_2 为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数 (%); X_3 为 pH。

表 3 方差分析
Tab.3 Analysis of variance

项目	自由度	平方和	F 值	P 值	显著性
模型	9	1.55	19.07	0.0004	***
X_1	1	3.125×10^{-4}	0.035	0.8576	
X_2	1	0.31	34.15	0.0006	***
X_3	1	0.011	1.25	0.0210	***
X_1X_2	1	0.065	7.21	0.0005	***
X_1X_3	1	4.000×10^{-4}	0.044	0.0180	*
X_2X_3	1	0.084	9.32	<0.0001	***
X_1^2	1	0.12	13.45	0.7354	
X_2^2	1	0.15	16.80	<0.0001	***
X_3^2	1	0.72	79.31	0.0004	***
残差	7	0.063			
失拟项	3	0.062	55.56	0.2305	
纯误差	4	1.480×10^{-3}			
总值	16	1.61			

注: $R^2=0.9608$, $R^2_{\text{Adj}}=0.9104$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.3.3 各因素交互作用的分析与优化

考察 PEG600- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相萃取虎舌红皂苷响应曲面实验各因素之间的交互作用对萃取率的影响,作出各交互作用响应曲面和等高线图(图 7—9)。

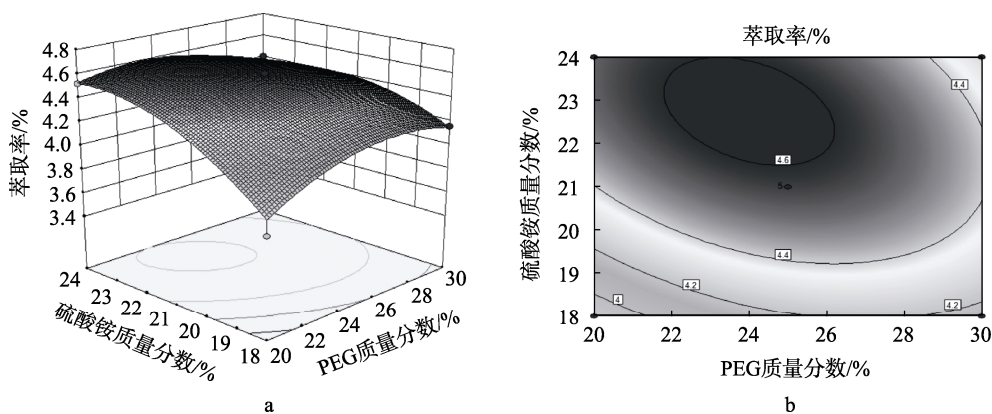


图 7 PEG600、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对皂苷萃取率的响应曲面、等高线

Fig.7 Response surface diagram and contour map of the mass fraction of PEG600 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the extraction rate of saponin

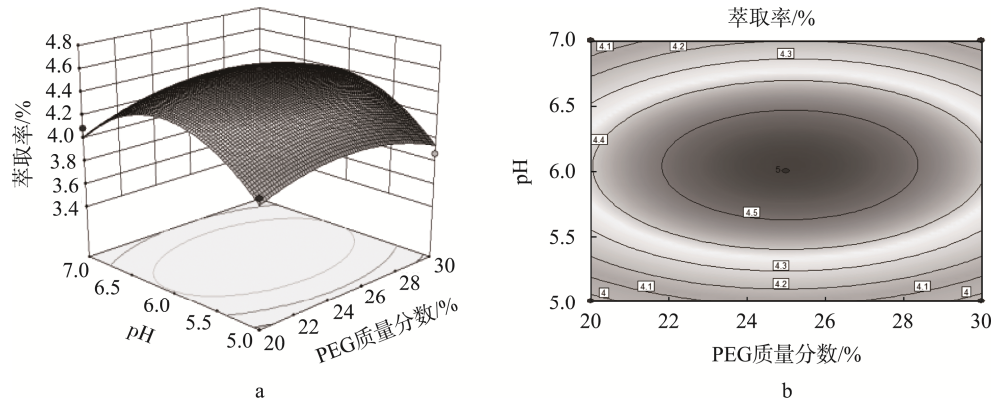


图 8 PEG600 质量分数、pH 对皂苷萃取率的响应曲面、等高线
Fig.8 Response surface diagram and contour map of PEG600 mass fraction and pH to saponin extraction rate

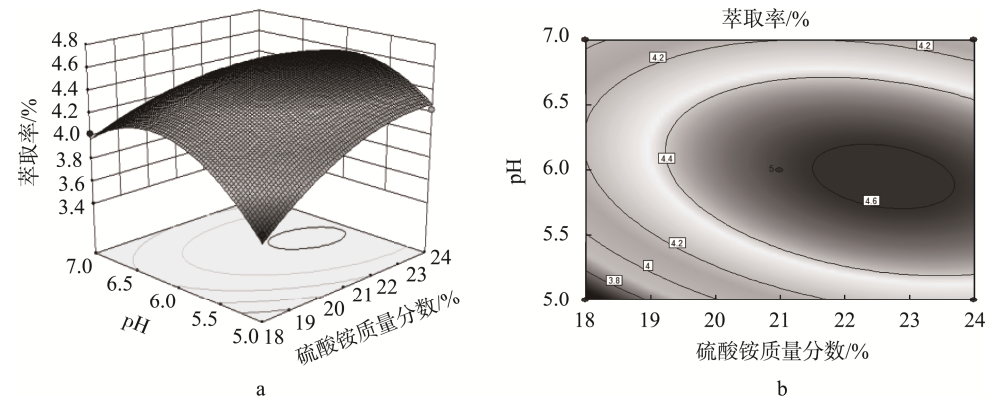


图 9 (NH₄)₂SO₂ 质量分数、pH 对皂苷萃取率的响应曲面、等高线
Fig.9 Response surface diagram and contour map of (NH₄)₂SO₂ mass fraction and pH to saponin extraction rate

由各因素交互作用的响应曲面和等高线图可知，PEG600 质量分数与(NH₄)₂SO₄ 质量分数，PEG600 质量分数与 pH，(NH₄)₂SO₄ 质量分数与 pH 这 3 组交互作用都显著，表现为其等高线图都呈椭圆形。可以解释为 3 个交互作用中某一因素的水平上升时，另一因素水平如果也上升，会导致响应值下降。即在实验过程中，当 PEG600 质量分数上升时，降低(NH₄)₂SO₄ 质量分数能提高皂苷的萃取率，同时升高(NH₄)₂SO₄ 质量分数则会导致萃取率下降，其余各因素交互作用同理。对数据进行分析，得到了模型理论的最佳条件：PEG600 质量分数为 25.04%（调整为 25.0%），

(NH₄)₂SO₄ 质量分数为 21.0%，体系 pH 为 6.20。在此条件下进行验证实验，平行试验 3 次，皂苷萃取率为 (4.73±0.06)%，与模型预测值(4.70%)接近，说明该模型可靠。

2.4 虎舌红皂苷稳定性研究

利用 PEG600-(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取实验考察了虎舌红皂苷的稳定性，包括温度、pH 值、保留时间对其稳定性的影响，见图 10。由于温度、pH 值、保留时间是物质稳定性的最重要和最常见的影响因素，所以没有进一步考察其他影响因素^[18]。结果发现，

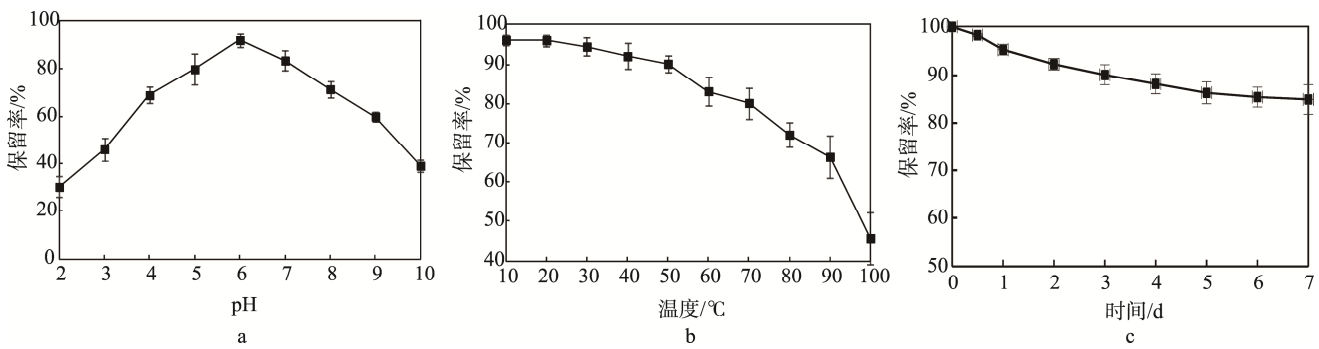


图 10 温度、pH、保留时间对虎舌红皂苷稳定性的影响
Fig.10 Effects of temperature, pH and retention days on stability of Saponins from *Ardisia mamillata*

在考察 pH 对虎舌红皂苷稳定性的影响时, 可以明显看出最适 pH 值为 6; 在温度为 20 ℃ 以下时, 虎舌红皂苷保留率能达到 90% 以上; 从保留时间上看, 在保留 7 d 后虎舌红皂苷依然有较高的保留率, 说明其性质稳定。郑娜等^[19]在研究温度和 pH 值对黄芪皂苷 IV、III、I 稳定性的影响时发现, 随着 pH 值和温度的增加, 黄芪皂苷 I 的含量会逐渐降低。综合来看, 对于虎舌红皂苷的保存, 应尽量满足温度在 20 ℃ 以下, pH 值为 6 的低温弱酸性环境, 才能得到有效保存。

3 结语

在以往的研究中, 在对天然植物和相关农产品中含有的皂苷类化合物进行溶剂法提取分离时, 通常采用稀乙醇提取-水饱和正丁醇萃取技术。应用此方法时, 由于稀乙醇溶液中含有大量的水, 在提取过程中不可避免地会混入大量的水溶性成分, 例如多糖、水溶蛋白等, 容易导致提取物质纯度的降低。另外正丁醇的气味较大, 且具有低毒性。考虑到这些问题的存在, 找到一种新型绿色的提取方法具有重要意义。研究中通过单因素-响应曲面法优化了 PEG600-(NH₄)₂SO₄ 双水相萃取虎舌红皂苷的条件, 建立的提取模型经验证后可靠性较高, 对各因素与萃取率的关系能进行准确预测, 能得到有效应用, 对于虎舌红的开发利用具有重要意义。

通过对虎舌红皂苷的贮藏稳定性进行研究, 考察了其在温度、pH 值、时间变化情况下的保留率, 能够更全面地了解虎舌红皂苷的稳定性。在研究中发现, 虎舌红皂苷在贮藏期间保留率出现一定的降低, 在此过程中是否发生了降解亦或转化还不得而知, 是否发生了新物质的产生也不确定, 这在后续中还应继续跟进研究。

参考文献:

- [1] 曾云英. 野生植物资源虎舌红的研究进展[J]. 北方园艺, 2008, 2008(1): 61—62.
ZENG Yun-ying. Research Progress on Wild Plant Resources *Ardisia Mamillata Hance* [J]. Northern Horticulture, 2008, 2008(1): 61—62.
- [2] 凌育赵, 曾满枝, 严志云. 超临界萃取气-质联用分析虎舌红挥发油化学成分[J]. 精细化工, 2005, 22(10): 766—769.
LING Yu-zhao, ZENG Man-zhi, YAN Zhi-yun. Analysis of Components in Essential Oil from *Ardisia mamillata* by GC-MS with Supercritical Fluid Extraction [J]. Fine Chemical Industry, 2005, 22(10): 766—769.
- [3] 邵金华, 马永强, 何福林, 等. 虎舌红多糖超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化活性评价[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 166—169.
SHAO Jin-hua, MA Yong-qiang, HE Fu-lin, et al. Ul-
- trasonic-assisted Extraction of Polysaccharide from *Ardisia Aamillata* and the Evaluation of Its Antioxidant Activity[J]. Food & Machinery, 2016, 32(12): 166—169.
- [4] MA Y Q, SHAO J H, FAN X, et al. Optimization of Isolation and Purification of Total Flavonoids from *Ardisia Mamillata Hance* Roots Using Macroporous Resins, and Determination of Their Antioxidant Activity[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2018, 17(5): 897—904.
- [5] ZHANG E F, LING Y, YINI Z, et al. Identification and Structural Characterisation of Triterpene Saponins from the Root of *Ardisia Mamillata Hance* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS[J]. Natural Product Research, 2018, 32(8): 918.
- [6] 孙森凤, 姜雪, 张春玲, 等. 紫金牛属植物成分及药理研究进展[J]. 山东化工, 2017(8): 77—79.
SUN Sen-feng, JIANG Xue, ZHANG Chun-ling, et al. Progress in Research on Chemical Component and Pharmacological Activities of *Ardisia* Plants[J]. Shandong Chemical Industry, 2017(8): 77—79.
- [7] IQBAL M, TAO Y, XIE S, et al. Aqueous Two-phase System (ATPS): an Overview and Advances in Its Applications[J]. Biological Procedures Online, 2016, 18(1): 18.
- [8] 张喜峰, 罗光宏, 张芬琴, 等. 响应面试验优化 [bmim]cl-na₂so₄ 双水相萃取分离琉璃苣种子总黄酮工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(14): 50—54.
ZHANG Xi-feng, LUO Guang-hong, ZHANG Fen-qin, et al. Aqueous Two-phase System Based on [Bmim] Cl-Na₂SO₄ for Isolation of Total Flavonoids from Borage Seed[J]. Food Science, 2015, 36(14): 50—54.
- [9] 徐雅琴, 蔡菲, 王丽波, 等. 双水相法分离黑穗醋栗果实多糖及其结构和活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 100—107.
XU Ya-qin, CAI Fei, WANG Li-bo, et al. Isolation of Polysaccharides from Black Currant Fruit by Aqueous Two Phase System and It's Structure and Activities[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(1): 100—107.
- [10] 汪兴平, 程超, 田盼盼. 逐级盐析法结合双水相萃取纯化葛仙米藻蓝蛋白[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 16—22.
WANG Xing-ping, CHENG Chao, TIAN Pan-pan. Purification of Phycocyanin from Nostoc Spharoids Kutzing by Stepwise Salting-out and Aqueous Two-phase Extraction[J]. Food Science, 2015, 36(24): 16—22.
- [11] 励娜, 周文杰, 禹奇男, 等. 星点设计—效应面法优化红梅消总皂苷双水相提取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(5): 726—730.
LI Na, ZHOU Wen-jie, YU Qi-nan, et al. Optimization of Aqueous Two-phase Extraction of Saponins from *Rubus Parvifolius* L by Modified Central Composite

- Design and Response Surface Methodology[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2014, 26 (5): 726—730.
- [12] 周国燕, 王春霞, 桑迎迎, 等. 正交试验优化超声辅助法提取三七有效成分工艺[J]. *食品科学*, 2012, 33(12): 8—11.
- ZHOU Guo-yan, WANG Chun-xia, SANG Ying-ying, et al. Orthogonal Array Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of *Panax Notoginseng* Saponin Rg1[J]. *Food Science*, 2012, 33 (12): 8—11.
- [13] ALMEIDA M R, PASSOS H, PEREIRA M M, et al. Ionic Liquids as Additives to Enhance the Extraction of Antioxidants in Aqueous Two-phase Systems[J]. *Separation & Purification Technology*, 2014, 128(19): 1—10.
- [14] 党晓芳, 曹飒丽, 林龙飞, 等. 三七提取液中皂苷类成分的热稳定性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(1): 31—34.
- DANG Xiao-fang, CAO Sa-li, LIN Long-fei, et al. Thermal Stability Analysis of Saponins from *Notoginseng Radix et Rhizoma* Extract[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2014, 20 (1): 31—34.
- [15] 王莹. 熟三七炮制工艺及人参皂苷稳定性研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.
- WANG Ying. Study on the Processing Research on the Processing Technology of *Panax Notoginseng* and the Stability of Ginsenosides[D]. Kunming: Kunming University of Technology, 2017.
- [16] MURARI G F, PENIDO J A, MACHADO P A L, et al. Phase Diagrams of Aqueous Two-phase Systems Formed by Polyethylene Glycol+Ammonium Sulfate+Water: Equilibrium Data and Thermodynamic Modeling[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2015, 406: 61—69.
- [17] 杜梦扬, 文沛瑶, 李秀信, 等. PEG-无机盐双水相体系萃取水榆花楸叶中总黄酮[J]. *化学研究与应用*, 2018, 30(2): 201—206.
- DU Meng-yang, WEN Pei-yao, LI Xiu-xin, et al. PEG-inorganic Salt Aqueous Two-phase System for the Extraction of Total Flavonoids[J]. *Chemical Research and Application*, 2018, 30(2): 201—206.
- [18] 陆燕, 潘旭. 三七总皂苷中代表性皂苷含量测定方法学的建立及稳定性研究[J]. *中国药物应用与监测*, 2014(2): 88—91.
- LU Yan, PAN Xu. Establishment of a Methodology for Determination of Representative Saponins in *Panax Notoginseng* Total Saponins and Study on Its Stability [J]. *Chinese Journal of Drug Application and Monitoring*, 2014 (2): 88—91.
- [19] 郑娜, 师亚玲, 吉艳霞, 等. 温度和酸度对黄芪皂苷 IV、Ⅲ、Ⅰ稳定性和转化的影响[J]. *中南药学*, 2014(11): 1062—1065.
- ZHENG Na, SHI Ya-ling, JI Yan-xia, et al. Stability and Transformation of Astragaloside IV, III and I[J]. *Central South Pharmacy*, 2014 (11): 1062—1065.