

双水相分配技术提取黄芩中的黄芩苷的实验研究

杨根生, 竹弘, 蒋亚群(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032)

摘要:本文以黄芩为原料, EOPO 溶液和混合磷酸盐为上下相材料, 考察了利用双水相技术来分离提取黄芩提取液中的主要成分——黄芩苷, 并考察了在不同的温度和 pH 值条件下黄芩苷在温度诱导系统中的分配系数。初步得出了温度和 pH 值对黄芩苷在温度诱导系统中的分配系数和提取率的影响。从而为进一步研究黄芩苷在双水相系统和温度诱导系统中的提取奠定了基础。

关键词:黄芩苷; 双水相; 温度诱导

Experimental study of Extraction of Baicalin from Scutellaria by Aqueous Two-phase Systems

YANG Gen-sheng, ZHU Hong, JIANG Ya-qun(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

ABSTRACT: In this paper, extraction of baicalin from scutellaria by aqueous two-phase system, contained ethylene oxide-propylene oxide random copolymer (EOPO) and phosphate, has been studied. The effect of temperature and pH on the partition coefficients and extraction rate of baicalin by aqueous two-phase systems combined with temperature induced was investigated. The main discussions are devoted to the technical aspects for extraction of flavonoids from Scutellaria by using aqueous two-phase systems extraction and temperature-induced phase separation.

KEY WORDS: baicalin; aqueous two-phase system; temperature induced phase separation

黄芩是一种传统的中药, 而且是一种疗效确切的常用中药。据《神农本草经》记载: 黄芩又名酒芩、子芩。性苦、寒。入心、肺、胆、大小肠经。主要功效为清热解毒, 清肺燥湿, 安胎, 止血^[1]。临床上广泛应用于肺炎、肝炎、慢性支气管炎、高血压、化脓性感染及先兆流产等疾病。黄芩的有效成分是黄酮类物质, 目前从黄芩中已发现 41 种黄酮类物质, 其中, 黄芩苷、黄芩苷元、汉黄芩素、和汉黄芩苷等为黄芩的特征化学成分。黄芩苷(baicalin)是黄芩中具有药用价值的主要成分, 有抗血小板凝集、抗肿瘤、降血脂和降压利尿等作用, 在医学界引起了很大的关注^[2]。对黄芩的有效化学成分诸如黄芩苷的提取的传统方法有酸沉淀法、超声法、超滤法、溶剂提取法等, 但由于这些传统方法或多或少存在产品收率少、纯度低和成本高等缺点, 在一定程度上阻碍了黄芩的工业化发展。

将两种不同的水溶性聚合物的水溶液混合时, 当聚合物浓度达到一定值, 体系会自然地分成互不相溶的两相。这一现象早在 1896 年就被 Beijerinck 观察到了^[3], 这就是双水相现象。到了 1956 年, 以 Abertsson 教授为首的研究小组将之应用于生物物质的分配后才开始了真正的双水相技术的研究开发^[4]。经近半个世纪的发展, 双水相分配(ATTP)技术已广泛应用于生物物质的分离和纯化^[4]。研究的对象主要是一些生物大分子如酶^[5]、核酸^[6]、病毒^[7]、细胞组织^[8]、生长素和干扰素^[9]等。一直以来, 双水相分配技术被认为只能用于生物大分子的分离。近几年来, 浙江大学朱自强教授和不少科研机构的研究工作表明, 用双水相分配技术来处理小

分子物质, 如抗生素^[10]、氨基酸^[11]和植物有效成分^[12]的分离和纯化, 同样也取得比较理想的效果。将双水相分配技术应用于生物小分子的提取开辟了一个崭新的领域, 在一定的程度上代表了双水相分配技术的又一个发展趋势。虽然近年来 ATTP 技术取得了较大的进展, 但利用双水相分配技术提取和分离中草药有效成分的研究至今鲜有报道, Mishima 等曾报道了黄芩苷在 PEG(聚乙二醇)6000/K₂HPO₄ 双水相系统中的分配情况^[13], 但没有进行深入的研究。李伟等人报道了黄芩苷在伴有温度诱导效应双水相系统中的分配行为^[14], 本文以黄芩为原料 EOPO 溶液和混合磷酸盐为上下相材料, 考察了利用双水相技术来分离提取黄芩提取液中的主要成分——黄芩苷, 并察黄芩苷在 EOPO/混合磷酸钾双水相系统和温度诱导相分离后的分配行为。

1 材料与实验方法

1.1 实验材料

黄芩由浙江中医院赠送, 黄芩苷标准品由养生堂天然药物研究所有限公司赠送。EOPO(EO 与 PO 的摩尔比为 1:1, 平均分子量为 4000)浙江大学化工厂制备, 使用前用二氯甲烷提纯。去离子水由本实验室提供。其余均为市售分析纯试剂。

1.2 实验仪器

集热式恒温磁力搅拌器 DF-101B, 巩义市英峪予华仪器厂制造; 台式离心机 JD80-2B, 上海安亭科学仪器厂制造; 马头牌架盘天平 BP-II 型, 上海医用激光仪器厂制造; 紫外-可见分光光度计 CARY-50, 美国 VARIAN 公司, 岛津 LC-VP

高效液相色谱仪, 岛津苏州工厂。

1.3 实验方法

1.3.1 黄芩苷的测定波长确定 用不同浓度的黄芩苷溶液在不同波长的紫外光下扫描, 得出较佳的黄芩苷的吸收条件。

1.3.2 黄芩苷的标准曲线的制定 配制 20 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷标准溶液。将 20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液分别稀释成 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16 $\mu\text{g/mL}$ 。以去离子水为空白相, 测定各浓度标准液的吸光度。

1.3.3 黄芩苷的初提 为了提取黄芩中的黄酮类物质, 首先将其萃取到溶液中。本实验采取以下处理方法:

水溶液浸泡: 取 2g 黄芩粉末倒入 50mL 容量瓶中, 再加入 40g 去离子水, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温中放置 12h 以上。

20% 乙醇的水溶液浸泡: 取 2g 黄芩粉末倒入 50mL 容量瓶中, 再加入 40g 20% 乙醇的水溶液浸泡, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温中放置 12h 以上。

热水煎煮: 取 2g 黄芩粉末倒入 50mL 容量瓶中, 再加入 20g 去离子水, 加热回流 2h, 减压过滤, 保留滤液, 在滤渣中再加入 20g 去离子水, 加热回流 2h, 减压过滤, 合并 2 次减压过滤的滤液。

以上系统中均用磷酸盐缓冲液调 pH 值至 6.5。

1.3.4 黄芩苷在双水相系统的分配实验 按预定的系统组成, 在 10mL 的离心管中分别加入一定量的 EOPO 和混合磷酸盐溶液。加入一定量用上述方法初提取的黄芩苷溶液, 以去离子水补足系统总量。封口, 充分混合。用离心机以 1500r/min 离心 5min 或静置使其自然分相。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中恒温 12h 以上。读出上、下体积。分别取出上相和下相的溶液, 用紫外分光光度法分析黄芩苷的含量。

1.3.5 黄芩苷在温度诱导的双水相系统的分配实验 取出富含 EOPO 的上相, 分别置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中静置 120min, 形成新的两相系统, 其中上相富含 EOPO。记录上、下相体积, 取上、下相溶液, 用紫外分光光度法分析黄芩苷的含量。

1.3.6 黄芩苷在不同 pH 条件下温度诱导相系统中的分配实验 选择水浸系统来做 pH 诱导, 取出富含 EOPO 的上相, 添加一定量的无机盐(本实验用 0.1mol/L 的 NaCl 溶液), 用 0.1mol/L、0.01mol/L 的盐酸调 pH 至 1.0、2.5、3.5、6.2, 置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴中静置 120min, 形成新的两相系统, 其中上相富含 EOPO。记录上、下相体积, 取上、下相溶液分别用紫外分光光度法分析黄芩苷的含量。

1.3.7 HPLC 分析 色谱条件: 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇-水-磷酸(47: 53: 0.2)为流动相; 检测波长为 280nm。

1.3.8 黄芩苷分配的计算公式 黄芩苷的分配系数 K、相比 R、分配率 G 和萃取率 Y 分别定义为:

$$K = \frac{c_t}{c_b} \quad (1)$$

$$R = \frac{V_t}{V_b} \quad (2)$$

$$G = K \frac{V_t}{V_b} \quad (3)$$

$$Y = \frac{V_t c_t}{V_t c_t + V_b c_b} \quad (4)$$

式中: c_t 、 c_b - 上、下相中黄芩苷的浓度; V_t 、 V_b - 上、下相溶液的体积。

2 结果与讨论

2.1 黄芩苷的分析

图 1 为黄芩苷紫外吸收光谱图。从图中可以看出在 269nm 时有较大的吸收峰。这与文献报道一致。

实验中发现 EOPO 在该波长下也有一定的吸光度。因此, 每组实验以不含黄芩苷的空白体系作对照。

图 2 为黄芩苷的标准曲线。结果表明浓度与吸光度关系曲线具有较好的线性关系。

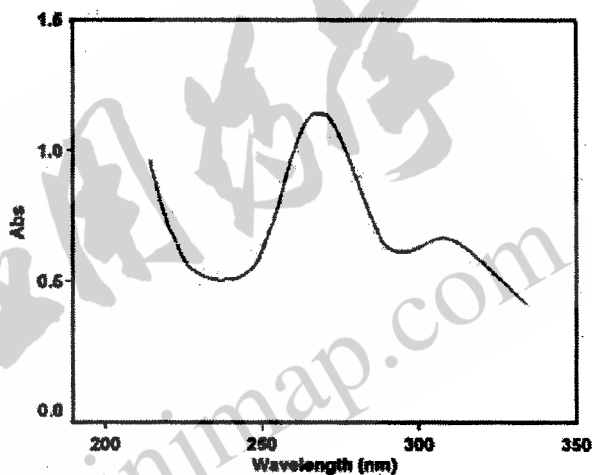


图 1 黄芩苷紫外吸收光谱图

Fig 1 UV absorption spectrum of baicalin

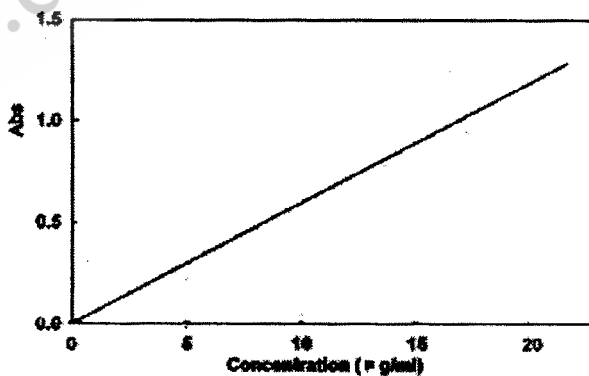


图 2 黄芩苷的标准曲线

Fig 2 Calibration curve for baicalin

2.2 黄芩苷在双水相系统的分配实验

在黄芩苷在双水相系统中提取过程如加入缓冲溶液, 并调节 pH 值至 6.5 的试样, 其萃取率比没有加缓冲溶液的试样要稳定。如表 1 所示。分析其原因可能是由于黄芩苷的分子式中有邻二酚羟基, 使其在碱液中不稳定, 易被氧化, 其颜色由黄色变为深红色。故在分离提取黄芩苷的过程中溶液的 pH 值不应大于 7。

表 1 缓冲溶液在黄芩苷双水相系统中的分配的影响

Tab 1 The effect of buffer in partitioning of baicalin in EOPO/KHP aqueous two phase system

	分配系数/K		相比/R		分配率/G		萃取率/Y × 100	
	加缓冲液	不加	加缓冲液	不加	加缓冲液	不加	加缓冲液	不加
水溶液浸泡	9.58	4.54	0.247	0.119	2.36	0.54	70.25	35.07
20% 乙醇的水溶液浸泡	9.09	8.01	0.250	0.146	2.27	1.17	69.45	53.96
热水煎煮	9.68	7.43	0.222	0.146	2.15	1.07	68.27	52.10

注:2g40% 的 EOPO 溶液,2g40% 的混合磷酸钾溶液,1 g 黄芩苷初提溶液

表 2 黄芩苷在温度诱导双水相系统中的分配

Tab 2 Partitioning of baicalin in aqueous two phase system combined with temperature induced phase separation

	分配系数/K		相比/R		分配率/G		萃取率 Y × 100
	30℃	55℃	30℃	55℃	30℃	55℃	
水溶液浸泡	9.58	0.08	0.247	2.000	2.36	0.21	58.15
20% 乙醇的水溶液浸泡	9.09	0.13	0.250	2.563	2.27	0.32	52.63
热水煎煮	9.68	0.15	0.222	2.327	2.15	0.36	50.35

注:2g40% 的 EOPO 溶液,2g40% 的混合磷酸钾溶液,1g 黄芩苷初提溶液

2.2.1 温度诱导下黄芩苷在双水相系统中的分配

由表 2 可以看出在本双水相体系中,开始黄芩苷在该系统中的分配系数较大,这就是说大量的黄芩苷被分配在 EO-PO 相。经温度诱导相分离后,黄芩苷则被萃取到水相,特别是在系统中添加盐时,尽管此时的分配系数较小,但相比较大,所以总的萃取率就达 40% 多。

根据以上的实验结果,可以看出经第一次双水相体系将

表 3 黄芩苷在不同温度诱导双水相系统中的分配

Tab 3 Partitioning of baicalin in aqueous two phase system combined with different temperature induced phase separation

	分配系数/K					萃取率/Y × 100				
	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃	45℃	50℃	55℃	60℃	65℃
水溶液浸泡	0.15	0.11	0.08	0.12	0.14	13.1	13.3	12.1	17.2	18.7

从表 3 可以知道,在温度小于 55℃ 时分配系数逐渐减小,萃取率也相应有些变化,但当诱导温度大于 55℃ 时,分配系数又逐渐增大,同样萃取率也逐渐增大。可以说提高诱导温度会导致黄芩苷更多地进入 EOPO 相,虽然可以达到浓缩 EOPO,但这对总的萃取率有着较大的影响。所以我们选择 55℃ 为诱导温度。

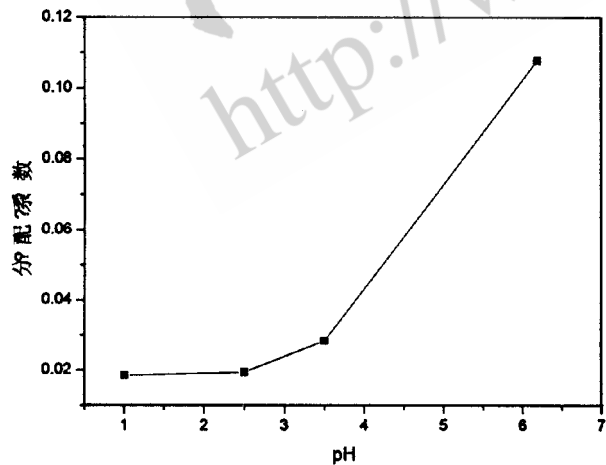


图 3 不同 pH 值下黄芩苷在温度诱导的双水相系统中分配系数

Fig 3 Partitioning coefficients of baicalin in aqueous two phase system combined with temperature induced phase separation in

黄芩中的大部分黄芩苷提取到 EOPO 相,而一些杂质特别是一些水溶性的杂质被留在了下相,然后,取出富含 EOPO 的上相加入适量的无机盐,升温后形成新的两相系统,这时大部分的黄芩苷被提取到几乎不含 EOPO 的水中,这样就可以达到分离提纯黄芩苷的目的,而 EOPO 则可以回收使用。

2.2.2 不同温度诱导下的黄芩苷在双水相系统中分配

different pH

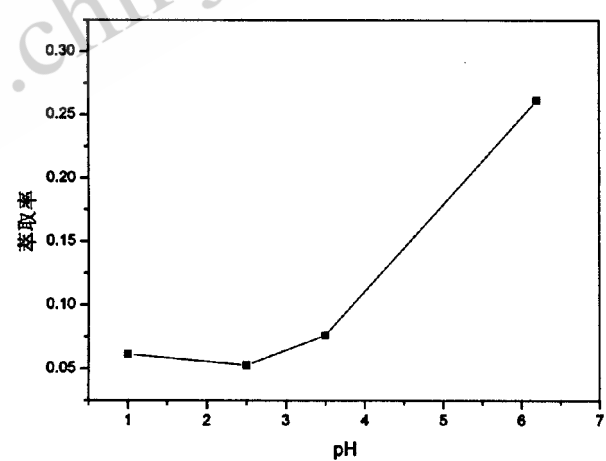


图 4 不同 pH 值下黄芩苷在温度诱导的双水相系统中萃取率

Fig 4 Extraction rate of baicalin in aqueous two phase system combined with temperature induced phase separation in different pH

2.2.3 不同 pH 值下温度诱导黄芩苷在双水相系统中的分配

前面已经提到,当溶液中的 pH 值大于 7 时,黄芩苷将不稳定。为此,考察了 pH 在 1.0 ~ 6.5 范围内,黄芩苷在温度

诱导系统中的分配情况。如上两图所示,在较低的 pH 值范围内,随 pH 增加对黄芩苷的分配系数和萃取率影响不大,其值几乎不变。这一结果可能是在低 pH 值的条件下,黄芩苷苯环上的酚羟基的电离受到抑制,使黄芩苷不能很好的溶解于水,所以有大量的黄芩苷留在 EOPO 相,而只有极少量的黄芩苷进入水相,由此表现出的便是分配系数和萃取率很小且基本不变。当 pH 值超过 3 时,由于水溶液对黄芩苷酚羟基电离的抑制减弱,使得有相当一部分的黄芩苷电离进入水

溶液中,而黄芩苷在 EOPO 相中的溶解度基本不变。这表现为在 pH = 3.0 ~ 6.5 时黄芩苷的分配系数随水溶液 pH 值的增大而增大。

2.2.4 HPLC 分析

我们将经温度诱导的黄芩提取液进行了 HPLC 的检测,检测结果显现提取溶液的黄芩苷峰值保留时间,与对标准品的峰值保留时间基本一致,含量也达 56.8%。

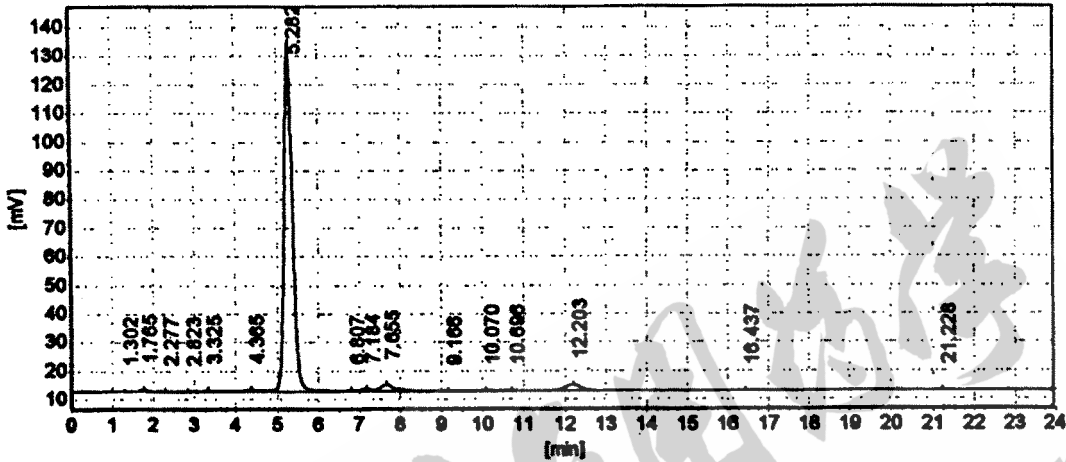


图 5 黄芩苷标准品 HPLC 图

Fig 5 HPLC for baicalin

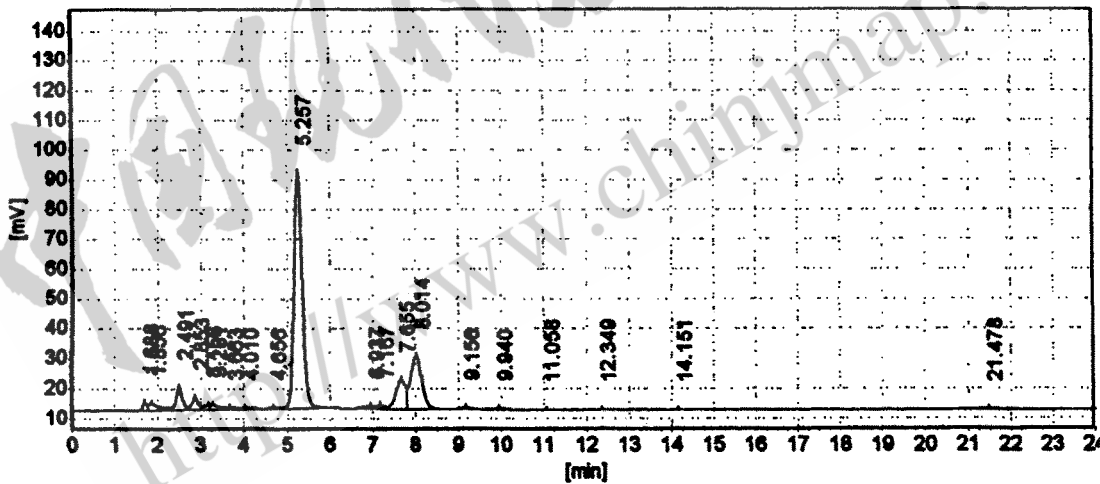


图 6 温度诱导双水相分离的黄芩提取样品的 HPLC 图

Fig 6 HPLC for the product extracted from scutellaria by aqueous two-phase systems combined with temperature induced separation

3 结论

(1)在黄芩的双水相提取中,均需用缓冲液,其原因是避免 PH 值超过 7,因为当 PH 值超过 7 时,黄芩苷分子中的 γ -吡酮环会发生裂解。

(2)可以通过两步法分离黄芩中的黄芩苷,也就是第一步双水相分配体系将黄芩中大部分的黄芩苷提取到富含 EOPO 的上相,而一些杂质则留在下相,第二步取出富含 EOPO 的上相,加入适量的无机盐,升温后形成新的两相系统,即温度诱导相分离,这样大部分黄芩苷提取到几乎不含 EOPO 的水相中,达到分离的目的。

参考文献

[1] 杨芳珍,余文彬编.《古今方药集锦》.四川科学技术出版社.1988.

[2] 潘飞,冯毓秀. 天然产物研究与开发,1994,6(2):61.

[3] Berjerrinck, M. W., Zbl. Bakt., 1896, 2:627.

[4] Albertsson PA., Partition of cell particles &Macromolecules. 3rded. NewYork: JohnWiley&Sons, 1986.

[5] 梅乐和,朱自强. 酶的双水相体系萃取分离技术. 现代化工, 1991,(6):15.

[6] Kimura, K. Kobayashi, H., Partitioning of yeast RNA in aque-

- ous two-phase system; *Biotechnol. Tech.* 1992, 6(2):149.
- [7] Andrew, B. A. ; Huang, R. B. and Asenjo, J. A. , Purification of virus like particles from yeast cells using aqueous two-phase systems, *Bioseparation*, 1995, 5:105.
- [8] 朱自强, 郁士贵, 梅乐和等译. P. A. Albertsson 著. 细胞颗粒和大分子的分配(第三版). 浙江大学出版社, 1995.
- [9] 杨基础, 沈忠耀. 双水相萃取技术及其在基因工程产品分离纯化中的应用. *化工进展*, 1988, (4):30.
- [10] Yang, W. Y. ; Lin, C. D. ; Chun, I. M. ; Lee, C. J. , Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition, *Biotechnol. Bioeng.* , 1994, 43:439.
- [11] Li, M. ; Zhu, Z. Q. and Mei, L. H. , Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation, *Biotechnol. Prog.* , 1997, 13(1):105.
- [12] Modlin, R. F. ; Alred, P. A. and Tjerneld, F. Utilization of temperature-induced phase separation for the purification of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from spinach. *J. Chromatogr. A.* , 1994, 668:229.
- [13] Mishima K, *et al.* 日本溶剂萃取论文报告会. II, 福冈, 日本, 1995.
- [14] 李伟, 朱自强, 等. 黄芩甙在伴有温度诱导效应双水相系统中的分配行为. *化工学报*, 1998, 49(1):92.

收稿日期:2004-06-18