

PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相系统中葛根素分配系数的测定和关联

霍清(北京联合大学生物化学工程学院生物医药系,北京 100023)

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2005)09-0856-03

葛根是多年生缠绕藤本植物,葛 *Pueraria Lobata* (willd) Ohwi 或 *Pueraria Thomsonii* Benth 的根,具有解肌退热、生津透疹、生阳止泻的功效^[10]。葛根的主要有效成分是葛根素,大豆甙,大豆甙元等多种异黄酮类物质。这些物质对改善高血压,动脉硬化患者的脑血流,扩张脉血管,调节血液循环有明显效果。葛根传统的提取方法有醇提取法和铅盐法,污染大且收率较低^[1]。

双水相萃取技术是指亲水性聚合物水溶液在一定条件下可以形成双水相,由于被分离物在两相中分配不同,便可实现分离。该技术自研究开发以来,被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域的产品分离和提取。双水相萃取技术设备投资少,操作简单,且不存在有机溶剂残存问题,因此在天然药物分离与提取中亦有良好的应用前景。但是,由于聚合物回收困难,所以在一定程度上阻碍了 ATP 技术的应用^[2]。

基金项目:北京市教委科技发展项目(00KJ-067)

作者简介:霍清(1966-),北京,副教授,硕士,1984-1988 华东理工大学,化学制药专业获学士学位,1999-2001 北京化工大学获硕士学位,主要从事中药有效成分提取研究。

虽然,该技术在应用方面已取得了很大的进展,但几乎都是建立在实验的基础上。到目前为止还没能完全清楚地从理论上解释双水相系统的形成机理以及生物分子在系统中的分配机理。考虑到生物物质在双水相系统中分配时,是一个由聚合物、聚合物(或无机盐)、生物分子和水等构成的四元系统,系统中的组分性质千差万别,从晶体到无定形聚合物、从非极性到极性、从电解质到非电解质、从无机小分子到有机高分子甚至生物大分子,这些都不可避免地造成理论计算的复杂性。近 10 年来,已有包括作者在内的各国学者开展了一些研究,各类用于计算生物物质在双水相系统分配系数的模型也时有报导,诸如 Baskir 晶体吸附模型、Hayne 模型、Grossman 自由体积模型、Diamond-Hsu 模型等,但结果均难以令人满意。Diamond-Hsu 模型既可计算聚合物/聚合物双水相系统中低分子量肽的分配系统,又能计算高分子量蛋白质的分配系数,有一定的普适性。但该模型在计算小分子在

聚合物/盐双水相系统中的分配系数时,效果不佳。本文拟系统地测定甘草酸单铵盐在不同分子量的聚乙二醇/无机盐(聚乙二醇/硫酸铵)双水相系统中的分配系数,并用改进的Diamond-Hsu模型关联分配系数,以进一步考察该模型的普适性和精确度^[3]。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

PEG600、PEG1500、PEG4000(北京化学试剂公司进口分装)
葛根标准品 质量分数≥98%(陕西镇坪制药厂)
(NH₄)₂SO₄、无水乙醇(分析纯)
仪器:800型离心沉淀器(4000r/min,上海易用器械十厂);UV-260型紫外可见分光光度计(日本岛津)。

1.2 实验方法

双水相体系按质量配制,各组分用质量分数表示,系统总量为20克,混合均匀后,在离心机中以2000r/min离心5min,读取上下相体积,分别取样分析上下相中葛根素的含量。

有关的计算公式为 $R = V_t/V_b$
 $K = C_t/C_b$
 $Y = 1/(1 + 1/R \times K)$

R—双水相体系上下相的体积比

V_t—双水相体系上相体积,mL

V_b—双水相体系下相体积,mL

K—葛根素双水相体系分配系数

C_t—双水相系统上相葛根素的质量浓度,mg/mL

C_b—双水相系统下相葛根素的质量浓度,mg/mL

Y—葛根素在上相中的收率

1.3 分析方法

采用紫外—可见分光光度计,在249nm下测定葛根素的质量浓度^[4]。用葛根素测定的标准曲线计算。回归方程: $C = K_0 + K_1 \times Abs$ $K_0 = -0.00105$, $K_1 = 0.01291$, $R^2 = 0.99924$ 。

2 结果与讨论

2.1 PEG/(NH₄)₂SO₄等双水相体系的分配特性研究

对葛根素在PEG4000/(NH₄)₂SO₄、PEG1500/(NH₄)₂SO₄、PEG600/(NH₄)₂SO₄等双水相体系的分配情况进行研究,由于PEG6000的黏度太大,故实验数据较少。实验结果见表1和表2。

表1 PEG600的质量分数对葛根素分配系数的影响

Tab 1 Effect of PEG600 on the partition coefficient

PEG600	V _t	V _b	C _t	C _b	R	K	Y%
18%	8.5	9.3	0.0302	0.0136	0.914	2.2206	66.99
20%	8.6	9.4	0.0139	0.0015	0.9149	9.267	89.45
22%	9.2	8.8	0.0121	0.0018	1.0454	6.72	87.54
24%	9.1	8.5	0.0431	0.0049	1.0706	8.7959	90.4
26%	9.5	8.3	0.0118	0.0054	1.1446	2.1852	71.44

表2 PEG1500的质量分数对葛根素分配系数的影响

Tab 2 Effect of PEG1500 on the partition coefficient

PEG1500	V _t	V _b	C _t	C _b	R	K	Y%
12%	5.6	812.4	0.0553	0.0012	0.45	48.1	95.58
16%	6.2	910.0	0.0465	0.0006	0.62	84.54	98.13
18%	6.2	10.2	0.0495	0.0006	0.61	90.0	98.2
20%	6.7	9.1	0.0445	0.0003	0.73	148.2	99.09
22%	6.9	9.5	0.0414	0.0004	0.758	103.3	98.92
24%	7.2	9.0	0.0454	0.0006	0.8	75.7	98.38
26%	7.8	8.6	0.0406	0.0008	0.91	50.69	97.88

对PEG1500/(NH₄)₂SO₄的进一步实验表明PEG1500质量分数为20%,(NH₄)₂SO₄的质量分数16%,pH值为7,温度为50℃。最大的分配系数可达148.2,最大收率99.09%。

2.2 葛根素在PEG/(NH₄)₂SO₄体系中分配系数的关联

对于上述实验测定葛根素在PEG600/(NH₄)₂SO₄、PEG1500/(NH₄)₂SO₄、二个双水相系统中的分配系数,采用Diamond-Hsu模型进行关联,结果不理想。Diamond和Hsu从扩展的Flory-Huggins理论出发,截止到浓度的二次项,并把相间电势表达为上下相浓度差的二次函数,得到分配系数的简洁表达式如下:

$\ln K = A(w_1'' - w_1') + b(w_1'' - w_1')^2$ (1)

式中,A,b为D-H模型参数,w₁为重量百分比。

朱自强等在关联尿激酶在PEG/混合磷酸钾系统中的分配系数时,对Diamond-Hsu模型进行了适当的改进,把相间电势表达为上下相浓度差的三次关系,截止到浓度的三次项,得到分配系数的表达式如下:

$\frac{\ln K}{(w_1'' - w_1')} = A^* + b^*(w_1'' - w_1') + c^*(w_1'' - w_1')^2$ (2)

式中,A^{*}、b^{*}、c^{*}为改进的Diamond-Hsu模型参数,K为分配系数。当忽略三次项(即c^{*}=0)时,式(2)就回复为D-H模型表达式(1)。

在关联葛根素在PEG/(NH₄)₂SO₄系统中的分配系数时,我们对Diamond-Hsu模型(以下简称D-H模型)和朱自强改进的Diamond-Hsu模型进行适当的改进,得到分配系数的表达式如下:

$\ln K/R^2 K^2 = A^* + b^*(w'' - w')$ (3)

式中A^{*}、b^{*}为改进的Diamond-Hsu模型参数,w^{''}、w[']分别是葛根素在下相、上相的质量百分比

$w'' = n_b/n_{\text{总}} = 1/(RK + 1)$

$w' = n_t/n_{\text{总}} = RK/(RK + 1)$

$w'' - w' = \frac{1}{RK + 1} - \frac{RK}{RK + 1} = \frac{1 - RK}{1 + RK}$ (4)

n_总:体系中葛根素的总质量

n_t:双水相体系中葛根素在上相的质量

n_b:双水相体系中葛根素在下相的质量

采用改进的Diamond-Hsu模型对葛根素在各PEG/(NH₄)₂SO₄双水相系统中的分配系数进行关联,关联参数及关联的相关系数列于表3~5。

表 3 葛根素在 PEG1500/(NH₄)₂SO₄ 双水相系统中的关联参数

Tab 3 Thermodynamic model parameter of puerarin in aqueous two-phase extraction system PEG1500/(NH₄)₂SO₄

WPEG%	R	K	w'' - w'	LnK/R ² K ²	LnK	LnK/(w'' - w')
12	0.45	48.1	-0.85627	0.008267	3.873	-4.523
16	0.62	84.54	-0.96248	0.001615	4.437	-4.61
18	0.61	90	-0.96427	0.001493	4.4998	-4.667
20	0.73	148.2	-0.98182	0.000427	4.99856	-5.091
22	0.758	103.3	-0.97477	0.000756	4.638	-4.758
24	0.8	75.7	-0.96725	0.00118	4.327	-4.474
26	0.91	50.69	-0.95761	0.001845	3.926	-4.1

表 4 葛根素在 PEG600/(NH₄)₂SO₄ 双水相系统中的关联参数

Tab 4 Thermodynamic model parameter of puerarin in aqueous two-phase extraction system PEG600/(NH₄)₂SO₄

WPEG%	R	K	w'' - w'	LnK/R ² K ²	LnK	LnK/(w'' - w')
18	0.914	2.2206	-0.3398	0.1937	0.7978	-2.3478
20	0.9149	9.267	-0.789	0.031	2.2264	-2.8218
22	1.0454	6.72	-0.7508	0.0386	1.9051	-2.53743
24	1.0706	8.7959	-0.808	0.0245	2.1743	-2.69096
26	1.1446	2.1852	-0.4288	0.125	0.7817	-1.82299

表 5 改进的 Diamond-Hsu 模型对葛根素在各 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统中分配系数的关联参数及关联的相关系数

Tab 5 New thermodynamic model parameter of puerarin in aqueous two-phase extraction system PEG/(NH₄)₂SO₄

双水相体系	A *	B *	R		
			D-H 模型	本文改进模型	朱自强等模型
PEG1500/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.06219	0.06295	0.88219	0.99978	0.77961
PEG600/(NH ₄) ₂ SO ₄	0.28807	0.32972	0.99221	0.98166	0.90312

R 相关系数

$$R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

(5)

SD(standard deviation)标准方差

$$SD = \sqrt{Var}$$

$$Var = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

(6)

在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 体系中用 Diamond-Hsu 模型关联的相关系数在 0.88 < R < 0.99 范围内,而采用本文改进模型关联的相关系数 R > 0.98,因此,采用 lnK/R²K² = A * + b * (w'' - w')模型对葛根素在 PEG /(NH₄)₂SO₄ 系统中分配系数的关联较为准确。

3 结论

实验表明利用 PEG/(NH₄)₂SO₄ 双水相体系萃取葛根素,最大的分配系数可达 148.2,最大收率 99.09%。葛根素大部分被分配在 PEG 相(上相)中。另外结果表明双水相中 PEG 分子量、PEG 浓度、盐浓度、pH 值及温度等都对双水相体系的分配系数、相比及葛根素的收率有一定影响,最佳的条件为:PEG 1500 质量分数为 20%, (NH₄)₂SO₄ 的质量分数 16%, pH 值为 7,温度为 30 ~ 40℃。

对葛根素在 PEG/(NH₄)₂SO₄ 系统中的分配系数用改进的 Diamond-Hsu 模型进行关联,得到分配系数的表达式如下:lnK/R²K² = A * + b * (w'' - w') R = 0.99978。结果表明,对 Diamond-Hsu 模型的改进是有效的,关联结果与实验值符合良好。

参考文献

[1] 北京中医药大学. 中药化学[M]. 贵州人民出版社 1990. 500-506.

[2] 朱自强,关怜新,李勉. 双水相分配技术提取生物小分子的进展[J]. 化工进展,1996,11(4):29-34.

[3] 梅乐和,朱自强,林东强,付 晖,韩兆熊. 聚合物/盐系统中 BSA 分配系数的测定和关联[J] 浙江大学学报 1999,33(1): 52-56 .

[4] 梁生旺,刘伟. 中药制剂定量分析[M]. 北京:中国中医药出版社,1997,242-246.