

技术·中药现代化, 2000, 2(1): 35-38.

[4] 张兆旺, 孙秀梅. 中药方剂药效物质提取新技术—“半仿生提取模式”的初探 [J]. 世界科学技术·中药现代化, 2000, 2(5): 5-

10.

[5] 张兆旺, 修彦凤, 孙秀梅. 用均匀设计优选参附汤的半仿生提取法工艺条件 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(6): 345-347.

双水相体系萃取甘草酸盐的研究

林 强, 霍 清*

(北京联合大学化学工程学院, 北京 100023)

摘 要: 目的 研究从甘草中提取甘草酸盐的新工艺。方法 采用与水互溶的有机溶剂的新型双水相体系萃取。结果 提取甘草酸盐的最佳溶剂为乙醇-磷酸氢二钾双水相体系, 此体系的两相分配完全, 分配系数达 12.8, 收率为 98.3%。结论 此方法简单易行, 是从甘草提取液中制备甘草酸单铵盐的新工艺。

关键词: 有机溶剂; 双水相萃取体系; 甘草酸单铵盐

中图分类号: R284.02; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)08-0702-03

Separation of glycyrrhetate by aqueous two-phase extraction system

LIN Qiang, HUO Qing

(College of Chemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Key words organic solvents; aqueous two-phase extraction system; glycyrrhetate

近年, 双水相萃取 (Aqueous Two-phase, ATP) 技术因设备投资少, 操作简单, 引起了人们极大的重视, 并且被广泛用于生物化学、细胞生物学和生物化工等领域。该类双水相体系多为聚乙二醇、葡萄糖和聚乙二醇/无机盐两种^[1]。但水溶性聚合物形成的双水相萃取体系存在着粘度高、分析困难及需要反萃取。事实上, 普通的能与水互溶的有机溶剂在无机盐的存在下也可形成双水相体系^[2]。基于与水互溶的有机溶剂和盐水相的双水相萃取体系具有价廉、低毒、较易挥发等特点, 本实验根据对双水相体系中不同种类盐分相能力及不同种类有机溶剂的分相情况开展研究, 并应用于甘草提取主要成分甘草酸中, 确定乙醇-磷酸氢二钾双水相体系萃取甘草有效成分的工艺。

1 试剂与仪器

试剂均为分析纯。甘草酸单铵盐 (呼和浩特制药厂, 纯度 $\geq 98\%$), 甘草饮片 (北京同仁堂股份公司饮片厂出品), 800型离心沉淀器 (4 000 r/min, 上海医用器械十厂); 721紫外可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器厂)。

2 实验方法

2.1 双水相体系的配制: 双水相体系按体积配制, 各组分浓度用毫升数表示, 系统总量为 10 mL, 置于

10 mL离心试管中, 加入一定体积的有机溶剂, 加水至 10 mL, 再加入一定量的盐, 甘草酸单铵盐加入量为 0.2 g。振荡 2 min, 放置片刻, 待溶液分相完全, 以 2 000 r/min离心 5 min, 读取上下相体系, 分别取样分析上下相中甘草酸单铵盐的含量。

相比 $R = V_t / V_b$, V_t 、 V_b 分别是上、下相体积

分配系数 $K = C_t / C_b$, C_t 、 C_b 分别是上、下相甘草酸单铵盐的浓度

收率 $Y = 1 / (1 + 1/RK)$

2.2 甘草浓缩液的制备: 将甘草粗粉 (40目左右), 加入少量氨水, 浸泡, 100℃煎煮 30 min后, 过滤, 滤液浓缩至 1/3, 得甘草浓缩液, 低温保存备用。

2.3 利用双水相乙醇-磷酸氢二钾体系从甘草中提取甘草酸: 称取 1.5 g磷酸氢二钾溶于 4 mL甘草浓缩液中, 搅拌使溶解, 并与 6 mL无水乙醇混合, 倒入 10 mL的离心试管中, 以 2 000 r/min离心 3 min, 形成两相, 用分液漏斗将两相分开, 分别向两相中缓慢逐滴加入浓硫酸, 析出大量甘草酸沉淀 (pH=2), 停止加酸。放在冰水浴中冷却 10 min, 使沉淀完全析出, 用无水乙醇洗涤沉淀, 称量并记录数据。

2.4 分析方法: 甘草酸单铵盐的含量测定采用紫外可见分光光度计在 253 nm下测定^[4]。

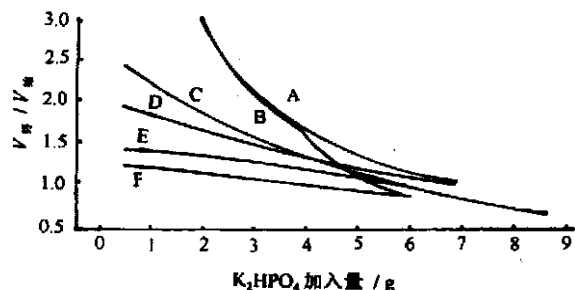
3 结果

3.1 确定萃取甘草酸单铵盐适合的双水相体系: 在 $V_{\text{有机溶剂}} = 4 \text{ mL}$, $V_{\text{水}} = 6 \text{ mL}$ 条件下, 盐的加入量为 1.5 g , 对比异丙醇 硫酸铵、异丙醇 磷酸氢二钾、乙醇 硫酸铵、乙醇 磷酸氢二钾 丙酮 硫酸铵 丙酮 / 硫酸氢二钾双水相体系中甘草酸单铵盐的分配情况, 发现丙酮 硫酸铵 丙酮 磷酸氢二钾体系形成的双水相不稳定。乙醇 磷酸氢二钾体系的 K 较大, 达 25.6, 甘草酸单铵盐主要在上层乙醇中, 而 $R = 4.27$ 说明与丙酮和异丙醇相比, 乙醇有较强的水化能, 所以确定乙醇 磷酸氢二钾为萃取甘草酸单铵盐适合的体系。结果见表 1

表 1 不同双水相体系的分配系数和相比

双水相组成	分配系数 K	相比 R
异丙醇 硫酸铵	15.27	0.90
异丙醇 磷酸氢二钾	1.91	5.25
乙醇 硫酸铵	11.81	1.29
乙醇 磷酸氢二钾	25.60	4.27

3.2 乙醇 磷酸氢二钾体系中乙醇加入量的确定: 磷酸氢二钾在乙醇 磷酸氢二钾体系中, 改变磷酸氢二钾的加入量, 测定磷酸氢二钾用量对乙醇相体积变化的影响。由图 1 可见: 初始乙醇溶剂量小时, 分相所需无机盐的量较大。在这种富盐氛围中, 少量有机溶剂的水和分子滞留其中。当盐的浓度进一步增加, 盐夺取了水分子, 有机溶剂分子才被释放出来。初始乙醇溶剂量大时, 分相所需无机盐的量较小。对于上述几个初始的乙醇溶剂量, 随着盐的量的增加, $V_{\text{始}}/V_{\text{终}}$ 趋近于 1, 说明双水相的分相过程是一个有机溶剂与无机盐争夺水分子的过程。 $V_{\text{乙醇}} = 5 \text{ mL}$ 时, $V_{\text{始}}/V_{\text{终}}$ 趋近于 1 所需盐量较大, $V_{\text{乙醇}} = 7 \text{ mL}$, $V_{\text{始}}/V_{\text{终}}$ 趋近于 1 的所用盐量比 $V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$ 时的盐量并没明显减少。故选用 $V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$ 和 $V_{\text{乙醇}} = 7 \text{ mL}$ 作为乙醇初始体积。



A- $V_{\text{始}} = 2$ B- $V_{\text{始}} = 3$ C- $V_{\text{始}} = 4$
D- $V_{\text{始}} = 5$ E- $V_{\text{始}} = 6$ F- $V_{\text{始}} = 7$

图 1 磷酸氢二钾用量对乙醇相体积的影响

3.3 乙醇 磷酸氢二钾体系中磷酸盐含量的确定:

当 $V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$, $V_{\text{水}} = 4 \text{ mL}$ 时, 改变磷酸氢二钾的加入量, 考察它对分配系数及收率的影响 (见表 2)。由表 2 可见, 加入 1.5 g 的盐效果最好, 分配系数 $K = 12.8$ 最大, 收率 $Y = 98.3\%$ 。当磷酸氢二钾量为 1.5 g 时, 虽然 Y 较大, 但 K 不大 且相比 R 过大, 对今后处理甘草粗品时, 甘草酸单铵盐的纯化率不宜提高

表 2 磷酸氢二钾的加入量对分配系数及收率的影响 ($V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$)

磷酸氢二钾 (g)	相比 R	分配系数 K	收率 $Y(\%)$
0.5	21.2	4.02	98.9
1.0	7.5	4.0	96.8
1.5	4.4	12.80	98.3
2.0	3.8	11.13	97.7

当 $V_{\text{乙醇}} = 7 \text{ mL}$, $V_{\text{水}} = 3 \text{ mL}$ 时, 改变磷酸氢二钾加入量, 考察它对分配系数及收率的影响 (见表 3)

表 3 磷酸氢二钾的加入量对分配系数及收率的影响 ($V_{\text{乙醇}} = 7 \text{ mL}$)

磷酸氢二钾 (g)	相比 R	分配系数 K	收率 $Y(\%)$
1.0	7.25	0.43	75.7
1.5	5.31	0.95	83.5
2.0	4.78	1.31	86.2

对比表 2, 3 发现, $V_{\text{乙醇}} = 7 \text{ mL}$ 时, K , Y 值不如 $V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$ 理想, 所以选择乙醇 磷酸氢二钾体系萃取甘草有效成分时, 当总量为 10 mL , $V_{\text{乙醇}} = 6 \text{ mL}$, 磷酸氢二钾的量为 1.5 g 时, 分配系数 $K = 12.8$ 最大, 收率 $Y = 98.3\%$ 。

3.4 乙醇 磷酸氢二钾双水相体系萃取甘草酸单铵盐的验证: 用分液漏斗将两相分开, 分别缓慢逐滴加入浓硫酸, 上下两相都析出大量沉淀, 上层结晶质量为 0.052 g , 下层结晶质量为 0.493 g , 经紫外光谱分析, 上相得到的结晶主要是甘草酸单铵盐, 下相主要是磷酸盐。此外, 实验表明应磷酸盐的加入量不宜过多, 因为甘草浓缩液中本身就含有无机盐, 盐量过多, 不利于甘草酸单铵盐的分离

4 讨论

通过对 6 种不同水溶性溶剂 盐的双水相体系对甘草酸单铵盐萃取研究表明, 最佳的双水相体系是乙醇 磷酸氢二钾。当加入有机溶剂量小时, 分相所需的无机盐量较大; 当加入有机溶剂量大时, 分相所需的无机盐量较小; 随着盐的加入量的增加, $V_{\text{始}}/V_{\text{终}}$ 趋近于 1

乙醇 磷酸氢二钾体系萃取甘草酸, 当总量为 10 mL , 乙醇的 $V_{\text{始}} = 6 \text{ mL}$, $V_{\text{水}} = 4 \text{ mL}$, 磷酸氢二钾的量为 1.5 g , 甘草精品为 0.200 g , 分配系数 $K =$

12.8最大,回收率 $Y=98.3\%$ 。

甘草饮片提取液,当 $V_{乙醇}=6\text{ mL}$, $V_{浓缩液}=4\text{ mL}$,磷酸氢二钾为 1.5 g ,加酸后提到结晶 0.052 g ,结晶是白色松散粉末。与传统工艺相比,工艺简洁,且结晶性状、纯度较高。

乙醇-磷酸氢二钾是基于与水互溶的有机溶剂和盐水相的双水相萃取体系,具有溶剂价廉、低毒、较易挥发而无需反萃取和避免使用粘稠水溶性高聚物等特点,易回收、易处理、操作简便。这种新型的萃

取体系在中草药有效成分提取中的应用还未见报道,用此体系萃取其他中药有效成分还需继续研究。

参考文献:

- [1] 梅乐和,朱自强. 酶的双水相体系萃取分离技术 [J]. 现代化工, 1991, 11(6): 15-19.
- [2] 王志华,马会民,马泉莉,等. 双水相萃取体系的研究 [J]. 应用化学, 2001, 18(3): 173-175.
- [3] 北京中医学院. 中医药化学 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1990.
- [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.

HPLC法同时测定三七总皂苷中人参皂苷 R_g 与 R_b 的含量

梁宁¹,赵怀清¹,周迎春¹,曲燕¹,鲁鑫焱¹,张福蔓^{2*}

(1. 沈阳药科大学药学院,辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药大集琦药业有限责任公司,辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立 HPLC同时测定三七总皂苷中人参皂苷 R_g 与 R_b 的方法。方法 采用 HPLC法,以茶碱为内标,氨基键合相为固定相,流动相为乙腈-水 (80:20),检测波长 203 nm 。结果 三七总皂苷中人参皂苷 R_g 和 R_b 与其他成分分离良好,保留时间分别约为 5.7 和 21.5 min 。人参皂苷 R_g 在 $80\sim 280\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9995$), R_b 在 $80\sim 240\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9993$) 线性关系良好, R_g 和 R_b 加样回收率分别为 97.1% 和 98.4% , RSD 分别为 2.44% 和 2.35% ($n=9$)。结论 本法操作简便、准确、重现性好,可用于人参及三七的质量控制。

关键词: 三七总皂苷;人参皂苷 R_g ;人参皂苷 R_b ;高效液相色谱法

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)08-0704-02

Determination of ginsenoside R_g and R_b in total saponins of *Panax notoginseng* by HPLC

LIANG Ning¹, ZHAO Huai-qing¹, ZHOU Ying-chun¹, QU Yan¹, LU Xin-yan¹, ZHANG Fu-man²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Shenyang Yaodajiqi Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110016, China)

Key words total saponins of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; ginsenoside R_g ; ginsenoside R_b ; HPLC

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen的干燥根,有散瘀止血、消肿定痛的功效,用于咯血、吐血、衄血、便血、崩漏、外伤出血、胸腹刺痛、跌扑肿痛等。三七总皂苷主要有效成分为人参皂苷 R_g 和 R_b 。《中华人民共和国药典》2000年版一部采用薄层色谱法以人参皂苷 R_g 和 R_b 为指标进行含量测定。目前有关文献报道测定人参单体皂苷的方法有薄层光密度法^[1],薄层扫描法^[2],高效液相色谱法^[3-6]。而在同一色谱条件下以内标法同时测定多种皂苷含量的方法未见报道。本实验采用氨基柱,流动相配比简单,以茶碱作内标,使人参皂苷 R_g 与 R_b 与三七总皂苷中的其他

成分及内标物均达到较好分离。实验证明,该方法准确可靠,重现性好,能够有效地测定三七总皂苷中人参皂苷 R_g 和 R_b 的含量。

1 仪器、试剂与材料

日立 L-7110型高效液相色谱仪,日立 L-7400型紫外检测器,江申色谱工作站,DT-100A光电天平。人参皂苷 R_g (0703-200015)与人参皂苷 R_b (0704-200012)对照品由中国药品生物制品检定所提供;三七总皂苷原料由沈阳药科大学天然药化研究室王金辉副教授提供,乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

* 收稿日期: 2001-10-15

作者简介: 梁宁 (1967-),女,辽宁沈阳人,工程师,药物分析专业硕士研究生,研究方向为中药材和中药质量评价方法以及中药药理学研究。 Tel (024) 23902568 E-mail: zfm11@online.ln.cn