

双相层流微流控芯片快速提取人参皂苷

萧金仪¹, 曾家健¹, 卢啟贤¹, 孙悦^{1*}, 陈宏²

(1 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006; 2 厦门大学萨本栋微纳米技术研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要 目的: 建立基于微流控芯片液-液萃取技术进行人参药材样品前处理的方法。方法: 注射泵引入药材初提液及萃取剂于芯片中进行萃取, 收集样品溶液进行 HPLC 检测。对芯片的前处理; 药液与萃取剂的流速、流速比; 萃取通道的宽度等因素进行考察。结果: 纯水清洗后风干的芯片, 药液与萃取剂的流速与流速比为 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 6(\mu\text{L}/\text{min}) : 12(\mu\text{L}/\text{min})$ 萃取通道宽度为 200 μm 的情况下萃取效果更理想。在优化条件下平行试验 6 次, RSD 小于 1.2%。芯片萃取所得人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 含量分别为 1.05、0.54、1.30 mg/mL, 萃取时间仅需 2 min, 与传统液液萃取相比, 芯片萃取的萃取率分别提高了 12%、13%、15%。结论: 该方法简单、快速、萃取效率高。

关键词 微流控芯片; 液-液萃取; 人参皂苷

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2015)05-1070-03

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2015.05.047

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 具有大补元气、补脾益肺等功效。人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 等为其主要活性成分^[1]。对有效成分的提取多采用传统液-液萃取分离法, 但其工作量大、耗时长、试剂用量大, 且剧烈振荡易导致乳化。微流控芯片液-液萃取具有快速、低耗、微型化、易集成化等优点, 在众多领域中的应用研究有大量报道^[2-7], 但用于中药材前处理的研究报道不多。本文采用双 Y 结构的玻璃芯片对人参中的人参皂苷进行萃取, 考察芯片使用的前处理、药液与萃取剂引入的流速和流速比、萃取通道的宽度等因素, 旨在建立基于微流控芯片液-液萃取技术进行人参药材样品前处理的方法。

1 仪器与材料

MI12 型显微镜(广州市明美光电技术有限公司); SPLab01 型注射泵, SPLab02 型注射泵(保定申辰泵业有限公司); BP211D 型分析天平(德国赛多利斯集团); KQ3200 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XS-02A 型多功能粉碎机(上海兆申科技有限公司); 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU); 紫外检测器(SPD-M20A)。

实验用人参药材(批号: 130901) 购自采芝林药房, 由广东药学院姬生国教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎; 人参皂苷 Rg_1 (批号: 121210)、人参皂苷 Re (批号: D1227021)、人参皂苷 Rb_1 (批号: 130312) 对照品均购自美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈(色谱纯, 霍尼韦

尔美国); 屈臣氏蒸馏水; 正丁醇(AR, 天津百世)。

2 方法

2.1 芯片的制备 参照文献^[8] 自制如图 1 微流控玻璃双 Y 型结构芯片。其中, A、B 为进样口, C、D 为出样口, EF 为萃取通道。进出口支通道均为长 5 mm, 宽 100 μm 。萃取通道长 20 mm, 3 种芯片萃取通道 EF 宽度不一样, 分别为 100、200、300 μm , 近进样口深 40 mm。近进样口两端钻有 4 个直径为 1.0 mm 的小孔。

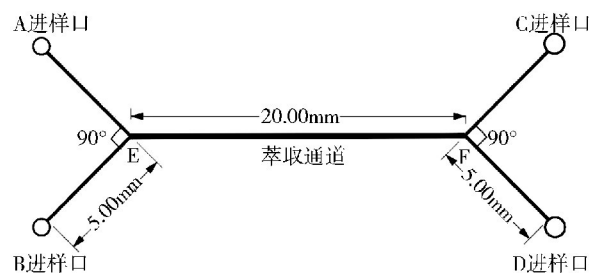


图 1 萃取芯片结构示意图

2.2 对照品溶液的制备 称取人参皂苷 Rg_1 、 Re 及 Rb_1 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含人参皂苷 Rg_1 1.01 mg、人参皂苷 Re 1.03 mg 及人参皂苷 Rb_1 0.99 mg 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 药材初提液的制备: 精密称取人参药材粉末(过四号筛) 2.0 g, 加 70% 乙醇 40 mL 超声提取(600 W, 40 kHz) 2 次, 每次 30 min, 合并滤液, 减压浓缩至干, 残渣加水 20 mL 溶解, 即得药材初提液。

收稿日期: 2014-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(81001600)

作者简介: 萧金仪(1988-), 女, 在读硕士研究生, 专业方向: 中药质量分析与控制; Tel: 15913155594, E-mail: xiaojinyi333@163.com。

* 通讯作者: 孙悦, Tel: 13427545966, E-mail: sunyuesdz@163.com。

2.3.2 芯片萃取: 在双 Y 芯片 4 个小孔的正上方用甲基丙烯酸酯 AB 胶粘合内径 1.0 mm、外径 6.0 mm、高 12.0 mm 的半二通管作为连接聚四氟乙烯管的接头装置。按顺序连接上聚四氟乙烯管和注射器, 注射器内分别盛有水饱和正丁醇液和 1 mL 药材初提液。注射器嵌入注射泵中, 在泵的驱动下分别在 A、B 进样口导入药材初提液和萃取液(水饱和正丁醇), 控制实验条件(注射泵流速、管道压力等)使两相形成稳定的居中界面, 药液经过萃取通道后再分别在 D、C 出口收集样品液和废液。样品液挥干水饱和正丁醇, 加甲醇 0.5 mL 溶解, 即得。

2.4 检测方法

2.4.1 色谱条件: 岛津 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0 ~ 35 min 19% A; 33 ~ 55 min 19% ~ 29% A; 55 ~ 70 min 29% A; 0 ~ 100 min 29% ~ 40% A); 检测波长: 203 nm; 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 mL/min。

2.4.2 线性关系考察: 精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液 4、6、8、10、12、14、16 μL 注入高效液相仪, 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 以对照品进样量 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归, 得人参皂苷 R_{G1}、R_e 及 R_{b1} 的回归方程分别为: Y₁ = 408330X₁ + 121370, r₁ = 0.9997; Y₂ = 331247X₂ + 125736, r₂ = 0.9995; Y₃ = 201804X₃ + 56039, r₃ = 0.9996。人参皂苷 R_{G1}、R_e、R_{b1} 进样量分别在 4.04 ~ 16.16 μg、4.12 ~ 16.48 μg、3.96 ~ 15.84 μg 范围与各峰面积呈良好线性关系。

3 结果与讨论

3.1 芯片前处理的影响 实验考察了芯片使用之前清洗所需的具体操作及影响。发现使用丙酮、乙醇等有机溶剂冲洗通道后会导致萃取过程中的两相界面不稳定, 易产生波浪状界面且界面维持时间较短(低于 20 min)。分析原因可能是有机溶剂粘附于通道表面残留致使通道表面的亲疏水性质不一致导致萃取过程中的相界面不稳定。相反, 直接用纯水冲洗的芯片形成的相界面更稳定和持久。

经过考察, 本实验最终采用的芯片前处理操作为: 纯水冲洗通道至显微镜下看不见任何杂质后, 以冷风吹干通道, 用甲基丙烯酸酯 AB 胶把二通管切割所得的半二通管粘于进出口小孔正上方, 置通风处 20 min, AB 胶干透即可连接聚四氟乙烯管和注射泵进行实验。芯片萃取装置的整体示意图见图 2。

3.2 两相流速比的影响 鉴于药材初提液(水相)和水饱和正丁醇(有机相)两相的密度和粘度等物理参数的差异, 在层流萃取的过程中形成的两股液

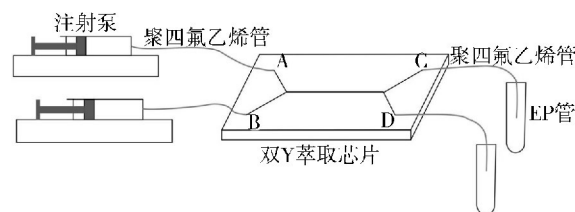


图 2 芯片萃取整体装置示意图

流之间有一定的压力差, 从而影响相界面以及出液口岔口处的液流偏向一边流动。为了降低两相间的压力差, 笔者进行了液流流速的比例调整, 通过流速比例的不同来进行压力差补偿^[9]。

实验对进样口的水饱和正丁醇和药材初提液注入芯片时的泵流速比例进行了考察。以相界面的稳定性、出样口岔口的液流流向为判断指标, 在考察了 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 2(\mu\text{L}/\text{min}) : 1(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $1(\mu\text{L}/\text{min}) : 1(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $1(\mu\text{L}/\text{min}) : 1.5(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $1(\mu\text{L}/\text{min}) : 2(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $1(\mu\text{L}/\text{min}) : 2.5(\mu\text{L}/\text{min})$ 五个比例的流速后, 选择出最优流速比例 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 1 : 2$ 。

3.3 萃取流速的影响 在流速比例 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 1 : 2$ 的前提下, 实验考察了萃取过程中不同的进样流速。于 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 2(\mu\text{L}/\text{min}) : 4(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $4(\mu\text{L}/\text{min}) : 8(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $6(\mu\text{L}/\text{min}) : 12(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $8(\mu\text{L}/\text{min}) : 16(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $10(\mu\text{L}/\text{min}) : 24(\mu\text{L}/\text{min})$ 、 $12(\mu\text{L}/\text{min}) : 24(\mu\text{L}/\text{min})$ 六个流速下用水饱和正丁醇对药材初提液中的人参皂苷进行芯片层流萃取, 收集出样口的样品液, 并与传统药典萃取法萃取所得的人参皂苷样品液进行比较。

实验结果表明芯片层流萃取的萃取效果明显比传统萃取方法的萃取效果好, 并且随着萃取流速的降低, 萃取效率不断增高。在流速为 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 2(\mu\text{L}/\text{min}) : 4(\mu\text{L}/\text{min})$ 时, 人参皂苷 R_{G1} 和 R_e 的萃取率最高, 但在流速 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 2(\mu\text{L}/\text{min}) : 4(\mu\text{L}/\text{min})$ 下人参皂苷 R_{b1} 的萃取率下降了。在流速 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 4(\mu\text{L}/\text{min}) : 8(\mu\text{L}/\text{min})$ 的情况下也出现了人参皂苷 R_{G1} 和 R_e 萃取量增高而人参皂苷 R_{b1} 萃取量降低现象。故从人参总皂苷提取率的角度考虑, 笔者选择了 $v_{(水饱和正丁醇)} : v_{(药材初提液)} = 6(\mu\text{L}/\text{min}) : 12(\mu\text{L}/\text{min})$ 作为萃取的最优流速。

3.4 芯片通道宽度的影响 本实验考察了不同宽度的萃取通道对萃取结果的影响。实验分别考察了萃取通道宽度为 100、200、300 μm 的 3 种芯片的萃取效果。由表 1 结果显示随着通道宽度的增大, 萃

取效率下降。通道宽度于萃取效率而言是越小越好,但实验操作中发现通道越小,注射器与聚四氟乙烯管之间以及聚四氟乙烯管与半三通管之间的压力会随之越大,压力越大则越容易导致漏液。故笔者选择出宽度 200 μm 作为芯片层流萃取的最优萃取通道宽度。

表 1 不同宽度的萃取通道萃取所得的 3 种人参皂苷浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

化合物	萃取通道		
	100 μm	200 μm	300 μm
人参皂苷 Rg_1	12.5430	10.3511	9.9321
人参皂苷 Re	6.5467	5.2983	5.0632
人参皂苷 Rb_1	14.6854	12.8952	12.2503

3.5 芯片萃取重现性的考察 在 $v_{\text{水饱和正丁醇}} : v_{\text{药材初提液}} = 6(\mu\text{L}/\text{min}) : 12(\mu\text{L}/\text{min})$ 下,用萃取通道宽度为 200 μm 的芯片对人参皂苷进行萃取,实验重复 6 次,分别收集萃取所得样品,再进行高效液相检测。结果测得的人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 含量的 RSD 分别为 0.90%、1.13%、0.91%。由此可见此萃取方法重现性良好。

3.6 与传统样品前处理方法的比较 与传统液-液萃取系统相比,在芯片液-液萃取系统中,有机相和水相之间具有较大的比表面积和较短的扩散距离,因为具有较高的萃取效率和较快的萃取速度。本实验中,微流控芯片萃取所得人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 含量分别为 1.05、0.54、1.30 mg/mL ,萃取时间仅需 2 min,与传统液-液萃取相比,芯片萃取各有效成分的萃取率分别提了 12%、13%、15%。

4 结论

本实验优化了基于微流控芯片技术对人参中的人参皂苷进行萃取的实验条件,通过对使用芯片的前处理清洗、药液与萃取剂引入的流速和流速比、萃取通道的宽度等因素进行考察,优化出理想的实验

条件。此实验方法与传统的液-液萃取法相比,具有自动化程度高、萃取效果好、有机溶剂消耗少等优势。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 8.
- [2] Ángel R, Mhammed Z. Sample preparation for micro total analytical systems ($\mu\text{-TAS}$) [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013 43: 174-188.
- [3] Xiao H, Liang D, Liu G, et al. Initial study of two-phase laminar flow extraction chip for sample preparation for gas chromatography [J]. *Lab Chip* 2006 6(8): 1067-1072.
- [4] Copper CL, Newman CI, Collins GE. Simple and rapid extraction, separation and detection of alkaloids in beverages [J]. *J Sep Sci* 2008 31(21): 3727-3731.
- [5] Tokeshi M, Minagawa T, Kitamori T. Integration of a Micro-extraction System on a Glass Chip: Ion-Pair Solvent Extraction of $\text{Fe}(\text{II})$ with 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline-disulfonic Acid and Tri-n-octylmethylammonium Chloride [J]. *Anal Chem* 2000 72(7): 1711-1714.
- [6] Tetala KK, Swarts JW, Chen B, et al. A three-phase microfluidic chip for rapid sample clean-up of alkaloids from plant extracts [J]. *Lab Chip* 2009 9(14): 2085-2092.
- [7] Mu XA, Liang QL, Hu P, et al. Selectively modified microfluidic chip for solvent extraction of Radix Salvia Miltiorrhiza using three-phase laminar flow to provide double liquid-liquid interface area [J]. *Microfluid Nanofluid*, 2010 9(2-3): 365-373.
- [8] 殷学峰, 沈宏, 方肇伦. 制造玻璃微流控芯片的简易加工技术 [J]. *分析化学* 2003 31(1): 116-119.
- [9] Shen Y, van Beek TA, Zuillhof H, et al. Hyphenation of optimized microfluidic sample preparation with nano-liquid chromatography for faster and greener alkaloid analysis [J]. *Anal Chim Acta* 2013 797: 50-56.