

从人参果肉中提取人参皂苷-Re 工艺的研究

刘继华, 卢 丹, 刘金平, 李平亚

(吉林大学再生医学研究所, 吉林 长春 130021)

摘要: 目的: 建立从人参果肉中分离人参皂苷-Re 的方法。方法: 利用 D4020 大孔吸附树脂吸附人参果总皂苷, 分别以水、2% NaOH 和 90% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 回收乙醇, 静置沉淀, 得到人参皂苷-Re。结果: 所得产品的含量达到 50% 以上。结论: 以本法提取分离人参皂苷-Re, 方法简便易行, 为进一步将人参皂苷-Re 开发为新药奠定了基础。

关键词: 人参皂苷-Re; 大孔吸附树脂; 高效液相色谱法

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)02-0014-03

人参果为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的果实, 秋季采收, 除去果核, 晒干, 即得人参果肉。人参果肉中含有大量的人参果总皂苷, 人参皂苷-Re 为其中的活性成分。据报道, 给 37 例高血糖患者服用人参果总皂苷, 2 个月为 1 疗程, 治疗组空腹血糖下降率为 62.1%, 采用双盲法服用安慰剂的对照组治疗前后的血糖值无明显差异^[1~2]。本课题组研究证明, 人参果中的人参皂苷-Re 具有降低高血糖模型大鼠血糖的作用, 为了进一步将人参果肉开发为治疗糖尿病的新药, 本文探讨了从人参果肉中提取分离人参皂苷-Re 的工艺^[3~4]。

1 仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪; 岛津 UV-1601PC 分光光度计; D101 D4020 AB-8 大孔吸附树脂(天津南开大学化工厂); 人参皂苷-Re 对照品(中国生物制品检定所); 人参果肉(吉林省靖宇第一参厂); 试剂

均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法学实验 本文以高效液相色谱法测定人参皂苷-Re 的含量。检测条件: ODS 色谱柱 (4.6m × 250mm), 流动相为乙腈-磷酸(0.05%) (100:400)^[5], 流速为 1.0ml/min, 检测波长 203nm, 柱温 40℃。进样量为 10μl。

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷-Re 对照品 13mg, 置 50ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1ml 含人参皂苷-Re 0.26mg)。

2.1.2 测定波长的选择 经岛津 UV-160 IPC 分光光度计扫描, 人参皂苷-Re 甲醇溶液在波长 203.8nm 波长处有最大吸收, 故选定测定波长为 203nm。

2.1.3 线性关系考察 精密量取人参皂苷 Re 对照品溶液(0.26mg/ml) 2.4.6.8.10.12.14μl 进样, 以对照品峰面积为纵坐标, 对照品的量为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为 $Y = 767791.6X + 8238.7$, $r = 0.99992$ 。结果表明, 在 0.52~ 3.64μg 范围内二者呈

良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液(0.26 mg/ml) 8ml, 重复进样 5 次, 结果精密度良好, RSD 为 0.513%。

2.1.5 重复性试验 同一批样品, 依法独立测定 5 次, 结果表明重复性良好, RSD 为 1.45%。

2.1.6 回收率试验 称取已知含量的供试品, 精称人参皂苷 Re 对照品 12.5mg, 加入样品中, 按供试品溶液制备各方法制备, 最后定容于 100ml 量瓶中, 即为供试液, 依法测定, 计算回收率, 平均加样回收率为 99.12%, RSD 为 1.34%。

经以上方法学考察, 证明本方法测定人参皂苷 Re, 线性关系良好, 精密度、重复性、回收率较好, 方法可行。

2.2 利用大孔吸附树脂分离人参皂苷-Re 工艺的考察 D4020 大孔吸附树脂是树脂厂为提取分离皂苷类有机物而研究设计的新型树脂之一, 它能够选择性吸附人参皂苷类成分, 而很少吸附多糖、蛋白质等高分子物质以及非极性有机物, 是提取分离人参皂苷类物质的理想树脂。

2.2.1 大孔吸附树脂预处理方法 装柱前清洗设备及管道, 以防有害物对树脂的污染, 并排净设备内的水; 先于吸附柱内加入相当于装填树脂体积 0.4~0.5 倍的乙醇, 然后将新树脂投入柱中, 使其液面高出树脂层面约 0.3m, 浸泡 24h; 用 2 倍树脂体积 (2BV) 乙醇, 以 2BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 4~5h; 继续用乙醇以 2BV/h 的流速通过树脂层, 洗至流出液加两倍体积水不呈白色混浊, 并且流出液在 200~400nm 范围除了乙醇本身吸收外无其它吸收为止, 并且水以同样流速洗净乙醇; 用 2BV 的 5% HCL 溶液, 以 4~6BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 2~4h, 而后用水以同样流速洗至出水 pH 中性; 用 2BV 的 5% NaOH 溶液, 以 4~6BV/h 的流速通过树脂层, 并浸泡 2~4h, 而后用水以同样流速洗至出水 pH 中性。

2.2.2 树脂类型的选择 D4020 AB-8 D101 大孔吸附树脂是树脂厂为提取分离皂苷类有机物而研制设计的树脂。本实验对其进行了筛选, 选择合适的树脂进行实验。

取人参果肉水提液 1000ml, 分别通过预先处理好的 D4020 AB-8 D101 大孔吸附树脂(100g), 经水洗、醇洗, 收集醇液, 蒸干, 测其总皂苷含量, 结果见表 1。

表 1 D4020、AB-8 和 D101 树脂吸附总皂苷量的比较

树脂类型	D101	AB-8	D4020
总皂苷含量(g)	25	56	61

试验表明 D4020 能够选择性吸附人参皂苷类成分, 而很少吸附多糖、蛋白质等高分子物质以及非极性有机物, 是提取人参皂苷的理想树脂类型。

2.2.3 最佳洗脱溶剂的确定 由于人参皂苷是从水溶液中被树脂吸附的物质, 解吸时可选用水溶性的有机溶剂和甲醇、乙醇或丙酮等; 用水稀释成为稀溶液效果更好, 由于甲醇的毒性较大, 而丙酮的挥发性较强, 均不适合工业生产, 因而从工业生产条件、成本及对环境的影响等考虑, 选择乙醇水溶液为洗脱剂。

2.2.4 洗脱液用量的确定 取人参果肉的水提液, 滤过, 滤液上大孔吸附树脂(D4020 大孔吸附树脂, 20g), 经 2% NaOH 洗脱、水洗脱后, 分别用相当于人参果肉的水提液的 1、2、3、5、10 倍体积的 90% 乙醇洗脱液洗脱(流速 5ml/min), 依次收集乙醇洗脱液, 至流出液不显皂苷反应, 以 HPLC 法检测人参皂苷 Re 含量, 结果见表 2。

表 2 乙醇洗脱剂体积的选择

乙醇洗脱液(倍)	1	2	3	5	10
总皂苷的产量(g)	12	23	46	50	51

结果表明, 使用 3、5、10 倍体积的洗脱液时, 总皂苷的产量相差不多, 因而从节省能源, 人力的角度考虑, 以 3 倍体积的洗脱液洗脱是合适的。

2.2.5 洗脱剂碱浓度的选择 人参果肉经水提取后, 提取液分别上 D4020 树脂柱, 分别选用 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% NaOH 碱溶液洗脱色素至洗脱液无色为止, 水洗至中性, 继以 90% 乙醇洗脱, 回收溶液, 静置沉淀, 即得。以人参皂苷 Re 的含量为检测指标设计平行实验, 选择最佳碱浓度, 结果见表 3。

表 3 碱浓度的选择实验结果

NaOH 浓度(%)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Re 含量(g/100g)	26.5	31.2	38.4	39.1	39.5

从表 3 中可以看出, 碱浓度在 2.0%、2.5%、3.0% 时, 对杂质的洗脱效果较好, 即人参皂苷 Re 含量高, 而碱浓度小于 2.0% 时, 杂质较多, 因此选用 2.0% NaOH 溶液洗脱, 以除去色素等杂质。

2.2.6 洗脱剂乙醇浓度的选择 人参果肉经水提取后, 将提取液上大孔吸附树脂柱, 经 2% NaOH 洗脱、水洗至中性后, 再选用 50%、60%、70%、80%、

90% 乙醇进行洗脱至无皂苷反应, 以人参皂苷 Re 含量为检测指标设计平行实验, 选择最佳醇洗浓度, 结果见表 4。

表 4 不同浓度乙醇洗脱得人参皂苷中 Re 的含量

乙醇浓度(%)	50	60	70	80	90
Re 含量(g/100g)	45.4	49.0	55.1	65.0	78.3

从表 4 可以看出乙醇浓度越高, 得到的产品中 Re 的含量越高. 选择 90% 浓度乙醇进行洗脱. 为最佳洗脱条件。

3 样品的测定

通过以上工艺条件的研究, 制定了从人参果肉中提取人参皂苷-Re 的生产工艺, 依照本工艺进行小试生产试验, 对三批小试样品的人参皂苷 Re 含量进行检查, 结果见表 5。

表 5 三批小试样品的检查结果

批号	20030419	20030422	20030510
投料量(g)	85	85	85
药粉量(g)	18.54	18.18	17.83
Re 含量(%)	55.0	56.1	57.3

由表 5 可见, 按本工艺生产的三批小试样品, 人参皂苷-Re 含量均大于 50.0% 工艺稳定可行。人参皂苷-Re 含量测定的液相图谱如附录图 1 2 所示。

4 讨论

经过上述实验, 选择最佳分离工艺为: 人参果水提液上 D4020 大孔吸附树脂柱, 先水洗至洗脱液无色, 然后 2% 碱液洗脱杂质, 水洗至中性, 90% 乙醇洗

脱, 收集乙醇洗脱液, 浓缩, 浓缩液静置沉淀, 滤过, 沉淀干燥, 即得。本工艺简单、成本低, 所得的人参皂苷 Re 纯度可满足二类药开发的要求, 可应用于工业大规模生产中。

本论文中首次应用 D₄₀₂₀ 大孔吸附树脂分离提取含有人参皂苷 Re 高达 55% 以上的人参果总皂苷, 为今后进一步开发以人参皂苷-Re 为有效成分的制剂奠定了基础。

实验结果表明, 影响吸附纯化的因素有: (1) 上样前树脂柱中充满水, 水面略高于树脂面, 树脂中无气泡; (2) 人参果的水煎液应过滤后上柱, 以除去不溶性杂质, 防止树脂柱堵塞及污染; (3) 药液上柱前不能太浓, 太浓粘度大, 易堵塞大孔吸附树脂孔隙, 本工艺药材的煎煮液滤过后直接上柱即可。

参考文献:

- [1] 张树臣. 中国人参[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1992. 351.
- [2] 王本群, 王铁生, 徐东铭. 人参研究进展[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1991. 29.
- [3] 陈彦. 人参果果汁加工技术研究[J]. 食品工业科技, 2001(4): 25.
- [4] 张家骊. 人参果保健饮料的研制[J]. 饮料工业, 2001, 4(2): 13.
- [5] 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 6.