

## · 中药提取工艺研究 ·

## 大孔吸附树脂纯化人参总皂苷的工艺研究

姚海燕 万玉华 沈雅婕 李小莹 刘明平 李耿 孟祥超

**【摘要】 目的** 应用大孔吸附树脂纯化人参提取物中人参皂苷,并对其工艺进行优化。**方法** 以人参总皂苷的含量为指标,比较不同型号树脂和不同工艺条件对人参皂苷的分离纯化能力。**结果** X-5 树脂具有较好的吸附和解吸性能,其最佳工艺条件为上样液质量浓度为 5.99 mg/ml,上样体积为 2 倍柱体积,吸附流速为 1.1 ml/min,用 70% 乙醇洗脱,用量 5 倍柱体积,洗脱流速为 1.0 ml/min,人参总皂苷纯度可达 60% 以上。**结论** 该工艺简便,适宜于人参总皂苷的工业化分离纯化。

**【关键词】** 人参总皂苷; 大孔树脂; 分离纯化

**【中图分类号】** R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.02.002

**Study on purification process of ginsenosides with macroporous resin** YAO Hai-yan, WAN Yu-hua, SHEN Ya-jie, et al. Chinese Academy of Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Corresponding author: LI Geng, E-mail: lg@gzhtcm.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To optimize the refining technology for total saponin of panax ginseng by macroporous resin. **Methods** Based on the content of total saponin of panax ginseng, comparison of different types of resin and different technological conditions on the separation and purification capacity of total saponin of panax ginseng. **Results** X-5 macroporous resin's adsorption and desorption ability was better, the best technological conditions were 70% ethanol as elution agent, volume of elution agent was 5 BV and the sample volume agent was 2 BV, concentration of sample was 5.99 mg/ml and the flow velocity of adsorption was 1.1 ml/min and the flow eluting velocity was 1.0 ml/min. In these condition, purity of total saponin of panax ginseng could reach above 60%. **Conclusion** Macroporous resin method was easy to separate and purify total saponin of panax ginseng in industry.

**【Key words】** Total saponin of panax ginseng (TSPG); Macroporous resin; Separation and purification

人参皂苷是一种三萜类化合物,主要存在于人参属药材中。人参皂苷是人参中的主要活性成分,具有增加白细胞数量、提高人体免疫力、促进物质代谢、抗疲劳、抗衰老等作用<sup>[1-2]</sup>。选用何种纯化方法和手段决定了人参皂苷提取物的纯度以及提取

物应用于治疗疾病的作用效果的强弱,也成为人参提取工艺的核心,而大孔吸附树脂法是一种常用的方法。大孔吸附树脂是一类不含交换基团且有较大孔结构的高分子吸附树脂,具有吸附性和筛选性相结合的分离、纯化等多种功能,近年来广泛应用于中草药有效成分的提取、分离、纯化工作中<sup>[3-4]</sup>。本研究通过单因素试验,对 X-5 型大孔树脂纯化人参皂苷工艺条件及参数进行研究,探索纯化人参皂苷的工艺流程,从而进一步优化人参皂苷的精制工艺,为人参皂苷的研究、提取及生产提供参考。

## 1 试剂与仪器

Bluestar-A 紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪

基金项目:广东省产学研项目(2011B090400545);广州市白云区科技支撑计划课题(2009-SZ-44)

作者单位:510006 广州中医药大学中药学院[姚海燕(硕士研究生)、沈雅婕(硕士研究生)、李小莹、刘明平、李耿];霸王(广州)有限公司(万玉华);广州市花都区梯面镇人民政府(孟祥超)

作者简介:姚海燕(1988-),女,2010 级在读硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础研究。E-mail: 850305243@qq.com

通讯作者:李耿(1983-),博士,讲师。研究方向:中药新产品开发。E-mail: lg@gzhtcm.edu.cn

器有限公司), HH-S 水浴锅(巩义予华仪器有限责任公司), RE-52A 旋转蒸发器(巩义予华仪器有限责任公司), SHZ-B 循环水真空泵(巩义予华仪器有限责任公司)。

参须粗提物由霸王(广州)有限公司提供; D101、X-5、HPD-400、AB-8、ADS-17 共 5 种大孔吸附树脂: 广州市福宁祥化工有限公司; 人参皂苷 Re 对照品(批号: 11041201), 购于中国食品药品检定研究院; 香草醛(批号: 20100315)、高氯酸(批号: 20100904)、冰醋酸(批号: 20090320)、乙醇(批号: 20100806)、乙醚(批号: 20110719)、正丁醇(批号: 20110428)均为分析纯, 购于天津市百世化工有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 标准曲线建立

精密称取人参皂苷 Re 对照品适量, 加甲醇制成每 1 ml 含 0.2 mg 的对照品溶液, 即得人参皂苷 Re 对照品储备液<sup>[5]</sup>。精密吸取人参皂苷对照品溶液 0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.5 ml、0.6 ml、0.7 ml、0.8 ml 分别置于刻度试管中, 水浴蒸干, 精密加入 5% 的香草醛-冰醋酸溶液 0.2 ml 和高氯酸 0.8 ml, 在 60℃ 下水浴反应 15 分钟, 冰水冷却 10 分钟以终止反应, 精密加入冰醋酸 5 ml, 摇匀, 照紫外-可见分光光度法<sup>[6]</sup>, 在 555 nm 处测定吸光度, 以吸光度(Y) 对人参皂苷质量(X) 进行线性回归, 得回归方程为  $Y = 4.997X + 0.003$ 。( $r = 0.9996$ )。结果表明人参皂苷在 24.12 ~ 193.0 μg 范围内呈良好的线性关系, 方法学考察符合要求。

### 2.2 不同大孔吸附树脂对人参总皂苷的静态吸附容量及静态洗脱考察

取适量经预处理的 D101、X-5、HPD-400、AB-8、ADS-17 大孔吸附树脂, 抽干, 称取各种大孔吸附树脂 2 g, 置于具塞锥形瓶中。精密加入 25 ml 参须提

取液(浓度 11.98 mg/ml), 室温条件下振荡 24 小时, 滤过。取 2 ml 滤液, 处理后测定其吸光度, 计算吸附容量(mg/g 树脂)和吸附率。结果见表 1。

取经过静态吸附的各种树脂, 蒸馏水洗涤后, 置于具塞锥形瓶中, 加入 25 ml 体积分数为 70% 的乙醇, 室温条件下振荡 24 小时, 滤过。取 0.1 ml 滤液, 处理后测定其吸光度, 计算解析率。结果见表 1。

通过比较, 得知五种大孔吸附树脂对人参总皂苷吸附率依次是 X-5 > AB-8 > HPD-400 > D101 > ADS-17; 在解吸附试验中, HPD-400 树脂的解吸附率较 X-5 高, 但其吸附容量比 X-5 的吸附容量小, 损失率较高, 综合考虑, 确定使用 X-5 树脂分离纯化人参总皂苷。

### 2.3 NaHCO<sub>3</sub> 洗脱除杂对人参总皂苷洗脱纯度的影响

分别称取两份经过预处理的 X-5 大孔吸附树脂 30 g 湿法上柱, 标记为 A、B。各量取参须提取液 100 ml 过柱。随后两柱子分别加蒸馏水洗至水洗液无 Molish 反应后: A 柱加 2% NaHCO<sub>3</sub> 100 ml 溶液洗脱, 收集洗脱液备用; 再加 75% 乙醇 200 ml 洗脱, 收集醇洗液备用。B 柱直接加 75% 乙醇 200 ml 洗脱。

A、B 柱醇洗液用蒸馏水定容 500 ml 后取 10 ml 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 分次洗涤并定容至 25 ml。量取 0.1 ml 溶液, 处理后测定其吸光度, 计算两份醇洗液中人参总皂苷的重量。另各取 20 ml 醇洗液, 水浴蒸干, 烘干至恒重后, 记录其重量。实验结果见表 2。

结果表明, 先用 2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗脱除杂, 不但没有洗脱人参皂苷, 反而能增加醇洗液中人参总皂苷的纯度, 故考虑对大孔吸附树脂纯化人参总皂苷时, 先用 2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗脱。

表 1 不同树脂型号筛选结果

| 树脂型号    | 吸附前溶液浓度(mg/ml) | 吸附后溶液浓度(mg/ml) | 解析后溶液浓度(mg/ml) | 吸附容量(mg/g) | 吸附率(%) | 解析率(%) |
|---------|----------------|----------------|----------------|------------|--------|--------|
| D101    | 11.98          | 2.549          | 8.503          | 114.4      | 78.7   | 90.2   |
| X-5     | 11.98          | 1.269          | 10.150         | 125.7      | 89.4   | 94.8   |
| HPD-400 | 11.98          | 1.774          | 10.000         | 116.0      | 85.2   | 98.7   |
| AB-8    | 11.98          | 1.504          | 9.926          | 119.6      | 87.4   | 94.8   |
| ADS-17  | 11.98          | 6.888          | 4.252          | 61.2       | 42.5   | 83.5   |

表 2 A、B 柱醇洗液中人参总皂苷纯度测定结果

| 编号 | 吸光度 A  | 洗脱液中人参总皂苷重量 (mg) | 干膏重量 (g) | 纯度 (%) |
|----|--------|------------------|----------|--------|
| A  | 0.4226 | 1050.11          | 1.50     | 0.70   |
| B  | 0.4224 | 1049.61          | 1.68     | 0.63   |

## 2.4 洗脱溶剂的选择

称取经过预处理的大孔吸附树脂 30 g 湿法上柱。量取参须提取液 100 ml 过柱。水洗液无 Molish 反应, 然后加 2%  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 ml 洗脱, 弃去  $\text{NaHCO}_3$  洗脱液, 再依次用体积分数分别为 10% 乙醇、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇各 150 ml 洗脱, 洗脱流速为 1 ml/min, 每 25 ml 收集 1 份洗脱液。

从各份洗脱液中精密量取 10 ml 至蒸发皿中, 蒸干后, 用甲醇洗涤, 定容至 25 ml。取 0.1 ml 溶液, 处理后测定其吸光度, 计算各份洗脱液中人参总皂苷的重量。结果见表 3。

表 3 洗脱溶剂的选择

| 编号 | 洗脱溶剂   | 洗脱液中皂苷含量 (mg) | 洗脱率 (%) |
|----|--------|---------------|---------|
| 1  | 10% 乙醇 | 18.12         | 1.73    |
| 2  | 30% 乙醇 | 72.95         | 7.09    |
| 3  | 50% 乙醇 | 569.00        | 59.54   |
| 4  | 70% 乙醇 | 351.60        | 33.59   |
| 5  | 90% 乙醇 | 35.09         | 3.35    |

由表中可以看出, 50% 乙醇的洗脱率最高, 但由于 50% 乙醇并不能将大部分皂苷洗脱下来, 故确定体积分数为 70% 的乙醇作为洗脱剂。

## 2.5 泄露曲线的确定

称取经过预处理的大孔吸附树脂 30 g 湿法上柱。量取 200 ml 参须提取液, 上柱, 以 1 ml/min 的流速过柱, 过柱液每 10 ml 收集 1 份。

过柱液用乙醚萃取两次 (10 ml、5 ml), 弃去乙醚层; 水层用水饱和正丁醇萃取三次 (15 ml、10 ml、5 ml), 合并水饱和正丁醇层, 蒸干后, 用甲醇分次洗

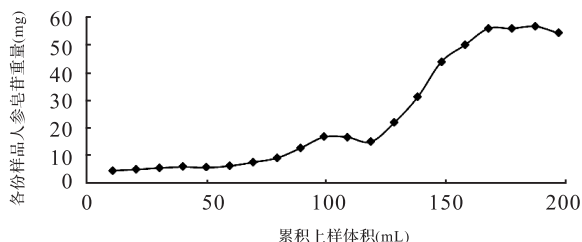


图 1 人参总皂苷泄露曲线图

涤, 定容至 25 ml。取 0.1 ml 溶液, 处理后测定其吸光度, 计算过柱液中人参总皂苷的重量, 绘制泄露曲线。结果见图 1。

由图可知在累积体积 100 ml 后发生明显泄露, 故可确定最大上样量为 100 ml。

## 2.6 上样浓度考察

称取四份经过预处理的大孔吸附树脂 30 g 湿法上柱。量取四份 100 ml 参须提取液于烧杯中, 编号 1~4, 分别加入蒸馏水 150 ml、100 ml、50 ml、0 ml, 搅拌, 所得上样液浓度分别为 4.79 mg/ml、5.99 mg/ml、7.99 mg/ml、11.98 mg/ml, 以 1 ml/min 的流速过柱。再加蒸馏水洗至水洗液无 Molish 反应, 收集过柱液和水洗液, 合并浓缩至约 30 ml。浓缩液用乙醚萃取三次 (50 ml、30 ml、20 ml), 弃去乙醚层。水层用水饱和正丁醇萃取四次 (30 ml、20 ml、20 ml、15 ml), 合并水饱和正丁醇层, 蒸干后, 用甲醇分次洗涤, 定容至 25 ml 容量瓶中, 摇匀。取 0.1 ml 溶液, 处理后测定其吸光度, 计算各份溶液中人参总皂苷重量。结果见图 2。

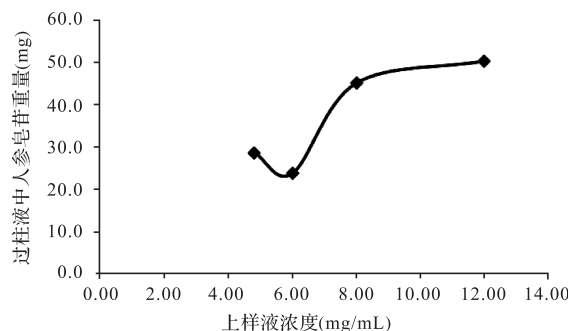


图 2 上样液浓度对树脂吸附人参总皂苷的影响

由上图可知当上样液浓度为 5.99 mg/ml 时, 大孔吸附树脂吸附效果相对较好。

## 2.7 上样流速考察

称取四份经过预处理的大孔吸附树脂 30 g 湿法上柱。量取四份 100 ml 参须提取液, 各加蒸馏水 100 ml。上柱后, 分别以 1.1 ml/min、2.2 ml/min、3.3 ml/min、4.4 ml/min 的流速过柱。收集过柱液和水洗液, 合并浓缩至约 30 ml。浓缩液用乙醚萃取三次 (50 ml/30 ml/20 ml), 弃去乙醚层, 水层用水饱和正丁醇萃取四次 (30 ml/20 ml/20 ml/15 ml), 合并水饱和正丁醇层, 蒸干后, 用甲醇分次洗涤, 定容至 25 ml 容量瓶中, 摇匀。取 0.1 ml 溶液, 处理后测定其吸光度, 计算各份溶液中人参总皂苷重量。结果见图 3。

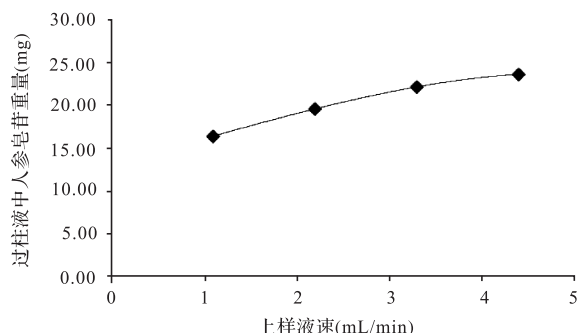


图3 样流速对树脂吸附效果的影响

由下图可知吸附流速为 1.1 ml/min 时过柱液中人参总皂苷量最少及树脂吸附量最多,故吸附流速为 1.1 ml/min。

## 2.8 洗脱剂用量考察

称取经过预处理的大孔吸附树脂约 30 g 湿法上柱。量取 100 ml 参须提取液至烧杯中,加蒸馏水 100 ml,上样,流速为 1.1 ml/min。上样后,用蒸馏水洗至无 Molish 反应后,加 2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 100 ml 洗脱,弃去 NaHCO<sub>3</sub> 洗脱液,继以 100 ml 体积分数为 70% 乙醇洗脱,洗脱流速 2 ml/min,每 25 ml 收集 1 份洗脱液。

从 25 ml 洗脱液中精密量取 10 ml,蒸干后,用甲醇分次洗涤,定容至 25 ml 容量瓶。取 0.1 ml 溶液,处理后测定其吸光度,计算各洗脱液中人参总皂苷的重量。结果见图 4。

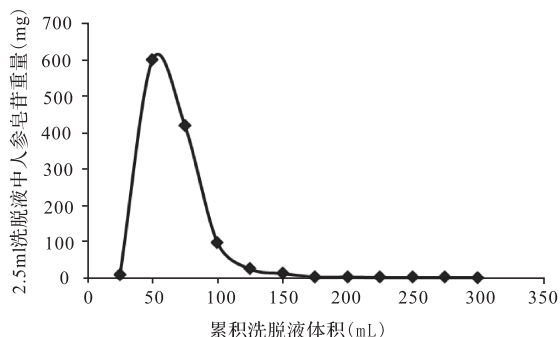


图4 洗脱剂用量考察曲线图

由上图可知当洗脱剂用量为 250 ml 时,洗脱的人参总皂苷为 99% 以上,从经济与时间上考虑,洗脱剂用量为 250 ml。

## 2.9 洗脱流速的考察

称取经过预处理的大孔吸附树脂约 30 g 湿法上柱。量取四份 100 ml 参须提取液,加蒸馏水 100 ml,搅拌,以 1.1 ml/min 的流速上柱。用蒸馏水洗至无 Molish 反应,加 2% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 100 ml

洗脱,继以用 100 ml 体积分数为 70% 乙醇洗脱,洗脱流速分别调为 0.5 ml/min,1 ml/min,1.5 ml/min,2 ml/min,收集洗脱液。

各份洗脱液用蒸馏水定容至 500 ml 容量瓶,精密量取 5 ml 的溶液,蒸干后,用甲醇分次洗涤,定容至 25 ml 容量瓶中,摇匀。取 0.1 ml 溶液,处理后测定其吸光度,计算各份洗脱液中人参总皂苷的重量。结果见表 4。

表4 人参总皂苷洗脱流速考察结果

| 编号 | 洗脱流速 (ml/min) | 洗脱液中人参总皂苷的含量 (mg) | 洗脱率 (%) |
|----|---------------|-------------------|---------|
| 1  | 0.5           | 1034.8            | 87.61   |
| 2  | 1.0           | 1052.6            | 89.11   |
| 3  | 1.5           | 1035.3            | 87.65   |
| 4  | 2.0           | 1015.8            | 86.00   |

由表可知当洗脱速度为 1 ml/min 时,洗脱率最高为 89.11%,故洗脱流速为 1 ml/min。

## 2.10 大孔吸附树脂分离富集工艺验证试验

采用 X-5 大孔吸附树脂,条件为上样液质量浓度为 5.99 mg/ml,上样体积为 2 倍柱体积,吸附流速为 1.1 ml/min,70% 乙醇洗脱,用量 5 倍柱体积,洗脱流速为 1.0 ml/min 进行实验,收集洗脱液,处理并测定吸光度,计算洗脱液中人参总皂苷的重量。

另外于 500 ml 容量瓶中,精密吸取 20 ml 溶液至干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,烘干至恒重后称定重量,计算恒重后干膏重量(g)。

计算洗脱液中人参总皂苷的重量和固体中人参总皂苷的纯度(%)。结果见表 5。

表5 人参总皂苷的纯度测定及计算结果

| 编号 | 干膏重量 (g) | 洗脱液中人参总皂苷量 (mg) | 纯度 (%) | 平均纯度 (%) ( $\bar{x} \pm s$ ) |
|----|----------|-----------------|--------|------------------------------|
| 1  | 0.77     | 544.3           | 70.7   | 69.8% $\pm$ 1.2%             |
| 2  | 0.79     | 545.3           | 69.0   |                              |

结果表明,在选定的纯化条件下,洗脱液总固体中人参总皂苷纯度达 69.8%,提示该工艺合理、稳定、可行。

## 3 讨论

本文通过对不同型号的大孔树脂进行考察,应用紫外-可见分光光度法以及 Molish 化学反应对大孔树脂的吸附力进行判定简单有效。确定 X-5 大孔吸附树脂纯化人参总皂苷的最佳工艺条件为:先

用 2%  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗脱除杂,其中上样液质量浓度为 5.99 mg/ml,上样体积为 2 倍柱体积(100 ml),吸附流速为 1.1 ml/min,用 70% 乙醇洗脱,用量 5 倍柱体积(250 ml),洗脱流速为 1.0 ml/min。X-5 型大孔树脂富集和纯化人参总皂苷的容量大、效果好,且工艺简便,生产连续化程度高,适宜于工业化生产人参总皂苷的分离纯化。

### 参 考 文 献

[1] 毛祖林,李晓波,龚文明,等. 人参皂苷提取工艺优选[J]. 时珍国医国药,2008,19(11):2762-2763.

- [2] 丁振铎,桑咏梅,薛佳,等. 大孔树脂纯化八珍汤苷类部位的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报,2010,26(5):518-523.
- [3] 闫广军,张宝江,徐道娟. 几种常用人参提取工艺研究比较[J]. 山东医药工业,2002,21(4):88.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:8.
- [5] 郑宏钧,詹亚华. 现代中药材鉴别手册[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:33.
- [6] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京:学苑出版社,1994:1.

(收稿日期:2012-10-09)

(本文编辑:刘群)

## 煎药机煎煮时浸泡时间对旋覆代赭汤 5 种有效成分溶出量的影响

张家成 刘峰 张岩 章军 穆兰澄 郭允 彭智平 焦拥政 仝小林

**【摘要】 目的** 以旋覆代赭汤中人参和甘草为主要研究对象,运用高压中药煎煮机,初步探索复方中人参和甘草在高压煎煮时浸泡时间对主要成分溶出的影响。**方法** 浸泡时间:0、10、20、30、40、50、60、120 分钟。煎煮时间:30 分钟。加水量:6 倍。煎煮次数:1 次。用简单对比实验法确定煎煮工艺。每种工艺取旋覆代赭汤(人参 6 g、旋覆花 9 g、代赭石 9 g、炙甘草 6 g、清半夏 9 g、大枣 4 枚、干姜 10 g)10 剂,使用高压煎药机进行煎煮,重复 3 次。用高效液相色谱法(HPLC 法)测定其煎煮液中所含 5 种有效成分人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草酸铵、绿原酸含量,计算、比较不同煎煮工艺下煎出液中各有效成分的溶出量并绘制溶出曲线。**结果** 在煎煮时间 30 分钟,加水量 6 倍药重条件下,不同浸泡时间对旋覆代赭汤中人参、甘草等主要成分的含量没有明显影响。**结论** 在煎煮时间 30 分钟,加水量 6 倍药重的高压煎煮条件下,煎煮前的浸泡时间对药材中部分成分的溶出无明显影响。

**【关键词】** 旋覆代赭汤; 煎药机; 煎煮工艺; 高效液相色谱; 有效成分

**【中图分类号】** R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.02.003

**Immersion time influence on 5 major bioactive components of Xuanfu Daizhe Decoction decocted by modern decocting medicinal herbs machine** ZHANG Jia-cheng, LIU Feng, ZHANG Yan, et al. Department of Endocrinology, Guang'an men Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Corresponding author: TONG Xiao-lin, E-mail: xiaolintong66@sina.com; LIU Feng, E-mail: liufeng3021@163.com

基金项目:国家中医药管理局 2010 年度中医药行业科研专项(201007010);国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB530602)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院内分泌科[张家成(硕士研究生)、刘峰、张岩(硕士研究生)、郭允(硕士研究生)、彭智平(硕士研究生)、仝小林],药剂科(穆兰澄),中医男科兼科研处(焦拥政);北京中医药大学针灸推拿学院[张家成(硕士研究生)];中国中医科学院中药所(章军)

作者简介:张家成(1985-),2005 级七年制在读硕士研究生。研究方向:糖尿病临床及科研。E-mail:13426324787@163.com

通讯作者:仝小林(1956-),博士,博士生导师,主任医师,中国中医科学院首席研究员,国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目首席科学家。研究方向:中医内分泌临床及科研。E-mail: xiaolintong66@sina.com;刘峰(1979-),博士,出站博士后。研究方向:中药煎煮规范化研究。E-mail: liufeng3021@163.com。仝小林、刘峰并列本文通讯作者。