

正交试验优化超高压提取人参中人参皂苷的工艺研究

陈瑞战, 张守勤*, 王长征

(吉林大学生物与农业工程学院, 吉林 长春 130025)

摘要:目的 研究超高压提取人参中人参皂苷的最佳工艺。方法 采用超高压技术常温提取, 正交试验优化, 分光光度法检测人参总皂苷的含量。结果 超高压提取人参皂苷的最佳提取工艺参数为: 提取溶剂为50%乙醇, 固液比为1:75, 提取压力为500 MPa, 提取时间2 min, 人参皂苷的得率高达7.76%。结论 超高压提取工艺具有提取效率高、时间短、能耗低、杂质含量少等优点。

关键词: 人参; 超高压技术; 人参皂苷; 正交设计

中图分类号: R284.1

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)03-0365-04

Optimizing super pressure extracting technique for ginsenoside from *Panax ginseng* by orthogonal test

CHEN Rui-zhan, ZHANG Shou-qin, WANG Chang-zheng

(College of Biology and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130025, China)

Abstract: Objective To study the optimum procedure of extracting ginsenoside from *Panax ginseng* by super pressure extracting technique (SPET). **Methods** SPET was used to extract ginsenoside from *P. ginseng* at the normal temperature. The optimum extracting process was selected by the orthogonal test. The contents of ginsenoside in *P. ginseng* were determined by UV-spectrophotometry. **Results** The optimum condition of SPET was as follows: when the solid dissolved in 50% ethanol, ratio of raw *P. ginseng* (g) and solvent (mL) was 1:75, the pressure was kept at 500 MPa for 2 min; the high yield of ginsenoside was up to 7.76%. **Conclusion** SPET has a series of advantages, such as higher efficiency, shorter extracting time, and lower exhausting energy, at the same time, the impurity is little, etc.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; super pressure extracting technique (SPET); ginsenoside; orthogonal design

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科多年生草本植物, 是一种传统的名贵中药材, 其活性部位人参皂苷具有较高的生物活性和药用价值, 用于抗肿瘤、抗心律失常、改善心肌缺血。常用的提取方法有浸渍法^[1]、煎煮^[2]、醇回流、超声、微波处理^[3]、超临界 CO₂ 萃取^[4]。这些方法存在提取时间长、得率低、能耗大等不足。超高压提取技术是一种全新的天然产物有效成分提取技术, 它是利用 100 MPa 以上的流体静压力作用于料液上, 保压一段时间(几分钟), 然后迅速卸压, 进行分离纯化, 达到提取的目的。为此, 本实验将超高压技术应用于人参皂苷的提取, 并采用正交试验对人参皂苷的超高压提取工艺进行了优化, 为天然产物有效成分的提取, 提供了一种新工艺。该工艺具有操作简单、提取得率高、时间短、杂质含量少、能耗低、环保等优点。

1 仪器与材料

DL700 超高压等静压机(上海大隆机器厂), UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂), JY92 型超声波发生器(宁波新芝生物技术研究), MA110 电子天平(精度 0.1 mg, 上海天平仪器厂), RE-52 旋转蒸发器(上海安亭电子仪器厂), DZKW-C 恒温水浴锅, TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

人参产于抚松县万良镇, 经吉林省药品检验所鉴定; 人参皂苷 Re 对照品由中国药品生物制品鉴定所提供, 批号: 110704-200216; 乙醇、甲醇、正丁醇、三氯甲烷、冰醋酸、高氯酸、香草醛均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品处理: 样品(人参干根)干燥, 粉碎过 40 目筛, 按 1:40 加三氯甲烷回流 3 h 脱脂, 回收溶剂,

收稿日期: 2004-05-10

基金项目: 吉林省科委科技发展重要资助项目(20011109-6)

作者简介: 陈瑞战(1967—), 男, 山东胶南人, 副教授, 博士研究生, 主要从事天然药物有效成分提取研究。

* 通讯作者 Tel: (0431) 5094123 E-mail: sqzhang@email.jlu.edu.cn

残渣挥干溶剂,备用。

2.2 人参皂苷提取:精确称取已脱脂的人参干粉末 0.5 g,准确加入一定量的溶剂,密封混匀,按预先设计的高压参数处理,离心,取一定体积上清液,用分光光度法测量吸光度(A)值。

2.3 人参皂苷的测定

2.3.1 标准曲线的制备:精确称取人参皂苷 Re 对照品 6.2 mg,加甲醇定容至 25 mL,精确量取对照品溶液 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 mL 于具塞试管中,加热挥干溶剂,分别加 0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸、0.8 mL 高氯酸,于 60 ℃ 水浴中加热 15 min,加入 5 mL 冰醋酸,冷却至室温。以溶剂作空白,在 400~700 nm 扫描,最大吸收波长为 550 nm。在 550 nm 处测 A 值,得人参皂苷 Re 质量浓度 Y (mg/mL)与吸光度值 A 的回归方程: $Y=0.033 A$, $r=0.999 4$ 。

2.3.2 样品测定:精确量取上述待测样 0.2 mL 于具塞试管中,加热挥干溶剂,分别加 0.2 mL 5%香草醛-冰醋酸、0.8 mL 高氯酸,于 60 ℃ 水浴中加热 15 min,加入 5 mL 冰醋酸,冷却至室温,以溶剂作空白,在 550 nm 处测 A 值,计算人参皂苷提取率 Y。

$$Y=0.019 8 \times A \times \frac{V}{V_1} \times \frac{1}{m} \times 100\%$$

A 为吸光度值,V 为溶液总体积, V_1 为检测时所取溶液体积,m 为人参样品质量

2.4 单因素试验及结果

2.4.1 溶剂的选择:精确称取 0.5 g 已脱脂样品 4 份,分别准确加水 25 mL、甲醇 25 mL、50%乙醇 25 mL、水饱和正丁醇 25 mL,密封混匀,加压 500 MPa,保压 2 min,取上层液离心,在 550 nm 处测定 A 值,计算提取得率(表 1)。要快速、高效的从人参固体粉末中把人参皂苷提取出来,同时尽可能减少杂质的溶出,超高压提取首先需要选择一种合适的溶剂。常用来提取人参皂苷的溶剂有水、甲醇、乙醇、正丁醇(水饱和)等。不同的溶剂对人参皂苷的溶出率不一样,提取工艺条件也不一样。乙醇具有提取得率最高、无毒、易回收等特点。因此,选择乙醇作为超高压提取的溶剂。

2.4.2 溶剂体积分数的选择:精确称取 0.5 g 已脱脂样品 5 份,分别准确加入 10%、25%、75%、90%乙醇 25 mL(料液比为 1:100)密封,加压 500 MPa,保压 2 min、取上层液离心,在 550 nm 处测定 A 值,计算提取得率(表 2)。

提取溶剂乙醇的体积分数的大小,影响人参皂苷的溶出率,同时也影响细胞的结构变化。选择合适

的溶剂体积分数,可以提高得率。当乙醇体积分数增大时,人参皂苷的提取得率增大。而乙醇体积分数为 90%时,人参皂苷的提取收率明显降低。因此,选择乙醇的最佳体积分数为 30%~70%。

表 1 超高压提取人参皂苷的不同溶剂选择

Table 1 Ginsenoside in different solvents by SPET

溶剂	收率/%
水	5.68
50%乙醇	7.14
甲醇	5.93
正丁醇	6.90

表 2 超高压提取人参皂苷的乙醇体积分数

Table 2 Ginsenoside at different concentrations of ethanol by SPET

乙醇体积分数/%	收率/%
10	6.30
30	6.99
50	7.14
70	7.51
90	5.13

2.4.3 固液比的选择:精确称定 0.5 g 已脱脂样品 5 份,分别准确加入 70%乙醇 5 mL(固液比 1:10) 12.5 mL(固液比 1:25)、25 mL(固液比 1:50)、37.5 mL(固液比 1:75)、50 mL(固液比 1:100)密封,加压 500 MPa,保压 2 min,取上层液离心,在 550 nm 处测定 A 值,计算提取收率(表 3)。可以看出当固液比在 1:10~1:100,随着固液比的增加,人参皂苷的提取收率逐渐增加。但考虑到有效成分提取分离的后处理的工作量以及经济性。选择最佳固液比范围为 1:25~1:75。

表 3 超高压提取人参皂苷的不同固液比

Table 3 Ginsenoside in different ratios of solid and solvent by SPET

固液比	收率/%
1:10	6.17
1:25	6.69
1:50	7.14
1:75	7.19
1:100	7.51

2.4.4 压力的选择:精确称定 0.25 g 已脱脂样品 5 份,分别准确加入 70%乙醇 25 mL(固液比 1:100),密封混匀,加压 50、200、350、500、650 MPa,保压 2 min、取上层液离心,在 550 nm 处测定 A 值,计算提取收率(表 4)。压力是超高压提取人参皂苷的一个重要参数,其大小影响皂苷的溶解平衡速率和细胞的破坏程度^[6]。可见,随着提取压力的升高,提取收率逐渐增加。在 100~500 MPa 时,两者呈线性正相关关系。当压力达到 600 MPa 时,提取收率有

表 4 超高压提取人参皂苷的不同压力收率比较
Table 4 Ginsenoside at different pressures by SPET

压力/MPa	收率/%
100	7.24
200	7.36
300	7.43
400	7.45
500	7.51
600	7.44

所降低。由此可以得到最佳压力为:100~500 MPa。
2.4.5 提取时间的选择:在超高压提取过程中,提取时间也是一个重要参数。在相同条件下,结果见图 1。由于提取过程中压力较高,溶剂能够在极短的时间渗透到细胞内部,且人参皂苷能够快速达到溶解平衡,因此提取时间较短(几分钟)。可以看到延长提取时间并不能明显增加人参皂苷的提取收率。

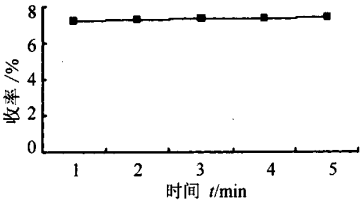


图 1 不同提取时间对提取收率的影响
Fig. 1 Effect of different extracting times on yield

2.5 正交试验结果与数据分析:在单因素试验的基础上,按照尽量减少试验次数和寻求设计最优的原则,选择提取压力(A)、溶剂体积分数(B)和固液比(C)作为因素,每个因素各取 3 个水平,正交试验方案及结果见表 5。

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案及结果
Table 5 $L_9(3^4)$ orthogonal test and results

试验号	A/MPa	B/%	C/(g·mL ⁻¹)	收率 Y/%
1	100	30	25	7.14
2	100	50	50	7.21
3	100	70	75	7.36
4	300	30	75	7.23
5	300	50	25	7.42
6	300	70	50	7.15
7	500	30	50	7.81
8	500	50	75	7.57
9	500	70	25	7.25
k_1	21.61	22.18	21.81	
k_2	21.80	22.20	22.17	
k_3	22.63	21.76	22.16	
R_1	7.20	7.39	7.27	
R_2	7.27	7.40	7.38	
R_3	7.54	7.25	7.39	
R	0.30	0.15	0.12	
优水平	A ₃	B ₂	C ₃	
主次因素	A, B, C			
最优组合	A ₃ B ₂ C ₃			
追加试验		A ₃ B ₂ C ₃		7.76 (n=3)

结果表明,各因素对人参皂苷提取收率影响大小为:A(提取压力)>B(溶剂体积分数)>C(固液比);最佳试验方案为 A₃B₂C₃,即提取压力 500 MPa、溶剂体积分数为 50%、固液比 1:75、提取时间 2 min;追加试验结果表明最高提取收率为 7.76%。

2.6 重现性试验:取同一批次的脱脂样品,按照优化出的最优条件,进行 5 次平行试验,结果人参皂苷的提取收率为 7.70%,RSD 为 1.4% (n=5)。

2.7 不同提取方法的比较:常用来提取人参皂苷的方法有多种,不同的提取方法、收率和提取工艺不同。为此,对超高压与其他提取方法用同一批次样品,进行了比较,结果见表 6。从实验结果看,超高压提取较乙醇回流,人参皂苷的提取收率提高了 27%,但提取时间是乙醇回流的 0.8%。因此超高压提取,具有收率高、时间短、能耗低、效益高等优点。

表 6 不同提取工艺的比较

Table 6 Comparison of various extracting techniques

提取方法	提取时间	收率/%
水煮	4 h	4.98
50%乙醇回流	4 h	5.75
50%乙醇超声	30 min	5.89
50%乙醇高压	2 min	7.33

3 讨论

3.1 人参皂苷的超高压最佳提取工艺参数:提取压力 500 MPa、溶剂体积分数为 50%、固液比 1:50、提取时间为 2 min;最高提取收率为 7.76%。为天然产物有效成分的提取提供了一种新工艺。

3.2 与传统提取法相比,超高压提取具有下列优点:①提取时间短、得率高:超高压提取人参皂苷收率比传统乙醇回流提取方法增加 25%,但提取时间为 2 min,是乙醇回流的 1%;②能耗低:超高压提取过程中在升压阶段溶液体积压缩(压缩量较小),消耗一部分能量,在保压和卸压过程都没有能量的消耗,也没有能量的传递,超高压提取能耗的能量只有回流提取的 1%左右;③常温提取:超高压提取过程中,溶液在被压缩时产生的热量较少,基本可以维持在室温下进行,因此人参皂苷不会因热效应损失和降低活性;④杂质含量少:实验中发现超高压提取液中杂质含量明显低于水煮的,且提取液澄清度、稳定性也远远高于水煮;⑤该提取工艺操作简单,机械化程度高,适宜于现代化大生产,为人参皂苷工业化生产提供了一种新技术。

3.3 超高压提取过程中,由于压力较高,大大加快

了浸润过程和溶质扩散过程,使人参基块内部毛细孔内快速充满溶剂,提高了有效成分的传质速度。在短时间(小于2 min)内人参基块内部的溶液浓度与外面周围介质浓度即可达到平衡。这样细胞就处于高渗透压的介质(提取溶剂乙醇)中,在泄压过程中,介质压力急速降低,细胞内外渗透压差迅速增大,从而导致细胞破碎;同时在高压作用下,细胞骨架、细胞膜等结构以及化学键发生变化,这样细胞内有效成分与提取溶剂充分接触,因此缩短了提取时间、提高了提取收率。

3.4 超高压不会影响生物小分子的结构,但能够影响蛋白质、核酸、脂质、淀粉等生物大分子的立体结构,使蛋白质变性、淀粉糊化、酶失活、细菌等微生物灭活^[7],因此超高压技术有待于进一步的深入研究。

References:

- [1] Zhang C H, Zhang C X Y. Study on the optimum extraction process of ginsensides with soale method [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(1): 73-74.
- [2] Zhou J, Wang C Q, Yuan Y, *et al.* Study on the extraction method of ginseng sopoing Re [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(4): 667-670.
- [3] Zhang J, Chen Q C, Gong X J, *et al.* Effect of different method on extracting rations of ginsenosides [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(1): 71-73.
- [4] Song Q H, Bai Y, Zhou J H, *et al.* Study on process of extracting ginsenosides from pfaffia [J]. *Chem Eng Guangzhou* (广州化工), 2000, 28(4): 94-96.
- [5] Zhang S Q. Process of extracting small molecular ingredients from biological materials under super high pressure [P]. WO 03/05a362A1, 2003-07-24.
- [6] Balny C, Masson P, Heremans K. High pressure eiects on biological macromolecules; from structural changes to alteration of cellular processes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1595: 3-10.
- [7] Boonchai B B, Chan B P, Douglas S C. Pressure eiects on intra-and intermolecular interactions within proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1595: 235-249.

猪苓多糖长循环脂质体的制备

王凯平,张 玉,张 俊

(华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究猪苓多糖长循环脂质体的制备方法,并对其质量进行控制。方法 用氯仿注入合并硫酸铵梯度法制备猪苓多糖长循环脂质体,并采用紫外-Sephadex 法测定脂质体中猪苓多糖的含量和包封率。结果 猪苓多糖长循环脂质体平均粒径为100 nm,药物包封率为55.3%。结论 用氯仿注入合并硫酸铵梯度法可制得包封率高、粒径小的猪苓多糖长循环脂质体。紫外-Sephadex 法测定该脂质体的包封率准确性高、重现性好、简便易行。

关键词:猪苓多糖;长循环脂质体;包封率;紫外-Sephadex 法

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)03-0368-03

Preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes

WANG Kai-ping, ZHANG Yu, ZHANG Jun

(School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To prepare the *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PUPS) long cirrculating liposomes (LCLs) and to study the quality control of PUPS LCLs. **Methods** The PUPS LCLs were prepared by chloroform infusion combined with the ammonium sulphate gradient method. The content and encapsulation efficiency of PUPS in LCLs were determined by UV-Sephadex method. **Results** Mean diameter of the PUPS LCLs was 100 nm, with the encapsulation efficiency of 55.3%. **Conclusion** The LCLs with high encapsulation efficiency and small particle size could be prepared by chloroform infusion combined with the ammonium sulphate gradient method. UV-Sephadex method is suitable for the quality control of PUPS LCLs and the results are reliable.

Key words: *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PUPS); long circulating liposomes (LCLs); encapsulation efficiency; UV-Sephadex method

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 系多孔菌科多孔菌属猪苓的菌核。从猪苓中提取的猪苓

多糖具有抑制肿瘤生长,增强荷瘤动物及肿瘤病人机体免疫功能的作用^[1]。脂质体是目前降低药物毒