

蛋白组分的 SDS-PAGE 条带数明显少于低温炮制工艺,溶栓活性与抗肿瘤活性也显著低于低温炮制工艺。

在传统炮制工艺条件下,地龙部分蛋白组分被降解为小分子肽或游离的氨基酸,该类产物或在 SDS-PAGE 凝胶的低相对分子质量区积聚成带,或较早跑出凝胶进入电泳缓冲液而不能在凝胶上显示;变性的蛋白组分在电泳上样前,经离心沉淀而被除去;低温炮制工艺与之不同,使用液氮将新鲜的地龙快速冷冻,在低温下研制成粉末后,应用冷冻干燥技术制成冻干粉,整个工艺流程在低温下进行,蛋白酶的活性极低,可有效阻止蛋白组分的降解和变性,更好的保全其活性。因此,低温炮制工艺的 SDS-PAGE 总条带数多于传统炮制工艺,但在低相对分子质量区,传统炮制工艺明显多出两条主带。另外两种炮制工艺所得地龙的水溶性蛋白组成都很复杂,多种相对分子质量相近的组分在 SDS-PAGE 中没有有效分开,导致凝胶图像扫描分析结果的蛋白峰型不规则,峰间距小,甚至重叠,明显的蛋白峰数低

于电泳的实际条带数。理论上,本研究提出的低温炮制工艺也适用于活性成分以多肽和蛋白质为主的其他动物类中药的炮制。

#### References:

- [1] Wang H Q, Liang X W, Fan X Y. Studies on bio-engineering technology of earthworm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 386-387.
- [2] Ausubel F, Brent R, Kingston R E, et al. *Concise Guidebook of Experiment Molecular Biology* (精编分子生物学实验指南) [M]. Beijing: Science Press. 1995.
- [3] Lee S K, Bae D H, Kwon T J, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste [J]. *J Microbiol Biotechnol* (微生物生物技术学报), 2001, 11: 845-852.
- [4] Park Y S, Cha M H, Yong W M, et al. The purification and characterization of *Bacillus subtilis* tripeptidase (pepT) [J]. *J Biochem Mol Biol* (生物化学与分子生物学学报), 1999, 32: 239-246.
- [5] Zhang Y B, Xu C F. Construction, expression, purification and characterization of a thrombin activated single chain Urokinase type Plasminogen activator [J]. *Chin J Biotechnol Biochem Molecular Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 1999, 15: 403-408.
- [6] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

## 超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取人参中人参皂苷的研究

罗登林, 聂英, 刘建学, 郭金英

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:**目的 提高超临界 CO<sub>2</sub> 萃取人参中人参皂苷的萃取率。方法 采用二-(2-乙基己基)磺基琥珀酸钠(AOT)/乙醇/水/超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳对人参皂苷的萃取进行研究。结果 在萃取压力 25 MPa、温度 45 ℃、时间 4 h、CO<sub>2</sub> 流量为 2 L/h 条件下,超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取的人参皂苷萃取率是乙醇/水/超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的 3.2 倍。人参皂苷的萃取率随加入的水量、萃取压力的增大而增大,随 AOT 浓度、萃取温度的升高先增大后减小。萃取人参皂苷时,采用适量水先浸泡物料与萃取过程中加入水相比,人参皂苷的萃取率要提高 30%。结论 结合实验结果与理论探讨,超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取人参皂苷的机制主要是其形成的极性水池增大了对人参皂苷的溶解度。

**关键词:**人参;人参皂苷;超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取;超临界 CO<sub>2</sub> 萃取

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1003-04

## Ginsenosides from *Panax ginseng* by supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction

LUO Deng-lin, NIE Ying, LIU Jian-xue, GUO Jin-ying

(Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract: Objective** To raise ginsenosides yield from *Panax ginseng* by supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction. **Methods** Bis-(2-ethylhexyl) sodium sulphosuccinate (AOT)/ethanol/water/supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction was carried out to extract ginsenosides. **Results** The ginsenosides extracting rate by supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction was 3.2 times that of by ethanol/water/supercritical CO<sub>2</sub> extraction in extracting pressure 25 MPa, extracting temperature 45 ℃,

收稿日期:2006-11-29

作者简介:罗登林(1976—),男,湖北麻城人,博士,主要从事天然产物生化技术、超临界流体技术和食品营养与安全的研究。

Tel:(0379)64282342 E-mail:luodenglin@sohu.com

extracting time 4 h, and CO<sub>2</sub> flow rate 2.0 L/h, respectively. The ginsenosides extracting yield increased with the increasing of the water amount and the extracting pressure, increased first and then decreased with the increasing of AOT concentration and the extracting temperature. The ginsenosides extracting yield with *P. ginseng* soaked with water before extraction was 1.3 times that with *P. ginseng* soaked with water during the extraction. **Conclusion** Combined the experimental results with the theoretic deduction, the mechanism of supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction is that the polar water pools of reverse microemulsion can make more ginsenosides dissolved.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A. Meyer; ginsenosides; supercritical CO<sub>2</sub> reverse microemulsion extraction; supercritical CO<sub>2</sub> extraction

人参皂苷是人参的主要活性成分,具有增强机体免疫功能、调节机体代谢、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎和抗诱变等作用<sup>[1]</sup>。超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的环境好、产品质量高。由于人参皂苷的极性较强,即使在超临界 CO<sub>2</sub> 萃取中使用夹带剂萃取的效果也有限<sup>[2]</sup>。将特定的表面活性剂和水引入到超临界 CO<sub>2</sub> 中,形成反相微乳体系,能显著提高对极性物质的萃取,从而扩大了超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的对象和应用范围<sup>[3,4]</sup>。本实验选择二-(2-乙基己基)酯磺酸基琥珀酸钠(AOT)为主表面活性剂,乙醇为助表面活性剂,对 AOT/乙醇/水/超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取人参皂苷进行了研究,并与乙醇/水/超临界 CO<sub>2</sub> 萃取人参皂苷进行了比较。

## 1 原料与仪器

人参为白参,经广州中医药大学冯彪教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根,烘干后粉碎过 40 目筛,含水量为 5.66%;人参二醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 110701);CO<sub>2</sub>(广州粤港气体公司生产,体积分数大于 99.5%);二-(2-乙基己基)磺基琥珀酸钠(Aerosol-OT, AOT)、乙醇、香草醛、高氯酸、甲醇均为分析纯;1 L 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取设备(广州市轻工研究所)。

## 2 方法与结果

**2.1 试验方法:**称取人参 100 g,用一定量水浸泡 12 h,放入 1 L 萃取罐中。同时配制一定浓度的 AOT/乙醇溶液 140 mL,用夹带剂泵加入 AOT/乙醇溶液,设定萃取温度与压力固定,分离温度与压力分别为 55 ℃、5 MPa,先静态萃取 0.5 h,再动态萃取 3.5 h,CO<sub>2</sub> 流量设定为 2.0 L/h,萃取减压挥干溶剂,测定萃取固形物中人参皂苷的量,计算人参皂苷的萃取率。

萃取率 = 萃取的人参皂苷质量 / 人参原料的质量 × 100%

**2.2 人参皂苷的测定:**萃取产物先回收溶剂,再用适量水溶解,加入乙醚萃取极少量的脂溶性部分,取水层液,加入水饱和正丁醇对水层液反复萃取 5 次,收集正丁醇液,减压回收正丁醇,残渣用丙酮溶解,离心收集沉淀并真空干燥,用甲醇定容,以人参二醇作对照品,采用香草醛-冰乙酸-高氯酸法测定萃取产物中人参皂苷的量<sup>[5]</sup>。其中质量浓度对吸光度回归的标准曲线方程为  $A = 9.9657C - 0.0023$ ,  $R^2 = 0.9981$ 。

**2.3 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取与超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取人参皂苷的萃取动力学:**分别选择乙醇作夹带剂的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取和 0.05 mol/L AOT 的超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取的两种方法,设定萃取温度为 45 ℃,萃取压力为 25 MPa,其萃取人参皂苷的动力学曲线见图 1。可以看出,在前 1 h 内两种方法的人参皂苷萃取率均较高,达到了各自总萃取率的 65% 以上,这主要是由于乙醇夹带剂和 AOT/乙醇一次性泵入萃取罐中,开始 30 min 采用静态萃取没有循环,然后开始动态即循环萃取 30 min 后才收集,对于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取和超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取体系来说,在此过程中有大量人参皂苷从人参细胞内溶出而进入流体相中,溶解度趋向于饱和,随萃取时间的延长,人参中人参皂苷的量下降,乙醇夹带剂或 AOT/乙醇/水体系的量也显著下降,导致萃取率的明显下降。但是超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取法萃取人参皂苷的萃取率明显高于超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法,大约是其 3 倍,而且超临界 CO<sub>2</sub> 反相微乳萃取的萃取曲线斜率也约是超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的 3 倍。

**2.4 AOT 浓度对人参皂苷萃取的影响:**配制 0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.09 mol/L AOT/乙醇溶液。设定萃取温度与压力分别为 45 ℃、25 MPa,考察 AOT 浓度对反相微乳萃取人参皂苷的影响(图 2)。结果表明,AOT 浓度在 0~0.1 mol/L 时,人参皂苷的萃取率上升很快;在 0.01~0.07 mol/L 时,随 AOT 浓度的增加人参皂苷的萃取率增加减缓,

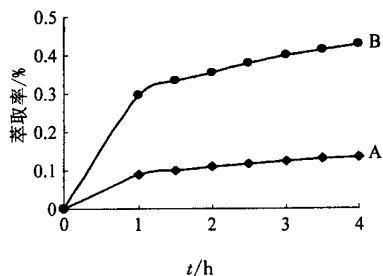


图 1 超临界  $\text{CO}_2$  萃取(A)与超临界  $\text{CO}_2$  反相微乳萃取(B)人参皂苷的萃取动力学曲线

Fig. 1 Ginsenosides extraction kinetics with supercritical  $\text{CO}_2$  extraction (A) and supercritical  $\text{CO}_2$  reverse microemulsion extraction (B)

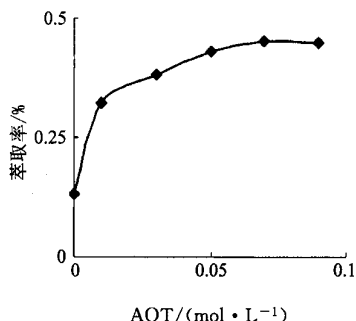


图 2 AOT 浓度对人参皂苷萃取率的影响

Fig. 2 Effect of AOT concentration on ginsenosides extracting yield

当 AOT 浓度为 0.07 mol/L 时,人参皂苷萃取率趋于最大,后随 AOT 浓度增大,人参皂苷的萃取率略有下降。提示 AOT 浓度在 0.01 mol/L 时,已有一定数量的反相微乳形成,能增溶一定量的人参皂苷;随 AOT 浓度的增大形成的反相微乳数目增多,对人参皂苷的增溶量增大;当表面活性剂浓度过高时,形成的反胶团结构趋于紧密,人参皂苷进入胶团内核的空间阻力增大,同时浓度过高的表面活性剂超过了其在超临界  $\text{CO}_2$  中的溶解度时,不溶的表面活性剂沉积在人参颗粒表面,阻碍了人参皂苷进入超临界  $\text{CO}_2$  中。

2.5 水分对人参皂苷萃取的影响:浸泡的水体积选择 0、20、40、60、80、100 mL, AOT/乙醇浓度为 0.05 mol/L, 设定萃取温度与压力分别为 45 °C、25 MPa。考察加入的水量对反相微乳萃取人参皂苷的影响(图 3)。结果表明,在没加水之前,人参皂苷萃取率仍能达到一定的值,其萃取方式主要是人参皂苷增溶于反胶团极性核中。随着水的加入和增多,人参皂苷是以二次增溶的方式增溶于反相微乳形成的极性水池中,由于胶团增溶了水而变大,使得人参皂苷较易进入胶团中,并且被增溶量也变大,人参皂苷萃取

率上升;当加入的水量达到或超过反相微乳的最大溶水量时,多余的水不能增溶于胶团中,此时人参皂苷的萃取率趋于最大。

2.6 水加入方式对人参皂苷萃取的影响:一种方式是用水配制 70%乙醇,再配制 0.05 mol/L AOT/70%乙醇溶液 200 mL,在萃取前加入;另一种方式用 60 mL 水先浸泡人参原料,然后在萃取前加入 140 mL 0.05 mol/L AOT/无水乙醇溶液。考察水的加入方式对反相微乳萃取人参皂苷的影响(图 4)。结果表明,人参先用水浸泡一定时间可以明显提高其萃取率。由于萃取过程包括人参皂苷从细胞内扩散到细胞表面和从细胞表面再进入超临界  $\text{CO}_2$  中,用水浸泡一方面使得人参颗粒的体积膨胀,细胞壁之间的孔径增大,增大了人参皂苷的传质面积,人参皂苷容易透过细胞壁而扩散到细胞表面;另一方面,已有一部分人参皂苷溶解于水中而扩散到细胞壁表面,增大了细胞表面人参皂苷的浓度。

2.7 萃取压力对人参皂苷的影响:人参先用 60 mL 水浸泡 12 h, 设定萃取温度为 45 °C, AOT/乙醇浓度为 0.05 mol/L, 萃取压力选择为 15、20、25、30 MPa, 考察萃取压力对反相微乳萃取人参皂苷的影响(图 5)。结果表明,随着萃取压力的升高,  $\text{CO}_2$  密

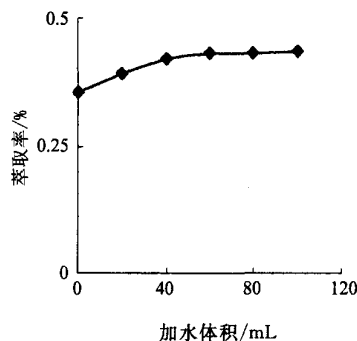


图 3 加入的水量对人参皂苷萃取率的影响  
Fig. 3 Effect of water amount added on ginsenosides extracting rate

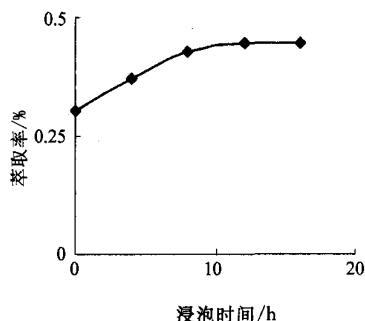


图 4 水浸泡时间对人参皂苷萃取率的影响  
Fig. 4 Effect of water soaking times on ginsenosides extracting rate

度增大,CO<sub>2</sub>与AOT分子间作用力增强,AOT在CO<sub>2</sub>中溶解度增大,形成的反胶团数增多,人参皂苷的萃取率增大。

2.8 萃取温度对人参皂苷的影响:人参先用60 mL水浸泡12 h,设定萃取压力28 MPa,AOT/乙醇浓度为0.05 mol/L,萃取温度选择35、45、55、65℃,考察萃取温度对反相微乳萃取人参皂苷的影响(图6)。结果表明,萃取温度在45℃时人参皂苷的萃取率达最高。温度低于45℃时,虽然超临界CO<sub>2</sub>的密度增大,形成的反相微乳数目增加,能增溶更多的人参皂苷,但温度低人参皂苷的扩散变慢,从人参原料扩散进入反相微乳的时间增长,此时扩散起主导因素;温度高于45℃时,虽然人参皂苷的扩散速度加快,但超临界CO<sub>2</sub>的密度降低,形成的反相微乳数目减少,人参皂苷的增溶量降低,此时形成反相微乳数目的多少起主导因素。

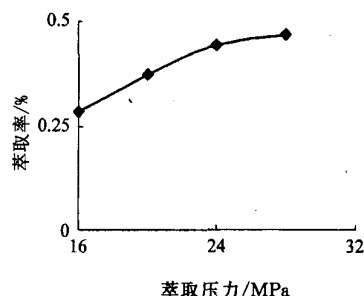


图5 萃取压力对人参皂苷萃取率的影响

Fig. 5 Effect of extracting pressure on ginsenosides extracting rate

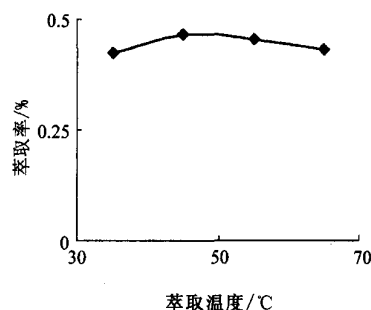


图6 萃取温度对人参皂苷萃取率的影响

Fig. 6 Effect of extracting temperature on ginsenosides extracting rate

### 3 讨论

超临界CO<sub>2</sub>反相微乳萃取的人参皂苷得率明显高于采用夹带剂的超临界CO<sub>2</sub>萃取,其主要原因可能是这两种方法溶解皂苷的机制不同。对于AOT/超临界CO<sub>2</sub>萃取体系,AOT在超临界CO<sub>2</sub>萃取体系中形成反相微乳,在这种体系中,AOT形成聚集体的亲油基与CO<sub>2</sub>相结合,而亲水相互靠拢形成极性核,水被增溶于这种极性核中而形成微小的水池,人参皂苷则溶解水池中。对于超临界CO<sub>2</sub>萃取体系,由于人参皂苷在超临界CO<sub>2</sub>中是不能溶解的,主要靠夹带剂乙醇溶解。一般认为是溶质(人参皂苷)与夹带剂(乙醇)分子间相互作用是夹带剂发挥作用的最主要因素,尽管人参皂苷在乙醇中有一定的溶解度,但是由于CO<sub>2</sub>的分子极性比一些烷烃类还弱,乙醇对其分子极化率十分低,使得与乙醇分子之间的作用力十分微弱,因此虽然使用了一定量的乙醇作夹带剂,但对极性物质(人参皂苷)的萃取效果仍很低。另外,由于表面活性剂AOT能起到润湿增溶的作用,降低了药材与溶剂间的界面张力,使润湿角变小,促进溶媒对药材的润湿渗透。因此,在超临界CO<sub>2</sub>中引入反相微乳体系能显著提高CO<sub>2</sub>对极性物质的溶解度,增大其萃取率,扩大了超临界CO<sub>2</sub>萃取对象的范围。

### References:

- [1] Wang H N, Progress in studies on pharmacologic effects of ginsenosides [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2006, 11(11): 1201-1206.
- [2] Ma X H, Yao X Y, Han F M, et al. Study of the ginsenosides in *Anemone raddeana* Regel by supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction [J]. *J Hubei Univ: Nat Sci* (湖北大学学报:自然科学版), 2003, 25 (2): 156-159.
- [3] Zielinski R G, Kline S R, Kaler E W. A small-angle neutron scattering study of water in carbon dioxide microemulsions [J]. *Langmuir*, 1997, 13: 3934-3937.
- [4] Beckman E J. Carbon dioxide extraction of biomolecules [J]. *Science*, 1996, 271: 613-614.
- [5] Li B. The research of commonly used ginsenosides reference substance [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14 (1): 11-12.

## 《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理总局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青