

· 中药工业 ·

AB-8 大孔树脂分离纯化人参保健酒皂苷的工艺研究

诸晓波¹, 李德坤^{2,3}, 郭巧生^{1*}, 鞠爱春^{2,3*}, 叶正良^{2,3*}

(1. 南京农业大学 中药材研究所, 江苏 南京 210095;

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402;

3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402)

[摘要] 目的: 摸索 AB-8 大孔吸附树脂分离纯化人参保健酒中人参皂苷的工艺条件及参数。方法: 以人参皂苷 R_{g1} 、Re、 R_{b1} 的含量为指标, 考察大孔树脂在不同工艺条件下对人参单体皂苷的分离纯化能力。结果: AB-8 大孔吸附树脂对皂苷具有较好的纯化富集性能。其最佳工艺条件为 2.0 g 树脂最大吸附 1.0 g 生药量, 分别用 10.0 mL 纯化水、20.0 mL 0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠、30% 甲醇除杂, 90% 甲醇洗脱, 洗脱剂用量为 20.0 mL, 洗脱流速为 0.6 mL·min⁻¹。结论: 该工艺简单易行, 适用于高效液相测人参保健酒中单体皂苷含量。

[关键词] 保健酒; AB-8 大孔吸附树脂; 人参皂苷; 高效液相色谱

Refining Technology of Ginseng Health Wine with AB-8 Macroporous Resin

ZHU Xiao-bo¹, LI De-kun^{2,3}, GUO Qiao-sheng^{1*}, JU Ai-chun^{2,3*}, YE Zheng-liang^{2,3*}

(1. Institute of Chinese medicinal materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300402, China;

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

[Abstract] **Objective:** The study aims at refining technology of ginseng health wine. **Methods:** Based on the content of ginsenoside R_{g1} , Re, R_{b1} , different types of refining and different technological conditions on the separation and purification capacity of single saponin in ginseng were compared. **Results:** AB-8 macroporous adsorption resin was the best choice to absorb and purify saponin among the methods. The best technological conditions were 90% methanol as elution agent, volume of elution agent was 20.0 mL, the flow eluting velocity was 0.6 mL·min⁻¹. and 2.0 g resin absorb the 1.0 g material, 0.05 mol·L⁻¹ NaOH 30% methanol is the prefer concentration to wash the impurity. **Conclusion:** AB-8 macroporous adsorption resin is suitable to separate and purify single saponin in ginseng health wine.

[Keywords] Health wine; AB-8 macroporous adsorption resin; ginseng saponin; HPLC

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20170714003

人参是五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根茎, 具有抗疲劳、抗肿瘤、提高免疫力、补气安神^[1] 等功能。人参主要含有人参皂苷 R_{b1} 、 R_{g1} 等 30 多种人参皂苷, 并含有人参多糖、人参挥发油等多种活性成分。人参具有良好功能, 故被制成各种保健品, 然而人参保健酒药材多、成分复杂, 不利于质量监控。

人参保健酒的样品前处理主要集中在皂苷的分

离纯化、大孔吸附树脂^[2-3]、萃取^[4] 等。本实验室前期研究中比较了几种不同样品前处理方法对含量测定的影响, 最终筛选出 AB-8 大孔吸附树脂纯化分离人参单体皂苷, 以人参皂苷 R_{g1} 、Re、 R_{b1} 为指标, 利用 HPLC 法测定含量, 进行工艺研究。本实验系统考察了人参皂苷的工艺参数, 包括吸附量、吸附流速、洗脱液浓度、洗脱流速等, 为人参保健酒中皂苷含量测定提供参考。

* [通信作者] 郭巧生, 教授, Tel: (025)84396591, E-mail: gqs@njau.edu.cn;

叶正良, 教授, 高级研究员, Tel: (022)84342066, E-mail: yezl@yahoo.com

1 仪器和试剂

Waters 2695 高效液相、Waters2489 紫外检测器、Empower2 工作站 [沃特世科技(上海)有限公司]; METTLER XS105 型十万分之一电子分析天平 [梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司]; 数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司); 色谱柱: 艾杰尔 Venusil MP C18(2)(序列号: VA952505-2, 天津博纳艾杰尔科技有限公司); 布琦水浴锅(瑞士布琦有限公司); 层析柱; 常规玻璃仪器等。

人参保健酒样品(自制); 人参皂苷 R_{g_1} (中国食品药品检定研究院, 纯度 91.7%, 批号: 110703-201530); 人参皂苷 Re(天津一方科技有限公司, 纯度 98%, 批号: Am250G); 人参皂苷 R_{b_1} 对照品(中国食品药品检定研究院, 纯度: 93.7%, 批号: 110704-201424); 磷酸(分析纯, 天津华东试剂厂); 乙腈、甲醇为色谱纯(美国 OMNI 公司); 氢氧化钠(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); AB-8 型大孔吸附树脂(孔径 13~14 nm, 天津市海光化工有限公司)。

2 保健酒中人参皂苷含量测定

2.1 混合对照品溶液的制备

分别精密称取人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 对照品适量, 用甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 制成混合对照品溶液, 摇匀, 质量浓度分别为 R_{g_1} : $0.670\ 1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Re: $0.692\ 7\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, R_{b_1} : $1.134\ 2\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

2.2 供试品溶液的制备

取 15 mL 保健酒样品水浴挥干, 用水溶解后上预先处理好的 AB-8 树脂柱(60~80 目, 柱内径 6~8 mm, 树脂柱高约 10 cm), 用 $0.05\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠冲洗, 弃去; 30% 甲醇溶液冲洗, 弃去; 甲醇洗脱至蒸发皿中, 水浴挥干, 用 1.0 mL 水溶解, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜, 即得。

2.3 人参专属性溶液制备

人参保健酒的处方中不加入人参药材制成阴性对照, 溶液制备方法同供试品溶液的制备项下方法。

2.4 色谱条件

色谱柱: 艾杰尔 Venusil MP C₁₈(2) 分析柱

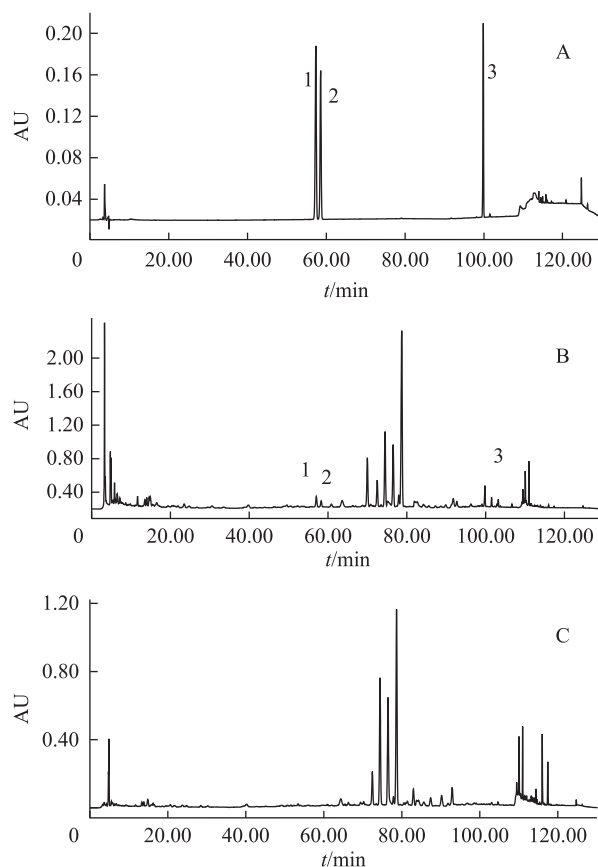
(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 203 nm; 进样量为 10 μL 。

2.5 含量测定

分别吸取对照品溶液、样品溶液、人参专属性样品进样, 计算含量, 色谱图见图 1。

表 1 液相梯度洗脱程序

时间/min	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	A(%)	B(%)
0	0.8	19	81
30	0.8	19	81
75	0.8	29	71
85	0.8	29	71
105	1.0	40	60
110	1.0	100	0
120	1.0	100	0
125	0.8	19	81
130	0.8	19	81



注: A. 人参皂苷对照品; B. 样品; C. 人参专属性样品; 1~3. 人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 。

图 1 人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 含量测定 HPLC 图

2.6 标准曲线绘制

精密吸取对照品母液 1.0、3.0、5.0、6.0、8.0 mL, 分别用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀。分别精密吸取上述对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 将峰面积 Y 与对照品浓度 X 作线性回归, 得标准曲线: $Y_{R_{g1}} = 5 \times 10^6 X + 28\ 819$, $r = 0.999\ 61$; $Y_{R_e} = 4 \times 10^6 X + 28\ 819$, $r = 0.999\ 29$; $Y_{R_{b1}} = 3 \times 10^6 X + 28\ 819$, $r = 0.999\ 67$, 人参皂苷 R_{g1} 在 0.134 0 ~ 0.067 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好; 人参皂苷 R_e 在 0.138 5 ~ 0.069 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好; 人参皂苷 R_{b1} 在 0.143 5 ~ 0.113 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好。

2.7 精密度试验

精密吸取上述同一对照品溶液 10 μ L, 连续进样 6 次, 测定色谱峰面积。人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的 RSD 分别为 0.19%、0.12%、0.16%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液分别于 0、4、8、12、16、20 h 进样, 进样量 10 μ L, 人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的 RSD 分别为 0.12%、0.05%、0.13%, 表明人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 在 20 h 内保持稳定。

2.9 重复性试验

取同一批人参酒样品, 按 2.2 项下制备 6 份供试品溶液, 测定。人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的 RSD 分别为 0.9%、1.0%、1.3%, 表明样品处理方法重复性良好。

2.10 回收率试验

吸取已知含量的样品 6 份, 分别加入一定量的对照品溶液, 按各 2.2 项下制备样品, 测定, 计算加样回收率。人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的平均回收率为 97.43%、98.24%、97.58%, RSD 分别为 0.51%、0.47%、0.86%。

3 工艺条件及参数优化

3.1 大孔树脂预处理

AB-8 型大孔树脂是苯乙烯弱极性共聚体, 本实验使用的是净品树脂, 新树脂使用前加入高出树脂层 2~3 cm 乙醇浸泡 3 h, 用水冲洗至中性, 备用。

3.2 泄漏曲线考察

取保健酒样品 40.0 mL 水浴挥干, 用等量水溶

解后上装有 AB-8 大孔树脂 2 g 的层析柱(柱体积约 3 mL), 控制流速为 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 5.0 mL 为 1 个流份, 收集 8 份, 蒸干, 照 2.2 项下自“上预先处理好的 AB-8 树脂柱”起, 依法制得供试品溶液, 并测定各流份中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的含量。以过柱液中 3 个皂苷含量为纵坐标, 累计上样体积为横坐标, 绘制泄漏曲线, 见图 2。

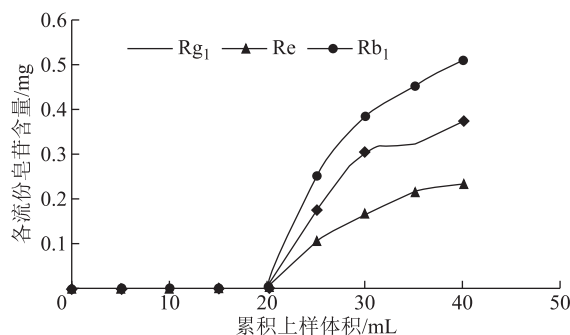


图2 人参皂苷泄漏曲线考察

结果显示, 从第 5 流份开始, 流出液颜色逐渐加深, 人参皂苷开始泄漏, 故可确定最大上样量为 20 mL, 即 2 g AB-8 树脂可以吸附 1 g 生药量。

3.3 洗脱溶媒浓度考察

3.3.1 甲醇浓度考察 吸取 10.0 mL 保健酒样品, 水浴挥干溶解后上已处理好的 AB-8 柱(柱体积约 3 mL), 依次用纯化水、0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、纯甲醇各 20.0 mL 进行梯度洗脱, 分别收集洗脱液于蒸发皿内, 水浴挥干, 加 1.0 mL 水溶解, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。用 HPLC 法测定人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 的含量, 以确定甲醇的浓度, 结果见表 2。

表2 不同浓度甲醇洗脱皂苷含量

编号	甲醇浓度 (%)	R_{g1} /mg	R_e /mg	R_{b1} /mg	3 个皂苷和/mg	洗脱率 (%)
1	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	50	0.14	0.08	0.06	0.28	12.84
3	70	0.33	0.21	0.31	0.85	38.99
4	90	0.13	0.10	0.72	0.95	43.58
5	100	0.01	0.01	0.09	0.10	4.59

由表中可知, 30% 甲醇对皂苷洗脱无影响, 90% 甲醇洗脱率最高, 累计洗脱率达 95.41%, 故确定 90% 的甲醇作为洗脱剂。

3.3.2 氢氧化钠浓度考察 在 3.3.1 项的基础上考察

氢氧化钠的浓度。吸取渗漉液3份各10.0 mL,水浴挥干溶解后上预先处理好的AB-8柱(柱体积约3 mL),依次用纯化水、不同浓度的氢氧化钠(收集)、30%甲醇、90%甲醇洗脱,收集洗脱液于蒸发皿内,水浴挥干,加1.0 mL水溶解,过0.45 μm 滤膜,即得。用HPLC法测定人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的含量。

由表3可知,随着氢氧化钠浓度增加,90%甲醇洗脱液中人参皂苷含量下降。当氢氧化钠浓度为0.15 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,含量最低,故选择0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠作为除色素溶液。

表3 不同氢氧化钠浓度皂苷含量

编号	氢氧化钠 浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	90% 甲醇洗脱液中 皂苷含量/mg			氢氧化钠洗脱液中 皂苷含量/mg		
		Rg_1	Re	Rb_1	Rg_1	Re	Rb_1
1	0.05	0.41	0.31	1.03	0	0	0.02
2	0.10	0.33	0.26	0.84	0	0	0.02
3	0.15	0.28	0.23	0.75	0	0	0

3.4 洗脱溶媒用量考察

90% 甲醇洗脱用量考察:吸取10.0 mL 保健酒样品,水浴挥干溶解后上预先处理好的AB-8柱(柱体积约3 mL),依次用纯化水、0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、30% 甲醇洗脱,弃去,90% 甲醇洗脱,洗脱流速:0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,每5 mL 收集1份洗脱液于蒸发皿内水浴挥干,加1.0 mL 水溶解,过0.45 μm 滤膜,即得。用HPLC法测定人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的含量,以确定90% 甲醇洗脱用量,结果见图3。

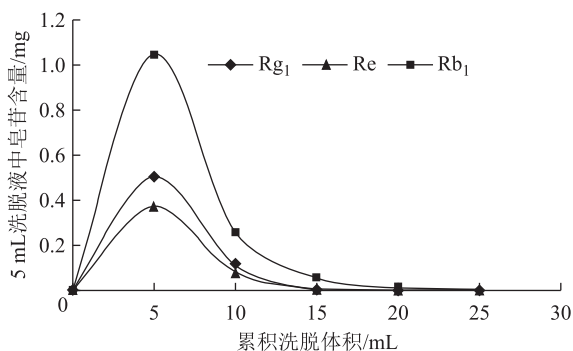


图3 洗脱剂用量考察曲线图

由下图可知,当洗脱剂用量为10 mL时,树脂颜色变淡,洗脱剂用量为15 mL时,洗脱液颜色变白,当90% 甲醇洗脱剂用量为20 mL时,洗脱的人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 含量为100%。故最佳洗脱体

积为20 mL。

3.5 洗脱流速考察

吸取渗漉液4份各10.0 mL,水浴挥干溶解后上已处理好的AB-8柱(约3 cm高),依次用纯化水、0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、30% 甲醇洗脱,弃去,用20 mL 90% 甲醇洗脱,洗脱流速分别调至0.3、0.6、1、1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,收集洗脱液于蒸发皿内,水浴挥干,加1.0 mL 水溶解,过0.45 μm 滤膜,即得。用HPLC法测定人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的含量,以确定洗脱流速,结果见表4。

表4 人参皂苷洗脱流速考察结果

编号	洗脱流速 $/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	Rg_1/mg	Re/mg	Rb_1/mg	3个皂 苷和/mg
1	0.3	0.39	0.29	0.91	1.53
2	0.6	0.36	0.24	0.82	1.36
3	1.0	0.30	0.20	0.68	1.15
4	1.5	0.25	0.17	0.62	1.04

由上表可知当洗脱速度为0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,洗脱下来的皂苷含量最高,但0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 洗脱速度的洗脱率较高,从时间上考虑,选择0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的洗脱速度。

3.6 样品前处理 AB-8 大孔树脂纯化富集工艺验证

选用AB-8大孔吸附树脂,条件为上样量10.0 mL (0.5 g 生药量/g 树脂),0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、30% 甲醇洗脱,弃去,20 mL 90% 甲醇洗脱,洗脱流速为0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。收集洗脱液于蒸发皿水浴挥干,加1.0 mL 水溶解,过0.45 μm 滤膜,用HPLC法测定人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 的含量。

表5 重复验证结果($n=4$)

编号	mg		
	Rg_1 含量	Re 含量	Rb_1 含量
1	0.43	0.32	1.01
2	0.45	0.31	0.97
3	0.48	0.31	0.99
4	0.46	0.31	1.01
均值	0.46	0.31	1.0
RSD	4.6%	1.6%	1.9%

结果显示,在该工艺条件下,人参皂苷测得量较高,色谱图较好,提示该工艺可行,可用于保健酒质量控制中HPLC测人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 。

4 讨论

本文选用 AB-8 大孔吸附树脂富集纯化人参皂苷,通过考察人参皂苷泄露曲线、甲醇洗脱浓度及用量、氢氧化钠洗脱浓度、甲醇洗脱速度为人参保健酒皂苷检测提供参考。本文研究发现,单体皂苷和人参总皂苷的检测不同,洗脱剂的浓度也不同,许多文献表明,70%或80%的乙醇^[5]对总皂苷的洗脱率最高,而本研究表明,人参单体皂苷适宜的洗脱浓度为90%甲醇。氢氧化钠作为除色素常用的碱时,要注意考察浓度,浓度过高,人参皂苷含量反而下降。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 王博. 人参酒中人参皂苷前处理技术研究[J]. 人参研究,2016,28(6):18-19.
- [3] 郭婷婷,王兆华,张大军. 大孔树脂分离纯化西洋参叶总皂苷的工艺研究[J]. 中国现代中药,2016,18(9):1196-1200.
- [4] 姚海燕,万玉华,沈雅捷,等. 大孔吸附树脂纯化人参总皂苷的工艺研究[J]. 环球中医药,2013,6(2):84-88.
- [5] 黄立新,熊友文,张启云,等. 红参中人参总皂苷的大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):6-9.

(收稿日期 2017-07-14)

(上接第188页)

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:中国中医药科技出版社,2015:302.
- [2] 唐国廷. 黄芪药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医药临床杂志,2010,22(9):844-845.
- [3] 秦雪梅,李震宇,孙海峰,等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3234-3238.
- [4] 郭瑜瑞. 不同矿质元素处理下蒙古黄芪生长和有效成分的差异研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [5] 梁喜龙,方淑梅,刘畅,等. CuSO_4 与 H_3BO_3 对黄芪幼苗建成及部分生理生化指标的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(3):1-4.
- [6] 刘畅,王征,李海. ZnSO_4 和 MnCl_2 对黄芪幼苗形态建成及生理特性的影响[J]. 中国林副特产,2010(6):10-13.
- [7] 曹秀,夏仁学,张德健,等. 水培条件下营养元素对枳幼苗根毛发育及根生长的影响[J]. 应用生态学报,2013,24(6):1525-1530.
- [8] 潘瑞炽. 植物生理学:5版.[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [9] 魏群. 分子生物学试验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2006.
- [10] 陈燕瑞,曾以旺,王少平,等. 黄芪中免疫活性成分的不同提取方式比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):42-44.
- [11] 曹恭,梁鸣早. 锰—平衡栽培体系中植物必需的微量元素[J]. 土壤肥料,2004,4(1):49-50.
- [12] 武松伟,胡承孝,谭启玲,等. 钼与植物抗寒性研究进展[J]. 湖北农业科学,2016,55(1):13-16,42.
- [13] 张晓博. 硼对植物生理功能影响的研究进展[J]. 现代农村科技,2010,39(14):55-56.

(收稿日期 2017-09-15)