

人参须根粉直接制备人参皂苷 Rg5 的工艺研究

郭丹丹¹, 成乐琴¹, 李玲², 甘凤琴², 于秀茹¹

(1. 吉林化工学院 化学与制药工程学院, 吉林 吉林 132022;

2. 通化百奥金森生物科技有限公司, 吉林 通化 134000)

摘要:以人参须根粉为原料, 盐酸为催化剂, 水饱和正丁醇溶液为提取溶剂, 研究常压下加热回流直接提取人参须根粉中的人参皂苷 Rg5, 通过单因素实验和正交实验优化人参皂苷 Rg5 的提取工艺, 同时进行精密度实验、稳定性实验、重复性实验和加样回收率实验, 采用高效液相色谱法对人参须根粉提取物中的人参皂苷 Rg5 进行定量分析。结果表明, 当固液比为 1:20 g/mL, 酸浓度为 0.06 mol/L, 于 70 °C 提取 5 h, 人参皂苷 Rg5 的得率为 2.48%。人参皂苷 Rg5 在 48 h 内表现出良好的稳定性, 加样回收率在 99.32% ~ 103.70% 之间, RSD 为 1.33%。该方法较大地提高了人参皂苷 Rg5 得率、缩短了提取时间, 操作简单、重现性好。

关键词:人参皂苷 Rg5; 人参须根粉; 盐酸; 提取; 正交实验

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)03-0070-07

Preparation of ginsenoside Rg5 with ginseng fibrous root powder

GUO Dan-dan¹, CHENG Le-qin¹, LI Ling², GAN Feng-qin², YU Xiu-ru¹

(1. College of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Jilin Institute of Chemistry Technology, Jilin Jilin 132022; 2. Tonghua Bai'aojinsen Biotechnology Co., Ltd, Tonghua Jilin 134000)

Abstract: Taking ginseng fibrous root powder (GFRP) as raw material, hydrochloric acid as a catalyst and water-saturated n-butanol as the extraction solvent, respectively, the method of preparation of ginsenoside Rg5 from GFRP at atmospheric pressure by heating reflux was studied. The extraction process of ginsenoside Rg5 was optimized through one-factor experiment and orthogonal experiment, the precision test, stability test, repeatability test and sample recovery test were also carried out. High Performance Liquid Chromatography was applied to determine the content of ginsenoside Rg5 in ginseng fibrous root powder extracts. The optimum result obtained from orthogonal test was as follows: ratio of ginseng fibrous root powder to extraction solvent 1:20 g/mL, acid concentration 0.06 mol/L, extraction temperature 70 °C and extraction time 5 h. Under the optimized conditions, the yield of ginsenoside Rg5 was 2.48%. Ginsenoside Rg5 showed good stability in 48 h, and the sample recovery rate was 99.32% ~ 103.70%, RSD was 1.33%. The method has following characteristics such as high extraction yield, simple operation, good reproducibility and short extraction time.

Key words: ginsenoside Rg5; ginseng fibrous root powder; hydrochloric acid; extract; orthogonal experiment

人参为五加科属草本植物, 在亚洲已有上千年的药用历史, 具有抗衰老、提高免疫力、抗氧化的功效。人参皂苷被认为是人参中的主要活性成分, 但

其在人参中的含量较低^[1-2]。人参皂苷 Rg5 是红参中天然存在的、极其微量的稀有人参皂苷^[3], 在抗肿瘤^[4-5]、保护神经^[6-8]、改善肺部炎症^[9-10]、改善记忆^[11-12]等方面具有显著效果。如图 1 所示, 人参皂苷 Rg5 是由人参中的原人参二醇组(PPD)皂苷在 C-20 位选择性水解生成的人参皂苷-Rg3 基础上, 进一步在 C-20 位的 -OH 与 C-22 位的 -H

收稿日期: 2016-10-18

基金项目: 吉林省科技厅公关项目(20140306003YY); 吉林化工学院项目(吉化院合字[2015]第 036 号)

作者简介: 郭丹丹, 1991 年出生, 女, 硕士研究生。

通讯作者: 成乐琴, 1969 年出生, 女, 教授。

脱水而成的次级稀有人参皂苷,也可由丙二酸单酰基人参皂苷经过糖基修饰得到^[13]。

关于人参皂苷 Rg5 制备的研究报道非常少^[14-17],人参皂苷 Rg5 在制备过程中根据水解和脱水方式不同,常常伴随 Rd、F2、Gypenoside XVII、Rh2、Rk1 和 Rz1 等其他次级人参皂苷产生。人参皂苷 Rg5 可由 Rg3 脱水生成,两种构型(S/R)的 Rg3 在水中的溶解性存在一定的差异性,R 构型的人参皂苷 Rg3 在水中易以固体形式析出,从而导致不能有效地转化为人参皂苷 Rg5,导致人参皂苷 Rg5 得率较低。金银萍等^[18]从红参的甲醇提取物中分离得到人参皂

苷 Rg5,其产率仅为0.012%;关大朋等^[19]通过高温热裂解人参茎叶皂苷制备人参皂苷 Rg5,其产率为13.17%;Soo Kyung Jo 等^[20]将白参置于98℃下蒸75 h后,分离得到人参皂苷 Rg5,其得率为1.756%。目前,人参皂苷 Rg5 的制备途径主要包括两种,即先提取人参皂苷后转化制备人参皂苷 Rg5 和先制备含有人参皂苷 Rg5 的人参产品后提取人参皂苷。无论采用哪种制备方法,都有较大弊端,一方面制备所需时间长,需要几十甚至上百个小时;另一方面提取工艺较长,提取效率较低。因此,有必要开发一种简单易行、高效的人参皂苷 Rg5 制备方法。

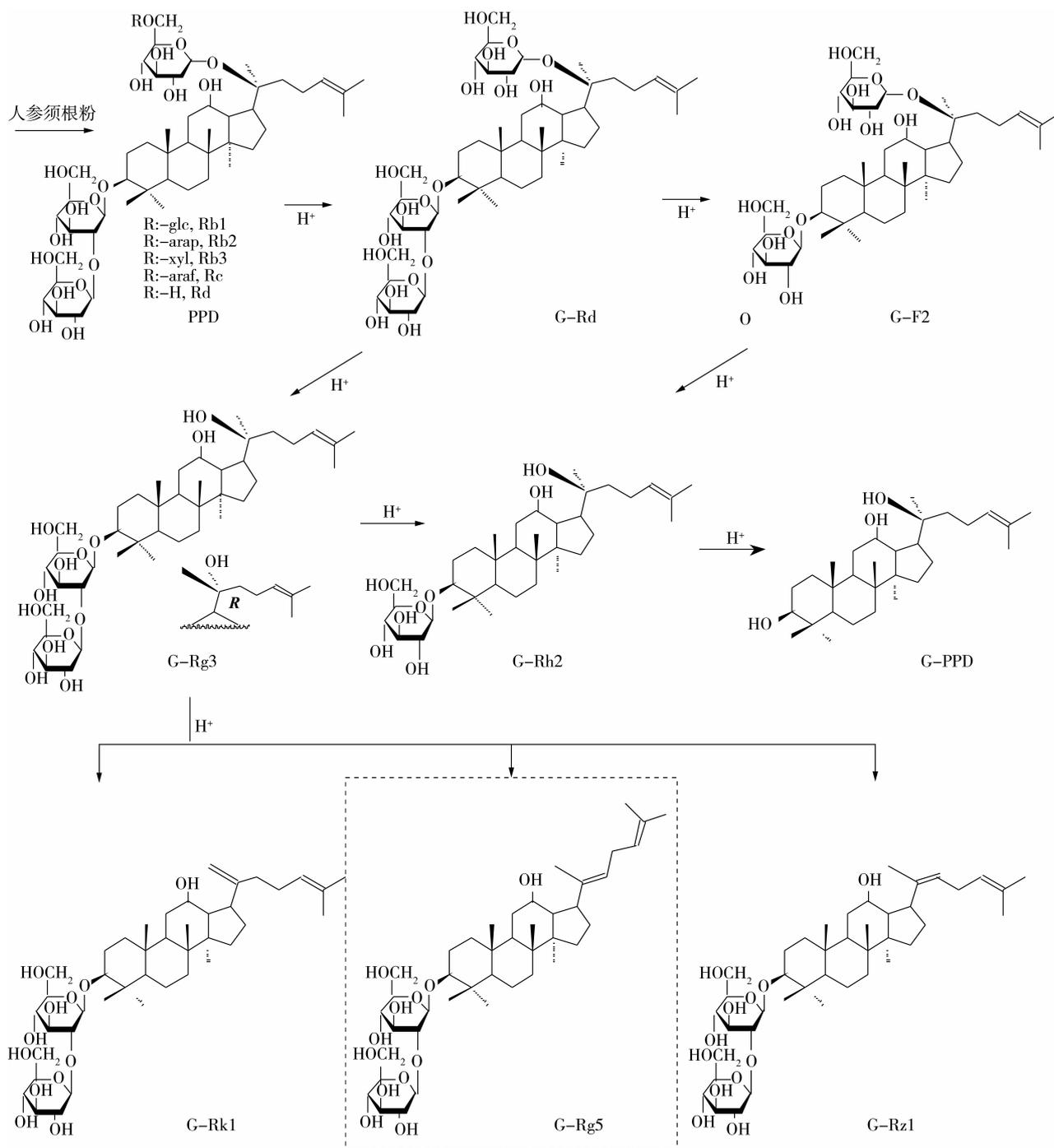


图1 人参须根粉中人参皂苷 Rg5 的生成途径

本文以人参须根粉为原料,以盐酸为催化剂,利用常压下的加热回流提取方式,通过一步法将人参皂苷的提取、人参皂苷的选择性水解和定向脱水相融合制备人参皂苷 Rg5,即在一步操作中完成“人参粉→人参皂苷→人参皂苷 Rg3→人参皂苷 Rg5”的转化,并以人参皂苷 Rg5 的得率为考察指标进行工艺优化。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

人参须根粉(GFRP):吉林省通化彩森仁生物有限公司提供;对照品人参皂苷 20(S) - Rg3(批号 MUST - 12041211)、20(R) - Rg3(批号 MUST - 12080811)、Rg5(批号 MUST - 15051917):购自成都曼斯特公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

乙腈(色谱纯):瑞典欧森巴克化学公司;甲醇(色谱纯):天津大茂化学试剂厂。正丁醇等溶剂为国产分析纯试剂,购自天津大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(配有 P230P 高压恒流泵、UV230 + 紫外 - 可见检测器、AT - 350 Column Heater、EC - 2000 LU 工作站):大连依利特分析仪器有限公司;H2050R 型高速离心机:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;L - 760 型化学合成反应仪:北京来亨科贸有限责任公司;RE - 2000A 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂; C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m):月旭材料科技(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

根据文献^[21],设置样品的色谱条件为: C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),检测波长为 203 nm,进样量 20 μ L,柱温 35 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min。流动相为乙腈(A)和水(B)。梯度洗脱:0 ~ 10 min, 22% A; 10 ~ 20 min, 22% ~ 27% A; 20 ~ 25 min, 27% ~ 31% A; 25 ~ 45 min, 31% ~ 38% A; 45 ~ 60 min, 38% ~ 52% A; 60 ~ 65 min, 52% A; 65 ~ 75 min, 52% ~ 55% A; 75 ~ 82 min, 55% ~ 60% A; 82 ~ 82.10 min, 60% ~ 90% A; 82.10 ~ 100 min, 90% A; 100 ~ 100.10 min, 90% ~ 22% A; 100.10 ~ 115 min, 22% A。

1.3.2 混合对照品溶液的制备

准确称取适量干燥的人参皂苷 20(S) - Rg3、20(R) - Rg3、Rg5 对照品,用色谱纯甲醇定容至 10 mL,配制成对照品贮备液[含人参皂苷 - 20(S) -

Rg3 495.2 μ g/mL、20(R) - Rg3 524.4 μ g/mL、Rg5 264.767 μ g/mL],移取不同体积的对照品贮备液加甲醇定容至 10 mL,配制成不同质量浓度的对照品贮备液。

1.3.3 供试品溶液的制备

准确称取人参须根粉 0.25 g,加入 5 mL 水饱和正丁醇溶液,并加入适量浓盐酸使得提取剂酸浓度为 0.06 mol/L,80 $^{\circ}$ C 水浴加热提取 4 h,提取一次。提取液冷却后,用 Na_2CO_3 溶液调 pH 值至 6 ~ 7,8 000 r/min 离心 5 min。离心后固体加适量水饱和正丁醇溶液萃取,合并有机相,于 45 $^{\circ}$ C 浓缩至干后用 8 mL 色谱纯甲醇溶解,从中取 1 mL,用色谱纯甲醇定容至 10 mL,即得供试品溶液,经 HPLC 定量分析,计算得率。

1.4 法学考察

1.4.1 线性关系考察

取不同浓度的混合对照品贮备液,在“1.3.1”色谱条件下进行定量分析,记录峰面积。以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4.2 精密度实验

取同一对照品溶液,在“1.3.1”色谱条件下重复进样 5 次,测定人参皂苷 20(S) - Rg3、20(R) - Rg3、Rg5 峰面积。

1.4.3 稳定性实验

取同一对照品溶液,在 48 h 内,每隔 6 h,在“1.3.1”色谱条件下进样一次,测定人参皂苷 Rg5 峰面积。

1.4.4 重复性实验

准确称取 0.25 g 同一人参须根粉 5 份,按“1.3.3”操作方法制备供试品溶液,在“1.3.1”色谱条件下测定,记录峰面积,计算人参皂苷 Rg5 的平均质量浓度。

1.4.5 加样回收率实验

准确称取已知含量的样品 9 份,按“1.3.3”提取并定容。从中各取 4 mL 溶液于 10 mL 容量瓶中,精确加入样品中人参皂苷 Rg5 含量的 80%、100%、120% 的对照品,加入色谱纯甲醇定容,在“1.3.1”色谱条件下进样,记录峰面积,计算回收率。

1.5 单因素考察

称取人参须根粉 0.25 g 于平行合成仪的配套试管内,按照预设的提取液酸浓度、固液比、提取剂配比、提取温度和提取时间进行人参皂苷 Rg5 的提

取。提取液冷却后,用 Na_2CO_3 溶液调 pH 值至 6 ~ 7, 8 000 r/min 离心 5 min。离心后固体加适量水饱和和正丁醇溶液萃取,合并有机相,于 45 °C 浓缩至干后用 8 mL 色谱纯甲醇溶解,从中移取 1 mL,用色谱纯甲醇定容至 10 mL,经 HPLC 定量分析,计算 Rg5 得率。

1.6 正交实验

在单因素实验基础上,以提取温度(A)、酸浓度(B)、提取时间(C)为考察因素,根据 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验。因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

水平	A 提取温度/°C	B 酸浓度/(mol/L)	C 提取时间/h
1	70	0.04	3
2	80	0.06	5
3	90	0.08	4

1.7 验证实验

称取人参须根粉 5 g 于圆底烧瓶中,在正交实验得出的最优条件下,进行三次平行实验。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

根据测定结果,人参皂苷 20(S) - Rg3、20(R) - Rg3、Rg5 的回归方程及线性范围分别为: $Y_{S-Rg3} = 6.501 3X + 16.078, 2.476 \sim 495.2 \mu\text{g/mL}, r = 0.999 7; Y_{R-Rg3} = 4.761 6X + 12.252, 2.622 \sim 524.4 \mu\text{g/mL}, r = 0.999 7; Y_{Rg5} = 14.185X + 40.192, 7.925 \sim 264.767 \mu\text{g/mL}, r = 0.999 9$ 。在各自线性范围内呈现良好的线性关系。

2.2 精密度实验

测得人参皂苷 20(S) - Rg3、20(R) - Rg3、Rg5 峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.25%、0.89%,说明仪器精密度良好。

2.3 稳定性实验

测得人参皂苷 Rg5 峰面积的 RSD 为 0.63%,峰面积无明显变化,说明人参皂苷 Rg5 样品溶液在 48 h 内具有良好的稳定性。

2.4 重复性实验

按“1.3.3”操作方法制备供试品溶液,计算得到人参皂苷 Rg5 的平均质量浓度为 17.53 mg/g, RSD 为 1.68%,说明该方法的重现性较高。

2.5 加样回收率实验结果

加样回收率实验结果见表 2。

表 2 加样回收率实验结果

原有量 /mg	取样量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
4.380 4	0.219 4	0.175 5	0.401 2	103.59
4.379 9	0.218 9	0.175 5	0.393 2	99.32
4.376 4	0.219 9	0.175 5	0.398 3	101.65
4.378 3	0.218 9	0.219 8	0.441 7	101.36
4.377 7	0.219 5	0.219 8	0.442 1	101.27
4.374 0	0.219 0	0.219 8	0.441 1	101.05
4.376 4	0.218 5	0.270 3	0.491 2	100.89
4.380 1	0.219 7	0.270 3	0.495 3	101.96
4.377 6	0.219 3	0.270 3	0.499 6	103.70

注:平均回收率为 101.64%,RSD 为 1.33%。

结果显示,加样回收率在 99.32% ~ 103.70% 之间,平均回收率为 101.64%,RSD 值为 1.33%,说明该方法的准确度较高。

2.6 单因素实验结果分析

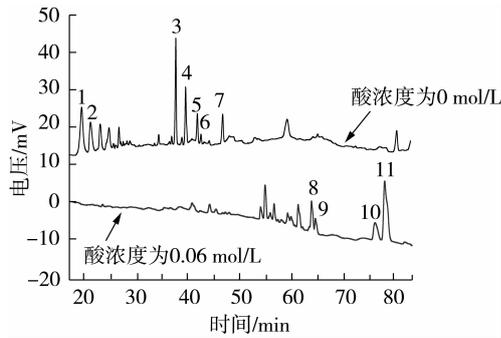
2.6.1 提取液酸浓度对人参皂苷 Rg5 得率的影响

人参皂苷 Rg5 的制备需要经过“人参须根粉→原人参二醇组皂苷→Rg3→Rg5”的转化过程,而酸在此转化过程中起到催化作用。为了考察酸浓度对人参皂苷 Rg5 得率的影响,固定提取温度为 80 °C、固液比 1:20 g/mL、提取时间 4 h,只改变酸浓度(0、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mol/L),进行提取。实验结果见表 3。

表 3 酸浓度对人参皂苷 Rg5 得率的影响

酸浓度/(mol/L)	Rg5 得率/%	R - Rg3 得率/%	S - Rg3 得率/%
0	0	0	0
0.02	0.03	0.05	0.02
0.03	1.01	0.15	0.46
0.04	1.07	0.21	0.51
0.05	1.38	0.38	0.69
0.06	1.98	0.55	0.91
0.07	1.65	0.35	0.55
0.08	1.47	0.28	0.42

由表 3 可知,随着酸浓度的增大,人参皂苷 Rg5 的得率先逐渐增加,当酸浓度为 0.06 mol/L 时得率达到最大值,酸浓度进一步增加,得率反而减小。由图 2 可知,当酸浓度为 0 时,原人参二醇组皂苷 Rb1(3)、Rc(4)、Rb2(5)、Rb3(6)、Rd(7) 的含量很高,说明原人参二醇组皂苷在无酸催化条件下,转化成人参皂苷 Rg5 的量极低,仅为 8.06 $\mu\text{g/mL}$;当酸浓度为 0.06 mol/L 时,Rg5 含量达到最大值,为 61.99 $\mu\text{g/mL}$,Rg5 的含量明显提高;当酸浓度过大时,人参皂苷 Rg5 会发生进一步的分解反应,导致其得率降低。故酸浓度以 0.06 mol/L 为宜。



1 - Rg1 2 - Re 3 - Rb1 4 - Rc 5 - Rb2 6 - Rb3 7 - Rd
8 - 20(S) - Rg3 9 - 20(R) - Rg3 10 - Rz1 + Rk1 11 - Rg5

图2 人参须根粉提取产物 HPLC 色谱图

2.6.2 固液比对人参皂苷 Rg5 得率的影响

由人参须根粉直接提取人参皂苷 Rg5 的过程中,水饱和正丁醇溶液的酸溶液不仅是人参皂苷的提取剂,也是人参皂苷通过水解、脱水等化学反应转化成人参皂苷 Rg5 的反应溶剂。为了考察人参须根粉和水饱和正丁醇溶液酸溶液的固液比对制备人参皂苷 Rg5 的影响,固定提取温度为 80 °C、提取液酸浓度 0.06 mol/L、提取时间 4 h,只改变固液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL),进行提取。实验结果见表4。

表4 固液比对人参皂苷 Rg5 得率的影响

固液比/(g/mL)	Rg5 得率/%	R - Rg3 得率/%	S - Rg3 得率/%
1:10	1.93	0.33	0.75
1:15	1.98	0.55	0.91
1:20	2.11	0.40	0.87
1:25	1.94	0.35	0.79
1:30	1.75	0.25	0.65

由表4可知,随着固液比的增大,人参皂苷 Rg5 的得率呈现先增加后减小的趋势。这是由于随着固液比的增大,即提取溶剂的用量增加,提取溶剂中溶解的 PPD 皂苷增加,因此,人参皂苷 Rg5 的得率增加。但当固液比大于 1:20 g/mL 时,人参皂苷 Rg5 的得率反而降低,这是由于提取剂酸浓度一定但提取剂用量增大,相当于提取剂中电离出的 H⁺ 数增加,导致生成的 Rg5 分解成其他物质,使其得率减小。

2.6.3 提取溶剂配比对人参皂苷 Rg5 得率的影响

根据相似相容原理,极性相似,溶解度好。为了考察不同极性的提取剂对人参皂苷 Rg5 得率的影响,在提取温度为 80 °C、提取时间 4 h、酸浓度 0.06 mol/L、固液比为 1:20 g/mL 的条件下,只改变水与正丁醇的配比(分别为 0:100、水饱和正丁醇溶液、20:80、40:60、60:40、80:20、100:0),进行提取实验。

实验结果见表5。

表5 提取剂配比对人参皂苷 Rg5 得率的影响

提取溶剂配比 (V _水 :V _{正丁醇})	Rg5 得率 /%	R - Rg3 得率/%	S - Rg3 得率/%
0:100	1.97	-	0.18
水饱和和正丁醇溶液(15:85)	2.11	0.40	0.87
20:80	1.57	0.41	0.75
40:60	1.51	0.82	0.95
60:40	1.23	0.75	0.88
80:20	1.29	1.07	1.09
100:0	1.47	1.93	1.42

由表5可知,提取溶剂配比对人参皂苷 Rg5 得率的影响,呈现出两端高、中间低的趋势,这是因为在酸催化下,由人参须根粉制备人参皂苷 Rg5 是一个极其复杂的过程,不仅受 PPD 皂苷和丙二酸单酰基人参皂苷提取效果的影响,而且还受提取的 PPD 皂苷定向水解生成人参皂苷 Rg3 和人参皂苷 - Rg3 定向脱水生成人参皂苷 Rg5 的过程的影响。随着提取溶剂中水含量的增加,大量的 Rg3 以固体形式析出,溶解在提取溶剂中的 Rg3 减少,不能有效转化为人参皂苷 Rg5,导致人参皂苷 Rg5 的得率逐渐降低,但随着提取溶剂中水含量的进一步增加,增大了提取溶剂的极性,促进了酸的解离,从而提高了强极性的丙二酸单酰基人参皂苷的提取率,同时使丙二酸单酰基人参皂苷转化成更多的人参皂苷 Rg3,为人参皂苷 Rg5 的制备提供更多直接原料,因此人参皂苷 Rg5 的得率有所上升。实验结果表明,水饱和和正丁醇溶液的提取效果最佳,因此以水饱和和正丁醇溶液为最佳提取溶剂。

2.6.4 提取温度对人参皂苷 Rg5 得率的影响

提取温度不仅影响人参皂苷的提取,同时会影响人参皂苷的水解和脱水过程。为了考察温度对人参皂苷 Rg5 得率的影响,固定提取时间为 4 h、酸浓度为 0.06 mol/L、固液比 1:20 g/mL,分别在 65、70、75、80、85、90 °C 下进行提取实验。实验结果见表6。

可以看出,随着提取温度的升高,人参皂苷 Rg5 的得率先增加后减小,这是因为随着提取温度的升高,一方面更多的原人参二醇组人参皂苷被提取,另一方面温度的升高又会加快原人参二醇组皂苷向人参皂苷 Rg5 转化,有助于提高人参皂苷 Rg5 的得率。但当温度进一步升高,特别是提取温度达到 90 °C 时,人参皂苷 Rg5 的得率明显低于 80 °C 时的得

率,这表明过高的提取温度不利于人参皂苷 Rg5 的稳定性。因此,适宜的提取温度为 80 ℃。

表6 提取温度对人参皂苷 Rg5 得率的影响

温度/℃	Rg5 得率/%	R - Rg3 得率/%	S - Rg3 得率/%
65	1.00	0.25	0.51
70	1.20	0.40	0.68
75	1.84	0.3	0.78
80	2.11	0.55	0.91
85	1.70	0.41	0.67
90	1.51	0.43	0.38

2.6.5 提取时间对人参皂苷 Rg5 得率的影响

为了考察提取时间对人参皂苷 Rg5 得率的影响,固定提取温度为 80 ℃、酸浓度为 0.06 mol/L、固液比 1:20 g/mL,只改变提取时间(2、3、4、5、6 h),进行提取实验。实验结果见表 7。

表7 提取时间对人参皂苷 Rg5 得率的影响

时间/h	Rg5 得率/%	R - Rg3 得率/%	S - Rg3 得率/%
2	1.35	0.23	0.49
3	1.73	0.36	0.58
4	2.11	0.40	0.89
5	1.73	0.27	0.63
6	1.71	0.27	0.55

由表 7 可知,提取开始阶段,由于体系中还不存在或只少量存在人参皂苷 Rg5,使得人参皂苷 Rg5 生成速率大于人参皂苷 Rg5 的分解速率,因此提取刚开始随着提取时间的延长,人参皂苷 Rg5 的得率增加;当提取时间大于 4 h 后,随着原料中二醇组皂苷含量的降低,人参皂苷 Rg5 的分解速率快于其生成速率,人参皂苷 Rg5 得率降低。因此,提取时间以 4 h 为宜。

2.7 正交实验优化

为进一步优化人参皂苷 Rg5 的制备工艺条件,在单因素实验基础上,以提取温度(A)、酸浓度(B)、提取时间(C)为考察因素,根据 L₉(3⁴)正交表设计实验,并对最优方案进行验证。正交实验结果见表 8。

由表 8 可以看出,最佳实验方案为 A₁B₂C₂,即提取温度为 70 ℃,酸浓度为 0.06 mol/L,提取出时间为 5 h,此时,人参皂苷 Rg5 的得率为 2.47% (实验 2),优于单因素的最优方案(实验 5, 2.18%)。由方差分析(表 9)可知,影响人参皂苷 Rg5 得率的因素次序为 A > B > C,即:提取温度 > 酸浓度 > 提取时间,对最优方案进行三次重复性验证实验,得出

人参皂苷 Rg5 的得率分别为 2.44%、2.52%、2.47%,平均得率为 2.48%,是金银萍等^[18]从红参中分离的人参皂苷 Rg5 得率的 205 倍,验证实验 RSD 值为 1.63%,说明该方法的重现性较好。

表8 正交实验 L₉(3⁴)设计和结果

实验序号	A	B	C	误差	人参皂苷 Rg5 得率/%
1	1	1	1	1	1.24
2	1	2	2	2	2.47
3	1	3	3	3	2.36
4	2	1	2	3	1.84
5	2	2	3	1	2.18
6	2	3	1	2	1.92
7	3	1	3	2	1.01
8	3	2	1	3	1.36
9	3	3	2	1	1.66
K1j	2.02	1.36	1.51	1.69	
K2j	1.98	2.01	2.00	1.80	
K3j	1.34	1.98	1.85	1.85	
Qj	0.87	0.79	0.37	0.04	3
MAX	2.02	2.00	1.99	1.85	
极差	0.68	0.65	0.49	0.16	
优水平	A ₁	B ₂	C ₂		

表9 方差分析表

差异源	平方和	自由度	方差	F 值	F _{0.01}	F _{0.05}	F _{0.10}	显著性
因素 A	0.87	2	0.44	22.06	99	19.000	9.000	显著
因素 B	0.79	2	0.40	20.04	99	19.000	9.000	显著
因素 C	0.37	2	0.19	9.41	99	19.000	9.000	有一定影响
误差	0.04	2	0.02					
总计	2.07	8						

注: F > F_{0.01}, 极显著; F_{0.01} < F < F_{0.05}, 显著; F_{0.05} < F < F_{0.10}, 有一定影响; F < F_{0.10}, 无影响。

在最优方案条件下,对一次萃取后的人参渣进行二次萃取,HPLC 分析谱图见图 3。对人参皂苷 Rg5 的定量分析结果表明,按照本方法由人参须根粉直接制备 Rg5,一次性得率为 2.47% 左右。将第一次提取的固体残渣,在同等条件下进行二次提取

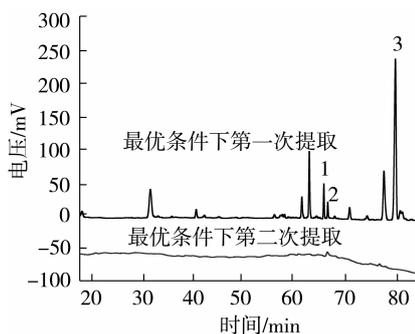


图3 最优实验条件下第一次提取和第二次提取结果对比图

和三次提取,计算 Rg5 的二次得率为 0.03%,第三次得率为 0,计算可知第一次提取占三次提取总和的 98.80%。通常人参皂苷需要三次提取,而通过本方法提取人参皂苷 Rg5 的一次提取效果基本达到三次提取的效果,提取效率较高。

2.8 验证实验

在最优方案条件下,以 5 g 人参须根粉(放大 20 倍)为原料进行三次人参皂苷 Rg5 的制备平行实验。实验结果表明,人参皂苷 Rg5 的得率分别为 2.20%、2.48%、2.46%,平均值为 2.38%,RSD 值为 1.29%,说明放大条件下同样有较好的重现性。

3 结论

本实验在单因素实验基础上,通过正交实验对人参皂苷 Rg5 的制备工艺进行优化,探索提取温度、酸浓度、提取时间及其相互作用对人参皂苷 Rg5 得率的影响,得最优工艺为提取温度 70 °C,酸浓度 0.06 mol/L,提取时间 5 h,在此条件下,人参皂苷 Rg5 得率为 2.48%。

传统的人参皂苷 Rg5 制备方法一般采用长时间高温蒸制鲜参,得到含有人参皂苷 Rg5 的人参产品,再分离出人参皂苷 Rg5;或者先将人参中的皂苷提取后,再将其转化成人参皂苷 Rg5。无论采用何种传统方法,均存在制备时间长、制备效率低的缺点。本论文通过采用常压加热提取方法,融合人参皂苷的提取技术和人参皂苷的转化技术,直接从人参须根粉中一步制备人参皂苷 Rg5,不仅简化了实验操作步骤,而且缩短了制备时间,提高了制备效率,为人参皂苷 Rg5 提供了简单易行的制备方法。

参考文献:

[1] 吴少雄,王保兴,郭祀远,等. 三七叶苷的提取分离与纯化[J]. 食品与发酵工业,2005,31(1):149-151.

[2] 鱼红闪,陈琪,金凤燮. 不同种类人参及其各部位中皂苷组成和比例的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,28(2):24-28.

[3] 周琪乐,徐崑,杨秀伟,等. 中国红参化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(2):233-249.

[4] Kim S J, Kim A K. Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (Panax ginseng Meyer) and ginsenoside Rg5[J]. Journal of Ginseng Research,2015,39:125-134.

[5] 高戎,徐建如,李仁奇,等. 人参皂苷 Rg5 对脓毒血症大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 现代生物医学进展,2013,13(11):2062-2064.

[6] Shin Y W, Bae E A, Kim D H. Inhibitory effect of ginsenoside Rg5 and its metabolite ginsenoside Rh3 in an oxazolone-induced mouse

chronic dermatitis model[J]. Arch Pharm Res,2006,29(8):685-690.

[7] 金玲,金香淑. 红参皂苷 Rg5 对 MPP+ 所致 SH-SY5Y 细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):878-880.

[8] Lee Y Y, Park J S, Jung J S, et al. Anti-inflammatory Effect of Ginsenoside Rg5 in Lipopolysaccharide-stimulated BV2 Microglial Cells[J]. International Journal of Molecular Sciences,2013,14:9820-9833.

[9] Kim T W, Joh E H, Kim B, et al. Ginsenoside Rg5 ameliorates lung inflammation in mice by inhibiting the binding of LPS to toll-like receptor-4 on macrophages[J]. Int Immunopharmacol,2012,12(1):110-116.

[10] 张晶,王世荣,陈全成,等. 人参皂苷 Rg3(R), Rg3(S), Rg5/Rk1 对乙醇致小鼠记忆阻碍改善作用的影响[J]. 吉林农业大学学报,2006,28(3):283-284.

[11] Kim E J, Jung I H, Le T K V, et al. Ginsenosides Rg5 and Rh3 protect scopolamine-induced memory deficits in mice[J]. Journal of Ethnopharmacology,2013,146(1):294-299.

[12] 姚华,金永日,杨洁,等. 密闭式微波降解法促进常见人参皂苷向稀有人参皂苷转化的规律[J]. 高等学校化学学报,2014,35(11):2317-2323.

[13] 杨凌,何克江,杨义,等. 一种人参二醇型皂甙酸水解制备人参皂甙 Rk1 和 Rg5 的方法[P]. 中国专利:CN02109790.9,2005-09-21.

[14] 郑佑燮,崔镇华. 用于制备加工人参以获得增加的人参皂甙 Rg5 含量的新颖方法[P]. 中国专利:200680011768,2006-04-11.

[15] 金凤燮,鱼红闪. 红参皂苷 Rg3 组合 Rh2 组混合皂苷的制备方法[P]. 中国专利:CN102352402A,2012-02-15.

[16] 戚政焯,姜奇成,郑凤哲,等. 通过微波辐照产生的具有提高的人参皂苷 Rg3、Rg5 和 Rk1 含量比的人参属植物提取物、制备所述人参属植物提取物的方法以及包含所述人参属植物提取物的组合物[P]. 韩国发明专利,CN104487079A,2015.

[17] 孙成鹏,高维平,赵宝中,等. 柠檬催化转化原人参二醇组皂苷制备人参皂苷 Rg5 的初步研究[J]. 中成药,2013,35(12):2694-2698.

[18] 金银萍,郑培和,郑斯文,等. 人参皂苷 20(S)-Rg3,20(R)-Rg3,Rg5,Rk1 对照品的制备[J]. 吉林农业大学学报,2014,36(5):591-594.

[19] 关大朋,王欢,李伟,等. 高温热裂解人参皂苷 Rk1 和 Rg5 的制备工艺优化[J]. 上海中医药杂志,2015,49(1):91-95.

[20] Soo Kyung Jo, In Sook Kim, Keon Sang Yoon, et al. Preparation of ginsenosides Rg3, Rk1, and Rg5-selectively enriched ginsengs by a simple steaming process[J]. European Food Research and Technology,2015,240(1):251-256.

[21] 孙成鹏,高维平,赵宝中,等. 酒石酸催化转化原人参二醇组皂苷制备 20(R)-人参皂苷 Rg3[J]. 中草药,2013,44(14):1893-1898. 完