

离子液体—超声—微波协同辅助提取人参 中人参皂苷的工艺研究

周祥坤

牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157000

摘要: 人参皂苷是人参的主要有效成分之一, 是人参发挥生理活性的主要物质基础, 主要存在于人参根和茎中, 人参皂苷 Rb1 提取工艺的优化是提高人参皂苷 Rb1 得率和降低成本的关键环节。文章以人参皂苷 Rb1 得率为指标, 通过单因素试验及响应面法优化离子液体—超声—微波协同辅助提取人参中人参皂苷 Rb1 的工艺。结果显示: 影响该法提取人参中人参皂苷 Rb1 的因素从大到小为微波提取时间、离子液体浓度、料液比; 最佳提取工艺条件为 0.63mol/L 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐, 料液比 1:12, 超声提取 0.5h, 微波 65s。在该条件下, 人参皂苷 Rb1 得率达 1.49%。

关键词: 人参皂苷; 离子液体; 微波提取; 超声; 响应面

0 前言

人参作为传统中药材, 其药理活性主要源于人参皂苷类成分, 其中人参皂苷 Rb1 因含量丰富且生物活性显著而备受关注。研究证实, Rb1 具有神经保护、抗肿瘤、心肌修复及肝脏保护等多重作用^[1-3]。如其可通过促进肿瘤细胞氧化死亡抑制增殖迁移, 并通过增强线粒体功能减轻心肌纤维化^[4-6]。然而, 传统超声提取方法虽得率较高, 但存在有机溶剂毒性大、环境负荷高等缺陷。

本研究采用离子液体—超声—微波协同辅助提取法, 在单因素实验的前提下, 探讨了离子液体浓度、微波处理时间以及料液比对人参皂苷 Rb1 得率的影响。通过 Design-Expert 10 软件进行响应面试验设计, 旨在优化人参皂苷 Rb1 的提取工艺条件, 为后续对人参皂苷 Rb1 的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人参(牡丹江医药有限公司); 人参皂苷 Rb1 标品(苏州普路生物科技有限公司); 1-正丁基-3-甲基咪唑溴盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-丁基-3-甲基咪唑氯化物、1-丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐(上海爱纯生物科技有限公司); 无水乙醇(分析纯, 南京兴沙化工有限公司); 甲醇、乙腈(色谱级, 济南世纪通达化工有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 人参皂苷 Rb1 含量的测定

(1) 高效液相色谱条件的建立。色谱条件: 十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm)。流动相: 乙腈/水=48:52, 检测波长 280nm, 柱温 25℃, 时间 40min。

(2) 标准曲线的绘制。将适量的人参皂苷 Rb1 标品用色谱甲醇稀释成 5 个梯度浓度, 分别为 0.0625、0.125、0.25、0.5、1mg/mL, 在所选定色谱条件下通过高效液相色谱测得标品的峰面积, 以人参皂苷 Rb1 标品浓度为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 建立回归方程。

(3) 人参皂苷 Rb1 得率测定。得率按下式公式进行计算:

$$y = \frac{c \times v}{m} \times 100\%$$

式中, y 表示人参皂苷 Rb1 得率, %; C 表示提取液中人参皂苷 Rb1 的浓度, 由标准曲线计算得到, g/mL; V 表示的是人参提取液体积, mL; m 表示的是参与提取的人参样品的量, g。

1.2.2 人参皂苷 Rb1 的提取

将粉碎后的人参样品过 20 目筛后取 0.1g 置于 50mL 锥形瓶, 按照 1:10 的料液比(g/mL)加入离子液体进行超声, 超声温度 60℃, 随后微波提取得人参皂苷 Rb1 粗提取液。

1.2.3 单因素实验

采用控制变量法分别考察离子液体种类(1-丁基-3-甲基咪唑氯化物、1-丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-正丁基-3-甲基咪唑溴盐)、离子液体浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mol/L)、超声提取时间(10、20、30、40、50、60 和 70min)、微波提取时间(10、20、30、40、50、60 和 70s)、料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35g/mL) 对人参皂苷 Rb1 得率的影响, 每组实验数据平行测 3 次。

1.2.4 响应面优化实验

在单因素试验结果的基础上, 选取对人参皂苷 Rb1 得率影响最显著的 3 个因素进行响应面优化实验。根据 Design-Expert10 软件中的 Box-Behnken 试验设计方法, 以人参皂苷 Rb1 得率为评价标准, 选定离子液体浓度 A (0.5~0.7 mol/L)、微波时间 B (50~70s) 和料液比 C

(1:5~1:10 g/mL) 作为试验因素, 进行 3 因素 3 水平的实验设计。

2 结果分析

2.1 人参皂苷 Rb1 标准曲线

得回归方程为 $y=3632722.98x-89403.75$, $R^2=0.9966$ 的标准曲线, 在测试浓度范围内线性关系良好。

2.2 单因素实验结果分析

实验如图 1(A), 在 0.3mol/L 的四种离子液体中, 1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐的提取效果最佳, 得率达 1.37%。当考察离子液体浓度时(图 1B), 得率随浓度增加呈先升后降趋势, 0.6mol/L 时达峰值 1.29%, 此时溶剂化作用增强促进溶出, 但更高浓度会导致黏度显著

上升, 阻碍溶剂扩散和细胞渗透^[7]。(图 1C) 料液比对提取的影响表现为 1:5 至 1:10 范围内得率提升明显, 最高为 1.42%, 此时溶剂黏稠度降低有利于成分扩散; 但超过 1:10 后, 过量溶剂吸收微波能量, 导致人参组织对微波的利用效率下降, 这与微波辅助提取中溶剂量与能量吸收的平衡机制相符^[8]。超声时间(10~30min)与得率呈正相关(图 1D), 30min 时达 1.56% 峰值, 其机制在于空化效应持续破坏细胞壁并促进溶出; 但超 30min 后得率下降, 推测因超声机械作用导致人参皂苷等三萜类成分结构受损降解^[9]。(图 1E) 微波时间则显示 60s 为最佳参数, 得率为 1.61%, 短时微波可快速提升细胞内压促进成分释放, 但超过 60s 可能引发氧化或热分解^[10]。

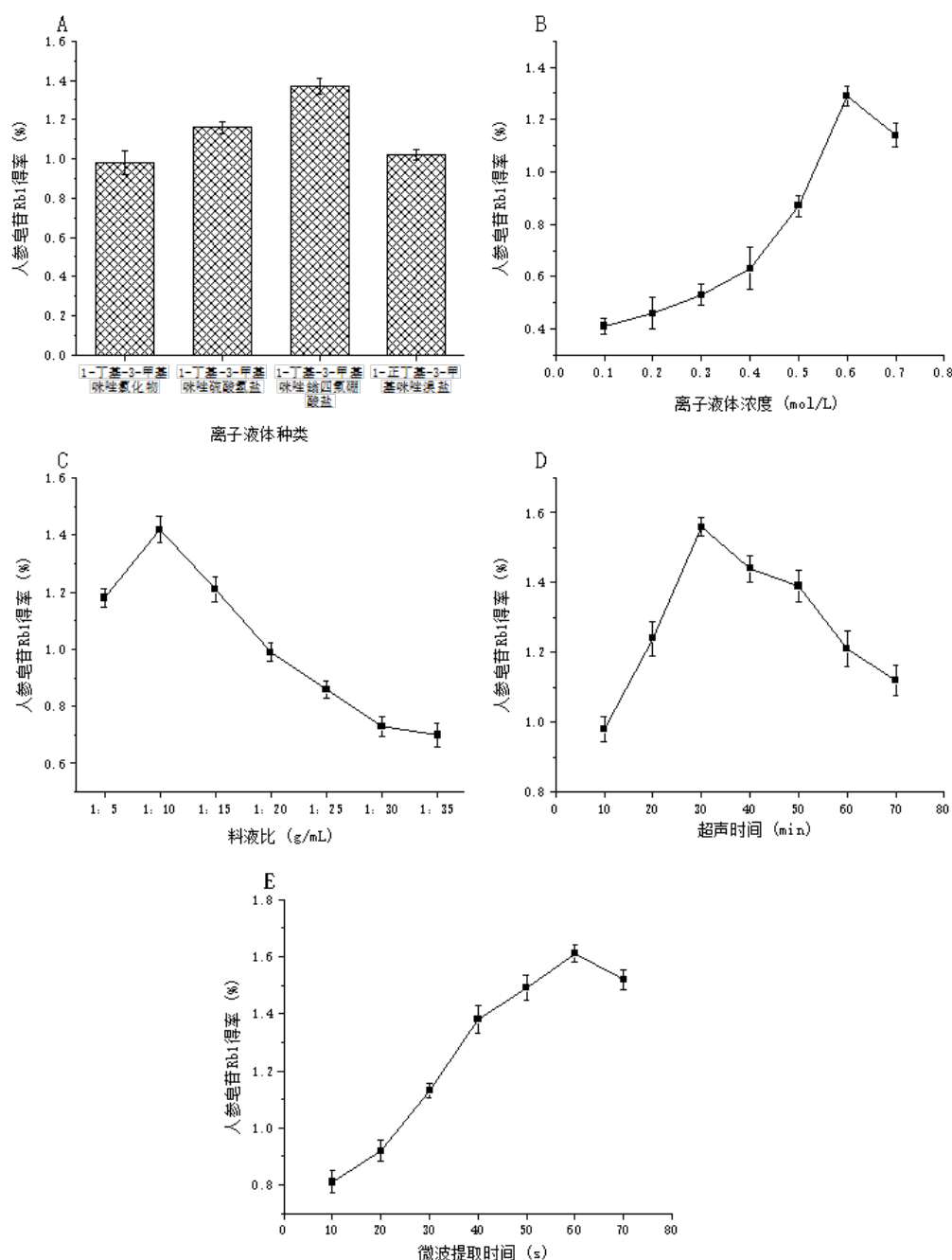


图 1 各单因素对人参皂苷 Rb1 的得率的影响

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 回归模型的建立与方差分析

利用 Design-Expert10 软件分析, 可得回归数学模型为:

$Y=1.58+0.1175A+0.1762B+0.1138C+0.1400AB+0.0050AC+0.2425BC-0.3127A^2-0.3153B^2-0.3153C^2$, 对方程进行方差分析, 结果如表 1 所示。

表 1 方差分析结果

方差来源	平均和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.17	9	0.2413	32.39	<0.0001	significant
A (离子液体浓度)	0.1105	1	0.1105	14.82	0.0063	
B(微波时间)	0.2485	1	0.2485	33.35	0.0007	
C(料液比)	0.1035	1	0.1035	13.89	0.0074	
AB	0.0784	1	0.0784	10.52	0.0142	
AC	0.0001	1	0.0001	0.0134	0.9110	
BC	0.2352	1	0.2352	31.57	0.0008	
A2	0.4118	1	0.4118	55.28	0.0001	
B2	0.4185	1	0.4185	56.16	0.0001	
C2	0.4185	1	0.4185	56.16	0.0001	
残差	0.0522	7	0.0075			
失拟项	0.0257	3	0.0086	1.29	0.3916	not significant
纯误差	0.0265	4	0.0066			
总差	2.22	16				
R2	0.9764					
Radj2	0.9464					

由表 1 知, $F=32.39$, $P<0.0001$, 处于极显著水平, 表明模型具备统计学显著性。失拟项 $P=0.3916>0.05$, 差异不显著, 说明模型拟合情况良好, 试验误差小, 表明此模型能够很好地对试验结果进行预测。此外, 决定系数 $R^2=0.9764$, $Radj^2=0.9464$, 两个数值均十分接近 1, 进一步证实该模型成立。最终得出各因素对人参皂苷 Rb1 得率影响程度从高到低依次为: B(微波提取时间)、A(离子液体浓度)、C(料液比)。通过应用响应面法得到人参中人参皂苷 Rb1 提取的最佳条件: 0.630mol/L 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐, 料液比 1: 11.856, 超声提取 0.5h, 微波时间 64.89s, 得率为 1.66%。

2.4 验证试验

结合实际所需, 最终确定提取工艺为 0.63mol/L 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐, 料液比 1:12, 超声提取 0.5h, 微波 65s。经实际验证, 该条件下人参皂苷 Rb1 得率三次实测均值为 1.49%, 高于传统醇提取的

1.13%, 且与理论预测值 1.66% 偏差 0.17 个百分点。偏差较小, 证明优化结果可信, 可为生产和研究提供可靠依据。

3 结论

本研究通过响应面法优化得到离子液体微波辅助提取人参中人参皂苷 Rb1 的最佳工艺参数: 0.63mol/L 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐, 料液比 1:12, 超声提取 0.5h, 微波 65s。在此条件下, 人参皂苷 Rb1 的得率达到 1.49%, 相较于传统的醇提法, 显著提高了得率并缩短了提取时间, 表明优化后的提取工艺具有较好的操作性。因此, 离子液体—超声—微波协同辅助提取技术为提高人参皂苷 Rb1 的提取效率, 进而提升人参的经济效益提供了新的思路。然而, 在试验过程中, 虽然该工艺有效提升了得率, 但微波化学反应器的体积较小, 限制了其在大规模生产中的应用。因此, 若要将该提取技术推广到工业生产, 还需解决微波容器的适配问题。

参考文献:

- [1]Gong L, Yin J, Zhang Y, et al. Neuroprotective mechanisms of ginsenoside Rb1 in central nervous system diseases[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 914352.
- [2] 吴博. 人参皂苷 Rb1 脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [3] 宋莹莹, 韩欣妍, 王梦雪, 等. 人参皂苷 Rb1 改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经炎症的作用及机制 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(12): 55-60.
- [4] 韩雪, 白巧云, 申林, 等. 人参皂苷 Rb1 通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 轴调节线粒体裂变融合缓解哮喘气道炎症 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(4): 798-799.

- [5] 朱敬轩, 宋囡, 杨莹, 等. 人参皂苷 Rb1 通过 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路促进肝细胞癌 HepG2 细胞发生氧死亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(5): 445-451.
- [6] 李雨澎. 人参皂苷 Rb1 联合 PRDX6 对心肌损伤的干预及保护作用研究 [D]. 吉林: 北华大学, 2023.
- [7] 苏适, 于德涵, 柴宝丽, 等. 响应面法优化超声辅助离子液体提取黑豆花青素工艺研究 [J]. 中国调味品, 2019, 44(7): 154-159.
- [8] 李丽丹, 梁丹丹, 郑帅印, 等. 复合酶协同微波提取沙棘叶黄酮工艺优化 [J]. 广东蚕业, 2024, 58(4): 38-43.
- [9] 封可欣. 超声波辅助提取沙棘叶黄酮及其生物活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [10] 李乐, 陈本寿, 袁莹. 无花果多糖的微波提取工艺优化 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 215-220.

作者简介: 周祥坤 (1998—), 男, 汉族, 河南省周口市人, 硕士, 主要从事植物活性成分提取利用方面的研究。