

# 大孔树脂纯化革皮氏海参总皂苷工艺

于林芳, 王超, 王玉明, 王林, 董平, 薛勇\*, 薛长湖  
(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

**摘要:** 比较7种大孔吸附树脂对革皮氏海参总皂苷的静态吸附和解吸效果, 从中筛选出适合该海参总皂苷分离纯化的树脂, 并对其动态吸附和解吸性能进行研究。结果表明, XAD761树脂最适合革皮氏海参总皂苷的纯化。当上样液质量浓度2mg/mL, 流速0.8mL/min, 上样液体积9BV时, 树脂达到动态吸附饱和。再用5BV 70%乙醇, 以1mL/min的流速可以洗脱完全, 解吸率为93.31%。经过树脂的纯化, 皂苷的纯度由原来的21%提高到65%。  
**关键词:** 海参; 皂苷; 分离纯化; 大孔树脂

## Macroporous Resin Purification of Saponins from the Sea Cucumber *Pearsonothria graeffei*

YU Lin-fang, WANG Chao, WANG Yu-ming, WANG Lin, DONG Ping, XUE Yong\*, XUE Chang-hu  
(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The adsorption and desorption rates of 7 types of macroporous resins towards total saponins from the sea cucumber *Pearsonothria graeffei* were investigated. Among the studied macroporous resins, XAD761 resin was the most suitable to purify crude total flavonoid extract from *Pearsonothria graeffei*. When 9 BV of 2 mg/mL sample was flowed through XAD761 resin column at a speed of 0.8 mL/min, the adsorption reached dynamic equilibrium. The adsorbed saponins could be completely eluted with 5 BV of 70% (V/V) ethanol at 1 mL/min, with a desorption rate of 93.31%. After the purification, the purity of total saponins was increased from 21% to 65%.

**Key words:** sea cucumber; saponin; purification; macroporous resin

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0001-04

海参属棘皮动物门海参纲, 自古以来被认为是一种名贵的滋补食品和药材。海参皂苷是海参的主要次生代谢产物, 也是其进行化学防御的物质基础。它们具有抗真菌<sup>[1]</sup>、抗肿瘤<sup>[2]</sup>、细胞毒<sup>[3]</sup>、溶血<sup>[4]</sup>等多种生物活性。海参皂苷的分离纯化过程很复杂, 常规的步骤包括<sup>[5-7]</sup>: 60%乙醇加热回流或冷浸提取、大孔树脂层析、水饱和正丁醇萃取、正相和反相硅胶柱层析和HPLC纯化。由于海参属于海洋生物, 体内含有较多的盐分, 会严重影响萃取时溶剂的分层效果以及其他后续的分离纯化过程。因此, 在进一步的分离纯化之前, 要先将海参提取液中的盐分除去。大孔吸附树脂柱层析是一个很好的途径, 还可除去部分蛋白、色素、多糖等一些水溶性杂质。选用合适的大孔树脂, 在除去提取物中的盐分的同时, 还可以富集皂苷类成分。目前用于纯化海参皂苷的大孔树脂主要有Amberlite XAD-2<sup>[8-9]</sup>、Polychrom-1<sup>[10-11]</sup>、DA101<sup>[12]</sup>、HP20<sup>[13]</sup>、AB-8<sup>[14]</sup>等。大

孔吸附树脂纯化海参皂苷无需耗用有机试剂, 树脂可重复使用, 方法经济简便, 适用于规模化工业生产。董平等<sup>[15]</sup>对几种市售海参中总皂苷的含量进行了研究, 结果发现革皮氏海参(*Pearsonothuria graeffei*)总皂苷的含量明显高于其他海参, 可作为进一步研究和开发海参皂苷的良好来源。在此基础上, 本研究采用7种不同类型的大孔树脂对革皮氏海参的皂苷粗提液进行吸附和解吸实验, 从中筛选出合适的树脂, 并对其吸附和解吸性能进行研究, 优化工艺, 为革皮氏海参总皂苷的大规模生产奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

革皮氏干海参 青岛市购。

刺参甙A标准品由本实验室提供; XAD761、XAD7HP、XAD1180大孔吸附树脂 美国罗门哈斯公

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31000795); 国际科技合作项目(2010DFA31330)

作者简介: 于林芳(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋天然产物。E-mail: yulinfang77@yahoo.cn

\*通信作者: 薛勇(1976—), 男, 研究方向为水产加工与贮藏。E-mail: xueyong@ouc.edu.cn

司; HP-20 大孔吸附树脂 日本三菱化学公司; H103、AB-8 大孔吸附树脂 安徽三星树脂科技有限公司; DA201-C 大孔吸附树脂 江苏苏青水处理工程集团有限公司; 无水乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸等均为国产分析纯试剂。

RE52CS 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; SHZ-D(III)循环水真空泵 上海申光仪器仪表有限公司; WFI 2000 型可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 水浴恒温振荡器 常州国华电器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品的制备

革皮氏海参干品 1.0kg 粉碎, 过 40 目筛。在室温条件下用 60% 乙醇溶液冷浸提取 4 次, 每次 10L(共 40L)。合并提取液, 旋转蒸发器浓缩、干燥, 得革皮氏海参粗总皂苷。

### 1.2.2 皂苷含量测定

采用香草醛-冰醋酸法, 按文献[15]方法建立的海参总皂苷含量测定方法进行。

### 1.2.3 大孔吸附树脂的预处理

将实验的 7 种大孔吸附树脂分别置于三角瓶中, 以无水乙醇浸泡 3 次, 每次 24h, 除去浸液上层漂浮的杂质后, 用蒸馏水冲洗至无醇味, 湿态保存备用。

### 1.2.4 静态吸附-解吸实验

准确量取经过预处理的 7 种大孔树脂各 5mL, 置于 7 个具塞三角瓶中。分别加入 1mg/mL 海参总皂苷样品溶液 50mL, 盖紧瓶塞, 置于水浴恒温振荡器中于 25℃ 振荡 12h, 振荡频率 150 次/h, 使树脂充分吸附海参总皂苷。过滤, 测定滤液中皂苷的含量, 计算树脂对皂苷的吸附率; 将吸附饱和的树脂放入另外 7 个具塞三角瓶中, 分别加入 50mL 70% 乙醇溶液, 置于水浴恒温振荡器中振荡 12h, 温度 25℃, 振荡频率 150 次/h, 使海参总皂苷充分解吸。过滤, 测定滤液中皂苷的含量, 计算树脂对皂苷的解吸率。

### 1.2.5 动态吸附-解吸实验

#### 1.2.5.1 流速对动态吸附的影响

将预处理好的树脂装入层析柱中, 柱床体积为 10mL, 将 2mg/mL 的供试液上柱, 控制流速分别以 0.4、0.8、1.0、1.4、1.8mL/min 进行动态吸附, 分部收集流出液(每管收集 1BV), 测定其中的皂苷质量浓度, 计算吸附量。

#### 1.2.5.2 上样液质量浓度对动态吸附的影响

将预处理好的树脂装入层析柱中, 柱床体积为 10mL, 分别将质量浓度为 1.5、1.8、2.0、2.2、2.5mg/mL 的供试液上柱, 控制流速 0.8mL/min 进行动态吸附, 分

部收集流出液(每管收集 1BV), 测定其中的皂苷质量浓度, 计算吸附量。

#### 1.2.5.3 解吸液浓度对动态解吸的影响

将预处理好的树脂装入层析柱中, 柱床体积为 10mL。将质量浓度 2mg/mL 的供试液以 0.8mL/min 的流速上柱, 直至吸附饱和后, 用 5BV 蒸馏水以 1.0mL/min 的流速洗柱, 分别用 30%、50%、70%、90% 乙醇溶液解吸, 解吸流速为 1.0mL/min, 分部收集解吸液(每管收集 1BV), 测定其中的皂苷质量浓度, 得到解吸率。

### 1.2.6 吸附容量和解吸率计算

$$q_e = Q_e/m = (C_0 - C_e) \times V_1/m$$

式中:  $q_e$  为吸附容量/(mg/g);  $Q_e$  为吸附总量/mg;  $m$  为树脂质量/g;  $C_0$  为吸附前溶液的质量浓度/(mg/mL);  $C_e$  为吸附后溶液中剩余的质量浓度/(mg/mL);  $V_1$  为溶液体积/mL。

$$D/\% = Q_d/Q_e \times 100 = C_d \times V/Q_e \times 100$$

式中:  $D$  为解吸率/%;  $Q_d$  为解吸量/mg;  $Q_e$  为吸附总量/mg;  $C_d$  为解吸液质量浓度/(mg/mL);  $V$  为解吸液体积/mL。

### 1.2.7 皂苷纯度的计算

收集洗脱液, 旋转浓缩后真空干燥至质量恒定, 准确称取干燥粉末适量( $m_1$ )/mg, 以乙醇溶解定容后按 1.2.2 节方法测定皂苷含量( $m_2$ )/mg, 则:

$$\text{皂苷纯度}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 树脂的筛选

由于树脂的极性、孔径、比表面积等性质差异, 不同的树脂对皂苷的吸附和解吸性能会有很大差别。另外, 由于不同种海参体内皂苷的结构和性质差异, 一种树脂并不能适用于所有品种的海参皂苷, 因此针对某种海参皂苷, 需要选择合适类型的大孔树脂, 以达到最优的纯化效果。本实验选取了 7 种常用的大孔树脂, 进行静态吸附-解吸实验。通过结果分析(表 1 和表 2)可知, 7 种树脂对革皮氏海参总皂苷的吸附和解吸性能呈现一定的趋势, 即随着树脂极性的增大其对皂苷的吸附和解吸能力增强, 其中极性树脂 XAD761 的吸附容量和解吸率均最高, 吸附容量达 49mg/g, 解吸率达 96%, 这可能与革皮氏海参总皂苷的极性较大有关, 因而可推断海参总皂苷的极性强弱是筛选树脂的关键因素。本实验的发现可以为其他种类海参总皂苷纯化时树脂的筛选提供参考依据。综合以上分析, 本实验选择吸附和解吸性能最高的 XAD761 树脂纯化海参总皂, 并对其纯化工艺进行研究。

表1 7种树脂对海参总皂苷的吸附率比较

Table 1 Comparison of adsorption rates of 7 types of macroporous resins

型号	$C_0$ 初始溶液质量浓度/(mg/mL)	$C_e$ 剩余溶液质量浓度/(mg/mL)	$Q_e$ 树脂吸附总量/mg	$Q_m$ 吸附容量/(mg/g)
HP-20(非极性)	1.004	0.060	47.20	39.11
DA201-C(非极性)	1.004	0.068	46.82	36.61
H103(非极性)	1.004	0.121	44.15	31.05
XAD1180(非极性)	1.004	0.047	47.85	43.00
AB-8(弱极性)	1.004	0.052	47.62	42.00
XAD761(极性)	1.004	0.058	47.29	49.12
XAD7HP(极性)	1.004	0.058	47.29	43.95

表2 7种树脂对海参总皂苷的解吸率比较

Table 2 Comparison of desorption rates of 7 types of macroporous resins

型号	$Q_0$ 解吸前树脂吸附量/mg	$C_d$ 解吸液质量浓度/(mg/mL)	$Q_d$ 解吸量/mg	$D$ 解吸率/%
HP-20(非极性)	47.20	0.627	31.36	66.44
DA201-C(非极性)	46.82	0.665	33.23	70.98
H103(非极性)	44.15	0.499	24.97	56.57
XAD1180(非极性)	47.85	0.687	34.36	71.80
AB-8(弱极性)	47.62	0.792	39.62	83.20
XAD761(极性)	47.29	0.913	45.63	96.48
XAD7HP(极性)	47.29	0.837	41.87	88.54

2.2 XAD761树脂动态吸附-解吸条件的优化

2.2.1 流速对树脂吸附的影响

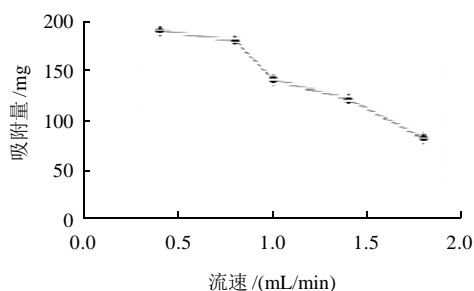


图1 流速对树脂吸附量的影响

Fig.1 Effects of flow rate on the adsorption of XAD761 resin

按1.2.5.1节方法,考察不同流速对树脂吸附性能的影响。结果(图1)表明,随着流速的增加,大孔树脂对海参总皂苷的吸附量逐渐下降。原因可能是,随着流速的增加,溶液在树脂内停留时间缩短,固定相和流动相间没有充分的接触,导致流动相中的皂苷还未与树脂内表面接触就已提前穿透流出,交换容量变小。因此吸附流速以慢速为好,但过慢会延长分离纯化时间,

降低生产效率,不符合规模化生产要求。综合考虑,流速选择0.8mL/min为宜。

2.2.2 上样液质量浓度对树脂吸附的影响

按1.2.5.2节方法,测定不同质量浓度对树脂吸附性能的影响,图2结果表明,随着上样液质量浓度的增加,大孔树脂对海参总皂苷的吸附量下降,当上样液质量浓度在1.5~2.0mg/mL时,吸附量下降缓慢,继续增加上样液质量浓度,下降幅度增大。原因可能是,当皂苷质量浓度增大后,皂苷分子间的竞争吸附增强,大量皂苷分子没有机会与树脂内表面交换吸附而穿透流出,因此上样液质量浓度不宜太高。但当上样液质量浓度过低时,所需吸附时间较长,不利于皂苷的高效率纯化生产,综合分析,上样液质量浓度以2.0mg/mL为宜。

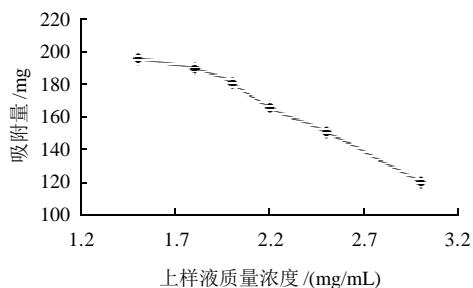


图2 上样液质量浓度对树脂吸附量的影响

Fig.2 Effects of saponin concentration on the adsorption of XAD761 resin

2.2.3 解吸液体积分数对树脂解吸率的影响

表3 不同体积分数乙醇对树脂解吸率的影响

Table 3 Effect of ethanol concentration on the desorption of XAD761 resin

乙醇体积分数/%	30	50	70	90
解吸量/mg	64.38	124.55	167.96	140.03
解吸率/%	35.76	69.19	93.31	77.79

按1.2.5.3节方法,将已吸附饱和的树脂用不同体积分数的乙醇进行解吸,解吸速率为1mL/min,测定解吸液的皂苷含量,计算解吸率,结果见表3和图3。结果表明,当乙醇体积分数为30%时,总皂苷的解吸率最低,解吸所需时间也最长;当乙醇体积分数增加到50%时,其解吸效果明显增强,但解吸率仍较低;当乙醇体积分数为70%时,解吸速率加快,且解吸率最高,达到93.31%;当乙醇体积分数升至90%时,解吸速率最快,但消耗乙醇多且有更多色素类杂质被洗脱下来,解吸率有所下降。从图3可以看出,当洗脱溶剂用量为5BV时,基本已将总皂苷洗净,因此最优的解吸条件为体积分数70%乙醇溶液,洗脱体积为5BV。

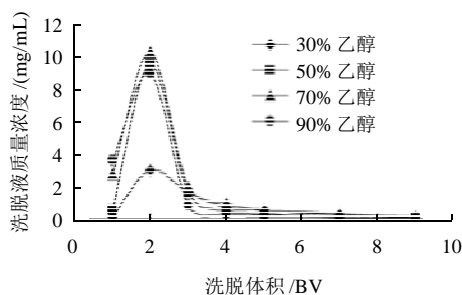


图3 不同体积分数乙醇对海参总皂苷的解吸曲线

Fig.3 Elution curves of saponins at different concentrations of aqueous ethanol

### 2.3 皂苷纯度的计算

海参总皂苷粗提液经 XAD761 树脂纯化后, 按 1.2.7 节方法计算, 测得其中皂苷的含量为 65%, 较原粗提液中皂苷的含量 21% 提高了 3 倍, 说明 XAD761 树脂对革皮氏海参总皂苷的纯化效果较好, 能大幅度提高提取物中的总皂苷含量。

## 3 结论

本实验采用大孔树脂对革皮氏海参总皂苷进行了吸附-解吸实验, 选出了性能最佳的树脂, 并对其纯化工艺进行研究。采用静态吸附-解吸法对 7 种不同极性的树脂进行筛选, 确定 XAD761 树脂为纯化革皮氏海参总皂苷的理想树脂。针对影响动态吸附解吸效果的 3 个因素: 流速、上样浓度、解吸液浓度进行了试验, 得到 XAD761 型大孔树脂纯化海参总皂苷的最佳工艺条件, 当动态吸附流速为 0.8 mL/min, 上样质量浓度为 2.0 mg/mL, 上样体积为 9 BV 时, 树脂达到吸附饱和。用体积分数 70% 乙醇溶液进行解吸, 以 1 mL/min 的流速洗脱, 洗脱体积为 5 BV 时, 能将皂苷基本洗脱完全, 解吸率达到 93.31%。实验结果表明, 革皮氏海参总皂苷经 XAD761 型大孔树脂纯化后, 皂苷的含量由原来的 21% 提高到 65%, 取得了较好的效果。

### 参考文献:

[1] RAJESH K, ASHOK K C, PRAVEEN K S. Antifungal activity in

triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(15): 4387-4391.

[2] NGUYEN H D, NGUYEN V T, PHAN V K, et al. Two new triterpene glycosides from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra*[J]. Archives of Pharmacal Research, 2007, 30(11): 1387-1391.

[3] ZHANG Shuyu, YI Yanghua, TANG Haifeng. Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria fuscocinerea*[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(10):1492-1495.

[4] KALININ V I, PROKOFIEVA N G, LIKHATSKAYA G N, et al. Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order dendrochirotida: Some trends in the evolution of this group of toxins[J]. Toxicol, 1996, 34(4): 475-483.

[5] 翁怡毅, 易杨华, 李玲, 等. 沙海参中的三个海参皂苷[J]. 中国天然药物, 2007, 5(2): 96-100.

[6] 喇明平, 易杨华, 李玲, 等. 叶瓜参中的三个海参皂苷[J]. 中国天然药物, 2008, 6(4): 254-258.

[7] YUAN Weihua, YI Yanghua, LI Ling, et al. Two triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata* Jaeger[J]. Chinese Chemical Letters, 2008, 19(4): 457-460.

[8] JAIME R, RITA C, RICARDO R. Holothurinosides: new antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*[J]. Tetrahedron, 1991, 47(26): 4753-4762.

[9] MARTA S M, ALEJANDRO J R, ANABEL K. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*[J]. Journal of Natural Products, 2001, 64(6): 732-736.

[10] VLADIMIR I K, SERGEY A A, ELENA Y K, et al. Structure of eximisoside A, a novel triterpene glycosides from the far-eastern sea cucumber *Psolus eximius*[J]. Journal of Natural Products, 1997, 60(8): 817-819.

[11] SERGEY A A, ALEXANDR S A, OLGA A D, et al. Triterpene glycosides from the far-eastern sea cucumber *Pentamera calcigera*. 1. Monosulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivatives [J]. Journal of Natural Products, 2000, 63(1): 65-71.

[12] HAN Hua, YI Yanghua, LI Ling, et al. A new triterpene glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota*[J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(2): 161-164.

[13] GRETA M, PETER T N, ALEXANDRA S S, et al. Mollisosides A, B1, and B2: Minor triterpene glycosides from the New Zealand and South Australian sea cucumber *Australostichopus mollis*[J]. Journal of Natural Products, 2005, 68(6): 842-847.

[14] 樊廷俊, 袁文鹏, 丛日山, 等. 仿刺参水溶性海参皂苷的分离纯化及其抑瘤活性研究[J]. 药学学报, 2009, 44(1): 25-31.

[15] 董平, 薛长湖, 盛文静, 等. 海参中总皂苷含量测定方法的研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(1): 28-32.