

微波辅助双水相提取盾叶薯蓣中的皂苷成分

刘琳, 董悦生, 修志龙

(大连理工大学环境生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 采用微波辅助乙醇/硫酸铵双水相体系, 从盾叶薯蓣中提取皂苷成分. 实验结果表明, 各种皂苷成分可有效地富集于醇相, 盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷、延龄草次苷的最大分配系数分别达 89, 91, 93, 117 和 153. 微波辅助双水相提取皂苷成分的最佳药材/乙醇质量比为 1:21, 最佳相组成为乙醇 25% (ω), 硫酸铵 19% (ω), 该条件下的提取率为, 总皂苷 95.1%, 盾叶新苷 99.8%, 三角叶皂苷 97.4%, 薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷 97.3%, 薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷 86.6%, 延龄草次苷 63.2%.

关键词: 微波辅助双水相萃取; 乙醇/硫酸铵体系; 盾叶薯蓣; 甾体皂苷; 提取率

中图分类号: TQ460.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)06-1147-06

1 前言

薯蓣皂苷元是甾体避孕药和激素类药物的重要合成前体^[1]. 盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)是生产薯蓣皂苷元的主要药源植物, 苷元以甾体皂苷形式存在于植物中. 甾体皂苷有广泛的药理作用和重要的生物活性, 如抗肿瘤、抗真菌、防治心血管疾病、降血糖、免疫调节等^[2-4]. 研究表明, 盾叶薯蓣中甾体皂苷主要有盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷及延龄草次苷^[5], 结构如图 1 所示.

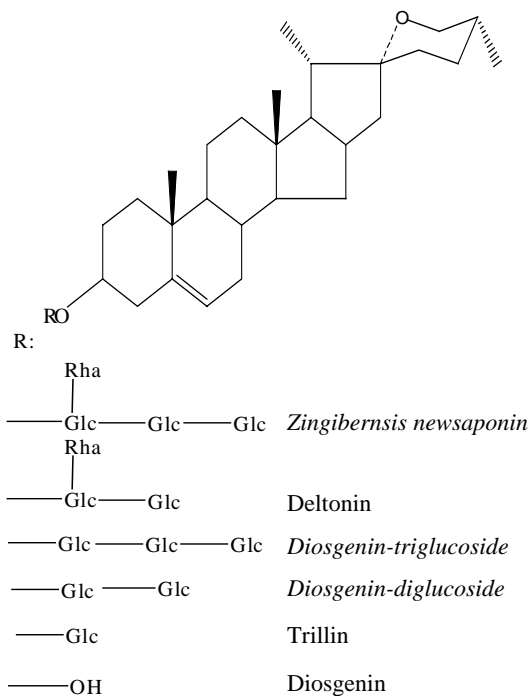


图1 盾叶薯蓣中皂苷成分的结构

Fig.1 Structures of saponins in *D. zingiberensis*

生产薯蓣皂苷元的方法有直接酸水解、预发酵-酸水解、酶解-酸水解、预分离纤维素淀粉等. 尽管自然发酵、淀粉分离、酶解等预处理能提高皂苷得率, 但自然发酵的条件难以控制, 易引入杂菌, 给药品安全带来隐患; 淀粉分离法需进行一系列操作, 导致皂苷损失较多; 而外加酶使生产成本提高, 因而难以实际应用. 目前工业上主要采用直接酸水解法, 但该方法有酸用量大、污染严重、副产品淀粉纤维素无法回收等缺点^[6]. 而从盾叶薯蓣中分离总甾体皂苷, 将其加酸水解生产薯蓣皂苷元, 由于纤维素、淀粉不参与水解, 从而可大大降低酸用量, 减少对环境的污染, 同时也为回收淀粉和纤维素等副产品提供了可能性. 传统的皂苷提取工艺采用冷浸提或连续加热回流提取, 不仅提取时间长, 而且提取不完全, 皂苷损失较大, 产品得率较低.

双水相萃取是近年新兴的一种分离技术. 传统的聚合物-盐双水相体系因使用的聚合物粘度较大, 不易回收, 导致成本过高, 后续处理麻烦. 短链醇/盐体系作为一种新型的双水相体系, 因原料丰富、价格低廉、溶剂粘度小、传质速度快、试剂易回收等优点, 已被用于分离天然产物^[7-9]. 利用双水相体系直接提取药材中有效成分必须结合细胞破碎的过程, 如将丙醇/硫酸铵双水相体系与超声提取耦合, 从葡萄籽中提取抗氧化活性物质^[10]和从灯盏花中提取分离类黄酮^[11].

微波辅助提取具有操作时间短、溶剂消耗量少、有效成分得率高、环境污染小、适合于热不稳定成分等优点, 被广泛地应用于天然产物有效成分的提取^[12]. 本课题组提出微波辅助双水相萃取的新技术, 并应用于虎杖中大黄素、白藜芦醇及其皂苷的直接提取^[13]. 该技术在微波辅助提取有效成分的同时, 将有效成分富集于醇

3.2 皂苷在乙醇/硫酸铵体系中的分配行为

盾叶薯蓣中各种皂苷成分的分配系数和回收率与乙醇浓度的关系见图 2. 由图可知, 保持 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度不变, 增大乙醇浓度, 各种皂苷的分配系数和回收率都明显提高. 这是因为随着乙醇浓度增大, 分相能力增加, 上相中乙醇浓度随之增加, 而皂苷成分在乙醇中的溶解度比水大, 因此分配系数和回收率都增大. 霍清等^[16]在利用乙醇/ K_2HPO_4 双水相体系萃取甘草有效成分时也发现, 当盐浓度一定时, 醇浓度升高, 分配系数增大.

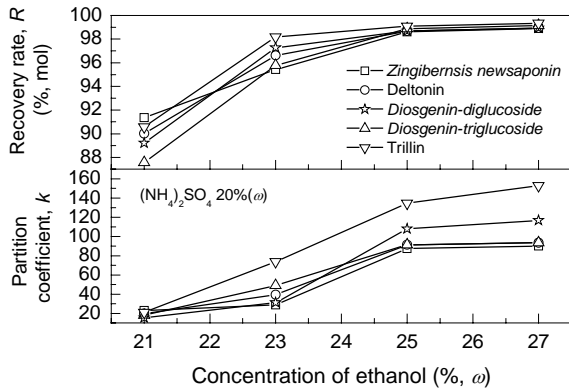


图 2 乙醇浓度对皂苷分配系数和回收率的影响
Fig.2 Effect of concentration of ethanol on partition coefficient and recovery rate of saponins

各种皂苷成分的分配系数和回收率与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的关系如图 3 所示. 从图可知, 固定乙醇浓度, 各种皂苷成分的分配系数和回收率随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加而增大. 乙醇的初始浓度相同时, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度增大, 分相能力也增大, 上相中乙醇浓度也随之增加, 这与乙醇浓度增加时分配系数和回收率增加的规律一致.

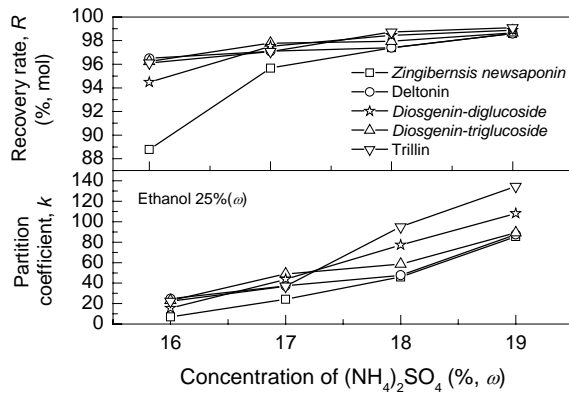


图 3 硫酸铵浓度对皂苷分配系数和回收率的影响
Fig.3 Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on partition coefficient and recovery rate of saponins

在乙醇或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度较高时, 各种皂苷成分均具有较大的分配系数和较高的回收率, 这说明各种皂苷

成分在上相中得到了有效的富集. 盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷、延龄草次苷的最大分配系数分别达到了 89, 91, 93, 117, 153. 延龄草次苷的分配系数最大, 盾叶新苷的分配系数最小, 表明物质的极性越小, 在乙醇/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 体系中分配系数越高.

3.3 微波辅助双水相提取盾叶薯蓣中的皂苷成分

3.3.1 不同提取剂对盾叶薯蓣皂苷成分提取率的影响

不同的提取剂具有不同的极性, 提取效果也不同. 将 25%(ω)乙醇/19%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系(85 g)中的不同组分分别与盾叶薯蓣粉末混合, 微波加热 2 min 后, 立即加入相应的其他组分, 使之组成双水相体系. 比较各种溶剂组分和双水相体系对皂苷成分的提取效果. 5 种提取剂分别为双水相体系、无水乙醇、乙醇水溶液、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液及水, 各种提取剂中所用乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和水的质量相同.

5 种提取剂均具有一定的极性, 但由于极性不同, 对皂苷的溶解性能和微波的吸收不同, 提取效果也不同. 从图 4 可知, 与双水相体系相比, 其他溶剂均不能达到较好的皂苷提取效果. 微波辅助双水相总皂苷提取率为乙醇提取的 1.4 倍、乙醇溶液提取的 1.8 倍、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液提取的 9 倍、水提取的 11 倍. 盾叶薯蓣中的皂苷成分极性较强, 且水溶性较差, 因此用水或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液作为提取剂, 皂苷得率很低. 本课题组曾考察过不同浓度乙醇对盾叶薯蓣中皂苷的提取效果, 表明在盾叶薯蓣皂苷的冷浸提中以 50%乙醇和 95%乙醇作为提取剂得到的皂苷提取率明显低于 70%乙醇^[2]. 可见过高或过低浓度的乙醇均不利于皂苷的提取. 盾叶薯蓣中皂苷成分有 1~4 个糖基, 且糖基连接方式不同, 使皂苷成分的极性差别很大, 因此纯乙醇或 30%(φ)乙醇水溶液均不

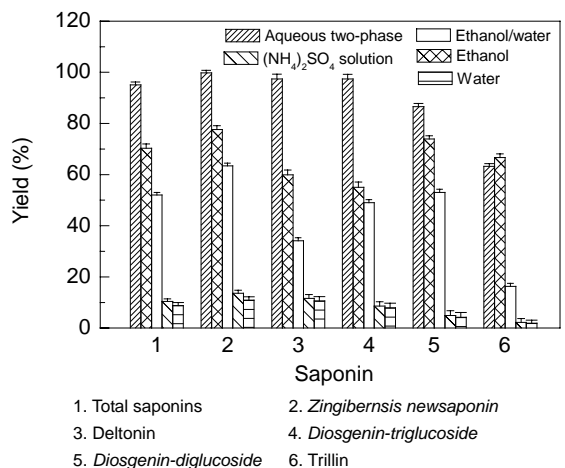


图 4 不同提取剂对皂苷提取率的影响
Fig.4 Effect of extracting reagent on yield of saponins

能高效提取各种皂苷成分. 双水相体系作为提取剂时总皂苷的提取率最高, 一方面是因为微波辅助双水相存在分相行为, 上相的乙醇浓度相对较高[49%(φ)], 更有利于皂苷成分的提取, 且皂苷在释放的同时被快速萃取至乙醇相, 达到提取和分离合二为一的目的; 另一方面双水相体系中加入无机盐 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使溶液的介电常数增加, 有利于吸收微波能, 提高溶剂温度, 传质作用加强, 使有效成分的溶解增强. 在使用无水乙醇为溶剂微波辅助提取时, 延龄草次苷的提取率较微波辅助双水相稍高, 原因是延龄草次苷的极性较弱, 无水乙醇有利于其溶出, 而其他皂苷的极性相对较强, 更易溶于低浓度的乙醇, 在纯乙醇溶剂中提取率较低.

3.3.2 料液比对盾叶薯蓣皂苷成分提取率的影响

为了得到更高的皂苷提取率, 取 1 g 药材, 分别按药材/乙醇质量比为 1:10, 1:15, 1:21, 1:25 加入相应质量的乙醇, 然后加入一定量的水和硫酸铵, 形成双水相体系[乙醇 25%(ω), 硫酸铵 19%(ω)], 考察药材/乙醇比对总皂苷及各种皂苷成分提取效果的影响, 结果如图 5 所示. 可知当药材/乙醇由 1:10 变化到 1:21, 总皂苷及各种皂苷成分的提取率显著增加, 之后继续增加乙醇, 皂苷的提取率没有明显变化. 说明双水相体系中当药材/乙醇比超过 1:21 时, 再增加乙醇用量对皂苷成分的提取没有促进作用. 因此, 确定提取盾叶薯蓣皂苷成分的最佳药材/乙醇质量比为 1:21.

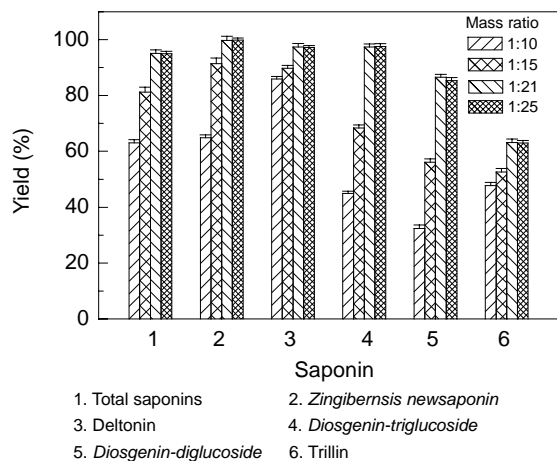


图5 药材/乙醇质量比对皂苷提取率的影响
Fig.5 Effect of mass ratio of material to ethanol on yield of saponins

3.3.3 相组成对盾叶薯蓣皂苷成分提取率的影响

分别选择 4 种高皂苷回收率的相组成体系: (1) 20%(ω) 乙醇-25%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (2) 25%(ω) 乙醇-19%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (3) 30%(ω)乙醇-15%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

(4) 35%(ω)乙醇-12%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 考察双水相相组成对皂苷提取效果的影响.

由图 6 可知, 总皂苷的提取率随体系中乙醇浓度增加而先增加后下降. 当乙醇浓度为 20%(ω)时, 提取率很低, 当乙醇浓度达到 25%(ω)时, 提取率显著增加, 达 95.1%, 其后随乙醇浓度增加, 提取率反而下降. 盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷在不同相组成条件下提取率的变化规律与总皂苷类似, 当乙醇浓度为 25%(ω)时, 各种皂苷成分的提取率分别为 99.8%, 97.4%, 97.3%, 86.6% 和 63.2%. 葡萄糖二糖苷、延龄草次苷的提取率低于前三者, 主要是因为这 2 种皂苷的极性较弱, 不能被提取完全. 延龄草次苷的提取率随双水相体系中乙醇浓度增加而增加, 当乙醇浓度为 35%(ω)时提取率最高, 达 83.3%. 综合考虑各种皂苷的提取率, 确定体系(2), 即 25%(ω)乙醇-19%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为提取盾叶薯蓣皂苷成分的最佳相组成.

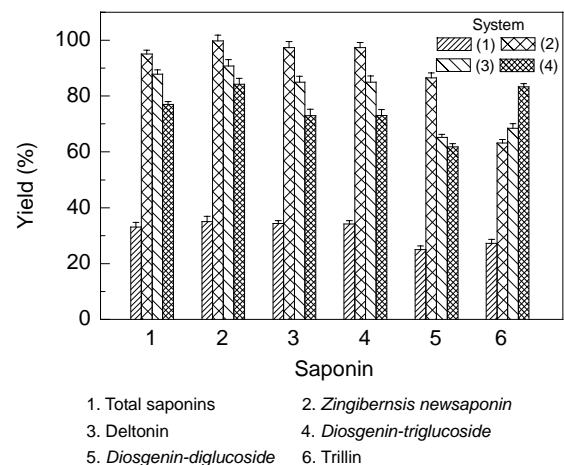


图6 相组成对皂苷成分提取率的影响
Fig.6 Effect of phase composition on yield of saponins

3.4 微波辅助双水相和其他提取方法的比较

本课题组曾考察了不同浓度乙醇对盾叶薯蓣中皂苷的提取效果, 表明当乙醇浓度为 70%(φ)时, 皂苷的提取率最高^[2]. 因此本实验以 70%(φ)乙醇为提取剂, 分别采用索氏提取、加热回流和冷浸提 3 种方法与微波辅助双水相提取进行比较, 结果见表 2. 微波辅助双水相提取对总皂苷的提取率(95.1%)高于加热回流提取(91.0%)和冷浸提(90.0%). 这是因为盾叶薯蓣中各种皂苷成分被淀粉纤维素包裹, 微波作用使药材细胞结构破坏, 破坏了淀粉纤维素的包裹或笼蔽作用, 进而减少传质阻力, 从而更有利于皂苷的提取. 另外, 在双水相体系中, 皂苷成分被释放的同时, 迅速被萃取到醇相, 使

药材周围皂苷浓度降低,提取、分离同时进行有利于皂苷成分的进一步溶解.而加热回流提取和冷浸提主要靠组分的浓度梯度扩散,组分透过细胞膜溶解于溶剂中,

提取过程中药材细胞结构完整,只是略微收缩^[17].由于盾叶薯蓣药材细胞内淀粉纤维素的包裹,这 2 种方法得到的皂苷的提取率相对较低.

表 2 微波辅助双水相与传统提取方法的比较

Table 2 Comparison of microwave-assisted aqueous two-phase method with other extraction methods

Method	Microwave-assisted aqueous two-phase	Soxhlet	Heat reflux	Cold leaching
Treatment time	2 min	4 h	4 h	3 d
Yield of total saponins (%)	95.1	100	91.0	90.0
Volume of extracted saponins (mL)	37	100	100	100
Concentration of saponins ($\mu\text{mol/mL}$)	1.44	0.56	0.51	0.51
Ethanol used (g)	21.25	54.6	54.6	54.6
Glucose content (mg/g)	2.88	15.47	19.5	14.92
Reducing sugar content (mg/g)	7.89	10.92	20.5	10.28
Protein content (mg/g)	9.66	10.04	18.16	10.64

微波辅助双水相仅用不到其他方法 40% 的乙醇用量,却得到了比加热回流和冷浸提更高的皂苷提取率,减少了有机溶剂的用量.在保证较高的皂苷提取率的前提下,处理等量的药材,微波辅助双水相得到的皂苷提取液体积仅为其他方法的 37%,皂苷浓度为索氏提取的 2.6 倍、回流和冷浸提的 2.8 倍.可见,与其他方法相比,微波辅助双水相相对皂苷成分具有浓缩作用.微波辅助双水相提取皂苷整个过程只需 2 min,而传统方法需要几小时甚至几天.

另外,各种提取方法得到的皂苷醇溶液中含有大量糖和蛋白等杂质,为后续皂苷成分的进一步分离纯化带来很大麻烦.双水相体系上相皂苷提取液中葡萄糖、还原糖和杂蛋白的含量均少于其他方法,其中,葡萄糖含量仅为索氏提取和冷浸提的 19%、加热回流提取的 15%;还原糖含量为索氏提取的 72%、冷浸提的 77%、加热回流提取的 38%;杂蛋白含量为加热回流提取的 53%.采用双水相体系得到的皂苷提取液含较少的糖和杂蛋白,提取液中皂苷纯度相对较高,对后续纯化过程十分有利.

4 结论

(1) 乙醇/硫酸铵双水相体系可将各种皂苷成分集中于醇相,且回收率均在 97% 以上.

(2) 随着双水相体系中硫酸铵和乙醇浓度的增加,盾叶薯蓣中各种皂苷成分的分配系数和回收率相应增大.盾叶新苷、三角叶皂苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷、延龄草次苷的最大分配系数分别达 89, 91, 93, 117 和 153.

(3) 微波辅助双水相提取盾叶薯蓣皂苷成分的最佳药材/乙醇质量比为 1:21,最佳相组成为 25%(ω)乙醇-19%(ω)(NH_4)₂SO₄.此时,总皂苷提取率为 95.1%,盾叶新苷为 99.8%,三角叶皂苷为 97.4%,薯蓣皂苷元-

葡萄糖三糖苷为 97.3%,薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷为 86.6%,延龄草次苷为 63.2%.

(4) 微波辅助双水相总皂苷提取率高于加热回流提取和冷浸提,且耗时少、皂苷提取液浓度高、杂质少.

参考文献:

- [1] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial Conversion of Steroids Compounds: Recent Developments [J]. Enzyme Microbiol. Technol., 2003, 32: 688-705.
- [2] Qi S S, Dong Y S, Zhao Y K, et al. Quantitative Analysis of Microbial Transformation of Steroidal Saponins in *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chromatographia, 2009, 69: 865-870.
- [3] 韩枫,李稳宏,王继武.磨浆-超声法提取薯蓣皂素工艺过程 [J]. 化学工程, 2007, 35(7): 71-74.
- [4] Raju J, Bird R P. Diosgenin, a Naturally Occurring Steroid Saponin Suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase Expression and Induces Apoptosis in HCT-116 Human Colon Carcinoma Cells [J]. Cancer Lett., 2007, 255: 194-204.
- [5] Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, et al. Different Contribution of Apoptosis to the Antiproliferative Effects of Diosgenin and other Plant Steroids, Hecogenin and Tigogenin, on Human 1547 Osteosarcoma Cells [J]. Int. J. Oncol., 2003, 22: 899-905.
- [6] 张存莉,吴战库,马惠玲,等.甾体皂苷的生物活性研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2003, 18(2): 95-100.
- [7] Tan T W, Huo Q, Ling Q. Purification of Glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with Ethanol/Phosphate Aqueous Two Phase System [J]. Biotechnol. Lett., 2002, 24: 1417-1420.
- [8] Zhi W B, Deng Q Y. Purification of Salvianolic Acid B from the Crude Extract of *Salvia miltiorrhiza* with Hydrophilic Organic/Salt-containing Aqueous Two-phase System by Counter-current Chromatography [J]. J. Chromatogr. A, 2006, 1116: 149-152.
- [9] 李梦清,耿艳辉,刘桂敏,等.双水相萃取技术在白藜芦醇提纯工艺中的应用 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 647-649.
- [10] 李玲,杨雪滢,高云涛.双水相分离与超声提取耦合法从葡萄籽中提取抗氧化活性物质研究 [J]. 酿酒科技, 2008, (5): 27-33.
- [11] 高云涛,戴建辉,贝玉祥,等.双水相与超声耦合从灯盏花中提取分离类黄酮研究 [J]. 中成药, 2009, 31(5): 700-703.
- [12] 张代佳,刘传斌,修志龙,等.微波技术在植物胞内产物提取中的应用 [J]. 中草药, 2000, 31(9): 附 5-6.
- [13] Wang H, Dong Y S, Xiu Z L. Microwave-assisted Aqueous Two-phase Extraction of Piceid, Resveratrol and Emodin from

- Polygonum cuspidatum* by Ethanol/Ammonium Sulphate System [J]. Biotechnol. Lett., 2008, 30: 2079–2084.
- [14] Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar [J]. Anal. Chem., 1959, 31: 426–428.
- [15] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248–251.
- [16] 霍清, 林强, 赵玉娥. 利用双水相乙醇–磷酸氢二钾体系萃取甘草有效成分的研究 [J]. 精细化工, 2002, 19(2): 65–67.
- [17] 范华均, 林广欣, 肖小华. 微波辅助提取石蒜和虎杖中有效成分的热力学机理研究 [J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(12): 2271–2276.

Microwave-assisted Aqueous Two-phase Extraction of Steroidal Saponins in *Dioscorea zingiberensis*

LIU Lin, DONG Yue-sheng, XIU Zhi-long

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

Abstract: Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* was studied by ethanol/ammonium sulphate system. The results showed that almost all the five main saponins were enriched in the top phase, and the maximum partition coefficients of *Zingiberensis newsaponin*, deltonin, *Diosgenin-triglucoside*, *Diosgenin-diglucoside* and trillin were 89, 91, 93, 117 and 153, respectively. The optimum mass ratio of material to ethanol was 1:21. The optimum system was composed of 25%(ω) ethanol and 19%(ω) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Under the optimum condition, the yield of total saponins was 95.1%, and the yields of *Zingiberensis newsaponin*, deltonin, *Diosgenin-triglucoside*, *Diosgenin-diglucoside* and trillin were 99.8%, 97.4%, 97.3%, 86.6% and 63.2%, respectively.

Key words: microwave-assisted aqueous two-phase extraction; ethanol/ammonium sulphate system; *Dioscorea zingiberensis*; steroidal saponins; yield