



穿龙薯蓣皂苷的提取及其副产物的分离

袁 毅, 张黎明, 王亮亮, 马 妍

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘 要: 采用改进后的“分离法加工薯蓣植物”分别得到穿龙薯蓣水溶性皂苷及水不溶性皂苷, 同时分离出淀粉及其纤维素, 并水解制备微晶纤维素. 经大孔树脂法精制得到穿龙薯蓣水溶性皂苷提取率为 0.33%, ZTC 澄清剂精制得到水不溶性皂苷提取率为 1.02%, 淀粉提取率为 16.46%, 微晶纤维素提取率为 18.95%. 通过与对照品微晶纤维素对比发现, 实验制得的微晶纤维素各项参数基本达到商品级要求, 为根茎类药材中有效成分的分离提取及副产物的综合利用提供基础数据.

关键词: 穿龙薯蓣; 皂苷; 淀粉; 微晶纤维素

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-6510 (2007) 03-0001-05

Extracting Technology of Dioscin and By-products from *Dioscorea nipponica* Makino

YUAN Yi, ZHANG Li-ming, WANG Liang-liang, MA Yan

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Water-soluble saponins and water-insoluble saponins were isolated with the method of general isolation from *Dioscorea nipponica* Makino, meanwhile the starch and MCC were isolated. The extraction rates of water-soluble saponins purified with macroporous resin, water-insoluble saponins purified with ZTC flocculating agent, starch and MCC were 0.33%, 1.02%, 16.46%, 18.9%, respectively. All of these parameters about MCC are corresponded with results of standard MCC. This study provides an elementary data for extracting technology of effective constituent and by-products from tuberous medical materials.

Keywords: *Dioscorea nipponica* Makino; saponins; starch; microcrystalline cellulose

穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino), 又名穿龙骨, 穿山龙, 串地龙, 地龙骨等, 它是薯蓣科薯蓣属根状茎组中的一种多年生草本缠绕藤本, 穿龙薯蓣的根茎中含有 1.4%~4.6%的甙体皂苷, 除此之外, 还有大量的淀粉和纤维素^[1]. 穿龙薯蓣根茎中有效成分分为甙体皂苷(含水溶性甙体皂苷和水不溶性甙体皂苷), 其中水溶性甙体皂苷是生产治疗冠心病药物地奥心血康和维奥欣片的主要原料; 而工业上将薯蓣根茎中皂苷(主要为水不溶性甙体皂苷)直接酸解成薯蓣皂苷元, 用于合成多种皮质激素类和性激素类药物^[2].

目前工业上生产薯蓣皂苷元的工艺主要是采取酸水解法^[3], 酸水解法分为常规酸水解法和预发酵法. 常规酸水解法是将药材粗粉直接加酸水解, 水解

酸液经碱中和、洗涤、干燥后用汽油或石油醚等有机溶剂萃取药渣中的薯蓣皂苷元; 预发酵法是在常规酸水解法前将原料自然发酵, 其余步骤同常规水解法. 这些工艺的缺点是, 薯蓣根茎中的淀粉和部分纤维被酸水解产生大量糖液, 随废水排入江河, 增加了环境中有机物含量, 使 BOD 和 COD 增高, 给环境造成严重的污染. 对此, 周振起^[4]等人提出分离法加工穿龙薯蓣植物的新工艺. 该工艺在考虑皂苷元提取的同时, 将穿龙薯蓣中的淀粉糖转化作为培养基使用, 但不足的是, 其提取皂苷后的大量纤维残渣也没有得到利用. 为了充分利用提取皂苷后的穿龙薯蓣残渣, 本文在该法基础上进行改进, 分别制得穿龙薯蓣水溶性甙体皂苷(通过大孔吸附树脂富集)及水不溶性甙体皂苷(通过回流提取, 以 ZTC 澄清剂澄清精制),

收稿日期: 2006-11-28; 修回日期: 2007-03-16

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金资助项目(20031210)

作者简介: 袁 毅(1981—), 男, 江苏大丰人, 硕士研究生.

同时分离出穿龙薯蓣淀粉及其微晶纤维素,并对其淀粉及微晶纤维素的理化性质进行表征。

1 材料与方法

1.1 材料

穿龙薯蓣饮片,山西离石药物公司;薯蓣皂苷元标准品,中国药品生物制品检定所;101QD型微晶纤维素对照品,台湾明台公司;D₁₀₁型大孔吸附树脂,天津农药厂;ZTC-II型天然澄清剂(天津正天成澄清技术有限公司);A组分用蒸馏水配制成1%的水溶液,预溶胀24 h, B组分用1%醋酸溶液配制成1%的溶液,预溶胀24 h;所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Gene-Spec V 7A0-0052型紫外-可见全波长扫描仪,日本日立公司;Rigaku D/max 2500型广角X射线衍射仪,日本理学公司;Brabender Viscograph-E 型黏度测试系统,德国Brabender OHG公司;Hitachi S-3500N 型扫描电子显微镜,日本日立公司。

1.3 实验方法

取干燥后穿龙薯蓣饮片,加蒸馏水(pH10)浸泡12h,将植物体带水于搅拌机中磨碎(不能过细,避免过滤液中有纤维残渣),过40目筛,用蒸馏水多次洗涤筛上物,过滤后将滤液合并,静置4 h,得上清液和沉淀物。上清液经减压浓缩后,加ZTC-II型澄清剂得到澄清液^[5],再经大孔吸附树脂富集纯化得水溶性甙体皂苷;将过滤后的粗滤渣用75%乙醇(物料比1:10),55℃回流提取2 h,重复2次后收集醇提取液,同时将上述沉淀物以75%乙醇洗涤多次至醇提取液无色,合并上述醇提取液,减压回收乙醇,经澄清剂澄清后制得水不溶性甙体皂苷;将醇处理过后的洗涤物经脱蛋白脱脂后,得到薯蓣淀粉^[6];将醇处理过后的残渣以10%氢氧化钠溶液(物料比1:10)加热煮沸1 h待冷却后,弃去碱液洗涤至中性,加5%的次氯酸钠溶液(物料比1:2),于pH 5.0加热至55℃漂白1 h得到纤维素。最后加6%盐酸溶液(物料比1:15),在微沸状态下酸解1 h后,用蒸馏水洗至中性,抽滤,烘干,研磨,过筛得到微晶纤维素^[7]。

1.4 穿龙薯蓣皂苷含量测定

采用分光光度法测定穿龙薯蓣皂苷含量^[8]。

1.5 穿龙薯蓣淀粉理化性质分析

1.5.1 颗粒尺寸分析

采用Omec LS-POP(III)型激光粒度分析仪测试样品颗粒大小。

1.5.2 X射线衍射分析

采用日本理学Rigaku D/max 2500型广角X射线衍射仪进行样品淀粉的结构性质分析。其中衍射测试电压设置为40 kV,电流设置为150 mA;扫描角度(2 θ)范围为3°~50°,测3次平行。淀粉的结晶度采用Nara^[9]方法计算。

1.5.3 直链淀粉含量的分析

采用Fathat^[10]法测定相对直链淀粉含量,测3次平行。

1.5.4 淀粉糊化性质分析

取30.0 g淀粉样品加入470.0 mL蒸馏水混匀并移至布拉班德分析仪测试杯中,测试温度以1.5℃/min的加热速率从35℃加热至95℃并保温30 min,然后仍以1.5℃/min的速率降温至50℃并保温30 min。测试相关系数:糊化温度,峰值黏度,衰退值,回生值。

1.6 穿龙薯蓣微晶纤维素(MCC)理化性质分析

1.6.1 MCC含量分析

精密称取约0.125 g样品,移入锥形瓶中,加入25 mL水,精密加重铬酸钾溶液(浓度为0.083 0 mol/L)50.0 mL,混匀,小心加硫酸100 mL,迅速加热至沸,放冷至室温,移至250 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,放冷至室温,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取25.0 mL,加邻二氮菲指示剂3滴,用硫酸亚铁铵滴定液(0.1 mol/L)滴定,并将滴定的结果用空白试剂校正。每1 mL的硫酸亚铁铵滴定液(0.1 mol/L)相当于0.675 mg的纤维素。

1.6.2 MCC聚合度分析

测定方法采用饱和氢氧化铜乙二胺-乌氏黏度计法^[11],测3次平行。

1.6.3 MCC扫描电子显微镜(SEM)分析

将样品制成切片,在溅射涂膜机上喷涂10 nm厚的金后,于扫描电镜观察并照相。

1.6.4 MCC的X射线衍射仪分析

采用理学D/max 2500 广角X射线衍射仪,测试条件同“1.5.2”项,采用Nara法^[9]计算结晶度,做3次平行样;同时以小角X射线衍射测量颗粒粒度分布。

2 结果与讨论

2.1 穿龙薯蓣水溶性甙体皂苷富集结果分析

由于穿龙薯蓣中含有水解酶及大量的淀粉、纤维等成分,加碱不仅可以防止皂苷等成分和淀粉多糖类成分被酶解,而且有利于软化纤维、促进甙体皂苷类成分的溶出。将实验制得穿龙薯蓣水溶性甙体皂苷上

清液(主要成分是穿龙薯蓣皂苷 Dc),先后经 ZTC 澄清剂澄清、大孔吸附树脂富集后,其洗脱液总固体中水溶性甾体皂苷含量(以皂苷元计)达到 26%(上柱前水溶性甾体皂苷含量为 9.5%),表明经树脂富集后,水溶性甾体皂苷精制程度得到较大的提高。

2.2 穿龙薯蓣水不溶性甾体皂苷提取工艺优化

2.2.1 正交实验结果分析

由于薯蓣皂苷元在植物体内主要以薯蓣皂苷的形式与纤维素结合存在于细胞壁中^[3],其中主要皂苷成分为薯蓣皂苷、纤细皂苷等水不溶性甾体皂苷类,易溶于乙醇,不溶于水,因此选择不同浓度乙醇为溶剂,提取穿龙薯蓣粗滤渣中水不溶性甾体皂苷。

称取干燥后穿龙薯蓣原料 48.0 g 9 份,选用 L⁹ (3⁴) 正交表对醇提过程中影响水不溶性甾体皂苷提取的相关因素如乙醇体积分数、提取温度、时间和次数进行实验,确定水不溶性甾体皂苷提取的优化条件。

从表 1 中可看出,以水不溶性甾体皂苷得率作为考察指标,穿龙薯蓣水不溶性甾体皂苷的最佳提取条件:75%乙醇,在 55℃下提取 2 次,每次提取 2 h。

考虑到沉淀物中部分皂苷分子被淀粉颗粒包埋,为充分提取薯蓣中水不溶性甾体皂苷,将实验过程中得到沉淀物以 75%乙醇洗涤多次至醇提取液无色,合并醇提取液后用 ZTC 澄清剂澄清处理。

表 1 正交实验结果

Tab. 1 Result of orthogonal test

实验号	乙醇 /%	醇提时间 / (h/次)	醇提温度 / °C	醇提次数	皂苷质量 /mg	水不溶性皂苷提取率 /%
1	95	1	55	1	93.87	0.196
2	95	2	65	2	392.76	0.818
3	95	3	75	3	266.07	0.554
4	85	1	65	3	393.75	0.820
5	85	2	75	1	324.67	0.676
6	85	3	55	2	371.59	0.774
7	75	1	75	2	487.62	1.015
8	75	2	55	3	449.31	0.936
9	75	3	65	1	322.54	0.671
K ₁	1.223	1.585	1.487	1.205		
K ₂	1.771	1.896	1.802	2.034		
K ₃	2.047	1.560	1.752	1.803		
R	0.824	0.336	0.315	0.829		

2.2.2 验证实验

为考察上述优选提取工艺的稳定性,按照上述穿龙薯蓣水不溶性甾体皂苷最佳提取条件验证 3 次,结果如表 2 所示。

从表中可看出,穿龙薯蓣水不溶性皂苷平均提取率为 1.02%,其中 $n = 3$, $RSD = 1.21\%$ 。验证试验结果

与正交试验结果基本一致,说明提取工艺条件基本稳定,重现性好。

表 2 工艺验证实验结果

Tab. 2 Process certification for experimental results

实验号	水不溶性皂苷提取率/%
1	1.01
2	1.04
3	1.00

2.3 穿龙薯蓣淀粉理化性质分析

2.3.1 颗粒尺寸、晶型及直链淀粉含量分析

穿龙薯蓣淀粉颗粒尺寸明显小于木薯和马铃薯淀粉颗粒尺寸,其结果见表 3。小颗粒的穿龙薯蓣淀粉或许更好得到消化,因为小颗粒具有更大的表面积,更能被淀粉酶所消化^[12]。这一特性为开发食用穿龙薯蓣淀粉提供了有力的证据。

表 3 穿龙薯蓣淀粉颗粒尺寸及直链淀粉含量

Tab. 3 X-ray diffraction properties and amylose content of tapioca, potato and *D. nipponica* Makino starches

样品	颗粒平均直径/μm	结晶度/%	直链淀粉含量/%
木薯淀粉	14.7	48.0 ± 0.2	23.7 ± 0.1
马铃薯淀粉	30.5	45.9 ± 0.6	29.3 ± 0.2
穿龙薯蓣淀粉	9.5	48.5 ± 0.3	26.3 ± 0.2

注: $n = 3$, 平均值 ± 标准方差。

2.3.2 糊化性质的测定

布拉班德黏度结果如表 4 所示,穿龙薯蓣淀粉较高的糊化温度 (PT) 和较低的峰值黏度 (PV), 其较高的 PT 值可以归结为穿龙薯蓣淀粉中较多的蛋白质分子以及较高的结晶度; 而较低的 PV 值则说明其淀粉较低的持水能力^[13]。穿龙薯蓣淀粉的衰退值最低, 说明其淀粉膨胀度较低, 不易被分解, 这种特性可以广泛应用于食品药品储藏加工中。此外, 穿龙薯蓣淀粉显示了中等的回生值, 这与其中等含量的直链淀粉含量呈正相关; 同时也表明其淀粉不易发生凝沉。

表 4 木薯淀粉、马铃薯淀粉及穿山龙淀粉糊化性质参数

Tab. 4 Pasting properties of tapioca, potato and *D. nipponica* Makino starches

样品	糊化温度 /°C	黏度峰值 / (BU)	回生值 / (BU)	衰退值 / (BU)
木薯淀粉	64	801	176	551
马铃薯淀粉	60	1806	312	1242
穿山龙淀粉	73	362	222	179

2.4 穿龙薯蓣微晶纤维素理化性质分析

穿龙薯蓣微晶纤维素与 101QD 型微晶纤维素的理化性质见表 5。从表 5 中可看出, 穿龙薯蓣纤维素经酸水解后, 得到的微晶纤维素含量为 91.7%, 明显高

于酸解前的穿龙薯蕨纤维素中 MCC 的含量, 略低于台湾明台 101QD 型对照品的含量。

SEM 分析结果如图 1、图 2 所示: 经酸水解后, 得到的穿龙薯蕨微晶纤维素表面出现了严重的“剥离”现象(图 2), 这与 101QD 型微晶纤维素(图 1)颗粒表面降解程度相似, 样品的降解程度与其平衡聚合度结果(表 5)呈负相关, 即平衡聚合度越小, 其降解程度越大。平衡聚合度表示的是纤维素中重复的

葡萄糖结构单元的数目。在酸解过程中, 纤维素分子中的 1,4-葡萄糖苷键断裂, 当聚合度下降到趋于平衡时所得产品称为微晶纤维素(MCC), 此时的聚合度称为平衡聚合度(LODP)。从表 5 中可看出, 穿龙薯蕨纤维素的聚合度经酸水解后从 776 下降到 164, 而对照品 101QD 型微晶纤维素为 185, 表明产品得到充分水解, 达到了台湾明台 101QD 型微晶纤维素降解程度。

表 5 穿龙薯蕨微晶纤维素与 101QD 型微晶纤维素平衡聚合度、结晶度及颗粒尺寸的比较

Tab. 5 LODP, crystallinity degrees and grain sizes of *D. nipponica* Makino's MCC compared with 101QD MCC

样品	MCC 的平衡聚合度	MCC 结晶度/%	MCC 平均颗粒直径/nm	MCC 的含量/%
101QD 型微晶纤维素	185 ± 0.4	78.6 ± 0.3	25.45	95.3 ± 0.5
穿龙薯蕨纤维素	776 ± 0.6	53.5 ± 0.2	41.36	56.9 ± 0.4
穿龙薯蕨微晶纤维素	164 ± 0.3	77.1 ± 0.3	23.21	91.7 ± 0.5

注: 数据为平均值 ± 标准方差, n=3.

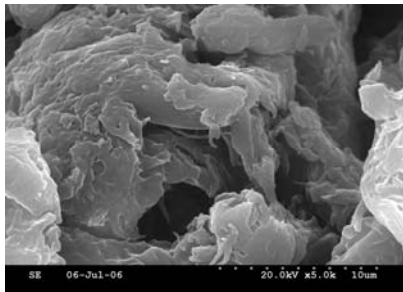


图 1 101QD 型微晶纤维素扫描电镜照片
Fig. 1 SEM of the 101QD MCC

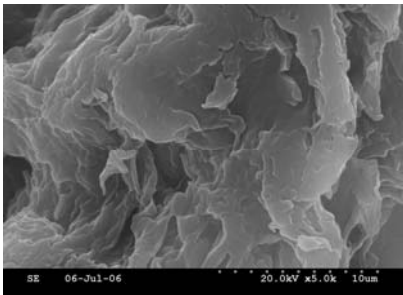


图 2 穿龙薯蕨微晶纤维素扫描电镜照片
Fig. 2 SEM of the *D. nipponica* Makino's MCC

穿龙薯蕨微晶纤维素与对照品 X 射线衍射对比图谱如图 3 所示。从图中可看出, 当出现主峰 ($2\theta = 22.4^\circ$) 后, 随衍射角 (2θ) 的增加, 其衍射强度迅速下降。这是由于样品晶区中仍含有无定形区所导致, 这一结论可从测得相对较低的结晶度值中得到证实。此外, 由该图可推断, 酸水解后的穿龙薯蕨微晶纤维素(B) 仍保持水解前纤维素的结构晶型(A), 即酸水解前后产品和不同型号的对照品仍为纤维素 I 晶型。由 X 射线衍射测得的结晶度结果见表 5, 穿

龙薯蕨微晶纤维素的结晶度从酸解前的 53.5% 上升到酸解后的 77.1%, 接近于 101QD 型微晶纤维素的结晶度(78.6%), 表明其理论上降解到平衡聚合度而制得的微晶纤维素并不是纯粹的微晶纤维素晶粒, 其分散颗粒中仍有小部分非晶区存在。

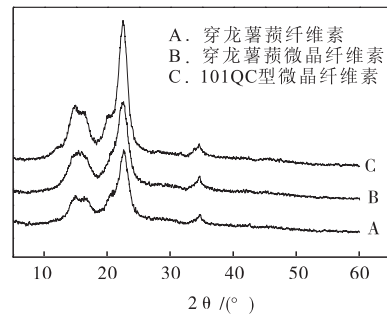


图 3 穿龙薯蕨微晶纤维素与不同型号的微晶纤维素的 X 射线衍射图

Fig. 3 Wide-angle X-ray diffractograms of *D. nipponica* Makino and different-type standard MCC

晶粒尺寸是指垂直于(hkl)晶面方向的微晶体的尺度。由于实验中测得的衍射峰弥散而重叠, 本文利用计算机多重峰分离法将各邻峰分离并对照 X 射线衍射仪的标准卡片, 从而确定了图 2 中(002)晶面衍射峰的峰位 2θ 在 22.4° 附近, (101)晶面衍射峰的峰位 2θ 在 14.5° 附近, (10 $\bar{1}$)晶面衍射峰的峰位 2θ 在 16.3° 附近, (040)晶面衍射峰的峰位 2θ 在 34.6° 附近。通过 Scherer 公式计算结果(表 5)比较发现, 其酸水解后穿龙薯蕨微晶纤维素各晶面晶粒尺寸较酸水解前有所增加, 这是因为水解过程中许多小晶粒和不完整晶粒被降解, 从而使得晶粒尺寸增大。通过和各型号对照品比较发现(表 6), 实验制得的穿龙薯蕨微

晶纤维素各晶面的晶粒尺寸接近于101QD型微晶纤维素各晶面的晶粒尺寸,表明产品晶粒基本达到商品级指标。其颗粒尺寸分布结果还显示,穿龙薯蓣微晶纤维素的平均颗粒直径为23.21 nm,低于101QD型微晶纤维素颗粒直径(25.45 nm),说明产品颗粒大小优于对照品。

综上所述,实验制得穿龙薯蓣微晶纤维素的测试各项指标基本达到对照品台湾明台 101QD 型微晶纤维素要求。

表 6 穿龙薯蓣微晶纤维素与不同型号的微晶纤维素 X 射线衍射晶粒尺寸的比较

Tab. 6 Crystallite sizes of *D. nipponica* Makino's MCC compared with different-type standard MCC measured by X-ray diffraction

样品	D ₁₀₁	D ₁₀₁	D ₀₀₂	D ₀₄₀
101QD 型微晶纤维素	7.5	8.9	7.0	9.9
穿龙薯蓣纤维素	5.0	7.1	6.8	9.3
穿龙薯蓣微晶纤维素	7.3	8.2	7.0	10.3

3 结 论

按照分离法得到的水溶性甾体皂苷提取率为 0.33% (以薯蓣皂苷元计), 水不溶性甾体皂苷提取率为 1.02% (而传统方法^[14]提取穿龙薯蓣皂苷元得率为 1.31%), 淀粉提取率为 16.46%, 微晶纤维素提取率为 18.95%。经本实验证明: 采用综合分离法加工穿龙薯蓣植物, 不仅不影响皂苷提取率, 而且制备出微晶纤维素和纯淀粉, 是充分开发利用穿龙薯蓣资源的一个较好的途径。

参 考 文 献:

- [1] 宋发军. 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14 (3): 89—93.
- [2] 聂凌鸿, 林淑英, 宁正祥. 薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25 (5): 318—320.
- [3] 汤兴利, 徐增莱, 夏冰, 等. 盾叶薯蓣皂素提取工艺及检测方法研究进展[J]. 中药材, 2004, 27 (11): 877—879.
- [4] 周振起, 封玉贤. 薯蓣皂苷元分离工艺的研究及其综合利用[J]. 西北植物学报, 1995, 15 (3): 254—260.
- [5] 张黎明, 徐玮, 杜连祥. 胡芦巴水溶性甾体皂苷的提取分离工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (1): 47—50.
- [6] Ahamed N T, Singhal R S. Physicochemical and functional properties of *Chenopodium quinoa* starch[J]. Carbohydrate Polymers, 1996, 31: 99—103.
- [7] 范国荣, 朱新传, 卢平英, 等. 杉木微晶纤维素制备工艺的研究[J]. 江西林业科技, 2005, 3: 3—4.
- [8] 王俊, 杨克迪, 陈钧. 分光光度法测定薯蓣皂苷元[J]. 分析试验室, 2004, 23 (1): 73—75.
- [9] Nara S, Komiy T. Studied on the relationship between water-saturated state and crystallinity by the diffraction method for moistened potato starch [J]. Starch/Stärke, 1983, 35: 407—410.
- [10] Fathat I A, Tunde O, Roger N J. Characterization of starches from West African Yam[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79: 2106—2111.
- [11] 哈丽丹·买买提, 努尔买买提, 吾满江·艾力. 黏度法测定植物纤维素的聚合度[J]. 合成纤维工业, 2006, 29 (1): 40—42.
- [12] Riley C K. In vitro digestibility of raw starches extracted from five Yam species grown in Jamaica [J]. Starch/Stärke, 2004, 56: 69—73.
- [13] Alves R M, Grossmann M, Ferrero C, et al. Chemical and functional characterization of products obtained from yam tubers [J]. Starch/Stärke, 2002, 54: 476—481.
- [14] 王昌利, 张振光, 杨景亮, 等. 超声提高薯蓣皂苷得率的实验研究[J]. 中成药, 1994, 16 (4): 7—8.