

从绞股蓝中联合提取皂苷、黄酮和多糖工艺优化

王青豪, 潘虹, 杨宇飞, 张熊祿
(赣南师范学院化学化工学院, 江西 赣州 341000)

摘要: 以体积分数由高至低的乙醇溶液为单一溶剂, 从绞股蓝茶叶中联合提取皂苷、黄酮和多糖的工艺, 利用正交试验得到的提取多糖最优工艺条件为80%乙醇溶液提取皂苷、30%乙醇溶液提取黄酮和5%乙醇溶液提取多糖。在此条件下, 皂苷提取率8.75%, 黄酮提取率0.75%, 多糖提取率3.38%。联合提取工艺的原料利用率高于单一提取工艺, 可为绞股蓝的综合利用提供参考。

关键词: 绞股蓝; 皂苷; 黄酮; 多糖; 联合提取工艺

Optimization of Successive Extraction of Saponins, Flavonoids and Polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* Stems and Leaves

WANG Qing-hao, PAN Hong, YANG Yu-fei, ZHANG Xiong-lu
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Gannan Normal University, Ganzhou 341000, China)

Abstract: This paper reports the application of orthogonal array design method to optimize the successive extraction of saponins, flavonoids and polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* stems and leaves. The solvents used for the extraction of the phytochemicals were aqueous ethanol solutions at decreasing concentrations. The optimal ethanol concentration for saponins flavonoids and polysaccharides was 80%, 30% and 5%, respectively, resulting in an extraction efficiency of 8.75%, 0.75% and 3.38%, respectively. The successive extraction procedure showed more efficient utilization of raw materials than single extraction procedures and therefore could provide references for the comprehensive utilization of *Gynostemma pentaphyllum*.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; saponins; flavonoids; polysaccharides; successive extraction

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)22-0063-04

绞股蓝[*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino] 是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物, 可用于治疗高血脂, 心悸气短、胸闷肢麻、眩晕头痛、健忘耳鸣、自汗乏力, 脘腹胀满等病症^[2]。绞股蓝黄酮类化合物具有显著的生理活性, 对一些常见病、多发病有重要的生理作用, 如有抗氧化和清除氧自由基作用; 抗癌、防癌作用; 改善心脑血管循环、扩张冠状动脉血管、松弛支气管、利尿以及明显的抗血小板活化因子等作用^[3]。迄今研究表明, 绞股蓝多糖具有包括抗肿瘤、抗癌、提高免疫、降血糖和抗衰老等作用^[4]。

科研人员对绞股蓝中的皂苷、黄酮和多糖进行了提取、纯化工艺和某些应用研究^[5-12]。陈武、沈宏伟等用高浓度乙醇和HP20大孔吸附树脂提取和纯化绞股蓝总皂苷进行了工艺研究^[2,13-14]; 王青豪等用乙醇溶液/微波辅助和DM130大孔吸附树脂提取和纯化绞股蓝黄酮进行了工艺研究^[3,15]; 池爱平等用水/微波辅助研究了绞股蓝多糖的

提取工艺^[4], 宋淑亮等对提取的绞股蓝粗多糖进行了分离纯化, 研究了不同成分对神经细胞谷氨酸损伤的保护作用^[16]。从绞股蓝中联合提取皂苷、黄酮和多糖工艺未见报道, 由于传统单一成分的提取工艺没有充分利用原料, 本实验尝试采用体积分数由高至低的单一乙醇溶液为溶剂, 依次从绞股蓝中联合提取皂苷、黄酮和多糖, 并用正交试验法优化得到其优化联合提取工艺条件, 期望为绞股蓝的综合利用提供有益的参考, 也可为绞股蓝皂苷、黄酮和多糖的进一步应用研究提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

绞股蓝茶叶(叶与短茎, 产自赣南九连山, 经本校生命与环境科学学院刘仁林教授鉴定)。

人参皂苷Rb1标准品、芦丁标准品、D(+)-葡萄糖标准

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ11580)

作者简介: 王青豪(1963—), 男, 教授, 学士, 研究方向为天然产物化学与应用。E-mail: wang_qing_hao@yahoo.cn

品、香草醛 阿拉丁试剂(中国)有限公司; 甲醇、冰醋酸、高氯酸、苯酚、浓硫酸、95%乙醇 南昌洪都试剂化工厂; 亚硝酸钠 洛阳市化学试剂厂; 硝酸铝 广东台山化工厂; 氢氧化钠 江西核工业实验化工厂。以上试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

三乐牌WP650D家用微波炉 南京蓝通科工贸有限公司改装; RE-5203型旋转蒸发器、SHZ-III型循环水式多用真空泵 上海亚荣生化仪器厂; 7200光栅分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司; 电热恒温真空干燥箱 上海跃进医疗器械厂; 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 电子调温电热套 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准曲线的绘制

1.3.1.1 人参皂苷标准曲线^[14,17]

准确称取人参皂苷Rb1标准品10mg置于5mL容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为2.0mg/mL的储备液。精密量取储备液50、100、150、200、250 μ L分别置于15mL具塞试管中, 参照文献[14]、[17]的方法显色。另精密量取甲醇250 μ L置于15mL具塞试管中, 同法加入显色试剂, 作为空白溶液。取供试品溶液和空白溶液, 在560nm的波长处分别测定吸光度。以人参皂苷Rb1质量浓度C/(g/L)为纵坐标、吸光度A为横坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程为: $C = 0.7467A - 0.0003 (R^2 = 0.9981)$, 皂苷质量浓度在0.0083~0.0417g/L范围内与吸光度之间有较好的线性关系。

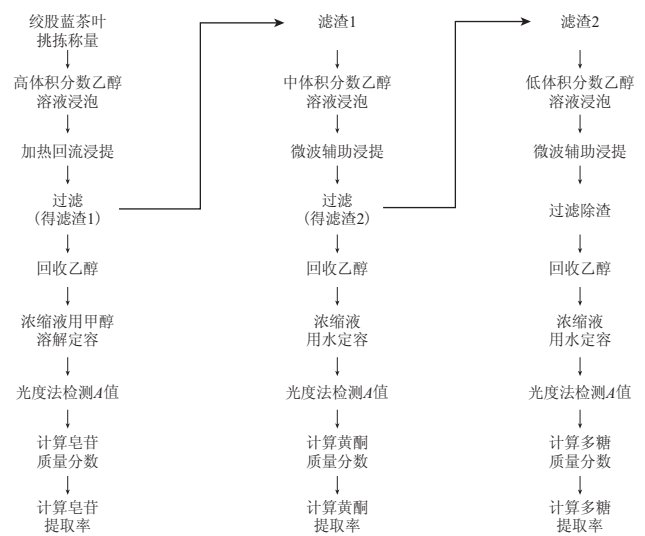
1.3.1.2 芦丁标准曲线^[3]

准确称取0.1327g芦丁标准样品, 用30%乙醇溶解并定容于500mL棕色容量瓶中, 待用。分别移取上述芦丁标准液0.0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mL于6只50mL容量瓶中, 参照文献[3]的方法显色后于500nm波长处测其吸光度, 以芦丁质量浓度C/(g/L)为纵坐标、吸光度A为横坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程为: $C = 0.1206A - 0.0012 (R^2 = 0.9961)$, 芦丁质量浓度在0.0053~0.0425g/L范围内与吸光度有较好的线性关系。

1.3.1.3 葡萄糖标准曲线^[4]

准确称取105 $^{\circ}$ C干燥至质量恒定的D(+)-葡萄糖40mg, 蒸馏水溶解, 并转移至1000mL容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 摇匀。精密量取0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8mL, 分别置具塞试管中, 参照文献[4]的方法显色, 同时用不加葡萄糖液做对照, 在490nm波长处分别测定吸光度。以葡萄糖质量浓度C/(g/L)为纵坐标, 吸光度A为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程为: $C = 0.0723A + 0.0004 (R^2 = 0.9960)$, 葡萄糖质量浓度在0.0020~0.0090g/L范围内与吸光度有较好的线性关系。

1.3.2 联合提取绞股蓝皂苷、黄酮和多糖工艺流程



1.3.3 单一提取工艺流程

1.3.3.1 单一提取绞股蓝皂苷工艺流程

绞股蓝茶叶→挑拣称量→80%乙醇溶液浸泡→加热回流1h浸提3次→过滤除渣→回收乙醇→浓缩液用甲醇溶解定容→光度法检测A值→计算皂苷质量分数→计算皂苷提取率

1.3.3.2 单一提取绞股蓝黄酮工艺流程

绞股蓝茶叶→挑拣称量→30%乙醇溶液浸泡→微波辅助195W浸提10min→过滤除渣→回收乙醇→浓缩液用水定容→光度法检测A值→计算黄酮质量分数→计算黄酮提取率

1.3.3.3 单一提取绞股蓝多糖工艺流程

绞股蓝茶叶→挑拣称量→5%乙醇溶液浸泡→微波辅助195W浸提8min→过滤除渣→回收乙醇→浓缩液用水定容→光度法检测A值→计算多糖质量分数→计算多糖提取率

1.3.4 3种活性成分提取率计算公式

1.3.4.1 皂苷提取率计算公式

$$\text{皂苷提取量/g} = (0.7467A - 0.0003) \times 200 \times 0.05$$

$$\text{皂苷提取率/\%} = (\text{皂苷提取量/原料质量}) \times 100$$

1.3.4.2 黄酮提取率计算公式

$$\text{黄酮提取量/g} = (0.1206A - 0.0012) \times 50 \times 0.25$$

$$\text{黄酮提取率/\%} = (\text{黄酮提取量/原料质量}) \times 100$$

1.3.4.3 多糖提取率计算公式

$$\text{多糖提取量/g} = (0.0723A + 0.0004) \times 32 \times 1$$

$$\text{多糖提取率/\%} = (\text{多糖提取量/原料质量}) \times 100$$

2 结果与分析

2.1 联合提取工艺浸提溶剂的选择依据和优化设计

皂苷、黄酮、多糖三者极性逐渐增大, 根据相似相溶原理, 联合提取浸提溶剂的极性也须逐渐增大, 即若

选用乙醇溶液做联合提取工艺的浸提溶剂时,乙醇溶液的体积分数应逐渐减小。陈武等^[2]通过条件实验确定了绞股蓝皂苷最佳提取溶剂为70%乙醇溶液,考虑到水对黄酮和多糖的溶解,本实验参考优先选择极性更小的95%乙醇溶液提取皂苷;王青豪等^[3]采用单因素试验和正交试验,确定了绞股蓝黄酮的最佳提取溶剂为30%乙醇溶液,考虑到水对多糖的溶解,本实验参考优先选择极性更小的50%乙醇溶液提取黄酮;池爱平等^[4]通过条件实验确定了绞股蓝多糖最佳提取溶剂为水,考虑到乙醇对含有多元醇结构的多糖的相似相溶原理,本实验参考优先选择10%乙醇溶液提取多糖。绞股蓝中3种主要活性成分的极性是:皂苷<黄酮<多糖,而溶剂的极性是:95%乙醇溶液<50%乙醇溶液<10%乙醇溶液。综合考虑,本实验首先选择用95%~65%乙醇溶液提取皂苷,其次选择用50%~30%乙醇溶液提取黄酮,最后用10%乙醇-水提取多糖的联合提取工艺三因素三水平正交试验优化方案,见表1。

表1 多糖联合提取工艺优化L₉(3³)正交试验因素水平表
Table 1 Factors and their coded levels used in the orthogonal array design for optimization of successive extraction of phytochemicals

水平	A 提取皂苷的乙醇 体积分数/%	B 提取黄酮的乙醇 体积分数/%	C 提取多糖的乙醇 体积分数/%
1	95	50	10
2	80	40	5
3	65	30	0

2.2 联合提取工艺优化试验及其验证实验

准确称取5.0g干燥绞股蓝茶叶放入250mL圆底烧瓶内,参照文献^[2]加入50mL[料液比1:10(g/mL)]95%~65%乙醇溶液浸泡至绞股蓝茶叶充分湿润,然后再进行加热回流提取绞股蓝皂苷^[2]。过滤(另得滤渣1),提取液回收乙醇后,用甲醇溶解定容于50mL容量瓶中,取60μL按制作皂苷标准曲线的方法显色,最终为12mL,在560nm波长处测定吸光度,按1.2.4.1节公式计算得皂苷提取率,结果见表2。

滤渣1转入250mL圆底烧瓶内,参照文献^[3]加入160mL[料液比1:32(g/mL)]50%~30%乙醇溶液浸泡至绞股蓝茶叶滤渣1充分湿润后再进行微波辅助提取绞股蓝黄酮,微波炉采用195W功率档,微波辐射10min^[3]。过滤(另得滤渣2),提取液回收乙醇后用水定容于250mL容量瓶中,取1.0mL于50mL容量瓶中按制作芦丁标准曲线的方法显色后用30%乙醇定容,放置15min后于500nm波长处测定吸光度,按1.2.4.2节所述计算公式计算得黄酮提取率,结果见表2。

滤渣2转入250mL圆底烧瓶内,参照文献^[4]加入100mL[料液比1:20(g/mL)]10%~0%乙醇溶液浸泡至绞股蓝茶叶滤渣2充分湿润后再进行微波辅助提取绞股蓝多糖,微波炉采用195W功率档,微波辐射8min^[4]。过滤除渣,提取液回收乙醇后用水定容于1000mL容量瓶中,取

250μL按制作葡萄糖标准曲线的方法显色,最终为8mL,室温放置30min后在490nm波长处测定吸光度,按1.2.4.3节公式计算得多糖提取率,结果见表2。

表2 多糖联合提取工艺优化L₉(3³)正交试验设计及结果
Table 2 Orthogonal array design matrix and corresponding results for optimization of successive extraction of phytochemicals

试验号	A 提取皂苷的乙醇 体积分数/%	B 提取黄酮的乙醇 体积分数/%	C 提取多糖的乙醇 体积分数/%	皂苷提取率/%	黄酮提取率/%	多糖提取率/%
1	1(95)	1(50)	1(10)	7.01	0.76	3.31
2	1	2(40)	2(5)	6.66	0.94	3.89
3	1	3(30)	3(0)	7.11	1.12	3.67
4	2(80)	1	2	8.30	0.60	3.31
5	2	2	3	8.60	0.57	2.66
6	2	3	1	8.45	0.76	3.09
7	3(65)	1	3	5.77	0.30	3.02
8	3	2	1	5.91	0.27	3.16
9	3	3	2	6.06	0.36	3.09
K ₁	20.78	1.66	9.56			
K ₂	25.35	1.78	10.29			
K ₃	17.74	2.24	9.35			
k ₁	6.93	0.55	3.19			
k ₂	8.45	0.59	3.43			
k ₃	5.91	0.75	3.12			
R	2.54	0.20	0.31			

表2表明,乙醇体积分数影响绞股蓝皂苷、黄酮、多糖联合提取率的因素顺序是A>C>B,即皂苷>多糖>黄酮。绞股蓝皂苷、黄酮、多糖联合提取优化工艺条件为:A₂B₃C₂,即按先后次序以80%乙醇溶液提取皂苷,以30%乙醇溶液提取黄酮,以5%乙醇溶液提取多糖。

按优化的联合提取工艺条件进行3次验证实验得皂苷提取率8.75%,黄酮提取率0.75%,多糖提取率3.38%。

而由表2可知,乙醇体积分数对多糖的提取率影响很小,从节约溶剂乙醇降低工艺成本考虑,最后一步可考虑采用纯水提取多糖,按80%乙醇溶液提取皂苷,30%乙醇溶液提取黄酮,水提取多糖进行实验得皂苷提取率8.60%,黄酮提取率0.79%,多糖提取率3.16%。

另由表2可知:第一步提取皂苷所用的乙醇体积分数愈小,而后的黄酮提取率及多糖提取率就愈小,这是因为联合提取工艺中溶剂水分愈多第一步损失的黄酮及多糖就愈多。若侧重提取黄酮和多糖,可考虑采用以95%乙醇提取皂苷,30%乙醇提取黄酮,纯水提取多糖的联合提取工艺,即表2的第3项A₁B₃C₃,得皂苷提取率7.11%,黄酮提取率1.12%,多糖提取率3.67%。

2.3 单一提取工艺试验

2.3.1 单一提取皂苷

步骤同联合提取工艺第一步,提取3次,80%乙醇溶液提取5.0g原料的皂苷,提取率为8.90%。

2.3.2 单一提取黄酮

准确称取5.0g干燥绞股蓝茶叶放入250mL圆底烧瓶内,加入160mL[料液比1:32(g/mL)]30%乙醇溶液浸泡

至绞股蓝茶叶充分湿润后,用195W功率档,微波辐射10min提取绞股蓝黄酮3次。过滤除渣,滤液回收乙醇后用水定容于250mL容量瓶中,取1.0mL按制作芦丁标准曲线的方法显色,最后用30%乙醇定容于50mL容量瓶中,测得吸光度为0.068,按1.2.4.2节提取率计算公式计算得黄酮提取量为0.0875g,黄酮提取率为1.75%。

2.3.3 单一提取多糖

准确称取5.0g干燥绞股蓝茶叶放入250mL圆底烧瓶内,加入100mL[料液比1:20(g/mL)]5%乙醇溶液浸泡至绞股蓝茶叶充分湿润后,用195W功率档,微波辐射8min提取绞股蓝多糖3次。过滤除渣,滤液回收乙醇后用水定容于1000mL容量瓶中,取250 μ L按制作葡萄糖标准曲线的方法显色,最终为8mL,测定吸光度为0.087,按1.2.4.3节提取率计算公式计算得多糖提取量为0.214g,多糖提取率为4.28%。

2.4 两种提取工艺比较

优化的联合提取工艺中提取率为皂苷8.75%、黄酮0.75%、多糖3.38%,而相同条件下的单一提取工艺经3次提取的提取率为皂苷8.90%,黄酮1.75%、多糖4.28%。说明联合提取工艺中前面步骤对后续成分提取有一定影响,即黄酮和多糖的提取率有所降低,特别是黄酮降低较多,原因是前一步的溶剂对后面的成分有所溶解而损失。现各用15g原料进行联合提取工艺与单一提取工艺的对比实验,联合提取工艺的原料用量为15g,实验结果其皂苷提取量为1.3125g,黄酮提取量为0.1125g,多糖提取量为0.507g;而同样条件下采用单一提取工艺提取3种活性成分时,原料用量只能各用5g,实验结果其皂苷提取量为0.445g,黄酮提取量为0.0875g,多糖提取量为0.214g。两种提取工艺相对提取量对比柱形图见图1。

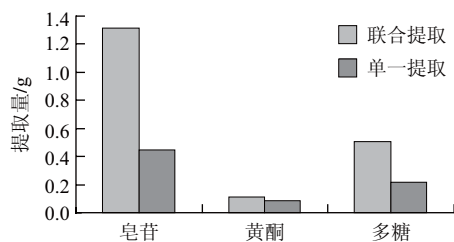


图1 两种提取工艺相对提取量对比

Fig.1 Comparison of extraction yields of saponins, flavonoids and polysaccharides by successive and single extraction procedures

由图1可知,联合提取工艺比单一提取工艺的原料利用率得到了较大的提高。

3 结论

采用从高至低不同体积分数的单一乙醇溶液做溶剂,按皂苷、黄酮和多糖先后顺序从绞股蓝茶叶中联合提取皂苷、黄酮和多糖,利用正交试验优化得到了联合提取工艺的优化工艺条件:80%乙醇溶液传统法提取皂苷、30%乙醇溶液微波辅助法提取黄酮和5%乙醇溶液微

波辅助法提取多糖。

在优化的联合提取工艺条件下,皂苷提取率8.75%,黄酮提取率0.75%,多糖提取率3.38%。各用15g原料进行联合提取工艺与单一提取工艺的对比实验,联合提取工艺其皂苷提取量为1.3125g,黄酮提取量为0.1125g,多糖提取量为0.507g;而同样条件下的单一提取工艺其皂苷提取量为0.445g,黄酮提取量为0.0875g,多糖提取量为0.214g。比较可知:联合提取工艺的原料利用率得到了较大的提高。

此项联合提取工艺以单一乙醇溶液做提取溶剂,既绿色环保又无毒回收方便,符合当今绿色环保新理念。联合提取工艺仅用一份原料就可从绞股蓝中提取3种活性成分,原料得到了充分利用,有一定的经济参考价值,可为工业化生产提供理论参考。联合提取工艺还为进一步从绞股蓝皂苷下脚料(提取完用于生产绞股蓝皂苷胶囊或含片的废渣)中提取黄酮,特别是提取多糖提供了理论依据,同时提供了一条绞股蓝综合利用的新途径。

参考文献:

- [1] 陈武,邹盛勤,吴晓春,等.绞股蓝无糖口含片的制备工艺研究[J].食品科学,2008,29(3):245-248.
- [2] 陈武,伍晓春,邹盛勤,等.绞股蓝总皂苷提取工艺的研究[J].食品与机械,2008,24(1):75-77.
- [3] 王青豪,方芳,张熊祿.微波辅助提取绞股蓝黄酮工艺研究[J].食品科学,2010,31(22):149-152.
- [4] 池爱平,陈锦屏.微波辅助提取绞股蓝多糖的工艺研究[J].食品科学,2007,28(7):181-184.
- [5] 周建华,张兴亚.绞股蓝开发研究新进展及应用[J].食品科技,2010,35(2):74-76.
- [6] 徐冉冉,吉爱国,宋淑亮,等.绞股蓝活性成分的研究进展[C]//中国资源生物技术与糖工程学术研讨会论文集.威海:中国微生物学会,2005:346-349.
- [7] 易克传,徐凯,杨萍,等.动态连续逆流提取绞股蓝皂苷的研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(2):244-247.
- [8] 唐晓丹,赵金良,运达,等.大孔吸附树脂对绞股蓝多糖的吸附[J].食品与发酵工业,2012,38(1):72-76.
- [9] BAI Mingsheng, GAO Jinmin, FAN Chen, et al. Bioactive dammarane-type triterpenoids derived from the acid hydrolysate of *Gynostemma pentaphyllum saponins*[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 306-310.
- [10] LU You, YANG Xingbin, ZHAO Yan, et al. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection[J]. Food Chemistry, 2009, 112(3): 742-746.
- [11] CHI A P, CHEN J P, WANG Z Z, et al. Morphological and structural characterization of polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino and its anti-exercise fatigue activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3/4): 868-874.
- [12] WANG Z J, LUO D H. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(1): 54-58.
- [13] 沈宏伟,肖彦春,车仁国,等.绞股蓝皂苷最佳提取条件的研究[J].安徽农业科学,2008,36(4):1332-1336.
- [14] 沈宏伟,肖彦春,车仁国,等.绞股蓝中总皂苷的提取及含量研究[J].食品科技,2008,33(4):158-160.
- [15] 王青豪,张熊祿.大孔吸附树脂对绞股蓝黄酮类化合物的精制工艺研究[J].林产化工通讯,2005,39(6):12-16.
- [16] 宋淑亮,吉爱国,梁浩,等.绞股蓝多糖的分离纯化及其对神经细胞谷氨酸损伤的保护作用[J].天然产物研究与开发,2008,20(2):229-232;238.
- [17] 王睿.绞股蓝皂苷提取工艺研究进展[J].广西轻工业,2010,26(7):16-17.
- [18] 董玉睿.绞股蓝总皂苷提取工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2007(6):48-49.
- [19] 尚晓妮,钦传光,曹刚,等.绞股蓝多糖提取分离、化学结构及生物活性的研究进展[J].天然产物研究与开发,2010,22(3):514-518;540.
- [20] 岳琳娜,高学玲,岳鹏翔.绞股蓝皂苷提取及分离纯化工艺的研究[D].合肥:安徽农业大学,2009.