

超声波提取刺嫩芽中齐墩果酸类皂苷的工艺研究*

颜廷才¹, 孟宪军¹, 李江阔², 刘 静¹

1(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳, 110161) 2(国家农产品保鲜工程技术研究中心, 天津, 300000)

摘 要 以本溪产刺嫩芽为原料, 通过单因素试验和正交试验研究了超声波提取刺嫩芽中总皂苷的提取工艺条件和参数。结果表明: 刺嫩芽中含有丰富的齐墩果酸类皂苷, 皂苷的最大吸收波长为 291 nm。皂苷浓度为 2~6 $\mu\text{g/mL}$ 时吸收曲线呈现良好的线性关系。正交试验结果表明: 影响超声波提取皂苷的因素从大到小排列依次是料液比、温度、超声波处理时间、乙醇体积分数。当乙醇体积分数为 100%, 温度为 65℃, 超声波时间为 20 min, 料液比 1:20 时刺嫩芽齐墩果酸类皂苷提取率最大为 8.7%。

关键词 刺嫩芽, 皂苷, 超声波, 提取

刺嫩芽(*Aralia elata* Seem)属五加科木属植物^[1], 为多年生落叶小乔木或灌木^[2], 又名龙牙木、刺老鸦、刺龙牙, 主要分布在我国河北省东北部, 辽宁省东部及南部山区, 吉林、黑龙江等地区, 其叶和根中含有丰富的皂苷, 有消炎、利尿、强心、增强免疫等作用; 根皮的醇浸液长期服用, 可增进体力、智力活动的效能; 叶或根的酊剂可降压, 根皮的水浸液有轻泻作用, 对中枢神经系统有兴奋作用; 与人参相似, 具有“适应原”样作用^[3~6]。刺嫩芽根皮中皂苷含量高于人参 3 倍之多, 可作为人参替代品, 大大降低皂苷的成本。超声波具有破碎细胞壁、振动、搅拌作用, 可以促使细胞内的物质溶出, 提高物质的提取效果, 近些年来超声波技术广泛应用于萃取活性物质, 逐渐成为了一种新的萃取分离技术^[7~10]。目前国内外对刺嫩芽的研究比较少, 尤其是对辽宁产刺嫩芽的活性成分及其活性效果的研究更需深入进行。现在的主要研究集中在刺嫩芽新皂苷种类的发现上, 而对刺嫩芽总皂苷的提取工艺、纯化方法、活性提高方法等方面鲜有报道, 本试验是以辽东产刺嫩芽为原料, 采用超声波萃取技术, 通过单因素和正交试验筛选出超声波提取刺嫩芽齐墩果酸类皂苷的最佳工艺条件和参数, 提高皂苷的提取率, 为开发利用本植物提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

刺嫩芽: 2006 年 5 月采自辽宁本溪县, 刺嫩芽采

后及时在 60℃ 条件下烘干, 粉碎后密封保存备用。

1.2 主要试验仪器与试剂

齐墩果酸标准品: 中国医药品生物制品检定所; 乙醇、甲醇、浓硫酸、异丙酮等, 均为国产分析纯。

RE-52 型旋转蒸发器, 上海博通仪器厂; 超声波反应器(KQ-250A 型), 昆山市超声仪器有限公司; PHS-3 精密数显酸度计; SHZ-D(Ⅲ) 循环水式真空泵, 巩义市英峪予华仪器厂; FA1004 型分析天平, 上海精科天平仪器厂; WFZ UV-2000 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.3 试验设计与处理

1.3.1 最大吸收波长的确定

取齐墩果酸标准品制成浓度为 0.2 mg/mL 的溶液, 精密吸取该溶液 1 mL。置于带塞比色管中, 加 2 mL 浓 H_2SO_4 , 充分摇匀, 置 80℃ 水浴中加热 30 min。立即放入冰浴中, 用甲醇稀释至 10 mL, 作为标准对照溶液; 另取刺嫩芽总皂苷样品加甲醇制成每 1 mL 约含 0.2 mg 的溶液, 精密吸取该溶液 1 mL, 置于带塞比色管中, 加 2 mL 浓 H_2SO_4 , 充分摇匀, 置 80℃ 水浴中加热 30 min。立即放入冰浴中, 用甲醇稀释至 10 mL, 作为样品溶液, 以质量分数 20% H_2SO_4 - CH_3OH 溶液为空白对照, 在波长 200~400 nm 之间, 分别连续测定标准对照溶液和样品溶液的吸收值, 确定出最大吸收波长。

1.3.2 标准曲线的绘制

精密吸取上述齐墩果酸皂苷标准品甲醇溶液 10 mL, 置带塞比色管中, 水浴蒸干溶剂。残渣加浓 H_2SO_4 20 mL, 充分摇匀, 置 80℃ 水浴中加热 30 min, 立即放入冰浴中。分别精密吸取该浓 H_2SO_4 溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL, 置 8 个

第一作者: 博士研究生, 讲师。

* 沈阳农业大学青年基金项目(No. 2005039)。

收稿日期: 2008-01-09; 改回日期: 2008-03-17

带塞比色管中,分别加甲醇至 10 mL,静置 1h 后,分别以不同浓度的 $\text{H}_2\text{SO}_4-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液为空白对照,在最大吸收波长出处,用分光光度计测定其吸收值,绘制出吸收曲线。

1.3.3 试验设计

1.3.3.1 单因素试验

(1)乙醇体积分数对超声波提取皂苷的影响。称取 10 g 刺嫩芽粉末 4 份,分别加入体积分数为 40%、60%、80%、100% 的乙醇溶液各 200 mL,在超声波清洗器中振荡 25 min,再在 70℃ 的恒温水浴中提取 1 h,将溶液抽滤留下滤液,再将滤渣溶于相应浓度的乙醇溶液中提取,重复 3 次上述操作,收集滤液,旋转蒸发浓缩滤液至约 50 mL,用移液管取 1 mL,用溶液定容至 100 mL,用移液管取 1 mL 进行测定。

(2)料液比对超声波提取皂苷的影响。分别加入 100、150、200、250、300 mL 体积分数 95% 的乙醇溶液,其他处理操作同(1)。

(3)超声波振荡时间对皂苷提的影响。加 200 mL 95% 的乙醇溶液,在超声波清洗器中分别振荡 15、20、25、30 min,其他处理操作同(1)。

(4)抽提次数对超声波提取皂苷的影响:加 200 mL 95% 的乙醇溶液,分别对溶液进行 1 次、2 次、3 次、4 次抽提,其他处理操作同(1)。

(5)温度对超声波提取皂苷的影响:加 200 mL 体积分数 95% 的乙醇溶液,分别 50、60、70、80、90℃ 恒温水浴中超声波提取 1h,其他处理操作同(1)。

1.3.3.2 正交试验

通过上述单因素试验确定四因素三水平正交试验的因素和水平,进一步确定主要影响超声波提取齐墩果酸类皂苷的因素和参数。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

由图 1 可以看出,经过 H_2SO_4 处理后的齐墩果酸最大吸收峰在 291 nm 处,而不在齐墩果酸的 215 nm 处,说明齐墩果酸已经与硫酸酯化,形成新的化合物,出现了新的最大吸收峰。由图 2 可知,刺嫩芽总皂苷溶液的最大吸收峰也出现 291 nm 处,说明了刺嫩芽总皂苷含有丰富的齐墩果酸皂苷元,可以用齐墩果酸含量粗略地计算刺嫩芽皂苷的总量。因此确定皂苷含量的测试波长选择 291 nm。

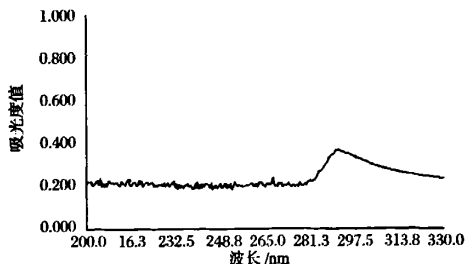


图 1 齐墩果酸标准品硫酸酯化后波长扫描图

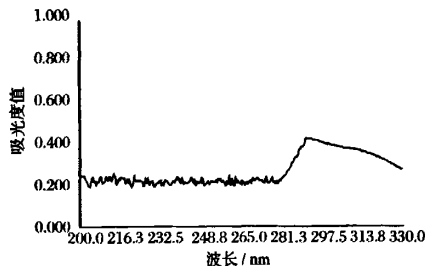


图 2 总皂苷样品溶液波长扫描图

2.2 齐墩果酸溶液的标准曲线

根据图 3 结果计算,回归方程为 $y=41.914x$,相关系数: $R^2=0.9707$ 。表明齐墩果酸标准品浓度在 2~16 $\mu\text{g/mL}$ 时,吸收曲线呈现良好的线性关系,可以选择在此范围内测定粗皂苷的浓度。

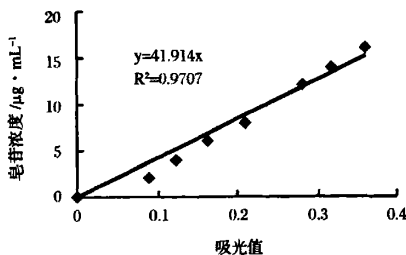


图 3 齐墩果酸标准曲线

2.3 单因素试验

2.3.1 乙醇体积分数对超声波提取皂苷的影响

由图 4 可知,当乙醇溶液体积分数从 40% 增大到 95% 时,吸光值呈上升趋势,即当乙醇溶液的体积分数为 95% 时,皂苷的提取量最大。皂苷溶于热的乙醇溶液中,理论上讲,乙醇体积分数越高,皂苷的提取量越大,吸光度值越大。但从图 4 中看到,乙醇体积分数 > 95% 时,吸光值却下降,这可能是由于乙醇溶液体积分数高,使得皂苷浸出的速度变慢,或者浸出的杂质太多而使吸光度下降。

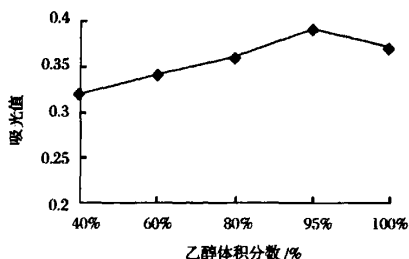


图4 乙醇体积分数对超声波提取皂苷的影响

2.3.2 料液比对超声波提取皂苷的影响

由图5可知,随着提取剂用量的增大溶液吸光值逐渐增大,但当料液比(g:mL)达到1:20后,吸光值上升速度变得极其缓慢,说明料液比为达到1:20,皂苷提取已经比较完全。为了保证充分提取,同时还要节约能源与劳动量,增强经济效益,试验中应选择料液比为1:20。

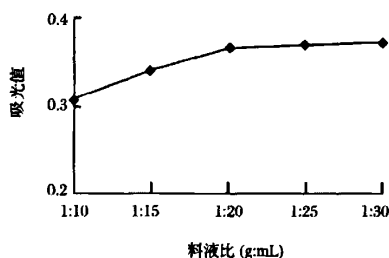


图5 料液比对超声波提取皂苷的影响

2.3.3 超声波振荡时间对皂苷提取的影响

由图6可知,初期吸光值随着超声波振荡时间的延长而增大,当处理时间为15 min时,达到最大。之后吸光值迅速减小后变成平缓曲线。可能的原因是,皂苷属于大分子物质,在超声波振荡时间过长时,有些皂苷分子也会被打碎;也可能长时间超声波处理使皂苷与杂质结合更加紧密,从而被去除。因此,超声波处理时间要适度。过短,提取不完全;过长,会造成皂苷的损失。从试验中得出,15 min是超声波提取皂苷的最适宜的时间。

2.3.4 抽提次数对超声波提取皂苷的影响

由图7可知,在抽提次数为2次时,吸光值达到最大,随着提取次数的增加,吸光值有减小的趋势,理论上讲,提取次数越多,吸光度应该越大,但是图上反映吸光度随着次数的增加反而减小,分析原因可能是,次数越多,收集的液体也越多,旋转蒸发时需要更长的时间,这样反而使原有的皂苷降解或被杂质吸附,所以可以确定抽提2次最适宜。

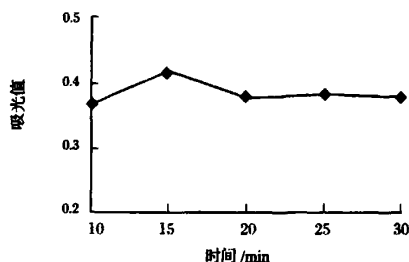


图6 超声波振荡时间对皂苷提取的影响

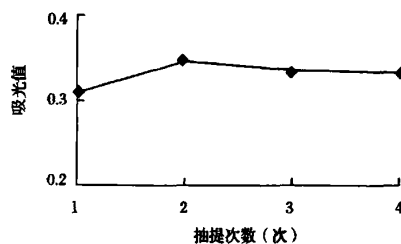


图7 抽提次数对超声波提取皂苷的影响

2.3.5 温度对超声波提取皂苷的影响

由图8可知,初期吸光值随着温度的升高而增大,在温度为70℃时,吸光值达到最大值,然后随着温度升高吸光值反而下降。这说明不是温度越高越好,高温浸提速度加快,同时加速了物质的降解和反应速度,促使了吸光值下降,所以超声波浸提温度应选择70℃。

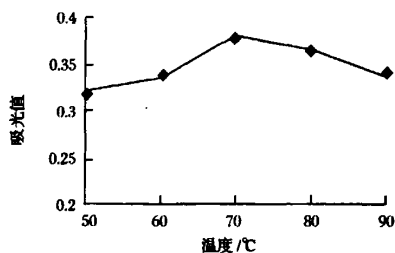


图8 温度对超声波提取皂苷的影响

2.4 正交试验

由表1极差结果来看,影响超声波提取皂苷得率的因素大小顺序是D>B>C>A,即料液比、温度、超声波处理时间、乙醇浓度。由试验结果看出7号试验效果最好,最大提取率达8.7%,最佳条件为乙醇浓度100%,温度65℃,超声波时间20 min,料液比为1:20,即A₃B₁C₃D₂。

表1 正交试验因素、水平及结果表

| 试验号 | (A)乙醇体 积分数/% | (B) 温度/℃ | (C)时间 /min | (D)料液比 (g : mL) | 吸光度 |
|-------|-----------------|-------------|---------------|--------------------|-------|
| 1 | 90 | 65 | 10 | 1:15 | 0.278 |
| 2 | 90 | 70 | 15 | 1:20 | 0.320 |
| 3 | 90 | 75 | 20 | 1:25 | 0.397 |
| 4 | 95 | 65 | 15 | 1:25 | 0.202 |
| 5 | 95 | 70 | 20 | 1:15 | 0.260 |
| 6 | 95 | 75 | 10 | 1:20 | 0.370 |
| 7 | 100 | 65 | 20 | 1:20 | 0.416 |
| 8 | 100 | 70 | 10 | 1:25 | 0.160 |
| 9 | 100 | 75 | 15 | 1:15 | 0.265 |
| K_1 | 0.995 | 0.896 | 0.808 | 0.803 | |
| K_2 | 0.832 | 0.740 | 0.787 | 1.106 | |
| K_3 | 0.841 | 1.032 | 1.073 | 0.759 | |
| k_1 | 0.332 | 0.299 | 0.269 | 0.268 | |
| k_2 | 0.277 | 0.247 | 0.262 | 0.369 | |
| k_3 | 0.280 | 0.344 | 0.358 | 0.253 | |
| R | 0.055 | 0.097 | 0.096 | 0.116 | |

3 结 论

刺嫩芽粗皂苷含有丰富的齐墩果酸皂苷元,可以用齐墩果酸含量粗略地计算刺嫩芽皂苷的总量,皂苷的最大吸收波长为 291 nm。皂苷浓度在 2~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时吸收曲线呈现良好的线性关系,可以选择在此范围内测定总皂苷的浓度。

单因素试验结果表明:当乙醇体积分数为 95%,料液比(g : mL)1 : 20,超声波时间为 15 min,提取温度为 70℃时,提取 2 次,刺嫩芽皂苷的提取效果比

较好。正交试验结果表明:影响超声波提取皂苷的因素从大到小排列依次是料液比、温度、超声波处理时间、乙醇浓度。当乙醇体积分数为 100%,温度为 65℃,超声波时间为 20 min,料液比(g : mL)为 1 : 20 刺嫩芽皂苷提取率最大为 8.7%。

参 考 文 献

- 姜晓莉. 刺嫩芽山野菜的开发利用[J]. 农牧产品开发, 1999,(7):13
- 吴立东,赵凤珍. 刺嫩芽资源的经营利用[J]. 林业勘查设计, 2004,(2):53 卢艳花主编. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2002. 60~63
- 赵红霞. 皂苷生物活性的研究及其在饲料中的应用[J]. 饲料博览, 2003,(3):5
- 赵世明. 茶皂素的化学结构及药理活性研究[J]. 国外医学植物药分册, 1998,13(1):3~6
- 吴寿金,张晓闻. 近年来皂苷药理活性的研究概况[J]. 国外医学植物药分册, 1994,9(6):264~252
- Shashi B. Triterpenoids[J]. Phytochemistry, 1992,31(7): 2 199~2 249
- 葛发欢. 超临界 CO_2 从黄山药中萃取薯蓣皂素的工艺研究[J]. 中草药, 2000,31(3):181~183
- 杨 月. 四叶参根茎总皂苷制备工艺研究[J]. 中草药, 1993,24(9):469~470
- 吴寿金,张晓闻. 近年来皂苷药理活性的研究概况[J]. 国外医学植物药分册, 1994,9(6):264~252

Study of Extracting Oleanolic Saponin from *Aralia elata* Seem by Ultrasonic Method

Yan Tingcai¹, Meng Xianjun¹, Li Jiangkuo², Liu Jing¹

1(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

2(National Engineering Technology Research Center for Preserving Agricultural Products, Tianjin 300000, China)

ABSTRACT *Aralia elata* (Miq) Seem produced in Benxi, Liaoning province was used as raw material. The extracting conditions and parameters of raw saponin from *Aralia elata* Seem by ultrasonic method was based on the single factor orthogonal test. The results indicated: *Aralia elata* Seem contains abundant oleanolic acid and homologous saponin, the largest absorb wavelength was 291 nm. If the saponin concentration was from 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the absorb curve presents good linear relation. The saponin concentration could be detected in this concentration range. The orthogonal test demonstrated: the sequence of the affected extracting saponin from the strongest to the weakest was the solvent ratio, the extracting temperature, the ultrasonic-assisting time and the concentration of alcohol. The best extracting parameters were as follows: the concentration of alcohol was 100%; the extracting temperature was 65℃; the ultrasonic-assisting time was 20 min; the solvent ratio was 1 : 20, at this condition the maximum extraction rate were 8.7%.

Key words *Aralia elata* seem, saponin, ultrasonic, extracting