

- film coating process for tablets using near infrared reflectance spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 20: 27-37.
- [7] Kirsch J D, Drennen J K. Near-Infrared spectroscopic monitoring of the film coating process [J]. *Pharm Res*, 1996, 13 (2): 234-237.
- [8] Kirsch J D, Drennen J K. Determination of film-coated tablet parameters by near-infrared spectroscopy [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 13: 1273-1281.

阶梯生物催化协同提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的研究

张裕卿, 王东青, 李滨县, 梁江华

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:目的 利用阶梯生物催化协同提高提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的收率和质量。方法 通过正交试验对阶梯生物催化协同提取薯蓣皂苷元工艺进行研究, 确定该工艺最佳条件; 用红外光谱和 HPLC 谱对皂苷元产品进行定性和定量测定; 以产品的收率和熔点为考察标准, 比较阶梯生物催化法与直接酸水解法、自然发酵法以及酶解法的优劣。结果 利用阶梯生物催化法, 当纤维素酶和果胶酶复合酶制剂、淀粉酶以及糖化酶按顺序依次加入时, 能够将植物中 98% 的薯蓣皂苷元提取出来, 其产品的红外谱图与对照品谱图相吻合, 经 HPLC 谱测定薯蓣皂苷元质量分数 95% 以上。结论 利用阶梯生物催化协同提取薯蓣皂苷元与其他 3 种工艺相比, 能耗降低, 皂苷元收率和质量均提高。

关键词: 盾叶薯蓣; 薯蓣皂苷元; 阶梯生物催化; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)05-0688-04

Extraction of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* through stepwise biocatalysis

ZHANG Yu-qing, WANG Dong-qing, LI Bin-xian, LIANG Jiang-hua

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To enhance the yield and product quality of diosgenin extract, the method of stepwise biocatalysis was used. **Methods** The optimum conditions of stepwise biocatalysis were obtained through orthogonal tests. In qualitative and quantitative analysis of diosgenin extracted through stepwise biocatalysis, IR spectrum and HPLC chromatogram were used. The yield and melting point of diosgenin were taken as investigated standard index to compare this method with others, such as acid hydrolysis, spontaneous fermentation, and enzymatic hydrolysis. **Results** When cellulase and pectinase compound, amylase and diastatic enzyme were added in order in the method of stepwise biocatalysis, 98% diosgenin from plants was extracted. IR spectrum of the product was in accordance with that of reference substance and the purity of it is more than 95% according to its HPLC chromatogram. **Conclusion** Compared with other three methods, it can improve the yield and quality with less energy consumption by stepwise biocatalysis.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wrigth; diosgenin; stepwise biocatalysis; orthogonal test

薯蓣皂苷元(diosgenin), 工业上称为薯蓣皂素, 是薯蓣中的重要活性成分, 它是合成甾体激素药物重要的医药中间体, 其经裂解、氧化和消除反应后生成的醋酸孕甾双烯醇酮再经过改造后可得到数千种甾体药物, 被医药界称为“药用黄金”。薯蓣皂苷元由薯蓣根茎为原料制备得到, 常用的方法有直接酸水解法、自然发酵法、酶解法等。直接酸水解法只能提取出药材中 45% 的薯蓣皂苷元成分, 并且药材中的

其他有效成分被大量废弃造成资源的严重浪费和环境的污染^[1]。自然发酵法是先将药材发酵一段时间后再进行酸水解, 该法自然发酵时间较长(48~72 h), 能耗大, 并且发酵过程复杂, 可控性差, 薯蓣皂苷元收率较低, 仅能提取出植物中 65% 的薯蓣皂苷元^[2]。近年来, 国内外一些研究者采用纤维素酶等单一的酶制剂对薯蓣原料进行酶处理后结合酸水解进行研究, 结果能够使药材中 70% 的薯蓣皂苷元成分

收稿日期: 2005-09-20

基金项目: 中国博士后科学基金(413395-0306); 天津市科技攻关计划(033180811); 天津大学青年教师基金资助项目(411716)

作者简介: 张裕卿, 男, 生物化工专业博士后, 副教授, 研究生导师, 曾获得 2004 年国家科学技术发明二等奖, 发表论文 20 余篇。

Tel: (022) 81838383 27890470 E-mail: zhangyuqing@tju.edu.cn

提取出来^[3~5]。但是,由于酶催化反应的专一性较强,同时药材中薯蓣皂苷元结合的糖的种类和结构比较复杂,并且还被一些果胶、蛋白质和植物纤维等杂质紧密包裹,因此采用单一的酶进行反应的效果不佳,从而限制了薯蓣皂苷元收率的提高。

薯蓣等根茎类植物药材的有效成分,一般都与植物纤维、果胶、淀粉等非药物成分混杂在一起。所以,选用多种生物酶催化剂,对药材通过阶梯分步处理,将其中的杂质尽量分解,再结合酸水解后可以最大限度地将其薯蓣皂苷元提取出来。本实验用 3 种生物酶,对薯蓣药材进行阶梯生物催化处理,再结合酸水解后可以将药材中 98% 以上的薯蓣皂苷元提取出来,经理化测试表明,薯蓣皂苷元达到陕西省优级品标准,它的红外光谱谱图与对照品相吻合,HPLC 谱测定其质量分数在 95% 以上^[6]。

1 材料与仪器

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 由陕西省旬阳盾叶薯蓣公司提供,该公司鉴定为盾叶薯蓣的干燥根茎,并根据 DB61/T-301-2002 中 4.1.2 的方法测出该原料中薯蓣皂苷元的质量分数为 2.87%;纤维素酶和果胶酶复合酶制剂(酶活性 2×10^4 U/g)、淀粉酶(酶活性 1×10^5 U/g)、糖化酶(酶活性 1.5×10^4 U/g)由诺维信(中国)生物制剂有限公司提供;120# 汽油由天津石油公司提供;薯蓣皂苷元对照品由天津药业有限公司三隆制药厂提供,质量分数为 99.2%,熔点 202~204 °C;甲醇、乙腈为色谱纯,浓 H_2SO_4 、无水 Na_2CO_3 为分析纯,由天津市化学试剂五厂提供。

WH8401 型电动搅拌器(天津市威华实验仪器厂),101—1 型电热鼓风干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司通州分公司),SENCOR 系列旋转蒸发器(上海申生科技有限公司),FTS3000 红外光谱仪(BIO-RAD 美国),Yanaco MP-500 型熔点仪(株式会社柳本制作所),日本岛津 LC—10Avp 高效液相色谱仪,包括 SPD—10Avp 紫外可见光检测器,CLASS-VPV 5.03 色谱数据处理工作站。

2 方法与结果

2.1 阶梯生物酶催化协同提取薯蓣皂苷元

2.1.1 提取方法:取干燥的盾叶薯蓣粉末 25 g,加一定量水于三口烧瓶中,搅拌均匀后依次加入纤维素酶和果胶酶复合酶制剂、淀粉酶、糖化酶进行生物催化反应,然后加入一定量的浓 H_2SO_4 配成 2 mol/L 的水解液于 100 °C 进行酸水解 4 h。滤过,滤渣用 10% NaOH 溶液洗涤至中性,干燥,研磨得到粉末

状提取物。提取物用索氏提取器回流提取 8 h 后,用旋转蒸发器浓缩提取液并将产物结晶,最后在 80~100 °C 真空干燥箱中干燥,得薯蓣皂苷元。

2.1.2 酶制剂最佳作用条件的确定:酶制剂的作用条件以酶制剂用量、反应温度、作用时间和反应液 pH 值为考察因素,各因素均设置 3 个水平,以皂苷元收率(皂苷元收率=皂苷元提取量/薯蓣干粉质量 $\times$ 100%)和熔点作为考察目标,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验方法设计,以确定纤维素酶和果胶酶复合酶制剂最佳作用条件为例,因素与水平见表 1,结果见表 2。

表 1 纤维素酶和果胶酶复合酶制剂最佳作用条件的因素水平

Table 1 Factors and levels of optimum conditions of cellulase and pectinase compound

水平	因素			
	A 酶制剂用量/%	B 作用时间/h	C 反应温度/°C	D 反应液 pH 值
1	0.05	2	40	4.0
2	0.10	4	50	5.0
3	0.15	6	60	6.0

表 2 纤维素酶和果胶酶复合酶制剂最佳作用条件的正交优选

Table 2 Orthogonal selecting of optimum conditions of cellulase and pectinase compound

序号	A	B	C	D	皂苷元收率/%	皂苷元熔点/°C
1	1	1	1	1	1.95	199~201
2	1	2	2	2	2.41	200~203
3	1	3	3	3	1.74	200~204
4	2	1	2	3	2.72	202~204
5	2	2	3	1	2.09	200~203
6	2	3	1	2	2.17	199~203
7	3	1	3	2	2.08	199~202
8	3	2	1	3	1.83	198~203
9	3	3	2	1	2.26	201~203
皂苷元收率	I 6.10	6.75	6.95	6.30		
	II 6.98	6.33	7.39	6.29		
	III 6.17	6.17	5.91	6.66		
R	0.88	0.58	1.48	0.37		

由表 2 可以看出,对纤维素酶和果胶酶复合酶制剂来说,影响皂苷元收率的因素重要顺序为 $C > A > B > D$ 。该复合酶的最佳作用条件为 $A_2B_1C_2D_3$,即酶制剂液用量为 0.10% (0.1 g 原料加 1 μ L 酶液),作用时间为 2 h,反应温度为 50 °C,反应液 pH 值为 6.0。

同理可得,淀粉酶的最佳作用条件为酶制剂液用量 0.10%,反应时间为 1.5 h,作用温度为 75 °C,反应液 pH 为 5.5;糖化酶的最佳作用条件为酶制剂液用量为 0.10%,作用时间为 2 h,反应温度为 60 °C,反应液 pH 为 5.5。

2.1.3 阶梯生物催化协同提取薯蓣皂苷元的重复

试验:按照最佳试验条件进行 5 次重复试验,并对各次所得产品进行收率和熔点的测定。结果收率范围是 2.68%~2.80%,提取率范围是 93.83%~97.68%;熔点为 201~204 ℃。

2.1.4 产品的红外光谱的测定:将薯蓣皂苷元对照品和阶梯生物催化所得皂苷元产品用 KBr 压片法制样,用 FTS3000 红外光谱仪测定两者的红外光谱。结果所得产品与对照品的特征吸收峰基本吻合,IR (KBr) $\nu_{\text{cm}^{-1}}$:980、918~898、864 (25R 螺缩酮)、1 237、1 050 ($\text{C}_3\text{-OH}$ 和 C-5、6 位双键)。

2.1.5 产品的高效液相色谱的测定:色谱条件:Shim-Pack CLC-ODS 色谱柱(150 mm×6.0 mm, 5 μm)(日本岛津),流动相乙腈-水(8:1),体积流量 1 mL/min,检测波长 210 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL 。将对照品与样品用甲醇溶解,配成质量浓度为 0.2 mg/mL 的溶液,按上述色谱条件测定。结果 HPLC 图谱中,保留时间 4.6 min 对应的峰是薯蓣皂苷元的峰,样品中薯蓣皂苷元的质量分数为 95.51%。

2.2 阶梯生物催化工艺与其他工艺的比较

2.2.1 直接酸水解法:取干燥盾叶薯蓣粉末 25 g,加定量水于三口烧瓶中,搅拌均匀后加入适量浓 H_2SO_4 配成 2 mol/L 的水解液于 100 ℃进行酸水解 4 h。滤过,滤渣用 10% NaOH 溶液洗涤至中性,干燥,研磨得到粉末状提取物。提取物用索氏提取器回流提取 8 h 后,用旋转蒸发器浓缩提取液并将产物结晶,最后在 80~100 ℃真空干燥箱中干燥后得薯蓣皂苷元,对所得产品进行收率和熔点的测定。

2.2.2 自然发酵法:取干燥的盾叶薯蓣粉末 25 g,加定量水浸湿后堆放,自然发酵 48 h,然后加入一定量的浓 H_2SO_4 配成 2 mol/L 的水解液于 100 ℃进行酸水解 4 h,其余操作同 2.2.1,对所得产品进行收率和熔点的测定。

2.2.3 酶解法:取干燥的盾叶薯蓣粉末 25 g,加定量水于三口烧瓶中,搅拌均匀后在温度 50 ℃下加入 0.1% 的纤维素酶和果胶酶复合酶制剂处理 12 h,然后加入一定量的浓 H_2SO_4 配成 2 mol/L 的水解液于 100 ℃进行酸水解 4 h,其余操作同 2.2.1,对所得产品进行收率和熔点的测定。

按阶梯生物催化协同提取最佳工艺提取,将 4 种方法所得的 4 份薯蓣皂苷元产品称质量,并测定各自的熔点,结果见表 3。

根据陕西省地方标准(DB61/T-301-2002),熔点在 195~206 ℃的薯蓣皂苷元属于合格品,并且熔

表 3 4 种提取薯蓣皂苷元的方法比较

Table 3 Comparison of four extract methods of diosgenin

方法	皂苷元质量/g	收率/%	提取率/%	熔点/℃
直接酸水解法	0.320 0	1.28	44.81	195~199
自然发酵法	0.465 3	1.86	65.16	198~202
酶解法	0.538 6	2.15	75.42	199~202
阶梯生物催化法	0.697 6	2.79	97.68	202~204

点越高,熔距越短,产品的纯度就越高,质量就越好;其中熔点在 197 ℃以上的为优级品。

由表 3 可以看出,4 种提取方法中,直接酸水解法所得产品的收率低,仅为 1.28%,只提取出薯蓣中 44% 的薯蓣皂苷元,质量也较差,熔点未到 197 ℃,因此使用该方法容易造成薯蓣药材资源的浪费;与其他 3 种方法相比,阶梯生物催化法所得薯蓣皂苷元的收率较高,达到了 2.79%,远高于直接酸水解法的 1.28%,能够将薯蓣中近 98% 的薯蓣皂苷元提取出来,并且该方法所得产品的熔点较高,熔距较短,产品纯度高,符合优级品的标准。

3 讨论

阶梯生物催化协同提取技术中采用了多种类生物酶,并且分别按照一定的顺序加入后对药材进行分步处理,这是由薯蓣类药材的结构特性及皂苷的结构组成决定的。在植物中,薯蓣皂苷元和糖链连接形成薯蓣皂苷,大量的淀粉颗粒与皂苷共混存于细胞的主要部分,外部被纤维组成的细胞壁包裹着,同时还有果胶等杂质存在。纤维素酶和果胶酶复合酶制剂可以促进 $\beta\text{-D-}$ 葡萄糖苷键的水解而破坏植物细胞壁,并可以使果胶等充分的分解掉,有利于有效成分的析出;淀粉酶可部分分解淀粉使黏稠的原料液黏度降低,进一步使皂苷裸露出来;糖化酶可使薯蓣皂苷连接的糖链部分断裂。这样,通过生物酶的阶梯分步处理,可以使薯蓣药材中包裹着薯蓣皂苷的杂质分解掉,生成次级皂苷,空间位阻减少,从而在水解时能够最大限度地使薯蓣皂苷转化成薯蓣皂苷元,使薯蓣皂苷元的提取收率提高。

利用阶梯生物催化协同提取薯蓣皂苷元技术时,依次加入纤维素酶和果胶酶复合酶制剂、淀粉酶、糖化酶,且各种酶均在其最佳作用条件下作用于药材后,薯蓣皂苷元的收率最高,达到 2.79%;该技术能够将薯蓣药材中 98% 的薯蓣皂苷元提取出来,所得产物纯度较高,经 HPLC 测定质量分数达 95% 以上,熔点为 200~204 ℃,符合陕西省优级品标准。

阶梯生物催化协同提取技术能够将薯蓣植物中约 98% 的薯蓣皂苷元提取出来,该技术与直接酸水解法、自然发酵法、酶解法等相比,表现出能耗低、薯

赧皂苷元的收率高、植物药材资源利用充分、产品成本低等优点。

References:

- [1] Rothrock J W, Hammes P A, Mcalleer W J. Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of sapogenin [J]. *Ind Eng Chem*, 1957, 49: 186.
- [2] Tang X L, Xu Z L, Xia B, et al. Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Plant Resour Environm* (植物资源与环境学报), 2004, 13 (3): 35-37.
- [3] Tong L, Zhang S K, Li J, et al. Extraction sapogenins from *Dioscorea zingiberensis* through enzymatic hydrolysis [J]. *J Shaanxi Norm Univ* (陕西师范大学学报), 2003, 31 (2): 81.
- [4] Pan W J, Xiao X H, Yuan H L, et al. Review on study of key technologies in manufacture of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (4): 361-367.
- [5] Zhang L M, Zhang L Y, Du L X. Technology for extracting diosgenin from seeds of *Trigonella foenum-graecum* through enzymatic hydrolysis [J]. *Transact CSAE* (农业工程学报), 2005, 21 (2): 161-164.
- [6] Zhang Y Q, Wang D Q. The method of extracting diosgenin through stepwise biocatalysis [P]. CN: 200510014456.4, 2005-07-11.

抗衰老复方化学配伍关系的色谱指纹谱研究

曹进, 叶兆波, 车镇涛*

(香港中文大学中医学院, 香港)

摘要:目的 对抗衰老复方形成、配伍以及配制过程的变化进行指纹图谱研究。方法 建立 HPLC-UV 和 LC-MS 指纹图谱, 对图谱结果进行比较分析。结果 以获取的复方指纹图谱 18 个编码指纹峰为基础, 对药材指纹图谱将复方中编码的指纹峰进行来源归属, 其中复方 1、2 号峰来自灵芝 11L、21L 号峰; 复方 4、5 号峰来自女贞子 1N、4N 号峰; 复方 3、8、9、10、11、12、13、14、18 号峰来自五味子 1W、4W、12W、14W、16W、18W、22W、26W、31W 号峰, 而复方 6、7、15、16、17 号峰无药材归属峰。归属显示在该测定方法下, 药材来源的峰在复方中的表达可以划分一定的指纹区域, 其中 6~14 min 主要来自灵芝, 20~30 min 主要来自女贞子, 40 min 以后主要来自五味子, 区域的划分加强了抗衰老复方的化学配伍研究的针对性。结论 药材到复方的形成过程中, 药材会产生两种变化, 一种是不受共存药材的影响; 而另一种是受到影响, 结合在抗衰老复方的配制中, 如果考虑 3 药共煎和药材先后加入的情况, 则五味子的加入顺序会影响最终复方的质量, 而先投入五味子, 后投入女贞子或者灵芝, 产生的复方与 3 药共煎的结果是相同的, 说明在复方配置过程中, 药材的变化受到了药材间配伍关系的影响, 结果为复方的配伍和质量研究提供了可行途径。

关键词:抗衰老复方; 指纹图谱; 配伍

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)05-0691-04

Fingerprint in chemical compatibility of Anti-aging Compound Recipe

CAO Jin, PAUL Ip, CHE Chun-tao

(School of Traditional Chinese Medicine, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: **Objective** To study the variance of fingerprint peaks in the processes of Anti-aging Compound Recipe formation, compatibility, and preparation. **Methods** Anti-aging Compound Recipe and its herbs' fingerprint chromatogram were studied and validated by HPLC/UV and LC/MS which were used in chemical compatibility. **Results** Based on the 18 code peaks from compound recipe fingerprint and compared with herb fingerprints, 18 code peaks of compound recipe were under the assignment of herb source, that was, No. 1, 2 from *Ganoderma* No. 11L, 21L; No. 4, 5 from *Fructus Ligustri Lucidi* No. 1N, 4N; No. 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18 from *Fructus Schisandrae*. No. 1W, 4W, 12W, 14W, 16W, 18W, 22W, 26W, 31W; and No. 6, 7, 15, 16, 17 were no assignment. The assignment resulted the peaks of herb source could be divided into several fingerprint regions, as anti-aging formulae, 6—14 min mainly from *Ganoderma*, 20—30 min from *Fructus Ligustri Lucidi*, after 40 min from *Fructus Schisandrde*. All of them enhanced what the study on chemical compatibility of Anti-aging Compound Recipe was aimed at. **Conclusion** The two actions have appeared during mixing the crude Chinese

收稿日期: 2005-09-17

基金项目: 香港政府中药材质量标准项目资助

作者简介: 曹进, 香港中文大学中医学院博士, 助研。

* 通讯作者 车镇涛 Tel: (00852) 26098130 E-mail: chect@cuhk.edu.hk