

大孔树脂纯化芦笋总皂苷的工艺研究

张若洁, 徐永霞, 王鲁峰, 陈清婵, 徐晓云, 潘思轶, 王可兴*

华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 目的 研究芦笋总皂苷的大孔树脂纯化工艺。方法 采用静态及动态吸附解吸试验优选适宜的大孔树脂, 并优化纯化条件。结果 S-8型树脂对芦笋总皂苷有较好的吸附和洗脱效果, 并具有良好的脱色效果, 其最佳纯化条件为上样质量浓度 1 mg/mL, 上样量 60 mL/g 树脂, 用 pH 7 的 75%乙醇洗脱, 洗脱剂用量为 10 mL/g 树脂。纯化后得提取物中芦笋总皂苷的质量分数可达 50.15%, 脱色率为 92.23%。结论 S-8型大孔树脂用于富集芦笋总皂苷效果最佳, 是一种理想的分离纯化介质。

关键词: 芦笋; 总皂苷; 大孔树脂; 纯化; 脱色; 吸附

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)06-1097-04

Purification of total saponins from *Asparagus officinalis* by macroporous resin

ZHANG Ruo-jie, XU Yong-xia, WANG Lu-feng, CHEN Qing-chan, XU Xiao-yun, PAN Si-yi, WANG Ke-xing

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: **Objective** To investigate the purification of saponins from *Asparagus officinalis* by macroporous resin. **Methods** Macroporous resin was chosen with static and dynamic adsorption and desorption experiments to optimize the purification parameters. **Results** S-8 macroporous resin was found to have good adsorption and desorption effects and show an excellent decolor effect. The optimum purification conditions were 1 mg/mL of saponins eluted by 75% ethanol at pH value 7 with a volume of 10 mL/g, and the loaded amount was 60 mL/g. The purity of total saponins increased to 50.15% after the purification, and the decoloration rate maintained 92.23%. **Conclusion** S-8 is an ideal resin with the best enrichment for separating and purifying total saponins from *A. officinalis*.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; saponins; macroporous resin; purification; decoloration; adsorption

芦笋 *Asparagus officinalis* L. 又名石刁柏、龙须菜, 为百合科天门冬属宿根性多年生草本植物。现代医学表明, 芦笋具有抗癌^[1]、抗肿瘤^[2]、抗真菌^[3]、抗衰老^[4]、调节免疫^[5]等多种药理作用。芦笋中的生物活性物质主要是甾体皂苷类化合物^[6]。国内外已有许多关于芦笋中甾体皂苷生理活性的研究, 特别是对其抗癌、抗真菌的研究相对更为深入。Shao等^[1]研究发现从芦笋茎中提取到的芦笋粗皂苷对抑制人类白血病 HL-60 细胞的生长和大分子合成存在剂量-时间关系。Shimoyamada等^[3]研究发现从白芦笋下脚料中提取到的粗皂苷对白色念珠菌具有显著的抑菌作用。

大孔树脂是内部呈交联网状结构的高分子珠状

体, 其对物质具有选择性分离作用, 被广泛应用于天然活性物质的分离纯化^[7-8]。目前, 利用大孔树脂纯化皂苷的研究已有很多报道, 如 AB-8、D-101 型大孔树脂已被广泛应用于皂苷的纯化^[9-12]。但其多数是以总皂苷的吸附率和解吸率为评价指标, 并没有反映色素等杂质在纯化前后的变化, 有研究表明^[13], 经 AB-8、D-101 树脂分离得到的皂苷提取物含有较多杂质, 其中色素的量很高, 产品颜色较深。本实验所采用的原料为芦笋, 其中色素的量相当高, 因此选择纯化树脂时不仅要考虑树脂的吸附解吸性能为指标, 同时要考虑解吸液中色素的脱除情况。为得到质量分数更高的芦笋总皂苷, 本实验采用 6 种不同极性的树脂, 分别比较纯化后提取液的吸附率、

收稿日期: 2011-09-18

作者简介: 张若洁 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工化学。

Tel: 15172519592 E-mail: zhangruojie@126.com 409166386@qq.com

*通讯作者 王可兴 Tel: (027)87282426 E-mail: wangkx@mail.hzau.edu.cn

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0856.010.html>

解吸率及脱色率, 优选最适宜的树脂, 并优化其纯化条件。

1 仪器与材料

BT—220S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); 752 型分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); R—215 旋转蒸发仪 (瑞士步琪有限公司); 玻璃色谱柱 (1.0 cm×40 cm, 上海青浦沪西公司)。

X-5、D-101、AB-8、HPD-450、S-8、NKA-9 大孔树脂 (上海摩速科学器材有限公司)。芦笋原料采自湖北省黄陂蔡甸芦笋产业园, 经武汉新辰食品有限公司李春风实验员鉴定为芦笋 *Asparagus officinalis* L. 的茎。菝葜皂苷元对照品 (110744-200509, 中国药品生物制品检定所)。乙醇、甲醇、正丁醇、乙醚、高氯酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芦笋粗皂苷样品的制备

称取 10 g 芦笋粉末, 置于索氏提取器内, 用乙醚萃取脱色, 样品挥干溶剂后, 用 250 mL 乙醇于 60 °C 水浴提取 2 次, 每次 1 h, 提取液经减压滤过后旋转蒸发至干, 加 250 mL 蒸馏水溶解, 用 250 mL 水饱和正丁醇萃取 4 次, 合并正丁醇相, 再用 500 mL 正丁醇饱和水洗涤 2 次, 将正丁醇相减压回收至干, 残渣用 100 mL 水溶解, 即得生药量为 0.1 g/mL、总皂苷质量浓度约为 2.5 mg/mL 的样品。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取菝葜皂苷元对照品 4.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 备用。

2.3 大孔树脂预处理

将树脂先用 2 倍体积 5% NaOH 洗涤, 用蒸馏水洗至中性后, 再用 2 倍体积 10% HCl 洗涤, 最后用蒸馏水洗至中性。以乙醇湿法装柱, 用 95% 乙醇在柱上流动淋洗, 检查流出的乙醇液, 至乙醇液与水混合 (1:5) 无白色浑浊为止, 然后以大量蒸馏水洗去乙醇^[14]。

2.4 芦笋总皂苷定量测定

2.4.1 供试品溶液的制备及总皂苷定量测定 按“2.1”项方法制备粗皂苷, 按生药量-甲醇 (1:50) 定容, 即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液和对照品溶液适量, 置 10 mL 比色管中, 水浴挥干溶剂, 加高氯酸 5 mL, 摇匀, 65 °C 水浴 15 min, 取出后冰水冷却 5 min, 采用紫外分光光度法在 310 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。

2.4.2 标准曲线的制备 精密吸取 0.4、0.6、0.8、

1.0、1.2 mL 对照品溶液置于具塞试管中, 按“2.4.1”项下操作, 在 310 nm 处测定 *A* 值。以菝葜皂苷元质量为横坐标 (*X*), *A* 值为纵坐标 (*Y*) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.003\ 2\ X+0.002\ 6$, $r^2=0.999\ 2$, 表明菝葜皂苷元在 72~216 μg 与 *A* 值呈良好的线性关系。

2.4.3 方法学考察 参考文献方法^[15]进行, 结果精密密度 RSD 为 0.76% ($n=6$); 稳定性 RSD 为 1.48% ($n=7$), 表明供试品溶液在 60 min 内稳定; 重复性 RSD 为 1.25% ($n=6$); 菝葜皂苷元平均回收率为 98.89%, RSD 为 1.49% ($n=9$)。

2.5 芦笋总皂苷脱色率的测定^[16]

将粗皂苷样品或洗脱液经双层滤纸滤过, 然后分别在 420、670 nm 处测其 *A* 值。

$$\text{脱色率}=(A_{\text{总前}}-A_{\text{总后}})/A_{\text{总前}}$$

$A_{\text{总前}}$ 为脱色前溶液在 420、670 nm 处 *A* 值的和, $A_{\text{总后}}$ 为脱色后溶液在 420、670 nm 处 *A* 值的和

2.6 静态吸附试验筛选大孔树脂^[17]

分别称取处理好的树脂各 0.5 g, 置 100 mL 三角瓶中, 加入芦笋粗皂苷样品 20 mL, 密塞, 于室温下 (27 °C) 在振荡器中振荡 24 h, 充分吸附后, 测定溶液中总皂苷的量, 计算各种树脂的吸附量、吸附率。抽滤吸附饱和的大孔树脂, 用 100 mL 蒸馏水分次洗涤, 至不滴水为止, 置 100 mL 三角瓶中, 加入 75% 乙醇 20 mL, 密塞, 同上述条件振荡 24 h, 充分解吸后, 测定解析液中总皂苷的量, 计算各种树脂的解吸量、解吸率及脱色率。

$$\text{吸附率}=(C_0-C_1)/C_0$$

$$\text{解吸率}=C_2/(C_0-C_1)$$

C_0 为吸附前样液中总皂苷质量浓度 (mg/mL), C_1 为吸附后样液中总皂苷质量浓度 (mg/mL), C_2 为解吸后样液中总皂苷质量浓度 (mg/mL)

依据已有文献报道, 选用常用于皂苷分离的树脂, 并按其极性不同, 分为 3 类, 每类选取两种树脂, 种类见表 1。可以看出, 各种树脂均对芦笋总皂苷表现出良好的吸附性, 其中 S-8 树脂对皂苷的吸附率最高, D-101 及 NKA-9 的解吸率相对较高, 但从最终解吸量来看, S-8 树脂解吸量最大。在此基础上, 本实验对各树脂脱色效果进行了比较, S-8 树脂无论是吸附后溶液颜色还是解吸后溶液颜色均浅于其他树脂, 经测定 S-8 树脂的脱色率高达 92.95%, 明显优于其他树脂, 显著提高了纯化后总皂苷的质量分数。因此, 本实验选择 S-8 树脂作为

表 1 不同树脂对芦笋总皂苷的分离脱色效果对比
Table 1 Comparison on separation and decoloration of total saponins in *A. officinalis* by different kinds of resins

树脂类型	极性	吸附率 / %	解吸率 / %	脱色率 / %
X-5	非极性	67.64	47.35	86.34
D-101	非极性	64.52	56.38	84.55
AB-8	弱极性	66.10	42.72	82.67
HPD-450	弱极性	64.02	55.43	82.24
S-8	极性	84.19	50.22	92.95
NKA-9	极性	64.30	59.17	82.95

芦笋总皂苷的纯化树脂, 进行深入研究。

2.7 动态吸附试验确定 S-8 大孔树脂纯化芦笋总皂苷的工艺参数

2.7.1 上样质量浓度的确定 将预处理好的 S-8 树脂 5 g, 装入色谱柱中, 用水洗涤平衡备用。取质量浓度为 2.5 mg/mL 的芦笋粗皂苷样品 5 份, 分别用蒸馏水稀释至质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL 的溶液后上大孔树脂柱, 以 1 mL/min 体积流量吸附, 计算不同上样质量浓度下的吸附率, 结果分别为 69.97%、66.43%、55.34%、49.03%、46.87%。可以看出, 解吸液中总皂苷的量随上样质量浓度的增大而呈下降趋势。这是因为大孔树脂吸附为物理吸附, 增大吸附质量浓度, 则会使平衡吸附量增加, 从而使吸附率降低^[18]。降低质量浓度有利于吸附, 但质量浓度过低, 则会延长上样时间。因此, 综合考虑, 选取 1.0 mg/mL 为上样质量浓度。

2.7.2 吸附容量的确定 取已确定最佳质量浓度的芦笋粗皂苷样品, 以 1 mL/min 体积流量上样, 每 10 mL 收集 1 管, 连续接取。测定其中总皂苷的量, 绘制泄露曲线, 确定树脂吸附容量。由图 1 可以看出, 随着上样量的增加, 流出液中总皂苷质量浓度增加, 树脂吸附效果下降。上样量少于 50 mL 时, 流出液中总皂苷质量浓度极低。当上样量超过 50 mL 时, 流出液中总皂苷质量浓度出现明显上升, 但总的流出液混合质量浓度较低。当增加上样量至 300 mL 时, 流出液中总皂苷质量浓度接近上样液质量浓度, 表明树脂吸附能力已出现明显下降。继续增加上样量, 样液中总皂苷大量泄露, 表明树脂已趋近饱和, 吸附能力大大下降。为避免样液中总皂苷大量泄露而降低纯化得率, 选取 300 mL 为最佳上样量, 即 1 g 树脂吸附 60 mL 质量浓度为 1.0 mg/mL 样液。实际生产工艺中, 1 g 树脂吸附生药量 (1 g

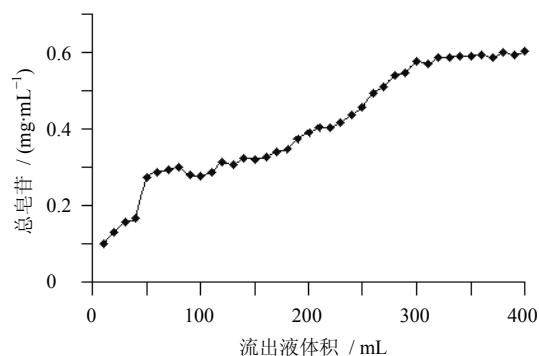


图 1 S-8 型树脂上样吸附泄露曲线

Fig. 1 Adsorption leaking curve on S-8 macroporous resin

生药中含总皂苷约 24 mg) 不超过 2 g 为宜。

2.7.3 洗脱剂体积分数的确定 上样吸附后, 先用蒸馏水洗至流出液为无色, 分别用 35%、55%、75%、95%乙醇在中性条件下洗脱, 收集洗脱液, 测定不同体积分数的乙醇洗脱得到的解吸液的解吸率及脱色率, 确定最佳洗脱剂体积分数。结果解吸率分别为 17.52%、17.54%、40.95%、48.30%, 脱色率分别为 93.45%、92.36%、90.39%、85.90%。可以看出, 55%以下体积分数的乙醇, 总皂苷解吸率很低, 增大乙醇体积分数, 皂苷解吸随之增大, 当乙醇体积分数为 75%时, 总皂苷解吸率增幅明显。说明提高解吸液中乙醇体积分数, 对提高皂苷解吸率有显著作用。脱色效果随乙醇体积分数的增高而下降, 乙醇体积分数达到 95%时, 色素溶出显著。综合考虑, 选用体积分数为 75%的乙醇作为洗脱剂。

2.7.4 洗脱剂 pH 值的确定 上样吸附后, 先用蒸馏水洗至流出液为无色, 分别用 pH 3、5、7、9 的 75%乙醇洗脱, 收集解吸液, 测定不同 pH 值的解吸液的解析率及脱色率, 确定最佳洗脱剂 pH 值。结果解吸率分别为 54.11%、58.06%、45.27%、37.63%, 脱色率分别为 79.50%、88.04%、92.95%、95.84%。可以看出, 总皂苷在微酸性条件下解吸率最大, 在碱性条件下, 解吸率有下降趋势, 酸性条件也适宜于色素的洗脱, 使得解吸液的脱色率下降, 中性偏碱性条件更有利于色素保留在树脂上, 提高解吸液的脱色率。当 pH 值为 7 时, 脱色率就高达 92.23%。因此, 综合考虑, 选取中性条件洗脱, 保证总皂苷质量分数的同时, 使得率不致过低。

2.7.5 洗脱曲线的考察 上样吸附后, 先用蒸馏水洗至流出液为无色, 再用 75%乙醇在 pH 7 的条件下以 1 mL/min 体积流量洗脱, 每 5 mL 收集 1 管, 测定解吸液中总皂苷的量, 确定最佳洗脱液用量。

由图2可以看出,75%乙醇的洗脱曲线峰型集中,无明显拖尾现象。第3管,即20 mL解吸液中总皂苷的量就已达到最大值,第10管,即50 mL解吸液中总皂苷已基本洗脱完全。因此,选取50 mL为洗脱液用量,即10 mL/g树脂。

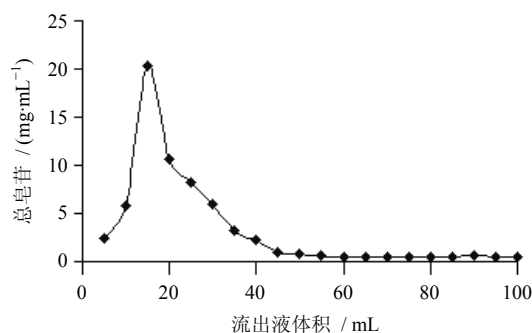


图2 S-8型树脂洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of S-8 macroporous resin

2.8 S-8 最佳工艺验证

按最佳工艺条件进行验证,选用S-8型大孔树脂,上样液质量浓度1 mg/mL,上样量60 mL/g树脂,用pH 7的75%乙醇洗脱,洗脱剂用量为10 mL/g树脂,经纯化芦笋总皂苷的质量分数由纯化前的24.95%提高到50.15%,脱色率为92.23%。

3 讨论

对于芦笋这类色素量高的原料,在精制其活性物质时,常采用活性炭脱色后,再进行纯化的两步法^[19]。但在活性炭脱色过程中,在除去色素的同时,也使皂苷分子被吸附,从而皂苷的量显著下降^[9]。本实验首次采用脱色率为筛选最佳纯化树脂的评价指标,结合吸附率与解吸率指标,通过静态吸附和解吸试验,从6种树脂中筛选出最适合纯化芦笋总皂苷的大孔树脂为S-8型树脂,通过一步法,即达到脱色目的,又使皂苷质量分数提高。实验结果表明,此树脂不仅具有较好的吸附解吸性能,而且表现出相当好的脱色效果,非常适用于芦笋这种含色素高的原料。

参考文献

[1] Shao Y, Poobrasert O, Kennelly E J, *et al.* Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity [J]. *Planta Med*, 1997, 63(3): 258-262.
[2] Edenharder R, John K, Ivo-Boor H. Antimutagenic activity of vegetable and fruit extracts against *in vitro* benzo(a)pyrene [J]. *Z Gesamte Hyg Grenzgeb*, 1990,

36(3): 144-148.

[3] Shimoyamada M, Suzuki M, Sonta H, *et al.* Antifungal activity of the saponin fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle [J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(10): 2553-2557.
[4] Kamat J P, Bloor K K, Devasagayam T P A, *et al.* Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by γ -radiation in rat liver mitochondria [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71(3): 425-435.
[5] Gautam M, Diwanay S, Gairola S, *et al.* Immunoadjuvant potential of *Asparagus racemosus* aqueous extract in experimental system [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91(2/3): 251-255.
[6] 李长秀, 张铁垣, 陈维杰. 芦笋根中菝葜皂甙元的气相色谱测定 [J]. *分析测试学报*, 1995, 14(1): 61-65.
[7] 高虹, 黎碧娜. S-8树脂对地榆皂苷溶液脱色的研究 [J]. *精细石油化工*, 2007, 24(3): 60-62.
[8] 李健, 陈姝娟, 刘宁, 等. 大孔树脂纯化肉桂总皂苷工艺研究 [J]. *食品科技*, 2008, 33(2): 61-65.
[9] 王光忠, 张明, 葛如斌, 等. 大孔树脂纯化盾叶薯蓣总皂苷的工艺研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(5): 25-27.
[10] 刑俊波, 吴禾, 刘云, 等. 大孔树脂分离黄芪总皂苷工艺研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(4): 519-521.
[11] 张梅, 宋芹, 张洪彬. 大孔树脂富集、纯化仙茅总皂苷 [J]. *华西药理学杂志*, 2005, 20(4): 295-298.
[12] 许舒雯, 龚祝南, 丛晓东, 等. 大孔树脂分离纯化苜蓿皂苷工艺研究 [J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(13): 3176-3177.
[13] 史作清, 施荣富, 范云鸽, 等. 大孔树脂吸附法在中草药有效成分提取中的应用 [J]. *中草药*, 2001, 32(7): 660-662.
[14] 李春美, 钟朝辉, 窦宏亮, 等. 大孔树脂分离纯化柚皮黄酮的研究 [J]. *农业工程学报*, 2006, 22(3): 153-157.
[15] 张若洁, 潘思铁. 芦笋皂苷的提取、纯化及其溶血活性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
[16] 胡娟, 金征宇, 王静. 菊芋菊糖的提取与纯化 [J]. *食品科技*, 2007, 46(4): 62-65.
[17] 张立华, 张元湖, 安春艳, 等. 石榴皮提取物的大孔树脂纯化及其抗氧化性能 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25(1): 142-148.
[18] 熊双丽, 李安林, 吴照民, 等. 鸡胸软骨硫酸软骨素的提取及分离纯化 [J]. *农业工程学报*, 2009, 25(1): 271-274.
[19] 段雅庆. 芦笋中黄酮和多糖的复合提取及其抗氧化活性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.