

超声辅助膜组合技术探索绞股蓝总皂苷部位的分离机制与精制模式

李存玉^{1,2}, 邹雨岑^{1#}, 马莉¹, 侍言¹, 许启龙¹, 彭国平^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 基于超声与膜分离技术, 探索绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 总皂苷的分离机制与精制模式。 **方法** 以总蛋白、多糖、绞股蓝总皂苷、绞股蓝皂苷 A、芦丁为指标进行综合评价, 微滤-纳滤联用预处理去除大分子并浓缩药液, 采用 Box-Behnken 中心组合设计, 明确膜孔径、超声功率、pH 值对皂苷及黄酮类成分超滤分离行为的差异性, 探讨分离机制, 设定分离目标, 构建绞股蓝总皂苷部位的精制模式。 **结果** 微滤和纳滤组合预处理水提取液, 可大幅度去除多糖和蛋白, 提高浓缩液中总皂苷浓度; 超声功率可以调控绞股蓝皂苷胶束状态, 溶液碱化, 促进包裹或嵌合在胶束中的芦丁溶出, 构建了超声辅助超滤的绞股蓝总皂苷精制模式, 皂苷类成分总转移率 79.7%, 其他考察成分均低于 6%。 **结论** 成分存在状态与分离行为直接相关, 以溶液环境和超声辅助调控皂苷缔合状态, 构建精制模式, 为中药皂苷类成分的常温化精制提供技术支撑。 **关键词:** 皂苷; 绞股蓝; 膜分离; 超声; 芦丁; 多糖; 蛋白; 精制; 绞股蓝皂苷 A; 微滤; 纳滤; Box-Behnken 中心组合设计; 转移率

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)01-0091-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.012

Exploring separation mechanism and refined mode of *Gynostemma pentaphyllum* total saponin by ultrasonic assisted membrane combination technique

LI Cun-yu^{1,2}, ZOU Yu-cen¹, MA Li¹, SHI Yan¹, XU Qi-long¹, PENG Guo-ping^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To explore separation mechanism and refined mode of *Gynostemma pentaphyllum* total saponin by ultrasonic assisted membrane combination technique. **Methods** In the experiment, total protein, polysaccharide, *G. pentaphyllum* total saponin, gypenoside A and rutin were selected as indexes to evaluate comprehensively, microfiltration-nanofiltration pretreatment was used to remove macromolecules and concentrate solution. The differences of separation behavior between saponin and flavonoid were analyzed with Box-Behnken central composite experiment design, which contributed to clarify separation mechanism, set separation goals and establish the refined mode of *G. pentaphyllum* total saponin. **Results** Experiments indicated that the polysaccharide and protein can be effectively removed by microfiltration-nanofiltration, while helping to form micelles of saponins in the concentrated solution. Rutin was dissolved from gypenosides micelles by regulating micelle state with ultrasonic power and ionizing with pH value. And then, the ultrasonic-assisted ultrafiltration model was constructed to refine *G. pentaphyllum* total saponin, the total transfer rate of saponins was 79.7%, while other components under investigation were less than 6%. **Conclusion** The separation behaviors of membrane were related to molecular state. Taking *G. pentaphyllum* total saponin as an example, the refined mode was established by regulating solution environment and the associative state of saponins, and the results provided references for membrane concentrate for traditional Chinese medicine of saponins at room temperature.

收稿日期: 2020-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074006); 国家自然科学基金资助项目 (81503258); 2020 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010315037)

作者简介: 李存玉 (1985—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药制药。Tel/Fax: (025)86798186 E-mail: licunyuok@163.com

*通信作者: 彭国平 (1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂精制及新药研究。

Tel/Fax: (025)86798186 E-mail: guopingpeng@126.com

#共同第一作者: 邹雨岑 (1999—), 女, 本科生, 研究方向为中药资源与开发。Tel: 19805187190 E-mail: 924966594@qq.com

Key words: saponin; *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; membrane separation; ultrasonic; rutin; polysaccharide; protein; refine; gypenoside A; microfiltration; nanofiltration; Box-Behnken central composite design; transfer rate

绞股蓝始载于《救荒本草》，来源于葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的全草，具有健脾安神、补气生津等功效，其中绞股蓝皂苷具有抗肿瘤、保护心脑血管、保肝和抗氧化等功效，故有“南方人参”之称^[1-5]。绞股蓝药材富含皂苷、黄酮、氨基酸等成分，采用溶剂提取、树脂富集的模式精制皂苷类成分，存在溶剂污染、分离周期长、热转化等技术瓶颈^[6-7]。

膜分离技术分为微滤、超滤、纳滤和反渗透，通过跨膜压力差，依靠孔径、电荷等参数实现精制分离，具有常温操作、分离效率高等技术优势^[8-10]。同时，皂苷类成分多具有类表面活性，在达到临界胶束浓度时，通过分子间缔合形成胶束^[11]，胶束大小、物化性质等参数与其他类成分有明显区别，通过调控成分状态，放大差异，采用膜分离技术精制绞股蓝总皂苷，存在理论可行性，但科研探索尚处于初始阶段。本实验采用膜组合与超声耦合，动态调控皂苷胶束状态，以绞股蓝总皂苷、绞股蓝皂苷 A 为指标，定向去除多糖、蛋白、黄酮等小分子成分，优化分离参数，构建绞股蓝总皂苷部位的精制分离模式。

1 仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪，PDA 检测器，美国 Waters 公司；1812 型 Fogmachine 膜分离设备，南京拓钰医药科技有限公司；MS105 十万分之一电子天平，瑞士 Mettler Toledo 集团；T6 紫外-可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；GQ150 管式离心机，宜兴市华鼎机械有限公司；KH-250B 型超声波清洗器，昆山禾创超声仪器有限公司；PB-10 型 pH 计，德国 Sartorius 公司。

绞股蓝购自安徽亳州市药材市场，产地陕西平利，批号 20190601，经南京中医药大学药学院严辉副教授鉴定为葫芦科植物绞股蓝 *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino；对照品绞股蓝皂苷 A（批号 jbz0622，质量分数≥98%），南京金益柏生物科技有限公司；D-无水葡萄糖（批号 110833-201406，质量分数 99.9%）、芦丁（批号 100080-201409，质量分数≥91.9%），中国食品药品检定研究院；BCA 蛋白含量检测试剂盒，江苏凯基生物技术股份有限公司；乙腈、甲醇为色谱纯，乙醇、硫酸、苯酚为分析纯，水为纯化水。膜组件规格参数见表 1，星达（泰州）膜科技有限公司。

表 1 膜组件规格参数

Table 1 Specification parameters of membrane modules

类别	孔径	面积	型号	材质
微滤膜	0.1 μm	0.3 m ²	卷式-V0.1	聚偏氟乙烯
纳滤膜	截留相对分子质量 (M _w) 600~800		卷式-NFG	复合聚酰胺
超滤膜	截留 M _w 1000、5000、10 000		卷式	聚醚砜

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 绞股蓝提取液 称取绞股蓝饮片 50 kg，加入 15 倍纯化水提取 2 次，提取时间为 1.5 h，滤液采用管式离心（15 000 r/min）去除不溶物，制得绞股蓝水提液。

2.1.2 绞股蓝皂苷 A 对照品溶液 精密称取干燥至恒定质量的绞股蓝皂苷 A 对照品 4.99 mg 置于 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，得质量浓度为 0.499 mg/mL 的绞股蓝皂苷 A 对照品溶液。

2.1.3 芦丁对照品溶液 精密称取干燥至恒定质量的芦丁对照品 2.10 mg 置于 10 mL 量瓶中，甲醇稀

释至刻度，得质量浓度为 0.210 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.1.4 葡萄糖对照品溶液 精密称取干燥至恒定质量的 D-无水葡萄糖 5.00 mg 置于 10 mL 量瓶中，纯化水稀释至刻度，得质量浓度为 0.500 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液。

2.2 微滤-纳滤预处理

取孔径为 0.1 μm 微滤膜置于膜分离设备中，控制跨膜压力差低于 0.1 MPa，采用纯化水循环清洗，取截留端及滤液端溶液。采用经过三点校正（pH 4.01、6.86、9.18 缓冲液）的 pH 计测定截留端及滤液端溶液至显示中性（pH 7.0±0.1），排空膜组件及

管道中残留纯化水。将绞股蓝水提取置于储液罐中,调节跨膜压力差在 0.05~0.10 MPa,将截留端与进液端置于储液罐中,收集滤液端溶液,待储液罐中溶液体积无法维持分离时,储液罐中加入纯化水,待滤液端收集溶液达到原体积时,即完成微滤分离。

为了去除绞股蓝微滤液中小分子类成分,并进一步提高绞股蓝总皂苷浓度,调控溶液中胶束状态,选择孔径 M_w 600~800 的纳滤膜进行分离,调节跨膜压力差在 1.0~1.5 MPa,将截留端和进液端置于储液罐中,对绞股蓝微滤液进行纳滤分离,待纳滤浓缩液体积降至原体积 1/3 处时,采用纯化水补足体积至原体积,继续纳滤分离,重复操作 3 次,待浓缩液体积降至原体积 1/3 时,停止纳滤,收集纳滤浓缩液。

2.3 超滤精制分离

通过微滤-纳滤预处理,提升绞股蓝皂苷浓度促进胶束形成。选择超滤膜置于膜组件系统中,将 2.0 L 纳滤浓缩液置于储液罐中,调节超声波功率、跨膜压力差 $\leq$ 0.1 MPa,将截留端与进液端置于储液罐中,收集超滤液端溶液,待储液罐中溶液体积无法维持分离时,储液罐中加入纯化水,待滤液端收集溶液达到 2.0 L 时,即完成超滤分离。

单因素考察过程中,超滤膜孔径为截留 M_w 1000、5000、10 000、30 000、50 000;超声功率 0、100、200、300、400、500、600 W、溶液 pH 值 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,其中固定操作参数为超滤膜孔径截留 M_w 5000、超声功率 100 W, pH 值 5.0。

为了纯化绞股蓝总皂苷,通过超声调控溶液中胶束缔合状态,以绞股蓝皂苷 A、芦丁、总蛋白转移率为指标,结合膜通量参数,采用 Design-Expert 8.06 软件,分析超滤膜孔径(A,以截留 M_w 表示)、超声功率(B)、pH 值(C)参数对分离精制效率的影响,实验方案见表 2。

2.4 指标检测

2.4.1 总蛋白 参照 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒操作规程^[12],测定待测样品中蛋白质量浓度,评价

分离参数对蛋白质分离效果。

2.4.2 多糖 根据硫酸-蒽酮法^[13],精密量取葡萄糖对照品溶液 0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mL 置于 100 mL 量瓶中,纯化水稀释至刻度,摇匀。精密吸取系列质量浓度葡萄糖溶液 2 mL 于 10 mL 具塞刻度试管中,各加入 6 mL 硫酸蒽酮溶液,摇匀,迅速置于冰水浴中冷却,然后置沸水浴中加热 10 min 后,再在冷水浴中冷却。于 620 nm 测吸光度(A)值,以葡萄糖质量浓度(C)为横坐标,A 值为纵坐标进行线性回归分析,绘制葡萄糖质量浓度与 A 值标准曲线为 $A=0.014\ 4\ C-0.000\ 2$, $R^2=0.999\ 7$,结果表明葡萄糖在 10.00~25.00 mg/mL 与 A 值线性关系良好。该方法的精密度、重复性及加样回收率均符合要求,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 绞股蓝总皂苷 参考文献中检测方法^[14],以吸光度值为纵坐标(Y),绞股蓝皂苷 A 的质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=4.308\ 6\ X-0.088\ 3$, $R^2=0.999\ 6$,结果表明绞股蓝皂苷 A 在 0.06~0.21 mg/mL 与 A 值线性关系良好。该方法精密度、重复性及加样回收率均符合要求,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 绞股蓝皂苷 A 参考文献中色谱条件^[15],精密吸取绞股蓝皂苷 A 对照品溶液 1、2、5、10、20、50 μ L,高效液相色谱仪检测,以峰面积为纵坐标(Y_1),对照品进样量为横坐标(X_1),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程为 $Y_1=601\ 728\ X_1-35\ 681$, $R^2=0.998\ 6$,结果表明绞股蓝皂苷 A 在 0.25~12.50 μ g 线性关系良好。该方法精密度、重复性及加样回收率均符合要求,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 芦丁 参考文献中色谱条件^[16],精密吸取芦丁对照品溶液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL 分别置于 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,高效液相色谱仪检测,以峰面积为纵坐标(Y_2),对照品溶液质量浓度为横坐标(X_2),进行线性回归,得线性回归方程为 $Y_2=15.72\ X_2+24.89$, $R^2=0.999\ 3$,结果表明芦丁在 4.2~84.0 μ g/mL 线性关系良好。该方法精密度、重复性及加样回收率均符合要求,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 转移率计算 根据高效液相色谱法、分光光度法、试剂盒中操作规程,检测并采用标准曲线计算待样品中指标质量浓度,结合分离前后体积参数,

表 2 超滤分离因素与水平

Table 2 Factors and levels of nanofiltration separation

水平	A(截留 M_w)	B/W	C
-1	1000	200	6.0
0	5000	300	7.0
+1	10 000	400	8.0

分别计算转移率 (T_r)、总转移率 (T_{tr})。

$$T_r = C_1 V_1 / C_2 V_2$$

$$T_{tr} = T_{r1} T_{r2} \cdots T_{rx}$$

T_{r1} 为步骤 1 的成分转移率, T_{rx} 为步骤 x 的成分转移率, C_1 和 V_1 为微滤液、纳滤浓缩液、超滤液中待测指标的质量浓度和体积, C_2 和 V_2 分别为微滤、纳滤、超滤原液中待测指标质量浓度和体积。

超滤透过率采用转移率公式计算。

2.5 微滤-纳滤前处理对成分的影响

借助微滤与纳滤分离优势, 指标性成分转移率见表 3, 分析发现微滤可以高效去除绞股蓝提取液中的蛋白与多糖, 同时绞股蓝中皂苷、黄酮均可以透过微滤膜。基于纳滤分离的电荷排斥及孔径筛分原理, 大分子蛋白较好的保存在浓缩液中, 而多糖转移率下降, 推测是小分子单糖、二糖、寡糖等容易透过纳滤膜孔, 皂苷类成分得到较好的保留, 黄酮类代表成分芦丁损失 17.6%。

2.6 考察因素对指标性成分的影响

2.6.1 超滤膜孔径选择 如表 4 所示, 在膜孔径为截留 M_w 5000~10 000, 绞股蓝浓缩液中 5 种指标性成分透过率出现明显转折。经过微滤-纳滤前处理后, 溶液中的蛋白和多糖均属于大分子类化合物, 在系列孔径超滤膜中呈现出透过率缓慢上升的趋势。而绞股蓝皂苷类成分与芦丁在膜孔径为截留 M_w 1000、5000 时, 呈现出的透过率差异, 主要由

表 3 微滤-纳滤前处理对绞股蓝中指标性成分转移率的影响
Table 3 Effect of microfiltration-nanofiltration pretreatment on transfer rate of indexes

前处理	转移率/%				
方法	总蛋白	多糖	绞股蓝总皂苷	绞股蓝皂苷 A	芦丁
微滤	26.4	37.2	97.6	98.3	94.5
纳滤	91.5	22.7	96.4	99.6	82.4

表 4 超滤膜孔径对成分透过率的影响

Table 4 Effect of ultrafiltration pore size on transmittance of indexes

膜孔径	透过率/%				
(M_w)	总蛋白	多糖	绞股蓝总皂苷	绞股蓝皂苷 A	芦丁
1000	3.4	2.5	9.6	10.4	32.5
5000	4.5	4.6	15.7	21.6	62.6
10 000	16.4	6.9	84.5	87.6	79.3
30 000	21.8	12.3	95.2	94.6	88.7
50 000	27.7	16.5	97.6	98.3	98.1

表 5 超声功率对成分透过率的影响

Table 5 Effect of ultrasonic power on transmittance behavior of indexes

功率/ W	透过率/%				
	总蛋白	多糖	绞股蓝总皂苷	绞股蓝皂苷 A	芦丁
0	4.5	4.6	15.7	21.6	62.6
100	4.2	3.8	16.2	21.4	72.2
200	4.9	2.6	19.5	22.8	83.7
300	5.5	3.7	32.8	36.9	89.5
400	5.9	3.4	45.2	48.7	92.6
500	6.5	3.3	47.1	50.5	94.3
600	6.9	4.2	46.9	52.6	95.1

孔径筛分效应引起的^[17], 也为绞股蓝浓缩液中黄酮与皂苷类成分的拆分提供了理论可行性。

2.6.2 超声功率考察 对比表 5 中超声功率对绞股蓝中成分的影响, 其中绞股蓝总皂苷及绞股蓝皂苷 A 透过率与超声功率具有明显相关性, 当功率高于 200 W 时绞股蓝皂苷透过率呈现出升高趋势, 达到 400 W 后趋于稳定。同时, 芦丁出现相似分离行为。通过超声处理, 水溶液中的绞股蓝皂苷类成分存在状态发生改变, 因单分子及低分子态皂苷比例增加, 吸附在或嵌合在绞股蓝皂苷胶束中的黄酮类成分芦丁逐步释放至溶液中, 容易通过超滤膜, 引起透过率升高。

2.6.3 pH 值考察 通过改变溶液酸碱度, 调节黄酮类成分存在状态, 进一步放大黄酮类成分与皂苷类成分的分离差异。分析表 6 中数据, pH 值未对皂苷、蛋白和多糖的膜分离行为产生明显影响, 而芦丁呈现透过率逐步升高的规律, 是由于黄酮类成分在溶液中逐步离子化, 降低成分表面能, 以及与膜分离层的界面效应。芦丁 M_w 为 610.52, pK_a 为 6.17, 当溶液中 pH 8.0 时, 芦丁主要以离子态形式存在, 理论上可以通过孔径为截留 M_w 5000 的超滤膜, 但

表 6 pH 值对成分透过率的影响

Table 6 Effect of pH on transmittance of indexes

pH 值	透过率/%				
	总蛋白	多糖	绞股蓝总皂苷	绞股蓝皂苷 A	芦丁
4	4.8	4.3	15.2	20.4	56.3
5	4.5	4.6	15.7	21.6	62.6
6	5.7	5.9	16.5	20.7	64.5
7	4.6	6.2	16.2	22.9	69.7
8	4.1	7.4	16.6	23.6	71.4

透过率仅为 71.4%，但仍有接近 30% 的芦丁未解离至溶液中，而难以通过超滤膜。

2.7 响应面法分离参数优化及显著性分析

基于单因素对指标性成分分离的影响，在截留 M_w 1000~10 000 超滤膜中多糖、蛋白的透过行为

相对稳定，同时绞股蓝皂苷 A 与绞股蓝总皂苷的分离行为相似，选择绞股蓝皂苷 A 和芦丁为指标进行参数优化。采用 Design-Expert 8.06 软件中 Box-Behnken 中心组合设计原理，试验设计及结果见表 7，方差分析见表 8。

表 7 超声辅助超滤的响应曲面设计与结果

Table 7 Response surface design and results of ultrasound-assisted ultrafiltration

试验号	A	B/W	C	透过率/%		试验号	A	B	C	透过率/%	
				绞股蓝皂苷 A	芦丁					绞股蓝皂苷 A	芦丁
1	5000 (0)	400 (+1)	8.0 (+1)	30.2	99.6	10	5000 (0)	300 (0)	7.0 (0)	36.4	95.2
2	1000 (-1)	400 (+1)	7.0 (0)	22.6	87.5	11	5000 (0)	200 (-1)	6.0 (-1)	23.4	82.0
3	10 000 (+1)	400 (+1)	7.0 (0)	94.3	96.2	12	5000 (0)	300 (0)	7.0 (0)	32.4	99.7
4	1000 (-1)	300 (0)	6.0 (-1)	15.8	73.2	13	5000 (0)	300 (0)	7.0 (0)	35.5	97.1
5	5000 (0)	400 (+1)	6.0 (-1)	48.3	90.3	14	1000 (-1)	300 (0)	8.0 (+1)	14.6	86.7
6	10 000 (+1)	300 (0)	6.0 (-1)	90.0	94.6	15	10 000 (+1)	300 (0)	8.0 (+1)	89.3	94.4
7	1000 (-1)	200 (-1)	7.0 (0)	12.6	76.5	16	5000 (0)	300 (0)	7.0 (0)	33.7	93.8
8	5000 (0)	300 (0)	7.0 (0)	34.7	93.5	17	10 000 (+1)	200 (-1)	7.0 (0)	87.8	93.2
9	5000 (0)	200 (-1)	8.0 (+1)	32.6	92.1						

表 8 响应曲面二次回归模型的方差分析

Table 8 Analysis of variance of regression model

方差来源	自由度	绞股蓝皂苷 A					芦丁				
		平方和	均方	F 值	P 值	显著性	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
模型	9	12 909.24	1434.36	499.777	<0.000 1	极显著	884.45	98.27	22.233	0.000 2	极显著
A	1	10 937.20	10 937.20	3 810.871	<0.000 1	极显著	371.28	371.28	83.970	<0.000 1	极显著
B	1	184.89	184.89	64.422	<0.000 1	极显著	103.80	103.80	23.484	0.001 9	极显著
C	1	14.32	14.32	4.989	0.063 1		120.55	120.55	27.274	0.001 2	极显著
AB	1	3.65	3.65	1.272	0.296 6		16.30	16.30	3.688	0.096 3	
AC	1	0.20	0.20	0.068	0.801 2		48.97	48.97	11.079	0.012 6	显著
BC	1	186.32	186.32	64.919	<0.000 1	极显著	0.16	0.16	0.036	0.854 5	
A ²	1	964.51	964.51	336.066	<0.000 1	极显著	171.32	171.32	38.760	0.000 4	极显著
B ²	1	1.02	1.02	0.355	0.569 6		14.68	14.68	3.321	0.111 2	
C ²	1	8.34	8.34	2.906	0.132 0		37.71	37.71	8.532	0.022 3	显著
残差	7	20.09	2.87				30.95	4.42			
失拟项	3	10.40	3.47	1.434	0.358 1		4.42	1.47	0.222	0.876 7	
纯误差	4	9.69	2.42				26.53	6.63			
总离差	16	12 929.34					915.40				

对表 8 中绞股蓝皂苷 A 及芦丁的数学模型进行方差分析，其中所考察因素中膜孔径、超声功率对绞股蓝皂苷 A 分离行为影响显著，溶液 pH 值并不会引起绞股蓝皂苷胶束状态变化，对分离行为未产生显著影响。

绞股蓝皂苷 A 透过率与考察变量的回归方程为

绞股蓝皂苷 A 透过率 = $38.46 + 36.97 A + 4.82 B - 1.34 C - 0.95 AB + 0.22 AC - 6.83 BC + 15.37 A^2 + 0.49 B^2 - 1.41 C^2$ 。回归方程模型 $P < 0.000 1$ ，模型高度显著，失拟项 $P = 0.358 1$ ，说明所构建的 2 次回归模型成立。多元相关系数 $R^2 = 0.998 4$ ，预测 $R^2 = 0.986 0$ ，调整 $R^2 = 0.996 4$ ，说明该模型可用于

绞股蓝皂苷 A 的超滤分离行为预测与分析。

膜孔径、超声功率、pH 值均对芦丁超滤分离有显著影响, 芦丁透过率与考察变量的回归方程为芦丁透过率 $=96.70+6.81 A+3.61 B+3.89 C-2.01 AB-3.49 AC-0.20 BC-6.48 A^2-1.87 B^2-2.99 C^2$, 2 次回归模型 $P=0.000 2$, 模型高度显著, 失拟项不显著 ($P=0.876 7$), 说明所构建的 2 次回归模型成立。多元相关系数 $R^2=0.966 2$, 预测 $R^2=0.976 7$, 调整 $R^2=0.922 7$, 说明该模型可用于芦丁的超滤分离行为预测与分析。

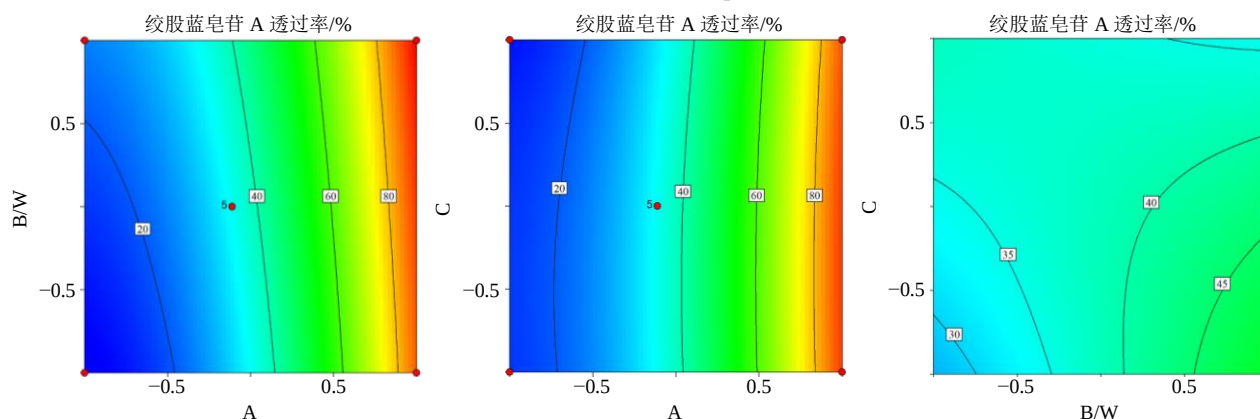


图 1 绞股蓝皂苷 A 考察因素相关性等位线图

Fig. 1 Correlation between gypenoside A and factors

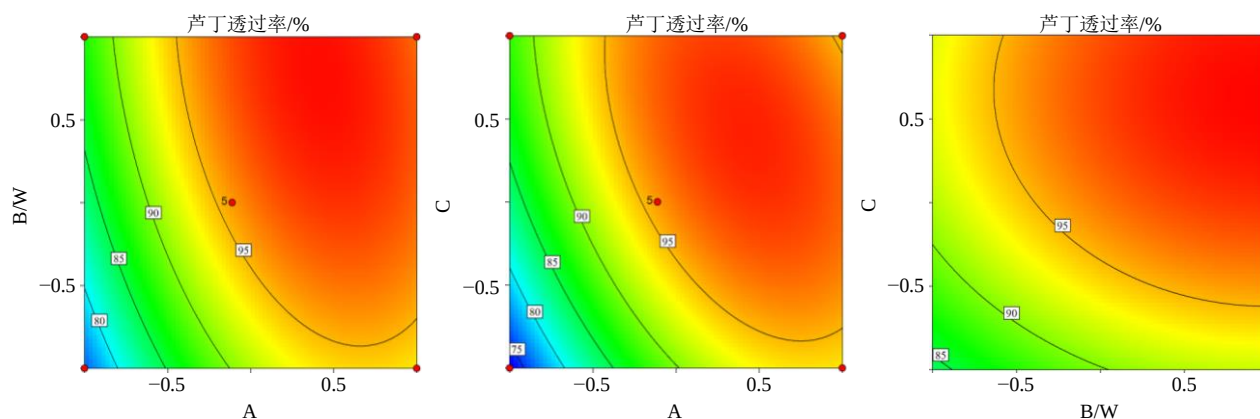


图 2 芦丁考察因素相关性等位线图

Fig. 2 Correlation between rutin and factors

400 W, pH 值 8.0 时, 芦丁在孔径截留 $M_w 1000$ 超滤膜中的透过率大于 90%。而在 pH 值单因素考察时, 截留 $M_w 5000$ 超滤膜中的透过率仅为 71.4%。同时, 超声功率、pH 值对大分子蛋白、多糖的分离未产生明显影响, 综合分析发现在超声功率和 pH 值协同作用下, 芦丁从胶束中脱离并离子化, 进而通过超滤膜, 从而提高透过率。

2.9 绞股蓝总皂苷部位精制模式

以绞股蓝总皂苷为指标, 建立去除大分子及以

2.8 绞股蓝皂苷与黄酮类成分的分离机制

分析考察因素与绞股蓝皂苷 A 的等位线图 (图 1), 膜孔径为截留 $M_w 3000$ 时, 随着超声功率的增加, 绞股蓝皂苷 A 透过率升高趋势明显, 而随着孔径增加, 此现象并未加剧。说明缔合成胶束状态存在的绞股蓝皂苷, 在相应超声功率作用下引起的空化和湍流效应^[18], 溶液中单分子态、低分子缔合态比例增加, 但仍是高分子胶束为主要状态。

对比芦丁的等位线图 (图 2), 膜孔径、超声功率、pH 值均对其透过率成正相关。当超声功率为

黄酮类成分为代表的小分子成分, 设定绞股蓝皂苷 A 透过率 90.0%、芦丁透过率 95% 为目标值, 采用 Design-Expert 8.06 软件优选参数为膜孔径截留 $M_w 10\ 000$ 、功率 400 W、pH 值 7.8; 同时, 以绞股蓝皂苷 A 透过率 15.0%、芦丁透过率 90% 为目标值, 优选参数为膜孔径截留 $M_w 1000$ 、功率 300 W、pH 值 7.9。

采用绞股蓝提取液进行验证, 步骤 1: $0.1\ \mu\text{m}$ 微滤膜耦合截留 $M_w 800$ 纳滤膜前处理; 步骤 2: 采

用上述 2 步超滤耦合超声的分离模式进行分离, 计算指标性成分的转移率, 结果见表 9。通过膜分离与超声耦合, 结合成分物化性质差异进行系统拆分, 其中目标成分绞股蓝皂苷的总转移率为 79.7%, 其

他成分的转移率均低于 6%。

分析绞股蓝皂苷类成分在精制过程中的含量变化, 结果见表 9。精制过程中, 微滤、截留 M_w 10 000 超滤环节对总蛋白和多糖含量影响明显。在精制模

表 9 精制模式下的成分转移率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Component transfer rate by refined mode ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	转移率/%				
	总蛋白	多糖	绞股蓝总皂苷	绞股蓝皂苷 A	芦丁
微滤液	27.3±1.6	35.5±2.3	98.2±0.8	97.4±1.1	95.7±0.9
纳滤浓缩液	91.5±0.4	22.7±1.2	96.4±0.4	99.6±0.1	82.3±1.6
截留 M_w 10 000 超滤液	5.2±0.8	4.8±0.5	93.1±0.8	92.5±0.7	93.6±2.1
截留 M_w 1000 截留液	87.3±1.7	32.6±1.0	90.4±1.3	87.2±1.5	7.9±0.3
总转移率	1.1	0.1	79.7	78.2	5.8

式下, 固含物从 102.18 g 下降至 22.91 g, 除杂率为 77.58%。绞股蓝总皂苷在固含物中占比由 17.40% 升高至 61.81%, 精制效果明显。

3 讨论

中药皂苷类成分的分离多采用树脂吸附、层析色谱等技术, 在热处理、环境污染等方面存在一定的局限性。膜分离多用于溶液体系的预处理、除菌过滤, 难以用于复杂体系中成分系统拆分。本实验根据成分物化性质, 通过溶液环境、外加力场调控成分存在状态, 放大成分分离行为差异, 通过膜组合技术, 构建的皂苷类成分分离模式, 总固体除杂率 77.58%, 绞股蓝总皂苷含量提升 3 倍以上, 在总固体中占比 61.81%, 但其中仍有与皂苷物化性质相似的成分, 基于膜分离原理和应用的局限性, 尚需进一步与色谱技术结合, 进一步提升绞股蓝总皂苷纯度。

绞股蓝总皂苷部位具有较好水溶性, 在亲水性材质膜组件中吸附行为不明显。但是在微滤过程中, 经离心处理的绞股蓝提取液会引起膜污染, 膜通量下降明显, 通过控制跨膜压力差在 0.05~0.10 MPa, 降低膜面浓差极化效应。同时, 微滤分离完成后, 采用 0.1% 氢氧化钠水溶液清洗, 膜通量可以恢复至 95% 以上, 提示多糖、蛋白在膜表面形成的凝胶层为主要污染因素。

中药皂苷类成分多具有表面活性, 在满足临界胶束浓度时, 通过分子间氢键缔合形成胶束, 以降低分子表面能, 提高溶液稳定性。绞股蓝提取液中皂苷类成分胶束形成过程, 也有黄酮类成分参与其中, 本实验选择芦丁为绞股蓝黄酮的代表性成分,

因水溶性差, 容易通过吸附、嵌合或包裹的方式分布于绞股蓝皂苷胶束中, 基于孔径筛分原理, 以缔合态、分子态、离子态的芦丁呈现出差异性分离行为, 采用溶液碱化和超声处理, 促进了缔合态向分子态、离子态的转移, 从而改善芦丁的超滤传质效率。然而, 绞股蓝皂苷的胶束缔合机制, 以及黄酮等其他类成分的参与规律尚不明确, 限制了皂苷类成分的精制纯化和相应分离技术的应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang X S, Shi G H, Sun Y Y, et al. Triterpenes derived from hydrolyzate of total *Gynostemma pentaphyllum* saponins with anti-hepatic fibrosis and protective activity against H_2O_2 -induced injury [J]. *Phytochemistry*, 2017, 144: 226-232.
- [2] 张西珍, 苏光悦, 夏晓艳, 等. 天然达玛烷型皂苷降血糖作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(15): 2758-2763.
- [3] 刘明兵, 石国慧, 张宏宇, 等. 绞股蓝次级皂苷 H 诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(5): 828-832.
- [4] 王同壮, 王 尚, 马 朋, 等. 绞股蓝叶水提物对糖尿病大鼠降血糖作用研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2828-2834.
- [5] 诸夔姐, 寿旗扬, 田雨闪, 等. 绞股蓝治疗糖尿病的效应成分群及作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2248-2257.
- [6] 范冬冬, 匡艳辉, 董利华, 等. 基于“伴随标志物”在线控制技术的绞股蓝总皂苷纯化工艺及成分鉴定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(7): 1331-1337.
- [7] Tsai Y C, Lin C L, Chen B H. Preparative

- chromatography of flavonoids and saponins in *Gynostemma pentaphyllum* and their antiproliferation effect on hepatoma cell [J]. *Phytomedicine*, 2010, 18(1): 2-10.
- [8] 李存玉, 牛学玉, 刘桓姪, 等. 多指标评价有机相中纳滤分离丹酚酸 B 的适用性 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1328-1333.
- [9] Lively R P, Sholl D S. From water to organics in membrane separations [J]. *Nat Mater*, 2017, 16(3): 276-279.
- [10] 陈雅萍, 王桂有, 封亮, 等. 丹参滴注液中酚酸类活性成分在中空纤维膜超滤过程中迁移规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 548-554.
- [11] 李存玉, 支兴蕾, 牛学玉, 等. 基于成分状态分析溶液环境对三七总皂苷超滤分离行为的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5246-5252.
- [12] 王丽, 王吟, 胡业勤, 等. BCA 法检测组分百日咳疫苗中间品蛋白含量的可行性评价 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(9): 1048-1053.
- [13] 林丽, 王琰, 王福星, 等. 基于硫酸-蒽酮法对不同产地藏药线叶龙胆多糖的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2774-2776.
- [14] 杨长花, 刘峰, 户宪珍, 等. 响应曲面法优化绞股蓝中总皂苷和总黄酮的提取工艺研究 [J]. 陕西农业科学, 2018, 64(7): 52-56.
- [15] 马玉凤, 黄文, 赵芸卉, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中绞股蓝皂苷 XLIX 的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5528-5531.
- [16] 彭亮, 李诒光, 陈杰, 等. HPLC 测定不同产地、不同品种绞股蓝中芦丁和槲皮素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 45-47.
- [17] Li C Y, Ma Y, Li H Y, et al. A convenient method for the determination of molecular weight cut-off of ultrafiltration membranes [J]. *Chin J Chem Eng*, 2017, 25(1): 62-67.
- [18] 孙朋垚. 超声波耦合酶辅助连续逆流黄芪多糖提取过程的建模、仿真及优化 [D]. 广州: 华南理工大学, 2019.

[责任编辑 郑礼胜]