

· 中药工业 ·

穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元提取工艺优化

刘巾玮¹, 胥维昌^{2*}, 王远^{2*}, 阎峰¹, 孙丽娟², 谢青云¹

1. 沈阳化工大学, 辽宁 沈阳 110142;

2. 沈阳化工研究院, 辽宁 沈阳 110023

[摘要] 目的: 优化穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的提取工艺, 开发一种在酸水解前的酶解预处理工艺。方法: 利用酶的生物降解作用, 断开薯蓣皂苷与纤维素的葡萄糖苷键, 从而改变植物细胞壁的通透性。通过单因素试验考察酶添加量、酶解温度、酶解时间、酶解 pH、料液比对薯蓣皂苷得率的影响, 并在此基础上通过 Box-Behnken 响应面分析法优化薯蓣皂苷的提取工艺条件。结果: 纤维素酶提取薯蓣皂苷的最佳工艺条件为纤维素酶用量 400 U、酶解温度 55 °C、酶解时间 8 h、酶解 pH 5.5、料液比 1:30, 在此条件下薯蓣皂苷得率为 9.78%。酸解得到薯蓣皂苷元得率为 32.07%, 薯蓣皂苷元纯度为 70.89%。结论: 通过一步纤维素酶预处理可以使薯蓣皂苷元得率提高 140.59%, 薯蓣皂苷元纯度提高 41.21%。该方法方便、高效, 可为薯蓣皂苷元的进一步研究和工业化生产提供参考。

[关键词] 穿龙薯蓣; 纤维素酶; Box-Behnken 响应面法; 薯蓣皂苷元

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0144-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220623001

Optimization of Extraction Technology of Diosgenin from *Dioscorea nipponica*LIU Jin-wei¹, XU Wei-chang^{2*}, WANG Yuan^{2*}, YAN Feng¹, SUN Li-juan², XIE Qing-yun¹

1. Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

2. Shenyang Research Institute of Chemical Industry, Shenyang 110023, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction process of diosgenin from *Dioscorea nipponica* and develop an enzymatic pretreatment process before acid hydrolysis. **Methods:** The permeability of plant cell wall can be changed by breaking the glucoside bond between diosgenin and cellulose through enzyme biodegradation. Single factor experiment was conducted to investigate the effects of enzyme addition amount, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time, enzymatic hydrolysis pH, and solid-liquid ratio on the yield of diosgenin. On this basis, Box-Behnken response surface analysis was used to optimize the extraction conditions of diosgenin. **Results:** The optimum conditions for the extraction of diosgenin by cellulase were cellulase dosage of 400 U, enzymatic hydrolysis temperature of 55 °C, enzymatic hydrolysis time of 8 h, enzymatic hydrolysis pH of 5.5, solid-liquid ratio of 1:30. Under these conditions, the yield of diosgenin was 9.78%. **Conclusion:** The yield of diosgenin can be increased by 140.59% and the purity of diosgenin can be increased by 41.21% through the one-step cellulase pretreatment. The method is convenient and efficient, which provides a theoretical basis for further research and industrial production of diosgenin.

[Keywords] *Dioscorea nipponica* Makino; cellulase; Box-Behnken response surface analysis; diosgenin

穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Makino 是薯蓣科薯蓣属植物, 又称穿地龙、穿龙骨、地龙骨、常山等, 主要分布在我国东北、华北、山东、河南、安徽、陕西、甘肃、宁夏、青海、四川等地^[1-2]。

穿龙薯蓣的主要化学成分为甾体皂苷类, 包括

水不溶性皂苷与水溶性皂苷, 其中水不溶性皂苷有薯蓣皂苷和纤细皂苷; 还含有对-羟苄基酒石酸、25D-螺甾-3,5-二烯、尿囊素、氨基酸等成分^[3-4]。穿龙薯蓣根茎中的薯蓣皂苷质量分数为 1.36%~4.60%, 总皂苷水解产生薯蓣皂苷元的平均质量分

* [通信作者] 胥维昌, 教授级高级工程师, 研究方向: 天然产物分析; E-mail: xuweichang@sinochem.com
王远, 教授级高级工程师, 研究方向: 天然产物分析; E-mail: wangyuan@sinochem.com

数为0.93%~2.26%^[5-6]。其有效成分甾体总皂苷具有抗肿瘤、改善心血管功能、调节免疫、镇咳平喘、抗炎镇痛的功效。水解后得到的薯蓣皂苷元是合成避孕药、甾体激素类药物的重要原料,具有抗肿瘤、抗炎、增强免疫力、保护肝脏等功效^[7-10],是世界上少有的几种天然甾体激素原料之一。

传统的提取薯蓣皂苷元的方法有酸水解法、预发酵法、微生物法、酶解法等^[11]。其中,最常见的方法是直接酸水解法,即采用强酸对植物中的淀粉、纤维素、色素等有机物质进行降解。但由于穿龙薯蓣中的薯蓣皂苷紧密结合存在于细胞壁中,细胞壁的韧性使薯蓣皂苷不易分离纯化,加上根茎中的淀粉含量高,故酸水解过程具有污染严重、废水量大、提取效率低等缺点^[12-13]。针对以上问题,笔者研究了一种在酸水解前的预处理工艺,利用生物酶专一性好、条件温和、绿色环保的特点解决直接酸水解法中薯蓣皂苷元得率和纯度低的问题。本研究分别考察了纤维素酶、 α -淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶及木聚糖酶对薯蓣皂苷得率的影响,并通过单因素试验及响应面优化得到提取薯蓣皂苷元的最佳工艺,可为其工业化生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

AL204型电子天平、E28型pH计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];U3000型高效液相色谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药

纤维素酶(10 000 U·g⁻¹,批号:C805042)、淀粉葡萄糖苷酶(100 000 U·mL⁻¹,批号:A800618)、 α -淀粉酶(10 000 U·g⁻¹,批号:A800731)、木聚糖酶(100 000 U·g⁻¹,批号:X832362)均来源于上海麦克林生化科技有限公司;对照品薯蓣皂苷(批号:BP0503-100 mg,纯度≥98%)、薯蓣皂苷元(批号:BP0504-100 mg,纯度≥98%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司;乙酸、硫酸、高氯酸、石油醚(60~90℃)、香草醛、乙酸钠均为分析纯,甲醇为色谱纯,以上试剂均来源于国药集团化学试剂有限公司;实验用水为去离子水。

穿山龙提取物(70%乙醇提取,批号:21072903,薯蓣皂苷质量分数为4.4%,总皂苷质量分数为28%)购自陕西天行健生物化工技术有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

采用高效液相色谱仪测定薯蓣皂苷及薯蓣皂苷元含量。色谱条件:Agilent XDB-C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~7.0 min, 55%A; 7.0~25.0 min, 85%A; 25.0~30.0 min, 55%A);流速为1.0 mL·min⁻¹;检测波长为203 nm;柱温为30℃;进样量为10 μ L。按公式(1)计算薯蓣皂苷得率,按公式(2)计算薯蓣皂苷元得率。

酶解后样品中总皂苷含量测定采用参考文献[14]中的高氯酸比色法。

$$\text{薯蓣皂苷得率} = \frac{\text{样品中薯蓣皂苷质量}}{\text{原粉质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{薯蓣皂苷元得率} = \frac{\text{样品中薯蓣皂苷元质量}}{\text{原粉中总皂苷质量}} \times 100\% \quad (2)$$

2.2 薯蓣皂苷元的提取工艺

2.2.1 直接酸水解法 根据参考文献[15]中的水解条件,称取穿山龙提取物100 mg置于50 mL圆底烧瓶中,加入水3 mL使其分散均匀,并加入硫酸0.408 mL,配制成浓度为2.5 mol·L⁻¹的水解体系,在90℃条件下进行酸解,滤过,用蒸馏水反复冲洗滤渣至中性,将滤渣烘干,向滤渣中加入石油醚,冷却回流提取薯蓣皂苷元,滤过,将滤液中的石油醚回收,得到薯蓣皂苷元样品。用2.1项下色谱条件测定薯蓣皂苷元含量。

2.2.2 酶解预处理工艺 薯蓣皂苷的酶解:称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中,加入乙酸-乙酸钠缓冲溶液使样品分散均匀,调节体系的pH为5.5,加入一定量的酶制剂,加热搅拌,最后进行高温灭活,得到酶解液。

薯蓣皂苷的提取:向酶解液中加入80%乙醇,加热回流4 h,对酶解液中的薯蓣皂苷进行提取。滤过,将滤液中的溶剂减压蒸干,得到薯蓣皂苷醇提取物。分别采用2.1项下色谱条件测定薯蓣皂苷和总

皂苷的含量。

薯蓣皂苷元的提取：按2.2.1项下方法向2.2.2项下薯蓣皂苷醇提取物中加入硫酸0.408 mL，配制成浓度为 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水解体系，在90℃条件下进行酸解，后续处理同2.2.1项下方法。

2.3 单因素试验

2.3.1 酶种类对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，加入少量的乙酸-乙酸钠缓冲溶液使样品分散均匀，调节体系的pH为5.5，分别加入纤维素酶、糖化酶、 α -淀粉酶、木聚糖酶，加热搅拌，最后进行高温灭活。后续处理同2.2.2项下方法。

2.3.2 酶添加量对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，分别加入纤维素酶100（10%）、200（20%）、300（30%）、400（40%）、500（50%）、600 U（60%），分别在体系pH 5.5、温度55℃、酶解时间3 h、料液比1:30条件下加热搅拌。后续处理同2.2.2项下方法。

2.3.3 酶解温度对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，酶解温度分别为40、50、55、60、70、80℃，在体系pH 5.5、纤维素酶添加量200 U、酶解时间3 h、料液比1:30条件下加热搅拌。后续处理同2.2.2项下方法。

2.3.4 酶解时间对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，酶解时间分别为2、3、4、5、6、7、8 h，在体系pH 5.5、纤维素酶添加量200 U、酶解温度55℃、料液比1:30条件下加热搅拌。后续处理同2.2.2项下方法。

2.3.5 酶解pH对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，体系pH分别为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0，在纤维素酶添加量200 U、酶解温度55℃、酶解时间3 h、料液比1:30条件下加热搅拌。后续处理同2.2.2项下方法。

2.3.6 料液比对薯蓣皂苷得率的影响 准确称取穿山龙提取物100 mg于烧杯中，共6份，体系料液比分别为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60，在纤维素酶添加量200 U、酶解温度55℃、酶解时间3 h、pH 5.5条件下加热搅拌。后续处理同2.2.2项下方法。

2.4 Box-Behnken响应面优化

根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理选取纤维素酶用量（A）、酶解时间（B）、酶解温度（C）3个变量，采用响应面分析方法对其进行优化，以薯蓣皂苷得率（Y）为指标，设计三因素三水平的响应面试验，因素与水平见表1。

表1 酶解法提取薯蓣皂苷工艺响应面试验的影响因素与水平

水平	A/U	B/h	C/℃
1	100	4.00	40
2	250	7.00	60
3	400	10.00	80

3 结果与讨论

3.1 酶解法提取薯蓣皂苷的单因素试验

由图1可知，在相同的反应条件下，纤维素酶的酶解效果明显优于糖化酶、 α -淀粉酶及木聚糖酶。综合比较选取纤维素酶进行后续提取薯蓣皂苷的实验。在纤维素酶添加量为0~200 U时，薯蓣皂苷得率随着加酶量的增加而升高，在加酶量为200~400 U时，薯蓣皂苷增加的速度减慢，加酶量400 U以后薯蓣皂苷开始下降。从经济性的角度考虑，最佳加酶量200 U（由于薯蓣皂苷得率与总皂苷得率变化相似，以下都以薯蓣皂苷得率进行说明）。

随着酶解温度的增加，薯蓣皂苷得率呈现先升高后下降的趋势，在温度达到55℃时，得率达到最大值，故选取最佳酶解温度为55℃。

酶解时间低于3 h时，薯蓣皂苷得率随着时间延长呈现升高趋势，在3 h后增加较为平缓，说明酶解3 h时细胞壁基本酶解完全。故选取最佳酶解时间为3 h。

薯蓣皂苷的得率随着pH的升高而增大，说明适当地提高体系的pH可以提高酶的活性，有利于薯蓣皂苷向提取溶剂中释放。当pH>5.5时，薯蓣皂苷得率开始下降，故选取最佳pH为5.5。

当料液比低于1:30时，薯蓣皂苷得率随着料液比的升高而升高。当料液比高于1:30时，薯蓣皂苷得率开始下降。从经济性角度考虑，选取最佳料液比为1:30。

3.2 响应面试验设计及结果 响应面试验设计及结果见表2。

3.2.1 回归模型的建立与检验 各因素经回归拟合

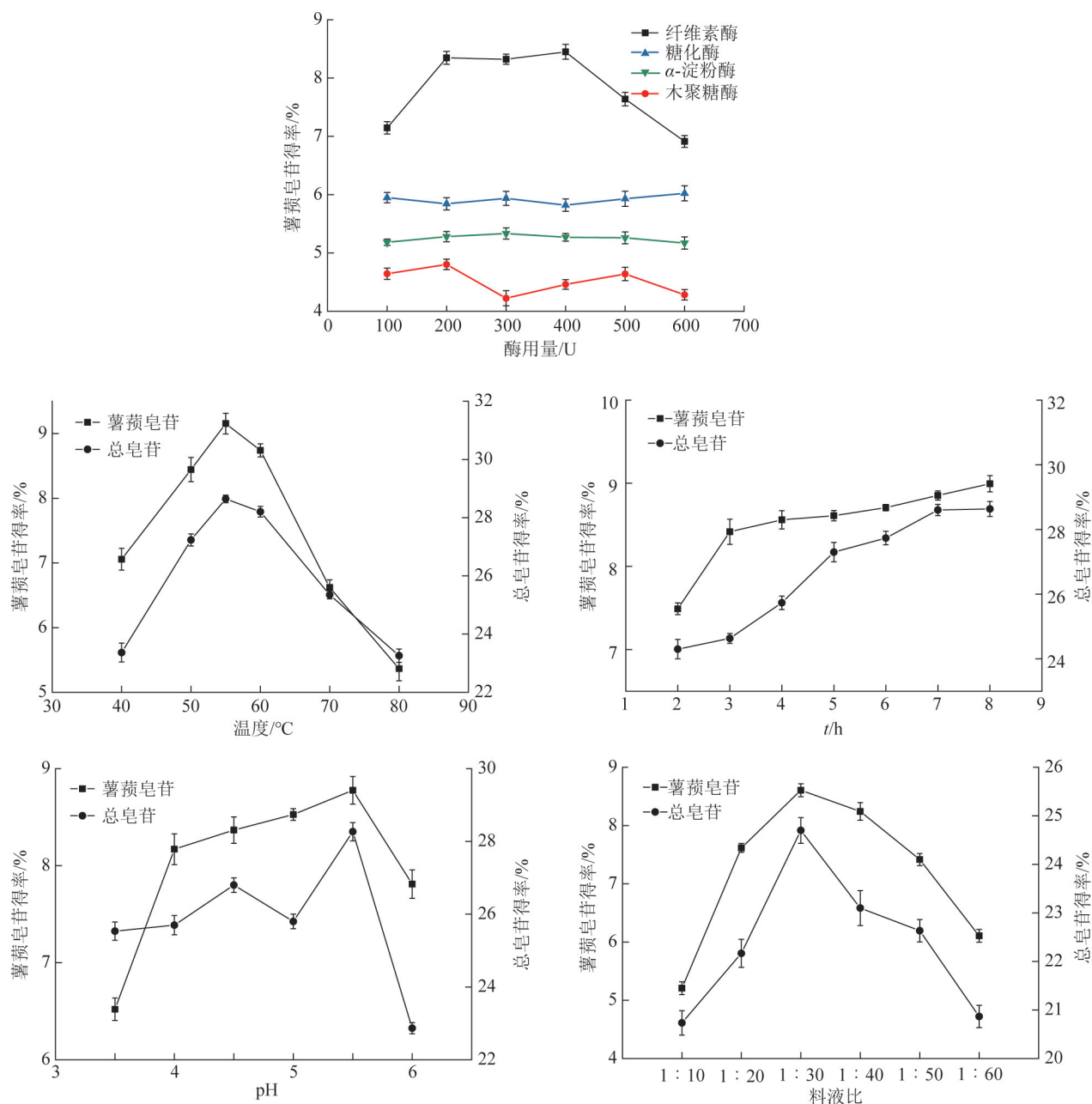


图1 酶活力、酶解温度、酶解时间、酶解pH、料液比对薯蓣皂苷得率及总皂苷得率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

后得到二次多项回归方程 $Y=9.47+0.69A+0.24B-0.89C-0.25AB-0.40AC-0.45BC-0.39A^2-0.22B^2-2.71C^2$ 。对回归方程进行方差分析, 结果见表3。

由二次回归方程可知, 一次项中, A、B、C 极显著; 二次项中 B^2 显著, A^2 、 C^2 、AB、AC、BC 极显著, 说明 AC、BC、BD 之间存在显著的交互作用, 影响因素 $C>A>B$ 。该模型达到极显著水平 ($P<0.01$), 失拟项 $P=0.2336>0.05$, 表明误差小; 模型的 $r=0.9969$, 该模型能解释 99.69% 响应值的变化, 校正决定系数 (R^2_{Adj}) 为 0.9928, 可

知该回归方程的置信度很高, 因而该模型拟合程度比较好, 误差小, 故可用于设计范围内的预测。

3.2.2 响应面图分析及最佳条件优化 响应曲面与等高线图能够直观反映各因素间的交互作用。响应面图中曲面最高点代表交互作用的极大值, 曲面弧度越大则代表两因素交互作用越显著。由图2可知, 该响应面图为向下开口的凸形曲面, 说明在选定区域内薯蓣皂苷的得率存在极大值。其中酶解温度与纤维素酶用量、酶解时间与酶解温度两组交互作用比较明显, 与方差分析结果一致。

表2 酶解法提取薯蓣皂苷工艺响应面试验设计及结果

试验号	A/U	B/h	C/°C	薯蓣皂苷得率/%
1	100	4	60	7.76
2	400	4	60	9.65
3	100	10	60	8.57
4	400	10	60	9.46
5	100	7	40	6.12
6	400	7	40	8.30
7	100	7	80	5.22
8	400	7	80	5.80
9	250	4	40	7.01
10	250	10	40	8.18
11	250	4	80	5.74
12	250	10	80	5.48
13	250	7	60	9.59
14	250	7	60	9.42
15	250	7	60	9.58
16	250	7	60	9.37
17	250	7	60	9.35

表3 酶解法提取薯蓣皂苷工艺响应面二次回归方程方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	44.390 0	9	4.930	247.19	<0.000 1
A	3.840 0	1	3.840	192.29	<0.000 1
B	0.367 0	1	0.370	18.40	0.003 6
C	6.060 0	1	6.060	303.51	<0.000 1
AB	0.250 0	1	0.250	12.53	0.009 5
AC	0.640 0	1	0.640	32.08	0.000 8
BC	0.552 8	1	0.550	27.71	0.001 2
A ²	0.617 2	1	0.620	30.94	0.000 8
B ²	0.163 0	1	0.160	8.17	0.024 4
C ²	30.660 0	1	30.660	1 536.95	<0.000 1
残差	0.139 7	7	0.020		
失拟项	0.086 6	3	0.029	2.17	0.233 6
误差	0.053 1	4	0.013		
总和	44.520 0	16			

而酶添加量与酶解时间的一组交互作用则不显著。

通过Design-Expert 8.0.6.1软件得出最佳工艺条件为酶用量389.64 U、酶解温度54.88 °C、酶解时间7.81 h,预测薯蓣皂苷的得率为9.94%。为验证最佳工艺条件,结合实际需求,控制酶用量400 U、酶解温度55 °C、酶解时间8 h,重复3次进行验证实验,得出的薯蓣皂苷得率为9.78%,与响应面试验预测值相符,说明该试验工艺条件可靠。根据最佳条件优化结果表明,本研究的薯蓣皂苷得率高于参考文献[13]中薯蓣皂苷得率。

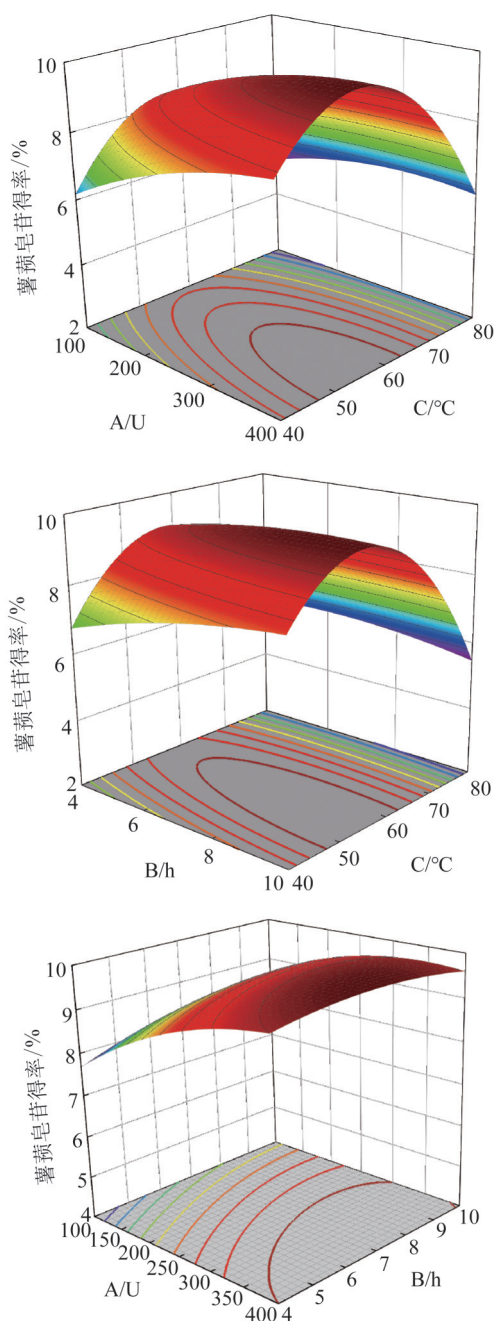


图2 酶解法提取薯蓣皂苷工艺各因素交互作用对薯蓣皂苷得率影响的响应面图

3.3 酸解试验

根据2.2项下方法进行酸解试验,并重复3次,结果见表4。得到直接酸水解法提取薯蓣皂苷元的得率为13.33%,薯蓣皂苷元纯度为50.18%。酶解预处理提取薯蓣皂苷元工艺得到薯蓣皂苷元得率为32.07%,薯蓣皂苷元的纯度为70.86%。与直接酸水解法相比,该工艺流程简单,在相同条件下,仅用一步单一酶解就使皂苷元得率提高140.59%,使

薯蓣皂苷元纯度提高了41.21%。

表4 不同工艺流程提取薯蓣皂苷元

方法	试验次数	薯蓣皂苷元得率	平均得率	薯蓣皂苷元纯度	平均纯度/%
直接酸解法	1	13.42	13.33	50.24	50.18
	2	13.61		50.16	
	3	12.96		50.14	
酶解预处理工艺	1	31.89	32.07	70.92	70.86
	2	32.05		70.56	
	3	32.27		71.10	

在此工艺生产中, 仍要借助硫酸使皂苷转化为皂苷元, 硫酸的使用不可避免。因此后续研究可考虑代谢工程、合成生物等其他新型技术手段, 开发生产薯蓣皂苷元的清洁生产工艺, 从而彻底杜绝酸的使用^[16]。

4 结论

近年来, 因为生物酶的专一性强、催化效率高及条件温和等特点, 酶解法被广大学者关注并逐渐应用于活性物质的提取, 为此笔者改进了薯蓣皂苷元的提取工艺, 在传统酸水解前增加酶解预处理工艺, 通过对纤维素酶、 α -淀粉酶、木聚糖酶及糖化酶4种生物酶的对比发现, 纤维素酶可以分解掉包裹在皂苷周围的杂质, 能够最大程度地释放皂苷。在此基础上, 通过单因素试验及响应面试验优化, 确立了纤维素酶提取薯蓣皂苷的最佳工艺条件: 纤维素酶量400 U、酶解温度55℃、pH 5.5、酶解时间8 h、料液比1:30, 薯蓣皂苷得率为9.78%。在酶解的基础上进行酸解, 得到的薯蓣皂苷元的得率为32.07%, 比传统酸水解的得率高出140.59%, 制备的薯蓣皂苷元纯度为70.86%, 比传统酸水解法的纯度高出41.21%。结果表明, 纤维素酶预处理提取薯蓣皂苷元的工艺可以解决目前薯蓣皂苷元生产过程中提取率低、纯度低的问题, 可为薯蓣皂苷元的进一步研究和工业化生产提供参考。

参考文献

[1] 朱有昌. 东北药用植物[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术

出版社, 1989: 176-177.

- [2] 张因, 康廷国, 尹海波. 中药穿龙薯蓣化学成分与药理作用的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(6): 87-90.
- [3] 方一苇, 赵家俊, 贺玉珍, 等. 穿龙薯蓣中两种水难溶性甾体皂甙的结构研究[J]. 药学学报, 1982, 17(5): 388-391.
- [4] 朱艳琴, 周志宏, 李宝才, 等. 穿山龙水溶性有效成分的研究概况[J]. 云南化工, 2005, 32(6): 64-67.
- [5] 周继铭, 杨家珍, 周泽清. 四川地区薯蓣属植物中薯蓣皂甙元的含量[J]. 中药材, 1985, 8(3): 20-21.
- [6] 孙传菊, 葛重宇, 于长杰, 等. 不同产地穿山龙中薯蓣皂苷元比较[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2415-2419.
- [7] DONG M X, MENG Z F, KUERBAN K, et al. Diosgenin promotes antitumor immunity and PD-1 antibody efficacy against melanoma by regulating intestinal microbiota[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 1039-1051.
- [8] ZHANG R, WEN L, SHEN Y, et al. One compound of saponins from *Disocorea zingiberensis* protected against experimental acute pancreatitis by preventing mitochondria-mediated necrosis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35965-35978.
- [9] HUANG C H, LIU D Z, JAN T R. Diosgenin, a plant-derived sapogenin, enhances regulatory T-cell immunity in the intestine of mice with food allergy[J]. J Nat Prod, 2010, 73(6): 1033-1037.
- [10] ZHANG X L, HAN X, YIN L H, et al. Potent effects of dioscin against liver fibrosis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9713-9724.
- [11] 赵敏, 谭大维, 余河水, 等. 薯蓣皂苷元的制备方法研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(13): 1860-1866.
- [12] 盛芳园, 何忠梅, 陈凯, 等. 薯蓣皂苷元的提取分离、检测方法及其药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 914-917.
- [13] 江慧, 孙蓉, 汪魏平, 等. 穿山龙中薯蓣皂苷酶提取工艺的优化[J]. 中成药, 2017, 39(3): 621-624.
- [14] 陈华国, 靳风云, 赵超, 等. 胡芦巴中总皂苷的含量测定[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2): 580-582.
- [15] 刘树兴, 侯屹, 李祥, 等. 硫酸水解法提取薯蓣皂苷元的工艺[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 210-213.
- [16] 吕杰, 金湘, 毛培宏. 生物技术在薯蓣皂苷及其苷元生物合成中的应用[J]. 生物技术, 2009, 19(4): 88-90.

(收稿日期: 2022-06-23 编辑: 王笑辉)