

用盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元预发酵与水解条件优化

汤兴利, 徐增莱^①, 夏冰, 史云云

[江苏省药用植物研究开发中心, 江苏省植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]
中国科学院

摘要 采用 RP-HPLC 法检测薯蓣皂苷元, 对薯蓣皂苷元提取过程中影响产率的多种因素, 分预发酵、水解 2 部分分别用单因素和正交设计的方法进行优化。结果表明: 40℃ 预发酵 16 h, 加 6% 浓 H₂SO₄, 料液比为 1:6, 温度为 121~126℃, 水解 5 h, 产率高达 3.62%, 说明预发酵与水解条件优化可以提高盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 生产薯蓣皂苷元的产率。

关键词: 盾叶薯蓣; 薯蓣皂苷元; 预发酵; 酸水解; 优化

中图分类号: TQ281.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)03-0035-03

Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* TANG Xing-li, XU Zeng-lai^①, XIA Bing, SHI Yun-yun (The Jiangsu Provincial Key Laboratory for Medicinal Plant, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(3): 35-37

Abstract: To optimize the term of extracting technology of diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, single factor and orthogonal tests were applied by optimization of extracting technology, the diosgenin was determined by RP-PHLC. The results showed that the optimization terms of spontaneous fermentation is at 40℃, 16 h, acid hydrolysis term 6% H₂SO₄, proportion of solid to liquid 1:6, temperature 121-126℃, hydrolysis time 5 h. Using these conditions extracting diosgenin from the rhizome of *D. zingiberensis*, the diosgenin content increased to 3.62%. It suggests the optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis can improve the production of diosgenin from the rhizome of *D. zingiberensis*.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; diosgenin; spontaneous fermentation; acid hydrolysis; optimization

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 又名黄姜, 是中国特有的薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 植物, 其根茎富含薯蓣皂苷, 是工业生产薯蓣皂苷元的主要原料之一。目前利用盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元的主要方法主要采用直接酸水解法和预发酵法^[1]。前人研究表明在生产薯蓣皂苷元进行酸水解前, 对盾叶薯蓣进行预发酵能提高薯蓣皂苷元的产率^[2], 但是在采用预发酵法生产薯蓣皂苷元过程中, 往往由于长时间自然发酵生成了菝葜皂甙元酮 (smilagenone) 和表菝葜皂甙元酮 (epismilagenone)^[3]。有文献报道, 最佳发酵时间是 48 h^[4], 但其结果采用重量法测定有较大误差。因此控制预发酵的条件越来越受到研究人员的重视。另外, 在将盾叶薯蓣用盐酸或硫酸进行酸水解的过程中, 值得注意的是常有副反应发生, 一是使用盐酸

水解时, 有可能产生羟基氯代; 二是薯蓣皂苷元易脱水形成 $\Delta^{3,5}$ -deoxytigogenin, 其得量会随水解时间和温度的增加而增加; 三是加热方式的选择对酸水解有很大的影响, 采用水浴加热或者直火加热方式进行水解^[5], 前者温度达不到酸水解的条件, 水解不完全, 后者温度不易控制, 容易发生碳化。因而, 必须严格控制水解条件, 为此, 作者在进行工艺优化研究时, 使用硫酸代替盐酸进行酸水解, 并分预发酵和酸水解两部分进行优化, 尽可能准确地将各因素之间的影响进行最佳组合, 筛选出最优的预发酵和水解条件, 旨在最大程度地提高薯蓣皂苷元产率。

收稿日期: 2004-03-18

作者简介: 汤兴利 (1974-), 女, 湖北浠水人, 硕士, 从事药用植物学研究。

^① 通讯作者 E-mail: xuzl5194@sohu.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

盾叶薯蓣根茎由陕西省白河县科学技术局提供,经江苏省·中国科学院植物研究所徐增莱副研究员鉴定。实验用硫酸、石油醚(60~90℃)以及甲醇均为南京化学试剂厂生产(A.R.),粉碎机为天津市泰斯特仪器有限公司生产,高压灭菌锅由上海三申医疗器械有限公司生产,高效液相色谱仪为Agilent 1100 Series HPLC检测仪。薯蓣皂苷元标准品由本实验室制备(mp 207~208℃),并经高效液相色谱仪检测为薯蓣皂苷元(纯度超过98%)。

1.2 薯蓣皂苷元的检测方法

采用都述虎等的RP-HPLC方法^[6]检测薯蓣皂苷元的含量。

1.3 工艺流程

采用的工艺流程为:干燥盾叶薯蓣根茎样品→粉碎→过60~100目筛→发酵→酸水解→中和→抽滤→干燥→提取→浓缩→定容→检测

操作要素:(1)将盾叶薯蓣根茎去须根,去尽泥沙后,于80℃烘箱中烘干;(2)干燥后的盾叶薯蓣根茎粉碎,过60~100目筛;(3)准确称2.0g粉末于平底烧瓶中,加入2倍体积蒸馏水湿润,用牛皮纸封口后置于恒温箱中发酵;(4)发酵好后加入硫酸调整酸浓度,再扎好牛皮纸封口,置于高压灭菌锅中进行酸水解;(5)将水解后的水解渣以及水解液用饱和Na₂CO₃溶液中和至中性后,抽滤,将滤渣连同滤纸置于80℃烘干;(6)将烘干的滤渣用滤纸打包置于索氏提取器中,加入150mL石油醚于80℃水浴上循环提取6h;(7)提取液浓缩后用甲醇溶解,定容,高效液相检测仪检测。

2 结果和分析

2.1 预发酵条件优化

预发酵能提高薯蓣皂苷元产率,但是预发酵条件需要加以控制^[2~4]。本文对影响预发酵重要的因素:温度和发酵时间加以分析,以便得出最佳的薯蓣皂苷元提取条件。

2.1.1 预发酵温度选择 对影响预发酵的温度因素进行单因素考察,只改变温度条件,设4个温度条

件20℃、30℃、40℃和50℃,在其他条件为预发酵16h,6%浓硫酸,料液比为1:6,高压灭菌锅121~126℃条件下进行酸水解,水解时间为5h,80℃水浴提取5h,实验结果见表1。可以看出,预发酵温度为40℃时,薯蓣皂苷元的产率最高,达3.60%。

2.1.2 预发酵时间选择 对影响预发酵的发酵时间进行单因素考察,设发酵时间为4个梯度8、16、24和32h,在其他条件为预发酵温度为40℃,6%浓硫酸,料液比为1:6,高压灭菌锅121~126℃条件下进行酸水解,水解时间为5h,80℃水浴提取5h,实验结果见表2。由表2可见,不同预发酵时间薯蓣皂苷元的产率不同,以预发酵16h最佳,薯蓣皂苷元产率达3.65%。

表1 不同预发酵温度对盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元产率的影响(n=3)

Table 1 Effects of different temperatures of spontaneous fermentation on the content of diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright (n=3)

温度/℃ Fermentation temperature	薯蓣皂苷元含量/% Diosgenin content
20	2.96
30	3.15
40	3.60
50	3.08

表2 不同预发酵时间对盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元产率的影响(n=3)

Table 2 Effects of different time of spontaneous fermentation on the content of diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright (n=3)

时间/h Fermentation time	薯蓣皂苷元含量/% Diosgenin content
8	3.35
16	3.65
24	3.02
32	2.67

2.2 水解条件优化

选用L₉(3⁴)正交表^[7]对水解过程中影响薯蓣皂苷元水解的相关因素进行实验,各因素及水平见表3,实验结果见表4。在进行酸水解前未进行预发酵实验,以便能更准确地研究各因素对酸水解的影响大小,通过实验得出最佳的水解条件。

正交实验结果采用极差分析,所得的优水平为A₂B₂C₃D₂,即使用6%硫酸,料液比为1:6,121~126℃酸水解5h。其中水解方式(水解温度)的影响最大,酸的浓度和料液比次之,水解时间影响最小。

表3 盾叶薯蓣水解因素及水平表

Table 3 Affecting factors and levels for hydrolysis of the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

水平 Level	硫酸 浓度/% Conc. of H ₂ SO ₄	料液比 /g·mL ⁻¹ Solid/liquid	水解方式 Hydrolysis method	水解 时间/h Hydrolysis time
1	3	1:4	沸水浴 Heating in boiling water	4
2	6	1:6	直火(100℃) Electric heating	5
3	9	1:8	121~126℃加热 Heating at 121~126℃	6

表4 盾叶薯蓣水解正交实验设计[L₉(3⁴)]与结果Table 4 Orthogonal test [L₉(3⁴)] and experimental results for hydrolysis of the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

试验号 Test number	因素和水平 Factors and levels ¹⁾				薯蓣皂苷元 含量/% Diosgenin content
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.21
2	1	2	2	2	2.67
3	1	3	3	3	2.76
4	2	1	2	3	2.56
5	2	2	3	1	2.95
6	2	3	1	2	2.84
7	3	1	3	2	2.76
8	3	2	1	3	2.65
9	3	3	2	1	2.58
K1	7.64	7.53	7.70	7.74	
K2	8.35	8.27	7.81	8.27	
K3	7.99	8.18	8.47	7.97	
R	0.71	0.73	0.77	0.53	
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₂	

¹⁾ A: 硫酸浓度/% Concentration of H₂SO₄; B: 料液比/g·mL⁻¹ Solid/liquid; C: 水解方式 Hydrolysis method; D: 水解时间/h Hydrolysis time.

2.3 稳定性实验

将该盾叶薯蓣根茎样品在40℃条件下预发酵16 h,再在上述最佳工艺条件A₂B₂C₃D₂下,即采用酸水解条件为6%浓硫酸,料液比为1:6,高压灭菌锅121~126℃条件下进行酸水解,水解时间为5 h,80℃水浴提取5 h进行稳定性实验,测得薯蓣皂苷元含量为3.62%,RSD值为1.38%(n=5)。

3 结论和讨论

1) 在预发酵条件筛选时选择对预发酵影响较大的2个因素进行优化,采用单一因素不同水平进行考察,结果表明,预发酵最佳温度为40℃,最佳预发酵时间为16 h,可以得到较高的薯蓣皂苷元产率,并且预发酵16 h后用高效液相检测没有测检测到其他皂苷元的杂质峰;但预发酵24 h后,在薯蓣皂苷元出峰的保留时间附近可检测到其他杂质峰,因此,利用盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元的最佳预发酵时间为16 h。

2) 稳定性实验是先将实验材料进行预发酵后再进行酸水解,采用的是预发酵和酸水解2部分优化的条件进行重复实验(n=5),计算平均值以及RSD值,结果表明重现好。

3) 预发酵可以提高盾叶薯蓣皂苷元的产率,提高幅度可达22.7%(以正交优化的结果与稳定实验结果比较得出)。

该优化工艺对薯蓣皂苷元提取过程中的影响薯蓣皂苷元产率的因素进行定量,结果表明:目前工业化生产薯蓣皂苷元的产率有提高的潜力,进一步研究必将有利于盾叶薯蓣药用资源开发利用。

参考文献:

- [1] 杨明河. 薯蓣属植物中的甾体皂苷元[J]. 中草药,1981,12(8):41-48.
- [2] 四川省生物研究所薯蓣综合利用组. 预发酵提高薯蓣皂素产率及淀粉综合利用的研究[J]. 植物学报,1975,17(3):242-246.
- [3] 封玉贤,周振起. 我国薯蓣皂甙元的工业生产和资源的回顾与展望[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(1):93-97.
- [4] 王元兰,李水芳,杨志. 盾叶薯蓣皂甙元提取工艺研究[J]. 经济林研究,2002,20(2):67-68.
- [5] 丁志遵,唐世蓉,秦慧贞,等. 甾体激素药源植物[M]. 北京:科学出版社,1983. 49-54.
- [6] 都述虎,王晓华,夏重道,等. RP-PHLC法测定穿龙薯蓣总皂苷中薯蓣皂苷元的含量[J]. 中国药科大学学报,2001,32(1):37-40.
- [7] 潘亚明,朱鹤孙. 化学与化工中的数学方法[M]. 北京:北京理工大学出版社,1993. 348-369.