

Process Optimization of Extraction and Purification on Gypenosides*

Yongchang Wang¹, Weina Cheng², Jinting Duan², Shengnan Tang², Dawei Gao^{2#}

¹Leading Agriculture Limited Ltd., Qinhuangdao

²College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao

Email: #dwgao@ysu.edu.cn

Received: Sep. 14th, 2012; revised: Oct. 6th, 2012; accepted: Oct. 22th, 2012

Abstract: Gypenosides were extracted from the leaf and stems of five-leave gynostemma and the leaf of seven-leave gynostemma using water extraction and microwave-assisted alcohol extraction. Meanwhile, gypenosides content's differences were compared among them, and then the extracted gypenosides were purified by HP20 macroporous resin column chromatography and petroleum ether extraction, the effects of two purification methods were compared. The results show that the gypenosides' content of the leaf of seven-leave gynostemma was the most, the leaf of five-leave gynostemma followed and the stems of five-leave gynostemma pentaphyllum was the least. Microwave-assisted alcohol extraction is more efficient than the water extraction method. Water extracted gypenosides and purified by HP20 column chromatography is higher than the efficiency of petroleum ether extraction. In this study, the gypenosides' content from the leaf of seven-leave gynostemma by microwave-assisted ethanol extraction-petroleum ether extraction purified is the most, up to 89.76%; the gypenosides' content from the leaf of seven-leave gynostemma by water extraction-HP20 column chromatography is 76.40%.

Keywords: Gynostemma; Saponin; Microwave Extraction; Macroporus Resin (HP20); Extraction

绞股蓝总皂苷提取和纯化工艺的优化*

王永长¹, 程卫娜², 段金婷², 汤胜楠², 高大威^{2#}

¹领先生物农业股份有限公司, 秦皇岛

²燕山大学环境与化学工程学院, 秦皇岛

Email: #dwgao@ysu.edu.cn

收稿日期: 2012年9月14日; 修回日期: 2012年10月6日; 录用日期: 2012年10月22日

摘要: 以五叶绞股蓝的梗和叶、七叶绞股蓝的叶为材料, 用水提法和微波干辅助醇提法从中提取了绞股蓝总皂苷, 比较了其提取物中总皂苷含量的差异, 并分别用 HP20 大孔吸附树脂柱层析法和石油醚萃取法对提取的绞股蓝总皂苷进行了纯化, 比较了两种纯化方法的效果。结果表明七叶绞股蓝叶提取物中的总皂苷含量最高, 五叶绞股蓝叶次之, 五叶绞股蓝梗最低; 微波干辅助醇提的效率高于水提法; 本实验中微波醇提-石油醚萃取纯化七叶绞股蓝叶提取物得到的样品中总皂苷的含量最高为 89.76%; 水提-HP20 柱层析法纯化七叶绞股蓝叶提取物得到的样品中总皂苷的含量为 76.40%。

关键词: 绞股蓝; 皂苷; 微波提取; HP20 大孔吸附树脂; 萃取

*资助信息: 教育部博士点基金(No.20101333120011), 河北省自然科学基金(No.C2011203137, 11965152D), 和中国博士后基金(480013)的资助。

#通讯作者。

1. 引言

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*)又名七叶胆、五叶参、甘茶蔓等,是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物^[1]。绞股蓝含有 80 多种皂苷成分,有 4 种皂苷分别与人参皂苷 Rb1、Rb3、Rd 和 F2 的结构完全相同,其中人参皂苷的含量是人参的 8 倍,总皂苷含量是人参的 3 倍。绞股蓝皂苷虽然与人参皂苷作用相似,但无过量服用的副作用,是一种新的药食两用植物资源^[2]。绞股蓝皂苷(Gypenosides)是绞股蓝全草的有效成分,具有显著降血脂、降血糖、平衡血压、抗癌、抗缺氧、抗衰老、提高免疫功能、镇痛、催眠等功效,对中枢神经有良好的镇静和兴奋双向调节功能^[3-8]。绞股蓝主要分布在亚洲,在我国陕西绞股蓝资源最为丰富,以秦巴山区为中心的 37 个县市,安康和平利等地目前已成为我国绞股蓝最大的生产基地,其品种最为优良^[9]。由于产地和品种的差异以及植物部位的不同,所含绞股蓝皂苷有较大的差异^[10]。本文主要研究了不同提取和纯化方法获得绞股蓝总皂苷的效率。其中包括水提和微波干辅助醇提以及 HP20 大孔吸附树脂柱层析法和石油醚萃取纯化法。比较了五叶绞股蓝梗、叶和七叶绞股蓝叶在绞股蓝总皂苷含量上的区别以及两种提取方法和两种纯化方法的效果。

2. 材料与方法

2.1. 仪器和材料

2.1.1. 仪器

酶标仪:上海雷勃;旋转蒸发仪:上海志惠电讯器材有限公司;FD-1C 普通型多歧管冷冻干燥机:西安予辉有限公司;格兰仕微波/光波炉 800 W:顺德美的微波炉制造厂;BioLogic 中高压层析系统:美国 SP 公司。

2.1.2. 材料

五叶绞股蓝和七叶绞股蓝:陕西平利县;人参皂苷标准品:成都曼思特生物科技有限公司;HP20 大孔吸附树脂:日本三菱化学;实验所用甲醇、乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸、石油醚、正丁醇等试剂均为分析纯。

2.2. 标准曲线的绘制

精确称取人参皂苷 Rb1 10 mg,倒入 10 mL 的容

量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,然后分别取不同体积(20、40、60、80、100、120 μ L)的标准液置于具塞试管中,于 60 $^{\circ}$ C 水浴中挥去溶剂,加 5%香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL(现用现配 5 g 香草醛用冰醋酸溶解后,定容至 100 mL)、高氯酸 0.8 mL,混匀密置,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min,冰水浴冷却后加冰醋酸 5 mL,相应试剂为空白,在 550 nm 下测吸光值^[11]。以吸光值(x)对人参皂苷 Rb1 含量(y)做回归得标准曲线。

2.3. 绞股蓝提取物制备

水提法:分别称取五叶绞股蓝梗、叶和七叶绞股蓝叶各 20 g,加 100 倍水煎煮 3 次,每次 30 min,过滤合并滤液,旋转蒸发至一定体积,经冷冻干燥得绞股蓝提取物的干燥粉末,干燥保存备用^[12]。

微波干辅助醇提法:分别称取五叶绞股蓝梗、叶和七叶绞股蓝叶各 20 g,用 800 W 微波处理 2 min,间隔 10 min,重复辐照 1 次,共辐照 3 次。微波处理后,用 70%乙醇溶液 300 mL 快速浸泡提取。共提取 3 次,提取液合并,减压回收乙醇。经冻干得到绞股蓝提取物的干粉,干燥保存后备用^[13]。

2.4. 绞股蓝提取物纯化

2.4.1. HP20 大孔吸附树脂柱层析法纯化绞股蓝提取物

1) 大孔树脂预处理

用 95%的乙醇反复浸泡大孔吸附树脂,洗净的树脂挥去溶剂后保存备用。以乙醇湿法装柱,95%乙醇在柱上淋洗,不时检测流出的乙醇,直至与水混合(体积比 1:5)不呈现白色浑浊为止,再用纯水洗至无醇味备用。

2) 利用 HP20 大孔树脂纯化绞股蓝提取物

将得到绞股蓝提取物 0.5 g 分别溶解于 50 mL 的去离子水中,分别上 HP20 树脂柱,样品溶液重复吸附 4 次(流速为 2 mL/min),用去离子水反复洗脱,直至经 molish 反应检测无糖为止。然后,用 250 mL 20%乙醇溶液进行除杂(流速为 2 mL/min),除杂后,用 250 mL 70%乙醇溶液进行解吸(流速为 2 mL/min),将所得的解吸液经旋转蒸发浓缩,冻干得到绞股蓝提取物干粉,称重^[12]。

2.4.2. 石油醚萃取法纯化绞股蓝提取物

将绞股蓝皂苷溶于适量水中,加入等体积石油醚

萃取,至石油醚层无色;取水层加入等体积的水饱和正丁醇萃取,至正丁醇层无色;收集正丁醇层,蒸发浓缩至干,得淡黄色绞股蓝总皂苷粉末^[13]。

2.5. 绞股蓝皂苷含量测定

采用香草醛-高氯酸比色法测定绞股蓝皂苷的含量,方法同标准曲线的制备。

3. 结果与讨论

3.1. 标准曲线绘制

按照 1.2 的方法,标准溶液和空白溶液,在 550 nm 的波长处分别测定吸收度。以吸收度 $x(A)$ 为横坐标,以人参皂苷 Rb1 的含量 $y(mg)$ 为纵坐标,绘制标准曲线,结果如图 1 所示。曲线回归方程为 $y = 0.4176x + 0.0029$, 相关系数 $R^2 = 0.9997$ 。线性范围为 0.02~0.12 mg。

3.2. 绞股蓝提取物质量及其总皂苷含量

3.2.1. 绞股蓝提取物质量

称取绞股蓝样品 20 g,分别用水提法和微波干辅助醇提取法(微波醇提法)提取得到绞股蓝总皂苷粗提物,滤液经旋转蒸发后冷冻干燥得到绞股蓝总皂苷粗提物干粉,称重。然后分别取 0.5 g 绞股蓝总皂苷粗提物样品用 HP20 大孔吸附树脂柱层析法(HP20 柱层析法)和石油醚萃取法进行纯化。纯化前后绞股蓝提取物的质量如表 1 所示。

3.2.2. 绞股蓝总皂苷含量

采用香草醛-高氯酸比色法分别精确称取各样品 10 mg,倒入 10 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,然后分别取 100 μ L 的样品溶液置于具塞试管中,于 60 $^{\circ}$ C 水浴中挥去溶剂,加 5%香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL、高氯酸 0.8 mL,混匀密置,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中加热 15 min,冰水浴冷却后加冰醋酸 5 mL,相应试剂为空白,在 550 nm 下测吸光值,根据标准曲线,计算得纯化前后绞股蓝的含量如表 2 所示。

3.3. 绞股蓝中总皂苷含量差别

绞股蓝总皂苷的含量 = 提取物质量 \times 含量/绞股蓝的质量;根据公式计算得五叶绞股蓝的梗和叶、七叶绞股蓝的叶的含量如表 3 所示。

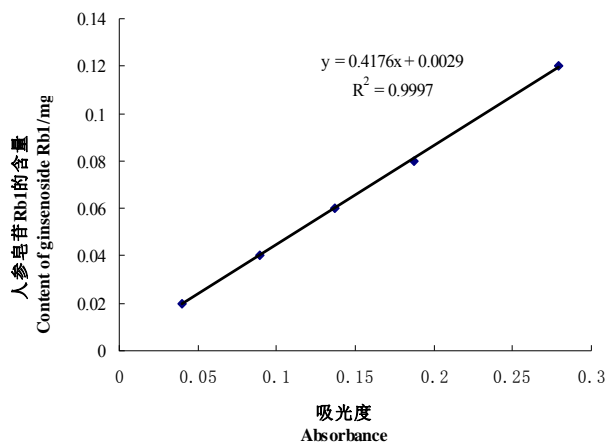


Figure 1. Standard curve of ginsenoside Rb1
图 1. 人参皂苷 Rb1 标准曲线

Table 1. Quality of gynostemma extract before and after purification/g
表 1. 纯化前后绞股蓝提取物的质量/g

	水提梗	水提五叶	水提七叶	微波梗	微波五叶	微波七叶
提取物	4.7934	4.6028	5.0852	1.8554	1.8322	3.0052
HP20 柱层析法	0.1013	0.0683	0.1167	0.1084	0.1463	0.0494
石油醚萃取法	0.0232	0.0174	0.0552	0.0560	0.0272	0.1864

Table 2. Content of gypenosides before and after purification/%
表 2. 纯化前后绞股蓝总皂苷的含量/%

	水提梗	水提五叶	水提七叶	微波梗	微波五叶	微波七叶
纯化前	7.076	7.9112	8.7464	7.9112	12.0872	16.2632
HP20 柱层析法	19.604	24.1976	76.3976	15.0104	16.2632	49.2536
石油醚萃取法	11.252	18.3512	47.1656	17.516	37.1432	89.7608

Table 3. Content of gypenosides
表 3. 绞股蓝总皂苷的含量

	水提梗	水提五叶	水提七叶	微波梗	微波五叶	微波七叶
提取物质量/g	2.3967	2.3014	2.5426	0.9277	0.9161	1.5026
提取物总皂苷含量/%	7.076	7.9112	8.7464	7.9112	12.0872	16.2632
绞股蓝总皂苷含量/%	1.69590	1.82068	2.22386	7.3392	1.10731	2.44371

由表 3 可知,五叶绞股蓝梗总皂苷的含量大约为 1.696%,五叶绞股蓝叶总皂苷的含量大约为 1.821%,七叶绞股蓝中总皂苷的含量大约为 2.444%。可见七叶绞股蓝叶中总皂苷的含量最高,五叶绞股蓝叶次之,五叶绞股蓝梗最低;但五叶绞股蓝梗和叶中总皂苷的含量相差并不多,表明五叶绞股蓝梗也具有一定的利用价值。

3.4. 两种提取方法比较

由上述结果可见, 虽然水提法得到绞股蓝粗提物的质量比微波醇提法得到的粗提物质量高, 但微波醇提法比水提法得到总皂苷的纯度高。微波加热可穿透物质, 使物体内部分子产生振动和摩擦, 在快速振动的微波电磁场中, 被辐射的极性物质分子吸收电磁能, 以每秒数十亿次的高速振动产生热能。微波辅助提取是利用微波能来提高萃取率, 微波在传输过程中遇到不同的物料, 会依物料性质不同而产生反射、穿透、吸收现象。由于物质结构不同, 吸收波能的能力不同, 因此在微波作用下, 某些待测组分被选择性加热使之与基体分离, 进入微波吸收能力较差的萃取溶剂中。由于微波加热的热效率较高, 升温快速且均匀, 故显著提高了萃取时间和效率^[14], 所以微波醇提法相对于水提法不仅大大缩短了提取时间, 而且增加了提取物的纯度。微波辅助提取绞股蓝皂苷耗时少, 效率高, 是一种值得应用和推广的提取方法。

3.5. 两种纯化方法比较

3.5.1. 绞股蓝提取物纯化后收率比较

绞股蓝提取物经 HP20 柱层析法和石油醚萃取法纯化后所得样品的质量如表 4 所示。可见除了用微波醇提法提取的七叶绞股蓝总皂苷经纯化后的收率, HP20 柱层析法比石油醚萃取法的低以外, 其他均为 HP20 层析法的收率高。所以用 HP20 柱层析法分离提纯绞股蓝总皂苷是可行而高效的。

采用 HP20 柱层析法纯化富集与分离时, 大孔树脂可以将色素与皂苷分离开。对于七叶绞股蓝, 可能是由于其所含皂苷的极性比较大, 不易与色素分离, 在纯化过程中会残留一部分皂苷吸附在色素上, 与色素一起被分离出来^[15]。水提法提取绞股蓝总皂苷时得到为黄色或棕黄色溶液, 而微波醇提法提取绞股蓝皂苷时颜色为绿色, 含有大量的色素, 这是因为色素可溶于乙醇, 而不溶于水。虽然五叶绞股蓝梗和叶在旋

Table 4. Quality of gynostemma extract after purification/g
表 4. 绞股蓝提取物经纯化后的质量/g

	水提梗	水提五叶	水提七叶	微波梗	微波五叶	微波七叶
HP20 柱层析法	0.1013	0.0683	0.1167	0.1084	0.1463	0.0494
石油醚萃取法	0.0232	0.0174	0.0552	0.0560	0.0272	0.1864

转蒸发时大部分色素被去除, 浓缩液为黄色, 但七叶绞股蓝的浓缩液颜色仍为绿色, 这也说明七叶绞股蓝的皂苷与色素很难分开, 在大孔树脂纯化时, 由于色素的分离一部分皂苷被损失掉了, 所以微波法提取的七叶绞股蓝叶提取物经 HP20 柱层析法纯化后所得样品的质量比水提法的低。

3.5.2. 绞股蓝总皂苷含量比较

绞股蓝提取物经 HP20 柱层析法和石油醚萃取法纯化后所得样品的含量见表 5, 对 HP20 柱层析法纯化后的绞股蓝提取物中总皂苷含量进行分析, 水提法提取的绞股蓝总皂苷含量比微波醇提法的高; 对石油醚萃取法纯化后的绞股蓝提取物中绞股蓝总皂苷含量进行分析, 微波醇提法提取的绞股蓝总皂苷含量比水提法的高。

对水提法提取的绞股蓝总皂苷进行分析, HP20 柱层析法纯化后的提取物中总皂苷含量比石油醚萃取法纯化后的高; 对微波醇提法提取的绞股蓝总皂苷数据进行分析, 石油醚萃取法纯化后的总皂苷含量比 HP20 柱层析法纯化的高。

从而得到两个优化的提取绞股蓝总皂苷的工艺流程是水提-HP20 柱层析法和微波醇提-石油醚萃取法。七叶绞股蓝叶经微波醇提-石油醚萃取后绞股蓝总皂苷含量最高为 89.76%, 经水提-HP20 柱层析法纯化后绞股蓝总皂苷含量为 76.40%。

4. 结论

本实验用水提法和微波醇提法从绞股蓝中提取绞股蓝总皂苷, 比较了陕西平利县五叶绞股蓝梗和叶、七叶绞股蓝叶中绞股蓝总皂苷含量, 并分别用 HP20 大孔吸附树脂柱层析和石油醚萃取对提取的绞股蓝总皂苷进行了纯化。结果表明, 七叶绞股蓝叶中总皂苷的含量最高约为 2.444%, 五叶绞股蓝叶次之约为 1.821%, 五叶绞股蓝梗最低约为 1.696%, 可见五叶绞股蓝梗也具有一定的利用价值。微波醇提法的效

Table 5. Content of gynostemma extract after purification/%
表 5. 绞股蓝提取物经纯化后的含量/%

	水提梗	水提五叶	水提七叶	微波梗	微波五叶	微波七叶
HP20 柱层析法	19.604	24.1976	76.3976	15.0104	16.2632	49.2536
石油醚萃取法	11.252	18.3512	47.1656	17.516	37.1432	89.7608

率高于水提法；HP20 柱层析法纯化水提绞股蓝皂苷优于石油醚萃取法，而石油醚萃取法纯化微波醇提绞股蓝皂苷优于 HP20 柱层析法。微波醇提 - 石油醚萃取纯化法提取得到的样品中七叶绞股蓝皂苷含量最高为 89.76%。水提-HP20 柱层析法得到的七叶绞股蓝皂苷含量为 76.40%。与其他方法相比得率较高。本文为绞股蓝的开发利用提供了一定理论依据。

参考文献 (References)

- [1] 陈武, 邹盛勤, 伍晓春等. 绞股蓝无糖口含片的制备工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 245-248.
- [2] 张晓喻, 黎艳, 雍彬等. 复方绞股蓝皂甙改善小鼠学习记忆的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 330-333.
- [3] M.-S. Bai, J.-M. Gao, C. Fan, et al. Bioactive dammarane-type triterpenoids derived from the acid hydrolysate of *Gynostemma pentaphyllum* saponins. Food Chemistry, 2010, 119: 306-310.
- [4] 汪黎植, 胡格, 翟文海. 绞股蓝总皂苷外用对高脂血小鼠的降血脂作用研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 2007, 84: 41-43.
- [5] 刘国辉, 姚丹丹, 卢佳怡等. 绞股蓝对 D-半乳糖所致亚急性衰老大鼠下丘脑的抗衰老作用及其机制研究[J]. 医学理论与实践, 2006, 19(5): 497-499.
- [6] T. H.-W. Huang, V. Razmovski-Naumovski, N. K. Salam, et al. A novel LXR- α activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. Biochemical Pharmacology, 2005, 70: 1298-1308.
- [7] B. Sriwanthana, W. Treesangsri, B. Boriboontrakul, et al. *In vitro* effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2007, 29 (Suppl.1): 17-28.
- [8] 周建华, 张兴亚. 绞股蓝开发研究新进展及应用[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 74-76.
- [9] 尚晓娅, 钦传光, 曹刚等. 绞股蓝多糖提取分离、化学结构及生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22: 514-518.
- [10] 刘世彪, 林如, 胡正海. 绞股蓝属 5 种植物的茎叶结构和总皂苷含量差异[J]. 福建农林大学学报, 2006, 35(5): 495-499.
- [11] 沈宏伟, 肖彦春, 车仁国等. 绞股蓝中总皂苷的提取及含量研究[J]. 食品科技, 2008, 4: 158-160.
- [12] 郑中钦, 李孝栋, 池奖鸿等. 古田产绞股蓝及其复方饮料总皂苷的含量测定[J]. 福建中医药大学学报, 2010, 20(5): 50-52.
- [13] 郭辉力, 邓泽元. 微波干法辅助提取绞股蓝总皂苷的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(1): 68-71.
- [14] 杨全胜, 崔艳丽, 李瑾瑜. 微波辅助提取葡萄籽油的研究[J]. 农产品加工, 2007, 6: 36-37.
- [15] 黄之镨, 玉波罕, 黄押稳等. 应用大孔吸附树脂柱层析法对西双版纳产绞股蓝总皂苷吸附性能的研究[J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(1): 22-24.