

芦笋下脚料皂苷超声提取工艺

孙健^{1,2}, 李曼³, 王丽卫^{1,2}, 赵兵^{1,*}

(1.中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049;
3.北京城市学院生物医药学部, 北京 100083)

摘要: 采用超声强化技术对芦笋下脚料中的皂苷成分进行提取, 通过两轮均匀试验对提取工艺进行优化。结果得到的最优提取工艺为液料比 1:1、温度 30℃、占空比 0.4:1.6、功率 200W、提取时间 30min、pH5.05、酒精体积分数 70%, 该工艺条件下单次提取得率为 7.5%(干基); 两次提取累积回收率达到 93.37%, 3 次提取累积回收率达到 98.40%。在 2L 循环超声提取装置中的放大实验表明, 两次提取累积回收率达到 97.49%, 3 次可提取完全。表明超声强化方法适用于芦笋下脚料中皂苷的提取。

关键词: 芦笋; 皂苷; 均匀试验; 超声循环提取

Ultrasonic-assisted Extraction of Saponins from *Asparagus officinalis* Scraps

SUN Jian^{1,2}, LI Man³, WANG Li-wei^{1,2}, ZHAO Bing^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of Biomedical, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to improve the utilization rate of *Asparagus officinalis* L. scraps, ultrasonic assistance was applied for the extraction of saponins from the materials. After two rounds of uniform design, the optimal extraction conditions for achieving maximum extraction rate of saponins were material-to-liquid ratio of 1:1 (*m/V*), extraction temperature of 30 °C, duty cycle of 0.4:1.6 (ratio of occupied to empty space), ultrasonic power of 200 W, extraction time of 30 min, extraction pH of 5.05 and ethanol concentration of 70%. Under the optimal conditions, the extraction rate of saponins was up to 7.5%, and the recovery rate was 98.78% after three rounds of extraction. The saponins could be fully recovered by three rounds of extractions in a 2 L circulated ultrasonic-assisted extraction device. Therefore, ultrasonic-assisted extraction is suitable for the extraction of saponins from *Asparagus officinalis* L. scraps.

Key words: *Asparagus officinalis* L.; steroid saponins; uniform design; ultrasonic circulation extraction

中图分类号: O629

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0152-04

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)又名石刁柏、龙须菜, 在国际上有“蔬菜之王”的美称, 在欧洲其消费量仅次于番茄、青刀豆、蘑菇和豇豆^[1]。被世界卫生组织列为世界十大最具有营养价值的蔬菜之首, 是国际上公认的防癌保健蔬菜。诸多研究表明芦笋可有效阻止肿瘤细胞的增殖^[2-3], 对抑制子宫癌、肝癌及可移植性肿瘤等有特殊疗效^[4], 可以明显抑制肿瘤细胞核酸生物合成^[5]。

芦笋含有多种活性成分, 如黄酮^[6]、芦笋多糖^[7]、皂苷、氨基酸^[8]、微量元素等。其中皂苷是其主要的

活性成分之一, 研究发现芦笋皂苷有诱导肿瘤细胞凋亡^[9]、抑制癌细胞生长^[10]、抑菌活性^[11]等。

我国芦笋种植面积已达到 170 万亩(约 11 万 3300 公顷), 年产量 140 万吨, 居世界第一位, 加工企业 143 家, 年产值 65 亿元。芦笋加工全是以保鲜、速冻和罐头销售出口, 附加值低。在加工过程中每年产生约 60 万吨老茎和笋皮等下脚料, 这些下脚料含水量很高, 极易腐败发臭, 不仅浪费资源, 而且造成严重环境污染。本实验以芦笋加工后的下脚料为原料, 建立芦笋皂苷的常温超声快速提取工艺, 并进行放大实验, 对于芦笋

收稿日期: 2010-06-23

作者简介: 孙健(1980—), 男, 博士研究生, 研究方向为植物天然产物提取。E-mail: sunjian@home.ipe.ac.cn

* 通信作者: 赵兵(1966—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为植物细胞工程与天然产物提取。

E-mail: bzhao@home.ipe.ac.cn

下脚料的综合、高值化利用具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芦笋下脚料由秦皇岛长胜农业有限公司提供, 主要为芦笋地上除去可鲜食的部分, 新鲜样品粉碎到 20 目备用。

菝葜皂苷元标准品 中国食品药品检定研究院; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

100D 超声波细胞粉碎机、500mL 不锈钢锥形提取容器、CTXNW-2B 超声循环提取机 北京弘祥隆生物技术开发有限公司; RE-6000 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; pH 计 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; 2802UV/VIS 分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 芦笋总皂苷检测方法的建立

芦笋中皂苷主要为甾体皂苷类, 其水解产物为菝葜皂苷元^[12-13]。本实验选取菝葜皂苷元作为标准品, 吸取一定量配制的菝葜皂苷元标准溶液, 置于 20mL 的刻度试管中, 在 70℃ 水浴中将溶剂挥发至干。分别加入 200 μ L 5g/100mL 香草醛乙酸溶液, 再加入 800 μ L 高氯酸。混匀后 70℃ 水浴中静置 15min^[14-15]。冷却至室温加 5mL 冰醋酸, 随行试剂做空白, 于 190~1100nm 波长进行扫描, 对照品在 535nm 处有最大吸收, 因此选定 535nm 为检测波长, 在该波长处进行了芦笋皂苷检测标准曲线的绘制。其回归方程为 $y=0.0034x+0.0461$, $R^2=0.9941$ 。结果表明, 菝葜皂苷元在 0~400 μ g 范围内呈良好的线性关系。

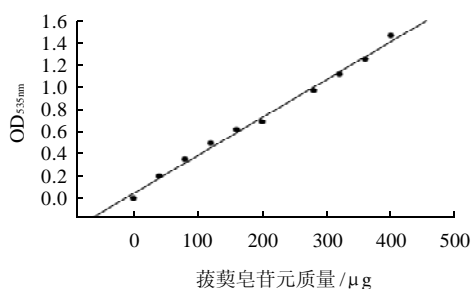


图1 芦笋总皂苷检测标准曲线

Fig.1 Standard curve for total saponins determination

1.3.2 均匀设计进行芦笋皂苷提取

本试验所用均匀设计表由 DPS 数据处理系统(V6.5.5.8 版本)产生^[16], 根据产生的均匀设计表分别对占空比、超声提取功率、提取时间、液料比、提取温度、pH 值、酒精体积分数等因素进行设计。将粉碎后样品加入一定量的含水乙醇后用稀盐酸调节 pH 值, 加入超声提取设备中进行提取, 提取后样品进行液固分离和真空

干燥, 得到的粗品按标准曲线方法进行总皂苷含量测定。测定结果按以下公式进行计算:

$$\text{出膏率} / \% = \frac{\text{粗提物干质量}}{\text{样品鲜质量} \times (1 - 0.928)} \times 100$$

$$\text{纯度} / \% = \frac{(A_{535} - 0.0461) \times 50 \times 100}{0.0034 \times M}$$

$$\text{提取得率} / \% = \text{出膏率} \times \text{纯度} \times 100$$

$$\text{累积回收率} / \% = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{8.75} \times 100$$

式中: 0.928 为样品含水量; M 为皂苷测定时称取的粗提物质量; 50 为稀释倍数; n 为提取次数; X_i 为不同提取次数下的单次提取得率; 8.75 为索氏提取的提取得率。

1.3.3 实验放大

按得到的最优提取条件, 用 2L 超声循环提取机进行放大实验, 实验条件与均匀试验得到的最优提取条件相同。

2 结果与分析

2.1 芦笋皂苷提取第一轮均匀试验结果

各因素水平根据已有文献加以确定^[17-18], 按设计的均匀试验组合进行试验, 对提取得到的样品进行了提取得率的计算, 表 1 的结果表明不同试验处理之间皂苷提取得率差异较大。

表1 第一轮均匀试验结果

Table 1 Results of the first round uniform design

因素	占空比	功率 / W	时间 / min	液料比	温度 / °C	pH	酒精体积分数 / %	提取得率 / %
N1	1.6:0.4	250	30	2:1	50	9	80	9.44
N2	0.4:1.6	750	40	5:1	40	9	40	2.78
N3	1.2:0.8	750	60	6:1	50	5	80	7.64
N4	0.8:1.2	1000	20	4:1	70	8	90	8.06
N5	0.8:1.2	250	20	4:1	20	5	50	8.33
N6	0.4:1.6	1000	30	2:1	40	4	70	6.94
N7	1.2:0.8	750	10	1:1	60	6	40	7.64
N8	0.4:1.6	250	60	3:1	60	7	60	8.47
N9	0.8:1.2	500	50	1:1	30	6	90	6.81
N10	1.6:0.4	1000	50	3:1	20	7	50	7.36
N11	1.2:0.8	500	10	6:1	30	8	70	8.19
N12	1.6:0.4	500	40	5:1	70	4	60	8.06

为了得到芦笋皂苷提取的最佳条件, 采用偏最小二乘回归分析方法以提取得率为目标值进行建模, 并在模型的基础上对其进行求解得到最佳提取条件。其模型如下:

$$Y=0.6668981+0.035150X_1-0.089199X_2-0.017975X_3+0.006047X_4-0.040916X_5+0.007231X_6+0.006181X_7-0.006952X_1^2+0.013531X_2^2+0.003925X_3^2-0.000906X_4^2+0.004253X_5^2-0.003395X_6^2-0.006450X_7^2+0.001784X_1X_2-0.000697X_1X_3+0.005467X_1X_4-0.001270X_1X_5+0.007422X_1X_6-0.007988X_1X_7-0.000581X_2X_3+0.000464X_2X_4+0.001504X_2X_5-0.004301X_2X_6+0.004286X_2X_7-0.000689X_3X_4+0.002441X_3X_5-0.004961X_3X_6+0.000397X_3X_7-0.000981X_4X_5-0.007052X_4X_6+0.003781X_4X_7+0.002128X_5X_6+0.000529X_5X_7+0.011288X_6X_7$$

($R^2=0.9642$)

式中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 分别为占空比、功率、时间、液料比、温度、pH 值、酒精体积分数。

通过对得到的方程进行求解可知, 使该方程的目标函数为最大值(10.10%)时得到的各自变量的值为占空比 1.44:0.86、功率 250W、提取时间 10min、料液比 1:1、提取温度 70℃、pH9.0、酒精体积分数 78.6%。

对最佳提取条件进行验证, 其提取得率为 7.92%。与预测值有很大差距, 分析其原因可能因为试验中选取的因素与水平不合理, 造成预测值不能很好的与实测值吻合。因此, 需要在此基础上重新设计和进行均匀试验。

2.2 均匀试验因素及水平的优化

由于第一次均匀试验中选取的因素较多, 且水平的选取仅根据已有的文献分析, 所以需要根据第一次均匀试验结果对因素及水平进行优化。以提取得率为目标函数进行标准回归系数(standardised regression coefficient, SRC)计算, 表示该因素对结果影响的大小, 正负表示该因素对目标函数作用的正负效应^[14], 结果见图 2。

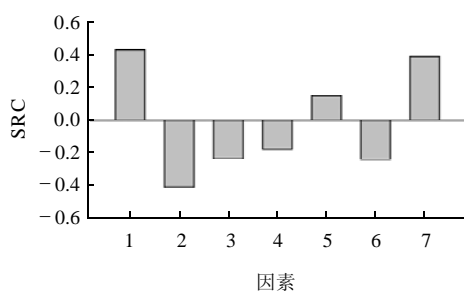


图2 以提取得率为目标函数各因素的 SRC 结果

Fig.2 SRC (standard regression coefficient) of each factor based on extraction rate of saponins

从图 2 可以看出, 液料比以及提取温度对提取得率影响较小, 因此在第二轮均匀试验中固定液料比 1:1、温度 30℃。

2.3 芦笋皂苷提取第二轮均匀试验结果

根据优化后的因素水平重新进行第二轮均匀试验设计, 结果见表 2。

表 2 第二轮均匀试验结果

Table 2 Results of the second round uniform design

因子	占空比	功率/W	时间/min	pH	酒精体积分数/%	提取得率/%
N1	1.8:0.2	200	10	6	80	4.58
N2	1.8:0.2	300	30	4	90	5.28
N3	1.4:0.6	200	30	5	70	7.22
N4	1.4:0.6	400	20	6	90	5.14
N5	1.6:0.4	300	20	5	80	5.42
N6	1.6:0.4	400	10	4	70	5.97

对第二轮均匀试验进行建模, 其模型为:

$$Y=0.5314381-0.046735X_1-0.039253X_2+0.018137X_3+0.043842X_4-0.087603X_5-0.002141X_1^2+0.005974X_2^2+0.008569X_3^2-0.017789X_4^2+0.015404X_5^2+0.018474X_1X_2-0.005113X_1X_3-0.001583X_1X_4+0.010771X_1X_5-0.017806X_2X_3+0.001030X_2X_4+0.004510X_2X_5+0.009889X_3X_4-0.008997X_3X_5+0.000965X_4X_5$$

($R^2=0.9968$)

式中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 分别为占空比、功率、时间、pH 值、酒精体积分数。

该方程目标函数为最大值(7.22%)时各自变量的值为占空比 0.4:1.6、功率 200W、提取时间 30min、pH5.05、酒精体积分数 70%。通过验证实验发现, 在该提取条件下提取得率为 7.50%, 与预测值吻合较好。

2.4 提取次数对实验结果的影响

在提取实验优化结果的基础上, 进一步研究提取次数对提取效果的影响, 提取结果如表 3 所示。

表 3 提取次数对提取效率的影响

Table 3 Effect of number of repeated extractions on extraction rate of saponins

提取次数	纯度/%	出膏率/%	提取得率/%	累积回收率/%
1	14.26	49.86	7.11	81.26
2	14.96	7.08	1.06	93.37
3	16.61	2.64	0.44	98.40

通过对结果分析发现, 随着提取次数增加, 单次提取得率均降低明显。两次提取累积回收率达到 93.37%, 3 次提取累积回收率达到 98.40%, 进行两次提取即能实现样品中皂苷的高效回收。

2.5 放大实验

上述提取工艺研究实验是在容量为 500mL 的锥形提取容器中进行, 而目前工业化大生产使用的提取设备为超声循环提取装置, 因此有必要进行超声循环提取实验研究。采用 2L 超声循环提取机进行放大实验, 结果如表 4 所示。

放大前后的实验比较发现, 放大实验的出膏率、提取得率及累积回收率均优于放大前结果。这是由于超

声循环提取机样品混合更均匀,物料循环流动,使物料接受超声场处理更均匀,超声场作用效率更高。

表4 放大实验结果

Table 4 Results of scale-up experiments

提取次数	纯度/%	出膏率/%	提取得率/%	累积回收率/%
1	13.60	51.25	6.97	79.66
2	13.22	11.81	1.56	97.49
3	14.62	2.22	0.32	101.15

3 结 论

本实验采用超声强化实现芦笋皂苷的常温快速提取,避免了提取过程中活性物质损失,显著提高了提取效率和降低了提取能耗。本实验采用均匀设计方法进行,明显降低了试验次数,经过两次均匀试验得到的最优提取条件与试验值吻合。两次提取累积提取率达到93.37%,3次提取累计回收率达到98.40%。2L超声循环提取装置中两次提取累积提取率达到97.49%,3次提取完全,放大实验提取效果优于小规模实验的效果。

参考文献:

- [1] 胡立勇,余德谦. 芦笋栽培与加工[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1998: 1-10.
- [2] STRIPE F, GASPERI-CAMPANI A, BARBIERI L, et al. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree)[J]. *Biochem J*, 1983, 216(3): 617-625.
- [3] 黄玲,陈玲,林久茂. 大蒜、芦笋对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响[J]. 福建中医学院学报, 2007, 17(2): 27-29.
- [4] 李永琴,杨勤. 黔园九号芦笋抗小鼠肿瘤作用及毒性研究[J]. 贵阳医学院学报, 1995, 20(1): 21-23.
- [5] 夏俊,陈治文,石莹. 绿芦笋提取液抑制肿瘤细胞核酸生物合成的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2003, 15(4): 212-214.
- [6] MAKRISS D P, ROSSITER J T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): effect on flavonol content and antioxidant status[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(7): 3216-3222.
- [7] 李娟,王凤山. 芦笋多糖的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(3): 69-73.
- [8] 刘升一,王雪耘,李丽莉,等. 芦笋中氨基酸和微量元素锌、铜、铁、锰、硒含量测定[J]. 营养学报, 1990, 12(3): 328-329.
- [9] 汲晨峰,季宇彬,岳磊. 芦笋皂苷诱导肿瘤细胞凋亡作用及机制初步研究[J]. 中国药理通讯, 2007, 24(3): 11-12.
- [10] SHAO Yu, POBRASERT O, KENNELLY E J, et al. Steroidal saponins from *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity[J]. *Planta Med*, 1997, 63(3): 258-262.
- [11] SHIMOYAMADA M, SUZUKI M, MARUYAMA M, et al. An antifungal saponin from white asparagus (*Asparagus officinalis* L.) bottoms[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 72(4): 430-434.
- [12] 张新明,黄少华. 芦笋研究开发现状及展望[J]. 山东食品发酵, 2008(2): 16-18.
- [13] 孙春艳,赵伯涛,郁志芳,等. 芦笋的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 1-5.
- [14] CHEN Yi, XIE Mingyong, GONG Xiaofeng. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*[J]. *J Food Eng*, 2007, 81(1): 162-170.
- [15] 王光忠,刘伟伟,葛如斌,等. 分光光度法测定盾叶薯蓣总皂苷的含量[J]. 湖北中医学院学报, 2008, 10(2): 44-45.
- [16] FANG K T, DENNIS K J, WINKER P, et al. Uniform design: theory and application[J]. *Technometrics*, 2000, 42(3): 237-248.
- [17] 刘杰. 正交实验法优选芦笋茎中总皂苷的提取工艺[J]. 光明中医, 2008, 23(11): 1672-1676.
- [18] 方幼兰. 芦笋皂苷的提取纯化及其糖基组成[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 446-450.