

芦笋皂苷的提取纯化及其糖基组成

Purification and Monosaccharide Composition of Saponin from *Asparagus officinalis* L.

方幼兰*

FANG You-Lan*

福建师范大学化学与材料学院,福州 350007

Chemistry and Material College, Fujian Teachers University, Fuzhou 350007, China

摘 要 芦笋皂苷是以芦笋下脚料为原料提取出来的一种糖甙化合物。目的是充分利用再生资源,变废为宝,同时解决芦笋下脚料废弃物所造成的环境污染问题。实验探讨了乙醇浓度、液料比、温度、时间等工艺条件对芦笋皂苷提取率的影响,筛选出最佳提取工艺:乙醇浓度 95%、液料比(V/W)为 6:1、温度 90℃、时间 4h。从新鲜芦笋下脚料、芦笋干品提取皂苷的平均得率分别为 1.70%、4.01%。芦笋皂苷经氧化铝柱层析分离,以 40%乙醇的溶液为洗脱剂,洗出曲线为单一对称峰。采用 UV、IR、HPLC 等色谱对芦笋皂苷的结构特点、糖基组成进行初步分析。结果显示芦笋皂苷具有呋甾烷的结构特征,其糖基由木糖(Xyl)、岩藻糖(Fuc)、阿拉伯糖(Ara)组成,摩尔比为 Xyl:Fuc:Ara = 1.0:0.13:19.42,平均分子量(Mw)为 18 500。

关键词 芦笋, 提取, 纯化, 糖基组成

中图分类号 O629 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0446-05

Abstract The saponins extracted from the stem of *Asparagus officinalis* L., is a glucoside. In the mean time, it solved the problem of environment pollution about wastes of *Asparagus officinalis* L., and made the waste useful. The factors affected extractive efficiency of the saponin from *Asparagus officinalis* L. was investigated. The optimal conditions were 95% alcohol; V/W = 6:1; 90℃; 4h. The saponins average abstraction rate from fresh and dry wastes of *Asparagus officinalis* L. was 1.70% and 4.01% respectively. The saponins were dissociated with Al₂O₃ column. The eluent was 40% alcohol, the elute curves showed a symmetrical peak. The compound structure was determined by UV, IR and HPLC spectra *et al*. The results indicated that it belonged to the furostanol saponins and its glycosyl composed of xylose, fucose, arabinose, as well as the mole ratio was Xyl:Fuc:Ara = 1.0:0.13:19.42, Mw 18 500. In this paper, the saponins were extracted from wastes of *Asparagus officinalis* L. and analyzed glycosyl component in detail.

Key words *Asparagus officinalis* L., extraction, purification, monosaccharide composition

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)是百合科天门冬属中的食用种,又名石刁柏、龙须菜,其蛋白质和维生素的含量高于普通蔬菜,而且还含有天门冬酰胺、

天门冬酰胺酶及皂苷^[1]等特殊的营养成分。因此,芦笋作为高级营养蔬菜深受人们的推崇,芦笋罐头一直畅销国内外。

Received: December 13, 2004; Accepted: January 31, 2005.

This work was supported by a grant from the Province Sciences Foundation of Fujian (No. E 0110020).

* Corresponding author. Tel:86-591-83465716; E-mail: emfangyl@163.com

福建省自然科学基金资助项目(No. E 0110020)。

福建省闽南地区盛产芦笋,资源十分丰富,在加工罐头的过程中剩下大量的等外品和下脚料,约占原材料的45%左右,这些固体废弃物未得到充分利用,容易腐烂发臭,造成环境污染和资源浪费,因此对芦笋下脚料的化学综合利用研究具有重要意义。为解决环境污染问题,变废为宝,作者利用芦笋下脚料提取多糖^[2]和皂苷等生物物质。

皂苷是一类具有复杂化学结构的糖甙化合物,具有溶血、降胆固醇、抗炎和对肿瘤的抑制作用等多方面的药理活性^[3-4]。Goryanu Gm等发现芦笋皂苷能抑制胰腺癌、乳腺癌、子宫颈癌等癌细胞的生长^[5];Magota Hiromi等发现芦笋皂苷具有抗菌作用^[6]。李长秀等从芦笋根中分离得到菝葜皂甙元^[7]。而从芦笋茎中分离得到皂苷的研究在国内文献资料报道甚少,现将芦笋皂苷的提取纯化工艺和单糖组成进行报道。

1 材料和试剂

1.1 材料

新鲜芦笋和芦笋干品购自福建省东山县,先将新鲜芦笋洗净,摘下8~10cm的嫩茎供加工罐头用,剩余下脚料经粉碎后作为实验材料;芦笋干品经粉碎后备用。

1.2 试剂

D-半乳糖、D-甘露糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-岩藻糖均为上海试剂二厂产品;层析用氧化铝(200~300目),上海五四化学试剂公司产品;香草醛及其它试剂均为分析纯试剂。

2 方法

2.1 不同提取条件对芦笋皂苷得率的影响

新鲜芦笋下脚料和芦笋干品经粉碎后,采用有机溶剂萃取法提取皂苷化合物。实验探讨了不同的乙醇浓度、不同的液料比以及提取温度、提取时间对芦笋皂苷得率的影响,按下式计算芦笋皂苷得率。

芦笋皂苷得率(%) = 芦笋皂苷重量(g) ÷ 原材料重量(g) × 100%

2.1.1 不同的乙醇浓度对芦笋皂苷得率的影响:称250g新鲜实验材料,置于2000 mL的三口烧瓶中,分别加入6倍体积的55%、65%、75%、85%、95%等不同浓度的乙醇溶液,在90℃恒温水浴中加热回流提取4h,边加热边搅拌,冷却后过滤,将滤液浓缩。从滤液和滤渣中回收的乙醇可重复用于萃取。将浓缩液加到自制沉淀剂中进行沉淀,离心收

集沉淀物,用LGJ-1.5冷冻干燥机冷冻干燥,得到芦笋皂苷,并计算芦笋皂苷得率。以乙醇浓度为横坐标,以芦笋皂苷得率为纵坐标,作图选择出最佳的乙醇浓度。

2.1.2 不同的液料比对芦笋皂苷得率的影响:在其它提取条件相同的情况下,采用不同的液料比(V/W)进行实验,即95%乙醇体积(V/mL):原材料重量(W/g)分别为3:1、4:1、5:1、6:1、7:1。实验条件:95%乙醇,提取温度90℃,提取时间4h,操作步骤同2.1.1。以液料比(V/W)为横坐标,以芦笋皂苷得率为纵坐标,作图选择出最佳的液料比。

2.1.3 提取温度对芦笋皂苷得率的影响:在其它提取条件相同的情况下,采用50、60、70、80、90℃等不同的提取温度进行实验。实验条件:95%乙醇;液料比(V/W) = 6:1;提取时间4h,操作步骤同2.1.1。以提取温度为横坐标,以芦笋皂苷得率为纵坐标,作图选择出最适的提取温度。

2.1.4 提取时间对芦笋皂苷得率的影响:在其它提取条件相同的情况下,采用1、2、3、4、5h等不同的提取时间进行实验。实验条件:95%乙醇;液料比(V/W) = 6:1;提取温度90℃,操作步骤同2.1.1。以提取时间为横坐标,以芦笋皂苷得率为纵坐标,作图选择出最适的提取时间。

2.2 芦笋皂苷的纯化

称适量芦笋皂苷,用40%甲醇溶液溶解后,在氧化铝柱(1.6cm × 40cm)上进行层析,以40% CH₃OH溶液为洗脱剂,自动部分收集器收集,流出液0.5mL/min,4mL/管。从每3管中各抽1管,分别吸取0.2mL洗脱液,蒸馏水补充至0.5mL,按2.4.1方法,以香草醛-硫酸为显色剂跟踪测定440nm光密度,描绘洗脱曲线。将5~6次层析分离的有效成分收集在一起,进行浓缩后,用LGJ-1.5冷冻干燥机冷冻干燥,制备成精制皂苷样品。

2.3 芦笋皂苷的部分性质及其糖基组成分析

2.3.1 与香草醛-硫酸的显色反应:香草醛-硫酸是皂苷化合物的显色剂,常用于皂苷的定性分析。吸取浓度为0.1%的精制皂苷溶液0.3mL,用蒸馏水补充至0.5mL,加入香草醛溶液0.5mL、72% H₂SO₄ 2.5mL,混匀后在60℃恒温水浴中反应15 min,用冰水迅速冷却,10 min后采用721可见光分光光度计测定不同波长的光密度。在反应温度、反应时间及波长一定的情况下,测定不同皂苷含量的光密度。

2.3.2 紫外光谱分析:吸取浓度为0.1%的精制皂苷溶液0.5mL,用50%乙醇溶液定容至10mL,在W-

533 紫外分光光度计上测定波长 200 ~ 300nm 的光密度。

2.3.3 红外光谱分析:取适量经干燥后的芦笋精制皂苷,加入 KBr 粉末,研磨压片,置于 PE-577 型红外光谱仪上进行测试,扫描范围 4000 ~ 200 cm^{-1} 。

2.3.4 平均相对分子质量的测定:将精制皂苷粉末配制成 0.05% 的水溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液上柱描绘 HPLC 色谱图。色谱条件:岛津 LC-6A 高效液相色谱仪配 Waters 柱;流动相为二次蒸馏水;流速 1mL/min。由 RID-6A 示差折光仪检测,以葡聚糖为标样,由计算机自动打印出数据。

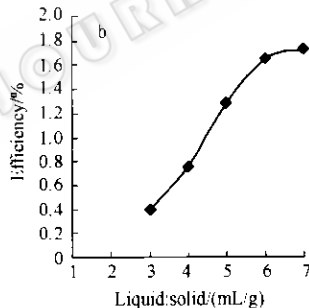
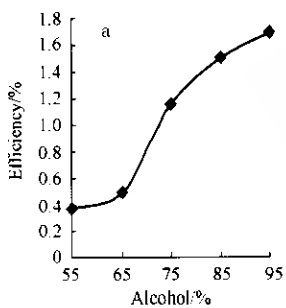
2.4 糖基组成与摩尔比的测定

称精制皂苷 50mg,加入 0.1mol·L⁻¹ 盐酸溶液 10mL,加热至 70℃ 水解 4h,抽真空除酸,制成进样液,上柱描绘 HPLC 色谱。色谱条件:岛津 LC-6A 高效液相色谱仪;色谱柱 SHIM-PACK-NH₂ (φ 4.6nm × 5.0cm);流动相为重蒸乙腈,流速 1mL/min。由 RID-6A 示差折光仪检测,以标准单糖为标样,用外标法由计算机自动打印出数据。

3 结果

3.1 不同提取条件对芦笋皂苷得率的影响

3.1.1 不同的乙醇浓度对芦笋皂苷得率的影响:



在其它实验条件相同得情况下,即液料比(V/W) = 6 : 1,提取温度 90℃,提取时间 4h,当乙醇浓度为 55% ~ 65% 时,芦笋皂苷的得率较低,随着乙醇浓度的不断增大,使芦笋皂苷得率逐渐增加。这是因为新鲜芦笋等外品或下脚料中含水率较高,如果采用低浓度的乙醇,不利于芦笋皂苷的提取。如图 1(a) 所示,最佳的乙醇浓度为 95%。

3.1.2 不同的料液比对芦笋皂苷得率的影响:在其它实验条件相同的情况下,即 95% 乙醇溶液,提取温度 90℃,时间 4h,随着液料比(V/W)的上升,增加了芦笋皂苷得率,当达到一定比例时,上升幅度不明显,如图 1(b),最佳的液料比(V/W)为 6:1。

3.1.3 提取温度对芦笋皂苷得率的影响:在其它实验条件相同的情况下,即:95% 乙醇,液料比(V/W) = 6:1,提取时间 4h。实验温度对芦笋皂苷得率有较大的影响,温度上升,芦笋皂苷得率也随之上升,最佳的实验温度为 90℃,如图 1(c)所示。

3.1.4 提取时间对芦笋皂苷得率的影响:在其它实验条件相同的情况下,即 95% 乙醇,液料比(V/W) = 6:1,提取温度 90℃,随着提取时间的增多,芦笋皂苷提取得率也随之增加,4 ~ 5h 的上升幅度缓慢,最佳的提取时间为 4h,如图 1(d)所示。

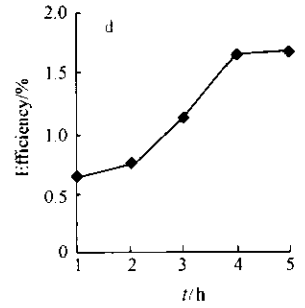
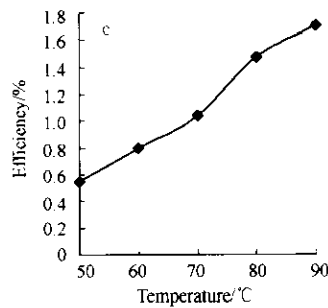


图 1 不同提取条件对皂苷得率的影响

Fig.1 Effect of Extractive conditions on the extractive efficiency of saponins

Liquid: different concentration alcohol (mL); Solid: raw material (g, the same below). Extractive conditions: 95% alcohol; Liquid(mL):solid(g) = 6:1; 90℃; 4h. a: Effect of concentration of ethanol on the extractive efficiency of saponins; b: Effect of liquid-solid ration on the extractive efficiency of saponins; c: Effect of extractive temperature on the extractive efficiency of saponins; d: Effect of extractive time on the extractive efficiency of saponins.

3.1.5 芦笋皂苷的得率:分别采用新鲜芦笋下脚料和芦笋干品为原料,按上述最佳工艺条件进行提取,即 95% 乙醇为萃取剂;液料比(V/W)为 6:1;温度 90℃;时间 4h。新鲜芦笋下脚料每次投料 250g,芦

笋干品每次投料 150g,操作步骤同 2.1.1。按 2.1 的计算式计算芦笋皂苷得率,新鲜芦笋下脚料提取皂苷的平均得率为 1.70%;芦笋干品提取皂苷的平均得率为 4.01%,见表 1。

表 1 芦笋皂苷得率

Table 1 Extractive efficiency of saponins from *Asparagus officinalis* L.

Material	Fresh <i>Asparagus officinalis</i> L.			Dry <i>Asparagus officinalis</i> L.		
	1	2	3	4	5	6
Material weight/g	250	250	250	150	150	150
Saponins weight /g	4.23	4.30	4.20	5.96	5.98	6.09
Extractive efficiency /%	1.69	1.72	1.68	3.97	3.99	4.06
Extractive efficiency average/%	1.70			4.01		

Extractive conditions: 95% alcohol; Liquid(mL):solid(g) = 6:1; 90°C; 4h.

3.2 柱层析分离

图 2 是芦笋皂苷在 Al₂O₃ 柱上的洗脱曲线, 为单一洗脱峰, 将多次经柱层析分离得到的有效成分合并, 经浓缩后干燥, 得到淡黄色的芦笋皂苷精制品。

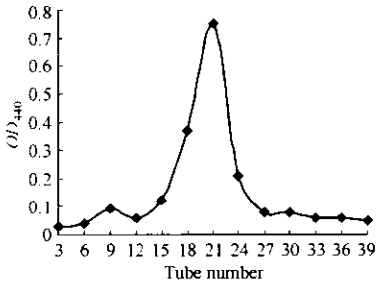


图 2 芦笋皂苷在 Al₂O₃ 柱上的洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of saponins from *Asparagus officinalis* L. on Al₂O₃ column

Eluent: 40% CH₃OH; Eluate rate: 0.5mL/min, 4 mL/tube; OD₄₄₀: determined with 721 spectrophotometer.

3.3 芦笋皂苷的部分性质与结构分析

3.3.1 芦笋皂苷与香草醛-硫酸的显色反应: 芦笋皂苷能与香草醛-硫酸呈黄褐色反应, 在 420~560nm 范围内的吸光值随波长增加而下降, 在反应温度、反应时间一定的情况下, 440nm 的吸光值随皂苷含量的增大而增大, 详见图 3。

3.3.2 UV 谱图分析: 图 4 是芦笋皂苷的 UV 图谱, 可以看出, 在 238nm 有明显吸收峰, 提示其皂甙元有共轭双键存在^[9]; 260nm 与 280nm 均没有吸收峰, 表明芦笋皂苷样品不含核酸与蛋白质^[8]。

3.3.3 IR 谱图: 图 5 是芦笋皂苷的 IR 图谱, 其结构特点是由呋喃甾烷醇和 β-D 吡喃糖的糖基组成的, 并通过 1,4 糖苷键或 1,2 糖苷键相连接。主要吸收谱带: 3500~3250cm⁻¹ 羟基伸缩振动; 1150~1000cm⁻¹ 是 β-D 吡喃糖糖苷的羟基伸缩振动; 1700~1500cm⁻¹ 范围内又宽又强的吸收谱带与呋喃甾烷(多稠环)骨架的伸缩振动相对应; 分子中烷基的吸收谱带出现在 2960~2850cm⁻¹ (C-II 伸缩振动) 和 1460~1370cm⁻¹ (C-H 变形振动); 1680~1620cm⁻¹ 和

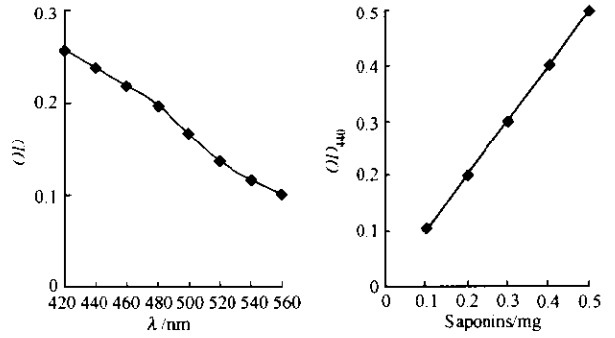


图 3 皂苷与香草醛-硫酸显色后的光密度

Fig.3 OD values of color reaction of saponins with vanillin-H₂SO₄ acid

Vanillin liquor 0.5mL; 72% H₂SO₄ 2.5mL; 60°C; 15min; 721 spectrophotometer.

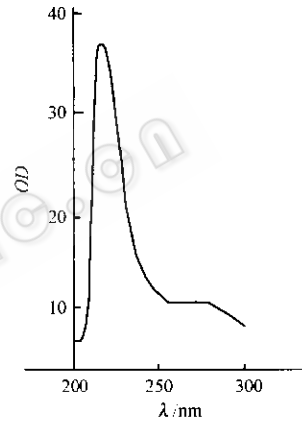


图 4 皂苷的 UV 谱图

Fig.4 UV spectrum of saponin 0.005% saponin, W-533 UV spectrophotometer

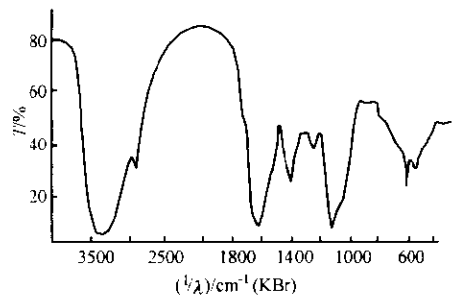


图 5 皂苷的 IR 谱图

Fig.5 IR spectrum of saponins PE-577 IR spectrophotometer

1250~1240cm⁻¹ 分别是羧基 C-C 和 C-O 伸缩振动^[9]。在 1000~800 cm⁻¹ 缺乏螺旋甾烷型的四个特征吸收峰, 即 980, 920, 895, 860 cm⁻¹, 可作为皂甙元 F-环开链的依据^[10]。因此它不属于螺旋甾烷型, 而属于呋喃甾烷型皂苷。

3.3.4 HPLC 图谱: 图 6 是芦笋皂苷的 HPLC 图谱, 根据计算机自动打印出数据, 出峰时间 3.358min, 计

算其峰宽指数为 4.55, 平均相对分子质量 (Mw) 为 18 500。

3.3.5 糖基组成与摩尔比: 图 7 是标准单糖 (a) 与皂苷酸水解液 (b) 的 HPLC 谱图, 通过与标准单糖的出峰时间相对照, 表明芦笋皂苷的糖基由木糖 (Xyl)、岩藻糖 (Fuc)、阿拉伯糖 (Ara) 等糖基组成, 根据这 3 种单糖的含量计算出它们的摩尔比, 即 Xyl:Fuc:Ara = 1.0:0.13:19.42, 详见表 2。

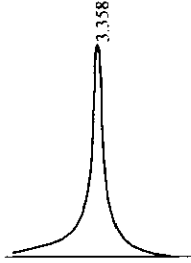


图 6 芦笋皂苷的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC spectrum of saponin

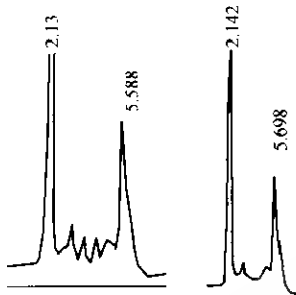


图 7 标准单糖 (a) 与皂苷酸水解液 (b) 的 HPLC 谱图

Fig. 7 HPLC spectrum of standard monosaccharides and acid hydrolytic fluid of saponin

(a): 3.225 (Man), 3.800 (Rha), 4.561 (Xyl), 4.967 (Fuc), 5.588 (Ara); (b): 4.500 (Xyl), 5.012 (Fuc), 5.698 (Ara).

表 2 芦笋皂苷的糖基组成与摩尔比

Table 2 Composition and mole ratio of saccharide in saponins from *Asparagus officinalis* L.

Glycosyl	Eluate time of standard/min	Eluate time of sample/min	Content/%	Mole ratio
Xylose	4.561	4.500	1.1247	1.0
Fucose	4.967	5.012	0.159	0.13
Arabinose	5.588	5.698	21.8374	19.42

4 讨论

通过对芦笋皂苷提取工艺的探讨, 筛选出最佳工艺条件, 即采用 95% 乙醇为萃取剂, 液料比 (V/W) 为 6:1; 提取温度 90℃, 提取时间 4h。从新鲜芦笋下脚料、芦笋干品提取皂苷的平均得率分别为 1.70%、4.01%, 芦笋干品的提取得率比新鲜原料

高。因此, 利用芦笋下脚料提取皂苷, 可以直接用新鲜原料提取, 也可以先将其晒干或烘干后再提取。

芦笋下脚料经提取皂苷后, 因一些水溶性的物质如多糖、色素等也被萃取出来, 所以残渣重量和体积都大为减少, 只为原来的 1/3 ~ 1/4, 而且这些残渣经晒干或烘干后, 还可加工成饲料加以利用。芦笋下脚料固体废弃物的综合利用的研究, 既可解决严重的环境污染问题, 又能充分利用再生资源, 变废为宝, 具有一定的社会效益和经济效益。

皂苷在抗癌方面的生理活性和药理作用, 是近年来国内外的研究热点^[11], 一些皂苷如人参皂苷、三七皂苷等已作为药物得到应用。因此, 作者将芦笋皂苷配制成口服液, 其稳定性和嗜口性都很好, 有待于进行开发应用, 有关芦笋皂苷的生理活性将做进一步研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Goryann Gm, Krokhnalyuk VV, Kintya PK et al. Steroidglycosides from *Asparagus officinalis*, *Asparagosides* F and H. *Khim Prii Soedin*, 1977, 6: 810
- [2] Fang YL (方幼兰), Liu YR (刘艳如), Lin SQ (林少琴) et al. Study on the polysaccharides from the *Asparagus officinalis* L. *Chinese Journal of Fujian Normal University (Natural Science)* [福建师范大学学报(自然科学版)], 1995, 11(2): 69-73
- [3] Ju Y (巨勇), Jia ZJ (贾忠建). Recent progress in steroidal saponins. *Chinese Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1995, 7(3): 60-68
- [4] Xu LX (徐礼棠). Progress in the research of analytical methods of saponins. *Chinese Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), 1982, 17(4): 314
- [5] Goryanu Gm, Nistryan AK. Steroid glycoside from *Asparagus officinalis* and their biological activity. *Nauka Farm Prakt*, 1984, 38: 39
- [6] Magota Hiromi SHM, Okubok, Shimoyamada M et al. Isolation of steroidal saponin as antifungal agent. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*, 1991, 48: 694
- [7] Li CX (李长秀), Zhang TH (张铁垣), Chen WJ (陈维杰). Gas chromatographic determination of sarsasapogenin in the root of *Asparagus officinalis* L. *Chinese Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 1995, 14(5): 61-65
- [8] Zhang LX (张龙翔), Zhang TF (张庭芳), Li LY (李令媛). *Biochemical Methods and Techniques* (生化实验方法和技术), Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 1997: 137
- [9] Zhu MH (朱明华). *Instrumental Assay* (仪器分析) 3rd ed, Beijing: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2000, pp. 294-303
- [10] Zhang JQ (张剑秋), Yu B (俞斌), Hui YZ (惠永正). Recent progress in research of furostanol sponins. *Chinese Journal of Organic Chemistry* (有机化学), 2000, 20(5): 663-665
- [11] Li J (李忌), Chen JJ (陈俊杰), Ju Y (巨勇) et al. Antitumour effect of steroidal saponins. *Chinese Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发), 1999, 11(1): 14-17