

紫花苜蓿中 苜蓿皂甙工业化生产工艺的研究

胡焕荣¹,高 云²,蒋旭华³

(1.桂林莱茵生物科技股份有限公司,广西桂林 541004;

2.诸城市浩天药业有限公司,山东诸城 262218;3.柳州铁道职业技术学院,广西柳州 545007)

摘 要:目的:采用大孔树脂分离技术将紫花苜蓿中苜蓿皂甙分离出来,用于制造降血脂、抗动脉硬化等功能性保健食品。方法:利用多年生草本植物-紫花苜蓿作原料,按原料:溶剂=1:8的比例加入45%乙醇溶剂,在80℃温度下提取二次,经专用大孔树脂吸附水洗除杂,再经30%和75%乙醇溶剂梯度洗脱,最后回收乙醇,喷雾干燥得苜蓿皂甙产品。结果:经过连续20批正常试生产,得到苜蓿皂甙平均回收率为93.8%,产品中苜蓿皂甙含量平均为80.4%,产品对原料的平均收率为1.72%。结论:试生产证明本工艺是成功的,它能一次性将产品中苜蓿皂甙含量提高到80%以上,可以直接用于制药行业,是值得推广的新工艺。

关键词:苜蓿皂甙,紫花苜蓿,大孔树脂,梯度洗脱

Study on the industrialized production of alfalfa saponin from alfalfa

HU Huan-rong¹, GAO Yun², JIANG Xu-hua³

(1. Guilin Layn Natural Ingredients Corp, Guilin 541004, China;

2. Zhucheng Haotian Pharm Co., Ltd., Zhucheng 262218, China;

3. Liuzhou Transport Vocational Technical College, Liuzhou 545007, China)

Abstract: Objective: The alfalfa saponin was separated from alfalfa by macroporous resin, The alfalfa saponin was used in the manufacture of decreasing blood fat, anti-atherosclerosis drug, and other features of health care. Method: Using the perennial herb-alfalfa for raw materials, according to the raw materials:solvent=1:8 ratio by adding 45% ethanol solvent, temperature 80℃, for two times, the special macroporous resin adsorption water impurity, and then by 30% And 75% ethanol solvent gradient elution, then final recovery of ethanol, spray drying, alfalfa saponin products was obtained. Results: After 20 consecutive granted normal preproduction, the average recovery rate of alfalfa saponin was 93.8 percent, the product of alfalfa saponin content in an average was 80.4 percent, the average yield of raw materials was 1.72 percent. Conclusion: The test proved that the production of this process was successful, it would improve product in alfalfa saponin content to more than 80% at one-time, and it can be used in the pharmaceutical industry to promote the new technology.

Key words: alfalfa saponin; alfalfa; macroporous resin; gradient elution

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)08-0274-03

紫花苜蓿(alfalfa)又名紫花苜蓿、苜蓿、南苜蓿、金花菜、光风草、草头等,为豆科植物,是多年生草本植物。营养成分特点是每100g干苜蓿粉含纯蛋白质4.2g、铁4.8mg、胡萝卜素3.48mg、维生素B₂ 20.22mg、维生素C 85mg、纯苜蓿皂甙1.3~1.6g。《中药大辞典》记载其主要功能为:“清脾胃、利大小肠、下膀胱结石。”《本草纲目》记载苜蓿:“安中利人,可久食。利五脏,轻身健人。苜蓿含有皂甙、卢瑟醇、苜蓿酚、

大豆异黄酮、苜蓿素、瓜氨酸等;还含有丰富的蛋白质、碳水化合物、胡萝卜素、维生素C、B₂、K、膳食纤维和磷、钙矿物质等较全面的营养物质。苜蓿的水醇提取物—苜蓿皂甙(Alfalfa Saponins)具有降血脂、抗动脉硬化等作用。苜蓿皂甙降血脂的机理独特,一般降血脂制剂的作用部位在肝脏,是当胆固醇通过胃肠道吸进入血液达到肝脏后才起作用;而苜蓿皂甙降血脂的机理是:在胃部阻止外源性胆固醇在胃肠道中吸收,同时促进内源性胆固醇和胆汁的排泄,使血清磷脂浓度降低,使血浆蛋白在体内分布正常化。本品长期服用无毒性,并能有效地控制血浆胆固醇和甘油三酯,是目前推崇的降血脂保健功能食品。

收稿日期:2008-11-11

作者简介:胡焕荣(1963-),男,工程师,研究方向:生物发酵及天然植物的提取和开发。

目前国内的工艺生产苜蓿皂甙含量在 50% 以下,只能用于保健食品,不能用于药品生产。而本文新工艺能一次性将苜蓿皂甙含量提高到 80% 以上,可以直接用于降血脂药品生产,是值得推广的新工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

紫花苜蓿 来自有苜蓿之乡的沧州,主要取紫花苜蓿地上部分(不得有霉变),要求干原料中苜蓿皂甙含量 $\geq 1.3\%$;专用大孔吸附树脂 与树脂生产公司合作开发的一种专门用于苜蓿皂甙分离的大孔树脂(HS300 型);QH380 澄清剂 自制;人参二醇标准品 购自中国药品生物制品检定所;乙醇、甲醇、香草醛、高氯酸 分析纯;重蒸水,食用乙醇(95%)。

紫外分光光度计 上海产 53WB;静态提取罐(容积 4m^3),真空浓缩罐(蒸发量 1000kg/hr),冷却沉淀罐(容积 1m^3),管式离心机(GQ105B 型),树脂柱($\Phi 300\text{mm} \times 2100\text{mm}$),真空干燥箱(YZG-15 型),粉碎机(30B 型),真空泵(WLW-100 型,无油),电子天平(1/10000),容量瓶,超声波清洗器,玻璃比色皿(1cm)。

1.2 工艺流程

原药材 → 前处理 → 提取 → 浓缩回收乙醇 → 加水冷却静置
↓
浸膏浓缩 ← 溶剂梯度洗脱 ← 水洗除渣 ← 树脂柱吸附 ← 离心除渣
↓
喷雾干燥 → 混合 → 包装灭菌 → 成品

1.3 操作要点

1.3.1 前处理 原料切成 0.5~1cm 的小段。

1.3.2 提取 每批投料 350kg,按原料:溶剂 = 1:8,加入 45% 乙醇溶液,温度 80°C 下,回流提取 2h,共提取 2 次。渣加入少量的工艺水,蒸汽加热至 $70\sim 80^\circ\text{C}$ 进行减压回收乙醇。

1.3.3 浓缩回收乙醇 两次提取液合并,在温度 70°C 、真空度 0.06MPa 下,回收乙醇,并控制浓缩液:原料 = 1.5:1,浓缩结束。

1.3.4 冷却沉淀 打开搅拌,加入沉降剂(用量为 3mg/L),同时将浓缩液冷却至室温,然后静置 6h 以上。

1.3.5 离心除渣 用高速管式离心机(转速 16000r/min)除渣、除胶体、除蛋白质,要求离心液透光度 $\geq 90\%$ 。

1.3.6 树脂吸附 专用大孔树脂吸附苜蓿皂甙。要求吸附树脂量:原料 = 1:3.5,吸附流量控制在 1BV/h (BV 为树脂柱中树脂的体积)。

1.3.7 水洗除渣 吸附完毕,用 3BV 工艺水进行水洗 2h 左右,要求流出液至澄清透明,水洗流量控制在 1.5BV/h 左右。

1.3.8 溶剂梯度洗脱 水洗完后,第一次用 1BV 的 30% 乙醇溶液进行洗脱;第二次用 1.5BV 的 75% 乙醇溶液进行洗脱,流量控制在 1BV/h ,主要收集第二次洗脱液,收集量为 1.5BV,要求洗脱液澄清透明。回收前段混浊部分、第一次洗脱液和后段颜色略淡带乙醇味的部分返回,与下次提取液合并一起浓缩。

1.3.9 浸膏浓缩 收集的洗脱液进行减压浓缩回收乙醇并制成浸膏。要求料液无乙醇味、温度控制在 60°C 以下、真空度控制在 0.08MPa 以上,浸膏浓度控

制在 25 波美度左右。

1.3.10 喷雾干燥 将浸膏进行喷雾干燥。要求控制进风温度为 170°C ,出口温度为 90°C ,水分控制在 5% 以下。

1.3.11 粉碎 将干燥后的浸膏进行粉碎,要求粒度在 60~100 目。

1.3.12 包装 干粉抽样送检,合格后按客户要求要求进行包装。

1.4 实验方法

1.4.1 绘制标准曲线

1.4.1.1 5% 香草醛冰乙酸溶液的配制 精准称取香草醛 5g,加入冰乙酸溶解并定容至 100mL。

1.4.1.2 标准曲线的建立 精密称取恒重后的人参二醇标准品 50mg 置于 50mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容(即标准溶液浓度为 1mg/mL)。用吸管精密吸取上述标准液 0、20、40、60、80、100 μL (相当于人参二醇 0、20、40、60、80、100 μg)分别置于 5mL 具塞刻度试管中,放在水浴上挥发干燥(要求温度为 60°C 以下),精确加入 5% 的香草醛冰乙酸溶液 0.2mL,振摇 5min 溶解,再加入 0.8mL 高氯酸,混合后在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 水浴 10min,取出在冰浴中冷却后加入冰乙酸 5.0mL 混均,以 1cm 比色杯于 560nm 波长处测得吸光值。作人参二醇量与吸光值的标准曲线,进行回归处理,得回归方程为 $y = 120.03x + 3.61$, ($r = 0.999$)。

1.4.2 样品的测定

1.4.2.1 样品处理 精密称取皂甙产品 50mg 置于 100mL 容量瓶中,加入少量蒸馏水在超声波下溶解 30min,再定量至刻度,摇匀,放至 15min。

1.4.2.2 显色 精确吸取上述已处理好上清液 1mL,精确加入 5% 的香草醛冰乙酸溶液 0.2mL,振摇 5min 溶解,再加入 0.8mL 高氯酸,混合后移入 10mL 具塞刻度试管中,在 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 水浴 10min,取出在冰浴中冷却后加入冰乙酸 5.0mL 混均,以 1cm 比色杯于 560nm 波长处测得吸光值。在标准曲线上查出样品吸光度值对应的毫克数或采用回归方程计算。

1.4.2.3 计算 此法的最低检出限度为 $10\text{mg}/100\text{g}$ 试样苜蓿皂甙。在人参二醇 $20\sim 100\mu\text{g}$ 之间成线性关系,相关系数为 0.999,从回归方程看,线性关系好($r = 0.999$)。苜蓿皂甙计算公式:

$$\text{苜蓿皂甙}(\text{g}/100\text{g}) = \frac{A \times 2.5 \times V \times 100}{W \times 1000 \times 1000}$$

式中:W-取样量(g);A-从标准曲线得到的被测液中的人参二醇量(μg);V-稀释倍数;2.5-RB 组皂甙平均分子量与人参二醇分子量之比(常数)。

2 结果与讨论

2.1 连续生产 10 批生产情况

连续生产 10 批生产情况见表 1。

从表 1 可知,每批平均投料 350kg,苜蓿皂甙(含量 $\geq 80\%$)的平均产量为 6.02kg,原料中苜蓿皂甙平均回收率为 93.8%,产品对原料平均收率为 1.72%。试生产证明本工艺是可行的,是值得推广的新工艺。

2.2 技术参数讨论

2.2.1 原料前处理 原料过细和过粗,都会影响原料

表1 10批生产情况

批号	原料			产品			苜蓿皂甙回收率(%)	产品收率(%)
	重量(kg)	含量(%)	纯皂甙量(kg)	重量(kg)	含量(%)	纯皂甙量(kg)		
06005	350	1.43	5.01	5.86	80.1	4.69	93.6	1.67
06006	350	1.43	5.01	5.79	80.5	4.66	93.1	1.65
06007	350	1.43	5.01	5.92	79.8	4.72	94.2	1.69
06008	350	1.43	5.01	5.83	80.3	4.68	93.5	1.67
06009	350	1.43	5.01	5.75	80.9	4.65	92.8	1.64
06010	350	1.52	5.32	6.29	80.0	5.03	94.5	1.80
06011	350	1.52	5.32	6.23	80.2	5.00	94.1	1.78
06012	350	1.52	5.32	6.16	80.9	4.98	93.7	1.75
06013	350	1.52	5.32	6.12	81.1	4.96	93.3	1.75
06014	350	1.52	5.32	6.27	80.4	5.04	94.8	1.79
平均	350	1.48	5.17	6.02	80.4	4.84	93.8	1.72

注:苜蓿皂甙回收率指产品中纯苜蓿皂甙除原料中纯苜蓿皂甙;产品收率指产品中产品重量除原料重量。

中苜蓿皂甙回收率、产品的收率和产品的含量,中试和试生产都证明原料的切片控制在0.5~1cm之间最佳。

2.2.2 提取 采用原料:溶剂=1:8,溶剂为45%乙醇溶液,在温度80℃下回流提取2次,每次为2h,原料中苜蓿皂甙回收率基本上达到90%以上,中试和试生产都证明增加提取时间、次数和溶剂含量,会导致综合生产成本提高,影响经济效率。

2.2.3 冷却沉淀 本工艺采用自制的QH380澄清剂,对提取液中蛋白质、胶体、淀粉、叶绿素、有机酸去除率达到80%以上。它对提高产品中苜蓿皂甙的含量起着重要的作用。

2.2.4 树脂吸附洗脱 本工艺采用新研究的HS300型专用大孔树脂。其特点:对苜蓿皂甙吸附量大(100mg/g树脂),对杂质及色素吸附量少,其杂质经水洗、低醇洗脱大部分被除去;树脂吸附的苜蓿皂甙经75%的乙醇溶剂洗脱可以完全洗脱下来,洗脱液中苜蓿皂甙含量高,此新研究的专用吸附树脂和梯度洗脱方法为本生产工艺技术的关键。

2.2.5 本工艺生产的产品为淡黄色粉末,平均苜蓿皂甙含量≥80%。

3 结论

经过20批试生产证明,每批平均投料350kg,可

(上接第273页)

下坚实的基础,利于生产厂家对生产副产品的加工利用。

3.2 通过单因素和正交实验,得到葡萄皮渣中反式白藜芦醇的最佳提取工艺条件为料液比1:20,温度60℃,乙醇浓度80%,提取时间5h。在此条件下,反式白藜芦醇的提取得率为94.2μg/g。

参考文献

- [1] 康彦芳,杨永杰,封军来,等.从葡萄穗轴废渣中提取白藜芦醇的工艺研究[J].食品科学,2007,28(11):203~207.
- [2] 范婷婷,王欣,刘颖.白藜芦醇制备方法的研究进展[J].精细与专业化学品,2007,15(16):11~13.
- [3] <http://www.winechina.com/html/2008/07/20080717670.html>
- [4] 张秀玲,祝义伟,孙佳平.酿酒后的葡萄渣的综合利用[J].食品工业科技,2008,29(7):284~288.

平均产苜蓿皂甙含量≥80%的产品量为6.02kg,原料中苜蓿皂甙平均回收率为93.8%,产品对原料平均收率为1.72%。说明本工艺是可行的,由于它能一次性将产品中苜蓿皂甙含量提高到80%以上,而且产品为淡黄色粉末,微生物和重金属指标都达到国家标准,可以直接用于制药行业,所以它是值得推广的新工艺。

参考文献

- [1] 王鑫,马永祥,李娟.紫花苜蓿营养成分及主要生物学特性[J].草业科学,2003,20(10):39~40
- [2] 姚新生主编.天然药物化学[M].北京:人民卫生出版社,1994.336.
- [3] 冀春如,等.中药化学实验技术与实验[M].郑州:河南科技出版社,1998.366.
- [4] 贺玉薇,王松柏,王代军.苜蓿皂甙提取工艺研究[J].草原与草坪,2005(5):27~29
- [5] 刘凯,庞庆丰,周范,等.苜蓿皂甙对血胆固醇和LDL清除非受体途径的影响[J].徐州医学院学报,1995,15(2):118
- [6] 余从洪,郭江宁,温锦涛,等.AB-8大孔树脂分离纯化苜蓿总皂苷的研究[J].中国健康文摘,2006,3(9):1~2.
- [5] 丁宇,范红.天然植物活性成份白藜芦醇的抗炎作用研究进展[J].华西医药,2008,23(1):199~200.
- [6] Carusq Francescct Tanskj Joseph, VillegasEstrada, Adriel, et al.Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2004,52(24):7279~7285.
- [7] Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, et al.Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles:role of nitric oxide and potassium channels[J].Invest Ophthal-mol Vis Sci,2007,48(9):4232~4239.
- [8] 张文众,李宁,李蓉.白藜芦醇的雌激素作用研究[J].中国食品卫生杂志,2008,20(3):214~216.
- [9] Wu CC, Wu CI, Wang WY, et al.Low concentrations of resveratrol potentiate the antiplatelet effect of prostaglan-dins[J]. Planta Med,2007,73(5):439~443.