

# 苦瓜皂甙的提取工艺优化研究

田力东<sup>1,2</sup>, 张名位<sup>2</sup>, 郭祀远<sup>1</sup>, 张雁<sup>2</sup>, 张瑞芬<sup>2</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

(2. 广东省农业科学院生物技术研究所农业部功能食品重点开放实验室, 广东 广州 510610)

**摘要:** 研究苦瓜皂甙的提取工艺和测定方法。以人参皂甙 Rg1 标准品为参照, 采用分光光度法对苦瓜中皂甙进行定量分析; 以料液比、浸提温度、乙醇的质量分数、提取时间为考察因素, 采用二次回归正交旋转组合试验方法对苦瓜皂甙提取工艺条件进行优化。通过贡献率法分析表明, 各因子对浸提率影响的相对大小依次为: 提取时间>料液比>乙醇浓度>浸提温度; 经频率分析得到苦瓜皂甙浸提率>2.18%的优化条件为: 料液比 10.190~11.016 倍, 浸提温度 68.80~72.33℃, 乙醇浓度 71.32~74.32%, 提取时间 13.484~19.396h, 且所建立的数学模型在此范围内能够较准确的预测皂甙的浸提率。料液比 1:10, 浸提温度 70℃, 乙醇浓度 70%, 提取时间为 12h, 这个条件比较贴近实际生产应用, 且比较接近理论值。

**关键词:** 苦瓜皂甙; 浸提工艺; 数学模型

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2007)01-0040-05

## Study on Optimization of Extraction Technology of Saponin from *Momordica charantia L.*

TIAN Li-dong<sup>1, 2</sup>, ZHANG Ming-wei<sup>2</sup>, GUO Si-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, ZHANG Rui-fen<sup>2</sup>

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture, Bio-tech. Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** In this paper, the extraction technology of saponin in *Momordica charantia L.* and methods for measuring saponin were studied. The quantitative analysis of saponin extracted from *Momordica charantia L.* was made by spectrophotometry using the Ginsenoside Rg1 standard as reference. Several influential factors in the extraction of saponin from *Momordica charantia L.*, including solid-liquid ratio, temperature, mass fraction of alcohol, time, were investigated and optimized by means of orthogonal rotational combination design. The results indicated that the effects of factors on the extraction were in the order of extraction time>solid-liquid ratio>mass fraction of alcohol >temperature. The frequency analysis showed that the optimal solid-liquid ratio, temperature, mass fraction of alcohol and extraction time were 10.190~11.016, 68.80~72.33℃, 71.32~74.32% and 13.484~19.396h, respectively, under which the extraction rate of saponin was above 2.18%. Additionally, the mathematic model was well established to estimate the extraction rate of saponin from *Momordica charantia L.* within the investigated range. From a practical viewpoint, Solid-liquid ratio, temperature, mass fraction of alcohol and extraction time was considered to be 1:10, 70℃, 70% and 12h, respectively, which were close to both the practical production and the theoretical values.

**Key words:** Saponin; *Momordica charantia L.*; Extraction technology; Mathematic model

苦瓜是一种常见蔬菜, 中医认为它性味苦寒, 具有清凉解热作用。现代研究证实苦瓜具有抗肿瘤、抑菌、提高免疫功能、抗 HIV、降血糖等作用<sup>[1~3]</sup>。因此建立一个合理的提取模型对进一步分离纯化主要活性成分和探讨其作用机制具有重要作用。已有研究表明, 苦瓜皂甙是苦瓜中有效的成分之一, 为四环三萜类化

收稿日期: 2006-09-15

田力东, 硕士, 研究方向为天然糖质分离纯化新方法新技术

通讯作者: 张名位博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为生物活性物质

合物。采用二次回归正交旋转组合试验方法建立一个可以较准确的预测苦瓜皂甙浸提率的数学模型, 进而找到一个比较接近理论值而且适合实际生产的优化工艺条件。本研究旨在为进一步研究苦瓜皂甙这种活性物质的功能评价和实际生产提供保证。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

苦瓜干: 由广东省农科院蔬菜研究所提供的鲜苦

瓜,切片,经 70℃ 烘干作为试验材料。

试剂:乙醇、石油醚、正丁醇、香草醛、甲醇、冰醋酸、高氯酸等,均为国产分析纯;人参皂甙 Rg<sub>1</sub> 标准品由中国药品生物制品检定所购买。

## 1.2 主要试验仪器

紫外可见分光系统(UV-1700);旋转蒸发器(RE-52A,上海生化仪器厂)。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 标准曲线的绘制

精密称取干燥至恒重的人参皂甙 Rg<sub>1</sub> 对照品 5mg,加甲醇溶液定容至 5mL,摇匀,作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 30、60、90、120、150、180μL 于具塞试管中,水浴挥去溶剂;加入新配置的 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.2mL 和高氯酸 0.8mL;在 60℃ 水浴中加热 15min,流水冷却,加冰醋酸 5mL,放置 15min,在 548nm 处测吸光度 A,另取甲醇溶液随行空白对照。以吸光度(A)为纵坐标,人参皂甙 Rg<sub>1</sub> 取样量为横坐标绘制标准曲线。经统计分析,得线性回归方程为:  $Y=0.0055X+0.0085$ ,  $R^2=0.9998$ 。

### 1.3.2 苦瓜皂甙提取工艺

参考崔恒林等<sup>[4]</sup>的方法并稍加改动,对苦瓜皂甙进行提取和测定其浸提率。

(1)取一定量苦瓜干,粉碎过 40 目筛,得苦瓜粉。

(2)称取 5g 干燥苦瓜粉,置于 500mL 锥形瓶中,然后向其中加入一定体积不同质量分数的乙醇溶液,摇匀,在不同温度下回流浸提一定时间,冷却后用布氏漏斗过滤,将滤液减压浓缩至干。

(3)用 60mL 蒸馏水溶解,两倍体积石油醚萃取 2 次,合并石油醚层,用少量水洗石油醚层,水层及洗液合并,然后浓缩至 40mL。

(4)水溶液用水饱和正丁醇萃取 3 次(30、30、20mL),取正丁醇相浓缩至呈褐色粘稠状时冷却。

(5)加入适量甲醇溶解,并转移到 25mL 容量瓶中进行定量,为待测液。

### 1.3.3 二次回归正交旋转组合设计优化苦瓜皂甙的浸提工艺

以影响皂甙提取的料液比( $X_1$ )、浸提温度( $X_2$ )、乙醇质量分数( $X_3$ )、提取时间( $X_4$ ) 4 个因素为自变量,以皂甙相对苦瓜干粉含量(%)为考察值,作 4 因素 2 水平的二次正交旋转组合设计<sup>[5]</sup>,共计 36 个试验点,其中 12 个为中心实验,用以估计误差。试验因素和水平见表 1。

### 1.3.4 苦瓜皂甙的定量

量取适量待测液,按照测皂甙方法以甲醇为空白溶液,在 548nm 处测定吸光度。皂甙浸提率计算公式为:

$$\text{皂甙浸提率}(\%) = \frac{1 \cdot X \cdot V}{1000M \cdot v} \times 100\%$$

式中 1—人参皂甙标准品的浓度,  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; X—内标法计算得到的待测液取样量,  $\mu\text{L}$ ; V—定容体积, mL; v—实际待测液取样量,  $\mu\text{L}$ ; M—苦瓜粉的质量, g。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the regression orthogonal tests

规范变量 $Z_j$	料液比 $X_1/w:v$	浸提温度 $X_2/^\circ\text{C}$	乙醇浓度 $X_3/\%$	提取时间 $X_4/h$
上星号臂(2)	1:14	90	90	20
上水平(1)	1:12	80	80	16
零水平(0)	1:10	70	70	12
下水平(-1)	1:8	60	60	8
下星号臂(-2)	1:6	50	50	4
变化区间 $\Delta_j$	1:2	10	10	4

## 2 统计分析方法

### 2.1 四元二次回归方程的建立与检验

料液比、浸提温度、乙醇浓度和提取时间等因素对苦瓜皂甙提取的影响较大,本研究以苦瓜皂甙浸提率为指标,采用二次回归正交旋转设计对提取工艺进行了优化,试验结果见表 2。

通过 DPS 软件对表 2 数据进行处理,方差分析结果见表 3。由表 3 可知,料液比、乙醇浓度和提取时间的一次项和二次项对皂甙的提取在 0.01 水平呈极显著;浸提温度的二次项对皂甙的提取在 0.01 水平呈极显著;浸提温度和提取时间的交互项在 0.01 水平呈极显著。由于各因素对提取时皂甙浸提率的影响不是简单的线性关系,为了更明确各因子对其的影响,采用 DPS 软件对表 2 中皂甙浸提率数据进行多元回归分析,得到如下回归数学模型:

$$Y=2.41667+0.03580X_1+0.00511X_2+0.06534X_3+0.04564X_4-0.07628X_1^2-0.13366X_2^2-0.10753X_3^2-0.03764X_4^2+0.00937X_1X_2-0.00369X_1X_3-0.01222X_1X_4+0.00426X_2X_3+0.03097X_2X_4-0.00483X_3X_4$$

由方差分析可知,回归方程失拟性检验  $F_1=1.667(F_{0.05}(10,11)=2.94)$  不显著,则可认为所选用的二次回归模型是适当的;对  $\alpha=0.10$  显著水平剔除不显著项后,简化的回归方程为:

$$Y=2.41667+0.03580X_1+0.06534X_3+0.04564X_4-0.07628X_1^2-0.13366X_2^2-0.10753X_3^2-0.03764X_4^2+$$

0.03097X<sub>2</sub>X<sub>4</sub>

表 2 苦瓜皂甙的二次正交旋转设计试验及结果

Table2 Results of quadric regression orthogonal rotary test of

Saponins extracted from <i>Momordica charantia L</i>					
序号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y
1	1	1	1	1	2.234
2	1	1	1	-1	2.120
3	1	1	-1	1	2.107
4	1	1	-1	-1	2.020
5	1	-1	1	1	2.102
6	1	-1	1	-1	2.170
7	1	-1	-1	1	2.039
8	1	-1	-1	-1	1.989
9	-1	1	1	1	2.170
10	-1	1	1	-1	2.020
11	-1	1	-1	1	2.030
12	-1	1	-1	-1	1.852
13	-1	-1	1	1	2.089
14	-1	-1	1	-1	2.043
15	-1	-1	-1	1	1.957
16	-1	-1	-1	-1	1.952
17	-2	0	0	0	2.075
18	2	0	0	0	2.170
19	0	-2	0	0	1.916
20	0	2	0	0	1.870
21	0	0	-2	0	1.857
22	0	0	2	0	2.139
23	0	0	0	-2	2.143
24	0	0	0	2	2.411
25	0	0	0	0	2.416
26	0	0	0	0	2.498
27	0	0	0	0	2.411
28	0	0	0	0	2.430
29	0	0	0	0	2.384
30	0	0	0	0	2.411
31	0	0	0	0	2.398
32	0	0	0	0	2.370
33	0	0	0	0	2.420
34	0	0	0	0	2.443
35	0	0	0	0	2.402
36	0	0	0	0	2.416

表 3 苦瓜皂甙方差分析结果

Table3 Variance analysis of Saponins extracted from

*Momordica charantia L*

变异来源	平方和	自由度	均方	比值 F	显著水平 P
X <sub>1</sub>	0.0034	1	0.0034	22.77157	0.00010**
X <sub>2</sub>	0.0001	1	0.0001	0.46473	0.50287
X <sub>3</sub>	0.0114	1	0.0114	75.87654	0.00000**
X <sub>4</sub>	0.0056	1	0.0056	37.02571	0.00000**
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.0207	1	0.0207	137.87298	0.00000**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.0635	1	0.0635	423.36002	0.00000**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.0411	1	0.0411	273.98220	0.00000**
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	0.0050	1	0.0050	33.57549	0.00001**
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.0002	1	0.0002	1.04133	0.31913
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.0000	1	0.0000	0.16160	0.69175
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.0003	1	0.0003	1.76806	0.19789
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.0000	1	0.0000	0.21515	0.64753
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.0017	1	0.0017	11.36092	0.00289**
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0.0000	1	0.0000	0.27635	0.60461
回归	0.1530	14	0.0109	F <sub>2</sub> =72.839	0.00000**
剩余	0.0032	21	0.0002		
失拟	0.0019	10	0.0002	F <sub>1</sub> =1.667	0.15548
误差	0.0013	11	0.0001		
总和	0.1562	35			

2.2 数学模型的应用分析

2.2.1 单因子效应分析

选取 3 个因子固定为零水平，考察第四个因子与苦瓜皂甙提取率之间的关系，根据四个因子与苦瓜皂甙提取率的相关性得到曲线关系组图 1。

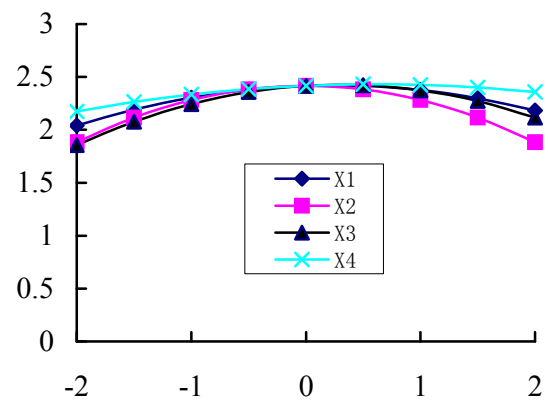


图 1 单因子与皂甙提取率关系图

Fig1 The effect of Single factor on extraction percentage

由图 1 可知：皂甙提取率随着料液比的增加呈现先增加后降低的趋势，说明料液比应选取一个最佳值，并非越大越好。随着浸提温度的增加，皂甙的提取率也是先增加后降低，说明在温度低的时候，可能温度对细胞壁的溶胀效果不是很好，而且根据分子热运动理论，细胞内分子运动缓慢，不能完全离开细胞内部，随着温度升高细胞壁也逐渐破裂，分子运动速度加快，细胞内容物逐渐完全溶出，但当超过某一个温度的以后，由于温度的影响可能造成皂甙这种成分改变原有的结构。同样，乙醇浓度的逐渐升高造成皂甙提取率先升高后降低的变化，造成这种影响的原因可能是，皂甙等一些小分子物质易溶于极性溶液，在乙醇浓度较低的时候，醇溶液的极性较低，但随着溶液浓度增加极性也增加，皂甙有一个适合的极性值（某一乙醇浓度），超过这个值皂甙反而溶出能力下降。皂甙提取率随着提取时间的增加有一个缓慢攀升的趋势，之后趋于水平，远端有下降趋势，这说明在浸提过程中，随着时间增加皂甙慢慢溶出来，待皂甙完全溶出后，一段时间内不会有其他变化，但时间过长，持续的条件附加可能会引起皂甙的发生化学变化。

2.2.2 双因子交互作用分析

选取两个因素固定于零水平，求余下两个因素的交互效应关系，可得到两两交互的曲面图，如图 2。

由图 2 中的曲面图可知，随着某个因素水平的提高，浸提率有一个先升高后降低的趋势。

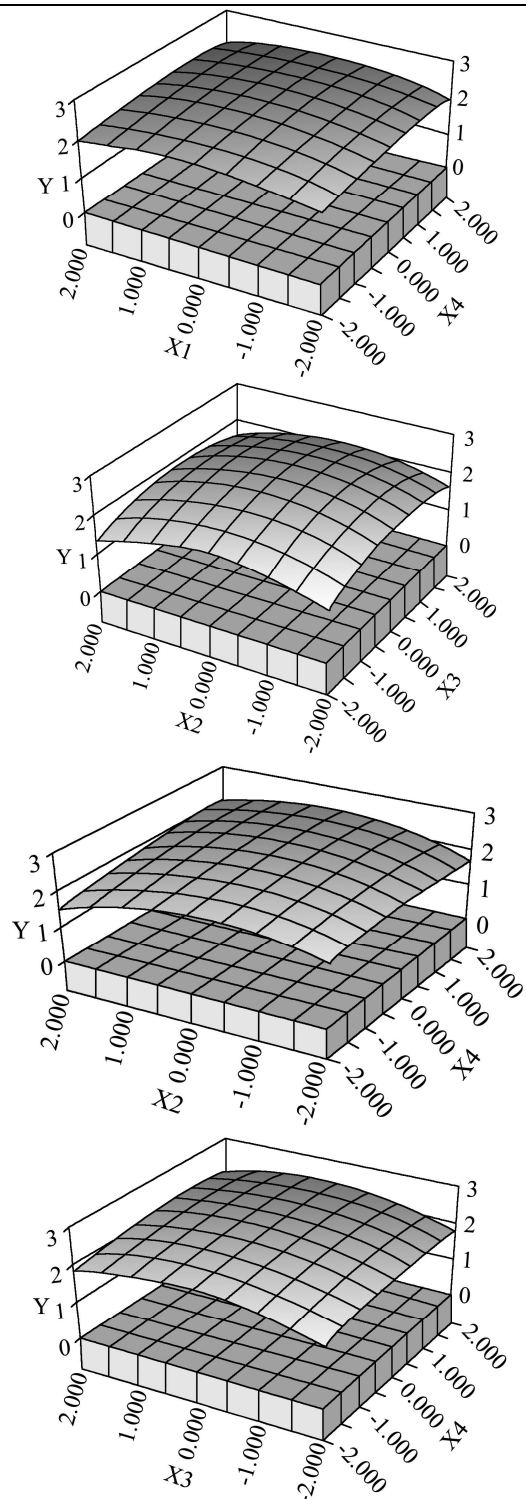
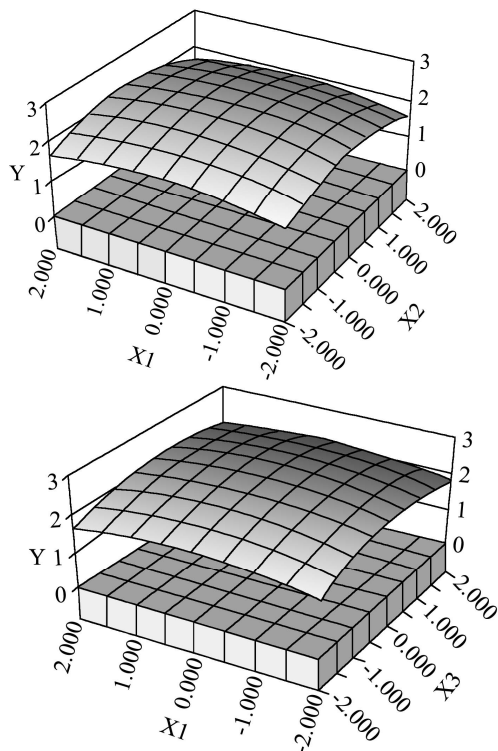


图 2 两两交互效应的曲面图和等高线图

Fig2 The curved surface and contour charts of two factors interaction

2.2.3 各因素的重要性分析

对各因素的重要性分析采用贡献率法<sup>[6]</sup>

$$\delta = \begin{cases} 0 & \text{若 } F \leq 1 \\ 1 - \frac{1}{F} & \text{若 } F > 1 \end{cases}$$

设各因素回归系数显著性检验的均方比为  $F_{(j)}$ ,  $F_{(ij)}$ 。

令各因素对指标的贡献率可表示为:

$$\Delta_j = \delta_j + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \delta_{ij} + \delta_{jj}$$

$j=1,2,\dots,n$

据表 4 均方比  $F$ , 可知料液比、浸提温度、乙醇浓度、提取时间对浸提率的贡献率分别为  $\Delta_1=2.18588$ ,  $\Delta_2=1.47347$ ,  $\Delta_3=1.98317$ ,  $\Delta_4=2.61640$ 。因  $\Delta_4 > \Delta_1 > \Delta_3 > \Delta_2$ , 所以对提取率作用大小依次为:提取时间>料液比>乙醇浓度>浸提温度。

因为皂甙类物质的熔点在  $100^\circ\text{C}$  以上, 对此类物质的化学性质改变不大, 温度条件的施加起到了细胞壁溶胀作用和加快分子热运动的作用; 料液比为分子提供了一个运动空间; 提取时间是分子完全运动到细胞外的保障; 根据相似相容原理, 一个合理的乙醇浓度能够加速分子的热运动。由此看来, 四个因素对浸提率的影响都比较重要, 它们之间的差别不是很大, 相对而言可能是出现了提取时间>料液比>乙醇浓度>浸提温度这样情况。

#### 2.2.4 提取条件的优化及验证

由于四元二次回归数学模型不存在浸提率函数的极大值, 不能用边际分析法求最佳提取条件, 可用频率分析法寻优。由于提取时间相对其它因素而言对浸提率影响较大, 因此在  $-2 < X_2, X_3, X_4 < 2$  和  $-1 < X_1 < 1$  区间内分别取步长 1 和 0.5, 则浸提方案可得到 625 个, 其中浸提率高于 2.18% 的方案有 53 个, 对数学回归模型进行频率分析得到的结果见表 4。

表 4 优化浸提方案中  $X_i$  取值频率分布表

Table 4 The frequency distribution of  $X_i$  in optimum extraction process

因素水平	X1		X2		X3		X4	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率	次数	频率
1	0	0.00000	0	0.00000	0	0.00000	0	0.00000
2	8	0.15094	10	0.18868	5	0.09434	8	0.15094
3	23	0.43396	30	0.56604	27	0.50943	17	0.32075
4	20	0.37736	13	0.24528	21	0.39623	17	0.32075
5	2	0.03774	0	0.00000	0	0.00000	11	0.20755
$\bar{x}$	0.302		0.057		0.302		0.585	
$S_{\bar{x}}$	0.105		0.090		0.087		0.135	
95%置信区间	0.095~0.508		-0.120~0.233		0.132~0.472		0.321~0.849	
浸提条件	10.190~11.016		68.80~72.33		71.32~74.32		13.484~19.396	

表 4 可知, 在 95% 的置信区间浸提率大于 2.18% 的优化方案为:料液比 10.190~11.016 倍, 浸提温度 68.80~72.33 $^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度 71.32~74.32%, 提取时间 13.484~19.396h。为了贴近实际生产, 可将优化方案定为料液比 1:10, 浸提温度  $70^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度 70%, 提取时间为 12h。对此方案进行试验得到浸提率  $Y=2.41\% > 2.18\%$ , 与平均值方案的理论值 2.44% 比较接近, 因此此方案可行。

### 3 结论

#### 3.1 苦瓜皂甙提取条件的优化数学回归模型为:

$$Y=2.41667+0.03580X_1+0.06534X_3+0.04564X_4-0.07628X_1^2-0.13366X_2^2-0.10753X_3^2-0.03764X_4^2+0.03097X_2X_4$$

此模型在试验范围内能较准确的预测苦瓜皂甙的浸提率。

#### 3.2 四个因素对浸提率影响的相对大小

在料液比 6~14 倍, 浸提温度  $40\sim 90^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度 40~90%, 提取时间 4~20h 的范围内, 四个因素度提取率作用的相对大小依次为: 提取时间>料液比>乙醇浓度>浸提温度。

#### 3.3 苦瓜皂甙最优提取条件范围

料液比为 10.190~11.016 倍, 浸提温度为  $68.80\sim 72.33^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度为 71.32~74.32%, 提取时间为 13.484~19.396h。为了减少实际生产中的能源消耗, 因此设定最优条件为: 料液比 1:10, 浸提温度  $70^\circ\text{C}$ , 乙醇浓度 70%, 提取时间为 12h。

### 参考文献

- [1] 陈勋,于海宁,唐德松,洪军,沈生荣.苦瓜皂甙快速分离方法纯化研究[J].食品科学,2004,25(2):114-117.
- [2] 孙磊.乙醇提取苦瓜皂甙的工艺研究[J].宁夏医学杂志,2005,27(2):112-114.
- [3] 王先远,金宏,许志勤,高兰兴.苦瓜皂甙降血糖作用及其机制初探[J].氨基酸和生物资源,2001,23(3):42-45.
- [4] 崔恒林,徐斌,董英.苦瓜皂甙的提取过程研究[J].江苏大学学报(自然科学版),2004,25(5):372-375.
- [5] 袁志发,周静芋.试验设计与分析[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [6] 巩发永,齐桂年,李静.四川边茶中茶多糖提取条件的优化研究[J].茶叶科学,2005,25(3):229-236.