

由台灣產植物分離精製皂素

Isolation and Purification of Saponin from Formosan Plants

計畫編號：NSC89-2214-E-002-54

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：黃世佑 台大化工系教授

一、中文摘要

紫苜蓿中所含之皂素具有界面活性劑特質，在醫療上或滋補食品上頗具價值。可藉微胞強化超過濾，去除其他小分子，達到皂素濃縮之目的。

鹽類濃度、酸鹼度、皂素濃度均會影響溶液中之微胞臨界濃度，本研究先用批次過濾膜組，以兩種薄膜孔徑 (MWCO) 的 polysulfone 薄膜進行超過濾，分別為 10kD 與 50~100kD，據此批次實驗的結果，以中空纖維模組放大規模進行分離純化。

結果顯示酸鹼度與薄膜孔徑影響過濾效果最鉅。批次超過濾中，pH 為 3.2 以 MWCO 10kD 薄膜行過濾時，對於兩種皂素成分可達到 84.3% (medicagenic acid glycoside) 與 82.3% (soyasaponin) 的回收率，過濾程序中的排鹽率 (rejection) 也可高過 0.8。中空纖維以相同條件下過濾可得 85.9% (medicagenic acid glycoside) 與 83.2% (soyasaponin) 的回收率，而其處理時間比批次過濾快約 20 倍，濾液通量 (permeate flux) 由 0.15 增至 0.33 cm/hr。

關鍵詞：皂素、分離精製、微胞強化超過濾、濾液通量、排鹽率

英文摘要

Saponin content in alfalfa is quite high. It has been recognized as a good health nutrient and as a surfactant. Therefore it is worthwhile to separate and concentrate the saponin from naturally grown alfalfa. In this work, the Micelle-enhanced ultrafiltration (MEUF) was used to separate and purify the saponin from the methanol extract.

Two kinds of polysulfone (PS) membrane with different MWCO, 10kD and 50~100kD, respectively were employed to MEUF in a stirred UF module (volume 200ml). It was found that

the pH value and pore size of membrane were the two major factors affecting the efficiency of separation. The highest recovery of medicagenic acid glycoside and soyasaponin attained in this work were 84.3% and 82.3%, respectively.

The hollow fiber module with 10kD MWCO, 420cm² total area was employed to perform the MEUF. The recovery of saponin reached 85.9% and 83.2% for medicagenic acid glycoside and soyasaponin, respectively. Permeate flux was much higher than that of stirred cell module (0.33 cm/hr vs. 0.15 cm/hr).

Keywords: Saponin, separation and purification, Micelle enhanced ultrafiltration, Permeate flux, Salt rejection.

二、緣由與目的

皂素為一種廣泛存在於植物中二次代謝物質，近年來發現其中許多有醫療或滋補食物、滅火等用途，頗具商業價值。其中人參皂素已由植物組織細胞培養方式工業化。天然紫苜蓿價格較人參低廉許多，且紫苜蓿皂素含量頗豐，並且有殺菌降膽固醇等生物活性。

皂素是天然界面活性劑，在超過臨界微胞濃度 (critical micellar concentration, CMC) 以上會形成微胞 (聚集 50 個單體以上的熱力學穩定結構)。

本研究乃以省產紫苜蓿為原料，以 30% 甲醇萃取，萃取物經固、液分離後，冷凍乾燥所得粉末以微胞強化超過濾，以期獲得高純度、高回收率之皂素產品。

三、研究方法

3.1 實驗材料 紫苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 由行政院農委會畜產試驗所恆春分所栽植 30

天，在萃取前以 80°C 乾燥 72 小時並研磨成粉末。

皂素標準品：由波蘭 Oleszek W. 教授提供 (Department of Biochemistry, Institute of Soil and Plant Cultivation, Pulawy, Poland)，包括 soyasaponin I and medicagenic acid saponin。

3.2 紫苜蓿萃取含皂素的天然物 將紫苜蓿粉末與 30% 的甲醇按 1:10 (w/v) 的比例置入瓶中，均勻攪拌並以水浴恆溫 (約 60°C)，並裝設迴流冷凝管回收蒸發之溶劑，萃取時間為 90 分鐘。將混合溶液以濾紙固、液分離，所得之濾液先以減壓濃縮移除大部分溶劑，並再利用冷凍乾燥得到乾燥的樣品。

3.3 Stirred Cell UF 超過濾實驗採用 Amicon 8050 module, UF 膜採 polysulfone UF 膜, MWCO 10kD 與 50~100kD (DESAL, U.S.A.) 兩種。超過濾的壓力來源是氮氣鋼瓶，並以恆溫水槽循環水控制溫度。

(1) 配製預定濃度 (60, 120, 180 mg/mL)、電解質濃度 (0.3, 0.6, 1.0M)、酸鹼度 (pH = 3.2, 8.1) 的紫苜蓿萃取物水溶液，置於恆溫裝置中以 30°C 下低速攪拌 30 分鐘。實驗中以 KCl 調整電解質濃度。以鹽酸和氨水調整 pH，觀察其對於分離效果的影響。

(2) 15mL 上述溶液，加入已將薄膜安裝好的 stirred cell 中，接上壓力管，放入恆溫槽中 30 分鐘 (30°C)，以氮氣鋼保持 40psi 壓力。

3.4 Hollow Fiber Module 超過濾程序

(1) 將配製各種濃度、電解質濃度、酸鹼度的苜蓿萃取物水溶液，置於恆溫裝置中低速攪拌 30 分 (30°C)，以 KCl 調整電解質濃度。

(2) 取 200mL 的溶液，管口皆應低於水面。

(3) 將 pump 調至 600rpm，藉調整回流比使壓力升到預定值，收集濾液以分析各項數據。

3.5 分析方法

(1) 總糖類分析採用酚-硫酸法 [1]

(2) 總酚類分析採用 Folin-Ciocalten 法 [2]

(3) 皂素之 HPLC 分析

將已經由衍生化及固相萃取後之待分析甲醇溶液，經 0.2 μ M 的濾頭過濾並以 HPLC

分析。其分析條件如下：

Stationary phase: Reverse phase C12 column (SYNERGI 4 μ , Max-RP, RP, Phenomenex)
Spike volume: 20 μ L, Detector: UV 260nm,
Mobile phase: acetonitrile/ H₂O, gradient elution, Flow rate: 1 mL/min.

四、結果與討論

本研究討論溶液性質對超過濾程序的影響，主要操作變因包括鹽類濃度、酸鹼度、溶質進料濃度等。藉著操作條件的改變，觀察並記錄過濾的效果，以 permeate flux, rejection, recovery 評估之，先以小規模 stirred cell UF module 找尋出合適的操作條件，再以 hollow fiber UF module 進行較大規模的超過濾。

Fig. 1(a) 為使用 MWCO 為 10kD 時 Permeate flux ($\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$)，與 KCl 濃度的關係。由 Fig. 1(a) 可知，使用 MWCO 為 10kD 的薄膜進行超過濾時，濾液通量隨時間遞減，到 60 分鐘以後趨近於穩定，通量值則無太大變化。觀察三種 KCl 濃度過濾的 permeate flux 遞減趨勢接近，穩定狀態的 flux 皆約為 0.4 $\text{cm}^3/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$ 。當使用 MWCO 50~100 kD 的薄膜進行超過濾時，濾液通量跳動較大，初始通量也比以 10kD 薄膜過濾的慢。雖然 50~100 kD 孔徑比 10kD 來得大，但若以純水進行過濾，MWCO 50~100kD 的通量值也比 MWCO 為 10kD 小。推論 MWCO 50~100kD 一系列的薄膜擁有比 MWCO 10kD 系列薄膜還小的孔隙度或 MWCO 為對稱性薄膜。

KCl 濃度較高，對酚類會有較高的 rejection，同樣的現象也適用於糖類。此現象推論與電解質濃度升高，溶液因離子強度增加，進而導致粒子間的電雙層被壓縮導致凝聚的效應增加，使得溶質中被薄膜阻擋的機會更大。以 MWCO 10kD 薄膜進行超過濾的糖類與酚質的 rejection，皆比以 MWCO 50~100 kD 薄膜進行超過濾的值高。

本研究採用兩種皂素 (soyasaponin 及 medicagenic acid glycoside) 作為分析之標準。

Fig. 2 明顯看出 1.0 M KCl 紫苜蓿萃取物溶液過濾有最高的 rejection，且 rejection 會隨著 KCl 濃度降低而減少。Fig. 3 顯示 0.3M KCl 溶液過濾時有最高的 rejection，其次是 KCl 濃度

為 1.0M，KCl 濃度為 0.6M 時會有最低的 rejection，此現象明顯看出鹽類濃度對於兩種皂素的影響並不一致。其原因推論為 medicagenic acid glycoside 的 aglycone 結構中有三個羧基，故其離子性較強易受鹽類濃度影響，造成高鹽類濃度中有較佳的聚集效果，而得到較高的 rejection；反之 soyasaponin 之 aglycone 為中性的 sapogenol 結構上並無離子性官能基。

4.1 鹽類濃度對 Stirred Cell UF 之影響 以 medicagenic acid glycoside 在 1.0 KCl 溶液的超過濾為例，以 MWCO 為 10kD 的薄膜過濾 rejection 約是 0.6，以 MWCO 為 50~100kD 的薄膜過濾，rejection 在 0.2 以下。可推論 medicagenic acid glycoside 的聚集物分子量在 50~100kD 以下。

Medicagenic acid glycoside 的回收率會隨 KCl 濃度升高而增加，對於 soyasaponin 則無此規律。

4.2 酸鹼度對 Stirred Cell UF 之影響 Fig. 4 可明顯看出酸鹼度對通量大小的影響很大，其大小順序為：pH8.1 > pH5.5 > pH3.2，pH3.2 的通量遞減變化也最大。Doulia [3] 指出 polysulphone membrane 對界面活性劑的吸附力與其疏水性相關，疏水性愈高的界面活性劑愈易被吸附。Fig. 5 明顯看出 pH = 3.2 時的 rejection 較不調整酸鹼度的有大幅提高，而 pH = 8.1 的 rejection 最低。medicagenic acid glycoside 的結構中有三個羧基，所以於低 pH 利於聚集形成微胞，使皂素易於被排拒。Soyasaponin 的 rejection 也高，因為 soyasaponin 的糖基上的葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 有 -COOH，其酸鹼改變微胞聚集的好壞與過濾表現的機制與 Medicagenic acid glycoside 相同。兩種皂素都是 pH = 3.2 時有最高的回收率，可達 80% 以上。

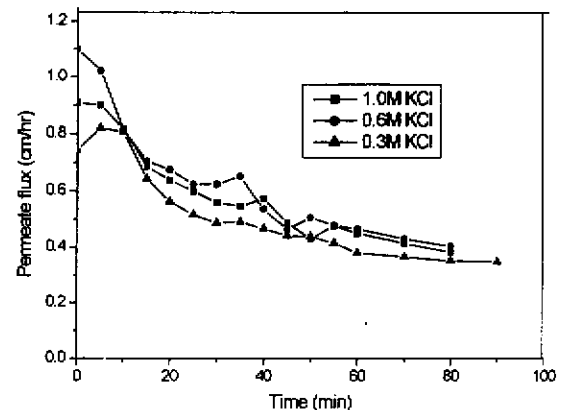
4.3 進料濃度對 Stirred Cell UF 的影響 以 60 mg/ml 為 1 unit 濃度，計畫作 1~3 unit 之濃度以探討濃度對 UF 之影響。實驗結果知，以 1 unit 濃度過濾時有比較高的 rejection。因對疏水性薄膜而言，hydrophobic interaction 的緣故而吸附界面活性劑。換言之，薄膜表面的濃度梯度比進料濃度時升高，即有更大的驅動力迫使皂素穿透薄膜而造成 rejection 的降低。兩皂素的回收率與

rejection 的表現相同，一樣是 medicagenic acid glycoside 比 soyasaponin 高。

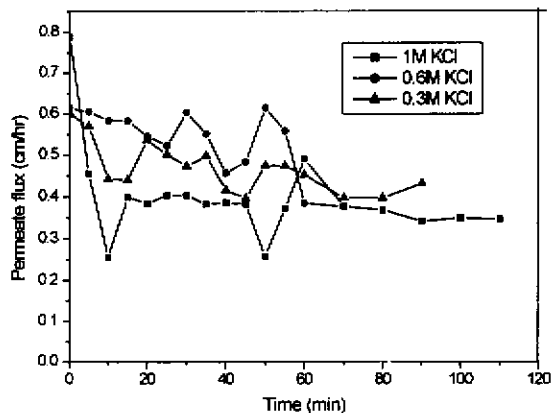
4.4 以 Hollow Fiber UF Module 分離皂素 使用 Model UFP-10-E-4A, A/G Technology Co. (Needham, MA, USA) (過濾面積 420 cm²)。Fig. 6 示 medicagenic acid glycoside 以 hollow fiber 行超過濾可以得到比用 stirred cell 還高的 rejection (Fig. 5)。對於 soyasaponin 亦然。但以兩種 module 操作，皂素濃度與時間的關係卻有不同的趨勢。以 hollow fiber 操作，rejection 會隨時間增加而遞減，經一段時間便呈穩定。而以 stirred cell 進行超過濾時，rejection 會隨時間增加而上升。以 stirred cell 進行過濾時，在薄膜表面形成緻密的 gel layer，過濾行為類似 sieving mechanism，意即發生濃度極化使 rejection 上升。反觀 hollow fiber 因掃流效應而抑制 gel layer 形成，過濾機制傾向因為濃度梯度提高而增加透過薄膜的機會，促使 rejection 下降。

五、參考文獻

- [1] Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. Carbohydrate Analysis IRU Press, Washington D.C. 1986. p.2.
- [2] Shahidi, F. and Naczk, M. Food Phenolics: Chemistry, Effect and Application. Technomic Publishing Co. (Lancaster, USA), pp.292-293. (1995).
- [3] Doulia, D. and Tragargh, G. and Gekas, V. Interaction behavior in ultrafiltration of nonionic surfactants Part 2. Static Adsorption below CMC. J. Membrane Sci. 123, 133-142 (1997).

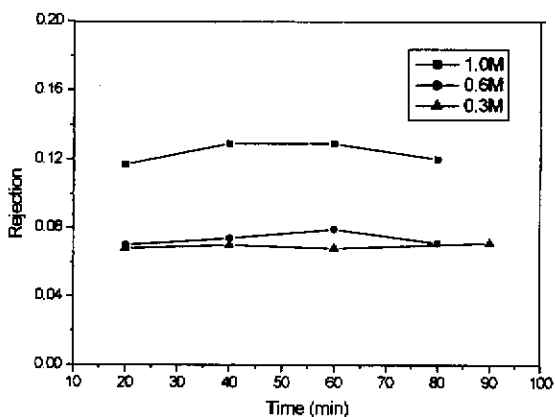


(a)

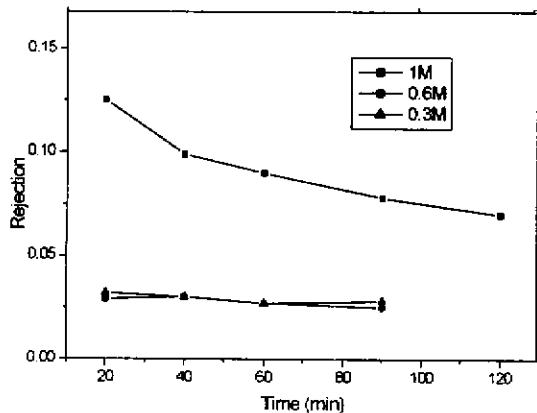


(b)

Fig. 1. Time course of permeate flux with different KCl concentration. (a)MWCO 10kD (b)MWCO 50~100kD Operation conditions: Amicon 8050 stirred cell UF module, PS membrane, temp: 30°C, pressure: 40psi, pH: 5.5(nature), feed conc.: 60mg/mL.

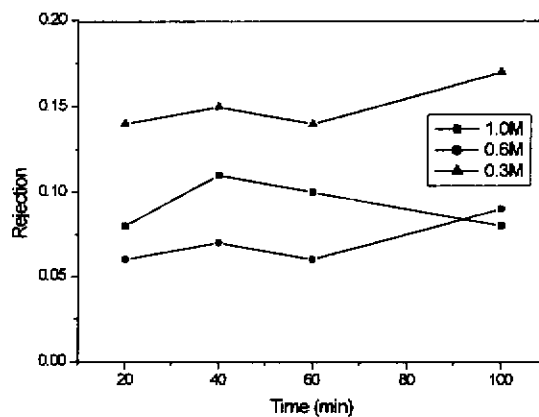


(a)

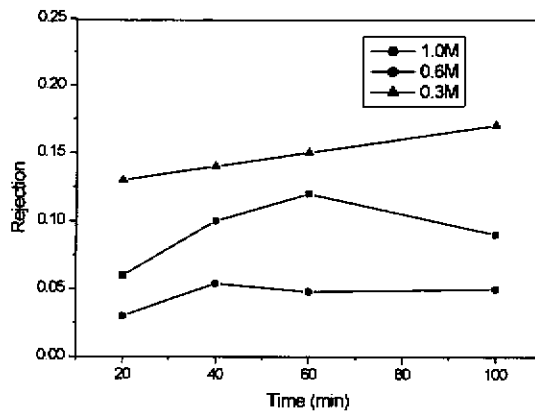


(b)

Fig. 2. Time course of rejection of carbohydrates with different KCl concentration. (a)MWCO 10kD (b)MWCO 50~100kD. Operation conditions: Amicon 8050 stirred cell UF module, PS membrane, temp: 30°C, pressure: 40psi, pH: 5.5(nature), feed conc.: 60mg/mL.



(a)



(b)

Fig. 3. Time course of rejection of soyasaponin with different KCl concentration. (a)MWCO 10kD (b)MWCO 50~100kD. Operation conditions: Amicon 8050 stirred cell UF module, PS membrane, temp: 30°C, pressure: 40psi, pH: 5.5(nature), feed conc.: 60mg/mL.

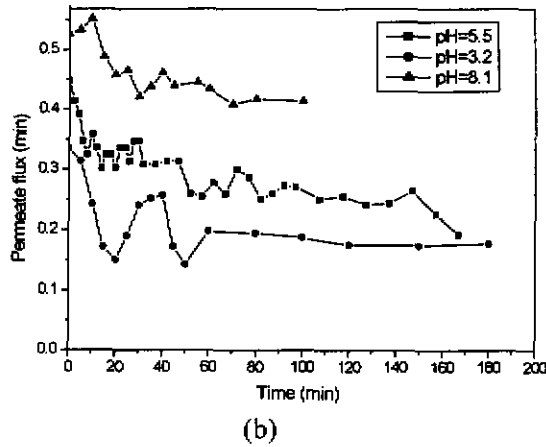
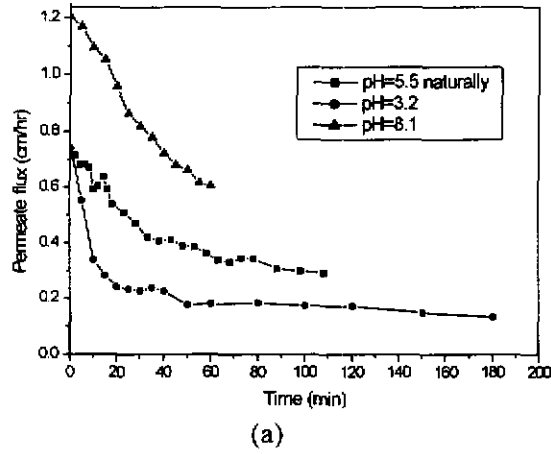


Fig. 4. Time course of permeate flux with different pH. (a) MWCO 10kD (b) MWCO 50~100kD. Operation conditions: Amicon 8050 stirred cell UF module, PS membrane, temp: 30°C, pressure: 40psi, without salt, feed conc.: 60mg/mL.

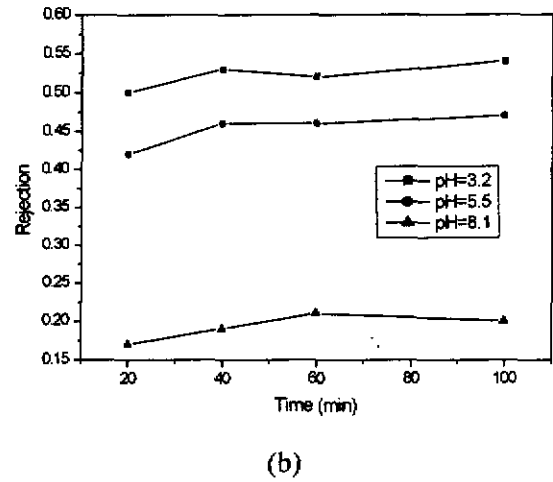
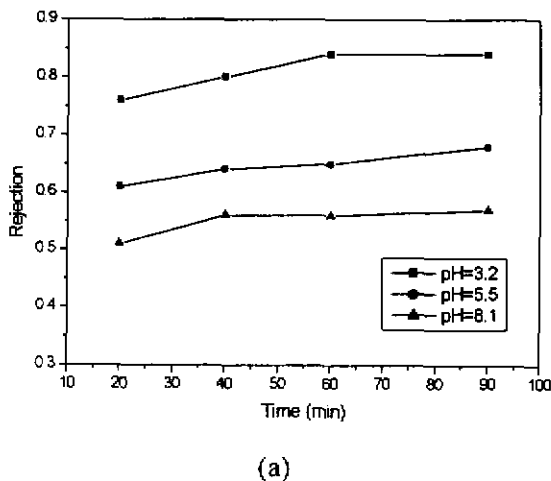


Fig. 5. Time course of rejection of medicagenic acid glycoside with different pH. (a) MWCO 10kD (b) MWCO 50~100kD. Operation conditions: Amicon 8050 stirred cell UF module, PS membrane, temp: 30°C, pressure: 40psi, without salt, feed conc.: 60mg/mL.

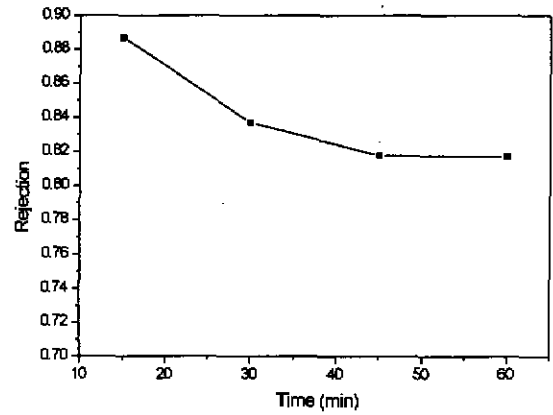


Fig. 6. Time course of rejection of medicagenic acid glycoside in hollow fiber UF module, MWCO: 10kD. Operation conditions: PS membrane, temp: 30°C, pressure: 15psi, pH: 3.2, without salt, feed conc.: 60mg/mL.