

盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元方法的研究进展

张娟, 黄凤玉, 王庆婷, 杨颜溶, 杨静, 雷敬卫, 谢彩侠*

(河南中医药大学药学院, 河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 郑州 450046)

[摘要] 传统工业广泛采用直接酸水解盾叶薯蓣根茎制备薯蓣皂苷元,该方法大量使用无机酸催化剂,废水排放量大,环境污染严重。因此,探寻清洁、高效的制备方法和工艺成为实现薯蓣皂苷元工业生产可持续发展的必然选择。故笔者综述并分析了近10年来酶水解、微生物转化及改进酸水解等方法在盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元中的研究进展及存在问题,并展望了其应用前景。酶水解反应条件温和,但薯蓣皂苷元产率低、经济成本高、活性酶纯化过程复杂。微生物特异性好,转化效率高、转化过程清洁环保,但转化周期长,代谢产物复杂。改进酸水解法中,双相酸水解工艺优势在于酸使用量减少,磺酸功能化离子液体催化优势在于可代替无机酸,循环性能良好,但二者均无法避免废液排放,固体酸催化剂无腐蚀性,易回收,但需使用乙醇作为反应溶剂具有一定安全隐患,且催化剂制备过程繁琐。综上所述,探索清洁高效的转化方法是盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元的重要发展趋势。对于酶水解法,应深入探寻生物转化过程中的关键糖苷水解酶,充分阐明酶解皂苷的转化路径及酶特异性,着力提高酶水解效率;对于微生物转化法,以选育高效转化菌株为基础,优化稳定的转化体系和转化过程,加快推动微生物转化的工业应用进程,深入探究生物转化机制,充分阐明特异性关键水解酶及其催化特性,着力提高生物转化效率;对于改进酸水解法,探索使用结构简单、性能稳定、可生物降解的新型酸催化体系,有效解决环境污染及生产安全问题。

[关键词] 盾叶薯蓣; 薯蓣皂苷元; 酶解; 酸水解; 微生物转化; 清洁制备

[中图分类号] R22;R28;R932;G353.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)20-0274-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230564 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20221222.0826.002>

[网络出版日期] 2022-12-23 15:19:23

Preparation of Diosgenin from *Dioscorea zingiberensis*: A Review

ZHANG Juan, HUANG Fengyu, WANG Qingting, YANG Yanrong, YANG Jing,
LEI Jingwei, XIE Caixia*

(School of Pharmacy, Henan Provincial Engineering Technology Research Center for
Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine,
Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] Direct acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* rhizomes for preparation of diosgenin is widely used in the traditional industry, which uses a large amount of inorganic acid catalysts, with high wastewater discharge and serious environmental pollution. Therefore, exploring clean and efficient preparation methods and processes has become an inevitable choice to realize the sustainable development of industrial production of diosgenin. Herein, the author reviewed and analyzed the research progress and problems of enzymatic hydrolysis, microbial transformation and modified acid hydrolysis in the preparation of diosgenin from *D. zingiberensis* rhizomes during the last ten years, and their application prospects are analyzed. Enzymatic hydrolysis has mild reaction conditions, but the yield of diosgenin is low, the economic cost is high, and the purification process of active enzyme is complicated. Microorganism shows specific activity to the substrate and

[收稿日期] 2022-11-07

[基金项目] 河南省高等学校重点科研计划项目(23A360003)

[第一作者] 张娟,博士,副教授,从事仪器分析及中药分析研究,E-mail:zj19820305@163.com

[通信作者] * 谢彩侠,博士,教授,从事中药质量控制研究,E-mail:nanyangcxcx@126.com

high efficiency for diosgenin production, and microbial transformation is clean and environmentally friendly, but microbial transformation is time-consuming and the metabolic intermediates are complicated. For the modified acid hydrolysis, two-phase acid hydrolysis can reduce the amount of acid catalyst, and sulfonic acid-functionalized ionic liquid displays good recyclable performance by replacing the traditional inorganic acid, however, the wastewater discharge should still be considered. Solid acid catalysts are non-corrosive and easy to be recycled, but the need to use ethanol as the reaction solvent has certain safety hazards, and the catalyst preparation process is cumbersome. In conclusion, exploring clean and efficient conversion methods is an important research trend for preparation of diosgenin from *D. zingiberensis* rhizomes. For the enzymatic hydrolysis, the key glycoside hydrolases in the bioconversion process should be explored in depth, the conversion pathway of enzymatic saponins and enzyme specificity should be fully elucidated, and efforts should be made to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis. For the microbial transformation, we should accelerate its industrial application process based on selecting and breeding efficient transformation strains, and optimizing stable transformation systems and processes, and in-depth investigation of the mechanism of microbial transformation, fully elucidating the specific key hydrolases and its catalytic properties, and striving to improve the efficiency of microbial transformation. For the modified acid hydrolysis, novel acid catalytic system with simple structure, stable performance and good biodegradability should be explored and applied, which can effectively solve the problems of environmental pollution and production safety.

[Keywords] *Dioscorea zingiberensis* rhizomes; diosgenin; enzymatic hydrolysis; acid hydrolysis; microbial transformation; clean preparation

盾叶薯蓣又称黄姜,薯蓣科薯蓣属植物,为我国特有物种,由于需求量极大,在我国河南、陕西、湖北、湖南等10多个省市已得到广泛种植。盾叶薯蓣是生产薯蓣皂苷元的重要植物来源。薯蓣皂苷元,又称薯蓣皂素,具有抗肿瘤、抗氧化、抑菌抗炎、治疗类风湿性关节炎、心血管病、糖尿病等功效^[1-2]。薯蓣皂苷元也是合成甾体激素类药物的重要基础原料^[3],以薯蓣皂苷元为前体,通过化学修饰,可以合成上百种甾体激素类药物,是一种药用价值极高的医药中间体,因此薯蓣皂苷元被人们称为“药用黄金”和“激素之母”。全世界对薯蓣皂苷元的需求量高,而我国由于盾叶薯蓣资源丰富,种植面积较广,为生产和出口薯蓣皂苷元的主要国家之一。

传统工业广泛采用直接酸水解法制备薯蓣皂苷元^[4-6],其工艺中需使用大量盐酸、硫酸等无机酸水溶液直接作用于药材原料,水解后用大量清水洗涤,直至水解液达到pH中性,再用有机溶剂(如石油醚、有机汽油、三氯甲醇等)从水解产物中萃取薯蓣皂苷元。该方法所需工艺和设备简单,生产成本低,一直被众多企业广泛采用。但由于直接酸水解法所需酸用水量高,导致废水排放量大,环境污染严重,无机酸易腐蚀工业设备,酸催化体系难以回收和循环使用,这些因素均制约了薯蓣皂苷元的工业生产。

探寻清洁、高效的制备方法和技术是实现薯蓣

皂苷元工业生产可持续发展的必然选择和重要课题。酶水解、微生物转化及改进酸水解等方法能够在提高薯蓣皂苷元产率的同时减少或避免废液排放,有效缓解环境污染,近10年来得到了广泛关注和持续研究。本文通过综述酶水解、微生物转化及改进酸水解等方法在盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元中的研究进展,讨论分析现存问题,并对其应用前景进行展望,为盾叶薯蓣清洁高效转化制备薯蓣皂苷元研究提供参考和思路。

1 酶解法

酶解法在薯蓣皂苷元制备中的应用研究主要集中于酶预处理药材^[7-13]和酶水解皂苷^[14-24]2个方面。盾叶薯蓣根茎中,皂苷类成分被纤维素或淀粉包裹,存在于细胞壁中。细胞壁一般是由纤维素、半纤维素、果胶、木质素等物质构成,结构致密。选择相应的生物酶,可降解细胞壁成分,促使细胞内有效成分溶出。因此,人们将不同种类的商品化酶如纤维素酶、淀粉酶、果胶酶、木聚糖酶等用于盾叶薯蓣药材的预处理,促使皂苷从植物细胞壁中释放出来,为下一步水解提供有利条件。可见,生物酶预处理的主要目的在于提高总皂苷提取率。将纤维素酶和果胶酶1:1配比的复合酶用于超声波-微波辅助提取盾叶薯蓣总皂苷,提取时间仅为300 s,薯蓣皂苷元产率为1.41%^[10]。采用纤维素酶和淀粉

酶联合预处理提取总皂苷得率可达8.86%,酸水解后所得薯蓣皂苷元产率达3.71%,比直接酸水解法提高了1.2倍^[11]。利用阶梯酶解协同超声提取技术,向盾叶薯蓣根茎中依次加入纤维素酶、果胶酶复合酶制剂及 α -淀粉酶,可使薯蓣总皂苷得率提高1.37%~1.60%^[12]。通过比较纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶的不同组合酶预处理结果发现,果胶酶可能是影响盾叶薯蓣还原糖和薯蓣皂苷元提取率的关键酶,果胶酶处理盾叶薯蓣后,淀粉颗粒更分散,纤维素和淀粉颗粒有明显穿孔现象,说明果胶酶对植物细胞壁的降解更充分^[13]。

多种生物酶能够催化水解糖苷键,在天然产物酶解转化^[14-15]及中药资源利用^[25]等领域已得到广泛研究。用于制备薯蓣皂苷元的酶解法主要为单一酶解和复合酶解。单一酶解法只用一种生物酶水解转化盾叶薯蓣中的皂苷类成分。例如,纤维素酶不但能够降解 β -D-葡萄糖苷键,促进有效成分溶出,还可使皂苷结构中的糖苷键断裂得到薯蓣皂苷元^[16-17],而通过将纤维素酶催化与三液相分离相结合的方式,使产物和酶分别存在于不同相层,可有效避免产物抑制效应,提高酶解效率^[18-19]。诸多研究表明,不同种类的糖苷水解酶对皂苷降解效果不同。例如,通过比较5种常用糖苷水解酶(蜗牛酶、苦杏仁酶、植物酶SPE-002、 β -葡聚糖酶、纤维素酶)对皂苷的降解效果发现, β -葡聚糖酶水解效果最好,薯蓣皂苷元产率是其他4种酶的2~3倍,优化条件下, β -葡聚糖酶水解制备薯蓣皂苷元产率可达2.03%^[20]。赵国强等^[21]分别采用纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶作用于盾叶薯蓣根茎粉末,实施分段控温发酵,所得薯蓣皂苷元产率比恒温自然发酵提高了69%。从微生物可分离纯化得到关键糖苷水解酶,对糖苷键具有特异性降解功能。例如,从犁头霉菌分离纯化得到的薯蓣皂苷-糖苷酶能够依次水解薯蓣皂苷C-3位连接的 α -L-鼠李糖、 β -D-葡萄糖,最终释放出薯蓣皂苷元^[22];来自烟曲霉的 β -葡萄糖苷酶,可水解盾叶薯蓣中多种螺甾烷皂苷结构中的糖苷键^[23];王海艳^[24]将实验室培养霉菌所产活性酶作用于盾叶薯蓣粗皂苷,薯蓣皂苷元产率可达1.51%,该活性酶缓冲液/石油醚双相反应体系的应用,可使皂苷水解与薯蓣皂苷元萃取同步进行,酶解液可至少重复使用2次。

盾叶薯蓣中以薯蓣皂苷元为母核的皂苷类成分较多^[26],因此,单一生物酶转化作用有限,使得薯蓣皂苷元产率不高。利用复合酶解法,将2种或以

上生物酶共同作用于底物,在薯蓣皂苷元制备中可显示出较优效果^[27-31]。例如,由纤维素酶和蜗牛酶组成的复配酶结合超声破碎法作用于盾叶薯蓣药材,所得薯蓣皂苷元产率与传统酸解法相当,比直接酶解法提高了25%^[29-30]。将四元复合酶(包含碱性果胶酶、单宁酶、半纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶)直接作用于盾叶薯蓣原料,薯蓣皂苷元收率达4.34%,比传统酸解法提高了1.69倍^[31]。采用复配酶解法^[32],即纤维素酶解48 h后,再进行 β -葡萄糖苷酶反应36 h,最终可将薯蓣皂苷元产量提高到31.68 mg·g⁻¹,并产生葡萄糖230 mg·g⁻¹。分别来自黄曲霉和新月弯孢霉的甾体皂苷- β -葡萄糖苷酶、甾体皂苷- α -1,2-鼠李糖苷酶相组合,也能够表现出比单一酶更高的生物活性^[33]。

酶预处理和酶解反应条件均较为温和,酶预处理可与酸水解联合使用,有利于提高薯蓣皂苷元产率,而生物酶直接水解过程无需酸催化剂,废液量小,更为环保。但受商品化生物酶种类有限,价格较高,生物产酶获取和筛选过程复杂及酶活性易受环境或底物抑制等影响,制约了酶解法获取薯蓣皂苷元的应用研究。未来可深入探究生物转化过程中的关键糖苷酶及其催化特性,开展酶促动力学基础研究,并利用分子生物学技术构建体外表达体系,为高效生物转化制备薯蓣皂苷元打下基础。

2 微生物转化法

微生物转化法又称为发酵法,即筛选具有分解皂苷的微生物,与药材或皂苷成分混合发酵。微生物产生的特殊酶作用于皂苷成分,通过发酵过程断开糖苷键,使薯蓣皂苷元游离出来,然后从发酵残渣、菌丝中提取薯蓣皂苷元^[34-50]。盾叶薯蓣含有呋甾烷和螺甾烷型皂苷,微生物转化过程中,呋甾烷型皂苷迅速转化为螺甾烷型皂苷,在微生物发酵作用下,螺甾烷型皂苷再逐步转化为薯蓣皂苷元。在盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元中,微生物转化过程具有反应条件温和、清洁无污染、转化效率高于酶水解等独特优势,显示出广阔的应用前景。相关微生物及其转化条件、薯蓣皂苷元产率见表1。不同微生物所产代谢产物不同,因此,微生物转化制备薯蓣皂苷元的途径以及转化效率差异较大。例如,通过比较黑曲霉、米曲霉、烟曲霉对薯蓣皂苷元产率的影响发现,相同条件下,烟曲霉对粗皂苷的转化率是黑曲霉、米曲霉的4倍^[47]。

探讨分析微生物转化过程,开展催化动力学基础研究,有利于人们深入理解微生物转化机制,为

表1 微生物转化制备薯蓣皂苷元

Table 1 Microbial transformation for preparation of diosgenin from *D. zingiberensis* rhizomes

微生物	转化底物	转化条件	薯蓣皂苷元产率 /mg·g ⁻¹
米曲霉 ^[34-35]	盾叶薯蓣干粉	含 1.0 g 盾叶薯蓣的 66.7 mmol·L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ 缓冲液 (pH 6.0) 30 mL, 8% 接种量, 37 °C 发酵 84 h 后, 50 °C 继续转化 8 h	17.06
哈茨木霉 ^[37-38]	盾叶薯蓣干粉	发酵培养液组成: 0.06 mol·L ⁻¹ 的 Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ 缓冲液 30 mL、聚山梨酯-85 0.7 g·L ⁻¹ 、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.93 mmol·L ⁻¹ , 药材载量 33.3 g·L ⁻¹ , 6% 接种量, 30 °C 发酵 120 h	30.05
里氏木霉 ^[43]	盾叶薯蓣酶解物	发酵培养液组成: 蛋白胨 26.7 g·L ⁻¹ 、K ₂ HPO ₄ 2.7 g·L ⁻¹ 、聚山梨酯-80 7.3 g·L ⁻¹ 、底物 10 g·L ⁻¹ , pH 5.8, 接种量 10%, 37 °C 发酵 156 h	27.3
赤霉菌 ^[44]	盾叶薯蓣酶解物	发酵培养液组成: 葡萄糖 20.6 g·L ⁻¹ 、酵母膏 5.0 g·L ⁻¹ 、NaCl 1 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 3 g·L ⁻¹ 、ZnSO ₄ 1.5 g·L ⁻¹ , 底物 3 g·L ⁻¹ , 30 °C 发酵时间 5 d	31
塔宾曲霉 ^[45]	盾叶薯蓣醇提总皂苷	发酵培养液组成: 葡萄糖 10 g·L ⁻¹ 、NaNO ₃ 3 g·L ⁻¹ 、K ₂ HPO ₄ 1 g·L ⁻¹ 、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ 、KCl 0.5 g·L ⁻¹ 、FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ , 底物浓度 2 g·L ⁻¹ , pH 6.0, 接种量 10%, 37 °C 发酵 72 h	19.1
泡盛曲霉 ^[46]	盾叶薯蓣醇提粗皂苷	培养基组成: NaNO ₃ 3.0 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 1.0 g·L ⁻¹ 、MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g·L ⁻¹ 、KCl 0.5 g·L ⁻¹ 、FeSO ₄ ·7H ₂ O 3.0 g·L ⁻¹ , pH 7.0, 接种量 8%, 180 r·min ⁻¹ 搅拌, 30 °C 发酵 8 d	74.26 ¹⁾
烟曲霉 ^[47]	物理分离得粗皂苷	发酵培养液组成: MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.9 g·L ⁻¹ 、KH ₂ PO ₄ 1 g·L ⁻¹ 、(NH ₄) ₂ SO ₄ 4.0 g·L ⁻¹ 、ZnSO ₄ ·7H ₂ O 0.09 g·L ⁻¹ 、CaCl ₂ 0.1 g·L ⁻¹ 、酵母浸膏 1.0 g·L ⁻¹ 、胰蛋白胨 2.0 g·L ⁻¹ , 自然 pH, 接种量 2.0%, 33 °C 发酵 5 d	15.7
里氏木霉+烟曲霉 ^[48]	盾叶薯蓣酶解物	培养基含蛋白胨 2.67%、K ₂ HPO ₄ 0.27%、聚山梨酯-80 1.3%, pH 5.8, 湿度 75%, 搅拌速率 300 r·min ⁻¹ , 30 °C, 里氏木霉(接种量为 7.5×10 ⁶ spores·g ⁻¹) 发酵 24 h 后再加入烟曲霉(接种量为 1.5×10 ⁷ spores·g ⁻¹) 继续发酵 5 d	28.38
益生菌 ^[49]	物理分离粗皂苷	5% 接种量, pH 7.0, 37 °C 发酵 48 h	15%~18% ²⁾
镰刀菌 ^[50]	盾叶薯蓣干粉	发酵基质含葡萄糖 2.86%、K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 2.86%、MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.43%、(NH ₄) ₂ SO ₄ 11.4%, 接种量 10%, 30 °C 发酵 22 d	21.6
镰刀菌+月弯菌 ^[50]	盾叶薯蓣干粉	发酵基质含葡萄糖 2.86%、K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O 2.86%、MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.43%、(NH ₄) ₂ SO ₄ 11.4%, 30 °C 镰刀菌(接种量 10%) 发酵 22 d 后, 引入月弯菌(接种量 20%) 继续发酵 7 d	27.9

注: ¹⁾每 1 g 粗皂苷所得薯蓣皂苷元质量; ²⁾皂苷转化率

实际过程中优化发酵条件、获取高转化效率提供科学和理论基础。根据数学模型进行动力学分析推测,米曲霉转化皂苷是一个多底物-多酶参与的复杂反应过程^[36],甾体皂苷结构中侧链鼠李糖基、葡萄糖链依次先后发生水解,最后释放出薯蓣皂苷元,其主要转化途径见增强出版附加材料。而酶促动力学研究表明,米曲霉转化过程中,鼠李糖水解反应速率常数明显大于葡萄糖,导致中间产物堆积,因此,薯蓣皂苷元产率不高。对于哈茨木霉转化过程,以盾叶薯蓣发酵过程中各种皂苷分析以及薯蓣皂苷元浓度变化规律为基础,构建动力学模型。根据动力学分析结果推测,生成薯蓣皂苷元的主要转化途径为,盾叶新苷先水解鼠李糖,再水解葡萄糖二糖,最后水解末端葡萄糖^[37]。转化过程中鼠李糖和葡萄糖水解同时进行,涉及主要底物和中间产物的各转化反应速率均较高,因此,中间产物积累少,有

利于薯蓣皂苷元产率提高,主要转化途径见增强出版附加材料。

微生物代谢产生的特异性糖苷水解酶,可使盾叶薯蓣皂苷中的糖苷键断裂,最终释放出薯蓣皂苷元。因此,充分研究源自微生物活性酶及其催化特性,对于阐明微生物转化机制以及调控微生物转化过程具有重要意义。例如,从里氏木霉可纯化得到 E1、E2、E3、E4 4 种酶,以原纤细薯蓣皂苷为底物,通过酶促动力学分析可推测出皂苷的主要转化途径见增强出版附加材料^[51],即 C-26 和 C-3 终端葡萄糖苷键依次被里氏木霉产生的 E1、E2、E3、E4 4 种酶催化水解,然后 C-3 终端鼠李糖苷和 C-3 葡萄糖苷键在 E2、E3 催化作用下逐步断裂,释放出薯蓣皂苷元。其中,E2 和 E3 是皂苷水解关键酶,而 C-3 位糖苷键的水解是决定整个生物转化过程的关键步骤。里氏木霉对盾叶薯蓣皂苷进行发酵后,加入烟曲霉

继续发酵,可显著提高薯蓣皂苷元产率^[48],这一结果可由里氏木霉的转化机制解释,即里氏木霉发酵皂苷成分得到延龄草苷,而烟曲霉产生的 β -葡萄糖苷酶能够促进延龄草苷中C-3位糖苷键的水解,因此对薯蓣皂苷元产率的提高起到正向作用。

内生菌与植物共同进化生长,在生物转化中具有独特优势。根据盾叶薯蓣转录组分析以及皂苷元生物合成关键酶基因筛选研究推测,盾叶薯蓣根茎中的内生菌可能参与薯蓣皂苷元生物合成^[52]。以盾叶薯蓣内生菌的不断深入研究为基础^[53-55],通过进一步分离筛选,可找出具备薯蓣皂苷元合成特性的内生菌株,并将其应用于薯蓣皂苷元发酵生产技术。例如,从盾叶薯蓣分离出123种内生真菌菌株,生物分析和固态发酵实验结果显示,其中的镰刀菌对甾体皂苷水解生成薯蓣皂苷元的转化活性最高,经22 d发酵,薯蓣皂苷元产率达2.16%,镰刀菌发酵盾叶薯蓣干粉22 d后,引入月弯菌继续发酵7 d,最终可将薯蓣皂苷元产率提高至2.79%^[55]。该固态发酵过程清洁有效,操作简便。其中,分离筛选高活性微生物菌种、确定培养基质组成、优化固态发酵条件等步骤是高效制备薯蓣皂苷元的关键。可见,深入研究具有转化特性的内生菌,能够为薯蓣皂苷元的微生物制备途径提供新的思路。

从以上分析可以看出,相比于传统酸水解法,微生物转化具有反应条件温和、清洁无污染、生产成本低等独特优势。微生物作用下的薯蓣皂苷元产率普遍高于酶解法。因此,微生物转化法具有更为广阔的应用前景。但是,不同微生物所产生的代谢产物复杂,特异性高,导致微生物转化制备薯蓣皂苷元的途径和产率差异较大,转化过程不易控制。另外,微生物转化周期较长,使得生产效率下降。截至目前,微生物转化方法应用于工业规模制备薯蓣皂苷元的研究仍鲜有报道。为促进微生物转化的工业应用,未来可从以下几个方面进行深入研究:①利用多种现代化生物技术选育高效转化菌株,着力提高薯蓣皂苷元产率;②采用多种微生物混合发酵,使所产酶种类更加丰富多样,充分发挥微生物转化优势,进一步提高转化效率;③优化稳定的微生物转化体系,提高转化过程可控性,使微生物转化过程在放大生产后依然能够保持较高转化效率;④开发高效、清洁、廉价的薯蓣皂苷元产物分离纯化技术,也是工业化应用中需要注意的关键问题。

3 改进酸水解法

3.1 双相酸水解 传统酸水解法中,无机酸、反应物、产物等物质始终共存于水相之中,薯蓣皂苷元产物易发生脱水、异构化等副反应,从而影响薯蓣皂苷元产率。利用薯蓣皂苷元易溶于非极性溶剂的特点,将水和有机溶剂组成的双相体系应用于皂苷水解,可促使产物与酸分离,降低副反应程度。例如,使用水/石油醚为双相反应介质时,反应过程中催化剂与反应物在水相发生水解,薯蓣皂苷元产物被萃取富集于石油醚相,从而减弱产物与酸催化剂的接触程度,这样既能够促进水解平衡向正反应方向移动,又能够防止产物发生异构化或脱水等副反应,因此,水解效率和薯蓣皂苷元产率提高,而酸催化剂用量减少。同时,双相酸水解体系的应用还实现了水解反应和产物萃取连续完成,有利于简化工业生产程序,提高生产效率。

以盾叶薯蓣根茎粉末为原料,以含硫酸的甲醇水溶液与石油醚组成的双相混合体系为反应介质,建立了双相联合酸水解法萃取薯蓣皂苷元的最佳工艺为,反应温度100℃、甲醇体积分数20%、反应时间8 h、硫酸体积分数6%。该工艺操作简便易行、硫酸溶液用量减少,所得薯蓣皂苷元产率可达3.83%,明显高于传统直接酸水解方法的3.01%^[56-59]。高压条件有利于促进皂苷酸水解进程^[60],因此,将双相酸水解体系与高压反应条件相结合,结果表明,加压双相酸水解法制备薯蓣皂苷元的产率高于直接酸水解等传统提取工艺,而硫酸消耗量则比传统直接酸水解法降低了88.53%,废水中的化学耗氧量(COD)和总有机碳(TOC)分别降低了50.15%和64.39%^[61-64]。可见,加压双相反应体系的应用,不但能够有效提高薯蓣皂苷元产率,还能够显著降低无机酸使用量,有效减少酸废排放及环境污染。最近,由季铵盐和有机酸组成的低共熔溶剂(DES)代替水相,与石油醚共同构成双相反应体系^[65],在超声波辐射条件下,所得薯蓣皂苷元产率与传统酸水解法相当。该体系具备以下多重优势:反应温度低至40℃、反应时间只有15 min、废水中COD只有传统方法的1%、低共熔溶剂可回收并循环使用等。可见,DES的应用为薯蓣皂苷元的清洁有效制备提供了新思路和新方法。

3.2 磺酸功能化离子液体催化 离子液体完全由阴阳离子组成,在室温或接近室温条件下呈液态存在,具有非挥发性和不可燃性。其中,磺酸功能化离子液体($\text{SO}_3\text{H-ILs}$)由于其合成方法简单、

布朗斯特酸性强,催化活性高、性质稳定、易于回收等优势,可替代硫酸或盐酸等无机强质子酸,在工业催化、药物合成、生物质处理与转化等领域得到了广泛研究^[66-68]。与无机酸相比, $\text{SO}_3\text{H-ILs}$ 的非挥发性和热化学稳定性使其在反应中既可以有效避免或减轻环境污染及设备腐蚀等现象,也为催化体系的回收和循环使用提供了基础条件和有效途径。

1-磺丙基-3-甲基咪唑硫酸氢盐离子液体($[\text{PSMIm}]\text{HSO}_4$)可取代硫酸用于催化制备薯蓣皂苷元^[69],水解实验的单因素考察结果表明,药材原料2.0 g可得薯蓣皂苷元6.35 mg。由于是采用直接酸水解方法,离子液体水溶液直接作用于原料药材粉末,因此酸性离子液体消耗量较多,使得成本增加。同时,由于药材未进行提取分离,转化底物所含成分复杂,导致离子液体催化剂分离效率和循环使用性能并不是很高。采用先提取后水解的方法,从盾叶薯蓣提取分离总皂苷成分,然后以1-磺丁基-3-甲基咪唑硫酸氢盐($[\text{BHSO}_3\text{MIm}]\text{HSO}_4$)离子液体为催化剂,在微波辐射条件下可实现皂苷短时间高效水解^[70]。研究结果表明,优化条件下,薯蓣皂苷元得率为 $99\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,水解反应时间只有20 min,酸性离子液体循环使用5次后仍具有较高催化活性。磺酸功能化离子液体的应用本质仍为液体酸催化,其优势在于酸催化剂的非挥发性和可循环使用性能,但依然无法避免废液处理和排放等问题。

3.3 固体酸催化 以液体酸为催化剂时,反应结束后,酸催化剂和其他一些水溶性产物混溶于水相,在一定程度上限制了催化剂的循环使用性能。而以固体酸为催化剂,通过简单过滤和洗涤即可实现催化剂的分离和回收。李谦等^[71]将强酸型离子交换树脂用于催化薯蓣皂苷水解,所得薯蓣皂苷元产率为盐酸直接水解的70%,而溶液中的氢离子浓度一直都比较低,这大大减轻了环境污染和设备腐蚀现象。酸度表征结果显示,负载磺酸固体催化剂酸性与均相硫酸相当,在高温高压条件下能够稳定存在,且易于从反应体系中分离回收,因此,在催化领域的应用研究已较为广泛^[72]。近几年来,负载磺酸固体催化剂也被用于薯蓣皂苷元制备过程^[73-78]。例如,将磺酸基引入表面修饰的纳米 Fe_3O_4 颗粒,得到了一系列磺酸型磁性固体酸^[73-76]。其中2种固体酸 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@\text{SO}_3\text{H}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Pr-S-SO}_3\text{H}$ 的强酸浓度分别为 2.01 、 $2.34\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$,能够显示出更高的酸催化活性,优化条件下,所得薯蓣皂苷元产率分

别为18.78%和19.15%。利用核磁共振波谱及液-质联用技术对产物进行分离和鉴定结果显示,催化产物中存在薯蓣皂苷元以及含有乙基葡萄糖苷基团的化合物^[73-74],说明在此类固体酸催化作用下,皂苷成分通过醇解路径最终转化为薯蓣皂苷元。

多孔 SiO_2 制备工艺成熟,表面反应活性高,常用作负载各类功能化基团的良好载体。以廉价磷尾矿作为硅源可制备得到 SiO_2 ,再对其表面直接进行磺化得到硅基负载磺酸固体催化剂($\text{SiO}_2\text{-SO}_3\text{H}$)^[77]。将其用于催化醇解盾叶薯蓣总皂苷,薯蓣皂苷元产率比传统酸水解法提高了12.9%,催化剂有效循环使用5次后,通过稀硫酸溶液浸泡3 h即可恢复催化活性。苯乙烯、双丙烯酰胺和烯丙基磺酸钠通过聚合反应和酸化作用可得到聚合物负载磺酸固体催化剂,也可有效催化醇解薯蓣总皂苷,薯蓣皂苷元产率可达12.82%,催化剂易于分离,可循环使用6次^[78]。

在盾叶薯蓣转化制备薯蓣皂苷元过程中,负载磺酸固体催化剂显示出布朗斯特酸性强、催化活性高、产物和反应物均易于分离回收、对设备无腐蚀性、无酸废液排放等显著优势。然而,催化剂的制备需使用多种无机材料及有机试剂,合成过程也较为复杂,这将使得其应用成本显著增加;磺酸基团的负载量及催化性能受合成条件和载体基质的影响较为显著;同时,反应过程需使用乙醇为溶剂,为安全生产带来一定风险。未来可通过探寻新型负载材料、简化固体酸制备过程、提高催化剂稳定性、增强催化体系循环使用性能等方面进行不断深入研究和改进,以推动固体酸催化剂的产业化制备和工业化应用。

4 结语与展望

薯蓣皂苷元药用价值广泛,盾叶薯蓣是薯蓣皂苷元的重要植物来源。传统的直接酸水解法为无机酸直接作用于盾叶薯蓣药材根茎粉末,制备过程中的酸废液排放量大、环境污染严重、淀粉和纤维素等富含资源浪费、薯蓣皂苷元产率不高等问题严重制约其工业生产的可持续发展。为解决这些问题,国内外相关企业和科研机构一直致力于薯蓣皂苷元新型生产工艺和绿色制备方法的研究与开发,目前研究主要集中于酶水解、微生物转化以及改进酸水解等。

由于反应条件温和、清洁无污染等优势,酶水解和微生物转化方法在盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元过程中的应用研究较为持续和广泛。对于酶水解,

应深入探寻生物转化过程中的关键糖苷水解酶,充分阐明酶解皂苷的转化路径以及酶特异性,着力提高酶水解效率。现阶段微生物转化制备薯蓣皂苷元研究仍然停留在实验室阶段,并以菌种筛选和培养最为常见。由于转化成本低、薯蓣皂苷元产率高,微生物转化方法具有更广阔的应用前景。一方面,明确微生物转化机制,分离纯化代谢产生的糖苷酶,探究其催化性能,为实现高效转化奠定基础。另一方面,选育高效转化菌株、开发稳定的微生物转化体系、采用简单有效的产物分离技术,加快推进微生物转化制备薯蓣皂苷元的工业化进程。

改进酸水解中,高压双相酸水解技术虽能显著降低无机酸消耗量,但使用有机相和高压条件对设备要求更高,生产安全风险加大,无法避免使用无机酸也是双相酸水解未能得到深入研究和应用的主要因素。酸功能化离子液体无挥发性、热稳定性高,为代替无机酸提供了应用基础,其在盾叶薯蓣转化制备薯蓣皂苷元过程中已显示出良好催化活性和循环性能,但由于本质仍为液体酸催化,离子液体催化体系仍无法避免废液处理和排放问题。因此,未来可探寻应用可生物降解离子液体,充分发挥离子液体催化剂的循环使用性能,以有效解决环境污染难题。固体酸催化剂用于盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元的优势在于无腐蚀性、易回收,缺点在于需使用乙醇作为反应溶剂、催化剂制备过程较为繁琐,未来可探索使用结构简单、易合成、性能稳定的固体酸催化剂,以促进固体酸在盾叶薯蓣制备薯蓣皂苷元中的研究和应用。

[参考文献]

- [1] 张释晴,宋雨轩,张文雪,等. 抗肿瘤天然产物薯蓣皂苷元的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 4360-4366.
- [2] 李陶然,周小青,刘宏栋,等. 治疗阿尔茨海默病的皂苷类成分及其作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 28(14): 216-225.
- [3] 罗卓玛,胡越高,王璐红,等. 薯蓣皂苷元抗肿瘤衍生物的合成及其生物活性的研究[J]. 有机化学, 2018, 38(4): 919-925.
- [4] ROTHROCK J W, HAMMES P A, MCALEER W J. Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of saponin [J]. Ind Eng Chem, 1957, 49(2): 186-188.
- [5] 王俊,陈钧,杨克迪,等. 水解原位萃取薯蓣皂苷元的工艺条件研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(10): 40-43.
- [6] 汤兴利,徐增莱,夏冰,等. 盾叶薯蓣皂素提取工艺及检

- 测方法研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(11): 877-880.
- [7] 韩凤梅,姚向阳,陈勇. 盾叶薯蓣纤维素酶酶解工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2004, 21(6): 26-27.
- [8] 雷震,雷攀,杜士明,等. 盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的不同提取方法比较研究[J]. 中国药业, 2015, 24(22): 24-26.
- [9] 李会,张佳佳,梁静怡,等. 基于酶法辅提和微波酸解的黄姜薯蓣皂苷元清洁生产工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 94-98.
- [10] 汪朋. 盾叶薯蓣中甾体皂苷的提取和薯蓣皂苷元绿色制备工艺研究[D]. 无锡:江南大学, 2015.
- [11] 雷攀,杨光义,杜士明,等. 生物酶预处理-醇提酸解法提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的工艺[J]. 医药导报, 2016, 35(4): 389-393.
- [12] 高中超. 黄姜薯蓣皂苷的泡沫分离及薯蓣皂苷元的制备研究[D]. 西宁:青海师范大学, 2016.
- [13] 喻书诚,喻家欣,魏蜜,等. 不同水解酶组合对黄姜细胞壁降解和皂苷释放量的影响及其结构特征分析[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2020, 42(6): 603-610.
- [14] 刘玥,胡立宏,张毅楠. 商品化糖苷酶转化糖苷类天然产物研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 721-726.
- [15] 周中流,李春燕,陈林浩,等. 天然产物皂苷类化合物生物转化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 173-192.
- [16] 唐俊,葛海涛,张云霞,等. 纤维素酶辅助提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的工艺优化研究[J]. 中国医药科学, 2012, 2(1): 27-29.
- [17] 赵敏,谭大维,余河水,等. 薯蓣皂苷元的制备方法研究进展[J]. 中草药, 2013, 44(13): 1860-1866.
- [18] 魏夺. 纤维素酶催化与三液相萃取耦合制备薯蓣皂苷元[D]. 大连:大连理工大学, 2011.
- [19] 魏夺,董悦生,韩松,等. 纤维素酶催化与三液相萃取偶联制备盾叶薯蓣皂苷元[J]. 化工学报, 2012, 63(6): 1877-1882.
- [20] 杨转萍. 黄姜中薯蓣皂苷的提取纯化及酶解工艺研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2011.
- [21] 赵国强,王常高,林建国,等. 黄姜中薯蓣皂苷元提取工艺的优化[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1834-1837.
- [22] FU Y Y, YU H S, TANG S H, et al. New dioscin-glycosidase hydrolyzing multi-glycosides of dioscin from *Absidia* strain[J]. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(6): 1011-1017.
- [23] LEI J, NIU H, LI T H, et al. A novel β -glucosidase from *Aspergillus fumigates* releases diosgenin from spirostanosides of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright (DZW)[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2012, 28(3): 1309-1314.
- [24] 王海艳. 双相酶水解制备宝藿苷 I 和薯蓣皂苷元的

- 研究[D]. 镇江:江苏大学,2018.
- [25] 陈彭月,刘艳,陈莎,等. 芍药甘草汤药渣中资源性成分的再利用[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(24):171-177.
- [26] 陶晓赛,陈志红,谢彩侠,等. 基于HPLC和NIRS建立快速检测盾叶薯蓣中3种皂苷含量的方法[J]. 天然产物研究与开发,2020,32(2):305-316.
- [27] 罗娜. 复合酶法提取黄姜中薯蓣皂苷元及其综合利用研究[D]. 郑州:郑州大学,2006.
- [28] 钟桂芳,刘径羽,番攀,等. 复合酶法提取薯蓣皂素的研究[J]. 中国酿造,2013,32(5):62-66.
- [29] 肖婉娜,李欣,赖家良,等. 超声辅助复配酶法制备黄姜中薯蓣皂素[J]. 安徽农业科学,2017,45(16):121-125.
- [30] 肖婉娜. 超声辅助复配酶法制备薯蓣皂素的工艺研究[D]. 广州:华南农业大学,2017.
- [31] 李文君,王成章,张水晶,等. 多元复合酶降解黄姜薯蓣皂苷元的工艺研究[J]. 生物质化学工程,2014,48(4):23-27.
- [32] 闫美屹. 生物法制备薯蓣皂素的清洁生产工艺[D]. 北京:北京化工大学,2015.
- [33] HUANG H Z, ZHAO M, LU L, et al. Pathways of biotransformation of zingiberen newsaponin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin [J]. J Mol Catal B-Enzym, 2013, 98: 1-7.
- [34] 董悦生,齐珊珊,刘琳,等. 米曲霉直接转化盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元[J]. 过程工程学报,2009,9(5):993-998.
- [35] QI S S, DONG Y S, ZHAO Y K, et al. Qualitative and quantitative analysis of microbial transformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chromatographia, 2009, 69(9/10): 865-870.
- [36] DONG Y S, TENG H, QI S S, et al. Pathways and kinetics analysis of biotransformation of *Dioscorea zingiberensis* by *Aspergillus oryzae* [J]. Biochem Eng J, 2010, 52(2/3): 123-130.
- [37] 刘琳. 哈茨木霉生物转化盾叶薯蓣中的皂苷及其产物提取分离[D]. 大连:大连理工大学,2010.
- [38] LIU L, DONG Y S, QI S S, et al. Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum* [J]. Appl Microbiol Biot, 2010, 85(4): 933-940.
- [39] ZHU Y L, HUANG W, NI J R, et al. Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(5): 1409-1416.
- [40] ZHU Y L, HUANG W, NI J R. A promising clean process for production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. J Clean Prod, 2010, 18(3): 242-247.
- [41] ZHU Y, NI J, HUANG W. Process optimization for the production of diosgenin with *Trichoderma reesei* [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2010, 33(5): 647-655.
- [42] 朱余玲,黄文,刘葳,等. 利用里氏木霉生物转化制备黄姜薯蓣皂苷元的清洁新工艺[J]. 北京大学学报:自然科学版,2010,46(4):661-666.
- [43] ZHENG T X, YU L D, ZHU Y L, et al. Evaluation of different pretreatments on microbial transformation of saponins in *Dioscorea zingiberensis* for diosgenin production [J]. Biotechnol Biotech Eq, 2014, 28(4): 740-746.
- [44] 张佳佳,李会,李恒,等. 高效转化黄姜皂苷为薯蓣皂苷元菌株的筛选及转化条件优化[J]. 生物工程学报,2013,29(6):848-852.
- [45] 郭梦真. 盾叶薯蓣总皂苷提取及微生物转化研究[D]. 武汉:华中科技大学,2017.
- [46] CHEN Y, DONG Y, CHI Y L, et al. Eco-friendly microbial production of diosgenin from saponins in *Dioscorea zingiberensis* tubers in the presence of *Aspergillus awamori* [J]. Steroids, 2018, 136: 40-46.
- [47] 徐利丽. 基于生物转化制备异槲皮苷及薯蓣皂苷元的研究[D]. 镇江:江苏大学,2020.
- [48] CHENG Y T, DONG C, HUANG C C, et al. Enhanced production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* in mixed culture solid state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Aspergillus fumigatus* [J]. Biotechnol Biotech Eq, 2015, 29(4): 773-778.
- [49] SHU G W, WANG Z, CHEN H. Screening and identification of probiotic *Lactobacillus* for the production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* Wright by biotransformation [J]. Biotechnol Biotech Eq, 2017, 31(5): 1026-1032.
- [50] XIANG H B, ZHANG T, PANG X, et al. Isolation of endophytic fungi from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright and application for diosgenin production by solid-state fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(13): 5519-5532.
- [51] ZHU Y L, ZHU H C, QIU M Q, et al. Investigation on the mechanisms for biotransformation of saponins to diosgenin [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(1): 143-152.
- [52] 李雅静,王丰青,谢彩侠,等. 盾叶薯蓣转录组分析及其皂苷元生物合成关键酶基因的挖掘[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3885-3894.
- [53] ZHAO J, ZHENG B, LI Y, et al. Enhancement of diepoxin ζ production by yeast extract and its fractions in liquid culture of Berkleasium-like endophytic fungus Dzf12 from *Dioscorea zingiberensis* [J].

- Molecules, 2011, 16(1): 847-856.
- [54] 王越,王春慧,张琰,等. 盾叶薯蓣内生菌研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1808-1811.
- [55] 王祖华,徐启燃,周顺丽,等. 内生 *Bacillus sivelezensis* HBB5 菌株发酵盾叶薯蓣产薯蓣皂苷元的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(7): 774-778.
- [56] 杨欢,杨克迪,陈钧. 双相酸水解法提取薯蓣皂苷元的研究[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(4): 270-272.
- [57] 沈玉萍,尹华武,刘瀛浣,等. 双相联合酸水解法从黄姜中萃取薯蓣皂苷元的研究[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2272-2274.
- [58] 夏国华,尹华武,王旭波,等. 双相联合酸水解-HPLC法测定中药黄姜中薯蓣皂素的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(12): 1699-1703.
- [59] 王旭波,杨欢,尹华武,等. 预发酵-双相联合酸水解法萃取薯蓣皂素的初步研究[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(3): 187-190.
- [60] 阴春晖,李培琴,赵江林,等. 从盾叶薯蓣组培苗中高压酸解制备薯蓣皂苷元[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(1): 114-117.
- [61] YANG H, YIN H W, WANG X W, et al. In-situ pressurized biphasic acid hydrolysis, a promising approach to produce bioactive diosgenin from the tubers of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11(43): 636-642.
- [62] YANG H, YIN H W, SHEN Y P, et al. A more ecological and efficient approach for producing diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers via pressurized biphasic acid hydrolysis[J]. J Clean Prod, 2016, doi: 10. 1016/j. jclepro. 2016. 05. 030.
- [63] 杨鹏飞,朱烨婷,方旭,等. 加压提取法制备盾叶薯蓣根茎中薯蓣皂苷元[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2745-2747.
- [64] 尹华武. 基于加压双相酸水解技术萃取薯蓣皂苷元的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [65] XIANG CH, ZHANG S Y, CHE Y, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent/petroleum ether biphasic system for the green and efficient production of diosgenin[J]. Clean Eng Technol, 2022, doi: 10. 1016/j. clet. 2021. 100361.
- [66] SHI S B, WU Y F, ZHANG M T, et al. Direct conversion of cellulose to levulinic acid using SO_3H -functionalized ionic liquids containing halogen-anions[J]. J Mol Liq, 2021, doi: 10. 1016/j. molliq. 2021. 117278.
- [67] VAFAEZADEH M, ALINEZHAD H. Brønsted acidic ionic liquids: Green catalysts for essential organic reactions[J]. J Mol Liq, 2016, 218: 95-105.
- [68] LI C, ZHAO J, TONG H X, et al. Design and synthesis of SO_3H -functionalized acidic ionic liquids for catalytic conversion of wheat straw to ethyl levulinate [J]. Fuel, 2023, 333: 126284.
- [69] WANG Y, LUO J, SONG H, et al. New ionic liquid-based preparative method for diosgenin from *Rhizoma dioscoreae nipponicae* [J]. Pharmacogn Mag, 2013, 9(35): 250-254.
- [70] WANG P, MA C Y, CHEN S W, et al. Conversion of steroid saponins into diosgenin by catalytic hydrolysis using acid-functionalized ionic liquid under microwave irradiation[J]. J Clean Prod, 2014, 79: 265-270.
- [71] 李谦,高向涛,徐俊清,等. 离子交换树脂催化薯蓣皂苷水解[J]. 应用化学, 2009, 26(4): 431-434.
- [72] WANG P, ZHAO Y, LIU J. Versatile design and synthesis of mesoporous sulfonic acid catalysts[J]. Sci Bull (Beijing), 2018, 63(4): 252-266.
- [73] SHEN B W, YU X J, ZHANG F R, et al. Green production of diosgenin from alcoholysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. wright by a magnetic solid acid[J]. J Cleaner Prod, 2020, doi: 10. 1016/j. jclepro. 2020. 122297.
- [74] SHEN B W, ZHANG F R, ZHAO M Q, et al. Synthesis and characterization of magnetic solid acid $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}@\text{SO}_3\text{H}$ and application for the production of diosgenin by alcoholysis of turmeric saponins [J]. Mol Catal, 2021, doi. 10. 1016/j. mcat. 2021. 111751.
- [75] JIANG W X, ZHANG F R, SHEN B W, et al. Magnetically recyclable solid acid catalyst $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ETMS-TETA-SO}_3\text{H}$ for efficient alcoholysis of dioscin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. Catal Commun, 2020, 143: 106066.
- [76] JIANG W X, YU X J, HUI Y, et al. Catalytic alcoholysis of saponins in *D. zingiberensis* C. H. Wright (*Curcuma longa* L) with magnetic solid acid to prepare diosgenin by response surface methodology [J]. Ind Crop Prod, 2021, 161: 113197.
- [77] SHEN B W, YU X J, JIANG W X, et al. Green conversion of saponins to diosgenin in an alcoholysis system catalyzed by solid acid derived from phosphorus tailings [J]. ACS Omega, 2021, doi: 10. 1021/acsomega. 0c05627.
- [78] YUAN H, YU X J, SHEN B W, et al. Preparation of poly(styrene-co-allyl sulfonic acid) as a novel catalyst for the alcoholysis of dioscin[J]. Polym Adv Technol, 2020, doi: 10. 1002/pat. 4904.

[责任编辑 李嘉麟]