

盐析辅助酶提取龙牙楸木皂苷及其抗氧化活性研究

李德海¹, 朱晓冉¹, 王路², 王振宇², 赵楠楠¹, 龚金华³

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 黑龙江哈尔滨 150090)
(3. 香港教育大学博文及社会科学学院科学与环境学系, 香港 999077)

摘要: 以龙牙楸木为试验原料, 采用盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷, 在单因素试验的基础上, 采用响应面优化提取工艺并对比研究盐析辅助酶法、溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷抗氧化活性的区别。结果表明盐析辅助酶法最佳工艺为: 酶解 pH 5.405、酶解温度 61.3 °C、磷酸氢二钠添加量 7.74%、酶解时间 90 min、纤维素酶添加量 1.5%, 在此条件下龙牙楸木皂苷得率 3.97%, 该方法与溶剂提取法相比, 可显著提高皂苷得率。抗氧化活性试验表明, 盐析辅助酶法和溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷对 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值依次为 0.342 mg/mL、0.365 mg/mL, 对超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 值依次为 1.220 mg/mL、1.432 mg/mL, 总还原能力由强到弱为: Vc>盐析辅助酶法>溶剂提取法。本试验研究为龙牙楸木皂苷高效提取以及初步明确其抗氧化功能提供科学数据参考。

关键词: 龙牙楸木皂苷; 盐析辅助酶法; 响应面法; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)12-129-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.020

Extraction and Antioxidant Activity of Saponins from *Aralia elata* by Salting-out Assisted Enzymatically Hydrolysis

LI De-hai¹, ZHU Xiao-ran¹, WANG Lu², WANG Zhen-yu², ZHAO Nan-nan¹, GONG Jin-hua³

(1. College of Forestry, Northeast Forest University, Harbin 150040, China) (2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China) (3. Department of Science and Environmental Studies, Faculty of Liberal Arts and Social Sciences, Education University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

Abstract: The aims of this study were to optimize the extraction process of the *Aralia elata* saponin and to evaluate its antioxidant capacity. A salting-out assisted enzymatically hydrolysis process was used to extract the saponin and optimized by response surface method. The product of solvent extraction was selected as control and the effects of this process on the antioxidant activities of the extract were investigated. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: pH 5.405, temperature 61.3 °C, disodium phosphate concentration 7.74%, cellulase concentration 1.5% and duration 90 min. The productivity of *Aralia elata* saponin was 3.97% under these conditions. The productivity of this process significantly increased comparing with solvent extraction. Results from the antioxidant test showed that the IC₅₀ values of products extracted by the optimized process and the solvent extraction process toward DPPH radicals were 0.342 mg/mL, 0.365 mg/mL, those toward superoxide radicals were 1.220 mg/mL, 1.432 mg/mL, respectively. The total antioxidant capacity superiority sequence was as follows: Vc > optimized process extracted product > solvent extracted product. This study provides scientific data for the efficient extraction and preliminary antioxidant function clarification of *Aralia elata* saponin.

Key words: *Aralia elata* saponin; salting-out assisted enzymatically hydrolysis process; surface response method; antioxidant capacity

人体正常生理代谢, 体内自由基处于生成和消除的动态平衡, 如果自由基生成过多或者清除过少, 蓄积的自由基会损害机体内蛋白质、脂肪和 DNA 等生物大分子, 造成机体氧化损伤, 增加血管粥样硬化、

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFC0500307-07); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金 (2017RAQXJ091)

作者简介: 李德海 (1976-), 男, 副教授, 研究方向: 食品化学及植物有效成分

通讯作者: 王路 (1973-), 女, 副教授, 研究方向: 天然产物分离与性质

高血压、糖尿病、肿瘤、帕金森症、老年痴呆症等疾病的发病率^[1]。天然植物活性抗氧化剂由于低毒、来源广泛、且可直接作用于自由基或通过破坏自由基链的反应, 从而有效地抑制或缓解这些疾病的发病率等优点正受到研究者的极大关注。

龙牙楸木 (*Aralia elata*), 别称辽东楸木, 俗称刺老鸦、虎阳刺、东北野香椿等, 是五加科楸木属的多年生木本植物, 主要分布于亚洲、北美洲, 在我国主要分布于黑龙江东北部、吉林中部以及辽宁东北部等地区^[2]。龙牙楸木医药价值高, 其根、根皮及叶可入

药, 味苦、辛, 性平, 具有活血化瘀、补气安神、强精滋肾、除湿止痛之功效, 可用于治疗风湿性关节炎、神经衰弱、肝炎、糖尿病及肿瘤等^[3]。龙牙楸木营养丰富, 含有糖、氨基酸、矿物质、维生素等营养物质以及皂苷、多糖、多酚等多种活性成分, 有“山野菜之王”的美誉。现代药理学研究及临床试验证明, 皂苷类化合物是龙牙楸木的主要功能性组分。我国学者对龙牙楸木及龙牙楸木皂苷的研究报道多为栽培研究和初级加工工艺学^[4]、药理作用和临床应用^[5]、提取工艺^[6,7]等, 对龙牙楸木的高值化深加工研究较少。目前龙牙楸木皂苷提取多采用热回流、微波、超声波、闪式提取法等单一辅助方法, 单一方法存在着用时长、能耗高、提取不完全等缺点^[8], 因此本试验采用盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷。盐析效应可通过亲和力、氢键、离子的静电等作用, 与水溶液中某种组分发生优先溶剂化反应, 形成难挥发的溶剂化化合物, 减少了该组分与另一组分之间的吸引作用, 从而强化目标有机物的分离效果^[9], 而酶法可使提取液发生酶解反应, 破坏组织细胞、释放内容物, 从而提高提取得率^[10]。本试验以龙牙楸木为试验原料, 在单因素试验的基础上, 利用响应面法优化了盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷的工艺, 并经大孔树脂纯化后, 将盐析辅助酶法制备的龙牙楸木皂苷与溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷的抗氧化活性进行对比分析, 为龙牙楸木这一药食同源性木本植物更好的开发利用、更全面地发挥其药用价值和经济价值提供科学参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

龙牙楸木采自辽宁丹东; 齐墩果酸标准品、Tris、DPPH, 美国 Sigma 公司; D101 大孔树脂、纤维素酶, 国药集团化学试剂有限公司; 氯化钠、氯化镁、硫酸铵、硫酸镁、磷酸氢二钠、香草醛、冰醋酸、Vc、无水乙醇等其它试剂均为分析纯, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SHB-III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; RT-6000 酶标仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; KQ-700GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器, 江苏省昆山市超声波仪器有限公司; LGJ-25C 型冷冻干燥机, 北京四环科学仪器厂有限公司; EL20 型 pH 计, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 材料预处理

龙牙楸木新鲜样品 40 °C 烘干粉碎过 60 目筛, 按 1:20 料液比加入石油醚脱脂脱色, 50 °C 烘箱挥干溶剂后于 4 °C 保藏备用。

1.3.2 盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷的单因素试验

准确称取预处理的龙牙楸木, 按 1:30 g/mL 加入蒸馏水后, 添加一定量的纤维素酶, 调节酶解温度、酶解 pH, 酶解一定时间后离心定容按 1.3.5 测定提取液中皂苷含量, 残渣按 1:25 g/mL 加入含一定量无机盐的 80% 的乙醇溶液复提, 离心定容按 1.3.5 测定提取液中皂苷含量。考察纤维素酶添加量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)、酶解 pH (4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)、酶解温度 (45、50、55、60、65、70 °C)、酶解时间 (30、60、90、120、150、180 min)、盐的种类 (氯化钠、氯化镁、硫酸铵、硫酸镁、磷酸氢二钠)、最优盐的添加量 (4%、6%、8%、10%、12%) 对龙牙楸木皂苷提取得率的影响。

1.3.3 Plackett-Burman 试验设计联用 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺

在单因素试验的基础上, 通过 Plackett-Burman 试验确定对龙牙楸木皂苷提取得率影响显著的因素, 采用中心组合 Box-Behnken Design (BBD) 设计试验进行响应面优化盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷工艺^[11]。

1.3.4 龙牙楸木皂苷的纯化

将龙牙楸木皂苷粗提物用处理后的 D101 大孔树脂纯化, 上样质量浓度为 0.5 mg/mL, 上样量 0.6 BV, 梯度洗脱, 收集 60% 组分, 50 °C 下减压浓缩, 水饱和正丁醇萃取后冻干于 -20 °C 冰箱中备用^[12]。

1.3.5 龙牙楸木皂苷得率的测定

采用香草醛-冰醋酸-紫外分光光度法^[13]。准确称取干燥至恒重的齐墩果酸标准品 4 mg, 加乙醇溶解定容至 50 mL, 制成浓度为 0.08 mg/mL 的齐墩果酸标准溶液。精密吸取齐墩果酸标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于具塞试管中, 挥干溶剂, 先加入新制 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL, 再加入 0.8 mL 高氯酸溶液, 在 70 °C 水浴中加热 15 min, 取出, 流水冷却, 使之反应完全。加入 4 mL 乙酸乙酯, 摇匀, 随行试剂作空白, 在 560 nm 处测定吸光度。以齐墩果酸标准溶液质量浓度为横坐标, 溶液吸光度为纵坐标, 得到标准曲线为 $y=6.9129x-0.00788$, $R^2=0.9993$ 。精密吸

取样品液按照标准曲线制备的方法测定皂苷含量, 三次平行, 取平均值, 计算龙牙楸木皂苷得率, 计算公式如下所示:

$$\text{皂苷得率} = \frac{C \times N \times V}{M} \times 100\%$$

式中: C 为提取液中皂苷浓度, mg/mL; N 为稀释倍数, V 为提取液体积, mL; M 为原料质量, g。

1.3.6 龙牙楸木皂苷抗氧化活性的测定

1.3.6.1 DPPH 自由基 (DPPH·) 清除能力的测定

参考文献^[14]的方法, 在 2 mL 样液中加入 2 mL 0.1 mmol/L DPPH·溶液, 混匀室温下避光静置 20 min 后, 在 517 nm 处测定吸光值, DPPH·清除率按下列公式计算。

$$\text{DPPH·清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.6.2 超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 清除能力的测定

参照 Qi H 等^[15]的方法并作一定调整, 试管中加入 1 mL 样液和 3 mL pH 8.2 的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 混匀后 25 °C 水浴平衡 8 min, 加入 35 mmol/L 的邻苯三酚 200 μL, 两者混合均匀, 加入 8 mmol/L 盐酸 1 mL 终止反应, 325 nm 处测定吸光值。

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中: A_0 为样品空白组吸光值; A_1 为样品组吸光值; A_2 为对照组吸光值。

1.3.6.3 总还原力的测定

参考文献^[16]的方法, 并作出改动。样液 1.00 mL 加入 2.50 mL 1% 铁氰化钾溶液, 在 50 °C 下反应 20 min, 速冷后向溶液加入 2.50 mL 10% 的三氯乙酸溶液, 5 min 后, 依次加入 5 mL 去离子水、0.50 mL 0.1% 三氯化铁溶液, 反应 30 min, 在 700 nm 处测定吸光值。

1.4 统计分析

数据处理采用统计分析软件 SPSS 21.0 与 Origin 8.5 进行统计分析, 所得结果用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) 表示, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验结果

2.1.1 酶解 pH 对龙牙楸木皂苷得率的影响

由图 1 可知, 酶解 pH 在 4.0~5.5 时, 随着提取液

pH 的升高, 龙牙楸木皂苷得率不断提高, 在酶解 pH 5.5 时达到最大值, 为 3.89%。当酶解 pH 超过 5.5, 皂苷提取得率急剧下降, 在酶解 pH 6.5 时皂苷得率下降 22.37%, 这可能是因为酶解 pH 不适宜既破坏酶的构想, 也影响底物、辅酶及酶活性部位相关基因的解离程度, 从而影响酶分子对底物分子的结合和催化, 因此只有特定的 pH 值条件下, 解离状态最适宜酶、底物和辅酶的相互结合, 从而使酶反应速度达到最大值^[17]。

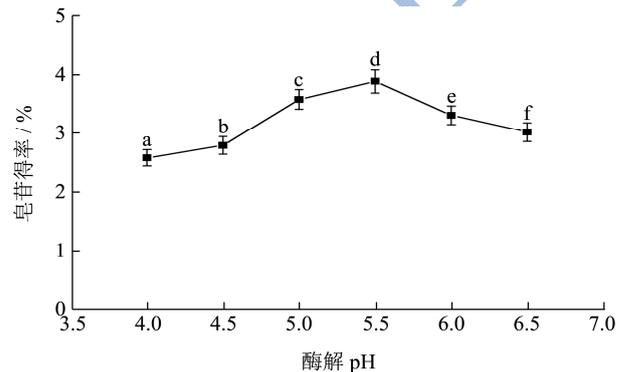


图 1 酶解 pH 对龙牙楸木皂苷得率的影响

Fig.1 Effect of enzymatic hydrolysis pH on the yield of saponin

2.1.2 酶解时间对龙牙楸木皂苷得率的影响

由图 2 可知, 在提取的前 90 min, 随着酶解时间的延长, 龙牙楸木皂苷提取得率逐渐上升, 峰值为 3.75%; 但在 90 min 后提取得率呈略微下降或趋于不变。这种变化趋势可能是因为酶发挥作用需要一定的时间, 随着酶解时间的延长给予酶与底物充分反应的机会, 同时也表明酶促提取时间越长不一定越适合酶的活力发挥。因此, 最佳的龙牙楸木皂苷提取酶解时间为 90 min。

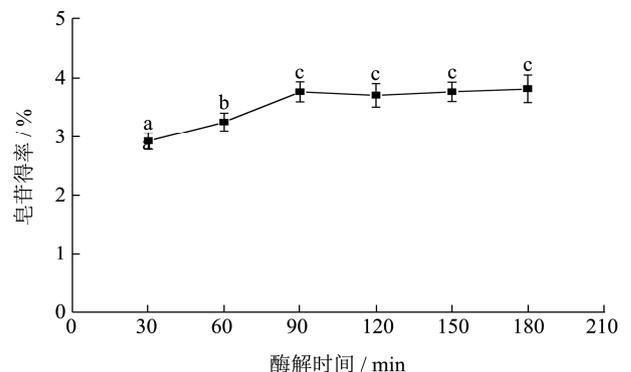


图 2 酶解时间对龙牙楸木皂苷得率的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis time on the yield of saponin

2.1.3 酶解温度对龙牙楸木皂苷得率的影响

温度显著影响酶的活性, 每一种酶都有最适宜的酶解温度。由图 3 可知, 低于 60 °C 时, 随着温度的升高龙牙楸木皂苷提取得率不断升高, 这是因为在适宜温度条件下, 反应物的能量增加, 单位时间内各组

分之间有效接触的次数增多,反应速度加快,但当温度超过 60 ℃,提取得率开始下降并且在酶解温度超过 65 ℃后急剧下降,这可能是因为酶解温度过高,酶分子吸收过多能量,导致酶分子结构的次级键断裂,致使酶蛋白变性失活,因此降低了提取得率^[18]。

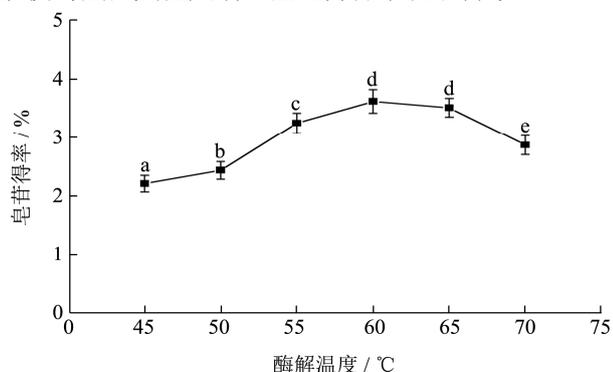


图3 酶解温度对龙牙櫟木皂苷得率的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on the yield of saponin

2.1.4 酶添加量对龙牙櫟木皂苷得率的影响

由图4可知,龙牙櫟木皂苷的提取得率与纤维素酶添加量呈现正相关,随着酶添加量的增加,皂苷提取得率快速增加,当酶添加量占龙牙櫟木粉末质量的1.5%时,皂苷提取得率达到最大值,3.84%,这是由于酶添加量增加,促进了酶与细胞壁接触,加速破壁作用,从而加快皂苷类化合物的溶出。当酶添加量超过1.5%后,皂苷得率不再增加,其原因可能是由于底物完全被酶分子所饱和,继续增加的酶分子失去了与底物结合的机会,造成酶解反应速度不再变化^[19]。

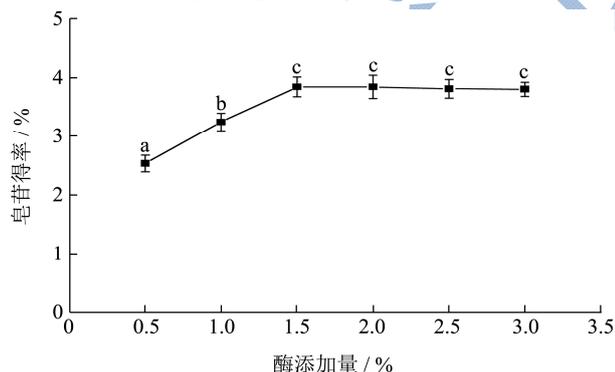


图4 酶添加量对龙牙櫟木皂苷得率的影响

Fig.4 Effect of enzyme dosage on the yield of saponin

2.1.5 盐的种类对龙牙櫟木皂苷得率的影响

不同盐对同一种有机溶剂的作用各不相同,这是各种分子和离子间力相互作用的结果,本试验考察氯化钠、氯化镁、硫酸铵、硫酸镁、磷酸氢二钠对龙牙櫟木皂苷提取得率的影响。由图5可知,不同种类的无机盐对皂苷提取得率的影响不同,差异性显著,其中添加磷酸氢二钠皂苷提取得率最高,为3.85%,添

加硫酸镁皂苷提取得率最低,为3.43%,但均高于不添加无机盐的提取得率。添加无机盐能提高皂苷提取得率可能是因为浓度差加速细胞壁膜的破碎,释放内容物,及盐可与溶液中某种组分发生优先溶剂化反应,形成难挥发的化合物,减少了组分之间的吸引作用^[20],从而有利于目标组分的分离。

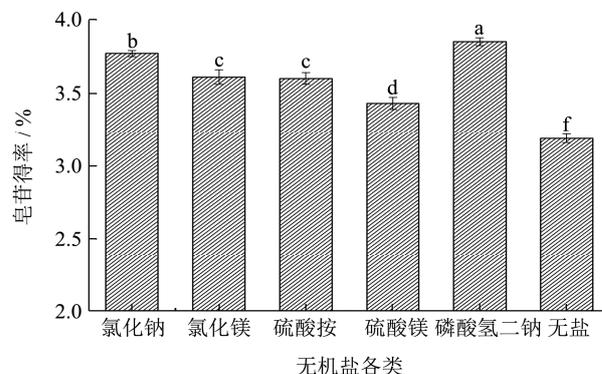


图5 盐的种类对龙牙櫟木皂苷得率的影响

Fig.5 Effect of the type of salt on the yield of saponin

2.1.6 盐添加量对龙牙櫟木皂苷得率的影响

由图6可知,当磷酸氢二钠含量由4%上升至8%时,龙牙櫟木皂苷得率随之上升,磷酸氢二钠含量8%时,皂苷得率最高为3.89%,比磷酸氢二钠含量4%的提取得率高出25.08%,继续升高磷酸氢二钠含量,皂苷提取得率下降。Rivera^[21]等采用磁场加热蒸馏制备葛缕子精油,发现提取液中氯化钠浓度较高时精油产率降低,定量检测发现,随氯化钠浓度升高,精油中柠檬烯含量降低,葛缕酮的含量升高,据此说明盐的浓度越高不一定越适合提高提取得率,因此龙牙櫟木皂苷最佳得率提取为磷酸氢二钠含量8%。

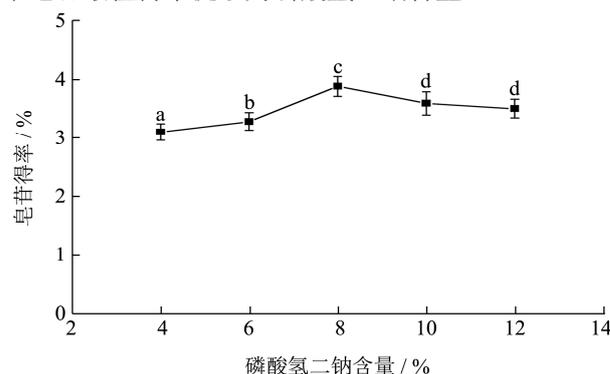


图6 盐添加量对龙牙櫟木皂苷得率的影响

Fig.6 Effect of salt dosage on the yield of saponin

2.2 响应面试验结果

采用 Plackett-Burman 试验对影响因素进行显著性分析,各因素对龙牙櫟木皂苷得率影响强弱顺序为:酶解 pH>酶解温度>盐添加量>酶解时间>酶添加量,因此试验选取酶解 pH、酶解温度、盐添加量三个因素

进行响应面优化试验,以龙牙楸木皂苷得率为考察指标,利用 Box-Behnken 建立三因素三水平数学模型。

表 1 试验因素与水平设计

Table 1 Experimental factors and levels design

| 因素 | 水平 | | |
|--------------|-----|-----|-----|
| | -1 | 0 | 1 |
| 酶解 pH (A) | 5.0 | 5.5 | 6.0 |
| 酶解温度/(°C, B) | 55 | 60 | 65 |
| 盐添加量/(%, C) | 6 | 8 | 10 |

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Results of Box-Behnken experimental design

| 试验号 | 酶解 pH | 酶解温度 | 盐添加量 | 皂苷得率% |
|-----|-------|------|------|-------|
| 1 | 1 | -1 | 0 | 3.11 |
| 2 | -1 | 0 | 1 | 3.26 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 4.01 |
| 4 | 0 | -1 | 1 | 3.21 |
| 5 | -1 | 1 | 0 | 3.69 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 3.92 |
| 7 | 1 | 0 | 1 | 3.19 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 3.89 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 3.85 |
| 10 | 1 | 1 | 0 | 3.12 |
| 11 | -1 | -1 | 0 | 3.05 |
| 12 | 0 | -1 | -1 | 3.25 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 4.05 |
| 14 | 1 | 0 | -1 | 3.08 |
| 15 | -1 | 0 | -1 | 3.32 |
| 16 | 0 | 1 | -1 | 3.59 |
| 17 | 0 | 1 | 1 | 3.13 |

采用 Design-Expert 8.05 软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,获得的响应值皂苷得率 (Y) 对酶解 pH (A)、酶解温度 (B)、盐添加量 (C) 真实值的回归模型方程为:

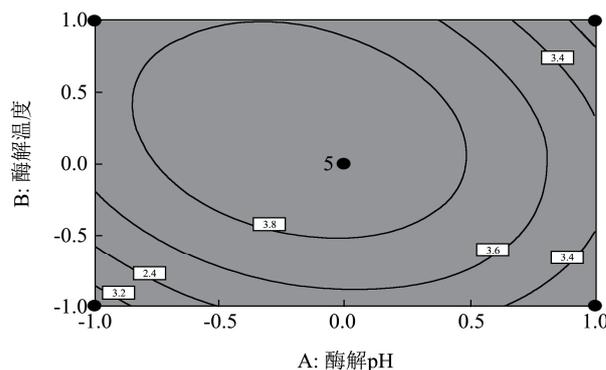
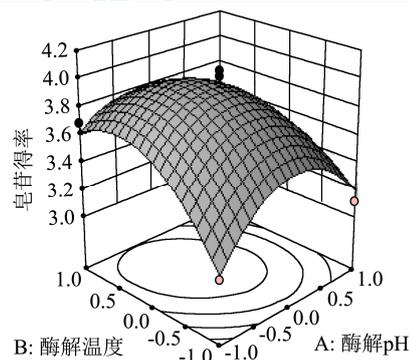
$$Y=3.94-0.10A+0.11B-0.055C-0.16AB+0.045AC-0.10BC-0.39A^2-0.31B^2-0.34C^2$$

由表 3 可知模型的 *p* 值小于 0.01, 表明该响应面回归模型达到极显著水平。失拟项不显著 (*p*=0.1584), 说明该模型对本试验拟合程度较好。回归方程的决定系数 *R*² 为 0.9583, 说明该模型对实验点的适配度达到 95.83%, 具有较高的拟合度, 仅有总变异 4.17% 不能用该模型解释, 因此可以利用该模型预测上述提取条件对皂苷得率的影响。调整决定系数为 0.9047, 说明该模型能够解释 90.47% 的响应值变化, 因而模型的拟合度良好, 可对盐析辅助酶法的不同提取条件下龙牙楸木皂苷提取得率进行预测。

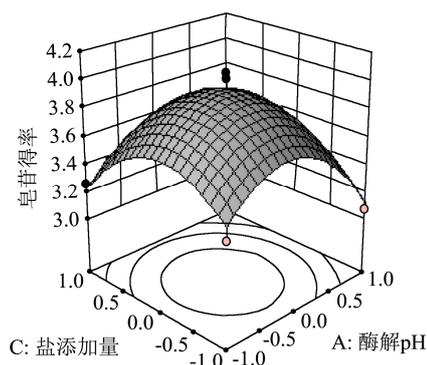
表 3 回归方程系数显著性检验

Table.3 Significance test of regression equation coefficients

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------|--------|-----|---------|-------|--------|
| 模型 | 2.08 | 9 | 0.23 | 17.88 | 0.0005 |
| A | 0.086 | 1 | 0.086 | 6.65 | 0.0365 |
| B | 0.10 | 1 | 0.10 | 7.99 | 0.0255 |
| C | 0.024 | 1 | 0.024 | 1.87 | 0.2139 |
| AB | 0.099 | 1 | 0.099 | 7.66 | 0.0278 |
| AC | 0.0081 | 1 | 0.0081 | 0.63 | 0.4550 |
| BC | 0.044 | 1 | 0.044 | 3.41 | 0.1075 |
| A ² | 0.65 | 1 | 0.65 | 50.28 | 0.0002 |
| B ² | 0.40 | 1 | 0.40 | 30.09 | 0.0009 |
| C ² | 0.49 | 1 | 0.49 | 37.75 | 0.0005 |
| 残差 | 0.091 | 7 | 0.013 | - | - |
| 失拟项 | 0.063 | 3 | 0.021 | 3.00 | 0.1584 |
| 纯误差 | 0.028 | 4 | 0.00698 | - | - |
| 总和 | 2.17 | 16 | - | - | - |



a. 酶解 pH 和 酶解温度



C: 盐添加量

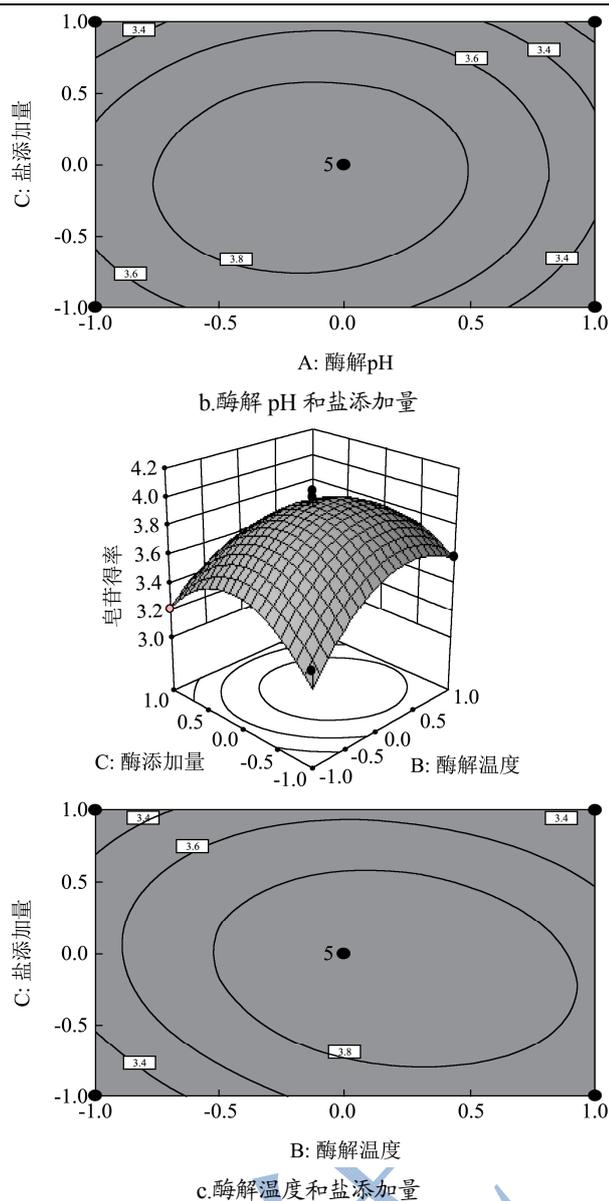


图7 各因素交互作用影响皂苷提取得率的响应面图

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effect of interactions among various factors on the yield of saponins

根据龙牙楸木皂苷回归模型做出相应的三维球面图, 如图7所示。响应面曲面的坡度可反映该因素对龙牙楸木皂苷得率影响的强弱程度。等高线的形状表明因素之间的交互影响是否显著。圆形等高线表明两因素之间的交互影响不显著; 椭圆形等高线表明两因素之间的交互影响显著^[22]。如图7a、b所示, 响应面显示坡度较陡, 等高线呈马鞍形或椭圆形, 表明酶解pH和酶解温度、酶解pH和盐的添加量之间交互作用显著, 对龙牙楸木皂苷的提取得率影响较大, 这与方差分析结果一致。酶解温度和盐添加量交互作用不显著, 方差分析结果 p 值为0.1075, 表现为曲线平滑, 等高线为圆形。

2.3 模型的验证

试验课题组采用响应面优化了盐析辅助酶、溶剂提取法提取龙牙楸木皂苷的工艺, 盐析辅助酶法最佳提取工艺为: 酶解pH 5.405、酶解温度 61.3 °C、磷酸氢二钠添加量 7.74%、酶解时间 90 min、纤维素酶添加量 1.5%。溶剂提取法最佳提取工艺为: 料液比 1:29.85 g/mL、乙醇体积分数 81.65%、提取温度 63.95 °C、提取时间 120 min, 考虑到实际操作可能性, 对两种提取方法最佳提取条件略作调整进行验证试验, 结果为盐析辅助酶法提取皂苷得率为 3.90%±0.154%, 溶剂提取法的得率为 3.64%±0.070%, 差异性显著, 表明盐析辅助酶法可提高龙牙楸木皂苷的提取得率。

2.4 龙牙楸木皂苷抗氧化活性分析

DPPH 自由基性质稳定, 通常当做自由基清除能力的标准物质。超氧阴离子自由基本身有毒性, 且可生成羟基自由基, 使机体处于过氧损伤状态^[23]。活性物质的抗氧化能力与还原力具有一定的相关性, 因此本试验选定清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基能力和总还原能力评价龙牙楸木皂苷的抗氧化能力, 结果如图8所示。

由图8可知, 两种提取方法制备的龙牙楸木皂苷抗氧化能力随着质量浓度的升高而加强, 呈现显著的剂量依赖关系。在皂苷质量浓度为 1.5 mg/mL 时, 盐析辅助酶、溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷对 DPPH 自由基的清除率依次为 81.03%、77.56%, 是初始浓度的 2.94 倍、3.47 倍, 抗氧化能力均低于同浓度的 Vc。龙牙楸木皂苷能清除 DPPH 自由基可能是因为皂苷释放氢离子, 配对孤对电子, 使 DPPH 自由基生成稳定的化合物^[24]。

在试验浓度范围内, 随着皂苷质量浓度的升高, 龙牙楸木皂苷对超氧阴离子自由基的清除率逐渐增大。质量浓度为 6 mg/mL 时, 盐析辅助酶法、溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷对超氧阴离子自由基的清除率达到最大值, 依次为 88.28%、82.35%, 提高了 3.42 倍、5.35 倍, 抗氧化能力低于 Vc。邻苯三酚碱性条件下自氧化生成有色中间产物, 并释放超氧阴离子自由基^[25]。龙牙楸木皂苷清除超氧阴离子自由基可能是因为其活性氢与超氧阴离子自由基结合生成水, 中断中间有色产物的积累。

总还原能力的强弱依次为 Vc、盐析辅助酶法、溶剂提取法。在试验浓度范围内, 盐析辅助酶法制备的

龙牙楸木皂苷总还原力 OD 值由 0.097 上升至 0.625、溶剂提取法由 0.10 上升至 0.599。龙牙楸木皂苷具有还原能力可能是因为皂苷打破自由基链, 导致 Fe^{3+} 得到电子还原成为 Fe^{2+} 。盐析辅助酶、溶剂提取制备的龙牙楸木皂苷清除 DPPH 自由基 IC_{50} 依次为 0.342 mg/mL、0.365 mg/mL, 清除超氧阴离子自由基的 IC_{50} 依次为 1.220 mg/mL、1.432 mg/mL 总还原能力强弱依次为盐析辅助酶、溶剂提取, 方差分析差异不显著, 表明盐析辅助酶法提取龙牙楸木皂苷不会破坏皂苷类化合物的抗氧化活性。

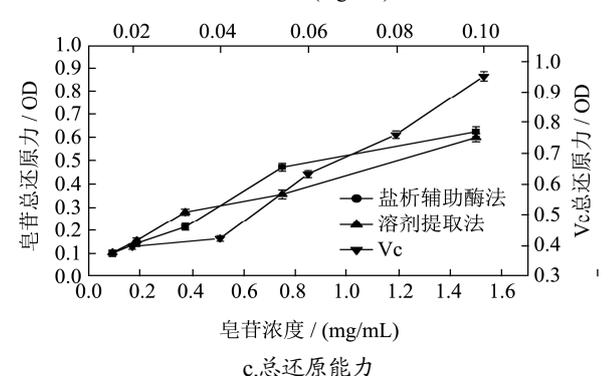
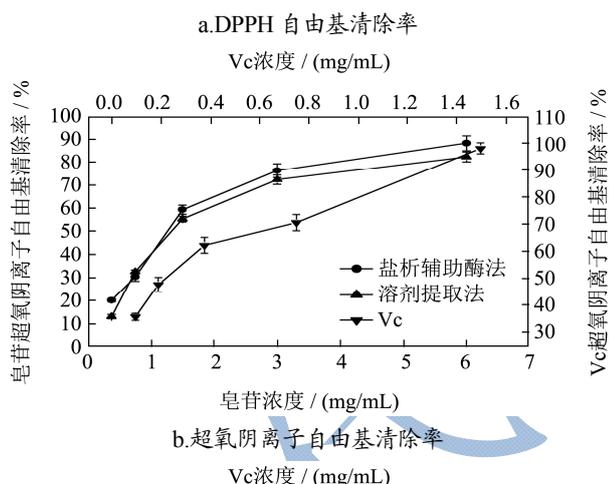
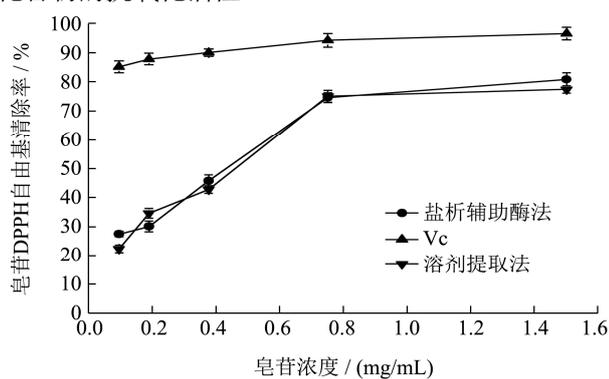


图8 龙牙楸木皂苷抗氧化能力

Fig.8 The antioxidant capacity of saponins from aralia elata

3 结论

通过单因素试验和响应面法试验确定了盐析辅助酶

法提取龙牙楸木皂苷的最佳工艺条件为酶解 pH 5.405、酶解温度 61.3 °C、磷酸氢二钠添加量 7.74%、酶解时间 90 min、纤维素酶添加量 1.5%, 在此条件下龙牙楸木皂苷得率 3.97%。以 Vc 为对照, 对比盐析辅助酶法和溶剂提取法制备的龙牙楸木皂苷抗氧化活性可知, 两种提取方法与 Vc 对 DPPH 自由基的清除能力从大到小: Vc>盐析辅助酶法>溶剂提取法, 单因素方差分析结果显示, 两种提取方法制备的样品对 DPPH 自由基的清除效果差异显著 ($p<0.05$); 对超氧阴离子自由基的清除能力从大到小: Vc>盐析辅助酶法>溶剂提取法, 差异不显著 ($p>0.05$)。总还原能力的强弱依次为 Vc、盐析辅助酶法、溶剂提取法, 差异不显著 ($p>0.05$)。可以看出, 盐析辅助酶法能够显著提高龙牙楸木皂苷得率 ($p<0.05$), 并很好地保留了皂苷的抗氧化活性。因此本试验对龙牙楸木皂苷高效制备及明确其抗氧化功能有积极指导作用。

参考文献

- [1] Bassenge E, Schneider H T, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases [J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2005, 130(50): 2904-2909
- [2] Zhang Y, Han F Y, Wu J, et al. Triterpene saponins with α -glucosidase and PTP1B inhibitory activities from the leaves of *Aralia elata* [J]. Phytochemistry Letters, 2018, 26: 179-183
- [3] Hwang K A, Hwang Y J, Song J. Cholesterol-lowering effect of *Aralia elata* (Miq.) Seem via the activation of SREBP-2 and the LDL receptor [J]. Journal of the Chinese Medical Association Jcma, 2017, 80(10)
- [4] 李奕莹,张顺捷.龙牙楸木与北五味子培植技术研究[J].林业科技,2017,42(4):36-38
LI Yi-xuan, ZHANG Shun-jie. Study on the cultivation technique of *Aralia elata* and *Schisandra chinensis* [J]. Forestry Science & Technology, 2017, 42(4): 36-38
- [5] 姜天童.益气活血中成药对 PCI 术后患者疗效的影响及龙牙楸木总皂苷对心肌细胞凋亡的作用[D].北京中医药大学,2017
JIANG Tian-tong. Effect of Chinese patent medicine on the curative effect of patients after PCI and the effect of total saponins of *Aralia elata* on cardiomyocyte apoptosis [D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2017
- [6] 王雪,田义新,张丽鹏,等.龙牙楸木总皂苷提取工艺的优化[J].人参研究,2014,26(1):38-41
WANG Xue, TIAN Yi-xin, ZHANG Li-peng, et al. Optimization of the aralosides extraction from *Aralia elata* (Miq.) Seem [J]. Ginseng Research, 2014, 26(1): 38-41

- [7] 刘娟,徐倩,赵旭伟.闪式提取法提取龙牙楸木中总皂苷的工艺研究[J].现代食品科技,2010,26(6):622-624
LIU Juan, XU Qian, ZHAO Xu-wei. Extraction of total saponins in *Aralia elata* seem by herbal flash extractor [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(6): 622-624
- [8] 黄倩,岳田利,袁亚宏,等.响应面试验优化超声-真空提取杏鲍菇多糖工艺[J].食品科学,2015,36(16):77-82
HUANG Qian, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, et al. Optimization of ultrasonic-vacuum extraction of polysaccharides from fruit bodies of *Pleurotus eryngii* [J]. Food Science, 2015, 36(16): 77-82
- [9] 李敏杰,陆兆新,赵海珍.超声波辅助-盐析-水蒸气蒸馏法提取葛缕子精油的研究[J].食品工业科技,2013,34(11):99-103
LI Min-jie, LU Zhao-xin, ZHAO Hai-zhen. Extraction of caraway essential oils by ultrasonic-assisted salting-out hydrodistillation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(11): 99-103
- [10] 李晓,李春阳,曾晓雄,等.响应面试验优化红花籽油水酶法提取工艺[J].食品科学,2017,38(22):231-238
LI Xiao, LI Chun-yang, ZENG Xiao-xiong, et al. Optimization of aqueous enzymatic extraction of safflower oil by response surface methodology [J]. Food Science, 2017, 38(22): 231-238
- [11] Thanhblicharz J L, Białas W, Lewandowicz G. Response surface optimization of manufacturing of dietary starch products [J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2009, 8(4): 51-62
- [12] 赵玲艳,张红芳,陈崇莲,等.响应曲面法优化枸骨总皂苷的提取工艺及抗氧化活性[J].江苏农业科学,2017,45(22):205-209
ZHAO Ling-yan, ZHANG Hong-fang, CHEN CHong-lian, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of total saponins of tibia by response surface methodology [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(22): 205-209
- [13] 李文平,梁银丽,包天莉,等.苦瓜果实及叶片中总皂苷和总黄酮含量对土壤水分的响应及其相关性分析[J].食品科学,2015,36(8):134-138
LI Wen-ping, LIANG Yin-li, BAO Tian-li, et al. Responses of total flavonoids and total saponins contents in fruits and leaves of balsam pear to soil moisture and their correlations [J]. Food Science, 2015, 36(8): 134-138
- [14] Bendahou A, Dufresne A, Kaddami H, et al. Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(3): 601-608
- [15] Qi H, Zhang Q, Zhao T, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(4): 195-199
- [16] Wang B, Wang Y M, Chi C F, et al. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Marine Drugs, 2013, 11(11): 4641-4661
- [17] 罗凯,黄秀芳,周毅峰,等.响应面试验优化复合酶法提取碎米荠多糖工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(4):237-242
LUO Kai, HUANG Xiu-fang, ZHOU Yi-feng, et al. Optimization of multi-enzymatic extraction of polysaccharides from cardamine hupingshanensis and their antioxidant activity [J]. Food Science, 2017, 38(4): 237-242
- [18] 包怡红,郭阳.响应面试验优化超声波辅助水酶法提取松籽油工艺及其氧化稳定性[J].食品科学,2016,37(22):60-68
BAO Yi-hong, GUO Yang. Optimization of ultrasonic-assisted aqueous enzymatic extraction of pine nut oil and its oxidative stability [J]. Food Science, 2016, 37(22): 60-68
- [19] Sun B L, Kim I H, Ryu D D Y, et al. Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism [J]. Biotechnology & Bioengineering, 1983, 25(1): 33
- [20] 陈迅,陆筱艾,刘向程,等.盐析效应在水蒸气提取植物精油中作用分析[J].广州化工,2015(6):112-113
CHEN Xun, LU Xiao-ai, LIU Xiang -cheng, et al. Analysis of salting-out effect on plant essential oil in steam distillation [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 6: 112-113
- [21] Rivera L L, Vilarem G. Hydrodistillation of caraway by direct induction heating assisted by a magnetic field process [J]. Flavour & Fragrance Journal, 2010, 22(3): 178-183
- [22] Francis F, Sabu A, Nampoothiri K M, et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15(2): 107-115
- [23] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. lactis 12 [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914
- [24] Sparg S G, Light M E, Van S J. Biological activities and distribution of plant saponins [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 94(2): 219-243
- [25] 朱晓冉,徐颖,李德海,等.酸碱性和分子量对木耳多糖抗氧化活性及相关性的影响[J].现代食品科技,2018,34(3):59-67

ZHU Xiao-ran, XU Ying, LI De-hai, et al. Correlation of the antioxidant activity and of polysaccharides from *Auricularia auricula* with its molecular weight and extracting agent

properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 59-67

