

# 文冠果果壳总皂苷的提取工艺优化 及抗氧化、抗肿瘤活性评价

王冠英<sup>1,2</sup>, 李珂珂<sup>2</sup>, 李中玉<sup>2</sup>, 叶淑红<sup>1</sup>, 孙浩<sup>1\*</sup>, 弓晓杰<sup>2\*</sup>

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116038) (2. 大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116602)

**摘要:** 文冠果果壳是文冠果生产过程中产生的废弃物, 该研究以文冠果果壳为原料, 采用单因素结合响应面法优化超声细胞破碎法提取文冠果果壳总皂苷的工艺条件, 以 DPPH·清除率、ABTS<sup>+</sup>清除率及 Fe<sup>2+</sup>螯合能力为指标评价总皂苷提取物的抗氧化活性, 用 CCK-8 法分析总皂苷提取物对 HepG2 和 A549 细胞增殖的抑制效果。结果表明, 文冠果果壳总皂苷最佳提取条件为: 乙醇体积分数 65%、液料比 35:1 (mL/g)、超声功率 200 W、超声时间 35 min、超声温度 50 °C, 总皂苷得率可达 14.95 mg/g。抗氧化实验结果表明总皂苷提取物浓度为 0.05 mg/mL, 对 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>的清除率分别为 91.35%、82.63%; 浓度为 0.10 mg/mL, 对 Fe<sup>2+</sup>螯合能力为 88.01%; 总皂苷提取物浓度与 ABTS<sup>+</sup>清除能力、Fe<sup>2+</sup>螯合能力呈极显著相关 ( $p < 0.01$ )。抗肿瘤结果表明总皂苷提取物浓度为 120 μg/mL, 作用于 HepG2 细胞和 A549 细胞的细胞存活率分别为 10.95%和 2.04%, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 79.30 μg/mL 和 63 μg/mL。综上所述, 超声细胞破碎法是一种高效的制备文冠果果壳总皂苷的技术, 文冠果果壳总皂苷提取物具有良好的抗氧化、抗肿瘤活性, 该研究可为文冠果废弃物的有效开发利用提供方法学借鉴。

**关键词:** 文冠果果壳; 总皂苷; 工艺优化; 抗氧化; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2022)12-290-299

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0076

## Optimization of the Extraction Process and Evaluation of the Antioxidant and Antitumor Activities of Total Saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge Husk

WANG Guanying<sup>1,2</sup>, LI Keke<sup>2</sup>, LI Zhongyu<sup>2</sup>, YE Shuhong<sup>1</sup>, SUN Hao<sup>1\*</sup>, GONG Xiaojie<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, Dalian Polytechnic University, Dalian 116038, China)

(2. Academy of Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116602, China)

**Abstract:** *Xanthoceras sorbifolia* Bunge husk is a waste material produced during the cultivation of this plant. Here, the process conditions for extracting total saponins from *X. sorbifolia* Bunge husk as a raw material were optimized using single-factor ultrasonic cell fragmentation combined with the response surface methodology. The antioxidant activity of the extracted total saponins was evaluated using DPPH· and ABTS<sup>+</sup> scavenging and Fe<sup>2+</sup> chelating assays. Further, the inhibitory effects of the extracted total saponins on the proliferation of HepG2 and A549 cells were analyzed using the CCK-8 assay. The optimum extraction conditions for total saponins from *X. sorbifolia* Bunge husk were as follows: 65% ethanol volume fraction, 35:1 solvent-to-solid ratio, 200 W ultrasonic power, 35 min ultrasonic treatment duration, and 50 °C ultrasonic treatment temperature; under these conditions, the total saponin yield reached 14.95 mg/g. Antioxidant assays showed that

引文格式:

王冠英,李珂珂,李中玉,等.文冠果果壳总皂苷的提取工艺优化及抗氧化、抗肿瘤活性评价[J].现代食品科技,2022,38(12):290-299

WANG Guanying, LI Keke, LI Zhongyu, et al. Optimization of the extraction process and evaluation of the antioxidant and antitumor activities of total saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge Husk [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 290-299

收稿日期: 2022-01-20

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究经费项目 (LJKZ0538); 大连市科技创新基金 (2021JJ13SN51); 大连民族大学-西藏农牧学院联合基金 (DLMZ-NMXY2021003)

作者简介: 王冠英 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能性成分, E-mail: 15235113638@163.com

通讯作者: 孙浩 (1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工技术的开发及食物资源开发与综合利用, E-mail: 13654288092.cjohns@163.com; 共同通讯

作者: 弓晓杰 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物活性化学成分及新药开发, E-mail: gxjclr@163.com

at the total saponin concentration of 0.05 mg/mL, the DPPH<sup>·</sup> and ABTS<sup>·+</sup> scavenging rates were 91.35% and 82.63%, respectively. Moreover, at the total saponin concentration of 0.10 mg/mL, the Fe<sup>2+</sup> chelating rate was 88.01%. Total saponin concentration was significantly correlated with ABTS<sup>·+</sup> scavenging and Fe<sup>2+</sup> chelating potential ( $p < 0.01$ ). At the total saponins concentration of 120  $\mu\text{g/mL}$ , the survival rates of HepG2 and A549 cells were 10.95% and 2.04%, with the IC<sub>50</sub> values of 79.30 and 63  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Thus, ultrasonic cell fragmentation is an efficient technology for extracting total saponins from *X. sorbifolia* Bunge husk. Total saponins extracted from *X. sorbifolia* Bunge husk exhibit potent antioxidant and antitumor activities. This article provides a methodological reference for the effective utilization of *X. sorbifolia* Bunge waste.

**Key words:** *Xanthoceras sorbifolia* Bunge husk; total saponins; process optimization; antioxidant; antitumor

文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) 又名文冠木、木瓜、温旦革子等, 为无患子科 (*Sapindaceae*) 文冠果属 (*Xanthoceras*) 植物, 单属单种<sup>[1]</sup>。文冠果原产于我国北方黄土高原地区, 天然分布于北纬 32°~46°, 东经 100°~127°, 是我国特有的珍稀木本油料作物<sup>[2]</sup>。可从文冠果仁中提取得到品质较高的食用油, 文冠果果油含有丰富的人体不能自身合成的亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸等成分<sup>[3]</sup>。文冠果的果壳、叶片、茎枝、种皮、种仁均可入药, 曾列入 1977 年版《中国药典》, 且作为蒙药列入 1984 年版《中国民族药志》, 主要用于治疗风湿病<sup>[4]</sup>。近年来, 研究发现文冠果中含有丰富的玉蕊醇型三萜及皂苷类化学成分, 其中, 该成分在文冠果的果壳、果柄及种子中含量较高; 另外, 活性研究表明, 此类皂苷具有显著的抗肿瘤及抗阿尔茨海默病作用<sup>[5-7]</sup>。因此, 通过开发高效的文冠果果壳总皂苷提取工艺, 可为文冠果果壳的深入开发利用提供参考依据, 并为玉蕊醇型皂苷的药物筛选提供丰富的物质基础。

超声细胞破碎法利用超声分散破坏植物组织, 能加速溶剂穿透组织的作用, 提高样品中有效成分的提取; 另外, 在提取过程中, 可以利用冷凝装置保持温度的恒定, 避免温度升高对成分的破坏, 具有高效节能、节约溶剂的优点, 已广泛应用于龙葵多糖<sup>[8]</sup>、香蕉皮单宁<sup>[9]</sup>、甜菊多酚<sup>[10]</sup>等天然产物的提取。

本实验采用响应面法对超声细胞破碎法提取文冠果果壳总皂苷的工艺进行优化, 旨在提供一种高效的文冠果果壳总皂苷的提取工艺。采用扫描电镜对不同方式提取后的样品粉末的形态进行观察, 为不同提取工艺下总皂苷含量高低做出最直观的科学解释, 并对优化后的超声细胞破碎法提取的总皂苷提取物的抗氧化、抗肿瘤作用进行研究, 为文冠果果壳中皂苷类物质的生理活性研究提供理论支持, 并为其废弃物的充分开发利用提供实际的指导意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

文冠果 (*X. sorbifolium* Bunge) 果壳 (无霉变、无

杂质), 采自辽宁朝阳; 肺癌细胞 A549 和肝癌细胞 HepG2 为实验室保藏; 齐墩果酸 (标准品), 上海阿拉丁生物化学科技有限公司; Trolox (标准品)、EDTA-2Na (标准品)、二苯基苦基苯肼自由基、2,2-联氨-二-(3-乙基-苯并噻-6-磺酸)二胺盐、6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸, 上海源叶公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 高糖 DMEM, 美国 Gibco 公司; 链霉素, 美国 Beyotime 公司; 细胞计数试剂盒-8, 美国 Dojindo 公司; 胰蛋白酶 EDTA, 美国 Gibco 公司; 无水乙醇、甲醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司。

JY99-II DN 超声波细胞粉碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Synergy HI 酶标仪, 美国 BioTex Instruments 公司; SB-1300 旋转蒸发仪, 上海爱郎仪器有限公司; H2050R 高速冷冻离心机, 广州深华生物技术有限公司; S-4800 扫描电镜, 日本 Hitachi 公司; KQ-3000TDE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 102739-103Steri-Cycle CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, Thermo Electron 公司; HYC-950L-20 °C 冰箱, 海尔集团。

### 1.2 文冠果果壳总皂苷提取方法

#### 1.2.1 超声细胞破碎法

取 1 g 文冠果果壳粉末, 按液料比为 35:1 (mL/g) 加入 70%乙醇置于超声细胞破碎仪中进行提取。超声功率 200 W、超声时间 35 min、超声温度 50 °C。分别考察乙醇体积分数、液料比、超声时间、超声功率及超声温度对总皂苷提取得率的影响。

##### 1.2.1.1 单因素试验

分别考察乙醇体积分数及溶剂 (60%、70%、80%、90%、无水乙醇、甲醇), 液料比 (20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1 mL/g), 超声时间 (15、20、25、30、35、40 min), 超声功率 (90、144、198、252、306、360 W) 及超声温度 (40、45、50、55、60、65 °C) 对总皂苷提取得率的影响。研究其中单一因素改变时, 其他各因素固定的条件为: 乙醇体积分数 70%、液料比 35:1 mL/g、超声时间 35 min、超声功率 198 W、超声温度 50 °C。

### 1.2.1.2 Box-Behnken 试验设计

在单因素试验基础上,以文冠果果壳中总皂苷得率作为响应值,选取对果壳皂苷含量影响最大的液料比 $X_1$ 、乙醇体积分数 $X_2$ 和超声功率 $X_3$ 设计响应面试验。在3个水平上(-1、0、1)系统地确定了提取变量,试验设计见表1。

表1 Box-Behnken 设计试验因素水平编码

Table 1 Code and level of independent variables used for

Box-Behnken design			
水平	液料比 $X_1$ /(mL/g)	乙醇体积分数 $X_2$ /%	超声功率 $X_3$ /W
-1	30:1	60	144
0	35:1	70	198
1	40:1	80	252

### 1.2.2 加热回流法

取1g文冠果果壳粉末,按液料比为35:1(mL/g)加入 $\varphi=65\%$ 乙醇置于回流抽提器中,水浴加热温度90℃,回流提取3次,每次35min。将提取液离心(4000 r/min, 10 min),取上层溶液减压浓缩至浸膏。将浸膏加正丁醇:水(V/V=1:1)萃取3次,合并正丁醇层萃取液,减压浓缩至膏状,即得到文冠果果壳总皂苷。

### 1.2.3 常规超声法

取1g文冠果果壳粉末,按液料比为35:1(mL/g)加入 $\varphi=65\%$ 乙醇置于超声清洗器,其余方法同1.2.1。

### 1.2.4 扫描电镜观察

取适量提取后并晒干的文冠果果壳粉末,用双面胶带将其固定于样品台,进行镀膜处理后放置在扫描电镜下观察样品形态。

## 1.3 文冠果果壳中总皂苷的含量测定

采用邱悦等<sup>[11]</sup>的香草醛-高氯酸比色法,并稍作修改。准确称取齐墩果酸标准品6mg,配置成0.12mg/mL的齐墩果酸标准品储备液。量取不同浓度标准品溶液50 $\mu$ L于试管中,水浴挥发甲醇;加入新鲜配置的5%香草醛-冰醋酸溶液0.50mL,高氯酸1mL,于60℃恒温水浴加热15min取出,流水冷却,并在最佳波长530nm处测定吸光度。以齐墩果酸含量( $X$ , mg)为横坐标,吸光度值( $A$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $y=4.94x+0.12$  ( $R^2=0.9934$ )。取“1.2”项制备的文冠果果壳皂苷溶液50 $\mu$ L按标准曲线的方法测其吸光度值,计算出待测液的总皂苷含量,再通过公式(1)计算得到样品中的总皂苷含量。

$$Y = \frac{c \times V}{m} \quad (1)$$

式中:

$Y$ ——样品中总皂苷含量, mg/g;

$c$ ——待测液中总皂苷含量, mg/mL;

$V$ ——待测液总体积, mL;

$m$ ——文冠果果壳质量, g。

## 1.4 抗氧化活性测定

将超声细胞破碎法最佳工艺下提取的总皂苷提取物减压浓缩,用无水乙醇配置成不同浓度的溶液。阳性对照 Trolox(水溶性维生素E)用无水乙醇配置,EDTA-2Na用去离子水配置。DPPH·清除能力测定参照 Tsai 等<sup>[12]</sup>的方法;ABTS<sup>+</sup>·清除能力测定参照 Luo 等<sup>[13]</sup>的方法;Fe<sup>2+</sup>螯合能力测定参照 Huang 等<sup>[14]</sup>的方法。

## 1.5 抗肿瘤活性测定

### 1.5.1 细胞形态观察

细胞活性的测定参照孟雪等<sup>[15,16]</sup>的方法。取对数生长期的A549细胞和HepG2细胞从CO<sub>2</sub>培养箱取出,进行消化,替换新的培养基并于37℃, $\varphi=5\%$ CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。按照空白对照组(牛血清)、药物组(优化后的文冠果果壳总皂苷提取物溶液20、40、60、80、100、120 $\mu$ g/mL)加样品处理,每组3个复孔,每孔为1mL。按上述处理方式孵育24h后,使用普通光学显微镜下观察并拍摄细胞形态变化。

### 1.5.2 细胞活力测定

对空白对照组和实验组加样品处理24h后,每孔加CCK-8试剂100 $\mu$ L,置于含有 $\varphi=5\%$ CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中24h。然后采用酶标仪于450nm下测定OD值。以正常对照组OD值为100%细胞活力,其余各组OD值与正常对照组OD值的比值为相对活力。以相对活力评价文冠果果壳总皂苷提取物对A549细胞和HepG2细胞增殖的抑制率。

$$C = \frac{OD_{450\text{药物}}}{OD_{450\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$C$ ——细胞生长抑制率, %;

$OD_{450\text{药物}}$ ——药物组450nm下的OD值;

$OD_{450\text{对照}}$ ——细胞对照组450nm下的OD值

## 1.6 数据处理与分析

采用SPSS 23软件对实验数据进行Duncan's差异分析,以 $p < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 总皂苷提取的单因素试验结果

#### 2.1.1 乙醇体积分数对文冠果果壳总皂苷含量的影响

如图 1 所示, 乙醇体积分数在 60%~100%时, 总皂苷的含量先升高后降低, 在乙醇体积分数为 70%时达到最大值, 此时总皂苷得率为 14.50 mg/g。乙醇与水的混合液可以破坏皂苷类物质与蛋白质、糖类、果胶等物质的结合键, 有利于皂苷的提取<sup>[17]</sup>。用甲醇作提取溶剂时, 总皂苷得率为 13.20 mg/g, 这说明大极性的甲醇也能够提取获得较大的皂苷, 但是得率还是低于 $\varphi=70\%$ 乙醇。这可能是由于用甲醇提取时, 没有水的参与, 只有甲醇与果壳细胞间的相互作用<sup>[18]</sup>。这与 Escribano-Bailon<sup>[19]</sup>报道的结果类似。皂苷做为水溶性成分, 在含水有机溶剂中有利于其从细胞中溶出, 提高得率。因此, 最佳提取溶剂为 70%乙醇。

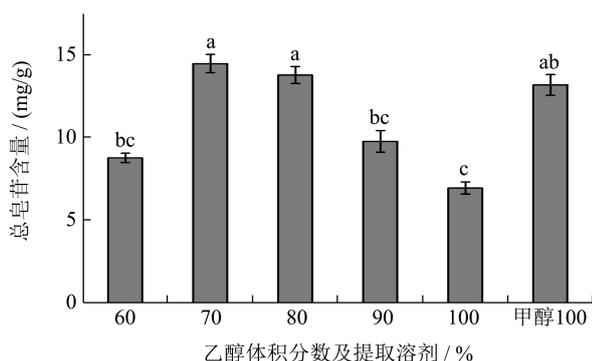


图 1 乙醇体积分数及提取溶剂对文冠果果壳总皂苷含量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration and extraction solvent on the total saponin yield from husk of *X. sorbifolia*

#### 2.1.2 液料比对文冠果果壳总皂苷含量的影响

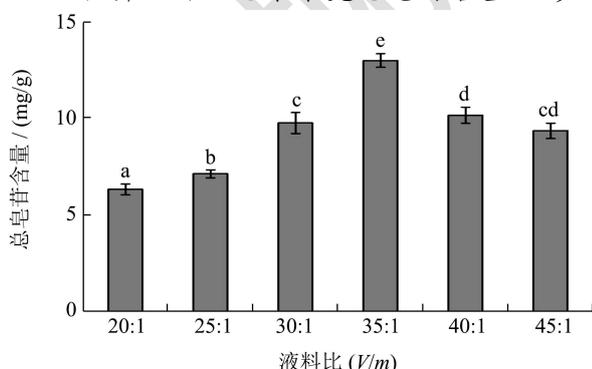


图 2 液料比对文冠果果壳总皂苷含量的影响

Fig.2 Effect of liquid material ratio on the total saponin yield from husk of *X. sorbifolia*

如图 2 所示, 文冠果果壳总皂苷的得率先升高后降低。在液料比为 20:1~35:1 时, 随着液料比不断增加,

总皂苷的含量不断升高。这可能是由于溶剂的不断增多, 使其在超声波作用下的分散系数和溶解细胞壁能力增强。当液料比达到 35:1 时, 溶液的溶解度达到最大, 总皂苷得率为 13 mg/g。当液料比超过 35:1 时, 总皂苷得率不断下降。这可能是由于随着溶剂的增多, 非皂苷类成分的溶出会影响皂苷的提取率。因此, 最佳液料比为 35:1。

#### 2.1.3 超声时间对文冠果果壳总皂苷含量的影响

如图 3 所示, 随着超声时间的延长, 总皂苷的含量不断升高。这可能是由于在一定的时间内, 果壳与溶剂能够充分接触, 从而使皂苷在超声波的作用下最大程度地溶出至溶剂中。在超声时间达到 35 min 时, 总皂苷的含量最高, 为 11.40 mg/g。但是, 超声时间超过 35 min, 总皂苷的含量会下降。这可能是由于长时间的超声波作用, 使溶出的部分皂苷发生降解。因此, 最佳超声时间为 35 min。

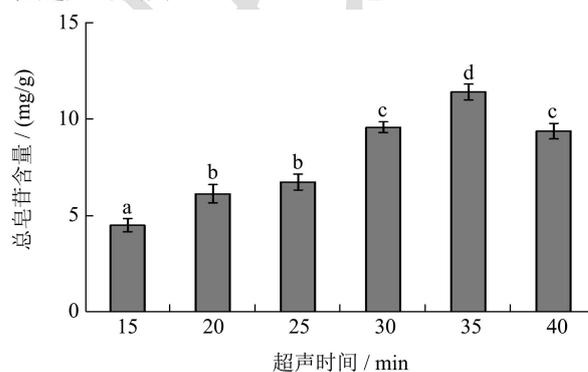


图 3 超声时间对文冠果果壳总皂苷含量的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic time on the total saponin yield from husk of *X. sorbifolia*

#### 2.1.4 超声功率对文冠果果壳总皂苷含量的影响

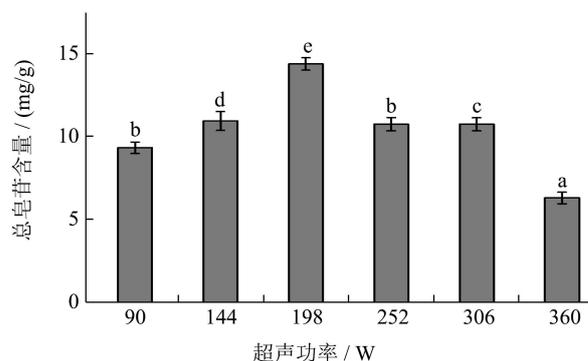


图 4 超声功率对文冠果果壳总皂苷含量的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic power on the total saponin yield from husk of *X. sorbifolia*

如图 4 所示, 文冠果果壳总皂苷的含量先升高后降低。提取功率为 90~198 W 时, 总皂苷含量随超声功率的增大而增加, 这可能是由于超声波传质能力的加强, 不断增强对果壳细胞的粉碎程度, 促进皂苷从细

胞内溶出。当超声功率超过 198 W 时,总皂苷含量又呈下降趋势,从 14.45 mg/g 下降至 6.36 mg/g。这可能是因为功率增大,导致部分皂苷降解。因此,最佳超声功率为 198 W。

### 2.1.5 超声温度对文冠果果壳总皂苷含量的影响

如图 5 所示,在恒定的超声功率下,超声温度在 40~50 °C 时,随着温度的升高总皂苷的得率不断增大,这与文献报道的结果一致,升高温度会提高溶质的溶解度和扩散系数,促使小极性含量低的皂苷也能溶解于提取溶剂中<sup>[20]</sup>。在超声温度为 50 °C 时,总皂苷得率达到最大值 12.02 mg/g。当进一步升高超声温度时,总皂苷含量呈下降趋势。这可能是因为温度过高,改变了传质效率,导致皂苷结构破坏。因此,最佳超声温度为 50 °C。

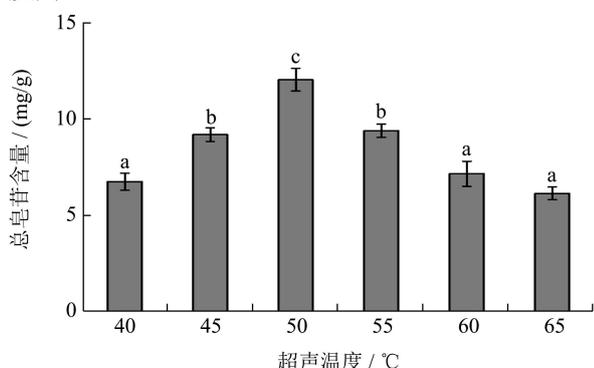


图 5 超声温度对文冠果果壳总皂苷得率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic temperature on the total saponin yield from husk of *X. sorbifolia*

## 2.2 响应面优化法试验结果

以总皂苷得率为响应值,在单因素试验的基础上,选取液料比( $X_1$ )、乙醇体积分数( $X_2$ )及超声功率( $X_3$ )进行响应面设计,实验设计及结果如表 2 所示。

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,结合单因素试验结果,采用响应面法对文冠果果壳总皂苷的提取工艺进行优化,以液料比  $X_1$ 、乙醇体积分数  $X_2$  和超声功率  $X_3$  为自变量,总皂苷含量 ( $Y$ ) 为响应值,得到文冠果果壳总皂苷得率的三因素三水平的结果如表 2 所示。二次多项回归方程为:  
 $Y=1.48-0.11X_1-0.20X_2+0.03X_3-0.03X_1X_2+0.08X_1X_3-0.09X_2X_3-0.31X_1^2-0.27X_2^2-0.14X_3^2$ 。

试验所选用模型  $F$  值 (40.24) 较高,  $p$  值较低 ( $< 0.000 1$ ), 失拟项  $F$  值 ( $p=0.662 > 0.05$ ) 不显著, 决定系数  $R^2$  值为 0.981 0, 校正系数  $R_{adj}^2$  为 0.956 7。说明响应值的变化有 98.10% 来源于所选变量, 该方程的拟合情况较好, 可以用来分析和预测文冠果果壳总皂苷得率的工艺参数<sup>[21]</sup>。通过  $F$  值分析, 各因素对总皂

苷含量的影响依次为乙醇体积分数及提取溶剂 ( $X_2$ )  $>$  液料比 ( $X_1$ )  $>$  超声功率 ( $X_3$ )。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design with experimental results

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总皂苷含量 / (mg/g)
1	-1	-1	0	11.23
2	1	-1	0	10.14
3	0	1	-1	8.58
4	1	1	0	6.15
5	-1	0	-1	12.42
6	1	0	-1	8.36
7	-1	0	1	10.82
8	1	0	1	9.85
9	0	-1	-1	11.43
10	-1	1	0	8.64
11	0	0	0	14.50
12	0	1	1	8.21
13	0	0	0	14.48
14	0	-1	1	14.54
15	0	0	0	15.33
16	0	0	0	14.96
17	0	0	0	15.13

表 3 回归方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F	$p$
Model	136.19	9	15.13	40.24	<0.000 1**
$X_1$	9.35	1	9.35	24.87	0.001 6**
$X_2$	30.69	1	30.69	81.63	<0.000 1**
$X_3$	0.86	1	0.86	2.28	0.174 6
$X_1X_2$	0.46	1	0.46	1.21	0.307 4
$X_1X_3$	2.40	1	2.40	6.39	0.039 4*
$X_2X_3$	3.03	1	3.03	8.05	0.025 1*
$X_1^2$	40.37	1	40.37	107.36	<0.000 1**
$X_2^2$	31.87	1	31.87	84.76	<0.000 1**
$X_3^2$	8.72	1	8.72	23.18	0.001 9**
失拟项	2.63	7	0.38		
残差	2.12	3	0.71	5.52	0.066 2
纯误差	0.51	4	0.13		
总误差	138.82	16	9.35		

注: \*\*极显著 ( $p < 0.01$ ); \*显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 6a 可知, 随液料比和乙醇体积分数的增加, 总皂苷含量显示出先增大后减小的趋势。在液料比为 35:1 (mL/g) 左右、乙醇体积分数为 70% 左右时, 总皂苷含量达到最大值。液料比和乙醇体积分数交互作用中坡度较为平坦, 等高线图近似圆形, 影响不显著。

而乙醇体积分数对应的曲线更陡峭,说明乙醇体积分数较液料比对文冠果果壳总皂苷含量影响更显著,这与方差分析结果相符合。由图 6b 可知,随着液料比和超声功率的增加,总皂苷含量表现出先增大后减小的趋势。在液料比为 35:1 (mL/g) 左右,超声功率为 198 W 左右时,总皂苷含量达到最大值。液料比的曲面变化与超声功率曲面相比,较为陡峭,说明液料比较超声功率对文冠果果壳总皂苷含量影响更显著。从等高线图来看,其等高线图近似椭圆,说明液料比和超声功率对文冠果果壳总皂苷含量影响的交互作用较弱。由图 6c 可知,总皂苷含量随乙醇体积分数和超声功率的增大先快速升高到最大值后缓慢下降,在乙醇体积分数为 70% 左右,超声功率为 198 W 左右时,总皂苷含量达到最大限度。乙醇体积分数对应的曲线变化更陡峭,说明乙醇体积分数较超声功率对文冠果果壳总皂苷含量影响更显著。此外,从曲面图和等高线图来看,其等高线图呈明显的椭圆形,说明乙醇体积分数和超声功率之间交互作用较为显著<sup>[22]</sup>。

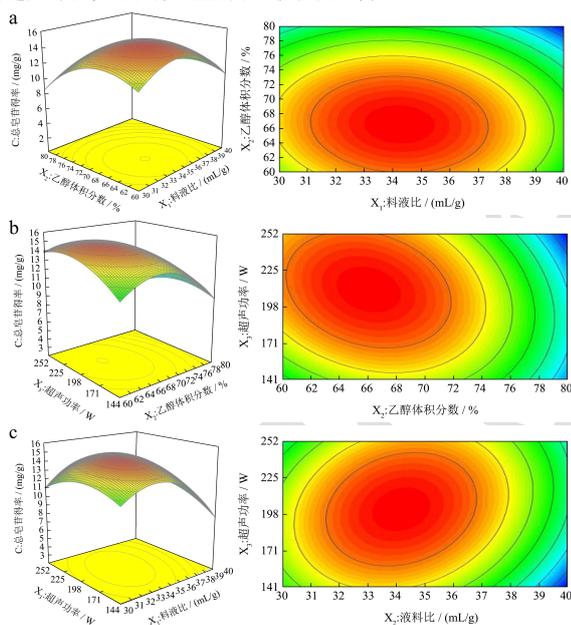


图 6 两因素交互作用对总皂苷提取量的响应面图和等高线图  
Fig.6 Response surface and contour plots showing the interactive effects of ethanol concentration, solvent-to-solid ratio, and ultrasonic power on the extraction yield of total saponin from husk of *X. sorbifolia*

### 2.3 验证性实验结果

为检验模型预测的准确性,考虑到实际性操作,将最优工艺条件调整为乙醇体积分数 65%、液料比 35:1 (V/m)、超声功率 200 W、超声时间 35 min,进行验证性实验,得到实际总皂苷的含量为 14.95 mg/g,而模型预测的总皂苷含量为 15.26 mg/g,证明该方程的准确

性和实用性较好<sup>[23]</sup>,具有一定的指导意义。

### 2.4 不同提取方法的总皂苷得率比较

本实验选取实验室常用的加热回流法及常规超声法,与优化后得到的超声细胞破碎法在同一工艺条件下进行比较。结果表明,加热回流法得到的总皂苷仅为 5.95 mg/g,常规超声法得到的总皂苷为 10.72 mg/g,超声细胞破碎法得到的总皂苷含量显著高于其他两种常规方法,分别是其 2.51 倍和 1.39 倍。图 7 是电镜下不同提取方法所得文冠果果壳提取粉末的微观结构图。

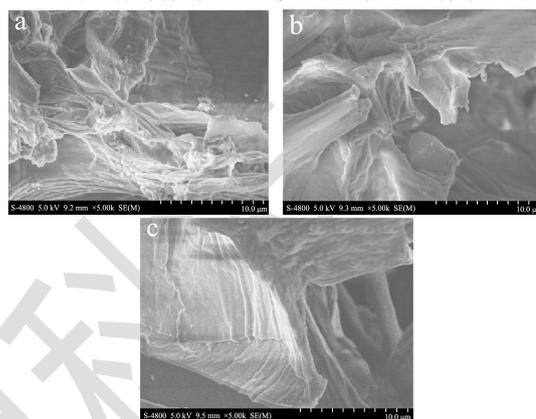


图 7 不同提取方法所得文冠果果壳提取粉末的扫描电镜图  
Fig.7 SEM of the extracted powder of husk of *X. sorbifolia* by different extraction methods

注: a: 超声波细胞破碎仪; b: 超声波清洗器; c: 加热回流。

如图 7a, 超声细胞破碎法提取后的文冠果果壳粉末,细胞壁完全破裂,断层及褶皱明显;如图 7b, 常规超声法提取后的文冠果果壳粉末,其细胞壁虽有破裂,但链接密集度高;如图 7c, 加热回流法提取后的文冠果果壳粉末,细胞壁基本无破碎现象,细胞链接紧密。由此可见,超声细胞破碎法的提取可以达到对样品中所含物质较为完全的获取,是一种比较高效的活性物质提取方法<sup>[24]</sup>。

### 2.5 总皂苷提取物抗氧化活性测定结果

#### 2.5.1 DPPH·清除能力测定结果

按照 1.4 的方法进行试验,总皂苷提取物对 DPPH·清除能力的影响如图 8 所示。DPPH·是具有特征吸收的质子自由基的化合物之一,在接触自由基清除剂后,其吸收明显减少。在与 DPPH·相互作用时,抗氧化剂会将一个电子或一个氢原子转移到 DPPH·,从而中和它的自由基特性<sup>[25]</sup>。由图 8 可知,总皂苷提取物浓度为 0.01~0.05 mg/mL 范围内时, DPPH·清除能力和总皂苷提取物质量浓度呈显著差异 ( $p < 0.05$ )。对比阳性对照 Trolox (96.22%),浓度为 0.05 mg/mL 时,总皂苷提取物的 DPPH·清除能力最强,清除率达到

91.35%，其 DPPH·清除率 IC<sub>50</sub> 值 0.02 mg/mL。总皂苷提取物质量浓度为 0.04 mg/mL 和 0.05 mg/mL 时，两者之间并无显著性。齐国雨等<sup>[26]</sup>发现文冠果果壳提取物质量浓度为 0.75 mg/mL 时，对 DPPH·清除率达 97.25%，这可能是超声细胞破碎法对文冠果果壳粉碎程度高，导致皂苷、多酚及色素等物质的溶出量较大。

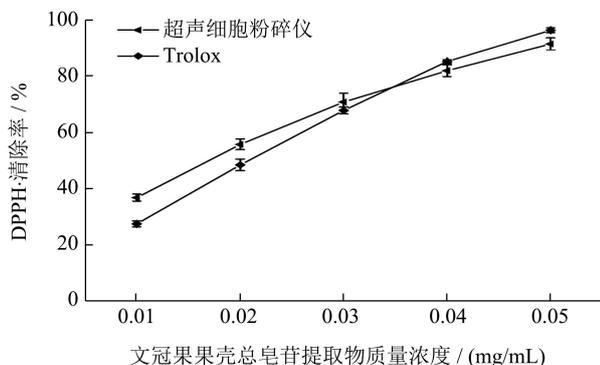


图 8 文冠果果壳总皂苷提取物 DPPH·清除能力的测定结果

Fig.8 Determination results of DPPH radical scavenging activity in husk of *X. sorbifolia* total saponins extraction

### 2.5.2 ABTS<sup>+</sup>·清除能力测定结果

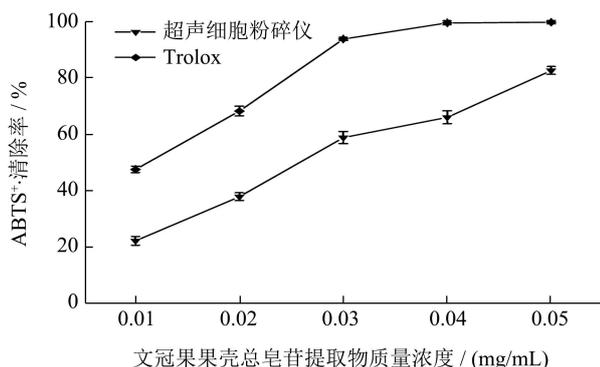


图 9 文冠果果壳总皂苷提取物 ABTS<sup>+</sup>·清除能力的测定结果

Fig.9 Determination results of ABTS<sup>+</sup>· scavenging activity in husk of *X. sorbifolia* total saponins extraction

按照 1.4 的方法进行试验，总皂苷提取物对 ABTS<sup>+</sup>·清除能力的影响如图 9 所示。ABTS<sup>+</sup>·清除能力分析也是一种评价天然产物抗氧化能力最常用的方法之一。由图 9 可知，总皂苷提取物质量浓度为 0.01~0.05 mg/mL 范围内时，ABTS<sup>+</sup>·清除能力与总皂苷提取物质量浓度为极显著差异 ( $p < 0.01$ )。ABTS<sup>+</sup>·清除能力随溶液浓度增加而增强，但都显著低于阳性对照 Trolox (99.62%) 的清除率。总皂苷提取物浓度为 0.05 mg/mL，对 ABTS<sup>+</sup>·最大清除能力为 82.63%，其 IC<sub>50</sub> 值为 0.01 mg/mL，说明超声细胞破碎法得到的提取物中皂苷等有效组分的含量高。托盘根总皂苷提取物浓度为 1 mg/mL 时，对 ABTS<sup>+</sup>·清除能率为 84.38%，其 IC<sub>50</sub> 值为 0.28 mg/mL<sup>[27]</sup>。由此可见，总皂苷提取物质量浓度对 ABTS<sup>+</sup>·的形成具有明显的抑制作用。

### 2.5.3 Fe<sup>2+</sup>螯合能力测定结果

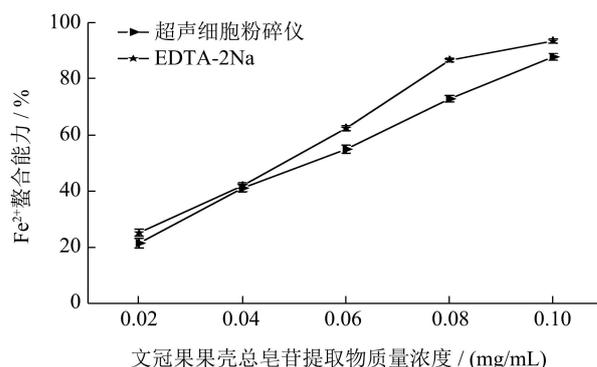


图 10 文冠果果壳总皂苷提取物 Fe<sup>2+</sup>螯合能力的测定结果

Fig.10 Determination results of Fe<sup>2+</sup> reduction capacity in husk of *X. sorbifolia* total saponins extraction

按照 1.4 的方法进行试验，总皂苷提取物对 Fe<sup>2+</sup>螯合能力的影响如图 10 所示。金属离子螯合剂可能通过稳定 Fe<sup>2+</sup>来抑制脂质氧化<sup>[28]</sup>。由图 10 可知，总皂苷提取物质量浓度为 0.02~0.1 mg/mL 范围内时，Fe<sup>2+</sup>螯合能力与总皂苷提取物质量浓度为极显著差异 ( $p < 0.01$ )。浓度为 0.1 mg/mL，总皂苷的 Fe<sup>2+</sup>螯合能力达到最大值 88.01%，其 IC<sub>50</sub> 值为 0.02 mg/mL，但明显弱于 EDTA-2Na (93.62%) 的 Fe<sup>2+</sup>螯合能力。韦兴英等<sup>[29]</sup>发现金属离子的螯合能力与藜麦总皂苷提取物浓度呈正相关。这些结果表明超声细胞破碎法得到的提取物中皂苷分子中含有羟基、羧基，能够起到较强的抗氧化效果<sup>[7]</sup>。

### 2.6 总皂苷提取物抗肿瘤活性测定结果

#### 2.6.1 肝癌 HepG2 细胞活力测定结果

肝癌 HepG2 细胞活力测定主要对总皂苷提取物作用于 HepG2 细胞的细胞形态及细胞存活率进行了分析，如图 11 所示。如图 11a 所示，从细胞存活率来看，CCK-8 试验结果显示随总皂苷提取物质量浓度的升高，HepG2 细胞存活率逐渐降低，说明总皂苷提取物质量浓度与细胞凋亡呈剂量依赖性。总皂苷提取物质量浓度为 100 μg/mL 和 120 μg/mL 对 HepG2 细胞的存活率为 15.63% 和 10.95%，其作用于 24 h 的 IC<sub>50</sub> 值为 79.30 μg/mL，两者无显著差异。张志宇等<sup>[30]</sup>发现文冠果种仁对 HepG2 细胞处理 24 h 后的 IC<sub>50</sub> 为 9.70 mg/mL，张富禄<sup>[31]</sup>发现文冠果果壳总皂苷提取物质量浓度为 50 μg/mL 对 HepG2 细胞的抑制率达到 89.50%。从图 11b 结果来看，与对照组相比，HepG2 细胞经不同总皂苷提取物浓度处理后，其增殖受到明显的抑制作用。对照组中 HepG2 细胞的细胞状态良好，呈规则的圆形，细胞表面整体较为平滑<sup>[32,33]</sup>。随着总皂苷提取物质量浓度的增加 (从 20~120 μg/mL)，HepG2

细胞胞体出现坍塌，体积明显收缩，细胞的数量明显变少。这些结果表明果壳总皂苷提取物能明显抑制 HepG2

细胞的生长。

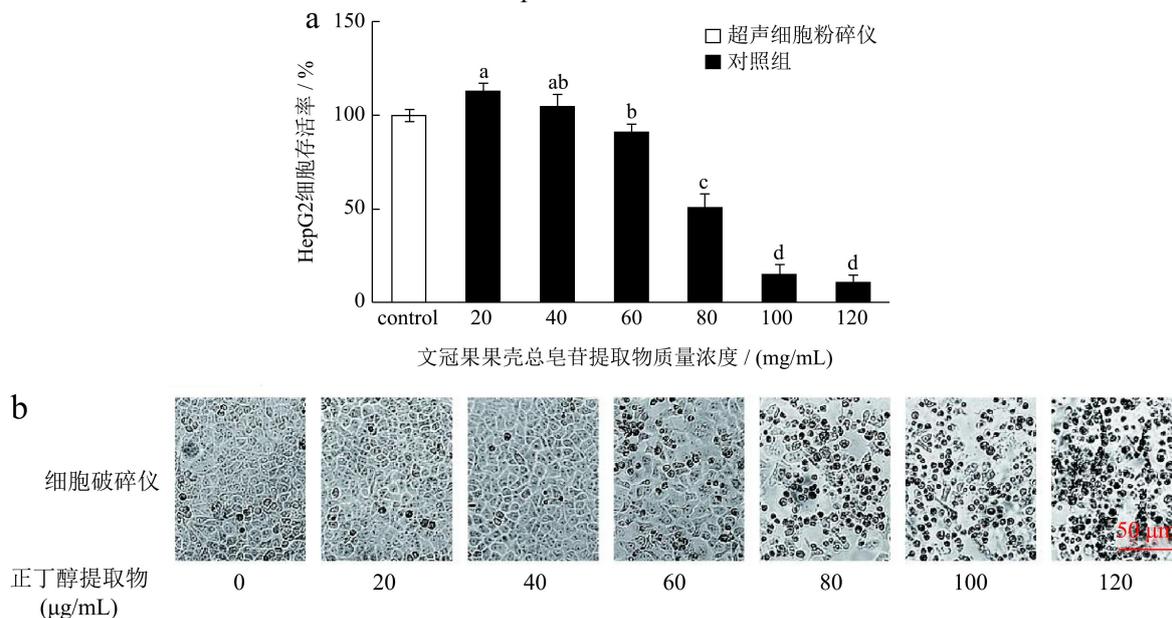


图 11 文冠果果壳总皂苷提取物作用于 HepG2 细胞的试验结果

Fig.11 Test results of husk of *X. sorbifolia* total saponins extraction acting on HepG2 cells

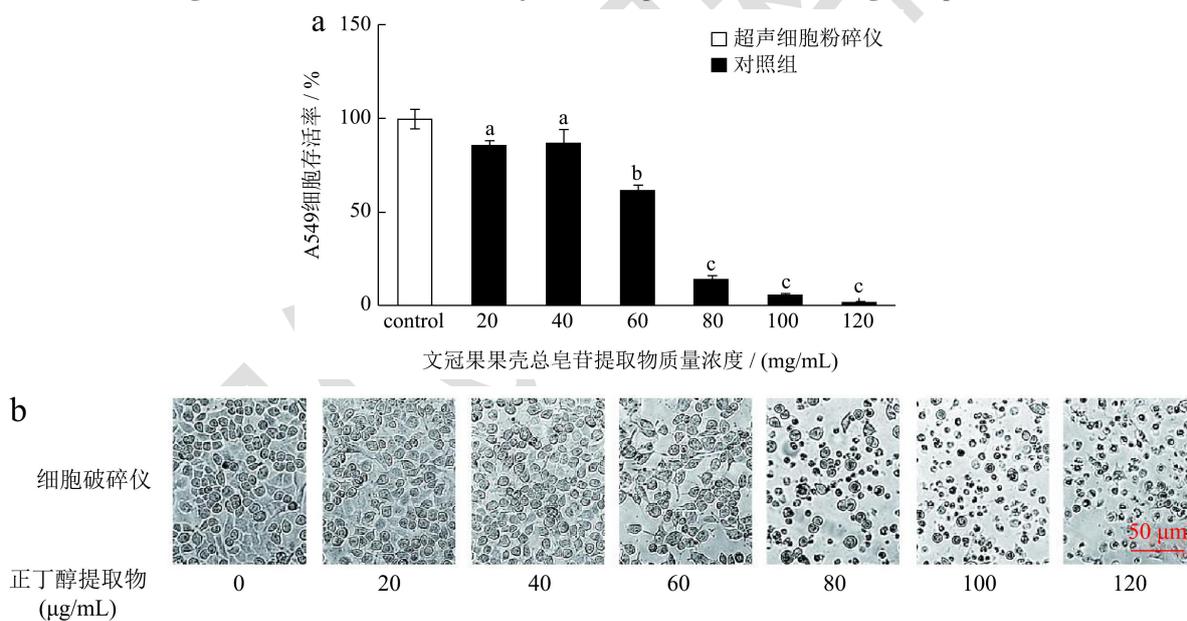


图 12 文冠果果壳总皂苷提取物作用于 A549 细胞的试验结果

Fig.12 Test results of husk of *X. sorbifolia* total saponins extraction acting on A549 cells

### 2.6.2 肺癌 A549 细胞活力测定结果

肺癌 A549 细胞活力测定主要对总皂苷提取物作用于 A549 细胞的细胞形态及细胞存活率进行了分析，如图 12 所示。如图 12a 所示，从细胞存活率来看，CCK-8 试验结果显示随总皂苷提取物质量浓度升高，细胞存活率整体呈降低趋势，细胞存活率与总皂苷提取物质量浓度呈剂量依赖性。浓度为 40 μg/mL~80 μg/mL 时，总皂苷提取物质量浓度对 A549 细胞抑制率尤为明显，存活率显著下降。质量浓度为 120 μg/mL，细胞存活率

达到最低 2.04%，其作用于 24 h A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 63 μg/mL。人参皂苷 Rh2 也可明显抑制 A549 细胞增殖，其作用于 24 h A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 46.56 μg/mL<sup>[34]</sup>。从图 12b 显微镜观察结果来看，与对照组相比，A549 细胞经不同总皂苷提取物质量浓度处理后，其增殖受到明显的抑制作用。对照组的 A549 细胞的细胞形态为典型的上皮细胞样，细胞状态良好，呈立体的梭形，并且形成融合细胞集落<sup>[35]</sup>。随着总皂苷提取物质量浓度的增加（从 20 μg/mL 至 120 μg/mL），A549 细胞从

细长梭形逐渐皱缩变圆,细胞的数量明显变少。当总皂苷提取物质量浓度达到最大的时候,细胞形态收缩变形,并伴有细胞数目的递减。这些结果表明,果壳总皂苷提取物能明显抑制 A549 细胞的增殖<sup>[36]</sup>。

### 3 结论

本研究采用超声细胞破碎法对文冠果果壳总皂苷进行提取,并在此基础上评价其抗氧化及抗肿瘤效果。结果表明:通过单因素试验及响应面法优化文冠果果壳总皂苷的提取工艺,同时辅以扫描电镜,得到最佳提取工艺:乙醇体积分数 65%、液料比 35:1 (mL/g)、超声功率 200 W、超声时间 35 min、超声温度为 50 °C,在此条件下,含量大小依次为超声细胞破碎法 (14.95 mg/g) > 常规超声法 (10.72 mg/g) > 加热回流法 (5.95 mg/g); 文冠果果壳总皂苷提取物具有良好的 DPPH·、ABTS<sup>+</sup>清除能力及 Fe<sup>2+</sup>螯合能力,总皂苷提取物质量浓度与 ABTS<sup>+</sup>清除能力及 Fe<sup>2+</sup>螯合能力均呈极显著差异 ( $p < 0.01$ ),与 DPPH·清除能力呈显著相关性 ( $p < 0.05$ )。(3) 文冠果果壳总皂苷提取物对肝癌 HepG2 细胞和肺癌 A549 细胞具有一定的抑制效果,总皂苷提取物质量浓度与细胞生长率呈极显著差异 ( $p < 0.01$ )。实验结果表明,超声细胞破碎法是一种高效的从文冠果果壳中获得总皂苷的方法,成功开发了一种从废弃资源中获得具有丰富生物活性成分的提取方法;抗氧化、抗肿瘤实验结果表明文冠果果壳总皂苷提取物具有良好的抗氧化、抗肿瘤活性,具有开发成抗氧化剂和抗肿瘤药物制剂的潜力。本文旨在促进文冠果资源的充分利用及为其深入开发利用提供科学理论依据。

### 参考文献

- [1] 张洪梅,周泉城.文冠果果壳开发利用研究进展[J].中国粮油学报,2012,27(11):118-121
- [2] 杨春艳,杨军丽,哈伟,等.文冠果果壳化学成分与生物活性研究进展[J].中草药,2016,47(8):1418-1424
- [3] 许佳敏,曹月琴,佟祎鑫,等.文冠果油的化学成分及其功能活性研究进展[J].中国油脂,2021,269(12):1-12
- [4] 商庆辉,孙妍.文冠果的化学成分和药理作用研究进展[J].中国药房,2015,26(30):4316-4320
- [5] 陆秋莉,丁浩然,李颖怡,等.玉蕊醇型三萜的结构特征、波谱规律及药理活性研究进展[J].中草药,2016,47(11):2000-2010
- [6] Xiao W, Wang Y, Zhang P, et al. Bioactive barrigenol type triterpenoids from the leaves of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 60(5): 263-270
- [7] Yu L L, Tang X L, Chen L X, et al. Oleanane-type triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. Fitoterapia, 2012, 83(8): 1636-1642
- [8] Zhu L, Lu Y, Sun Z, et al. The application of an aqueous two-phase system combined with ultrasonic cell disruption extraction and HPLC in the simultaneous separation and analysis of solanine and *Solanum nigrum* polysaccharide from *Solanum nigrum* unripe fruit [J]. Food Chemistry, 2020, 304: 125383
- [9] 刘涛,刘宁,王雅,等.超声波细胞破碎法提取香蕉皮中水解单宁的工艺研究[J].中国调味品,2019,44(2):39-44
- [10] Barba F J, Grimi N, Vorobiev E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 149: 222-228
- [11] 邱悦.文冠果叶总皂苷的提取纯化及其生理活性研究[D].长春:吉林农业大学,2020
- [12] Tsai Y D, Hsu H F, Chen Z H, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of extracts from different parts of farmed and wild *Glossogyne tenuifolia* [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 57: 98-105
- [13] Luo Y, Peng B, Liu Y, et al. Ultrasound extraction of polysaccharides from guava leaves and their antioxidant and antiglycation activity [J]. Process Biochemistry, 2018, 73: 228-234
- [14] Huang C Y, Wu S J, Yang W N, et al. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 1121-1129
- [15] 孟雪.人参皂苷 CK 抗肿瘤作用机制研究及其脂质体的制备 [D].长春:长春中医药大学,2020
- [16] 张玲艳,高翔,王晓玲.菝葜的体外抗肿瘤活性研究[J].中国民族民间医药,2015,24(8):33-34
- [17] Wan Xiao, Ying Wang, Peng Zhang, et al. Bioactive barrigenol type triterpenoids from the leaves of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 60: 263-270
- [18] Arya Prajya, Kumar Pradyuman. Comparison of ultrasound and microwave assisted extraction of diosgenin from *Trigonella foenum-graceum* seed [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 74: 105572
- [19] Maite T. Escribano-bailon, celestino santos-buelga. anthocyanin copigmentation - evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines [J]. Current Organic Chemistry, 2012, 16(6): 1-9

- [20] Y B Zhang, L H Wang, D Y Zhang, et al. Ultrasound-assisted extraction and purification of schisandrin B from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill seeds: Optimization by response surface methodology [J]. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 2014, 21(2): 1-6
- [21] Jun Cao, Meng Yang, Fuliang Cao, et al. Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyprenyl acetates from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 152: 1-7
- [22] 李斌,雷月,孟宪军,等.响应面法优化超声波辅助提取蓝靛果多酚工艺及其抗氧化活性[J].*食品科学*,2015,36(22):33-39
- [23] Qi Cui, Juzhao Liu, Litao Wang, et al. Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 184: 4-10
- [24] Hailong Jiang, Junli Yang, Yanping Shi. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology [J]. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 2017, 34: 3-7
- [25] Song H, Zhang Q, Zhang Z, et al. *In vitro* antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumosa* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(4): 1057-1061
- [26] 齐国雨,杨爱梅,郑泽生,等.文冠果果壳提取物抗氧化活性和抑菌活性研究[J].*中医学报*,2019,47(1):58-60
- [27] 杨秀东,白子凡,徐永涛,等.响应面法优化托盘根总皂苷提取工艺及抗氧化活性研究[J].*食品工业科技*,2021,42(18): 183-189
- [28] Changxing Jiang, Qingping Xiong, Dan Gan, et al. Antioxidant activity and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cyclina sinensis* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 91(1): 262-268
- [29] 韦兴英,郭晓农,韦良贞,等.藜麦总皂苷的提取及其抗氧化活性研究[J].*中兽医医药杂志*,2020,39(3):16-20
- [30] 张志宇,王珂,李涵,等.文冠果种仁总皂苷的抗氧化及抗肝癌活性初探[J].*天然产物研究与开发*,2016,28(7):1012-1019
- [31] 张富禄.文冠果果壳总皂苷提取纯化及分离[D].兰州:兰州理工大学,2020
- [32] Guo Zhiwei, Xia Yajuan, Hao Guang, et al. *In vitro* analysis on inhibitory effect of sodium arsenite combined with astragaloside IV on HepG2 liver cancer cells [J]. *Alexandria Engineering Journal*, 2021, 60(6): 5749-5764
- [33] 巫青,胡杨志,王凌,等.肝癌细胞 HepG2 诱导淋巴细胞形态变化的原子力显微镜观察[J].*中华肿瘤防治杂志*,2021,28(12):898-902,933
- [34] 王雨辰,卢泽原,徐华丽,等.拟人参皂苷 Rh2 诱导人肺癌 A549 细胞凋亡作用及机制研究[J].*神经药理学报*,2018,8(6):53-54
- [35] Ye Guangying, Li Jie, Zhang Jinhui, et al. Structural characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Dendrobium wardianum* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 269: 118253
- [36] 赵胜娟,费鹏,刘丽莉,等.石榴鞣花酸提取物对人肺癌细胞 A549 凋亡的诱导[J].*河南科技大学学报(自然科学版)*,2020, 41(6):87-92