

热转化西洋参茎叶皂苷的抗氧化及美白活性

张彪¹, 滕聪², 杨修仕², 张瑞³, 王英平³, 任贵兴^{1,2*}

(1. 成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川成都 610106)

(2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081) (3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118)

摘要: 该文研究了热转化前后西洋参茎叶皂苷中低极性人参皂苷含量的变化, 并对转化前后的西洋参茎叶皂苷的抗氧化活性和美白活性进行了研究。结果表明, 热转化过程使得西洋参茎叶皂苷中低极性人参皂苷含量由 0.07 mg/mg 增加到 0.66 mg/mg。并且, 在 0.1~5 mg/mL 浓度范围内, 转化前后西洋参茎叶皂苷对 DPPH 自由基的最大清除率分别为 16.65% 和 38.28%, 对 ABTS 自由基的最大清除率分别为 8.20% 和 41.94%, 还原能力分别为 3.24 mg TEAC/g DW 和 25.22 mg TEAC/g DW。此外, 在 0.025~0.1 mg/mL 浓度范围内, 热转化前后西洋参茎叶皂苷对 B16 细胞内酪氨酸酶活性最大抑制率分别为 30.22% 和 33.54%, 对 B16 细胞内黑色素生成的最大抑制率分别为 17.27% 和 29.33%。综上, 热转化过程提高了西洋参茎叶皂苷中的低极性人参皂苷含量, 增强了西洋参茎叶皂苷的抗氧化活性和美白活性, 在美容与医药领域具有很大的应用价值。

关键词: 热转化; 西洋参茎叶皂苷; 抗氧化; 美白

文章编号: 1673-9078(2022)09-254-263

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1285

Antioxidant and Whitening Activities of Heat-transformed American Ginseng Stem-leaf Saponins

ZHANG Biao¹, TENG Cong², YANG Xiushi², ZHANG Rui³, WANG Yingping³, REN Guixing^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Minor Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China) (2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China) (3. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The levels of less-polar ginsenosides in American ginseng stem-leaf saponins and the antioxidant and whitening activities of American ginseng stem-leaf saponins before and after heat transformation were studied. The results showed that the content of less-polar ginsenosides in American ginseng stem-leaf saponins increased from 0.07 mg/mg to 0.66 mg/mg during heat transformation. Moreover, when the concentration of American ginseng stem-leaf saponins before and after transformation was in the range of 0.1~5 mg/mL, the maximum of DPPH free radical scavenging rates were 16.65% and 38.28%, respectively, ABTS free radical scavenging rates were 8.20% and 41.94%, respectively, and the reducing capacity was 3.24 mg TEAC/g DW and 25.22 mg TEAC/g DW, respectively. In addition, the concentration of American ginseng stem-leaf saponins before and after thermal transformation was in the range of 0.025~0.1 mg/mL, the maximum inhibition rates of tyrosinase activity in B16 cells were 30.22% and 33.54%, respectively, and the maximum inhibition rates of melanin production in B16 cells were 17.27% and 29.33%, respectively. In conclusion, the content of less-polar ginsenosides in American ginseng stem-leaf saponins was increased, and the antioxidant and whitening activities of American ginseng stem-leaf saponins were enhanced after heat transformation treatment, which has great application value in the fields of beauty and medicine.

Key words: heat-transformed; American ginseng stem-leaf saponins; antioxidant; whitening

引文格式:

张彪,滕聪,杨修仕,等.热转化西洋参茎叶皂苷的抗氧化及美白活性[J].现代食品科技,2022,38(9):254-263

ZHANG Biao, TENG Cong, YANG Xiushi, et al. Antioxidant and whitening activities of heat-transformed american ginseng stem-leaf saponins [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 254-263

收稿日期: 2021-11-16

基金项目: 吉林省重大科技专项课题 (20200504001YY)

作者简介: 张彪 (1995-), 男, 硕士研究生在读, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2460852428@qq.com

通讯作者: 任贵兴 (1963-), 男, 研究员, 研究方向: 作物种质资源品质评价, E-mail: renguixing@caas.cn

随着生活水平的提高,越来越多的人开始注重抗衰老和皮肤美白方面的保养^[1,2]。氧化过程是人体必不可少的生理过程,氧化自由基的过度产生会导致皮肤疾病,加速衰老^[3,4]。另外,酪氨酸酶是黑色素合成中的关键酶,酪氨酸酶的过量表达会致使黑色素生成过量进而引起各种色素性疾病,导致皮肤老化^[5]。然而,化学合成抗氧化剂如丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)具有一定毒性和致畸作用^[6]。美白活性成分如曲酸、熊果苷、维生素C及其衍生物等又具有安全隐患、稳定性不佳或功效显现缓慢等缺点^[7]。因此,寻求天然、安全有效的抗氧化和美白活性成分成为近年来国内外的研究热点之一。

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)是五加科人参属的一种多年生草本植物,原产于北美洲东部。人参皂苷是西洋参的主要活性成分之一,具有抗氧化、抗炎、抗糖尿病、抗疲劳、抗黑色素生成等生物活性^[8,9]。根据其苷元结构的不同,可分为达玛烷型皂苷、奥克梯隆型皂苷和齐墩果酸型皂苷3种类型^[10]。目前应用较为广泛的提取方法有索氏提取、热回流提取、超声辅助提取等^[11]。西洋参的根、茎叶等部位均含有人参皂苷,且其皂苷组分较为类似,主要为Rb1、Re、Rd、Rc、Rg1、Rb3,但茎叶中人参皂苷含量明显高于主根^[12-15]。西洋参根一般要生长3~4年才能采收^[16],而西洋参茎叶可于每年9~10月份进行采收^[17],且其人参皂苷含量受生长年限的影响不大^[18],因而以茎叶为原料生产的人参皂苷具有成本更低的特点。

人参皂苷分为极性人参皂苷和低极性人参皂苷^[19],低极性人参皂苷的生物活性和吸收效率通常高于极性人参皂苷^[20-23],而对人参属植物使用一些加工处理方式可以导致低极性人参皂苷含量的增加。通过糖苷酶及微生物等生物转化方法产生低极性皂苷,特异性强,反应条件温和,但反应时间较长,条件要求高^[24,25]。还有学者采用微波加酸或加碱处理,其投料量大,但存在转化率低,安全性及环境污染等问题^[26,27]。上述转化方法均不能满足工业化生产需求,而热转化法较为适合,其具有操作简单、转化率高、单次生产量大等优势。顾承真等^[28]将人参、西洋参、三七喷洒适量水后置于高压灭菌锅中,在120℃条件下蒸12h再保持24h,其主要成分(人参皂苷Rg1、Re、Rb1、Rd等)全部转化为低极性人参皂苷Rk3、Rh4、Rk1、Rg5和20(S/R)-Rg3等。Xue等^[29]以三七皂苷为原料,于高压反应釜中130℃条件下蒸制3h,使5种极性人参皂苷(三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、

Re、Rb2、Rd)几乎全部转化为3种低极性人参皂苷(人参皂苷Rk3、Rh4、Rh5)。此外,有研究表明,热转化过程中低极性人参皂苷含量会随着温度(100~120℃)的升高与时间(0.5~4h)的延长而增加^[30]。实验室前期优化了可工业化制备的热转化条件。发现西洋参茎叶皂苷(American Ginseng Stem-leaf Saponins, AGS)在130℃下加热3h后,低极性人参皂苷(Rg6、F4、Rh4、20(S)-Rg3、20(R)-Rg3、Rk1等)含量由0.08 mg/mg增加到0.76 mg/mg^[31]。

因此,本文利用高效液相色谱技术分析热转化前后西洋参茎叶皂苷中低极性人参皂苷的含量变化,同时对热转化前后西洋参茎叶皂苷抗氧化活性和美白活性进行研究,为热转化西洋参茎叶皂苷活性(Heat-Transformed American Ginseng Stem-leaf Saponins, HAGS)的深入研究及其开发利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

西洋参茎叶皂苷购自吉林宏久生物科技有限公司。人参皂苷标准品Re、20(S)-Rg2、Rb2、Rd、Rg6、F4、Rh4、20(S)-Rg3、20(R)-Rg3、Rk1(≥98%),吉林人参研究院;乙腈(色谱纯),美国Thermo Fisher公司;DMSO(≥99.7%)、DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,≥98%)、ABTS(2,2'-氮联-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸,≥98%)、Trolox,美国Sigma公司;左旋多巴(≥98%)、戊二醛、亚甲基蓝、TPTZ(2,4,6-三吡啶基三嗪,≥98%),上海源叶生物科技有限公司;B16F10小鼠黑色素瘤细胞,武汉普诺赛生命科技有限公司;RPMI1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素,上海富衡生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS),美国Gibco公司;熊果苷(≥98%),阿拉丁试剂有限公司;过硫酸钾、醋酸、乙醇、无水氯化铁均为分析纯。

1.2 仪器与设备

YMC-ODS-AM色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、LC-20A高效液相色谱仪,日本Shimadzu公司;多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司;二氧化碳培养箱,美国Thermo公司;倒置显微镜,上海永亨光学仪器制造有限公司;高压蒸汽灭菌锅,日本Panasonic公司;台式离心机,可成仪器设备有限公司;水平振荡仪,美国Orbital shaker公司。

1.3 实验方法

1.3.1 热转化西洋参茎叶皂苷的制备

取西洋参茎叶皂苷适量置样品盘中, 高压蒸汽灭菌锅 130 °C 左右加热处理 3 h, 待冷却后, 冷冻干燥, 即得热转化西洋参茎叶皂苷^[31]。

1.3.2 转化前后西洋参茎叶皂苷中人参皂苷含量测定

液相色谱条件^[31]: 采用色谱柱 YMC-ODS-AM (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 水 (A) 和乙腈 (B), 流速: 0.8 mL/min, 检测波长 202 nm, 柱温: 25 °C, 洗脱条件如表 1 所示。

样品溶液配置: 分别精密称取适量西洋参茎叶皂苷和热转化西洋参茎叶皂苷, 体积分数为 70% 甲醇溶解配置成终浓度为 4 mg/mL 的溶液, 过 0.45 μm 滤膜后进样, 每次进样 30 μL, 重复三次。

标准曲线的建立: 精密称取适量的人参皂苷标准品 Re、20(S)-Rg2、Rb2、Rd、Rg6、F4、Rh4、20(S)-Rg3、20(R)-Rg3 及 Rk1, 体积分数 70% 甲醇溶解配置成终浓度为 0.5 mg/mL 的标准溶液。过 0.45 μm 滤膜, 按进样量 5、10、15、20、25、30 μL 分别依次注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 皂苷进样含量为横坐标作标准曲线。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱程序

Table 1 High performance liquid chromatography gradient

elution program		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	75	25
15	70	30
24	62	38
28	62	38
30	54	46
50	36	74
60	0	100
65	75	25
70	75	25

1.3.3 转化前后西洋参茎叶皂苷的抗氧化活性

1.3.3.1 DPPH 自由基清除率的测定

准确称取 DPPH 试剂 19.71 mg, 用无水乙醇溶解至 500 mL 容量瓶中, 摇匀得 0.1 mmol/L, 取待测样溶液 0.1 mL (AGS、HAGS 为 0.1、0.5、1、2、5 mg/mL, Trolox 为 0.025、0.05、0.1、0.15、0.2 mg/mL, 所有测试样品均溶解在 70% 乙醇) 和 3.9 mL DPPH 溶液混匀, 室温避光反应 1 h, 在 517 nm 波长下测定吸光度, 体积分数 70% 乙醇为空白对照^[32]。根据公式 (1) 计

算待测样品对 DPPH 的自由基清除率:

$$F_1 = \left(1 - \frac{A_2 - A_1}{A_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

F_1 —DPPH 自由基清除率, %;

A_2 —0.1 mL 样品和 3.9 mL DPPH 的吸光度值;

A_1 —0.1 mL 样品和 3.9 mL 无水乙醇的吸光度值;

A_0 —0.1 mL 70% 乙醇和 3.9 mL DPPH 的吸光度值。

1.3.3.2 ABTS⁺ 自由基清除率的测定

取 352 μL 140 mmol/L 过硫酸钾溶液和 20 mL 7 mmol/L ABTS 储备液混合, 室温避光储备 12~16 h 得到 ABTS⁺ 溶液, 测定之前加入无水乙醇将 ABTS⁺ 溶液稀释至吸光度为 0.700±0.02 (734 nm), 将 3.9 mL 的 ABTS⁺ 溶液与 0.1 mL 待测样液 (AGS、HAGS 为 0.1、0.5、1、2、5 mg/mL, Trolox 为 0.025、0.05、0.1、0.15、0.2 mg/mL, 所有测试样品均溶解在体积分数 70% 乙醇) 混合均匀, 室温避光反应 6 min, 在 734 nm 下测吸光度, 70% 乙醇为空白对照^[33]。根据公式 (2) 计算 ABTS 自由基清除率:

$$F_2 = \frac{A_n - A_m}{A_n} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

F_2 —ABTS⁺ 自由基清除率, %;

A_m —0.1 mL 样品和 3.9 mL ABTS⁺ 溶液的吸光度值;

A_n —0.1 mL 70% 乙醇和 3.9 mL ABTS⁺ 溶液的吸光度值。

1.3.3.3 还原力的测定

0.3 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 值 3.6), 10 mmol/L TPTZ 溶液 (40 mmol/L 的盐酸溶液配置) 和 20 mmol/L FeCl₃ 以 10:1:1 的比例混合得 FRAP 工作液。3.9 mL FRAP 工作液加入 0.1 mL 样品溶液 (浓度均为 5 mg/mL), 混匀后, 在 37 °C 恒温水浴中反应 10 min, 于 593 nm 下读取吸光度值, 以体积分数 70% 乙醇为空白对照^[34]。

标准曲线的绘制: 吸取 0.1 mL 系列浓度为 0.025、0.05、0.1、0.15、0.2 和 0.5 mg/mL Trolox, 与 3.9 mL FRAP 溶液混合, 在 37 °C 水浴中反应 10 min, 于 593 nm 下读取吸光度值, 以 Trolox 的浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线: $y=2.4817x+0.0177$, $R^2=0.9993$ 。结果 FRAP 值表示为每克干重相当于 Trolox 还原力的相当量 (mg TEAC/mg DW)。

1.3.4 转化前后西洋参茎叶皂苷的美白活性

1.3.4.1 细胞培养及传代

无菌条件下, 将 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞 (B16 细胞) 接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI-1640 培养基的培养瓶中。待细胞生长至融合状态, 用 PBS 漂洗 1 次, 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 添加

含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI-1640 培养基,于二氧化碳培养箱中 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度环境中培养,每 2 d 传代一次。

1.3.4.2 B16 细胞增殖率的测定

取对数期生长的 B16 细胞,调整细胞浓度为每毫升 2×10^5 个细胞,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,于培养箱中 37 ℃,5% CO₂ 培养 24 h,弃去培养液,分别加入 100 μ L 不同浓度(0.025、0.05 和 0.1 mg/mL)的样品,每个浓度 3 次重复,24 h 后用 PBS 洗 1 次,加入 50 μ L HBSS(含 1.25%戊二醛+0.6%亚甲基蓝),至培养箱中孵育 1 h,取出倾倒入染色液,蒸馏水漂洗,加入 100 μ L 洗脱液(含 49% PBS 缓冲液+体积分数 50%乙醇+体积分数 1%乙酸),室温振荡 30 min,波长 570 nm 测吸光度值^[35]。根据公式(3)计算细胞存活率。

$$P = \frac{A_w}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

P —细胞存活率, %;

A_0 —对照组吸光度;

A_w —样品组吸光度。

1.3.4.3 B16 细胞内酪氨酸酶抑制活性的测定

取对数期生长的 B16 细胞,调整细胞密度为每毫升 5×10^5 个细胞,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,于培养箱中 37 ℃,5% CO₂ 培养 24 h,吸弃培养液,PBS 洗 1 次,每孔加入 1 mL 不同浓度(0.025、0.05 和 0.1 mg/mL)的样品,48 h 后,弃上清液,用 PBS 清洗 1 次,质量分数 0.25%胰蛋白酶消化收获细胞沉淀。加入 1 mL 0.5%脱氧胆酸钠水溶液,在 -20 ℃下放置 5 min,然后在 4 ℃下放置 10 min 裂解细胞制备含酪氨酸酶提取液。取该提取液 0.5 mL,于 37 ℃预温 10 min 后加入 0.3%多巴溶液 0.5 mL,37 ℃水浴反应 5 min 后取出,在 475 nm 处测定吸光值,平行试验 3 次^[36]。细胞酪氨酸酶抑制率按公式(4)计算:

$$Z_1 = \frac{B_0 - B_n}{B_n} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

Z_1 —酪氨酸酶抑制率, %;

B_0 —对照组吸光度值;

B_n —实验组吸光度值。

1.3.4.4 B16 细胞内黑色素形成抑制活性的测定

细胞培养方法同 1.3.4.3。在收获的细胞沉淀中加入 1 mL 1 mol/L 的 NaOH(含体积分数 10% DMSO)溶液,于 80 ℃水浴 1 h 充分溶解后,测定 405 nm 处的吸光值^[37]。根据公式(5)计算抑制率:

$$Z_2 = \frac{C_0 - C_n}{C_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

Z_2 —黑色素形成抑制率, %;

C_0 —对照组吸光度;

C_n —样品组吸光度。

1.3.5 数据处理

应用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行数据分析,所得结果进一步采用 Origin 9.1 作图。

2 结果与讨论

2.1 转化前后西洋参茎叶皂苷标准曲线的建立及含量测定

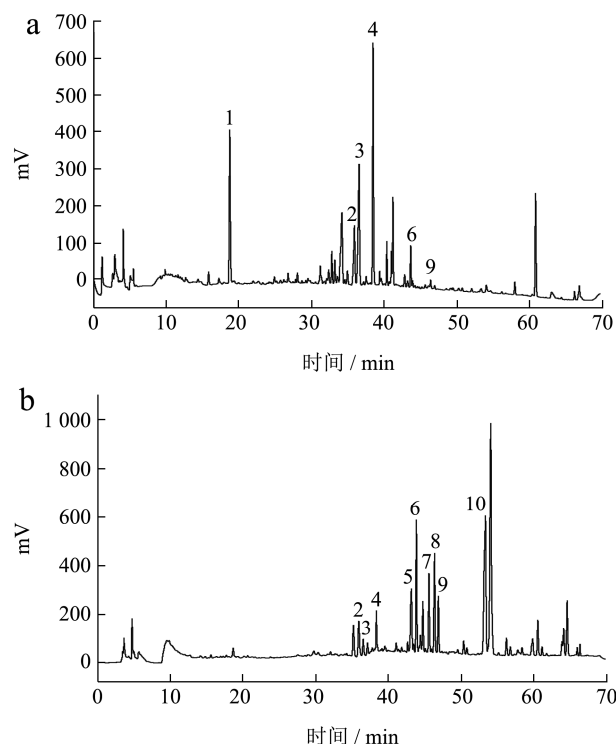


图 1 转化前后西洋参茎叶皂苷的 HPLC-UV 液相色谱图

Fig.1 HPLC-UV liquid chromatogram of American ginseng stem-leaf saponins before and after transformation

注: a 为西洋参茎叶皂苷; b 为热转化西洋参茎叶皂苷; 1 为 Re; 2 为 Rg2(S); 3 为 Rb2; 4 为 Rd; 5 为 Rg6; 6 为 F4; 7 为 Rh4; 8 为 Rg3(S); 9 为 Rg3(R); 10 为 Rk1。

如图 1 所示,图 1a 为转化前的西洋参茎叶皂苷的液相色谱图,图 1b 为转化后的西洋参茎叶皂苷的液相色谱图。人参皂苷标准曲线及含量如表 2 所示,热转化后,西洋参茎叶皂苷中总人参皂苷含量由 0.46 mg/mg 显著增加至 0.75 mg/mg,其中极性人参皂苷 Re、Rg2(S)、Rb2、Rd 含量减少,而低极性人参皂

苷(包括 Rg6、F4、Rh4、Rg3(S)、Rg3(R)、Rk1) 含量由 0.07 mg/mg 显著增加至 0.66 mg/mg。本研究结果与 Hwang 等^[38]和 Kim 等^[39]得出热处理后人参粗皂苷含量增加, 极性人参皂苷含量逐渐减少, 而低极性人参皂苷含量显著增加的结论相似。另外, 有研究表明, 原人参二醇型皂苷 Rb2、Rd 的 C-20 位糖苷键断裂产

生人参皂苷 Rg3, 而人参皂苷 Rg3 的 C-20 位置进一步脱水转化为 Rg5 和 Rk1^[40]。极性人参皂苷 Re 经过脱糖和脱水反应, 可生成低极性人参皂苷 Rh4^[41]。在本研究中, 低极性人参皂苷 Rg6、F4、Rh4、20S-Rg3、20R-Rg3、Rk1 可能是由于极性人参皂苷 Re、Rb2 和 Rd 在热转化过程中脱去糖基和水分子形成的。

表 2 人参皂苷标准曲线的建立及含量

Table 2 Establishment and content of standard curve of ginsenosides (mg/mg)

峰	人参皂苷	标准曲线	R ²	AGS	HAGS
1	Re	y=534 586x+135 013	0.998 4	0.09±0.00	n.d
2	Rg2(S)	y=639 489x+470 838	0.998 1	0.03±0.00	0.02±0.00
3	Rb2	y=363 918x+32 321	0.999 6	0.12±0.01	0.02±0.00
4	Rd	y=479 329x-200 040	0.998 4	0.15±0.02	0.05±0.00
5	Rg6	y=755 811x+665 185	0.998	n.d	0.03±0.01
6	F4	y=220 173x+92 157	0.996	0.05±0.00	0.18±0.02
7	Rh4	y=174 604x+40 242	0.998 9	n.d	0.16±0.01
8	Rg3(S)	y=784 394x+160 538	0.998	n.d	0.05±0.00
9	Rg3(R)	y=198 612x+24 675	0.999 5	0.03±0.00	0.12±0.00
10	Rk1	y=626 961x+163 506	0.998 6	n.d	0.12±0.02
总人参皂苷				0.46±0.02	0.75±0.05
低极性皂苷				0.07±0.00	0.66±0.05

注: 低极性人参皂苷包括 Rg6、F4、Rh4、Rg3(S)、Rg3(R)、Rk1。

2.2 西洋参茎叶皂苷抗氧化活性

2.2.1 DPPH 自由基清除能力

如图 2 所示, 转化前后的西洋参茎叶皂苷均具有清除 DPPH 自由基的能力, 且呈浓度依赖关系。Trolox 的 DPPH 自由基清除能力最强, 浓度为 0.2 mg/mL 时, Trolox 对 DPPH 自由基的清除率为 60.48%。浓度为 5 mg/mL 时, 热转化前后西洋参茎叶皂苷对 DPPH 自由基的清除率分别为 16.65%和 38.28%, 可以看出, 转化后西洋参茎叶皂苷对 DPPH 自由基的清除能力得到显著提高。袁元等^[42]研究报道白参、红参和黑参的 DPPH 自由基清除率大小顺序为黑参>白参>红参, 可能原因是白参的总皂苷高于红参, 且红参中生成的稀有人参皂苷 Rg3、Rh1 的含量有限, 而黑参总皂苷含量虽然没有白参总皂苷含量多, 但由于生成了大量具有高抗氧化性的人参皂苷 Rg3、Rh1, 所以黑参皂苷自由基清除能力最强。Lee 等^[43]研究表明膨化前后红参提取物的 DPPH 自由基清除率分别为 51%和 86.2%。膨化红参中总人参皂苷含量提高, 其中人参皂苷 Rg3(S)含量从 0.23 mg/g 显著增加至 0.46 mg/g。膨化红参提取物体外抗氧化活性增强的原因之一可能是总人参皂苷含量或人参皂苷 Rg3(S)的增加。在本研究中, 热转化西洋参茎叶皂苷的总人参皂苷含量得到

显著提高, 其中人参皂苷 Rg3(包括 Rg3(S)和 Rg3(R))含量从 0.03 mg/mg 增加至 0.17 mg/mg, 所以热转化西洋参茎叶皂苷比西洋参茎叶皂苷具有更强的抗氧化能力。此外, 美拉德反应产物的形成可能是热转化西洋参茎叶皂苷抗氧化活性增强的另一个原因^[44]。Sharma 等^[45]报道称, 热加工过程中发生了美拉德反应, 进而产生了深色色素。Manzocco 等^[46]认为这些色素(尤其是类黑素)是具有抗氧化活性的化合物。所以, 抗氧化活性的提高可能与美拉德褐变色素的形成有关, 而美拉德褐变色素的产生增强了热转化西洋参茎叶皂苷的抗氧化活性。

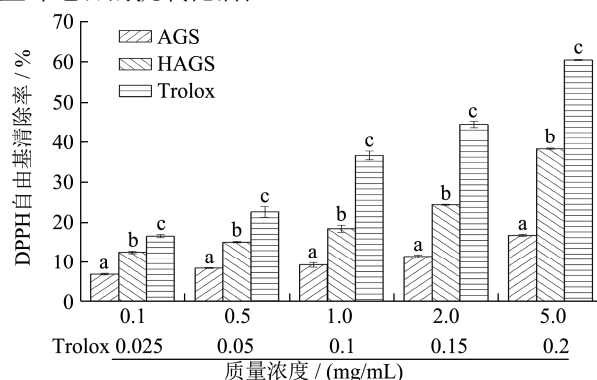


图 2 转化前后西洋参茎叶皂苷对 DPPH 自由基的清除作用
Fig.2 Scavenging effect of American ginseng stem-leaf saponins on DPPH free radical before and after transformation

2.2.2 ABTS⁺自由基清除能力

如图3所示,转化前后的西洋参茎叶皂苷均具有清除ABTS⁺自由基的能力,且呈浓度依赖关系。Trolox的ABTS⁺自由基清除能力最强,浓度为0.2 mg/mL时, Trolox对ABTS⁺自由基的清除率为51.37%。浓度为5 mg/mL时,热转化前后西洋参茎叶皂苷的ABTS⁺自由基清除率分别为8.24%和41.94%,转化后西洋参茎叶皂苷ABTS⁺自由基清除能力显著提高。

Lee等^[43]测得膨化前后红参提取物的ABTS⁺自由基清除率分别为28.72%和72.23%。膨化红参提取物的DPPH与ABTS⁺自由基清除率均在70%以上。Hwang等^[47]研究表明随着热处理温度的升高,人参的DPPH自由基清除能力与ABTS⁺自由基清除能力均得到显著提高。其它研究表明,ABTS法测定的抗氧化能力与DPPH法测定的抗氧化能力呈极显著正相关^[48]。本研究中,西洋参茎叶皂苷、热转化西洋参茎叶皂苷和Trolox的ABTS⁺自由基清除能力也表现出与DPPH自由基清除能力一致的趋势。

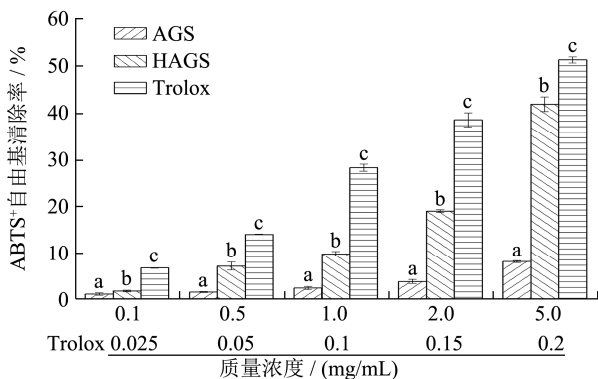


图3 转化前后西洋参茎叶皂苷对ABTS⁺自由基的清除作用
Fig.3 Scavenging effect of American ginseng stem-leaf saponins on ABTS free radical before and after transformation

2.2.3 还原力

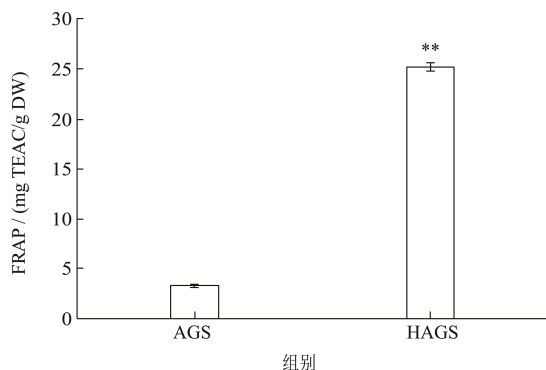


图4 转化前后西洋参茎叶皂苷的还原力(FRAP值)
Fig.4 Reducing power of American ginseng stem-leaf saponins before and after transformation (FRAP)

还原力是评价天然产物抗氧化能力的指标之一。不同样品的还原能力如图4所示,在5 mg/mL浓度下,

热转化西洋参茎叶皂苷的FRAP值为25.22 mg TEAC/g DW,西洋参茎叶皂苷的FRAP值为3.24 mg TEAC/g DW。热转化西洋参茎叶皂苷的还原能力约为西洋参茎叶皂苷的8倍。本文测定热转化前后西洋参茎叶皂苷的还原力结果与Hwang等^[38]得出热处理后人参根和人参叶的还原力显著提高的结果相似。此外,Gui等^[49]研究发现对白参粉和红参粉进行挤压蒸煮后还原能力均得到提高。本研究中,热转化前后西洋参茎叶皂苷的还原力与DPPH自由基清除能力和ABTS自由基清除能力趋势保持一致。

2.3 西洋参茎叶皂苷美白活性

2.3.1 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞增殖的影响

不同样品处理后的B16细胞存活率如图5所示,在0.025~0.1 mg/mL浓度范围内,随着西洋参茎叶皂苷与熊果苷浓度的升高,B16细胞存活率未见明显下降。而随着热转化西洋参茎叶皂苷浓度的逐渐升高,热转化西洋参茎叶皂苷对B16细胞表现出一定的抑制作用,但在浓度0.1 mg/mL时,热转化西洋参茎叶皂苷处理下的B16细胞存活率仍大于90%,表明转化前后的西洋参茎叶皂苷在受试浓度范围内不会对B16细胞产生细胞毒性。

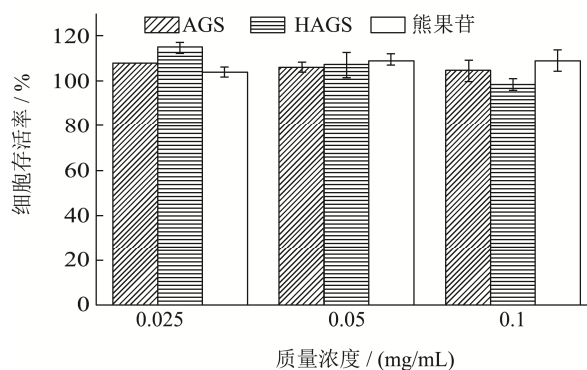


图5 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞增殖的影响
Fig.5 Effects of American ginseng stem-leaf saponins on B16 cell proliferation before and after transformation

2.3.2 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞内酪氨酸酶活性的影响

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶,抑制酪氨酸酶活性就能够有效抑制黑色素的形成^[5]。如图6所示,在0.025~0.1 mg/mL浓度范围内,随着样品浓度的提高,样品对细胞内酪氨酸酶的抑制作用越来越强,且呈现剂量依赖关系。在各个测试浓度下,熊果苷对B16细胞内酪氨酸酶活性的抑制作用最强。在0.025~0.05 mg/mL浓度范围内,西洋参茎叶皂苷对酪氨酸酶的抑制作用强于热转化西洋参茎叶皂苷;当浓度达到

0.1 mg/mL 时, 热转化西洋参茎叶皂苷对酪氨酸酶的作用强于西洋参茎叶皂苷, 抑制率分别为 33.54%和 30.22%。研究表明, 人参皂苷 Rb2、Rh4、Rg3 和 Rk1 均能抑制酪氨酸酶活性^[50-53]。在本研究中, 西洋参茎叶皂苷中人参皂苷 Rb2 和 Rg3(R)含量分别为 0.12 mg/mg 和 0.03 mg/mg。热转化西洋参茎叶皂苷中人参皂苷 Rb2、Rh4、Rg3(S)、Rg3(R)和 Rk1 含量分别为 0.02、0.16、0.05、0.12 和 0.12 mg/mg。虽然热转化西洋参茎叶皂苷中人参皂苷 Rb2、Rh4、Rg3(S)、Rg3(R)和 Rk1 含量显著高于西洋参茎叶皂苷中人参皂苷 Rb2 和 Rg3(R)含量, 但热转化西洋参茎叶皂苷对酪氨酸酶的抑制作用并未显著强于西洋参茎叶皂苷。有研究表明, 不同药物的组合应用所产生的效应关系可以是协同作用, 也可以是拮抗作用^[54]。所以造成热转化西洋参茎叶皂苷对酪氨酸酶的抑制作用并未显著强于西洋参茎叶皂苷的可能原因是热转化西洋参茎叶皂苷中各组分之间存在着抑制酪氨酸酶活性的拮抗作用。

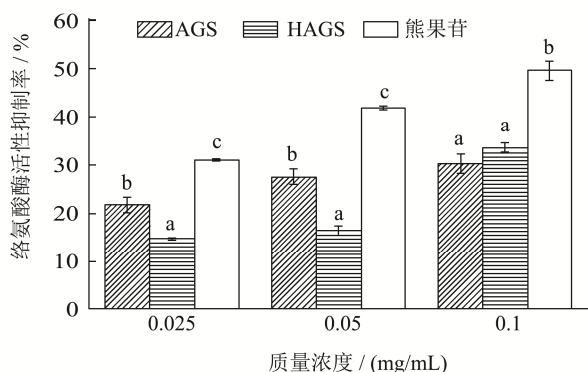


图6 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞内酪氨酸酶活性的抑制作用

Fig.6 Inhibition of saponins from American ginseng stem-leaf saponins on tyrosinase activity in B16 cells before and after transformation

2.3.3 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞内黑色素形成的抑制作用

如图7所示, 在不同的浓度下处理B16细胞, 随着样品浓度的提高, 样品对B16细胞内黑色素形成的抑制作用逐渐增强, 且呈现剂量依赖关系。在浓度为0.1 mg/mL时, 热转化西洋参茎叶皂苷对细胞内黑色素形成的抑制作用最强, 西洋参茎叶皂苷次之, 熊果苷最弱, 抑制率分别为29.33%、17.27%和12.31%。这与吴永祥等^[55]测得100 mg/L的熊果苷对黑色素生成的抑制率为17.29%实验结果相似。然而, 本研究结果与酪氨酸酶活性抑制结果: 熊果苷>热转化西洋参茎叶皂苷>西洋参茎叶皂苷的趋势不一致。有研究报道, 人参皂苷 Rb2 通过下调小眼畸形相关转录因子 (MITF) 和酪氨酸酶 (TYR) 表达, 降低小鼠黑色素

细胞中的黑色素形成^[50]。人参皂苷 Rh4 苷元可通过下调 MITF 和 TYR 显著降低 B16 黑色素瘤细胞中的环磷酸腺苷 (cAMP) 水平, 抑制黑色素形成^[51]。人参皂苷 Rg3 能有效抑制 MITF、酪氨酸酶相关蛋白 1 (TRP1) 和 TYR 的表达, 提高细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号蛋白水平来抑制黑色素形成^[52]。Rk1 通过激活 MEK-ERK 信号通路来抑制酪氨酸酶表达, 减少黑色素的形成^[53]。上述研究表明, 热转化西洋参茎叶皂苷与西洋参茎叶皂苷除通过抑制酪氨酸酶活性来减少黑色素生成的途径外, 还存在其他抑制黑色素形成的机制途径, 所以熊果苷对黑色素形成的抑制作用最弱。此外, 又由于热转化西洋参茎叶皂苷中人参皂苷含量 (Rb2、Rh4、Rg3、Rk1) 明显高于西洋参茎叶皂苷, 因此, 热转化西洋参茎叶皂苷对 B16 细胞内黑色素形成的抑制作用强于西洋参茎叶皂苷。

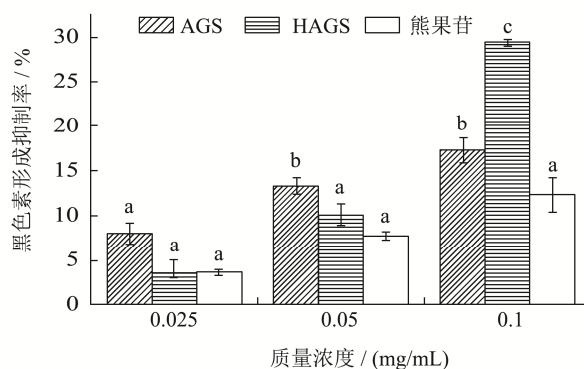


图7 转化前后西洋参茎叶皂苷对B16细胞内黑色素形成的抑制作用

Fig.7 Inhibition of saponins from American ginseng stem-leaf saponins on melanin formation in B16 cells before and after transformation

3 结论

本研究利用西洋参茎叶皂苷作为原料, 通过热转化处理使得西洋参茎叶皂苷中的极性人参皂苷脱去糖基和水分子形成低极性人参皂苷, 低极性人参皂苷含量得到显著提高。同时, 热转化西洋参茎叶皂苷表现出比西洋参茎叶皂苷更强的 DPPH 自由基清除能力、ABTS⁺自由基清除能力、还原能力、抑制酪氨酸酶活力以及抑制黑色素合成能力, 并表现出明显的量效关系。这些结果将对西洋参茎叶皂苷的开发研究提供重要的参考价值, 为后期深入探究热转化西洋参茎叶皂苷的抗氧化、美白相关的活性机制奠定基础。

参考文献

[1] 廖华勇,王景,李红玉.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速分析化妆品中 17 种喹诺酮类药物[J].

- 分析测试学报,2019,38(9):1102-1107
- LIAO Huayong, WANG Jing, LI Hongyu. Rapid determination of 17 quinolones in cosmetics using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(9): 1102-1107
- [2] 蓝草,邵琳智,陈思敏.实时直接分析-高分辨质谱法快速检测化妆品中的氯霉素[J].分析测试学报,2019,38(12):1503-1506
- LAN Cao, SHAO Linzhi, CHEN Simin. Rapid determination of chloramphenicol in cosmetics using direct real-time analysis-high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(12): 1503-1506
- [3] Liochev S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 60(10): 1-4
- [4] Albrecht S, Ahlberg S, Beckers I, et al. Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy [J]. Methods, 2016, 109: 44-54
- [5] Sarkar R, Arora P, Garg K. Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available? [J]. Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery, 2013, 6(1): 4-11
- [6] 刘微微,任虹,曹学丽,等.天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展[J].食品科学,2010,31(17):415-419
- LIU Weiwei, REN Hong, CAO Xueli, et al. Progress in evaluation techniques for antioxidant activity of natural products *in vitro* [J]. Food Science, 2010, 31(17): 415-419
- [7] 王一帆,赖家珍,龙晓英,等.中药美白机制及功效评价进展[J].广东药学院学报,2014,30(4):525-529
- WANG Yifan, LAI Jiazhen, LONG Xiaoyin, et al. Progress of traditional Chinese medicine in skin-whitening mechanism [J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2014, 30(4): 525-529
- [8] Qi L W, Wang C Z, Yuan C S. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity [J]. Phytochemistry, 2011, 72(8): 689-699
- [9] You L, Cho J Y. The regulatory role of Korean ginseng in skin cells [J]. Journal of Ginseng Research, 2020, 45(3): 363-370
- [10] Szczuka D, Nowak A, Małgorzata Zakłós-Szyda, et al. American ginseng (*Panax quinquefolium* L.) as a source of bioactive phytochemicals with pro-health properties [J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1-29
- [11] Jegal J, Jeong E J, Yang M H. A review of the different methods applied in ginsenoside extraction from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* roots [J]. Natural Product Communications, 2019, 14(9): 1-10
- [12] 李凤林.人参茎叶皂苷药理作用的研究进展[J].贵州农业科学,2013,41(2):54-57
- LI Fenglin. Research progress of pharmacology effect about ginsenosides from stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 54-57
- [13] Qu C L, Bai Y P, Jin X Q, et al. Study on ginsenosides in different parts and ages of *Panax quinquefolius* L [J]. Food Chemistry, 2008, 115(1): 340-346
- [14] Wang A B, Wang C Z, Wu J A, et al. Determination of major ginsenosides in *Panax quinquefolius* (American ginseng) using high-performance liquid chromatography [J]. Phytochem Analysis, 2005, 16(4): 272-277
- [15] Lim W, Mudge K W, Vermeylen F. Effects of population, age, and cultivation methods on ginsenoside content of wild American ginseng (*Panax quinquefolium*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(22): 8498-8505
- [16] 薛燕,闻莉.西洋参根及茎叶皂苷提取物中 12 种主要皂苷成分的分析研究[J].药物分析杂志,2009,29(1):79-81
- XUE Yan, WEN Li. RP-HPLC determination of twelve ginsenosides in extract of root, and stem and leaf from *Panax quinquefolius* L [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(1): 79-81
- [17] 曹欣欣,曹庆军,杨粉团,等.影响西洋参中皂苷含量的因子分析[J].东北农业科学,2018,43(5):43-46
- CAO Xinxin, CAO Qingjun, YANG Fentuan, et al. Analysis of factors affecting ginsenoside content in *Panax quinquefolium* [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2018, 43(5): 43-46
- [18] 王健,赵岚峰,东贵华.西洋参茎叶中西洋参皂甙的分析[J].中成药,1995,1:36-38,51
- WANG Jian, ZHAO Lanfeng, DONG Guihua. Analysis of *Panax quinquefolium* saponins in the stems and leaves of American ginseng [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 1995, 1: 36-38, 51
- [19] Kwon S W, Han S B, Park I H, et al. Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 918(2): 335-339
- [20] Le T H V, Lee S Y, Lee G J, et al. Effects of steaming on saponin compositions and antiproliferative activity of Vietnamese ginseng [J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(3): 274-278
- [21] Kim S J, Kim A K. Anti-breast cancer activity of fine black ginseng (*Panax ginseng* Meyer) and ginsenoside Rg5 [J].

- Journal of Ginseng Research, 2015, 39(2): 125-134
- [22] Lee M R, Yun B S, Sung C K. Comparative study of white and steamed black *Panax ginseng*, *P. quinquefolium*, and *P. notoginseng* cholinesterase inhibitory and antioxidative activity [J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(1): 93-101
- [23] Duan Z G, Deng J, Dong Y, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rk3 on non-small cell lung cancer cells: *in vitro* and *in vivo* [J]. Food & Function, 2017, 8(10): 3723-3736
- [24] Du J, Cui C H, Park S C, et al. Identification and characterization of a ginsenoside-transforming β -glucosidase from *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 and its application for enhanced production of minor ginsenoside Rg2(S) [J]. Plos One, 2014, 9(6): e96914
- [25] Akter S, Wang X Q, Lee S Y, et al. *Paenibacillus roseus* sp. nov., a ginsenoside-transforming bacterium isolated from forest soil [J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(7): 3997-4004
- [26] Kim S J, Kim J D, Ko S K. Changes in ginsenoside composition of ginseng berry extracts after a microwave and vinegar process [J]. Journal of Ginseng Research, 2013, 37(3): 269-272
- [27] Zhang F X, Tang S J, Zhao L, et al. Stem-leaves of *Panax* as a rich and sustainable source of less-polar ginsenosides: comparison of ginsenosides from *Panax ginseng*, American ginseng and *Panax notoginseng* prepared by heating and acid treatment [J]. Journal of Ginseng Research, 2021, 45(1): 163-175
- [28] 顾承真,曾碧雪,张钰佳,等.人参属植物高温蒸制前后人参皂苷含量的变化和细胞毒活性研究[J].中草药,2021,52(11): 3391-3397
- GU Chengzhen, ZENG Bixue, ZHANG Yujia, et al. Variation of ginsenosides in raw and processed ginsengs (*Panax* sp.) and their cytotoxicities [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(11): 3391-3397
- [29] Xue P, Yang X S, Sun X Y, et al. Antifungal activity and mechanism of heat-transformed ginsenosides from notoginseng against *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, and *Trichophyton mentagrophytes* [J]. RSC Advances, 2017, 7: 10939-10946
- [30] Wang C Z, Aung H H, Ni M, et al. Red American ginseng: ginsenoside constituents and antiproliferative activities of heat-processed *Panax quinquefolius* roots [J]. Planta Medica, 2007, 73(7): 669-674
- [31] Xue P, Yao Y, Yang X S, et al. Improved antimicrobial effect of ginseng extract by heat transformation [J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(2): 180-187
- [32] Gordon M H, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(5): 2480-2485
- [33] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9-10): 1231-1237
- [34] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76
- [35] Yang J, Liu R H. Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(18): 8581-8586
- [36] Curto E V, Kwong C, Hermersdrfer H, et al. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *in vitro* comparison of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57(6): 663-672
- [37] Kim I S, Yoom S J, Park Y J, et al. Inhibitory effect of ephedrannins A and B from roots of *Ephedra sinica* STAFF on melanogenesis [J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 2015, 1850(7): 1389-1396
- [38] Hwang C R, Lee S H, Jang G Y, et al. Changes in ginsenoside compositions and antioxidant activities of hydroponic-cultured ginseng roots and leaves with heating temperature [J]. Journal of Ginseng Research, 2014, 38(3): 180-186
- [39] Kim D K, Baik M Y, Kim H K, et al. Standardization of ginseng processing for maximizing the phytonutrients of ginseng [J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(1): 221-226
- [40] Lee S M, Shon H J, Choi C S, et al. Ginsenosides from heat processed ginseng [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2009, 57(1): 92-94
- [41] Chen W, Balan P, Popovich D G. Changes of ginsenoside composition in the creation of black ginseng leaf [J]. Molecules, 2020, 25(12): 2809
- [42] 袁元,金河延,于洋,等.白参、红参和黑参有效成分与抗氧化活性比较研究[J].延边大学农学学报,2019,41(4):14-20
- YUAN Yuan, JIN Heyan, YU Yang, et al. A comparative study on effective components and antioxidant activities in

- white, red and black ginseng [J]. Agricultural Science Journal of Yanbian University, 2019, 41(4): 14-20
- [43] Lee S J, Oh S, Kim M J, et al. Oxidative stability of extracts from red ginseng and puffed red ginseng in bulk oil or oil-in-water emulsion matrix [J]. Journal of Ginseng Research, 2018, 42(3): 320-326
- [44] Bressa F, Tesson N, Rosa M D, et al. Antioxidant effect of Maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(3): 692-695
- [45] Sharma P, Gujral H S. Effect of sand roasting and microwave cooking on antioxidant activity of barley [J]. Food Research International, 2011, 44(1): 235-240
- [46] Manzocco L, Calligaris, S, Mastrocola D, et al. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods [J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11(9-10): 340-346
- [47] Hwang I G, Kim H Y, Joung E M, et al. Changes in ginsenosides and antioxidant activity of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) with heating temperature and pressure [J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 941-949
- [48] Floegel A, Kim D O, Chung S J, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24(7): 1043-1048
- [49] Gui Y, Ryu G H. Effects of extrusion cooking on physicochemical properties of white and red ginseng (powder) [J]. Journal of Ginseng Research, 2014, 38(2): 146-153
- [50] Lee D Y, Jeong Y T, Jeong S C, et al. Melanin biosynthesis inhibition effects of ginsenoside Rb2 isolated from *Panax ginseng* berry [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 25(12): 2011-2015
- [51] Jeong Y M, Oh W K, Tran T L, et al. Aglycone of Rh4 inhibits melanin synthesis in B16 melanoma cells: possible involvement of the protein kinase a pathway [J]. Biosci Biotech Bioch, 2013, 77(1): 119-125
- [52] Lee S J, Lee W J, Chang S E, et al. Antimelanogenic effect of ginsenoside Rg3 through extracellular signal-regulated kinase-mediated inhibition of microphthalmia-associated transcription factor [J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(3): 238-242
- [53] Jin Y, Kim J H, Hong H D, et al. Ginsenosides Rg5 and Rk1, the skin-whitening agents in black ginseng [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 45: 67-74
- [54] Adams L S, Seeram N P, Hardy M L, et al. Analysis of the interactions of botanical extract combinations against the viability of prostate cancer cell lines [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2006, 3(1): 117-124
- [55] 吴永祥,毕淑峰,姜薇,等.桑白皮多酚对 B16 细胞内黑色素生成的影响及其机制[J].中国药理学通报,2018,34(9):1296-1301
- WU Yongxiang, BI Shufeng, JIANG Wei, et al. The effect of mulberry bark polyphenols on melanin production in B16 cells and its mechanism [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(9): 1296-1301