

襄麦冬总甾体皂苷提取工艺优化及体外清除自由基活性评价

In vitro scavenging free radical activity evaluation and its extraction process optimization of total steroidal saponins from *Liriope spicata* var. *prolifera*

杨佳娣 柯婉 叶国栋 潘婉莲 于博 余海忠

YANG Jia-di KE Wan YE Guo-dong PAN Wan-lian YU Bo YU Hai-zhong

(湖北文理学院化学工程与食品科学学院, 湖北 襄阳 441053)

(School of Chemical Engineering and Food Science, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441053, China)

摘要:以山麦冬皂苷B含量为考察指标,通过响应面法对襄麦冬总甾体皂苷的提取工艺进行优化,并评价甾体皂苷的体外抗氧化能力。结果表明,当采用超声时间0.5 h、超声液料比19.5:1.0 (mL/g)、超声温度39.7℃、索氏提取时间3 h处理襄麦冬块根粉碎物时,提取物中甾体皂苷的含量最高,山麦冬皂苷B可达到0.073 8 mg/mL。襄麦冬总甾体皂苷对OH·自由基、O₂⁻自由基、DPPH自由基以及ABTS自由基均具有一定的体外清除能力,且清除活性与甾体皂苷的浓度呈线性关系;对OH·自由基和O₂⁻自由基,在设定的最高浓度(1.28 mg/mL)时,清除率均超过50%,分别达到59.66%和52.3%。

关键词:襄麦冬;甾体皂苷;提取;自由基清除活性;体外

Abstract: The extraction process of total steroidal saponins was optimized by the response surface method and its *in vitro* radical scavenging activity was also evaluated by the methods of α -deoxyribose, pyrogallol autoxidation, DPPH and ABTS. The results showed that the content of total steroidal saponins would be the highest if the time, liquid-solid ratio and temperature of ultrasonic treatment was 0.5 h, 19.5:1.0 (mL/g) and 39.7℃, and the soxhlet extraction time was 3 h. At this point, the Liriope saponins B could reach 0.073 8 mg/mL. In addition, the antioxidant activity test showed that steroidal saponins had some antioxidant activities, and positive correlations were found between its antioxidant activities and its concentration. In particular, it had the obvious scavenging activity to OH· free radicals and superoxide anions, which reached 59.66% and 52.3% respectively at the

highest concentration of 1.28 mg/mL.

Keywords: *Liriope spicata* var. *prolifera*; steroidal saponins; extraction; radical scavenging activity; *in vitro*

襄麦冬学名湖北麦冬(*Liriope spicata* var. *prolifera*),为百合科山麦冬属植物,其块根与川麦冬、杭麦冬一起入药,连续收载于《中华人民共和国药典》(1995,2000,2005,2010,2015年版),是国家地理标志产品。甾体皂苷是襄麦冬的主要活性成分之一,在医学研究、保健品开发、食品生产等方面应用广泛^[1]。目前,对襄麦冬甾体皂苷的研究,主要集中在成分或含量测定方面。张伟等^[2]建立了UPLC-MS/MS法检测妇康宁片中掺加的湖北麦冬皂苷;吴发明等^[3]从中国四大产地的麦冬中均检出麦冬皂苷D,但浙江麦冬含量较低;同时也发现不同产地麦冬中4种有效组分(2个皂苷和2个黄酮)的含量差异极显著^[4]。陈乃东等^[5]证明高效毛细管电泳法可用于25R与25S-鲁斯可皂苷元手性拆分,为鲁斯可皂苷元药理学研究、质量控制提供了新方法。吴弢等^[6]采用ELSD测定了湖北麦冬中山麦冬皂苷B的含量,结果表明ELSD是皂苷类化合物较为适宜的检测器。林以宁等^[7]采用HPLC-ELSD法测定发现不同种麦冬类药材在皂苷元组成及含量上均有区别,其总皂苷元含量为:短葶山麦冬>川麦冬和湖北麦冬>杭麦冬。

也有学者开展了一些皂苷与其品质相关性的研究。王小刚^[8]发现山麦冬皂苷B的含量在不同种苗间无显著差异,但是与土壤中有有效磷和全钾呈显著性相关。兰宏昌^[9]以山麦冬皂苷B含量等5个因素为考核指标,分析不同施加时间、不同施加剂量的多效唑对湖北麦冬质量和产量的影响,得出多效唑的合适施用量为0.84 g/m²,最佳施用时间为9月中下旬。朱业芹^[10]以山麦冬皂苷B和多糖的含量作为质量评价指标,确定了以具有粗根、新生芽的植株为种苗,株

基金项目:国家星火计划面上项目(编号:2015GA760011);湖北省自然科学基金项目(编号:2013CFC025)

作者简介:杨佳娣,女,湖北文理学院在读本科生。

通信作者:余海忠(1976—),男,湖北文理学院副教授,博士。

E-mail: haizhongvip@126.com

收稿日期:2017-12-15

距×行距(10 cm×15 cm)种植,摘花葶处理时的湖北麦冬质量和产量较优。

此外,在甾体皂苷的细胞活性评价、降血糖方面也有一些报道。林以宁等^[7]发现不同种麦冬类药材均对中性粒细胞呼吸爆发呈抑制作用,其中,短葶山麦冬对中性粒细胞的呼吸爆发具有较强的抑制作用。刘霞等^[11-12]证实了湖北麦冬所含总多糖和总皂苷均具有降血糖作用,降糖效果为湖北麦冬总多糖>湖北麦冬总皂苷>湖北麦冬总提取物。

目前,关于囊麦冬的皂苷提取研究报道较少,仅见林韵涵^[13]与刘霞^[11,14]的报道。前者通过正交试验获得总皂苷最佳提取工艺的得率为18.67%;后者则利用大孔吸附树脂分离、纯化囊麦冬块根提取物,得到纯度含量为66.52%的总多糖和81.15%的总皂苷。而对囊麦冬甾体皂苷的抗氧化活性研究则更为鲜见,仅见其不同极性部位粗提物的^[15],尚未见单一类组分——总甾体皂苷的体外抗氧化活性报道。同时,从植物中寻找天然抗氧化物质已逐渐成为食品行业关注的热点^[16-17],作为药食兼用的囊麦冬,不仅具有较好的药理与保健作用,还被广泛用于食品开发,目前已有麦冬酒、麦冬茶、麦冬咀嚼片、麦冬酸奶等产品问世^[18-19]。

基于上述,本试验拟通过响应面法优化囊麦冬总甾体皂苷的提取工艺,并采用 α -脱氧核糖法、邻苯三酚自氧化法、DPPH法、ABTS法测试其体外抗氧化能力,以期能为天然抗氧化剂的开发提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

囊麦冬块根:囊麦冬原产地——湖北襄阳欧庙,新鲜块根洗净后60℃烘干至恒重,粉碎待用;

α -脱氧核糖、硫代巴比妥酸、邻苯三酚、ABTS、生育酚、甲醇等:分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司;

DPPH:分析纯,美国Sigma公司;

山麦冬皂苷B标准品:分析纯,中国食品药品检定研究院;

微型植物粉碎机:FZ102型,天津泰斯特仪器有限公司;

数显鼓风干燥箱:GZX-9240 MBE型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

紫外-可见分光光度计:UV-1800型,日本岛津公司;

高效液相色谱仪:LC-20AT型,日本岛津公司;

超声波清洗器:KH3200DB型,昆山禾创超声仪器有限公司;

小型冷冻干燥机:FreeZone 12型,美国Labconco公司。

1.2 囊麦冬总甾体皂苷的提取

分别称取1.0 g囊麦冬块根粉碎物,加入一定体积甲醇进行超声处理,在设定的温度下提取一定时间后,过滤。滤渣转移至索氏提取器内,加入100 mL甲醇,80℃恒温水浴,继续提取一定时间后停止,合并2次滤液,减压浓缩得浸膏。取100 mL纯水常温超声溶解浸膏,过滤,滤液中加入40 mL乙醚进行萃取脱酯。对保留的水层部分,依次加入15,10,5,5 mL水饱和正丁醇,分4次萃取样品溶液,合并萃取的正丁醇层部分,依次进行45℃水浴减压浓缩和-40℃真空冷冻干燥,所得产物即为囊麦冬总甾体皂苷。

1.3 甾体皂苷的HPLC含量测定

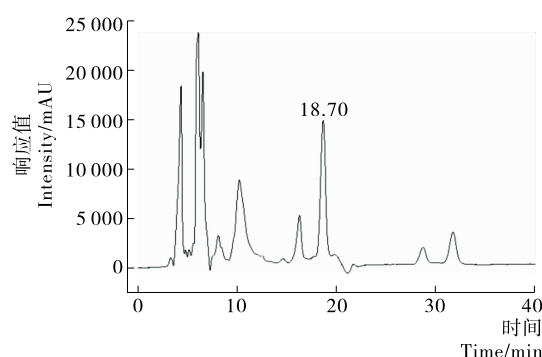
以山麦冬皂苷B的含量来示踪囊麦冬块根提取物中的总甾体皂苷含量,HPLC检测条件:检测器SPD-M20A,色谱柱Inert Sustain C₁₈,柱温箱CTO-20A,真空脱气机DGU-20A3,流动相85%甲醇,流速0.3 mL/min,检测波长208 nm,进样量10 μ L,等度洗脱40 min。用甲醇将山麦冬皂苷B标准品配制成0.125,0.250,0.050,0.750,1.000 mg/mL的溶液,上机检测后以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标制作标准曲线(图1),得到回归方程 $y=7.99 \times 10^6 x - 1.08 \times 10^6$, $R^2=0.995$ 。

1.4 囊麦冬总甾体皂苷的提取单因素试验设计

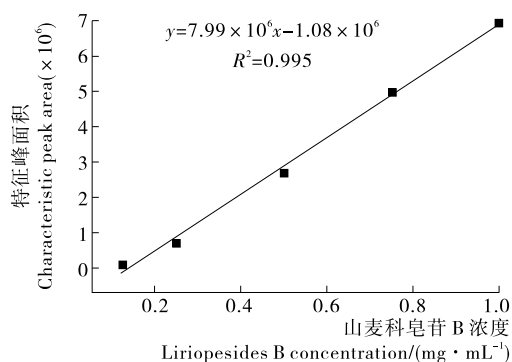
1.4.1 液料比对得率的影响 各取1 g样品,分别按液料比10:1,15:1,20:1,25:1,30:1,35:1 (mL/g)与甲醇混合,30℃超声处理1.0 h后转入索氏提取1.0 h。最后对样品进行萃取、浓缩、干燥,用30 mL甲醇溶解定容即得总甾体皂苷溶液,测定其含量。

1.4.2 超声处理温度对得率的影响 各取1 g样品,按液料比20:1 (mL/g)与甲醇混合,分别在25,30,35,40,45,50℃下超声处理1.0 h后转入索氏提取1.0 h。最后对样品进行萃取、浓缩、干燥,用30 mL甲醇溶解定容即得总甾体皂苷溶液,测定其含量。

1.4.3 超声处理时间对得率的影响 各取1 g样品,按液料



(a) 山麦冬皂苷B特征峰



(b) 标准曲线

图1 山麦冬皂苷B的HPLC色谱图及标准曲线

Figure 1 HPLC chromatogram and standard curve of Liriopesides. B

比 20 : 1 (mL/g) 与甲醇混合, 30 ℃ 分别超声处理 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h 后转入索氏提取 1.0 h。最后对样品进行萃取、浓缩、干燥, 用 30 mL 甲醇溶解定容即得总甾体皂苷溶液, 测定其含量。

1.4.4 索氏提取时间对得率的影响 各取 1 g 样品, 按液料比 20 : 1 (mL/g) 与甲醇混合, 30 ℃ 超声提取 1.0 h 后转入索氏提取 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h。最后对样品进行萃取、浓缩、干燥, 用 30 mL 甲醇溶解定容即得总甾体皂苷溶液, 测定其含量。

1.5 甾体皂苷的抗氧化活性测试

用甲醇或乙醇对最佳条件下提取的囊麦冬总甾体皂苷进行溶解, 制成 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08 mg/mL 的供试样品, 分别测试其对 OH 自由基、 O_2^- 自由基、DPPH 自由基以及 ABTS 自由基的清除活性。以育酚为阳性对照。

1.5.1 清除 OH 自由基的活性测试 采用 α -脱氧核糖法^[20]。取不同的具塞试管, 分别依次加入 0.20 mL 的 $FeSO_4$ -EDTA 溶液 (10 mmol/L)、0.20 mL 的 α -脱氧核糖溶液 (10 mmol/L)、1 mL 不同浓度的样品溶液、0.4 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.4, 0.1 mol/L) 和 0.20 mL H_2O_2 (10 mmol/L), 混匀, 37 ℃ 水浴 1 h 后, 再依次加入 1 mL 的 2.8 g/100 mL 三氯乙酸溶液和 1.0 mL 的 1.0 g/100 mL 硫代巴比妥酸溶液, 迅速摇匀, 100 ℃ 水浴 10 min, 冷水冷却后在 532 nm 处测定吸光值 A_s 。不加样品溶液, 同上操作处理, 测定其对比吸光值 A_c 。不加样品溶液且不在 37 ℃ 水浴中反应, 其它处理同上, 测定空白吸光值 A_0 。每个样品重复 3 次, 清除率按式 (1) 计算:

$$S = [1 - (A_s - A_0) / (A_c - A_0)] \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

S ——清除率, %;

A_s ——样品吸光值;

A_0 ——空白吸光值;

A_c ——对比吸光值。

1.5.2 清除 O_2^- 自由基的活性测试 采用邻苯三酚自氧化法^[21]。取不同的具塞试管, 分别加入 4.5 mL 的 Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液, 25 ℃ 水浴 20 min 后, 再加入 0.4 mL 不同浓度的样品溶液和 25 ℃ 下保温的邻苯三酚溶液 0.1 mL, 混匀, 25 ℃ 下反应 4 min 后立即加入 2 滴 HCl (10 mol/L) 溶液终止反应, 在 325 nm 处测定吸光值。对照以蒸馏水代替样品, 缓冲液加蒸馏水作为空白, 每个样品重复 3 次, 清除率按式 (2) 计算:

$$S = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S ——清除率, %;

A_c ——对照吸光值;

A_s ——样品吸光值。

1.5.3 清除 DPPH 自由基的活性测试 采用 DPPH 法^[22]。取不同的具塞试管, 分别依次加入 3.9 mL 的 DPPH 甲醇溶液 (25 mg/L) 和 0.1 mL 不同浓度的样品, 混匀, 将试管放入暗处反应 30 min 后, 立刻取出测定其在 515 nm 处吸光值, 空白用甲醇替代样品溶液, 其它操作相同。每个样品重复 3

次, 清除率按式 (3) 计算:

$$S = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

S ——清除率, %;

A_s ——样品吸光值;

A_0 ——空白吸光值。

1.5.4 清除 ABTS 自由基的活性测试 采用 ABTS 法^[23]。取 0.2 mL 的 ABTS (7.4 mmol/L) 溶液, 加入 0.2 mL 的 $K_2S_2O_8$ (2.6 mmol/L) 溶液, 混匀, 室温避光静置 12 h, 用 95% 乙醇稀释 40 倍, 此时在 734 nm 处测得吸光值为 0.7 ± 0.02 即可。取不同的具塞试管, 分别加入 0.8 mL 上述溶液和 0.2 mL 不同浓度的样品溶液, 剧烈振摇 10 s, 充分混合, 静置 6 min, 立刻测定其在 734 nm 处吸光值。空白用乙醇代替, 每个样品重复 3 次, 清除率按式 (4) 计算:

$$S = (1 - A_s / A_0) \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

S ——清除率, %;

A_s ——样品吸光值;

A_0 ——空白吸光值。

1.6 数据处理

响应面试验设计与数据处理采用 Design-expert 8.0.6 进行, 其它数据采用 Origin Pro 8.5 进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

目前, 已从囊麦冬块根中分离出包括山麦冬皂苷 B 在内的 14 种结构的甾体皂苷^[24]。本试验以山麦冬皂苷 B 含量为示踪指标。

2.1.1 液料比对得率的影响 由图 2(a) 可知, 液料比对甾体皂苷含量影响较大。总体上看, 在设定的范围内液料比为 20 : 1 (mL/g) 时, 提取物中山麦冬皂苷 B 的含量最大, 达到 0.069 2 mg/mL。此时, 也意味着提取的甾体皂苷的含量最大。

2.1.2 超声处理温度对得率的影响 由图 2(b) 可知, 超声温度对山麦冬皂苷 B 的影响趋势与液料比的类似, 也是先增加后减小, 可能与囊麦冬块根中富含多糖有一定的关系, 在加热的情况下, 样品粉末自身携带的少量水分与富含多糖的块根粉末糊化, 形成胶体, 阻挡了部分甲醇与甾体皂苷分子的充分接触, 影响了甾体皂苷的进一步溶解。

2.1.3 超声处理时间对得率的影响 由图 2(c) 可以看出, 超声处理时间对甾体皂苷的提取含量的影响比较小, 提取物中山麦冬皂苷 B 的平均含量维持在 0.058 5 mg/mL 左右, 因此, 取 0.5 h 作为超声处理时间。

2.1.4 索氏提取时间对得率的影响 由图 2(d) 可知, 在 3 h 之前, 随着提取时间的延长, 山麦冬皂苷 B 的含量也随之提高, 达到 3 h 之后, 提取含量的增幅减小, 甾体皂苷的含量趋于稳定。因此, 考虑提取时间成本, 选择 3 h 作为最佳索氏提取时间。

2.2 响应面法试验结果

2.2.1 响应面法试验设计及结果 利用 Design-expert 软件,

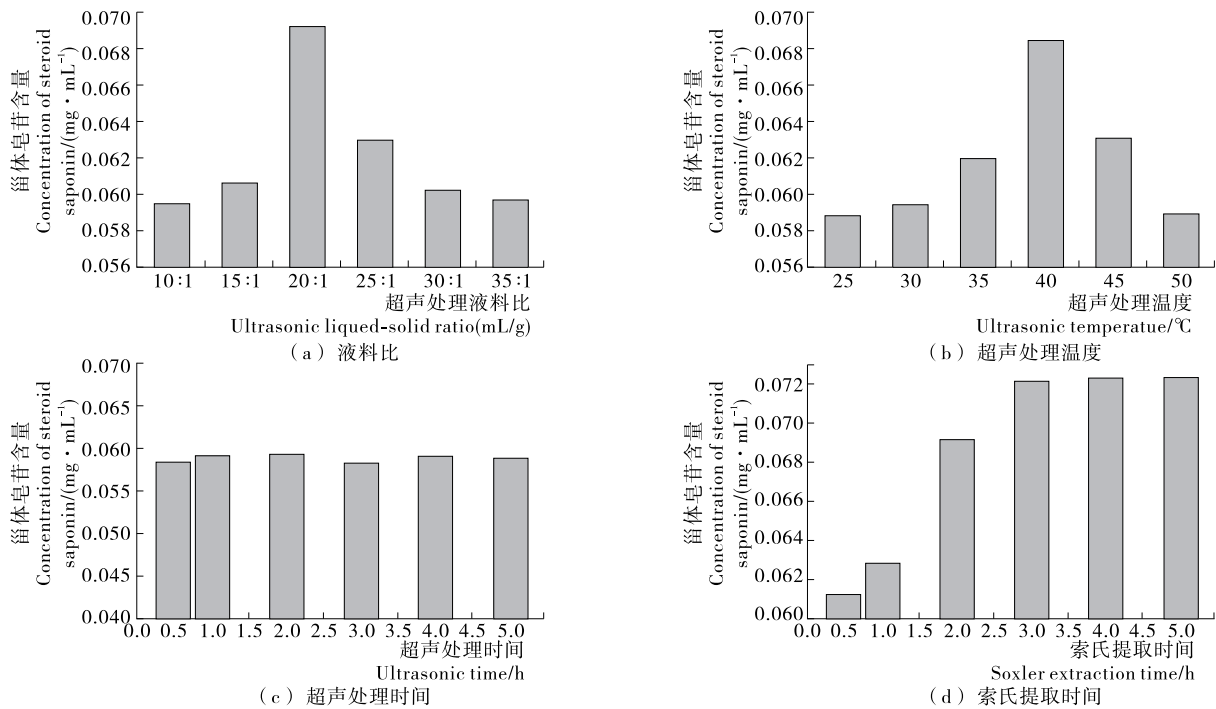


图2 处理因素对囊麦冬总甾体皂苷含量的影响

Figure 2 Effects of different treatment factors on contents of total steroid saponins from *L. spicata* var. *prolifera*

结合单因素试验结果,在超声处理 0.5 h 的基础上,选择液料比、超声处理温度、索氏提取时间 3 个为影响因素,分析各因素及因素间对提取物中山麦冬皂苷 B 含量的影响,试验设计及结果分别见表 1、2。

2.2.2 方差分析 利用软件对表 2 试验数据进行多元回归比拟,得出甾体皂苷含量(Y)对超声处理液料比、超声处理温度和索氏提取时间的二次多项回归方程为:

$$Y = -0.221\ 65 + 0.008\ 435A + 0.008\ 79B + 0.025\ 35C + 3E - 0.06AB - 0.000\ 485AC - 0.000\ 185BC - 0.000\ 182\ 5A^2 - 0.000\ 104\ 5B^2 - 0.001\ 262\ 5C^2.$$
 (5)

由表 3 可以看出,模型 $P = 0.000\ 3 < 0.01$,说明此回归模型极显著;失拟误差 $P = 0.797\ 1 > 0.05$,说明检验结果与模型计算结果不存在显著差异,相关系数 $R^2 = 0.964\ 2$,说明 96.42% 的试验数据的变异性可以用此回归模型解释,和实际情况拟合程度较好。因此,该方程可用于分析和预测囊麦冬块根总甾体皂苷的提取工艺。

2.2.3 主效应分析 对试验数据进行方差分析,结果见表 3。根据各因素变量的显著性检验,可以看出:C 因素的显著水平 $P < 0.01$,说明索氏提取时间对甾体皂苷含量的影响极显著;A 因素的显著水平 $P < 0.05$,说明超声液料比对甾体皂苷含量的影响显著;而 B 因素显著水平 $0.193\ 2 > 0.05$,即

表 2 Box-Behnken 的试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of Box-Behnken center composite

试验号	A	B	C	甾体皂苷含量/ (mg · mL ⁻¹)
1	1	0	1	0.069 3
2	0	1	1	0.070 8
3	0	0	0	0.073 3
4	0	0	0	0.072 1
5	0	0	0	0.074 1
6	-1	0	1	0.070 6
7	-1	-1	0	0.063 3
8	0	1	-1	0.066 8
9	1	-1	0	0.065 3
10	1	1	0	0.067 1
11	1	0	-1	0.067 2
12	-1	1	0	0.064 8
13	0	0	0	0.071 2
14	0	-1	1	0.071 9
15	0	-1	-1	0.064 2
16	-1	0	-1	0.058 8
17	0	0	0	0.070 8

超声处理温度对甾体皂苷含量的影响不显著,因此,各因素对甾体皂苷含量的影响主次顺序为:C>A>B。

2.2.4 两因素间的交互效应分析 保持 1 个因素为最优条件,对其它 2 个因素间的交互效应进行分析,它们与响应值的关系用三维空间响应面图和三维等高线图表示,具体见图 3。

图 3(a)、(b)显示的是超声处理温度与液料比对甾体皂苷含量的影响。随着温度和液料比的增加,甾体皂苷含量均

表 1 Box-Behnken 设计的因素水平表

Table 1 The level table of factors of Box-Behnken design

水平	A 液料比 (mL/g)	B 超声处理 温度/℃	C 索氏提取 时间/h
-1	15 : 1	35	1
0	20 : 1	40	2
1	25 : 1	45	3

表 3 各因素的回归系数及影响因子的显著性 [†]						
Table 3 Regression coefficients, impact factors and their significances						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.62E-04	9	2.91E-05	20.919 7	0.000 3	* *
A	1.62E-05	1	1.62E-05	11.687 1	0.011 2	*
B	2.88E-06	1	2.88E-06	2.071 9	0.193 2	
C	8.19E-05	1	8.19E-05	58.935 3	0.000 1	* *
AB	2.25E-08	1	2.25E-08	0.016 2	0.902 3	
AC	2.35E-05	1	2.35E-05	16.922 7	0.004 5	* *
BC	3.42E-06	1	3.42E-06	2.462 2	0.160 6	
A ²	8.76E-05	1	8.76E-05	63.056 1	<0.000 1	* *
B ²	2.87E-05	1	2.87E-05	20.674 5	0.002 6	* *
C ²	6.71E-06	1	6.71E-06	4.828 2	0.064 0	
残差	9.73E-06	7	1.39E-06			
失拟误差	1.99E-06	3	6.63E-07	0.342 8	0.797 1	不显著
纯误差	7.74E-06	4	1.94E-06			
总和	2.71E-04	16				

[†] *:P<0.05,显著;* *:P<0.01,极显著;R²=0.964 2。

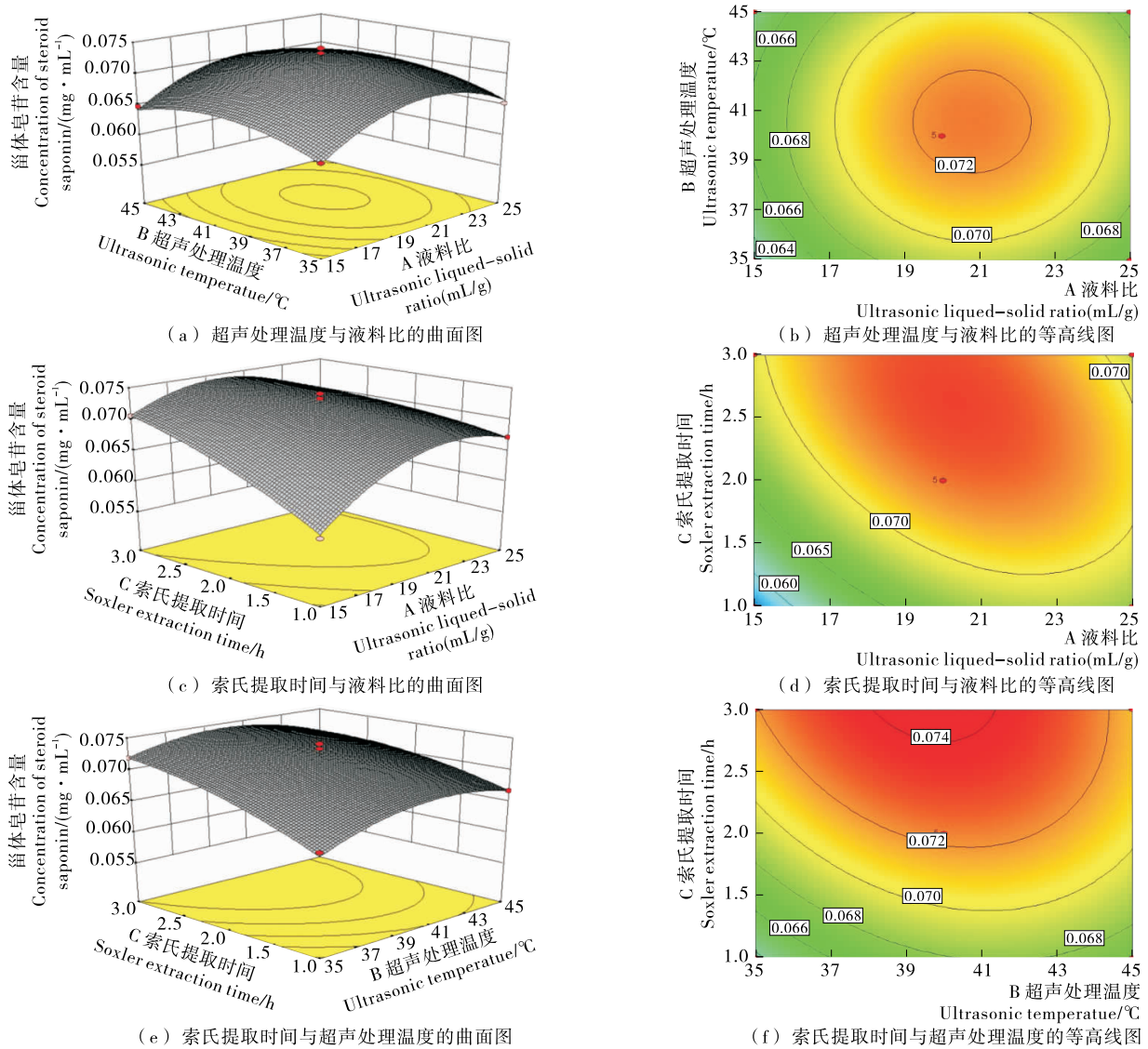


图 3 两因素间的交互效应分析

Figure 3 Surface figure analysis of interaction between two factors

有一个先逐渐升高后逐渐降低的过程。图 3(c)、(d)显示的是索氏提取时间与液料比对甾体皂苷含量的影响。当固定液料比在某一值时,随着索氏提取时间的延长,甾体皂苷含量逐渐升高;当固定索氏提取时间在某一值时,随着液料比的升高,甾体皂苷含量先增加后减少。图 3(e)、(f)显示的是索氏提取时间与超声处理温度对甾体皂苷含量的影响,它们之间的交互影响趋势与图 3(c)、(d)类似。

2.2.5 响应面最佳条件的选择及验证 利用软件对囊麦冬总甾体皂苷提取工艺进行响应面分析,得出最佳提取条件为:超声处理时间 0.5 h、液料比 19.45:1 (mL/g)、超声处理温度 39.68 °C、索氏提取时间 3 h,此时,提取物中甾体皂苷含量最高,达到 0.074 3 mg/mL。为了验证预测值是否准确,同时考虑到实际操作的便利,将最佳条件调整为:超声处理时间 0.5 h、液料比 19.5:1 (mL/g)、超声处理温度 39.7 °C、索氏提取时间 3 h。在此条件下,进行 3 次平行实验,结果测得的甾体皂苷含量为 0.073 8 mg/mL,与预测值相差 0.000 5,非常接近。这证明二次多元回归模型的预测值与实际值吻合良好,具有较高的可信度和实用价值。本试验主要考察响应面法在囊麦冬甾体皂苷提取条件上的优化应用,对样品采用甲醇溶解辅以超声处理、80 °C 索氏提取、萃取、减压浓缩和冷冻干燥等处理步骤,获得最佳工艺下的提取得率为 22.14%,比林韵涵等^[13]报道的通过正交试验优化的提取得率(18.67%)高出近 4%,证明采用响应面法优化可有效提高囊麦冬甾体皂苷的得率。

2.3 自由基清除活性的评价

通过体外测试,本试验发现囊麦冬甾体皂苷对 OH 自

由基、 O_2^- 自由基、DPPH 自由基以及 ABTS 自由基均具有一定清除活性,其清除能力均随甾体皂苷浓度的增高而增强,尤其是对 OH 自由基和 O_2^- 自由基,清除率均超过 50%。这表明囊麦冬甾体皂苷具有一定的天然抗氧化剂开发潜力。

2.3.1 清除 OH 自由基的活性测试 图 4(a)显示的是甾体皂苷对 OH 自由基的清除活性变化情况:在较低浓度范围内,清除率随着浓度的增加而急剧升高;但是当浓度达到一定数值后,清除率虽然仍随浓度的增加而升高,但是升高的趋势减缓,这种变化趋势与阳性对照生育酚类似。在设定的最高浓度为 1.28 mg/mL 时,清除率达到最高(59.66%),表明囊麦冬甾体皂苷对 OH 自由基具有较强的清除能力。

2.3.2 清除 O_2^- 自由基的活性测试 图 4(b)则反映的是甾体皂苷对 O_2^- 自由基的清除活性。不同浓度的囊麦冬甾体皂苷均对邻苯三酚自氧化反应有一定抑制作用,随着样品浓度的增加,清除率也上升,当浓度为设置的最高值 1.28 mg/mL 时,清除率最高,达到 52.3%。

2.3.3 清除 DPPH 自由基的活性测试 图 4(c)显示的是囊麦冬甾体皂苷对 DPPH 自由基的清除活性。虽然随着样品浓度的升高而呈逐步加强的趋势,但是总体上看,相较于阳性对照生育酚,其清除能力并不强,在设置的最高浓度 1.28 mg/mL 时,清除率也仅为 10.5%。

2.3.4 清除 ABTS 自由基的活性测试 由图 4(d)可知,同清除 DPPH 自由基活性一样,囊麦冬甾体皂苷对 ABTS 自由基的清除能力也较弱,在设置的最高浓度 1.28 mg/mL 时,清除率也仅为 28.7%。

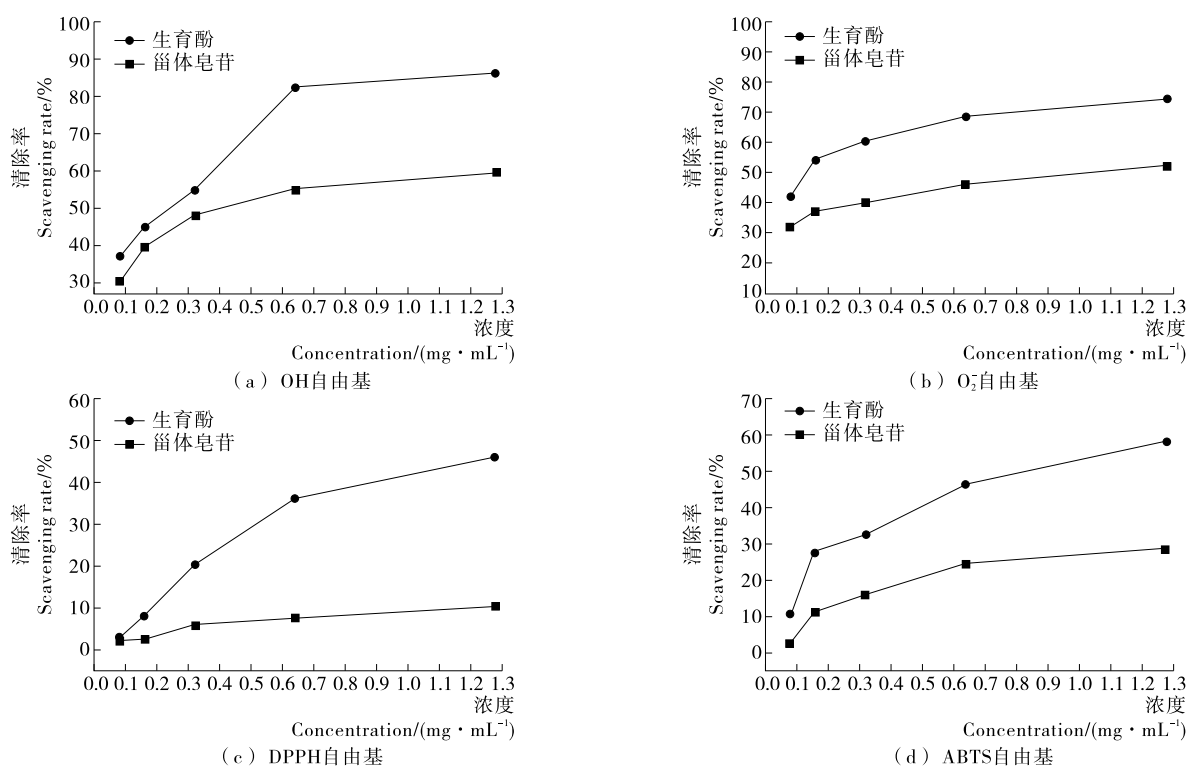


图 4 囊麦冬甾体皂苷对不同自由基的体外清除活性评价

Figure 4 Scavenging activity of steroidal saponins on different free radicals from *L. spicata* var. *prolifera*

3 结论

本试验以湖北道地药材——襄麦冬块根为研究材料, 采用响应面法优化了总甾体皂苷提取工艺, 并对提取物的体外清除自由基能力进行了评价。结果表明, 当采用超声处理时间 0.5 h、液料比 19.5:1 (mL/g)、超声处理温度 39.7 °C、索氏提取时间 3 h 处理襄麦冬块根粉碎物时, 提取物中甾体皂苷含量最高, 此时, 山麦冬皂苷 B 可达到 0.073 8 mg/mL, 即 30 mL 的提取物溶液中山麦冬皂苷 B 的含量为 2.21 mg, 提取率达到 22.14%。

此外, 抗氧化活性测试也表明, 襄麦冬甾体皂苷对 OH 自由基、O₂⁻ 自由基、DPPH 自由基以及 ABTS 自由基均具有一定的体外清除能力, 且清除活性与甾体皂苷的浓度呈线性关系。尤其对 OH 自由基和 O₂⁻, 在设定的最高浓度 (1.28 mg/mL) 时, 清除率均超过 50%, 分别达到 59.66% 和 52.3%。

本试验对襄麦冬甾体皂苷所做的提取工艺优化, 仅仅是采用响应面法进行的前期实验室研究, 考虑到工业生产应用实际, 下一步的工作将从提取、分离、纯化融合工艺参数优化, 以及降低生产成本等方面展开, 以期能建立一套产能高、成本低的成熟生产工艺。

参考文献

- [1] 刘星, 余江丽, 刘敏, 等. 近 10 年甾体皂苷的生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2 518-2 523.
- [2] 张伟, 宋文静, 武嘉庚, 等. UPLC-MS/MS 法检测妇康宁片中掺加的山麦冬[J]. 中成药, 2017, 39(4): 867-869.
- [3] 吴发明, 杨瑞山, 李敏, 等. 麦冬主流品种药材质量比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(6): 447-451.
- [4] 吴发明, 张思获, 曾俊, 等. HPLC-ELSD 法测定不同产地麦冬中 4 种代表性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1 370-1 376.
- [5] 陈乃东, 陈琼, 何健. 高效毛细管电泳法拆分 25R、25S 鲁斯可皂苷元初步研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 805-812.
- [6] 吴弢, 余伯阳, 程志红, 等. HPLC-ELSD 法测定湖北麦冬中主要皂苷的含量[J]. 中草药, 2000, 31(3): 175-177.
- [7] 林以宁, 朱丹妮, 寇俊萍, 等. 麦冬类药材皂苷元含量与其抑制中性粒细胞呼吸爆发的相关性[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 549-552.
- [8] 王小刚. 湖北麦冬种植优化和遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011: 25-30.
- [9] 兰宏昌. 多效唑应用于湖北麦冬种植的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010: 46-48.
- [10] 朱业芹. 湖北麦冬关键种植技术研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007: 28, 35, 39.
- [11] 刘霞. 湖北麦冬规范化种植及其提取物的降血糖作用研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009: 41-44.
- [12] 刘霞, 张安萍, 孙江桥, 等. 湖北麦冬不同提取物降血糖作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(9): 719-721.
- [13] 林韵涵, 李崇明, 李晓东, 等. 湖北麦冬有效部位总皂苷的提取纯化工艺研究[J]. 中药材, 2013, 36(5): 803-806.
- [14] 刘霞, 张琼光, 向阳, 等. 大孔吸附树脂同步提取湖北麦冬总多糖和总皂苷[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1 235-1 236.
- [15] 聂伦, 熊尚森, 余海忠. 襄麦冬不同极性部位粗提物抗氧化性能初步评价[J]. 山地农业生物学报, 2013, 32(1): 32-34, 51.
- [16] 葛智超, 陈宏伟, 朱蕴兰, 等. 富锗金针菇菌丝体多糖的分离纯化及对自由基的清除能力[J]. 农业工程, 2017, 7(3): 100-104, 112.
- [17] 祁小妮, 马晓红, 李振亮, 等. 响应曲面优化丹参多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 南方农业学报, 2016, 47(11): 1 926-1 931.
- [18] 邹光友. 麦冬须根食用的综合开发利用[J]. 食品科学, 1992(2): 33-36.
- [19] 陈开霜, 陈美芳, 于博, 等. 转谷氨酰胺酶在凝固型麦冬酸奶中的应用研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(9): 158-162.
- [20] 周婷, 刘统, 林丹洁, 等. 鱼腥草甲醇提取物体外抗氧化性及抑菌活性评价[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(1): 87-90.
- [21] 陈留勇, 孟宪军, 贾薇, 等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基、提高免疫活性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 167-170.
- [22] 余海忠, 刘统, 林丹洁, 等. 鄂西北产鱼腥草提取物体外抗氧化性的四种化学方法评价[J]. 中国野生植物资源, 2012, 31(1): 22-25.
- [23] 白海娜, 王振宇, 刘瑞海, 等. 白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 64-68.
- [24] YU Bo-yang, QIU Sheng-xiang, ZAW Kyaw, et al. steroidal glycosides from the subterranean parts of *Liriope spicata* var. *prolifera*[J]. Phytochemistry, 1996, 43(1): 201-206.
- [6] 王栋, 陶乐仁, 刘训海. 隔断装置对冷风机电热融霜影响的实验研究[J]. 制冷学报, 2014, 35(6): 81-95.
- [7] 申江, 路坤仑, 李慧杰, 等. 附加保温融霜装置的冷风机融霜实验研究[J]. 制冷学报, 2014, 35(4): 104-107.
- [8] 刘训海, 姜敬德, 朱华, 等. 低温冷库电热融霜与热气融霜的对比试验研究[J]. 制冷学报, 2009, 30(3): 58-62.
- [9] XIA Yan-ping, ZHONG Yong-fang, HRNJAK P S, et al. Frost, defrost, and refrost and its impact on the air-side thermal-hydraulic performance of louvered-fin, flat-tube heat exchangers[J]. International Journal of Refrigeration, 2006, 29(7): 1 066-1 079.
- [10] WANG Dong, JIANG Jing-de, TAO Le-ren, et al. Experimental investigation on a novel cold storage defrosting device based on electric heater and reverse cycle[J]. Applied Thermal Engineering, 2017, 127: 1 267-1 273.
- [11] 王栋, 陶乐仁. 有无隔断装置对冷风机热气融霜的影响[J]. 低温与超导, 2014, 42(2): 56-61.
- [12] MELO C, KNABBEN F T, PEREIRA P V. An experimental study on defrost heaters applied to frost-free household refrigerators[J]. Applied Thermal Engineering, 2013, 51(1/2): 239-245.
- [13] 王剑, 臧润清. 液体冷媒融霜制冷系统融霜过程制冷温度变化规律的实验研究[J]. 制冷学报, 2013, 34(3): 91-95.
- [14] SONG Meng-jie, DENG Shi-ming, XIA Liang. A semi-empirical modeling study on the defrosting performance for an air source heat pump unit with local drainage of melted frost from its three-circuit outdoor coil[J]. Applied Energy, 2014, 136: 537-547.

(上接第 102 页)