

黄精皂苷与多糖超声辅助提取工艺优化 及降血糖活性研究

Study on the technology of ultrasonic assisted combined extraction
of saponins and polysaccharides from *Polygonatum sibiricum*
and its hypoglycemic activity

谢冰宗¹ 李 密² 董彩文¹ 王 鑫³ 刘 菡³ 马艳莉²

XIE Bingzong¹ LI Mi² DONG Caiwen¹ WANG Xin³ LIU Han³ MA Yanli²

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450000; 2. 南阳理工学院张仲景国医国药学院,
河南 南阳 473000; 3. 河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071000)

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou,
Henan 450000, China; 2. Zhang Zhongjing School of Chinese Medicine, Nanyang Institute of
Technology, Nanyang, Henan 473004, China; 3. College of Food Science and Technology,
Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China)

摘要:目的:以黄精为原料,开发高效协同提取黄精皂苷(*Polygonatum sibiricum* sponins, PSSs)和多糖(*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSPs)的工艺,并考察提取物及其复合物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制活性。方法:采用超声波法辅助复合酶解提取PSSs和PSPs,考察超声料液比、超声时间、超声温度、酶解时间、酶添加量、酶解料液比、热水提取温度及热水提取时间等因素对PSSs、PSPs得率的影响,并利用Box-Behnken试验进行优化。结果:PSSs和PSPs的最佳协同提取工艺条件为超声温度50℃,超声时间50min,超声料液比1:25(g/mL),酶解时间2h,酶添加量3.053U/g,酶解料液比1:25(g/mL),热水提取温度80℃,热水提取时间1h,此条件下,两步提取PSSs总得率为12.22%,PSPs得率为27.07%;PSSs和PSPs对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶活性均具有抑制作用,且二者复合后仍具有较好的抑制作用。结论:经优化后获得了黄精皂苷和多糖高效协同提取的工艺条件,且与单一组分相

比,二者复合后降血糖活性有所提高。

关键词:黄精皂苷;黄精多糖;超声波法;酶解;降血糖活性

Abstract: Objective: With the *Polygonatum sibiricum* as raw material, to develop a process for the combined extraction of *Polygonatum sibiricum* sponins (PSSs) and polysaccharides (PSPs), and the inhibitory activities of the extract and their complexes (PSSs-PSPs) on α -glucosidase and α -amylase were investigated. **Methods:** PSSs and PSPs were performed using ultrasound combined with enzymatic hydrolysis. The effects of solid-liquid ratio, ultrasonic time, and ultrasonic temperature on the yield of PSSs, the types of multi-enzymes, the proportion of complex enzymes, enzymolysis time, enzyme dosage, solid-liquid ratio, hot water extraction time, and hot water extraction temperature on the yield of PSPs were investigated, and the Box-Behnken experiment design was used to optimize the extraction of PSSs and PSPs. **Results:** The optimum extraction parameters of PSSs and PSPs were as follows: ultrasonic temperature was 50℃, ultrasonic time was 50 min, ultrasonic solid-liquid ratio was 1:25 (g/mL), enzymolysis time was 2 h, enzyme dosage was 3.053 U/g, solid-liquid ratio was 1:25 (g/mL), hot water extraction temperature was 80℃, and hot water extraction time was 1 h. Under the control of these conditions, the total yield of PSSs and PSPs was 12.22% and the 27.07%. The inhibitory activities of the extract and their complexes (PSSs-PSPs) on α -glucosidase and α -amylase were verified, and their complexes also have a good inhibitory effect on those enzymes. **Conclusion:**

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:32101960);河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(编号:2020GGJS226);南阳市协同创新重大专项项目(编号:21XTCX12005)

作者简介:谢冰宗,男,郑州轻工业大学在读硕士研究生。

通信作者:马艳莉(1982—),女,南阳理工学院教授,博士。

E-mail: myl_dz@sina.com

收稿日期:2023-05-05 **改回日期:**2023-11-01

The process conditions for the efficient synergistic extraction of polygonatin and polysaccharide were obtained after optimization. Compared with a single component, the hypoglycemic activity of their complexes was improved.

Keywords: *Polygonatum sibiricum* saponins (PSSs); *Polygonatum sibiricum* polysaccharides (PSPs); ultrasonic method; enzymatic hydrolysis; hypoglycemic activity

黄精(*Polygonatum sibiricum*)为药食同源植物,主要分布在北半球温带地区,中国的华北、华中、华南等地均有分布^[1]。黄精根茎中富含多种活性成分,如多糖、皂苷、生物碱、三萜、木脂素、类黄酮等^[2],具有抗脂肪肝、抗糖尿病、保护肾脏、保护神经、增强免疫力、抗炎、抗癌等作用^[3]。目前,市场上只有小部分黄精用于活性物质开发等方面,存在黄精产业发展不平衡、资源利用不充分等问题^[4]。

黄精多糖(*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSPs)是黄精中含量最多的活性物质,具有增强免疫力、抗糖尿病和抗菌抗炎等作用,还可调节相关蛋白表达,减少氧化应激,发挥抗衰老作用^[5-8]。黄精皂苷(*Polygonatum sibiricum* saponins, PSSs)是黄精中另一主要活性物质,主要包括甾体皂苷类和三萜皂苷类化合物,具有抗糖尿病、调节免疫、抑制癌细胞增值和诱导凋亡等作用^[9-11]。PSPs和PSSs因具有多种功能活性,且对人体低毒副作用,在食品和医药工业生产等领域应用前景广阔。

目前,关于PSPs或PSSs的提取方法较多。其中,PSPs的水提醇沉法提取率能达到19.87%^[12],而新技术的加入(如超高压法和超声辅助酶法)可将其得率提升至25%左右^[13-14]。PSSs的提取方法有生物酶法^[15]、浸渍法^[16]、闪式提取法^[17]等,其中生物酶法的得率最高。目前,大部分研究均主要关注单一活性物质的提取,关于协

同提取二者以及二者复合后的降糖活性的研究尚未见报道。研究拟通过超声波辅助处理黄精原料的同时进行PSSs的第一步提取,后以剩余残渣作为原料,在超声辅助下利用纤维素酶和木瓜蛋白酶解提取PSPs,并对PSSs进行二次提取,利用两种酶的酶解效果,以期提高二者得率。采用响应面法优化超声波法协同提取PSSs和PSPs的工艺条件,并通过对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的抑制能力评价PSSs、PSPs及其复合物(PSSs-PSPs)的体外降糖活性,以为黄精功能成分的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄精:一蒸一晒,经鉴定为百合科黄精属植物黄精(*Polygonatum sibiricum*),河南联源生物科技股份有限公司;

人参皂苷Rb1标准品、香草醛(分析纯)、无水葡萄糖标准品、阿卡波糖、 α -淀粉酶(46.6 U/mg):上海源叶生物科技有限公司;

无水乙醇、浓硫酸、苯酚:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

纤维素酶:10万U/g,山东隆科特酶制剂有限公司;

木瓜蛋白酶:10万U/g,南宁庞博生物工程有限公司;

α -葡萄糖苷酶:50 U/mg,南京都莱生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PSSs和PSPs联合提取 联合提取工艺见图1。

1.2.2 酶的选择 精密称取1g黄精粉末,加入适量蒸馏水并调节pH,分别加入3000 U/g的纤维素酶、木瓜蛋白酶、纤维素酶-木瓜蛋白酶复合物($m_{\text{纤维素酶}}:m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 为1:1),单酶酶解条件参照产品说明书,复合酶解条件参

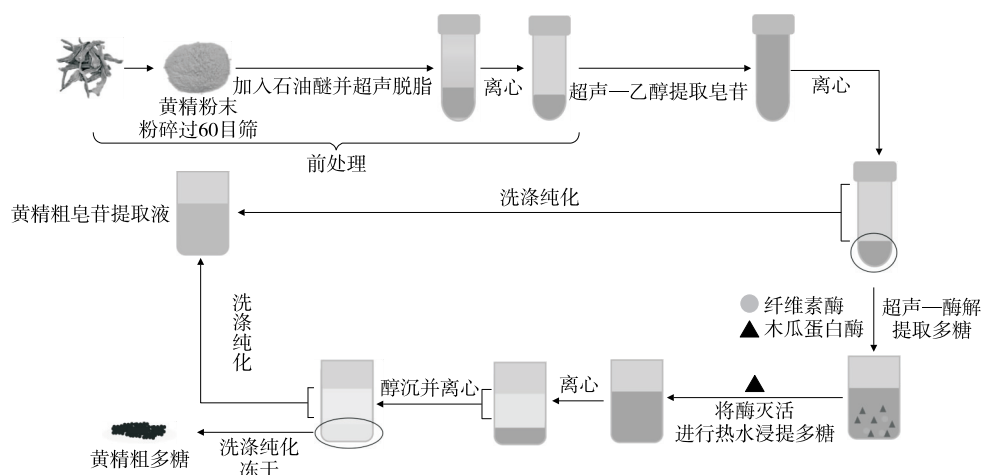


图1 PSSs和PSPs的协同提取工艺流程^[18]

Figure 1 Simultaneous extraction process of PSSs and PSPs

照文献[19—20],取 PSPs 沉淀定容至 100 mL,测定并比较上清液中 PSPs 得率,确定酶种类。

1.2.3 复合酶比例的选择 根据酶种类筛选结果,固定总加酶量为 3 000 U/g,考察 m 纤维素酶 : m 木瓜蛋白酶 分别为 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1 时,复合酶比例对酶解效果的影响。

1.2.4 联合提取单因素试验

(1) PSSs 提取单因素试验:分别考察超声料液比 [1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 25, 1 : 30 (g/mL)]、超声温度 (40, 45, 50, 55, 60 °C)、超声时间 (30, 35, 40, 45, 50 min) 对 PSSs 得率的影响。

(2) PSPs 提取单因素试验:分别考察酶解时间 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h)、酶解料液比 [1 : 15, 1 : 20, 1 : 25, 1 : 30, 1 : 35 (g/mL)]、酶添加量 (1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000 U/g)、热水浸提时间 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h)、热水浸提温度 (75, 80, 85, 90, 95 °C) 对粗 PSPs 得率的影响。

1.2.5 PSSs 和 PSPs 联合提取的响应面优化试验

(1) PSSs 提取的响应面优化试验:依据单因素试验,以超声温度、料液比和超声时间为影响因素,以 PSSs 得率为指标进行三因素三水平响应面优化试验。

(2) PSPs 提取的响应面优化试验:依据单因素试验,以酶解时间、酶添加量、酶解料液比为因素,以 PSPs 得率为指标进行三因素三水平响应面优化试验。

1.2.6 PSSs、PSPs 得率测定

(1) PSSs 得率:参照中国药典^[1]并加以调整。精密移取配制好的人参皂苷 Rb1 标准溶液 (1 mg/mL) 各 0.03, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, 0.21 mL 于 10 mL 试管中,60 °C 水浴挥干溶剂,加入 8% 香草醛—甲醇溶液 0.5 mL 和浓硫酸 5 mL,60 °C 水浴 10 min,冰水浴 10 min,测定 560 nm 处吸光度,绘制标准曲线方程为 $Y = 0.6438X + 0.0034$ ($R^2 = 0.9939$),并测定稀释后样品 PSSs 含量在 0~0.21 mg 范围内的线性关系。按式(1)计算提取液中 PSSs 得率。

$$Y = \frac{C_1 \times V_1}{m} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y ——提取物得率, %;

C_1 ——根据回归方程计算的样品溶液质量浓度, mg/mL;

V_1 ——提取液体积, mL;

m ——样品原料质量, mg。

(2) PSPs 得率:精密移取 D -无水葡萄糖对照品溶液 (0.112 mg/mL) 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL 于 10 mL 容量瓶中,定容。取 1 mL 溶液,加入 6% 苯酚 1 mL 和浓硫酸 5 mL,测定 490 nm 处吸光度,绘制标准曲线(方程为 $Y =$

$13.899X - 0.0027$, $R^2 = 0.999$),并测定稀释后样品 PSPs 含量在 0~0.056 mg/mL 范围内的线性关系。按式(1)计算 PSPs 得率。

1.2.7 降糖活性测定 分别制备质量浓度为 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL 的 PSSs、PSPs、PSSs-PSPs ($m_{PSSs} : m_{PSPs}$ 为 1 : 2) 样品溶液,并以 6 mg/mL 的阿卡波糖为阳性对照溶液进行降糖活性测定。

(1) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力:参照刘勇等^[21]的方法稍作改动。将 50 μ L 不同浓度的各样品溶液加入到 100 μ L 含有 α -葡萄糖苷酶 (3 U/mL) 溶液的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 5.5) 中,37 °C 孵育 10 min,加入 50 μ L 的对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (5 mmol/L),37 °C 孵育 60 min,加入 50 μ L Na_2CO_3 (1 mol/L) 终止反应,测定 405 nm 处吸光度。所有操作在 96 孔板中进行,所有溶液均使用 pH 为 5.5 (0.1 mol/L) 的 PBS 配制或稀释。对照组以等量的 PBS 替换样品添加,空白对照组中无酶无样品,空白样品组为 PBS 等量替换酶液添加,以阿卡波糖为阳性对照。按式(2)计算 α -葡萄糖苷酶抑制率。

$$R = \left(1 - \frac{\Delta A_2}{\Delta A_1}\right) \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——酶抑制率, %;

ΔA_1 ——对照组和空白对照组吸光度之差;

ΔA_2 ——样品组和空白样品组的吸光度之差。

(2) 对 α -淀粉酶的抑制能力:参照李云姣等^[22]的方法并改动。取 0.5 mL 样品与 0.5 mL α -淀粉酶溶液 (6.5 U/mL) 于 37 °C 下混合孵育 10 min,加入 0.5 mL 可溶性淀粉溶液 (1%),37 °C 孵育 10 min,加入 1 mL DNS 试剂混匀,沸水浴 10 min,迅速冷水浴 5 min,加入 10 mL 蒸馏水,测定 540 nm 处吸光度。所有溶液均使用 pH 为 6.9 的 PBS (0.02 mol/L, 含 0.006 mol/L NaCl) 配制或稀释。对照组以等量的 PBS 替换样品添加,空白对照组中无酶无样品,空白样品组为 PBS 等量替换酶液添加,以阿卡波糖为阳性对照。按式(2)计算 α -淀粉酶抑制率。

1.2.8 数据处理 采用 Design-Expert 13 软件进行响应面设计与分析,采用 SPSS 软件进行数据分析,采用 Origin 2021 软件作图;所有试验重复 3 次取平均值,字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 酶种类对 PSPs 得率的影响

由图 2 可知,复合酶处理的提取效果优于单一酶处理的,可能与两种酶的协同作用及 PSPs 在植物细胞内的存在状态有关。纤维素酶主要破坏植物细胞壁,去除植物细胞的保护屏障,而后细胞破裂,内物流出;木瓜蛋白酶分解了糖蛋白中的蛋白质,PSPs 得到释放,提高了

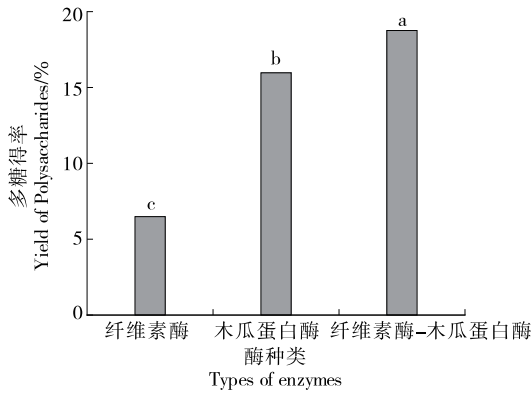


图2 酶种类对PSPs得率的影响

Figure 2 Effects of different enzyme species on extraction of PSPs

PSPs得率。综上,选择纤维素酶和木瓜蛋白酶构建复合酶提取PSPs。

2.2 复合酶比例对PSPs得率的影响

由图3可知,当 $m_{\text{纤维素酶}} : m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 为 3 : 7 时,PSPs得率最高,说明复合酶中木瓜蛋白酶起主要作用。因此,后续试验中选择 $m_{\text{纤维素酶}} : m_{\text{木瓜蛋白酶}}$ 为 3 : 7。

2.3 PSSs和PSPs协同提取单因素试验

2.3.1 PSSs提取单因素试验 由图4(a)可知,随着超声料液比的增加,PSSs得率先升高后降低,在超声料液比为 1 : 25 (g/mL)时达到最大值(2.39%),且与超声料液比为 1 : 20, 1 : 30 (g/mL)的相比差异显著 ($P < 0.05$)。这可能是因为随着超声料液比的增大,物料与溶剂的接触面积不断增大,有利于PSSs的浸出,但由于物料中PSSs含量有限,且存在其他醇溶杂质,导致在乙醇添加量较大时,会有其他醇溶杂质不断溶出,杂质增多,导致PSSs得率下降。故选择超声料液比 1 : 25 (g/mL)为中心点进行后续研究。

由图4(b)可知,随着超声温度的增加,PSSs得率整体呈先上升后下降趋势。当超声温度为 50 °C时,PSSs得率达到最高(2.87%),与超声温度为 45 °C的相比差异显著

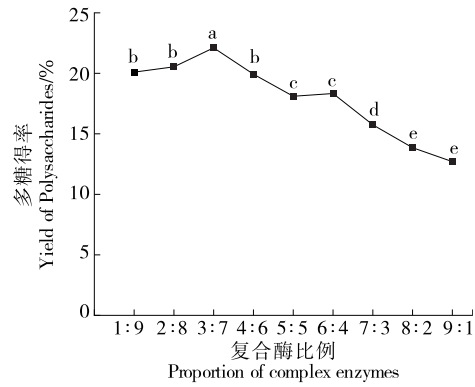


图3 复合酶比例对PSPs得率的影响

Figure 3 Effects of different the ratio of the compound enzyme on extraction of PSPs

著 ($P < 0.05$)。而超声温度为 45, 55, 60 °C 的得率差异不显著 ($P < 0.05$),可能是 50 °C 之后的高温破坏了 PSSs 结构,且溶液黏度显著变大,不利于 PSSs 的提取。因此,后续试验中选择超声温度为 50 °C。

由图4(c)可知,随着超声时间的延长,PSSs得率先上升后下降,在 40 min 时达到最高(2.62%),与超声时间为 30, 50 min 的相比差异显著 ($P < 0.05$),可能是超声时间的增加使黄精粉末与乙醇溶液接触更充分,促进了PSSs的溶出,但处理时间过长,分子量较大、不稳定的PSSs易发生分解,且伴随其他醇溶物质的溶出,从而降低了PSSs得率。因此,选择超声时间 40 min 进行后续试验。

2.3.2 PSPs提取单因素试验 由图5(a)可知,随着酶解时间的延长,PSPs得率先上升后下降,在酶解时间为 2 h 时达最大值 21.56%。当酶解时间 > 2 h 时,PSPs得率下降,与 2 h 时相比具有显著性差异 ($P < 0.05$)。这可能是酶解时间过长,酶催化活性减弱,同时PSPs也发生了部分水解^[23]。因此,选用 2 h 作为后续酶解时间。

由图5(b)可知,PSPs得率随酶解料液比的增加先上升后下降,当酶解料液比为 1 : 25 (g/mL)时,PSPs得率

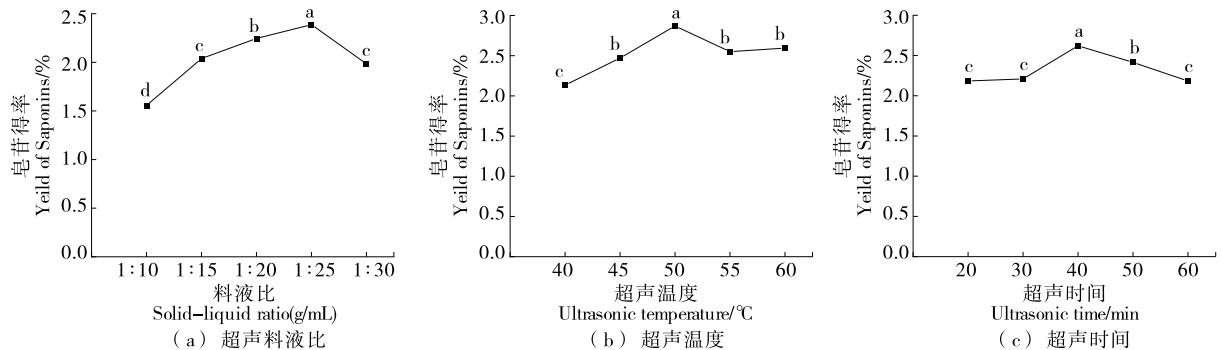


图4 PSSs提取单因素试验结果

Figure 4 Results of single factor test for extraction of PSSs

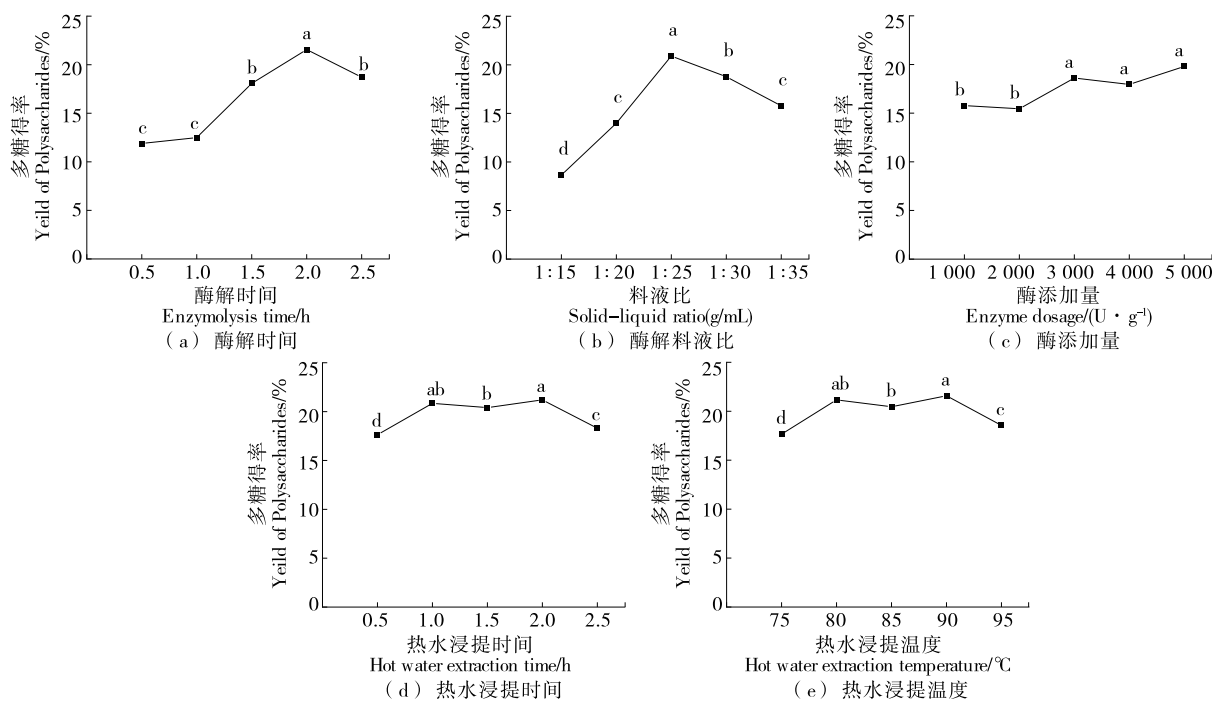


图 5 PSPs 提取单因素试验结果

Figure 5 Results of single factor test for extraction of PSPs

最高为 20.9%，与酶解料液比为 1 : 15, 1 : 20 (g/mL) 的相比差异显著 ($P < 0.05$)；而后随着酶解料液比的增加，PSPs 得率又明显降低，与 1 : 25 (g/mL) 的相比差异显著 ($P < 0.05$)。这可能是随着溶剂的增加，酶与底物的接触面积也逐渐增加，能更好地促进酶与底物反应，但酶解料液比太大时会带来能量损失，降低酶解效果，溶液浓度过低也会减弱超声波对物料的机械作用^[24]。因此，选择酶解料液比为 1 : 25 (g/mL) 进行后续试验。

由图 5(c) 可知，随着酶添加量从 1 000 U/g 增加到 3 000 U/g，PSPs 得率显著增加，当酶添加量为 3 000 U/g 时，PSPs 得率为 18.61%，进一步增加酶添加量至 4 000, 5 000 U/g 时，与酶添加量为 3 000 U/g 时的相比差异不显著 ($P > 0.05$)，说明此时复合酶已达到饱和状态。因此，结合实际生产中的成本控制因素，选择酶添加量 3 000 U/g 进行后续试验。

由图 5(d) 可知，随着热水浸提时间从 0.5 h 增加至 1.0 h，PSPs 得率显著提高，达到 20.85%，进一步延长热水浸提时间，PSPs 得率变化不大，且与 1.0 h 的相比差异不显著 ($P > 0.05$)，但继续延长热水浸提时间至 2.5 h 时，得率又明显下降。这可能是浸提时间过短，PSPs 溶解不充分^[25]，随着浸提时间的增加，经酶解释放的 PSPs 逐步溶解，浸提时间过长时，部分 PSPs 结构被破坏，得率降低。因此，结合实际生产效率，选择 1.0 h 作为最佳热水浸提时间。

由图 5(e) 可知，随着热水浸提温度从 75 °C 升高到 80 °C，PSPs 得率达 21.17%，而后随着热水浸提温度的升

高，PSPs 得率变化不大，且二者之间差异不显著 ($P > 0.05$)；继续升高热水浸提温度至 95 °C 时，PSPs 得率显著减小。这可能是随着热水浸提温度的升高，PSPs 的溶解量逐渐升高，当酶解释放的 PSPs 完全溶解时，在一定浸提温度范围内得率变化不大，而后过高的浸提温度会破坏 PSPs 的结构，导致得率降低。因此，选择 80 °C 作为最佳浸提温度。

2.4 响应面优化试验

2.4.1 PSSs 提取的响应面试验 基于单因素试验结果，选取超声温度、超声料液比、超声时间为自变量，以 PSSs 得率为响应值优化 PSSs 的最佳提取工艺条件。PSSs 响应面试验因素水平见表 1，试验设计及结果见表 2。

通过 Design-Expert 13 软件分析得到回归模型方程为：

$$Y = 3.04 + 0.016 9A + 0.057 1B - 0.006 3C - 0.048 2AB - 0.009 7AC + 0.003 4BC - 0.256 9A^2 - 0.485 7B^2 - 0.397 2C^2 \quad (3)$$

由表 3 可知，模型 $P < 0.001$ ，极显著；失拟项 $P = 0.818$ ，不显著； $R^2 = 0.955 9$ ， $R^2_{Adj} = 0.899 3$ ，表明该模型具有较高的可信度。因素 A^2 、 B^2 、 C^2 对 PSSs 得率影响极显著 ($P < 0.01$)，其余各因素均不显著。根据 F 值可知，各因素对 PSSs 得率的影响顺序为 $B^2 > C^2 > A^2$ 。各因素之间的交互作用对响应值影响的响应面如图 5 所示。

经模型分析，PSSs 的最佳提取工艺条件为超声温度 50.14 °C，超声料液比 1 : 25.289 (g/mL)，超声时间，

49.921 min此条件下 PSSs 得率为 3.04%。根据实际应用,将最佳工艺条件修正为超声温度 50℃,超声料液比

1:25 (g/mL),超声时间 50 min,测得 PSSs 平均得率为 (3.16±0.12)% (n=3),与理论值相对误差为 3.95%,说明该模型有效可靠,工艺可行。

表 1 PSSs 提取响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of PSSs extraction response surface test

水平	A 超声温度/℃	B 超声料液比 (g/mL)	C 超声时间/min
-1	45	1:20	40
0	50	1:25	50
1	55	1:30	60

表 2 PSSs 提取响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface test of extraction of PSSs

试验号	A	B	C	PSSs 得率/%
1	0	0	0	2.885 32
2	0	0	0	2.992 41
3	0	0	0	3.040 03
4	-1	0	1	2.395 75
5	0	1	1	2.233 86
6	0	-1	-1	2.091 66
7	1	0	1	2.414 66
8	-1	0	-1	2.342 28
9	-1	-1	0	2.223 16
10	1	-1	0	2.349 04
11	1	1	0	2.279 82
12	-1	1	0	2.346 70
13	0	-1	1	2.025 75
14	0	1	-1	2.286 22
15	0	0	0	3.273 47
16	0	0	0	3.020 26
17	1	0	-1	2.399 94

2.4.2 PSPs 提取的响应面试验 基于单因素试验结果,选取酶解时间、酶添加量、酶解料液比 3 个因素为自变量,以 PSPs 得率为响应值优化 PSPs 提取工艺。PSPs 响应面试验因素水平见表 4,试验设计及结果见表 5。

通过 Design-Expert 13 软件分析得到回归模型方程为:

$$Y = 26.64 + 0.628 6A + 0.541 5B - 0.257 1C - 0.115 8AB + 0.781 0AC + 0.561 0BC - 4.89A^2 - 2.27B^2 - 0.796 4C^2. \quad (4)$$

表 3 PSSs 响应面试验方差分析†

Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial of saponins

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.180 0	9	0.242 5	16.870 0	0.000 6	**
A	0.002 3	1	0.002 3	0.159 8	0.701 2	
B	0.026 1	1	0.026 1	1.820 0	0.219 8	
C	0.000 3	1	0.000 3	0.021 8	0.886 8	
AB	0.009 3	1	0.009 3	0.646 3	0.447 9	
AC	0.000 4	1	0.000 4	0.026 1	0.876 2	
BC	0.000 0	1	0.000 0	0.003 2	0.956 5	
A ²	0.277 9	1	0.277 9	19.340 0	0.003 2	**
B ²	0.993 3	1	0.993 3	69.110 0	<0.000 1	**
C ²	0.664 4	1	0.664 4	46.220 0	0.000 3	**
残差	0.100 6	7	0.014 4			
失拟项	0.019 6	3	0.006 5	0.321 6	0.810 8	
纯误差	0.081 1	4	0.020 3			
总和	2.280 0	16				

† ** P<0.01 极显著; R²=0.955 9; R_{adj}²=0.899 3; CV=4.78%。

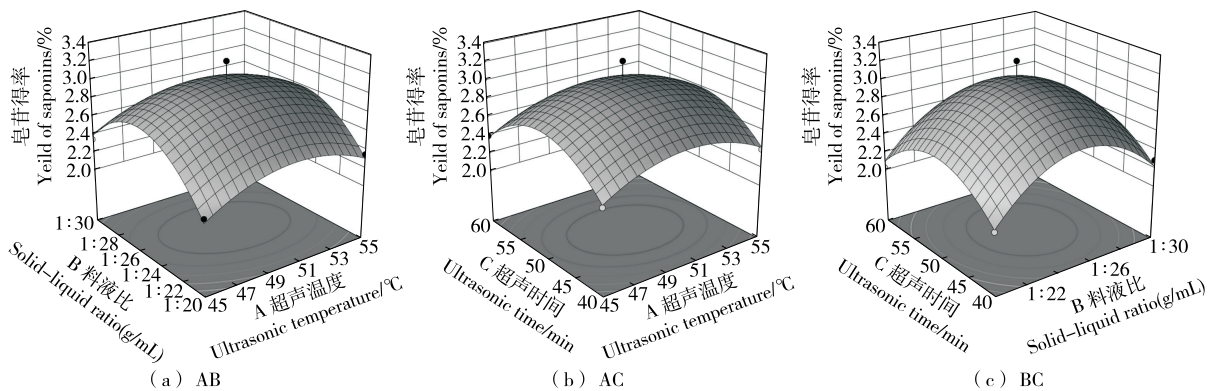


图 6 各因素交互作用对 PSSs 得率影响的响应面图

Figure 6 Interactions of various factors on the yield of PSSs

由表 6 可知,模型 $P < 0.001$,极显著,失拟项 $P = 0.494 8$,不显著; $R^2 = 0.950 1$, $R_{adj}^2 = 0.886 0$,表明该模型真实可靠具有可信度。由 F 值可知,因素 A^2 、 B^2 对 PSPs

得率的影响极显著($P < 0.01$),其余各因素均不显著。各因素之间的交互作用对响应值影响的响应面如图 6 所示。

通过模型分析,PSPs 提取的最佳工艺条件为酶解时间 2.01 4 h,酶添加量 3 053.262 U/g,酶解料液比 1 : 24.515 (g/mL),此条件下 PSPs 得率为 26.7%。将理论条件修正为酶解时间 2 h,酶添加量 3 053 U/g,酶解料液比 1 : 25 (g/mL),测定 PSPs 得率为 $(27.07 \pm 0.31)\%$ ($n=3$),与理论值相对误差为 1.39%,说明回归模型有效可靠,具有实际应用价值。试验测得 PSPs 得率高于传统热水浸提法^[14]、水提醇沉法^[13]的,也高于苑璐等^[19,26]利用酶法提取的。

同时,测得此提取液中 PSSs 平均得率为 9.05%。因此二步提取法得到的 PSSs 总得率为 12.22%,优于包瑞敏等^[27-31]采用超声提取法和酶解法的。

表 4 PSPs 提取响应面试验因素水平表

Table 4 Factors and levels of PSPs extraction response surface test

水平	A 酶解时间/h	B 酶添加量/ (U · g ⁻¹)	C 酶解料液比 (g/mL)
-1	1.75	2 500	1 : 20
0	2.00	3 000	1 : 25
1	2.25	3 500	1 : 30

表 5 PSPs 提取响应面试验设计与结果

Table 5 Design and results of response surface test of extraction of polysaccharides

试验号	A	B	C	PSPs 得率/%
1	-1	0	-1	20.865 3
2	-1	0	1	18.766 8
3	-1	-1	0	19.070 1
4	-1	1	0	19.658 3
5	0	-1	1	23.474 6
6	0	-1	-1	21.860 8
7	0	0	0	27.055 4
8	0	1	1	24.792 0
9	0	0	0	24.792 0
10	0	0	0	26.942 1
11	0	0	0	27.397 3
12	0	1	-1	24.162 0
13	0	0	0	27.001 5
14	1	0	-1	21.581 0
15	1	1	0	19.663 2
16	1	0	1	22.606 5
17	1	-1	0	19.538 3

表 6 PSPs 提取响应面试验方差分析[†]

Table 6 Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial of extraction of polysaccharides

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	143.30	9	15.92	14.82	0.000 9	**
A	3.16	1	3.16	2.94	0.130 1	
B	2.35	1	2.35	2.18	0.183 1	
C	0.53	1	0.53	0.49	0.505 6	
AB	0.05	1	0.05	0.05	0.829 6	
AC	2.44	1	2.44	2.27	0.175 6	
BC	1.26	1	1.26	1.17	0.315 0	
A ²	100.53	1	100.53	93.55	<0.000 1	**
B ²	21.67	1	21.67	20.17	0.002 8	**
C ²	2.67	1	2.67	2.49	0.158 9	
残差	7.52	7	1.07			
失拟项	3.14	3	1.05	0.955 0	0.494 8	
纯误差	4.38	4	1.10			

[†] ** $P < 0.01$ 极显著; $R^2 = 0.950 1$; $R_{adj}^2 = 0.886 0$; CV = 4.53%。

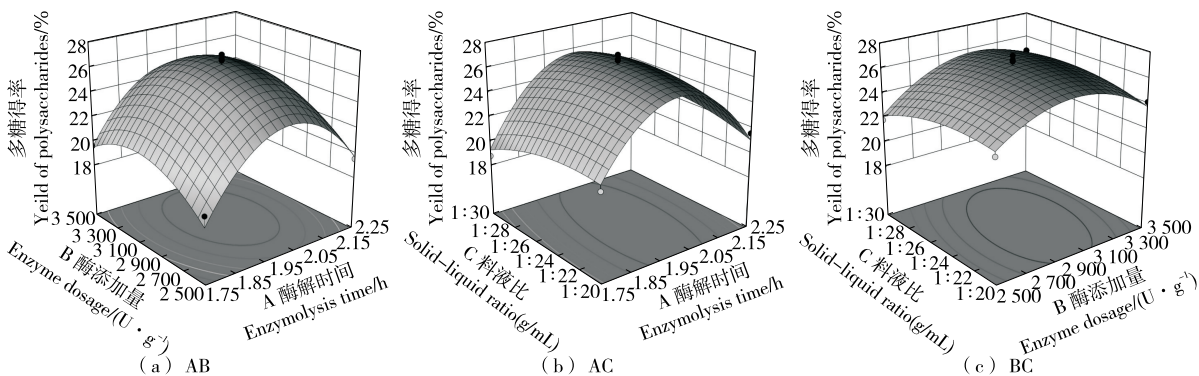


图 7 各因素交互作用对 PSPs 得率影响的响应面图

Figure 7 Interactions of various factors on the yield of PSPs

2.5 体外 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制活性

由图 8 可知,随着样品质量浓度的增加,PSSs、PSPs 及 PSSs-PSPs 对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶抑制率均增加。与单一物质相比,PSSs-PSPs 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效

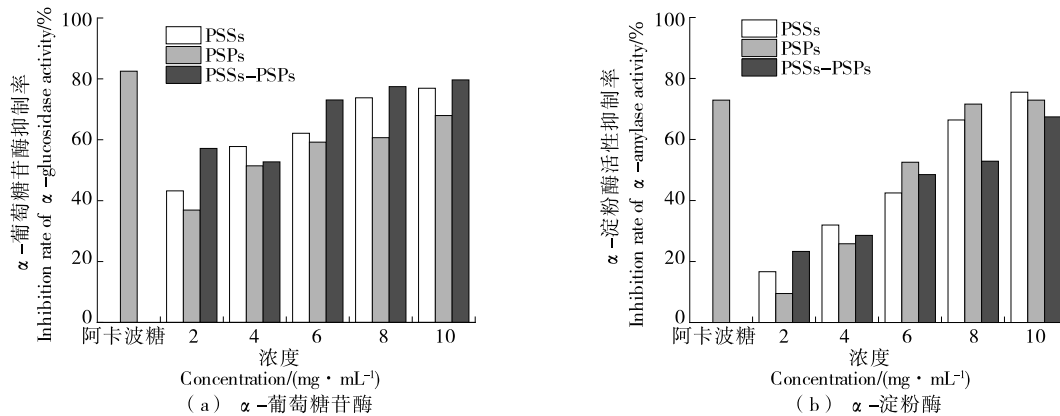


图 8 PSSs、PSPs 及 PSSs-PSPs 对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率

Figure 8 Inhibition rate of PSSs, PSPs and PSSs-PSPs on α -glucosidase and α -amylase

突,从而降低了对 α -淀粉酶的抑制作用。

3 结论

研究以黄精中黄精皂苷和黄精多糖得率为指标,对其提取工艺进行了优化。结果表明,黄精皂苷和黄精多糖的最佳协同提取工艺条件为超声温度 50 °C,超声料液比 1 : 25 (g/mL),超声时间 50 min,酶解时间 2 h,酶添加量 3 053 U/g,酶解料液比 1 : 25 (g/mL), m 纤维素酶 : m 木瓜蛋白酶 3 : 7,热水浸提时间 1 h,热水浸提温度 80 °C。黄精皂苷的两步提取总得率可达 12.22%,黄精多糖得率可达 27.07%。且黄精皂苷—黄精多糖复合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用强于黄精皂苷和黄精多糖单一组分的,说明二者复合仍具有较好的降糖活性,可作为开发具有降血糖功能食品的原料。后续可研究黄精皂苷、黄精多糖以及黄精皂苷—黄精多糖复合物对酶的抑制类型、纯化程度及其复合比例对降糖活性的影响。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 319.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China: Volume 1 [S]. 2020 Edition. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 319.
- [2] 于纯森, 刘宁, 宫铭海, 等. 黄精药理作用研究进展及在保健食品领域的应用开发[J]. 黑龙江科学, 2019, 10(18): 66-68.
YU C M, LIU N, GONG M H, et al. Research progress and application development status of pharmacology of *Polygonatum sibiricum*[J]. Heilongjiang Science, 2019, 10(18): 66-68.
- [3] WANG Q, BAN J, CAI R, et al. Metabolic composition and quality traits of *Polygonatum cyrtoneura* Hua from different germplasms

果更好,其对 α -淀粉酶的抑制效果较差,可能是因为 PSSs 和 PSPs 在 α -葡萄糖苷酶上的结合位点不同,复合后,二者对酶的抑制作用互不影响或影响不大;但在 α -淀粉酶的抑制作用中,PSSs 和 PSPs 二者可能存在结合位点冲

and age sections based on widely targeted metabolomics analysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6 077.

- [4] 张娜娜, 潘慧云, 侯芯芯, 等. 黄精研究现状与可持续发展探析[J]. 安徽农学通报, 2022, 28(10): 24-26.
ZHANG N N, PAN H Y, HOU X X, et al. Analysis on the present situation and sustainable development of *Polygonatum*[J]. Anhui Agricultural Bulletin, 2022, 28(10): 24-26.
- [5] GAO Q H, FU X, ZHANG R, et al. Neuroprotective effects of plant polysaccharides: A review of the mechanisms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 749-754.
- [6] XIE S Z, ZHANG W J, LIU W, et al. Physicochemical characterization and hypoglycemic potential of a novel polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* Red through PI3K/Akt mediated signaling pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 93: 105080.
- [7] LI L, THAKUR K, LIAO B Y, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtoneura* Hua[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 317-323.
- [8] ZHENG S. Protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on D-galactose-induced aging rats model [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2 246.
- [9] WANG J, LU C S, LIU D Y, et al. Constituents from *Polygonatum sibiricum* and their inhibitions on the formation of advanced glycosylation end products[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2016, 18(7): 697-704.
- [10] CHOI S B, PARK S. A steroidal glycoside from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce. improves insulin resistance but does not alter insulin secretion in 90% pancreatectomized rats [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(10): 2 036-2 043.

- [11] MA Y L, ZHANG Y S, ZHANG F, et al. Methylprotodioscin from *Polygonatum sibiricum* inhibits cervical cancer through cell cycle arrest and apoptosis induction[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 132: 110655.
- [12] ZHAO P, LI X, WANG Y, et al. Comparative studies on characterization, saccharide mapping and antiglycation activity of polysaccharides from different *Polygonatum* ssp [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 186: 113243.
- [13] 金昊艺, 林洪宇, 赵东夫, 等. 响应面法优化黄精多糖提取工艺[J]. 食品安全导刊, 2022(20): 148-150, 154.
JIN H Y, LIN H Y, ZHAO D F, et al. Optimization of the extraction process of *Polygonatum* polysaccharide by response surface methodology[J]. Journal of Food Safety, 2022(20): 148-150, 154.
- [14] 王毅, 穆麒麟, 田小海, 等. 正交法优化黄精多糖的提取工艺[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(15): 114-117.
WANG Y, MU Q L, TIAN X H, et al. Optimization of extraction technology of polysaccharide in *Polygonatum sibiricum* by orthogonal method[J]. Hubei Agricultural Science, 2020, 59(15): 114-117.
- [15] 赵丽蓉, 罗汉, 相英龙, 等. Box-Benhken 响应面法优化微波提取黄精总皂苷的条件[J]. 中国现代中药, 2018, 20(8): 1 010-1 015.
ZHAO L R, LUO H, XIANG Y L, et al. Optimization of microwave extracting total saponins from *Rhizoma Polygonti* by Box-Benhken response surface method[J]. Modern Chinese Medicine, 2018, 20(8): 1 010-1 015.
- [16] 庞红霞, 崔婧, 范桂强, 等. 黄精皂苷提取条件的 Design-Expert 优化及其降血糖效果初步研究[J]. 中国药师, 2018, 21(9): 27-30, 42.
PANG H X, CUI J, FAN G Q, et al. Extraction optimization of saponin from *Polygonatum sibiricum* by Design-Expert and preliminary study on its hypoglycemic effect [J]. Chinese Pharmacology, 2018, 21(9): 27-30, 42.
- [17] 马艳平, 张叶琪, 张婧娴, 等. 闪式提取法在中药复方制剂中的研究进展[J]. 中医药导报, 2020, 26(5): 106-109.
MA Y P, ZHANG Y Q, ZHANG J X, et al. Research progress of flash extraction method on compound Chinese medicine prescriptions[J]. Introduction to Traditional Chinese Medicine, 2020, 26(5): 106-109.
- [18] 陈蕾, 万婉, 刘艳, 等. 黄精有效成分提取测定的研究[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2019, 35(9): 37-39.
CHEN L, WAN W, LIU Y, et al. Study on the extraction and determination of effective components in *Polygonatum*[J]. Journal of Chifeng University (Natural Science Edition), 2019, 35(9): 37-39.
- [19] 苑璐, 冷凯良, 周余航, 等. 复合酶解法优化黄精多糖提取工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(9): 996-1 001.
YUAN L, LENG K L, ZHOU Y H, et al. Optimization of multi-enzymatic extraction process of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum*[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2017, 36(9): 996-1 001.
- [20] 张梓原, 徐伟, 王鑫, 等. 黄精多糖的提取工艺对比研究[J]. 包装工程, 2020, 41(9): 51-58.
ZHANG Z Y, XU W, WANG X, et al. Comparative study on extraction technologies of polysaccharides from *Rhizoma Polygonatum*[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(9): 51-58.
- [21] 刘勇, 张彩虹, 谢普军, 等. 响应面优化皂角刺皂苷超声波辅助提取工艺及其降血糖活性[J]. 林产化学与工业, 2023, 43(2): 12-18.
LIU Y, ZHANG C H, XIE P J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction technology of saponins from *Gleditsia sinensis* Thorn by RSM and its hypoglycemic activity[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2023, 43(2): 12-18.
- [22] 李云姣, 李琪, 杜佳峰, 等. 水果酵素体外抗氧化及抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 79-84.
LI Y J, LI Q, DU J F, et al. Antioxidant activity and inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase of fermented fruit juice in vitro[J]. Journal of Chinese Food Science, 2019, 19(4): 79-84.
- [23] 徐丽梅, 陈炼红. 响应面复合酶法提取紫薯多糖及抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(4): 190-197.
XU L M, CHEN L H. Study on the extraction of polysaccharides from Purple Sweet Potato by response surface and compound enzymemethods and the antioxidant activity[J]. Chinese Seasoning, 2022, 47(4): 190-197.
- [24] 任昌娟, 朱云龙. 生姜多糖提取技术工艺优化及效益分析[J]. 中国调味品, 2021, 46(9): 117-120.
REN C J, ZHU Y L. Extraction technology optimization and benefit analysis of Ginger polysaccharides[J]. Chinese Seasonings, 2021, 46(9): 117-120.
- [25] 陈永, 宋真萍, 吴晖, 等. 红蓝草多糖提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 166-173.
CHEN Y, SONG Z P, WU H, et al. Optimization of the extraction process of *Peristrophe roxburghiana* polysaccharide and analysis of its antioxidant activity[J]. Food Industry Technology, 2023, 44(5): 166-173.
- [26] 方如银, 李铭德. 复合酶法优化黄精多糖的提取工艺研究[J]. 中国处方药, 2018, 16(7): 32-33.
FANG R Y, LI M D. Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from *Polygonati Rhizoma* with mixed enzymes[J]. Chinese Prescription Medicine, 2018, 16(7): 32-33.
- [27] 包瑞敏, 张智, 杜亚飞, 等. 黄精总皂苷提取工艺优化及其对 α -淀粉酶及 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 163-168, 175.
BAO R M, ZHANG Z, DU Y F, et al. Optimization of extraction technology of total saponin from *Polygonatum Sibiricum* and its inhibitory activity to α -amylase and α -glucosidase [J]. Food Industry Technology, 2020, 41(16): 163-168, 175.

(下转第 196 页)

- various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(7): 2 755-2 759.
- [18] 张妮妮, 阮晓惠, 陈浩, 等. 核桃蛋白的酶解工艺优化及产物特性研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(10): 18-23.
ZHANG Y N, RUAN X H, CHEN H, et al. Optimization of enzymatic process and product properties of walnut protein [J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(10): 18-23.
- [19] 邓宇, 曹文红, 陈忠琴, 等. 白贝肉酶解工艺的优化及其产物呈味特性研究[J]. *中国调味品*, 2023, 48(3): 11-17.
DENG Y, CAO W H, CHEN Z Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process of *Monetaria moneta* and flavor characteristics of its products [J]. *Chinese Condiments*, 2023, 48(3): 11-17.
- [20] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 205-208.
WANG Z, XU S Y, TANG J. *Food chemistry* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009: 205-208.
- [21] PEREZE G, BECERRA L G, CERVANTES E L. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2017, 15(4): 489-496.
- [22] SAIDI S, DERATANI A, BELLEVILLE M P, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process [J]. *Food Research International*, 2014, 65: 329-336.
- [23] 樊雨梅, 汝文文, 史传超, 等. 阿胶低聚肽的成分分析及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(18): 314-318, 323.
FAN Y M, RU W W, SI C C, et al. Composition and its antioxidant activity of *Colla Corii Asini* oligopeptides [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 41(18): 314-318, 323.
- [24] 任海伟, 石菊芬, 王曼琪, 等. 藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征[J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 162-169.
REN H W, SHI J F, WANG M Q, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from Tibetan sheep and its structural characterization [J]. *Food & Machinery*, 2019, 36(4): 162-169.
- [25] 刘文颖, 冯晓文, 李国明, 等. 牡蛎低聚肽的结构表征及体外抗氧化作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(12): 261-269.
LIU W Y, FENG X W, LI G M, et al. Structural characteristics and in vitro antioxidative activity of oyster oligopeptides [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 21(12): 261-269.
- [26] 邢其毅, 裴伟伟, 徐瑞秋, 等. 基础有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 145-146.
XING Q Y, PEI W W, XU R Q, et al. *Basic organic chemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2016: 145-146.
- [27] MUTHUSELVI L, DHATHATHREYAN A. Simplecoacervates of zein to encapsulate gitoxin [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, 51(1): 39-43.
- [28] 陈默. 珍珠油杏仁蛋白和抗氧化肽的制备及功能活性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022: 32-33.
CHEN M. Preparation and functional activity of pearl oil apricot almond protein and antioxidant peptides [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022: 32-33.
- [29] ZHANG F, QU J, THAKUR K, et al. Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed dreg [J]. *Food Chemistry*, 2019, 285: 266-274.
- [30] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 小麦低聚肽的结构特征及其体外抗氧化活性[J]. *现代食品科技* 2021, 37(12): 72-79.
LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Structural characteristics and in vitro antioxidative activity of wheat oligopeptides [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(12): 72-79.
- [31] BAO C, CHEN H, CHEN L, et al. Comparison of ACE inhibitory activity in skimmed goat and cow milk hydrolyzed by alcalase, flavourzyme, neutral protease and proteinase K [J]. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, 2016, 20: 77-84.
- [32] AMBIGAIPALAN P, AIKHALIFA A S, SHAHIDI F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using alcalase, flavourzyme and thermolysin [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 1 125-1 137.
- [33] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 大米低聚肽的制备和结构表征及体外抗氧化作用[J]. *华南理工大学学报*, 2021, 49(21): 47-54.
LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Preparation, structural characterization and in vitro antioxidant activity of rice oligopeptides [J]. *Journal of South China University of Technology*, 2021, 49(21): 47-54.
- (上接第 166 页)
- [28] 黄祥元, 黄美容. 黄精提取物中总皂苷含量的测定[J]. *食品与机械*, 2012, 28(6): 106-108.
HUANG X Y, HUANG M R. Content determination of total saponins in extracts of *Rhizoma Polygonati* [J]. *Food & Machinery*, 2012, 28(6): 106-108.
- [29] 喻祖文, 张旺凡. 多倍体黄精中多糖和皂苷的提取及含量测定[J]. *中国现代中药*, 2011, 13(5): 20-22.
YU Z W, ZHANG W F. The extraction and determination of polyploid main active ingredients of *Polygonatum* [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2011, 13(5): 20-22.
- [30] YOU X J, GUO R, WANG L, et al. Ultrasonic extraction process of saponins from *Polygonatum sibiricum* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(3): 163-166.
- [31] LIU G, FENG S, SUI M, et al. Extraction and identification of steroidal saponins from *Polygonatum cyrtonema* Hua using natural deep eutectic solvent-synergistic quartz sand-assisted extraction method [J]. *Journal of Separation Science*, 2023, 46(7): 2200823.