

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90182

仿刺参雌性生殖腺皂苷提取分离工艺优化及体外抗氧化活性研究

Optimizations of extraction and separation process of saponins and *in vitro* antioxidant activity from the female gonad of *Apostichopus japonicus*

钟静诗^{1,2} 张健² 刘芳² 王共明² 王艺欣^{1,2}

ZHONG Jing-shi^{1,2} ZHANG Jian² LIU Fang² WANG Gong-ming² WANG Yi-xin^{1,2}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东 烟台 264006)

(1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai, Shandong 264006, China)

摘要:目的:优化超声辅助提取和高速逆流色谱(HSCCC)分离仿刺参雌性生殖腺皂苷工艺并探究其抗氧化活性。方法:以提取时间、乙醇体积分数、超声时间、料液比为考察因素,采用响应面试验优化皂苷提取工艺;针对高速逆流色谱分离工艺的关键参数溶剂体系配比、流动相体积流量、转速进行优化,并通过 DPPH 自由基、ABTS 自由基清除试验评价粗提物及分离组分的抗氧化活性。结果:粗皂苷的最佳提取条件为提取时间 7 d,乙醇体积分数 83%,超声时间 33 min,料液比 1:20 (g/mL),此条件下皂苷提取率为(0.66±0.02)%。在 HSCCC 溶剂体系配比为 $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ 为 2.0:3.0:0.2:4.8,流动相体积流量为 2 mL/min,转速为 800 r/min 的条件下分离粗皂苷提取物得到组分 1 和组分 2。粗皂苷提取物、组分 1 和组分 2 的 DPPH 自由基清除率分别可达(36.23±0.55)%, (35.07±0.20)% 和 (38.40±0.14)%, ABTS 自由基清除率分别可达为(17.55±0.42)%, (24.49±0.50)% 和 (33.65±0.34)%。结论:经工艺优化获得了较高的仿刺参雌性生殖腺粗皂苷得率及较好的分离效果,且相较于粗皂苷,经 HSCCC 分离后得到的组分 2 的抗氧化活性有所提高。

关键词:仿刺参生殖腺;皂苷;高速逆流色谱法;抗氧化活性

Abstract; Objective: This study aimed to optimize the ultrasonic-

基金项目:山东省现代农业产业技术体系刺参产业创新团队建设(编号:SDAIT-22-07);山东省自然科学基金重点项目(编号:ZR2020KC034)

作者简介:钟静诗,女,上海海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:张健(1980—),男,山东省海洋资源与环境研究院副研究员,博士。E-mail:zjsd408@163.com

收稿日期:2021-12-09

assisted extraction technology and HSCCC separation process of saponins from the female gonad of *Apostichopus japonicus* and to explore their antioxidant activities. **Methods:** Extraction time, ethanol concentration, ultrasonic time, and solid-to-solvent ratio as the influencing factors were considered in this study, and the extraction process of saponin was optimized using the response surface methodology. The ratio of solvent systems, the volume flow of mobile phases, and the rotation speeds of HSCCC were optimized. The DPPH radical and ABTS radical scavenging experiments were conducted to evaluate the antioxidant activities of the crude extracts and the separated fractions. **Results:** The optimal extraction condition of the crude saponin were extraction time of 7 d, ethanol concentration of 83%, ultrasound time of 33 min, and solid-to-solvent ratio of 1:20 (g/mL). Under these conditions, the extraction rate of saponins was (0.66 ± 0.02)%. Components 1 and 2 were separated from the crude saponin by HSCCC with $V_{\text{acetate}}:V_{\text{butanol}}:V_{\text{methanol}}:V_{\text{water}} = 2.0:3.0:0.2:4.8$, 2 mL/min volume flow, and 800 r/min rotation speed. The DPPH radical scavenging rate of the crude saponin, component 1, and component 2 were (36.23 ± 0.55)%, (35.07 ± 0.20)%, and (38.40 ± 0.14)%, respectively, while the ABTS radical scavenging rate were (17.55 ± 0.42)%, (24.49 ± 0.50)% and (33.65 ± 0.34)%, respectively. **Conclusion:** A higher yield of crude saponin from the female gonad of *Apostichopus japonicus* with better separation was obtained after process optimization. Compared with the crude saponin, the antioxidant activity of component 2 was improved after HSCCC separation.

Keywords: *Apostichopus japonicus* gonad; saponins; high-speed countercurrent chromatography; antioxidant activity

海参营养丰富且商业价值高,年产值达 300 亿

元^[1-2]。其中,仿刺参是中国北方养殖的重要经济品种,隶属于棘皮动物门海参纲楯手目刺参科仿刺参属^[3],其含有多肽、多糖、磷脂、皂苷等多种生物活性成分,是海参中的珍品。海参加工过程中产生的大量副产物如生殖腺等具有丰富的营养成分,但未被充分利用^[4]。目前,有关海参生殖腺的研究主要集中于通过生物酶解制备多糖、多肽等^[2,5],而有关皂苷的研究较少。动植物皂苷具有抗氧化^[6]、抗癌^[7]、改善动脉粥样硬化^[8]等生物活性,而仿刺参皂苷也被证实具有抗菌^[9]、抗肿瘤^[10]等作用,但对其抗氧化作用的研究尚未见报道。研究表明,氧化自由基产生于生物体的生长代谢过程中,与多种疾病相关^[11],其过量产生后会引引起细胞发生脂质过氧化、DNA 损伤、蛋白质结构发生变化等^[12],进而导致癌症、糖尿病、心血管等多种疾病发生。

目前,采用层析技术进行分离纯化的海参皂苷得率较低。而高速逆流色谱法(HSCCC)是利用液-液萃取达到分离纯化的目的,具有减少固定相对样品的吸附作用、制备量大等优点^[13],已被应用于黄酮^[14]、香豆木脂素^[15]等物质的分离纯化中。研究拟采用超声辅助冷浸提取皂苷的方法,对仿刺参雌性生殖腺中皂苷的提取时间、乙醇体积分数、超声时间、料液比进行优化,对 HSCCC 溶剂体系配比的选择、流动相体积流量、转速进行优化,并测定粗皂苷及分离纯化后组分对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力,以期对仿刺参生殖腺活性成分的进一步开发利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

仿刺参雌性生殖腺:烟台开发区八角润康海产品经销部;

DPPH 自由基清除能力检测试剂盒、ABTS 自由基清除能力检测试剂盒:北京索莱宝科技有限公司;

乙醇、正丁醇等化学试剂:国产分析纯。

1.2 仪器与设备

高速逆流色谱仪:TBE200V 型,上海同田生物技术有限公司;

高效液相色谱仪:1260 型,安捷伦科技(中国)有限公司;

冷冻干燥机:FD-2A 型,北京博医康实验仪器有限公司;

超声波清洗器:KQ-600B 型,昆山市超声仪器有限公司;

高速中药粉碎机:XFB-200 型,吉首市中诚制药机械厂;

旋蒸仪:IKA HB10 型,德国 IKA 公司;

酶标仪:1510 型,赛默飞世尔(中国)有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 粗皂苷提取工艺

仿刺参雌性生殖腺→冻干→粉碎过 60 目筛→超声辅助乙醇冷浸提取→旋蒸至流浸膏状→分散于水中→7 000 r/min 离心 30 min→过滤除去不溶性杂质→滤液水饱和正丁醇萃取→正丁醇层旋蒸浓缩→冻干→仿刺参雌性生殖腺粗皂苷粉末

1.3.2 标准曲线的绘制 参照 Guo 等^[16]的方法,得标准曲线方程为 $y=0.0634x+0.0915$, $R^2=0.9961$ 。

1.3.3 皂苷提取率计算 按式(1)计算皂苷提取率。

$$Y = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——皂苷提取率,%;

m_1 ——粗皂苷粉末中皂苷质量,g;

m_2 ——原料质量,g。

1.3.4 单因素试验

(1) 提取时间:固定乙醇体积分数 60%,超声时间 20 min,料液比 1:10 (g/mL),考察提取时间(1,3,6,9,12 d)对皂苷提取率的影响。

(2) 乙醇体积分数:固定提取时间 1 d,超声时间 20 min,料液比 1:10 (g/mL),考察乙醇体积分数(50%,60%,70%,80%,90%)对皂苷提取率的影响。

(3) 超声时间:固定提取时间 1 d,乙醇体积分数 60%,料液比 1:10 (g/mL),考察超声时间(10,20,30,40,50 min)对皂苷提取率的影响。

(4) 料液比:固定提取时间 1 d,乙醇体积分数 60%,超声时间 20 min,考察料液比[1:5,1:10,1:15,1:20,1:25 (g/mL)]对皂苷提取率的影响。

1.3.5 响应面试验 在单因素试验基础上,应用 Box-Behnken 中心组合设计原理,以皂苷提取率为响应值,提取时间、乙醇体积分数、超声时间、料液比为自变量,优化皂苷提取工艺并利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行回归分析。

1.3.6 HSCCC 分离纯化

(1) HSCCC 溶剂体系的选择:参照文献^[17]。HPLC 分析条件:色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈,流动相乙腈(A)—0.1%三氟乙酸(B);梯度洗脱:0~25 min,5% A;25~50 min,5%~25% A;50~60 min,25%~35% A;60~70 min,35%~55% A;70~75 min,55%~75% A;75~85 min,75%~100% A;流速 1 mL/min;进样量 30 μ L;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 205 nm。

参照马亮亮^[18]的方法,在分液漏斗中配制不同比例两相溶剂体系 20 mL,充分摇匀后静置分层。精密称取皂苷粗提物 20 mg 于分液漏斗中,加入上、下相各 5 mL,平衡后各取上、下相 2 mL,加入 50%甲醇定容至 10 mL,

HPLC 测定上、下相溶剂的色谱峰面积,并按式(2) 计算分配系数。

$$K = \frac{A_U}{A_L}, \quad (2)$$

式中:

K ——分配系数;

A_U ——上相溶剂色谱峰面积;

A_L ——下相溶剂色谱峰面积。

(2) HSCCC 分离纯化工艺优化:在选定 HSCCC 溶剂体系的基础上,固定流动相体积流量 2 mL/min,考察转速(700,750,800,850,900 r/min)对固定相保留率的影响;固定转速 800 r/min,考察流动相体积流量(1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL/min)对固定相保留率的影响。

(3) 粗皂苷的 HSCCC 分离纯化:配制高速逆流色谱两相溶剂体系于分液漏斗中静置分层,上相为固定相,下相为流动相。称取 0.5 g 粗皂苷,并加入上、下相各 5 mL 超声溶解,通过进样环泵入样品。HSCCC 条件为转速 800 r/min、流动相体积流量 2 mL/min。每 5 min 收集一管样品,真空冷冻干燥后用 50% 乙醇溶解,测定 205 nm 下的吸光度,以时间为横坐标,吸光度为纵坐标绘制 HSCCC 分离纯化图。

1.3.7 仿刺参雌性生殖腺粗皂苷抗氧化能力的测定

(1) DPPH 自由基清除率:配置 DPPH 工作液,96 孔板中加入 190 μ L 工作液,质量浓度分别为 1,2,4,6,8,10 mg/mL 的样品溶液 10 μ L,混匀后室温下避光静置 30 min,测定 515 nm 下的吸光度。无水乙醇代替工作液为对照孔;提取液代替样品为空白孔。按式(3) 计算 DPPH 自由基清除率。

$$R = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

R ——自由基清除率, %;

A_0 ——空白孔吸光度;

A_1 ——样品孔吸光度;

A_2 ——对照孔吸光度。

(2) ABTS 自由基清除率:根据 ABTS 自由基清除能力检测试剂盒进行操作,测定 405 nm 下各孔的吸光度,并按式(3) 计算 ABTS 自由基清除率。

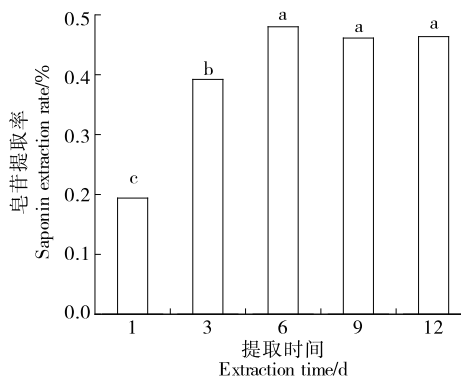
1.4 数据处理

采用 Excel 2010 整理试验数据,使用 Design Expert 8.0.6、SPSS 20.0 软件进行统计分析,分析方法采用单因素方差分析,Waller-Duncan 检验,置信区间为 95% ($P < 0.05$),使用 Origin 2019 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间对皂苷提取率的影响 由图1可知,仿



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

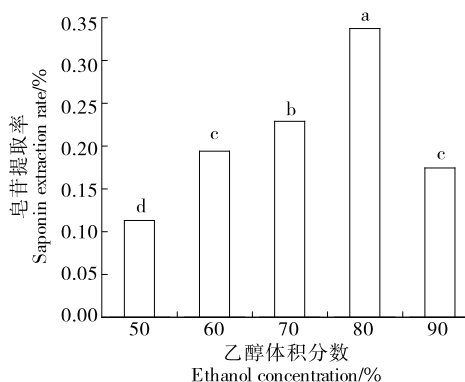
图1 提取时间对皂苷提取率的影响

Figure 1 Effect of extraction time on yield of saponins

刺参雌性生殖腺皂苷提取率在冷浸提取时间为 6 d 时最大 ($P < 0.05$),与朱亚红等^[19]的结果接近。因此,选择提取时间 3,6,9 d 进行响应面试验。

2.1.2 乙醇体积分数对皂苷提取率的影响 由图 2 可知,皂苷提取率随乙醇体积分数的增大而升高,当乙醇体积分数为 80% 时达到峰值,且显著高于其他处理组 ($P < 0.05$)。皂苷的极性一般较大,根据相似相溶原理,过高体积分数的乙醇可能会降低皂苷的溶解度^[20]。同时,过高体积分数的乙醇会促进仿刺参雌性生殖腺中的脂溶性杂质和色素溶出,从而降低皂苷的提取率。这与赵亚东^[21]的结论类似。因此,选择 70%,80%,90% 乙醇体积分数进行响应面试验。

2.1.3 超声时间对皂苷提取率的影响 由图 3 可知,仿刺参雌性生殖腺中的皂苷提取率随超声时间的延长而增大,当超声时间为 30 min 时达到峰值,且显著高于其他处理组 ($P < 0.05$),而后提取率逐渐下降。超声波波长极短,能产生空化作用和机械效应等,增加细胞的渗透性,使溶剂更易于进入细胞,从而有利于皂苷的溶出^[22-23]。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图2 乙醇体积分数对皂苷提取率的影响

Figure 2 Effect of ethanol concentration on yield of saponins

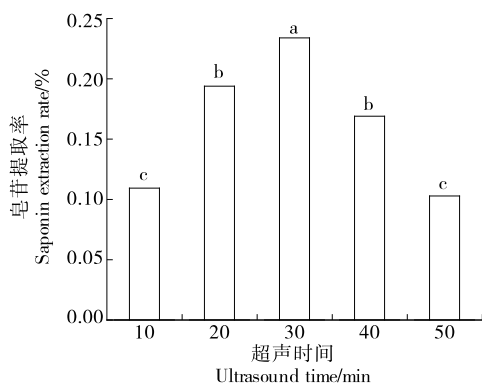


图 3 超声时间对皂苷提取率的影响

Figure 3 Effect of ultrasound time on yield of saponins

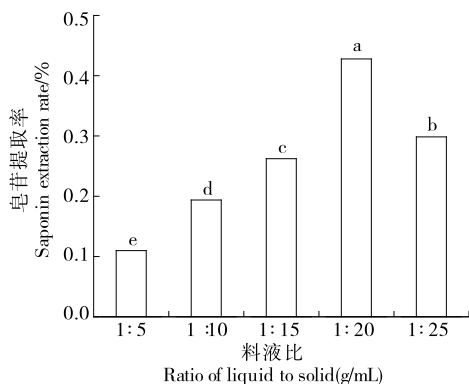
随着超声时间的进一步延长,超声过程中不断产生的热量可能导致皂苷成分损失。因此,选择超声时间 20,30,40 min 进行响应面实验。

2.1.4 料液比对皂苷提取率的影响 由图 4 可知,随着料液比的升高,皂苷提取率增加,当料液比为 1:20 (g/mL) 时达到峰值,且显著高于其他处理组 ($P < 0.05$),而后下降。一般而言,较高的溶剂体积能提高提取率,过高的溶剂体积一方面会浸出较多的杂质,导致溶剂黏度增大,影响皂苷的溶出进而降低提取率^[24];另一方面,超声产生的能量被溶剂吸收,能量耗散,导致超声对皂苷提取的作用减小。因此,选择料液比 1:15,1:20,1:25 (g/mL) 进行响应面实验。

2.2 响应面实验

2.2.1 试验设计与分析 在单因素试验的基础上,选择提取时间、乙醇体积分数、超声时间、料液比 4 个因素进行 Box-Behnken 试验设计,因素水平见表 1,试验设计及响应结果见表 2。

2.2.2 响应面数学模型建立与方差分析 运用 Design-



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 4 料液比对皂苷提取率的影响

Figure 4 Effect of solid-to-solvent ratio on the yield of saponins

表 1 响应曲面因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface

水平	A 提取时间/d	B 乙醇体积分数/%	C 超声时间/min	D 料液比 (g/mL)
-1	3	70	20	1:15
0	6	80	30	1:20
1	9	90	40	1:25

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results of the response surface analysis

试验号	A	B	C	D	皂苷提取率/%
1	-1	-1	0	0	0.31
2	1	-1	0	0	0.33
3	-1	1	0	0	0.32
4	1	1	0	0	0.46
5	0	0	-1	-1	0.41
6	0	0	1	-1	0.49
7	0	0	-1	1	0.36
8	0	0	1	1	0.47
9	-1	0	0	-1	0.31
10	1	0	0	-1	0.40
11	-1	0	0	1	0.30
12	1	0	0	1	0.43
13	0	-1	-1	0	0.18
14	0	1	-1	0	0.36
15	0	-1	1	0	0.33
16	0	1	1	0	0.54
17	-1	0	-1	0	0.36
18	1	0	-1	0	0.36
19	-1	0	1	0	0.33
20	1	0	1	0	0.57
21	0	-1	0	-1	0.15
22	0	1	0	-1	0.50
23	0	-1	0	1	0.29
24	0	1	0	1	0.34
25	0	0	0	0	0.66
26	0	0	0	0	0.65
27	0	0	0	0	0.67
28	0	0	0	0	0.61
29	0	0	0	0	0.68

Expert 8.0.6 软件对试验数据进行统计分析,得到回归模型方程为:

$$Y = 0.65 + 0.052A + 0.077B + 0.058C - 5.833 \times 10^{-3}D + 0.03AB + 0.06AC + 0.01AD + 7.5 \times 10^{-3}BC - 0.075BD + 7.5 \times 10^{-3}CD - 0.14A^2 - 0.18B^2 - 0.10C^2 - 0.14D^2$$

(4)

由表 3 可知,模型的 $P < 0.000 1$,表明所选二次多项模型极显著;失拟项 P 为 0.142 7,不显著;相关系数(R^2)为 0.955 1,校正决定系数 $R_{\text{adj}}^2 = 0.910 2$,表明该试验模型的拟合性较好。因此,该模型可以较好地预测仿刺参雌性生殖腺皂苷的提取率。由 F 值可知,各因素对皂苷提取率的影响为乙醇体积分数 > 超声时间 > 提取时间 > 料液比。

2.2.3 响应面交互作用分析 由表 3 可知,AC、BD 的 P 值 < 0.05 ,与之对应的图 5(b)、图 5(e) 曲面陡峭,等高线较为密集且呈椭圆状,表明提取时间与超声时间、乙醇体积分数与料液比有相互作用。而其他响应面曲面平缓,等高线密度较为均匀且趋近圆形,相互作用不显著,与方差分析的结果相对应。

2.2.4 验证实验 回归方程分析得最佳工艺条件为提取时间 6.93 d,乙醇体积分数 82.61%,超声时间 32.78 min,料液比 1 : 20 (g/mL),此时皂苷提取率理论值为 0.68%。鉴于试验的可操作性,将最佳条件适当调整为提取时间 7 d,乙醇体积分数 83%,超声时间 33 min,料液比 1 : 20 (g/mL)。在此条件下进行 3 次验证实验,皂苷提取率为 $(0.66 \pm 0.02)\%$,与理论提取率无显著差异,说明该响应模型具有适用性,工艺参数具有可靠性。

2.3 HSCCC 分离条件优化

2.3.1 HSCCC 溶剂体系的选择 分配系数(K)反映样

品在两相中的分配比例,过小会降低分离度,过大会延长洗脱时间,峰形变宽。一般而言, $0.5 \leq K \leq 2.0$ 能得到分离效果较好的峰形^[25]。由表 4 可知,溶剂体系 4 的 K 值 > 2 ,样品在固定相中的保留时间较长,会导致分离时间的延长和溶剂消耗的增加,不宜选用。其余溶剂体系的 K 值均在 0.5~2.0 范围内,能较好分离皂苷,最终选定溶剂体系为 $V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{\text{正丁醇}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 2.0 : 3.0 : 0.2 : 4.8$ 。

2.3.2 HSCCC 流动相体积流量 一般而言,固定相保留率应大于 30%^[25]。由图 6 可知,流动相体积流量的平方根与固定相保留率呈线性关系,其回归方程为 $y = -16.90x + 67.159, R^2 = 0.990 9$,线性关系较好,与文献^[26]相符。随着流动相体积流量的提高,固定相保留率不断降低,但过低的流动相体积流量会使样品出峰时间延长。因此,选择流动相体积流量为 2 mL/min。

2.3.3 HSCCC 转速 由图 7 可知,随着转速的提高,固定相保留率不断提高,当转速为 900 r/min 时,固定相保留率达到最高且各组间差异显著($P < 0.05$)。皂苷具有起泡性,过高的转速会产生乳化现象^[27],不利于皂苷的分离纯化。因此,选择转速为 800 r/min。

2.3.4 HSCCC 分离纯化仿刺参雌性生殖腺皂苷 按优化条件分离纯化仿刺参雌性生殖腺粗提物,得到分离纯

表 3 回归模型方差分析[†]

Table 3 Variance analysis of the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.55	14	0.04	21.27	$< 0.000 1$	* *
A	3.20×10^{-2}	1	3.20×10^{-2}	17.50	0.000 9	* *
B	0.07	1	0.07	39.37	$< 0.000 1$	* *
C	0.04	1	0.04	22.31	0.000 3	* *
D	4.08×10^{-4}	1	4.08×10^{-4}	0.22	0.644 0	
AB	3.60×10^{-3}	1	3.60×10^{-3}	1.97	0.182 6	
AC	0.01	1	0.01	7.87	0.014 0	*
AD	4.00×10^{-4}	1	4.00×10^{-4}	0.22	0.647 4	
BC	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	0.12	0.731 1	
BD	0.02	1	0.02	12.29	0.003 5	* *
CD	2.25×10^{-4}	1	2.25×10^{-4}	0.12	0.731 1	
A ²	0.12	1	0.12	67.32	$< 0.000 1$	* *
B ²	0.22	1	0.22	120.07	$< 0.000 1$	* *
C ²	0.07	1	0.07	37.47	$< 0.000 1$	* *
D ²	0.13	1	0.13	71.03	$< 0.000 1$	* *
残差	0.03	14	1.83×10^{-3}			
失拟项	0.02	10	2.27×10^{-3}	3.11	0.142 7	不显著
纯误差	2.92×10^{-3}	4	7.30×10^{-4}			
总和	0.57	28				

[†] * * 极显著($P < 0.01$), * 显著($P < 0.05$); $R^2 = 0.955 1, R_{\text{adj}}^2 = 0.910 2$ 。

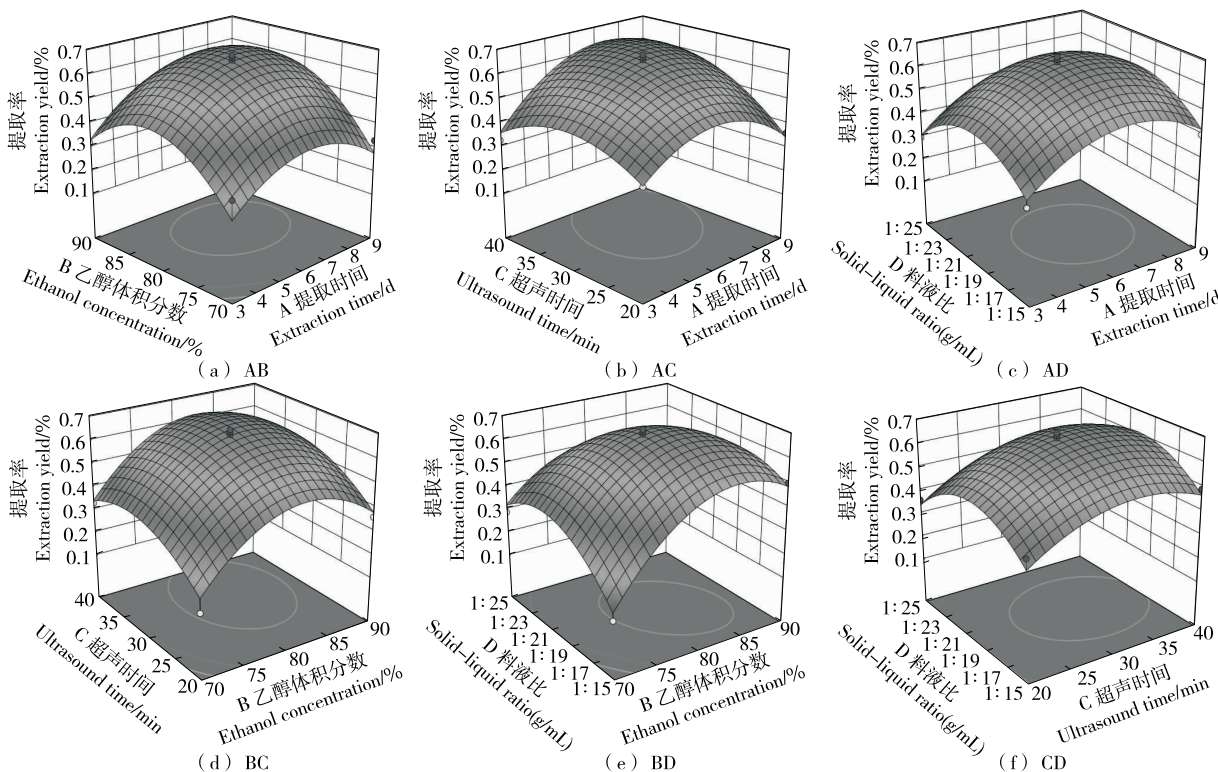


图 5 各因素交互作用对皂苷得率的响应面图

Figure 5 Response surface diagrams and contour diagrams of the interactive effects of various factors on the yield of saponins

表 4 仿刺参雌性生殖腺皂苷在不同溶剂体系中的分配系数

Table 4 Distribution coefficient of gonad saponins from the female *Apostichopus japonicus* in different solvent systems

溶剂体系	$V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{\text{正丁醇}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}}$	K
1	1.4 : 3.6 : 0.2 : 4.8	1.36
2	2.0 : 3.0 : 0.2 : 4.8	1.32
3	2.4 : 2.6 : 0.2 : 4.8	1.94
4	2.6 : 2.4 : 0.2 : 4.8	2.59
5	3.2 : 1.8 : 0.2 : 4.8	1.59

化组分如图 8 所示。经优化后,得到两组分分别命名为组分 1 和组分 2。

2.4 抗氧化能力分析

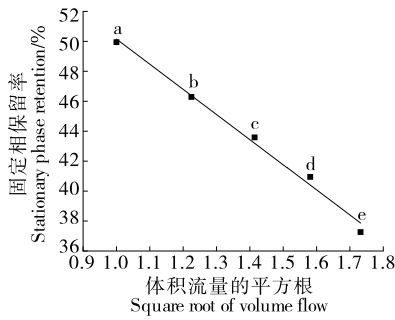
2.4.1 DPPH 自由基清除率 由图 9 可知,仿刺参雌性生殖腺皂苷粗提物和 HSCCC 分离纯化后的两组分均具有一定的清除 DPPH 自由基的能力,且 DPPH 自由基清除率随样品质量浓度的增加而增大,同一样品不同浓度组间差异显著 ($P < 0.05$),其清除 DPPH 自由基的能力低于维生素 C。当样品质量浓度 $> 4 \text{ mg/mL}$ 时,粗提物的抗氧化活性显著高于组分 1 而低于组分 2 ($P < 0.05$),其

中 10 mg/mL 组分 2 的 DPPH 自由基清除率最高,可达 $(38.40 \pm 0.14)\%$,显著高于皂苷粗提物和组分 1 的,推测经 HSCCC 分离纯化后,具有较高清除 DPPH 自由基的活性成分得到了有效分离。

2.4.2 ABTS 自由基清除率 由图 10 可知,仿刺参雌性生殖腺粗提物和 HSCCC 分离纯化后两组分均具有清除 ABTS 自由基的能力,且 ABTS 自由基清除率随样品质量浓度的增加而增大,其清除 ABTS 自由基的能力低于维生素 C。此外,组分 1 和组分 2 的 ABTS 自由基清除率高于同质量浓度的粗提物,其中组分 2 的清除率又高于组分 1,且差异均显著 ($P < 0.05$)。当仿刺参雌性生殖腺皂苷质量浓度为 10 mg/mL 时,组分 1 和组分 2 的 ABTS 自由基清除率可达 $(24.49 \pm 0.50)\%$ 和 $(33.65 \pm 0.34)\%$,显著高于粗提物的,可能与分离纯化后除去部分杂质有关。

3 结论

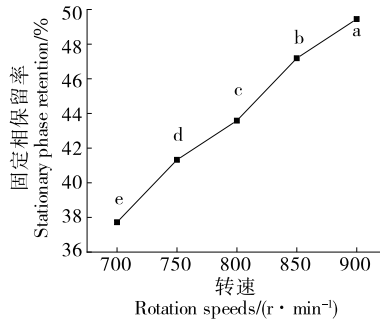
对仿刺参雌性生殖腺的皂苷提取进行了工艺优化,获得最佳提取工艺条件为提取时间 7 d,乙醇体积分数 83%,超声时间 33 min,料液比 1 : 20 (g/mL),此条件下粗皂苷提取率为 $(0.66 \pm 0.02)\%$ 。在高速逆流色谱法溶剂体系配比 $V_{\text{乙酸乙酯}} : V_{\text{正丁醇}} : V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 2.0 : 3.0 : 0.2 : 4.8$ 、流动相体积流量为 2 mL/min ,转速为



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图6 流动相体积流量对固定相保留率的影响

Figure 6 Effect of volume flows on the retention rate of stationary phase



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图7 转速对固定相保留率的影响

Figure 7 Effect of rotation speeds on the retention rate of stationary phase

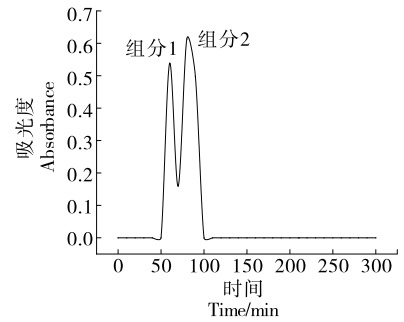
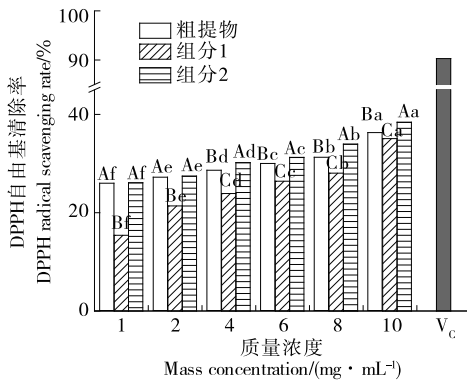


图8 HSCCC 分离纯化

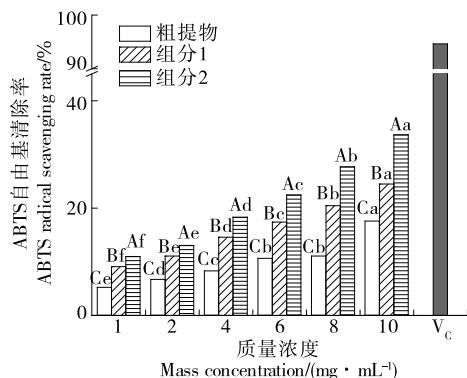
Figure 8 Separation and purification by HSCCC



同一浓度不同样品大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 同一样品小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图9 仿刺参雌性生殖腺皂苷的 DPPH 自由基清除率

Figure 9 DPPH radical scavenging rate of saponins from the female gonad of *Apostichopus japonicus*



同一浓度不同样品大写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 同一样品小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图10 仿刺参雌性生殖腺皂苷的 ABTS 自由基清除率

Figure 10 ABTS radical scavenging rate of saponins from the female gonad of *Apostichopus japonicus*

800 r/min 条件下分离纯化粗皂苷, 可得到组分 1 和组分 2, 分离效果较好。经测定, 仿刺参雌性生殖腺粗皂苷、组分 1 和组分 2 均具有一定的抗氧化性, 且经分离纯化后组分 1 的 ABTS 自由基清除能力显著高于粗提物 ($P < 0.05$); 组分 2 对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除能力均显著高于皂苷粗提物和组分 1 ($P < 0.05$)。综上, 作为一种新型分离手段, 高速逆流色谱法可有效分离粗皂苷并获得具有更高抗氧化活性的组分。后续可对组分 1 和组分 2 进一步分离纯化并进行物化性质分析和结构解析, 以探究其构效关系。

参考文献

[1] 周新. 大连沿海主要棘皮类动物的脂质分析[D]. 大连: 大连工业大学, 2018: 1-2.
 ZHOU Xin. Analysis of lipids in major echinoderms in coastal areas of Dalian[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018: 1-2.
 [2] 刘昕, 刘京熙, 张健, 等. 仿刺参多糖的分离纯化及体外抗肿瘤活性[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 105-110.
 LIU Xin, LIU Jing-xi, ZHANG Jian, et al. Purification and antitumor activity in vitro of polysaccharides from *Apostichopus japonicus* spawn[J]. Food Science, 2016, 37(23): 105-110.
 [3] 袁文鹏, 张绵松, 胡炜, 等. 仿刺参酶解提取物营养成分分析及其对小鼠免疫功能的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11): 45-50.
 YUAN Wen-peng, ZHANG Mian-song, HU Wei, et al. Analysis of nutritional components of enzymatic extract from *Apostichopus japonicus* and its effects on the immunological functions of mice[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(11): 45-50.
 [4] 曹荣, 刘淇, 殷邦忠. 响应面法优化海参性腺酶解工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 29-33.
 CAO Rong, LIU Qi, YIN Bang-zhong. Optimization of enzymatic hydrolysis process for sea cucumber gonads by response surface methodology[J]. Food Science, 2012, 33(2): 29-33.

- [5] 向怡卉, 苏秀榕, 董明敏, 等. 复合蛋白酶水解海参生殖腺工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(3): 143-144, 146.
XIANG Yi-hui, SU Xiu-rong, DONG Ming-min, et al. Study on hydrolysis of sea cucumber gonads by compound protease[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(3): 143-144, 146.
- [6] 杨佳娣, 柯婉, 叶国栋, 等. 藜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[J]. 食品与机械, 2018, 34(4): 168-174.
YANG Jia-di, KE Wan, YE Guo-dong, et al. In vitro scavenging free radical activity evaluation and its extraction process optimization of total steroidal saponins from *Liriope spicata* var. *prolifera*[J]. Food & Machinery, 2018, 34(4): 168-174.
- [7] 申佩瑶, 张也, 李玉钦, 等. 竹节参生物活性与质量控制研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 211-220.
SHEN Pei-yao, ZHANG Ye, LI Yu-qin, et al. Research progress on biological activity and quality control of *Panax japonici Rhizoma*[J]. Food & Machinery, 2021, 37(11): 211-220.
- [8] HAN Q A, JIA S L, LI K F, et al. Thelenota ananas saponin extracts attenuate the atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by modulating lipid metabolism[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 58: 238-247.
- [9] ZENG L W, HONG W Z, WEI H Y, et al. Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Food Chemistry, 2012, 132: 259-300.
- [10] DAI Y L, KIM E A, LUO H M, et al. Characterization and anti-tumor activity of saponin-rich fractions of South Korean sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(6): 2 283-2 292.
- [11] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.
LI Yong, KONG Ling-qing, GAO Hong, et al. Progress on free radical and diseases[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(4): 85-88.
- [12] 张丽芬, 郭玉萍, 周军, 等. 运动对人体自由基代谢的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(17): 3 388-3 393.
ZHANG Li-fen, GUO Yu-ping, ZHOU Jun, et al. Effects of exercise on free radical metabolism[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(17): 3 388-3 393.
- [13] 杨发容, 景联鹏, 顾丽莉, 等. 色谱技术在黄酮类化合物分离纯化中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2021, 37(12): 202-208.
YANG Fa-rong, JING Lian-peng, GU Li-li, et al. Application progress of chromatographic technology in the separation and purification of flavonoids[J]. Food & Machinery, 2021, 37(12): 202-208.
- [14] 甘春芳, 韦万兴, 周敏, 等. 高速逆流色谱技术在天然产物分离中的应用[J]. 应用化工, 2009, 38(10): 1 505-1 508.
GAN Chun-fang, WEI Wan-xing, ZHOU Min, et al. Application of high-speed counter-current chromatography in natural products separation[J]. Applied Chemical Industry, 2009, 38(10): 1 505-1 508.
- [15] LIU J L, WANG X Y, ZHANG L L, et al. Two-dimensional counter-current chromatography × high performance liquid chromatography with heart-cutting and stop-and-go techniques for preparative isolation of coumarin derivatives from *Peucedanum praeruptorum dunn*[J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1 374: 156-163.
- [16] GUO L, GAO Z Y, ZHANG L Q, et al. Saponin-enriched sea cucumber extracts exhibit an antiobesity effect through inhibition of pancreatic lipase activity and upregulation of LXR-beta signaling[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(8): 1 312-1 325.
- [17] 董平. 革皮氏海参 (*Pearsonothria graeffei*) 皂苷化合物的分离鉴定、结构修饰及活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 89-90.
DONG Ping. Studies on the isolation, identification, structure-modification and bioactivities of triterpene glycosides in *Pearsonothria graeffei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009: 89-90.
- [18] 马亮亮. 泰山照山白生物活性研究及其有效成分的高速逆流色谱分离[D]. 泰安: 泰山医学院, 2017: 33-34.
MA Liang-liang. The biological activity research of taishan *Rhododendron Micranthum turcz* and the high-speed counter-current chromatography separation of effective [D]. Taian: Taishan Medical University, 2017: 33-34.
- [19] 朱亚红, 吴珉, 胡秀卿, 等. 无患子皂苷粗提物提取方法比较[J]. 浙江农业科学, 2008(2): 247-248.
ZHU Ya-hong, WU Min, HU Xiu-qing, et al. Comparison of extraction methods of *Sapindus saponin* crude extract[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2008(2): 247-248.
- [20] 刘桂英, 王旭达, 葛坤, 等. 响应面法优化提取仿刺参中海参皂苷工艺[J]. 水产科学, 2021, 40(6): 810-817.
LIU Gui-ying, WANG Xu-da, GE Kun, et al. Saponins in *Apostichopus japonicus* by response surface methodology[J]. Fisheries Science, 2021, 40(6): 810-817.
- [21] 赵亚东. 青海藜麦资源营养品质评价及功能成分与抗氧化活性研究[D]. 西宁: 青海大学, 2018: 26.
ZHAO Ya-dong. Nutritional quality evaluation and study of the functional compositions and antioxidant activities in quinoa from Qinghai[D]. Xining: Qinghai University, 2018: 26.
- [22] 商海军, 蒋丽君, 於春, 等. 藜麦的营养功能及其蛋白和皂苷提取的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2021, 27(4): 43-48.
SHANG Hai-jun, JIANG Li-jun, YU Chun, et al. Nutritional function of quinoa and extraction status of quinoa protein and saponin[J]. Food and Nutrition in China, 2021, 27(4): 43-48.
- [23] 李雪, 谭运寿, 马贵刚, 等. 山茶籽油研究应用进展[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(11): 191-196.
LI Xue, TAN Yun-shou, MA Gui-gang, et al. Advance in research and application of *Camellia* oil[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(11): 191-196.
- [24] 赵璐, 张蕾. 超声辅助加热回流法提取无患子皂苷新工艺的研究[J]. 技术与创新管理, 2021, 42(3): 275-280, 347.
ZHAO Lu, ZHANG Lei. Study on the new technology of ultrasonic-assisted reflux extraction of *Sapindus saponins*[J]. Technology and Innovation Management, 2021, 42(3): 275-280, 347.

(下转第 245 页)

摄入情况,不能盲目跟风。随着人们对健康生活的追求,社会上涌现出大量健身房,帮助人们针对身体各部位进行针对性训练,短时间内就能使身体某一部位达到自己想要的状态。然而,饮食如果不进行相应转变,就会使人体无法从食品中获取相应营养元素,难以适应高强度的健身房训练,不仅训练会因体力不支难以为继,也会对训练者身体造成严重伤害。因此,要针对不同的训练项目进行不同的饮食安排,以此助力身心健康发展。

(2) 锻炼时借助食品补充不同营养元素可以满足不同的运动需求。不同的食品中蕴含着不同的营养成分,只要了解食品的营养成分并进行合理搭配,就可以实现科学的饮食运动计划,帮助体育运动顺利进行,加强运动者身体素质。比如,在进行慢跑时,要注重水分和糖分的补充,防止出现低血糖现象。慢跑对于改善人体素质具有很大裨益,但由于慢跑通常只有保持较长时间的运动才能达到锻炼的目的,所以慢跑往往伴随着人体内大量水分的蒸发和能量消耗。慢跑时要特别注重及时饮水,饮食安排也要尽量选择含糖较高的食谱,保证慢跑能够达到减肥和优化个人体质的目的。

体育运动过程中会消耗大量蛋白质,要格外注重蛋白质的补充。尤其是专业运动员,蛋白质作为身体细胞的重要组成部分,可以帮助运动员调节身体状态,使运动员以最好的精神面貌参加体育竞赛活动。因此,在有大量体育训练需要完成时,要及时安排蛋白质含量丰富的食品为运动者提供能量,帮助运动者肌肉快速恢复活性,达到更好的体育锻炼效果。肉、蛋、鱼类作为补充蛋白质的有效食品,要合理加入运动员食谱中。同时,碳水化合物作为能量的主要提供者,钙、维生素和微量元素等营养物质作为身体调节的必需品,也要在食谱中合理安排,针对运动员需求进行营养补充。

水作为生命之源,也是运动中必须补充的营养元素。运动往往伴随着流汗,人体通过流汗来调节体温的同时,也会使部分营养元素流失。若不方便通过进食补充营养成分,可以利用功能性运动饮料。功能性运动饮料针对运动中所需的营养成分进行科学设计,对于大部分人而言都具有普适性,在运动中积极使用能够有效而快速地补充因流汗流失的水分和众多营养元素,帮助运动者迅速恢复体力。由此看来,运动时选择合适的食品以补充不同的营养元素能使运动达到更好的效果,有利于身心健康发展。

(3) 有助于针对不同年龄段的体育运动补充所需营养成分。书中明确指出:不同年龄段具有不同的运动需求,即便开展同样的运动,由于身体状况不同,也具有不同的营养需求。因此,要针对不同年龄段的人群,定制个性化的食谱。

青少年正处于身体的成长期和发育期,其本身的能

量消耗就比较大,对各种营养成分的需求更为旺盛,稍不注意就会出现营养不良的情况。所以,要及时补充各种维生素和矿物质,避免因为此类能量不足导致青少年身体发育变缓甚至停滞。同时青少年精力较其他年龄段的人群更加旺盛,体力消耗更快,所以要为青少年提供多种补充糖类和蛋白质的方式。除一日三餐外,可以允许学生利用课堂之外的时间适量食用零食,以此弥补其能量消耗。此外,青少年正处于中学的紧张学习中,学习压力大,脑力消耗过多,因此要为学生补充蛋白质和身体必需氨基酸。大豆类的食品就是很好的选择,其富含大量赖氨酸,对脑组织发展具有特殊的意义。总而言之,对于青少年旺盛体育运动的需求,除为其提供营养平衡的三餐之外,借助健康零食的方式,增加下午茶和夜宵以保证其营养成分摄入的充足。

快节奏的生活模式使上班族工作繁重、压力大,因此人们早起困难,上班前时间紧迫,通常没有时间吃早饭就匆忙前往工作地点。缺乏早餐的营养补充,在工作中更易感觉疲惫。因此,在上班族的饮食安排中,除保证一日三餐的按时用餐外,还要在食谱上选择高能量食品,奶粉、香肠、蛋糕等便携的高热量食品非常适合在时间紧张的早晨为上班族提供充足能量。总之,食品营养是健康身体的必要前提,不注重饮食的合理摄入,光靠体育运动根本无法保障身体健康。

总而言之,科学的食品营养摄入有助于锻炼者更好地进行体育运动。食品营养与体育运动的协调发展,有助于人体健康发展。因此,在日常生活中,人们要按时科学地摄入一日三餐,食谱安排依据近期体育运动活动而定,同时体育活动时间尽量避开早晨空腹时间和饭后时间,保证营养与运动协调发展,助力身体健康成长。

(作者:张志刚,男,焦作师范高等专科学校〔太极文化研究所〕体育学院讲师,硕士)

(上接第 156 页)

- [25] ITO Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 065(2): 145-168.
- [26] ZHANG M, IGNATOVA S, HU P, et al. Cost-efficient and process-efficient separation of geniposide from *Gardenia jasminoides ellis* by high-performance counter-current chromatography [J]. *Separation and Purification Technology*, 2012, 89: 193-198.
- [27] 吴佩娟, 卢凤来, 羊学荣, 等. HSCCC 分离纯化未成熟罗汉果皂苷类化合物 [J]. *广西植物*, 2018, 38(5): 545-551.
- WU Pei-juan, LU Feng-lai, YANG Xue-rong, et al. Separation and purification of mogrosides from unripe *Siraitia grosvenorii* by high-speed countercurrent chromatography [J]. *Guihaia*, 2018, 38 (5): 545-551.