

低共熔溶剂提取黄精多糖工艺优化及抗氧化活性研究

汪涛^{1,2,3}, 周新群¹, 孙君社^{1,2}, 张志民^{1,2},

王民敬^{1,2}, 胡雪芳^{1,2}, 裴海生^{1,2,*}

(1. 农业部规划设计研究院 农产品加工工程研究所, 北京 100121;

2. 农业部农产品产后处理重点实验室, 北京 100121;

3. 贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 选用不同离子组合的低共熔溶剂提取黄精多糖, 筛选确定尿素-氯化胆碱低共熔溶剂提取黄精多糖效果最好, 随后在单因素考察的基础上, 采用响应面分析法优化尿素-氯化胆碱低共熔溶剂提取黄精多糖的工艺条件, 并进行了低共熔溶剂重复利用对多糖提取率和含量的影响研究。通过测定总抗氧化能力、超氧阴离子自由基(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)和1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率考察黄精多糖体外抗氧化活性。结果表明: 低共熔溶剂提取黄精多糖的优化工艺参数为温度70℃、尿素-氯化胆碱摩尔比1.19、时间42.30 min、液料比20.75 mL/g, 此条件下的多糖提取率为18.55%, 较预测值相对误差为2.69%, 比传统的热水浸提法增加了139.97%。低共熔溶剂重复利用不仅对黄精多糖提取率没有影响, 在重复利用第3次时提取率最高, 较新鲜溶剂提高了83.9%; 而且黄精多糖含量随重复次数增加呈不断增加后趋于稳定的趋势, 重复利用4、5次后多糖含量基本趋于稳定, 达到63.48%、64.12%, 说明其纯度不断提高。黄精多糖的 $O_2^{\cdot-}$ 自由基清除能力、DPPH自由基清除能力、总抗氧化能力随质量浓度的增加而增加; 在测定的质量浓度范围内, 清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基和DPPH自由基的 IC_{50} 分别为0.524 mg/mL和0.951 mg/mL, 总抗氧化能力最高为241.2 μ g/mL。因此, 低共熔溶剂法是一种效率高、清洁环保的新型黄精多糖提取方法。

关键词: 低共熔溶剂; 黄精多糖; 响应面; 重复利用; 抗氧化活性

中图分类号: TS201; R285

文献标志码: A

黄精(*Polygonatum sibiricum*, PS)是我国首批进入药食同源的中药品种, 富含多糖、黄酮、多酚、葱醌甾体皂苷、生物碱和人体所需的多种氨基酸等重要的活性成分^[1]。黄精多糖(*Polygonatum sibiricum* polysaccharides, PSPs)是黄精的主要活性成分之一, 具有抗氧化^[2]、抗衰老^[3]、抗疲劳^[4]、增强免疫^[5]、

治疗糖尿病^[6]和有助于预防老年痴呆^[7]等作用。Long等^[8]用生理盐水和PSPs溶液分别处理荷瘤小鼠, 发现PSPs通过激活TLR4受体来阻碍肺癌MAPK/NF- κ B信号通路, 发挥免疫增强作用, 表明PSPs未来有可能用于预防肺癌的发生。

目前, PSPs提取技术主要集中在热水浸提、碱

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21776142)。

第一作者: 汪涛, 男, 硕士研究生, 研究方向为应用生物技术

*通信作者: 裴海生, 男, 高级工程师, 博士, 主要从事生物质资源综合利用方面的研究。

提、酶解、微波和超声波辅助等,但美中不足的是这些技术存在能耗大、效率低、价格昂贵和污染环境等诸多问题,最关键的是它们很难应用于大批量的工业化生产^[9-10]。为了解决这些问题,需要开发一种新型的提取方法。低共熔溶剂(deep eutectic solvents, DESs)是由氢受体与氢供体按合适比例混合加热形成的液态混合溶剂,其凝固点比任何一种配位剂都要低,具有不易挥发、价格低、毒性小、绿色环保、容易制备、不需要纯化等优势,更重要的是它可以适用于工业化生产^[11-14]。目前,DESs的应用主要集中在化工方面,在药食方面相对较少。Tang等^[15]应用DESs提取白柏中黄酮类化合物,与热水浸提法相比较,黄酮类化合物槲皮素、杨梅素和穗花杉双黄酮提取率分别增加了128.7%、111.7%和111.1%。Chanioti等^[16]选取DESs中氯化胆碱-柠檬酸(DES-CA)和胆碱氯化物-乳酸(DES-LA)分别提取橄榄渣中酚类化合物,发现DES-CA提取的总酚含量和抗氧化活性均高于均质化、微波、超声波和高静水压力辅助等提取方法。DESs除了提取黄酮、酚类物质的应用外,已有提取多糖方面的相关报道,如Saravan等^[17]利用DESs结合亚临界水提取褐藻多糖,结果表明在150℃、1.99 kPa,含水量70%及液料比36.81 mL/g条件下,褐藻多糖的提取率为14.93%。DESs之所以能够增加植物活性物质溶出,可能与其自身的理化性质有关,DESs黏度低且呈弱酸性,黏度低的溶液有很好的渗透能力,再者弱酸性溶液有辅助分解植物细胞壁木质素及纤维素的作用^[18]。但到目前为止,未见其应用于提取PSPs的报道。因此,本研究利用DESs提取PSPs,通过响应面分析优化提取工艺,并通过总抗氧化能力试剂盒法、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法和邻苯三酚自氧化法对其抗氧化活性进行研究,以期PSPs工业化提取和功能性研究提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄精(*Polygonatum sibiricum*),辽宁澳地森生物工程有限公司。

氯化胆碱,上海国药控股化学试剂有限公司;乙二醇、柠檬酸、丙三醇、尿素、草酸、浓硫酸、苯酚、邻苯三酚、1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)自由基、抗坏血酸,国药集团化学试剂有限公司;总抗氧化能力测

定试剂盒,南京建成生物工程研究所。所有试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1780型紫外可见分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司;GM-0.5型隔膜真空泵,天津市津腾实验设备有限公司;HWS-26型电热恒温水浴锅,苏州江东精密仪器有限公司;RE-52B型旋转蒸发仪,上海上自仪转速表仪表电机有限公司;AR223CN型电子天平,奥豪斯(常州)仪器有限公司;H1850型台式离心机,北京普析通用仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PSPs提取方法与测定

热水浸提法^[19]:称取0.2 g黄精粉(80目),在温度80℃、液料比1.5 mL/g的条件下提取120 min,重复提取2次得到黄精多糖。

DESs提取法:称取0.2 g黄精粉(80目)与DESs混匀,水浴提取。待提取结束后,加5.0 mL蒸馏水终止反应。真空抽滤,收集滤液,蒸发浓缩,加入无水乙醇至最终含量为80%,静置醇沉2 h,7 000 r/min离心8 min得到粗多糖。

提取实验均重复3次,采用苯酚-硫酸法^[23]测定PSPs含量。葡萄糖标准曲线: $y = 0.0082x + 0.0283$, $R^2 = 0.9991$ 。按式(1)计算PSPs提取率:

$$\text{PSPs 提取率} = \frac{\rho \times V \times d \times 10^{-6}}{M_1} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, ρ ,PSPs水溶液质量浓度, $\mu\text{g/mL}$; V ,PSPs水溶液体积,mL; d ,稀释倍数; M_1 ,样品干质量,g。

1.3.2 DESs配位剂对PSPs提取率的影响

将乙二醇-氯化胆碱(DES-EC)、柠檬酸-氯化胆碱(DES-GC)、丙三醇-氯化胆碱(DES-CC)、尿素-氯化胆碱(DES-UC)、草酸-氯化胆碱(DES-OC)分别按氢受体与氢供体摩尔比2.0混匀,在100℃水浴至溶解。在温度80℃、液料比20 mL/g、时间30 min条件下,按1.3.1实验步骤分别提取PSPs并计算提取率。

1.3.3 单因素实验设计

在DESs配位剂筛选结果的基础上,分别选取DESs配位剂摩尔比(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0)、温度(70、80、90、100、110℃)、时间(15、30、45、60、75 min)和液料比(10、20、30、40、50 mL/g)进行单因素实验,考察各因素对PSPs提取效果的影响,按

1.3.1 实验步骤分别提取 PSPs 并计算提取率。

1.3.4 响应面优化试验

在单因素实验的基础上,确定最适温度,并利用响应面分析法对其余 3 个因素进一步优化。根据 Box-Behnken 试验设计原理,选取尿素-氯化胆碱摩尔比(A)、时间(B)及液料比(C)3 个因素为自变量,以 PSPs 提取率为响应值,进行三因素三水平的响应面分析,优化 PSPs 的提取工艺,试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	-1	0	1
A 摩尔比	1.0	1.5	2.0
B 时间/min	30	50	70
C 液料比/(mL·g ⁻¹)	10	20	30

1.3.5 DESs 重复利用实验

按照 1.3.1 节 DESs 提取 PSPs 方法,将醇沉离心得到的上清液真空蒸发至体积不变以回收 DESs,根据 1.3.4 得到的优化工艺条件重复利用 DESs 提取 PSPs,按式(1)、式(2)计算 PSPs 提取率和含量。

$$w(\text{PSPs}) = \frac{\rho \times V \times d \times 10^{-6}}{M_2} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, ρ , PSPs 水溶液含量, $\mu\text{g/mL}$; V , PSPs 水溶液体积, mL ; d , 稀释倍数; M_2 , 粗多糖干质量, g 。

1.3.6 PSPs 抗氧化活性测定

1.3.6.1 O₂⁻ 自由基清除率的测定

取 1.0 mL 不同质量浓度的 PSPs 与 5.0 mL Tris-HCl 溶液 (pH 值 8.2) 混匀, 25 ℃ 水浴 20 min 后加入 1.0 mL 0.05 mol/L 邻苯三酚溶液, 混匀, 25 ℃ 水浴 5 min, 加入 1.0 mL 浓盐酸终止反应, 蒸馏水调 0, 在波长 325 nm 处测定吸光度^[20]。按式(3)计算 O₂⁻ 自由基清除率。

$$\text{O}_2^- \text{ 自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, A_0 , 蒸馏水代替样品的吸光度; A_{x_0} , 蒸馏水代替邻苯三酚的吸光度; A_x , 样品的吸光度。

1.3.6.2 DPPH 自由基清除率的测定

取 2.0 mL 不同质量浓度的 PSPs 与 2.0 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混匀, 暗反应 30 min, 蒸馏水调 0, 在波长 517 nm 处测定吸光度(A_x); 同样测定 2.0

mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液与 2.0 mL 体积分数 70% 乙醇溶液的吸光度(A_0), 以及 2.0 mL 不同质量浓度的 PSPs 与 70% 乙醇溶液的吸光度(A_{x_0})^[21]。按式(4)计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x_0})}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

1.3.6.3 总抗氧化能力测定

根据总抗氧化能力测定试剂盒操作步骤测定不同质量浓度的 PSPs 总抗氧化能力^[22]。按式(5)计算 PSPs 的总抗氧化能力。

$$\text{总抗氧化能力} = \frac{\text{OD}_{\text{测定}} - \text{OD}_{\text{对照}}}{0.01 \times 30} \times \frac{V_{\text{反}}}{V_{\text{样}}} \times d \quad (5)$$

式(5)中, 总抗氧化能力, $\mu\text{g/mL}$; $V_{\text{反}}$, 反应液体积, mL ; $V_{\text{样}}$, 取样液体积, mL ; d , 稀释倍数。

1.4 数据处理

采用 Design Expert 8.0.6、Origin 2017 和 SPSS 19 对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 DESs 配位剂对 PSPs 提取率的影响分析

DESs 选择不同的配位剂结合, 可以得到具有特定理化性质的溶剂。根据配位剂的性质可以将 DESs 分为 3 种类型: I 类由季铵盐和 MCl_x 形成, 该类与金属卤化物/咪唑盐体系类似; II 类由水合金属卤化物与氯化胆碱形成; III 类由氢受体与氯化胆碱组成, 氢受体通常是酰胺、羧酸或醇^[11,23]。I、II 类具有金属离子性质, 不适合在药食方面的应用, 这里主要考察 III 类 DESs, 在此基础上选择乙二醇-氯化胆 (DES-EC)、柠檬酸-氯化胆碱 (DES-GC)、丙三醇-氯化胆碱 (DES-CC)、尿素-氯化胆碱 (DES-UC)、草酸-氯化胆碱 (DES-OC) 作为提取 PSPs 的研究对象。这 5 种 DESs 按摩尔比 2.0 混合溶解, 在温度 80 ℃、液料比 20 mL/g 条件下, 提取 PSPs 30 min, 结果如图 1。DES-UC 对 PSPs 提取效果最好, 多糖提取率为 15.11%。与热水浸提得到的 PSPs 提取率 (7.73%) 进行比较, PSPs 提取率由大到小依次为 DES-UC、DES-OC、DES-CC、DES-GC、DES-EC、热水浸提。引起 PSPs 提取效果差异的原因一方面可能是 DESs 的理化性质, 如黏度、极性和溶解度不同; 另一方面可能是 DESs 与 PSPs 之间的键能和静

电作用^[24]。根据实验结果,选择 DES-UC 作为后续的研究对象。

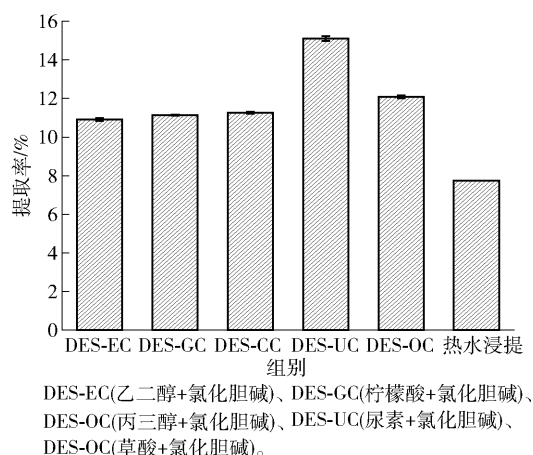


图1 DESs 配位剂对 PSPs 提取率的影响

Fig. 1 Effect of DESs complexing agent on extraction rate of PSPs

2.2 单因素实验结果

PSPs 的单因素实验结果见图 2。当尿素-氯化胆碱摩尔比小于 1.0 时,液态 DESs 迅速凝固无法与黄精粉混合均匀,不利于 PSPs 的提取,所以选取摩尔比 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 为研究参数。由图 2

(a) 可知, PSPs 提取率随摩尔比的增加而减小,与 DESs 特定的理化性质,如酸碱度、溶解度和黏度等对黄精细胞壁的影响有关^[17,25]。所以本实验选取尿素-氯化胆碱摩尔比 1.0 作为后续研究参数。

当温度低于 70 ℃ 时, DESs 无法形成液态溶剂,所以选取温度 70、80、90、100、110 ℃ 为研究参数。由图 2(b) 可知, PSPs 提取率随温度的升高而降低,可能是温度过高使 PSPs 发生了降解,而且温度对 DESs 的黏度、导电率和酸碱度等性质也有影响。所以本实验选取温度 70 ℃ 作为后续研究参数。

由图 2(c) 可知在一定的时间范围内, PSPs 提取率随时间的增加而增加;当达到一定时间后,反应体系达到平衡, PSPs 提取率随之降低,可能是提取时间过长使多糖分子发生了过度降解。PSPs 提取率在 60 min 时达到最大值,所以本实验选取时间 60 min 作为后续研究参数。

由图 2(d) 可知, PSPs 提取率随液料比增加呈先增加后下降的趋势,出现这种趋势与 DESs 的作用程度、黏度有关。液料比过大时,物质间相互作用力太小,使多糖溶出率降低,且过多的溶剂体积会对后续的处理造成困难,增加了工艺的成本;液料比过小使黏度增大,多糖分子截留在 DESs 中,降低了

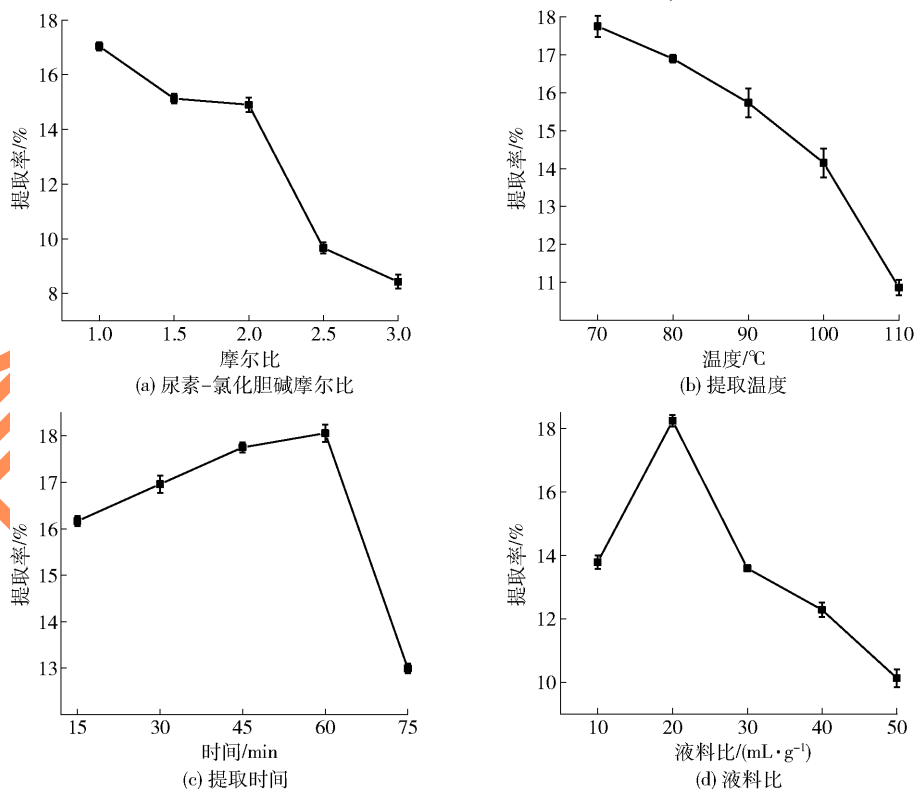


图2 不同因素对 PSPs 提取率的影响

Fig. 2 Effect of different factors on extraction rate of PSPs

PSPs 提取率。液料比为 20 mL/g 时,PSPs 提取反应体系达到平衡,提取率最大,所以本实验选取液料比 20 mL/g 作为后续研究参数。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 响应面试验设计与结果

在单因素实验结果的基础上,设计了三因素三水平的响应面试验。17 组试验方案及结果见表 2。

2.3.2 模型建立与方差分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对结果进行方差分析(见表 3),将数据进行多元回归拟合,得到二次响应面回归方程为: $Y = -5.20 + 6.21A + 0.25B + 1.43C + 0.19AB - 0.166AC + 7.55 \times 10^{-2}BC - 4.57A^2 - 5.88 \times 10^{-3}B^2 - 0.03C^2$ 。回归方程一次项系数绝对值的大小,决定了各因素对响应值影响的主次顺序^[26],所以各因素对 PSPs 提取率的影响由大到小依次为 A、C、B。由表 3 可知,本实验所建模型中 A、B、AB、AC、A²、B²、C² 影响均极显著 ($P < 0.01$)。模型极显著 ($P < 0.01$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明该模型成立。模型的相关系数 $R^2 = 0.998\,0$,说明该模型实验值与预测值高度拟合;校正相关系数 $R^2_{Adj} = 0.995\,4$,表明有 99.54% 的响应值变化可以用模型来解释,且 R^2 和 R^2_{Adj} 均接近 1,说明模型准确性和通用性较高;变异系数 $CV = 1.01\% <$

10%,说明实验的可信度与精确度高,所以可以用此模型对 PSPs 提取工艺进行分析和预测。

表 2 响应面试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of response surface experiment					
实验号	A	B	C	PSPs 提取率/%	
				实验值	预测值
1	0	0	1	18.11	18.29
2	0	0	1	18.30	18.29
3	-1	0	-1	13.72	13.90
4	0	0	1	18.27	18.29
5	1	1	0	15.34	15.49
6	1	0	-1	12.82	12.64
7	-1	0	-1	15.51	15.56
8	0	1	-1	12.22	12.15
9	1	0	-1	14.34	14.29
10	0	1	-1	12.41	12.47
11	0	1	0	18.37	18.29
12	-1	-1	0	18.10	17.98
13	-1	1	0	13.05	12.98
14	0	-1	-1	18.37	18.29
15	0	0	0	18.42	18.29
16	0	-1	-1	13.72	13.67
17	1	-1	0	12.79	12.90

表 3 回归方程的方差分析

Tab. 3 Analysis of variance for regression equation						
方程来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	97.71	9	10.86	389.64	<0.000 1	**
A	3.20	1	3.20	114.86	<0.000 1	**
B	2.96	1	2.96	106.40	<0.000 1	**
C	1.125×10^{-4}	1	1.125×10^{-4}	4.038×10^{-3}	0.951 1	
AB	14.55	1	14.55	522.34	<0.000 1	**
AC	2.74	1	2.74	98.30	<0.000 1	**
BC	0.096	1	0.096	3.45	0.150 7	
A ²	5.49	1	5.49	197.08	<0.000 1	**
B ²	22.75	1	22.75	816.50	<0.000 1	**
C ²	39.28	1	39.28	1 409.87	<0.000 1	**
残差	0.20	7	0.028			
失拟性	0.14	3	0.046	3.30	0.139 4	不显著
纯误差	0.056	4	0.014			
总和	97.90	16				
$R^2 = 0.998\,0$			$R^2_{Adj} = 0.995\,4$	$CV = 1.10\%$		

**表示差异极显著 ($P < 0.01$)

2.3.3 响应面分析

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面如图 3。等高线图可以直观地反映自变量交互作用的显著性,圆形表示两者交互作用不显著,而椭圆形则表示显著。

由图 3 可知,时间和摩尔比交互作用的等高线呈椭圆形,表明两者交互作用对 PSPs 提取率有极显著影响;从三维图可以看出,随摩尔比和时间的增

加,PSPs 提取率呈先增大后减小的趋势。摩尔比与液料比相互作用的等高线呈椭圆形,表明两者相互作用极显著;从三维图可以看出,随摩尔比和液料比的增加 PSPs 提取率呈先增加后减小的趋势。液料比与时间相互作用的等高线几乎呈圆形,表明两者相互作用不显著,这与方差分析结果一致,从三维图可以看出,响应面曲线坡度较为陡峭,表明液料比和时间对 PSPs 提取率的影响均较大,随液料比与时间的增加 PSPs 提取率呈先增加后减小的趋势。

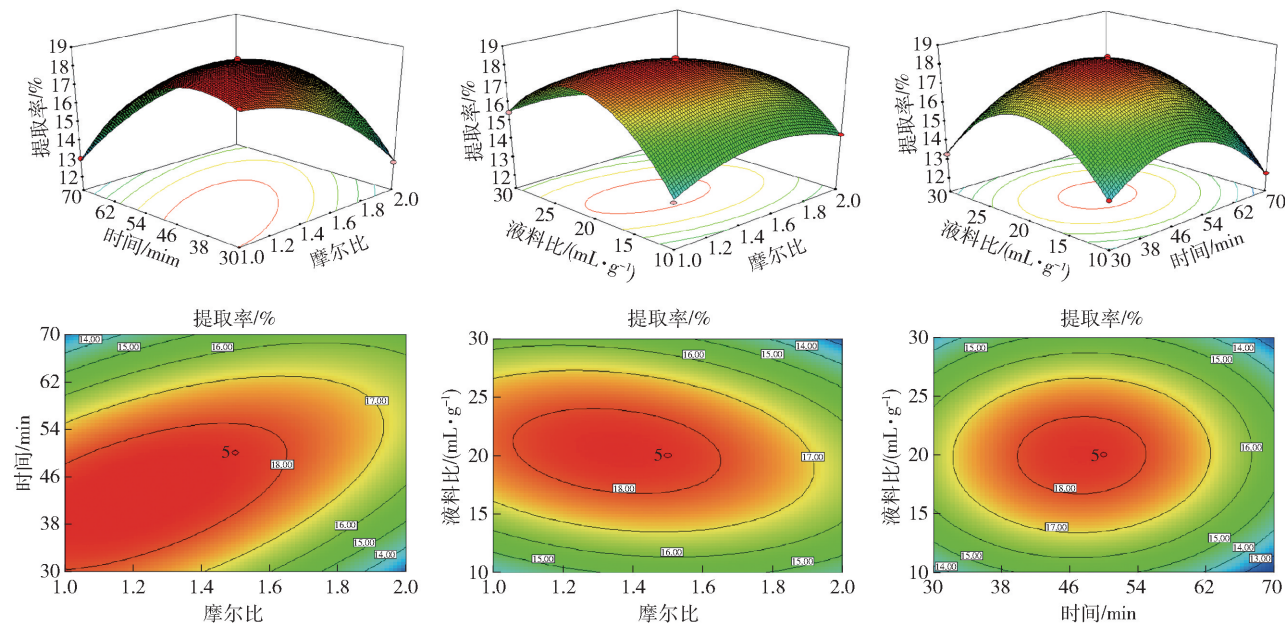


图3 各因素交互作用对 PSPs 提取率的影响

Fig. 3 Effect of interaction of different factors on extraction rate of PSPs

2.3.4 响应面模型预测值验证

通过软件 Design Expert 8.0.6 分析得到 PSPs 优化提取工艺参数为摩尔比 1.19、提取时间 42.30 min 和液料比 20.75 mL/g,在此条件下 PSPs 提取率的预测值为 18.61%。为了验证响应面结果的可靠性,对所得优化条件进行 3 组平行实验验证,所得 PSPs 提取率平均值为 18.55%,与预测值接近(相对误差为 2.69%),说明该模型可以准确预测 PSPs 提取率,优化工艺条件可靠,较传统的热热水浸提增加了 139.97%。

2.4 DESs 重复利用对 PSPs 提取率及含量的影响

DESs 重复使用 0~5 次时,PSPs 提取率分别为 18.81%、23.22%、23.47%、34.60%、26.23%、22.34%,呈先增加后降低的趋势;在重复使用 3 次时 PSPs 提取率达到最大(见图 4)。PSPs 含量分别为 43.25%、55.79%、56.97%、58.97%、63.48%、

64.12%,呈现逐渐上升的趋势,说明 PSPs 纯度越来越高,充分体现了 DESs 经济节约、绿色环保的特点。出现以上现象可能与 DESs 热稳定性差有关,不断地高温反复使用,使其黏度及微观结构发生变化。在实验过程也发现重复使用的 DESs 物理状态发生了变化,在低温下呈液体状态,较新鲜溶剂流动性更大,但具体原因还需进一步探究。

2.5 PSPs 的抗氧化活性分析

2.5.1 O_2^- 自由基清除能力分析

在测定的 PSPs 质量浓度范围内,随质量浓度的增加, O_2^- 自由基清除率也增加,当质量浓度达到 1.2 mg/mL 时,清除率几乎趋于稳定,说明采用 DESs 提取的 PSPs 具有一定的 O_2^- 自由基清除能力(见图 5)。经拟合,抗坏血酸曲线方程为 $y = 0.036 + 15.994x - 119.93x^2 + 28.13x^3$, $R^2 = 0.9952$, $IC_{50} = 0.444$ mg/mL;PSPs 曲线方程为 $y = 4.53 + 161.25x -$

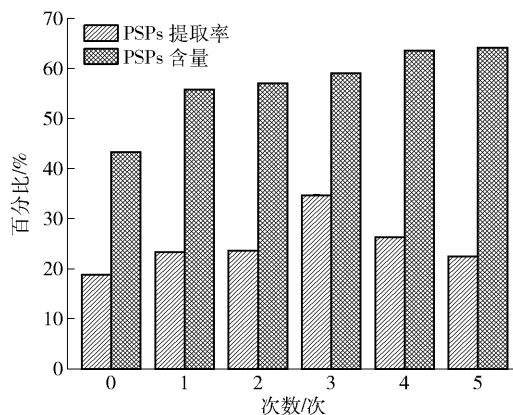
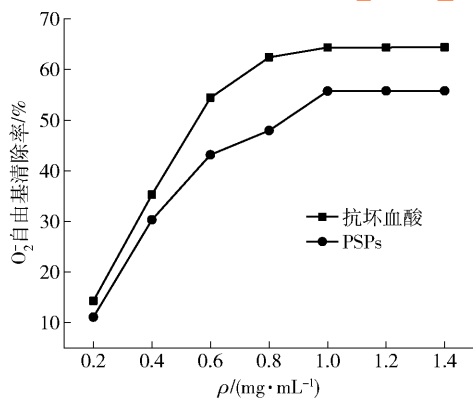


图4 重复使用 DESs 对 PSPs 提取率及含量的影响

Fig. 4 Effect of reuse of DESs on extraction rate and content of PSPs

$124.48x^2 + 30.21x^3$, $R^2 = 0.9935$, $IC_{50} = 0.524$ mg/mL。比较 IC_{50} , 抗坏血酸的 O_2^- 自由基清除能力大于 PSPs。宫江宁等^[27]用传统水提醇沉法提取 PSPs, 清除 O_2^- 自由基的 IC_{50} 为 23.33 mg/mL, 显著小于 DESs 提取的 PSPs 的 O_2^- 自由基清除能力。胡月琴等^[28]用有机溶剂石油醚和乙酸乙酯提取的 PSPs 没有 O_2^- 自由基清除能力。至少说明 DESs 这种新型溶剂不会造成 PSPs 对 O_2^- 自由基清除能力的下降。

图5 PSPs 对 O_2^- 自由基的清除率Fig. 5 Scavenging rate of PSPs on O_2^- free radical

2.5.2 DPPH 自由基清除能力分析

在测定的 PSPs 质量浓度范围内, DPPH 自由基清除率与 PSPs 质量浓度具有量效关系, 随质量浓度的增加而增加, 说明采用 DESs 提取的 PSPs 具有一定 DPPH 自由基清除能力, 见图 6。经拟合, PSPs 曲线方程为 $y = 15.13 + 23.86x + 8.72x^2 + 4.86x^3$, $R^2 = 0.9981$, $IC_{50} = 0.951$ mg/mL。比较 IC_{50} 可知,

DESs 提取的 PSPs 的 DPPH 自由基清除能力低于抗坏血酸, 但显著高于传统水提醇沉法提取的 PSPs 的 DPPH 自由基清除能力 ($IC_{50} = 19.57$ mg/mL)。Zhang 等^[29]研究发现微波辅助处理 PSPs, 使其 DPPH 自由基清除能力增强, 主要原因是清除能力最低的组分发生了降解; 而 DESs 的性质类似于离子液, 同样具有降解活性物质的能力。另外, 当 PSPs 质量浓度为 1 g/L 时, DESs 提取的 PSPs 的 DPPH 自由基清除率为 52.57%, 而魏炜等^[30]用超高压提取的 PSPs 的 DPPH 自由基清除率为 34.14%, 说明 DESs 对 PSPs 抗氧化能力有一定的提高。

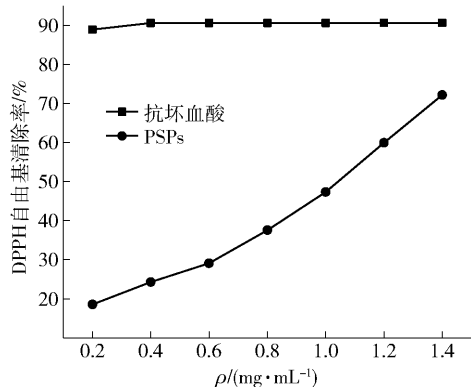


图6 PSPs 对 DPPH 自由基的清除率

Fig. 6 Scavenging rate of PSPs on DPPH free radical

2.5.3 总抗氧化能力分析

在测定的 PSPs 质量浓度范围内, 总抗氧化能力与质量浓度具有量效关系, 见图 7。随质量浓度的增加, 总抗氧化能力增加, 0.2 ~ 1.0 mg/mL 时总抗氧化能力增加较快; 当质量浓度为 1.4 mg/mL 时, 总抗氧化能力为 241.2 μ g/mL。PSPs 的总抗氧化能力略低于同质量浓度的抗坏血酸, 但仍具有一定的抗氧化能力。

3 结 论

使用 DESs 提取 PSPs, 筛选确定尿素-氯化胆碱低共熔溶剂提取 PSPs 效果最好, 在单因素实验的基础上, 采用响应面法得到优化工艺参数为温度 70 $^{\circ}$ C、尿素-氯化胆碱摩尔比 1.19、提取时间 42.30 min、液料比 20.75 mL/g, 此条件下 PSPs 提取率 18.55%, 较传统的热水浸提 PSPs 提取率增加了 139.97%。DESs 重复利用不仅对 PSPs 提取率没有影响, 且在重复利用第 3 次时提取率达到最高, 较新鲜溶液提高了 83.9%, 可能是重复利用使 DESs 键

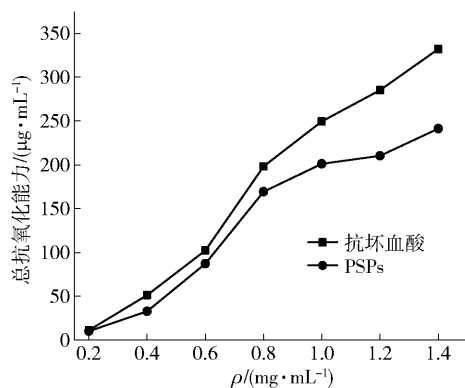


图7 PSPs的总抗氧化能力

Fig.7 Total antioxidant capacity of PSPs

能增加,破坏了PSPs的糖苷键,使大分子降解,PSPs更容易溶出;新鲜DESs提取PSPs时含量为43.25%,在重复利用4、5次后PSPs含量基本趋于稳定分别为63.48%、64.12%,说明纯度不断增高。此外,PSPs具有一定的 O_2^- 自由基和DPPH自由基清除能力及总抗氧化能力,且与质量浓度呈量效关系; O_2^- 自由基和DPPH自由基清除能力高于水提法和有机溶剂法。DESs作为低成本、可食用、可选择组合的新型绿色溶剂,为提取食品中活性成分提供了新思路,但DESs在提取过程中对活性成分的结构、理化性质的影响还需要进一步探索。

参考文献:

- [1] 王晓慧,赵祺,姜程曦.九华黄精药材道地性研究[J].园艺与种苗,2019,39(4):19-23,26.
WANG X H, ZHAO Q, JIANG C X. Study on the authenticity of Jiuhua Huangjing medicinal materials [J]. Horticulture & Seedlings, 2019, 39(4): 19-23, 26.
- [2] ZHANG H, CAI X T, TIAN Q H. Microwave-assisted degradation of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* and antioxidant activity [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(4): 754-761.
- [3] 衡银雪,刘丹丹,边凤霞,等.黄精多糖抗衰老作用及其食品应用研究进展[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2017,34(6):111-117.
HENG Y X, LIU D D, BIAN F X, et al. Anti-aging effects of *Polygonatum* polysaccharide and its application in food application [J]. Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2017, 34(6): 111-117.
- [4] 马怀芬,方欢乐,刘卓越.黄精多糖抗疲劳作用的研究[J].现代交际,2017(9):190.
MA H F, FANG H L, LIU Z Y. Study on anti-fatigue effect of *Polygonatum* polysaccharide [J]. Modern Communication, 2017(9): 190.
- [5] 华岩,周辟平,梁金孟.黄精多糖对大强度运动大鼠外周血肌酸激酶、尿素氮及部分免疫指标的影响[J].现代预防医学,2019,46(5):875-878.
HUA Y, ZHOU S P, LIANG J M. Effects of *Polygonatum* polysaccharide on peripheral blood creatine kinase, urea nitrogen and partial immune indexes in rats with high intensity exercise [J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(5): 875-878.
- [6] 陶爱恩,赵飞亚,王莹,等.黄精属植物抗糖尿病本草学、物质基础及其作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(15):15-24.
TAO A E, ZHAO F Y, WANG Y, et al. Research progress in anti-diabetic herbal medicine, material basis and mechanism of action of *Polygonatum* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(15): 15-24.
- [7] CUI X W, WANG S Y, CAO H, et al. A review: the bioactivities and pharmacological applications of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1170.
- [8] LONG T T, LIU Z J, SHANG J C, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF-KB signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 813-821.
- [9] 徐兵兵,于勇杰,吴帆,等.黄精多糖研究综述[J].中国野生植物资源,2015,34(4):38-41,46.
XU B B, YU Y J, WU F, et al. Study on the *Polygonatum* polysaccharide [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2015, 34(4): 38-41, 46.
- [10] 贾宇涵,吴澎,郝良卿,等.黄精多糖提取工艺及功能作用研究进展[J].中国调味品,2018,43(11):157-161.
JIA Y H, WU P, XI L Q, et al. Research progress in extraction process and functional effects of *Polygonatum* Chinese polysaccharides [J]. China Condiment, 2018, 43(11): 157-161.
- [11] 王冬梅.低共熔溶剂分离木质纤维素及纤维素组分的利用[D].北京:北京化工大学,2018.
WANG D M. Using eutectic solvent to separate lignocellulose and cellulose components [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2018.
- [12] 郭振.糖类化合物在离子液体和低共熔溶剂中的溶解性能研究[D].北京:北京化工大学,2016.
GUO Z. Study on the solubility of carbohydrates in ionic liquids and eutectic solvents [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2016.
- [13] 张平静.低共熔溶剂在黄酮类化合物苷元制备与分

- 析中的应用[D].杭州:浙江工商大学,2019.
- ZHANG P J. Application of eutectic solvent in the preparation and analysis of flavonoid aglycones [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2019.
- [14] 王慧, 席小丽. 超高压辅助低共熔溶剂提取复方双黄连有效成分[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2019(3):628-638.
- WANG H, XI X L. Extraction of compound Shuanghuanglian active ingredient by ultra-high pressure assisted eutectic solvent [J]. Journal of Shanxi University (Natural Science Edition), 2019(3):628-638.
- [15] TANG B, PARK H E, ROW K H. Simultaneous extraction of flavonoids from *Chamaecyparis obtusa* using deep eutectic solvents as additives of conventional extractions solvents[J]. Journal of Chromatographic Science, 2015, 53(5):5.
- [16] CHANIOTI S, TZIA C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 48: 228-239.
- [17] SARAVAN P S, CHO Y N, WOO H C, et al. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis [J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 198:1474-1484.
- [18] LIANG J, ZENG Y, WANG H, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of novel polysaccharides from *Dendrobium officinale* by deep eutectic solvents [J]. Natural Product Letters, 2019, 33(22):3248-3253.
- [19] 孙庭阁, 赵瑞萌, 张玲. 热水浸提法提取黄精多糖最佳工艺研究[J]. 泰山医学院学报, 2010, 31(2):128-130.
- SUN T G, ZHAO R M, ZHANG L. Study on the best technology of extracting *Polygonatum* polysaccharide by hot water extraction[J]. Journal of Taishan Medical College, 2010, 31(2):128-130.
- [20] 张媛媛, 张彬. 苯酚-硫酸法与蒽酮-硫酸法测定绿茶多糖的比较研究[J]. 食品科学, 2016, 37(4):158-163.
- ZHANG Y Y, ZHANG B. Comparative study on determination of green tea polysaccharides by phenol-sulfuric acid method and anthrone-sulfuric acid method[J]. Food Science, 2016, 37(4):158-163.
- [21] 罗敬文, 司凤玲, 顾子玄, 等. 3种木耳多糖的抗氧化活性与抑菌能力比较分析[J]. 食品科学, 2018, 39(19):64-69.
- LUO J W, SI F L, GU Z X, et al. Comparative analysis of antioxidant activity and antibacterial activity of three kinds of *Auricularia* polysaccharides [J]. Food Science, 2018, 39(19):64-69.
- [22] 敢小双, 熊晨阳, 刘光荣, 等. 竹荪多糖提取工艺及其抗氧化性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13):223-226.
- GAN X S, XIONG C Y, LIU G R, et al. Extraction process of polysaccharides from bamboo stalk and its antioxidant activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(13):223-226.
- [23] 庄玮婧, 郑亚凤, 郑宝东. 黄酒抗氧化能力的测试与分析[J]. 福建轻纺, 2010(12):24-29.
- ZHUANG W J, ZHENG Y F, ZHENG B D. Test and analysis of antioxidant capacity of yellow wine [J]. Fujian Textile, 2010(12):24-29.
- [24] XU P, ZHENG G W, ZONG M H, et al. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2017, 4(1):34.
- [25] 张成武. 低共熔溶剂预处理木质纤维素的研究[D]. 天津:天津大学, 2016.
- ZHANG C W. Study on pretreatment of lignocellulose with eutectic solvent [D]. Tianjin: Tianjin University, 2016.
- [26] 李亚辉, 马艳弘, 黄开红, 等. 响应面法优化复合酶提取芦荟多糖工艺及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(18):63-68.
- LI Y H, MA Y H, HUANG K H, et al. Optimization of aloe polysaccharide treatment by complex enzyme method and its antioxidant activity by response surface methodology [J]. Food Science, 2014, 35(18):63-68.
- [27] 宫江宁, 云成悦, 吴婕, 等. 黄精多糖的提取优化及抗氧化活性研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2019, 37(3):18-23.
- GONG J N, YUN C Y, WU J, et al. Study on extraction optimization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Science Edition), 2019, 37(3):18-23.
- [28] 胡月琴, 刘小阳. 有机溶剂提取黄精有效成分及其氧化活性检测[J]. 光谱实验室, 2013, 30(3):1464-1468.
- HU Y Q, LIU X Y. Extraction of effective components of *Polygonatum chinense* with organic solvents and detection of its oxidative activity [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2013, 30(3):1464-1468.
- [29] ZHANG H, CAI X T, TIAN Q H, et al. Microwave-assisted degradation of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* and antioxidant activity [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(4):754.
- [30] 魏伟, 李彦伟, 刘凤霞, 等. 响应面法优化超高压提取黄精多糖工艺[J]. 精细化工, 2019, 36(5):875-

Study on Optimal Process and Antioxidant Activity of *Polygonatum sibiricum* Polysaccharides Extracted by Deep Eutectic Solvents

WANG Tao^{1,2,3}, ZHOU Xinqun¹, SUN Junshe^{1,2}, ZHANG Zhimin^{1,2}, WANG Minjing^{1,2},
HU Xuefang^{1,2}, PEI Haisheng^{1,2,*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing Engineering, Planning and Design Institute,
Ministry of Agriculture, Beijing 100121, China;

2. Key Laboratory of Post-Production of Agricultural Products, Ministry of Agriculture, Beijing 100121, China;

3. School of Brewing and Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In this study, *Polygonatum sibiricum* polysaccharides (PSPs) were extracted by deep eutectic solvents (DESs) with different ion combinations. The optimal effect of urea-choline chloride deep eutectic solvents was obtained. Based on single factor investigation, response surface analysis was used to investigate the optimum conditions for the extraction of PSPs by urea-choline chloride eutectic solvent. And the effect of DESs reuse on the extraction rate and content of PSPs was studied. The antioxidant activity of the PSPs *in vitro* was determined by measuring the total antioxidant capacity, O_2^- free radicals and DPPH free radical scavenging rate. The results showed that the optimum process parameters for PSPs extraction by DESs were as follows: temperature 70 °C, urea-choline chloride molar ratio 1.19, extraction time 42.30 min, liquid to material ratio 20.75 mL/g. Under this condition, the extraction rate of PSPs was 18.55%, and the relative error was 2.69% compared with the predicted value, which was 139.97% higher than that extracted by the traditional hot water. The DESs reuse not only had no effect on the extraction rate of PSPs, and the maximum was 83.9% higher than that of fresh solvents when reusing for the third time; and the content of PSPs increased continuously and tended to be stable with increasing the repeated times. After 4 or 5 times of reuse, the PSPs content was basically stabilized at 63.48% and 64.12%, respectively, which indicated that the purity was increasing. The total antioxidant capacity, scavenging rate of O_2^- free radical and DPPH free radical was in dose dependent manner with mass concentration of PSPs, which was increased with the increase of mass concentration. The total internal antioxidant capacity was 241.2 $\mu\text{g/mL}$, and the IC_{50} of O_2^- free radicals and DPPH free radical scavenging capacity were 0.524 mg/mL and 0.951 mg/mL, respectively. Therefore, the DESs method was a new high-efficiency, clean and environment friendly method for extracting the polysaccharides.

Keywords: deep eutectic solvents; *Polygonatum sibiricum* polysaccharides; response surface; reuse; antioxidant activity