

中药现代化技术

超声辅助离子液体提取人参多糖工艺 及其抗氧化活性

黄冬婷^{1,2}, 黄俊生^{1,2}, 汤静洁^{1,2}, 张平军^{1,2}, 黎 鹏^{1,2*}

(1. 广东省科学院生物与医学工程研究所, 广东 广州 510316; 2. 广东省绿色制糖工程技术研究中心, 广东 广州 510316)

摘要: 采用超声辅助离子液体提取人参中的人参多糖, 通过单因素实验和正交实验确定了人参多糖的最优提取工艺条件; 利用苯酚-硫酸法测定提取的人参多糖中总糖含量; 以抗坏血酸为对照组, 采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基 (DPPH \cdot)、 \cdot OH、2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐自由基 (ABTS \cdot) 测定提取的人参多糖的抗氧化活性。结果表明, 人参多糖的最佳提取工艺为: 质量浓度为 8 g/L 的 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取溶剂, 料液比(人参和离子液体水溶液之比)为 1:40 (g:mL, 下同), 在 80 °C 下超声辅助提取 30 min, 人参多糖提取量为 172.89 mg/g, 提取的人参多糖总糖含量(质量分数)为 65.9%。采用 HPLC 对纯化后的人参多糖的单糖组成进行了测定, 得到人参多糖的单糖主要成分为: 甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖。人参多糖对 DPPH \cdot 和 \cdot OH 以及 ABTS \cdot 具有一定的清除力, 其抗氧化能力随质量浓度的增大而增强, 但弱于抗坏血酸。

关键词: 人参多糖; 离子液体; 超声提取; 抗氧化性; 中药现代化技术

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2022) 09-1851-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Ultrasonic-assisted ionic liquid extraction of ginseng polysaccharide and its antioxidant activity

HUANG Dongting^{1,2}, HUANG Junsheng^{1,2}, TANG Jingjie^{1,2}, ZHANG Pingjun^{1,2}, LI Peng^{1,2*}

(1. Institute of Biological and Medical Engineering, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510316, Guangdong, China; 2. Guangdong Province Engineering Research Center for Green Technology of Sugar Industry, Guangzhou 510316, Guangdong, China)

Abstract: Ginseng polysaccharide was obtained from ginseng by ionic liquid-based ultrasonic assisted extraction method, of which the extraction conditions were optimized *via* single factor and orthogonal experiments. The total sugar content in ginseng polysaccharide was then determined by phenol sulfuric acid method. Moreover, the antioxidant activity of ginseng polysaccharide was evaluated by scavenging 1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl free radical (DPPH \cdot), \cdot OH and 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS \cdot) with those of ascorbic acid as control. The optimal extraction conditions of ginseng polysaccharide were as follows: 1-hexyl-3-methylimidazolium bromide solution with a mass concentration of 8 g/L as extraction solvent, material-to-liquid ratio (ratio of ginseng to aqueous solution of ionic liquid) of 1:40 (g:mL, the same below), ultrasonic extraction time of 30 min and extraction temperature of 80 °C, under which the amount of ginseng polysaccharide extracted reached 172.89 mg/g. The total sugar content (mass fraction) in ginseng polysaccharide was 65.9%, while mannose, ribose, galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose and fucose were found to be the main components of monosaccharide by

收稿日期: 2021-12-29; 定用日期: 2022-06-09; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211332

基金项目: 广东省科学院发展专项资金项目 (2020GDASYL-20200103069); 揭阳市科技计划项目 (2019089)

作者简介: 黄冬婷 (1992—), 女, 工程师, 硕士, E-mail: 719584029@qq.com。联系人: 黎 鹏 (1992—), 女, 博士, E-mail: lipeng_1992@foxmail.com。

HPLC analysis after further purification. The ginseng polysaccharide exhibited certain scavenging ability for DPPH•, •OH and ABTS•. The antioxidant activity, though increased with the increase of ginseng polysaccharide mass concentration, was inferior to that of ascorbic acid.

Key words: ginseng polysaccharide; ionic liquid; ultrasonic extraction; antioxidant activity; modernization technology of traditional Chinese medicines

人参属于伞形目五加科多年生草本植物, 作为珍贵的中药材已有超过四千年的使用历史。现代研究发现, 人参具有抗衰老、抗肿瘤、提高机体免疫力、治疗心血管疾病等多种药理功效^[1-4]。人参多糖是人参的重要活性成分之一, 根据单糖组成不同, 人参多糖可分为中性多糖和果胶两大类。中性多糖主要由淀粉样葡萄糖构成; 果胶富含半乳糖醛酸。目前, 已发现人参多糖的水解单糖成分包括葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等。人参多糖的结构复杂多样, 具有单糖种类复杂、连接结构多样等特点, 已鉴定的结构包括 α -吡喃葡萄糖通过 1,6-糖苷键连接、葡萄糖通过 α -1,4-糖苷键连接、葡萄糖通过 1,3-糖苷键连接等。人参多糖具有免疫调节、抗衰老、抗癌、抗病毒等药理活性^[5-7]。人参多糖的提取方法主要有热水浸提法^[8-9]、超声辅助热水提取法^[10]、微波辅助热水提取法^[11]、酶辅助提取法^[12]、超临界提取法^[13]等。

离子液体是一种新型的萃取分离溶剂, 具有性质稳定、萃取率高、可设计性强等特点^[14]。离子液体提取技术是天然产物提取中一种非常有发展潜力的技术^[15-17]。二烷基咪唑类离子液体因其咪唑环 2 位氢的酸度系数(pK_a)较高 ($pK_a=18.6$), 此位点的氢相对容易离去, 因此酸性显著强于一般的烃类化合物, 倾向于和溶质中的碱性物质形成氢键, 促进溶解和萃取, 所以对植物中很多活性物质具有较好的提取效果^[18], 且提取的活性物质纯度较高。在超声方法辅助下, 可进一步提升其提取效率。因此, 超声辅助离子液体萃取法是一种高效的提取方法, 超声空化效应和热效应的辅助促进了有效成分的溶出, 节省时间、降低能耗的同时, 还可提高活性物质的提取量^[14]。目前, 关于采用超声辅助离子液体萃取法提取人参多糖的研究鲜见报道。

本文通过单因素实验方法和正交实验方法研究基于超声辅助离子液体萃取人参多糖的最佳工艺条件。利用廉价易得的 1-烷基-3-甲基咪唑溴盐提取人参多糖, 采用苯酚-硫酸法对人参多糖进行总糖含量分析, 并采用 DPPH•、•OH、ABTS•测定人参多糖的抗氧化活性, 为人参资源的研究及综合利用提供理论参考。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

人参, 购于河北省安国市药材市场。

D-葡萄糖标准品、苯酚、抗坏血酸、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、*N*-乙酰-氨基葡萄糖、*N*-乙酰-氨基半乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖、 α -淀粉酶、木瓜蛋白酶, 分析纯, 麦克林试剂生化科技有限公司; DPPH•、1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DEAE-52 纤维素, 分析纯, 上海惠诚生物科技有限公司; 水杨酸、ABTS、过硫酸钾, 分析纯, 安徽泽升科技有限公司; 1-乙基-3-甲基咪唑溴盐、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐、1-己基-3-甲基咪唑溴盐、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐, 分析纯, 上海成捷化学有限公司; 浓硫酸 (质量分数为 98%)、过氧化氢 (质量分数为 30%)、硫酸亚铁、无水乙醇, 市售分析纯。

Synergy H1m 酶标仪, 美国 BioTek 公司; XL5A 台式低速离心机, 湖南湘立科学仪器有限公司; UV-1750 紫外-可见分光光度计、LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司。

1.2 人参样品的预处理

取适量的人参用清水洗净, 置于托盘中, 直接放入电热鼓风干燥箱中 80 °C 烘至恒重, 将所得干燥人参粉碎过筛 (40 目), 置于密封袋中保存备用。

1.3 人参多糖的提取

准确称取 1.0 g 经过预处理的人参样品, 质量为 m_0 (g), 置于 50 mL 离心管内, 加入适量离子液体水溶液, 超声并加热提取, 待溶液冷却后离心, 取上清液。在上清液中加入 4 倍体积的无水乙醇, 放置在 -20 °C 环境中醇沉 24 h, 然后过滤收集沉淀。将沉淀放入真空干燥箱中 60 °C 烘至恒重, 最后将得到的人参多糖用天平准确称质量 m_1 (mg)。

人参多糖提取量计算公式如式 (1) 所示:

$$\text{人参多糖提取量 (mg/g)} = m_1/m_0 \quad (1)$$

人参多糖提取率计算公式如式 (2) 所示:

$$\text{人参多糖提取率/\%} = m_1/(1000 \times m_0) \times 100 \quad (2)$$

1.4 人参多糖超声辅助离子液体提取工艺的优化

1.4.1 单因素实验设计

在 1.3 节的实验条件下, 分别选取离子液体种类、离子液体质量浓度、料液比、超声时间、超声温度作为影响因素, 以人参多糖提取量为评价指标, 对超声辅助离子液体提取工艺进行优化, 每个单因素进行 3 次平行实验, 结果取平均值。

1.4.1.1 不同离子液体种类对人参多糖提取量的影响

在料液比 1:30、离子液体质量浓度 8 g/L、水浴温度 70 °C 下超声 30 min, 选用不同种类的离子液体(水、1-乙基-3-甲基咪唑溴盐、1-丁基-3-甲基咪唑溴盐、1-己基-3-甲基咪唑溴盐、1-辛基-3-甲基咪唑溴盐)进行提取, 考察离子液体种类对人参多糖提取量的影响。

1.4.1.2 不同离子液体质量浓度对人参多糖提取量的影响

选取 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取剂, 料液比 1:30, 水浴温度 70 °C 下超声 30 min, 设定不同的离子液体质量浓度(2、4、6、8、10 g/L), 考察离子液体质量浓度对人参多糖提取量的影响。

1.4.1.3 料液比对人参多糖提取量的影响

选取 8 g/L 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取剂, 水浴温度 70 °C 下超声 30 min, 设定不同的料液比[1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g:mL)], 考察料液比对人参多糖提取量的影响。

1.4.1.4 超声时间对人参多糖提取量的影响

选取 8 g/L 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取剂, 料液比 1:30, 水浴温度 70 °C, 设定不同的超声时间(10、20、30、40、50 min), 考察超声时间对人参多糖提取量的影响。

1.4.1.5 超声温度对人参多糖提取量的影响

选取 8 g/L 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取剂, 料液比 1:30, 超声 30 min, 设定不同的超声温度(40、50、60、70、80 °C), 考察超声温度对人参多糖提取量的影响。

1.4.2 正交实验

单因素实验初步确定提取参数变量范围后, 以单因素实验结果为基础, 对离子液体质量浓度、料液比、超声时间和超声温度进行四因素三水平正交实验, 优化人参多糖的提取工艺。

1.5 人参多糖总糖含量的测定

溶液配制: 精密称取在 105 °C 下干燥至恒重的无水葡萄糖粉末 1 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解稀释至刻度, 摇匀, 即得 10.0 g/L 的标准品储备液。精密吸取 0.50 mL 10.0 g/L 的葡萄糖储备液于 10 mL 容量瓶, 加蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 即得 0.50 g/L 葡萄糖标准溶液; 精密称取人参多糖 25.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水溶解稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.5 g/L 的供试品溶液; 精密称取 5.0 g 苯酚, 用 95 g 热水溶解即得质量分数为 5% 的苯酚溶液。

分别精密吸取 0.5 g/L 的葡萄糖标准溶液(20、40、60、80、120、140 μL)于 10 mL 具塞玻璃试管中, 加蒸馏水补足至 200 μL, 另取 200 μL 蒸馏水作

空白对照。再分别加入 100 μL 质量分数为 5% 的苯酚溶液, 迅速加入 2.0 mL 浓硫酸(质量分数为 98%), 摇匀, 于沸水浴中加热 30 min。冷却至室温后, 空白溶液作对照, 在 490 nm 波长处测定不同质量浓度葡萄糖标准溶液的吸光度。以吸光度为纵坐标, 葡萄糖标准溶液质量浓度为横坐标, 绘制葡萄糖标准曲线并得到回归方程。

精密吸取供试品溶液 200 μL, 平行 6 份, 按照上述过程进行操作, 并根据测得吸光度值计算总糖含量(质量分数)。

1.6 人参多糖单糖组成测定

采用高效液相色谱仪对人参多糖的单糖成分进行测试。

1.6.1 样品纯化

利用 α-淀粉酶去除人参多糖的淀粉。称量 5.00 g 人参多糖, 溶于 500 mL 去离子水, 配成人参多糖质量浓度 10 g/L 的溶液, 将 400 U α-淀粉酶加入到人参多糖溶液中, 55 °C 酶解 30 min, 在沸水浴中加热 5 min 终止酶解反应。溶液降温至室温后, 离心去除沉淀, 收集上清液。

利用木瓜蛋白酶去除人参多糖中的蛋白质。将 100 U 木瓜蛋白酶加入上述去除淀粉后的人参多糖溶液中, 35 °C 酶解 2 h, 在沸水浴中加热 5 min 终止酶解反应。溶液降温至室温后, 离心去除沉淀, 收集上清液。将上清液加热浓缩至 40 mL, 加入 160 mL 无水乙醇, 摇匀, -20 °C 冰箱冻存静置 24 h 以上, 过滤得到白色固体, 将白色固体烘干(60 °C)得 2.50 g 酶解后的人参多糖。

取 1.00 g 酶解后的人参多糖溶于 10 mL 去离子水中, 采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换层析柱对人参多糖进行纯化。用 2 倍柱体积蒸馏水进行洗脱。试管收集, 每管收集 8 mL。采用苯酚-硫酸法对每管溶液的吸光度进行检测, 对在 490 nm 处出现吸收峰的溶液进行收集, 将收集的溶液 -40 °C 冷冻干燥得到 0.6669 g 纯化后的人参多糖。

1.6.2 样品水解

称取 5 mg 纯化后的人参多糖置于水热反应釜中, 加入 4 mL 三氟乙酸密封, 置于 110 °C 烘箱中反应 4 h。反应结束后, 自然冷却至室温, 加入甲醇多次旋蒸, 除去三氟乙酸, 得到水解样品, 备用。

1.6.3 待测样品衍生

精密移取 4.0 mL 水至水解样品中, 超声溶解。精确吸取 250 μL 样品溶液到 5 mL 离心管中, 加入 250 μL 0.6 mol/L NaOH 溶液和 500 μL 0.4 mol/L PMP-甲醇溶液, 70 °C 反应 1 h。冷水中冷却 10 min; 加入 500 μL 0.3 mol/L HCl 溶液中和, 再加入 1 mL 氯仿涡旋振荡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min, 小心

取上清, 萃取 3 次。取上清液, 即得衍生的待测样品。

1.6.4 对照标准溶液衍生

精密称取甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、*N*-乙酰-氨基葡萄糖、葡萄糖、*N*-乙酰-氨基半乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖对照品各 50 μg, 全部固体混合后加水溶解并定容至 1 mL, 即得混合对照溶液。精确吸取 250 μL 混合对照溶液到 5 mL 离心管中, 后续衍生步骤同待测样品衍生步骤。

HPLC 检测条件: 色谱柱 Xtimate C18 (4.6 mm×200 mm×5 μm); 柱温 30 °C; 流动相 *V*(0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液): *V*(乙腈)=83:17; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 进样量 20 μL。

1.7 人参与糖抗氧化活性测定

1.7.1 人参与糖对 DPPH• 的清除能力

按照文献^[19]的方法, 称取 DPPH• 粉末用无水乙醇溶解, 配制成 0.2 mmol/L 的 DPPH• 溶液; 分别配制质量浓度为 25、50、200、400、800 mg/L 的人参与糖溶液和抗坏血酸溶液。分别量取 100 μL 不同浓度人参与糖溶液和抗坏血酸溶液加入 96 孔板中, 每孔再加入 100 μL DPPH• 溶液, 混匀, 室温下静置 30 min, 在 517 nm 的紫外吸收波长下测定样品或对照组的吸光度 (A_1)。以样品溶液或抗坏血酸溶液加蒸馏水测定的吸光度记为 A_2 。以蒸馏水加 DPPH• 溶液测定的吸光度记为 A_0 。按照式 (3) 计算人参与糖和抗坏血酸对 DPPH• 的清除率^[20]:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\%=[A_0-(A_1-A_2)]/A_0\times 100 \quad (3)$$

1.7.2 人参与糖对 •OH 的清除能力

依次配制浓度为 6 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液、硫酸亚铁溶液和过氧化氢溶液; 分别配制质量浓度为 50、100、200、400、800、1000、1500 mg/L 的人参与糖溶液和抗坏血酸溶液。分别量取 50 μL 不同浓度人参与糖溶液和抗坏血酸溶液加入 96 孔板中, 每孔再依次加入 50 μL 硫酸亚铁溶液、过氧化氢溶液, 混匀, 静置 10 min, 最后加入 50 μL 水杨酸溶液。37 °C 保温 30 min, 在 510 nm 的紫外吸收波长下测定样品或对照组的吸光度 (A_{11})。以蒸馏水代替水杨酸溶液测定的吸光度记为 A_{21} , 以蒸馏水代替样品溶液或抗坏血酸溶液测定的吸光度记为 A_{01} 。按照式 (4) 计算人参与糖和抗坏血酸对羟基自由基的清除率^[21]:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}/\%=[A_{01}-(A_{11}-A_{21})]/A_{01}\times 100 \quad (4)$$

1.7.3 人参与糖对 ABTS• 的清除能力

取 7.4 mmol/L 的 ABTS 溶液 0.5 mL 与 2.6 mmol/L 的过硫酸钾溶液 0.5 mL 混合, 避光室温放置 12 h, 加蒸馏水稀释 30~40 倍, 使其在 734 nm 波长处吸光度处于 0.68~0.72, 即得 ABTS• 工作液。配制质量浓

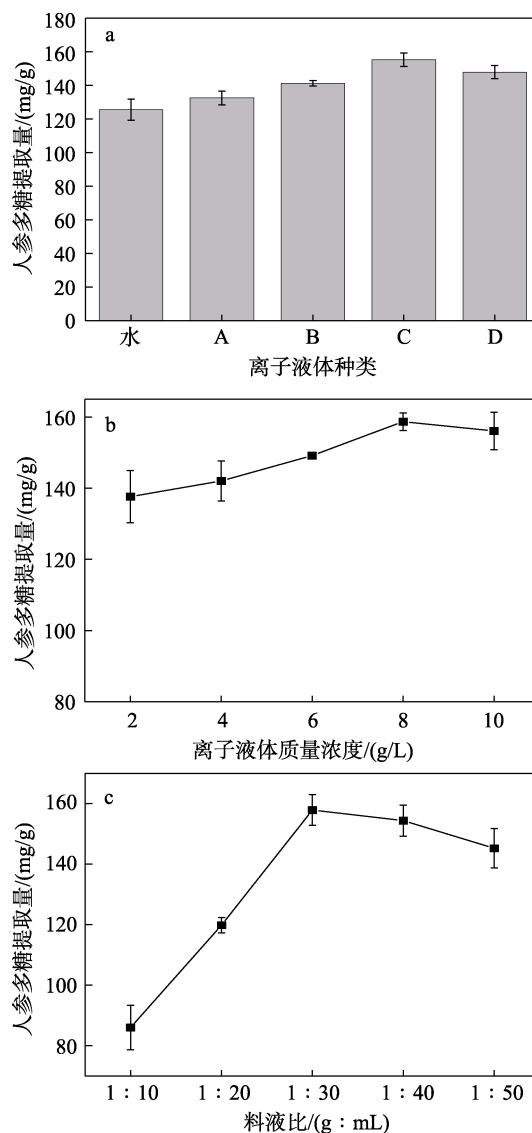
度为 50、100、200、400、800、1000、1500 mg/L 的人参与糖溶液, 配制质量浓度为 0.5、1、2、4、8、10、15 mg/L 的抗坏血酸溶液。分别量取 50 μL 不同浓度人参与糖溶液和抗坏血酸溶液加入 96 孔板中, 每孔再加入 100 μL ABTS• 工作液, 混匀, 室温下静置 6 min, 在 734 nm 的紫外吸收波长下测定样品或对照组的吸光度 (A_{12})。以无水乙醇代替 ABTS• 工作液测定的吸光度记为 A_{22} , 以蒸馏水代替样品溶液或抗坏血酸溶液测定的吸光度记为 A_{02} 。按照式 (5) 计算人参与糖和抗坏血酸对 ABTS 自由基的清除率^[22]:

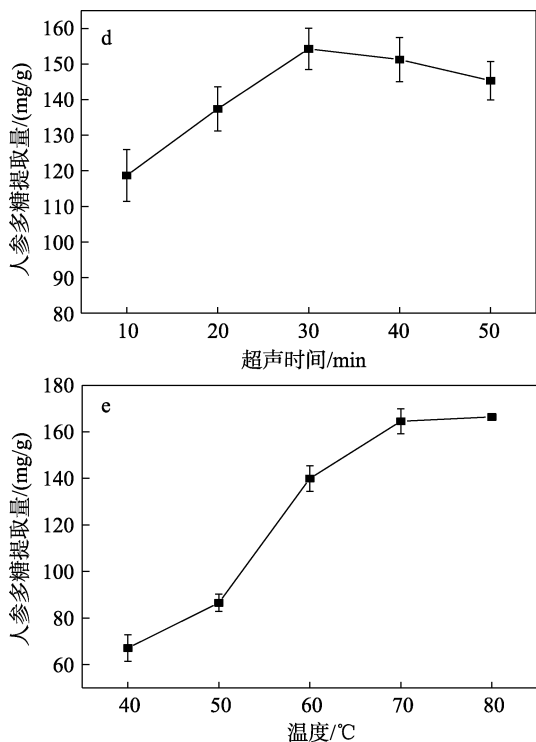
$$\text{ABTS}\cdot\text{清除率}/\%=[A_{02}-(A_{12}-A_{22})]/A_{02}\times 100 \quad (5)$$

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

离子液体种类、离子液体质量浓度、料液比、超声时间、超声温度对人参与糖提取量的影响见图 1。





A—1-乙基-3-甲基咪唑溴盐; B—1-丁基-3-甲基咪唑溴盐; C—1-己基-3-甲基咪唑溴盐; D—1-辛基-3-甲基咪唑溴盐

图 1 离子液体种类 (a)、离子液体质量浓度 (b)、料液比 (c)、超声时间 (d)、超声温度 (e) 对人参多糖提取量的影响

Fig. 1 Effects of ionic liquids type (a), ionic liquid mass concentration (b), material-to-liquid (c), ultrasonic time (d) and temperature (e) on extraction of ginseng polysaccharide

2.1.1 离子液体种类对人参多糖提取量的影响

由图 1a 可知, 离子液体水溶液的人参多糖提取量优于蒸馏水, 1-己基-3-甲基咪唑溴盐对人参多糖的提取量最高。所以, 选择 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液作为提取溶剂。

2.1.2 离子液体质量浓度对人参多糖提取量的影响

适当添加离子液体能够增强对植物细胞壁的破坏, 但离子液体添加量过大, 溶液黏度增加, 导致离子液体难以透过细胞壁, 阻碍多糖的溶出^[23]。由图 1b 可知, 当 1-己基-3-甲基咪唑溴盐质量浓度为 8 g/L 时, 人参多糖提取量最高。因此, 1-己基-3-甲基咪唑溴盐的质量浓度确定为 8 g/L。

2.1.3 料液比对人参多糖提取量的影响

由图 1c 可知, 料液比对人参多糖的提取量影响非常明显。人参多糖提取量随着料液比的增大而迅速增大, 当料液比为 1 : 30 (g : mL) 时, 人参多糖提取量达到最大, 增加提取溶剂有利于人参多糖的溶出, 使人参多糖提取量增加, 但是当人参多糖溶出达到平衡时, 再加大提取溶剂用量不但不能增加提取量, 还会阻碍超声波能量的传递, 不利于人参多糖的提取^[24]。因此, 最佳料液比为 1 : 30 (g : mL)。

2.1.4 超声时间对人参多糖提取量的影响

由图 1d 可知, 人参多糖提取量随着超声时间增加而增大。当超声时间为 30 min 时, 人参多糖提取量最大, 此后随着超声时间的增加, 提取量减小。可能的原因是超声时间过长, 人参多糖部分降解, 导致提取量降低^[25]。因此, 最佳超声时间为 30 min。

2.1.5 超声温度对人参多糖提取量的影响

由图 1e 可知, 人参多糖的提取量随超声温度的升高而大幅度增大。当温度为 70 或 80 °C 时, 增幅减小, 此时, 人参多糖提取量较高且相当。所以, 最终选择超声温度为 70 °C。

2.2 正交实验及验证

根据上述单因素考察结果, 对离子液体质量浓度、料液比、超声时间和超声温度 4 个因素进行正交实验优化。每个因素选择了 3 个水平, 见表 1。按照正交实验表 L9(3⁴) 进行 9 组实验, 结果见表 2。

表 1 正交实验的因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 离子液体质量浓度/(g/L)	B 料液比/(g : mL)	C 超声时间/min	D 超声温度/°C
1	6	1 : 20	20	60
2	8	1 : 30	30	70
3	10	1 : 40	40	80

表 2 L9(3⁴) 正交实验结果

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

序号	A	B	C	D	提取量/(mg/g)
1	1	1	1	1	154.25
2	1	2	3	2	157.93
3	1	3	2	3	168.85
4	2	1	3	3	160.63
5	2	2	2	1	156.73
6	2	3	1	2	169.97
7	3	1	2	2	158.98
8	3	2	1	3	158.80
9	3	3	3	1	155.40
k ₁	160.34	157.95	161.00	155.46	
k ₂	162.44	157.82	161.52	162.29	
k ₃	157.72	164.74	157.99	162.76	
R	4.72	6.92	3.53	7.30	

由表 2 可知, 各因素对人参多糖提取量影响程度的主次顺序为 D>B>A>C, 即提取温度为主要影响因素, 其次为料液比, 再次为离子液体质量浓度, 超声时间影响最小。最佳方案为 A2B3C2D3, 即离子液体质量浓度为 8 g/L、料液比为 1 : 40 (g : mL)、提取温度 80 °C、超声时间 30 min。在最佳工艺条件

下进行了提取人参多糖工艺的验证实验,结果表明在最佳工艺条件下,人参多糖的提取量为 172.89 mg/g,即提取率为 17.29%。使用水替代离子液体作为提取溶剂时,在同样料液比、提取温度和超声时间条件下,人参多糖的提取量为 98.26 mg/g。超声辅助离子液体提取法的提取量相较于超声辅助热水法提高了 74.63 mg/g,证明采用离子液体处理可大大提高人参多糖的提取量。同时,与肖志伟等^[8] [料液比为 1 : 12 (g : g), 提取时间 1 h, 提取 3 次, 人参多糖提取率约为 8.35%] 及万茜琳等^[9] [料液比为 1 : 38.55 (g : g), 提取时间 2.495 h, 提取温度 80 °C, 人参花多糖提取率为 13.81%±0.28%] 采用热水浸提/醇沉法提取人参多糖的方法相比, 超声辅助离子液体提取法具有节约时间、提取率高的优点。

2.3 人参多糖含量的测定

以葡萄糖为标准品,使用苯酚-硫酸法测定人参多糖中总糖的含量,以葡萄糖质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制葡萄糖标准曲线,得到葡萄糖标准品的线性回归方程为 $Y=3.17643X+0.13171$ ($0.05 \text{ g/L} \leq X \leq 0.35 \text{ g/L}$), $R^2=0.9973$, 表明葡萄糖质量浓度在 0.05~0.35 g/L 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

根据苯酚-硫酸法测定人参多糖总糖含量的精密密度考察结果,计算出吸光度的相对标准偏差 (RSD) 为 0.4%, 结果表明实验精密密度良好。

根据苯酚-硫酸法测定人参多糖总糖含量的加标回收率考察结果,计算出平均加样回收率为 97.1%, RSD 为 1.0%。结果表明该方法的准确度良好。

取 0.5 g/L 人参多糖供试品溶液 200 μL , 按标准曲线制备方法进行操作,测定吸光度并计算得到人参多糖产品总糖含量(质量分数)达到 65.9%。以同样方法测得超声辅助热水法提取得到的人参多糖中总糖含量(质量分数)为 45.32%。超声辅助离子液体提取法的总糖含量相较于超声辅助热水法提高 20.58%, 证明采用离子液体处理可提高人参多糖的总糖含量。同时,与张艳荣等^[13]采用超临界流体提取法的结果相比 [人参多糖总糖含量(质量分数)达 54.71%±2.16%], 本方法总糖含量更高,说明超声辅助离子液体提取法在人参多糖提取方面具有更高的选择性。

2.4 人参多糖单糖组成测定

采用高效液相色谱法对纯化后的人参多糖的单糖组成进行测定,混合单糖的液相色谱图见图 2; 人参多糖的液相色谱图见图 3。通过比较人参多糖的各单糖与混合标准单糖的保留时间和峰面积,得到人参多糖的单糖组成为:甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖,其物质的量比为 4.80 : 6.43 : 10.13 : 15.71 : 0.50 : 4.30 : 1.10。

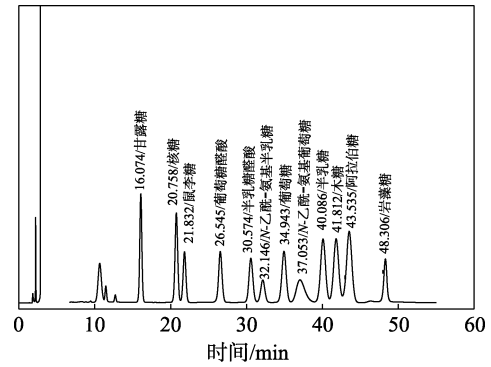


图 2 混合标准单糖的 HPLC 谱图
Fig. 2 HPLC of mixed standard monosaccharide

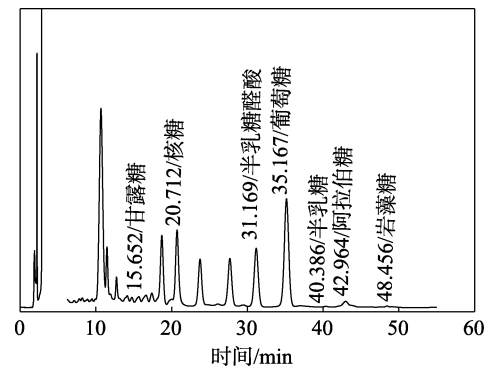


图 3 人参多糖的 HPLC 谱图
Fig. 3 HPLC of ginseng polysaccharides

2.5 人参多糖的抗氧化活性分析

2.5.1 人参多糖对 DPPH• 的清除能力

DPPH• 的清除能力测试原理是: DPPH• 含有单电子, 其醇溶液呈紫色, 在 517 nm 处有强吸收, 抗氧化剂可与单电子配对, 从而使此波长的紫外吸光度降低, 溶液褪色。人参多糖和抗坏血酸对 DPPH• 的清除能力见图 4。由图 4 可知, 人参多糖和抗坏血酸在 25~800 mg/L 范围内, 对 DPPH• 的清除能力均随其质量浓度增大而增加, 呈现剂量依赖性, 人参多糖对 DPPH• 的清除能力稍弱于抗坏血酸。

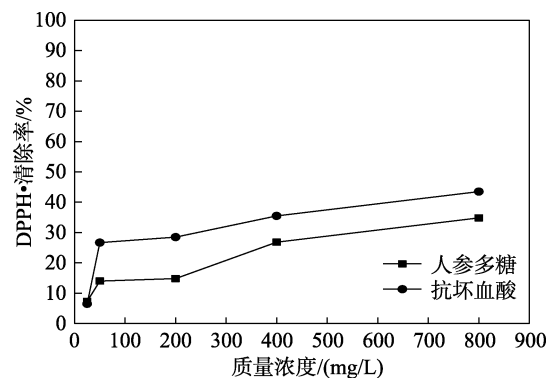


图 4 人参多糖和抗坏血酸对 DPPH• 的清除能力
Fig. 4 Scavenging ability of ginseng polysaccharides and ascorbic acid to DPPH•

2.5.2 人参多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合会生成 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OH}$ 与水杨酸反应产生紫色化合物, 紫色化合物在 510 nm 波长处有强吸收。当体系中 $\cdot\text{OH}$ 被清除时, 有色物质减少, 吸光度也减小。人参多糖和抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力见图 5。由图 5 可知, 人参多糖和抗坏血酸在 50~1500 mg/L 范围内, 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力均随其质量浓度增加呈上升趋势, 抗坏血酸上升速度更快。人参多糖对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力弱于抗坏血酸。

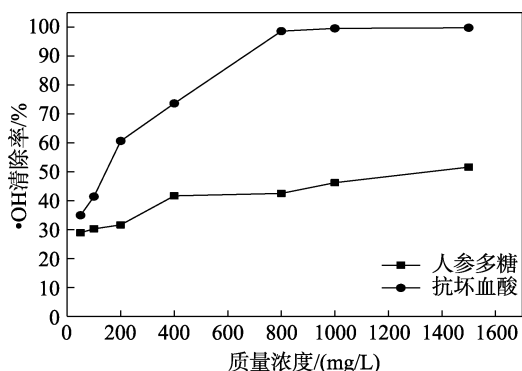


图 5 人参多糖和抗坏血酸对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力

Fig. 5 Scavenging ability of ginseng polysaccharides and ascorbic acid to $\cdot\text{OH}$

2.5.3 人参多糖对 ABTS \cdot 的清除能力

ABTS 与过硫酸钾反应生成灰蓝色 ABTS \cdot , 抗氧化剂与 ABTS \cdot 反应会使体系褪色, 吸光度降低, 可反映该物质对 ABTS \cdot 的清除能力, 人参多糖和抗坏血酸对 ABTS \cdot 的清除能力见图 6。由图 6 可知, 人参多糖在 50~1500 mg/L 范围内, 抗氧化能力随着质量浓度增大而增加, 呈现剂量依赖性。人参多糖对 ABTS \cdot 的清除能力相对于抗坏血酸较弱。

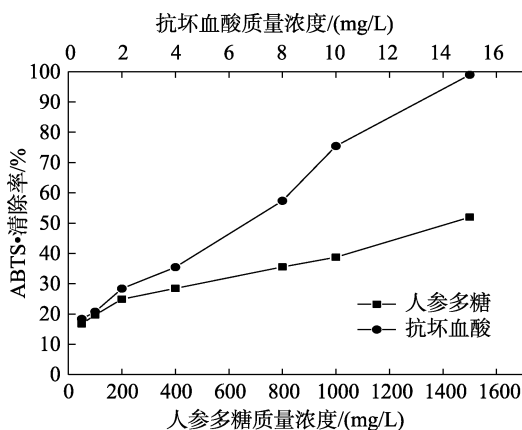


图 6 人参多糖和抗坏血酸对 ABTS \cdot 的清除能力

Fig. 6 Scavenging ability of ginseng polysaccharides and ascorbic acid to ABTS \cdot

3 结论

(1) 采用超声辅助离子液体提取法提取人参多

糖, 通过单因素实验和正交实验进行实验条件的优化, 得出最佳工艺条件为: 选择 1-己基-3-甲基咪唑溴盐水溶液为提取溶剂, 离子液体质量浓度为 8 g/L、料液比为 1:40 (g:mL)、提取温度 80 °C、超声时间 30 min, 此时人参多糖提取量最高, 达到 172.89 mg/g。4 种因素对人参多糖提取量影响的主次顺序为: 提取温度>料液比>离子液体质量浓度>超声时间。

(2) 依据苯酚-硫酸法的测定结果得到, 基于离子液体辅助超声法提取的人参多糖产品总糖含量 (质量分数) 可达 65.9%, 总糖含量较高, 且方法学考察表明实验可靠性、准确性、重复性均较好。采用高效液相色谱法对纯化后的人参多糖的单糖组成进行测定, 得到人参多糖的单糖组成为: 甘露糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖, 其物质的量比为 4.80:6.43:10.13:15.71:0.50:4.30:1.10。

(3) 人参多糖对 DPPH \cdot 和 $\cdot\text{OH}$ 以及 ABTS \cdot 有一定的清除能力, 其清除能力随其质量浓度增大而呈上升趋势, 表明人参中含有的人参多糖具有一定的抗氧化性。对人参中人参多糖进行提取可更好地利用人参资源。

参考文献:

- [1] SELLAMI M, SLIMENI O, POKRYWKA A, *et al.* Herbal medicine for sports: A review[J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2018, 15(1): 1-14.
- [2] RU W W, WANG D L, XU Y P, *et al.* Chemical constituents and bioactivities of *Panax ginseng* (CA Mey.) [J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2015, 9(1): 23-32.
- [3] AHUJA A, KIM J H, KIM J H, *et al.* Functional role of ginseng-derived compounds in cancer [J]. Journal of Ginseng Research, 2018, 42(3): 248-254.
- [4] WANG Y M (王一鸣), WANG X L (王兴录). Research progress on extraction, isolation and pharmacological effects of ginseng polysaccharides [J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences (东北农业科学), 2021, 46(2): 103-107, 119.
- [5] JI Z W (计竹娃). Extraction of ginseng polysaccharide and its neuroprotective effect on parkinson's disease [D]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2020.
- [6] SUN M X (孙萌肖), CHEN R Z (陈瑞战), LUO S J (骆淑君), *et al.* Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of ginseng [J]. Journal of Changchun Normal University (长春师范大学学报), 2021, 40(2): 105-112.
- [7] ZHAO B, LYU C N, LU J C. Natural occurring polysaccharides from *Panax ginseng* CA Meyer: A review of isolation, structures, and bioactivities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 133: 324-336.
- [8] XIAO Z W (肖志伟), LE Z Y (乐智勇), ZHU G X (朱国雪), *et al.* Optimization of detection method and extraction technology of ginseng polysaccharides [J]. Modern Chinese Medicine (中国现代中药), 2016, 18(1): 106-109.
- [9] WAN X L (万茜淋), JIAO L L (焦丽丽), MA L (马林), *et al.* Optimization of polysaccharides from flowers of *Panax ginseng* C. A. Meyer using response surface methodology [J]. Journal of Changchun University of Science and Technology: Natural Science Edition (长春理工大学学报: 自然科学版), 2015, 38(6): 154-158, 132.

(下转第 1871 页)