

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2024.04.005

无患子花总皂苷提取工艺优化及抗氧化、 美白活性研究



ZHANG Aohuan

张澳环¹, 赵子冰¹, 王晰¹, 翁学煌², 何华名^{1*}

(1.北京工商大学 化学与材料工程学院,北京市植物资源研究开发重点实验室,北京 100048;

2.福建源华林业生物科技有限公司,福建 建宁 354500)

摘要:以总皂苷得率为指标,采用单因素和正交试验优化无患子花总皂苷水提取工艺,对比无患子花水提液与无患子果皮水提液中的总皂苷、总黄酮和总酚含量。通过 DPPH·、ABTS⁺·、O₂⁻·清除实验以及铁离子还原能力测定评价无患子花水提液抗氧化能力;通过酪氨酸酶活性抑制实验,探究其美白效果;通过红细胞溶血试验,探究无患子花水提液的刺激性。结果表明:无患子花水提液的最佳提取条件为提取温度 80 ℃、提取时间 180 min、液料比 30:1 (mL:g),此条件下,总皂苷得率为 12.15%。无患子花水提液的总皂苷、总黄酮和总酚含量较无患子果皮高;无患子花与果皮的水提液抗氧化能力及酪氨酸酶活性抑制能力较好,且无患子花水提液优于果皮水提液。无患子花水提液的 HD₅₀/DI > 100,根据红细胞溶血试验刺激性分级标准,表明无患子花水提液无刺激性。

关键词:无患子花;皂苷;黄酮;抗氧化;酪氨酸酶

中图分类号:TQ35

文献标志码:A

文章编号:0253-2417(2024)04-0036-09

引文格式:张澳环,赵子冰,王晰,等.无患子花总皂苷提取工艺优化及抗氧化、美白活性研究[J].林产化学与工业,2024,44(4):36-44.

Optimisation of Extraction Process of *Sapindus mukorossi* Gaertn. Flowers and *in vitro* Antioxidant and Whitening Activities

ZHANG Aohuan¹, ZHAO Zibing¹, WANG Xi¹, WENG Xuehuang², HE Huaming¹

(1.College of Chemical and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing Key

Lab of Plant Resources Research and Development, Beijing 100048, China; 2.Fujian

Yuanhua Forestry Biotechnology Co., Ltd., Jianning 354500, China)

Abstract: Single-factor and orthogonal tests were used to optimize the extraction process of total saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn. flowers, using the total saponin yield as an indicator. The total saponins, flavonoids and phenols contents in the water extracts of *S. mukorossi* Gaertn. flowers and pericarp were compared. Furthermore, the antioxidant activity was evaluated by DPPH·, ABTS⁺·, O₂⁻· radical scavenging test, and ferric ion reducing ability assay. The whitening effect was explored by tyrosinase activity inhibition test, and the irritant properties were investigated by red blood cell haemolysis test. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: extraction temperature of 80 ℃, extraction time of 180 min and liquid-solid ratio of 30 (mL/g). Under these conditions, the total saponins yield was 12.15%. The contents of total saponins, flavonoids and phenols in the water extract of *S. mukorossi* Gaertn. flower were higher than that of pericarp. The antioxidant capacity and tyrosinase activity inhibiting ability of the *S. mukorossi* Gaertn. flower water extract were good, which were better than that of pericarp. The HD₅₀/DI > 100 of the aqueous extract of *S. mukorossi* Gaertn. flowers, according to the erythrocyte haemolysis test irritation grading criteria, indicated that the aqueous extract was non-irritating.

Key word: *Sapindus mukorossi* Gaertn. flowers; saponins; flavonoids; antioxidant; tyrosinase

收稿日期:2023-07-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32100254);2021年京明合作市级科技特派员专项项目(2021-N-24)

作者简介:张澳环(2000—),女,安徽宿州人,硕士生,研究方向为植物天然活性产物研究与开发

*通讯作者:何华名,副教授,硕士生导师,研究领域为细胞氧化还原信号转导与植物逆境响应以及植物天然活性产物研究与开发;

E-mail: hehuaming@btbu.edu.cn。

无患子(*Sapindus mukorossi* Gaertn.), 俗名油患子、苦患树、洗手果等, 主要分布于中国长江流域以南及印度、日本和朝鲜等。无患子具有较高的经济和生态效益^[1], 能够适应高温、干旱、盐碱地各种恶劣条件, 被用于城市景观树。历代中药典籍记载了无患子多以果实、根、叶片和种仁入药^[2], 具有一定的药用价值。无患子化学成分丰富, 皂苷是其主要活性成分, 此外, 无患子果实和根部还含有油脂类、黄酮类、酚类、蛋白质、氨基酸等成分^[3]。无患子中含有的皂苷成分作为一种天然表面活性剂被用于洗发香波、洗面奶等各种洗护产品中, 无患子还具有抑菌和杀菌^[4-5]、抗氧化^[6]、抑制酪氨酸酶^[7]、抗炎^[8]以及抗肿瘤^[9-10]等多种生物活性。Chen 等^[11]采用响应面法优化无患子果皂苷提取工艺, 所得提取物对 DPPH· 的清除率为 91.56%; 赵志敏等^[12]研究发现无患子总皂苷在低质量浓度(0.312 5 g/L) 时, 对酪氨酸酶的抑制能力与熊果苷相当; 而当质量浓度为 2 g/L 时, 抑制率仅为 41.67%, 远不及熊果苷效果好。陈雷等^[13]研究发现 1 g/L 无患子果皮提取物对酪氨酸酶活性的抑制率达 80.23%, 证明了果皮提取物具有美白能力。目前, 国内外对无患子的研究报道多集中于果皮部位, 对无患子的开发利用也集中在果皮、种仁部位, 而对花的相关研究较少。无患子花中富含皂苷和黄酮类活性物质^[14]。钱天元等^[15]提取无患子花色素并研究其理化性质, 通过自由基清除实验发现无患子花水提取液具有一定的抗氧化能力。但是目前对无患子花的提取工艺优化及其酪氨酸酶抑制能力的研究还未见报道。因此, 本研究采用单因素和正交试验对水提法提取无患子花总皂苷工艺条件进行优化, 比较无患子花水提液与果皮水提液的主要活性成分、抗氧化能力及酪氨酸酶抑制能力的差异, 并对无患子花水提液的刺激性进行评价, 以期提高无患子的综合利用率并为无患子花在化妆品领域的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

无患子花, 2022 年 6 月上旬采摘于福建三明地区; 无患子果, 2022 年 10 月采摘于福建三明地区。将花与果皮在 -20 ℃ 冷冻保存, 真空冷冻干燥机干燥、中药研磨机粉碎, 过 0.3 mm 孔径筛后备用。

无水乙醇、高氯酸、过硫酸钾、硫酸亚铁、冰醋酸、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯; 2,2-二(4-叔辛基苯基)-1-苦肟基自由基(DPPH 自由基)、酪氨酸酶, 上海麦克林生化科技有限公司; 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、十二烷基硫酸钠, 上海阿拉丁生化科技有限公司; L-多巴, 上海源叶生物科技有限公司; 香草醛、Tris-HCl 缓冲液, 无菌脱纤维绵羊血, 北京索莱宝科技有限公司; 抗坏血酸, 天津福晨化学试剂有限公司。

YS-08 型中药粉碎机, 北京燕山正德机械设备有限公司; LGJ-18 型真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技有限公司; Infinite M200 pro 多功能酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; TGL-25M 台式大容量高速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 无患子花总皂苷提取条件的优化

以无患子花提取液总皂苷得率为评价指标, 称取 1 g 的无患子花粉末, 置于 50 mL 离心管中, 按一定液料比加入去离子水为提取溶剂, 在水浴锅中一定温度下加热提取一段时间, 结束后于 4 500 r/min 离心 15 min, 取上清液用于无患子花提取液总皂苷得率的测定。实验中选择提取温度(40、50、60、70、80 ℃)、液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1 (mL:g)) 和提取时间(20、60、100、140、180 和 220 min) 这 3 个单因素条件进行考察。根据上述单因素试验结果, 采用正交试验设计对这 3 个工艺参数进一步优化, 明确最佳提取条件。实验中还制备了最佳提取条件下无患子果皮水提液用于研究无患子花水提液抗氧化及美白活性的对比。

1.3 无患子花水提液中主要成分的测定

采用香草醛-冰醋酸法^[16]测定无患子花提取液中总皂苷质量。总皂苷得率(Y) 与质量按式(1)、式(2)进行计算。

$$Y = m/m_0 \times 100\% \tag{1}$$

式中: m —总皂苷质量, mg; m_0 —无患子花粉末质量, mg。

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法^[17]测定无患子花提取液中总黄酮质量,采用 FoLin-Ciocalteu 法^[18]测定无患子花提取液中总酚质量,按式(2)进行计算。

$$m=c\times n\times v$$

(2)

式中: m —总皂苷/总黄酮/总酚质量,mg; c —稀释后的水提液的总黄酮/总多酚/总皂苷质量浓度,mg/L; n —稀释倍数; v —水提液体积,L。

1.4 无患子花水提液的抗氧化活性测定

1.4.1 DPPH·清除率 参照 Wang^[19]方法略做修改,在 96 孔板中加入 20 μ L 1.2 节得到的最优提取条件提取的无患子花或果皮水提液(用去离子水稀释成不同体积分数)以及 180 μ L DPPH 溶液(150 μ mol/L),置于室温下,用锡箔纸包裹反应 30 min,517 nm 波长下测吸光值。空白对照为无水乙醇,阳性对照为 Vc 溶液(100、150、200、250、300、350 mg/L),本底对照将 DPPH 溶液替换为无水乙醇。按照式(3)计算 DPPH·清除率。

$$C=[1-(A'-A_0)/A]\times 100\%$$

(3)

式中: C —自由基清除率,%; A' —反应样品的吸光度; A_0 —本底吸光度; A —空白吸光度。

1.4.2 ABTS⁺·清除率 将 7.4 mmol/L ABTS 溶液与 2.6 mmol/L 过硫酸钾溶液按体积比 1:1 混匀配制 ABTS 母液,在黑暗室温条件下反应 12~15 h 后,用无水乙醇将 ABTS 母液稀释至体积为原来的 40~50 倍,使稀释液在 734 nm 的吸光度为 0.7 ± 0.02 即得 ABTS 工作液。取 40 μ L 1.2 节得到的最优提取条件提取的无患子花或果皮水提液(用去离子水稀释成不同体积分数)于 96 孔板中,加入 160 μ L ABTS 工作液,振摇 10 s 混合后在室温条件下用锡箔纸包裹反应 6 min,734 nm 处测吸光值。空白对照为无水乙醇,本底对照将 ABTS 溶液替换为水,阳性对照为 Vc 溶液(20、40、60、80、100、120 mg/L)。按照式(3)计算 ABTS⁺·清除率。

1.4.3 铁离子还原能力(FRAP) 配制 2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)工作液。醋酸缓冲液:称 2.04 g 醋酸钠,加冰醋酸 8 mL,加蒸馏水定容至 100 mL,得到 pH 值为 3.6 的醋酸缓冲液。10 mmol/L TPTZ:称 15.6 mg TPTZ,溶于 5 mL 水中,加 2~3 滴浓盐酸,摇匀,至完全溶解方可使用。20 mmol/L 氯化铁:称 0.54 g 氯化铁六水合物溶于 100 mL 蒸馏水中;将醋酸缓冲液、10 mmol/L TPTZ 和 20 mmol/L 氯化铁这 3 种试剂按照体积比 10:1:1 混合即 TPTZ 工作液。FeSO₄标准曲线:在 96 孔板中,加入 20 μ L 不同质量浓度(0、1、10、50、100、200、400 mg/L)的 FeSO₄溶液,再加入 180 μ L TPTZ 工作液,用锡箔纸包裹避光于室温下反应 5 min,596 nm 处测吸光值。样品测定:96 孔板中加入 20 μ L 1.2 节得到的最优提取条件提取的无患子花或果皮水提液(用去离子水稀释成不同体积分数),加入 180 μ L TPTZ 工作液,混匀,用锡箔纸包裹,避光于室温下反应 5 min,596 nm 处测吸光值。空白对照为 200 μ L 蒸馏水,阳性对照为 Vc 溶液(20、40、60、80、100 mg/L)。根据标曲计算反应后溶液中 FeSO₄浓度。

1.4.4 O₂⁻·清除率 参照谢红^[20]方法,略做修改。96 孔板中加入 50 mmol/L pH 值 8.34 的 Tris-HCl,每孔 90 μ L,再加入 60 μ L 蒸馏水,40 μ L 1.2 节得到的最优提取条件提取的无患子花或果皮水提液(用去离子水稀释成不同体积分数),5 mmol/L 的邻苯三酚 10 μ L,摇匀,室温下放置 20 min,320 nm 处测吸光值,本底对照将邻苯三酚替换成水,空白对照为蒸馏水,阳性对照为 Vc 溶液(62.5、125、250、500、1 000 mg/L)。按照式(3)计算超氧阴离子自由基清除率。

1.5 无患子花水提液的酪氨酸酶抑制活性测定

参考行业标准 T/SHRH015-2018《化妆品-酪氨酸酶活性抑制实验方法》^[21],略做修改。对无患子花水提液的酪氨酸酶活性抑制率进行测定。空白对照为 pH 值 6.8 的 PBS 溶液,阳性对照为 Vc 溶液(125、250、500、1 000、2 000 mg/L)。首先按照表 1 在 96 孔板中添加待测样品、PBS 溶液和 100 U/mL 的酪氨酸酶溶液,将样品与酪氨酸酶充分混匀,置于

表 1 实验体系
Table 1 Experimental system

体系	待测样品/ μ L sample	PBS/ μ L	酪氨酸酶/ μ L tyrosinase	左旋多巴溶液/ μ L L-dopa
A	60	0	30	120
B	60	30	0	120
C	0	60	30	120
D	0	90	0	120

37 ℃ 水浴槽反应 10 min。然后依次在各孔中加入 120 μL 的左旋多巴溶液,控制每孔反应时间为 5 min,即刻用酶标仪在波长 475 nm 处测定吸光值(A)。酪氨酸酶抑制率(%) = $[1-(A_A-A_B)/(A_C-A_D)] \times 100\%$ 。

1.6 无患子花水提液的红细胞溶血实验

参照俞婕方法^[22],略作修改,用 PBS 缓冲液将水提液稀释,将不同体积分数水提液与红细胞悬液以 1:1 体积混合,并于 32 ℃,200 r/min 转速下振荡 10 min。振荡结束后 10 000 r/min 离心 1 min 以终止反应。吸取上清液用酶标仪测试 560、540、575 nm 处的吸光度值,每管样品采用 3 个复孔测定吸光度值,剔除异常数据后取平均值。完全溶血对照为蒸馏水,阴性对照为 PBS 缓冲液。溶血率和血红蛋白变性率按式(5)和式(6)计算。

$$H = (A_1 - A_2) / (A_3 - A_2) \times 100\%$$

$$DI = (A_{575} / A_{540}) / (A'_{575} / A'_{540})$$

式中: A_1 、 A_2 和 A_3 —分别为样品组、阴性对照组和完全溶血对照组在 560 nm 的吸光度; A_{575} 、 A_{540} —样品组在 575 和 540 nm 的吸光度; A'_{575} 、 A'_{540} —0.1% SDS 在 575 和 540 nm 的吸光度; H —溶血率,% ; DI —血红蛋白变性率,% 。

1.7 数据分析

差异显著性分析使用软件 IBM SPSS Statistics 25 中的 t -检验。

2 结果与讨论

2.1 无患子花总皂苷提取条件的单因素试验结果

2.1.1 提取温度对总皂苷得率的影响 在液料比 15:1 (mL:g)、提取时间 60 min、提取溶剂为蒸馏水条件下,不同提取温度对无患子花提取液中总皂苷得率影响见图 1(a)。在 40 ~ 60 ℃ 之间,无患子花总皂苷得率无显著性变化,而从 60 到 80 ℃ 之间,提取液中总皂苷得率随着提取温度升高而升高,提取温度为 80 ℃ 时,总皂苷得率最高。这与滇重楼茎叶总皂苷提取工艺研究结果一致,提取得率随温度升高而增加^[23]。这是因为在一定温度范围内,温度升高,分子运动越剧烈,扩散速度增快,有利于活性物质溶出,提取效果较好^[24];但温度过高时,部分皂苷可能会水解,同时提取成本也提高。

2.1.2 提取时间对总皂苷得率的影响 在液料比 15:1 (mL:g)、提取温度 50 ℃、提取溶剂为蒸馏水条件下,不同提取时间对无患子花提取液的总皂苷得率影响见图 1(b)。在 20 ~ 140 min 之间,总皂苷得率随着提取时间增加而增加,提取时间为 140 min 时,总皂苷得率最高,随后随着时间增加而下降。这与刘俊宏等^[25]研究结果类似,提取无患子总皂苷过程中,总皂苷得率与提取时间先呈正相关,达到峰值后则变化不明显,这可能是因为提取时间在一定范围内增大,溶质中活性物质在溶剂中溶出增多,但活性物质溶出到达一定浓度后,其扩散的速度变慢,逐渐趋于平衡^[26]。

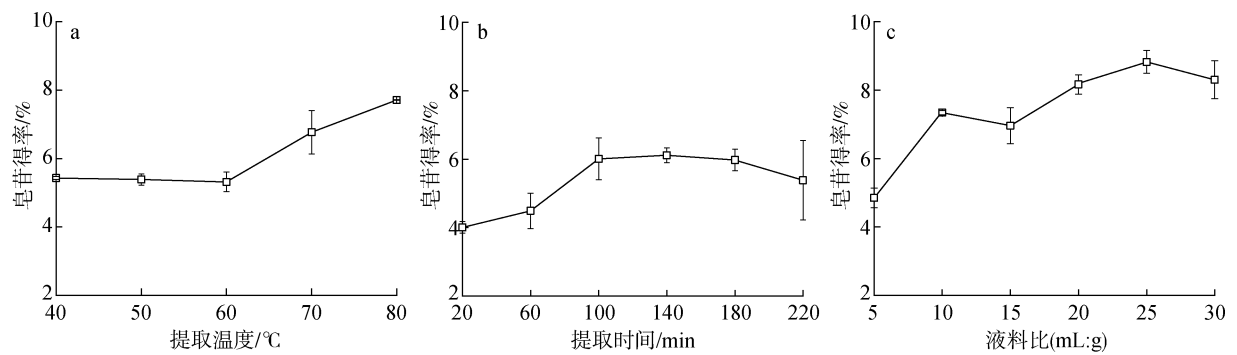


图 1 不同提取条件对无患子花提取液中总皂苷得率的影响

Fig.1 Effect of different extraction conditions on the yield of total saponins in soapberry flower extract

2.1.3 液料比对总皂苷得率的影响 在提取温度 80 ℃、提取时间 60 min、提取溶剂为蒸馏水条件下,不同液料比对无患子花提取液的皂苷得率影响见图 1(c)。液料比从 15:1 提升到 30:1 (mL:g),总皂苷得率先升高再下降,液料比为 25:1 (mL:g) 时,总皂苷得率最高。Hu 等^[27]提取金花茶皂苷时发现,在液

料比 30:1~50:1 (mL:g) 时,皂苷得率随着溶剂体积增加而增大,在 50:1 时最高,而后开始下降;提取文冠果果核脱脂残渣中三萜皂苷的研究亦有类似结果^[28]。这可能是因为皂苷在无患子花粉末与溶剂之间的浓度差越大,越有利于提高皂苷的传质速率,但溶剂量过大时则不利于溶质与溶剂间循环交换,导致提取率降低^[24],同时溶剂量过多提取成本也相应增大。

2.2 无患子花总皂苷提取条件的正交优化结果

2.2.1 正交试验结果 根据单因素试验结果,以总皂苷得率为评价指标,选取液料比(A)、提取时间(B)、提取温度(C)3 个因素进行正交试验,结果见表 2。由极差分析可知,对总皂苷得率影响最大的因素是液料比、其次为提取时间和提取温度。选取较佳提取工艺为 A₃B₁C₃ 或 A₃B₃C₃,即液料比 30:1 (mL:g)、提取时间为 100 min、提取温度为 80 ℃ 或液料比 30:1 (mL:g)、提取时间为 180 min、提取温度为 80 ℃。

表 2 无患子花总皂苷的提取条件优化的正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results of optimization of extraction conditions of total saponins from soapberry flowers					
编号 No.	A 液料比 (mL:g) ratio of liquid to solid	B 提取时间/min extraction time	C 提取温度/℃ extraction temperature	D 空白列 blank column	总皂苷得率/% saponins yield
1	20	100	60	1	11.07
2	20	140	80	2	10.61
3	20	180	70	3	10.72
4	25	100	80	3	12.35
5	25	140	70	1	11.82
6	25	180	60	2	12.17
7	30	100	70	2	12.47
8	30	140	60	3	12.25
9	30	180	80	1	12.79
k1	10.8002	11.9629	11.8284	11.8899	
k2	12.1136	11.5600	11.6700	11.7517	
k3	12.5023	11.8933	11.9176	11.7745	
R	1.7021	0.4029	0.2475	0.1382	

2.2.2 验证试验 按较佳提取条件进行验证试验,在提取条件为 A₃B₁C₃ 时,总皂苷得率为 11.43%,RSD 值为 4.9%;在提取条件为 A₃B₃C₃ 时,总皂苷得率较高(12.15%)且 RSD 值小(1.39%),说明此提取条件下结果稳定,即最佳提取条件为液料比 30:1 (mL:g)、提取时间为 180 min、提取温度为 80 ℃。

2.2.3 无患子花与无患子果皮水提液中的主要活性成分 最优提取条件下得到的无患子花水提液与果皮水提液中的总皂苷、总黄酮及总酚质量分数测定结果见表 3。由数据可知,无患子花水提液中总黄酮、总皂苷、总酚含量均显著高于无患子果皮水提液中的。

表 3 无患子花与果皮水提液中的总皂苷、总黄酮、总酚¹⁾

Table 3 Mass fractions of total saponins, total flavonoids and total phenols in aqueous extracts of soapberry flowers and pericarp %			
水提液来源	总皂苷 total saponin	总黄酮 total flavonoid	总酚 total phenolic
花 flowers	128.80 ± 0.94 *	28.23 ± 0.60 *	97.21 ± 1.87 *
果皮 pericarp	111.76 ± 4.10	4.42 ± 0.09	14.19 ± 1.03

1) * 代表显著性差异, $p < 0.05$ * represents a significant difference, $p < 0.05$

2.3 无患子花水提液的抗氧化活性

2.3.1 DPPH·清除率 无患子花水提液与果皮水提液对 DPPH·清除率如图 2(a) 所示。阳性对照 Vc 溶液在质量浓度 100~350 mg/L 之间对 DPPH·清除率为 61.53%~96.73%。无患子果皮水提液对 DPPH·清除率随体积分数增加而增大,具有用量依赖性,体积分数 100% 时,无患子果皮水提液对 DPPH·清除率为 91.98%,无患子花水提液对 DPPH·清除率则为 90.28%,随着提取液的稀释,无患子花水提液的抗氧化能力依然保持良好;体积分数为 3.125% 时,果皮水提液对 DPPH·清除率下降至 28.06%,无患子花水提液的 DPPH·清除率则高达 88.25%,高于 100 mg/L 的 Vc。

2.3.2 ABTS⁺·清除率 无患子花水提液与果皮水提液的 ABTS⁺·清除效果如图 2(b) 所示。Vc 溶液

在 20 ~ 120 mg/L 之间对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 清除率为 73.34% ~ 99.63%。无患子花与果皮水提液对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 的清除率随其体积分数增加而增大,具有用量依赖性,且在体积分数为 0.312 5% ~ 1.875% 之间时,无患子花水提液对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 清除率高于无患子果皮水提液。水提液体积分数为 1.875% 时,无患子花水提液对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 清除率高达 99.54%,无患子果皮水提液对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 清除率为 79.47%。水提液体积分数为 0.312 5% 时,无患子花水提液对自由基清除率与 20 mg/L 的 Vc 溶液相当。由此可见,无患子花与果皮水提液对 $\text{ABTS}^+ \cdot$ 清除能力均较好,且无患子花水提液要优于无患子果皮水提液。

2.3.3 铁离子还原能力(FRAP) 无患子花与果皮水提液的铁离子还原能力见图 2(c)。Vc 溶液在 20 ~ 100 mg/L 之间 FRAP 值为 50.72 ~ 282.39。无患子花与果皮水提液的铁离子还原能力具有用量依赖性,水提液体积分数越大,FRAP 值越大,对铁离子还原能力越强。水提液体积分数为 1.25% ~ 6.25% 时,无患子花水提液的铁离子还原能力高于果皮水提液;水提液体积分数为 6.25% 时,无患子花水提液铁离子还原能力与质量浓度为 100 mg/L 的 Vc 溶液相当,说明无患子花水提液具有较好的铁离子还原能力。

2.3.4 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除活性 无患子花与果皮水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除作用如图 2(d) 所示。Vc 溶液在 62.5 ~ 100 mg/L 之间对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率为 37.60% ~ 98.77%。水提液体积分数在 6.25% ~ 100% 之间,无患子花与果皮水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率均随着体积分数增加而增大;体积分数为 6.25% ~ 25% 时,无患子果皮水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率略高于无患子花水提液,但当水提液体积分数升至 50% ~ 100% 时,无患子花水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除能力显著高于果皮水提液。水提液体积分数为 6.25% 时,无患子花水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率与 62.5 mg/L 的 Vc 溶液相当。体积分数 100% 时无患子花水提液对 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率高达 95.15%。

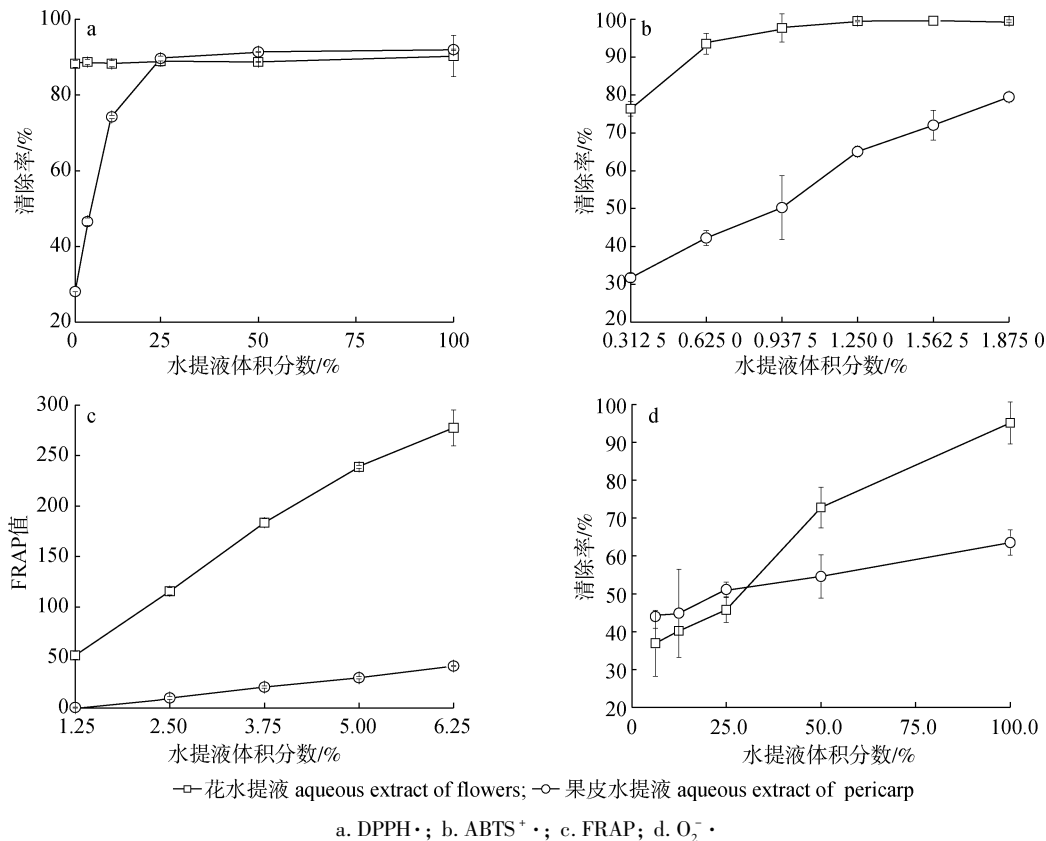


图 2 不同体积分数的无患子花和果皮水提液的抗氧化活性

Fig.2 Antioxidant activity of aqueous extract of soapberry flowers and pericarp at different volume fractions

总体来看,无患子花的抗氧化能力要优于无患子果皮,这可能是由无患子花与果皮中皂苷、黄酮和多酚类成分含量的差异造成的。Shah 等^[6]研究发现无患子茎皮不同极性萃取物的多种抗氧化活性与其总酚和总黄酮含量呈显著正相关。除黄酮和多酚以外,皂苷也具有抗氧化活性^[29-30]。Silva^[31]发现

无患子果实粗提物以及三萜皂苷在 DPPH、FRAP 等体外抗氧化试验中具有较高的抗氧化能力,其中三萜皂苷在 100 mg/L 时活性最好。

2.4 无患子花水提液的酪氨酸酶活性抑制能力

酪氨酸酶是一种多功能氧化酶,它参与黑色素形成过程中多个步骤,通过抑制其活性,可以有效阻止黑色素的生成^[32]。图 3 是无患子花与果皮水提液的酪氨酸酶抑制实验结果。阳性对照 Vc 在 125 ~ 2 000 mg/L 之间对酪氨酸酶活性抑制率为 37.60% ~ 98.77%。由图可以看出,水提液体积分数为 6.25% ~ 100% 时,无患子花水提液均保持着良好的酪氨酸酶活性抑制能力,抑制率最高为 92.76%;无患子果皮水提液的酪氨酸酶抑制率则随水提液体积分数增大而升高,最高为 88.06%;水提液体积分数为 6.25% 时,无患子花水提液的酪氨酸酶抑制能力高于 125 mg/L 的 Vc 溶液。无患子花与果皮水提液的酪氨酸酶抑制能力较好,且无患子花水提液的抑制效果要高于无患子果皮水提液。有研究发现无患子果皮水提液发酵液和半制备 HPLC 获得的 F4 级分在质量浓度 2 g/L 时对酪氨酸酶活性的抑制率为 63.88% 和 67.26%,同时,F4 级分中分析出三萜皂苷,其酪氨酸酶活性或与此有关^[33]。多酚化合物螯合金属离子的能力会影响酪氨酸酶的活性^[34],黄酮类物质如葛根素以可逆混合方式可显著抑制酪氨酸酶活性,槲皮素、芦丁、白藜芦醇等也都可以抑制酪氨酸酶活性^[35]。本研究无患子花水提液具有更优的美白效果,推测原因,应和其含有的皂苷、黄酮与多酚含量有关。

2.5 无患子花水提液的红细胞溶血实验

通过红细胞溶血实验判断无患子花水提液的刺激性,结果见图 4。图 4 显示随着提取液体积分数升高溶血率逐渐增大,拟合得到的无患子花水提液的 50% 红细胞发生溶血时的样品质量浓度 (HD₅₀) 为 25 798.77 mg/L,血红蛋白变性率 DI 为 93.44%,无患子花水提液的 HD₅₀/DI > 100,根据欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 的红细胞溶血试验刺激性分级标准^[36],表明无患子花水提液无刺激性。

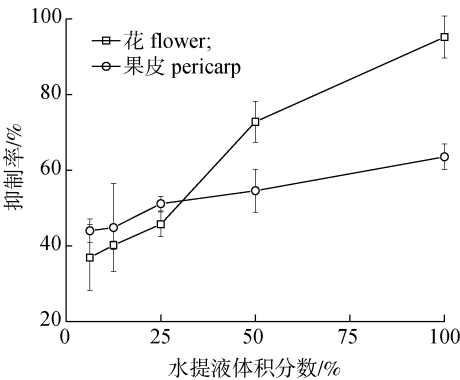


图 3 无患子花与无患子果皮水提液的酪氨酸酶抑制率
Fig. 3 Tyrosinase inhibition rate of aqueous extract of soapberry flowers and pericarp

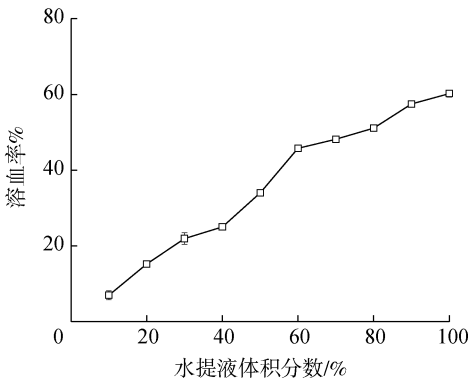


图 4 无患子花水提液的红细胞溶血率
Fig. 4 Erythrocyte haemolysis rate of water extract of soapberry flowers

3 结 论

3.1 采用单因素和正交试验设计优化无患子花总皂苷提取工艺,确定无患子花水提液的最佳提取条件为液料比 30:1 (mL:g)、提取时间 180 min、提取温度 80 ℃。无患子花水提液中总皂苷、总黄酮和总酚含量均高于无患子果皮水提液。

3.2 无患子花水提液与果皮水提液均具有较好的抗氧化能力,无患子花水提液对 DPPH·、ABTS⁺·和 O₂⁻·清除率最高分别达到 90.28%、99.54% 和 95.15%;果皮水提液最大清除率则分别为 91.98%、79.47% 和 63.54%。无患子花水提液的铁离子还原能力较好,果皮水提液则稍逊。

3.3 无患子花水提液的酪氨酸酶活性抑制能力优于无患子果皮水提液,水提液体积分数为 6.25% 时,无患子花水提液酪氨酸酶抑制率 (87.30%) 远高于果皮水提液抑制率 (25.17%),说明无患子花水提液具有较好的美白护肤功效。无患子花水提液的 HD₅₀ 为 25 798.77 mg/L, HD₅₀/DI > 100,表明无患子花

水提液无刺激性,此结果为无患子花在化妆品中的利用提供了可能性。

参考文献:

- [1] SINGH R, SHARMA B. Biotechnological advances, phytochemical analysis and ethnomedical implications of sapindus species [M]. Springer Singapore, 2019.
- [2] 曾庆钱, 郑良豹, 黄意成, 等. 无患子的本草考证及研究进展[J]. 林业与环境科学, 2018, 34(4): 168–175.
ZENG Q Q, ZHENG L B, HUANG Y C, et al. Herbal textual and research progress of *Sapindus mukorossi* [J]. Forestry and Environmental Science, 2018, 34(4): 168–175.
- [3] GOYAL S. Medicinal plants of the genus *Sapindus* (Sapindaceae) -A review of their botany, phytochemistry, biological activity and traditional uses [J]. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 2014, 4(5): 7–20.
- [4] SHARMA A, SATI S C, SATI O P, et al. A new triterpenoid saponin and antimicrobial activity of ethanolic extract from *Sapindus mukorossi* Gaertn. [J/OL]. Journal of Chemistry, 2013; 218510 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.1155/2013/218510>.
- [5] 林清霞, 郑德勇. 泡沫分离法分离纯化无患子皂苷的研究[J]. 生物质化学工程, 2013, 47(3): 34–38.
LIN Q X, ZHENG D Y. Foam separation and purification of saponin from *Sapindus mukorossi* [J]. Biomass Chemical Engineering, 2013, 47(3): 34–38.
- [6] SHAH M, PARVEEN Z, KHAN M R. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the stem bark of *Sapindus mukorossi* [J/OL]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17; 526 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2042-3>.
- [7] JIN K, SUN Y, ZHOU S. *Sapindus* saponins inhibits tyrosinase & glutathione-induced melanin deposition by obstructing DOPA and cysteyle derivatives transformation pathways [C] // 2021 International Symposium on Biomedical Engineering and Computational Biology, 2021: 1–6.
- [8] 雷发玲, 肖蕾, 么春艳, 等. 无患子皂苷抗炎抗菌功效研究[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(7): 9–13.
LEI F L, XIAO L, YAO C Y, et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of saponin from *Sapindus mukorossi* [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2020, 39(7): 9–13.
- [9] HENG W, LING Z, NA W, et al. Analysis of the bioactive components of *Sapindus* saponins [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 61; 422–429.
- [10] LIU M, CHEN Y L, KOU Y H, et al. Aqueous extract of *Sapindus mukorossi* induced cell death of A549 cells and exhibited antitumor property *in vivo* [J/OL]. Scientific Reports, 2018; 4831 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23096-w>.
- [11] CHEN I C, CHEN M T, CHUNG T W. Analysis of antioxidant property of the extract of saponin by experiment design methodology [C/OL] // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2020, 594(1): 012002 [2023-06-12]. DOI 10.1088/1755-1315/594/1/012002.
- [12] 赵志敏, 南艳平, 唐青涛, 等. 无患子总皂苷抗炎及抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1592–1595.
ZHAO Z M, NAN Y P, TANG Y Q T, et al. Anti-inflammatory activity and inhibitory activity on tyrosinase of soapnut saponin from *Sapindus mukorossi* Gaertn [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2014, 25(7): 1592–1595.
- [13] 陈雷, 赵春琳, 周生学. 无患子总皂苷体外抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(21): 56–58.
CHEN L, ZHAO C L, ZHOU S X. Research on the inhibition of tyrosinase activity *in vitro* by total saponins from *Sapindus* [J]. Anhui Journal of Agricultural Sciences, 2015, 43(21): 56–58.
- [14] 徐圆圆, 周思维, 陈仲, 等. 无患子不同器官中的总皂苷和总黄酮含量[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(4): 83–89.
XU Y Y, ZHOU S W, CHEN Z, et al. Contents of the total saponins and total flavonoids in different organs of *Sapindus mukorossi* [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2021, 45(4): 83–89.
- [15] 钱天元, 孙亭, 李成平, 等. 无患子花色苷理化性质研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 212–215, 234.
QIAN T Y, SUN T, LI C P, et al. Study on the physicochemical properties of pigment from flower of *Sapindus mukorossi* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 212–215, 234.
- [16] 阳春苗, 王秋玲, 梁芳, 等. 响应面法优化无患子皂苷超声提取工艺研究[J]. 生物化工, 2021, 7(1): 1–4, 10.
YANG C M, WANG Q L, LIANG F, et al. Optimization of ultrasonic extraction technology of saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn. by response surface analysis [J]. Biological Chemical Engineering, 2021, 7(1): 1–4, 10.
- [17] WANG B, QU J, LUO S, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from olive (*Olea europaea*) leaves, and evaluation of their antioxidant and anticancer activities [J/OL]. Molecules, 2018, 23(10): 2513 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.3390/molecules23102513>.
- [18] XU S J, FANG D, TIAN X Q, et al. Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste cotton (*Gossypium hirsutum* L.) flowers [J/OL]. Industrial Crops and Products, 2021, 164; 113369 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113369>.

- [19] WANG Y J, ZHAO L, ZHANG R Y, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction by response surface methodology, antioxidant capacity, and tyrosinase inhibitory activity of anthocyanins from red rice bran[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(2): 921–932.
- [20] 谢红. 酸枣仁皂苷的分离纯化及生物活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
XIE H. Study on separation, purification and biological activity of *Zizyphi Spinosae Semen* saponins[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [21] 上海日用化学品行业协会. T/SHRH 015-2018 化妆品-酪氨酸酶活性抑制实验方法[S]. 上海: 上海日用化学品行业协会, 2018.
Shanghai Daily Chemistry Trade Association. T/SHRH 015-2018 Cosmetics-tyrosinase activity inhibition test method[S]. Shanghai: Shanghai Daily Chemistry Trade Association, 2018.
- [22] 俞婕, 祝愿, 鲍红洁. 红细胞溶血法用于体外评价日化产品和原料刺激性的研究[J]. 中国洗涤用品工业, 2020(12): 36–41.
YU J, ZHU Y, BAO H J. Study on the *in-vitro* RBC hemolysis assay for the irritation evaluation of daily chemical products and raw materials [J]. China Cleaning Industry, 2020(12): 36–41.
- [23] 韦蒙, 许新恒, 李俊龙, 等. 滇重楼茎叶总皂苷提取工艺优化及其体外抗氧化活性分析[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(10): 1794–1800.
WEI M, XU X H, LI J L, et al. Extraction and antioxidant activity of total saponins from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz[J]. Natural Product Research and Developmen, 2015, 27(10): 1794–1800.
- [24] 张翠. 无患子总皂苷制备工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
ZHANG C. The production of total sapindus-saponins from *Sapindus mukurossi* Gaertn[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [25] 刘俊宏, 邱智东. 无患子总皂苷提取工艺优化及其对酪氨酸酶的抑制活性[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(9): 228–232.
LIU J H, QIU Z D. Optimisation of the extraction process of total saponins from *Sapindus mukurossi* Gaertn and its inhibitory activity on tyrosinase[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(9): 228–232.
- [26] 黄素梅, 王敬文, 杜孟浩, 等. 无患子总皂苷的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 354–356.
HUANG S M, WANG J W, DU M H, et al. Research on the extraction technology of total saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn[J]. Anhui Journal of Agricultural Sciences, 2010, 38(1): 354–356.
- [27] HU X, TANG J, ZHANG G, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activities of saponins from *Camellia fascicularis* leaves [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021, 15: 1889–1898.
- [28] LI J, ZU Y G, FU Y J, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2010, 11(4): 637–643.
- [29] LIM J G, PARK H M, YOON K S. Analysis of saponin composition and comparison of the antioxidant activity of various parts of the quinoa plant (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(1): 694–702.
- [30] EL IDRISSI Y, ELOUAFY Y, EL MOUDDEN H, et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of saponin extracts from different parts of *Argania spinosa* L. Skeels [J/OL]. Progress In Microbes & Molecular Biology, 2023, 6(1) [2023-07-12]. DOI: 10.36877/pmm.0000338.
- [31] SILVA R M G, MARTINS G R, NUCCI L M B, et al. Antiglycation, antioxidant, antiacne, and photoprotective activities of crude extracts and triterpene saponin fraction of *Sapindus saponaria* L. fruits: An *in vitro* study[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2022, 12(9): 391–399.
- [32] CHANG T S. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(6): 2440–2475.
- [33] WEI M P, QIU J D, LI L, et al. Saponin fraction from *Sapindus mukorossi* Gaertn as a novel cosmetic additive: Extraction, biological evaluation, analysis of anti-acne mechanism and toxicity prediction[J/OL]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 268: 113552 [2023-06-12]. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113552>.
- [34] RATZ-ŁYKO A, ARCT J, MAJEWSKI S, et al. Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin [J]. Phytotherapy Research, 2015, 29(4): 509–517.
- [35] ZHAO W, YANG A, WANG J, et al. Potential application of natural bioactive compounds as skin-whitening agents: A review[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2022, 21(12): 6669–6687.
- [36] ALVES E N, DE FARIAS PRESGRAVE R, et al. A reassessment of the *in vitro* RBC haemolysis assay with defibrinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: Comparison with the *in vivo* Draize rabbit test[J]. Alternatives to Laboratory Animals, 2008, 36(3): 275–284.