

线叶旋覆花总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性分析

钱慧琴, 秦晶晶, 魏婧, 王帅帅, 李佳祥, 张凌云, 闫福林*

(新乡医学院三全学院, 河南新乡 453000)

摘要: 采用响应面法优化线叶旋覆花总黄酮的提取工艺, 评价最佳条件下得到提取物的抗氧化活性。以线叶旋覆花总黄酮提取量为指标, 考察乙醇体积分数、提取温度、液料比、提取时间对总黄酮提取量的影响。在单因素试验的基础上, 采用4因素3水平的响应面法确定线叶旋覆花总黄酮的提取工艺。结果表明, 线叶旋覆花总黄酮提取的最佳工艺为: 乙醇体积分数70%、提取温度87℃、液料比31:1 mL/g、提取时间40 min, 线叶旋覆花总黄酮提取量为(33.62 ± 0.0207) mg/g。最佳工艺条件下得到的提取物对1,1-二苯基-2-苦基肼自由基(IC₅₀ = 0.074 mg/mL)的清除能力强于V_C(IC₅₀ = 0.082 mg/mL), 但对OH·的清除能力明显弱于V_C。响应面法优化线叶旋覆花总黄酮提取工艺切实可行, 得到的总黄酮有较强的抗氧化活性, 为线叶旋覆花总黄酮的开发提供理论依据。

关键词: 线叶旋覆花, 总黄酮, 提取, 工艺优化, 响应面法, 抗氧化

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Inula linearifolia* and Its Antioxidant Activity

QIAN Hui-qin, QIN Jing-jing, WEI Jing, WANG Shuai-shuai, LI Jia-xiang, ZHANG Ling-yun, YAN Fu-lin*

(Sanquan College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: The optimization of the extraction process of total flavonoids from *Inula linearifolia* was achieved by response surface methodology and its antioxidant activity were evaluated. The yield of total flavonoids was taken as the index to study the effect of ethanol concentration, extracting temperature, liquid/solid ratio and extracting time. Based on the single factor experiments, the four factors and three levels of response surface analysis method was taken to determine the extraction of total flavonoids from *Inula linearifolia*. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: Ethanol concentration 70%, extracting temperature 87℃, liquid-solid ratio 31:1 mL/g, extracting time 40 min. Under the conditions, the yield of total flavonoids was (33.62 ± 0.0207) mg/g. The scavenging ability of total flavonoids from *Inula linearifolia* on DPPH radical (IC₅₀ = 0.074 mg/mL) was stronger than that of V_C (IC₅₀ = 0.082 mg/mL), but the scavenging ability of hydroxyl radical was obviously weaker than V_C. The extraction process of total flavonoids from *Inula linearifolia* which optimized by response surface methodology was stable and practicable. Moreover, the total flavonoids obtained under optimum extraction conditions had strong antioxidant activity, which provided a theoretical basis for the development of total flavonoids from *Inula linearifolia*.

Key words: *Inula linearifolia*; total flavonoids; extract; process optimization; response surface methodology; antioxidant activity

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)22-0151-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.027

引文格式: 钱慧琴, 秦晶晶, 魏婧, 等. 线叶旋覆花总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(22): 151-156, 162.

线叶旋覆花(*Inula linearifolia*)为菊科旋覆花属多年生草本植物, 地上部分入药, 作中药“金沸草”用, 具有散风寒、化痰饮、消肿毒、祛风湿之效, 治疗风寒咳嗽、伏饮痰喘、肋下胀痛、可疮肿毒、风湿疼痛^[1]。现代药理作用表明, 线叶旋覆花在抗肿瘤、抗

炎、镇痛等方面具有显示较好的生物活性, 其主要活性成分为倍半萜、二萜、三萜、黄酮类、生物碱等^[2-4]。

黄酮类化合物是一种多羟基酚类的次生代谢产物, 普遍存在于自然界中。黄酮类化合物在抗氧化活性、保护肝脏、抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗菌等方面

收稿日期: 2019-03-26

作者简介: 钱慧琴(1988-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然药物活性成分研究, E-mail: qianhiquina@163.com。

* 通讯作者: 闫福林(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物活性成分研究, E-mail: 1191991780@qq.com。

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(20B350007); 新乡医学院三全学院校级教改重点课题(200706); 新乡医学院三全学院校级科技创新团队(STD201602)。

都具有良好的生物活性,被广泛应用于药品、保健品、化妆品等领域^[5-7]。目前,崔莹等^[8]通过正交试验得到线叶旋覆花同属植物旋覆花总黄酮提取工艺的最佳因素水平组合,聂利月等^[2]、陈莉萍^[9]对线叶旋覆花天然活性成分进行研究,而对于线叶旋覆花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性的研究尚未见文献报道。

为了研究线叶旋覆花总黄酮最佳的提取工艺,评价其抗氧化活性,提高线叶旋覆花的临床应用价值,本试验以线叶旋覆花地上部位为材料,在单因素试验的基础上,采用响应面法寻找线叶旋覆花总黄酮的最佳提取工艺,并评价其对 DPPH· 和 ·OH 的清除能力,以期对线叶旋覆花的开发和利用提供科学支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

线叶旋覆花 采集于南阳市桐柏县,经药学院闫福林教授鉴定为菊科旋覆花属植物线叶旋覆花的地上部分;芦丁对照品 中国食品药品检定研究院;1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH) 东京化成工业株式会社;L-抗坏血酸(V_C) 上海源叶生物科技有限公司;水杨酸、硫酸亚铁、30%过氧化氢、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝、无水乙醇 天津市德恩化学试剂有限公司。

T6 型新世纪紫外可见分光光度仪 北京普析通用仪器有限公司;HH-S 数显恒温水浴锅 金坛市金南仪器厂;HA2004 型电子分析天平 上海象平仪器仪表有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 线叶旋覆花预处理 将采集的线叶旋覆花地上部分洗净,用滤纸吸干,于 60 ℃ 烘干,粉碎,过 60 目筛,将烘干样品放入广口瓶中,备用。

1.2.2 线叶旋覆花总黄酮的提取 精密称定线叶旋覆花茎叶粗粉约 1 g,按一定液料比(mL/g)加入一定体积分数的乙醇溶液,摇匀,于一定温度下提取一定时间,之后过滤,滤液减压浓缩至浸膏,少量无水乙醇溶解并转移至 25 mL 容量瓶,无水乙醇定容,即得供试品溶液。

1.2.3 单因素试验 按照“1.2.2”项下线叶旋覆花总黄酮的提取方法,考察乙醇体积分数、提取温度、液料比和提取时间对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响。

1.2.3.1 乙醇体积分数对总黄酮提取量的影响 固定提取温度 80 ℃,液料比 30:1 mL/g,提取时间 60 min,提取次数 1 次,考察乙醇体积分数为 40%、50%、60%、70%、80%、90% 时对总黄酮提取量的影响,确定适宜的乙醇体积分数。

1.2.3.2 提取时间对总黄酮提取量的影响 固定乙醇体积分数 80%,提取温度 80 ℃,液料比 30:1 mL/g,提取次数 1 次,考察提取时间为 10、20、30、40、50、60 min 时对总黄酮提取量的影响,确定适宜提取时间。

1.2.3.3 提取温度对总黄酮提取量的影响 固定乙醇体积分数 80%,液料比 30:1 mL/g,提取时间

40 min,提取次数 1 次,考察提取温度为 40、50、60、70、80、90 ℃ 时对总黄酮提取量的影响,确定适宜的提取温度。

1.2.3.4 液料比对总黄酮提取量的影响 固定乙醇体积分数 80%,提取时间 40 min,提取温度 80 ℃,提取次数 1 次,考察液料比为 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1 mL/g 时对总黄酮提取量的影响,确定适宜的液料比。

1.2.4 响应面试验 在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 法进行试验设计,以乙醇体积分数、提取温度、液料比、提取时间为考察因素,以线叶旋覆花总黄酮提取量为响应值,采用 4 因素 3 水平的试验,确定线叶旋覆花总黄酮的最佳提取工艺,试验因素和水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%)	70	80	90
B 提取温度(℃)	70	80	90
C 液料比(mL/g)	30:1	40:1	50:1
D 提取时间(min)	30	40	50

1.2.5 标准曲线的制备 精确量取浓度为 100 mg/mL 芦丁标准品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 6 个 10 mL 容量瓶中,每个容量瓶中各加入 0.4 mL 5% 亚硝酸钠溶液,摇匀,放置 6 min,各依次加入 0.4 mL 10% 硝酸铝溶液,6 min 后再各加入 4 mL 4% NaOH 溶液,无水乙醇定容至刻度,摇匀,反应 15 min 后,于 510 nm 处测定其吸光度。空白对照组用相应的试剂溶液进行上述操作处理。以芦丁浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 0.0113x + 0.0184$,相关系数 $r = 0.9992$ 。此方程具有良好的线性关系,可用于评价线叶旋覆花总黄酮的质量浓度。

1.2.6 线叶旋覆花总黄酮含量测定 精密吸取线叶旋覆花供试品溶液 0.5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,按“1.2.5”项下方法测吸光度。根据芦丁标准曲线回归方程,计算线叶旋覆花总黄酮质量浓度,然后总黄酮提取量计算见式(1)。

$$Y = \frac{C \times V \times N}{m} \quad \text{式(1)}$$

式中:Y 为线叶旋覆花总黄酮提取量,mg/g;C 为线叶旋覆花总黄酮的质量浓度,mg/mL;V 为测量总黄酮提取液体积,mL;N 为稀释倍数;m 为线叶旋覆花干品质量,g。

1.2.7 线叶旋覆花总黄酮抗氧化活性测定

1.2.7.1 清除 DPPH· 能力测定 参照 Cai 等^[10]的方法并加以修改,将最佳提取工艺条件下提取得到的线叶旋覆花总黄酮溶液配成 0.03、0.06、0.08、0.10、0.14、0.20、0.24、0.26 mg/mL 不同质量浓度的样品溶液,吸取 2 mL 不同质量浓度的样品溶液置于试管中,依次加入 1.3×10^{-5} mol/L 的 DPPH 乙醇溶液 2 mL,摇匀,避光反应 30 min 后,于 517 nm 波长处测

其吸光值 A_1 。同时测定 2 mL 无水乙醇和 2 mL DPPH·乙醇溶液的吸光度值 A_0 , 以及 2 mL 无水乙醇和 2 mL 不同质量浓度的线叶旋覆花总黄酮溶液的吸光度值 A_2 。对照组为相同质量浓度的 V_c 溶液。DPPH·清除率计算见式(2)。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_0 为 2 mL DPPH·乙醇溶液 + 2 mL 无水乙醇的吸光度值; A_1 为 2 mL DPPH·乙醇溶液 + 2 mL 样品溶液的吸光度值; A_2 为 2 mL 无水乙醇 + 2 mL 样品溶液的吸光度值。

1.2.7.2 线叶旋覆花总黄酮清除羟基自由基能力测定 参照许建本等^[11]的方法并加以修改, 将最佳提取条件下提取得到的线叶旋覆花总黄酮溶液配成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5、4.5、5.0 mg/mL 不同质量浓度的样品溶液, 吸取 1 mL 不同质量浓度的样品溶液置 10 mL 容量瓶中, 依次加入 1 mL 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液, 1 mL 9 mmol/L $FeSO_4$, 最后加入 1.0 mL 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应, 去离子水定容至刻度, 于 37 °C 水浴放置 30 min 后, 冷却, 在 510 nm 处测定吸光值 A_1 。同时测定以 1 mL 无水乙醇代替样品提取液的吸光度值 A_0 , 以及 1 mL 去离子水代替 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 , 测定吸光度值 A_2 。对照组为相同质量浓度的 V_c 溶液。羟自由基清除率计算见式 3。

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: A_0 为空白吸光度; A_1 为样品溶液吸光度; A_2 为样品溶液的底吸光度。

1.3 数据处理

所有试验平行测定 3 次, 运用响应面分析软件 Design Expert 8.0.6、SPSS22.0 及 Excel 进行相关图表的绘制以及数据的处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数的影响 乙醇体积分数对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响见图 1。

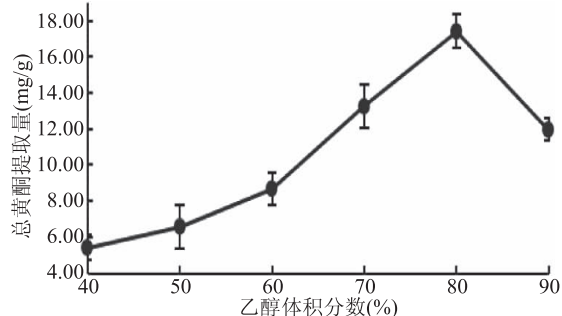


图1 乙醇体积分数对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on total flavonoid yield from *Inula linearifolia*

由图 1 可知, 乙醇体积分数在 40%~80% 之间, 线叶旋覆花总黄酮提取量随着乙醇体积分数的增大而增大; 乙醇体积分数为 80% 时, 总黄酮提取量达到最大值; 乙醇体积分数超过 80%, 总黄酮提取量呈下

降趋势。这与井文华等^[12]的研究报道的乙醇对于总黄酮提取量影响的变化趋势一致。这可能是因为乙醇体积分数为 80% 时, 线叶旋覆花黄酮类物质的溶出趋于饱和, 随着乙醇体积分数继续增加, 提取溶剂的极性相对降低, 促进线叶旋覆花中亲脂性强的化学成分的溶出, 最终导致线叶旋覆花总黄酮提取量相对下降。因此, 选取 80% 乙醇体积分数为宜。

2.1.2 提取时间的影响 提取时间对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响见图 2。

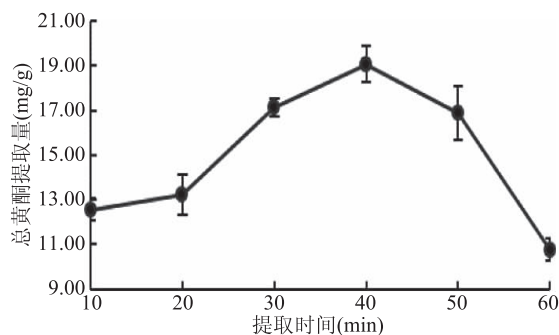


图2 提取时间对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响

Fig.2 Effect of extraction time on total flavonoid yield from *Inula linearifolia*

由图 2 可知, 提取时间在 10~40 min 之间, 线叶旋覆花总黄酮提取量随着提取时间的增加而增大; 当提取时间为 40 min 时, 总黄酮提取量达到最高; 超过 40 min 后, 总黄酮的提取量呈现下降的趋势。这与林香信等^[16]研究提取时间对总黄酮提取量影响的研究结果一致。这可能是因为提取时间过短, 黄酮类物质不易溶出, 使得总黄酮提取量较低。随着提取时间的延长, 线叶旋覆花茎叶与乙醇充分接触, 使线叶旋覆花黄酮类物质充分溶出, 40 min 时, 黄酮类物质已基本溶出。40 min 后, 继续增加提取时间, 在长时间高温提取的情况下, 黄酮类物质可能发生氧化、降解或者是增加其他物质的溶出, 致使总黄酮提取量下降。因此, 选取提取时间 40 min 为宜。

2.1.3 提取温度的影响 提取温度对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响见图 3。

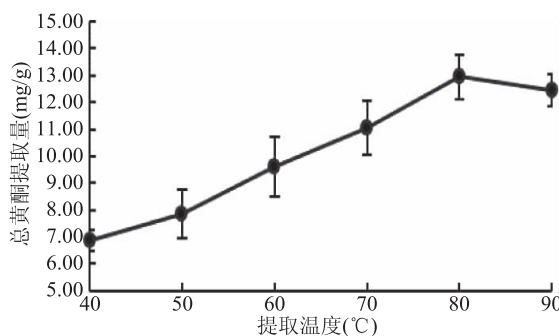


图3 提取温度对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature on total flavonoid yield from *Inula linearifolia*

由图 3 可知, 提取温度在 40~80 °C 范围内, 线叶旋覆花总黄酮提取量随着提取温度的增加而增大;

提取温度达到 80 ℃ 时总黄酮提取量达到最高;超过 80 ℃ 时,总黄酮提取量呈下降趋势。这与曾桥等^[13] 研究报道的温度对总黄酮提取量影响的变化趋势一致。可能是因为温度升高,有利于加快分子运动的速度,线叶旋覆花中黄酮类化合物的渗透、扩散和溶解速度也会加快,黄酮类物质溶出量增加。当温度升高到一定程度,黄酮类物质的结构遭到破坏,且其他脂溶性杂质的溶出增加,致使总黄酮提取量降低^[14]。所以,选取提取温度 80 ℃ 为宜。

2.1.4 液料比的影响 液料比对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响见图 4。

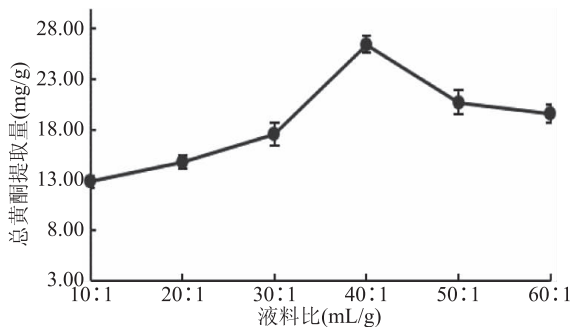


图4 液料比对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响

Fig.4 Effects of liquid-to-solid ratio

on total flavonoid yield from *Inula linearifolia*

由图 4 可知,液料比在 10:1-40:1 mL/g 范围内,线叶旋覆花总黄酮提取量随液料比的增加而增大;液料比为 40:1 mL/g 时,总黄酮提取量最大;液料比超过 40:1 mL/g,总黄酮提取量呈现下降的趋势。这与王慧芳等^[15] 研究液料比对总黄酮提取量影响的研究结果一致。这可能是因为随着液料比的增加,增加乙醇与线叶旋覆花粗粉的接触面积,有利于黄酮类物质溶出;当液料比为 40:1 mL/g 时,线叶旋覆花黄酮类化合物的溶出逐渐趋于动态平衡;继续增加液料比,非黄酮类可溶性物质溶出增多,同时,后续浓缩提取液的时间也会增加。所以,选取液料比 40:1 mL/g 为宜。

2.2 响应面法优化线叶旋覆花总黄酮提取工艺

2.2.1 响应面试验设计结果 根据单因素试验结果,选择乙醇体积分数(A)、提取温度(B)、料液比(C)、提取时间(D)4个因素按照表2设计进行试验,得到线叶旋覆花总黄酮提取量(Y),见表2。

2.2.2 响应面回归模型的建立及显著性分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行回归拟合,得到以线叶旋覆花总黄酮提取量为响应值的回归方程: $Y = 22.73 - 9.00A + 0.31B - 0.68C - 1.21D - 2.89AB + 2.70AC - 1.70AD + 0.097BC + 2.75BD - 0.31CD - 1.95A^2 + 0.48B^2 - 1.67C^2 - 1.51D^2$ ($R^2 = 0.9828$),响应面回归模型方差分析结果见表3。

由表3可知,模型的 F 值为 57.04, $P < 0.0001$,表明该模型极显著,建立的回归模型准确;失拟项 F 值为 2.55, $P = 0.1906 > 0.05$,失拟项不显著,表明该模型能够预测试验结果的分析;该模型相关系数 $R^2 = 0.9828$ 和调整系数 $R^2_{Adj} = 0.9655$,说明模型能解释 97.78% 的响应值变化。因此,该模型可以分析和预

表2 响应面优化试验设计与结果

Table 2 Experimental design with experimental values of flavonoid yield for response surface analysis

序号	A	B	C	D	Y 总黄酮提取量 (mg/g)
1	0	1	1	0	20.32
2	0	0	1	1	17.95
3	-1	1	0	0	33.64
4	0	0	0	0	23.79
5	0	0	0	0	21.68
6	-1	-1	0	0	27.32
7	1	0	-1	0	7.20
8	-1	0	0	1	27.03
9	-1	0	1	0	26.31
10	0	0	0	0	22.51
11	0	-1	0	-1	25.72
12	0	1	-1	0	22.60
13	0	-1	0	1	18.57
14	0	0	-1	1	20.26
15	1	1	0	0	10.40
16	1	-1	0	0	15.63
17	0	0	0	0	22.36
18	-1	0	0	-1	27.38
19	-1	0	-1	0	31.62
20	1	0	1	0	12.69
21	0	-1	-1	0	21.29
22	0	0	1	-1	20.42
23	1	0	0	-1	13.26
24	0	0	0	0	23.31
25	0	0	-1	-1	21.48
26	1	0	0	1	6.12
27	0	-1	1	0	18.62
28	0	1	0	-1	20.03
29	0	1	0	1	23.88

测线叶旋覆花总黄酮的最佳提取工艺。

模型中因素一次项乙醇体积分数(A)、提取时间(D),二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 对线叶旋覆花总黄酮提取量有极显著的影响。交互项中的乙醇体积分数(A)和提取温度(B)、乙醇体积分数(A)和液料比(C)、提取温度(B)和提取时间(D)对线叶旋覆花总黄酮提取量影响极显著 ($P < 0.01$),交互项乙醇体积分数(A)和提取时间(D)有显著影响 ($P < 0.05$),其余项均不显著。根据 F 值的大小,各个因素对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响顺序依次为:乙醇体积分数(A) > 提取时间(D) > 液料比(C) > 提取温度(B)。

2.2.3 响应面优化 各因素交互作用对线叶旋覆花总黄酮提取量影响的响应面见图5~图8。图5~图8所呈现的响应曲面坡度陡峭,说明乙醇体积分数与提取温度、乙醇体积分数与液料比、乙醇体积分数与提取时间、提取温度与提取时间对线叶旋覆花总黄酮提取量的影响显著,这与响应面回归模型分析结果一致。

表3 响应面回归模型方差分析
Table 3 The response surface quadratic model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1153.08	14	82.36	57.04	<0.0001	**
A	972.33	1	972.33	673.35	<0.0001	**
B	1.15	1	1.15	0.8	0.387	
C	5.51	1	5.51	3.82	0.071	
D	17.47	1	17.47	12.1	0.0037	**
AB	33.35	1	33.35	23.09	0.0003	**
AC	29.17	1	29.17	20.2	0.0005	**
AD	11.55	1	11.55	8	0.0134	*
BC	0.037	1	0.037	0.026	0.8744	
BD	30.22	1	30.22	20.93	0.0004	**
CD	0.39	1	0.39	0.27	0.6102	
A ²	24.55	1	24.55	17	0.001	**
B ²	1.5	1	1.5	1.04	0.3252	
C ²	18.18	1	18.18	12.59	0.0032	**
D ²	14.74	1	14.74	10.21	0.0065	**
残差	20.22	14	1.44			
失拟项	17.47	10	1.75	2.55	0.1906	
纯误差	2.74	4	0.69			
总误差	1173.3	28				

$R^2 = 0.9828$ $R^2_{Adj} = 0.9655$

注: * 表示有显著差异 ($P < 0.05$); ** 表示有极显著差异 ($P < 0.01$)。

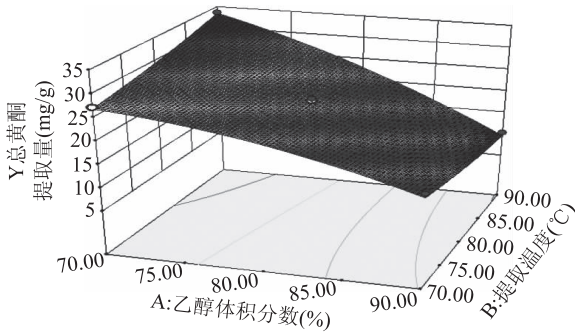


图5 乙醇体积分数与提取温度的响应曲线
Fig.5 RSM analysis for interactive effects of alcohol concentration and extraction temperature

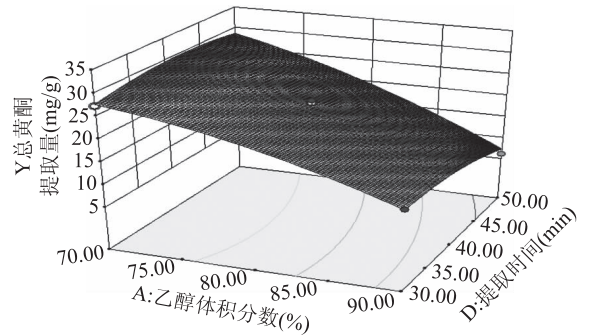


图7 乙醇体积分数与提取时间的响应曲线
Fig.7 RSM analysis for interactive effects of alcohol concentration and extraction time

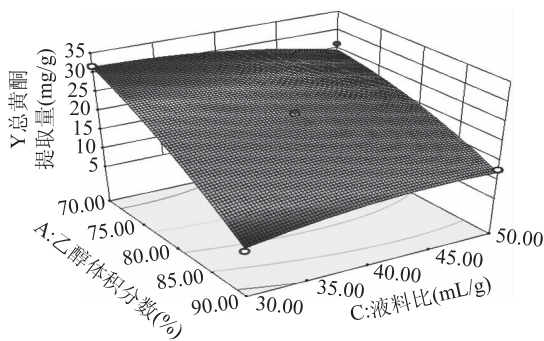


图6 乙醇体积分数与液料比的响应曲线
Fig.6 RSM analysis for interactive effects of alcohol concentration and liquid-to-solid ratio

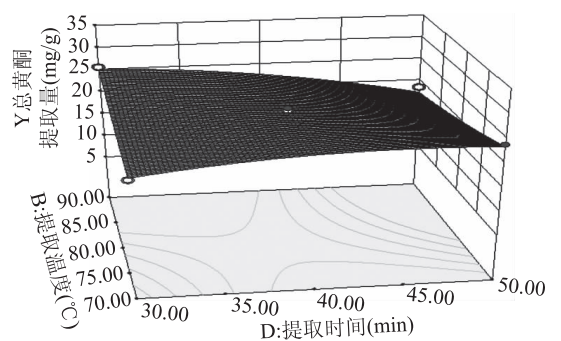


图8 提取温度与提取时间的响应曲线
Fig.8 RSM analysis for interactive effects of extraction temperature and extraction time

2.2.4 最优工艺及验证试验 由 Design-Expert 8.0.6 软件得出的最佳提取工艺为:乙醇体积分数 70.28% ,

提取温度 87.71 °C ,液料比 31.37: 1 (mL/g) ,提取时间 40.40 min ,此条件下线叶旋覆花总黄酮提取量最高,

预测值为 33.982 mg/g。为了验证此条件的有效性,并结合实验可操作性,将最佳提取工艺修正为:乙醇体积分数 70%、提取温度 87 °C、液料比 31:1 mL/g、提取时间 40 min,此条件下,重复 3 次试验,线叶旋覆花总黄酮提取量为 (33.62 ± 0.0207) mg/g,与预测值基本一致,说明该模型预测的线叶旋覆花总黄酮的提取工艺参数可靠可行。

2.3 抗氧化活性实验结果与分析

2.3.1 清除 DPPH· 的能力 如图 9 所示,当线叶旋覆花总黄酮质量浓度在 0.03~0.24 mg/mL 范围内,对 DPPH· 的清除率随着质量浓度的增加显著增大;当质量浓度超过 0.24 mg/mL,对 DPPH· 清除率趋于平缓。通过 SPSS 22.0 软件数据分析,线叶旋覆花总黄酮对 DPPH· 的半数清除率 IC_{50} 为 0.074 mg/mL, V_c 对 DPPH· 的半数清除率 IC_{50} 为 0.082 mg/mL,由此可见,线叶旋覆花总黄酮对 DPPH· 的清除能力高于 V_c ,表现出较强的抗氧化活性。

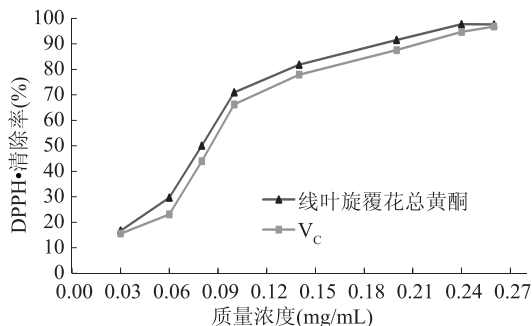


图 9 线叶旋覆花总黄酮和 V_c 的 DPPH· 清除能力

Fig.9 DPPH free radical scavenging capacity of total flavonoids from *Inula linearifolia* and V_c

2.3.2 线叶旋覆花总黄酮清除羟基自由基的能力 如图 10 所示,线叶旋覆花总黄酮的质量浓度在 0.5~4.5 mg/mL 范围内,对 OH· 的清除能力随着质量浓度的增加逐渐增强,当线叶旋覆花总黄酮质量浓度超过 4.5 mg/mL,对 OH· 的清除逐渐趋于平缓,基本保持在 57% 以上,其清除能力始终弱于 V_c ,但依然有着明显的清除羟基自由基的作用。这可能是由于 V_c 本身对羟自由基的清除能力较高,且线叶旋覆花最佳提取温度过高,其他杂质溶出过多,后期提取液分离纯化不彻底,最终导致黄酮类化合物与其他

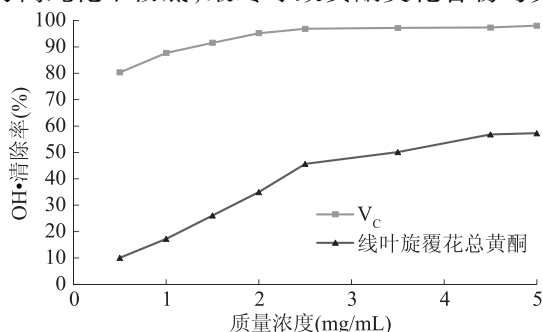


图 10 线叶旋覆花总黄酮和 V_c 的 OH· 清除能力

Fig.10 OH free radical scavenging capacity of total flavonoids from *Inula linearifolia* and V_c

物质之间的相互作用,致使线叶旋覆花总黄酮对羟自由基的清除能力弱于 V_c [17]。

3 结论

通过响应面法建立线叶旋覆花总黄酮提取工艺的回归方程,计算出最佳提取条件为:乙醇体积分数为 70%、提取温度为 87 °C、液料比为 31:1 mL/g、提取时间 40 min,此条件下,线叶旋覆花总黄酮提取量为 (33.62 ± 0.0207) mg/g,本研究可为线叶旋覆花总黄酮的有效提取提供可靠依据。体外抗氧化活性研究表明,线叶旋覆花总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力明显高于 V_c ,但是对羟基自由基的清除能力明显弱于 V_c 。线叶旋覆花具有一定的抗氧化活性,可以为线叶旋覆花总黄酮的生物活性物质的开发提供理论依据。下一步主要探讨线叶旋覆花总黄酮成分的组成,以及黄酮类化合物抗肿瘤方面的生物活性,进一步提高线叶旋覆花的附加值,产生更高的经济效益。

参考文献

- [1] 国家中药药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998.
- [2] 聂利月,金慧子,严岚,等. 线叶旋覆花的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(4):643-646.
- [3] Qin J J, Jin H Z, Huang Y, et al. Selective cytotoxicity, inhibition of cell cycle progression, and induction of apoptosis in human breast cancer cells by sesquiterpenoids from *Inula linearifolia* Turcz[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2013,68:473-481.
- [4] Nie L Y, Qin J J, Huang Y, et al. Sesquiterpenoids from *Inula linearifolia* inhibit nitric oxide production[J]. Journal of Natural Products, 2010,73(6):1117-1120.
- [5] Shashank K, Abhay K P. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview[J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013:1-16.
- [6] Takashi M, Atsushi K, Junichi K, et al. Pharmacokinetic study of bioactive flavonoids in the traditional Japanese medicine keigaiirenyoto exerting antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2):328-358.
- [7] Shang X C, Tan J N, Du Y M, et al. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities[J]. Molecules, 2018, 23(9):2110-2123.
- [8] 崔莹,付洪冰,冯航,等. 超声波法提取旋覆花总黄酮工艺的优化[J]. 保鲜与加工,2018,18(5):61-64,71.
- [9] 陈莉萍. 川木香与线叶旋覆花中倍半萜内酯二聚体的研究[D]. 上海:第二军医大学,2017.
- [10] Cai H, Xie Z Y, Liu G H, et al. Isolation, identification and activities of natural antioxidants from *Callicarpa kwangtungensis* Chun[J]. PLoS One, 2014, 9(3):1-14.
- [11] 许建本,苏秀芳,莫耀芳. 超声波辅助法提取假羊萎树叶总黄酮及其清除羟自由基能力研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23):199-202,209.

(下转第 162 页)

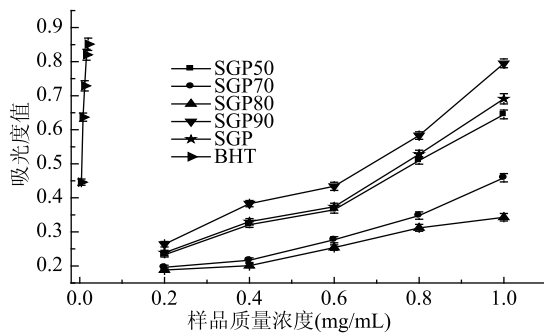


图7 山豆根多糖各组分和BHT的还原能力

Fig.7 Reducing power of SGP and SGP components and BHT

结果表明最佳提取工艺为:提取温度 83 ℃,提取时间 133 min,液料比 30:1 mL/g。在此基础上进行验证实验,实测多糖得率为 3.98% ± 0.15%,接近预测的得率(4.15%),说明该模型能较好地预测各因素与 SGP 得率之间的关系。体外抗氧化研究结果表明,山豆根多糖各组分均有一定的抗氧化能力,其中 SGP 90 的抗氧化活性最强,可作为下一步目标进行深入研究。造成 SGP 各醇沉组分抗氧化能力差异的原因可能是由不同体积分数乙醇沉淀得到的多糖分子量不同、极性不同、结构组成不同,还可能与提取物中含有其他活性成分有关,其确切原因尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam M M, et al. Oxidative stress and human health [J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3(7): 997-1019.
- [2] Farnad N, Heidari R, Aslanipour B. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*) [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2014, 8(2): 113-121.
- [3] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 苦参化学成分研究[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(5): 471-473.
- [4] 隆金桥, 林华, 羊晓东, 等. 广西山豆根化学成分的研究[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2011, 33(1): 72-76.
- [5] Yang R Y. Isoflavonoids from *Sophora tonkinensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 48(4): 674-676.
- [6] Yang R. A new isoflavanolignan glycoside from the roots of *Sophora tonkinensis* [J]. *Rec Nat Prod*, 2012, 6(3): 212-217.
- [7] 钟正贤, 张颖, 卢文杰, 等. 多叶越南槐和山豆根的药理作用比较[J]. *云南中医中药杂志*, 2012, 33(1): 58-60.
- [8] 胡庭俊, 苏丽娟, 帅学宏, 等. 山豆根提取物的制备与体外

抗菌及清除自由基作用的试验[J]. *广西畜牧兽医*, 2009, 25(3): 136-138.

[9] 周明眉, 杨红舟, 赵爱华, 等. 山豆根非生物碱部分对小鼠免疫功能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(12): 2954-2955.

[10] G Q X, Z H, W S, et al. Effects of matrine on HepG2 cell proliferation and expression of tumor relevant proteins *in vitro* [J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(3): 275.

[11] 肖正明, 宋景贵, 徐朝晖, 等. 山豆根水提物对体外培养人肝癌细胞增殖及代谢的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2000, 24(1): 62-64.

[12] 帅学宏, 胡庭俊, 曾芸, 等. 山豆根多糖对免疫抑制模型小鼠免疫器官指数和自由基相关酶活性的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(2): 170-172.

[13] 帅学宏, 苏子杰, 胡庭俊, 等. 山豆根多糖对鸡脾脏淋巴细胞信号转导相关分子水平的影响[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(1): 36-41.

[14] 胡庭俊, 程富胜, 陈昊然, 等. 山豆根多糖体外清除自由基作用的研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2004, 23(5): 6-7.

[15] 徐静珠, 吴彩娥, 应瑞峰, 等. 青钱柳叶多糖不同组分体外降血糖及抗氧化活性研究[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2017, 41(4): 6-12.

[16] 刘继攀, 李佳欢, 张紫华, 等. 分级醇沉对真姬菇多糖抗氧化活性的影响[J]. *食品科技*, 2017, 43(1): 201-214, 221.

[17] 郭文, 陶红, 于立梅, 等. 柚皮多糖提取分级及分子质量的分布[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(3): 233-237.

[18] 卫强, 江敦清, 纪小影, 等. 微波辅助提取垂丝海棠花中多糖及其抗氧化研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(3): 137-141, 150.

[19] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙朦, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 275-281.

[20] Qiu Z Y, Tang M L, Deng G J, et al. Antioxidant and antigenotoxic activities of ethanol extracts from *Rhus chinensis* Mill. leaves [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, 23(4): 1213-1221.

[21] 邢懿, 梁波, 汪璐, 等. 黄山杜鹃总黄酮的体外抗氧化活性研究[J]. *华西药学杂志*, 2013, 28(1): 53-55.

[22] 王金华, 杜超, 梁晨, 等. 贵长猕猴桃多糖提取工艺及体外抗氧化功能[J]. *食品科学*, 2016, 37(20): 19-23.

[23] 宋思圆, 苏平, 王丽娟, 等. 响应面法优化超声提取黄秋葵花果胶多糖工艺及其体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 283-289.

[24] 许远, 魏和平, 吴彦, 等. 响应面优化藜荷总黄酮提取及抗氧化研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(5): 233-239.

(上接第 156 页)

[12] 井文华, 骆立双, 刘永芳, 等. 超声提取红花总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(7): 1540-1543.

[13] 曾桥, 韦承伯, 韩国锋, 等. 桑叶砖茯茶总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J]. *食品科技*, 2018, 43(6): 221-230.

[14] 朱文学, 焦坤鹏, 罗磊, 等. 绿豆皮黄酮的超声波辅助水提工艺优化及抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2015, 36(16): 12-17.

[15] 王慧芳, 邵圣娟, 王曼, 等. 陈皮总黄酮提取及抑菌活性初探[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(8): 130-135.

[16] 林香信, 颜孙安, 姚清华, 等. 响应面法优化超声辅助提取黄秋葵花总黄酮的工艺研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(1): 19-27.

[17] 李会端, 江岸, 余建中. 生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化及提取液对羟自由基清除活性[J]. *北方园艺*, 2017(23): 155-164.