

响应面法优化相思藤黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性分析

龚受基, 覃 媚, 戴梓茹, 蒋红明, 郭德军

Optimization of Extraction Process by Response Surface Method and Analysis of Antioxidant Activity *in Vitro* of Total Flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

GONG Shouji, QIN Mei, DAI Ziru, JIANG Hongming, and GUO Dejun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040026>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

忍冬藤总黄酮超声辅助提取工艺及其体外抗氧化活性研究

Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activities *in vitro* of total flavonoids from *Caulis Lonicerae*

食品工业科技. 2017(02): 251-256 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.040>

响应面法优化结香花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Edgeworthia chrysantha* Lindl. by Response Surface Analysis and Its Antioxidant Activities *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(19): 192-197 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.030>

响应面法优化马鞭草中总黄酮闪式提取工艺及其体外抗氧化活性

Optimization of Flash Extraction Technology of Total Flavonoids from *Verbena officinalis* L. by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity *in Vivo*

食品工业科技. 2019, 40(3): 173-178,184 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.028>

白肉番石榴总黄酮提取工艺优化及体外抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process and *in Vitro* Antioxidant Activity Analysis of Total Flavonoids from White-flesh Guava(*Psidium guajava* L. cv. Pearl)

食品工业科技. 2019, 40(8): 196-201 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.033>

柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids and *in Vitro* Antioxidant Activity of Extract from Persimmon Leaves

食品工业科技. 2020, 41(13): 32-38,45 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.006>

佛手黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化活性

Optimization of Extraction Process of Flavonoids from *Bergamot* and Its Antioxidative Activity *in Vitro*

食品工业科技. 2018, 39(24): 192-197 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.24.033>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

龚受基,覃媚,戴梓茹,等. 响应面法优化相思藤黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 178–185.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040026

GONG Shouji, QIN Mei, DAI Ziru, et al. Optimization of Extraction Process by Response Surface Method and Analysis of Antioxidant Activity *in Vitro* of Total Flavonoids from *Abrus precatorius* Linn[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 178–185. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040026

· 工艺技术 ·

响应面法优化相思藤黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性分析

龚受基^{1,2,3},覃 媚^{1,2},戴梓茹^{1,2},蒋红明^{1,3},郭德军^{1,3,*}

(1.北部湾大学食品工程学院,广西钦州 535011;

2.广西高校北部湾海产品高值化利用与预制食品重点实验室,广西钦州 535011;

3.钦州市特色果蔬发酵重点实验室,广西钦州 535011)

摘 要:为优化相思藤黄酮的提取工艺,探讨其抗氧化活性,以乙醇浓度、料液比、超声能量、超声时间为影响因素,以黄酮得率为考核指标,采用单因素和 Box-Behnken 法优化相思藤黄酮提取工艺,并通过检测相思藤黄酮对 DPPH、ABTS⁺自由基的清除能力和对亚铁离子的还原力探讨其抗氧化能力。结果表明,在料液比 (W/V) 为 1:50 时,相思藤黄酮的最佳提取工艺为乙醇浓度 82%、超声能量 507 J、超声时间 42 min,此时相思藤黄酮得率为 0.696%。相思藤黄酮能有效清除 DPPH、ABTS⁺自由基,清除半数有效浓度 EC₅₀ 分别为 0.028、0.009 mg/mL,清除能力优于水溶性维生素 E (Trolox),且在一定浓度范围内清除能力随着质量浓度的增加而增强;相思藤黄酮浓度为 5 mg/mL 时对铁离子的还原力为 2.42 mmol/L,弱于 Trolox。综上,应用超声提取技术可有效提取相思藤黄酮,提取的黄酮具有良好的抗氧化活性。

关键词:相思藤,黄酮,提取工艺,抗氧化活性

中图分类号:TS201.1

文献标识码: B

文章编号:1002-0306(2024)06-0178-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040026



本文网刊:

Optimization of Extraction Process by Response Surface Method and Analysis of Antioxidant Activity *in Vitro* of Total Flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

GONG Shouji^{1,2,3}, QIN Mei^{1,2}, DAI Ziru^{1,2}, JIANG Hongming^{1,3}, GUO Dejun^{1,3,*}

(1.College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China;

2.Guangxi College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and

Prepared Food in Beibu Gulf, Qinzhou 535011, China;

3.Qinzhou Key Laboratory of Characteristic Fruits and Vegetables Fermentation, Qinzhou 535011, China)

Abstract: The objective of this study was to optimize the extraction process of flavonoids from *Abrus precatorius* Linn, and explored its antioxidant activity. Ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, ultrasonic energy and ultrasonic extracting time as variables, the yield of flavonoids as evaluation index, single factor tests and Box-Behnken method were used to optimize the extraction process. The scavenging ability on DPPH, ABTS⁺ free radicals, and the reducing power of flavonoids from *Abrus precatorius* Linn were also detected to estimate the antioxidant activities. Results showed that, when solid-liquid ratio reached 1:50, the optimum extraction process (0.696%, highest yield) could be achieved under condition of ethanol volume fraction 82%, ultrasonic energy 507 J and ultrasonic extracting time 42 min. Half effective concentration being EC₅₀

收稿日期: 2023-04-06

基金项目: 广西壮族自治区教育厅: 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (2022KY0425); 钦州市科技攻关 (202014820)。

作者简介: 龚受基 (1970-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品活性成份, E-mail: gong5895801@163.com。

* 通信作者: 郭德军 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与功效成份, E-mail: guodejun356@126.com。

0.028 and 0.009 mg/mL respectively. *Abrus precatorius* Linn flavonoids were able to scavenge DPPH and ABTS⁺ free radicals effectively, and its ability risen as mass concentration increases, meaning it is superior to Trolox. When flavonoid concentration was set at 5 mg/mL, the reducing power on iron ion reached 2.42 mmol/L, which was weaker than Trolox. To sum up, ultrasonic extraction technology can be effectively employed to the extraction of *Abrus precatorius* Linn flavonoids, resulting in better antioxidant activity.

Key words: *Abrus precatorius* Linn; flavonoids; extraction technology; antioxidant activity

相思藤, 中药大辞典记载其为豆科相思子属植物相思子(*Abrus precatorius* Linn.)^[1], 以根藤入药, 有清热解毒、消炎利尿、润肺护肝功效。相思藤主要分布于广西、广东、福建、云南和台湾等地山地疏林中^[2], 在广西钦州、南宁、玉林等地已有大规模人工种植并将枝叶开发为相思藤茶, 相思藤茶茶汤纯净金黄、清甜回甘、淡香清爽、风味独特, 深受消费者欢迎。文献报道从相思藤根茎叶果等分离得到 100 多个化学成分, 主要为黄酮、生物碱、甾体和三萜皂苷等^[3-5], 具有保护肝损伤^[6]、抗肿瘤^[7-8]、抗菌^[9]和降血糖^[10]等作用, 主要活性物质为黄酮类、脂溶成分和蛋白质等。相思藤能够成为消费者欢迎的类茶饮料, 与其清甜回甘特性有很大关系, 甜味成分来源于环烷型皂苷^[11], 与罗汉果甜苷具有类似苷元结构。陈红霞等^[6]认为相思藤总黄酮对 CCl₄、对乙酰氨基酚(AP)和 D-半乳糖胺(D-GalN)所致小鼠急性化学性肝损伤有保护作用, 显著降低 ALT、AST 活性, 抑制 MDA 的生成, 明显提高肝组织 GSH 水平和 GSH-PX 活性($P<0.05$), 作用机制可能与清除自由基、抑制脂质过氧化有关。其他研究发现相思藤叶、果实、果实壳成分都具有较好的抗氧化效果^[12-13]。自由基在调节宿主防御、衰老和凋亡等生理过程发挥重要作用, 在疾病的发生和发展中扮演重要角色^[14], 而目前相思藤抗氧化物质基础和机制并不清楚。黄酮类物质具有多种生理活性, 可以通过乙醇浸泡, 超声波、微波、高压脉冲电场辅助方法提取, 也可以通过超临界流体萃取。微波、高压脉冲电场辅助和超临界流体萃取因设备要求高、价格贵导致目前应用难以普及, 超声波辅助提取法因操作方便、设备简单、可在室温进行等优点得到广泛应用^[15]。本文探索超声波辅助乙醇提取相思藤黄酮的工艺及其体外抗氧化作用, 期望能够为相思藤的深入开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

相思藤(*Abrus precatorius* Linn.) 购自广西钦州市城东市场; 2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、2,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、芦丁标准品 上海如吉生物科技发展有限公司; 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox) 上海西宝生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯试剂。

VC505 超声波破碎仪 美国 SONICS 公司产品; EVOLUTION 201 紫外分光光度计 美国 Thermo 公司产品; EU-C 4002 RS D 型高精度电子分析天平 德国 GIBERTINI 公司产品; DZF-6030A 真空干燥箱 上海龙跃仪器设备有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 相思藤黄酮提取及纯化 将相思藤和 500 mL 石油醚置于索氏回流装置中, 进行回流萃取叶绿素 2 h 后晾干。分别称取 1.0 g 去除叶绿素样品, 在不同乙醇浓度、料液比、超声能量和超声时间等条件下进行黄酮提取工艺研究。

取去除叶绿素的相思藤粉碎, 按上述单因素研究所确定的最优工艺进行总黄酮提取, 以旋转蒸发仪浓缩除去乙醇至粘稠状, 加入 10 倍量水稀释浓缩液并抽滤除去不溶物。处理好的 D-101 大孔吸附树脂填充于 1.5 cm×34 cm 层析柱并平衡, 将过滤液以 4 mL/min 速度上样, 上样体积 50 mL, 先以 9 倍量柱体积水洗脱除杂, 用 70% 乙醇以 1 mL/min 速度洗脱, 收集 12 倍量柱体积乙醇洗脱液, 浓缩、冷冻干燥得粗黄酮^[16], 检测得粗黄酮中总黄酮含量为 65.86%。

1.2.2 芦丁标准曲线的绘制及样品黄酮得率测定 参照夏雨弘等^[17]方法并加以改进, 分别量取浓度为 2.0 mg/mL 的芦丁标准溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 于 10 mL 刻度管中, 加入 5% 的 NaNO₂ 溶液 0.3 mL, 静置 6 min, 然后加入 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL, 静置 6 min, 再加入 4% NaOH 溶液 4.0 mL, 静置 15 min, 最后加入 50% 乙醇定容至 10 mL, 暗处静置 30 min, 于波长 510 nm 处测定吸光值, 以芦丁浓度为横坐标、吸光值为纵坐标绘制芦丁浓度-吸光度标准曲线。吸光度与浓度的回归方程为 $y=0.0011x-0.0067$, $R^2=0.9991$, 芦丁对照品浓度范围为 0~400 μg/mL 时, 吸光度和浓度呈现比较好的线性关系。

黄酮提取液进行抽滤, 滤液定容至 60 mL, 分别吸取各样品 1.0 mL, 按照上述操作测量样品吸光度, 计算样液中总黄酮含量和得率^[18]。

$$\text{黄酮得率}(\%) = \frac{\text{提取液中总黄酮质量}}{\text{相思藤质量}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 单因素实验条件

1.2.3.1 乙醇浓度对相思藤黄酮得率的影响 准确称取相思藤样品 1.0 g, 固定超声时间 40 min、料液比(W/V)1:30 和超声能量 450 J, 乙醇浓度分别选

用 50%、60%、70%、80%、90% 等 5 个水平提取相思藤黄酮, 计算黄酮得率。

1.2.3.2 料液比对相思藤黄酮得率的影响 准确称取相思藤样品 1.0 g, 固定超声能量 450 J、乙醇浓度 80%、超声时间 40 min, 料液比 (W/V) 分别选用 1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 等 5 个水平提取相思藤黄酮, 计算黄酮得率。

1.2.3.3 超声时间对相思藤黄酮得率的影响 准确称取相思藤样品 1.0 g, 固定超声能量 450 J、乙醇浓度 80% 和料液比 (W/V) 1:50, 超声时间分别选用 20、30、40、50、60 min 等 5 个水平提取相思藤黄酮, 计算黄酮得率。

1.2.3.4 超声能量对相思藤黄酮得率的影响 准确称取相思藤样品 1.0 g, 固定超声时间 40 min、乙醇浓度 80% 和料液比 (W/V) 1:50, 超声能量分别选用 350、400、450、500、550 J 这 5 个水平提取相思藤黄酮, 计算黄酮得率。

1.2.4 响应面试验设计 以黄酮得率为考察指标, 对黄酮得率最高水平与相邻水平进行组间比较, 根据影响显著性设计三因素三水平的响应面试验(表 1)。

表 1 响应面试验设计因素与水平
Table 1 Design factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A: 乙醇浓度(%)	B: 超声时间(min)	C: 超声能量(J)
-1	70	30	450
0	80	40	500
1	90	50	550

1.2.5 抗氧化能力的测定

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力测定 用无水乙醇配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 的黄酮溶液及 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18 mg/mL 的 Trolox 标准液, 各取 5 mL 置于刻度管中, 配制浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液, 向黄酮样品和 Trolox 刻度管中加入现配的 DPPH 溶液 5.0 mL, 将刻度管置于暗处反应 30 min 后, 在 517 nm 处测定吸光值, 计算黄酮和 Trolox 对 DPPH 自由基的清除率、 EC_{50} ^[19]。

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

式中 C—DPPH 自由基清除率, A_1 —空白溶液的吸光度, A_2 —样品溶液的吸光度。

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除能力测定 吸取 7.4 mmol/L 的 ABTS 原液 25.0 mL 与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液 25.0 mL 混合, 在暗处反应 16 h。吸取浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的黄酮溶液各 1 mL, 加入配置好的 ABTS⁺工作液 5.0 mL, 混匀后静置 5 min, 在 734 nm 处测其吸光度, 用无水乙醇作为空白对照, 采用相同方法吸取 0.005、0.010、0.015、0.020、0.025、0.030 mg/mL 的

Trolox 标准液进行反应测定。计算黄酮和 Trolox 对 ABTS⁺自由基的清除率、 EC_{50} ^[17]。

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

式中, A_1 为空白溶液的吸光度, A_2 为样品溶液的吸光度。

1.2.5.3 FRAP 的测定 分别吸取浓度为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/mL 的黄酮溶液 60 μ L 于刻度管中, 在每个刻度管中加入 5 mL 的 FRAP 试剂, 混和均匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 在 595 nm 处测其吸光度, 以 Trolox 为对照进行对比分析^[20]。

1.3 数据处理

单因素实验和抗氧化实验数据采用 Origin 9.1 进行整理和绘图; 响应面试验数据利用 Design-Expert 10 软件中的 Box-Behnken 进行回归模型方程的建立及方差分析, 实验均重复三次; 使用 SPSS 20.0 软件进行组间方差分析及显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素对相思藤黄酮得率的影响

2.1.1 乙醇浓度对相思藤黄酮得率的影响 在固定的工艺组合条件下, 改变乙醇浓度, 考察乙醇浓度对相思藤黄酮提取率的影响。当乙醇浓度在 50% 至 80% 时, 随着乙醇浓度增加, 相思藤黄酮得率慢慢增加。当乙醇浓度达到 80% 时, 相思藤黄酮得率接近最高值。乙醇浓度超过 80%, 相思藤黄酮得率减小, 80% 乙醇提取率与 70%、90% 比较具有显著性差异 ($P < 0.001$), 如图 1A 所示。不同材料使用乙醇提取时, 获得最高提取率的乙醇浓度存在差异, 小二仙草在 75% 时提取率最高^[17], 黄花菜于 90%~95% 乙醇浓度时提取率最高^[13], 野葛在 50% 的乙醇中提取率最高^[11], 而本实验用 80% 乙醇提取相思藤黄酮得率最高, 造成这些差异的原因尚不清楚, 猜测可能与材料结构细胞致密度相关。本实验根据单因素结果对 70%~90% 的乙醇进行超声提取相思藤黄酮响应面研究。

2.1.2 料液比对相思藤黄酮得率的影响 改变料液比考察其对提取相思藤黄酮得率的影响, 当料液比 (W/V) 在 1:20 至 1:40 时, 随着料液比改变, 相思藤黄酮得率快速增加。当料液比 (W/V) 超过 1:40 时候, 相思藤黄酮得率趋于平衡, 见图 1B, 有学者认为当料液比达到一定值后, 黄酮能充分溶出, 其他成分溶出相对较少, 提取液比例增加后, 杂质溶出增加, 与黄酮结合沉淀, 黄酮得率反而降低^[21]。本试验中得率最高水平与相邻水平 1:40、1:50、1:60 三个水平实验中, 最高值和最低值相差 2.0%, 没有显著性差异。野葛在 1:15~1:20 的料液比区间提取黄酮得率最高^[11], 小二仙草在 1:40 时得率最高^[17]。本实验中 1:40~1:60 的料液比对相思藤黄酮得率的影响差别

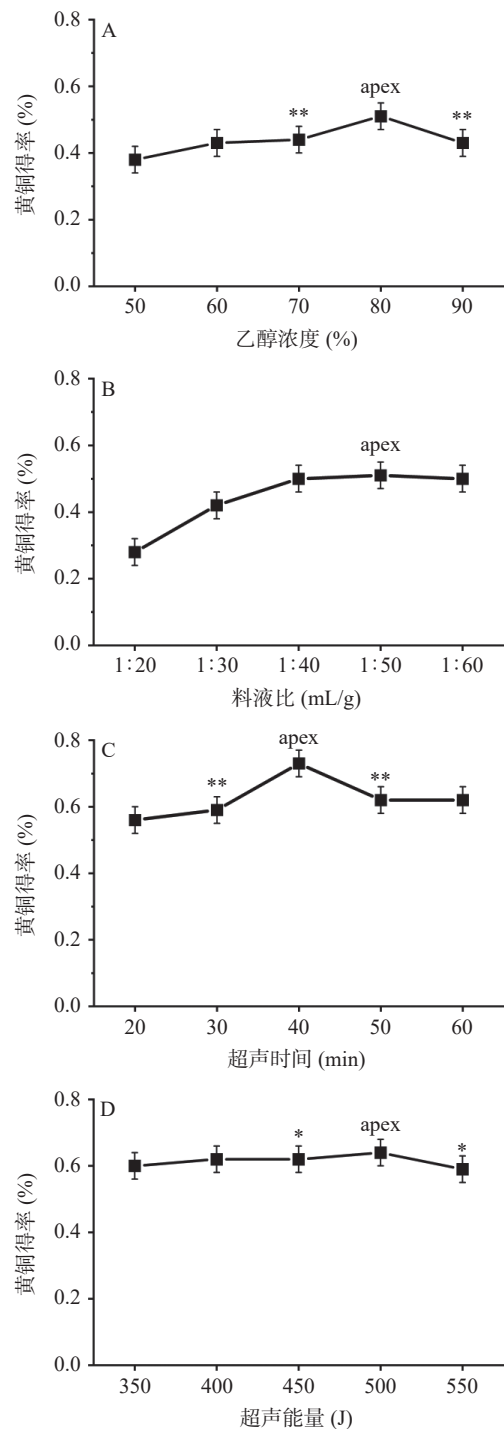


图1 乙醇浓度、料液比、超声时间和超声能量对黄酮得率的影响

Fig.1 Effects of ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, ultrasonic extracting time and ultrasonic energy on the extraction rate of flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

注: 与黄酮得率最高水平比较, * $P<0.05$, ** $P<0.001$; A: 乙醇浓度对黄酮得率的影响; B: 料液比对黄酮得率的影响; C: 超声时间对黄酮得率的影响; D: 超声能量对黄酮得率的影响; apex 代表最高值。

不大,所以在响应面试验中直接选用料液比(W/V)为 1:50 进行后续研究。

2.1.3 超声时间对相思藤黄酮得率的影响 超声时间在 40 min 时相思藤黄酮得率最高,在 20~40 min 时,相思藤黄酮得率随超声时间增加而增加。在

40~60 min 时,相思藤黄酮得率随超声时间增加而减少,如图 1C 所示。超声外场的引入,使细胞壁更易出现裂缝,更易破碎,提高孔隙率,增大溶剂与固体基质的接触面积,并且随着超声处理时间的延长,细胞破壁受损情况也更加明显,从而有效成分的溶解也就更加完全,提取效率更高^[22]。但黄酮能通过氢键、疏水吸引和其他相互作用与蛋白质结合,超声使蛋白分子结构发生改变,疏水基团外露^[23-24],增加两者结合^[25],反而导致黄酮得率下降。所以超声时间确定为 30、40、50 min,进行响应面优化试验研究。

2.1.4 超声能量对相思藤黄酮得率的影响 黄酮得率不但与超声时间相关,而且也与超声能量相关。当超声能量小不足以破坏细胞壁时,细胞内有效成分仅通过细胞壁及细胞膜依靠浓度差进行渗透释放,当超声能量足够大,除了加速细胞壁裂缝产生和发展,而且促使细胞膨胀至破裂,细胞内成分直接暴露进入溶剂中,大大提高溶出率及溶出速率^[22]。本研究中超声能量在 350~500 J 时,随超声能量增加相思藤黄酮得率增加,在 500 J 时相思藤黄酮得率趋向最大值。超声能量超过 500 J,相思藤黄酮得率减小,如图 1D 所示。故选用超声能量为 450、500、550 J 作为研究相思藤黄酮超声提取的响应面分析比较合适。

在各单因素研究中,黄酮得率分别出现了最大值,与得率最大值水平比较,70% 和 90% 乙醇浓度的黄酮得率、30 和 50 min 的黄酮得率有显著性差异($P<0.001$),450 和 550 J 的黄酮得率有显著性差异($P<0.05$),而 1:40 和 1:60 料液比的黄酮得率与 1:50 水平比较没有显著差异($P>0.05$)。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 响应面试验设计与结果 单因素的实验结果比较分析表明,对相思藤黄酮得率影响显著的因素是乙醇浓度、超声时间、超声能量,以上三个因素为

表 2 响应面分析方案及结果

Table 2 Design and results of response surface experimental				
实验号	A: 乙醇浓度 (%)	B: 超声时间 (min)	C: 超声能量 (J)	黄酮得率 (%)
1	1	0	1	0.61
2	0	0	0	0.69
3	-1	0	-1	0.55
4	0	0	0	0.69
5	-1	-1	0	0.56
6	1	0	-1	0.62
7	0	1	1	0.66
8	0	-1	-1	0.59
9	-1	1	0	0.61
10	0	0	0	0.68
11	-1	0	1	0.59
12	0	0	0	0.70
13	0	0	0	0.70
14	0	1	-1	0.60
15	1	1	0	0.64
16	-1	-1	1	0.62
17	-1	-1	0	0.64

自变量, 相思藤黄酮得率为响应值, 采用 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件的 Box-Behnken 模型设计三水平三因素的响应面分析试验, 响应面分析方案及结果如表 2 所示。

对黄酮得率的结果进行拟合, 得到相思藤黄酮得率对乙醇浓度(A)、超声时间(B)和超声能量(C)的二次多项式回归方程模型:

$$Y=0.49+0.025A+0.012B+0.015C-0.012AB-0.013AC+0.0075BC-0.052A^2-0.027B^2-0.047C^2$$

对回归模型进行方差分析, 模型的 F 值为 36.02, $P<0.0001$, 故该模型极显著, 即对相思藤黄酮得率的影响较为显著, 具有统计学意义。失拟误差的 $P=0.2104>0.05$, 可以看出该模型与实际试验拟合良好, 误差小, 模型的 $R^2=0.9789$, $R^2_{Adj}=0.9517$, 说明该模型可以解释 97.89% 的黄酮得率变化, 大概有 2.1% 的变化不能得到合理解释, 表明预测结果与实际结果的一致性较好。由表计算各因素的 P 值, $P_A=0.0003$, $P_B=0.0123$, $P_C=0.0051$ 。 P 值越小, 影响越明显, 所以各因素对相思藤黄酮得率的影响程度为乙醇浓度(A)>超声能量(C)>超声时间(B)。乙醇浓度的二次项和超声能量的二次项的 P 值都小于 0.0001, 达到了极显著水平。乙醇浓度与超声时间、乙醇浓度与超声能量的交互作用的 P_{AB} 、 P_{AC} 均小于 0.05, 交互作用显著, 超声时间与超声能量交互作用 $P_{BC}=0.1983$, 大于 0.05, 交互作用不显著, 见表 3。

表 3 响应面试验的方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression simulation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.036	9	0.004014	36.02	<0.0001
A	0.005	1	0.005	44.87	0.0003
B	0.00125	1	0.00125	11.22	0.0123
C	0.0018	1	0.0018	16.15	0.0051
AB	0.000625	1	0.000625	5.61	0.0497
AC	0.000625	1	0.000625	5.61	0.0497
BC	0.000225	1	0.000225	2.02	0.1983
A ²	0.011	1	0.011	103.16	<0.0001
B ²	0.003127	1	0.003127	28.06	0.0011
C ²	0.0094	1	0.0094	84.36	<0.0001
残差	0.00078	7	0.0001114	—	—
失拟误差	0.0005	3	0.0001667	2.38	0.2104
纯误差	0.00028	4	0.00007	—	—
总和	0.037	16	—	—	—

2.2.2 各因素间交互作用的响应面分析 利用 Design-Expert 8.0.6 Trial 自身所带软件对各因素之间的交互作用做响应面分析, 得到响应面曲线如图 2。观察响应面坡度, 如果响应面的坡度是陡峭的, 说明两个因素交互作用对相思藤黄酮得率的影响显著, 坡度平缓, 则影响非显著。坡度最陡的是乙醇浓度和超声能量响应面图 2B, 乙醇浓度和超声时间的响应面坡度比较陡如图 2A, 超声时间和超声能量响应面的坡度较平缓图 2C, 说明乙醇浓度和超声时

间、乙醇浓度和超声能量交互作用对相思藤黄酮提取的影响显著, 而超声时间和超声能量交互作用对相思藤黄酮提取的影响不显著, 这与方差分析结果一致。

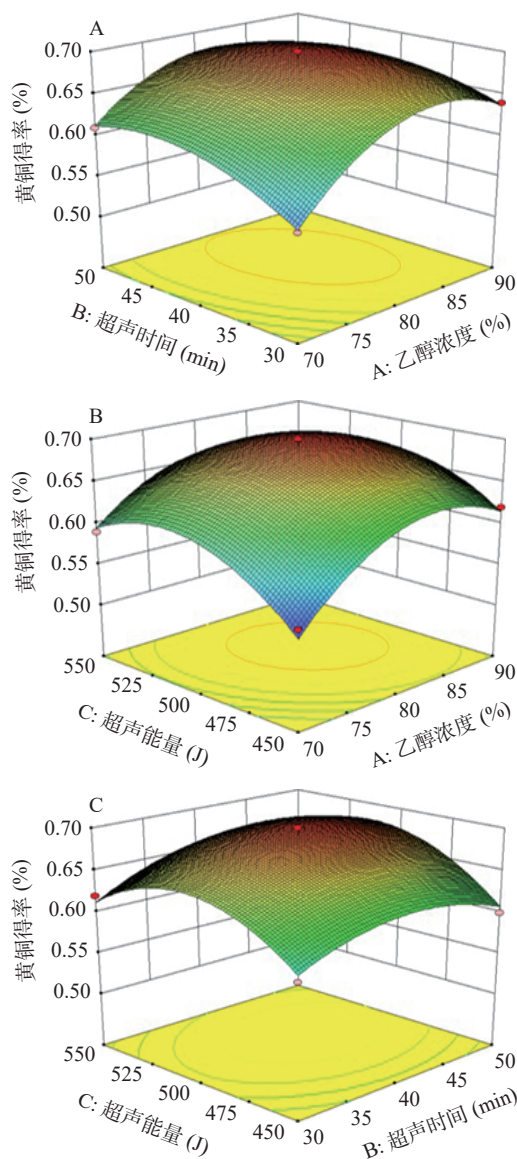


图 2 乙醇浓度、超声时间和超声能量交互作用对黄酮得率的影响

Fig.2 Interactive effects of ethanol volume fraction, ultrasonic extracting time and ultrasonic energy on the extraction rate of flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

2.2.3 验证试验 为了确定各因素的最优值, 采用 Design-Expert 8.0.6 Trial 软件中的 Optimization 的 Numerical 功能, 在模型因素的取值范围内, 选取最大的响应值。提取相思藤黄酮得率最优条件为: 乙醇浓度为 82.0%, 超声时间为 42.1 min, 超声能量为 507.4 J, 此时黄酮得率为 0.70%。根据实际的操作条件, 将最优条件参数进行修正, 选择提取相思藤黄酮得率最优的条件为: 乙醇浓度为 82%, 超声时间为 42 min, 超声能量为 507 J。为了验证响应面法优化结果的可靠性, 选用修正的最优提取条件, 进行三次验证试验, 黄酮得率的平均值为 0.696%, 相对标准偏

差为 0.605%, 说明试验值与理论值没有显著差别。

2.3 相思藤黄酮的抗氧化能力

随着相思藤黄酮和 Trolox 浓度增加, FRAP 值增加, 亚铁离子还原能力与黄酮、Trolox 含量呈现良好的线性关系。相思藤黄酮浓度为 0.5 mg/mL 时对铁离子的还原力为 2.42 mmol/L, Trolox 浓度为 0.5 mg/mL 时对铁离子的还原力为 2.76 mmol/L, Trolox 在较低浓度时的 FRAP 响应值和较高浓度的相思藤黄酮的 FRAP 值相当, 见图 3。可见相思藤黄酮的铁离子还原能力要弱于 Trolox, 但与苦笋黄酮还原能力相当^[26], 优于化橘红^[27], 远优于黄花菜、百香果皮和牛大力^[28-30], 综合来看相思藤黄酮对亚铁离子的还原能力较好。

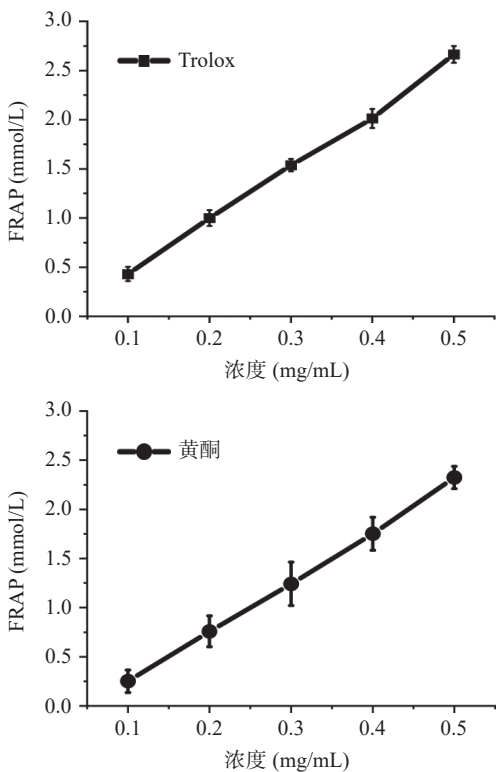


图 3 相思藤黄酮对铁离子的还原能力

Fig.3 Reducing activity to iron ions of flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

相思藤黄酮具有较好的清除 DPPH 自由基能力, 浓度在 0.1~0.5 mg/mL 范围内与 DPPH 自由基清除率有良好的线性关系, 清除 DPPH 自由基 EC₅₀ 为 0.028 mg/mL, 见表 4。Trolox 是水溶性维生素 E, 具有强效抗氧化作用, 常用作食品、饮料和补充剂的

表 4 Trolox 和相思藤黄酮抗氧化能力

Table 4 Antioxidant activity of Trolox and flavonoids from *Abrus precatorius* Linn

项目	对DPPH·的清除能力	对ABTS·的清除能力
Trolox	线性方程 y=465.9x+5.9827	y=3219.1x-0.5633
	EC ₅₀ (mg/mL) 0.094	0.015
黄酮	线性方程 y=103.52x-2.24	y=330.2x+2.426
	EC ₅₀ (mg/mL) 0.028	0.009

抗氧化能力阳性对照, 其 EC₅₀ 值 0.094 mg/mL。相思藤黄酮的 EC₅₀ 小于 Trolox, 清除 DPPH 自由基能力优于 Trolox。相思藤黄酮清除 DPPH EC₅₀ 值与小二仙草相当^[17], 清除 DPPH 自由基能力优于陈艾和野葛总黄酮^[31-32], 远优于山茱萸、黄花菜、百香果皮、黄晶果果皮和罗汉参皮等黄酮^[28-29,33-35], 但比三叶木通黄酮效果差^[36]。

相思藤黄酮在 0.05~0.25 mg/mL 范围内与 ABTS⁺ 自由基清除率有良好的线性关系, 具有优秀的清除 ABTS⁺ 自由基能力, 半数清除有效浓度 EC₅₀ 为 0.009 mg/mL, 而 Trolox 对 ABTS⁺ 的 EC₅₀ 为 0.015 mg/mL, 见表 4, 显然相思茶黄酮对 ABTS⁺ 的清除效果明显优于 Trolox。与其他植物类黄酮相比, 相思藤黄酮清除 ABTS⁺ 自由基能力优于新疆圆柏^[37], 远优于罗汉参皮、黄晶果果皮、黄花菜和百香果皮^[28-29,33-34] 等黄酮, 与牛大力^[30] 黄酮能力相当。

相思藤果油 (EC 分别为 DPPH 5.03 mg/mL、ABTS⁺ 2.95 mg/mL) 和果壳油 (EC 分别为 DPPH 3.03 mg/mL、ABTS⁺ 3.07 mg/mL)^[13] 有一定的清除自由基效果, 但比相思藤黄酮差。总体上相思藤黄酮具有较好的抗氧化能力。

3 结论

相思藤中总黄酮含量较高, 利用响应面设计法优化相思藤黄酮提取条件切实可行, 在乙醇浓度 82%, 超声时间 42 min, 超声能量为 507 J, 黄酮得率为 0.696%。

以 Trolox 作为抗氧化研究对照, 体外测定 Trolox 和相思藤黄酮清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 分别为 0.094、0.028 mg/mL, 清除 ABTS⁺ 自由基的 EC₅₀ 分别为 0.015、0.009 mg/mL; 相思藤黄酮浓度为 5 mg/mL 时对铁离子的还原力为 2.42 mmol/L, 弱于 Trolox。本研究证实相思藤黄酮具有较好的清除自由基能力和还原能力, 是潜在的植物源抗氧化剂, 研究结果为相思藤黄酮的开发利用提供了理论依据。

参考文献

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第2版上, 上海: 上海科学技术出版社, 2014. [Nanjing University of Chinese Medicine. The Dictionary of Chinese Herbal Medicine[M]. Second Edition, Volume 1, Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2014.]

[2] 张春花, 郭宏伟, 黄仁彬, 等. 相思藤生药学研究[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1639-1643. [ZHANG C H, GUO H W, HUANG R B, et al. Pharmacognosy study on *Abrus precatorius* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(7): 1639-1643.]

[3] 薛显妹, 梁智科, 何翠敏, 等. 基于一测多评法测定相思子叶总黄酮部位中 5 种成分含量[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(2): 249-255. [XUE X M, LIANG Z K, HE C M, et al. Simultaneous determination of 5 components in total flavonoids fraction of *Abrus precatorious* leaves based on quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2023, 34(2): 249-255.]

[4] 李良波, 温秀萍, 何翊, 等. 相思子化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1371-1373. [LI L B, WEN X Q,

- HE Y, et al. Chemical constituents of *Abrus precatorius* L.[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(10): 1371–1373.]
- [5] 李春阳, 张平, 袁旭江. 相思子叶化学成分研究[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(1): 24–27. [LI C Y, ZHANG P, YUAN X J. Study on chemical constituents from the leaves of *Abrus precatorius* L.[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2014, 30(1): 24–27.]
- [6] 陈红霞, 吴咖, 黄仁彬, 等. 相思藤总黄酮对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用及机制[J]. 广西医学, 2012, 34(2): 138–140. [CHEN H X, WU K, HUANG R B, et al. Protective effect and mechanism of xiangsiteng flavonoid against acute chemical liver injuries in mice[J]. Guangxi Medical Journal, 2012, 34(2): 138–140.]
- [7] SHAFI S M, SATEESH M K, BASHIR M, et al. Cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Abrus precatorius* L. on human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB-231[J]. Cytotechnology, 2013, 65(3): 407–417.
- [8] SOFI M S, SATEESH M K, BASHIR M, et al. Chemopreventive and anti-breast cancer activity of compounds isolated from leaves of *Abrus precatorius* L.[J]. 3 Biotech, 2018, 8(8): 371.
- [9] ROY S, ACHARYA R, MANDAL N C, et al. A comparative antibacterial evaluation of raw and processed Guñjā (*Abrus precatorius* Linn.) seeds[J]. Ancient Science of Life, 2012, 32(1): 20–23.
- [10] ALEX B, DESMOND O A, ERIC O G, et al. Glucose lowering and pancreato-protective effects of *Abrus Precatorius* (L.) leaf extract in normoglycemic and STZ/Nicotinamide-Induced diabetic rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 258: 112918.
- [11] STAVRIANIDI A, STEKOLSHCHIKOVA E, RODIN I, et al. Structure elucidation of sweet-tasting cycloartane-type saponins from ginseng oolong tea and *Abrus precatorius* L. leaves[J]. Natural Product Research, 2017, 32(20): 2490–2493.
- [12] Z G M, FARHAN A, K K A, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of *Abrus precatorius* leaf extracts-an *in vitro* study[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, 13(1): 53.
- [13] SUNDAY O O, OLAYINKA T A, OLUWOLE B F, et al. Antioxidant and free radical scavenging capacity of seed and shell essential oils extracted from *Abrus precatorius* (L.) [J]. Antioxidants, 2014, 3(2): 278–287.
- [14] PHILIP, NEWSHOLME, VINICIUS, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes[J]. Biochemical Journal, 2016, 473: 4527–4550.
- [15] 李路亚, 冯雪, 李圣豪, 等. 药食同源中黄酮类化合物提取工艺的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2023, 29(7): 33–36. [LI L Y, FENG X, LI S H, et al. Research progress on extraction technology of flavonoids from medicine and food homology[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2023, 29(7): 33–36.]
- [16] 孙开芬, 陈胤睿, 徐文芬, 等. 大孔吸附树脂分离纯化红禾麻总黄酮工艺的优化[J]. 中成药, 2022, 44(8): 2619–2623. [SUN K F, CHEN Y R, XU W F, et al. Optimization of the separation and purification process of total flavonoids from red hemp with macroporous adsorption resin[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(8): 2619–2623.]
- [17] 夏雨弘, 刘颖, 周茗, 等. 小二仙草总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2023: 1–14. [XIA Y H, LIU Y, ZHOU M, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of total flavonoids from *Haloragis micrantha* (Thunb.) R. Brown[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023: 1–14.]
- [18] 罗蓉, 蔡旭, 薛宏坤, 等. 响应面法优化超声辅助低共熔溶剂提取山楂总黄酮工艺[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 229–237. [LUO R, CAI X, XUE H K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids from *Crataegus pinnatifida* using response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 229–237.]
- [19] 张志毅, 白若熙, 宗爱珍, 等. 菊芋中抗氧化成分的在线鉴定和构效关系分析[J]. 食品工业科技, 2023: 1–14[2024-01-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080031>. [ZHANG Z Y, BAI R X, ZONG A Z, et al. Online identification and constitutive relationship analysis of antioxidant components in *Jerusalem artichoke* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023: 1–14[2024-01-22]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022080031>.]
- [20] 陈智玲, 马剑, 文博, 等. 超高压提取蓝莓渣花色苷的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 185–194. [CHEN Z L, MA J, WEN B, et al. Optimization of ultra-high pressure extraction and the antioxidant activity of anthocyanins from blueberry pomace[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 185–194.]
- [21] 秦晶晶, 钱慧琴, 赵媛, 等. 柿叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(13): 32–38. [QIN J J, QIAN H Q, ZHAO Y, et al. Optimization of the extraction technology of total flavonoids and *in vitro* antioxidant activity of extract from persimmon leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(13): 32–38.]
- [22] 欧阳娜娜. 银杏黄酮提取的外场强化机理及分离方法对抗氧化活性影响的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2008. [OUYANG N N. Mechanism of outfields enhancing extraction flavonoids from *Ginkgo Biloba* and the effect of separation methods on antioxidant activity[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2008.]
- [23] 戴泽川, 毛相朝, 郝亚楠, 等. 高强度超声对凡纳滨对虾蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(19): 80–87. [DAI Z C, MAO X Z, HAO Y N, et al. Effect of high intensity ultrasound on structural and functional properties of proteins in *Litopenaeus vannamei*[J]. Food Science, 2022, 43(19): 80–87.]
- [24] 李根, 任国艳, 李倩, 等. 超声辅助提取鲢皮胶原蛋白工艺优化及结构特征分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 160–168. [LI G, REN G Y, LI Q, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction and structural characteristics analysis of collagen from chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 160–168.]
- [25] CHEN D, ZHU X, ILAVSKY J, et al. Polyphenols weaken pea protein gel by formation of large aggregates with diminished non-covalent interactions[J]. Biomacromolecules, 2021, 22(2): 1001–1014.
- [26] 晏俊玲, 樊扬, 秦川, 等. 苦笋总黄酮提取工艺优化及其体外抗炎抗氧化活性研究[J]. 四川农业大学学报, 2022, 40(2): 276–285. [YAN J L, FAN Y, QIN C, et al. Optimization of the extraction process of total flavonoids from the shoots of *Pleioblastus amarus* and evaluation of its anti-inflammatory and antioxidant activities *in vitro*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2022, 40(2): 276–285.]
- [27] 陈亦璐, 徐梦兰, 邓健善, 等. 化橘红黄酮的高压脉冲电场提取及抗氧化活性检测[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(3): 305–311. [CHEN Y L, XU M L, DENG J S, et al. Pulsed electric field extraction of flavonoids from *Exocarpium Citri grandis* and its antioxidant activity detection[J]. Journal of Hu-

nan Agricultural University (Natural Sciences), 2021, 47(3): 305–311.]

[28] 米智, 刘荔贞, 李慧. 响应面法优化黄花菜黄酮提取工艺及抗氧化活性的研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(7): 53–57. [MI Z, LIU L Z, LI H. Optimization of extraction process of flavonoids from *Hemerocallis citrina* baroni by response surface methodology and study on antioxidant activity[J]. China Condiment, 2022, 47(7): 53–57.]

[29] 景继月, 许梦圆, 田永涛, 等. 百香果皮总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(7): 43–48. [JING J Y, XU M Y, TIAN Y T, et al. Optimization of extraction technology of total flavonoids from *Passiflora edulis* sims peel and study on the antioxidant activity[J]. China Condiment, 2022, 47(7): 43–48.]

[30] 王立抗, 陈鸿庚, 黄智霖, 等. 牛大力不同部位总黄酮、多酚含量及其抗氧化活性研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 139–142. [WANG L K, CHEN H G, HUANG Z L, et al. Antioxidant activities and contents of total flavonoids and polyphenols from different parts of niudali (*Millettia speciosa* Champ)[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese, 2022, 40(3): 139–142.]

[31] 朱静, 杨玲玲, 陈亚蓝, 等. 响应面优化酶辅助半仿生法提取野生陈艾总黄酮及其体外抗氧化性研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(7): 104–109. [ZHU J, YANG L L, CHEN Y L, et al. Response surface optimization enzyme-assisted semi-bionic extraction of total flavonoids from aged *Artemisia argyi* in wild and its antioxidant activity *in vitro*[J]. Cereals & Oils, 2022, 35(7): 104–109.]

[32] 龚频, 翟鹏涛, 张梦璇, 等. 野葛总黄酮的提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 172–176. [GONG P, ZHAI P T, ZHANG M X, et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Pueraria lobata* and its antioxidant activity[J]. China Brewing, 2022, 41(10): 172–176.]

[33] 李杰, 马艳莉, 刘尚军, 等. 超声波辅助溶剂法提取山茱萸黄酮工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(12): 81–88. [LI J, MA Y L, LIU S J, et al. Study on ultrasonic-assisted solvent extraction technology of *Cornus officinalis* flavonoids and its anti-oxidation activity *in vitro*[J]. China Food Additives, 2022, 33(12): 81–88.]

[34] 李颖, 侯诗, 廖婉婷, 等. 响应面法优化黄晶果果皮总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J]. 食品科技, 2022, 47(7): 175–181. [LI Y, HOU S, LIAO W T, et al. Optimization of extraction process by response surface methodology and antioxidant activity of total flavonoids from *Abiu*. peels[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(7): 175–181.]

[35] 宋代荣, 刘昌衡, 贾爱荣, 等. 罗汉参皮总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2022, 43(8): 69–74. [SONG D R, LIU C H, JIA A R, Optimization of the extraction process of total flavonoids from the peel of *Apios americana* medic. and study on its antioxidant activity[J]. The Food Industry, 2022, 43(8): 69–74.]

[36] 苏慧慧, 许菲, 吴定坤, 等. 响应面优化三叶木通总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性[J]. 北方园艺, 2022(21): 100–105. [SU H H, XU F, WU D K, et al. Optimization of extraction conditions of flavonoids from *Akebia trifoliata* by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Northern Horticulture, 2022(21): 100–105.]

[37] 王为兰, 刘晓颖, 陈伟, 等. 新疆圆柏总黄酮的抗氧化活性及在食品保鲜中的应用[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2020, 37(2): 197–203. [WANG W L, LIU X Y, CHEN W, et al. Antioxidant activity of flavonoids from *Sabina vulgaris* Ant. and its application in food preservation[J]. Journal of Xinjiang University (Natural Science Edition in Chinese and English), 2020, 37(2): 197–203.]