

黄药叶总黄酮提取工艺优化及其 抗氧化活性研究

桂利利^{1,2}, 吴正坤^{1,2}, 余惠凡^{1,2}, 李飞^{1*}

(1.湖北医药学院药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室,湖北 十堰 442000;2.湖北医药学院 生物医药研究院,湖北 十堰 442000)

摘要:采用超声波辅助提取法提取黄药叶总黄酮,通过单因素试验和正交试验优化黄药叶总黄酮提取工艺,并探讨其体外抗氧化活性。结果表明,黄药叶总黄酮最佳提取工艺参数为乙醇体积分数70%,提取次数3次,提取时间40 min,料液比1:30(g/mL),此条件下黄药叶总黄酮得率为(6.18±0.13)%。体外抗氧化试验结果表明,黄药叶总黄酮提取物对羟自由基、DPPH自由基和超氧阴离子自由基均具有一定的清除能力,相应的半数清除浓度(inhibitory concentration, IC₅₀)为484.12、18.27、46.88 μg/mL,分别为L-抗坏血酸的1.50、4.50、2.51倍,黄药叶总黄酮提取物铁离子还原能力略低于L-抗坏血酸。

关键词:黄药叶;总黄酮;提取工艺;正交试验;抗氧化活性

Optimization of Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. Leaves

GUI Li-li^{1,2}, WU Zheng-kun^{1,2}, YU Hui-fan^{1,2}, LI Fei^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Department of Pharmacology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China)

Abstract: Single factor test and orthogonal test were used to optimize ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves. The antioxidant activity *in vitro* of the leaves was analyzed. Optimized extraction parameters were established as follows: ethanol concentration 70%; extraction times 3; extraction time 40 min; solid/liquid ratio 1:30 (g/mL). Under these conditions, total flavonoid yield was (6.18±0.13)%. The results of antioxidant experiments showed that the total flavonoids extracted from *Premna cavaleriei* Levl. leaves had certain scavenging rate of hydroxyl radicals, DPPH radicals and superoxide anion radicals. The corresponding inhibitory concentration (IC₅₀) was 484.12, 18.27 and 46.88 μg/mL, respectively and were 1.50, 4.50 and 2.51 times that of L-ascorbic acid, respectively. The ferric ion reducing ability of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves was slightly lower than that of L-ascorbic acid.

Key words: *Premna cavaleriei* Levl. leaves; total flavonoids; extraction technology; orthogonal test; antioxidant activity

引文格式:

桂利利, 吴正坤, 余惠凡, 等. 黄药叶总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 100-108.

GUI Lili, WU Zhengkun, YU Huifan, et al. Optimization of Extraction and Antioxidant Activity of Total Flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. Leaves[J]. Food Research and Development, 2021, 42(19): 100-108.

基金项目:湖北省教育厅重点项目(D20192101);湖北省卫生健康委青年人才项目(WJ2021Q010);十堰市市级引导性科研项目(21Y10);湖北医药学院人才启动金项目(2018QDJZR33)

作者简介:桂利利(1991—),女(汉),助理实验师,硕士研究生,研究方向:中草药活性成分研究。

*通信作者:李飞(1983—),女(汉),副教授,博士,研究方向:药理学与肿瘤生物学。

黄药(*Premna cavaleriei* Levl.)是马鞭草科豆腐柴属植物^[1],湖北省十堰市武当山地区野生黄药分布广、品质优,当地居民有用黄药叶制作“神仙豆腐”的传统,但多以农家自制为主,缺乏系统化和标准化开发。目前尚无黄药的相关研究报道,而相对报道较多的为黄药同属植物。研究表明,该属植物的叶中含有黄酮、果胶、挥发油、氨基酸、维生素、多糖和矿物质等多种营养成分^[2-3],其中黄酮类化合物具有抗氧化、抗菌、抗病毒、防治心脑血管疾病及降血脂等功效,应用范围广^[4-6]。因此,深入研究黄药叶黄酮成分、提取工艺等可为当地黄药叶质量标准制定与产品开发提供理论依据。

本文以总黄酮得率为检测指标,乙醇为提取溶剂,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验,优化黄药叶总黄酮超声波辅助提取工艺,并通过测定羟自由基清除率、DPPH 自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和铁离子还原能力考察其体外抗氧化活性。本研究弥补了黄药研究的空白,为明确其有效成分奠定基础,并为黄药药食同源相关产品开发利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄药叶原料:2019年9月采于十堰市张湾区黄龙镇青石村,经湖北医药学院附属十堰市人民医院中药学专家张晓燕副教授鉴定为马鞭草科豆腐柴属植物黄药(*Premna cavaleriei* Levl.)的叶;芦丁标准品:上海源叶生物科技有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、邻苯三酚、水杨酸、氯化铁、亚硝酸钠、硝酸铝、L-抗坏血酸(分析纯):国药集团化学试剂有限公司;30%过氧化氢(优级纯):德国 Merck 公司;盐酸(分析纯):上海安谱实验科技股份有限公司;DPPH、三羟甲基氨基甲烷(分析纯):北京索莱宝科技有限公司;2,4,6-三吡啶基三嗪(2,4,6-tripyridyl-triazine, TPTZ)(分析纯):阿拉丁试剂有限公司;试验用水均为超纯水。

TU-1901型紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;KQ-250DE型超声波清洗机:昆山市超声仪器有限公司;MBF-20A型高速中药粉碎机:温岭市迈邦机械设备有限公司;CPA225D型电子天平、PB-10型酸度计:德国 Sartorius 公司;RE-52AA型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;SH2-D(III)型循环水式真空泵:河南省予华仪器有限公司;GZX-9240MBE型电热鼓风干燥箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 试验方法

1.2.1 黄药叶样品制备

新鲜黄药叶,采摘当天用纯水洗净,50℃烘干,粉

碎过60目筛,得黄药叶粉末,密封备用。

1.2.2 超声波辅助提取法提取黄药叶总黄酮

1.2.2.1 单因素试验

精密称取1.2.1项下样品2.000 g,确定料液比1:20(g/mL),60%乙醇溶液,浸泡时间30 min,提取温度55℃,超声功率125 W,提取时间30 min,提取次数1次为固定因子,分别考察提取温度(25、35、45、55、65、75℃)、料液比[1:7.5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40(g/mL)]、乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%)、浸泡时间(0、10、20、30、40、50、60 min)、超声功率(100、125、150、175、200、225、250 W)、提取时间(0、10、20、30、40、50、60 min)和提取次数(1、2、3、4、5次)对超声波辅助提取黄药叶总黄酮得率的影响。

1.2.2.2 正交试验

在单因素试验结果基础上,选择对总黄酮得率影响较大的4个因素,进行四因素三水平正交试验,因素与水平见表1。

表1 正交试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A 料液比/(g/mL)	B 提取时间/min	C 提取次数	D 乙醇体积分数/%
1	1:25	20	2	50
2	1:30	30	3	60
3	1:35	40	4	70

1.2.3 样品提取液中总黄酮含量及得率测定

1.2.3.1 对照品溶液的配制

精密称取芦丁对照品20.0 mg,加无水乙醇定容至50 mL,备用。

1.2.3.2 标准曲线的绘制

采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠光度法测定样品总黄酮含量^[7]。精密吸取对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于25 mL容量瓶中,加无水乙醇至6.0 mL,再分别加入5%亚硝酸钠溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入10%硝酸铝溶液1 mL,摇匀,放置6 min;加入1 mol/L氢氧化钠溶液10 mL,摇匀,最后加入30%乙醇至刻度,放置15 min。510 nm波长处测定吸光度值,以吸光度值(A)为纵坐标、芦丁质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线 $Y = 0.01376X - 0.00104$, $R^2 = 0.9999$,结果表明芦丁对照品在0~0.08 mg/mL范围内线性关系良好。

1.2.3.3 样品提取液中总黄酮含量及得率测定

依据1.2.2项下方法提取样品,离心取上清,并用60%乙醇溶液定容至100 mL,精密吸取1.0 mL至25 mL

容量瓶,待测,以等体积无水乙醇为对照,按1.2.3.2项下试验步骤进行总黄酮含量测定。由公式(1)计算总黄酮得率。

$$\text{得率}/\% = \frac{cNV}{m \times 100} \times 100 \quad (1)$$

式中: c 为根据标准曲线方程计算出样品中总黄酮含量,mg/mL; N 为稀释倍数; V 为样品提取液总体积,mL; m 为样品质量,g。

1.2.4 黄药叶总黄酮提取物抗氧化性能测定

1.2.4.1 羟自由基清除率测定

参考李亚军等^[8]和Liang等^[9]的方法略作改动。在最优工艺条件下提取黄药叶总黄酮,并用提取溶剂(即80%乙醇溶液)将提取液稀释成浓度为50、100、200、300、400 μg/mL的黄药叶总黄酮溶液,取样品液1.0 mL于具塞刻度试管中,再加9 mmol/L FeSO₄ 1 mL,反应15 min后加9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液1 mL,最后加8.8 mmol/L H₂O₂ 1 mL,37 °C反应30 min,测510 nm处吸光度值,记A₁;用蒸馏水代替H₂O₂测定样品的本底吸光度值,记A₂;以蒸馏水代替样品,记A₀;用提取溶剂溶解阳性对照物L-抗坏血酸,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其羟自由基清除率。由公式(2)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (2)$$

1.2.4.2 DPPH 自由基清除率测定

参考Yeo等^[10]和GB/T 39100—2020《多肽抗氧化性测定DPPH和ABTS法》^[11]的方法略有改动。同1.2.4.1方法,稀释提取液得到浓度为2、4、6、8、10、20、40 μg/mL的黄药叶总黄酮溶液,取样品液2.0 mL于具塞刻度试管中,再依次加2 mL的DPPH试剂(0.2 mmol/L),暗反应30 min,离心后取上清液作为试验组,于517 nm处测吸光度值,记A₁;用2.0 mL甲醇代替2.0 mL DPPH,测定样品的本底吸光度值,记A₂;用蒸馏水代替样品作空白对照,记A₀;用提取溶剂溶解阳性对照物L-抗坏血酸,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其DPPH自由基清除率。由公式(3)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

1.2.4.3 超氧阴离子自由基清除率测定

参考Tao等^[12]的方法略有改动。同1.2.4.1方法,稀释提取液得到浓度为10、20、30、40、50 μg/mL的黄药叶总黄酮溶液,取样品液1.0 mL于具塞刻度试管中,再分别加50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.2)3 mL,37 °C水浴20 min,立即加37 °C预热的7 mmol/L邻苯三酚1 mL,迅速摇匀倒入比色皿,325 nm处每30 s测

吸光度值,连测4 min,计算每分钟变化值,记A₁;蒸馏水代替样品,增加值记A₀;用提取溶剂溶解阳性对照物L-抗坏血酸,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其超氧阴离子自由基清除率。由公式(4)计算清除率。

$$\text{清除率}/\% = (1 - A_1 / A_0) \times 100 \quad (4)$$

1.2.4.4 铁离子还原能力测定

参考王国庆等^[13]的方法略有改动。配制TPTZ工作液:将0.3 mol/L醋酸缓冲液(pH 3.6)、10 mmol/L TPTZ溶液(溶于40 mmol/L盐酸)、20 mmol/L氯化铁溶液以10:1:1体积比混合,现配现用。

同1.2.4.1方法,稀释提取液得到浓度为25、50、100、200、300、400 μg/mL的黄药叶总黄酮溶液。试验组加入200 μL同浓度样品和1.8 mL TPTZ工作液,空白组加入200 μL蒸馏水与1.8 mL TPTZ工作液,对照组加入200 μL不同浓度样品和1.8 mL蒸馏水。避光静置10 min,593 nm处测吸光度,空白组吸光度值为A₀,试验组吸光度值为A₁,对照组吸光度值为A₂。用提取溶剂溶解阳性对照物L-抗坏血酸,并配制为上述浓度梯度的溶液,同法测定其铁离子还原能力。吸光度越大表示还原能力越强。由公式(5)计算铁离子还原能力。

$$\text{还原能力} = A_1 - A_0 - A_2 \quad (5)$$

1.3 数据处理

所有试验均设3个平行,试验数据以平均值±标准差表示,采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析、GraphPad Prism 8.0进行绘图。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助提取法单因素试验

2.1.1 提取温度单因素试验结果

提取温度对黄药叶总黄酮得率的影响见图1。

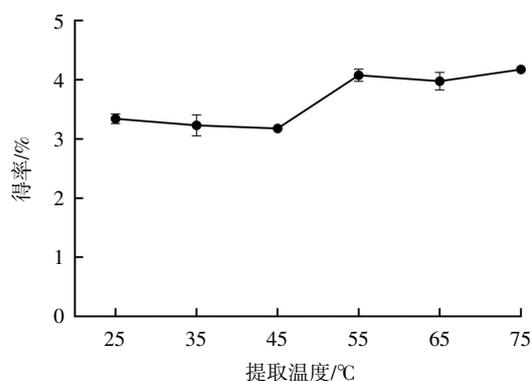


图1 提取温度对黄药叶总黄酮得率的影响
Fig.1 Extraction temperature on the yield of total flavonoids in *Premna cavaleriei* Levl. leaves

由图1可知,提取温度在25℃~55℃时,总黄酮得率呈先下降后升高趋势,在55℃时,达到峰值4.08%,继续升温至65℃以上时,总黄酮得率有所降低。温度升高可加剧分子热运动,降低溶剂黏度,总黄酮在溶剂中溶解速度加快,得率上升^[14-15];但温度过高可能会加快溶剂挥发和总黄酮氧化分解,导致得率下降^[16]。因此,55℃为最佳提取温度。

2.1.2 料液比单因素试验结果

料液比对黄药叶总黄酮得率的影响见图2。

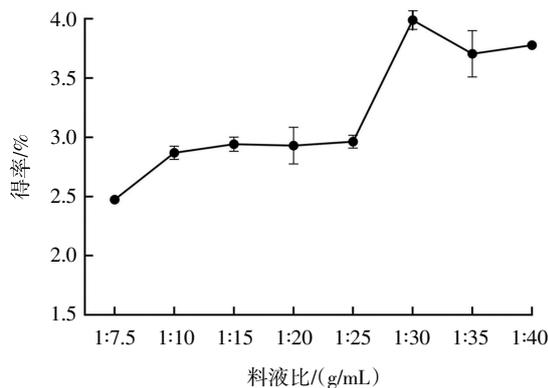


图2 料液比对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.2 Effect of solid/liquid ratio on the yield of total flavonoids in *Premna cavalieri* Levl. leaves

由图2可知,料液比在1:7.5(g/mL)~1:30(g/mL)时,随着溶剂体积的增大,总黄酮得率呈递增趋势,料液比为1:30(g/mL)时总黄酮得率达到最大值3.99%后趋于平衡。原因可能是随着溶剂量的加大,样品与溶剂的接触面积也逐渐增大,在料液比1:30(g/mL)时溶剂充分包裹样品,再继续增加溶剂量,对总黄酮得率将无促进作用^[17]。此外,随溶剂量增大,细胞内非黄酮类杂质溶出量增加,阻碍了总黄酮溶出,导致得率下降^[18]。为获取最佳料液比,选取1:25、1:30、1:35(g/mL)作为正交试验设计中料液比的3个水平。

2.1.3 乙醇体积分数单因素试验结果

乙醇体积分数对黄药叶总黄酮得率的影响见图3。

由图3可知,当乙醇体积分数为60%时,黄药叶总黄酮得率最高,为3.47%,但随着乙醇体积分数继续增大,总黄酮得率呈下降趋势。可能因60%乙醇溶液极性与黄药叶中黄酮类化合物的极性较为相近,依据相似相溶原理,得率较高,但当乙醇体积分数高于60%时,提取溶剂与黄酮类化合物之间极性差异增大,导致总黄酮得率呈下降趋势^[19]。另外,随着乙醇体积分数的增大,更多的蛋白质、糖类和脂溶性杂质溶出,导致总黄酮得率有所下降^[20-21]。因此,选择50%、60%和70%作为正交试验设计乙醇体积分数的3个水平。

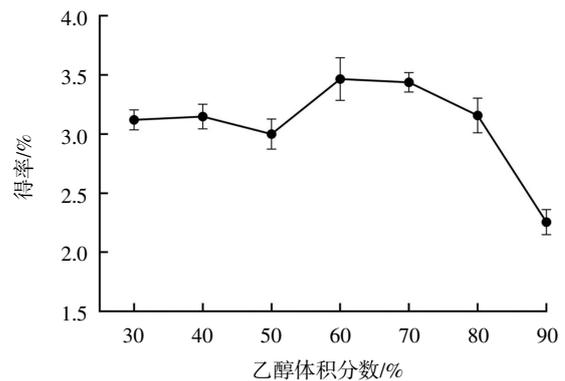


图3 乙醇体积分数对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.3 Effect of ethanol concentration on the yield of total flavonoids in *Premna cavalieri* Levl. leaves

2.1.4 浸泡时间单因素试验结果

浸泡时间对黄药叶总黄酮得率的影响见图4。

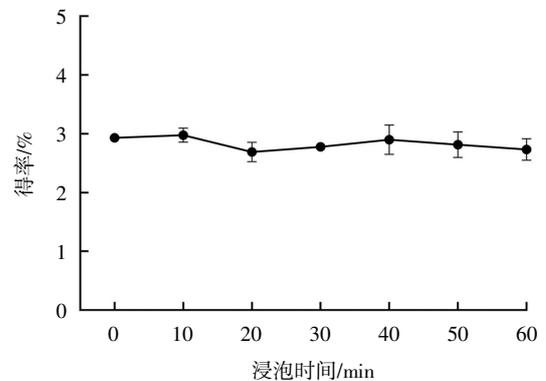


图4 浸泡时间对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.4 Effect of soaking time the yield of total flavonoids in *Premna cavalieri* Levl. leaves

由图4可知,当浸泡时间为10min时,黄药叶总黄酮得率最高,为2.98%。浸泡时间增加至20min时,总黄酮得率有所下降,随着浸泡时间的进一步延长,总黄酮得率基本稳定。可能是因为初始阶段提取溶剂迅速包裹样品,提取液中黄酮类化合物含量提高^[22],但随着浸泡时间的增加,样品在提取液中逐渐沉降^[23],导致提取液中有效成分减少。因此,浸泡时间10min为最佳。

2.1.5 超声功率单因素试验结果

超声功率对黄药叶总黄酮得率的影响见图5。

由图5可知,黄药叶总黄酮得率随着超声功率的增加先升高后趋于平稳,当超声功率150W时,黄药叶总黄酮得率最高,为3.82%。随着超声功率增强,加大了超声波的“机械效应”和“空化效应”,可有效减小粉末与溶剂之间的阻滞层,提高样品的破碎度,增加了总黄酮得率^[24-25];当超声功率达到一定值时,超声波产生的“机械效应”和“空化效应”已达最佳,所以在150W~250W范围,黄药叶总黄酮得率基本保持恒

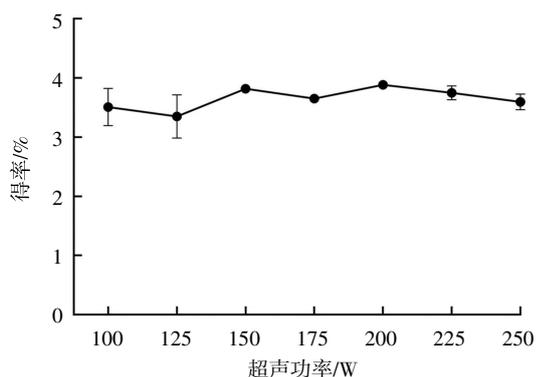


图5 超声功率对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic power on the yield of total flavonoids in *Premna cavaleriei* Levl. leaves

定。因此,适宜超声功率为 150 W。

2.1.6 提取时间单因素试验结果

提取时间对黄药叶总黄酮得率的影响见图 6。

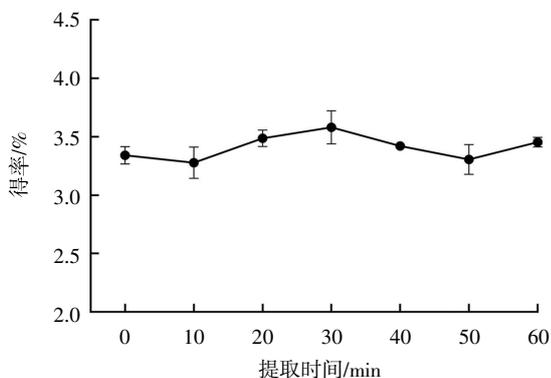


图6 提取时间对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.6 Effect of extraction time on the yield of total flavonoids in *Premna cavaleriei* Levl. leaves

由图 6 可知,提取时间为 30 min 时,黄药叶总黄酮得率达到峰值 3.58%,当提取时间继续延长,总黄酮得率呈下降趋势。可能由于提取时间在 0~30 min 时,样品破碎程度迅速增加,黄酮类化合物不断溶出,提取液中总黄酮得率在 30 min 时达到最大值,但随着提取时间延长,部分总黄酮被氧化或分解,导致目标产物得率降低^[29]。因此,选择提取时间为 20、30、40 min 进行正交试验。

2.1.7 提取次数单因素试验结果

提取次数对黄药叶总黄酮得率的影响见图 7。

由图 7 可知,随着提取次数增加,黄药叶总黄酮得率先快速升高后缓慢升高。提取 1 次~3 次时,总黄酮得率由 2.82%快速增至 4.19%,提取 3 次与提取 1 次相比,总黄酮得率增加 48.58%。随着提取次数进一步增加,提取 5 次时总黄酮得率为 4.74%,与提取 3 次相比,总黄酮得率增加 13.13%。可能因每次更换溶剂进行提取时,不断形成高渗透压环境,使得样品中黄酮

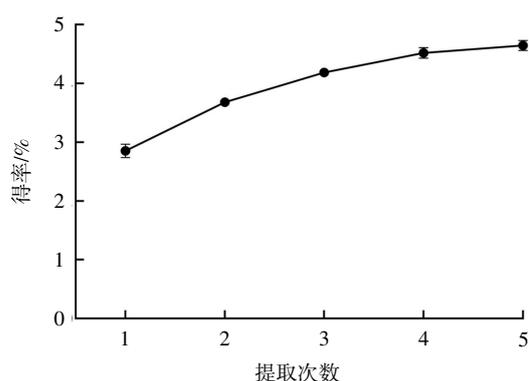


图7 提取次数对黄药叶总黄酮得率的影响

Fig.7 Effect of extraction times on the yield of total flavonoids in *Premna cavaleriei* Levl. leaves

类化合物逐次被提取,而样品中黄酮类化合物含量有限,随着提取次数进一步增加,黄酮类化合物已基本溶出,总黄酮得率增加缓慢;同时随着提取次数增加,促进了杂质的溶出,影响了总黄酮的提取^[27]。因此,选择提取次数 2、3、4 次进行正交试验。

2.2 正交试验设计优化超声波辅助提取法提取工艺

2.2.1 正交试验设计与结果分析

在单因素试验结果基础上,选择料液比(A)、提取时间(B)、提取次数(C)、乙醇体积分数(D)4 个因素,进行四因素三水平正交试验。其它参数固定为浸泡时间 10 min,超声功率 150 W,提取温度 55 ℃,正交试验结果与分析见表 2。

表 2 正交试验结果与分析

Table 2 Experimental results and analyses for optimization of total flavonoids

试验号	A 料液比	B 提取时间	C 提取次数	D 乙醇体积分数	得率/%
1	1	1	1	1	3.12 ± 0.07
2	1	2	2	2	4.33 ± 0.12
3	1	3	3	3	4.64 ± 0.16
4	2	1	2	3	4.64 ± 0.06
5	2	2	3	1	4.38 ± 0.11
6	2	3	1	2	4.42 ± 0.09
7	3	1	3	2	4.00 ± 0.08
8	3	2	1	3	4.45 ± 0.27
9	3	3	2	1	4.36 ± 0.13
K ₁	12.09	11.76	12.00	11.87	
K ₂	13.44	13.17	13.33	12.75	
K ₃	12.82	13.42	13.02	13.73	
k ₁	4.03	3.92	4.00	3.96	
k ₂	4.48	4.39	4.44	4.25	
k ₃	4.27	4.47	4.34	4.58	
R	0.45	0.55	0.44	0.62	
主次顺序				R _D >R _B >R _A >R _C	
最优组合				A ₂ B ₃ C ₂ D ₃	

由表2可知,4个因素极差顺序为D>B>A>C,即乙醇体积分数对黄药叶总黄酮得率影响最大,其次是提取时间、料液比,最后是提取次数。通过比较k值可知,4个因素的最佳水平为A₂B₃C₂D₃,即料液比1:30(g/mL),提取时间40 min,提取次数3次,乙醇体积分数70%,由于该条件不在正交试验的9次试验中,因此需进一步试验验证。

2.2.2 方差分析及最优工艺试验验证

方差分析见表3。

表3 正交试验结果方差分析

Table 3 Analysis of variance of orthogonal experiment results for optimization of total flavonoid extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A 料液比	1.603	2	0.801	29.574	<0.01
B 提取时间	0.977	2	0.489	18.038	<0.01
C 提取次数	1.740	2	0.870	32.103	<0.01
D 乙醇体积分数	0.911	2	0.456	16.815	<0.01
误差	0.488	18	0.027		
总计	496.010	27			

由表3可知,上述4个因素对黄药叶总黄酮得率的影响大小顺序是乙醇体积分数>提取时间>料液比>提取次数,与极差分析结果一致。同时,由P值可知4个因素均对黄药叶总黄酮得率有显著影响。

为进一步验证最优工艺可靠性,进行3组平行试验验证,得率分别为63.0%、62.5%和60.0%,均值为61.8%,相对标准偏差为0.13%,验证试验总黄酮得率均高于正交表中得率,证实该正交试验结果可靠,故确定黄药叶总黄酮的最优提取条件为乙醇体积分数70%,提取次数3次,提取时间40 min,料液比1:30(g/mL)。

2.3 黄药叶总黄酮提取物抗氧化能力测定

黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸抗氧化活性试验线性拟合结果见表4和表5。

表4 黄药叶总黄酮提取物抗氧化活性试验线性拟合结果

Table 4 The linearity correlation results of antioxidant activity of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves

抗氧化活性试验	浓度范围/($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	R ²	IC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)
羟自由基	50~500	$Y = 0.1034X - 0.0575$	0.9928	484.12
DPPH 自由基	0.5~40	$Y = 2.366X + 6.781$	0.9117	18.27
超氧阴离子自由基	5~50	$Y = 0.5482X + 24.30$	0.9757	46.88
铁离子还原能力	5~300	$Y = 0.01208X - 0.01635$	0.9890	/

注:/表示铁离子还原能力以吸光度值衡量,吸光度越大表示还原能力越强,无IC₅₀。

表5 L-抗坏血酸抗氧化活性试验线性拟合结果

Table 5 The linearity correlation results of antioxidant activity of L-ascorbic acid

抗氧化活性试验	浓度范围/($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	R ²	IC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)
羟自由基	50~500	$Y = 0.1604X - 1.890$	0.9841	323.50
DPPH 自由基	0.5~8	$Y = 11.57X + 3.032$	0.9910	4.06
超氧阴离子自由基	2.5~40	$Y = 2.391X + 5.378$	0.9684	18.66
铁离子还原能力	5~200	$Y = 0.01628X + 0.1597$	0.9847	/

注:/表示铁离子还原能力以吸光度值衡量,吸光度越大表示还原能力越强,无IC₅₀。

2.3.1 羟自由基清除率测定

黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸对羟自由基的清除作用见图8。

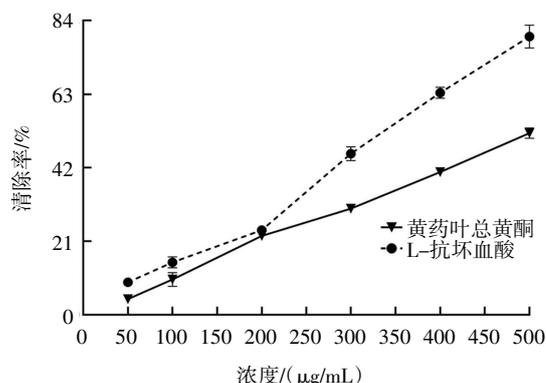


图8 黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸对羟自由基的清除作用
Fig.8 Hydroxyl radicals scavenging effects of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves and L-ascorbic acid

由图8可知,在50 $\mu\text{g/mL}$ ~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内黄药叶总黄酮提取物清除羟自由基的能力弱于同浓度的L-抗坏血酸,两者对羟自由基的清除作用均随浓度的增加而增大,在500 $\mu\text{g/mL}$ 时黄药叶总黄酮提取物对羟自由基的清除率为(51.87 \pm 1.18)%,低于L-抗坏血酸的(79.43 \pm 2.65)%。另外,由表4和表5可知,L-抗坏血酸的IC₅₀为323.50 $\mu\text{g/mL}$,而黄药叶总黄酮提取物的IC₅₀为484.12 $\mu\text{g/mL}$,是L-抗坏血酸的1.50倍。以上结果表明黄药叶总黄酮提取物对羟自由基具有较强的清除能力,且与浓度具有量效关系。

2.3.2 DPPH 自由基清除率测定

黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸对DPPH 自由基的清除作用见图9。

由图9可知,黄药叶总黄酮提取物清除DPPH 自由基的能力弱于同浓度的L-抗坏血酸,两者对DPPH 自由基的清除率随浓度的增加而增大,到达一定浓度

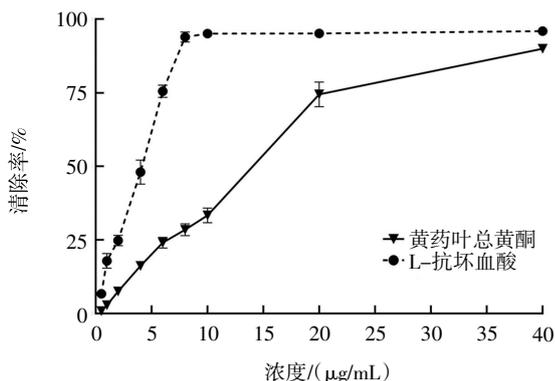


图9 黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸对DPPH自由基的清除作用

Fig.9 DPPH radical scavenging effects of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves and L-ascorbic acid

后增长趋于平缓。L-抗坏血酸及黄药叶总黄酮提取物分别在 0.5 μg/mL ~ 8 μg/mL、0.5 μg/mL ~ 40 μg/mL 范围时对 DPPH 自由基的清除率与其浓度相关性较好。由回归方程得 L-抗坏血酸的 IC₅₀ 为 4.06 μg/mL, 而黄药叶总黄酮提取物的 IC₅₀ 为 18.27 μg/mL, 是 L-抗坏血酸的 4.50 倍。在试验浓度范围内, 当黄药叶总黄酮提取物浓度为 40 μg/mL 时, 清除率最大为 (89.99 ± 0.11)%, 仅与 L-抗坏血酸相差 5.95%。因此, 黄药叶总黄酮提取物对 DPPH 自由基清除能力虽不及 L-抗坏血酸, 但也具有一定程度的清除作用。

2.3.3 超氧阴离子自由基清除率测定

黄药叶总黄酮提取物和 L-抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除作用见图 10。

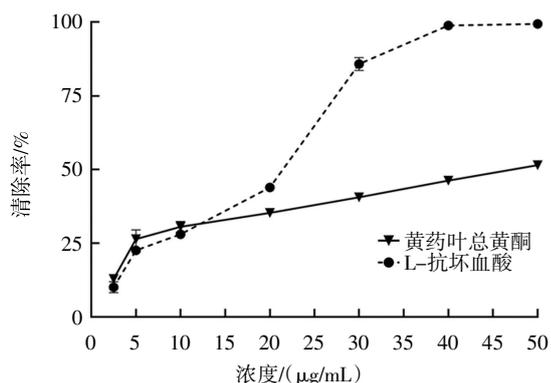


图10 黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除作用

Fig.10 Scavenging ability against superoxide anion radicals of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves and L-ascorbic acid

由图 10 可知, 当浓度小于 10 μg/mL 时, 黄药叶总黄酮提取物对超氧阴离子自由基的清除效果较 L-抗坏血酸略强; 当浓度大于 10 μg/mL 时, 随着浓度的增大, L-抗坏血酸对超氧阴离子自由基清除能力略优于

黄药叶总黄酮提取物清除能力, 当浓度为 50 μg/mL 时, 黄药叶总黄酮提取物对超氧阴离子自由基清除率为 (51.68 ± 0.23)%, 而 L-抗坏血酸则为 (99.30 ± 0.22)%, 两者清除率差值达最大值。黄药叶总黄酮提取物对超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 为 46.88 μg/mL, 为 L-抗坏血酸 IC₅₀ 的 2.51 倍, 表明黄药叶总黄酮提取物对超氧阴离子自由基的清除能力虽弱于 L-抗坏血酸, 但仍具有较强的超氧阴离子自由基的清除能力。

2.3.4 铁离子还原能力

黄药叶总黄酮提取物和 L-抗坏血酸的铁离子还原能力见图 11。

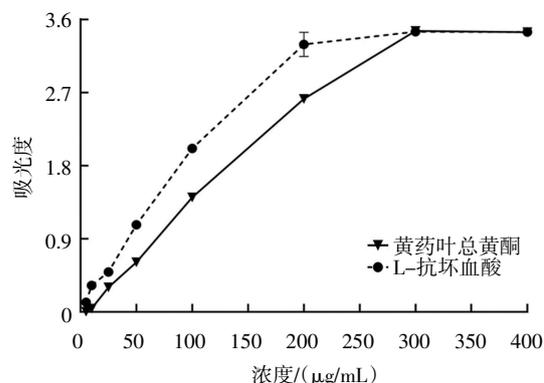


图11 黄药叶总黄酮提取物和L-抗坏血酸的铁离子还原能力
Fig.11 Ferric reducing ability of total flavonoids from *Premna cavaleriei* Levl. leaves and L-ascorbic acid

铁离子还原能力以吸光度值衡量, 吸光度值越大, 还原能力越强。由图 11 可知, 黄药叶总黄酮提取物在 5 μg/mL~300 μg/mL 范围内, 随着浓度升高吸光度值不断增大; 在 300 μg/mL~400 μg/mL 时吸光度值趋于平稳且与 L-抗坏血酸吸光度曲线重合, 表明黄药叶总黄酮提取物具有较强的铁离子还原能力。

3 结论

本文采用超声波辅助提取法提取武当山地区野生黄药叶总黄酮, 通过单因素试验和正交试验优化提取工艺, 获取最佳工艺条件为乙醇体积分数 70%, 提取次数 3 次, 提取时间 40 min, 料液比 1:30(g/mL), 此工艺条件下, 得率为 6.18%, 即提取量为 61.8 mg/g。与传统醇提法相比, 本研究所得最佳提取工艺条件可缩短提取时间, 避免长时间提取对活性成分的影响, 提高黄药叶总黄酮的提取量和效率。此外体外抗氧化活性研究表明, 黄药叶总黄酮提取物对羟自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基均具有清除作用, 且具有较强的铁离子还原能力; 同时一定浓度范围内, 抗氧化能力与浓度呈正相关。黄药叶总黄酮提取物对羟自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的 IC₅₀ 为

484.12、18.27、46.88 $\mu\text{g/mL}$, 分别为 L-抗坏血酸的1.50、4.50、2.51倍;此外,其铁离子还原能力略低于 L-抗坏血酸。本文首次对武当山野生黄药叶总黄酮提取工艺及体外抗氧化活性进行研究,可为当地野生黄药叶明确营养成分及活性物质奠定研究基础,以及为黄药药食同源相关产品开发提供了理论支撑。

参考文献:

- [1] 裴鉴,陈守良.中国植物志(第六十五卷,第一分册)[M].北京:科学出版社,1982:90.
PEI Jian, CHEN Shouliang. Flora of China(Volume sixty-five, Volume one)[M]. Beijing: Science Press, 1982: 90.
- [2] 曹稳根,蔡红,高贵珍,等.野生豆腐柴营养成分分析[J].生物学杂志,2001,18(4):23-24.
CAO Wengen, CAI Hong, GAO Guizhen, et al. Analysis of nutritional components of *Premna microphylla* Turcz[J]. Journal of Biology, 2001, 18(4): 23-24.
- [3] LU J K, LI J J, JIN R C, et al. Extraction and characterization of pectin from *Premna microphylla* Turcz leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 323-328.
- [4] XU F, LI L L, HUANG X H, et al. Antioxidant and antibacterial properties of the leaves and stems of *Premna microphylla*[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2010, 4(23): 2544-2550.
- [5] 李卫东,曹稳根.豆腐柴根提取物对大鼠炎症组织中前列腺素 E2 含量的影响[J].安徽医药,2003,7(5):327-328.
LI Weidong, CAO Wengen. Effect of *Premna microphylla* Turcz root extraction on the content of prostaglandin E2 in the inflammatory tissue of SD rats[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2003, 7(5): 327-328.
- [6] ZHANG H Y, GAO Y, LAI P X. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil from *Premna microphylla* turczaninow[J]. Molecules, 2017, 22(3): 381.
- [7] 景亚,张光辉,王美欢,等.鹅不食草总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J].国际药学研究杂志,2020,47(8):666-670,676.
JING Ya, ZHANG Guanghui, WANG Meihuan, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity of total flavonoids from *Centipeda minima*[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2020, 47(8): 666-670, 676.
- [8] 李亚军,易鹊,邓小美,等.桂花籽总黄酮的提取工艺及抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2020,33(9):98-101.
LI Yajun, YI Que, DENG Xiaomei, et al. Study on extraction technology of total flavonoids from *Osmanthus fragrans* seeds and their antioxidant effects[J]. Cereals & Oils, 2020, 33(9): 98-101.
- [9] LIANG Y K, FAROOQ M U, HU Y J, et al. Study on stability and antioxidant activity of red anthocyanidin glucoside rich hybrid rice, its nutritional and physicochemical characteristics[J]. Food Science and Technology Research, 2018, 24(4): 687-696.
- [10] YEO J, SHAHIDI F. Critical Re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(26): 7526-7529.
- [11] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会.多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法: GB/T 39100—2020[S].北京:中国标准出版社,2020.
State Administration of Market Supervision and Administration, State Standardization Administration Commission. Determination of antioxidant activity for polypeptides—DPPH and ABTS methods: GB/T 39100—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020.
- [12] TAO J, ZHAO Y Q, CHI C F, et al. Bioactive peptides from cartilage protein hydrolysate of spotless smoothhound and their antioxidant activity *in vitro*[J]. Marine Drugs, 2018, 16(4): 100.
- [13] 王国庆,何小娟,孟博,等.紫花苜蓿中主要黄酮类化合物抗氧化活性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2015(1):109-111.
WANG Guoqing, HE Xiaojuan, MENG Bo, et al. Study on antioxidant activity of total flavonoids from *Medicago sativa* L. [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015 (1): 109-111.
- [14] SHENG Z L, WAN P F, DONG C L, et al. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43: 778-786.
- [15] HAMMI K M, JDEY A, ABDELLY C, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2015, 184: 80-89.
- [16] PROMMUAUAK C, DE-EKNAMKUL W, SHOTIPRUK A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 62(2): 444-448.
- [17] 苗永美,孙佳琦,徐荣华,等.广东石豆兰多糖的提取工艺及其抗氧化活性[J].天然产物研究与开发,2019,31(5):779-785.
MIAO Yongmei, SUN Jiaqi, XU Ronghua, et al. Optimization of the extraction process of polysaccharide from *Bublophyllum kwangtungense* and its antioxidant activity[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(5): 779-785.
- [18] 张蕾,乔旭光,占习娟,等.超声波提取对荷叶超微粉中黄酮类物质提取的影响[J].食品工业科技,2007,28(9):137-140.
ZHANG Lei, QIAO Xuguang, ZHAN Xijuan, et al. The effect of super fine crushing and ultrasonic on the extraction of flavonoids in lotus leaf[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(9): 137-140.
- [19] 刘招娣,刘祥义,张水滔,等.青刺果总黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2018,39(1):20-24.
LIU Zhaodi, LIU Xiangyi, ZHANG Shuitao, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of total flavonoids from *Prinsepia utilis* Royle[J]. Food Research and Development, 2018, 39 (1): 20-24.
- [20] 张耀洲,谷清义,陈琼.乙醇提取-丙酮沉淀法提取分离茶皂素的工艺研究[J].生物质化学工程,2020,54(6):39-44.
ZHANG Yaozhou, GU Qingyi, CHEN Qiong. Study on ethanol extraction and acetone precipitation process of tea saponin[J]. Biomass Chemical Engineering, 2020, 54(6): 39-44.

- [21] LIU J, MU T H, SUN H N, et al. Optimization of ultrasonic - microwave synergistic extraction of flavonoids from sweet potato leaves by response surface methodology[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2019, 43(5): e13928.
- [22] 蔡邦宏, 涂先科, 莫乔斐. 超声波辅助萃取柠檬皮渣中的总黄酮[J]. 化学研究与应用, 2018, 30(5): 684-688.
CAI Banghong, TU Xianke, MO Qiaofei. Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from lemon peel[J]. Chemical Research and Application, 2018, 30(5): 684-688.
- [23] 蔡雨晴, 贾棹东, 吴茜茜, 等. 响应面法优化野生酸枣仁中总黄酮的提取工艺[J]. 中国饲料, 2016(3): 23-27, 35.
CAI Yuqing, JIA Zhaodong, WU Qianqian, et al. Optimization of extraction technology for flavonoids in wild *Ziziphi spinosae* semen using response surface methodology[J]. China Feed, 2016(3): 23-27, 35.
- [24] PAN G Y, YU G Y, ZHU C H, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS)[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(3): 486-490.
- [25] 葛飞. 超声波技术在食品工业中的应用[J]. 肉类工业, 1999(9): 43-45.
GE Fei. Application of ultrasonic technology in food industry[J]. Meat Industry, 1999(9): 43-45.
- [26] 吕泽东. 超声提取蛋黄中类胡萝卜素工艺的优化[J]. 辽宁化工, 2019, 48(6): 522-524.
LV Zedong. Optimization of ultrasonic extraction process of carotenoid from yolk[J]. Liaoning Chemical Industry, 2019, 48(6): 522-524.
- [27] 郭向阳. 辣木提取物的制备、抗氧化活性及其在饮料中的应用[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 145-150.
GUO Xiangyang. Optimization of extraction, antioxidant activities and beverage application of extract from leaves of *Moringa oleifera* Lam[J]. Food Research and Development, 2019, 40(18): 145-150.

加工编辑:冯娜
收稿日期:2021-04-14