

# 菜芙蓉花黄酮的超声协同双水相提取、成分分析及抗氧化性

杨胜男,赵斗,刘宇桂,仇燕\*

(河北科技大学 食品与生物学院,河北 石家庄 050018)

**摘要:**以菜芙蓉花为原料,采用超声协同乙醇-硫酸铵双水相提取黄酮,在单因素试验基础上,通过响应面试验优化提取工艺,并利用超高效液相色谱-轨道离子阱质谱(ultra-high performance liquid chromatography-orbit ion trap mass spectrometry, UPLC-Orbitrap-MS)进行成分分析,与传统方法提取的黄酮进行抗氧化活性比较,并分析黄酮主要单体与抗氧化活性的相关性。结果表明:菜芙蓉花黄酮最佳提取工艺为乙醇质量分数31%、硫酸铵质量分数20%、超声功率210 W、菜芙蓉花粉末质量0.5 g,在此条件下相比为 $1.16\pm 0.03$ ,分配系数为 $50.13\pm 2.50$ ,黄酮提取率达 $(98.31\pm 0.13)\%$ 。UPLC-Orbitrap-MS鉴定出63个黄酮类化合物,其中13个为首次鉴定出的化合物。与双水相法、超声法和醇提法相比,超声协同双水相提取的菜芙蓉花黄酮显示出较强的抗氧化活性,清除DPPH自由基和ABTS<sup>+</sup>自由基EC<sub>50</sub>分别为6.37 μg/mL和17.71 μg/mL。超声协同双水相法能高效提取菜芙蓉花黄酮,且该黄酮具有较高抗氧化活性。

**关键词:**菜芙蓉花;黄酮;超声协同双水相法;成分分析;抗氧化活性

## Ultrasound-Assisted Aqueous Two-phase Extraction of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic Flower Flavonoids, Components Analysis, and Antioxidant Activities

YANG Shengnan, ZHAO Dou, LIU Yuguai, QIU Yan\*

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, Hebei, China)

**Abstract:** *Abelmoschus manihot* (L.) Medic flowers were used as the raw materials for extracting flavonoids via ultrasound-assisted ethanol/ammonium sulfate aqueous two-phase extraction. Based on single-factor experiments, the extraction process was optimized using response surface methodology. The flavonoid components were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-orbit ion trap mass spectrometry (UPLC-Orbitrap-MS). The antioxidant activities of the flavonoids extracted by this method were compared with those extracted by traditional methods, and the correlation between the main flavonoid components and antioxidant activity was analyzed. The results showed that the optimal extraction conditions for flavonoids from *A. manihot* flowers were as follows: ethanol mass fraction of 31%, ammonium sulfate mass fraction of 20%, ultrasonic power of 210 W, and *A. manihot* flower powder amount of 0.5 g. Under these conditions, the two-phase volume ratio was  $1.16\pm 0.03$ , the partition coefficient was  $50.13\pm 2.50$ , and the flavonoid extraction rate was  $(98.31\pm 0.13)\%$ . A total of 63 flavonoid compounds were identified by UPLC-Orbitrap-MS, including 13 previously unreported compounds. Compared to aqueous two-phase extraction, ultrasound extraction, and alcohol extraction, ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction exhibited stronger antioxidant activity, with EC<sub>50</sub> values for DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals of 6.37 μg/mL and 17.71 μg/mL, respectively. The ultrasound-assisted aqueous two-phase method efficiently extracted flavonoids from *A. manihot* flowers, which possessed high antioxidant activity.

**Key words:** *Abelmoschus manihot* (L.) Medic flower; flavonoids; ultrasound-assisted aqueous two-phase; components analysis; antioxidant activity

基金项目:河北省重点研发计划项目(22322801D)

作者简介:杨胜男(2001—),女(汉),硕士研究生,研究方向:天然产物提取及活性研究。

\*通信作者:仇燕(1977—),女(汉),教授,博士,研究方向:天然产物及其生物学功能的研究。

引文格式:

杨胜男,赵斗,刘宇桂,等.菜芙蓉花黄酮的超声协同双水相提取、成分分析及抗氧化性[J].食品研究与开发,2025,46(5):102-113.

YANG Shengnan, ZHAO Dou, LIU Yugui, et al. Ultrasound-Assisted Aqueous Two-phase Extraction of *Abelmoschus manihot* (L.) Medic Flower Flavonoids, Components Analysis, and Antioxidant Activities[J]. Food Research and Development, 2025,46(5):102-113.

菜芙蓉(*Abelmoschus manihot* (L.) Medic)又名野芙蓉、金花葵,是锦葵科秋葵属一年生或多年生草本开花植物<sup>[1]</sup>,广泛分布在东欧、亚洲的温带和亚热带地区,在南太平洋岛国通常被视为一种主要的食用型绿叶蔬菜,并且也被用来制作茶叶。菜芙蓉在200多种秋葵植物中最具食用、药用和保健功能,被称为植物“大熊猫”<sup>[2]</sup>,目前在华北地区、江苏、安徽和广东等地广泛种植。菜芙蓉花中的化学成分复杂<sup>[3]</sup>,包括黄酮类化合物、氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素E、核苷类、多糖类和长链烃类等化合物。其中,菜芙蓉主要活性物质黄酮的含量超出黄酮生产的主要原料大豆、银杏等数十倍<sup>[4]</sup>。菜芙蓉黄酮主要包括金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、芦丁、杨梅素等,具有镇痛、抗炎、降血脂、免疫调节、抗氧化等功效<sup>[5]</sup>,在功能性食品和药品等方面具有广阔的应用前景。

目前,菜芙蓉黄酮提取多采用水或乙醇作为溶剂进行提取,水浸提取效率低且提取液易霉变,醇提则存在溶剂用量大、周期长、成分复杂及纯度不高等问题。双水相提取(aqueous two-phase extraction, ATPE)是根据生物活性物质在两相间的溶解性不同而实现高效分离的一种新型提取分离技术,在与水互溶的有机溶剂中加入盐后,由于电解质的水合作用破坏了有机溶剂与水之间弱的作用力,体系分相并形成互不相容的双水相体系,物质在两相间选择性分配,易溶于醇的黄酮成分被提取到上相,水溶性杂质则溶于下相。其具有提取率高、提取条件温和、目标产物活性保持好等优点<sup>[6]</sup>,被广泛应用于生物黄酮<sup>[7]</sup>、花青素<sup>[8]</sup>、多酚<sup>[9]</sup>等生物活性物质的大规模回收和纯化。超声提取法利用超声空化增加对植物组织细胞壁的破坏,改善从细胞到溶剂的传质,加速目标化合物的释放<sup>[10]</sup>。将超声和双水相提取协同作用,能够缩短提取时间,降低能耗,提高提取效率和产物纯度,在同一体系内实现提取、分离与纯化的目的。Wei等<sup>[11]</sup>利用传统的70%乙醇回流提取菟丝子种子黄酮,得率仅为3.43 mg/g,采用双水相法提取率提高到18.75 mg/g。石统帅等<sup>[12]</sup>通过超声协同双水相萃取的黑果腺肋花楸果实抗氧化成分对自由基的平均清除率为59.36%,显著高于单一双水相法的48.27%和超声醇提法的49.55%。

目前,应用超声协同乙醇-硫酸铵双水相系统提取

菜芙蓉花黄酮未见研究报道。本研究旨在探索超声协同双水相在菜芙蓉花黄酮提取中的应用潜力,获得比传统方法更高的黄酮提取率和具有更高抗氧化活性的黄酮。鉴于此,本研究通过单因素和响应面法优化菜芙蓉花黄酮提取工艺,利用超高效液相色谱-轨道离子阱质谱(ultra-high performance liquid chromatography-orbit ion trap mass spectrometry, UPLC-Orbitrap-MS)对提取的黄酮化合物进行鉴定,评估黄酮提取物的抗氧化活性,分析黄酮单体与抗氧化活性的相关性,以期为实现菜芙蓉花绿色、高效提取高抗氧化活性黄酮的工业应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

菜芙蓉花:产自河北省井陘县,2023年7~9月盛花期采摘,50℃烘干至恒重,粉碎过80目筛,备用;金丝桃苷(≥98%)、槲皮素(99.1%)、杨梅素(98.31%)、异槲皮素(98%)、芦丁(≥98%)标准品:上海源叶生物科技有限公司;乙腈(色谱纯):天津市康科德科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH):日本和光纯药工业株式会社;2,2'-联氮二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS):南京奥多福尼生物科技有限公司;过硫酸钾、硫酸铵、无水乙醇、亚硝酸钠:天津市永大化学试剂有限公司;硝酸铝:上海麦克林生化科技有限公司;氢氧化钠:天津市大茂化学试剂厂。所用试剂除特殊注明外,均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMAX i3x 酶标仪:美国美谷分子仪器有限公司;1525型高效液相色谱系统、2998型光电二极管阵列检测器:美国沃特世科技有限公司;Vanquish超高效液相系统、Orbitrap Exploris 120质谱检测器:美国赛默飞世尔科技有限公司;MB-96型组织研磨器:浙江美壁仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 超声协同双水相提取菜芙蓉花总黄酮

取一定质量的菜芙蓉花粉末加入至50g的乙醇-硫酸铵双水相体系中,在一定超声功率下,50℃,超声40min后,抽滤,滤液置于刻度试管中静置40min分

液,测定上相和下相体积。参照文献[13]的方法,以芦丁为标准品,绘制标准曲线( $Y=10.291X-0.0023$ ,  $R^2=0.9985$ ),计算总黄酮浓度(mg/mL)。

### 1.3.1.1 单因素试验

选择乙醇质量分数(28%、29%、30%、31%、32%)、硫酸铵质量分数(14%、16%、18%、20%、22%)、超声功率(150、180、210、240、270 W)、菜芙蓉花粉质量(0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 g)进行单因素试验。

提取结束后室温静置、分液后计算相比( $R$ )、分配系数( $K$ )、提取率( $Y$ , %),计算公式如下。

$$R = \frac{V_1}{V_b}$$

$$K = \frac{C_1}{C_b}$$

$$Y = \frac{R \times K}{1 + R \times K} \times 100$$

式中: $R$ 为相比; $K$ 为分配系数; $V_1$ 、 $V_b$ 分别为上、下相的体积,mL; $C_1$ 、 $C_b$ 分别为上、下相的总黄酮质量浓度,mg/mL。

### 1.3.1.2 响应面试验设计

在单因素试验结果的基础上,确定影响菜芙蓉花黄酮提取率的重要因素,利用 Design-Expert 13 软件,以硫酸铵质量分数、菜芙蓉花粉质量和超声功率为变量,以菜芙蓉花黄酮的提取率为响应值,进行三因素三水平的响应面设计。响应面试验因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface tests

水平	因素		
	A 硫酸铵质量分数/%	B 菜芙蓉花粉质量/g	C 超声功率/W
-1	18	0.50	180
0	20	0.75	210
1	22	1.00	240

### 1.3.2 与其他提取方法的比较

为评估超声协同双水相法,比较此法与双水相法、超声辅助法、醇提法对菜芙蓉花黄酮的提取效果及其抗氧化能力。

超声协同双水相法:乙醇和硫酸铵的质量分数分别为 31% 和 20%,用去离子水将体系补充至 50 g。加入菜芙蓉花粉 0.5 g,超声功率 210 W,超声温度 50 °C,提取 40 min。

双水相法:乙醇-硫酸铵双水相体系中加入 0.5 g 菜芙蓉花粉,搅拌提取 40 min。

超声辅助法:将 0.5 g 菜芙蓉花粉按照料液比 1:40 (g/mL)溶于 75% 的乙醇中,超声功率为 210 W,超声提取 40 min。

醇提法:将 0.5 g 菜芙蓉花粉按照料液比 1:40 (g/mL)溶于 75% 的乙醇中,并在 70 °C 水浴中浸

提 2 h。

### 1.3.3 总黄酮含量的测定

根据 1.3.1 芦丁标准曲线得到总黄酮浓度( $C_f$ , mg/mL),总黄酮含量( $M$ , mg/g)计算公式如下。

$$M = \frac{C_f \times V}{m}$$

式中: $V$ 为提取液体积,mL; $m$ 为菜芙蓉花粉质量,g。

### 1.3.4 菜芙蓉花黄酮的抗氧化活性测定

收集超声协同双水相黄酮提取液上相,4 °C 冰箱静置过夜,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,真空旋转蒸发浓缩。参照文献[14-17]方法测定黄酮对 DPPH·、ABTS·和  $O_2^-$  的清除能力以及总还原力,计算半数效应浓度(median effect concentration,  $EC_{50}$ )。

### 1.3.5 UPLC-Orbitrap-MS 分析

#### 1.3.5.1 样品溶液制备

取适量菜芙蓉花粉于 2 mL 离心管中,加入 600  $\mu$ L 甲醇(含 4 mmol/L 2-氯-L-苯丙氨酸),涡旋振荡 30 s,加入钢珠,放入组织研磨器中,55 Hz 研磨 60 s,室温超声 15 min,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取上清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜,过滤液加入到检测瓶中,用于检测。

#### 1.3.5.2 超高效液相色谱(UPLC)条件

利用 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8  $\mu$ m) 色谱柱,流速 0.3 mL/min,柱温 40 °C,进样量 2  $\mu$ L。

正离子模式流动相为 0.1% 甲酸乙腈(B2)和 0.1% 甲酸水(A2),梯度洗脱程序:0~1 min,8% B2;1~8 min,8%~98% B2;8~10 min,98% B2;10~10.1 min,98%~8% B2;10.1~12 min,8% B2。

负离子模式流动相为乙腈(B3)和 5 mmol/L 甲酸铵水(A3),梯度洗脱程序:0~1 min,8% B3;1~8 min,8%~98% B3;8~10 min,98% B3;10~10.1 min,98%~8% B3;10.1~12 min,8% B3。

#### 1.3.5.3 质谱条件

利用 Orbitrap Exploris 120 质谱检测器,电喷雾电离(electrospray ionization, ESI),正负离子模式分别采集数据。正离子喷雾电压为 3.50 kV,负离子喷雾电压为 -2.50 kV,鞘气 275.8 kPa,辅助气 3.3 L/min。毛细管温度 325 °C,以分辨率 60 000 进行一级全扫描,一级离子扫描范围( $m/z$ )100~1 000,并采用高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD)进行二级裂解,碰撞能量为 30%,二级分辨率为 15 000,采集信号前 4 离子进行碎裂,同时采用动态排除去除不必要的 MS/MS 信息。

### 1.3.6 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析

参照 Lai 等<sup>[18]</sup>的方法并略作改动,取 0.5 g 菜芙蓉

花粉按照优化条件提取菜芙蓉花黄酮,取上相进行 HPLC 分析。Waters Symmetry C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 体积分数 0.1% 磷酸(A)—乙腈(B), 梯度洗脱(0~17 min, 85% A; 18~25 min, 84% A; 26~34 min, 80% A; 35~44 min, 60% A; 45~50 min, 85% A), 检测波长 370 nm、柱温 30 °C、流速 1.0 mL/min、进样体积 10 μL。

#### 1.4 数据处理

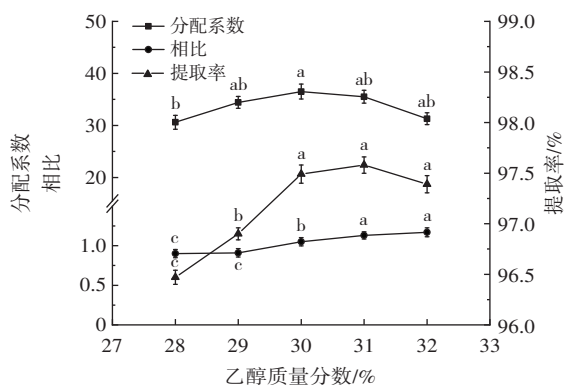
所有试验均重复 3 次, 数据以平均值±标准差表示。利用 Design-Expert 13 软件进行 Box—Behnken 试验设计, 采用 SPSS 27 进行数据分析, Origin 2021 用于作图。物质鉴定过程使用 Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>)、massbank (<http://www.massbank.jp/>)、LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>)、mzcloud (<https://www.mzcloud.org>)、KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 数据库进行检索比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声协同双水相体系提取菜芙蓉花黄酮单因素试验

#### 2.1.1 乙醇质量分数对分配系数、相比、提取率的影响

乙醇质量分数对分配系数、相比、提取率的影响见图 1。



同一指标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 1 乙醇质量分数对分配系数、相比、提取率的影响

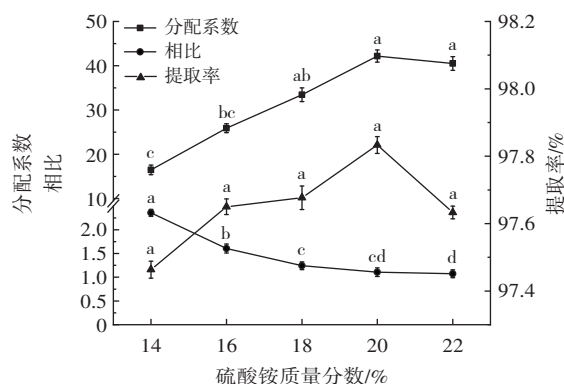
Fig.1 Effect of ethanol mass fraction on partition coefficient, phase ratio, and extraction rate

由图 1 可知, 随着乙醇质量分数的增加, 相比逐渐增加, 分配系数则表现为先增大后减小的趋势。乙醇质量分数为 28%~31% 时, 提取率持续升高, 当乙醇质量分数达 31% 时, 提取率最高, 达 97.58%。随乙醇质量分数增加, 上相结合水的能力增强故体积增大, 有利于醇溶性的黄酮在上相富集, 但是乙醇浓度过高溶液极性降低, 会引起其他有机小分子的溶出而抑制黄酮的萃取<sup>[19]</sup>。因此, 最佳乙醇质量分数为 31%。

#### 2.1.2 硫酸铵质量分数对分配系数、相比、提取率的影响

硫酸铵质量分数对分配系数、相比、提取率的影响

见图 2。



同一指标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

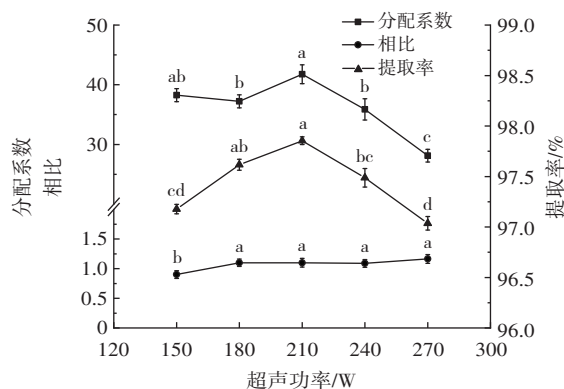
图 2 硫酸铵质量分数对分配系数、相比、提取率的影响

Fig.2 Effect of mass fraction of ammonium sulfate on partition coefficient, phase ratio, and extraction rate

由图 2 可知, 随着硫酸铵质量分数的增加, 相比逐渐降低, 这是因为随着盐浓度的增加结合水的能力增强, 下相体积增大。分配系数则呈先增大后减小的趋势。硫酸铵质量分数为 14%~20% 时, 随着硫酸铵质量分数的增加, 提取率逐渐升高, 当硫酸铵质量分数为 20% 时, 提取率最高, 为 97.83%。当硫酸铵质量分数继续升高, 体系中的盐溶液过饱和导致盐析出, 菜芙蓉花黄酮随盐从体系中沉淀出来, 导致提取率急剧下降<sup>[20]</sup>。因此, 选择硫酸铵质量分数为 18%、20%、22% 进行后续试验。

#### 2.1.3 超声功率对分配系数、相比、提取率的影响

超声功率对分配系数、相比、提取率的影响见图 3。



同一指标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 3 超声功率对分配系数、相比、提取率的影响

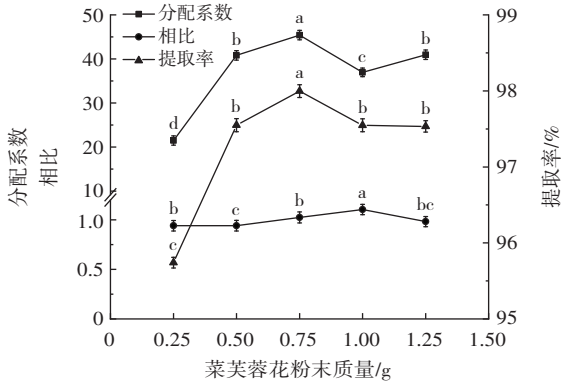
Fig.3 Effect of ultrasonic power on partition coefficient, phase ratio, and extraction rate

由图 3 可知, 超声功率为 150~210 W 时, 分配系数和提取率均随着超声功率增加而整体增加, 且在 210 W 时达到峰值, 分别为 41.52 和 97.85%。超声功率继续增加, 二者表现为急剧下降的趋势, 这可能是由于超声功率过高致使植物细胞内部过热, 破坏了黄酮化合物的结构。而相比随超声功率的增加变化不大。因此,

选择超声功率为 180、210、240 W 进行后续试验。

### 2.1.4 菜芙蓉花粉质量对分配系数、相比、提取率的影响

菜芙蓉花粉质量对分配系数、相比、提取率的影响见图 4。



同一指标不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 4 菜芙蓉花粉质量对分配系数、相比、提取率的影响

Fig.4 Effect of *A. manihot* flower powder amount on partition coefficient, phase ratio, and extraction rate

由图 4 可知,相比随菜芙蓉花粉质量增加逐渐升高而后略有下降。当菜芙蓉花粉质量小于 0.75 g 时,分配系数和提取率逐渐增加,当菜芙蓉花粉质量为 0.75 g 时二者均达到最高值,分别为 45.40 和 98.02%。黄酮化合物通常与细胞内的蛋白质、多糖等通过疏水键以结合态形式存在,溶剂进入细胞内破坏疏水键进而释放黄酮类物质。当菜芙蓉花粉质量较低时,上相中的乙醇与菜芙蓉花粉的接触面积较大,促进黄酮的溶出,当菜芙蓉花粉质量继续增加,超出了溶剂的萃取能力,甚至溶出的黄酮吸附到待提物中,造成提取率下降<sup>[12]</sup>。因此,选择菜芙蓉花粉质量为 0.50、0.75、1.00 g 进行后续试验。

## 2.2 响应面实验

### 2.2.1 响应面优化结果分析

以黄酮提取率为响应值  $Y$ ,选取对黄酮提取率影响程度较大的 3 个因素(硫酸铵质量分数、菜芙蓉花粉质量和超声功率)进行响应面实验设计,结果见表 2。

对表 2 的数据进行多元回归拟合,得到二次多项回归方程: $Y=98.03+0.62A-0.60B+0.46C+0.57AB-0.51AC+0.42BC-0.74A^2-0.31B^2-0.40C^2$ 。利用 Design-Expert 13 进行回归分析,方差分析结果见表 3。

由表 3 可知,回归模型的  $P=0.0013 < 0.01$ ,表示模型极显著,模型失拟项  $P=0.5023 > 0.05$ ,表明黄酮提取率的实际值与预测值之间具有较高的拟合度。 $F$  值表示菜芙蓉花黄酮提取率受因素影响强弱,3 个因素对提取率的影响先后顺序为  $A$ (硫酸铵质量分数) $>B$ (菜芙蓉花粉质量) $>C$ (超声功率)。回归模型的一次项  $A、B、C$ ,二次项  $A^2$  对提取率的影响均极显著( $P < 0.01$ ),

表 2 响应面实验设计及结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验号	因素			提取率/%
	A 硫酸铵质量分数/%	B 菜芙蓉花粉质量/g	C 超声功率/W	
1	20	0.75	210	97.51
2	22	1.00	210	97.64
3	18	0.75	180	95.31
4	18	0.75	240	97.52
5	20	0.75	210	98.35
6	20	0.75	210	98.07
7	20	0.50	240	97.75
8	18	1.00	210	94.96
9	20	0.50	240	97.92
10	20	1.00	240	97.55
11	22	0.50	210	97.85
12	22	0.75	180	97.29
13	20	1.00	180	96.06
14	20	0.75	210	97.87
15	18	0.50	210	97.46
16	22	0.75	240	97.45
17	20	0.75	210	98.34

表 3 响应面实验设计回归模拟方差分析

Table 3 Analysis of variance of response surface experimental design for regression model

差异来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	14.40	9	1.60	13.21	0.0013	**
A	3.11	1	3.11	25.68	0.0015	**
B	2.83	1	2.83	23.40	0.0019	**
C	1.70	1	1.70	14.06	0.0072	**
AB	1.31	1	1.31	10.85	0.0132	*
AC	1.05	1	1.05	8.66	0.0216	*
BC	0.69	1	0.69	5.74	0.0478	*
$A^2$	2.30	1	2.30	18.98	0.0033	**
$B^2$	0.41	1	0.41	3.37	0.1092	
$C^2$	0.66	1	0.66	5.45	0.0523	
残差	0.85	7	0.12			
失拟项	0.35	3	0.12	0.93	0.5023	
纯误差	0.50	4	0.12			
总离差	15.24	16				

注:\*表示影响显著,  $P < 0.05$ ; \*\*表示影响极显著,  $P < 0.01$ 。

交互项  $AB、AC、BC$  对提取率的影响显著( $P < 0.05$ ),说明不同因素与响应值之间不是简单的线性关系。

两因素交互作用的响应曲面及其等高线见图 5。

由图 5 可知,交互项  $AB、AC、BC$  响应曲面较陡,等高线呈椭圆形、颜色变化较快且分布密集,说明交互作用显著<sup>[21-22]</sup>,与表 3 分析结果吻合。

### 2.2.2 模型诊断

菜芙蓉花黄酮提取率的模型适应性诊断如图 6 所示。

由图 6a 可知,内部学生化残差与运行次数所有的

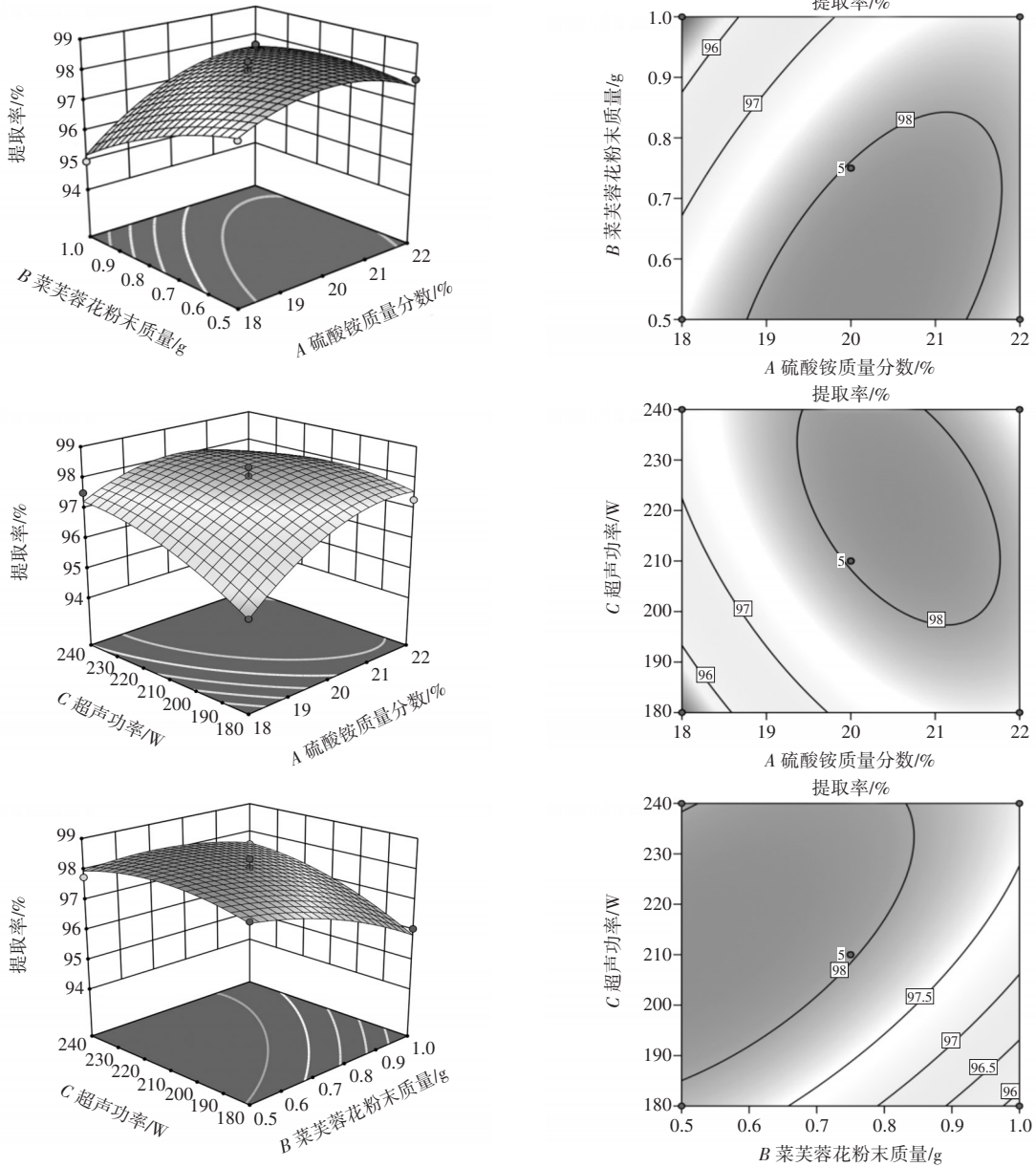
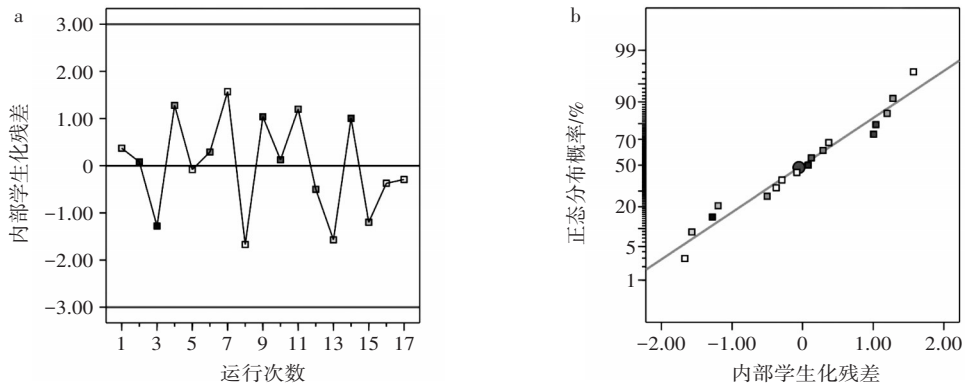


图5 硫酸铵质量分数、菜芙蓉花粉质量和超声功率交互作用的响应曲面和等高线

Fig.5 Response surface and contour map of the interaction of ammonium sulfate mass fraction, A. manihot flower powder amount, and ultrasonic power



a. 内部学生化残差与运行次数; b. 内部学生化残差与正态分布概率。

图6 模型适应性诊断图

Fig.6 Model adaptive diagnostic diagram

点分布无规律但都在-3~3之间,表明模型符合适应性及正态性假设<sup>[23]</sup>。由图6b可知,内部学生化残差与正态分布概率数据点分布对称、环绕零波动、无明显异常点且接近一条直线,说明方差没有偏差,模型稳定。综上,该模型具有较高的准确性和可信度。

### 2.2.3 验证试验

通过 Design-Expert 13 对模型优化分析,得到最优工艺条件为硫酸铵质量分数 20.13%、菜芙蓉花粉质量 0.54 g、超声功率 213.18 W,此条件下菜芙蓉花黄酮的提取率预测值为 98.32%。考虑到试验条件的可操作性,最优工艺条件调整为硫酸铵质量分数 20%、菜芙蓉花粉

末质量 0.5 g、超声功率 210 W,并进行 3 次重复验证试验,提取率为 $(98.31\pm 0.13)\%$ ,此时相比为 $1.16\pm 0.03$ ,分配系数为 $50.13\pm 2.50$ ,与预测结果基本一致,说明该回归模型合理可行。

### 2.3 UPLC-Orbitrap-MS 分析鉴定结果

超声协同双水相提取菜芙蓉花黄酮在正负离子模式下的 UPLC-Orbitrap-MS 基峰强度离子流图见图 7。

由图 7 可知,正、负离子流均有良好的分离效果和离子化效率。经质谱裂解碎片分析,菜芙蓉花黄酮提取液中黄酮类化合物鉴定结果见表 4。

由表 4 可知,两种模式下共鉴定出 63 个黄酮类化

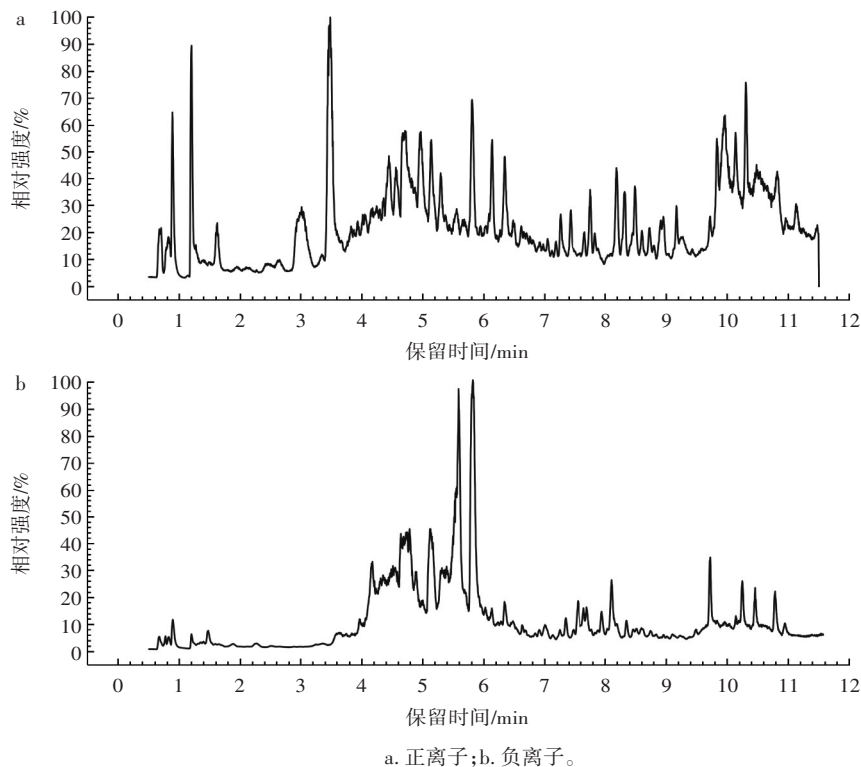


图 7 菜芙蓉花超声协同双水相提取黄酮 UPLC-Orbitrap-MS 检测的正、负离子模式下的总离子流图

Fig.7 Total ion current diagrams in positive and negative ion modes of UPLC-Orbitrap-MS determine in the *A. manihot* (L.) Medic flower flavonoids by ultrasound-assisted aqueous two-phase extraction

表 4 菜芙蓉花黄酮提取物中黄酮类化合物鉴定结果

Table 4 Identification results of flavonoid compounds in *A. manihot* (L.) Medic flower flavonoid extract

编号	化合物名称	保留时间/s	分子量/Da	质荷比	分子式	离子模式
1	金丝桃苷	662.9	464.095 5	465.108 9	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
2	异鼠李素	381.9	316.058 3	317.066 0	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
3	异牡荆素	464.7	432.105 6	432.228 8	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M] <sup>+</sup>
4	山奈酚	376.8	286.047 7	287.054 7	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
5	杨梅素	579.7	318.037 6	317.030 5	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
6	柚皮素	373.0	272.068 5	273.074 7	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
7	槲皮素	643.3	302.042 7	301.035 5	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
8	芦丁	274.4	610.153 4	611.157 0	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
9	紫云英苷	292.0	448.100 6	447.105 5	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
10	鸡豆黄素 A	551.3	284.068 5	283.168 2	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
11	儿茶酚	407.1	290.079 0	289.080 2	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
12	花青素-3-葡萄糖苷	227.8	449.108 4	449.110 7	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	[M] <sup>+</sup>

续表4 菜芙蓉花黄酮提取物中黄酮类化合物鉴定结果

Continue table 4 Identification results of flavonoid compounds in *A. manihot* (L.) Medic flower flavonoid extract

编号	化合物名称	保留时间/s	分子质量/Da	质荷比	分子式	离子模式
13	花青素-3-O-(β-D-木糖基-(1→2)-β-D-半乳糖苷)	226.6	581.150 6	581.146 5	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	[M] <sup>+</sup>
14	花青素-3-芸香糖苷	287.8	595.166 3	595.171 0	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	[M] <sup>+</sup>
15	飞燕草素-3-芸香糖苷	274.4	611.161 2	611.127 7	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	[M] <sup>+</sup>
16*	香叶木苷	311.8	608.174 1	607.161 1	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
17*	表儿茶素	255.9	290.079 0	289.074 3	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
18*	圣草酚	341.8	288.063 4	287.056 5	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
19*	染料木黄酮	348.7	270.052 8	269.045 4	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
20	染料木素	226.3	432.105 6	432.102 3	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	[M] <sup>+</sup>
21	黄豆黄素	435.2	284.068 5	283.063 8	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
22	橙皮素	334.1	302.079 0	303.081 9	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
23	橙皮素 7-新橘皮糖苷	274.4	610.189 8	611.184 2	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
24	高圣草酚查尔酮	216.3	302.079 0	303.085 2	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
25*	(+)-脱甲氧基天竺葵	495.7	370.141 6	353.143 9	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
26#	(2S)-黄烷酮	72.1	224.083 7	224.091 4	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	[M] <sup>+</sup>
27*	(2S)-甘草素	320.1	256.073 6	257.080 1	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
28	山奈酚胺	383.2	300.063 4	299.055 2	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
29#	3-O-甲基槲皮素	380.1	316.058 3	315.047 6	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
30	山奈酚 3-麦冬皂苷	258.4	772.206 2	773.237 5	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>21</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
31	山奈酚-3-O-芸香糖苷	287.8	594.158 5	595.158 0	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
32*	卡利诺 A	456.2	392.223 1	393.233 0	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
33	木犀草素	293.2	286.047 7	287.053 0	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
34	木犀草素 7-葡萄糖苷	293.2	448.100 6	449.121 1	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
35*#	3-叔丁基-5-甲基邻苯二酚	315.8	180.115 0	181.120 9	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
36*	5,7-二羟基黄酮	429.2	254.057 9	253.050 7	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
37	柚皮素 7-O-β-D-葡萄糖苷	304.4	434.121 3	435.126 1	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
38*	川陈皮素	435.8	402.131 5	403.138 4	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
39	毒叶素	223.1	304.058 3	305.065 7	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
40	芹菜素	437.5	270.052 8	269.045 4	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
41	槲皮素 3-(2G-木糖基芸香苷)	253.3	742.195 6	741.178 1	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
42	槲皮素-3-(6''-丙二酰基葡萄糖苷)	316.1	550.095 9	551.098 0	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
43	槲皮素 3-O-β-D-葡萄糖基-(1→2)-β-D-葡萄糖苷	229.2	626.148 3	627.144 8	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
44	异槲皮苷	514.8	464.095 5	463.093 2	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
45	芹菜素-7-(6''-丙二酰基葡萄糖苷)	308.1	518.106 0	499.075 2	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>
46*	水飞蓟素	614.2	482.121 3	465.120 3	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
47*#	橘皮素	457.3	372.120 9	373.129 0	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
48	草质素	308.4	302.042 7	303.047 9	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
49	槲皮苷	303.8	448.100 6	449.106 8	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
50*	二氢杨梅素	247.5	320.053 2	320.049 1	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	[M] <sup>+</sup>
51	鸢尾苷	301.5	462.116 2	462.113 6	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M] <sup>+</sup>
52	花青素-5-O-葡萄糖苷	293.2	449.108 4	449.092 7	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	[M] <sup>+</sup>
53	花青素-3-O-(6-O-丙二酰基-β-D-葡萄糖苷)	304.9	535.108 8	535.103 7	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub>	[M] <sup>+</sup>
54	花青素-3-O-(6''-葡萄糖基-2''-木糖基半乳糖苷)	258.1	743.203 5	743.207 8	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> O <sub>20</sub>	[M] <sup>+</sup>
55	槲皮素-3-硫酸酯	310.7	381.999 5	380.989 9	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>10</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>
56	槲皮素-3-O-[β-D-木糖基-(1→2)-β-D-葡萄糖苷]	264.8	596.137 7	595.124 3	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>
57	橙皮素 7-O-葡萄糖苷	332.7	464.131 9	465.134 5	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
58	鸡豆黄素 A-7-(6-丙二酰基葡萄糖苷)	320.7	532.121 7	533.125 1	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	[M+H] <sup>+</sup>
59	飞燕草素-3-O-β-D-葡萄糖苷-5-O-(6-香豆酰基-β-D-葡萄糖苷)	258.4	773.192 9	773.188 8	C <sub>36</sub> H <sub>37</sub> O <sub>19</sub>	[M] <sup>+</sup>
60	飞燕草素-3-葡萄糖苷-5-咖啡酰基葡萄糖苷	248.1	789.187 8	789.184 4	C <sub>36</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>	[M] <sup>+</sup>
61	飞燕草素-3,5,3'-三葡萄糖苷	248.1	789.208 9	789.204 1	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>22</sub>	[M] <sup>+</sup>
62	飞燕草素-3-O-β-D-三丁二糖苷	267.0	597.145 6	597.141 2	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	[M] <sup>+</sup>
63	飞燕草素-3-O-(6''-O-丙二酰基)-β-葡萄糖苷-3'-O-β-葡萄糖苷	270.7	713.156 5	713.144 1	C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>20</sub>	[M] <sup>+</sup>

注:\*表示菜芙蓉花首次鉴定出的黄酮化合物,#表示菜芙蓉花醇提法未鉴定出的黄酮物质。



合物。其中正离子模式下鉴定出金丝桃苷、山奈酚、芦丁、柚皮素等,负离子模式下鉴定出杨梅素、槲皮素、异槲皮苷、二氢杨梅素等。醇提法黄酮共鉴定出 59 个黄酮化合物,超声协同双水相提取法增加的 4 个化合物分别为川陈皮素、橘皮素、(2S)-甘草素、3-叔丁基-5-甲基邻苯二酚。杨雷<sup>[24]</sup>利用高效液相串联质谱对甲醇超声提取的金花葵花样品进行分离鉴定,得到 46 个化合物。王瑞君等<sup>[21]</sup>利用甲醇超声提取金花葵干花、花苞和鲜花样品,经超高效液相串联四极杆飞行时间质谱分离鉴定出包括牡荆素、金丝桃苷、槲皮素、红景天苷、芦丁、异槲皮素、杨梅素、槲皮素-3'-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷等在内 58 个黄酮类化合物。与已报道的金花葵黄酮类化合物<sup>[2, 24-25]</sup>比对可知,超声协同双水相提取物中有 13 种黄酮类化合物首次得以鉴定,分别是香叶木苷、表儿茶素、圣草酚、染料木黄酮、(+)-脱甲氧基天竺葵、(2S)-甘草素、卡利诺 A、3-叔丁基-5-甲基邻苯二酚、5,7-二羟基黄酮、川陈皮素、水飞蓟素、橘皮素、二氢杨梅素。综上,菜芙蓉原料和提取工艺的差异可能是导致提取黄酮种类及抗氧化性不同的主要原因。

#### 2.4 不同提取方法制备的菜芙蓉花黄酮抗氧化活性比较

为了评价超声协同双水相法的提取效果,将其与双水相法、超声辅助法和醇提法进行比较,结果见表 5。

由表 5 可知,超声辅助法、双水相法和超声协同双水相法提取的黄酮含量均高于传统的醇提法,分别提高 3.24% ( $P>0.05$ )、14.62% ( $P<0.05$ )、28.22% ( $P<0.05$ )。

表 5 不同提取方法制备的菜芙蓉花黄酮抗氧化性比较

Table 5 Antioxidant properties of flavonoid from *A. manihot* (L.) Medic flower prepared by different extraction techniques

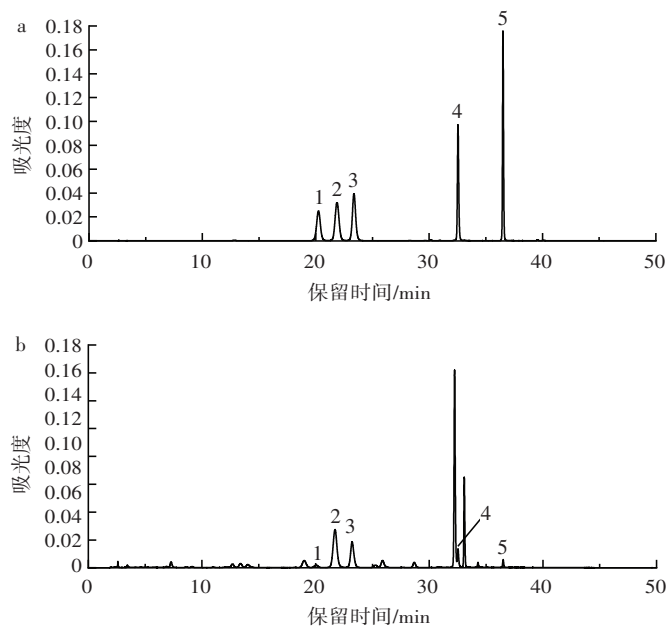
提取方法	黄酮含量/ (mg/g)	EC <sub>50</sub> /( $\mu$ g/ mL)		
		DPPH· 清除率	ABTS <sup>+</sup> · 清除率	平均清除率
超声协同 双水相法	43.94 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	6.37 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	17.71 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>	12.04 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>
双水相法	39.28 $\pm$ 1.74 <sup>b</sup>	6.83 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	21.55 $\pm$ 1.49 <sup>ab</sup>	14.19 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>
超声辅 助法	35.38 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	7.60 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	22.15 $\pm$ 3.91 <sup>ab</sup>	14.88 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>
醇提法	34.27 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>	12.75 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>	27.52 $\pm$ 4.75 <sup>a</sup>	20.14 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>

注:同列不同小写字母表示组间差异显著, $P<0.05$ 。

抗氧化能力随着黄酮含量的增加而增强。超声协同双水相法提取的黄酮对 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率的 EC<sub>50</sub> 值较醇提法的黄酮分别降低了 50.04% 和 35.65% ( $P<0.05$ ),平均清除率 EC<sub>50</sub> 则降低了 40.22% ( $P<0.05$ ),显示出较强的抗氧化能力。Li 等<sup>[26]</sup>利用 4 种不同方法提取苹果渣中的多酚,发现随着提取温度的升高,多酚单体的种类及抗氧化性都会降低。在本研究中,醇提法提取温度(70 °C)高于超声协同双水相法(50 °C),黄酮含量及抗氧化性均下降,可能是由于部分黄酮降解导致。

#### 2.5 菜芙蓉花黄酮主要成分与抗氧化活性的相关性分析

优化工艺条件下提取的菜芙蓉花黄酮 HPLC 分离图谱见图 8。



a. 标准品; b. 样品。1. 芦丁; 2. 金丝桃苷; 3. 异槲皮苷; 4. 杨梅素; 5. 槲皮素。

图 8 HPLC 图谱

Fig.8 HPLC chromatogram

由图8可知,5个菜芙蓉花主要黄酮成分色谱峰的分离度和峰形良好,通过HPLC分析比较标准品与菜芙蓉花黄酮样品的保留时间与峰面积,可以测定菜

芙蓉黄酮中主要黄酮成分含量。菜芙蓉花主要黄酮成分定量分析结果见表6。

由表6可知,芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、杨梅素和

表6 菜芙蓉花主要黄酮成分定量分析

Table 6 Content of main flavonoid compounds in *A. manihot* flower extracts analyzed by HPLC

黄酮成分	保留时间/min	回归方程	相关系数	线性范围/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	含量/( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
芦丁	20.046	$y=12\ 052.707x-8\ 531.083$	0.997 1	3.14~50.20	814.54
金丝桃苷	21.711	$y=19\ 839.085x-19\ 177.875$	0.996 9	2.63~42.10	7 109.03
异槲皮苷	23.211	$y=18\ 954.798x-18\ 472.500$	0.997 3	2.80~44.80	4 319.32
杨梅素	32.526	$y=35\ 934.721x-68\ 896.667$	0.995 1	1.55~24.80	1 138.73
槲皮素	36.501	$y=44\ 075.919x-69\ 717.167$	0.996 9	1.62~25.85	549.40

槲皮素含量分别为814.54、7 109.03、4 319.32、1 138.73、549.40  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

分别以芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、杨梅素和槲皮素的含量为标准,对黄酮提取液进行梯度稀释,测定不同质量浓度条件下5种黄酮成分对3种自由基的清除率以及总还原力,分析相关性系数。主要成分与抗氧化活性的相关性分析见表7。

表7 主要成分与抗氧化活性的相关性分析

Table 7 Correlation between antioxidant activities and main flavonoids content

项目	DPPH·清除率	ABTS <sup>+</sup> ·清除率	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·清除率	总还原力
芦丁含量	0.908**	0.998**	0.982**	0.985**
金丝桃苷含量	0.977**	0.999**	0.997*	0.999**
异槲皮苷含量	0.965**	0.998**	0.912**	0.998**
杨梅素含量	0.945**	0.999**	0.943**	0.995**
槲皮素含量	0.930**	0.998**	0.979**	0.995**
DPPH·清除率		0.913**	0.721**	0.948**
ABTS <sup>+</sup> ·清除率			0.898**	0.989**
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·清除率				0.876**

注:\*表示相关性显著, $P<0.05$ ;\*\*表示相关性极显著, $P<0.01$ 。

由表7可知,5种组分与DPPH·、ABTS<sup>+</sup>·和O<sub>2</sub><sup>-</sup>·清除率和总还原力都表现出较高的正相关性,其中金丝桃苷含量高,且与抗氧化活性的相关性较强,故金丝桃苷可能是菜芙蓉花黄酮发挥抗氧化作用的主要单体。

### 3 讨论与结论

当机体中的活性氧自由基与抗氧化保护机制之间的关系发生变化时,便会产生氧化应激与损伤,进而导致癌症、糖尿病、心血管疾病和神经系统疾病的产生<sup>[27]</sup>。黄酮是一类广泛存在于植物中的具有C3-C6-C3结构的二苯基发色酮化合物。黄酮类化合物具有极强的抗氧化能力,黄酮与其抗氧化活性的构效关系可能与C环中的C2-C3双键和4-羰基、羟基、O-甲基

化和/或糖基化有关<sup>[28]</sup>。菜芙蓉花含有丰富的黄酮类化合物,是黄酮类化合物提取的优选原料<sup>[29]</sup>。采用不同工艺提取的黄酮提取率、单体组成和生物活性也会存在差异<sup>[30]</sup>。

本研究采用超声协同乙醇-硫酸铵双水相提取菜芙蓉花黄酮,运用单因素试验和响应面法优化提取工艺,得出最佳提取条件为硫酸铵质量分数20%、乙醇质量分数31%、菜芙蓉花粉质量0.5 g、超声功率210 W、超声温度50℃、超声时间40 min。在此条件下,菜芙蓉花黄酮提取率达98.31%,黄酮含量达(43.94±1.48) mg/g。在此条件下,清除DPPH自由基和ABTS<sup>+</sup>自由基的EC<sub>50</sub>值分别为(6.37±0.44)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和(17.71±1.41)  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用此工艺获得的黄酮提取物中含有芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、杨梅素和槲皮素,其中含量最高的金丝桃苷对DPPH自由基、ABTS<sup>+</sup>自由基和超氧阴离子自由基清除率和总还原力表现出较高的相关性。UPLC-Orbitrap-MS分析结果表明,传统的醇提法鉴定出59个黄酮类化合物,而超声协同双水相法共鉴定出63个,增加的4个化合物分别为川陈皮素、橘皮素、(2S)-甘草素、3-叔丁基-5-甲基邻苯二酚。这些差异化合物可能是赋予超声协同双水相黄酮提取物高抗氧化活性的原因。

超声协同双水相法具有提取率高、成本低廉、操作简便等优势,是一种极具应用潜力的高效提取活性物质的方法,为菜芙蓉花黄酮大规模工业化提取提供参考。本研究目前仅通过自由基清除率来评估超声协同双水相菜芙蓉花黄酮提取物的抗氧化能力,后续将通过分子对接模拟预测黄酮单体与相关蛋白质结合的方式,并进行细胞保护作用试验,以研究黄酮提取物对细胞内氧化应激程度的影响。这将有助于更全面地阐明菜芙蓉花黄酮的抗氧化机制,进一步推动其作为天然抗氧化剂在功能性食品或药品开发等方面的应用。

### 参考文献:

[1] LUAN F, WU Q H, YANG Y, et al. Traditional uses, chemical con-

- stituents, biological properties, clinical settings, and toxicities of *Abelmoschus manihot* L.: A comprehensive review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1068.
- [2] 王瑞君, 田雨, 吴佳文, 等. 金花葵花中药用成分分析[J]. *天然产物研究与开发*, 2022, 34(4): 588-597, 721.  
WANG Ruijun, TIAN Yu, WU Jiawen, et al. Analysis of medicinal components in the flower of *Hibiscus manihot* L[J]. *Natural Product Research and Development*, 2022, 34(4): 588-597, 721.
- [3] YIN S X, MEI Y Q, WEI L F, et al. Comparison of multiple bioactive constituents in the *Corolla* and other parts of *Abelmoschus manihot*[J]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1864.
- [4] 王霞, 叶强, 郑英杰, 等. 金花葵的化学成分研究简述[J]. *中国林副特产*, 2020(4): 86-87, 90.  
WANG Xia, YE Qiang, ZHENG Yingjie, et al. Brief research on the chemical constituents of *Hibiscus manihot*[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, 2020(4): 86-87, 90.
- [5] 宋彩萍. 金花葵全产业链发展新模式的探索[J]. *农业技术与装备*, 2020(9): 23-24, 26.  
SONG Caiping. Exploration of new development mode of whole industry chain of *Hibiscus manihot* L[J]. *Agricultural Technology & Equipment*, 2020(9): 23-24, 26.
- [6] 王虹娟, 周晨雨, 冯茜等. 乙醇/磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )双水相提取核桃青皮多糖工艺及其抗氧化活性的研究[J]. *饲料工业*, 2024, 45(7): 106-114.  
WANG Hongjuan, ZHOU Chenyu, FENG Qian, et al. Study on extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from walnut peel by ethanol/ $K_2HPO_4$  in aqueous two-phase[J]. *Feed industry*, 2024, 45(7): 106-114.
- [7] 于建丽, 王汝华, 孟琬星, 等. 桑叶黄酮的双水相萃取及其抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(9): 32-39.  
YU Jianli, WANG Ruhua, MENG Wanxing, et al. Aqueous two-phase extraction of mulberry leaf flavonoids and their antioxidant activity[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(9): 32-39.
- [8] 郭杰, 王瑞雪, 郝楠, 等. 响应面法优化超声波辅助双水相提取黑果枸杞原花青素工艺[J]. *北京联合大学学报*, 2020, 34(4): 85-92.  
GUO Jie, WANG Ruixue, HAO Nan, et al. Optimization of ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of proanthocyanidins from *Lycium ruthenicum* Murr. by response surface methodology[J]. *Journal of Beijing Union University*, 2020, 34(4): 85-92.
- [9] FU X Q, MA N, SUN W P, et al. Microwave and enzyme co-assisted aqueous two-phase extraction of polyphenol and lutein from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 123: 296-302.
- [10] SANTOS REZENDE Y R R, NOGUEIRA J P, SILVA T O M, et al. Enzymatic and ultrasonic-assisted pretreatment in the extraction of bioactive compounds from monguba (*Pachira aquatic* Aubl) leaf, bark and seed[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 109869.
- [11] WEI Y Q, SUN M M, FANG H Y. Dienzyme-assisted salting-out extraction of flavonoids from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam[J]. *Industrial Crops and Products*, 2019, 127: 232-236.
- [12] 石统帅, 吴小杰, 钟明旭, 等. 超声辅助双水相萃取黑果腺肋花楸果实抗氧化成分[J]. *中南林业科技大学学报*, 2023, 43(1): 191-202.  
SHI Tongshuai, WU Xiaojie, ZHONG Mingxu, et al. Ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction of antioxidant components from *Aroni melanocarpa*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2023, 43(1): 191-202.
- [13] 郑墨钰, 王浩宇, 肖亚楠, 等. 响应面法优化菊花类黄酮微波辅助提取工艺[J]. *北方园艺*, 2023(22): 84-93.  
ZHENG Zhaoyu, WANG Haoyu, XIAO Yanan, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids from *Chrysanthemum* by response surface methodology[J]. *Northern Horticulture*, 2023(22): 84-93.
- [14] 黄梅桂, 徐云巧, 张忠明, 等. 薰衣草残渣中黄酮的超声辅助提取工艺及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(1): 214-220.  
HUANG Meigui, XU Yunqiao, ZHANG Zhongming, et al. Flavonoids extracted by ultrasonic assisted method from lavender residue and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(1): 214-220.
- [15] 刘威良, 高秀, 徐晴芳, 等. 超声辅助提取火棘干果的总黄酮及其体外抗氧化作用[J]. *甘肃农业大学学报*, 2024, 59(2): 304-312.  
LIU Weiliang, GAO Xiu, XU Qingfang, et al. Ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from dried *Pyracantha fortuneana* fruit and *in vitro* evaluation of their antioxidant activity[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2024, 59(2): 304-312.
- [16] 吕凤为, 黄莉, 孔琳. 加工工序对香椿芽抗氧化性影响的研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(6): 6-10.  
LI Fengwei, HUANG Li, KONG Lin. Effect of different processing approaches on antioxidant activity of *Toona sinensis* Buds[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(6): 6-10.
- [17] 刘宇, 戴沅霖, 马越, 等. 金银花粗多糖提取工艺优化及其抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(7): 188-196.  
LIU Yu, DAI Yuanlin, MA Yue, et al. Extraction process optimization and antioxidant activity evaluation of crude polysaccharides from *Lonicera japonica*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(7): 188-196.
- [18] LAI X Y, LIANG H, ZHAO Y Y, et al. Simultaneous determination of seven active flavonols in the flowers of *Abelmoschus manihot* by HPLC[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2009, 47(3): 206-210.
- [19] 葛水莲, 陈建中.  $C_2H_5OH-(NH_4)_2SO_4$  双水相萃取太行菊总黄酮及其抑菌活性[J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 227-234.  
GE Shuilian, CHEN Jianzhong. Extraction of flavonoids from *Opisthopappus taihangensis*(Ling) Shih by  $C_2H_5OH-(NH_4)_2SO_4$  aqueous two-phase system and the antibacterial activity[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(3): 227-234.
- [20] 吕博威, 王翠芳, 霍红雁, 等. 响应面法优化双水相萃取沙葱中总黄酮的工艺条件[J]. *中国调味品*, 2022, 47(4): 122-127.  
LYU Bowei, WANG Cuifang, HUO Hongyan, et al. Optimization of the aqueous two-phase extraction process of total flavonoids from *Allium mongolicum* regel by response surface methodology[J]. *China Condiment*, 2022, 47(4): 122-127.
- [21] 张会佳, 侯相竹, 张涵, 等. 黄芩多糖复合酶提取工艺优化及其 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(17): 181-189.  
ZHANG Huijia, HOU Xiangzhu, ZHANG Han, et al. Optimization of complex enzyme extraction process of *Astragalus* polysaccharides and its  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(17): 181-189.
- [22] 朱帅, 张水峰, 盛华栋, 等. 基于响应面分析的微波水解-亲水作用色谱法测定肉中羟脯氨酸含量[J]. *分析实验室*, 2024, 43(10): 1443-1451.  
ZHU Shuai, ZHANG Shuifeng, SHENG Huadong, et al. Determination of L-hydroxyproline in meat by microwave hydrolysis-hydrophilic interaction chromatography based on response surface analysis[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2024, 43(10): 1443-1451.
- [23] 诸爱士, 沈林芬, 赵军子. 响应面法优化酸提小米多糖工艺与模型诊断[J]. *浙江科技学院学报*, 2019, 31(1): 42-49, 57.

- ZHU Aishi, SHEN Linfen, ZHAO Junzi. Optimization of acid extraction technology of polysaccharides from foxtail millet by response surface method and diagnosis of model[J]. Journal of Zhejiang University of Science and Technology, 2019, 31(1): 42-49, 57.
- [24] 杨雷. 金花葵成分快速全分析及其潜在抗炎活性物质筛选[D]. 延吉: 延边大学, 2022.
- YANG Lei. Rapid and complete analysis the components of *Abelmoschus manihot* and screening its potential anti-inflammatory active substance[D]. Yanji: Yanbian University, 2022.
- [25] 张迪文, 马开, 田萍. UPLC-MS/MS 法同时测定金花葵中 11 个活性成分[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(5): 780-786.
- ZHANG Diwen, MA Kai, TIAN Ping. Simultaneous determination of 11 active components in *Aurea Helianthus* by UPLC-MS/MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(5): 780-786.
- [26] LI W, YANG R L, YING D Y, et al. Analysis of polyphenols in apple pomace: A comparative study of different extraction and hydrolysis procedures[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 147: 112250.
- [27] OKODUWA S I R, ABDULWALIYU I, IGIRI B E, et al. Multi-therapeutic potential of flavonoids as an essential component in nutraceuticals for the treatment and management of human diseases[J]. Phytomedicine Plus, 2024, 4(2): 100558.
- [28] TIZAZU A, BEKELE T. A review on the medicinal applications of flavonoids from *Aloe* species[J]. European Journal of Medicinal Chemistry Reports, 2024, 10: 100135.
- [29] 陈亮, 辛秀兰, 李晔, 等. SBC 法测定金花葵黄酮的含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 107-110.
- CHEN Liang, XIN Xiulan, LI Ye, et al. Determination of total flavonoid contents of *Hibiscus manihot* L. with SBC method[J]. Food Research and Development, 2016, 37(17): 107-110.
- [30] LV M W, YANG Y, CHOISY P, et al. Flavonoid components and anti-photoaging activity of flower extracts from six *Paeonia* cultivars[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 200: 116707.

加工编辑:张昱

收稿日期:2024-04-19