

◆ 研究类 ◆

基于响应面法的台湾香荚兰总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究^{*}杨一山^{1,2}, 唐健民¹, 秦惠珍¹, 罗亚进³, 邓振海³, 柴胜丰^{1**}

(1. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006; 2. 桂林医学院药学院, 广西桂林 541004; 3. 广西雅长兰科植物国家级自然保护区管理中心, 广西百色 533209)

摘要:为更系统、科学地开发和利用台湾香荚兰(*Vanilla somai* Hayata)资源, 选取提取时间、乙醇浓度、料液比3个因素为自变量, 总黄酮含量为因变量, 并利用三因素三水平的响应面法优化台湾香荚兰总黄酮的提取工艺; 以L-抗坏血酸作阳性对照, 测定台湾香荚兰总黄酮对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的清除能力和总还原力。研究表明, 台湾香荚兰中总黄酮的最佳提取工艺为提取时间37.5 min, 乙醇浓度45.6%, 料液比1:50.7 (g/mL)。总黄酮含量实测为1.19%, RSD值为0.65%。抗氧化试验结果表明, 台湾香荚兰中总黄酮对DPPH自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的IC₅₀值分别为0.0123 mg/mL、0.0159 mg/mL、0.0326 mg/mL, 总还原能力为L-抗坏血酸的79.2%。台湾香荚兰中总黄酮的提取工艺稳定、可行, 且具有较好的重现性, 模型预测值与实测值基本一致, 其总黄酮具有良好的抗氧化能力, 具有广阔的开发利用前景。

关键词:台湾香荚兰 总黄酮 单因素试验 正交设计 抗氧化活性

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2022)02-0197-09

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20220622.012

香荚兰属(*Vanilla* Plum ex Mill)作为兰科中具有较高经济价值的属之一, 全球已知约有70种。目前我国共发现4种香荚兰属种质资源, 分别是台湾香荚兰(*Vanilla somai* Hayata)、越南香荚兰(*V. anamica*)、大香荚兰(*V. siamensis*)和深圳香荚兰(*V. shenzhenica*)。台湾香荚兰(*Vanilla somai* Hayata)

主要分布于林下、溪边林下或岩壁上^[1]。据民间记载, 台湾香荚兰具有一定的药用价值, 其花中含有的挥发油具有解热的功效, 民间常用其新鲜的花汁涂抹全身治疗高热不退, 此外其花汁用来涂抹头发可达到固发的效果^[2]。目前对台湾香荚兰活性物质的研究鲜有报道, 为更系统、科学地开发和利用台湾香荚兰

收稿日期: 2022-01-06

* 广西创新驱动项目子课题(桂科AA19254007-4)和广西林业科技推广示范项目(桂林科字[2021]第28号)资助。

【作者简介】

杨一山(1998-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事药用植物化学成分分析研究, E-mail: 1214104853@qq.com。

【**通信作者】

柴胜丰(1980-), 男, 博士, 研究员, 主要从事珍稀濒危植物保育及可持续利用研究, E-mail: sfchai@163.com。

【引用本文】

杨一山, 唐健民, 秦惠珍, 等. 基于响应面法的台湾香荚兰总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 广西科学院学报, 2022, 38(2): 197-205.

YANG Y S, TANG J M, QIN H Z, et al. Study on Extraction Process Optimization of Total Flavonoids from *Vanilla somai* Hayata Based on Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2022, 38(2): 197-205.

资源,对其黄酮等活性物质的研究十分有意义。黄酮类化合物广泛存在于植物中,因其具有较好的抗氧化能力,被广泛应用于食品、保健品等行业。黄酮类化合物还具有良好的抗肿瘤、抗炎镇痛、抗病毒等功效^[3],在机体的免疫系统调节方面发挥着巨大的作用^[4],因此在医药领域也颇受欢迎。铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)^[5]、广东石豆兰(*Bulbophyllum kwangtungense*)^[6]等作为传统的兰科药用植物,含有丰富的黄酮类活性成分,近年来对其黄酮类活性成分的研究也在逐步深入。与此同时,其他兰科植物黄酮类成分的分析研究也在陆续开展。现阶段,关于台湾香荚兰药用价值的记载还仅限于民间,尚未被《中国药典》记载,国内外有关其总体的药用价值和化学成分的相关文献还较少。本研究拟采用超声辅助提取法和响应面法确定台湾香荚兰总黄酮的最佳提取工艺,并测定台湾香荚兰总黄酮的DPPH自由基清除率、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除率、超氧阴离子自由基($\text{O}_2\cdot^-$)清除率和总还原力,以评价其抗氧化能力,为台湾香荚兰资源的开发和综合利用提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

芦丁对照品(B20771-100 mg,上海源叶生物科技有限公司,HPLC \geq 98%),无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、L-抗坏血酸、DPPH、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢、三羟基氨基甲烷(Tris)、邻苯三酚、盐酸、磷酸盐缓冲液、三氯乙酸、铁氰化钾、三氯化铁等试剂均为分析纯。台湾香荚兰(*Vanilla somai* Hayata)全株采自广西雅长兰科植物国家级自然保护区。

仪器:TU-1901型双光束紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司;DL-720E智能超声波和万分之一电子分析天平购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-S4数显恒温水浴锅购自金坛双捷实验仪器厂;QE-100高速粉碎机购自浙江屹立工贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

将采集到的台湾香荚兰洗净,在60℃的条件下烘干48 h,粉碎后过60目筛,制成样品粉末,备用。

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取0.0125 g芦丁对照品,用60%乙醇定

溶于25 mL的容量瓶中,摇匀,制成0.500 mg/mL的对照品溶液。

1.2.3 供试品溶液的制备

准确称取0.5 g样品粉末,按照1:50(g/mL)的料液比,加入50%乙醇25 mL,在60℃、300 W的条件下超声辅助提取30 min,过滤,复提3次,然后定容于100 mL容量瓶中,即得。

1.2.4 最大吸收波长的确定

精密吸取1.2.2节对照品溶液和1.2.3节供试品溶液各2 mL,分别置于25 mL容量瓶中,各瓶中加入5%亚硝酸钠溶液2 mL,摇匀后放置6 min,加入5%硝酸铝溶液2 mL,摇匀后放置6 min,加入4%氢氧化钠溶液4 mL,摇匀后用60%乙醇稀释至刻度线,放置15 min后,用蒸馏水代替供试品溶液并以相同方法处理后的空白试剂作为参比溶液,于300-600 nm波长下扫描,发现在510 nm处吸光值最大,故选择510 nm作为最大吸收波长。

1.2.5 标准曲线的制备

分别精密吸取0.0 mL、0.4 mL、0.8 mL、1.2 mL、1.6 mL对照品溶液置于25 mL容量中,用60%乙醇加至2.0 mL,按照1.2.4节方法加样操作,于510 nm下测定吸光值。以芦丁的浓度(mg/mL)为横坐标,吸光值作为纵坐标,制作标准曲线,并计算回归方程。得到回归方程: $y = 11.743x + 0.002$ ($R^2 = 0.9993$)。

1.3 单因素试验

1.3.1 提取时间对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

准确称取样品粉末0.5 g,按照1:50(g/mL)的料液比,加入50%乙醇25 mL,在60℃、300 W的条件下分别超声辅助提取10 min、30 min、60 min、90 min、120 min,过滤,复提3次,然后定容于100 mL的容量瓶中。之后,按照1.2.4节方法加样操作,于510 nm处测定吸光值,最后计算出不同提取时间下的总黄酮含量。每种处理做3组重复。选取最佳提取时间,进行下一步单因素试验。

1.3.2 乙醇浓度对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

准确称取样品粉末0.5 g,按照1:50(g/mL)的料液比,分别加入40%、50%、60%、70%、80%的乙醇25 mL,在60℃、300 W的条件下分别超声辅助提取30 min,过滤,复提3次,然后定容于100 mL的容量瓶中。之后,按照1.2.4节方法加样操作,于510 nm处测定吸光值,最后计算出总黄酮含量。每种处理做3组重复。选取最佳乙醇浓度,进行下一步单因

素试验。

1.3.3 料液比对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

准确称取样品粉末 0.5 g, 按照 1:20 (g/mL)、1:30 (g/mL)、1:40 (g/mL)、1:50 (g/mL)、1:60 (g/mL) 的料液比, 加入 50% 乙醇, 在 60℃、300 W 的条件下分别超声辅助提取 30 min, 过滤, 复提 3 次, 然后定容于 100 mL 的容量瓶中, 之后, 按照 1.2.4 节方法加样操作, 于 510 nm 处测定吸光值, 最后计算出总黄酮含量。每种处理做 3 组重复。

1.4 响应面分析

根据单因素试验结果, 利用 Design Expert 8.0.6 软件设计响应面试验。以提取时间(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)为自变量, 以台湾香荚兰的总黄酮含量(Y)为考察指标, 共计 17 个试验点进行组合试验, 因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface test factors and levels

水平 Level	A: 提取时间(min) A: Extraction time (min)	B: 乙醇浓度(%) B: Ethanol concentration (%)	C: 料液比(g/mL) C: Solid-liquid ratio (g/mL)
-1	10	30	1:40
0	30	50	1:50
1	60	70	1:60

1.5 抗氧化活性的测定

根据以上试验结果, 采用最佳提取工艺对台湾香荚兰中的总黄酮进行提取, 并将提取液(0.059 5 mg/mL)稀释成 0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.03 mg/mL、0.04 mg/mL、0.05 mg/mL 5 个浓度的样品测试液, 用于对台湾香荚兰总黄酮的抗氧化活性进行综合评价。

1.5.1 台湾香荚兰总黄酮对 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除能力的测定参考宋佳敏等^[7]的方法, 并稍做调整。分别取 5 个浓度的 4 mL 样液于试管中, 加入等体积的 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液, 充分混匀后, 在室温下避光保存 30 min, 用无水乙醇作参比溶液(下同), 于 517 nm 处测定样品液中的吸光值, 记为 A_1 ; 4 mL 样液与无水乙醇等体积混合后测定吸光值, 记为 A_2 ; 用 4 mL 蒸馏水代替样液, 与 4 mL 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液混合后测定吸光值, 记为 A_0 。以相同浓度的 L-抗坏血酸作阳性对照。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%。$$

1.5.2 台湾香荚兰总黄酮对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力的测定参考 Fenton 反应体系^[8], 并稍做调整。取 2.0 mL 不同浓度梯度的样品溶液, 依次加入 1.0 mL 2.5 mmol/L 的水杨酸溶液、1.0 mL 5 mmol/L 的 FeSO_4 溶液和 2.0 mL 蒸馏水, 充分混匀后加入 1.0 mL 5 mmol/L 的 H_2O_2 溶液来启动反应, 在 37℃ 恒温水浴 30 min 后, 用蒸馏水作参比溶液(下同), 于 510 nm 处测定吸光值, 记为 A_s ; 用 1.0 mL 蒸馏水代替 H_2O_2 溶液处理的样品溶液, 测定的吸光值记为 A_b ; 用 2.0 mL 蒸馏水代替样品溶液, 测定的吸光值记为 A_p 。以相同浓度梯度的 L-抗坏血酸作阳性对照。

$$\text{羟基自由基}(\cdot\text{OH})\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_p}\right) \times 100\%。$$

1.5.3 台湾香荚兰总黄酮对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力

超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除能力的测定参考张德华等^[9]的邻苯三酚自氧化法。取 1.0 mL 不同浓度的样品溶液, 加入 5.0 mL Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 值为 8.2, 25℃ 水浴 20 min), 再加入 0.5 mL 25 mmol/L 的邻苯三酚溶液, 混匀后于 25℃ 条件下水浴 5 min, 立即加入 0.2 mL 8 mol/L 的 HCl 来终止反应, 用蒸馏水作参比溶液(下同), 于 320 nm 处测定吸光值, 记为 A_q ; 用 0.5 mL 蒸馏水代替邻苯三酚, 测定的吸光值记为 A_g ; 用 1.0 mL 蒸馏水代替样品溶液, 作空白对照, 记为 A_f 。以相同浓度梯度的 L-抗坏血酸作阳性对照。

$$\text{超氧阴离子自由基}(\text{O}_2^{\cdot-})\text{清除率} = \left(1 - \frac{A_q - A_g}{A_f}\right) \times 100\%。$$

1.5.4 台湾香荚兰总黄酮总还原力测定

总还原力的测定参考朱成豪等^[10]的方法。取 2.0 mL 不同浓度梯度的样品溶液, 先加入 2.5 mL 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 值为 6.6), 再加入 2.5 mL 1% 的铁氰化钾溶液, 混匀后在 50℃ 条件下水浴 20 min, 迅速冷却, 加入 2.5 mL 10% 的三氯乙酸溶液来终止反应。取 2.5 mL 的上清液, 加入 2.5 mL 的蒸馏水和 0.5 mL 0.1% 的 FeCl_3 溶液, 混匀, 静置 10 min 后, 用蒸馏水作参比溶液, 于 700 nm 下测定吸光值。以相同浓度梯度的 L-抗坏血酸作阳性对照。

1.6 数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件进行数据处理与分析,绘图采用 Origin 2019 软件。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取时间对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

由图 1 可知,台湾香荚兰的总黄酮含量随着提取时间的增加呈现先增加后降低的趋势,在提取时间为 30 min 时,总黄酮含量达到最高值 1.053%,之后,随着提取时间继续增加,总黄酮的含量则逐渐降低。

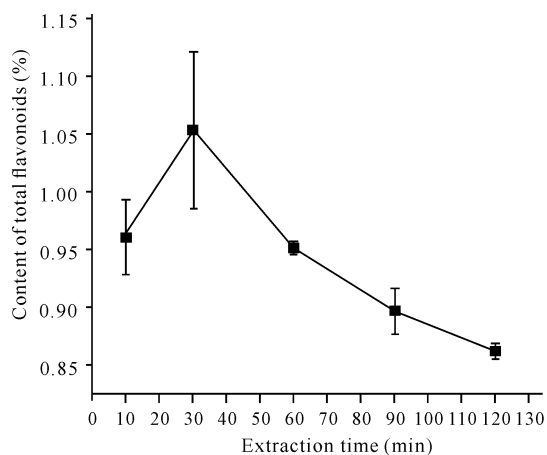


图 1 提取时间对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of extraction time on content of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata

2.1.2 乙醇浓度对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

由图 2 可知,台湾香荚兰总黄酮含量随着乙醇浓度增加呈现先增加后降低的趋势,在乙醇浓度为 50% 时,总黄酮含量达到最高值 1.250%。在此之后,随着乙醇浓度继续增加,总黄酮含量逐渐降低。

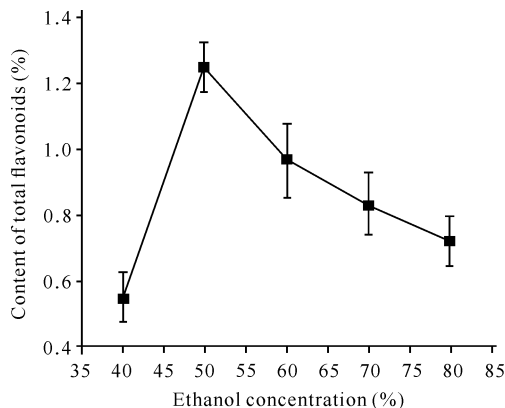


图 2 乙醇浓度对台湾香荚兰黄酮含量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on content of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata

2.1.3 料液比对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

由图 3 可知,台湾香荚兰总黄酮含量随着料液比的增加呈现先增加后降低的趋势,当料液比增加到 1:50 (g/mL) 时,总黄酮含量达到最高值 0.962%,当料液比继续增加时,总黄酮含量呈现降低的趋势。

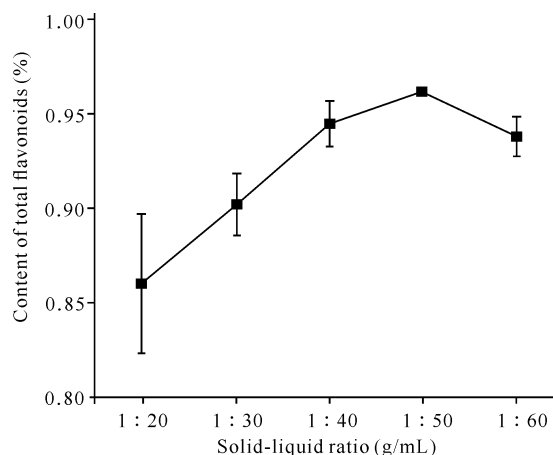


图 3 料液比对台湾香荚兰总黄酮含量的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on content of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面试验结果

根据表 1 设定的水平和因素,共计 17 个试验点,其中 12 个为析因点,5 个为零点。各个水平下总黄酮含量见表 2。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and result

试验号 Test number	A: 提取时间 (min) A: Extraction time (min)	B: 乙醇浓度 (%) B: Ethanol concentration (%)	C: 料液比 (g/mL) C: Solid-liquid ratio (g/mL)	总黄酮含量 (%) Content of total flavonoids (%)
1	60	50	1:40	0.957
2	10	50	1:60	0.841
3	35	70	1:40	0.906
4	35	50	1:50	1.068
5	35	70	1:60	0.906
6	35	50	1:50	1.125
7	35	50	1:50	1.242
8	10	30	1:50	0.896
9	60	70	1:50	0.829
10	60	50	1:60	0.925
11	35	30	1:40	1.030
12	60	30	1:50	0.853
13	35	50	1:50	1.278
14	35	30	1:60	1.027
15	10	70	1:50	0.564
16	35	50	1:50	1.345
17	10	50	1:40	0.667

由表3数据可知:模型中 F 值为7.65, $P = 0.0069 < 0.01$,且失拟误差的 P 值为 $0.9094 > 0.05$,两者表明模型具有极显著的统计学意义并且失拟性不显著,试验结果受未知因素的影响较小;模型的相关系数 $R^2 = 0.9077$,表明模型具有良好的可信度;修正系数 $R^2_{Adj} = 0.7891$,表示该模型可以解释78.91%的试验数据。对表3中的数据进行二项多元回归拟合,得到回归方程: $Y = 1.21 + 0.075A - 0.075B + 0.018B + 0.077AB - 0.051AC + (7.250E - 0.04)BC - 0.27A^2 - 0.15B^2 - 0.090C^2$,其中台湾香莢兰总黄酮含量用 Y 表示。由回归方程可知,因素 A^2 对含量 Y 具有极显著的影响,因素 B^2 对含量 Y 具有显著的影响,其他因素的影响效果不明显,表明各单因素与台湾香莢兰总黄酮含量 Y 之间存在着复杂的关系。结合表3中的数据和回归方

程可知,3个单因素对台湾香莢兰总黄酮含量 Y 的影响大小为乙醇浓度 $B >$ 提取时间 $A >$ 料液比 C 。

2.2.2 响应面交互作用分析

利用Design Expert 8.0.6软件,对 A 、 B 、 C 3个因素进行交互并分析比较,分别做出 AB 、 AC 、 BC 3个等高线图和响应面三维曲线图。由图4可知,在一定范围内,随着各因素数值的增加,总黄酮含量(响应值)也会随之增加;达到最高点后随着各因素数值继续增加,总黄酮含量(响应值)则会减少。坡度的大小,表明两个因素的交互程度,坡度越大,两个因素的交互作用就越强,反之则弱。两个因素形成的等高线越接近椭圆形,表示两者的交互作用越显著。由此可知,提取时间(A)与乙醇浓度(B)的交互效果大于提取时间(A)和料液比(C)的交互效果,大于乙醇浓度(B)和料液比(C)的交互效果,即 $AB > AC > BC$ 。

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
Model	0.061	9	0.068	7.65	0.0069**
A	0.044	1	0.044	5.02	0.0600
B	0.045	1	0.045	5.09	0.0587
C	2.466E-003	1	2.466E-003	0.28	0.6139
AB	0.024	1	0.024	2.67	0.1463
AC	0.011	1	0.011	1.19	0.3106
BC	2.103E-006	1	2.103E-006	2.376E-004	0.9881
A^2	0.31	1	0.31	35.19	0.0006**
B^2	0.097	1	0.097	11.01	0.0128*
C^2	0.034	1	0.034	3.86	0.0901
Residual	0.062	7	8.850E-003		
Misfit error	7.116E-003	3	2.372E-003	0.17	0.9094
Pure error	0.055	4	0.014		
Total error	0.67	16	0.068		
$R^2 = 0.9077$	$R^2_{Adj} = 0.7891$		0.044		

Note: * $P < 0.05$, significant; ** $P < 0.01$, extremely significant

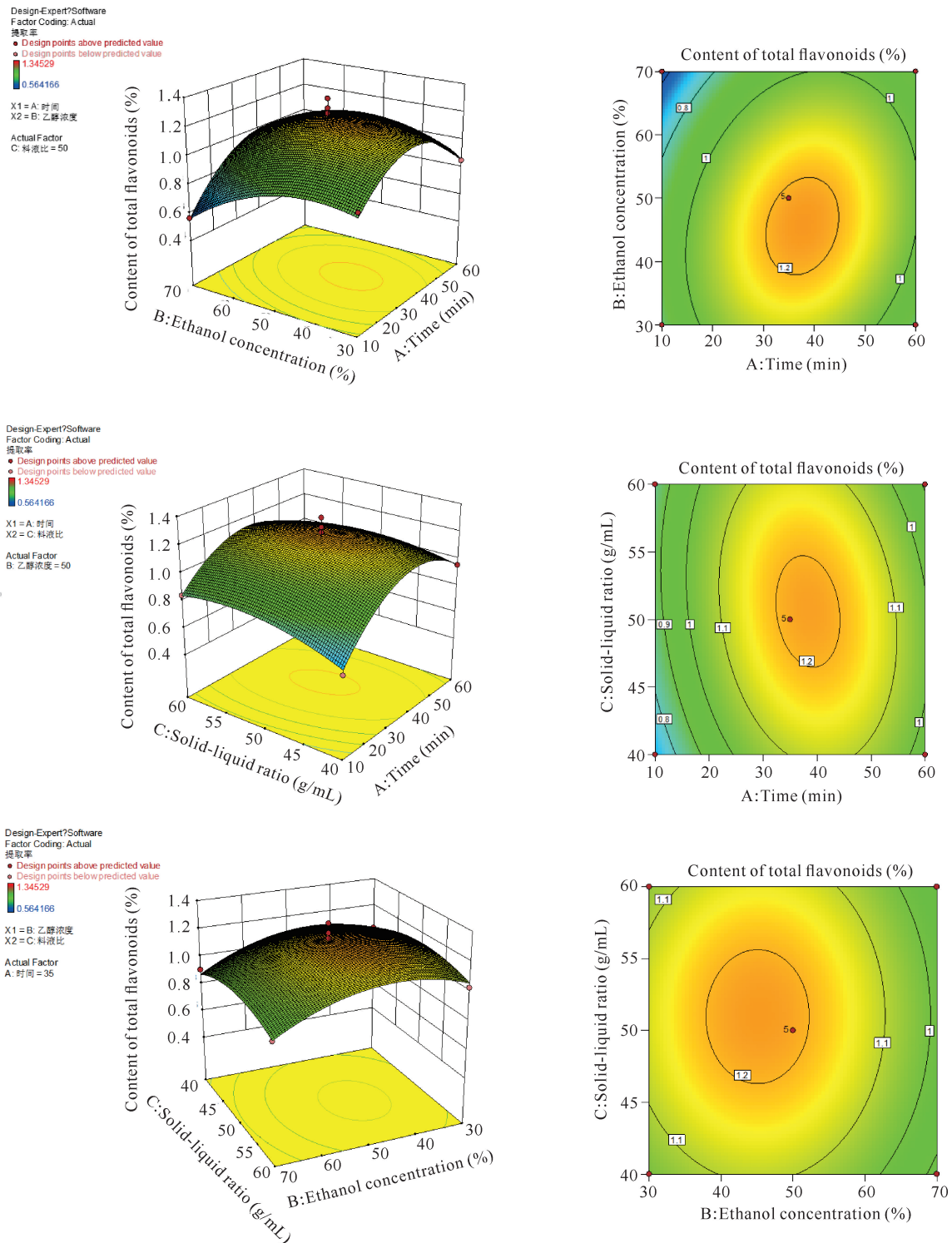


图4 交互因素对台湾香荚兰总黄酮含量影响的响应面图

Fig. 4 Response surface diagrams of interaction factors on content of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata

2.2.3 优化与验证试验结果

根据以上响应面模型和结果分析,得出台湾香荚兰总黄酮的最佳提取条件:提取时间为 37.5 min,乙醇浓度为 45.6%,料液比为 1:50.7 (g/mL)。在此条件下,模型预测台湾香荚兰的总黄酮含量为

1.22%。为方便试验,将试验条件调整为 38 min,乙醇浓度为 46%,料液比为 1:51 (g/mL),在此条件下进行 3 次平行验证试验,得到台湾香荚兰总黄酮的实际含量为 1.19%,RSD 值为 0.65% ($n=3$),与模型预测含量相差 0.03%,表示该模型具有较高的可

靠性,且提取工艺的重现性较好。

2.3 台湾香莢兰总黄酮的抗氧化活性

2.3.1 对 DPPH 自由基清除能力

由图 5 可知,当浓度为 0.01–0.04 mg/mL 时,台湾香莢兰总黄酮对 DPPH 自由基的清除能力随着浓度的增加逐渐增强,其清除率从 42.1% 增加到 90.6%,在此之后,总黄酮对 DPPH 自由基的清除率趋于平缓。L-抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力基本保持在 90% 以上,且变化的趋势较为平缓。总黄酮和 L-抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力,都是先增加后趋于平缓,两者在趋于平缓后,其清除能力相差较小,表明台湾香莢兰总黄酮对 DPPH 自由基具有较好的清除能力。将 0.01–0.04 mg/mL 的样品浓度(X_1)与该浓度梯度下所对应的总黄酮对 DPPH 自由基的清除率(Y_1)进行线性拟合,得到回归方程: $Y_1 = 1599.3X_1 + 30.387$ ($R_1^2 = 0.9506$),则总黄酮对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 0.0123 mg/mL。

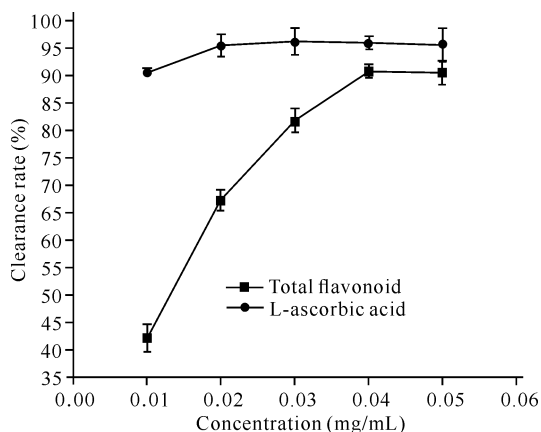


图 5 台湾香莢兰总黄酮对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 5 Scavenging ability of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata to DPPH

2.3.2 对羟基自由基清除能力

由图 6 可知,当浓度为 0.01–0.03 mg/mL 时,随着浓度的增加,台湾香莢兰总黄酮对羟基自由基的清除能力逐渐增强,但趋势较为平缓,其清除率从 46.8% 增加到 59.1%;当浓度为 0.03–0.05 mg/mL 时增加较快,清除率从 59.1% 增加到 76.5%。L-抗坏血酸对羟基自由基的清除能力基本保持在 85% 以上且变化较小。台湾香莢兰总黄酮对羟基自由基的清除能力明显低于同浓度的 L-抗坏血酸。将样品浓度(X_2)与总黄酮对羟基自由基的清除率(Y_2)进行线性拟合,得到回归方程: $Y_2 = 753.13X_2 + 37.992$ ($R_2^2 = 0.991$),则总黄酮对羟基自由基的 IC_{50} 值为

0.0159 mg/mL。

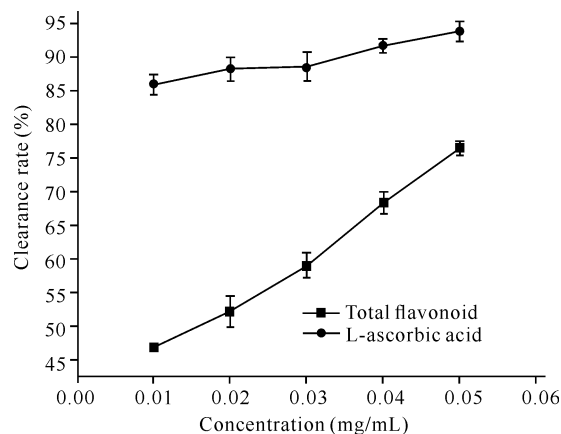


图 6 台湾香莢兰总黄酮对羟基自由基($\cdot OH$)的清除能力

Fig. 6 Scavenging ability of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata to hydroxyl radical ($\cdot OH$)

2.3.3 超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)清除能力

由图 7 可以看出,当浓度为 0.01–0.05 mg/mL 时,随着浓度的增加,台湾香莢兰总黄酮对 $O_2^- \cdot$ 的清除能力也随之增强,清除率从 40.2% 增加到 57.3%,且两者存在一定的线性关系。当 L-抗坏血酸的浓度为 0.01–0.03 mg/mL 时,清除率增加得较快;当浓度为 0.03–0.05 mg/mL 时,清除率的增加相对变缓。总黄酮对 $O_2^- \cdot$ 的清除能力低于同浓度的 L-抗坏血酸,但两者相差不大。将样品浓度(X_3)与总黄酮对 $O_2^- \cdot$ 的清除率(Y_3)进行线性拟合,得到回归方程: $Y_3 = 432.44X_3 + 35.902$ ($R_3^2 = 0.9989$),则总黄酮对 $O_2^- \cdot$ 的 IC_{50} 值为 0.0326 mg/mL。

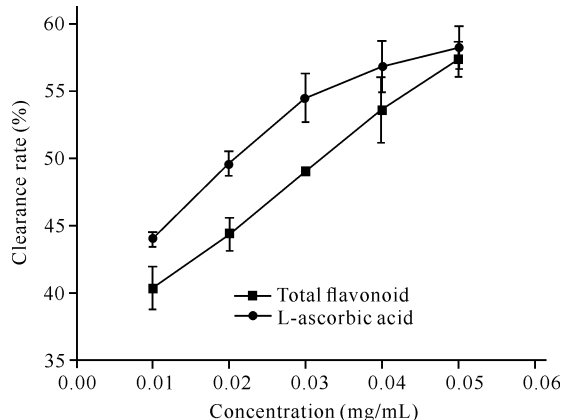


图 7 台湾香莢兰总黄酮对超氧阴离子自由基的清除能力

Fig. 7 Scavenging ability of total flavonoids from *Vanilla somai* to superoxide anion $O_2^- \cdot$

2.3.4 总还原力

以 L-抗坏血酸为对照,测定台湾香莢兰总黄酮的总还原力,结果如图 8 所示。随着总黄酮浓度的升

高,其还原能力也随之升高,且两者存在一定的线性关系。通过对比可以发现,总黄酮的总还原能力略低于同浓度的 L-抗坏血酸。对总黄酮和 L-抗坏血酸总还原力进行线性拟合,得到回归方程分别为 $Y_4 = 11.454X_4 + 0.0149$ ($R_4^2 = 0.998$)、 $Y_5 = 19.995X_5 - 0.171$ ($R_5^2 = 0.991$)。当吸光值为 0.5 时,对应总黄酮和 L-抗坏血酸的浓度分别为 0.042 mg/mL、0.034 mg/mL,可以得到总黄酮的总还原力为 L-抗坏血酸的 79.2%。

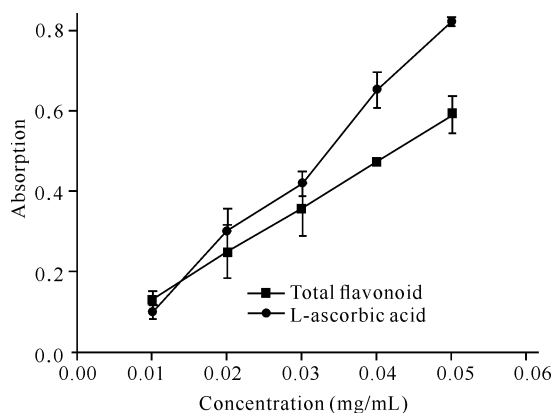


图 8 台湾香荚兰总黄酮的总还原力

Fig. 8 Total reducing ability of total flavonoids from *Vanilla somai* Hayata

3 讨论

目前,总黄酮的提取方法主要有乙醇回流提取法、浸提法、超声辅助提取法和超临界萃取法等。本研究以台湾香荚兰为原料,采用超声辅助提取法提取其总黄酮。超声辅助提取是利用超声波的机械效应、空化效应以及热效应,加速分子的运动速度和穿透力,从而增加有效物质的溶出,超声辅助提取相对于其他提取方法,如回流法、浸渍法等,具有提取效率高、操作简单等优点。本研究将乙醇作为总黄酮的提取溶剂,符合黄酮类化合物易溶于乙醇等有机溶剂的特点,在一定范围内,总黄酮的含量随着乙醇体积分数的增加而增加,当超过一定限度后,过高的乙醇浓度使植物细胞外的渗透压大于细胞内,从而限制有效物质的溶出;就提取时间而言,一方面提取时间的增加一定程度上可以增加总黄酮的溶出,使提取效率提高,另一方面,超声时间的延长,可能会使部分黄酮类化合物结构被破坏以及增加其他类型化合物溶出,从而降低黄酮类化合物的含量;适当的料液比可以增加目标产物的溶出,而过大的料液比不但使产物的含量下降,还会造成溶剂的浪费。本研究通过单因素试验

得到最佳试验点,再经过软件设计得到 17 个试验线和完整连续的面,最终在面中得到最佳值。通过响应面试验,不仅可以使目标产物的提取率达到最大,还节省了生产成本。

通过研究发现,台湾香荚兰中总黄酮的含量为 1.19%,其总黄酮的还原能力为 L-抗坏血酸的 79.2%,对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子自由基的 IC_{50} 值分别为 0.012 3 mg/mL、0.015 9 mg/mL、0.032 6 mg/mL。与广东石豆兰^[11]、石仙桃 (*Pholidota chinensis* Lindl.)^[12] 等兰科药用植物相比,台湾香荚兰中的总黄酮具有较为突出的抗氧化能力,但总黄酮的类型还不明确,需要进一步分离和鉴定。

4 结论

本研究采用超声辅助提取的方法,对台湾香荚兰中的总黄酮进行提取与测定,并采用单因素试验和响应面交互试验相结合的方法,得出 3 个单因素对台湾香荚兰中总黄酮含量的影响大小为乙醇浓度(B) > 提取时间(A) > 料液比(C),并确定了台湾香荚兰中总黄酮的最佳提取条件:提取时间为 37.5 min,乙醇浓度为 45.6%,料液比为 1:50.7 (g/mL)。在最佳提取条件下,台湾香荚兰中总黄酮的实际含量为 1.19%,与预测值相差 0.03%。台湾香荚兰总黄酮的还原能力为 L-抗坏血酸的 79.2%,对 DPPH 自由基、羟基自由基、超氧阴离子的 IC_{50} 值分别为 0.012 3 mg/mL、0.015 9 mg/mL、0.032 6 mg/mL,表明台湾香荚兰总黄酮具有较好的抗氧化活性,具有很好的开发利用前景。

参考文献

- [1] 梁淑云,吴刚,杨逢春,等. 香荚兰属种质研究与利用现状[J]. 热带农业科学,2009,29(1):54-58.
- [2] 王旭红,余国奠. 中国兰科药用植物[J]. 中国野生植物资源,1993(4):15-22.
- [3] 张纪宁,欧阳艳. 黄酮类化合物的提取工艺研究进展[J]. 伊犁师范学院学报(自然科学版),2008(2):27-30.
- [4] 杨杰,沙金丹,高翔,等. 黄酮类化合物的免疫调节作用及机制[J]. 动物营养学报,2017,29(12):4295-4300.
- [5] 高海立. 铁皮石斛叶黄酮提取纯化工艺优化及抗氧化性研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2019.
- [6] 苗永美,简兴,汪雁,等. 广东石豆兰不同溶剂提取物抗氧化及与总黄酮、总酚含量的关系[J]. 核农学报,2020,34(5):1038-1046.

- [7] 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.
- [8] 潘继生, 邓家云, 张棋翔, 等. 羟基自由基高级氧化技术应用进展综述[J]. 广东工业大学学报, 2019, 36(2): 70-77, 85.
- [9] 张德华, 邓辉, 乔德亮. 植物多糖抗氧化体外实验方法研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(4): 747-751.
- [10] 朱成豪, 唐健民, 韦霄, 等. 鳞尾木中总黄酮含量测定及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(20): 168-175.
- [11] 苗永美, 钱立生, 汪雁, 等. 响应面法优化广东石豆兰总黄酮提取工艺及提取物抗氧化性[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(7): 3180-3189.
- [12] 鞠玉旋, 谢倩, 陈清西. 石仙桃总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(11): 15-20, 27.

Study on Extraction Process Optimization of Total Flavonoids from *Vanilla somai* Hayata Based on Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity

YANG Yishan^{1,2}, TANG Jianmin¹, QIN Huizhen¹, LUO Yajin³, DENG Zhenhai³, CHAI Shengfeng¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi, 541004, China; 3. Guangxi Yachang Orchid National Nature Reserve Management Center, Baise, Guangxi, 533209, China)

Abstract: In order to develop and utilize *Vanilla somai* Hayata resources more systematically and scientifically, the extraction time, ethanol concentration and solid-liquid ratio were selected as independent variables, and the total flavonoids content was selected as the dependent variable and the extraction process of total flavonoids from *V. somai* Hayata was optimized by response surface methodology with three factors and three levels. With L-ascorbic acid as positive control, the DPPH radical, hydroxyl radical, superoxide anion radical scavenging ability and total reducing power of total flavonoids of *V. somai* Hayata were determined. The results show that the optimum extraction conditions of total flavonoids from *V. somai* Hayata were as follows: Extraction time was 37.5 min, ethanol concentration was 45.6%, and the ratio of solid to liquid was 1 : 50.7 (g/mL). The content of total flavonoids was 1.19% and the RSD value was 0.65%. The results of antioxidant test showed that the IC₅₀ values of total flavonoids in *V. somai* Hayata against DPPH free radical, hydroxyl free radical and superoxide anion free radical were 0.0123 mg/mL, 0.0159 mg/mL and 0.0326 mg/mL, respectively. The total reduction ability was 79.2% of L-ascorbic acid. The extraction process of total flavonoids from *V. somai* Hayata was stable, feasible and it had better reproducibility. The predicted values of the model were basically consistent with the measured values. Its total flavonoids had good antioxidant capacity and broad prospects for development and utilization.

Key words: *Vanilla somai* Hayata; total flavonoids; single factor experiment; orthogonal design; antioxidant activity

责任编辑: 陆雁