

麦积山野生刺五加多酚与黄酮的超声辅助提取与体外抗氧化活性的研究

王彦博,石 燕,袁毅君*

天水师范学院化学工程与技术学院,天水 741000

摘要:以麦积山野生刺五加为原料,研究了其有效成分总多酚和总黄酮的超声波辅助提取工艺及体外抗氧化活性。通过单因素试验和正交试验,确定最佳工艺条件为:超声时间 40 min、超声功率 600 W、提取温度 60 °C、料液比 1:35(g:mL),并对此条件进行三次平行验证实验,得出平均提取量为总多酚 25.21 ± 0.17 mg GAE/g 和总黄酮 28.11 ± 0.19 mg RE/g;以人工合成 V_c 为对照,进行了体外抗氧化活性的研究,得出提取物质量浓度达到 300mg/L 时,总抗氧化能力最大;提取物质量浓度达到 440.00 mg/L 时,DPPH 自由基清除能力最强,清除率为 94.52% ± 1.30%;提取物质量浓度达到 130.00 mg/L 时,超氧阴离子自由基(O₂⁻)清除能力最强,清除率为 86.71% ± 1.28%;提取物质量浓度达到 100.00 mg/L 时,羟基自由基(·OH)清除能力最强,清除率为 94.23% ± 1.53%。整体来看,野生刺五加提取物体外抗氧化能力显著强于人工合成的 V_c(P < 0.05)。

关键词:刺五加;多酚与黄酮;提取;抗氧化活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)12-2153-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.12.020

Ultrasonic assisted extraction of polyphenols and flavonoids from Maijishan wild *Acanthopanax* and their antioxidant activities *in vitro*

WANG Yan-bo, SHI Yan, YUAN Yi-jun*

School of Chemical Engineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741000, China

Abstract: Using Maijishan wild *Acanthopanax* as raw material, the parameters of ultrasonic assisted extraction process and the antioxidant activity *in vitro* of total polyphenols and flavonoids were studied. The better technological conditions as follows: ultrasonic time 40 min, ultrasonic power 600 W, ultrasonic temperature 60 °C, solid-liquid ratio 1:35 (g : mL). The process parameters were determined by using single factor test, orthogonal test, and three parallel validation experiments. The average extraction amount of total polyphenols is 25.21 ± 0.17 mg GAE/g and total flavonoids is 28.11 ± 0.19 mg RE/g. Using synthetic V_c as the control, the antioxidant activity *in vitro* was studied. The results showed that the total antioxidant capacity was the largest when the extract concentration reached 300 mg/L. When the concentration of extract reached 440.00 mg/L, DPPH free radical scavenging ability was the strongest, and the scavenging rate was 94.52% ± 1.30%. When the concentration of extract reached 130.00 mg/L, superoxide anion radical (O₂⁻) had the strongest scavenging ability, and the scavenging rate was 86.71% ± 1.28%. When the concentration of extract reached 100.00mg/L, the scavenging ability of hydroxyl radical (·OH) was the strongest, and the scavenging rate was 94.23% ± 1.53%. Overall, the antioxidant capacity of wild acanthopanax extract *in vitro* was significantly stronger than that of synthetic V_c (P < 0.05).

Key words: acanthopanax; polyphenols and flavonoids; extraction; antioxidant activity

刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Max-
im.) Harms 为五加科植物,野生资源丰富,全株均

可入药。因刺五加富含多种活性成分^[1],主要含有刺五加苷类、多糖、黄酮、木脂素、酚酸等^[1,2],Chen 等^[3]利用电喷雾质谱发现刺五加叶中存在槲皮苷、金丝桃苷、槲皮素和芦丁 4 种黄酮类化合物;Chen 等^[2]通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法从刺五加叶中鉴定出 30 个化合物,其中黄酮类化合物 9 个,有机酸

收稿日期:2019-07-22 接受日期:2019-11-27

基金项目:国家自然科学基金(81360619)

* 通信作者 E-mail:tsjenifer@163.com

类化合物 8 个,三萜及皂苷类化合物 2 个,木脂素类化合物 2 个,香豆素类化合物 3 个,氨基酸类化合物 3 个和其他类化合物 3 个,因此其被广泛应用于临床。大量药理研究表明:刺五加具有保护心脑血管^[4]、抗肿瘤^[5]、治疗糖尿病^[6]、抗疲劳^[7]、调节神经系统^[8]等作用。

天水市麦积山山区,野生刺五加资源丰富,每年 4~6 月,漫山遍野的野生刺五加就是人们的美味佳肴,当地人俗称它为“五撮典”,经天水师范学院生物科学与技术学院老师鉴定为野生刺五加。由于刺五加的嫩茎叶可以制做多种美味佳肴,故秦岭山脉一带居民将其作为一种功能性“药食同源”食品,很受欢迎。因此提取其中的天然活性物质并对它的抗氧化活性进行研究很有必要。

多酚与黄酮是植物特有的活性物质,已有研究表明多酚与黄酮类物质具有清除活性过氧自由基、延缓衰老、预防心血管疾病、抗癌、抗炎等生理功能^[9,10],所以含有多酚与黄酮的植物作为一种天然抗氧化剂,在食品、医药等领域被广泛关注和研究。

麦积山野生刺五加茎叶中多酚与黄酮的提取和抗氧化活性研究目前尚未见到文献报道。为充分利用资源,进一步提高其经济价值,本次实验原料来源于麦积山野生刺五加,选取茎叶为研究对象,利用超声辅助提取酚类与黄酮类物质,获取最佳提取工艺条件,在此基础上,测定其含量,并对最佳条件下的提取物做体外抗氧化活性研究。通过研究为麦积山野生刺五加的综合利用,生产天然抗氧化剂以及功能性食品的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生刺五加(*Acanthopanax*),5 月份采自天水市麦积山自然保护区。浓盐酸、硫酸、硝酸铝、亚硝酸钠、硫酸亚铁、碳酸钠、磷酸钠、钼酸铵、氢氧化钠、过氧化氢、无水乙醇、石油醚、邻苯三酚、水杨酸、抗坏

血酸(Vc)、Tris-HCl 萃取液,以上均为国药集团化学试剂有限公司产品 AR;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)标准品,美国 Sigma-Aldrich 公司;没食子酸标准品,中国药品生物制品检定所;芦丁标准品,北京化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

KQ-500VDB 型、KQ-700VDE 型三频数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;PTY-224/323 型电子天平,美国康州 HZ 电子科技有限公司;UV-2550 型,紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;DHG-9076A 型电热鼓风干燥箱,上海精密实验设备有限公司;KL04A 型离心机,上海安亭科学仪器厂;HH-S4 型数显恒温水浴,江苏省金坛市医疗仪器厂;RE-201 型旋转蒸发仪,上海锐欧仪器有限公司;FD-A10N-50 冷冻干燥机,上海胜卫电子科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

野生刺五加于 2018 年 5 月采自天水市麦积山区,只取茎和叶,40 °C 烘干、粉碎、过 60 目筛,于 60 °C 恒温干燥箱中干燥直到恒重,冷藏(4 °C)避光保存备用。

1.3.2 提取工艺

1.3.2.1 取上述备用原料,用石油醚脱脂后,以 70% 乙醇为溶剂,按实验所设计工艺条件进行超声提取,过滤,滤液用 5 000 rpm 离心 15 min,将上层清液,测定总多酚和总黄酮的含量。

1.3.2.2 按本实验所得到的最优条件进行提取,获得上层清液后旋转蒸发,浓缩后真空冻干 36 h,转入棕色瓶低温(-20 °C)避光保存,用于抗氧化实验。

1.3.3 多酚和黄酮的提取工艺优化

1.3.3.1 单因素试验

以总多酚与总黄酮提取量为考察指标,工艺参数选取如表 1 所示,每个因素水平均进行 3 次提取,平均值即为总多酚和总黄酮提取量。

表 1 单因素试验

Table 1 Single factor test

因素 Factor	水平 Level					
超声时间 Ultrasonic time(min)	10	20	30	40	50	60
超声功率 Ultrasonic power(W)	200	300	400	500	600	700
提取温度 Ultrasonic temperature(°C)	20	30	40	50	60	70
料液比 Solid-liquid ratio(g:mL)	1:20	1:25	1:30	1:35	1:40	1:45

1.3.3.2 正交试验

多酚和总黄酮的最佳工艺条件,正交实验因素水平见表2所示。

在单因素实验基础上,采用正交试验进行优化。设计 $L_9(3^4)$ 正交实验用以确定提取野生刺五加总

表2 正交试验因素与水平

Table 2 Factors and their coded levels used for orthogonal array design

水平 Level	因素 Factor			
	A 超声时间 Ultrasonic time (min)	B 超声功率 Ultrasonic power (W)	C 提取温度 Ultrasonic temperature (°C)	D 料液比 Solid-liquid ratio (g: mL)
1	30	400	40	1 : 30
2	40	500	50	1 : 35
3	50	600	60	1 : 40

1.3.4 总多酚含量的测定

采用福林-酚比色法^[11]测定。用70%乙醇配制没食子酸标准液质量浓度为0.250 0 mg/mL溶液。由表3可知,定容后60 °C水浴加热0.5 h,冷却后

暗处放置。取上层清液于760 nm处测定 $Y_{\text{吸光度}}$,得到标准曲线方程为 $Y = 3.990 1X + 0.051 3$, $R^2 = 0.998 2$,结果以没食子酸当量(mg GAE/g,以干质量计,下同)表示。线性范围为5.86~36.32 mg GAE/g。

表3 绘制福林-酚比色法标准曲线的相关数据

Table 3 The data of drawing standard curve for Folin-phenol colorimetry

试验编号 No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
没食子酸为标准溶液 Gallic acid is the standard solution(mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
福林-酚试剂 Folinol reagent(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
20%碳酸钠水溶液 20% Sodium carbonate solution(mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
去离子水溶液定容至 The deionized aqueous solution is constant volume to(mL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25

取1 mL刺五加样品液,按没食子酸标准曲线制作的方法测定总多酚 $Y_{\text{吸光度}}$,得总多酚浓度 X_1 ,按下式(1)计算:

$$\text{总多酚提取量(mg/g)} = \frac{X_1 \times V \times N}{M} \quad (1)$$

式中: X_1 —总多酚浓度(mg/mL), V —提取液体积(mL), N —稀释倍数, M —样品质量(g)

1.3.5 总黄酮含量的测定

采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法^[12]基础上改进。配制过程按表4依次加入,每步均需静置15 min,然后在510 nm波长处测 $Y_{\text{吸光度}}$,得到标准曲线方程为 $Y = 0.477 1X + 0.042 6$, $R^2 = 0.998 8$ 。结果以芦丁当量(mg RE/g)表示,线性范围为4.73~49.82 mg RE/g。

表4 绘制 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法标准曲线的相关数据Table 4 The data of drawing standard curve for $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ colorimetry

试验编号 No.	0	1	2	3	4	5	6
0.15 mg/mL 芦丁标液 Rutin standard liquid	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
去离子水溶液 Deionized aqueous solution(mL)	10	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0
5% NaNO_2 溶液 Sodium nitrite solution(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 Aluminium nitrate solution(mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4% NaOH 溶液 Sodium hydroxide solution(mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
去离子水溶液定容至 The deionized aqueous solution is constant volume to(mL)	25	25	25	25	25	25	25

取 1 mL 刺五加样品液,按芦丁标准曲线制作的方法测定总黄酮 $Y_{\text{吸光度}}$,得总黄酮浓度 X_2 ,按下式(2)计算:

$$\text{总黄酮提取量 (mg/g)} = \frac{X_2 \times V \times N}{M} \quad (2)$$

式中: X_2 -刺五加总黄酮质量浓度 (mg/mL); N -稀释倍数; V -提取液体积 (mL); M -样品质量 (g)

1.3.6 野生刺五加体外抗氧化活性测定

1.3.6.1 总抗氧化能力的测定

参照文献配制磷钼试剂^[13]。所有实验用蒸馏水作空白参比溶液,相同质量浓度梯度的人工合成的 V_c 作为对照。用相同的方法按表 5 测定 $A_{\text{吸光度}}$ 。对照品 V_c 不需加热。

表 5 总抗氧化能力试验

Table 5 Total antioxidant capacity test

试验编号 No.	1	2	3	4	5	6	7
样品质量浓度 Sample mass concentration (mg/L)	25.0	50.0	100.0	150.0	200.0	250.0	300.0
磷钼试剂配制 Preparation of phosphomolybdenum reagent	取 16.50 mL 硫酸,5.32 g 磷酸钠,2.4717 g 钼酸铵,用蒸馏水溶解并定容至 500 mL,配制浓度为 0.6 mol/L 硫酸、28 mmol/L 磷酸钠和 4 mmol/L 钼酸的磷钼试剂。						
$A_{\text{吸光度}}$ 测定 Absorbance measurement	取样品各 0.8 mL,加入 8 mL 磷钼试剂,置于 90 °C 水浴锅 100 min,在 695 nm 波长处测定其吸光度。						
结论 Conclusion	吸光度越高,总抗氧化活性越强。						

1.3.6.2 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法自由基清除能力的测定

参考文献^[14] 配制 DPPH 溶液 (0.2 mmol/L,无水乙醇溶液溶解,现用现配),避光于室温条件下贮存。所有实验以蒸馏水作空白参比液。相同质量浓

度梯度的人工合成的 V_c 作为对照,用相同的方法测定(如表 6 所示),并按公式(3)计算其 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH}(\%) = \left(1 - \frac{A_j - A_k}{A_s}\right) \times 100\% \quad (3)$$

表 6 DPPH 自由基清除能力的试验

Table 6 Free radical scavenging ability of DPPH

试验编号 No.	1	2	3	4	5	6
样品浓度 Sample concentration (mg/L)	60.0	100.0	140.0	240.0	340.0	440.0
A_j	2.0 mL 样品溶液(不同质量浓度,下同),加入 0.2 mmol/L DPPH 溶液 2.0 mL,充分摇匀混合后于室温避光条件下反应 30 min 后,用无水乙醇作参比液,测定其在波长 517 nm 处的吸光度 A_j ,平行测定 3 次,计算平均值,下同。					
A_s	2.0 mL DPPH 溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合,作为空白组,测定其在波长 517 nm 处的吸光度 A_s 。					
A_k	2.0 mL 样品溶液与 2.0 mL 无水乙醇混合,测定其在波长 517 nm 处的吸光度 A_k 。					

1.3.6.3 超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 清除率测定

参考文献^[15] 的方法改进,实验过程如表 7 所示。所有实验均以 10 mmol/L HCl 溶液作空白参比溶液,相同质量浓度梯度的人工合成 V_c 作为对照,

用相同的方法测定,并按公式(4)计算超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 清除率。

$$O_2^{\cdot-} \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A_1 - \Delta A_2}{\Delta A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

表 7 超氧阴离子自由基清除能力的试验

Table 7 Superoxide anion free radical scavenging ability test

试验编号 No.	1	2	3	4	5	6
样品浓度 Sample concentration (mg/L)	30.0	50.0	70.0	90.0	110.0	130.0
ΔA_0	0.05 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.2) 2.5 mL,加蒸馏水 1.0 mL,加 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.5 mL,25 °C 水浴加热 10 min,迅速摇匀后每隔 30 s 于 325 nm 处测定 ΔA_0 至 4 min 后加入 8 mol/L HCl 终止,平行测定 3 次,取平均值。					
ΔA_1	0.05 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.2) 2.5 mL,加不同质量浓度的样品液 1.0 mL,加 30 mmol/L 邻苯三酚溶液 0.5 mL,后同上。					
ΔA_2	0.05 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.2) 2.5 mL,加不同质量浓度的样品液 1.0 mL,加 10 mmol/L HCl 溶液 0.5 mL,后同上。					

1.3.6.4 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率测定

参考文献^[16]的方法改进, 实验过程如表 8 所示。所有实验用蒸馏水作空白参比溶液, 相同质量浓度梯度的人工合成的 Vc 作为对照。用相同的方

法测定, 按公式(5) 计算羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除率。

$$\cdot\text{OH} \text{ 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_R - A_S}{A_V}\right) \times 100\% \quad (5)$$

表 8 羟基自由基清除能力的试验

Table 8 Hydroxyl free radical scavenging ability test

试验编号 No.	1	2	3	4	5	6
样品浓度 Sample concentration (mg/L)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0
A_R	2.0 mL 样品溶液(不同质量浓度, 下同), 加 2.0 mL 6 mmol/L 的硫酸亚铁溶液和 2.0 mL 6 mmol/L 的过氧化氢溶液, 静置 20 min, 加 6 mmol/L 的水杨酸溶液 2.0 mL, 充分摇匀混合, 在室温下静置 40 min, 无水乙醇作参比液, 在 510 nm 波长处测定其吸光度 A_R , 平行测定 3 次, 计算平均值, 下同。					
A_V	2.0 mL 无水乙醇代替样品溶液, 其余同上, 测定混合液的吸光度 A_V 。					
A_S	2.0 mL 无水乙醇代替水杨酸, 其余同上, 测定混合液的吸光度 A_S 。					

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

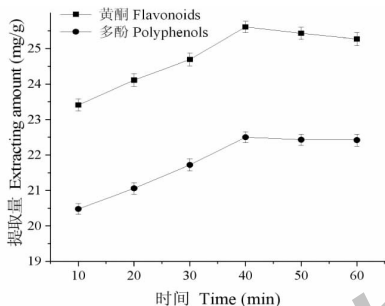


图 1 超声时间对总多酚与总黄酮提取量的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic time on the extraction efficiency of total polyphenols and total flavonoids

由图 1 可知, 总多酚与总黄酮提取量在超声提取时间为 10 ~ 40 min 之间时, 显著上升, 40 min 以后总多酚与总黄酮提取量趋于平稳。这可能是由于超声提取初期, 细胞破碎程度迅速增加, 使得提取液中总多酚与总黄酮含量不断增加。当超声时间超过 40 min 后, 刺五加总多酚与总黄酮已基本溶出, 因此提取量并未发生显著变化^[17]。故选择超声时间为 40 min, 此条件下总多酚提取量为 22.50 ± 0.15 mg GAE/g, 总黄酮提取量为 25.61 ± 0.16 mg RE/g。

由图 2 可得, 超声功率从 200 ~ 500 W 时, 总多酚提取量逐步增加, 当超声功率超过 500 W 时, 总多酚提取量逐渐下降, 这可能与超声波引起的“机械效应和空化效应”有关。导致酚类和黄酮类物质渗透速率加快^[17]。当超声功率超过 500 W 后, 过高的“空化效应”会破坏刺五加多酚和黄酮的结构, 同时杂质溶出增加, 导致总多酚和总黄酮提取量的有

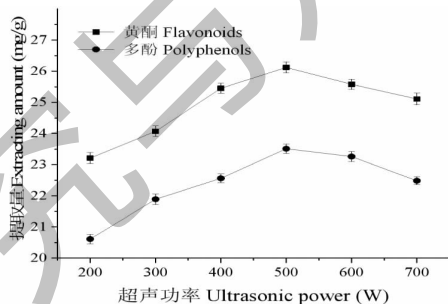


图 2 超声功率对总多酚与总黄酮提取量的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on the extraction efficiency of total polyphenols and total flavonoids

所下降。所以适宜超声功率选择 500 W, 此条件下总多酚提取量为 23.51 ± 0.15 mg GAE/, 总黄酮提取量为 26.12 ± 0.18 mg RE/g。

由图 3 可知, 当提取温度在 20 ~ 50 °C 时, 刺五加总多酚与总黄酮提取量显著上升, 但随着温度的进一步升高, 提取量逐步降低。这是由于温度在一定范围内升高时, 有利于多酚与黄酮类物质的溶解, 降低分子之间的粘滞度, 增加多酚与黄酮类物质

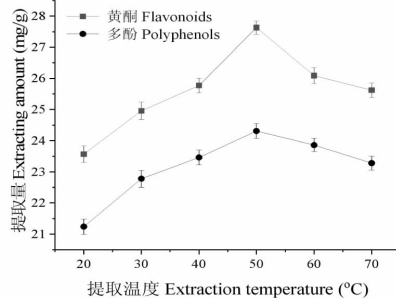


图 3 提取温度对总多酚与总黄酮提取量的影响

Fig. 3 Effect of extraction temperature on the extraction amount of total polyphenols and flavonoids

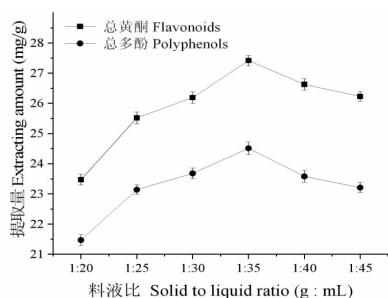


图4 料液比对总多酚与总黄酮提取量的影响

Fig. 4 Effect of solid to liquid ratio on the extraction efficiency of total polyphenols and total flavonoids

的溶出量。但温度过高,多酚与黄酮类物质结构的完整性会遭到破坏^[18]。反而使提取量有所下降,故选择适宜温度为 50 °C,此条件下总多酚提取量为 24.31 ± 0.21 mg GAE/g,总黄酮提取量为 27.60 ± 0.23 mg RE/g。

由图 4 可知,料液比在 1:20 ~ 1:35 (mL: g) 时,多酚与黄酮类物质提取量随着溶剂量的增加而增大,当液料比达到 1:35 (mL: g) 时,提取量达到最大(总多酚 24.51 ± 0.17 mg GAE/g;总黄酮 27.42 ±

0.21 mg RE/g);此后若继续增加溶剂的用量,总多酚与总黄酮提取量反而呈缓慢下降趋势,最后趋于稳定。这可能是由于溶剂在一定条件下有一定的溶解度,故随着溶剂量的增加提取量增加,液料比为 1:35 (mL: g) 时已达到溶出极限,继续增加溶剂的量则会溶解大量的色素、非多酚和非黄酮等醇溶性杂质,这可能降低了溶剂的溶出能力,而溶解的杂质也可能与溶解的多酚和黄酮在溶液中重新结合,从而降低了提取量。所以考虑提取成本和后续的回收操作,故选取液料比 1:35 (mL: g),此条件下总多酚的提取量为 24.51 ± 0.17 mg GAE/g;总黄酮的提取量为 27.42 ± 0.21 mg RE/g。

2.2 正交试验设计及结果

通过单因素试验,可知刺五加总多酚与总黄酮提取量受以上 4 个因素的影响较大,故设计 L₉(3⁴) 正交试验,来考察总多酚与总黄酮提取量,得到优组合条件,并对其进行三次平行验证实验。由表 9 可知 A₂B₃C₃D₂ 为提取最佳工艺条件,即超声时间 40 min、超声功率 600 W、提取温度 60 °C、料液比 1:35 (g: mL)。

表 9 正交试验设计及结果

Table 9 Orthogonal array design with experimental results

试验编号 No.	A 超声时间 Ultrasonic time (min)	B 超声功率 Ultrasonic power (W)	C 提取温度 Ultrasonic temperature (°C)	D 料液比 solid-liquid ratio (g: mL)	总多酚提取量 Total polyphenol leach (mg GAE/g)	总黄酮提取量 Total flavonoids extraction amount (mg RE/g)	
1	1	1	1	1	20.12	22.51	
2	1	2	2	2	20.91	23.94	
3	1	3	3	3	23.24	25.93	
4	2	1	2	3	21.01	24.01	
5	2	2	3	1	23.50	26.23	
6	2	3	1	2	20.93	24.75	
7	3	1	3	2	24.10	27.02	
8	3	2	1	3	19.21	21.61	
9	3	3	2	1	21.45	24.91	
K ₁ (总多酚), K ₁ (总黄酮)	64.27	72.38	65.23	73.54	60.26	68.87	
K ₁ (total polyphenols), K ₁ (total flavonoids)					65.07	73.65	
K ₂ (总多酚), K ₂ (总黄酮)	65.44	74.99	63.62	71.78	63.37	72.85	
K ₂ (total polyphenols), K ₂ (total flavonoids)					65.94	75.71	
K ₃ (总多酚), K ₃ (总黄酮)	64.76	73.54	65.62	75.59	70.84	79.18	
K ₃ (total polyphenols), K ₃ (total flavonoids)					63.46	71.55	
R ₀ (总多酚), R ₀ (总黄酮)	1.17	2.61	2.00	3.81	10.58	10.31	
R ₀ (total polyphenols), R ₀ (total flavonoids)					2.48	4.16	
因素主次顺序 Order of factor	总多酚 C > D > B > A			总黄酮 C > D > B > A			
	Total polyphenol			Total flavonoids			

续表 9 (Continued Tab. 9)

试验编号 No.	A 超声时间 Ultrasonic time (min)	B 超声功率 Ultrasonic power (W)	C 提取温度 Ultrasonic temperature (°C)	D 料液比 solid-liquid ratio (g: mL)	总多酚提取量 Total polyphenol leach (mg GAE/g)	总黄酮提取量 Total flavonoids extraction amount (mg RE/g)
优水平 Optimal level	A ₂	B ₃	C ₃	D ₂		
优组合 Optimal combination		A ₂ B ₃ C ₃ D ₂				

由表 10 可知,总多酚与总黄酮提取效果受超声温度影响显著,影响因素主次顺序为:C > D > B > A。

表 10 正交试验方差分析

Table 10 Analysis of variance of orthogonal experimental results

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 df	F 值 F value		P 值 P value	
			总多酚 Total polyphenolic	总黄酮 Total flavone	总多酚 Total polyphenolic	总黄酮 Total flavone
A 超声时间 (min) Ultrasonic time	0.130	2	0.240	1.023	1.891	< 0.1
B 超声功率 (W) Ultrasonic power	0.390	2	0.750	5.412	6.120	< 0.1
C 提取温度 (°C) Ultrasonic temperature	1.390	2	2.650	12.160	14.231	< 0.01
D 料液比 (g: mL) Solid-liquid ratio	0.756	2	1.320	8.124	9.741	< 0.05
总和 Sum	2.666	8	4.960			

注: $F_{0.10(2,2)} = 9.0$; $F_{0.05(2,2)} = 19.0$; $F_{0.01(2,2)} = 99.0$ 。

2.3 提取最佳工艺验证试验

由表 11 可知,按照最佳工艺条件 A₂B₃C₃D₂ 进行 3 次平行验证实验表明,此条件下总多酚与总黄酮提取量均高于以上 9 个试验组合,平均提取量为总多酚 25.21 ± 0.17 mg GAE/g,总黄酮 28.11 ± 0.19 mg RE/g。结果证明,在此工艺条件下提取,稳定可行。

2.4 总抗氧化能力

由图 5 可知,麦积山野生刺五加提取物的总抗氧化能力随其质量浓度增加逐步上升,表现出明显的量效关系。当提取物质量浓度在 25.00 ~ 150.00

mg/L 之间时,吸光度逐渐增大,抗氧化能力逐渐增强;当提取物质量浓度大于 150 mg/L 时,总抗氧化能力增加逐渐趋于平缓;当提取物质量浓度达到 300 mg/L 时,总抗氧化能力达到最大。整体来看,野生刺五加提取物的总抗氧化能力略强于人工合成的 V_c (P < 0.05)。

2.5 DPPH 自由基清除能力

由图 6 可知,麦积山野生刺五加提取物和人工合成 V_c 都有清除 DPPH 自由基的作用。对于刺五加来说,当提取物质量浓度在 60.00 ~ 140.00 mg/L 之间时,清除 DPPH 自由基的能力增强很快,清除率

表 11 验证性试验

Table 11 Verification test

试验编号 No.	样品量 Sample mass (g)	提取率 Extraction rate		平均值 Mean value	
		总多酚 Total polyphenolic (mg GAE/g)	总黄酮 Total flavone (mg RE/g)	总多酚 Total polyphenolic	总黄酮 Total flavone
1	2.0	25.09 ± 0.09	28.34 ± 0.08	25.21 ± 0.10	28.11 ± 0.10
2	2.0	25.30 ± 0.10	28.15 ± 0.12		
3	2.0	25.24 ± 0.11	27.84 ± 0.01		

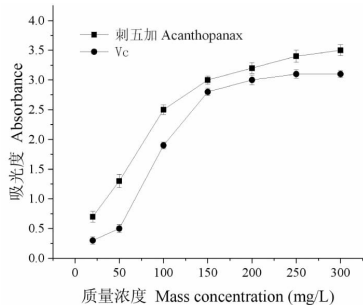


图5 刺五加提取物总抗氧化能力

Fig. 5 Total antioxidant capacity of extractive from *Acanthopanax*

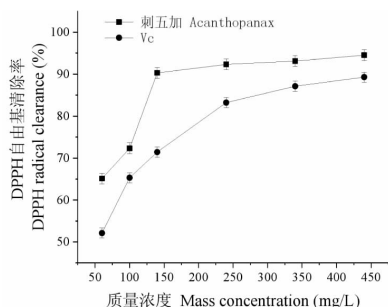


图6 刺五加提取物对 DPPH 自由基清除能力

Fig. 6 DPPH free radical scavenging ability of extractive from *Acanthopanax*

从 $65.12\% \pm 1.27\%$ 增加到 $90.29\% \pm 1.29\%$; 当提取物质量浓度在 140.00 mg/L 后清除率增加变平缓, 当提取物质量浓度在 440.00 mg/L 时, 清除率最大, 达到 $94.52\% \pm 1.30\%$ 。整体来看, 野生刺五加提取物对 DPPH 自由基清除能力显著强于人工合成的 V_c ($P < 0.05$)。

2.6 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力

由图 7 可知, 麦积山野生刺五加提取物和人工合成 V_c 都有清除 $O_2^{\cdot-}$ 自由基的作用。当刺五加提取物质量浓度小于 74.50 mg/L 时清除能力弱于人工合成 V_c ; 当提取物质量浓度为 74.50 mg/L 时, 刺五加提取物和人工合成 V_c 清除能力相同, 此时清除率达到 58.26% ; 当提取物质量浓度大于 74.50 mg/L 时, 刺五加提取物清除能力显著强于人工合成 V_c ($P < 0.05$); 当刺五加提取物质量浓度在 130.00 mg/L 时, 清除率最大, 达到 $86.71\% \pm 1.08\%$ 。整体来看, 野生刺五加提取物对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除能力显著强于人工合成的 V_c ($P < 0.05$)。

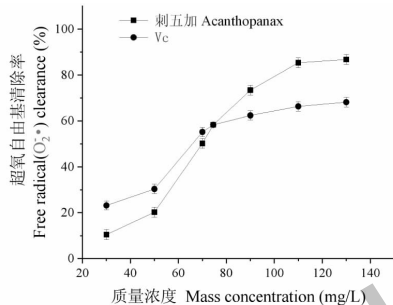
图7 刺五加提取物溶液对 $O_2^{\cdot-}$ 清除效果

Fig. 7 Superoxide anion free radical scavenging effect of extract from *Acanthopanax*

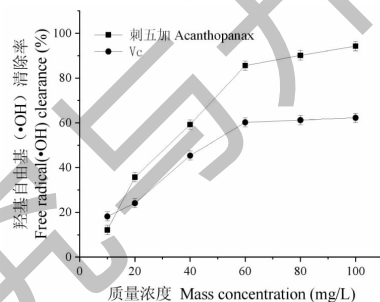
图8 刺五加提取物溶液对 $\cdot\text{OH}$ 清除效果

Fig. 8 Hydroxyl free radical scavenging effect of extract from *Acanthopanax*

2.7 羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力

由图 8 可知, 麦积山野生刺五加提取物和人工合成 V_c 都有清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的作用。当刺五加提取物质量浓度小于 14.00 mg/L 时, 清除能力弱于人工合成 V_c ; 当质量浓度等于 14.00 mg/L 时, 刺五加提取物和人工合成 V_c 清除能力相同, 此时清除率达到 20.0% ; 当提取物质量浓度大于 14.00 mg/L 时, 刺五加提取物清除能力显著强于人工合成 V_c ($P < 0.05$); 当刺五加提取物质量浓度在 $10.00 \sim 60.00 \text{ mg/L}$ 之间时, 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)能力增强很快, 清除率从 $12.12\% \pm 2.09\%$ 增加到 $85.52\% \pm 2.11\%$; 当提取物质量浓度在 60.00 mg/L 后清除率增加变平缓; 当提取物质量浓度在 100.00 mg/L 时, 清除率最大, 达到 $94.23\% \pm 1.53\%$ 。整体来看, 野生刺五加提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)清除能力显著强于人工合成的 V_c ($P < 0.05$)。

3 结论

本实验是以麦积山自然保护区野生刺五加为原料, 研究对象为刺五加中有效成分总多酚和总黄酮,

采用方法是用 70% 乙醇超声辅助提取。单因素实验做基础,通过正交试验对所选四个参数进行四因素三水平的工艺优化,得出最优组合为 $A_2B_3C_3D_2$,即超声时间 40 min、超声功率 600 W、提取温度 60 °C、料液比 1:35 (g:mL),并对此条件进行三次平行验证实验,平均提取量为总多酚 25.21 ± 0.17 mg GAE/g;总黄酮 28.11 ± 0.19 mg RE/g。此方法原料为野生刺五加茎叶粉末,成本较低,提取效果良好,适合工业生产。

近年来天然产物化学的研究热点之一就是植物中寻找抗氧化活性成分,并对其提取和药物效应进行研究。大量研究表明,植物多酚与黄酮类化合物是最主要的天然抗氧化剂^[19]。目前,对刺五加提取物药理效应方面研究较多,抗氧化活性方面研究较少,Tian 等^[20]研究表明,刺五加水提取物对 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot OH$)的清除率均好于维生素 C,对超氧负离子自由基($O_2^{\cdot -}$)也有一定的清除效果;Hu 等^[21]对刺五加茎叶提取物抗氧化活性研究表明,其对 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot OH$)、 NO^2 离子有一定的清除能力。本实验通过对麦积山野生刺五加提取物总抗氧化能力、DPPH 自由基清除能力、超氧负离子自由基($O_2^{\cdot -}$)和羟基自由基($\cdot OH$)清除能力的试验,证实其比人工合成 V_C 有更高的抗氧化活性,切无毒副作用,故可以作为天然抗氧化剂用于人们的日常生活,如食品、药品,化妆品等中,合理的开发对植物资源的综合利用具有一定的意义。

植物中多酚和黄酮类物质含量的高低除与它种类、结构有关外,还与采摘、保存、提取方法等因素有关,本实验只对麦积山野生刺五加的提取,抗氧化活性进行了初步研究,后续还需做很多研究工作,如活性成分的分离、各有效成分间的协同作用、活性关系等。

参考文献

- Bai X, Hu W, Jiang A, et al. Research advance on main active substance and pharmacological action of *Acanthopanax* [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2016, 39: 396-399.
- Chen HC, Wei WF, Huo J H. et al. Identification of chemical constituents of the leaves from *Acanthopanax senticosus* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39: 1536-1540.
- Chen M, Song F, Guo M. Identification of the flavonoid con-

- stituents from Leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2002, 23: 805-808.
- Xie Y, Zhang B, Zhang Y. Protective effects of *Acanthopanax* polysaccharides on cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanisms [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 72: 946-950.
- Jin H, Liu C, Fan L, et al. Effect of *Acanthopanax* polysaccharide on proliferation and apoptosis of human cervical cancer HeLa cells *in vitro* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2014, 36: 162-164.
- Fu J, Yuan J, Tu YY, et al. A polysaccharide from *Acanthopanax senticosus* improves the antioxidant status in alloxan-induced diabetic-mice [J]. *Carbohydr Poly*, 2012, 88: 517-521.
- Guan S, Ma J, Chu X, et al. Effects of total flavones from *Acanthopanax senticosus* on L-type calcium channels, calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes [J]. *Phytotherapy Res*, 2015, 29: 533-539.
- Nam Y, Lee D. Ameliorating effects of constituents from cortex *Acanthopanax radiceis* on memory impairment in mice induced by scopolamine [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(1): 57-62.
- Quinones M, Miguel M, Aleixandre A, et al. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 68: 125-131.
- Wang W, Dai GM, Li SM, et al. Optimization of total Flavonoid extraction from the invasive plant species *Praxelis clematidea* (Asteraceae) and its antibacterial activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1343-1348.
- Meot-Duros L, Christian M. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(1): 37-41.
- Chun OK, Kim DO, Lee CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums [J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51: 8067-8072.
- Qian CL, Hou SC, Ying JD, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Oenanthe javanica* and their antioxidant activity [J]. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37(10): 76-81.
- Zhang GQ, Guo XD, Xue WH, et al. Extraction and antioxidant activities of polyphenols from Tibetan wild *Polygonatum cirrhifolium* [J]. *Food Sci* (食品科学), 2017, 38: 236-241.
- Gan ZL, Ni YY, Guo R, et al. Separation and purification of rosehip polyphenols by macroporous resin and its antioxidant activity [J]. *Trans Chin Soci Agr Engin* (农业工程学报), 2015, 31: 298-306.
- Liu Q, Zhang WN, Zhu YY, et al. Comparison of the constitu-

- tions, distribution, and antioxidant activities of polyphenols from different varieties of tartary buckwheat seed produced from different regions of China[J]. *Sci Agr Sin*(中国农业科学), 2014, 47:2840-2852.
- 17 Zhang YJ, Yang TX, Wei AZ, et al. Accumulation patterns of total flavonoids, total polyphenol during growth of *Zanthoxylum bungeanum maxim.* and its antioxidant activities[J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*(西北植物学报), 2013, 33:620-625.
- 18 Hammi KM, 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 Chem*, 2015, 184:80-89.
- 19 Huang Q, Shen YX, Zhang CJ, et al. Correlation of the antioxidant property with the total phenolic content and total flavonoids of different *Dendrobium officinale* Dendrobium of cinale extracts[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2014, 20:438-442.
- 20 Tian SY, Yu CL, Xiu W, et al. Antioxidant activity of water extraction from *Acanthopanax senticosus*[J]. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2016, 37:110-113.
- 21 Hu CY, Fu Q. Study on the ultrasonic assisted extraction process and anti-oxidative activity of *Acanthopanax senticosus* stems and leaves [J]. *Fore Engin*(森林工程), 2018, 34(5):56-71.
-
- (上接第 2201 页)
- 53 Wu ZL, et al. Five rare dimeric sesquiterpenes exhibiting potential neuroprotection activity from *Vladimiria souliei*[J]. *Fitoterapia*, 2018, 128:192-197.
- 54 Fraga BM. Natural sesquiterpenoids [J]. *Nat Prod Rep*, 2013, 30:1226-1264.
- 55 Wu QX, et al. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family[J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23:699-734.
- 56 Li C, et al. Strategies toward the biomimetic syntheses of oligomeric sesquiterpenoids [J]. *J Org Chem*, 2014, 79:3289-3295.
- 57 Li C, et al. Biomimetic syntheses and structural elucidation of the apoptosis-inducing sesquiterpenoid trimers: (-)-ainsliatrimers A and B[J]. *Chem Sci*, 2013, 4:1163-1167.
- 58 Zhang W, et al. Total synthesis of absinthin[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127:18-19.