

五脉绿绒蒿总黄酮提取工艺优化、红外光谱分析及抗氧化活性评价

龙若兰^{1,2}, 李 朵^{1,2}, 冯 丹^{1,2}, 李佩佩^{1,2}, 孟晓萍¹, 孙 菁^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 西宁 810008;

²中国科学院大学, 北京 101408

摘要:以五脉绿绒蒿为研究对象,以总黄酮得率为指标,采用单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法优化五脉绿绒蒿总黄酮提取工艺,并对其提取液红外光谱及体外抗氧化能力进行了分析和评价。结果表明,五脉绿绒蒿总黄酮超声提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度 74%,超声时间 58 min,超声温度 64 °C,超声功率 160 W,液料比 1:50 (g/mL),该条件下五脉绿绒蒿中总黄酮得率为 65.04 ± 0.31 mg/g。提取液的红外光谱特征显示,在近红外谱区的 6 845、5 167、4 405、4 337、4 061、4 023 cm⁻¹以及中红外谱区的 3 354、2 975、1 647 cm⁻¹处的吸收峰为黄酮类物质的特征吸收峰。体外抗氧化活性结果显示,五脉绿绒蒿总黄酮提取液具有较好的抗氧化活性,清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 10.07 μg/mL,ABTS 法测得提取液的总抗氧化能力为 0.95 mmol/L;当提取液总黄酮浓度为 200 μg/mL 时,FRAP 值为 0.94 mmol/L。该提取工艺稳定可行,总黄酮得率高,抗氧化活性较好,可为五脉绿绒蒿资源深度开发利用提供科学依据。

关键词:五脉绿绒蒿;总黄酮;Box-Behnken 响应面法;红外光谱分析;抗氧化活性

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)Suppl-0001-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.S.001

Optimization of extraction process, the infrared spectroscopy analysis and antioxidant activity evaluation of total flavonoids from *Meconopsis quintuplinervia* Regel.

LONG Ruo-lan^{1,2}, LI Duo^{1,2}, FENG Dan^{1,2}, LI Pei-pei^{1,2}, MENG Xiao-ping¹, SUN Jing^{1*}

¹Qinghai Provincial Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resource, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ²University of Chinese Academy of Science, Beijing 101408, China

Abstract: This paper mainly aimed to establish an ultrasonic extraction method coupled with infrared spectral characteristic analysis so as to evaluate the antioxidant capacity of total flavonoids in an important Tibetan medicine *Meconopsis quintuplinervia* Regel. In this study, the single factor test combined with Box-Behnken response surface method was utilized to optimize the extraction method of total flavonoids in *M. quintuplinervia*. Then, the difference of infrared spectra between extraction solution and solvent was analyzed. Finally, DPPH, ABTS and FRAP methods were used to determine and evaluate the antioxidant capacity of the extraction solution. The results showed that total flavonoids yield was suitable when *M. quintuplinervia* was extracted 58 min in 74% ethanol with liquid-to-material ratio 1:50 (g/mL) at 64 °C and ultrasonic power 160 W. Under the above conditions, the yield of total flavonoids from *M. quintuplinervia* reached to 65.04 ± 0.31 mg/g. The results of infrared spectra analysis revealed that the absorption peaks of 6 845, 5 167, 4 405, 4 337, 4 061 cm⁻¹ and 4 023 cm⁻¹ in the near infrared spectra, and 3 354, 2 975 and 1 647 cm⁻¹ in the middle infrared spectra were characteristics of flavonoids. Meanwhile, the total flavonoids in *M. quintuplinervia* also had good antioxidant activity. The IC₅₀ value of scavenging DPPH free radicals was 10.07 μg/mL, the antioxidant capacity measured by the ABTS method was 0.95 mmol/L, and the FRAP value was 0.94

收稿日期:2021-10-26 接受日期:2021-12-14

基金项目:青海省科研基础条件平台项目(2020-ZJ-T05);中国科学院仪器功能开发技术创新项目(2022gl09);青海省中央引导地方科技发展资金计划(2022ZY012)

* 通信作者 E-mail:sunj@nwipb.cas.cn

mmol/L at the extracting concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This study provides a stable and feasible extraction method and the theoretical basis for the study of infrared spectral characteristic and antioxidant capacity of total flavonoids from *M. quintuplinervia*.

Key words: *Meconopsis quintuplinervia* Regel.; total flavonoids; Box-Behnken response surface method; infrared spectroscopy analysis; antioxidant activity

五脉绿绒蒿 (*Meconopsis quintuplinervia* Regel.) 为罂粟科 (Papaveraceae) 绿绒蒿属 (*Meconopsis*) 多年生草本植物, 藏音译名“欧贝完保”, 系藏药“吾巴拉”(或译“欧巴拉”“欧贝”) 类的正品^[1-3]。《晶珠本草》记载:“吾巴拉清肝肺热, 性凉、能解一切热病, 并能治热邪引起的喉阻塞”^[4]。《藏药志》中称, “吾巴拉”以全草入药, 微苦, 性寒味甘, 具有清热解毒、消炎利尿的功效, 用于治疗肺炎、肝炎、头痛、水肿等病症, 镇痛效果尤佳^[5]。现代药理研究表明, 五脉绿绒蒿具有多种生物活性成分, 如生物碱类、黄酮类、芳香酸类、挥发油类以及其他化学成分^[6]。其中, 黄酮类化合物是五脉绿绒蒿发挥抗炎、镇痛^[7,8]、保肝^[9,10]作用的重要药效基础物质。此外, 黄酮类化合物还具有抗氧化、抗癌、抗菌等生物活性, 其中抗氧化是黄酮类物质的主要活性之一^[11,12]。

目前, 植物中黄酮类化合物常用提取方法有浸提法、超声波辅助提取法^[13,14]、微波辅助提取法^[15]、回流提取法^[16]、酶辅助提取法^[17]等。近年来, 围绕绿绒蒿属植物的总黄酮提取工艺进行了众多研究工作。Ma 等^[18]采用响应面法优化了多刺绿绒蒿 (*Meconopsis horridula* Hook. f. et Thoms.) 总黄酮的超声提取工艺, 结果表明在乙醇浓度 70%、超声温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 60 min 条件下, 多刺绿绒蒿总黄酮得率为 3.21%。Xu 等^[19]利用响应面法优化了全缘叶绿绒蒿总黄酮的回流提取条件, 表明在乙醇体积分数 60%、液料比 25:1 (mL:g)、提取时间 1.5 h 条件下, 全缘叶绿绒蒿总黄酮得率为 0.123 mg/g。Liu 等^[20]比较了超声法、热回流法、浸提法、煎煮法、索氏提取法对红花绿绒蒿 (*Meconopsis punicea* Maxim.) 总黄酮得率的影响, 结果表明热回流法提取效果最好, 其次是煎煮法、超声法、索氏提取、浸提法。但热回流法耗时较长, 而超声提取法因其操作简便、效率高、无污染的优点得到了广泛应用^[16]。目前围绕五脉绿绒蒿总黄酮超声提取工艺的相关研究工作尚未开展。

因此, 本研究利用响应面法对五脉绿绒蒿总黄酮提取工艺进行了优化, 分析了提取液的红外光谱

特征, 并对其体外抗氧化能力进行了评价, 以期在五脉绿绒蒿资源深入开发利用及药理药效学研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验所用五脉绿绒蒿样品于 6~7 月花期期间采自青海省海北州祁连县, 所采样品经清洗、阴干、全草粗粉碎后, 过 80 目筛, 放入干燥器备用。原植物标本由中国科学院西北高原生物研究所孙菁研究员鉴定为罂粟科 (Papaveraceae) 绿绒蒿属 (*Meconopsis*) 五脉绿绒蒿 (*Meconopsis quintuplinervia* Regel.)。

1.2 仪器与试剂

仪器: 傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet iS50, ThermoFisher, 美国); Carry60 紫外—可见光分光光度计 (Agilent 公司, 美国); 5810R 离心机 (Eppendorf 公司, 德国); ME104 电子精密分析天平 (Mettler Toledo, 瑞士); 粉碎机 (北京中兴伟业仪器有限公司, 中国); KQ5200DE 型数控超声波清洗机 (昆山禾创超声仪器有限公司, 中国); Epoch2 酶标仪 (时代联想生物科技有限公司, 中国); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 中国)。

试剂: 芦丁对照品 (成都曼思特生物科技有限公司、中国科学院成都生物研究所研制, 批号: MUST-20011302)、乙醇 (成都市科隆化学品有限公司)、维生素 C (大连美仑生物技术有限公司)、亚硝酸钠 (天津市百世化工有限公司)、硝酸铝 (上海麦克林生化科技有限公司)、氢氧化钠 (上海麦克林生化科技有限公司), 以上化学试剂均为分析纯。DP-PH (Sigma-Aldrich[®], 默克)、ABTS 测试盒 (南京建成生物工程研究所)、FRAP 测试盒 (南京建成生物工程研究所)。实验用水为娃哈哈纯净水 (浙江娃哈哈宏振饮用水有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 芦丁标准曲线的绘制

精确称取 0.020 0 g 芦丁标准品, 以 60% 乙醇为溶剂定容至 10 mL 容量瓶, 配置成浓度为 2.00 mg/mL 的母液, 再利用母液分别配制浓度为 0.40、

0.80、1.20、1.60、2.00 mg/mL 浓度的标准工作液。分别量取上述不同浓度的工作溶液 1 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加入 1 mL 5% NaNO_2 , 摇匀,静置 5 min;加 1 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 后摇匀,静置 6 min;再加 1 mL 40% NaOH ,用 60% 乙醇定容,静置 15 min;以溶剂为空白对照,于 510 nm 下测定吸光度。以质量浓度(mg/mL)为横坐标 x ,吸光度为纵坐标 y ,绘制标准曲线,得到回归方程: $y = 0.4379x - 0.0038$, $R^2 = 0.9999$ 。

1.3.2 总黄酮含量测定

称取 0.5000 ± 0.0001 g 干燥的五脉绿绒蒿粉末,采用超声提取法进行总黄酮提取。提取完成后置于 50 mL 的离心管,8 000 r/min 离心 5 min,取上

清液待测。取 1 mL 待测液,按照“1.3.1”项下方法进行显色处理,以 60% 乙醇为空白对照,在 510 nm 波长处测其吸光度 y ,根据标准曲线得到 x 的值,计算五脉绿绒蒿中总黄酮得率。

$$\text{总黄酮得率} = x \times \text{稀释倍数} \times V/m \quad (1)$$

其中 V (mL) 为提取液体积; m (g) 为样品质量。

1.3.3 总黄酮提取工艺的优化

1.3.3.1 单因素试验设计

以乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度、超声功率为考察因素,设计五因素五水平试验(见表 1),以总黄酮得率为考察指标,各因素为变量设计单因素试验。对各因素影响下的总黄酮得率进行极差分析,选择极差值较大的四个因素进行响应面试验。

表 1 单因素试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels design of single factor test

水平 Level	因素 Factor				
	乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	料液比 Ratio of material to liquid (g/mL)	超声时间 Ultrasonic time (min)	超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	超声功率 Ultrasonic power (W)
L1	50	1:10	15	40	80
L2	60	1:30	27	50	120
L3	70	1:50	39	60	160
L4	80	1:70	51	70	200
L5	90	1:90	63	80	-

1.3.3.2 响应面试验因素水平的选择

在单因素试验基础上,根据极差分析结果,以总黄酮得率为指标,选取极差较大的乙醇浓度(A)、超

声时间(B)、超声温度(C)、超声功率(D)四因素进行响应面试验设计(见表 2)。

表 2 响应面试验因素水平设计

Table 2 Factors and levels design of response surface test

水平 Level	因素 Factor			
	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 超声时间 Ultrasonic time (min)	C 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)	D 超声功率 Ultrasonic power (W)
-1	60	30	60	120
0	70	45	70	160
1	80	60	80	200

1.3.4 红外光谱的采集

1.3.4.1 近红外光谱(near infrared spectrum, NIR)的采集

以空气作背景,设置波数范围 10 000 ~ 4 000 cm^{-1} ,扫描次数 32 次,分辨率 4 cm^{-1} ,利用傅里叶变换红外光谱仪的近红外光纤探头分别采集响应面最优条件下的五脉绿绒蒿总黄酮提取液和提取溶剂的

近红外光谱,每个样品平行采集 6 次,取平均光谱为分析谱图,并对提取液和提取溶剂的平均谱图进行差谱分析,以减少提取溶剂的信息干扰。

1.3.4.2 中红外光谱(mid-infrared spectrum with attenuated total reflection, MIR-ATR)的采集

以空气作背景,设置波数范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} ,扫描次数 32 次,分辨率 4 cm^{-1} ,利用傅里叶变换红

外光谱仪的衰减全反射模块分别采集样品溶液和提取溶剂的 ATR 光谱,每个样品平行采集 6 次,以平均光谱为分析谱图,并对提取液和提取溶剂的平均谱图进行差谱分析,以减少提取溶剂的信息干扰。

1.3.5 五脉绿绒蒿总黄酮的抗氧化活性测定

1.3.5.1 DPPH 清除能力测定

DPPH 配成 0.20 mmol/L 的乙醇溶液,将五脉绿绒蒿总黄酮提取液和维生素 C 用无水乙醇配成不同的浓度(5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别作为实验组和阳性对照组,精密量取 100 μL 不同浓度的样品溶液与 50 μL DPPH 溶液于 96 孔板中,混合均匀,于室温下反应,黑暗中静置 30 min,用酶标仪测定 517 nm 处溶液 OD 值($A_{\text{样品}}$)。同条件下测得 150 μL 不同浓度的样品溶液的 OD 值记作 $A_{\text{背景}}$ 。空白组为相同体积的无水乙醇代替总黄酮提取液,按上述条件混合、反应和静置,测定其在 517 nm 处的 OD 值($A_{\text{空白}}$),并按以下公式计算清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}}) / A_{\text{空白}}] \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5.2 ABTS 法测定总抗氧化能力

按 ABTS 测试盒说明书分别配置 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mmol/L Trolox 标准工作液,以标准品浓度为 x ,OD 值为 y ,制作标准曲线,其回归方程式为 $y = -0.8525x + 1.0828$, $R^2 = 0.9962$ 。将五脉绿绒蒿总黄酮提取液和维生素 C 用无水乙醇配成不同的浓度(20~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别作为实验组和阳性对照组,以无水乙醇为空白对照,参照说明书上

的步骤加入各试剂,室温反应 6 min,用酶标仪读取各孔在 405 nm 下的 OD 值。

1.3.5.3 FRAP 法测定总抗氧化能力

分别配置 0.15、0.30、0.60、0.90、1.20、1.50 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 标准工作液,以标准品浓度为 x ,OD 值为 y ,制作标准曲线,其回归方程式为 $y = 3.7393x - 0.4491$, $R^2 = 0.9997$ 。将五脉绿绒蒿总黄酮提取液和维生素 C 用无水乙醇配成不同的浓度(5~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别作为实验组和阳性对照组,以无水乙醇为空白对照,参照说明书上的步骤加入各试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,用酶标仪读取各孔在 593 nm 下的 OD 值。

1.3.6 数据处理

采用 Design-Expert 13 软件进行响应面试验设计和分析,用 GraphPad Prism 7 软件计算 IC_{50} 值,运用 OMNIC 7.0 软件进行红外光谱数据处理和谱图分析,Origin 2021 软件用于制图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

以总黄酮得率为指标,单因素试验筛选结果如图 1 所示。所选 5 个单因素的最佳条件分别为乙醇浓度 70%、液料比 1:50 (g/mL)、超声时间 45 min、超声温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 、超声功率 160 W。极差分析结果表明,乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度、超声功率的极差分别为 11.86、10.36、10.52、11.37、10.46 mg/g,因此选取对总黄酮得率的影响较大的乙醇浓

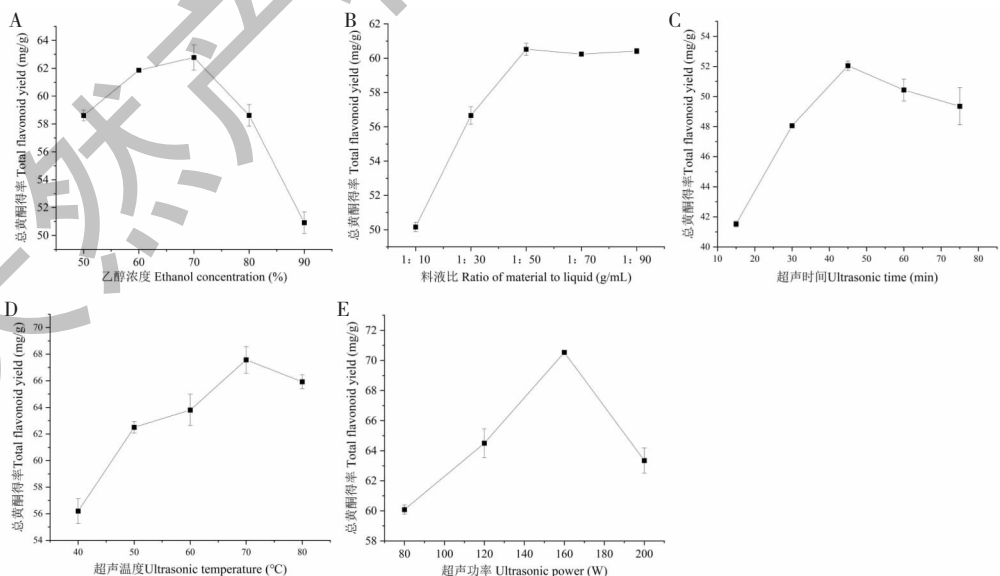


图 1 五脉绿绒蒿总黄酮提取工艺的单因素考察

Fig. 1 Single factor investigation of extraction technology of total flavonoids of *M. quintuplinervia*

度、超声时间、超声温度、超声功率此四个因素进行响应面优化试验设计。

2.2 总黄酮响应面试验

表3为响应面试验设计与结果,对其结果进行回归分析,得到五脉绿绒蒿总黄酮得率(Y)与所考察的提取工艺之间的二次多项式回归模型为: $Y = 66.64 + 0.185 1A + 0.523 8B - 1.10C - 1.08D + 1.19AB + 0.216 5AC - 0.046 1AD - 1.55BC + 1.5BD -$

$1.18CD - 4.33A^2 - 4.26B^2 - 0.862 3C^2 - 0.629 2D^2$,其中A为乙醇浓度、B为超声时间、C为超声温度、D为超声功率。由表4的方差及显著性检验分析可以看出回归模型 $P = 0.009 5 < 0.01$,说明该回归模型差异极显著;失拟度 $P = 0.107 8 > 0.05$,不显著,说明该回归模型的预测值与试验真实值之间的误差小,拟合度较好;决定系数 $R^2 = 0.964 9$,说明该回归模型具有较好的拟合度与可靠性。

表3 响应面试验设计与结果($n = 3$)

Table 3 Experimental designs and results for response surface analysis ($n = 3$)

试验号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 超声时间 Ultrasonic time (min)	C 超声温度 Ultrasonic temperature ($^{\circ}\text{C}$)	D 超声功率 Ultrasonic power (W)	总黄酮得率 Total flavonoid yield (mg/g)
1	80	45	80	160	59.01
2	80	60	70	160	60.93
3	70	30	70	200	60.34
4	60	45	80	160	62.45
5	70	45	70	160	67.62
6	70	45	70	160	67.48
7	70	45	80	200	61.10
8	80	45	70	200	64.20
9	70	45	70	160	65.52
10	70	60	60	160	63.52
11	60	60	70	160	56.30
12	70	30	60	160	63.05
13	60	45	70	200	63.92
14	80	45	60	160	60.00
15	60	45	70	120	60.42
16	70	45	80	120	65.63
17	60	45	60	160	64.31
18	70	45	60	200	65.67
19	70	60	70	200	64.40
20	70	30	70	120	62.11
21	60	30	70	160	56.19
22	70	60	80	160	58.23
23	70	30	80	160	63.98
24	70	45	60	120	65.48
25	70	45	70	160	65.84
26	80	30	70	160	56.06
27	80	45	70	120	60.88
28	70	45	70	160	66.74
29	70	60	70	120	60.15

表4 响应面回归方程方差分析

Table 4 Analysis of response surface regression equation variance

来源 Source	平方和 Sun of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	显著性 Significance
模型 Model	300.52	22	13.66	7.510 0	0.009 5	**
<i>A</i>	0.14	1	0.14	0.075 3	0.793 0	
<i>B</i>	1.10	1	1.10	0.603 1	0.466 9	
<i>C</i>	4.88	1	4.88	2.680 0	0.152 7	
<i>D</i>	4.69	1	4.69	2.580 0	0.159 4	
<i>AB</i>	5.69	1	5.69	3.130 0	0.127 4	
<i>AC</i>	0.19	1	0.19	0.103 0	0.759 1	
<i>AD</i>	0.01	1	0.01	0.004 7	0.947 7	
<i>BC</i>	9.66	1	9.66	5.310 0	0.060 7	
<i>BD</i>	9.03	1	9.03	4.970 0	0.067 4	
<i>CD</i>	5.57	1	5.57	3.060 0	0.130 7	
<i>A</i> ²	121.86	1	121.86	66.970 0	0.000 2	**
<i>B</i> ²	117.72	1	117.72	64.700 0	0.000 2	**
<i>C</i> ²	4.82	1	4.82	2.650 0	0.154 6	
<i>D</i> ²	2.57	1	2.57	1.410 0	0.279 7	
残差 Residual	10.92	6	1.82			
失拟度 Lack of fit	7.33	2	3.67	4.090 0	0.107 8	
纯误差 Pure error	3.58	4	0.90			
总和 Sum	311.44	28				

注: * 差异显著 ($P < 0.05$); ** 差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * Significant difference ($P < 0.05$); ** Extremely significant difference ($P < 0.01$).

本试验中各因素的影响程度依次为超声温度 ($P = 0.1527$) > 超声功率 ($P = 0.1594$) > 超声时间 ($P = 0.4669$) > 乙醇浓度 ($P = 0.7930$)。根据回归方程式,以总黄酮得率为响应值,绘出乙醇浓度、超声功率、超声时间、超声功率两两交互作用响应面图(见图2)。经分析,五脉绿绒蒿总黄酮最佳提取工艺为超声温度 $64.39\text{ }^{\circ}\text{C}$,超声功率 166.42 W ,超声时间 58.02 min ,乙醇浓度 73.39% ,此条件下五脉绿绒蒿中总黄酮得率预测值为 64.75 mg/g ,考虑到实际操作,对最优条件加以修正,修正后的条件为乙醇浓度 74% ,超声时间 58 min ,超声温度 $64\text{ }^{\circ}\text{C}$,超声功率 160 W ,该条件下五脉绿绒蒿中总黄酮平均得率为 $65.04 \pm 0.31\text{ mg/g}$ ($n = 3$),与预测值误差为 0.45% ,说明响应面优化模型可用于拟合分析,结果稳定可靠。Ma等^[18]报道的同属植物多刺绿绒蒿总黄酮得率为 3.21% ,Xu等^[19]报道全缘叶绿绒蒿总黄酮得率为 0.123 mg/g 。本研究中五脉绿绒蒿总黄酮得率为 65.04 mg/g ,表明本研究所建

立的总黄酮提取工艺条件具有较高的得率。

2.3 总黄酮提取液红外光谱特征分析

在前述响应面试验的基础上,对五脉绿绒蒿总黄酮提取液红外光谱进行分析。由图3A、3C可知,五脉绿绒蒿总黄酮提取液的NIR和ATR光谱都与其溶剂极其相似,为了排除溶剂的干扰,放大样品和溶剂的差异,利用OMNIC7.0软件对两者进行差谱分析,即从五脉绿绒蒿总黄酮提取液谱图中减去溶剂谱图,获得差谱(图3B、3D)。

图3B为五脉绿绒蒿总黄酮提取液和溶剂的NIR差谱。由图可知,减差后的特征峰共有7个,分别为 6845 、 5167 、 4405 、 4337 、 4251 、 4061 cm^{-1} 及 4023 cm^{-1} 。 6845 cm^{-1} 处的宽峰由氢键键合的O-H产生^[21], 5167 cm^{-1} 附近属酚O-H的吸收谱区, 4405 cm^{-1} 为O-H和C-O伸缩组合频, 4337 cm^{-1} 为烃类C-H反对称伸缩和弯曲振动组合频, 4251 cm^{-1} 为多糖C-H弯曲振动基频的二级倍频谱带, 4061 cm^{-1} 和 4023 cm^{-1} 主要来自C-H伸缩振动和弯曲振动的组

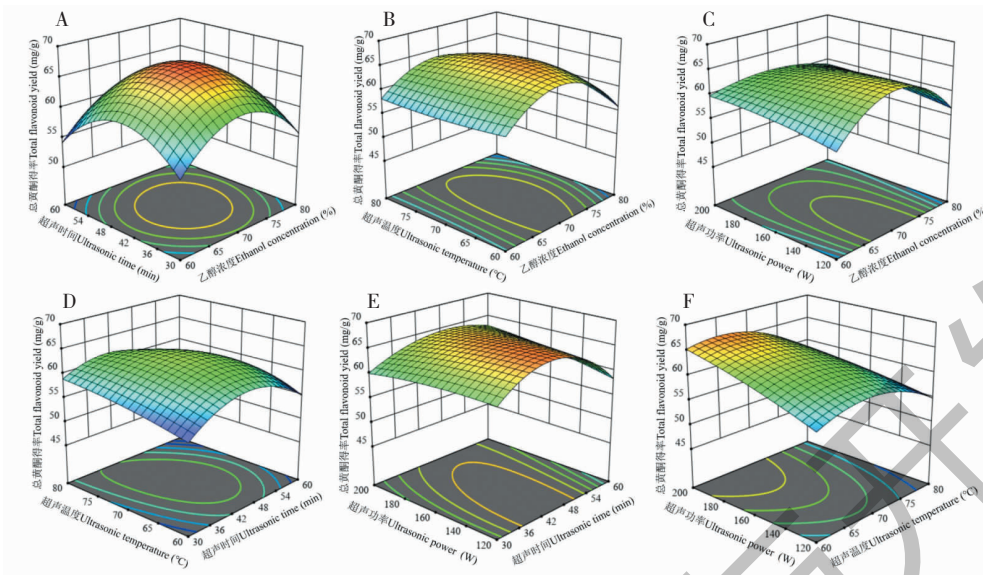


图2 四因素交互作用的响应面图

Fig. 2 Response surface graphs for the interactive effect among four factors

合频^[22]。

图3D为五脉绿绒蒿总黄酮提取液和溶剂的ATR差谱,两者在3 354、2 975、1 647、1 086、1 044、879、572 cm^{-1} 及432 cm^{-1} 波数处两种溶液的吸光度有较大的差值。3 354 cm^{-1} 附近为主要为酚 O-H 及蛋白质 N-H 伸缩振动产生的宽峰^[23],2 975 cm^{-1} 处的尖峰归属于烃类 C-H 的对称伸缩振动,1 647 cm^{-1}

处为黄酮类 C=O 的伸缩振动峰^[24],1 086 cm^{-1} 附近多为糖类、皂苷等 C-O 的伸缩振动峰,1 044 cm^{-1} 为 C-OH 伸缩振动,1 100 ~ 950 cm^{-1} 区域的强峰 1 044 cm^{-1} 来自糖类分子,950 cm^{-1} 以下的 879 cm^{-1} ,572 cm^{-1} 及 432 cm^{-1} 处主要为糖环骨架振动吸收^[25]。

黄酮类化合物是以 2-苯基色原酮为母核的一类植物次生代谢物,其母核上常有羟基、甲氧基、

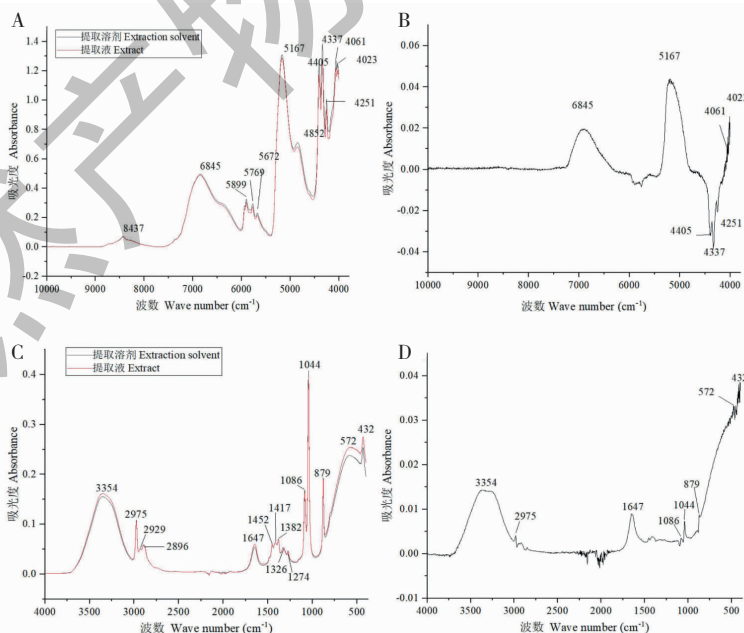


图3 五脉绿绒蒿总黄酮提取液及其溶剂的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectra of total flavonoid extract and its solvent of *M. quintuplinervia*

注:A为 NIR 均谱;B为 NIR 差谱;C为 ATR 谱图;D为 ATR 差谱。Note:A shows NIR average spectroscopy;B indicates NIR difference spectroscopy;C shows ATR average spectroscopy;D indicates ATR difference spectroscopy.

异戊烯氧基、酚羟基等基团^[26,27],故 NIR 谱图中的 6 845、5 167、4 405、4 337、4 061 cm^{-1} 和 4 023 cm^{-1} 以及 ATR 谱图中的 3 354、2 975、1 647 cm^{-1} 处特征峰的出现表明提取液中含有黄酮类化合物。

2.4 提取物抗氧化活性评价

图 4 为五脉绿绒蒿总黄酮提取液抗氧化能力测定结果。由图 4A 可知,在实验浓度 10 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 内,阳性对照物维生素 C 对 DPPH 的清除率较高,最终稳定在 96% 左右;五脉绿绒蒿总黄酮提取液对 DPPH 的清除作用在一定浓度范围内随样品浓度的增大而逐渐升高,最终稳定在 86% 左右,其清除活性略低于阳性对照。经分析,提取液对 DPPH 的半抑制率 IC_{50} 值为 10.07 $\mu\text{g/mL}$,高于维生素 C 的 IC_{50} 值 4.12 $\mu\text{g/mL}$,但低于 Ma 等^[18] 报道的多刺绿绒蒿清除 DPPH 的 IC_{50} 值 27.06 $\mu\text{g/mL}$ 。

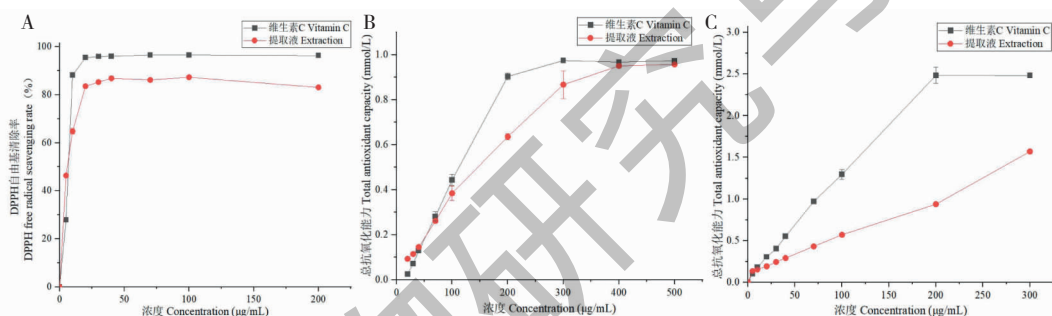


图 4 五脉绿绒蒿总黄酮提取液抗氧化能力测定

Fig. 4 Determination of antioxidant ability of total flavonoids extract of *M. quintuplinervia*

注:A:DPPH 自由基清除能力;B:ABTS 法测总抗氧化能力;C:FRAP 法总抗氧化能力测定。Note:A:The ability to scavenge DPPH free radicals;B:Using ABTS method to measure total antioxidant capacity;C:Using FRAP method to measure total antioxidant capacity.

3 结论

本研究采用超声波法对五脉绿绒蒿总黄酮的提取工艺进行了响应面优化,得到了其最佳提取工艺条件,并且有较高的得率 $65.04 \pm 0.31 \text{ mg/g}$,可为五脉绿绒蒿总黄酮的规模化提取制备提供参考。并对提取液的红外光谱进行了差谱分析,可为五脉绿绒蒿醇提液中总黄酮含量的快速测定和在线检测提供思路。体外抗氧化实验结果表明五脉绿绒蒿总黄酮提取液有良好的抗氧化能力。本研究所建立的提取工艺稳定可靠,具有较高的总黄酮得率和较好的抗氧化活性,可为五脉绿绒蒿资源深度开发利用提供科学依据。

参考文献

1 Qinghai Provincial Institute for Drug Control, Institute of Tibetan Medicine in Qinghai Province. Chinese Tibetan Medi-

由图 4B 可知,在 0 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内随着提取液总黄酮浓度的升高,其对 ABTS^+ 的产生的抑制作用也随之增强,表现出良好的量效关系。当提取液总黄酮浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时,其 ABTS^+ 抑制能力相当于 0.95 mmol/L 的 Trolox,略低于同浓度下的维生素 C 的总抗氧化能力 0.97 mmol/L。

由图 4C 可知,在 0 ~ 300 $\mu\text{g/mL}$ 范围内提取液 FRAP 总抗氧化力随着总黄酮浓度的升高而升高,表现出正相关关系。维生素 C 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,其 FRAP 总抗氧化力达到最高值 2.49 mmol/L,此时五脉绿绒蒿提取液总抗氧化能力为 0.94 mmol/L,低于维生素 C。可见,五脉绿绒蒿总黄酮提取液具有较好的 DPPH 清除能力和抑制 ABTS^+ 的产生能力。

cine; Vol III (中国藏药:第三卷) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1996:385-387.

2 Luo DS, Sun AL, Xia GC. Tibetan medicine in Qinghai-Tibet Plateau—A preliminary study on plant resources of *Meconopsis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1984, 15(8): 23-24.

3 Wu ZY. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1999, 32: 36-37.

4 Danzengpengcuo D. Shel Gong Shel Phreng (晶珠本草) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1980: 114-115.

5 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan Medicine (藏药志) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991: 465-467.

6 Xu YT, Xu HF. Research progress of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. [J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2014, 23: 451-453.

- 7 Wang ZW, Guo M, Ma J, et al. Study for anti-inflammatory and analgesia on effective parts of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. [J]. Chin J info Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2010, 17(1): 21-22.
- 8 Wang ZW, Shao J, Guo M, et al. Influence of the active fractions of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. growing in Gansu region on inflammatory cytokines in experimental live fibrosis rat[J]. Immunol J(免疫学杂志), 2013, 29(1): 24-27.
- 9 Wang ZW, Wang RQ, Guo M, et al. Study on liver protection of total flavones of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. from Gansu province in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(2): 206-209.
- 10 Ding L, Li JP. Study on protective effect of *Meconopsis quintuplinervia* Regel. on experimental hepatic injury in mice[J]. Chin Qinghai J Anim Vet Sci(青海畜牧兽医杂志), 2007, 37(4): 7-8.
- 11 Liu LH, Wan XC, Li DX. Research progress on the structure-activity relationship of flavonoids' antioxidant activity (review) [J]. J Anhui Agr Univ(安徽农业大学学报), 2002, 29: 265-270.
- 12 Zhu XQ, Zheng Y, Liu ZL, et al. Research on synergistic mechanism of main anticancer flavonoids of *Scutellaria barbata* based on network pharmacology [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2020, 31: 1037-1044.
- 13 Luo J, Hou J, Yang ST, et al. Study on extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from *Larix kaempferi* litter needles [J]. J Sichuan Univ(四川大学学报), 2021, 58(3): 188-194.
- 14 Meng QY, Fu L, Gao Z, et al. Comparison on different extraction processes of total flavonoids in *Chrysanthemum indicum* and its anti-oxidant effect [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46: 3194-3197.
- 15 Routray W, Orsat V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review [J]. Food Bioprocess Tech, 2012, 5: 409-424.
- 16 Jing CL. Extraction, Purification and antioxidant activities of flavonoids from alfalfa [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences(中国农业科学院), 2016.
- 17 Chen L, Jin H, Ding L. Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from Herba Epimedii [J]. Sep Purif Technol, 2008, 59(1): 50-57.
- 18 Ma J, Guo Y, Zhang GY, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Meconopsis horridula* Hook. f. & Thomson. by response surface methodology and study on its antioxidation [J]. China Food Addit(中国食品添加剂), 2021, 32(6): 31-38.
- 19 Xu YX, Wang Y, Liu MZ, et al. Extraction technology of total flavonoids and alkaloids from *Meconopsis integrifolia* (Maxim.) Franch. [J]. J Seed Ind Guide(种业导刊), 2021(4): 3-7.
- 20 Liu MZ, Li Q, Ji DJ, et al. Determination of total flavonoids in *Meconopsis punicea* Maxim. and optimization of extraction technology [J]. J Seed Ind Guide(种业导刊), 2019(9): 8-11.
- 21 Liu XY, Zhang SY, Zhao MQ, et al. The prediction of baicalin content in the extraction process of *Scutellaria baicalensis* by near-infrared spectroscopy combined with different variable selection methods [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2019, 54(1): 138-143.
- 22 Ke YK, Dong HR. Handbook of analytical chemistry 3B molecular spectroscopy analysis(分析化学手册 3B 分子光谱分析) [M]. Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2015: 773-805.
- 23 Cheng CG, Liu J, Cao WQ, et al. Classification of two species of *Bidens* based on discrete stationary wavelet transform extraction of FTIR spectra combined with probability neural network [J]. Vib Spectrosc, 2010, 54(1): 50-55.
- 24 Pei YF, Zuo ZT, Zhao YL, et al. Identification of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* from different origins using FTIR, ATR-FTIR and UV multispectral data [J]. J Instr Anal(分析测试学报), 2019, 38(1): 14-21.
- 25 Sun SQ, Zhou Q, Chen JB. Infrared spectroscopy analysis and identification of traditional Chinese medicine(中药红外光谱分析与鉴定) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014: 72-75.
- 26 Yu XC, Wang XJ. The extraction process and infrared spectroscopy analysis of flavonoids from pomelo peel [J]. Jiangsu Agr Sci(江苏农业科学), 2017, 45(4): 137-139.
- 27 Yang Y, Yang LC, Ji XL, et al. Rapid determination of active components in extraction process of *Bupleuri Radix* by near infrared spectroscopy [J]. J Instr Anal(分析测试学报), 2020, 39: 1311-1319.