

响应面法优化马鞭草中总黄酮 闪式提取工艺及其体外抗氧化活性

张 迪

(南阳医学高等专科学校, 河南南阳 473061)

摘 要:采用响应面法优化马鞭草中总黄酮的提取工艺。在单因素实验的基础上,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为自变量,总黄酮含量为因变量,运用 Box-Behnken 设计-响应面优化马鞭草中总黄酮闪式提取工艺。并通过马鞭草总黄酮对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用来评价其抗氧化活性。结果表明:马鞭草中总黄酮提取的最佳工艺条件为乙醇浓度 50%,料液比为 1:35 (g/mL),提取时间为 1.5 min,提取次数为 2 次。在此条件下,总黄酮含量达到 (8.282 ± 0.003) mg/g,与模型预测值 8.280 mg/g 相近。重复性试验结果表明,此方法稳定可靠,总黄酮得率高,适于马鞭草中总黄酮的提取。体外抗氧化活性实验表明,当马鞭草中总黄酮浓度为 60 μ g/mL 时,其对 DPPH、羟自由基、超氧阴离子 3 种自由基清除率分别为 74.8%、43.2%、89.5%,表明马鞭草总黄酮具有较强的体外抗氧化活性。

关键词:马鞭草,总黄酮,响应面法,抗氧化

Optimization of Flash Extraction Technology of Total Flavonoids from *Verbena officinalis* L. by Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity *in Vivo*

ZHANG Di

(Nanyang Medical College, Nanyang 473061, China)

Abstract: Response surface method was used to optimize the extraction technology of total flavonoids from *Verbena officinalis* L. On the basis of single-factor test, the extraction conditions (ethanol concentration, ratio of water to materials, extracting time and extraction time) were analyzed and optimized by the Box-Behnken design using the content of total flavonoids as index. Meanwhile, the antioxidant capacity was measured by scavenging of DPPH·, hydroxyl free radical and superoxide free radical. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration was 50%, ratio of raw material to liquid was 1:35 (g/mL), extracting 2 times, and each for 1.5 min. Under the conditions, the content of total flavonoids was (8.282 ± 0.003) mg/g, which close to predicted content of 8.280 mg/g. This method was suitable for the extraction of total flavonoids from *Verbena officinalis* L with high extraction rate. When the concentration of total flavonoids was 60 μ g/mL, the clearance rate on DPPH·, hydroxyl free radical and superoxide free radical was 74.8%, 43.2%, 89.5%, which showed that the total flavonoids of *Verbena officinalis* L. had a certain antioxidant activity.

Key words: *Verbena officinalis* L.; total flavonoids; response surface method; antioxidant activities

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)03-0173-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.03.028

引文格式: 张迪. 响应面法优化马鞭草中总黄酮闪式提取工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 173-178, 184.

马鞭草 (*Verbena officinalis* L.) 为马鞭草科植物马鞭草的干燥地上部分, 马鞭草作为传统中药, 收录于《中国药典》之中, 具有活血散瘀、解毒、利水消肿、退黄、截疟等功效^[1-2], 在临床上广泛用于治疗白喉、疟疾等症状。《中国药典》2015 版将马鞭草中齐墩果酸和熊果酸作为马鞭草质量控制的主要指标, 但是马鞭草中还存在多种化学成分如: 黄酮类、挥发油

类、环烯醚萜类、糖类等^[3-4]。这些化学成分也具有显著的活性作用, 故亟需对其理化性质及生物活性进行研究分析。其中黄酮类化合物是广泛存在于植物界的一大类天然产物, 具有抗炎、抗病毒、强心、镇静、镇痛、抗氧化、抗衰老和抗肿瘤等作用^[5-8]。

闪式提取法^[9]是在适当的溶剂下, 利用高速机械剪切力和超动态分子渗透作用, 使组织细胞内部

收稿日期: 2018-05-21

作者简介: 张迪 (1987-), 女, 硕士研究生, 助教, 主要从事天然药物化学方面的研究, E-mail: zhdi_87@163.com。

的有效成分迅速达到组织内外平衡,进而达到快速提取目的的一种方法,具有提取时间短、效率高、能耗低等特点^[10-11]。而响应面曲线法优化马鞭草中总黄酮闪式提取工艺及其体外抗氧化性研究未见文献报道,故本论文以马鞭草为原料,运用闪式提取法在单因素实验的基础上,考察了乙醇浓度、液料比、提取时间、提取次数对马鞭草中总黄酮含量的影响,并通过 Box-Behnken 设计-响应面法优化马鞭草中总黄酮的提取工艺,并对其体外抗氧化性进行研究,考察了其清除 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)自由基的能力^[7,8,12-18],以期为马鞭草的综合开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马鞭草 购于河南省药材公司,并经鉴定为 *Verbena Officinalis* L. 全草;芦丁 上海晶纯实业有限公司,纯度 > 99%;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH· Sigma);邻二氮菲、硫酸亚铁、过氧化氢、抗坏血酸、无水乙醇、甲醇、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝 均为国产分析纯,使用前未进一步纯化,水为蒸馏水。

JHBE-50S 闪式提取器 河南金鼎科技有限公司;Lab Tech UV-BlueStra 紫外可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司;BS210S 电子分析天平 北京赛多利斯公司;DK-98-1 型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;RE52CS 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;TDL-5-A 台式离心机 上海安亭科学仪器厂;KQ-50E 型超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准曲线的绘制 以芦丁为对照品,精密称取 105 ℃ 下干燥至恒重的芦丁 0.0200 g,用少量 70% 的乙醇溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀,其质量浓度为 0.2000 g·L⁻¹。分别移取芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、0.4、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 置于 10 mL 比色管中,加入 5% 的 NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀,静置 6 min,再加入 10% 的 Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,充分摇匀,静置 6 min。再加入 4% 的 NaOH 溶液 4 mL,混匀后用 70% 的乙醇定容至刻度,摇匀并放置 15 min,以试剂空白为对照,用 1 × 1 cm 的比色皿在 507 nm 处测定吸光度^[19]。以芦丁浓度 C 为横坐标、吸光度 A 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $y = 11.53x - 0.0059$, $R^2 = 0.9989$ 。表明芦丁对照品溶液在 10.00~60.00 μg/mL 范围内浓度和吸光度线性关系良好。

1.2.2 马鞭草中总黄酮的提取及含量的测定 闪式提取马鞭草中总黄酮的工艺流程:将自然风干至恒重的马鞭草粉碎后过 60 目筛,准确称取 2.00 g 置于 250 mL 闪式提取器中进行闪式提取,提取液经离心后抽滤,将滤液经减压浓缩至无醇味后用 70% 的乙醇溶液,定容至 250 mL 容量瓶中。

总黄酮含量的测定:采用 Al(NO₃)₃ - NaNO₂ - NaOH^[19] 分光光度法。准确量取样品溶液 2 mL 于 10 mL 比色管中,按照“1.2.1”中所述方法进行的操作,

以试剂空白为对照,用 1 × 1 cm 的比色皿在 507 nm 处测定吸光度,计算马鞭草中总黄酮的含量。

总黄酮含量(mg/g) = 提取的总黄酮质量(mg)/原料质量(g)

1.2.3 闪式提取马鞭草中总黄酮的单因素实验 以乙醇浓度、料液比、提取时间和提取次数四个因素为研究对象,以马鞭草中总黄酮含量为指标进行单因素实验。

1.2.3.1 乙醇浓度的选择 准确称取 6 份已粉碎的马鞭草样品各 2.00 g 置于 250 mL 闪式提取器中,在固定料液比 1:30 g/mL、闪式提取时间为 2 min、提取 1 次的条件下进行闪式提取。考察不同乙醇浓度(30%、40%、50%、60%、70%、80%)对总黄酮含量的影响。

1.2.3.2 料液比的选择 准确称取 6 份粉碎的马鞭草样品各 2.00 g 置于 250 mL 闪式提取器中,在固定乙醇浓度 60%、提取时间为 2 min、提取 1 次的条件下,考察料液比(1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:50 g/mL)对总黄酮含量的影响。

1.2.3.3 提取时间的选择 准确称取 6 份粉碎的马鞭草样品各 2.00 g 置于 250 mL 闪式提取器中,固定料液比为 1:35 g/mL、乙醇浓度为 60%、提取 1 次的条件下,考察提取时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 min)对总黄酮含量的影响。

1.2.3.4 提取次数的选择 准确称取 5 份粉碎的枣果皮样品各 2.00 g 置于 250 mL 闪式提取器中,固定料液比为 1:35 g/mL、乙醇浓度为 70%、提取时间为 2 min,考察提取次数(1、2、3、4、5 次)对总黄酮含量的影响。

1.2.4 响应面优化试验 采用 Box-Behnken 的中心组合原理为依据,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为自变量,总黄酮的含量为因变量,采用 4 因素 3 水平响应面优化提取工艺,利用统计学分析软件 Design Expert 8.0.6 软件建立数字回归模型,确定马鞭草中总黄酮最佳提取工艺条件,实验设计因素见表 1。

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and levels table of response surface experiment

水平	因素			
	A 乙醇体积 分数(%)	B 料液比 (g/mL)	C 提取时间 (min)	D 提取次数
-1	40	1:30	1.0	1
0	50	1:35	1.5	2
1	60	1:40	2.0	3

1.2.5 马鞭草总黄酮体外抗氧化试验

1.2.5.1 马鞭草总黄酮对 DPPH 自由基清除率的测定 将马鞭草浓缩液加无水乙醇配制成浓度分别为 5、10、20、40、60、80 μg/mL 的样品溶液。精密移取 2 mL 样品溶液于试管中,加入 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液 2 mL,充分混匀,室温下避光反应 30 min,以无水乙醇为空白对照,于 517 nm 波长处测定其吸光度^[20],平行测量 3 次。以抗坏血酸为阳性对照,精密称取一定量的抗坏血酸配制成相应浓度,按上述方

法操作。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}}] \times 100$$

1.2.5.2 马鞭草总黄酮对羟自由基清除率的测定 采用邻二氮菲法测定羟自由基的清除率,取 5 mmol/L 邻二氮菲溶液 1.5 mL 置于 10 mL 的具塞试管中,加入 2 mL 0.75 mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS),混匀后加入 1 mL 0.75 mmol/L 的 FeSO_4 溶液,充分混匀后加入 1 mL 不同浓度的供试液,再加入 1 mL 1% H_2O_2 溶液,然后加蒸馏水补足到 10 mL,混匀,在 37 °C 水浴下反应 1 h,空白组既不加样品溶液又不加 H_2O_2 ,对照组加 H_2O_2 溶液而不加样品溶液的吸光度。以 536 nm 波长下测定吸光值^[21]。以抗坏血酸为阳性对照,精密称取一定量的抗坏血酸配制成相应浓度,按上述方法操作。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}}] \times 100$$

1.2.5.3 马鞭草总黄酮对超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)清除率的测定 采用邻苯三酚自氧化法,配制 2 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH=8),于 25 °C 恒温 20 min,加入 1 mL 不同质量浓度的样品溶液,再加入 0.2 mL 经 37 °C 预热过的 7.0 mmol/L 邻苯三酚,摇匀后置于 25 °C 恒温反应 5 min,加入 0.1 mL 8.0 mol/L HCl 终止反应,以超纯水为参比溶液。在 320 nm 处测定吸光度值 A 样品,对照组以 Tris-HCl 缓冲液代替样品溶液和邻苯三酚盐酸溶液,测定吸光度值,空白组以 Tris-HCl 缓冲液代替马鞭草提取液,测定吸光度值^[22]。根据公式计算样品溶液对超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除率。以抗坏血酸为阳性对照,精密称取一定量的抗坏血酸配制成相应浓度,按上述方法操作。

$$\text{超氧自由基}(\text{O}_2^{\cdot-})\text{清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}}] \times 100$$

1.3 数据处理

运用 Origin 8.0 及 Design Expert 8.0.6 软件进行数据整理及分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 乙醇浓度的选择 图 1 表明,当乙醇浓度在 30%~50% 之间,马鞭草中总黄酮含量随乙醇浓度的增加而增大;当乙醇浓度为 50% 时总黄酮含量达到最大,继续增加乙醇浓度时,总黄酮含量下降。原因可能是随着乙醇浓度增大,黄酮类化合物达到饱和,由于醇溶性杂质“色素”等亲脂性强的成分溶出量增加,与黄酮类化合物竞争同溶剂结合,从而导致黄酮的提取含量下降^[23]。因此本实验选取乙醇浓度为 40%、50%、60% 进行优化。

2.1.2 料液比的选择 马鞭草中总黄酮的含量随着料液比的增加而逐渐增加且趋于平缓。原因有可能是:料液比过小,黄酮类化合物溶解不充分;料液比过大,则样品中一些非黄酮类的化合物溶解度增大,与黄酮类化合物竞争性溶出,从而使其含量趋于平缓,由于提取液体积的增大会增加蒸发浓缩的能耗

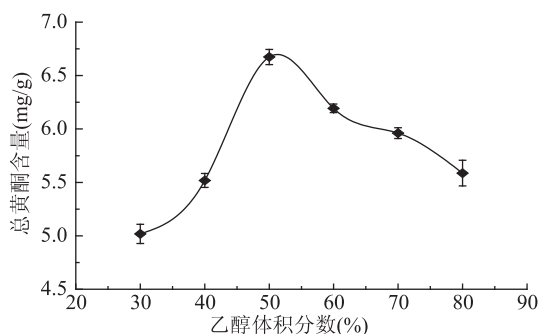


图1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on content of total flavonoids

和工耗,为降低成本,因此选择料液比 1:30、1:35、1:40 g/mL 三个水平进行优化。

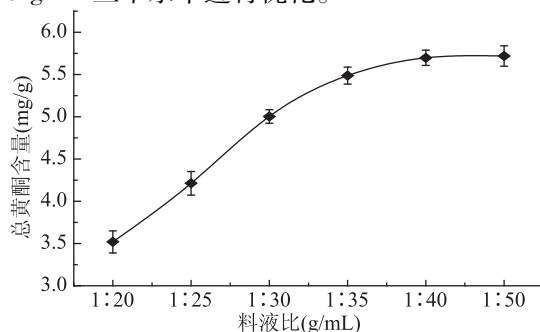


图2 料液比对总黄酮含量的影响

Fig.2 Effect of the ratio of water to materials on content of total flavonoids

2.1.3 提取时间的选择 由图 4 可知,在 2 min 时,总黄酮含量最高,在此之后总黄酮含量随时间的延长逐步下降,原因可能是随着时间的延长,闪式提取过程中发热,有利于总黄酮的溶出,但是黄酮类物质在长时间高温下会受到一定程度的破坏,因此提取量出现下降趋势。考虑到闪式提取一次提取时间最长不超过 2 min,时间长于 2 min 时,需要连续多次提取,且在 1 min 时的总黄酮含量与 2.5 min 时基本上一致,故选择提取时间 1、1.5、2 min 三个水平进行优化。

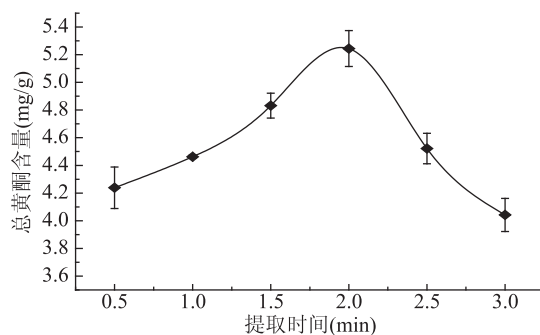


图3 提取时间对总黄酮含量的影响

Fig.3 Effect of extracting time on content of total flavonoids

2.1.4 提取次数的选择 由图 4 可知,随着提取次数的增加,多酚的含量逐渐增大且趋于平缓,但溶剂的消耗量增大,同时增加蒸发浓缩的能耗和工耗,为降

低成本,考虑到效益诸多方面的因素,故选择提取次数为1次、2次、3次三个水平进行优化。

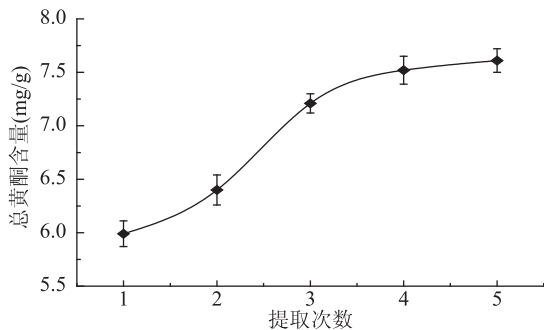


图4 提取次数对总黄酮含量的影响

Fig.4 Effect of extraction times on content of total flavonoids

2.2 响应面试验结果

2.2.1 响应面回归模型建立与分析 采用 Box-Behnken 的中心组合原理为依据,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为自变量,总黄酮的含量为因变量,采用4因素3水平响应面优化提取工艺,利用统计学分析软件 Design Expert8.0.6 软件建立数字回归模型,确定马鞭草中总黄酮最佳提取工艺条件,结果见表2。得回归方程 $Y = 8.13 + 0.32A + 0.46B + 0.48C + 0.16D + 0.39BC - 1.15A^2 - 1.06B^2 - 1.18C^2 - 1.13D^2$

对上述模型进行回归方差分析,并进行显著性检验,结果见表3。由表3可知,模型的决定系数 $R^2 = 0.9649$, $p < 0.0001$,说明因变量与全体自变量之间的多元回归关系显著,即回归方程能很好地模拟真实曲面,实验方法可靠;模型调整决定系数 $R^2_{adj} = 0.9482$,说明该模型能解释94.82%实验数据的变异性,模型的拟合程度高,实验误差小。失拟项 $p = 0.3901$,大于0.05,失拟项不显著,说明该模型与实际实验拟合度良好,变异系数CV值为0.9165,显示实验稳定性良好;因此,该模型可用于马鞭草中总黄酮的闪式提取的分析和预测。

模型中因素一次项B和C,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 对马鞭草总黄酮含量有极显著的影响($p < 0.001$),一次项A、交互项BC对马鞭草总黄酮的含量有高度显著影响($p < 0.01$),一次项D对马鞭草总黄酮的含量有显著影响($p < 0.05$),各因素对马鞭草中总黄酮含量的影响依次为:提取时间(C) > 料液比(B) > 乙醇浓度(A) > 提取次数(D)。

2.2.2 响应面交互作用分析与优化 响应曲面坡度越陡峭,说明响应值对于该因素的改变越敏感,而曲面坡度越平滑,该因素的改变对响应值的影响也就越小,各因素交互作用对马鞭草中总黄酮含量影响的响应曲面以及等高线如图5所示。提取时间和料液比两个因素随取值的变化,其效应曲面线变化比较陡峭,表明这两个因素对马鞭草总黄酮的提取的交互影响作用显著,乙醇浓度和料液比、乙醇浓度和提取时间、乙醇浓度和提取次数、料液比和提取次数、提取时间和提取次数对总黄酮含量的交互影响作用不显著,这与表3中交互项值的分析

表2 响应面试验结果及分析

Table 2 Results and analysis of response surface experiment

试验号	A	B	C	D	总黄酮含量 (mg/g)
1	0	1	0	-1	6.025
2	0	0	0	0	8.232
3	1	0	0	1	6.548
4	0	0	0	0	7.865
5	0	0	1	-1	6.213
6	1	0	0	-1	6.183
7	0	-1	0	-1	5.324
8	0	1	0	1	6.458
9	0	0	1	1	6.359
10	-1	-1	0	0	5.258
11	-1	0	1	0	5.986
12	0	0	0	0	7.928
13	0	-1	0	1	5.869
14	-1	0	0	-1	5.246
15	0	0	0	0	8.281
16	1	-1	0	0	5.767
17	0	0	-1	1	5.689
18	0	0	-1	-1	5.232
19	0	0	0	0	8.326
20	0	1	1	0	7.261
21	0	1	-1	0	5.589
22	-1	0	-1	0	5.229
23	1	0	1	0	6.686
24	1	0	-1	0	5.198
25	-1	0	0	1	5.210
26	0	-1	1	0	5.324
27	-1	1	0	0	6.226
28	0	-1	-1	0	5.201
29	1	1	0	0	6.656

一致。

2.3 最佳工艺验证

通过回归模型得出马鞭草中总黄酮的最佳提取工艺条件为:乙醇浓度51.6%,料液比为1:36.3(g/mL),提取时间为1.51 min,提取次数为2次,在此条件下,总黄酮的含量为8.280 mg/g,综合考虑将其最佳工艺条件调整为乙醇浓度50%,料液比为1:35(g/mL),提取时间为1.5 min,提取次数为2次,以此条件进行3次重复性试验,测得马鞭草中总黄酮的含量为 (8.282 ± 0.003) mg/g, $RSD = 0.29\%$,由此可说明模型和方法的可行性和有效性良好。

2.4 体外抗氧化活性

2.4.1 对DPPH自由基的清除能力 不同浓度的马鞭草总黄酮提取液与 V_c 溶液对DPPH自由基清除能力如图6所示。从图6中可以看出,马鞭草总黄酮对DPPH自由基的清除能力随着浓度的增加而升高,当其浓度为60 $\mu\text{g/mL}$ 时,清除率达到74.8%,此后,清除率基本保持不变。在实验浓度范围内,阳性对照物抗坏血酸在实验浓度范围内对DPPH自由基的

表3 回归方程方差分析结果
Table 3 Analysis results of regression and variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	28.80	14	2.06	34.47	<0.0001	***
A	1.26	1	1.26	21.05	0.0004	**
B	2.50	1	2.50	41.81	<0.0001	***
C	2.72	1	2.72	45.51	<0.0001	***
D	0.30	1	0.30	5.00	0.0422	*
AB	1.56×10^{-3}	1	1.56×10^{-3}	0.026	0.8739	
AC	0.13	1	0.13	2.24	0.1568	
AD	0.040	1	0.040	0.67	0.4256	
BC	0.60	1	0.60	10.05	0.0068	**
BD	3.136×10^{-3}	1	3.136×10^{-3}	0.053	0.8220	
CD	0.027	1	0.027	0.45	0.5117	
A ²	8.64	1	8.64	144.70	<0.0001	***
B ²	7.26	11	7.26	121.71	<0.0001	***
C ²	9.03	1	9.03	151.29	<0.0001	***
D ²	8.30	1	8.30	139.08	<0.0001	***
残差	0.84	14	0.060			
失拟误差	0.65	10	0.065	1.43	0.3901	
纯误差	0.18	4	0.046			
总离差	29.64	28				
$R^2 = 0.9649$			$R^2_{Adj} = 0.9482$		CV = 0.9165	

注：*** 表示差异极显著($p < 0.001$)，** 表示差异高度显著($p < 0.01$)，* 表示显著($p < 0.05$)。

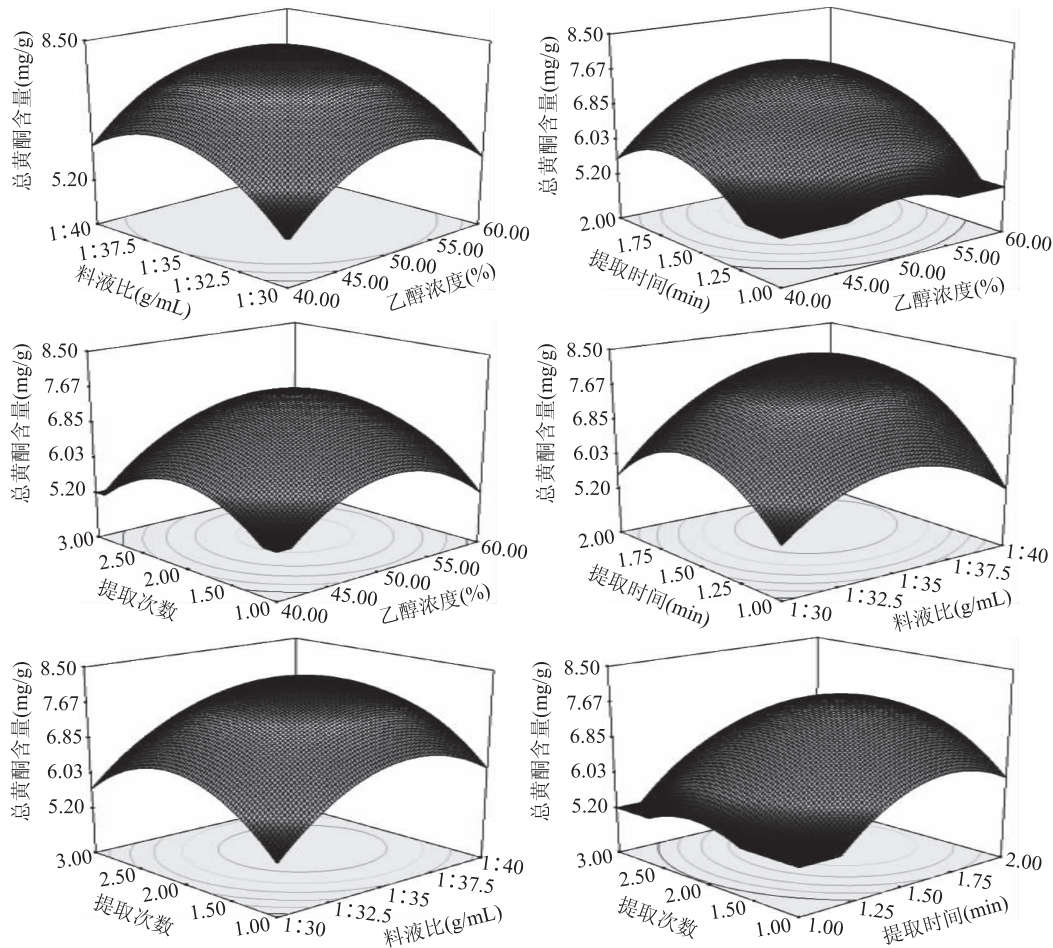


图5 各因素交互作用的响应面图
Fig.5 Response surface plot of interaction of various factors

清除能力始终高于马鞭草总黄酮。

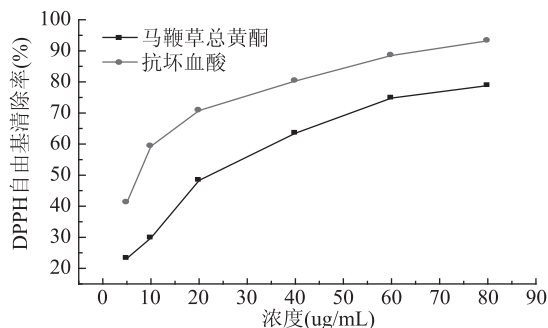


图6 不同浓度的马鞭草总黄酮和抗坏血酸对 DPPH·的清除率

Fig.6 DPPH·scavenging activities of V_c and total flavonoids

2.4.2 马鞭草总黄酮对羟自由基的清除能力 不同浓度的马鞭草总黄酮提取液与 V_c 溶液对羟自由基清除能力如图7所示。马鞭草总黄酮对羟自由基具有一定的抑制能力,但不如 V_c ,当马鞭草总黄酮浓度为 $60 \mu\text{g/mL}$ 时,清除率为 43.2%,此后,随着浓度的增加,清除率基本保持不变。在实验浓度范围内,阳性对照物抗坏血酸对 DPPH 自由基的清除能力始终高于马鞭草总黄酮。

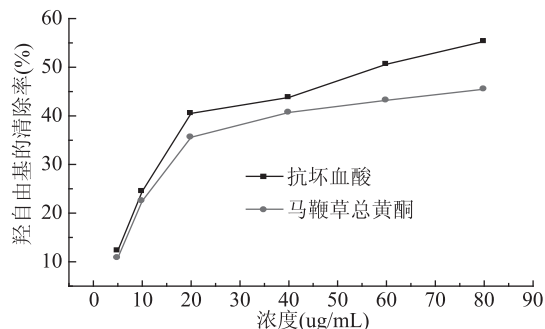


图7 不同浓度的马鞭草总黄酮和抗坏血酸对羟自由基的清除率

Fig.7 ·OH scavenging activities of V_c and total flavonoids

2.4.3 马鞭草总黄酮对 O_2^- ·清除能力 由图8可知,在实验浓度范围内,阳性对照物抗坏血酸对 O_2^- ·的清除能力开始高于马鞭草总黄酮,随着样品浓度的增高,马鞭草总黄酮对 O_2^- ·的清除率也在逐渐增加,在浓度大于 $40 \mu\text{g/mL}$ 时,对 O_2^- ·的清除能力开始略高于抗坏血酸。当浓度为 $60 \mu\text{g/mL}$ 时,清除率为 89.5%,此后,随着浓度的增加,清除率基本保持不变。

3 结论

通过采用响应面法优化马鞭草中总黄酮的闪式提取工艺,以马鞭草中总黄酮含量为响应值进行响应面分析,得到最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 50%,料液比为 1:35 (g/mL),提取时间为 1.5 min,提取次数为 2 次,在此条件下,总黄酮含量达到 $(8.282 \pm 0.003) \text{ mg/g}$,与模型预测值 8.280 mg/g 相近。与该方法可为马鞭草中总黄酮的研究提供一定的基础。马鞭草中总黄酮抗氧化活性试验表明随着马鞭草中总黄酮含量的增多,其抗氧化活性在一定

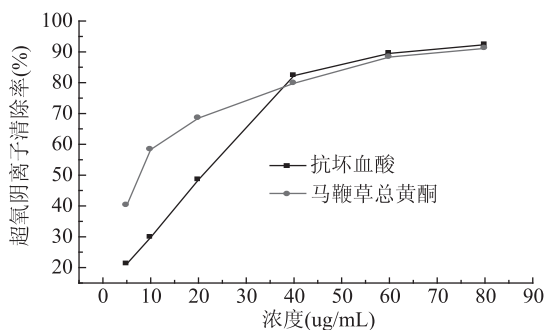


图8 不同浓度的马鞭草总黄酮和抗坏血酸对 O_2^- ·自由基的清除率

Fig.8 O_2^- ·scavenging activities of V_c and total flavonoids

范围内不断增加,为在食品、药品等领域开发天然抗氧化剂提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Fan JG. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 11-17.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 郭琳, 苗明三. 马鞭草化学、药理及临床应用探讨[J]. 中医学报, 2014, 29(9): 1345-1347.
- [4] 陈改敏. HPLC 测定不同地区马鞭草中毛蕊花苷的含量[J]. 光明中医, 2015, 30(11): 2498-2499.
- [5] 李萌萌, 焦天慧, 吕长鑫, 等. 红树莓籽中黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(2): 101-109.
- [6] 辜中春, 李君章, 李光荣, 等. 石楠叶总黄酮含量测定及抗氧化活性研究[J]. 应用化工, 2017, 46(12): 2488-2491.
- [7] 王全泽, 袁堂丰, 刘磊磊, 等. 响应面法优化闪式提取罗汉松总黄酮及其抗氧化活性[J]. 精细化工, 2018, 35(1): 65-71.
- [8] 赛春梅, 崔琳琳, 杨梦, 等. 响应曲面法优化超声辅助提取诸葛菜总黄酮工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品与药品, 2018, 41(1): 53-58.
- [9] 张迪, 王勇, 王彦兵, 等. 闪式提取法提取枣果皮中多酚的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 259-262.
- [10] 陈卓君, 艾买提·阿曼古力, 戴蕴青, 等. 响应面法优化闪式提取玫瑰黄酮化合物工艺[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 387-390.
- [11] 吴冬梅. 闪式提取器在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 34-37.
- [12] 张鲁, 张媛, 王文全, 等. 甘草地上部分总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(4): 55-59.
- [13] 李会端, 江岸, 余建中, 等. 生姜总黄酮甲醇浸提工艺的响应面优化及提取液对羟自由基清除活性[J]. 北方园艺, 2017(23): 155-164.
- [14] 王彦兵, 张迪, 刘绣华, 等. 茶多酚-锌(II)配合物的合成及抗氧化活性[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2012, 42(4): 378-383.
- [15] Chen R Z, Li H P, Li S Z, et al. Extraction optimization,

(下转第 184 页)

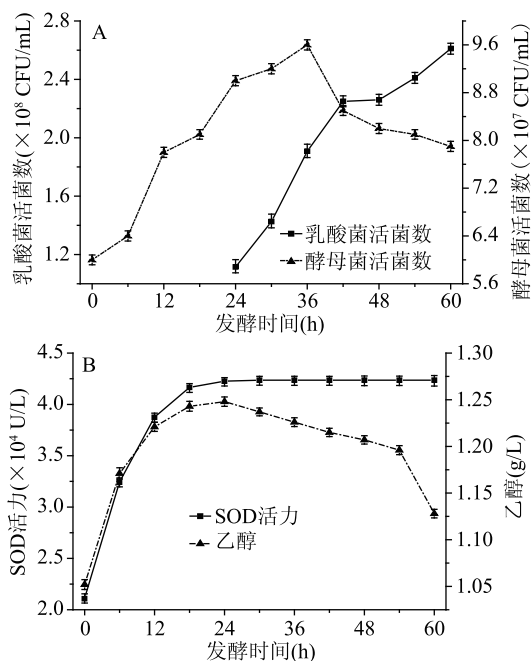


图10 复合发酵对发酵液的影响

Fig.10 Effect of complex fermentation on fermentation broth

比例混合作为乳酸菌发酵的菌种,并确定采用先接种酵母菌后接种乳酸菌发酵的方式得到的乳酸菌活菌数和SOD活力较优,在该顺序下得到的最佳复合发酵条件为:在初始pH5.0、添加1.2%的蛋白胨和装瓶量为30 mL(250 mL)的条件下,先接种0.2%的S4,30℃下振荡发酵24 h。酵母菌发酵结束后,再接种3%的复合乳酸菌(LA和LP的比例为1:1(v:v)),37℃静置发酵36 h,最后于4~8℃低温后发酵12 h产香。在此条件下,最终酵素中乳酸菌活菌为 2.61×10^8 CFU/mL,酵母菌活菌数为 7.9×10^7 CFU/mL,SOD活力为 4.23×10^4 U/L。本文首次以纯白首乌清汁为发酵基质,采用有益菌发酵的方法研制了一款新型的白首乌产品,该产品含有的大量活菌和功效酶,不仅提高了白首乌产品的附加值,还有利于当地产业的发展。

参考文献

[1] 宋俊梅,曲静然,丁霄霖.白首乌一般成分的研究[J].食品

研究与开发,2002,23(1):51-53.

[2] 孙彦敏,王辉,徐凌川.近10年白首乌研究进展[J].中国中医药信息杂志,2015,22(7):131-136.

[3] 宋萍萍,印敏,王年鹤.白首乌的综合利用[J].江苏农业科学,2011,39(2):426-427.

[4] 毛建卫,吴元锋,方晟.微生物酵素研究进展[J].发酵科技通讯,2010,39(3):42-44.

[5] 王子丹.微生物酵素的研究进展[J].农业科技与装备,2015(8):67-68.

[6] 刘加友,王振斌.微生物酵素食品研究进展[J].食品与发酵工业,2016,42(1):273-276.

[7] 任清,于晓艳,潘妍,等.微生物酵素美白抗衰老功效研究[J].香料香精化妆品,2008(3):28-32.

[8] Feng Y J, Zhang M, S Mujumdar, et al. Recent research process of fermented plant extract: A review[J].Trends in Food Science & Technology,2017,65:40-48.

[9] 蒋增良.天然微生物酵素发酵机理、代谢过程及生物活性研究[D].杭州:浙江理工大学,2013.

[10] 张梦梅,刘芳,胡凯弟,等.酵素食品微生物指标与主要功效酶及有机酸分析[J].食品与发酵工业,2017,43(9):195-200.

[11] 李铁军,李爱云,张晓峰.乳酸菌抗菌机理研究进展[J].微生物学通报,2002,29(5):81-85.

[12] 卫生部.GB 4789.35-2016 中华人民共和国国家标准,食品微生物学检验乳酸菌检验[S].北京:中国标准出版社,2016.

[13] 戎军.血球计数板及其使用方法[J].中学生物教学,2015(10):41-43.

[14] 王岁楼,张平之,张欣,等.酵母SOD形成的生理学研究[J].工业微生物,1997,27(3):20-23.

[15] 卫生部.GB/T 5009.171-2003 中华人民共和国国家标准,保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定[S].北京:中国标准出版社,2003.

[16] 林仁权,胡文兰,陈国亮.重铬酸钾氧化分光光度法测定酒中乙醇含量[J].浙江预防医学,2006,18(3):78-79.

[17] 解傲,赵恕.国内解酒制品研究进展[J].中国微生态学杂志,2012,24(12):1146-1149.

[18] 高仕德,陈朝银,赵声兰.解酒酵素的研究与开发[J].药物生物技术,2017,24(1):92-94.

[19] 孟志芬,祝勇,李聪,等.毛泡桐花中总黄酮含量的测定[J].光谱实验室,2012,29(1):221-225.

[20] 林三清,周中流,杨红艳,等.柠檬桉叶总黄酮提取工艺及其清除自由基活性研究[J].中国药业,2017,26(6):5-8.

[21] 刘薇,王宏君,赵建,等.邻二氮菲- Fe^{2+} 法测定保健食品的抗氧化能力[J].食品科学,2010,31(18):333-337.

[22] 郭雪峰,岳永德,汤锋,等.用清除超氧阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2008,28(8):1823-1826.

[23] 闫蕊,赵桦.黄花油点草总黄酮超声提取工艺的响应面优化及抗氧化性分析[J].食品工业科技,2018,39(10):190-196,203.

(上接第178页)

preliminary characterization and immunological activity of polysaccharides from figs[J].International Journal of Biological Macromolecules,2015,72(72):185-194.

[16] Li H, Luo S L, Su J C, et al.Optimization of extraction conditions for flavonoid composition and antioxidant activity of radix scutellariae[J].Analytical Letters,2015(48):1234-1244.

[17] 古丽巴哈尔·卡吾力,高晓黎,常占瑛,等.黑果枸杞总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性[J].江苏农业科学,2017,45(22):213-217.

[18] 寇亮,李璐,陆丽娜,等.响应面法优化柠条锦鸡儿总黄酮超声提取工艺及其体外抗氧化性研究[J].食品工业科技,2016,37(17):225-231.