

DOI:10.11937/bfyy.201521034

## 葛藤花总黄酮提取及抗氧化活性研究

何文兵<sup>1,2</sup>, 刘欢<sup>1,2</sup>, 夏光辉<sup>1,2</sup>, 张吉<sup>2</sup>

(1. 通化师范学院 长白山食品工程研究中心, 吉林 通化 134000; 2. 通化师范学院 制药与食品科学学院, 吉林 通化 134000)

**摘 要:**以长白山区野生葛藤花为原料,利用超声波辅助提取方法,在单因素试验基础上,以响应面法优化野生葛藤花总黄酮提取工艺,并考察其清除·OH和DPPH·的能力。结果表明:葛藤花总黄酮最佳工艺条件为提取时间24.30 min,提取温度70℃、乙醇体积分数为60%,在此提取条件下总黄酮的实际提取率可达7.608 mg/g。葛藤花总黄酮对DPPH·自由基和·OH自由基的清除能力均强于一定浓度的维生素C,说明其具有开发抗氧化剂的前景。

**关键词:**葛藤花;总黄酮;提取工艺;响应面法;抗氧化活性

**中图分类号:**TS 201.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0132-05

葛藤花为豆科植物野葛(*Pueraria lobata* (Willd) Ohwi)的花,异名葛条花<sup>[1]</sup>,在吉林省长白山区有广泛分布。作为我国的传统药物,葛藤花味甘、性平,用于治疗酒后发热、烦渴、食欲不振、脾虚等症,具有解酒醒脾的功效<sup>[2]</sup>,其主要有效成分是黄酮化合物<sup>[3]</sup>,而葛藤花中所含的该类化合物在解酒方面所具有简、便、效、廉的特点,日益受到人们关注。该研究以超声波辅助提取的方法,在单因素试验基础上,通过响应面法优化葛藤花总黄酮提取工艺,并考察其总黄酮的抗氧化活性,研究结果可为长白山区葛藤花资源的应用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试葛藤花于2012年8月采自吉林省集安市野葛植株;芦丁、95%乙醇、无水乙醇、甲醇、石油醚、正丁醇、DPPH、水杨酸、硫酸亚铁、双氧水、抗坏血酸等药品均为分析纯。

仪器:UV-2600 紫外-可见分光光度计(SHIMADZU);722 型可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);KQ-100KDB 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);FW-200 高速万能粉碎机;FA1604A 型电子分析天平(上海精天电子仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 单因素试验 影响葛藤花总黄酮的提取效果因素包括提取溶剂的种类及浓度、超声功率、超声温度、超

声时间等,以总黄酮的提取率作为评价指标,利用单因素试验确定主要影响因素及水平。3次重复,取平均值。不同溶剂对葛藤花总黄酮提取率的影响:在超声提取时间25 min,提取温度65℃,功率为50 W条件下,考察有机溶剂种类对总黄酮提取率的影响。超声提取时间对总黄酮提取率的影响:以乙醇为溶剂,在提取温度65℃,超声功率为50 W条件下,考察10、15、20、25、30 min不同提取时间对总黄酮得率的影响。超声提取温度对总黄酮提取率的影响:以乙醇为溶剂,在超声提取时间为25 min,超声功率为50 W时,考察25、35、45、55、65℃不同提取温度对总黄酮提取率的影响。超声功率对总黄酮提取率的影响:以乙醇为溶剂,在超声提取时间为25 min,超声提取温度为65℃时,考察40、50、60、70、80 W不同提取超声功率对总黄酮提取率的影响。乙醇浓度对总黄酮提取率的影响:在超声提取时间为25 min,超声提取温度为65℃、超声功率为50 W的条件下,考察40%、60%、80%乙醇及无水乙醇等不同浓度对总黄酮提取率的影响。

1.2.2 优化试验 以响应面分析法,通过Box-Behnken中心组合试验设计原理<sup>[5-9]</sup>,通过1.2.1中所确定的因素和水平,即提取温度、时间、乙醇浓度作为中心组合试验因子进行响应面分析,因素与水平见表1。

表1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels used in response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	A 提取时间 A Extraction time /min	B 提取温度 B Extraction temperature /℃	C 乙醇体积分数 C Alcohol concentration /%
-1	20	60	50
0	25	65	60
1	30	70	70

**第一作者简介:**何文兵(1977-),男,吉林九台人,博士研究生,副教授,现主要从事果蔬功能性成分及风味物质等研究工作。E-mail:hwber@126.com.

**收稿日期:**2015-07-02

### 1.3 项目测定

1.3.1 标准曲线的绘制 葛藤花总黄酮的分析方法采用分光光度法,以紫外分光光度计对芦丁标准对照品溶液进行扫描,根据其在一定波长下所处获得稳定的特征吸收峰,利用分光光度法在该波长下测定溶液的吸光度,得到吸光度  $X$  与总黄酮质量浓度  $Y(\text{mg/mL})$  的线性关系<sup>[4]</sup>。

1.3.2 葛藤花总黄酮的测定 定量称取粉碎处理后的葛藤花粉,倒入 25 mL 容量瓶中,按固液比 1:10 g/mL 加入乙醇溶液,置于超声波清洗器中超声提取,得到淡黄绿色溶液,静止后取上清液 4 mL 于 10 mL 容量瓶中定容,在 356 nm 测得吸光度,根据标准曲线计算总黄酮的提取率。

1.3.3 总黄酮抗氧化性测定 DPPH· 的清除:参照孔祥建<sup>[10]</sup>的方法并改进,在试管中分别加入 2 mL  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的 DHHP· 无水乙醇溶液和 0.041 6 mg/mL 提取液,混匀并放置 30 min,以一定浓度乙醇溶液调零,在 517 nm 处测定吸光度记为  $A_1$ ,同法 2 mL 溶剂与 2 mL DHHP· 溶液混匀测定吸光度  $A_2$ ,2 mL 样品溶液与 2 mL 的溶液混匀测定吸光度  $A_3$ ,3 次重复,取平均值。以 0.041 6 mg/mL 维生素 C 为阳性对照。DHHP· 清除率(%) $=[1-(A_1-A_3)/A_2] \times 100$ ,式中, $A_3$ :样品自身的吸光度值; $A_2$ :DPPH· 本身的吸光度值; $A_1$ :样品对 DHHP· 作用后的吸光度值。·OH 自由基的清除:参照 SMIRNOFF 等<sup>[12]</sup>的方法并改进,以 Fenton 反应产生·OH,测定原理<sup>[11-14]</sup>:体系中通过 Fenton 反应产生的·OH 能够氧化水杨酸产生 2,3-二羟基苯甲酸,它在 510 nm 处有特征吸收,通过测定水杨酸捕获·OH 所得到的产物,以确定·OH 的清除率。3 次重复,取平均值。以 0.041 6 mg/mL 维生素 C 为阳性对照。·OH 清除率(%) $=(A_0-A_x-A_{\text{降低}})/A_0 \times 100$ , $A_{\text{降低}}=A_{00}-A_{xx}$ ,式中: $A_0$  为加入 3 种溶液 37℃ 水浴 15 min 后的吸光度; $A_x$  为加入待测液水浴 15 min 后的吸光度; $A_{00}$  为对照组 37℃ 水浴 15 min 后的吸光度。

### 1.4 数据分析

利用 Design Expert 8.0.5 软件对试验数据进行回归分析,预测超声波辅助提取葛藤花总黄酮的最佳工艺。

## 2 结果与分析

### 2.1 芦丁标准品紫外吸收光谱

从图 1 可以看出,通过紫外吸收测定,在 356 nm 处芦丁标准样有最大吸收峰,故试验时选择此波长测定以下吸光度值。

### 2.2 总黄酮标准曲线

根据 1.3.1 方法绘制标准曲线,标准曲线方程为

$y=0.030\ 7x+0.000\ 4(R^2=0.999\ 3)$ 。式中: $y$  为总黄酮质量浓度(mg/mL), $x$  为吸光度。

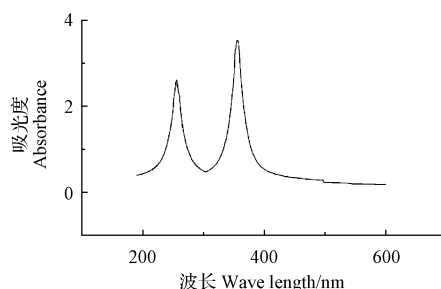


图 1 紫外吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrogram

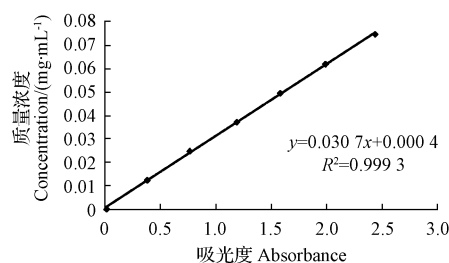


图 2 葛藤花总黄酮标准曲线

Fig. 2 The standard curve of total flavonoids of Kudzu flowers

### 2.3 单因素试验

2.3.1 不同溶剂对葛藤花总黄酮提取率的影响 由表 2 可知,对葛藤花总黄酮提取效果最好有机溶剂为乙醇,其提取率为 7.868 mg/g。

表 2 不同有机溶剂的提取效果

Table 2 Effect of the different organic solvents

有机溶剂	吸光度	提取率
Solvent	Absorbance	Extraction ratio/(mg·g <sup>-1</sup> )
乙醇 Ethanol	1.256	7.868
甲醇 Methanol	0.609	5.118
石油醚 Petroleum	0.214	1.088

2.3.2 超声提取时间对总黄酮提取率的影响 由图 3 可知,在提取时间低于 25 min 时,总黄酮提取率随时间的增加而逐渐升高,当时间超过 25 min 时,总黄酮提取

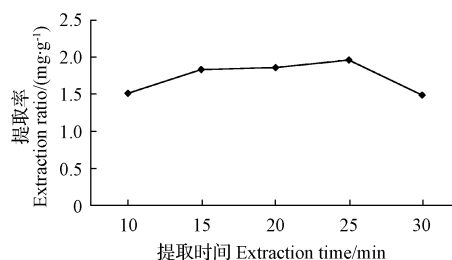


图 3 超声提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic treatment time on extraction ratio of total flavonoids

率不再上升,反而略有下降,故把超声时间 20~30 min 作为响应面试验的考查范围。

2.3.3 超声提取温度对总黄酮提取率的影响 由图 4 可知,随着温度的升高,总黄酮的提取率呈逐渐增大的趋势。当温度达到 65℃时,总黄酮的提取率最高。但随着提取温度继续升高,黄酮提取率缓慢降低,因此把超声温度 60~70℃作为响应面试验的考查范围。

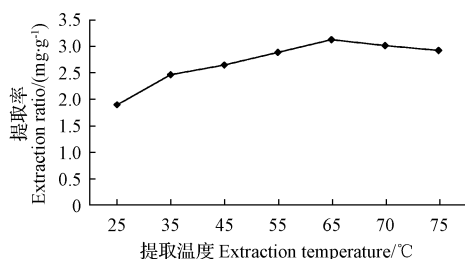


图 4 超声提取温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic treatment temperature on extraction ratio of total flavonoids

2.3.4 超声功率对总黄酮提取率的影响 由图 5 可知,超声功率在 40~50 W 范围内,总黄酮的提取率呈增大的趋势,当超声功率超过 50 W 时,提取率降低但差异不大。所以,试验选择 50 W 作为超声提取功率。

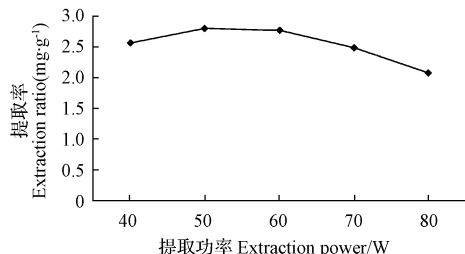


图 5 超声功率对总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic power on extraction ratio of total flavonoids

2.3.5 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响 从表 3 可以发现,总黄酮提取率随乙醇体积分数的增加呈现先增加后降低的趋势,体积分数为 60%时提取率最高。因此把乙醇体积分数 50%~70%作为响应面试验的考查范围。

表 3 乙醇不同体积分数提取效果

Table 3 Effect of the different alcohol concentration on extraction ratio of total flavonoids

乙醇体积分数 Ethanol concentration/ %	吸光度 A Absorbance A	提取率 Extraction ratio/(mg·g <sup>-1</sup> )
40	0.239	4.919
60	1.234	9.818
80	0.778	6.666
100	0.336	3.055

## 2.4 响应面优化提取工艺

### 2.4.1 模型的建立与显著性检验 借助于 Design Expert

8.0.5 软件,对不同试验条件下的数据(表 4)进行二次多元回归拟合,进行方差分析后所得模型二次多项式回归方程为  $Y=5.96-0.39A+0.55B-0.89C-0.12AB-0.16AC-0.10BC-1.18A^2+0.92B^2-1.06C^2$ ,从表 5 的方差分析可知,失拟项不显著( $P=0.305$   $0<0.05$ ),而模型的  $P$  值为 0.000 2,表明模型极显著。此外,因素一次项( $A$ 、 $B$ 、 $C$ )、二次项( $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ )对结果影响是显著的( $P<0.05$ ),交互项( $AB$ 、 $AC$ 、 $BC$ )对结果影响不显著( $P>0.05$ )。

表 4 Box-Behnken 设计方案及相应值结果

Table 4 The design of Box-Behnken and the response values

试验编号 Experiment number	因素			
	A 提取时间 A Extraction time/min	B 提取温度 B Extraction temperature/℃	C 乙醇体积分数 C Alcohol concentration/ %	Y 提取率 Y Extraction ratio/(mg·g <sup>-1</sup> )
	time/min	temperature/℃	concentration/ %	
1	25	65	60	6.407
2	30	65	70	2.235
3	25	65	60	5.615
4	25	70	50	7.205
5	25	65	60	5.825
6	25	60	70	4.638
7	30	65	50	4.235
8	25	60	50	6.329
9	25	70	70	5.114
10	20	65	70	3.518
11	30	70	60	6.053
12	25	65	60	5.878
13	20	70	60	6.895
14	30	60	60	4.751
15	20	60	60	5.125
16	25	65	60	6.084
17	20	65	50	4.892

表 5 方差分析

变异来源 Source	自由度 df	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	9	24.18	2.69	23.07	0.000 2	**
A	1	1.25	1.25	10.69	0.013 7	*
B	1	2.45	2.45	21.01	0.002 5	*
C	1	6.40	6.40	54.96	0.000 1	*
AB	1	0.055	0.055	0.47	0.515 0	
AC	1	0.098	0.098	0.84	0.389 6	
BC	1	0.040	0.040	0.34	0.576 2	
A <sup>2</sup>	1	5.85	5.85	50.22	0.000 2	**
B <sup>2</sup>	1	3.59	3.59	30.79	0.000 9	**
C <sup>2</sup>	1	4.76	4.76	40.86	0.000 4	**
残差 Residual	7	0.82	0.12			
失拟项 Lack of fit	3	0.46	0.15	1.69	0.305 0	
纯误差 Pure error	4	0.36	0.090			
总变异 Cor total	16	24.99				

注:  $P\leq 0.000 1$  为极显著,用“\*\*\*”表示;  $P\leq 0.05$  为显著,用“\*”表示;  $P>0.05$  为显著性不显著。下表同。

Notes: “\*\*\*” express very significant difference ( $P\leq 0.000 1$ ); “\*” express very significant difference ( $P\leq 0.05$ );  $P>0.05$  expresses not significant difference. The same below.

2.4.2 回归模型的优化 交互项( $AB$ 、 $AC$ 、 $BC$ )对结果影响不显著( $P>0.05$ ),故借手动优化方法对回归模

型进行优化,回归方程为  $Y=5.96-0.39A+0.55B-0.89C-0.16AC-1.18A^2+0.92B^2-1.06C^2$ 。由表 6 可知,失拟项不显著( $P=0.305\ 0<0.05$ ),而模型  $P<0.000\ 1$ ,说明模型极显著;预测值与实测值之间具有高度的相关性( $R^2=0.963\ 6$ ),信噪比 22.896,可以用此模型对超声波法提取葛藤花总黄酮进行分析和预测;在所选取的因素水平范围内,各因素对结果的影响排序为乙醇体积分数  $C>$  提取温度  $B>$  提取时间  $A$ 。

2.4.3 响应曲面图分析 从手动优化后的回归方程中的 AC 交互项所作等高线图和响应曲面的图 6 中可知,在一定的提取温度下,响应值总黄酮提取率受提取时间及乙醇浓度影响,表现为在一定时间范围内先增加后减小,响应曲面为开口向下的凸形曲面,表明 2 个因素在所选择范围内均能产生最佳的响应值,但曲面较平滑,等高线图为圆形<sup>[7]</sup>,表明二者之间交互作用不显著。

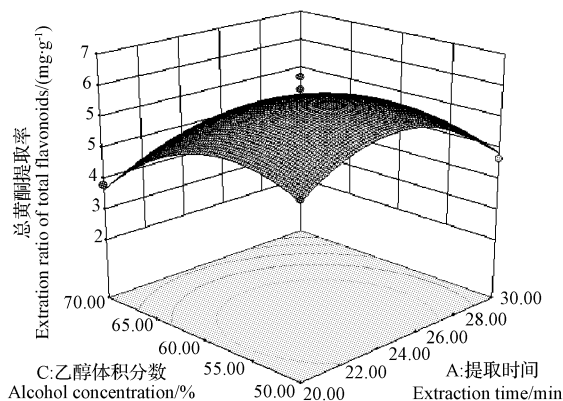
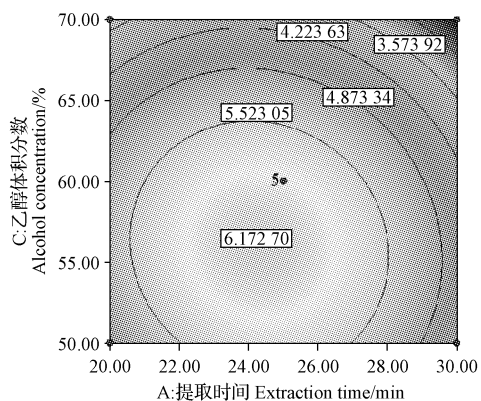


图 6 乙醇浓度与提取时间交互影响总黄酮提取率的等高线图和相应面图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot for alternate effect of alcohol concentration and extraction time on extraction ratio of total flavonoids

2.4.4 最佳萃取条件的预测和验证 通过 Design Expert 8.0.5 软件进行分析,以手动优化后的回归方程计算出超声波辅助提取长白山葛藤花总黄酮的最佳提取条件提取时间 24.30 min、提取温度 70℃、乙醇浓度 55.91%,在该条件下,其总黄酮提取率 7.649 mg/g。为了进一步验证超声波辅助提取葛藤花总黄酮最佳工艺,结合实际提取中遇到的问题,通过修正将最佳工艺修正为提取时间 24.30 min、提取温度 70℃、乙醇体积分数 60%,在该条件下进行 3 次试验,总黄酮提取率为 7.608 mg/g,验证结果与预测值偏差较小,说明超声辅助法提取葛藤花总黄酮的最佳工艺参数可靠。

## 2.5 总黄酮抗氧化性测定

2.5.1 清除 DPPH· 的能力 由图 7 可知,其清除 DPPH· 的能力随提取液浓度的增加而增加,其线性回归方程为  $Y=25.281X-12.185$  ( $R^2=0.988\ 5$ ),与维生素 C 溶液清除 DPPH· 的能力相比,在相同浓度下葛藤花总黄酮提取液对 DPPH· 的清除能力强于维生素 C 溶液。

表 6 去掉交互项 AB 和 BC 后的优化结果

Table 6 The optimization results of excluding AB and BC

变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	显著性
Source	df	Sum of squares	Mean square	F value	P value	Significance
模型 Model	7	24.08	3.44	34.03	<0.000 1	**
A	1	1.25	1.25	12.31	0.006 6	**
B	1	2.45	2.45	24.20	0.000 8	**
C	1	6.40	6.40	63.31	<0.000 1	**
AC	1	0.098	0.098	0.97	0.350 7	
A <sup>2</sup>	1	5.85	5.85	57.85	<0.000 1	**
B <sup>2</sup>	1	3.59	3.59	35.46	0.000 2	**
C <sup>2</sup>	1	4.76	4.76	47.07	<0.000 1	**
残差 Residual	9	0.91	0.10			
失拟项 Lack of fit	5	0.55	0.11	1.23	0.433 6	
纯误差 Pure error	4	0.36	0.090			
总变异 Cor total	16	24.99				

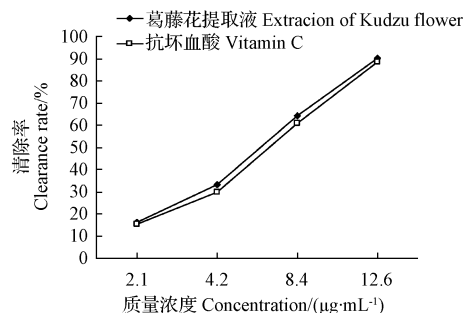


图 7 葛藤花提取液对 DPPH· 清除能力

Fig. 7 Scavenging activity of extract solution from Kudzu flowers against DPPH·

2.5.2 清除 ·OH 能力的测定 由图 8 可知,葛藤花提取液与维生素 C 对 ·OH 的清除能力随着质量浓度的增加而不断的增强,在相同浓度条件下,葛藤花提取液清除 ·OH 的能力比维生素 C 的清除率高,并呈线性关系,其线性回归方程为  $Y=10.731X-7.377$  ( $R^2=0.992\ 9$ )。

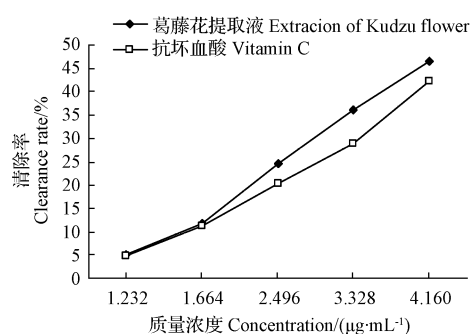


图8 葛藤花提取液对·OH清除能力

Fig. 8 Scavenging activity of extract solution from Kudzu flowers against ·OH

### 3 结论

通过单因素试验,利用响应面法优化超声波辅助提取长白山野生葛藤花总黄酮工艺,建立多元回归模型,该模型显著,拟合度好。长白山野生葛藤花总黄酮的最佳提取条件为提取时间 24.30 min、提取温度 70℃、乙醇体积分数 60%,在此条件下,总黄酮提取率达 7.608 mg/g。响应面分析法所优化提取工艺在各影响因素合理取值范围内找到最佳提取条件及其对应得率。

对葛藤花总黄酮抗氧化活性测定结果表明其抗氧化活性强,可为葛藤花资源合理开发利用提供理论依据。试验中对葛藤花总黄酮化合物的结构鉴定有待进一步研究。

## Total Flavonoids Extraction of Kudzu Flowers and Antioxidant Activity

HE Wenbing<sup>1,2</sup>, LIU Huan<sup>1,2</sup>, XIA Guanghui<sup>1,2</sup>, ZHANG Ji<sup>2</sup>

(1. Research Center of Changbai Mountain Food Engineering, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134000; 2. Department of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134000)

**Abstract:** Taking Kudzu flowers as materials, based on one-factor-at-a-time experiments, response surface methodology was used to optimize the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from Kudzu flowers wildly growing in Changbai Mountain. At the same time, the scavenging free radical capacity on ·OH and DPPH· with total flavonoids was evaluated. The results showed that the optimal extraction conditions as follow, extraction time was 24.30 minutes, extraction temperature was 70℃, ethanol concentration was 60%. Under these conditions, the actual extraction yield of total flavonoids was 7.608 mg/g. Extracted total flavonoids had higher scavenging capacity on ·OH and DPPH· than a certain concentration solution of vitamin C. The conclusion showed that flavonoids of Kudzu flowers had a potential which could be exploit antioxidant.

**Keywords:** Kudzu flowers; total flavonoids; extraction process; response surface method

### 参考文献

- [1] 朱华,刘蕊蕊,王孝勋. 葛花的研究进展[J]. 中医药学刊, 2005, 23(12): 2273-2274.
- [2] 尹俊亭,仲英,孙敬勇. 葛花的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1905-1906.
- [3] 郭蕊,张云,刘雅静,等. 野葛花醇提物中异黄酮含量及其抗氧化活性测定[J]. 西北植物学报, 2009, 29(6): 1259-1263.
- [4] 李洪雄,彭志远,邹海英. 葛根黄酮的提取与应用[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2006, 27(3): 114-116.
- [5] 龚文琼,刘睿. 响应面法优化微波辅助提取普洱茶中茶色素工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 137-142.
- [6] 王灵昭,邓家权. 微波法提取雨生红球藻中虾青素的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(12): 96-100.
- [7] 秦义,樊明涛,师俊玲,等. 富锌灵芝发酵培养基的响应面法优化研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(2): 24-29.
- [8] 袁志发,周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [9] 王永斌,王允祥. 玉米黑粉菌培养条件响应面法优化研究[J]. 中国酿造, 2006(5): 56-60.
- [10] 孔祥建. 葛藤总黄酮的提取纯化及其抗氧化活性的研究[D]. 重庆:西南大学, 2009.
- [11] 何文兵. 燕麦麸抗氧化性能研究及不饱和脂肪酸富集[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2007.
- [12] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [13] 黎勇坤,李聪,古昆,等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> 体系中羟基氧化行为的抑制与促进[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2002, 24(4): 302-305.
- [14] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.