

# 减压-超声辅助醇法提取薇菜黄酮及其对抗氧化活性的影响

符群<sup>1</sup>, 李卉<sup>1</sup>, 王振宇<sup>2</sup>, 王路<sup>2</sup>

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 哈尔滨工业大学化工与化学学院, 黑龙江哈尔滨 150090)

**摘要:** 为确定减压-超声波辅助醇法提取薇菜黄酮的最佳工艺条件, 以黄酮提取量为指标, 采用响应面法对主要工艺参数进行优化。方差分析结果表明: 回归模型较好地反应了薇菜黄酮提取量与料液比、乙醇体积分数和超声温度的关系; 最佳工艺条件为: 料液比 1:60, 乙醇体积分数 49.97%, 超声温度 70.19 °C, 超声时间 70 min, 超声功率 300 W, 提取压力 0.08~0.1 MPa。此条件下薇菜黄酮提取量为 (118.924±1.950) mg/g。回归模型的失拟值不显著, 说明该回归模型模拟较好。通过体外抗氧化试验表明: 减压-超声法和常压超声法提取黄酮类物质对 DPPH 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.117 mg/mL 和 0.119 mg/mL; 对 ABTS 自由基的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.072 mg/mL 和 0.076 mg/mL; 总还原能力由强到弱为: 减压-超声法>常压超声法>水溶 Vc。结论: 相同提取条件下减压-超声提取法的黄酮提取量比常压超声提取法黄酮提取量增加 (20.01±1.64) mg/g, 且不破坏黄酮类化合物抗氧化活性。

**关键词:** 薇菜; 黄酮; 减压-超声波; 响应面法; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2018)03-113-120

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.017

## The Effect of Decompression-ultrasonic Assisted Alcoholic Extraction on the Flavonoids from *Osmunda japonica* Thunb and Its Antioxidant Activity

FU Qun<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, WANG Zhen-yu<sup>2</sup>, WANG Lu<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

(2. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** In order to determine the optimum conditions of ultrasound-assisted decompression of alcoholic extraction of flavonoid from *Osmunda japonica* Thunb, the main process parameters were optimized by response surface methodology (RSM) with flavonoid extraction as an indicator. The results of variance analysis showed that the regression model could well reflect the relationship between extraction volume of flavonoids and the ratio of solid to liquid, the volume fraction of ethanol and the temperature of ultrasonic. The optimum extraction processing parameter was ascertained as follows: the solid-liquid ratio 1: 60, the volume fraction of alcohol 49.97%, ultrasonic temperature 70.19°C, ultrasonic time 70 min, ultrasonic power 300 W, and extraction pressure 0.08~0.1 MPa. Under these conditions, the yield of flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb was (118.924 ± 1.950) mg/g. Antioxidant test results showed that: the IC<sub>50</sub> of flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb by decompression-ultrasonic and atmospheric pressure ultrasonic extraction for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were 0.117 and 0.119, respectively. The IC<sub>50</sub> of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS<sup>+</sup>) were 0.072 and 0.076, respectively. The total reducing power: decompression- ultrasonic > atmospheric pressure ultrasonic > Vc. Under the same extraction conditions, the extraction of flavonoids by decompression-ultrasonic extraction method was 20.01 ± 1.64 mg/g higher than that by ultrasonic extraction, and the antioxidant activity of flavonoids was not affected.

**Key words:** *Osmunda japonica* Thunb; total flavonoids; decompression-ultrasonic; response surface methodology; antioxidant activity

收稿日期: 2017-10-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2016YFC0500307-07)

作者简介: 符群 (1974-), 博士, 高级工程师, 研究方向: 林下资源活性物质分离与性质研究

通讯作者: 王路 (1973-), 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物分离与性质研究

薇菜, 学名紫萁 (*Osmunda japonica* Thunb.), 民间俗称野鸡头、大巢菜、扫帚菜, 古时名为“巢菜”或“野豌豆”。紫萁科 (*Osmundaceae*) 紫萁属 (*Osmunda*) 多年生真蕨类植物。薇菜味苦性凉并富含多种蛋白质、氨基酸、维生素及微量元素<sup>[1]</sup>, 薇菜整株均可入药, 具有抗菌、凝血、消炎退热<sup>[2]</sup>、抗氧化、增进人体免疫力、抗癌防癌及延缓衰老的作用, 其中促进细胞修复等功效明显<sup>[3]</sup>。薇菜多年在国际上被称为“无污染菜”, 在日本更被誉为“野山菜之王”。

薇菜是我国重要的山珍和药食同源植物, 对薇菜最早的开发源于日本, 20 世纪 80 年代, 我国学者对薇菜进行研究<sup>[4]</sup>, 内容多为生态学、培育学和初级加工工艺学, 对薇菜高值化及深加工研究甚少。薇菜中富含黄酮类物质, 李凤霞<sup>[5]</sup>等人通过醇提法制备提取液中薇菜总黄酮含量为 15.99%。黄酮是一类具有多种生物活性的物质<sup>[6]</sup>, 目前黄酮类物质的制备有传统的浸提回流法<sup>[7]</sup>、生物酶法<sup>[8]</sup>、超声波辅助提取法<sup>[9]</sup>和微波辅助提取法<sup>[10]</sup>等, 单一方法提取存在一定局限性, 耗能高、时间久、提取不完全, 多种方法联合提取可以更高效、省时的提取出原料中黄酮类化合物。

本研究采用减压-超声波辅助溶剂法提取薇菜黄酮, 减压方法是通过真空泵抽取容器内的空气使提取物的气压维持在 (0.08 MPa~0.1 MPa) 的范围内的方法。减压条件下气压降低, 容器内的气体变稀薄, 溶剂分子之间的距离变大, 打破溶剂之间分子链的能量随之减少, 从而使溶剂的沸点降低, 同时通过超声波的空化作用, 分子之间的加速度加大了对分子链和细胞壁的作用, 使得提取物可以有效流出。通过响应面法对其提取工艺条件进行了优化, 并且将提取的黄酮化合物与常压条件下提取物的抗氧化活性进行对比分析, 为薇菜深加工技术推广提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

薇菜: 采自吉林长白山。

亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、铁氰化钾、三氯化铁、三氯乙酸均为分析纯; 芦丁, 纯度≥98%, Solarbio; DPPH, Sigma; ABTS, Sigma。

### 1.2 仪器与设备

KQ-300DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SHB-III G 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; ME204 分析天平, Mettler-Toledo; UV-1810 型紫外分光光度计, 上海普析通用。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 薇菜原料的预处理

将干制薇菜原料置于 40 °C 烘箱中烘干至残余水分含量小于 3%, 以超高速粉碎机粉碎过筛 60 目, 按照料液比 1:10 加入石油醚, 连续搅拌 2 h 脱脂脱色, 挥干溶剂后备用。

#### 1.3.2 标准曲线的绘制

采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  比色法测定<sup>[11]</sup>。将芦丁标准品干燥至恒重后, 准确称取 0.0140 g 定容于 50 mL 容量瓶中, 得浓度 0.28 mg/mL 的芦丁标准溶液。准确吸取芦丁标准溶液 0.0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 于 25 mL 容量瓶中, 加入 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 0.75 mL, 摇匀, 放置 6 min 再加入 10% 的  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液 0.75 mL, 摇匀, 放置 6 min 后再加入 4%  $\text{NaOH}$  溶液 10 mL, 70% 乙醇定容, 摇匀, 静置 10~15 min 后于 510 nm 处测定吸光度 A, 以芦丁浓度 X (mg/mL) 对吸光度 Y 进行线性回归, 得回归方程  $y=0.4367x-0.0006$ ,  $R^2=0.9996$ 。

#### 1.3.3 薇菜中黄酮类化合物提取量的测定

以芦丁为对照品, 采用 UV 法测定总黄酮含量。取一定体积的黄酮提取液, 按 1.3.2 操作, 加 75% 乙醇定容至 25 mL, 在波长 510 nm 处测定其吸光度。黄酮提取液中的黄酮含量以每 g 样品中芦丁当量计, 按照公式 (1) 计算黄酮提取量。

$$\text{黄酮提取量 (mg/g)} = \frac{C * V * N}{M} * 100\% \quad (1)$$

式中: C 表示测定液总黄酮含量 (mg/mL); N 表示稀释倍数; V 表示为样品体积 (mL); M 表示样品质量 (g)。

#### 1.3.4 薇菜黄酮提取单因素试验

试验时为减少在抽滤过程中提取溶剂乙醇体积分数的变化, 需将真空泵与抽滤瓶连接管替换成软质橡胶管, 抽滤时橡胶管迅速变形闭合同时用夹子夹住橡胶管即可有效减少提取液的损失又可保证提取瓶内气压稳定。此外, 将样品和提取液装入抽滤瓶后, 应做好详细刻度标记, 并每隔 5 min 观察提取液损失情况并及时补充, 最大限度减少乙醇体积分数受真空条件的影响。通过对抽滤瓶密封程度的改变来控制减压压力范围。

准确称取烘干至恒重的薇菜粉末 1.00 g, 分别研究料液比 (1:40、1:50、1:60、1:70、1:80), 乙醇体积分数 (30%、40%、50%、60%、70%), 超声功率 (180、210、240、270、300 W), 提取压力 (0.00~0.02、0.02~0.04、0.04~0.06、0.06~0.08、0.08~0.1 MPa), 提取温度 (40、50、60、70、80 °C), 提取时间 (20、30、40、50、60 min) 对薇菜黄酮提取量的影响。

### 1.3.5 提取工艺的响应面试验设计

在单因素试验的基础上,通过 Plackett-Burman 试验选取对黄酮提取量影响显著的因素 ( $p < 0.05$ ),非显著条件选择单因素最优条件,采用中心组合 Box-Behnken Design(BBD)设计试验进行响应面优化减压-超声波辅助醇法提取薇菜黄酮工艺。

### 1.3.6 薇菜黄酮 DPPH·自由基清除能力的对比

参照吕英华等<sup>[12]</sup>人的方法稍作修改,取不同梯度浓度稀释样品 2 mL 和 1 mmol/L DPPH·2 mL,加入同一试管中,混匀后室温下避光反应 6 min,在 515 nm 下测定吸光值  $A_i$ ,对照组  $A_j$  以等体积蒸馏水代替 DPPH·溶液,空白组  $A_0$  以等体积的蒸馏水代替样品溶液,并以等体积蒸馏水空白调零,清除率按公式 2 计算,并以 Vc 为阳性对照,平行测定 3 次。

$$\text{清除率} \% = \left[ 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $A_i$  表示 2 mL 样品+2 mL DPPH;  $A_j$  表示 2 mL 样品+2 mL 蒸馏水;  $A_0$  表示 2 mL 蒸馏水+2 mL DPPH。

### 1.3.7 薇菜黄酮 ABTS<sup>+</sup>·自由基清除能力对比

ABTS<sup>+</sup>·的测定方法参考白海娜等<sup>[13]</sup>人方法稍作修改,取不同梯度浓度稀释样品 1.5 mL 和 ABTS<sup>+</sup>·1.5 mL,加入同一试管中,混匀后室温下避光反应 6 min,在 734 nm 下测定吸光值  $A_i$ ,对照  $A_j$  以等体积蒸馏水代替 ABTS<sup>+</sup>·溶液,空白组  $A_0$  以等体积的蒸馏水代替样品溶液,并以等体积蒸馏水空白调零,清除率按式 3 计算,并以 Vc 为阳性对照,平行测定 3 次。

$$\text{清除率} \% = \left[ 1 - \frac{A_i - A_j}{A_0} \right] \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $A_i$  表示 1.5 mL 样品+1.5 mL ABTS<sup>+</sup>·;  $A_j$  表示 1.5 mL 样品+1.5 mL 蒸馏水;  $A_0$  表示 1.5 mL 蒸馏水+1.5 mL ABTS<sup>+</sup>·。

### 1.3.8 薇菜黄酮总还原力能力的对比

总还原力的方法参考萨茹丽<sup>[14]</sup>等人的方法,并稍作修改,考察减压-超声法提取的薇菜黄酮对总还原力的影响。在试管中分别加入 2.5 mL pH 为 6.6 的 PBS 溶液,再加入 0.01 g/mL 的铁氰化钾溶液 1 mL 混匀后加入薇菜总黄酮 1 mL,充分摇匀 50 °C 水浴静置 20 min,待冷却后迅速加入 10% 三氯乙酸溶液 2.5 mL 混匀,吸取 2 mL 于另一试管中,加入 0.1 g/mL 的三氯化铁溶液 1 mL 混匀,静置 10 min 后于 700 nm 处检测吸光值。

## 1.4 数据处理

本文绘图软件使用 OriginPro 8.6, Plackett-Burman 和 BBD 试验设计使用 Design-Expert 8.0.6,所有实验数据均重复 3 次,所得数据标准误差及其单因素方差

显著行分析 (LSD)、IC<sub>50</sub> 计算均使用 SPSS 19.0。

## 2 结果与讨论

### 2.1 减压-超声波辅助醇法提取薇菜总黄酮的

#### 单因素试验结果

#### 2.1.1 料液比对薇菜总黄酮提取量的影响

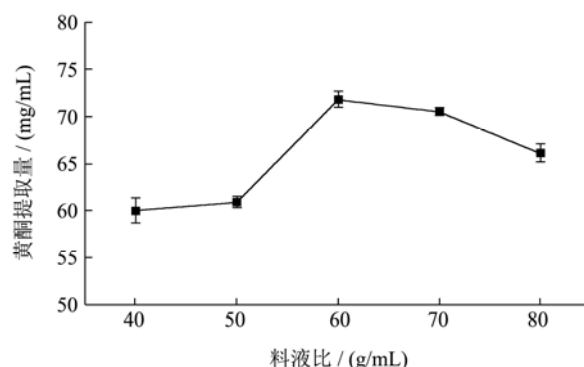


图1 料液比对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.1 Effects of solid-liquid ratio on the yield of total flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb

在提取温度 50 °C,乙醇体积分数 50%,提取时间 30 min,超声功率为 150 W,提取压力为 0.08~0.1 MPa 的条件下,考察不同液料比对薇菜黄酮提取量的影响。由图 1 可知,料液比在 1:40~1:60 的范围内,溶剂量增加对薇菜黄酮提取量有明显提高,当液料比为 1:60 时,薇菜黄酮提取量达到最大 71.93 mg/g,当料液比在 1:60~1:80 的范围内时,料液比与溶剂成负相关,此现象表明薇菜黄酮类物质已不随溶剂的增加而溶出。且液料比过大,成本增加,因此液料比选择在 1:50~1:70 范围内,进行响应面优化试验。

#### 2.1.2 乙醇体积分数对薇菜总黄酮提取量影响

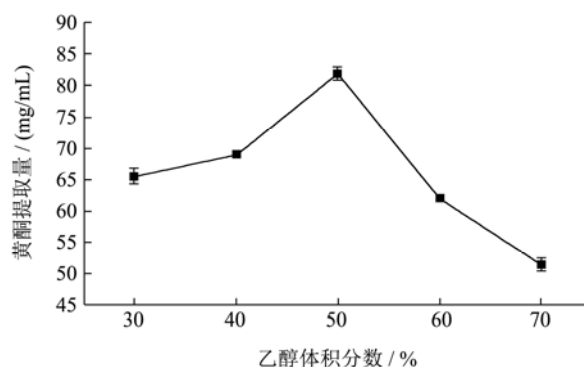


图2 乙醇体积分数对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.2 Effects of volume fraction of ethanol on the yield of total flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb

在提取温度 50 °C,料液比 1:60,提取时间 30 min,超声功率为 150 W,提取压力为 0.08~0.1 MPa 的条件



下,考察不同乙醇体积分数对薇菜黄酮提取量的影响。由图2可知,乙醇体积分数在30%~50%范围内,乙醇体积分数与黄酮提取量成正相关,当乙醇浓度50%黄酮提取量达到最大81.91 mg/g,当乙醇体积分数超过50%时,乙醇浓度与黄酮提取量成负相关。溶液提取根据相似相溶的原则,浓度过高过低都不利于提取物的溶出,因此最适乙醇体积分数选择40%~60%范围,进行响应面优化。

### 2.1.3 超声功率对薇菜总黄酮提取量的影响

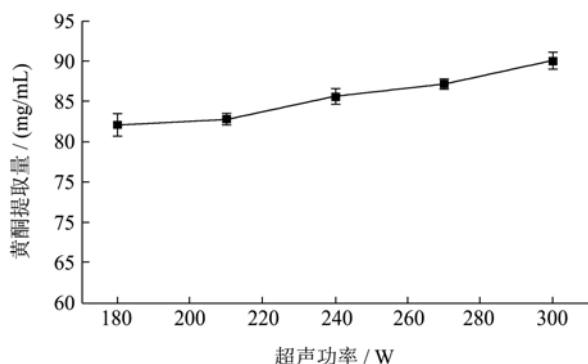


图3 超声功率对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic power on the yield of total flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb

在提取温度50℃,料液比1:60,提取时间30 min,乙醇体积分数50%,压力为0.08~0.1 MPa的条件下,考察不同超声功率对薇菜黄酮提取量的影响。

由图3可知,薇菜黄酮提取量随功率增加而持续增长,当超声功率达到300 W时,黄酮提取量达到最大值90.04 mg/g,此现象说明,超声功率越高,热效应、空穴效应及机械效应相应增加,共同促进了分子间运动相互作用的程度,有利于黄酮类化合物的溶出。超声波清洗器最大工作功率为300 W,选择超声功率300 W为黄酮最佳提取条件。

### 2.1.4 超声温度对薇菜总黄酮提取量的影响

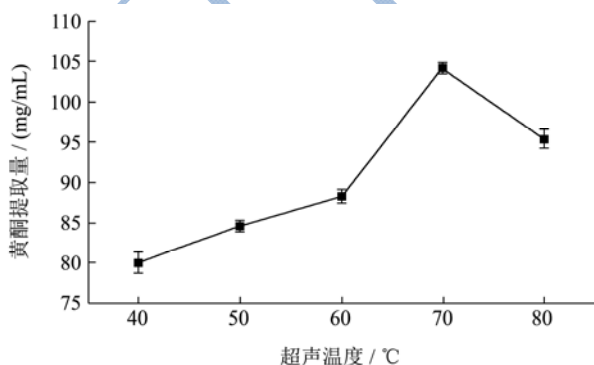


图4 超声温度对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic temperature on the yield of *Osmunda japonica* Thunb

在乙醇体积分数50%,液料比1:60,提取时间30

min,超声功率为300 W,气压为0.08~0.1 MPa的条件下,考察不同的超声温度对薇菜黄酮提取量的影响。

由图4可知,超声温度在40~70℃范围内,超声温度与黄酮提取量成正比,当超声温度70℃黄酮提取量达到最大104.2 mg/g,当超声温度超过70℃时,薇菜黄酮提取量开始降低,此现象说明,温度高会加速分子间的运动,增加黄酮的提取量。

### 2.1.5 减压对薇菜总黄酮提取量的影响

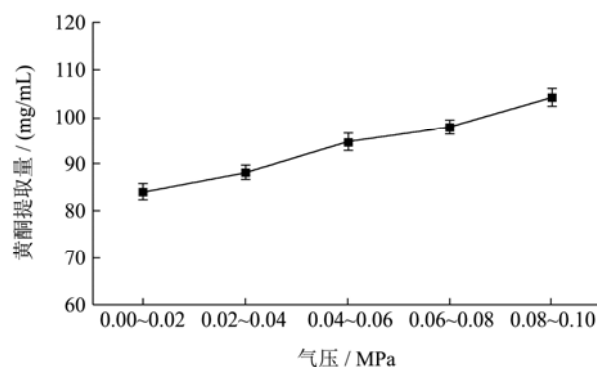


图5 压强对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.5 Effects of pressure on the yield of total flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb

在乙醇体积分数50%,料液比1:60,提取时间30 min,超声功率为300 W,超声温度70℃,考察不同压强对薇菜黄酮提取量的影响。由图5可知,随着提取压强的逐渐降低,黄酮提取量不断提高,当压强在0.00~0.02 MPa接近常压时,黄酮提取量为84.19 mg/g,而压强降至0.08~0.1 MPa接近真空时,黄酮提取量达到最大104.2 mg/g。减压比常压条件下黄酮提取量增加20.01 mg/mL。此现象说明:相同温度条件下,减压处理比常压更有利于黄酮类物质的溶出,低压时提取容器内空气稀薄,提取溶剂内的提取物受到的外力减小,分子链变大,需要打破分子链的能量降低,因此,相同条件下低压强提取较常压提取效率更高。

### 2.1.6 超声时间对薇菜总黄酮提取量的影响

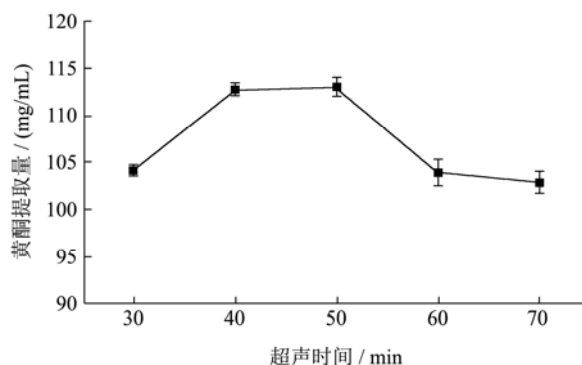


图6 超声时间对薇菜总黄酮提取量的影响

Fig.6 Effects of ultrasonic time on the yield of total flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb

在乙醇体积分数 50%，料液比 1:60，超声温度 70 ℃，超声功率为 300 W，提取压力为 0.08~0.1 MPa 的条件下，考察超声时间对薇菜黄酮提取量的影响。

由图 6 可知，超声时间在 30~50 min 范围内，超声温度与黄酮提取量成正比，当超声时间 50 min 黄酮提取量达到最大 113.05 mg/g，当超声时间超过 50 min 时，薇菜黄酮提取量开始降低，此现象说明，超声时间越长，提取物提取越充分；但时间过长对黄酮类物质活性会起到破坏作用，且提取时间过长在生产实践时会造成能源浪费，因此最佳提取时间为 50 min。

### 2.2 减压-超声波辅助醇法提取薇菜总黄酮的响应面优化试验结果

通过 Plackett-Burman 试验对 6 组单因素数据进行显著性分析，得到方程如下：

$$\text{黄酮提取量} = 91.68 + 3.25A + 3.49B - 1.71C + 2.05D - 0.98E - 1.31F$$

计算结果显示，在 6 个主效应中，料液比、乙醇体积分数、超声温度是显著影响因素 ( $p < 0.05$ )，显著性顺序为乙醇体积分数 (B) > 料液比 (A) > 超声温度 (D)，三因素与响应值均呈正相关，而其它因素影响不显著。根据 PB 结果，按照 3 因素 3 水平设计响应面试验。

表 1 试验因素与水平设计

Table 1 Experimental factors and levels design

因素	水平		
	-1	0	1
料液比 (g/mL, A)	1:50	1:60	1:70
乙醇体积分数 (% , B)	40	50	60
超声温度 (°C, C)	60	70	80

### 2.3 响应面法优化试验结果

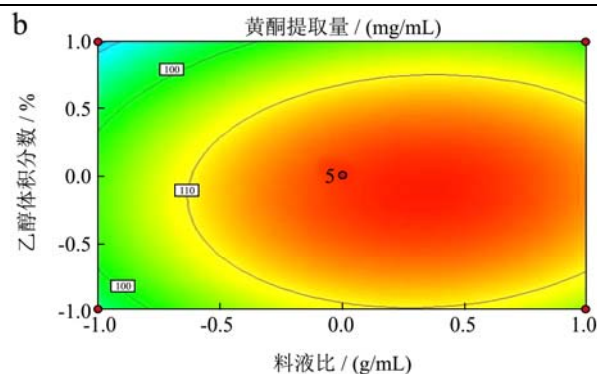
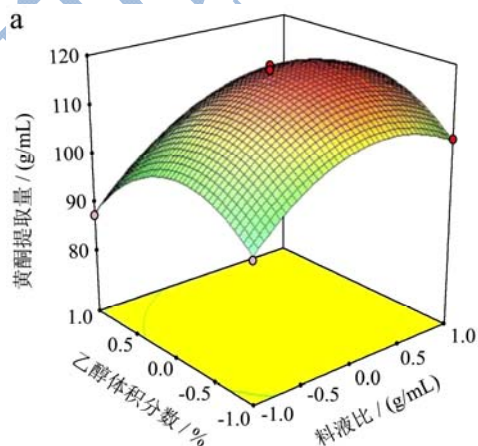


图 7 乙醇体积分数和料液比对黄酮提取量交互影响的响应面图和等高线图

Fig.7 Contour plot and response surface diagram of effects of the interaction between the volume fraction of ethanol and solid-liquid ratio on the yield of flavonoids

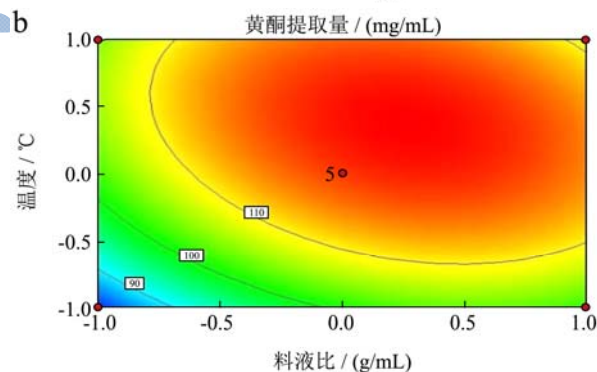
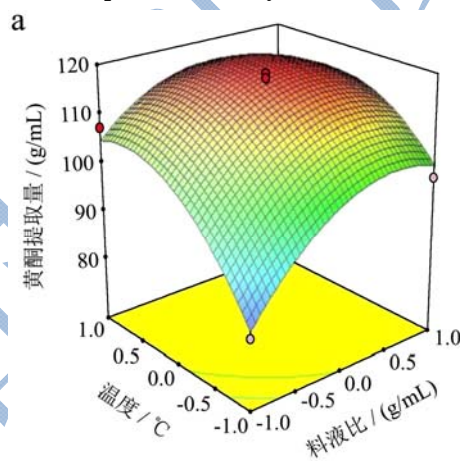


图 8 超声温度和料液比对黄酮提取量交互影响的响应面图和等高线图

Fig.8 Contour plot and response surface diagram of effects of the interaction between ultrasonic temperature and solid-liquid ratio on the yield of flavonoids

通过对图 7~图 9 响应面和等高线的观察分析，可直观的得出料液比 (A)、乙醇体积分数 (B) 和超声温度 (C) 之间的交互作用对薇菜黄酮提取量的影响，当等高线呈马鞍形或椭圆形时，交互作用显著；当等高线呈圆形时，则表示交互因素不显著<sup>[15]</sup>。

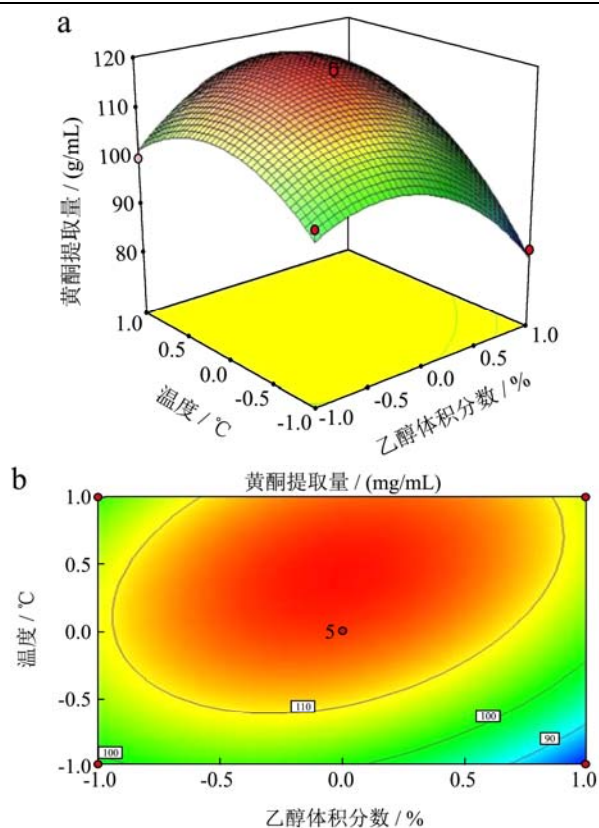


图9 超声温度和乙醇体积分数对黄酮提取量交互影响的响应面图和等高线图

Fig.9 Contour plot and response surface diagram of effects of the interaction between the ultrasonic temperature and volume fraction of ethanol on the yield of flavonoids

由图 7 可知，等高线呈较为明显的圆形，说明乙醇体积分数和料液比之间的交互作用不显著，与方差分析结果相符。由图 8 可知，超声温度的变化曲面和料液比的变化曲面较陡峭，说明这两个因素对薇菜黄酮提取量影响均较显著，温度比料液比的变化坡面陡峭，说明温度比料液比对薇菜总黄酮提取量的影响更为显著。与方差分析结果相符。由图 9 可知，等高线呈明显的椭圆形，说明温度和乙醇体积分数之间的交互作用较为显著，对薇菜总黄酮的提取量影响较大。

在单因素的基础上进行 3 因素 3 水平的试验，结果如表 2 所示，数据的方差分析见表 3。

通过 Design Expert.V8.0.6 软件对表 2 中薇菜黄酮

提取量进行优化处理，进行二次多项式回归拟合，得到薇菜黄酮提取量对料液比(A)、乙醇体积分数(B)、提取温度(C)的回归模型方程为：

$$Y=116.89+5.82A-2.77B+7.36C+1.05AB-3.86AC+5.83BC-8.66A^2-10.83B^2-8.87C^2$$

从表 3 可看出，该模型  $p<0.01$ ，说明该模型极显著；失拟项不显著  $p>0.05$ ，校正决定系数 ( $R^2_{Adj}$ ): 0.9526;  $R^2$ : 97.29%，说明拟合度良好，试验误差小，方程的显著性及可靠性很高，能够反映响应值的变化。通过此回归模型对减压-超声波辅助醇法提取薇菜总黄酮的工艺参数进行分析和预测。通过对回归模型显著性分析可知，A、C、AC、BC 对黄酮提取量有极显著的影响 ( $p<0.01$ )；B 对黄酮提取量具有显著影响 ( $p<0.05$ )，AB 影响不显著。由 F 值可知，各因素对薇菜黄酮提取量影响的顺序为：超声时间 (C) >料液比 (A) >乙醇体积分数 (B)。

表 2 响应面法试验设计结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验号	A	B	C	黄酮提取量/(mg/g)
1	-1	0	-1	81.1064
2	-1	-1	0	94.5552
3	-1	0	1	107.3230
4	1	1	0	102.3460
5	0	1	1	105.5320
6	1	0	-1	99.1302
7	0	0	0	116.1330
8	0	0	0	117.7240
9	0	0	0	113.8980
10	0	0	0	117.7730
11	0	-1	1	99.7880
12	1	-1	0	105.4280
13	0	1	-1	82.9287
14	0	-1	-1	100.4980
15	0	0	0	118.9240
16	-1	1	0	87.2786
17	1	0	1	109.9010

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance for quadric regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2238.63	9	248.74	36.70	<0.0001	**
A	270.77	1	270.77	39.94	0.0004	**
B	61.52	1	61.52	9.08	0.0196	*
C	433.37	1	433.37	63.93	<0.0001	**

转下页



接上页

AB	4.40	1	4.40	0.65	0.4470	
AC	59.65	1	59.65	8.80	0.0209	**
BC	135.88	1	1.51	20.05	0.0029	**
A2	315.41	1	315.41	46.53	0.0002	**
B2	494.18	1	494.18	72.90	<0.0001	**
C2	331.29	1	331.29	48.87	0.0002	**
残差	47.45	7	6.78	-	-	-
失拟项	32.31	3	10.77	2.85	0.1691	
纯误差	15.14	4	3.78	-	-	-
总和	2286.08	16	-	-	-	-

注: 决定系数  $R^2=0.9729$ ; 调整系数  $R^2_{Adj}=0.9526$ ; \*表示差异显著,  $p<0.05$ ; \*\*表示差异极其显著,  $p<0.01$ 。

## 2.4 最佳条件的确定和回归模型的验证

通过响应面法得到减压-超声辅助超声波提取薇菜总黄酮最佳工艺条件为: 液料比 1:60 (g/mL)、乙醇体积分数 49.97%、超声温度 70.19 °C, 提取压力 0.08~0.1 MPa、超声功率 300 W、超声时间 50 min 此条件下提取黄酮的最佳工艺 (118.924±1.950) mg/g。为便于产业化控制, 调整最佳工艺为料液比: 1:60 (g/mL)、乙醇体积分数 50%、超声温度为 70 °C, 在此条件下进行验证试验, 得到的黄酮含量为 (117.133±1.120) mg/g, 与理论值接近。

## 2.5 薇菜总黄酮的体外抗氧化活性对比分析

### 2.5.1 DPPH·清除率比较分析

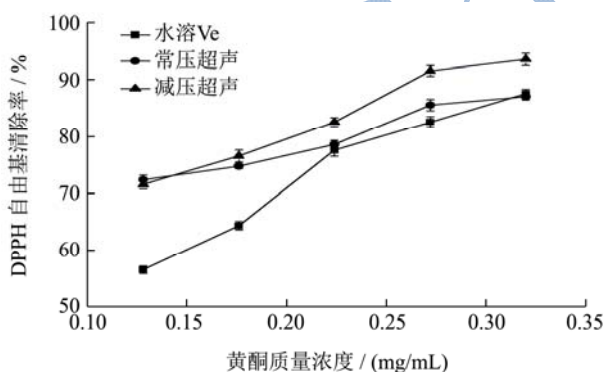


图 10 两种方法提取薇菜总黄酮 DPPH 自由基清除率差异  
Fig.10 Comparison of DPPH· radical scavenging capacity of flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb by two different methods

由图 10 可知, 常压超声和减压-超声提取薇菜总黄酮与水溶 Vc 组进行对照, 两种方法对 DPPH 的清除能力均高于 Vc, 且样品质量浓度与 DPPH 的清除率成正相关, 两种样品及 Vc 对 DPPH·清除率的  $IC_{50}$  分别为: 0.117 mg/mL (减压-超声)、0.119 mg/mL (常

压超声)、0.121 mg/mL (水溶 Vc)。通过比较分析, 两种方法提取的样品对 DPPH 自由基的清除效果差异均不显著 ( $p>0.05$ ) [15]。

### 2.5.2 ABTS<sup>+</sup>·清除率比较分析

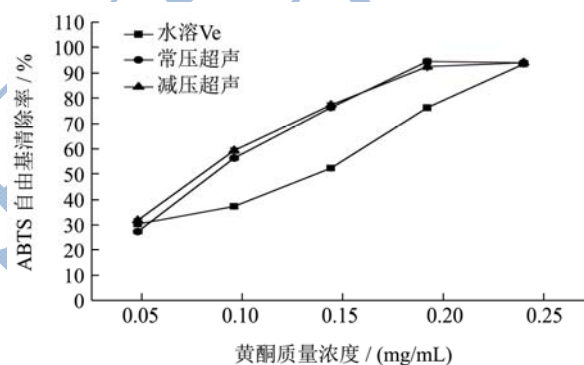


图 11 两种方法提取薇菜总黄酮 ABTS<sup>+</sup>·清除率差异

Fig.11 Comparison of ABTS<sup>+</sup>· radical scavenging capacity of flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb by two different methods

由图 11 可知当样品浓度范围在 0.05~0.2 mg/mL 之间时, 减压-超声提取的薇菜黄酮对 ABTS<sup>+</sup>·消除率增强。两种样品及 Vc 对 ABTS<sup>+</sup>·清除率的  $IC_{50}$  分别为 [16]: 0.072 mg/mL (减压-超声)、0.076 mg/mL (常压超声)、0.1 mg/mL (水溶 Vc)。两种提取方法的薇菜黄酮样液与 Vc 通过方差分析进行两两比较, 两种提取物对自由基的清除率显著高于水溶 Vc ( $p<0.05$ ), 但两种方法的黄酮提取液对自由基的清除率差异不显著 ( $p>0.05$ )。说明常压超声和减压-超声提取的薇菜总黄酮均对 ABTS<sup>+</sup>·有较强的清除效果。

### 2.5.3 总还原能力比较分析

通过图 12 可知, 随各样品浓度逐渐增加, 总还原能力也不断增强。两种方法提取的样液的还原能力均高于水溶 Vc, 通过单因素方差分析进行两两比较, 两种提取方法黄酮提取液的总还原能力差距不显著 ( $p>0.05$ )。

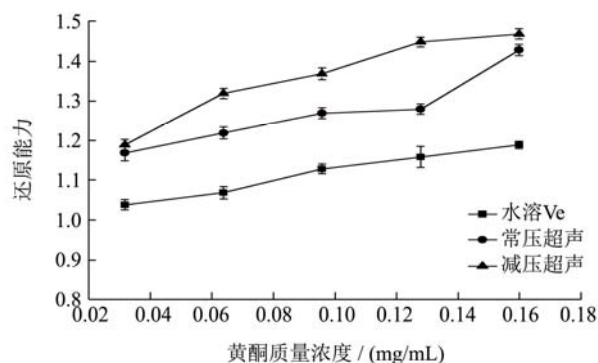


图 12 两种方法提取薇菜总还原力差异

**Fig.12 Comparison of total reducing power capacity of flavonoids extracted from *Osmunda japonica* Thunb by two different methods**

### 3 结论

3.1 采用减压-超声波辅助乙醇提取薇菜黄酮的最佳条件为：液料比 1:60 (g/mL)、乙醇体积分数 49.97%、超声温度 70.19 °C，提取压力 0.08~0.1 MPa、超声功率 300 W、超声时间 50 min 此条件下提取黄酮的最佳工艺 (118.924±1.950) mg/g。以水溶 Vc 为对照，通过对比常压超声和减压-超声提取液的体外抗氧化活性可知，两种提取方法与 Vc 对 DPPH 自由基的清除能力从大到小：减压-超声>常压-超声>水溶 Vc，单因素方差分析两两比较结果显示，两种提取方法的样品对 DPPH 自由基的清除效果差异不显著 ( $p>0.05$ )；对 ABTS 自由基的清除能力从大到小：减压-超声>常压-超声>水溶 Vc，两种方法的黄酮提取液清除率差异不显著 ( $p>0.05$ )，与 Vc 相比差异显著 ( $p<0.05$ )；两种提取方法的总还原能力差异均不显著 ( $p>0.05$ )。

3.2 综上所述，通过减压-超声法辅助乙醇提取薇菜黄酮，使薇菜黄酮提取量得到显著 ( $p<0.05$ ) 提升，也很好保留了黄酮的抗氧化活性。相比常压超声辅助乙醇提取法，减压-超声工艺通过降低提取容器内压强接近至真空状态，减小提取液分子间相互压力，从而降低提取所需能量，缩短了超声提取时间，降低了提取温度，对降低产业化成本有积极指导作用。

### 参考文献

- [1] 黄祥丰,李道新,徐慎东,等.我国森林薇菜研究进展[J].林业科技通讯,2015,10:75-77  
HUANG Xiang-feng, LI Dao-xin, XU Shen-dong, et al. Research progress of forest *osmunda japonica thunb* in China [J]. Journal of Forestry Science and Technology, 2015, 10: 75-77
- [2] 王谋强,励启腾.薇菜干的营养品质分析[J].植物资源与环

境,1995,4(2):63-64

WANG Mou-qiang, LI Qi-teng. Analysis on nutritional quality of *osmunda japonica thunb* dry [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 1995, 4(2): 63-64

- [3] 조현우, 김민석, 이기호, et al. Isolation and quantitative analysis of cinnamtannin b-1 from *osmunda japonica thunb* [J]. Korean Journal of Pharmacognosy, 2016, 47(3): 232-236
- [4] 赵莉,杨文钰.蕨类植物的活性成分研究进展[J].中药材,2004,27(6):452-456  
ZHAO Li, YANG Wen-yu. Research progress on the active components of pteridophytes [J]. Chinese Herbal Medicines, 2004, 27(6): 452-456
- [5] 李凤霞,王青,张钟,等.薇菜黄酮类化合物的提取及抗氧化研究[J].包装与食品机械,2008,26(1):7-11  
LI Feng-xia, WANG Qing, ZHANG Zhong, et al. Study on extraction and antioxidation of flavonoids from *osmunda japonica thunb* [J]. Packaging and Food Machinery, 2008, 26(1): 7-11
- [6] LUO Jiaqiang, CAI Weixi, WU Tong, et al. Phytochemical distribution in in hull and cotyledon of adzuki bean (*vigna angularis* L.) and mung bean (*vigna angularis* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities [J]. Food Chemistry, 2016, 201: 350-360
- [7] NIE W, LUO J G, WANG X B, et al. An insight into enrichment and separation of oleanane-type triterpenoid saponins by various chromato-graphic materials [J]. Separation and Purification Technology, 2009, 65(3): 93-95
- [8] Jitendra K S, Patel A K, Adsul M, et al. Cellulase adsorption on lignin: a roadblock for economic hydrolysis of biomass [J]. Renewable Energy, 2016, 98: 29-42
- [9] ZHU Caiping, ZHAI Xichuan, LI Linqiang, et al. Response surface of ultrasound-assisted polysaccharides extraction from pomegranate peel [J]. Food Chemistry, 2015, 177: 139-146
- [10] Pare J R J, Belanger J M R, StalTord S S. Microwave-Assisted Process (MAPTM): a new tool for the analytical laboratory [J]. Trends in Analytical Chemistry, 1994, 13(4): 176-1R4
- [11] 萨茹丽.沙葱黄酮提取工艺优化、结构鉴定及其相关生物活性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014  
SA Ru-li. Study on extraction technology, structure identification and related biological activity of flavonoids from onions [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014



- [12] 吕英华,苏平,那宇,等.桑椹色素体外抗氧化能力研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2007,33(1):102-107  
LV Ying-hua, SU Ping, NA Yu, et al. Study on antioxidant capacity of mulberry pigment [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2007, 33(1): 102-107
- [13] 白海娜,王振宇,张华.多酚类化合物与黑木耳多糖协同抗氧化作用研究[C]//中国食品科学技术学会第九届年会.黑龙江哈尔滨. 2012  
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, ZHANG Hua. Synergistic antioxidation of polyphenols and polysaccharides from black fungus [C]// The 9th Annual Meeting of China Food Science and Technology Society. Harbin Heilongjiang China. 2012
- [14] 萨茹丽,木其尔,王翠芳,等.沙葱总黄酮提取工艺优化及其体外抗氧化、抗菌作用[J].食品科学,2014,35(24):1-8  
SA Ru-Li, MU Qi-er, WANG Cui-fang, et al. Total flavonoids from *allium mongolicum* regel: optimization of extraction process and antioxidant and antibacterial effects in vitro [J]. Food Science, 2014, 35(24): 1-8
- [15] 李新原,李斌,颜廷才,等.超高压与超声波对蓝靛果多酚提取及抗氧化活性的影响[J].食品科学,2017,38(2):271-277  
LI Xin-yuan, LI Bin, YAN Ting-cai, et al. Comparative effects of ultra-high pressure and ultrasonic treatment on the extraction and antioxidant activity of polyphenols from *lonicera caerulea* fruits [J]. Food Science, 2017, 38(2): 271-277
- [16] J L Li, X Y Liu, J T Xie, et al. A Comparison of different estimation methods for fungicide EC<sub>50</sub> and EC<sub>95</sub> values [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163(4): 239-244