

本文引用: 排合尔丁·穆太力甫, 木艾塔尔·努尔麦麦提, 艾尼娃尔·艾克木, 田树革. 响应面法优化圆苞车前子多酚与总黄酮超声提取工艺及其抗氧化活性分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1801-1809.

响应面法优化圆苞车前子多酚与总黄酮超声提取工艺及其抗氧化活性分析

排合尔丁·穆太力甫^{1,3}, 木艾塔尔·努尔麦麦提^{1,3}, 艾尼娃尔·艾克木^{1,3}, 田树革^{2*}

1. 新疆和田学院, 新疆 和田 848000; 2. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830017;

3. 新疆和田特色中医药研究重点实验室, 新疆 和田 848000

[摘要] **目的** 本实验旨在优化圆苞车前子多酚和总黄酮提取工艺, 探究圆苞车前子提取物抗氧化活性。**方法** 采用单因素实验结合响应面 Box-Behnken 设计对圆苞车前子中多酚和总黄酮进行超声辅助提取工艺研究, 以多酚及黄酮提取率为指标, 利用响应面法得出最佳提取工艺。且通过 DPPH、ABTS⁺ 自由基的清除能力和总还原能力测定评价其抗氧化能力。**结果** 圆苞车前子多酚与总黄酮提取最佳工艺为: 料液比 1:20, 提取时间 41 min, 超声波功率 420 W, 乙醇体积分数 88%。该条件下, 多酚的提取量为 4.79 mg/g, 总黄酮的提取量为 23.19 mg/g。抗氧化实验结果表明, 圆苞车前子乙醇提取物在 2.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 对 DPPH、ABTS⁺ 自由基有较好的清除作用, IC₅₀ 值分别为 26.62 $\mu\text{g/mL}$ 和 9.40 $\mu\text{g/mL}$; 其总还原能力随着浓度的增加而增强, 且始终高于同浓度维生素 C 的还原能力。**结论** 该提取工艺稳定、可靠, 可用于圆苞车前子多酚与总黄酮的提取, 且圆苞车前子乙醇提取物具有较好的抗氧化活性。

[关键词] 圆苞车前子; 超声波辅助提取; 多酚; 黄酮; 响应面法; 抗氧化

[中图分类号] R283.6; R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.10.012

Optimization of ultrasonic extraction process of polyphenols and total flavonoids from *Plantago ovata* Forssk by response surface methodology and its antioxidant activity analysis

Paiheerding Mutailifu^{1,3}, Muaitaer Nuermaimaiti^{1,3}, Ainiwaer Aikemu^{1,3}, TIAN Shuge^{2*}

1. College of Xinjiang Hetian, Hetian, Xinjiang 848000, China; 2. College of Chinese Medicine, Xinjiang Medical University,

Urumqi, Xinjiang 830017, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Hetian Characteristic Chinese Medicine Research, Hetian,

Xinjiang 848000, China

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process of polyphenols and total flavonoids from *Plantago ovata* Forssk, and explore the antioxidant activity of its extracts. **Methods** Single factor experiments combined with a response surface Box Behnken design were used to study the ultrasonic-assisted extraction process of polyphenols and total flavonoids from *Plantago ovata* Forssk. The optimal extraction process was determined using response surface methodology with the extraction rates of polyphenols and flavonoids serving as the main indicators. In addition, the antioxidant capacity of the extracts was evaluated by measuring the scavenging ability of DPPH and ABTS⁺ free radicals and the total reducing power. **Results** The optimal extraction process for polyphenols and total flavonoids from *Plantago ovata* Forssk were as follows: solid-liquid ratio of 1:20, extraction time of 41 min, ultrasonic power of 420 W, and ethanol volume fraction of 88%. Under these conditions, the extraction amounts of polyphenols and

[收稿日期] 2024-04-08

[基金项目] 新疆维吾尔自治区重大科技项目(2017A03005-2)。

[通信作者] * 田树革, 男, 博士, 教授, E-mail: tianshuge@xjmu.edu.cn。

total flavonoids were 4.79 mg/g and 23.19 mg/g, respectively. The antioxidant experiment results showed that the ethanol extract of *Plantago ovata* Forssk had good scavenging effects on DPPH and ABTS+ free radicals in the range of 2.5–50 $\mu\text{g/mL}$, with the IC_{50} values of 26.62 $\mu\text{g/mL}$ and 9.40 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The total reducing power increased with increasing concentration and remains higher than that of vitamin C at the same concentration. Conclusion The extraction process is stable and reliable, and can be used for the extraction of polyphenols and total flavonoids from *Plantago ovata* Forssk. The ethanol extract of *Plantago ovata* Forssk exhibits good antioxidant activity.

[**Keywords**] *Plantago ovata* Forssk; ultrasonic-assisted extraction; polyphenol; flavonoid; response surface methodology; antioxidation

圆苞车前子为车前科车前属圆苞车前子(*Plantago ovata* Forssk)的干燥成熟种子,是亚洲、欧洲地中海地区和北非的特有植物^[1-2]。圆苞车前子在印度和伊朗有广泛分布,并用于治疗痢疾、发热、感冒、咳嗽、胃肠道功能衰竭^[3]。圆苞车前子为我国传统民族药记载于《回回药方》,具有止泻、降热、止痛、利尿、消肿利咽的功效^[4],维吾尔医名称为“伊斯普古勒”(Ispaghul),过去由巴基斯坦、印度等国进口,现已引种栽培于我国新疆和田、喀什地区^[5-6]。圆苞车前子因其溶胀和凝胶特异性,在治疗便秘、肥胖、糖尿病和高胆固醇血症方面得到广泛认可,作为食品补充剂用以防治糖尿病、高脂血症,已被列入我国新资源食品名录,在保健、食品和制药行业被广泛应用^[7-8]。

现代研究表明,圆苞车前子具有护肝、降压、抑菌、降血清胆固醇水平、治疗腹泻和提高胰岛素敏感性等多种药理作用^[9-10]。TALUKDER 等^[11-12]报道,圆苞车前子富含多种生物活性物质,如氨基酸、脂肪酸、黄酮和酚类化合物,具有抗氧化活性。目前,关于圆苞车前子的基础研究较薄弱,化学成分的研究集中在其主要成分糖类物质。对圆苞车前子中多酚和总黄酮以及提取工艺优化未见文献报道。超声波辅助提取法设备低廉、操作流程简易、提取时间短、多酚类和黄酮类提取率高^[13]。本研究通过乙醇作为提取溶剂,应用超声波辅助提取方法,运用响应面Box-Behnken 设计探讨最合适的提取工艺条件,并且研究其体外抗氧化能力,旨在为圆苞车前子的应用和挖掘提供基础理论依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

圆苞车前子购自乌鲁木齐维医药材店,由新疆医科大学中医学院中药鉴定教研室徐海燕教授鉴定。

芦丁标准品(纯度 99.4%,批号:100080-200707)

购自中国药品生物制品鉴定所;没食子(纯度:99.2%)购自成都科龙化工试剂厂;ABTS 试剂和 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)购自上海阿拉丁试剂有限公司;娃娃哈纯净水;NaNO₂、Al(NO₃)₃、NaOH 等均为分析纯试剂。

1.2 主要仪器

800Y 型粉碎机(浙江永康市铂欧五金制品有限公司);UV-2700 型紫外分光光度计(日本岛津公司);JY99-IIIN 型超声波破碎仪(宁波新芝公司);ME204E 型分析天平(上海梅特勒公司);Multiskan FC 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 原材料的预处理与提取工艺

将圆苞车前子粉碎后过 100 目药筛备用。分别称取粉末 1.0 g,在不同乙醇浓度、料液比、超声功率和超声时间等条件下进行总黄酮与多酚的提取工艺研究。

2.2 单因素实验

2.2.1 料液比对多酚和总黄酮提取率的影响 实验以 70%乙醇设定为提取溶剂,固定超声辅助提取时间 40 min 和超声能量 320 W,料液比分别选 1:15、1:20、1:25、1:30 及 1:35 进行提取,计算圆苞车前子中多酚和总黄酮的提取量。

2.2.2 提取时间对多酚和总黄酮提取率的影响 实验以 70%乙醇设定为提取溶剂,固定料液比 1:20 和超声能量 320 W,超声提取时间选 10、20、30、40、50 及 60 min 进行提取,计算圆苞车前子中多酚和总黄酮的提取量。

2.2.3 超声能量对多酚和总黄酮提取率的影响 实验以 70%乙醇设定为提取溶剂,固定料液比 1:20 和超声提取时间 40 min,超声能量分别选 120、220、320、420 及 520 W 进行提取,计算圆苞车前子中多酚和总黄酮的提取量。

2.2.4 乙醇体积分数对多酚和总黄酮提取率的影响 固定料液比 1:20、超声提取时间 40 min 和超声能量 420 W,选用 50%、60%、70%、80%、90%及 100%乙醇进行提取,计算圆苞车前子中多酚和总黄酮的提取量。

2.3 响应面实验

以单因素实验分析结果作为依据,应用 Design-Expert 8.0.6 软件和 Box-Behnken 设计四因素三水平响应面设计,因素及水平设计见表 1。

表 1 响应面实验设计因素与水平

Table 1 Response surface experiment design factors and levels

水平/因素	乙醇浓度/%	料液比/(g/mL)	超声时间/min	超声功率/W
-1	80	1:20	40	220
0	90	1:25	50	320
1	100	1:30	60	420

2.4 圆苞车前子总黄酮和多酚含量及提取率测定

2.4.1 总黄酮含量及提取率 总黄酮含量测定参照律梦伟等^[4]方法,得到标准曲线为 $y=1.174 2x-0.002 4$, $R^2=0.998 5$ 。总黄酮提取率以每克圆苞车前子中含有相当于芦丁毫克数表示,单位为 mg/g,如下计算:

$$W(\%)=\frac{c \times D \times V}{m} \times 100\%$$

式中:W 表示总黄酮得率,%;c 代表供试样品的质量浓度,mg/mL;D 为溶液稀释倍数;V 为测试样品溶液的体积,mL;m 为药材取样量,g。

2.4.2 多酚含量及提取率 多酚含量测定参照律梦伟^[4]等方法,得到标准曲线为 $y=7.614 3x+0.328 4$, $R^2=0.992 4$ 。总黄酮提取率以每克样品中含有相当于没食子酸毫克数表示,单位为 mg/g(按 1.2.4.1 公式 1 计算)。

2.5 圆苞车前子抗氧化能力测定

2.5.1 DPPH 自由基清除能力的测定 参考清除 DPPH 自由基测定的方法^[15]进行改良。以最佳提取条件下的提取液为原液,加乙醇稀释得质量浓度为 2.5、5、10、20、30、40、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液。用超纯水配成同浓度的维生素 C(Vc)作为阳性对照。向 96 孔板中加各样品溶液(100 μL)和 0.20 mmol/L DPPH 试剂(100 μL),避光静置 30 min,实验重复 3 次,517 nm 处测吸光值,并计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%)=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中 A_1 表示样品溶液加 DPPH 的吸光值; A_2 表示不加 DPPH 样品溶液的吸光值; A_0 为 DPPH 试剂的吸光值。

2.5.2 ABTS⁺自由基清除率测定 参照 GONG 等的^[16]方法进行改良,具体操作步骤如下:等体积的 7 mmol/L ABTS 溶液和 2.45 mmol/L 过硫酸钾混合,避光反应 16 h,用无水乙醇稀释至 734 nm 处吸光值 0.700 ± 0.02 准备 ABTS 工作溶液。向 96 孔板中加 2.5~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的样品溶液(20 μL)与 ABTS 工作溶液(200 μL),避光静置 6 min,734 nm 处测定吸光值,实验重复三次。同样浓度的抗坏血酸溶液作为阳性对照,并计算清除率。

$$\text{ABTS}^+\text{自由基清除率}(\%)=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0}) \times 100\%$$

式中 A_1 为样品加 ABTS 工作液的吸光值; A_2 为样品溶液吸光值; A_0 为 ABTS 工作液吸光值。

2.5.3 总还原能力测定 将提取液配制成不同质量浓度的待测液,参照 LIU 等^[17]方法测定圆苞车前子乙醇提取液总还原能力。将 1.0 mL 不同浓度的样品溶液与 1.0 mL 1%铁氰化钾水溶液混合,50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,再加 1.0 mL 10%三氯乙酸,离心 15 min(5 000 r/min,离心半径为 7 cm),取其上清液 2.5 mL 与 0.15 mL 三氯化铁(0.1%)混合,700 nm 处测吸光值。物吸光值之间升高表明还原能力的提高。同浓度 Vc 作为阳性对照。

2.6 数据处理

试验均设计 3 次平行实验,用 Origin 2021 和 Design-Expert 等软件对数据进行处理及统计分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 单因素实验结果

3.1.1 料液比对多酚和总黄酮提取率的影响 料液比较小时,随之料液比的增加,圆苞车前子的多酚和总黄酮提取率也增多,当料液比为 1:25 时,多酚和总黄酮的提取率均为最高,可能是圆苞车前子中多酚和黄酮物质得到了充分溶解,但继续增加料液比,多酚和黄酮的提取率降下。同时考虑溶剂用量和能量消耗,选择料液比为 1:25 最为适宜。详见图 1。

3.1.2 超声时间对多酚和总黄酮提取率的影响 10~

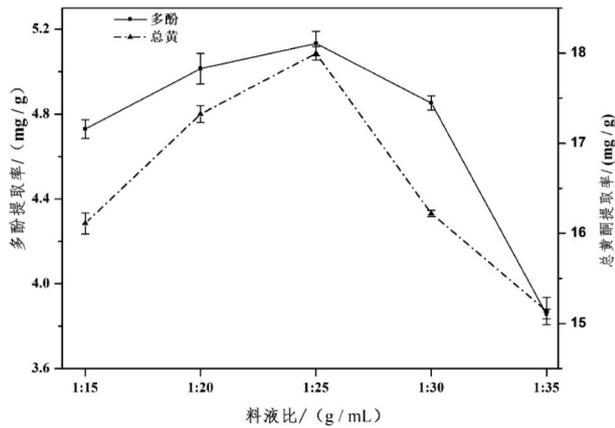


图1 料液比对多酚和总黄酮提取率的影响

Fig.1 Effects of solid-liquid ratio on the yields of polyphenols and total flavonoid

40 min 内,圆苞车前子中多酚和总黄酮提取量随着超声时间增加而提高,超声时间在 40 min 时提取率最高,在 40~60 min 时,多酚和总黄酮逐渐减少。详见图 2。

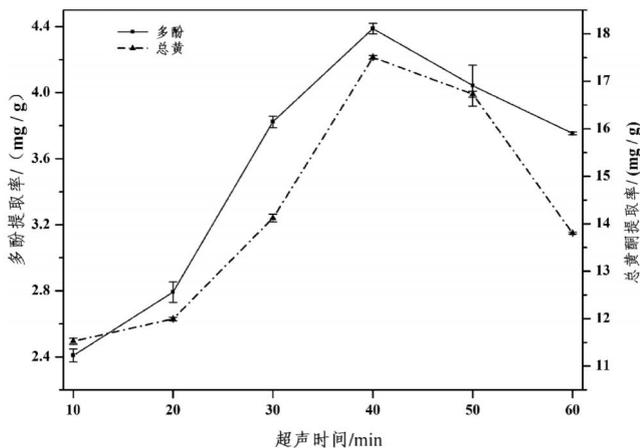


图2 超声时间对多酚和总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic time on the yields of polyphenol and total flavonoid

3.1.3 超声能量对多酚和总黄酮提取率的影响 多酚和总黄酮提取率随着超声能量增加而增加,在 420 W 时提取率最高。超声能量超过 420 W 时提取率减小。详见图 3。

3.1.4 乙醇体积分数对圆苞车前子多酚与总黄酮提取率的影响 随着提取溶剂乙醇的体积分数增多,多酚与总黄酮提取率急剧提高,当乙醇体积分数达到 90%时,圆苞车前子多酚与总黄酮的提取率也到达最高点,用无水乙醇提取时提取率反而直线下降。详见图 4。

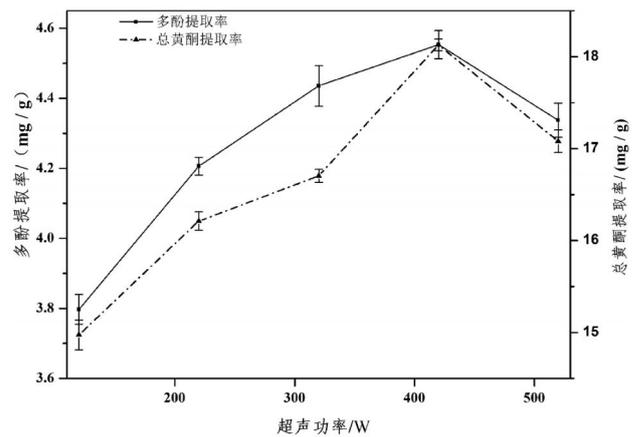


图3 超声能量对多酚和总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic energy on the yields of polyphenol and total flavonoid

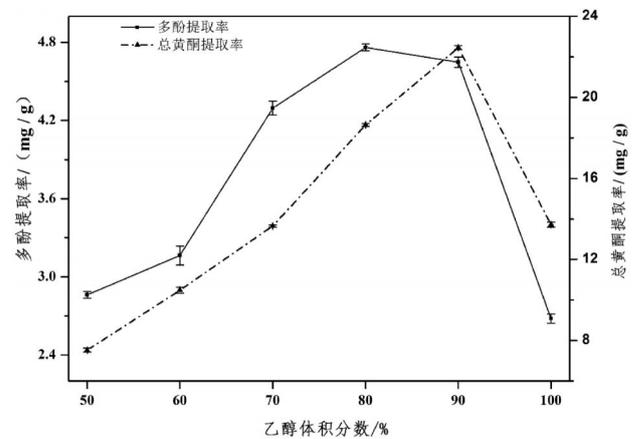


图4 乙醇体积分数对多酚和总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effects of ethanol volume fraction on the yields of polyphenol and total flavonoid

3.2 响应面实验结果与分析

3.2.1 Box-Behnken 试验设计与结果 单因素实验结果基础上,用 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 模型设计实验,响应面分析方案及结果如表 2 所示。

3.2.2 多酚回归方程方差分析及响应面试验结果对多酚得率的结果进行拟合,圆苞车前子中多酚提取率对乙醇体积分数、超声能量、料液比和超声时间的二次多项式回归方程模型: $Y=4.01-1.64A+0.081B-0.28C+0.15D-0.35AB-0.24AC-0.31AD+0.16BC-0.57BD+0.089CD-1.16A^2-0.20B^2+0.13C^2-0.12D^2$,对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

由表 3 可知:该模型的 $F=20.44, P<0.0001$,表明所得模型极显著,失拟项为 P 值为 $0.213>0.05$,不显著,表明方程式成立,方法可靠,并模型与数据拟

表2 超声波辅助提取多酚和总黄酮的响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface methodology design and results of ultrasound assisted extraction of polyphenol and total flavonoids

试验号	乙醇体积分数/%	超声功率/W	料液比/(g/mL)	超声时间/min	多酚提取量/(mg/g)	总黄酮提取量/(mg/g)
1	90	220	25	40	2.90	14.80
2	90	320	25	50	4.04	21.99
3	90	220	30	50	3.66	21.72
4	100	320	25	40	1.32	17.11
5	100	320	30	50	0.95	20.04
6	100	320	20	50	2.20	21.73
7	90	320	20	40	4.28	19.81
8	100	420	25	50	1.37	20.94
9	100	220	25	50	1.49	19.96
10	80	220	25	50	3.56	9.96
11	90	320	20	60	4.55	13.88
12	90	320	25	50	4.18	21.15
13	90	220	20	50	4.40	12.12
14	90	420	30	50	3.74	17.27
15	90	320	30	40	3.65	16.80
16	80	420	25	50	4.86	12.78
17	90	420	20	50	3.83	20.19
18	90	420	25	60	3.84	18.14
19	90	320	30	60	4.27	19.28
20	80	320	25	60	4.70	9.13
21	100	320	25	60	0.35	19.12
22	80	320	30	50	4.72	12.46
23	90	320	25	50	4.37	23.33
24	80	320	25	40	4.44	13.57
25	90	320	25	50	3.70	21.37
26	90	420	25	40	4.19	22.72
27	90	320	25	50	4.40	23.16
28	90	220	25	60	4.84	14.82
29	80	320	20	50	5.03	12.70

合程度良好。模型的复合相关系数 $R^2=0.9534$,表明相关性较强;可以用该模型优化圆苞车前子中多酚的提取工艺。根据 F 值可知所考察的因素对响应值影响力的大小顺序为乙醇体积分数(A)>料液比(C)>超声时间(D)>超声功率(B),其中 A 和 A²对圆苞车前子多酚化合物的分离提取有极显著差异($P<0.01$),C 和 BD 对圆苞车前子多酚的提取影响亦显著($P<0.05$)。

各因素交互作用对多酚提取量影响的响应曲面如图 5 所示。由图 5 可知,乙醇体积分数对多酚提取率的影响大于料液比、超声时间和超声能量的影响,这结果与方差分析所得结论一致。

3.2.3 总黄酮回归方程方差分析及响应面试验结果

以总黄酮提取量作为响应值,建立二次回归多元方程如下: $Y=22.2+4.02A+1.56B+0.6C-0.87D-0.46AB-0.36AC+1.61AD-3.13BC-1.15BD+2.1CD-4.12A^2-2.14B^2+1.81C^2-2.91D^2$,对回归模型进行方差分析,结果见表 4。

由表 4 可知,该模型的 $F=15.70$, $P<0.0001$,表明所得模型极显著,失拟项为 P 值为 $0.195>0.05$,不显著,表明方程式成立,方法可靠,并模型与数据拟合程度良好。模型的复合相关系数 $R^2=0.9401$,表明相关性较强;可以用该模型优化圆苞车前子中黄酮类成分的提取工艺。根据 F 值可知所考察的因素对响应值影响力的大小顺序为乙醇体积分数(A)>超声功率(B)>提取时间(D)>料液比(C),其中模型一次

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equations

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	45.48	14	3.25	20.44	<0.000 1
A	32.11	1	32.11	201.96	<0.000 1
B	0.07	1	0.08	0.50	0.491 6
C	0.91	1	0.91	5.71	0.031 5
D	0.26	1	0.26	1.65	0.219 4
AB	0.50	1	0.50	3.17	0.096 8
AC	0.22	1	0.22	1.40	0.256 6
AD	0.38	1	0.38	2.37	0.145 8
BC	0.11	1	0.11	0.68	0.423 5
BD	1.32	1	1.32	8.29	0.012 1
CD	0.03	1	0.03	0.20	0.660 8
A ²	8.74	1	8.74	54.96	<0.000 1
B ²	0.26	1	0.26	1.62	0.224 4
C ²	0.10	1	0.10	0.65	0.433 8
D ²	0.09	1	0.09	0.57	0.462 3
残差	2.23	14	0.16		
失拟项	1.90	10	0.19	2.35	0.213 0
纯误差	0.32	4	0.08		
总和	47.71	28			

注: $P < 0.05$, 表示差异显著; $P < 0.01$, 表示差异极显著。

项 A 和 B 对结果均有极显著影响 ($P < 0.01$); 交叉项 BC 具有极显著差异 ($P < 0.01$), 交叉项 AD 和 CD 具有显著差异 ($P < 0.05$); 二次项中 A^2 、 B^2 、 C^2 和 D^2 对结果均有极显著影响 ($P < 0.01$)。

各因素相互作用对黄酮提取率影响的响应曲面如图 6 所示。其中乙醇体积分数与超声功率, 乙醇体积分数与料液比以及乙醇体积分数与超声时间的相互作用均较强, 其次料液比与超声时间的相互作用最弱。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件 Optimization 的 Numerical 功能, 得到多酚和总黄酮响应面模型优化的最优提取工艺为乙醇体积分数 88.57%, 超声功率 420.0 W, 料液比 1:20, 超声时间 41.09 min。预测此条件下, 最大多酚提取量 4.81 mg/g, 最大黄酮提取量 23.26 mg/g。为便于工业生产及实际操作的可行性, 确定最终工艺为乙醇体积分数 88%, 超声功率 420 W, 提取时间 41 min, 料液比 1:20, 在此工艺条件下, 进行三次平行实验, 多酚得率的均值为 4.79 mg/g (RSD=0.44%), 黄酮得率均值为 23.19 mg/g (RSD=0.19%), 与预测值接近, 表明经优化的提取工

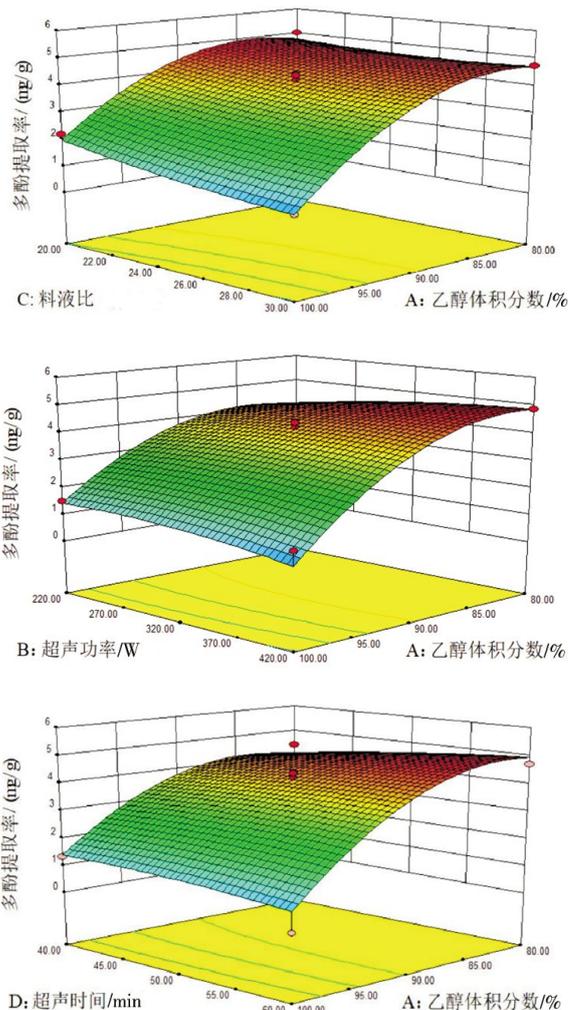


图 5 各因素交互作用影响多酚提取量的响应面图

Fig.5 Response surface diagram of the interaction effects of various factors on polyphenol extraction quantity

艺可行且稳定, 可用于圆苞车前子中多酚和总黄酮的提取。

3.3 圆苞车前子提取物抗氧化活性评价

3.3.1 清除 DPPH 自由基的能力 如图 7 所示, 在多酚浓度 2.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, 随着圆苞车前子乙醇提取物和 V_c 浓度的升高, DPPH 自由基清除能力均逐渐提高呈现量效关系, 但在测试浓度范围内提取物对 DPPH 自由基的清除能力弱于同浓度 V_c 。当多酚浓度大于 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 随着浓度继续增大, 清除率趋于平缓, 总提取物的清除率与 V_c 接近, 在多酚浓度为 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, V_c 的清除率为 87.84%, 圆苞车前子提取物的清除率为 84.31%。经计算得 V_c 和提取物的 IC_{50} 值分别为 14.38 $\mu\text{g/mL}$ 和 26.62 $\mu\text{g/mL}$, 可见, 提取物表现出较好 DPPH 自由基清除能力, 但与 V_c 相比, 提取物对 DPPH 自由

表4 回归方程方差分析

Table 4 Analysis of variance of regression equations

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Model	460.67	14	32.91	15.70	<0.000 1
A	194.31	1	194.31	92.72	<0.000 1
B	29.02	1	29.02	13.85	0.002 3
C	4.27	1	4.27	2.04	0.175 2
D	9.09	1	9.09	4.34	0.056 1
AB	0.85	1	0.85	0.40	0.535 1
AC	0.53	1	0.53	0.25	0.623 4
AD	10.38	1	10.38	4.95	0.043 0
BC	39.18	1	39.18	18.70	0.000 7
BD	5.26	1	5.26	2.51	0.135 4
CD	17.64	1	17.64	8.42	0.011 6
A ²	110.30	1	110.30	52.64	<0.000 1
B ²	29.58	1	29.58	14.11	0.002 1
C ²	21.27	1	21.27	10.15	0.006 6
D ²	54.99	1	54.99	26.24	0.000 2
残差	29.34	14	2.10		
失拟项	25.30	10	2.53	2.50	0.195 1
纯误差	4.04	4	1.01		
总和	490.01	28			

注: $P < 0.05$, 表示差异显著; $P < 0.01$, 表示差异极显著。

基清除率略弱。

3.3.2 清除 ABTS⁺自由基能力 如图8所示, 多酚浓度 2.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 随着圆苞车前子乙醇提取物和 Vc 浓度的升高, ABTS⁺ 自由基清除能力均逐渐提高呈剂量效应关系, 之后其清除 ABTS⁺ 自由基的能力趋于平缓, 且圆苞车前子提取物溶液总抗氧化能力始终比同等浓度抗坏血酸溶液高。当 Vc 浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率达到最大 (85.48%), IC_{50} 值为 19.49 $\mu\text{g/mL}$; 而圆苞车前子提取物在多酚浓度为 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 清除率达到最大 (97.21%), IC_{50} 值为 9.40 $\mu\text{g/mL}$; 说明圆苞车前子多酚具有良好的总抗氧化能力。

3.3.3 总还原能力 由图9可知, 在 5~100 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内, 相同浓度圆苞车前子多酚还原能力比 Vc 低, 但提取物的还原能力与其多酚质量浓度之间呈线性增加。当圆苞车前子多酚质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其还原能力与浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 Vc 接近, 表明圆苞车前子多酚具有较强的还原能力。

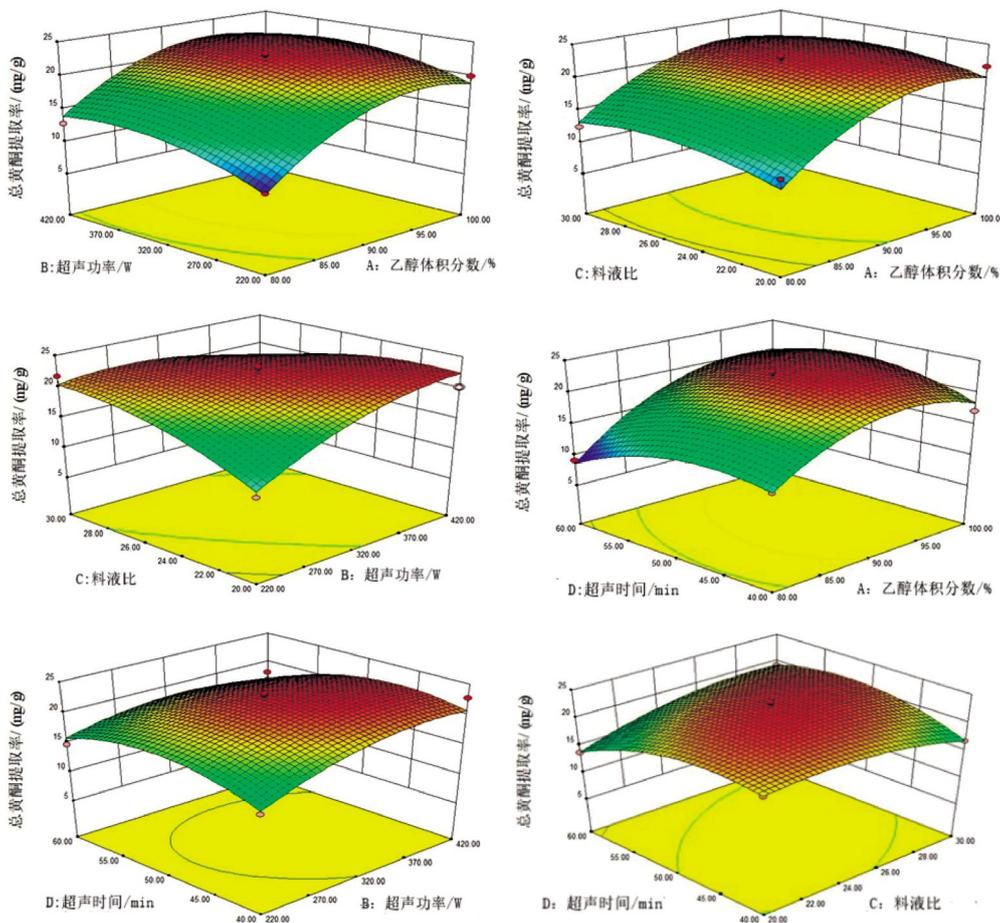


图6 各因素交互作用影响总黄酮提取量的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of the interaction between various factors affecting the total flavonoid extraction amount

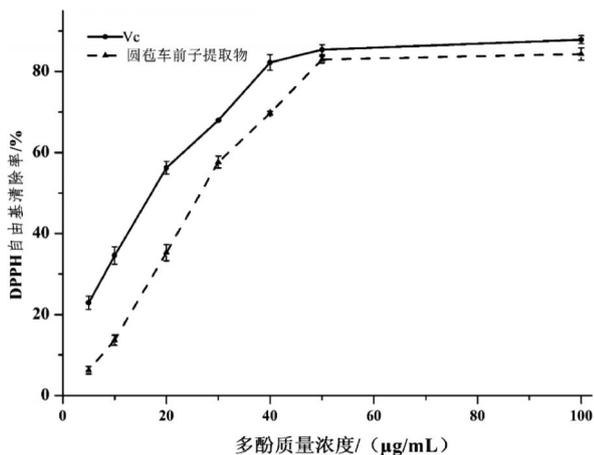


图7 圆苞车前子提取物对 DPPH 自由基清除能力

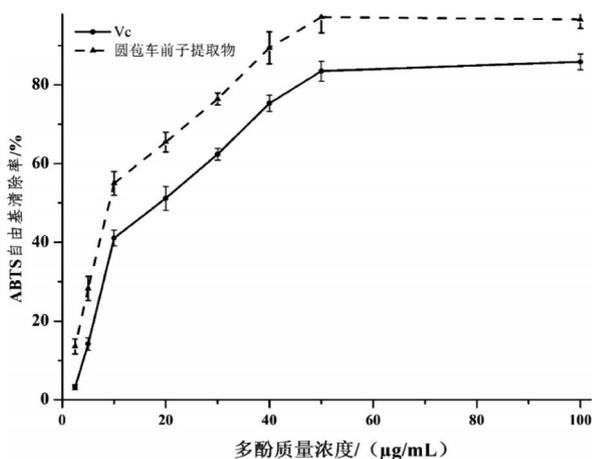
Fig.7 Scavenging rate of DPPH radicals by *Plantago ovata* Forssk extracts

图8 圆苞车前子提取物对 ABTS 自由基清除能力

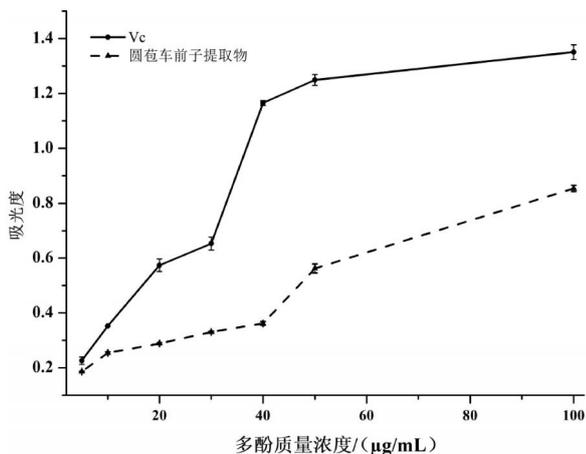
Fig.8 Scavenging rate of ABTS radicals by *Plantago ovata* Forssk extracts

图9 圆苞车前子提取物的总还原能力

Fig.9 Total reducing ability of *Plantago ovata* Forssk extracts

4 讨论

由单因素实验结果可见,当料液比为 1:25 时提

取率达到最高值。可能原因是,提取溶剂体积较小时,提取溶剂与药材的接触面积较小,得到多酚和总黄酮较少,而后当料液比大于 1:25 时,超声波的部分能量被较多的溶剂消耗,作用于圆苞车前子的超声波能量减弱,降低了多酚和黄酮类成分从细胞中溶出的能力,导致提取率的下降,使得多酚与总黄酮提取率下降^[18]。提取时间选为 40 min,提取时间过短时,样品中的黄酮类成分没有被完全溶出,但随着提取时间的增加,其他杂质逐渐被溶出,或由于长时间超声波振荡的影响,一些不稳定成分被破坏,导致多酚和总黄酮的得率下降^[18]。此外,提取率也与超声能量相关,一般情况下细胞内有效成分通过细胞膜及细胞壁依靠浓度差异进行渗透释放,当提供足够大的超声能量时,会加速细胞壁裂缝产生和发展,促使细胞膨胀至破裂,细胞内成分直接暴露进入溶剂中,提高溶出率及溶出速率^[13]。结果表明,各因素中乙醇体积对提取率的影响较大,可能是乙醇浓度继续增大后,因溶剂极性变小使醇溶性、脂溶性或其他低级性杂质也被提取^[18],从而导致多酚和总黄酮得率下降。文献报道不同药材使用乙醇提取时,获得最高提取率的乙醇体积分数存在一定差异^[19-21],这些差异可能是与药材结构细胞致密度相关^[13]。响应面图坡度的陡峭程度直观地反映了各因素对响应值的影响,响应面越陡峭的一方,对多酚提取率的影响越大^[22]。

通过观察响应面图,可判断乙醇体积分数与超声功率,乙醇体积分数与料液比以及乙醇体积分数与超声时间的互相作用均较强。它们所对应的响应曲面均为较陡峭;料液比与超声时间的相互作用最弱,因此,其响应曲面较为平缓。直观分析结果与方差分析结果一致。本研究基于单因素试验结果,通过 Box-Behnken 模型优化圆苞车前子中多酚和总黄酮的超声辅助提取工艺,确定乙醇体积分数 88%,超声功率 420 W,提取时间 41 min,料液比 1:20 为最理想的提取工艺条件。此条件下,圆苞车前子多酚和总黄酮的实际提取量为分别为 4.79 mg/g 和 23.19 mg/g,与预测值拟合效果好,表明建立的模型可靠,该提取工艺稳定合理,是提取圆苞车前子多酚和总黄酮的可行方法。

圆苞车前子乙醇提取物对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的 IC₅₀ 分别为 26.62 µg/mL 和 9.40 µg/mL,而 Vc 的 IC₅₀ 分别为 14.38 µg/mL 和 19.49 µg/mL。

可见,提取物表现出较好的 DPPH 自由基清除能力,但与 Vc 相比,其对 DPPH 自由基清除率略弱。此外,与 Vc 比较,该提取物具有较强的总还原能力。以上研究为圆苞车前子多酚和黄酮的生产以及圆苞车前子抗氧化活性成分应用于功能性食品开发提供理论依据。

参考文献

- [1] FREZZA C, SCIUBBA F, TOMAI P, et al. Phytochemical analysis on the seeds of a new Iranian *Plantago ovata* Forssk. population specimen[J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(14): 3761-3764.
- [2] 李振宇, 张永田, 依布拉音·艾尔西丁. 中国车前属植物一新记录[J]. *植物分类学报*, 2002, 40(5): 470-472.
- [3] SHAHRIARI Z, HEIDARI B, DADKHODAIE A, et al. Analysis of karyotype, chromosome characteristics, variation in mucilage content and grain yield traits in *Plantago ovata* and *P. psyllium* species[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 123: 676-686.
- [4] 王祥山, 张睦焱, 王林元, 等. 新外来中药圆苞车前子壳的中药药性探讨[J]. *环球中医药*, 2022, 15(8): 1308-1314.
- [5] 敏 德, 迪力努尔·沙比托夫, 依布拉音·艾尔西丁, 等. 圆苞车前子脂肪油化学成分的研究[J]. *中国民族民间医药杂志*, 2003, 12(6): 349-350.
- [6] 沈晓丽, 沙拉麦提·艾力. HPLC 法同时测定民族药材蚤状车前子中京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的含量[J]. *中国药师*, 2020, 23(8): 1628-1630.
- [7] ZHOU P Y, EID M, XIONG W F, et al. Comparative study between cold and hot water extracted polysaccharides from *Plantago ovata* seed husk by using rheological methods[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105465.
- [8] FRANCO E A N, SANCHES-SILVA A, RIBEIRO-SANTOS R, et al. *Psyllium* (*Plantago ovata* Forsk): From evidence of health benefits to its food application[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 96: 166-175.
- [9] 迪丽努尔·莎比托夫, 敏 德, 依布拉音, 等. 圆苞车前子乙醇提取物毒性及药理实验研究[J]. *中成药*, 2004, 26(11): 954-955.
- [10] NUERXIATI R, MUTAILIFU P, LU C F, et al. Optimization of alkali extraction, structure, and antioxidant activity of protein-bound polysaccharide from seeds of *Plantago ovata* Forssk [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 183: 114920.
- [11] TALUKDER P, TALAPATRA S, GHOSHAL N, et al. Antioxidant activity and high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds during in vitro callus culture of *Plantago ovata* Forsk. and effect of exogenous additives on accumulation of phenolic compounds[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(1): 232-244.
- [12] PATEL M K, TANNA B, GUPTA H, et al. Physicochemical, scavenging and anti-proliferative analyses of polysaccharides extracted from *psyllium* (*Plantago ovata* Forssk) husk and seeds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 190-201.
- [13] 龚受基, 覃 媚, 戴梓茹, 等. 响应面法优化相思藤黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(6): 178-185.
- [14] 律梦伟, 刘鑫榕, 兰 卫, 等. 响应面法优化毛菊苣总黄酮和总多酚的超声提取工艺[J]. *化学与生物工程*, 2023, 40(8): 20-25.
- [15] 郑 沛, 文 敏, 刘秋叶, 等. 半枝莲总黄酮提取工艺优化及抗氧化、抗肿瘤活性评价[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(23): 194-202.
- [16] GONG J Y, HUANG J, XIAO G N, et al. Antioxidant capacities of fractions of bamboo shaving extract and their antioxidant components[J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 996-1010.
- [17] LIU Y, DU Y Q, WANG J H, et al. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from *Jinjian mushroom*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 64: 63-68.
- [18] 杨 菁, 刘顶鼎, 陈 滕, 等. 粉条儿菜总黄酮提取工艺优化及抗氧化、抗炎活性分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(2): 192-200.
- [19] 夏雨弘, 刘 颖, 周 茗, 等. 小二仙草总黄酮提取工艺的优化及其抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(18): 244-250.
- [20] SALEH M A, CLARK S, WOODARD B, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils[J]. *Ethnicity & Disease*, 2010, 20(S1): S78-S82.
- [21] 张锦华, 徐 蔓, 白宝清, 等. 响应面法优化提取无花果干果中多酚和总黄酮物质及其抗氧化活性[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(16): 183-190, 212.
- [22] 孙立权, 滕茂浩, 丛 勇, 等. 响应面法优化柴胡药渣中柴胡皂苷提取工艺[J]. *北京理工大学学报*, 2023, 43(5): 540-548.

(本文编辑 苏 维)