

医药与日化原料

金花葵花黄酮超声辅助提取工艺优化及性能

王欣¹, 刘雨默¹, 郝静², 赵海宁³, 李萌^{1*}, 王昌涛^{1*}

(1. 北京工商大学 轻工科学与工程学院 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 3. 青岛西海岸新区疾病预防控制中心, 山东 青岛 266000)

摘要: 以金花葵花为原料, 采用超声辅助提取法提取了金花葵花黄酮, 通过单因素实验和正交实验优化了提取工艺, 评估了最佳工艺条件下提取的金花葵花黄酮的抗氧化活性及安全性。结果表明, 金花葵花黄酮最佳提取工艺为: 料液比(g:mL) 1:15、体积分数80%的乙醇水溶液为溶剂、超声功率300 W、超声时间35 min、提取温度75 °C, 在该条件下, 金花葵花黄酮提取率为89.97%。质量浓度为1.00 g/L金花葵花黄酮对1,1-二苯基-2-苦基苯肼自由基、羟基自由基和2,2'-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)自由基的清除率最高, 分别为94.81%、95.24%、82.80%; 对三者的半数抑制质量浓度(IC₅₀)分别为106.00、70.06和213.80 μg/mL。金花葵花黄酮质量浓度≤0.4 g/L时, 其对红细胞溶血率均<10%, 属于轻度刺激; 质量浓度为1.00 g/L的金花葵花黄酮对鸡胚绒毛尿囊膜无溶血。

关键词: 金花葵花; 黄酮; 超声辅助提取法; 工艺优化; 抗氧化活性; 安全性; 医药原料

中图分类号: TQ28

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 06-1310-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Ultrasonic-assisted extraction process optimization and properties of *Hibiseu manihot* L. flower

WANG Xin¹, LIU Yumo¹, HAO Jing², ZHAO Haining³, LI Meng^{1*}, WANG Changtao^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Plant Resource Research and Development, College of Light Industry Science and Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine Sciences, Beijing 100176, China; 3. Qingdao West Coast New Area Center for Disease Control and Prevention, Qingdao 266000, Shandong, China)

Abstract: Flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower were extracted by ultrasonic-assisted extraction method, which was optimized by single factor and orthogonal experiment. The *Hibiseu manihot* L. flower extracted under the optimal process conditions were then evaluated for its antioxidant activity and safety. The results showed that the optimum extraction process conditions of flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower were as follows: ultrasonic power 300 W, ethanol volume fraction in ethanol-water 80%, ultrasonic time 35 min, extraction temperature 75 °C, solid-liquid ratio (g : mL) 1 : 15. Under the above-mentioned optimum extraction process conditions, the maximum extraction rate of flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower was 89.97%. Flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower with a mass concentration of 1.00 g/L exhibited the highest scavenging rates on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, hydroxyl radical and diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) free radical, which were 94.81%, 95.24% and 82.80%, respectively, with the corresponding half maximal inhibitory mass concentration (IC₅₀) of 106.00, 70.06 and 213.80 μg/mL, respectively. Flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower with a mass concentration of less than 0.4 g/L showed a hemolysis rate of less than 10% on red blood cells, indicating mild irritation, while flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower with a mass concentration of 1.00 g/L displayed no hemolysis on chick embryo chorioallantoic membrane.

Key words: *Hibiseu manihot* L.; flavonoids; ultrasonic-assisted extraction method; process optimization; antioxidant activity; safety; drug materials

收稿日期: 2023-10-13; 定用日期: 2023-11-27; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230860

作者简介: 王欣(1998—), 女, 硕士生, E-mail: 1474453911@qq.com. 联系人: 李萌(1981—), 女, 副教授, E-mail: limeng@btbu.edu.cn; 王昌涛(1975—), 男, 教授, E-mail: wangct@th.btbu.edu.cn.

金花葵 (*Hibiscus manihot* L.) 是锦葵科秋葵属, 一年生草本植物, 又称菜芙蓉、野芙蓉^[1]。其耐热耐寒, 适应性较强, 目前国内已有很多金花葵种植基地^[2]。金花葵作为一种药食同源植物, 含有丰富的活性成分, 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF-MS) 对金花葵花全组分进行分析, 共鉴定出 100 多种化合物, 包括黄酮类化合物以及氨基酸类化合物、脂类化合物、核苷类化合物、亚油酸等不饱和脂肪酸以及一些糖类、有机酸、五环三萜、环烯醚萜类化合物、微量元素和不皂化物等^[3-4]。据《本草纲目》和《嘉佑本草》中记载, 金花葵具有清利湿热、消炎镇痛之功效。另据报道, 金花葵还可以抗氧化、抗炎、抗抑郁、增强免疫和治疗血管疾病以及肝肾疾病等^[5]。金花葵的优势在于其花中含有丰富的黄酮类化合物, 尤其是其中的金丝桃苷类黄酮成分^[6]。因此, 提高金花葵中黄酮类成分的提取率非常重要。目前, 提取植物黄酮的技术有很多, 其中, 超声波辅助提取法具有操作简单、提取快、提取率高、环保无污染等优势, 广泛应用于植物天然活性成分的提取中, 最适合提取黄酮类化合物^[7]。

当前, 金花葵作为原料在食品领域的应用较为成熟, 市面上已有许多相关产品。例如: 金花葵花茶、金花葵粉面食、金花葵果汁等^[8]。然而, 金花葵在化妆品方面的应用报道较少, 还未收录于由国家药品监督管理局发布的《已使用化妆品原料目录》中, 但基于其丰富的活性成分和优良的性能, 金花葵具有成为化妆品原料的潜质。另一方面, 国内对金花葵的研究起步较晚, 对其黄酮成分的提取方法和工艺优化还不够完善, 对其功效研究不够深入。

本文拟选用超声辅助提取法对金花葵花总黄酮进行提取, 通过单因素实验和正交实验优化提取工艺, 并对其抗氧化活性和安全性进行评估。以期对金花葵花黄酮的深加工及其在化妆品原料和医药等方面的应用提供参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

金花葵花, 北京同仁堂股份有限公司; 1,1-二苯基苦基苯肼 (DPPH)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 芦丁标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 抗坏血酸 (Vc)、2,2-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS), 北京百瑞极生物科技有限公司; 葡萄糖、无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、水杨酸、过氧化氢、硫酸亚铁, 分析纯, 市售; 实验用水为纯净水。

KQ-50E 型超声清洗机, 昆山禾创超声仪器有限公司; TGL-16 型离心机、ME104E 型分析天平, 上海爱朗仪器有限公司; Infinite M200 PRO 型酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司; 752 型紫外-可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; PRO 110-4 型冻干机, 丹麦 LaboGene 公司。

1.2 方法

1.2.1 金花葵花的预处理和黄酮提取

预处理: 将金花葵花置于 50 °C 的烘箱内进行干燥直至恒重, 粉碎后过筛 (60 目), 得到金花葵花干燥粉末, 置于密封袋中在干燥环境下保存待用。

黄酮提取: 取适量金花葵花干燥粉末, 加入一定量不同体积分数的乙醇水溶液, 在超声功率 300 W 条件下, 分别在不同提取温度及料液比 (g : mL) 条件下提取不同时间, 离心后, 上清液为金花葵花黄酮样品溶液, 将其旋蒸浓缩, 随后冻干 (-80 °C 冷冻 3 d) 得到固体粉末, 备用。

1.2.2 金花葵花黄酮提取率计算

采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法^[9]对金花葵花中的总黄酮进行检测。

芦丁标准曲线的创建: 配制不同质量浓度 (g/L) 的芦丁标准溶液。所有样品测试重复 3 次取算数平均值。用紫外-可见分光光度计测定芦丁标准溶液在 510 nm 处的吸光度, 绘制芦丁溶液吸光度 (y) - 质量浓度 (x) 标准曲线, 得到的回归方程为 $y=2.7141x+0.1238$ ($R^2=0.992$)。吸光度在芦丁质量浓度为 0~0.054 g/L 范围内, 具有良好的线性关系。

随后, 测定金花葵花黄酮样品溶液的吸光度, 依据芦丁溶液吸光度-质量浓度标准曲线的回归方程和稀释倍数计算得到金花葵花黄酮质量浓度 (以芦丁计), 并按照公式 (1) 计算金花葵花黄酮提取率 (%)。

$$\text{提取率}/\% = \rho \times V \times N / (1000 \times m) \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ 为稀释后金花葵花黄酮溶液质量浓度, g/L; V 为稀释前待测金花葵花黄酮溶液定容体积, mL; N 为稀释倍数; m 为金花葵花干燥粉末质量, g。

1.2.3 单因素实验

(1) 取适量金花葵花干燥粉末, 在超声功率 300 W 条件下, 固定超声时间 25 min, 提取温度 70 °C, 料液比 (g : mL) 1 : 25, 考察体积分数分别为 50%、60%、70%、80% 和 90% 的乙醇水溶液对金花葵花黄酮提取率的影响, 筛选出最佳体积分数 (φ_{optimal}) 的乙醇水溶液进行后续实验。

(2) 取适量金花葵花干燥粉末, 在超声功率 300 W 条件下, 固定提取温度 70 °C, 料液比 (g : mL) 1 : 25, 乙醇体积分数 φ_{optimal} , 考察超声时间

分别为 20、25、30、35、40 min 对金花葵花黄酮提取率的影响, 筛选出最佳超声时间 (t_{optimal}) 进行后续实验。

(3) 取适量金花葵花干燥粉末, 在超声功率 300 W 条件下, 固定超声时间 t_{optimal} , 料液比 (g : mL) 1 : 25, 乙醇体积分数 φ_{optimal} , 考察提取温度分别为 40、50、60、70、80 °C 对金花葵花黄酮提取率的影响, 筛选出最佳提取温度 (θ_{optimal}) 进行后续实验。

(4) 取适量金花葵花干燥粉末, 在超声功率 300 W 条件下, 固定提取温度 θ_{optimal} , 超声时间 t_{optimal} , 乙醇体积分数 φ_{optimal} , 考察不同 (1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35) 料液比 (g : mL) 对金花葵花黄酮提取率的影响, 得到最佳的料液比 (g : mL)。

1.2.4 正交实验设计

为提升提取金花葵花黄酮的效果, 明确最佳提取工艺, 以单因素实验结果为依据, 以 A (乙醇体积分数)、B (超声时间)、C (提取温度)、D (料液比) 为因素, 金花葵花黄酮提取率为指标, 设计四因素三水平的正交实验表 (表 1) 进一步优化金花葵花黄酮提取工艺。

表 1 正交实验因素与水平表
Table 1 Orthogonal test design table

水平	因素			
	A/%	B/min	C/°C	D/(g : mL)
1	75	25	65	1 : 15
2	80	30	70	1 : 20
3	85	35	75	1 : 25

1.3 金花葵花黄酮抗氧化活性测试

将上述最佳工艺条件下提取得到的金花葵花黄酮固体粉末, 用体积分数为 80% 的乙醇水溶液配制成质量浓度分别为 1.00、0.40、0.20、0.08、0.04 g/L 的金花葵花黄酮测试溶液, 同时配制相同质量浓度的 Vc 溶液作为阳性对照, 备用。

1.3.1 DPPH 自由基清除实验

按参考文献[10]方法, 配制质量浓度为 0.12 g/L 的 DPPH 乙醇溶液, 4 °C 储存备用。

实验设置 6 个组别, 分别为空白对照组、样品组、样品底值组、阳性对照组、阳性对照底值组和溶剂底值组, 其中, 样品底值组是为了消除 DPPH 溶液的影响; 溶剂底值组是为了消除无水乙醇的影响。按照表 2 所示的每组配制, 实验在 96 孔板上进行。每组反应液混合均匀后, 在暗黑环境中反应 30 min, 用酶标仪测其在 517 nm 处的吸光度。每个质量浓度 (0.04、0.08、0.20、0.40、1.00 g/L) 的金花葵花黄酮测试溶液平行实验 3 次, 按照公式 (2)

计算 DPPH 自由基清除率 (%), 所得结果以“平均值±标准差”表示。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = [1 - (A_2 - A_3)/(A_1 - A_6)] \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_6 分别为空白对照组、样品组、样品底值组、溶剂底值组在 517 nm 处的吸光度。

表 2 DPPH 自由基清除实验各组成分组成
Table 2 Components of DPPH free radical scavenging experiment

组别	加入量/ μL			
	金花葵花黄酮测试溶液	Vc 溶液	无水乙醇	DPPH 乙醇溶液
空白对照组	0	0	100	100
样品组	100	0	0	100
样品底值组	100	0	100	0
阳性对照组	0	100	0	100
阳性对照底值组	0	100	100	0
溶剂底值组	0	0	200	0

1.3.2 羟基自由基清除实验

采用 Fenton 法^[11]测定金花葵花黄酮对羟基自由基的清除率。

实验设置 3 个组别, 分别为空白对照组、样品组、样品底值组, 按照表 3 配制各组反应液 (200 μL), 其中, 硫酸亚铁水溶液、 H_2O_2 水溶液、水杨酸水溶液的浓度均为 6 mmol/L。未加入水杨酸溶液前, 将各组其他成分加入样品管后充分混匀, 室温静置 10 min 后, 再加入水杨酸溶液, 于 37 °C 水浴 30 min, 用酶标仪测定溶液在 510 nm 处的吸光度。每个质量浓度 (分别为 0.04、0.08、0.20、0.40、1.00 g/L) 的金花葵花黄酮样品溶液平行实验 3 次。按照公式 (3) 计算羟基自由基清除率 (%), 所得结果以“平均值±标准差”表示。

羟基自由基清除率/ $\% = (A_1 + A_3 - A_2)/A_1 \times 100 \quad (3)$
式中: A_1 、 A_2 、 A_3 分别为空白对照组、样品组、样品底值组在 510 nm 处的吸光度。

表 3 羟基自由基清除实验各组成分组成
Table 3 Components of hydroxyl radical scavenging experiment

组别	加入量/ μL				
	硫酸亚铁水溶液	金花葵花黄酮样品溶液	H_2O_2 溶液	蒸馏水	水杨酸水溶液
空白对照组	50	0	50	50	50
样品组	50	50	50	0	50
样品底值组	50	50	50	50	0

1.3.3 ABTS 自由基清除实验

通过 ABTS 自由基清除实验评价样品的总抗氧

化能力^[12]。

按参考文献 [13] 方法, 首先配制浓度为 2.6 mmol/L 的 K₂S₂O₈ 储备液和 7.4 mmol/L 的 ABTS 储备液。将同体积的 ABTS 储备液与 K₂S₂O₈ 储备液混合均匀, 避光室温放置 12 h。用蒸馏水稀释后, 于 734 nm 处测量溶液的吸光度在 0.70±0.02 内, 即得 ABTS 工作液。

取 0.8 mL ABTS 工作液与 0.2 mL 样品溶液(质量浓度分别为 0.04、0.08、0.20、0.40、1.00 g/L) 混合, 黑暗中反应 6 min, 于 734 nm 处测量溶液的吸光度, 记为 A; 取 0.8 mL ABTS 工作液与 0.2 mL 不同浓度抗坏血酸溶液混合, 黑暗中反应 6 min, 于 734 nm 处测量溶液的吸光度, 记为 A_c; 取 0.8 mL ABTS 工作液与 0.2 mL 体积分数为 80% 的乙醇水溶液混合, 黑暗中反应 6 min, 于 734 nm 处测量溶液的吸光度, 记为 A₀。

$$\text{ABTS 自由基清除率} / \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: A 和 A₀ 分别为样品组和空白组在 734 nm 吸光度。将式 (4) 中的 A 换为 A_c 即得阳性对照 Vc 的 ABTS 自由基清除率。

1.4 金花葵花黄酮的安全性实验

1.4.1 红细胞溶血实验

参照文献[14]进行红细胞溶血实验。实验设置 3 组, 分别为阳性对照组、阴性对照组和样品组, 其中: 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 下同) 作为阴性对照组受试样, 纯净水作为全溶血阳性对照组受试样, 6 个质量浓度梯度 (0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L) 的金花葵花黄酮样品溶液作为样品组受试样。实验使用的红细胞取自新鲜兔血, 并经过前处理 (将兔血于 1500 r/min 离心 10 min, 并用 PBS 洗 3 次) 去除血清、稀释后得到实验用红细胞裂解液 (RBC)。

首先, 在阳性对照组、阴性对照组和样品组 [1.5 mL 离心管 (简称 EP 管)] 中分别加入 0.25 mL 的 RBC+0.75 mL 的纯净水、PBS、不同质量浓度的金花葵花黄酮溶液, 总体积均为 1 mL。然后, 将 EP 管置于 150 r/min、37 °C 摇床中培育 15 min, 再将各 EP 管放在离心机中, 10000×g 的离心力离心 1 min 以停止培育, 离心后取上清液, 用酶标仪测定上清液在 540 nm 或 575 nm 处的吸光度 (A₅₄₀ 或 A₅₇₅), 记录并保存数据。

刺激性评分按照以下方法进行。首先, 以不同质量浓度 (x) 样品与 RBC 悬液作用后的溶血率 (y) 为横纵坐标, 绘制拟合曲线, 得到半溶血率 (H₅₀, 即溶血率为 50% 时对应的样品质量浓度); 然后, 观察 RBC 悬液在样品作用下红细胞溶血发生变色的临界质量浓度 (i), 此质量浓度作用下的单一变性

能力 (DI) 根据公式 (5) ~ (7) 计算:

$$DI = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100 \quad (5)$$

$$R_i = A_{575} (\text{样品组}) / A_{540} (\text{样品组}) \quad (6)$$

$$R_1 = [A_{575} (\text{阳性对照}) - A_{575} (\text{阴性对照})] /$$

$$[A_{540} (\text{阳性对照}) - A_{540} (\text{阴性对照})] \quad (7)$$

式中: R₁ 为氧合血红蛋白的吸光度, 约为 1.05±0.001; R₂ 为内部标准品十二烷基硫酸钠 (质量分数 0.1%) 的吸光度, 约为 0.65。

最后, 根据公式 (8) 得到裂解/变性比 (L/D) 来判断样品刺激性。

$$L/D = H_{50} / DI \quad (8)$$

L/D 与急性眼刺激实验的数据相对应, 如表 4 所示。

表 4 红细胞溶血实验刺激性评分标准

Table 4 Erythrocyte hemolysis test stimulation scoring criteria

刺激分类	刺激评分				
	L/D>100	10≤L/D<100	1≤L/D<10	0.1≤L/D<1	L/D<0.1
无刺激	轻度刺激	中度刺激	刺激性	重度刺激	

1.4.2 鸡胚绒毛尿囊膜实验

采用鸡胚绒毛尿囊膜实验 (HET-CAM) 评价金花葵花黄酮的安全性^[15]。

实验所用鸡蛋符合 SNT 2329—2009 化妆品眼刺激性标准, 在不触碰蛋膜的条件用镊子将培养 9 d 鸡胚轻轻破开蛋壳, 用生理盐水湿润蛋膜后用镊子轻轻挑开内膜, 保证血管膜完整。观察血管完整性后, 分别将 300 μL 阳性对照溶液 (0.1 mol/L 的 NaOH 水溶液)、阴性对照溶液 (生理盐水) 以及质量浓度为 1.00 g/L 的金花葵花黄酮样品溶液滴加至尿囊膜表面, 观察尿囊膜 5 min 内血管出血、凝固和血管溶解出现的时间, 每个样品液用 6 个鸡蛋进行平行测试, 采用反应时间法进行实验, 根据公式 (9) 计算刺激评分 (IS)。

$$IS = \frac{(301 - \text{secH}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{secL}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{secC}) \times 9}{300} \quad (9)$$

式中: secH 为出血时间, 即加样后尿囊膜上发生出血的平均时间, s; secL 为血管溶解时间, 即加样后尿囊膜上发生血管溶解的平均时间, s; secC 为凝血时间, 即加样后尿囊膜上出现凝血的平均时间, s。IS 与鸡胚绒毛尿囊膜实验的数据相对应, 如表 5 所示。

表 5 鸡胚绒毛尿囊膜实验刺激评分标准

Table 5 Chicken embryo chorioallantoic membrane test stimulation criteria

刺激分类	刺激评分			
	IS<1	1≤IS<5	5≤IS<9	IS≥9
无刺激	轻度刺激	中度刺激	强度刺激/腐蚀性	

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果分析

图 1 为金花葵花黄酮提取率的各单因素影响考察结果。

从图 1a 可以看出,随着乙醇体积分数的升高,金花葵花黄酮提取率呈现出先上升后下降的趋势。在乙醇体积分数为 50%~80% 的范围内,提取率呈现逐渐增加的趋势,且在乙醇体积分数为 70%~80% 的范围内增加效果更显著,当乙醇体积分数为 80% 时,提取率最大 (57.23%)。随后,随着乙醇体积分数的升高,提取率呈降低趋势。其原因在于,一方面是,不同体积分数的乙醇具有不同的极性,因此对黄酮的提取效果不同;另一方面是,乙醇体积分数的增大使其他醇溶性杂质溶出,从而影响结果测定^[16]。所以,选取乙醇的 φ_{optimal} 为 80% 进行后续研究。

从图 1b 可以看出,超声时间在 20~40 min 范围内,金花葵花黄酮的提取率呈现先增加后减少的趋势。其中,超声时间在 20~30 min 范围内,提取率和超声时间出现线性正相关性,在 30 min 时提取率最大 (65.47%),此后随着超声时间的增加,提取率降低。原因在于,在提取过程中,随着超声时间的延长,超声波在介质中产生的微小振动充分使原料中的黄酮溶出,但随着超声时间的进一步延长,黄酮浓度达到饱和,由于黄酮自身的抗氧化作用,此时一些类黄酮将发生氧化反应,成分降解,导致提取率下降^[17]。所以,选取 t_{optimal} 为 30 min 进行后续研究。

从图 1c 可以看出,随着提取温度的升高,金花葵花黄酮提取率呈现出先上升后下降的趋势。在 40~70 °C 范围内,提取率和温度呈近似线性正相关性,当温度达到 70 °C 时,提取率最大 (58.12%)。此后温度继续升高,提取率呈下降趋势。原因在于,随着提取温度的升高,溶液中分子运动速率越快,有利于黄酮的提取;但随着温度的不断升高,一方面溶剂挥发,导致提取率降低,另一方面溶出的黄酮活性成分不稳定,对结果造成影响^[18]。所以,选取 θ_{optimal} 为 70 °C 进行后续研究。

从图 1d 可以看出,金花葵花黄酮提取率在料液比 (g : mL) 为 1 : 15~1 : 20 范围内呈现上升的趋势,在 1 : 20 的料液比 (g : mL) 附近,提取率达到了最大值 (62.77%)。这是因为,料液比 (g : mL) 为 1 : 15~1 : 20 时,溶剂用量不足,所以提取率随着溶剂用量的增加而增大。继续增加溶剂用量,其他可溶性杂质提取量增加,导致黄酮提取量的减少,黄酮提取率反而降低,同时会造成资源浪费,也会增加后续浓缩工作量和能耗^[19]。所以,选取料液比 (g : mL) 1 : 20 进行后续研究。上述单因素实验中

相同条件下提取率有所差异是由于实验所用仪器带来的误差。

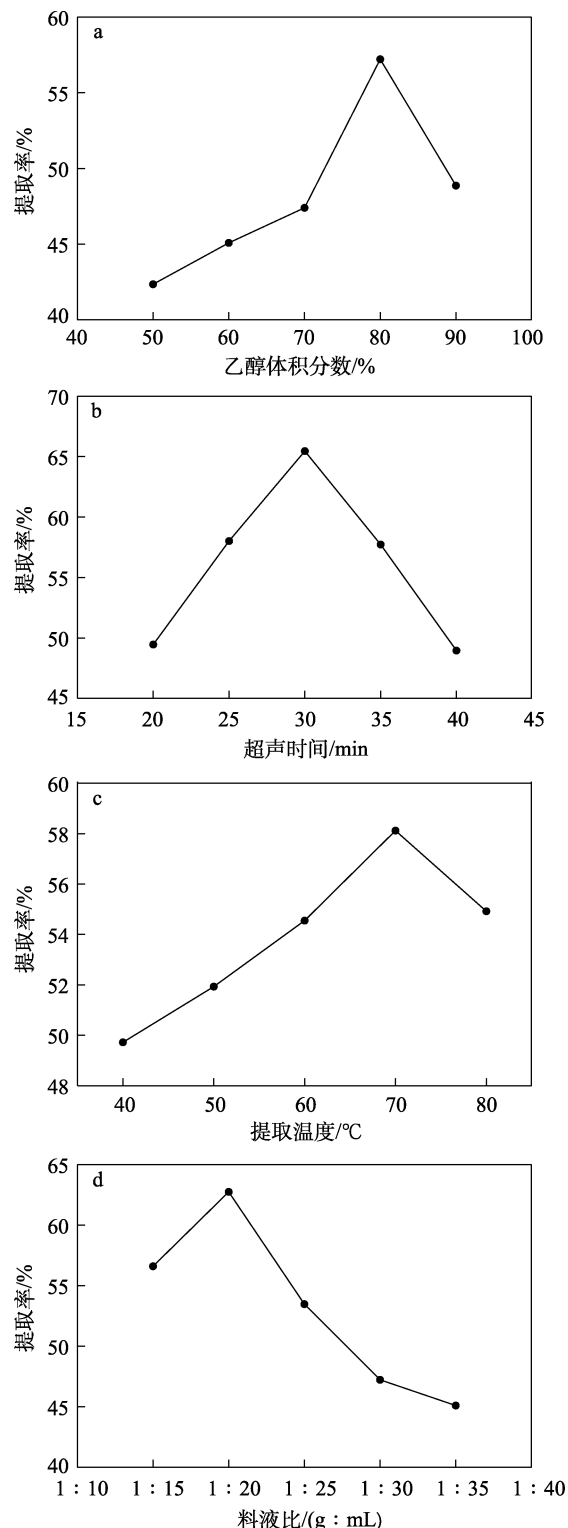


图 1 乙醇体积分数 (a)、超声时间 (b)、提取温度 (c) 和料液比 (g : mL) (d) 对金花葵花黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effects of ethanol volume fraction (a), ultrasonic time (b), extraction temperature (c) and solid-liquid ratio (g : mL) (d) on extraction rate of flavonoids from *Hibiseu manihot* L. flower

2.2 正交实验结果分析

表 6 为正交实验的结果与分析。从表 6 可以看出, 金花葵花黄酮的提取率受到 4 个因素: *A* (乙醇体积分数)、*B* (超声时间)、*C* (提取温度)、*D* (料液比) 的影响, 其中 *A* 是最为显著的因素, 其次是 *C*、*D* 和 *B*。由正交实验得出的最佳提取方案为: $A_2B_3C_3D_1$, 即乙醇体积分数 80%、超声时间 35 min、提取温度 75 °C、料液比 (g : mL) 1 : 15, 对此最佳提取工艺参数进行验证, 重复 3 次实验, 平均提取率为 89.97%, 此时得到的提取率高于表中 9 组实验中的最高提取率 (72.63%), 并且相比于已有的溶剂法 (50.52%) 提取金花葵黄酮研究^[20], 其提取率得到了较大的提高, 表明该优化方法有效可靠。

表 6 正交实验结果与分析

Table 6 Results and analysis of orthogonal experiment

实验号	<i>A</i> 乙醇体积分数/%	<i>B</i> 超声时间/min	<i>C</i> 提取温度/°C	<i>D</i> 料液比/(g : mL)	提取率/%
1	75	25	65	1 : 15	46.74
2	75	30	70	1 : 20	48.98
3	75	35	75	1 : 25	56.22
4	80	25	70	1 : 25	58.06
5	80	30	75	1 : 15	72.63
6	80	35	65	1 : 20	60.44
7	85	25	75	1 : 20	55.47
8	85	30	65	1 : 25	46.80
9	85	35	70	1 : 15	69.52
<hr/>					
K1	151.94	160.27	153.98	188.89	
K2	191.13	168.41	176.56	164.89	
K3	171.79	186.18	184.32	161.08	
k1	50.65	53.42	51.33	62.96	
k2	63.71	56.14	58.85	54.96	
k3	57.26	62.06	61.44	53.69	
R	13.06	8.64	10.11	9.27	
<hr/>					
<i>A</i> > <i>C</i> > <i>D</i> > <i>B</i>					
<hr/>					
最优方案	80	35	75	1 : 15	89.97

2.3 金花葵花黄酮的抗氧化活性分析

2.3.1 对 DPPH 自由基清除率的影响

图 2 为金花葵花黄酮对 DPPH 自由基的清除能力测试结果。

DPPH 自由基清除活性是评价有效抗氧化化合物的抗氧化活性最常用的分析方法之一^[21]。从图 2 可知, 金花葵花黄酮和 Vc 对 DPPH 自由基的清除效果都十分明显, 且都随着各自质量浓度的增大, DPPH 自由基的清除率逐渐增大后趋于平缓。其主要原因在于, 抗氧化剂质量浓度作为清除自由基能力的重要因素, 其清除能力是由其质量浓度和速率常数决定^[22]。当金花葵花黄酮质量浓度为 0.40 g/L

时, DPPH 自由基清除率达到 90% 以上, 此时, 金花葵花黄酮和 Vc 对 DPPH 自由基清除率相当; 当金花葵花黄酮质量浓度为 1.00 g/L 时, DPPH 自由基清除率达到最大 (94.81%)。经测定, 金花葵花黄酮与 Vc 对 DPPH 自由基的半数抑制质量浓度 (IC_{50}) 分别为 106.00 和 32.63 $\mu\text{g/mL}$ 。由图 2 可知, 两者在高质量浓度范围内对 DPPH 自由基的清除效果相当, 说明金花葵花黄酮对 DPPH 自由基清除效果较好。

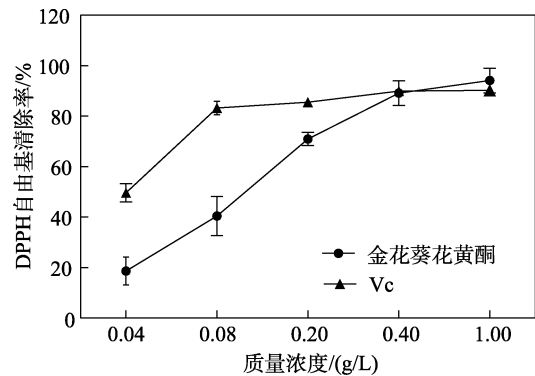


图 2 金花葵花黄酮对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 2 Scavenging ability of flavonoids from *Hibiscus manihot* L. flower against DPPH free radical

2.3.2 对羟基自由基清除率的影响

图 3 为金花葵花黄酮对羟基自由基的清除能力测试结果。

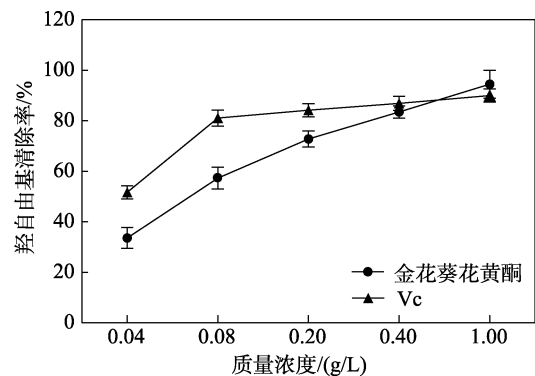


图 3 金花葵花黄酮对羟基自由基的清除能力

Fig. 3 Scavenging ability of flavonoids from *Hibiscus manihot* L. flower against $\cdot\text{OH}$ free radical

羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 是氧化性最强的自由基之一, 能对人体产生一系列危害^[23-24]。 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用与溶液中金属离子的螯合作用有关^[25]。从图 3 可知, 金花葵花黄酮和 Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果都十分明显, 且都随着各自质量浓度的增大, $\cdot\text{OH}$ 的清除率逐渐增大后趋于平缓。这可能的原因是, 随着黄酮质量浓度的增大, 其对金属离子的螯合能力逐渐达到阈值^[26]。经测定, 金花葵花黄酮与 Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的 IC_{50} 分别为 70.06 和 27.11 $\mu\text{g/mL}$ 。在低质量浓度 ($<0.63 \text{ mg/L}$) 时, Vc 对 $\cdot\text{OH}$ 的清除效果优于金花

葵花黄酮，而在高质量浓度 (>0.63 mg/L) 时，金花葵花黄酮对·OH 的清除效果优于 Vc。当金花葵花黄酮质量浓度为 1.00 g/L 时，·OH 清除率达到最大 (95.24%)。由 IC₅₀ 和图 3 可以看出，金花葵花黄酮表现出良好的清除·OH 的作用。

2.3.3 对 ABTS 自由基清除率的影响

图 4 为金花葵花黄酮对 ABTS 自由基的清除能力测试结果。

ABTS 自由基是一种广泛用于测定植物提取物的总抗氧化能力的化合物^[27]。从图 4 可知，在质量浓度范围内，金花葵花黄酮对 ABTS 自由基的清除能力随着质量浓度的增大而增大。当金花葵花黄酮质量浓度为 1.00 g/L 时，清除率为 82.80%。在质量浓度范围内，Vc 的清除率均高于金花葵花黄酮的清除能力。其中，金花葵花黄酮和 Vc 清除 ABTS 自由基的 IC₅₀ 分别为 213.80 和 5.58 μg/mL。由图 4 和 IC₅₀ 可以看出，在一定质量浓度下金花葵花黄酮具有良好的总抗氧化能力。

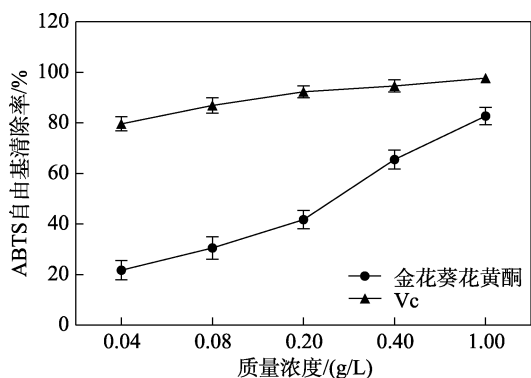


图 4 金花葵花黄酮对 ABTS 自由基的清除能力
Fig. 4 Scavenging ability of flavonoids from *Hibiseu manihot L.* flower against ABTS free radical

2.4 金花葵花黄酮的安全性分析

2.4.1 红细胞溶血实验结果分析

图 5 为不同质量浓度金花葵花黄酮的红细胞溶血率以及对应的 EP 管溶血情况。

由图 5 可知，当金花葵花黄酮质量浓度为 0.1、0.2 和 0.4 g/L (即 ≤0.4 g/L) 时，红细胞溶血率均 < 10%，并未出现明显的溶血性，这说明该质量浓度下，金花葵花黄酮对红细胞刺激性很小。当金花葵花黄酮质量浓度 > 0.4 g/L 后，溶血率显著上升。由标准曲线和公式计算得到 H₅₀ 为 0.4734 g/L, R₁ = 1.04, R₂ = R_{SDS} = 0.65, 再通过刺激性评分标准可得出，金花葵花黄酮质量浓度在 0.1~0.4 g/L 时 (即 ≤ 0.4 g/L) 为轻度刺激 (L/D=90.17~63.12)，质量浓度 > 0.4 g/L 后为中度刺激 (L/D=6.69~4.89)。结果表明，金花葵花黄酮在低质量浓度时具有良好的安全性。

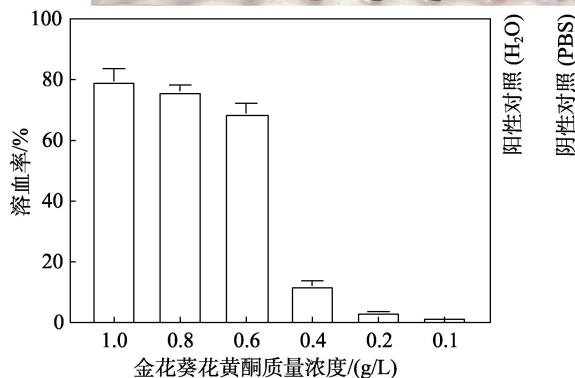
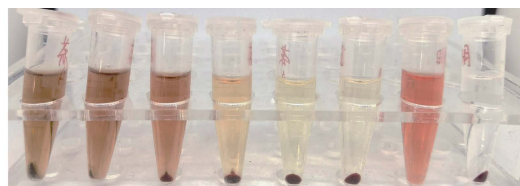


图 5 不同质量浓度金花葵花黄酮的红细胞溶血实验结果
Fig. 5 Results of erythrocyte hemolysis test of flavonoids from *Hibiseu manihot L.* flower with different mass concentration

2.4.2 鸡胚绒毛尿囊膜实验结果分析

图 6 为金花葵花黄酮对鸡胚尿囊膜血管作用实物图。

鸡胚绒毛尿囊膜实验是一种常用的眼刺激评价方法。基于其完整的血管系统，清晰透明的膜结构以及易于观察等优势，可以通过检测血管出血、凝血和血管溶解来确定被试物质是否为刺激物，常用于原料的早期安全性评价。采用 0.1 mol/L 的 NaOH 水溶液作为阳性对照溶液，刺激评分为 18，血管溶血明显，具有强刺激性；使用生理盐水作为阴性对照溶液，刺激评分为 0.04，血管无溶血；质量浓度为 1.00 g/L 的金花葵花黄酮样品溶液，刺激评分为 0.09，血管无溶血，表明样品不具有眼刺激性。

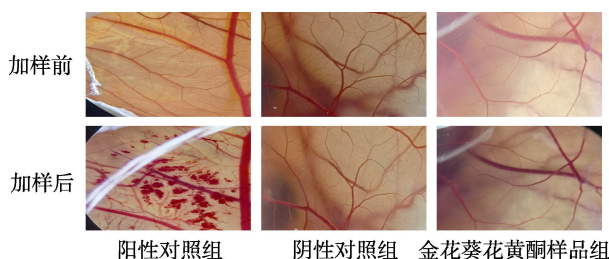


图 6 金花葵花黄酮样品液眼刺激性测试结果
Fig. 6 Eye irritation test results of flavone sample from *Hibiseu manihot L.* flower

3 结论

(1) 以金花葵花为原料，采用超声辅助提取法提取金花葵花黄酮，最佳提取工艺条件为：超声功率为 300 W，乙醇体积分数 80%，超声时间 35 min，提取温度 75 °C，料液比 (g : mL) 1 : 15，该条件

下的金花葵花黄酮提取率为 89.97%。

(2) 质量浓度为 1.00 g/L 的金花葵花黄酮对 DPPH 自由基、羟基自由基和 ABTS 自由基具有最大的清除率,分别为 94.81%、95.24%、82.80%; IC₅₀ 分别为 106.00、70.06 和 213.80 μg/mL。表明金花葵花黄酮具有良好的抗氧化活性,具有用作天然抗氧化剂的潜力。

(3) 质量浓度 ≤ 0.4 g/L 时,金花葵花黄酮对红细胞溶血率均 < 10%,属于轻度刺激;质量浓度为 1.00 g/L 的金花葵花黄酮溶液对鸡胚绒毛尿囊膜无溶血,表明金花葵花黄酮无眼刺激性,具有较高的安全性。

金花葵花富含黄酮类活性成分,具有较高的抗氧化活性和安全性,有望作为化妆品原料成为其重要成分之一。本文也为天然安全功效原料的研发提供了一定参考。

参考文献:

- [1] HE J M (何金妹). Rare health care wild vegetable—*Hibiseu manihot*[J]. Fujian Agriculture (福建农业), 2009, 2: 18.
- [2] QIAN W Z, HU Y Y, LIN X, et al. Phenological growth stages of *abelmoschus manihot*: Codification and description according to the BBCH scale[J]. Agronomy, 2023, 13(5): 1328.
- [3] LI J (李杰), WANG Y F (王玉丰), RONG J D (容静东). Nutritional value and antioxidant activity of *Abelmoschus manihot*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2019, 40(7): 1354-1358.
- [4] WANG R J (王瑞君), TIAN Y (田雨), WU J W (吴佳文), et al. Analysis of medicinal components in the flower of *Hibiseu manihot* L.[J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2022, 34(4): 588-597, 721.
- [5] CAO L H (曹利华), MIAO M S (苗明三). Analysis of modern research and comprehensive utilization of aurea *helianthus*[J]. Acta Chinese Medicine (中医学报), 2016, 31(12): 1966-1968.
- [6] JIN K (今科). "Life saving grass": Plants stand in the mountains, the wind is healthy—The medicinal value of the rare plant *Abelmoschus manihot* must be revealed[J]. Modern Science (今日科苑), 2008(5): 85-86.
- [7] LIGA S, PAUL C, PETER F. Flavonoids: Overview of biosynthesis, biological activity, and current extraction techniques[J]. Plants-Basel, 2023, 12(14): 2732.
- [8] ZHANG Y Q (张月琴), WANG Z W (王紫薇), YE W F (叶文峰). Present situation of application and development of *Aurea helianthu*. food[J]. Journal of Shanxi Datong University (Natural Science Edition) (山西大同大学学报: 自然科学版), 2022, 38(3): 76-78, 100.
- [9] MAESTRE-HEMANDEZ A B, VICENTE-LOPEZ J J, PEREZ-LIAMS F, et al. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents in floral saffron bio-residues[J]. Processes, 2023, 11(5): 1400.
- [10] GULCIN I, ALWASEL S H. DPPH radical scavenging assay[J]. Processes, 2023, 11(8): 2248.
- [11] GUNALAN G, DURGE A, ARCHANA A, et al. *In vitro* free radical scavenging activity of *Nandukkal Parpam*: A herbo-mineral Siddha formulation[J]. Annals of Phytomedicine: An International Journal, 2023, 12(1): 247-250.
- [12] ZHANG X L (张晓利), ZHAO R X (赵瑞香), JIANG J F (姜建福). Optimization of extraction process of taxifolin from grape pomace and determination of its antioxidant capacity[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2021, 42(5): 200-205, 220.
- [13] TENG C, QIN P, SHI Z, et al. Structural characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharides from quinoa[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 113: 106392.
- [14] TIAN N N (田妮娜), LIU X G (刘兴国), LI Y (李岩), et al. Preliminary study of using hemolysis test to evaluate the eye irritation of rinse-off cosmetics[J]. Gansu Science and Technology (甘肃科技), 2020, 36(2): 62-63, 78.
- [15] HE L C, ZHU S M, XIE Z, et al. Feasibility study of chick chorioallantoic membrane vascular test for evaluating eye irritation of cosmetics[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2017, 34(8): 1158-1162.
- [16] PROMMUAK C, DE-EKANMKUL W, SHOTPRUK A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thaisilk waste and antioxidant activity of extracts[J]. Separation & Purification Technology, 2008, 62(2): 444-448.
- [17] ABUDURHEMAN B. Optimization of flavonoid extraction from *Xanthoceras sorbifolia* bunge flowers, and the antioxidant and antibacterial capacity of the extract[J]. Molecules, 2021, 27(3): 139-157.
- [18] WANG J L (王俊龙), LIN Y G (蔺永刚), CHEN F X (陈凤霞), et al. Extraction and antioxidant and hypoglycemic activity of total flavonoids from *Hypericum benthamii*[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2024, 41(5): 1050-1059, 1083.
- [19] QI X N (祁小妮), WANG J L (王俊龙), LI Z L (李振亮), et al. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Drynariae Rhizoma*[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2018, 35(7): 1170-1175, 1181.
- [20] SHEN L Y (申利英), GAO Y H (高玉红), REN L W (任立伟), et al. Optimization of ultrasonic extraction process of total flavonoids in *abelmoschus manihot* by response surface methodology [J]. Coal and Chemical Industry (煤炭与化工), 2017, 40(9): 24-31.
- [21] LANEZ E, SAIDI M, LANEZ T. Assessment of antioxidant and DPPH free radical scavenging activity of 1,2-dithiole-3-thione derivatives by using cyclic voltammetry, spectroscopic, and molecular docking studies[J]. Journal of Sulfur Chemistry, 2023, 44(5): 542-558.
- [22] ZUO Y (左玉), XIE W L (谢文磊), WANG H (王会). New development of the biological antioxidants[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2006, 32(1): 62-67.
- [23] ZHAO Z W. Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2023, 208: 510-515.
- [24] ZHU B Y, SUN-WATERHOUSE D X, YOU L J. Insights into the mechanisms underlying the degradation of xylooligosaccharides in UV/H₂O₂ system[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 317: 121091.
- [25] AHIRE J J, MOKASHE N U, PATIL H J, et al. Antioxidative potential of forate producing *Lactobacillus helveticus* CD6[J]. Journal of Food Science and Fechnology, 2013, 50(1): 26-34.
- [26] ZHAO D (赵丹), LIU P P (刘平平), LI M (李萌), et al. Protective effect and mechanism of lactic acid bacteria fermentation extract on skin oxidative damage[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(4): 752-760.
- [27] CANO A, MAESTRE A B, HERNANDEZ-RUIZ J, et al. ABTS/TAC methodology: Main milestones and recent applications[J]. Processes, 2023, 11(1): 185.