

引用:罗春燕,林锦霞,许钧西,林淑贞,陈艳锦,张宽,林诗莹.千里光总黄酮响应面法提取优化与抗氧化活性研究[J].中医药导报,2026,32(3):44-50.

千里光总黄酮响应面法提取优化与抗氧化活性研究*

罗春燕^{1,2,3},林锦霞^{3,4},许钧西^{1,2},林淑贞^{1,2},陈艳锦^{1,2},张宽^{1,2},林诗莹⁵

- [1.福建中医药大学附属第二人民医院,福建 福州 350001;
2.福建省医疗机构中药制剂重点实验室(福建中医药大学),福建 福州 350001;
3.道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室,北京 100700;
4.福建中医药大学附属第三人民医院,福建 福州 350108;
5.福建中医药大学,福建 福州 350108]

[摘要] 目的:研究千里光总黄酮提取工艺的优化,并测定其抗氧化性。方法:基于单因素试验结合响应面法优化千里光总黄酮的提取工艺,并评估其体外抗氧化能力。结果:溶剂体系选用52%乙醇溶液,料液比控制在1:47(g/mL),提取温度在79℃条件下进行41 min水浴提取。经验证实验测得总黄酮提取达53.27 mg/g(以原料干质量计),该工艺参数显著提高了黄酮类物质的溶出效率。抗氧化试验中千里光总黄酮在DPPH和ABTS自由基清除中IC₅₀分别为0.40 mg/mL和3.76 mg/mL。结论:响应面法优化千里光总黄酮提取工艺方案设计稳定可行,且千里光具有良好的抗氧化能力。

[关键词] 千里光;总黄酮;响应面法;抗氧化;工艺优化

[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)03-0044-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.03.008

Optimization of Total Flavonoids Extraction from *Senecio Scandens* Using Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity Evaluation

LUO Chunyan^{1,2,3}, LIN Jinxia^{3,4}, XU Junxi^{1,2}, LIN Shuzhen^{1,2}, CHEN Yanjin^{1,2}, ZHANG Kuan^{1,2}, LIN Shiyang⁵

- [1.Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital, Fuzhou Fujian 350001, China;
2.Key Laboratory of traditional Chinese Medicine in Medical Institutions of Fujian Province (Fujian University of Traditional Chinese Medicine), Fuzhou Fujian 350001, China; 3.State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China; 4.Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Third Affiliated Hospital, Fuzhou Fujian 350108, China; 5.Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian 350108, China]

[Abstract] Objective: To optimize the extraction process of total flavonoids from *Senecio scandens* and determine its antioxidant activity. Methods: Based on single factor and response surface analysis, the extraction process of total flavonoids from *Senecio scandens* was optimized, and its antioxidant activity was investigated. Results: The optimum extraction process of total flavonoids from *Senecio scandens* was as follows: the volume fraction of ethanol was 52%, the ratio of material to liquid was 1:47 (g/mL), the extraction temperature was 79 °C, and the extraction time was 41 min. The extraction rate of total flavonoids from *Senecio scandens* was 53.27 mg/g, which was close to the predicted value. The IC₅₀ of total flavonoids in DPPH and ABTS free radical scavenging were 0.40 mg/mL and 3.76 mg/mL, respectively. Conclusion: The design of the extraction process of total flavonoids from *Senecio scandens* based on response surface optimization was stable and feasible, and *Senecio scandens* had good antioxidant capacity.

[Keywords] *Senecio scandens* Buch.-Ham; total flavonoids; response surface method; antioxidant; process optimization.

*基金项目:中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

通信作者:林锦霞,女,主管中药师,研究方向为中药鉴定

千里光为菊科植物千里光*Senecio scandens* Buch.-Ham. ex D. Don.的干燥地上部分,其别名有千里急、眼明草、九里光等,主要分布于江苏、浙江、广西、四川和贵州等地^[1]。其是苗岭山区地道的苗医苗药名药材^[2]。千里光其性味苦寒,归肺、肝经,具有清热解毒、明目和利湿的功效^[3],临床上用于治疗风热感冒、目赤肿痛、泄泻痢疾、皮肤湿疹疮疖等疾病^[4]。苗族民间验方中记载千里光与猪肝一起煎服,能够有效治疗夜盲症^[5]。现代研究发现千里光作为苗药痛风汤方剂药味之一,可以抑制痛风性关节炎的发作^[6]。据报道,千里光有效活性成分为黄酮类化合物,其是一种天然的药物活性成分,在清除自由基^[7]、抑菌^[8]、抗炎^[9]、抗癌^[10]、抗流感病毒^[11]等方面效果显著。梅莹等^[12]在双花千里光中分离得到槲皮素、槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷、山柰酚、槲皮素-3-B-D-芸香糖苷等多种黄酮类成分。李燕等^[13]发现不同采收期黔产千里光总黄酮的含量以6月份含量最高,绿原酸和金丝桃苷含量均以8月份最高。李筱玲等^[14]利用超声提取结合响应面法得到千里光总黄酮最优提取参数为乙醇体积分数62%,超声提取时间51 min,液料比34:1(mL/g),在此条件下千里光总黄酮提取率为10.34%。陆艳丽等^[15]通过DPPH法发现千里光黄酮提取物是一种有前途的天然抗氧化剂。

虽然千里光用药历史悠久,但其提取工艺和抗氧化研究仍相对不足,尤其是关于千里光总黄酮的回流提取工艺及其抗氧化性能尚未见系统报道。本研究创新性地将响应面法与梯度热回流技术相结合,基于传质-反应耦合机制,构建多参数协同优化模型,并采用DPPH与ABTS双自由基清除体系综合评价其抗氧化活性,以期为天然产物中黄酮类功能性组分产业化制备提供理论依据。

1 材 料

1.1 试药 千里光(批号:2405220032,产地:江苏)经福建中医药大学附属第二人民医院倪立坚主任中药师鉴定为菊科植物千里光干燥地上部分。芦丁标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-202012,纯度≥98%);无水乙醇(福建莱赛化工科技公司,批号:20230115);氢氧化钠(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:20180802);亚硝酸钠(西陇科学股份有限公司,批号:211102);过硫酸钾(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:K2401451);DPPH(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:K2323133);ABTS(山东科源生化有限公司,批号:C17465892)

1.2 仪器 新世纪紫外分光光度计(T6,北京普析通用仪器有限责任公司);万能高速多功能粉碎机(YF3-1A,瑞安市永历制药机械有限公司);纯水仪(RO-2T,四川卓越水处理设备有限公司);超声仪(KQ-500VDE,昆山市超声仪器有限公司);电子分析天平(KD-NEC,福州科迪电子有限公司);全波长酶标仪(K6600A,北京凯奥科技发展有限公司)

2 方 法

2.1 原材料预处理 将中药材千里光进行粉碎,过2号筛,放入干燥器保存。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁标准品5 mg,放置于

25 mL的容量瓶中,加入适量的50%乙醇超声辅助充分溶解后,加50%乙醇稀释至刻度线,摇匀,即可得到浓度为0.2 mg/mL芦丁对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取千里光粉末5 mg,加入50%乙醇25 mL,70℃回流提取2次,60 min/次,滤过,合并滤液,精密吸取滤液1 mL定容于25 mL容量瓶中,摇匀,依据“2.4”节操作流程进行显色反应,在黄酮-铝络合物特征吸收波长510 nm处进行吸光度测定。以芦丁标准品建立的标准曲线为参照,利用线性回归模型进行定量分析。根据公式 $Y=(C \cdot V \cdot D)/M$,计算总黄酮提取率^[16]。式中:Y为千里光总黄酮提取率,单位为mg/g;C为黄酮质量浓度,单位为mg/mL;V为提取液体积,单位为mL;D为稀释倍数;M为千里光质量,单位为g。

2.4 线性关系考察 采用梯度移取法配制芦丁标准曲线:依次向5组25 mL容量瓶中移取0.2 mg/mL芦丁母液(梯度体积1.0~5.0 mL),依次加入1 mL 5% NaNO₂溶液涡旋混合,避光反应5 min后加入1 mL 10% Al(NO₃)₃溶液二次混匀,继续静置5 min。随后加入10 mL 4% NaOH溶液终止反应,采用50%乙醇定容后暗处显色10 min。以相同体积试剂制备空白对照,使用紫外可见分光光度计于510 nm波长测定吸光度值。以芦丁对照品溶液质量浓度为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)进行线性回归。

2.5 单因素试验

2.5.1 乙醇体积分数考察 称取千里光粉末5 mg于100 mL锥形瓶中,在液料比1:50(mL/g),提取温度80℃回流提取2次,50 min/次,考察不同体积分数乙醇分数20%、30%、40%、50%、60%对千里光总黄酮提取率的影响,以确定最优乙醇体积分数。

2.5.2 料液比考察 称取千里光粉末5 mg于100 mL锥形瓶中,在乙醇体积分数50%,提取温度80℃回流提取2次,50 min/次,考察不同料液比1:30、1:40、1:50、1:60、1:70(mL/g)对千里光总黄酮提取率的影响,以确定最优料液比。

2.5.3 提取温度考察 称取千里光粉末5 mg于100 mL锥形瓶中,在乙醇体积分数50%,料液比1:50(mL/g),提取时间为60 min,回流提取2次,考察不同温度40、50、60、70、80℃对千里光总黄酮提取率的影响,以确定最优温度。

2.5.4 提取时间考察 称取千里光粉末5 mg于100 mL锥形瓶中,在乙醇体积分数50%,料液比1:50(mL/g),提取温度为80℃,回流提取2次,考察不同提取时间30、40、50、60、70 min对千里光总黄酮提取率的影响,以确定最优时间。

2.6 响应面设计 利用Design-Expert软件,在单因素试验基础上,以总黄酮提取率为响应值设计乙醇体积分数(%) (A)、液料比(mL/g) (B)、回流温度(℃) (C)、回流时间(min) (D)四因素三水平响应面模型以获得最优提取工艺条件。

2.7 千里光总黄酮抗氧化活性

2.7.1 DPPH自由基清除能力的测定 精确称量DPPH 16.51 mg,转移至10 mL琥珀色避光容量瓶中,加无水乙醇,超声(功率420 W,频率40 kHz)使其溶解,待溶液温度平衡至(25.0±0.5)℃后,采用0.22 μm PTFE滤膜过滤,用新鲜蒸馏无水乙醇分步定容至工作浓度0.103 mg/mL,溶液现配现用,转移至棕色液

相小瓶后避光保存(有效期≤4 h),即得DPPH工作液。取一定量的千里光粉末,按最优条件提取后浓缩,再于冷冻干燥器中干燥,得到总黄酮粗提物。取总黄酮粗提物20 mg,配成浓度为2 mg/mL的溶液,分别取1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL置于10 mL具塞比色管中,95%乙醇稀释至刻度,得到分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL的样品待测液。采用96孔板微量反应体系进行DPPH自由基清除能力测定。实验设置3组体系:(1)空白组:用95%乙醇溶液(100 μL)与DPPH工作液(100 μL)混合;(2)样品组:将梯度浓度千里光总黄酮溶液(100 μL)分别与等体积DPPH工作液混合;(3)对照组:各浓度黄酮溶液(100 μL)与无水乙醇(100 μL)复配。所有反应体系在避光条件下孵育30 min后,使用多功能酶标仪于特征波长517 nm处进行吸光度检测。以同质量浓度维生素C(VC)溶液作为阳性参照,每组实验设置3个复孔,取均值计算。根据公式 $Y=[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100\%$,计算DPPH自由基的清除率^[7]。式中:Y为DPPH自由基的清除率(%); A_1 为样品与DPPH自由基溶液混合体系的吸光度值; A_2 为对应样品与无水乙醇溶剂混合体系的吸光度值; A_0 为DPPH溶液与无水乙醇混合体系的吸光度值。

2.7.2 ABTS自由基清除测定 ABTS自由基工作液制备流程如下:(1)精确称量ABTS粉末(38.41 ± 0.20)mg于10 mL避光容量瓶中,经超纯水完全溶解后定容;(2)同步配制过硫酸钾溶液(66.10 mg/100 mL水相体系)。将两种母液按1:1体积比充分混匀,避光环境,(25 ± 2)°C下氧化反应12~16 h。采用紫外分光光度计对反应体系进行浓度校准,通过梯度稀释使稀释液在734 nm检测波长下的吸光值稳定于 0.70 ± 0.02 (3次平行测定RSD值<2%),最终获得标准化的ABTS自由基工作液。根据“2.7.1”中不同浓度的千里光总黄酮提取液,采用ABTS自由基清除法评估不同浓度千里光总黄酮的抗氧化活性。具体操作如下。在96孔板中分别构建3个反应体系:(1)待测组:移取20 μL梯度浓度样品溶液与180 μL ABTS反应液混合;(2)样品组:以20 μL 95%乙醇替代样品溶液,等体积加入ABTS反应液;(3)对照组:各浓度样品溶液20 μL与100 μL去离子水混合。所有体系在室温条件下孵育30 min后,使用酶标仪于734 nm波长处进行吸光度检测,每个浓度设置3个平行样本,数据以“均数±标准差”表示。阳性对照选用与样品等质量浓度的VC溶液进行同步实验。使用酶标仪于734 nm波长处进行吸光度检测,每个浓度设置3个平行样本。阳性对照选用与样品等质量浓度的VC溶液进行同步实验。按公式 $Y=[1-(A_1-A_2)/A_0] \times 100\%$,计算ABTS自由基清除率^[8]。式中: A_1 为ABTS自由基工作液与样品的混合体系吸光度值; A_2 为对应样品与无水乙醇溶剂的混合液吸光度值; A_0 为乙醇溶剂与ABTS工作液混合体系的吸光值。

2.8 统计学方法 研究通过数据可视化软件Design-Expert (v8.0.6.1)和统计学分析平台GraphPad Prism (v8.0)完成实验数据的统计分析可视化处理,所有数据均经3次独立实验验证。

3 结果与分析

3.1 芦丁标准曲线绘制 本研究采用芦丁标准品浓度梯度

(X轴)与对应吸光度测定值(Y轴)进行数学拟合,构建校准曲线,其线性回归模型 $Y=1.245 4X+0.001 8$ ($r=0.999 6$),呈现良好线性相关性。

3.2 单因素结果分析

3.2.1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响 本研究通过溶剂浓度梯度实验发现,千里光总黄酮得率与乙醇体积分数呈现显著的非线性关系(见图1)。实验数据显示,当乙醇体积分数提升至50%时,总黄酮提取效率达到峰值[(60.33 ± 0.45)mg/g],该浓度后得率随溶剂浓度增加呈下降趋势。此单峰曲线特征提示溶剂的极性与目标成分溶解度存在适配阈值。可能原因是黄酮类化合物在乙醇中有良好的溶解度,当乙醇体积分数为50%时,此时溶剂极性最接近千里光中总黄酮类成分的极性。但随着乙醇体积分数的增大,千里光总黄酮提取率反而降低,其可能的原因是随着乙醇体积分数的提高,千里光中其他物质的提取率也逐渐增加,例如植物色素、醇溶性物质、杂质等,从而抑制了总黄酮的提取。因此,选定乙醇体积分数40%、50%、60%3个梯度作为关键变量参数,开展响应面法提取工艺优化研究^[9]。

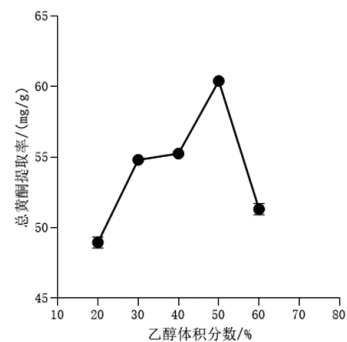


图1 乙醇体积分数对千里光总黄酮提取率的影响

3.2.2 料液比对总黄酮提取率的影响 实验数据(见图2)显示,当物料溶剂比达到1:50(g/mL)时,总黄酮提取量出现峰值[(60.24 ± 0.38)mg/g, RSD值=0.63%],超过该临界值后得率随溶剂体积增加呈下降趋势,可能是随着料液比的增大,使千里光粉末与乙醇溶液的接触面变大,得以充分提取,使有效成分迅速析出。当料液比大于1:50时,千里光总黄酮的提取率随之减少,推测是溶剂用量过多导致千里光中黄酮类成分扩散减慢。因此选用1:40、1:50、1:60进行响应面的优化。

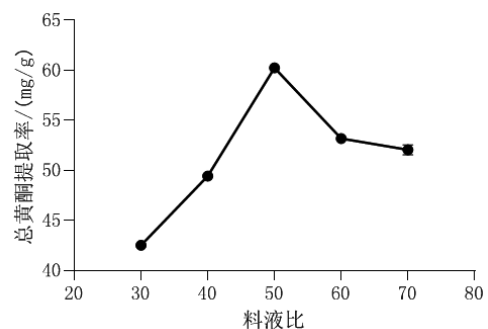


图2 料液比对千里光总黄酮提取率的影响

3.2.3 提取温度对总黄酮提取率的影响 由图3可知千里光总黄酮提取率是随着提取温度的升高呈现逐渐增大至平缓

的趋势。当温度为70℃时,总黄酮提取率达到46.25 mg/g。推测原因是随着温度的升高,分子间的热运动加速,该运动有利于千里光中黄酮类成分的溶出。当继续升高温度时,千里光中总黄酮含量的增加并不是那么明显,其可能原因是高温引起乙醇溶剂的挥发,使得有效成分的溶出变慢。综合考虑,选用60、70、80℃作为响应面的优化温度^[20]。

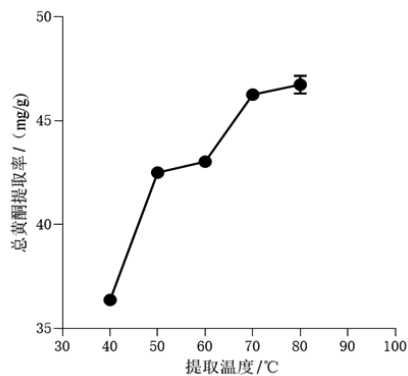


图3 提取温度对千里光总黄酮提取率的影响

3.2.4 提取时间对总黄酮提取率的影响 本研究通过提取动力学曲线分析发现,总黄酮提取率与作用时间呈现显著的单峰特征(见图4)。实验数据显示,50 min提取时段获得最大提取量 $[(57.24 \pm 0.42) \text{mg/g}]$ ($P < 0.01$),此后,提取率随提取时间的延长而下降 $(12.3 \pm 1.5)\%$ (60 min与50 min相比)。机理研究提示,过度延长时间可能导致黄酮苷键水解及酚羟基氧化聚合。基于响应面法原理,选择涵盖极值区间的40~60 min作为中心复合设计的核心工艺参数优化窗口。

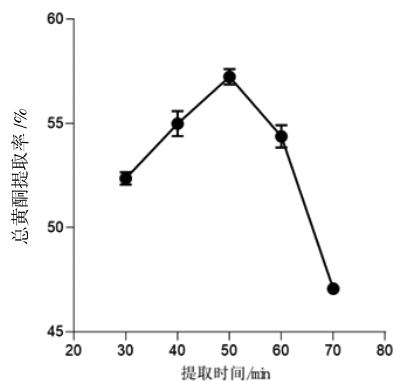


图4 提取时间对千里光总黄酮提取率的影响

3.3 千里光总黄酮提取工艺的响应面优化

3.3.1 本研究基于单因素预实验确定的极值响应区域,采用Box-Behnken中心复合设计构建四因素三水平响应面模型,关键工艺参数(乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度)及其梯度设置详见表1。通过27组实验矩阵的系统解析(见表2),结合方差分析(ANOVA)探究各变量间的交互效应,该方法严格遵循析因设计原理(Factorial Design)进行工艺参数优化。通过Design Expert 13软件对表2结果进行拟合回归分析处理得出回归方程为: $Y = 48.22 - 0.38A - 1.51B + 2.44C - 0.43D + 2.79AB + 1.36AC + 0.21AD - 1.36BC + 3.09BD - 2.75CD - 1.26A^2 - 1.94B^2 - 1.59C^2 + 0.15D^2$ 。通过线性回归和ANOVA分析该模型的适用性,并对其进行方差分析,由表3可知,该模型的 $F = 19.15$,

表明该模型具有较高的精确度,模型 $P < 0.0001$,证明了该模型的精确性与可靠性,决定系数 $R^2 = 0.9572$,说明该模型预测值与实际值拟合良好,校正系数Adjusted $R^2 = 0.9072$,表明该模型可以预测大多数变异。因此该模型适用于本实验数据的分析和预测。在此情况下,对该模型进行数据拟合及方差分析,结果表明,影响因素由强到弱为提取温度、料液比、提取时间、乙醇体积分数,其中提取温度和料液比的影响差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 千里光总黄酮提取工艺因素与水平

水平	乙醇体积分数(A)/%	料液比(B)/(g/mL)	提取温度(C)/℃	提取时间(D)/min
-1	40	40	60	40
0	50	50	70	50
1	60	60	80	60

表2 千里光总黄酮提取工艺方案设计与试验结果

序号	A	B	C	D	总黄酮提取率(Y)/(mg/g)
1	40	40	70	50	48.92
2	60	40	70	50	42.74
3	40	60	70	50	43.40
4	60	60	70	50	46.42
5	50	50	60	40	41.87
6	50	50	80	40	57.69
7	50	50	60	60	46.10
8	50	50	80	60	45.91
9	40	50	70	40	46.84
10	60	50	70	40	48.53
11	40	50	70	60	47.27
12	60	50	70	60	48.80
13	50	40	60	50	42.69
14	50	60	60	50	42.27
15	50	40	80	50	50.83
16	50	60	80	50	44.96
17	40	50	60	50	45.81
18	60	50	60	50	41.27
19	40	50	80	50	46.03
20	60	50	80	50	46.93
21	50	40	70	40	51.26
22	50	60	70	40	41.06
23	50	40	70	60	44.89
24	50	60	70	60	47.06
25	50	50	70	50	49.23
26	50	50	70	50	46.66
27	50	50	70	50	50.78

表3 千里光总黄酮提取工艺方差分析与结果

方差来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	252.76	14	18.05	19.15	0.000
A	1.75	1	1.75	1.86	0.198
B	27.52	1	27.52	29.18	0.000
C	71.73	1	71.73	76.07	0.000
D	2.27	1	2.27	2.41	0.147
AB	31.32	1	31.32	33.22	0.000
AC	7.40	1	7.40	7.85	0.016
AD	0.18	1	0.18	0.19	0.674
BC	7.42	1	7.42	7.87	0.016
BD	38.27	1	38.27	40.59	0.000
CD	30.31	1	30.31	32.14	0.000
A ²	8.52	1	8.52	9.04	0.011
B ²	20.17	1	20.17	21.39	0.001
C ²	13.45	1	13.45	14.27	0.003
D ²	0.12	1	0.12	0.13	0.726
残差	11.31	12	0.94		
拟失度	7.53	10	0.75	0.40	0.869
绝对误差	3.78	2	1.89		
高离差	264.08	26			

3.3.2 响应面图各因素交互作用分析 在响应面中,响应面越陡峭,该因素对总黄酮提取率的影响越显著;反之则该因素影响不显著。在等高线拓扑解析中,交互作用强度可通过等高线偏心率定量表征——当等高线呈现同心圆分布时(偏心率 $\epsilon \rightarrow 0$),提示变量间交互效应不显著($P > 0.05$);而椭圆等高线簇($\epsilon \geq 0.6$)则表明存在统计学意义的二阶交互作用($P < 0.01$),其长轴方向反映交互效应主导因素。该判读方法经Box-Cox变换验证,符合中心复合设计的效应可视化原理。由图5-9可知,乙醇体积分数和料液比、料液比和时间、温度和时间的交互作用均呈现上凸,各交互项对千里光总黄酮提取率的影响 $AB > BD > CD$ 。通过响应面轮廓图解析,色阶梯度演变及几何形态趋近椭圆状的特征证实,乙醇配比、物料溶剂比及萃取温度参数呈现显著关联性,该结论与ANOVA方差分析显示的显著性水平($P < 0.05$)具有统计学一致性。

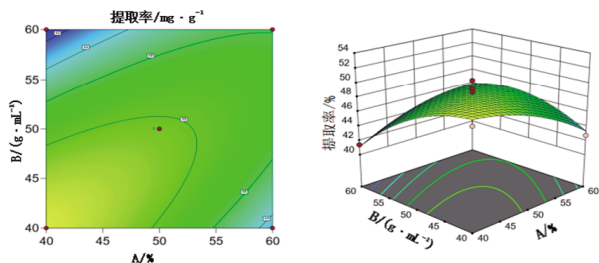


图5 乙醇体积分数和料液比对千里光总黄酮提取率影响的三维响应面和等高线图

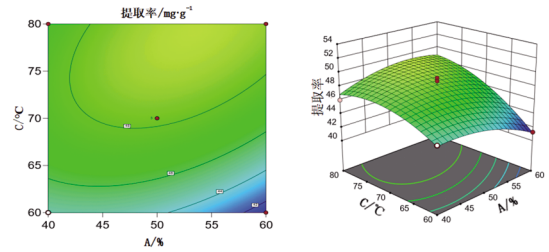


图6 乙醇体积分数和提取温度对千里光总黄酮提取率影响的三维响应面和等高线图

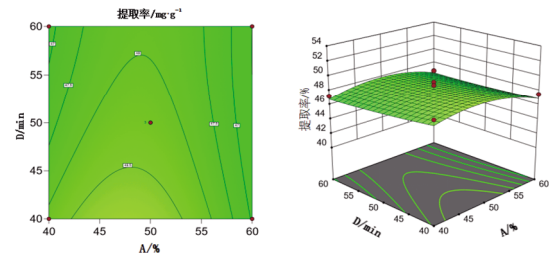


图7 乙醇体积分数和提取时间对千里光总黄酮提取率影响的三维响应面和等高线图

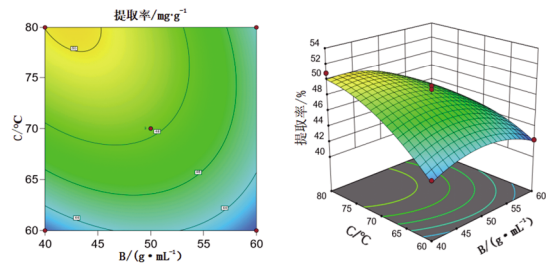


图8 料液比和提取温度对千里光总黄酮提取率影响的三维响应面和等高线图

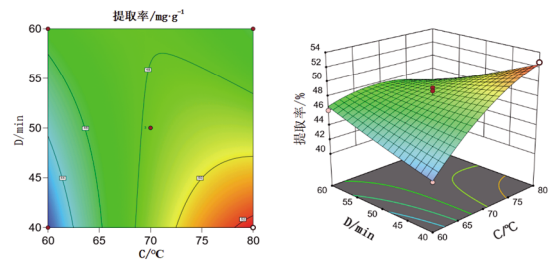


图9 提取温度和提取时间对千里光总黄酮提取率影响的三维响应面和等高线图

3.3.3 最佳提取工艺的验证 经响应面法优化解析,千里光黄酮提取工艺参数优化集为:乙醇体积分数52.08%,料液比1:46.94(g/mL),提取温度79.05℃,提取时长41.37 min。理论预测极值点为53.15 mg/g[95%CI(52.68, 53.62)]。经工程化参数修正后确定可执行工艺参数:乙醇体积分数(52.0±0.5)%,料液比1:(47.0±0.2)(g/mL),提取温度(79.0±0.5)℃,提取时间(41.0±0.5)min(参数调整偏差均<1.5%)。验证性实验数据显示($n=3$),实际得率为(53.27±0.45)mg/g(RSD 值为0.85%),与理论值相对误差仅0.23%,经配对 t 检验显示,差异无统计学意义($t=0.98, P=0.12$),证明该响应面模型具有优良的预测精度(绝对偏差值<1.5%)及工艺稳健性。

3.4 千里光总黄酮抗氧化活性结果分析

3.4.1 DPPH自由基清除能力 实验结果如表4、图10所示,结果表明:千里光总黄酮对DPPH的清除率在0.2~1.0 mg/mL的范围内呈一定的量效关系,DPPH的清除率随着千里光总黄酮的浓度增大而升高,即呈现为正相关。利用Graphpad Prism软件可计算出千里光总黄酮对DPPH自由基的半数抑制质量浓度(IC₅₀)为0.40 mg/mL,而VC作为阳性对照品,在0.2~1.0 mg/mL的浓度范围内,一直呈现接近100%的清除率,说明在这个浓度范围,VC能够完全抑制DPPH自由基的氧化。

表4 DPPH自由基清除能力

质量浓度/(mg/mL)	总黄酮吸光度平均值			VC吸光度平均值			DPPH自由基清除率/%	
	样品组	空白组	对照组	样品组	空白组	对照组	总黄酮	VC
0.2	0.448	0.809	0.112	0.109	0.684	0.045	58.368	90.546
0.4	0.309	0.809	0.135	0.078	0.684	0.070	78.483	98.733
0.6	0.282	0.809	0.167	0.075	0.684	0.085	85.738	101.462
0.8	0.251	0.809	0.179	0.066	0.684	0.089	91.096	103.314
1.0	0.218	0.809	0.152	0.079	0.684	0.107	91.880	104.142

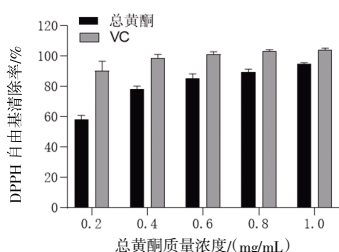


图10 千里光总黄酮对DPPH自由基清除率

3.4.2 ABTS自由基清除能力 实验结果如表5、图11所示,结果表明:千里光总黄酮对ABTS的清除率在0.2~1.0 mg/mL的范围内呈一定的量效关系,ABTS的清除率随着千里光总黄酮的浓度增大而升高,即呈现为正相关。利用Graphpad Prism软件可计算出千里光总黄酮对ABTS自由基的IC₅₀为3.76 mg/mL,而VC作为阳性对照品,在0.2~1.0 mg/mL的浓度范围内,一直呈现接近100%的清除率,说明在这个浓度范围,VC能够完全抑制ABTS自由基的氧化。

表5 ABTS自由基清除能力

质量浓度/(mg/mL)	总黄酮吸光度平均值			VC吸光度平均值			ABTS自由基清除率/%	
	样品组	空白组	对照组	样品组	空白组	对照组	总黄酮	VC
0.2	0.986	1.146	0.104	0.085	0.596	0.078	23.030	98.881
0.4	0.804	1.146	0.099	0.084	0.596	0.081	38.470	99.608
0.6	0.698	1.146	0.137	0.078	0.596	0.097	51.090	103.190
0.8	0.642	1.146	0.124	0.095	0.596	0.102	54.842	101.119
1.0	0.452	1.146	0.116	0.091	0.596	0.099	70.660	101.343

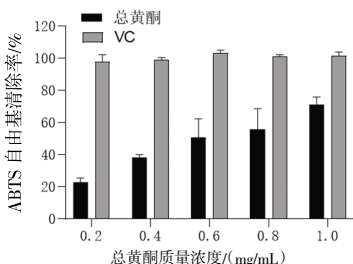


图11 千里光总黄酮对ABTS自由基清除率

4 讨 论

4.1 标准品的选择 千里光含有丰富的黄酮类化合物,该类化合物具有色原酮和C6-C3-C6的基本骨架结构,能够发生

显色反应,在NaNO₃-Al(NO₃)₃溶液体系中,黄酮类化合物可与金属离子络合,生成黄色或红棕色络合物,并在紫外下有特征吸收,因此该体系被广泛应用于黄酮类化合物的定性与定量分析。芦丁作为千里光中一种重要黄酮类成分,其结构包含2-苯基色原酮母核,在碱性条件下可与Al³⁺等金属离子形成稳定络合物,并在波长510 nm有最大吸收^[21],本实验所获芦丁标准曲线方程为 $Y=1.2454X+0.0018$ ($r=0.9996$),线性关系良好,表明芦丁适用于代表总黄酮进行定量分析,因此,本研究选用芦丁作为标准品。

4.2 响应面结果分析 响应面分析法通过考察多个影响因素及其交互作用进行研究,相对于传统的正交设计试验^[22],该方法不仅能够借助响应面图直观展示乙醇体积分析、料液比、提取时间和提取温度对千里光中总黄酮提取率的影响,还可准确反映各因素在提取过程中的交互影响^[23]。本次实验结果表明乙醇体积浓度和料液比交互作用最为显著,料液比和提取时间次之,而提取温度和提取时间最弱。这表明在相同的提取温度和时间条件下,乙醇体积浓度和料液比对千里光总黄酮的提取率的影响占主导地位。乙醇体积分数通过调节溶剂极性影响黄酮游离苷元及其苷类化合物的溶解效率,料液比则直接决定固液接触面积和溶出传质速率,二者共同显著调控提取效率。

4.3 抗氧化机制 黄酮与其抗氧化活性的构效关系可能与C环中的C2-C3双键和4-羰基、羟基、O-甲基化和/或糖基化有关^[24]。其抗氧化机制主要包括:提供氢原子给予自由基,自身转化为稳定的半醌式自由基;通过螯合金属离子减少氧化反应启动;直接清除链引发阶段的活性自由基;捕获链传递过程中产生的过氧自由基。从而延缓脂质自动氧化链反应的传递速率,阻断链反应,抑制脂质的进一步氧化^[25]。在实验测定中,DPPH自由基可溶于乙醇溶液,并在517 nm波长处有特征吸收,当向DPPH-乙醇溶液加入如黄酮类化合物时,其酚羟基上H原子可与DPPH自由基的未成对电子配对,导致DPPH自由基生成量减少。同理,ABTS在氧化剂(如过硫酸钾、过硫酸钠等)作用下可被氧化生成ABTS自由基,其在734 nm处有强吸收,加入抗氧化剂后,ABTS自由基的生成也会受到抑制^[26]。本研究中,千里光总黄酮对DPPH和ABTS自由基的IC₅₀分别为0.40、3.76 mg/mL,表现出较强的抗氧化能力,表明千里光具备作为天然抗氧化剂的开发潜力。

4.4 对比

4.4.1 提取方法的选择 温度升高有助于促进溶质的扩散,从而提高千里光中总黄酮的提取效率;但温度过高可能会导致部分黄酮类物质的分解,因此提取温度被视为影响总黄酮提取率的关键因素之一^[20]。本研究在李筱玲、薄彧坤等^[14,27]的研究基础上,进一步探讨回流提取应用于千里光总黄酮的可行性,采用梯度热回流技术,系统考察提取温度、时间及料液比等因素的影响;响应面法优化结果表明,最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数52.08%,料液比1:46.94(g/mL),提取温度79.05℃,提取时长41.37 min,总黄酮得率为53.27 mg/g,其中料液比、提取温度均为极显著因素;对比相关文献^[14]中的提取时长为51.24 min,乙醇体积分数61.51%,本研究在较短提取时间和较低乙醇体积分数条件下实现了总黄酮的有效提取,但得率略低。千里光的化学成分可能存在产地依赖性,例如

千里光根、茎、叶和全草中的总黄酮含量有明显差异,可能导致不同产地、不同批次的千里光含量测定结果有明显差异^[13]。后续研究可借助高效液相色谱(HPLC)或液相色谱-质谱联用(LC-MS)等技术,系统比较不同产地千里光提取物中总黄酮的含量,深入探讨得率差异的原因,为千里光的质量控制提供科学依据。

4.4.2 应用价值 千里光在抗氧化活性方面与金银花、黄芩这两种主流药物相比较差^[28-29],但其得率比金银花和黄芩高,能在提取产量、生产成本、工艺可操作性这三个方面找到一个很好的平衡点。这种“综合性价比高”的优势,使它在需要大量、低价使用天然抗氧化剂的领域,成了一个很有吸引力和竞争力的新选择。

5 结 论

本研究以千里光总黄酮得率为评价指标,采用乙醇作为提取溶剂,通过单因素实验结合响应面法进行协同优化。利用Design Expert 13软件进行实验设计及多元回归分析,确定最优提取参数为:乙醇体积分数52%、料液比1:47(g/mL)、提取温度79℃、提取时间41 min。体外抗氧化实验结果表明,千里光总黄酮对DPPH和ABTS自由基的IC50分别为0.40、3.76 mg/mL,显示其具有良好的抗氧化活性,且在一定浓度范围内抗氧化能力随浓度增加而增强。本研究为千里光总黄酮作为新型药物资源及相关产品开发提供了理论依据。目前研究工作仅涉及体外抗氧化实验,结果表明千里光能有效清除自由基,具有显著的体外抗氧化能力。后续将计划进一步采用菌株、细胞或动物模型,评价不同质量浓度千里光的抗氧化作用,以拓展其在质量控制和临床应用方面的科学研究基础。

参考文献

[1] 林余霖,李葆莉.新编中草药全图鉴[M].福州:福建科学技术出版社,2020:56.
 [2] 陈泽远,关祥祖.畲族医药学[M].昆明:云南民族出版社,1996:137.
 [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医学科技出版社,2020:35
 [4] 李燕,赵鸿宾,蒙慧彤.中药千里光化学成分及药理作用的研究进展[J].广东化工,2020,47(10):75-76,104.
 [5] 陈静,王值元,王江,等.黔东南苗族民间文化故事及民间验方撷菁[J].光明中医,2023,38(11):2169-2173.
 [6] 樊丰夷,蓝天座,于黔,等.苗药痛风汤方剂对痛风性关节炎大鼠炎症反应及NALP3炎性体信号的影响[J].西部医学,2022,34(3):375-380,385.
 [7] 王岩,于璐,高建伟,等.大叶千斤拔黄酮类成分提取及抗氧化活性研究[J].食品与机械,2021,37(6):179-183,190.
 [8] XIE C, KOKUBUN T, HOUGHTON P J, et al. Antibacterial activity of the Chinese traditional medicine, Zi Hua Di Ding[J]. Phytother Res,2004,18(6):497-500.
 [9] 王雪,史玉柱,司丽君,等.天山堇菜总黄酮抗菌、抗炎、解热、镇咳作用研究[J].中国医药导报,2019,16(29):21-24.
 [10] 张春瑞,卞艳丽,张体鹏,等.千里光总黄酮上调miR-520e对肝癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响[J].中国老年学杂志,2022,42(18):4564-4569.

[11] YANG X, GAO W Q, LIU H, et al. microRNA transcriptome analysis in chicken kidneys in response to differing virulent infectious bronchitis virus infections[J]. Arch Virol,2017,162(11):3397-3405.
 [12] 梅莹,黄帅,陈才,等.双花千里光中黄酮类成分的研究[J].华西药理学杂志,2012,27(5):496-498.
 [13] 李燕,韩忠耀,魏学军.不同采收期和部位黔产千里光中总黄酮、绿原酸和金丝桃苷含量动态比较[J].天津中医药大学学报,2018,37(2):155-160.
 [14] 李筱玲,马翠翠,邓寒霜.响应面法优化千里光总黄酮提取工艺研究[J].陕西农业科学,2018,64(7):61-65,95.
 [15] 陆艳丽,管毓相,方玉梅,等.千里光黄酮类化合物清除DPPH自由基的作用[J].食品科技,2010,35(3):197-199.
 [16] 武英茹,李媛媛,李宁,等.基于主要活性成分的白子菜叶干燥方式及采收时间研究[J].中国药房,2022,33(12):1442-1447.
 [17] 李东香,关荣发,黄海智,等.3种新疆沙棘黄酮的提取优化及抗氧化活性对比[J].中国食品学报,2023,23(4):157-167.
 [18] 王立抗,陈鸿庚,黄智霖,等.牛大力不同部位总黄酮、多酚含量及其抗氧化活性研究[J].中华中医药学刊,2022,40(3):139-142.
 [19] 宗春燕,苏学军,梁雅娟.超声浸渍法提取木蝴蝶中总黄酮的工艺研究[J].化学工程师,2019,33(2):18-20.
 [20] 侯笑林,于瑁妃.石榴叶总黄酮的提取及体外抗氧化性研究[J].现代食品,2021,29(21):187-190,198.
 [21] 王本富,王华洋,耿东升.以芦丁为对照品对莲威阿那奇处方醇提工艺研究[J].时珍国医国药,2012,23(10):2511-2512.
 [22] 景年水.正交设计法优化千里光总黄酮的提取工艺[J].中医药导报,2015,21(16):46-47.
 [23] 高翔,韦宝含.响应面分析法对广金钱草乙醇提取物的工艺优化[J].食品工业,2025,46(8):60-64.
 [24] OKODUWA S I R, ABDULWALIYU I, IGIRI B E, et al. Multi-therapeutic potential of flavonoids as an essential component in nutraceuticals for the treatment and management of human diseases[J]. Phytomed Plus,2024,4(2):100558.
 [25] 杨永涛.罗布麻总黄酮的提取、分离纯化及其抗氧化性能研究[D].广州:华南理工大学,2018.
 [26] 库咏峰.肉桂总黄酮提取分离分析及抗氧化活性研究[D].南宁:广西大学,2012.
 [27] 薄彧坤,周燕,王玉华.紫外可见分光光度法测定羽叶千里光中总黄酮的含量[J].内蒙古医学院学报,2007,29(5):356-359.
 [28] 石艳宾.金银花、银杏叶总黄酮协同清除DPPH自由基作用研究[J].食品研究与开发,2017,38(5):43-46.
 [29] 姚新成,王皎,骆瑞玲,等.滇黄芩叶总黄酮的自由基清除及抑酶活性[J].武汉大学学报(理学版),2024,70(2):195-200.

(收稿日期:2025-04-21 编辑:刘国华)