

二色补血草生物活性成分提取及抗氧化功能研究

王君*, 陈新, 张兆英, 郑祥泽

沧州师范学院生命科学学院, 河北沧州061001

摘要: 以沧州海兴湿地二色补血草(*Limonium bicolor*)为试验材料, 进行单因素和正交试验, 优化总黄酮、多糖和多酚的提取工艺参数。通过测定羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子(O_2^-)的清除率, 确定二色补血草中黄酮等生物活性成分的抗氧化功能。结果表明: 乙醇浓度60%、提取温度60°C、料液比1:30、提取时间150 min为总黄酮的最佳提取工艺参数, 在此条件下提取率达31.08%; 乙醇浓度80%、提取温度70°C、料液比1:30、提取时间4 h为多糖的最佳提取工艺参数, 在此条件下提取率为8.01%; 乙醇浓度70%、料液比1:20、提取温度55°C、提取时间150 min为多酚的最佳提取工艺参数, 在此条件下提取率达10.03%。二色补血草中总黄酮、多糖和多酚对 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 有明显的清除作用, 可以作为天然的抗氧化剂进行综合开发利用。

关键词: 二色补血草; 生物活性成分; 抗氧化活性

二色补血草(*Limonium bicolor*), 别名匙叶草, 为白花丹科(Plumbaginaceae)补血草属(*Limonium*)植物中常见的一种, 为多年生草本植物, 主要分布于我国北方沿海湿地。二色补血草含有多种生物活性成分, 包括黄酮、多糖、多酚、维生素、有机酸和氨基酸等, 具有一定药效价值和保健作用, 主要功能有益脾健胃、止血补血, 对肿瘤细胞具有抑制作用, 全草均可入药。可见, 二色补血草是一种具有较大药用价值的野生植物资源。

目前, 有关补血草资源的开发利用研究已引起科研工作者的重视。二色补血草开花前是重要的牧草资源, 开花时是重要的干鲜切花材料, 具有很高的观赏价值及生态价值。马婷等(2016)研究发现盐胁迫下黄花补血草幼苗中抗氧化酶和多胺代谢酶活性增强, 表现出较强的耐盐性; Lin和Fan(2013)试验发现低浓度NaCl能保持二色补血草较高的根系活力, 这均表明二色补血草植物的耐盐能力。赵芊等(2014)通过原子吸收法测定二色补血草中含有8种金属元素(K、Na、Mg、Ca、Fe、Zn、Cu、Mn), 且在根中含量最多。李琳等(2012)研究发现二色补血草中LPC多糖铁配合物可作为一种新型补铁剂, 但有关二色补血草资源的开发利用少有报道。沧州沿海湿地大部分野生二色补血草往往被当作杂草丢弃, 造成资源浪费, 若能从二色补血草中提取天然活性成分, 加以开发利用, 将对发挥其经济价值具有一定的推动作用。

黄酮、多糖、多酚类化合物是广泛存在于植

物中的几大类天然活性物质, 具有较强的抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节免疫、抗病毒、降低血糖等多种药理作用(范菁华等2010)。黄酮普遍存在于蔬菜、水果中, 对人体的健康有重要作用。研究表明二色补血草总黄酮对大鼠功能性子宫出血具有较好的止血效果(欧莉等2019)。罗磊等(2017)研究发现银花叶黄酮能有效提高衰老小鼠的抗氧化能力。左丽丽等(2016)采用乙醇辅助超声波法对西兰花总黄酮的提取进行正交试验优化, 总黄酮的提取率为0.256%。多糖是所有生命有机体的重要成分, 黄花补血草多糖对小鼠肝癌H22的生长有一定的抑制作用(龙玲等2012)。任薇等(2019)研究发现沙棘多糖对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、羟基自由基(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基(superoxide anion, O_2^-)均有一定的清除能力, 具有较强的抗氧化活性及抗脂质过氧化作用。多酚以其独特的分子结构和较强的抗氧化性广泛应用于食品、医药等领域(Rjeibi等2019; Esther等2019)。赵玉红等(2013)采用甲醇溶剂浸提法提取樟子松(*Pinus sylvestris*)中的松多酚, 确定了松多酚的最佳提取参数。王泽永(2018)从祁山药(*Dioscorea oppositifolia*)中提取多酚类物质, 确定了最佳提取工艺, 多

收稿 2019-09-22 修定 2019-11-12

资助 沧州市科学技术研究与发展重点研发计划资助项目(172204003)。

* 通讯作者(771478519@qq.com)。

酚含量为5.789 mg·L⁻¹。吴雅露等(2019)通过测定红巨苋(*Amaranthus tricolor*)叶片中的多酚类物质的抗氧化活性,发现其对DPPH和·OH的清除率较高,具有明显的抗氧化作用。因此,寻找可利用的原材料,是开发利用黄酮、多糖和多酚类化合物的关键所在。

目前关于补血草属植物的研究主要集中在栽培、形态特征及耐盐机理方面(王瑞兵等2017)。对二色补血草中生物活性成分提取工艺,尤其是多酚的提取及抗氧化性的研究鲜有报道。试验以沧州海兴湿地二色补血草为试材,以提取率为评价指标,采用提取效率高、工艺简单、成本低廉的有机溶剂浸提法,通过单因素和正交试验法对总黄酮、多糖和多酚的提取工艺参数进行优化,并探讨对·OH和O₂⁻的清除率来评价其抗氧化性,旨在为综合开发利用二色补血草药用植物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料于2018年9月采自沧州海兴湿地自然保护区,选取新鲜、完整、无蛀虫、长势好的二色补血草[*Limonium bicolor* (Bag.) Kuntze]植株。将材料置于低温箱内运回实验室,洗净、晒干、粉碎过60目筛,得干粉备用。

1.2 试验设计

1.2.1 总黄酮提取单因素试验

试验设置与提取二色补血草总黄酮直接相关的4个因素:乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度,各因素分别设置5个水平,进行单因素试验(表1)。

1.2.2 正交试验优化总黄酮提取工艺参数

在单因素试验的基础上,选择乙醇浓度、提

表1 总黄酮提取单因素试验表

Table 1 Single-factor experiment of flavonoid extraction			
乙醇浓度/%	料液比/g·mL ⁻¹	提取时间/min	提取温度/°C
40	1:10	90	40
50	1:20	120	50
60	1:30	150	60
70	1:40	180	70
80	1:50	210	80

取温度、料液比和提取时间为主要影响因素,以二色补血草总黄酮提取率作为评价指标,进行4因素3水平的正交试验L₉(3⁴),所选定的水平及影响因素见表2。

1.2.3 多糖提取单因素试验

试验设置与提取二色补血草多糖直接相关的4个因素:乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度,各因素分别设置5个水平,进行单因素试验(表3)。

1.2.4 正交实验优化多糖提取工艺参数

在单因素试验的基础上,设置乙醇浓度、提取温度、料液比和提取时间4个影响因素,以二色补血草多糖提取率作为评价指标,进行L₉(3⁴)正交试验,所选定的水平及影响因素见表4。

1.2.5 多酚提取单因素试验

试验设置与提取二色补血草多酚直接相关的4个因素:乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度,各因素分别设置5个水平,进行单因素试验(表5)。

1.2.6 正交实验优化多酚提取工艺参数

在单因素试验的基础上,设置乙醇浓度、提取温度、料液比和提取时间4个影响因素,以二色补血草多酚提取率作为评价指标,进行L₉(3⁴)正交试验,所选定的水平及影响因素见表6。

1.3 提取液的提取方法

称取二色补血草粉末1 g,置于锥形瓶中,加入

表2 总黄酮有机溶剂浸提法的因素水平表

Table 2 Factors and levels of organic solvent extraction of flavonoid

水平	因素			
	乙醇浓度(A)/%	提取温度(B)/°C	料液比(C)/g·mL ⁻¹	提取时间(D)/min
1	60	40	1:10	90
2	70	50	1:20	120
3	80	60	1:30	150

表3 多糖提取单因素试验表

Table 3 Single-factor experiment of polysaccharide extraction

乙醇浓度/%	料液比/g·mL ⁻¹	提取时间/h	提取温度/°C
50	1:10	1	50
60	1:20	2	60
70	1:30	3	70
80	1:40	4	80
90	1:50	5	90

70%乙醇溶液30 mL, 采用有机溶剂浸提法, 置于60℃的水浴锅中进行提取90 min。将浸提液取出、冷却, 1 790×g离心10 min, 用70%乙醇溶液定容至50 mL, 得到二色补血草的样品提取液。

1.4 项目测定

1.4.1 芦丁标准曲线的绘制及总黄酮含量测定

参照安淼(2017)的方法, 配制芦丁对照品溶液, 得回归方程 $y=9.0086x-0.001$, $R^2=0.9991$ 。采用 $Al(NO_3)_3$ - $NaNO_2$ 比色法测定总黄酮含量, 计算总黄酮提取率。

样品中总黄酮含量($mg \cdot g^{-1}$)= XV_1/mV_2 ;
式中 X : 回归方程中求得的芦丁量(mg);
 V_1 : 样品溶液总体积(mL);
 V_2 : 取样时的体积(mL);
 m : 称取的样品质量(g);

总黄酮提取率(%)=样品中总黄酮含量($mg \cdot g^{-1}$)/二色补血草干粉质量(g)×100。

1.4.2 葡萄糖标准曲线的绘制及多糖含量测定

参照马建丽等(2018)的方法, 以葡萄糖为对照品, 得回归方程 $y=26.065x+0.0171$, $R^2=0.9993$, 采用苯酚-硫酸法, 测定样品中多糖含量, 计算多糖提取率。

样品中多糖含量: $m=(A-0.0171)/26.065$;
式中 m : 二色补血草多糖含量($mg \cdot mL^{-1}$);
 A : OD值;

多糖提取率: $W(%)=CV/m \times 100$;
式中 C : 提取液中多糖的含量($mg \cdot mL^{-1}$);
 V : 提取液体积(mL);
 m : 称取的样品质量(g)。

1.4.3 没食子酸标准曲线的绘制及多酚含量测定

参照沈慧等(2016)的方法, 以没食子酸为对照品, 得回归方程 $y=14.886x+0.0104$, $R^2=0.9992$, 采用Folin酚比色法测定多酚含量, 计算多酚提取率。

样品中多酚含量: $m=(A-0.0104)/14.886$;
式中 m : 多酚的含量($mg \cdot mL^{-1}$);
 A : OD值;
多酚提取率: $W=CV/m \times 100\%$;
式中 C : 提取液中多酚的含量($mg \cdot mL^{-1}$);
 V : 提取液体积(mL);
 M : 称取的样品质量(g)。

1.4.4 生物活性成分对·OH的清除作用

试验采用水杨酸法测定二色补血草总黄酮、多糖和多酚对·OH的清除能力, 参照杨申明等(2016)的方法并加以改良。移取2 mL 6 mmol·L⁻¹的 $FeSO_4$ 溶液于7支试管中, 编号0~6, 接着在1~6号管中分别滴加2 mL不同浓度的总黄酮、多糖和多酚提取液, 摇匀。再分别加入2 mL 6 mmol·L⁻¹的 H_2O_2 溶液, 充分振荡。反应10 min, 最后分别加入2 mL 6 mmol·L⁻¹的水杨酸-乙醇溶液。反应30 min, 于510 nm处测OD值(A_0)。0号试管中以蒸馏水代替 H_2O_2 作为对照, 测其OD值(A_x)。·OH的清除率(%)= $(1-A_0/A_x) \times 100$ 。

1.4.5 生物活性成分对O₂⁻的清除作用

试验采用邻苯三酚法测定二色补血草总黄酮、多糖和多酚对O₂⁻的清除能力, 移取5.7 mL pH8.2的50 mmol·L⁻¹的Tris-HCL缓冲溶液于7支试管中, 编号0~6。向试管中分别移取0.6 mL不同浓

表4 多糖有机溶剂浸提法的因素水平表

Table 4 Factors and levels of organic solvent extraction of polysaccharide

水平	因素			
	乙醇浓度(A)/%	提取温度(B)/°C	料液比(C)/g·mL ⁻¹	提取时间(D)/h
1	70	70	1:20	2
2	80	80	1:30	3
3	90	90	1:40	4

表5 多酚提取单因素试验表

Table 5 Single-factor experiment of polyphenol extraction			
乙醇浓度/%	料液比/g·mL ⁻¹	提取时间/min	提取温度/°C
55	1:10	60	35
60	1:15	90	45
65	1:20	120	55
70	1:25	150	65
75	1:30	180	75

度的总黄酮、多糖和多酚提取液, 在25℃的环境下保温。向7支试管中分别滴加6 mmol·L⁻¹的邻苯三酚溶液(已预热10 min) 0.7 mL并快速摇动。在波长为320 nm下测定反应1 min时溶液的OD值记为A_s。对照组是相应浓度提取液, Tris-HCl缓冲溶液为对照, 测OD值记为A₀。

$$O_2^- \text{ 的清除率}(\%) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

1.5 数据分析

所有试验均重复测定3次, 取其平均值, 采用Excel 2010软件进行试验数据统计和极差分析处理。

2 实验结果

2.1 总黄酮提取单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对二色补血草总黄酮提取率的影响

在料液比1:30、提取温度60℃、提取时间150 min的条件下, 考察乙醇浓度对二色补血草总黄酮提取率的影响。图1表明, 二色补血草中的总黄酮提取率随乙醇浓度的升高而呈上升趋势, 当乙醇浓度达60%时, 总黄酮提取率达到最大值(25.47%), 之后提取率开始降低。因此在二色补血草中提取总黄酮时, 最佳乙醇的浓度为60%。

2.1.2 料液比对二色补血草总黄酮提取率的影响

在乙醇浓度60%、提取温度60℃、提取时间150 min条件下, 考察料液比对二色补血草中总黄

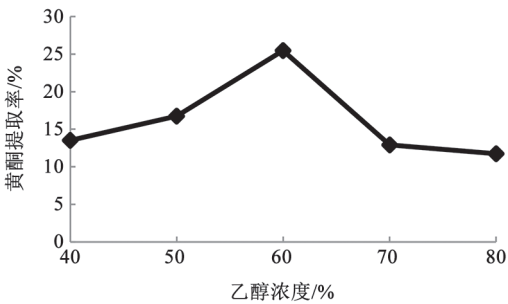


图1 乙醇浓度对二色补血草总黄酮提取率的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on flavonoid extracting ratio of *Limonium bicolor*

酮提取率的影响。图2表明, 二色补血草中总黄酮提取率随料液比增大而呈上升趋势, 当料液比为1:30时, 总黄酮提取率达最大值(12.5%), 之后开始下降。因此在二色补血草中提取总黄酮时, 最佳料液比为1:30。

2.1.3 提取时间对二色补血草总黄酮提取率的影响

在料液比1:30、提取温度60℃、乙醇浓度60%的条件下, 考察提取时间对二色补血草总黄酮提取率的影响。图3表明, 二色补血草中总黄酮提取率随时间的增加而呈上升趋势, 当提取时间达到150 min时, 总黄酮提取率达到最大值(12.4%), 之后逐渐下降。因此提取二色补血草中总黄酮时, 最佳提取时间是150 min。

2.1.4 提取温度对二色补血草总黄酮提取率的影响

在料液比1:30、乙醇浓度60%、提取时间150 min的条件下, 考察提取温度对二色补血草总黄酮提取率的影响。图4表明, 二色补血草中总黄酮提取率随提取温度的升高而呈上升趋势, 当提取温度为60℃时, 总黄酮提取率达最大值(22.4%), 之后逐渐降低。因此在二色补血草中提取总黄酮时, 最佳提取温度为60℃。

表6 多酚有机溶剂浸提法的因素水平表

Table 6 Factors and levels of organic solvent extraction of polyphenol

水平	因素			
	乙醇浓度(A)/%	提取温度(B)/°C	料液比(C)/g·mL ⁻¹	提取时间(D)/min
1	60	55	1:15	90
2	65	65	1:20	120
3	70	75	1:25	150

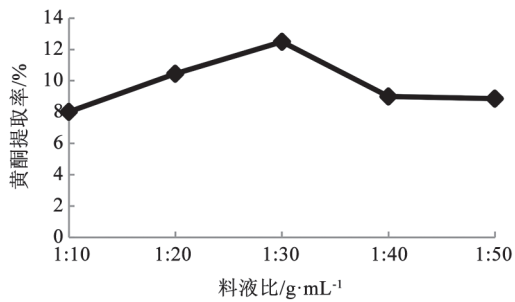


图2 料液比对二色补血草总黄酮得率的影响
Fig.2 Effects of solid-liquid ratio on flavonoid extracting ratio of *Limonium bicolor*

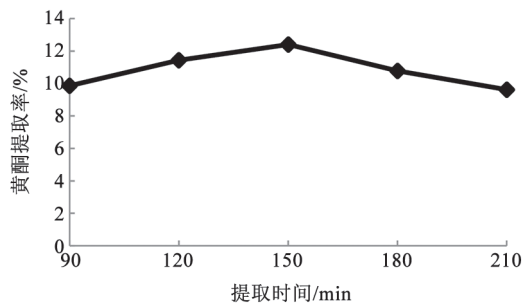


图3 提取时间对二色补血草总黄酮提取率的影响
Fig.3 Effects of extraction time on flavonoid extracting ratio of *Limonium bicolor*

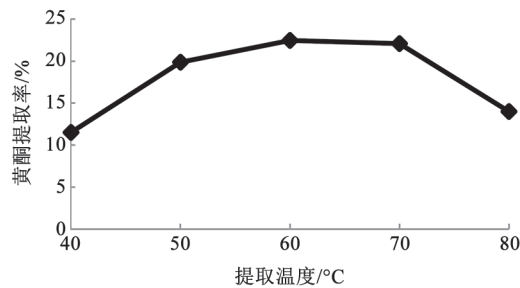


图4 提取温度对二色补血草总黄酮提取率的影响
Fig.4 Effects of extraction temperature on flavonoid extracting ratio of *Limonium bicolor*

2.2 正交试验及二色补血草总黄酮最佳提取工艺参数优化

在单因素试验的基础上,对二色补血草总黄酮提取条件进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,旨在优化总黄酮提取工艺参数。根据极差分析结果,得到总黄酮提取最优组合,并确定最优提取工艺。由表7中极

差R值表明,在选定的四个影响二色补血草总黄酮提取率的因素中,按照影响大小主次顺序为 $A > C > B > D$,即乙醇浓度>料液比>提取温度>提取时间。由K值确定二色补血草总黄酮提取的最优组合为 $A_1B_3C_3D_3$,即乙醇浓度60%,料液比1:30,提取时间150 min,提取温度60°C,最佳工艺参数下总黄酮的提取率为31.08%。根据正交试验优化后的最佳提取工艺参数进行3次总黄酮提取,来验证总黄酮最佳提取条件的可靠性,得到总黄酮的平均提取率为32.25%,因此,正交试验所选定的因素和设定的水平是合理的,可以在二色补血草总黄酮提取的生产实践中广泛应用。

2.3 多糖提取单因素试验结果

2.3.1 乙醇浓度对二色补血草多糖提取率的影响

在料液比1:30、提取温度70°C、提取时间4 h的条件下,考察乙醇浓度对二色补血草中多糖提取率的影响。图5表明,二色补血草中多糖提取率随乙醇浓度升高而呈上升趋势,当乙醇浓度为80%时,多糖提取率达最大值(8.81%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多糖时,最佳乙醇的浓度为80%。

2.3.2 料液比对二色补血草多糖提取率的影响

在乙醇浓度80%、提取温度70°C、提取时间4 h的条件下,考察料液比对二色补血草中多糖提取率的影响。图6表明,二色补血草中多糖提取率随料液比的升高呈上升趋势,当料液比达1:30时,多糖提取率达到最大值(8.17%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多糖时,最佳料液比为1:30。

2.3.3 提取时间对二色补血草多糖提取率的影响

在料液比1:30、提取温度70°C、乙醇浓度80%的条件下,考察提取时间对二色补血草中多糖提取率的影响。图7表明,二色补血草中多糖提取率随提取时间的升高呈上升趋势,当提取时间达到4 h时,多糖提取率达到最大值(6.92%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多糖时,最佳提取时间为4 h。

2.3.4 提取温度对二色补血草多糖提取率的影响

在料液比1:30、乙醇浓度80%、提取时间4 h的条件下,考察提取温度对二色补血草中多糖提取率的影响。图8表明,二色补血草中多糖提取率随

表7 总黄酮提取正交试验设计及分析结果

Table 7 Orthogonal design and analysis of flavonoid extraction

试管号	因素				吸光值	提取率/%
	A (乙醇浓度/%)	B (提取温度/°C)	C (料液比/g·mL ⁻¹)	D (提取时间/min)		
1	1 (60)	1 (40)	1 (1:10)	1 (90)	0.290	6.41
2	1 (60)	2 (50)	2 (1:20)	2 (120)	0.631	13.91
3	1 (60)	3 (60)	3 (1:30)	3 (150)	1.411	31.08
4	2 (70)	1 (40)	2 (1:20)	3 (150)	0.269	5.95
5	2 (70)	2 (50)	3 (1:30)	1 (90)	0.541	11.93
6	2 (70)	3 (60)	1 (1:10)	2 (120)	0.236	5.21
7	3 (80)	1 (40)	3 (1:30)	2 (120)	0.326	7.20
8	3 (80)	2 (50)	1 (1:10)	3 (150)	0.205	4.54
9	3 (80)	3 (60)	2 (1:20)	1 (90)	0.184	4.06
K ₁	17.130	6.520	5.387	7.467	—	—
K ₂	7.697	10.127	7.973	8.773	—	—
K ₃	5.267	13.450	16.736	13.857	—	—
极差(R)	11.863	6.930	11.350	6.390	—	—
主次因素	A>C>B>D				—	—
优水平	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	—	—
优组合	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃				—	—

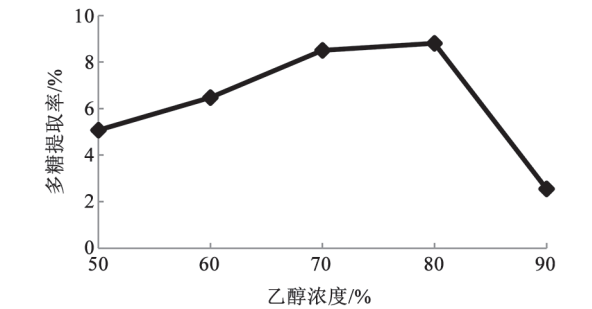


图5 乙醇浓度对二色补血草多糖提取率的影响
Fig.5 Effects of ethanol concentration on the extraction rate of polysaccharide from *Limonium bicolor*

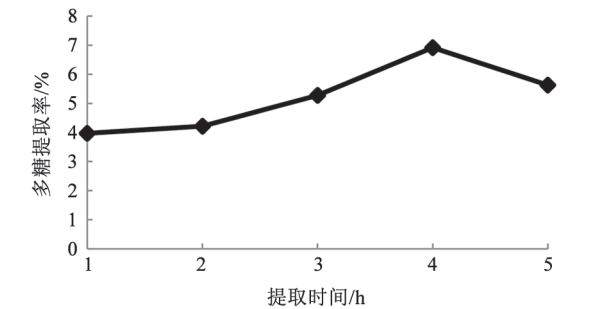


图7 提取时间对二色补血草多糖提取率的影响
Fig.7 Effects of the extraction time on the extraction rate of polysaccharide from *Limonium bicolor*

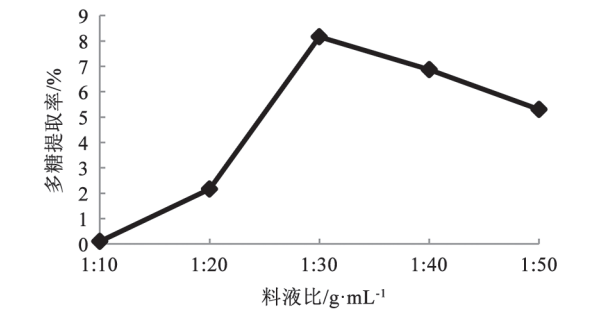


图6 料液比对二色补血草多糖提取率的影响
Fig.6 Effects of the ratio of solid-liquid ratio on the extraction rate of polysaccharide from *Limonium bicolor*

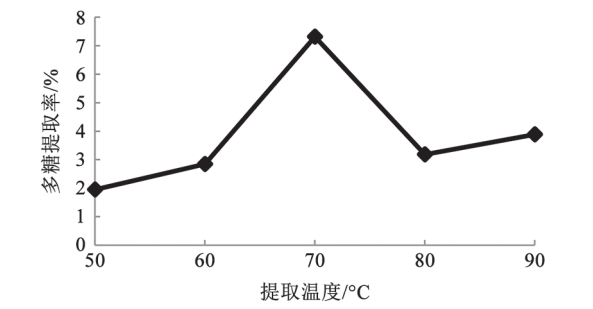


图8 提取温度对二色补血草多糖提取率的影响
Fig.8 Effect of extraction temperature on the extraction rate of polysaccharide from *Limonium bicolor*

着提取温度的升高呈上升趋势,当提取温度在70℃时,多糖提取率达到最大值(7.32%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多糖时,最佳提取温度为70℃。

2.4 正交试验及二色补血草多糖最佳提取工艺参数优化

由表8可知,根据*K*值得出多糖的最佳提取工艺参数为A₂B₂C₃D₁,即在乙醇浓度80%、料液比1:30、提取时间4h、提取温度70℃条件下,二色补血草中多糖的提取率最多,为8.01%。由极差(*R*)值显示,在选定的四个因素中,影响多糖提取的主次因素大小排序为A>B>D>C,即乙醇浓度>料液比>提取温度>提取时间。为验证二色补血草多糖提取最佳工艺参数的可靠性,用最优条件提取多糖3次,多糖提取率平均为7.98%,与正交试验中最佳工艺参数下的提取率相近,说明正交试验所选定的因素和设定的水平是合理的。

2.5 多酚提取单因素试验结果

2.5.1 乙醇浓度对二色补血草多酚提取率的影响

在料液比1:20、提取温度55℃、提取时间150 min的条件下,考察乙醇浓度对二色补血草中多酚提取的影响。图9表明,二色补血草中多酚提取率

随着乙醇浓度的升高呈上升趋势,当乙醇浓度达到70%时,多酚提取率达到最大值(8.50%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多酚时,最佳乙醇的浓度为70%。

2.5.2 料液比对二色补血草多酚提取率的影响

在乙醇浓度70%、提取温度70℃、提取时间4 h的条件下,考察料液比对二色补血草中多酚提取的影响。图10表明,二色补血草中多酚提取率随料液比增大呈上升趋势,当料液比达到1:20时,多酚提取率达到最大值(17.4%),之后开始下降。因此提取二色补血草中多酚时,最佳料液比为1:20。

2.5.3 提取时间对二色补血草多酚提取率的影响

在料液比1:20、提取温度55℃、乙醇浓度70%的条件下,考察提取时间对二色补血草中多酚提取的影响。图11表明,二色补血草中多酚提取率随着提取时间的升高呈上升趋势,当提取时间达到150 min时,多酚提取率达到最大值(10.3%),之后逐渐降低。因此在二色补血草中提取多酚时,最佳提取时间为150 min。

2.5.4 提取温度对二色补血草多酚提取率的影响

在料液比1:20、乙醇浓度70%、提取时间150 min的条件下,考察提取温度对二色补血草中多酚

表8 多糖提取正交试验设计及分析结果
Table 8 Orthogonal design and analysis of polysaccharide extraction

试管号	因素				吸光值	提取率/%
	A (乙醇浓度/%)	B (料液比/g·mL ⁻¹)	C (提取时间/h)	D (提取温度/℃)		
1	1 (70)	1 (1:20)	1 (2)	1 (70)	1.311	4.97
2	1 (70)	2 (1:30)	2 (3)	2 (80)	1.954	7.43
3	1 (70)	3 (1:40)	3 (4)	3 (90)	1.695	6.44
4	2 (80)	1 (1:20)	2 (3)	3 (90)	1.557	5.91
5	2 (80)	2 (1:30)	3 (4)	1 (70)	2.104	8.01
6	2 (80)	3 (1:40)	1 (2)	2 (80)	1.729	6.57
7	3 (90)	1 (1:20)	3 (4)	2 (80)	2.040	7.75
8	3 (90)	2 (1:30)	1 (2)	3 (90)	1.408	5.33
9	3 (90)	3 (1:40)	2 (3)	1 (70)	1.465	5.55
<i>K</i> ₁	5.816	6.177	6.210	6.280	—	—
<i>K</i> ₂	6.297	7.250	6.223	6.830	—	—
<i>K</i> ₃	7.400	5.897	6.187	6.210	—	—
极差(<i>R</i>)	1.584	1.353	0.036	0.620	—	—
主次因素	A>B>D>C				—	—
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	—	—
优组合	A ₂ B ₂ C ₃ D ₁				—	—

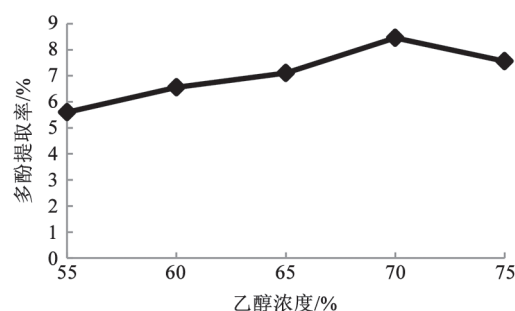


图9 乙醇浓度对二色补血草多酚提取率的影响

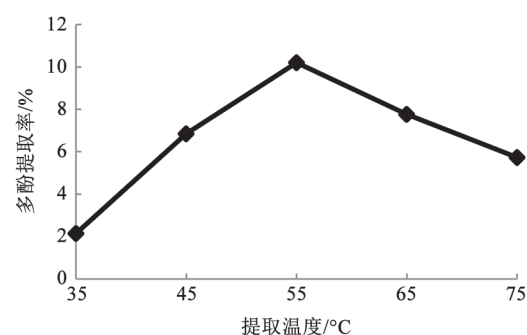
Fig.9 Effects of ethanol concentration on the extraction rate of polyphenols from *Limonium bicolor*

图12 提取温度对二色补血草多酚提取率的影响

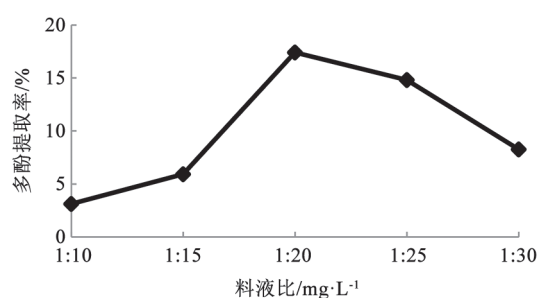
Fig.12 Effects of extraction temperature on the extraction rate of polyphenols from *Limonium bicolor*

图10 料液比对二色补血草多酚提取率的影响

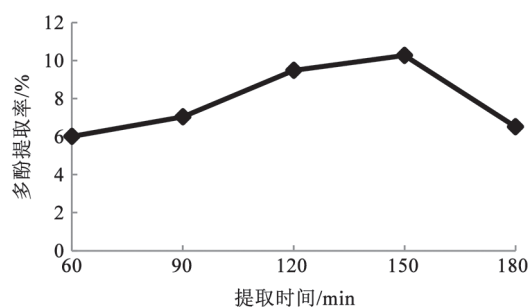
Fig.10 Effects of the ratio of solid liquid on the polyphenol extraction rate of *Limonium bicolor*

图11 提取时间对二色补血草多酚提取率的影响

Fig.11 Effects of extraction time on the extraction rate of polyphenols from *Limonium bicolor*

提取的影响。图12表明,二色补血草中多酚提取率随着提取温度的升高呈上升趋势,但当提取时间达到55°C时,多酚提取率达到最大值(10.2%),之后开始降低。因此在二色补血草中提取多酚时,最佳提取温度为55°C。

2.6 正交试验及二色补血草多酚最佳提取工艺参数优化

由表9可知,由K值确定多酚的最佳提取工艺参数为A₂B₂C₃D₁,即在乙醇浓度70%、料液比1:20、提取时间150min、提取温度55°C条件下,二色补血草中多酚的提取率最多,为10.03%。由极差(R)值显示,在选定的四个因素中,影响多酚提取的主次因素大小排序为B>C>D>A,即在有机溶剂浸提二色补血草多酚时,料液比对多酚提取量影响最大,其次是提取温度、提取时间和乙醇浓度。在正交试验得出的最佳工艺条件下进行3次验证性试验,多酚平均提取率为10.58%,说明优化后的工艺参数具有很好的重现性,可以在生产实践中应用。

2.7 二色补血草中生物活性成分的抗氧化性分析

2.7.1 生物活性成分对·OH的清除作用

由图13可知,二色补血草中不同活性成分对·OH的清除能力随着质量浓度的增加均呈上升趋势。总黄酮、多糖和多酚分别在含量为3~5、4~5、2~3 mg·mL⁻¹时,对·OH的清除率上升幅度较大。当含量较大或较小时,对·OH的清除能力变化较小,但仍呈现上升趋势。总体来说,二色补血草中的生物活性成分均对·OH具有明显的清除作用,清除能力与其浓度表现为剂量-效应关系。二色补血草中不同生物活性成分对·OH的清除能力不同。在试验浓度范围内,达到6 mg·mL⁻¹时,总黄酮、多糖和多酚对·OH的清除率达到最大值,分别为55.09%、35.18%和17.3%,即抗氧化性表现为总

表9 多酚提取正交试验设计及分析结果

Table 9 Orthogonal design and analysis of polyphenol extraction

试管号	因素				吸光值	提取率/%
	A (乙醇浓度/%)	B (料液比/g·mL ⁻¹)	C (提取温度/°C)	D (提取时间/min)		
1	1 (60)	1 (1:15)	1 (55)	1 (90)	0.983	6.53
2	1 (60)	2 (1:20)	2 (65)	2 (120)	1.129	7.51
3	1 (60)	3 (1:25)	3 (75)	3 (150)	0.999	6.64
4	2 (65)	1 (1:15)	2 (65)	3 (150)	1.358	9.06
5	2 (65)	2 (1:20)	3 (75)	1 (90)	1.375	9.16
6	2 (65)	3 (1:25)	1 (55)	2 (120)	1.408	9.39
7	3 (70)	1 (1:15)	3 (75)	2 (120)	1.219	8.12
8	3 (70)	2 (1:20)	1 (55)	3 (150)	1.504	10.03
9	3 (70)	3 (1:25)	2 (65)	1 (90)	1.054	7.01
K ₁	6.894	7.902	8.650	7.567	—	—
K ₂	9.202	8.904	7.860	8.340	—	—
K ₃	8.387	7.680	7.973	8.577	—	—
极差(R)	2.308	1.224	0.790	1.010	—	—
主次因素	B>C>D>A				—	—
优水平	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	—	—
优组合	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃				—	—

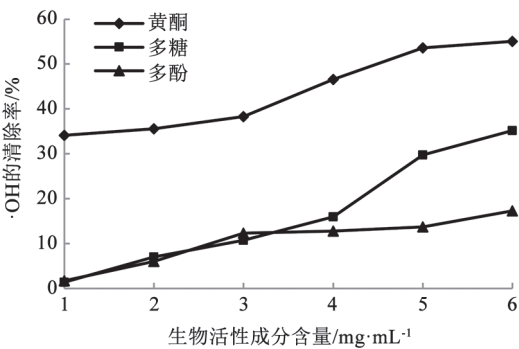


图13 生物活性成分对·OH的清除作用

Fig.13 Scavenging effect of bioactive components on hydroxyl radicals

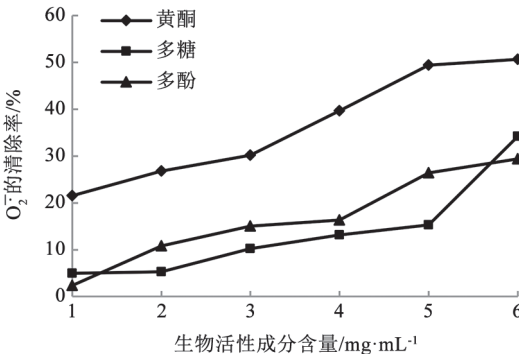


图14 生物活性成分对O₂⁻的清除作用

Fig.14 Scavenging effect of bioactive components on superoxide anion

黄酮>多糖>多酚。因此, 二色补血草中总黄酮、多糖和多酚对·OH的清除能力是评价抗氧化物的 重要指标, 均可以作为良好的抗氧化剂使用。

2.7.2 二色补血草中生物活性成分对O₂⁻的清除作用

由图14可知, 二色补血草中不同活性成分对 O₂⁻的清除作用随着质量浓度的增加而逐渐加强。总黄酮、多糖和多酚的含量分别在3~5、3~5、 4~5 mg·mL⁻¹时, 对O₂⁻的清除率上升幅度较大, 当含 量较大或较小时, 对O₂⁻的清除能力变化较小, 但仍

呈现上升趋势。总体来说, 二色补血草中生物活 性成分均对O₂⁻具有明显的清除作用, 清除能力与 其浓度表现为剂量-效应关系。二色补血草中不同 生物活性成分对O₂⁻的清除能力不同, 当质量浓度 达到6 mg·mL⁻¹时, 总黄酮、多糖和多酚对O₂⁻的 清除率达到最大值, 分别为50.07%、34.20%和 29.39%, 即抗氧化性表现为总黄酮>多糖>多酚, 因 此, 二色补血草中总黄酮、多糖和多酚表现出较 强的清除O₂⁻的能力。

3 讨论

二色补血草不仅是沿海湿地常见的野生植物,也是重要的药用植物(中国科学院中国植物志编辑委员会1987)。相关药理研究认为二色补血草具有的药理作用和体内含有黄酮、多糖类等物质有关(徐燕玉等2019)。因此,优化植物体内生物活性成分提取技术水平,是植物药用成分分析技术领域最为关注的问题之一。该试验采用乙醇溶剂浸提法及 $L_9(3^4)$ 正交试验优化二色补血草总黄酮、多糖和多酚的提取参数并进行重复验证,得出乙醇浓度60%、提取温度60℃、料液比1:30、提取时间150 min为提取总黄酮的最佳工艺参数,提取率达31.08%;乙醇浓度80%、提取温度70℃、料液比1:30、提取时间4 h为提取多糖的最佳工艺参数,提取率为8.01%;乙醇浓度70%、料液比1:20、提取温度55℃、提取时间150 min为提取多酚的最佳工艺参数,提取率达10.03%。因此,探讨的四因素对二色补血草活性成分提取率的影响结果与单因素试验结果基本一致,试验具有可信度,可广泛应用于生产实践。另外,不同因素对总黄酮、多糖和多酚提取率的影响存在很大差异,在二色补血草药用过程中要注意各因素的先后顺序,优先选择最佳的提取条件,可将其药用价值发挥到最大。

$\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 是生物体内重要的氧化性自由基,可参与肌体正常的代谢活动,当体内自由基过剩时会直接导致细胞结构受损,引起肌体的衰老和疾病的发生(Eskander等2013; 王中杭等2018; 邢媛媛等2018)。试验结果表明,二色补血草中总黄酮、多糖和多酚对 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 具有较强的清除能力,且随着活性成分浓度的升高,清除效果增强。从而证实这三种活性成分均具有抗氧化功能,可为二色补血草作为中药材开发利用提供理论参考。另外,相同提取液浓度下,二色补血草中不同活性成分清除 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的能力也存在明显差异,当活性成分浓度达到 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,总黄酮对 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 的清除率最大,分别为55.09%和50.07%,显著高于多糖和多酚。因此,可以选择二色补血草作为优先提取黄酮类化合物的原材料,同时兼顾提取多糖和多酚,从而达到二色补血草植物资源利用的最

大化。这一结果为沧州海兴湿地二色补血草中黄酮等生物活性成分在药用、食品等领域的应用及药用机理以及该植物的开发利用提供了新的想法与思路。

参考文献(References)

- An M, Yu XM, Wang J, et al (2017). The detection of flavonoids from leaves of 17 persimmon cultivars. *Plant Physiol J*, 53 (11): 54–62 (in Chinese with English abstract) [安淼, 余贤美, 王洁等(2017). 17个柿品种叶中黄酮类物质的检测. *植物生理学报*, 53 (11): 54–62]
- CAS Editorial Committee of the Flora of China (1987). *Flora of China*. 60 (1). Beijing: Science Press, 31–32 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1987). *中国植物志*. 60 (1). 北京: 科学出版社, 31–32]
- Eskander JY, Haggag EG (2013). A novel saponin from *Mankara hexandra* seeds and anti-inflammatory activity. *Med Chem Res*, 23 (6): 717–724
- Esther GM, Noelia RC, María EL (2019). Citrus peels waste as a source of value-added compounds: extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chem*, 295 (9): 289–299
- Fan JH, Xu HD, Li YJ, et al (2010). Ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from leaves of *Zanthoxylum Bungeanum* and its antioxidation *in vitro*. *J Chin Inst Food Sci Tech*, 10 (6): 22–27 (in Chinese with English abstract) [范菁华, 徐怀德, 李钰金等(2010). 超声波辅助提取花椒叶总黄酮及其体外抗氧化性研究. *中国食品学报*, 10 (6): 22–27]
- Lin Y, Fan H (2013). Effects of salt stress on root vitality of *Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze. *Agr Basic Sci and Tech*, 14 (6): 832–834, 910
- Li L, Li WH, Luo Y, et al (2012). Synthesis and physicochemical properties of *Limonium bicolor* polysaccharide-Fe (III) complex. *Food Sci*, 33 (16): 54–58 (in Chinese with English abstract) [李琳, 李稳宏, 雒羽等(2012). 二色补血草多糖铁(III)配合物的制备及理化性质研究. *食品科学*, 33 (16): 54–58]
- Long L, Wang JP, Chen SE, et al (2012). Antitumor effects of *Limonium aureum* (Linn.) polysaccharides. *J Northwest A&F Univ*, 40 (11): 19–20 (in Chinese with English abstract) [龙玲, 王军平, 陈世恩等(2012). 黄花补血草多糖的抗肿瘤作用研究. *西北农林科技大学学报*, 40 (11): 19–20]
- Luo L, Zhang BJ, Guan NN, et al (2017). *In vivo* antioxidant activity of honeysuckle leaf flavonoids in aging mice. *Food Sci*, 38 (19): 171–176 (in Chinese with English abstract) [罗磊, 张冰洁, 关宁宁等(2017). 金银花叶黄酮对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用. *食品科学*, 38 (19):

- 171–176]
- Ma JL, Li X, Duan ST, et al (2018). Optimization of extraction process of onion polysaccharide by orthogonal test. *China Pharmaceut*, 27 (22): 5–7 (in Chinese with English abstract) [马建丽, 李翔, 段斯庭等(2018). 正交试验优化洋葱多糖提取工艺研究. *中国药业*, 27 (22): 5–7]
- Ma T, Teng YJ, Li CX, et al (2016). Changes of ROS metabolizing enzyme activities in *Limonium aureum* seedlings under salinity stress. *Plant Physiol J*, 52 (2): 177–186 (in Chinese with English abstract) [马婷, 滕玉瑾, 李翠祥等(2016). 盐胁迫下黄花补血草幼苗ROS代谢酶活性的变化. *植物生理学报*, 52 (2): 177–186]
- Ou L, Miao YX, Gao F, et al (2019). Study on the hemostatic effect and mechanism of total flavonoids of *Limonium Bicolor* in the treatment of anovulatory dysfunctional uterine bleeding. *Jilin J Chin Med*, 39 (5): 638–641 (in Chinese with English abstract) [欧莉, 苗彦霞, 高峰等(2019). 二色补血草总黄酮治疗功能性子宫出血的止血作用及机制研究. *吉林中医药*, 39 (5): 638–641]
- Rjeibi I, Saad AB, Sdayria, J, et al (2019). HPLC–DAD identification of polyphenols from ethyl acetate extract of *Amaranthus spinosus* leaves and determination of their antioxidant and antinociceptive effects. *Inflammopharmacology*, 27 (5): 975–984
- Ren W, Bao XW, Zhang ZF, et al (2019). Study on free radical scavenging and anti-lipid peroxidation of seabuckthorn polysaccharide. *Sci Technol Food Ind*, 40 (8): 272–277 (in Chinese with English abstract) [任薇, 包晓玮, 张志芳等(2019). 沙棘多糖清除自由基及抗脂质过氧化作用研究. *食品工业科技*, 40 (8): 272–277]
- Shen H, Tao NP, Zhao LM, et al (2016). Extraction technology of polyphenol from *Moringa oleifera* leaves. *Sci Technol Food Ind*, 37 (18): 287–291, 296 (in Chinese with English abstract) [沈慧, 陶宁萍, 赵林敏等(2016). 辣木叶中多酚提取的工艺研究. *食品工业科技*, 37 (18): 287–291, 296]
- Wang RB, Zhang LN, Liu XJ, et al (2017). Research progress of *Limonium bicolor* (Bunge) O.Ktunze in China. *Mod Agr Sci Technol*, 13 (12): 76–77, 81 (in Chinese with English abstract) [王瑞兵, 张丽娜, 刘晓婕等(2017). 国内对二色补血草的研究进展. *现代农业科技*, 13 (12): 76–77, 81]
- Wang ZH, Li H, Song ZH, et al (2018). Antioxidant function of plant extracts. *Hunan J Anim Sci Vet Med*, 40 (2): 54–55 (in Chinese) [王中杭, 李浩, 宋泽和等(2018). 植物提取物的抗氧化功能. *湖南畜牧兽医*, 40 (2): 54–55]
- Wang ZY (2018). The extraction and determination of polyphenol in Chinese *Dioscorea opposita* Thunb. *Anhui Agri Sci Bull*, 24 (14): 13–15, 36 (in Chinese with English abstract) [王泽永(2018). 祁山药多酚类化合物的提取工艺研究. *安徽农学通报*, 24 (14): 13–15, 36]
- Wu YL, Wang XY, Pan ZB, et al (2019). Extraction optimization of polyphenols from red giant amaranth by response surface methodology and its antioxidant activity. *Cereal Feed Ind*, 42 (7): 40–46 (in Chinese with English abstract) [吴雅露, 王心怡, 泮张彬等(2019). 响应面法优化红巨苋多酚的提取工艺及抗氧化性. *粮食与饲料工业*, 42 (7): 40–46]
- Xing YY, Shi BL, Jin X, et al (2018). *Artemisia ordosica* affects immune and antioxidative function of animals and its mechanism. *Chin J Anim Nutr*, 30 (10): 3805–3809 (in Chinese with English abstract) [邢媛媛, 史彬林, 金晓等(2018). 黑沙蒿对动物免疫和抗氧化功能的影响及其机制. *动物营养学报*, 30 (10): 3805–3809]
- Xu YY, Yuan F (2019). Research progress of chemical composition and pharmacological action on *Limonium bicolor*. *J Univ Jinan Sci Tech*, 33 (6): 572–577 (in Chinese with English abstract) [徐燕玉, 袁芳(2019). 二色补血草化学成分与药理作用研究进展. *济南大学学报(自然科学版)*, 33 (6): 572–577]
- Yang SM, Wang ZJ, Fan SG, et al (2016). Optimization for extraction process of *Daucus carota* Linn total flavonoids and determination of antioxidant activity based on orthogonal test. *North Hort*, 10 (23): 134–138 (in Chinese with English abstract) [杨申明, 王振吉, 范树国等(2016). 正交实验法优化野胡萝卜总黄酮提取工艺及其抗氧化活性. *北方园艺*, 10 (23): 134–138]
- Zhao Q, Wang M, Jia ZH, et al (2014). Determination of the content of mental elements in the root of *Limonium Bicolor*. *Sci Technol Food Ind*, 35 (10): 83–85 (in Chinese with English abstract) [赵芊, 王蒙, 贾振华等(2014). 二色补血草根中几种金属元素含量分析. *食品工业科技*, 35 (10): 83–85]
- Zhao YH, Zhai YN, Wang ZY (2013). Extraction of polyphenols from *Pinus Sylvestris* L. and comparison of extraction method. *Sci Technol Food Ind*, 34 (4): 304–309 (in Chinese with English abstract) [赵玉红, 翟亚楠, 王振宇等(2013). 樟子松树皮中松多酚的提取工艺研究及提取方法比较. *食品工业科技*, 34 (4): 304–309]
- Zuo LL, Zhao L, Lei LL, et al (2016). Study on optimum route of extracting total flavone from broccoli by orthogonal experiment. *J Jilin Med Univ*, 37 (4): 245–248 (in Chinese with English abstract) [左丽丽, 赵路, 雷丽丽等(2016). 正交实验法优化西兰花总黄酮提取工艺研究. *吉林医药学院学报*, 37 (4): 245–248]

Study on extraction of bioactive components and antioxidant function of *Limonium bicolor*

WANG Jun*, CHEN Xin, ZHANG Zhao-Ying, ZHENG Xiang-Ze

College of Life Science, Cangzhou Normal University, Cangzhou, Hebei 061001

Abstract: Taking *Limonium bicolor* as experimental material, single factor and orthogonal experiments were carried out to optimize the parameters of extraction process for total flavonoids, polysaccharides and polyphenols. Through determining the clearance rate of hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) and superoxide anion (O_2^-), antioxidant function was determined for the *Limonium bicolor* medium flavonoids and other biological active components. The results show that the best extraction conditions of flavonoids was extraction duration of 150 min with 60% ethanol concentration, extraction temperature 60°C and material/water ratio 1:30 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The extraction ratio of flavonoids under the optimized conditions was 31.08%. The optimum technological condition for polysaccharide: ethanol concentration was 80%, water/material ratio was 1:30 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), extracting time was 4 h and extracting temperature was 70°C. Under this condition the extraction ratio of polysaccharide is 8.01%. The extracting ratio of phenol was 10.03% under the optimized conditions was 70%, 1:20 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 55°C and 150 min for ethanol concentration, water/material ratio, extraction temperature and time, respectively. Flavonoids, polysaccharides and polyphenols in *Limonium bicolor* had significant scavenging capacity of hydroxyl radicals and superoxide anion. It can be used as a natural antioxidant for comprehensive development and utilization.

Key words: *Limonium bicolor*; biologically active components; antioxidant activity

Received 2019-09-22 Accepted 2019-11-12

This work was supported by the Cangzhou Science and Technology Research and Development Project (172204003).

*Corresponding author (771478519@qq.com).